Kombinierte Rasterkraft-, Zugkraft- und Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mechanotransduktion in Knochenzellen

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Physik
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Erk Mennenga-Klopp

aus
Bremen

Marburg/Lahn, 2005

Vom Fachbereich Physik der Philipps-Universität als Dissertation angenommen am 01/12/2005

Erstgutachter: Prof. Dr. Martin Hofmann
Zweitgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Rühle

Tag der mündlichen Prüfung: 22/12/2005

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **1**

2 Knochen, Zellen und Mechanotransduktion **4**
2.1 Der Knochen 4
2.1.1 Aufbau und Struktur des Knochens 4
2.1.2 Umbauprozesse im Knochen 5
2.2 Die Knochenzellen 8
2.2.1 Der generelle Aufbau einer Zelle 8
2.2.2 Die Knochenzellen 11
2.3 Die Mechanotransduktion 12
2.3.1 Intrazelluläre Signaltransduktion 12
2.3.2 Die Mechanotransduktion 13
2.3.3 Die Relevanz der Mechanotransduktion 13
2.3.4 Die Physik der Mechanotransduktion in Zellen 14
2.3.5 Modellierung der Zellmechanik 15
2.3.6 Die Mechanismen der Mechanorezeption 17
2.3.7 Physiologische Reize auf Knochenzellen 21
2.3.8 Molekulare Prozesse der Mechanotransduktion und Calcium 22
2.4 Motivation dieser Arbeit 25

3 Fluoreszenzmikroskopie und Zellbiologie **28**
3.1 Einleitung 28
3.2 Zellkultur 28
3.2.1 Zellpräparation 28
3.2.2 Kryokonservierung 28
3.2.3 Phänotypisierung 29
3.2.4 Aussaat und Färbung der Zellen 30
3.3 Fluoreszenzfarbstoffe 30
3.3.1 Die Eigenschaften des Farbstoffs Fura-2 30
3.3.2 Die Kalibrierung von Fura-2 31
3.4 GFP-Transfektionen 32
3.4.1 Das *„Green-Fluorescent-Protein“* 33
3.4.2 Transiente Transfektion mit dem GFP-Vinculin-Vektor 33
3.5 Fluoreszenzmikroskopie 33
3.5.1 Die Detektionseinheit 34
3.5.2 Die Lichtquelle 36
3.6 Entwicklung einer Lichtquelle 36
3.6.1 Wahl einer geeigneten Lichtquelle 36
3.6.2 Dynamischer Wechsel des Spektralbereichs 37
3.6.3 Aufbau der Lichtquelle zur Quotientenmessung 37
3.7 Die ACLAR-Dehnungsapparatur 39
3.8 Die parallele Scherflusskammer 40
3.8.1 Laminare Strömungen in abgegrenzten Volumina 40
3.8.2 Design der Scherflusskammer 41
3.9 Molekular- und Zellbiologische Methoden 42

3.9.1 Thapsigargin . . . 43
3.9.2 Parathormon (PTH) . . . 43
3.9.3 Manganionen . . . 43
3.9.4 Cadmium und Lanthan . . . 44
3.9.5 EGTA . . . 44
3.9.6 ML-7 . . . 44
3.10 Zellmedien . . . 45

4 Das Kraftmikroskop 46
4.1 Einleitung . . . 46
4.2 Das eindimensionale Kraftmikroskop . . . 47
4.2.1 Die Detektionseinheit . . . 47
4.2.2 Positionierung des Detektors . . . 49
4.2.3 Ansteuerung des Kraftmikroskops . . . 50
4.2.4 Der Cantilever . . . 50
4.3 Das dreidimensionale Kraftmikroskop . . . 51
4.3.1 Prinzip der Detektionseinheit . . . 52
4.3.2 Positionierung des Detektors . . . 53
4.3.3 Ansteuerung des Kraftmikroskops . . . 53
4.4 Kalibrierung und Federkonstante . . . 54
4.4.1 Kraft-Abstands-Kurven und Kalibrierung . . . 54
4.4.2 Die Bestimmung vertikaler Federkonstanten . . . 56
4.4.3 Die Bestimmung lateraler Federkonstanten . . . 59
4.5 Externe Frequenzgenerierung . . . 60

5 Zugkraft-Mikroskopie 63
5.1 Einleitung . . . 63
5.1.1 Silikon-Substrate . . . 63
5.1.2 Mikrofabrizierte Cantilever . . . 64
5.1.3 Polyacrylamid-Substrate . . . 64
5.2 Die Traction-Force-Methode . . . 64
5.2.1 Herstellung von Polyacrylamid-Gelen . . . 65
5.2.2 Bestimmung der physikalischen Eigenschaften . . . 65
5.2.3 Analyse der zellulären Zugkräfte . . . 66
5.3 Traction-Force-Messungen . . . 69
5.3.1 Die Dehnungsmaschine . . . 69
5.3.2 Das Kraftmikroskop und die Scherflusskammer . . . 71
5.3.3 Zugkraftmessungen mit externen Kräften . . . 71
5.3.4 Quantenpunkte . . . 72

6 Experimente und Ergebnisse 73
6.1 Einleitung . . . 73
6.2 Vertikale Stimulation und Calcium . . . 73
6.2.1 Kraftschwelle und Dynamik der Calciumantwort . . . 73
6.2.2 Die interzelluläre Signalweiterleitung . . . 75
6.2.3 Die intrazelluläre Signalweiterleitung . . . 76
6.2.4 Mikroporation der Zellen . . . 81

6.2.5 Der Einfluss physiologischer Parameter auf die scheinbare Calciumkonzentration . . . 84
6.2.6 Die Osteosarkom-Stammzelllinie MG63 . . . 88
6.2.7 Zusammenfassung . . . 88
6.3 Laterale Stimulation und Calcium . . . 90
6.3.1 Einfluss der Stimulationsrichtung auf die Mechanotransduktion . . . 90
6.3.2 Experimente mit Calcium . . . 90
6.3.3 Vertikale und laterale Stimulationen lösen keine Mechanotransduktion unter der Beteiligung von Calcium aus . . . 91
6.4 Dehnungsmessungen mit dem Kraftmikroskop . . . 93
6.4.1 Applikation lokaler Dehnungsreize mit dem Kraftmikroskop . . . 94
6.4.2 Lokale Dehnungsreize lösen verzögerte Calciumantworten aus . . . 95
6.5 Mechanische Stimulation und Zugkraftmessungen . . . 96
6.5.1 Dehnungsmaschine und Zugkraftmessungen . . . 97
6.5.2 Kraftmikroskop und Zugkraftmessungen . . . 98
6.6 Krafttransmission bei vertikaler Stimulation . . . 106
6.6.1 Experimenteller Aufbau . . . 106
6.6.2 Krafttransmission durch externe Kräfte . . . 107
6.6.3 Interpretation der Ergebnisse . . . 112
6.7 Krafttransmission bei Scherflüssen . . . 115
6.7.1 Applikation von Scherkräften . . . 115
6.7.2 Die Krafttransmission zeigt keine Vorzugsrichtung . . . 117
6.8 Vertikale Stimulation und Vinculin-Konzentration . . . 118
6.8.1 Aktivität der fokalen Adhäsionen unter mechanischer Belastung . . . 118
6.8.2 Die Dynamik der fokalen Adhäsionen steigt nach mechanischer Belastung . . . 120

7 Diskussion **122**
7.1 Die Notwendigkeit der Modellierung der Zellmechanik . . . 122
7.2 Modelle der Zellmechanik . . . 122
7.2.1 Das Tensegrity-Modell . . . 122
7.2.2 Das Percolation-Modell . . . 123
7.2.3 Kortikale Membranmodelle / Kontinuumsansätze . . . 124
7.3 Die Ergebnisse im Rahmen der Zellmodelle . . . 124
7.3.1 Lokale Stimulation und Calciumantworten . . . 124
7.3.2 Kraft-Weiterleitung . . . 126
7.3.3 Aktive Zellantworten unter mechanischer Stimulation . . . 127
7.4 Vorschlag eines Mischmodells . . . 129
7.4.1 Kein Modell beschreibt das zellmechanische Verhalten vollständig . . . 129
7.4.2 Das Mischmodell . . . 129

8 Zusammenfassung und Ausblick **131**

Literatur **133**
A.2 Publikationsliste . . . 142

1 Einleitung

Das Skelett von Säugetieren übernimmt zahlreiche biologische, biomechanische sowie biochemische Aufgaben. Neben seiner Funktion als wichtigster Mineralienspeicher dient es der Fortbewegung und als Halteapparat. Dabei unterscheiden sich die einzelnen Knochen des Skeletts in Form und Größe, so dass eine differenzierte Funktionsausprägung einzelner Skelettteile möglich ist. Die spezifische Struktur und Größe eines Knochens ist zwar genetisch festgelegt, die Steifigkeit wird jedoch durch einen stetigen Umbauprozess, vermittelt über Hormone und physikalische Reize, reguliert. Schon vor über einhundert Jahren postulierte Julius Wolff, dass der Knochen in der Lage ist, seine Struktur den äußeren mechanischen Umgebungsbedingungen anzupassen. So kann beispielsweise nach einer hohen mechanischen Belastung die Zunahme der Steifigkeit, welche auf einen strukturellen Umbau zurückgeht, beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu führt lange Bettlägerigkeit zur Schwächung des Knochens durch den Abbau von Knochenmaterial.

Ist der physiologische Umbauprozess gestört, so kann ein übermäßiger Knochenabbau (Knochenschwund) auftreten, der zur so genannten Osteoporose führt. Osteoporose kann, da die Bruchfestigkeit des Knochens verringert ist, für den Menschen zu einer lebensgefährlichen Erkrankung werden. Dass allein in den USA schätzungsweise zehn Millionen Menschen an Osteoporose leiden, zeigt die klinische Relevanz der Erkrankung. Dieser pathologische Knochenabbau macht deutlich, wie wichtig das Verständnis der Physik des mechanisch induzierten Knochenumbaus für die Medizin ist. Hier stellt sich vor allem die Frage, wie die einzelnen Knochen in der Lage sind, die mechanischen Reize aufzunehmen und so zu verarbeiten, dass eine veränderte Knochensynthese resultiert.

Der Auf- und Abbau des Knochens wird im Prinzip durch Knochenzellen reguliert. Diese sind in der Lage, die auf den Knochen wirkenden mechanischen Belastungen in ein biologisches Signal umzusetzen. Dieser Prozess wird Mechanotransduktion genannt. Trotz zahlreicher Untersuchungen konnte der mikroskopisch-physikalische Ablauf der Mechanotransduktion bislang nicht geklärt werden. Man geht davon aus, dass eine bestimmte Zellstruktur - der Mechanosensor - den mechanischen Reiz wahrnimmt und in eine zellinterne Signalkaskade umsetzt. Hierbei spielt die intrazelluläre Calciumkonzentration eine wichtige Rolle. Über den Mechanosensor und dessen Aktivierung ist jedoch nur wenig bekannt. Aber gerade die physikalische Funktionsweise dieser die Mechanotransduktion einleitenden Struktur könnte helfen, das Wissen über die Reizaufnahme und -vermittlung, auch im Hinblick auf den ganzheitlichen Knochen, wesentlich zu vertiefen. Dabei stellt sich vor allem die Frage nach der Lokalisierung des Mechanosensors innerhalb der Zelle sowie nach dessen Molekülstruktur und mechanischen Eigenschaften; das heißt welche mechanischen Reize von Knochenzellen wahrgenommen und in ein biologisches Signal umgesetzt werden. Hierbei sind die mechanischen Eigenschaften der Zelle, die bislang nicht eindeutig beschrieben werden konnten, von großer Bedeutung.

Um physikalische und molekulare Prozesse, wie sie oben beschrieben sind, untersuchen zu können, sind die bekannten biologischen Methoden nur bedingt geeignet. Deshalb kamen in den letzten zehn Jahren mehr und mehr physikalische Prinzipien zur Anwendung. Gerade zur Analyse des zellbiologischen Kontextes hat sich die Rasterkraftmikroskopie als ein nützliches Werkzeug herausgestellt. Sie ermöglicht neben der Manipulation einzelner Strukturen auf molekularer Ebene die Bestimmung von physikalischen Bindungskräften,

die zwischen einzelnen Molekülen vorliegen. Auch zur Untersuchung der mechanischen Eigenschaften biologischer Gewebe wird die Rasterkraftmikroskopie verwendet. Hierbei ist vor allem von entscheidender Bedeutung, dass sie die Möglichkeit bietet, sehr kleine Kräfte bis in den Piko-Newton-Bereich hinein zu bestimmen.

Im Laufe dieser interdisziplinären Arbeit wird die Entwicklung und Weiterentwicklung eines Kraftmikroskops, das nach den Prinzipien der Rasterkraftmikroskopie funktioniert und für biologische Anwendungen adaptiert wurde, dargestellt. Das Kraftmikroskop diente der Untersuchung physikalischer Aspekte der Mechanotransduktion von Osteoblasten. Dabei handelt es sich um spezielle Knochenzellen, die für den Knochenaufbau verantwortlich sind. Im Gegensatz zu der im Allgemeinen üblichen mechanischen Stimulation von Zellen durch Scherflüsse und Dehnungsreize ermöglicht dieses Kraftmikroskop nicht nur die Quantifizierung der applizierten Kraft und die Bestimmung der verursachten Deformation, sondern auch die freie Wahl der Stimulationsparameter wie der Frequenz, der Amplitude und der Zyklenzahl innerhalb einer großen Bandbreite. Damit können die Mechanik des Mechanosensors und Analogien zwischen den makroskopischen Vorgängen im ganzheitlichen Knochen und mikroskopischen Abläufen auf zellulärer Ebene untersucht werden. Durch die Kombination mit einem Echtzeit-Fluoreszenzmikroskopie-System war es erstmals möglich, die Zelle mechanisch definiert zu stimulieren und gleichzeitig die auftretenden intrazellulären Vorgänge zu beobachten. Neben der Kraftmikroskopie kommen auch physikalisch-mathematische Techniken wie die Zugkraftmessung (*engl. „Traction Force Microscopy“ - TFM)* zum Einsatz. Diese Methode erlaubt die Beobachtung der zellulären Anhaftkräfte, die auf das Substrat, an der die Zellen anhaften, wirken. Man vermutet, dass die Adhäsionskräfte durch die Aktivierung des Mechanosensors variieren und in der Folge die mechanischen Eigenschaften der Zelle verändern können. Damit würden sie eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion spielen. Mit der oben beschriebenen Messtechnik können des Weiteren die mechanisch-physikalischen Eigenschaften der Zellen durch die Messung der intrazellulären Kraftweiterleitung nach Applikation äußerer Kräfte untersucht werden. Um eine Einführung in das Thema der Mechanotransduktion zu geben, bietet Kapitel 2.3 zunächst einen Überblick über den aktuellen Stand der Forschung bezüglich der physikalischen und biologischen Aspekte der Mechanotransduktion. Dieser Überblick wird die Notwendigkeit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente und Ergebnisse vermitteln. Er soll außerdem aufzeigen, dass viele Aspekte der Mechanotransduktion nur mit Hilfe physikalischer Methoden, die im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kommen, gezielt untersucht werden können. Der letzte Abschnitt des Kapitels legt die Motivation dieser Arbeit mit dem bis dorthin beschriebenen zellbiologischen Kontext dar.

Das sich an die Mechanotransduktion anschließende Kapitel 3 beschäftigt sich vor allem mit den in dieser Arbeit verwendeten biologischen Methoden und der Fluoreszenzmikroskopie. Die Entwicklung eines neuen Beleuchtungssystems für Verhältnismessungen wird ebenfalls beschrieben. Des Weiteren werden die Funktionsweise und die Weiterentwicklung der Dehnungsapparatur und der Scherflusskammer besprochen, die die Applikation äußerer mechanischer Reize auf Zellen ermöglichen. In Kapitel 4 wird die Entwicklung und die Weiterentwicklung des Kraftmikroskops beschrieben. Neben der Funktionsweise wird auch die Kalibrierung dieser Apparatur sowie die Analyse der erhobenen Messdaten dargelegt.

Die Technik, mittels derer die Messung zellulärer Zugkräfte erfolgte und deren Adap-

tion auf die für die Arbeit erforderlichen experimentellen Parameter, werden in Kapitel 5 erklärt. Das sich anschließende Kapitel 6 enthält die Beschreibung aller in dieser Arbeit durchgeführten Experimente und die Darstellung der erhaltenen Ergebnisse. Da die Experimente in starker Abhängigkeit zueinander stehen, werden direkt nach der Präsentation der Einzelergebnisse diese diskutiert und eine Interpretation im Hinblick auf die Mechanotransduktion gegeben.

Die bereits in Kapitel 6 dargestellten Interpretationen und Diskussionen werden in Kapitel 7 bezüglich verschiedener Zellmodelle diskutiert. Dazu wird am Anfang des Kapitels zunächst ein Überblick über die derzeit gängigen Modelle gegeben und am Ende ein eigenes Zellmodell vorgeschlagen.

Schließlich wird die vorliegende Arbeit mit einer Zusammenfassung in Kapitel 8 enden. Diese zeigt kurz die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit auf.

2 Knochen, Zellen und Mechanotransduktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit physikalischen Techniken die biologische Fragestellung untersucht, wie Knochenzellen mechanische Reize wahrnehmen können. Kernstück stellt das in Kapitel 4 beschriebene Kraftmikroskop dar, mit dem einzelne Zellen mechanisch stimuliert werden können und gleichzeitig die Reaktion der Zellen auf den Reiz beobachtet werden kann. Damit die Ergebnisse in einem vernünftigen Kontext diskutierbar sind, wird zunächst ein Einblick in den biologischen Hintergrund und die Relevanz der durchgeführten Messungen gegeben. Dabei werden als erstes der Knochenaufbau und dessen Funktionsweise sowie die Eigenschaften der Knochenzellen beschrieben. In der anschließenden Betrachtung steht die Aufnahme mechanischer Reize und deren Umwandlung in biologische Signale im Vordergrund. Wie sich im Laufe dieser Arbeit zeigen wird, spielen die mechanischen Eigenschaften der Zellen hierbei eine wichtige Rolle. Deshalb besteht die Notwendigkeit, physikalische Methoden für die Biologie zu adaptieren und zu nutzen, da die aufgeworfenen Fragestellungen nicht mit den Methoden der Biologie allein beantwortet werden können. Am Ende des Kapitels wird in Bezug auf den biologischen Kontext die Motivation dieser physikalischen Arbeit aufgezeigt.

2.1 Der Knochen

Ziel dieser Arbeit ist, ein tieferes Verständnis davon zu erlangen, wie der Knochen in der Lage ist, sich äußeren mechanischen Bedingungen anzupassen. Hierfür wird zunächst ein Überblick über die Bauweise und die Funktionen beziehungsweise Fehlfunktionen des Knochens gegeben.

2.1.1 Aufbau und Struktur des Knochens

Das Skelett ermöglicht durch seine Eigenschaften vielfältige Funktionen: es bildet zusammen mit der Muskulatur den Stütz- und Halteapparat und dient, neben dem Schutz der inneren Organe, der Speicherung von Mineralsalzen. Dabei gehört der Knochen trotz seiner geringen Dichte zu den stabilsten Geweben des Körpers. Gegenüber äußeren Kräften wie Dehnung, Druck oder Biegung weist er eine relativ hohe Festigkeit auf. Diese Stabilität beruht im Wesentlichen auf seiner biochemischen Zusammensetzung sowie der besonderen Architektur. Der Knochen besteht in erster Linie aus Knochenhartsubstanz (Interzellularsubstanz) und Knochenzellen und speichert große Mengen an Calciumverbindungen. Er erfüllt somit eine metabolische Funktion, indem er hilft, die Calcium-Homöostase im Blut konstant zu halten.

Knochen lassen sich anhand ihrer Struktur in Geflecht- und Lamellenknochen unterteilen. Beide haben einen ähnlichen Aufbau, bestehend aus einer kompakten Substanz (Substantia Compacta (Kortikalis)), die den Knochen umgibt und einer schwammartigen Struktur (Substantia Spongiosa) im Innern des Knochens. Der Geflechtknochen zeigt jedoch im Gegensatz zum Lamellenknochen eine unregelmäßige Anordnung der Strukturen (Kollagenfasern). Die typische Struktur eines Lamellenknochens ist in Abbildung 1 dargestellt. Die regelmäßige, zirkuläre Anordnung seiner Lamellen ist für diesen Knochen

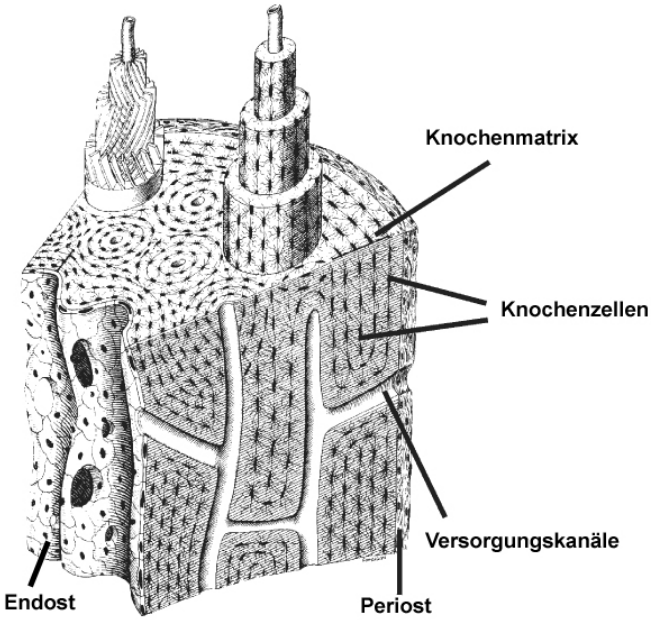

Abbildung 1: *Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau eines Lamellenknochens [Junqueira 1996].*

charakteristisch. Die Lamellen bestehen aus Kollagenfasern und Knochenzellen, den so genannten Osteozyten. Große Knochenkanäle dienen der Versorgung der in die Knochenmatrix eingelagerten Knochenzellen (in Abbildung 1 dunkel dargestellt). Des Weiteren steht ein Netz aus weit verzweigten kleinen Knochenkanälchen (Canaliculi) den Zellen zur gemeinsamen Kommunikation zur Verfügung.

Die hohe Stabilität des Knochens gegenüber äußeren Kräften wird durch die Ausbildung einer schwammartigen Struktur, den Spongiosabälkchen, entlang der Hauptspannungslinien des Knochens (Trajektorienbauweise) erreicht (siehe Abbildung 2). Dabei ist die Dichte der Spongiosabälkchen am Ort der größten mechanischen Belastung am höchsten. Im Mikroskop betrachtet weist der Knochen aber auch eine große Anzahl an Hohlräumen auf, die seine Leichtbauweise bedingen. Dass trotzdem - auf Grund der trajektoriellen Bauweise - eine hohe Stabilität des Knochens gewährleistet ist, kann mit dem strukturellen Aufbau eines Krans erklärt werden [126]. Auch dieser besteht - wie der Knochen - aus Bereichen, in denen wenig Material verbaut worden ist und große „Hohlräume“ zu finden sind. Jedoch sorgt die strukturelle Anordnung der vielen kleinen Verstrebungen dafür, dass die Kräne trotz der geringen Materialdichte stabil gegenüber äußeren Kräften sind und damit hohe Lasten tragen können.

2.1.2 Umbauprozesse im Knochen

Die trajektoriellen Eigenschaften des Skeletts haben sich über die Jahrtausende entwickelt (siehe Abbildung 2). Die Adaption des Knochens an seine Umwelt ist dabei von essentieller Bedeutung. Wäre die Erzeugung von Knochen kein dynamischer Prozess, so wäre es physikalisch nicht möglich, eine strukturelle Integrität unter allen physiologischen Bedingungen zu bewahren und dabei eine möglichst leichte Bauweise zu verfolgen. Erst die Fähigkeit

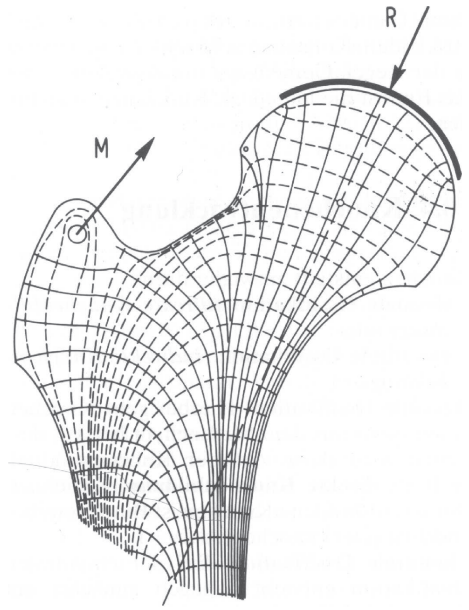

Abbildung 2: *Die Abbildung zeigt schematisch die Hauptspannungslinien (Trajektorien), an denen sich die Anordnung der Spongiosabälkchen orientiert. R stellt die resultierende Druckkraft, M die Zugrichtung durch die Muskeln dar (aus [172]).*

des Knochens, sich den mechanischen Gegebenheiten der Umgebung anzupassen, befähigt ihn zur Ausbildung einer Architektur, die auf eine möglichst geringe Dichte ausgelegt ist. Wäre dies nicht der Fall, müsste das Skelett und die Muskelmasse des Menschen auf dessen maximale Belastungskapazität angepasst sein. Konkret hieße das, dass Menschen mit wenig Muskelmasse nur geringe Kräfte generieren könnten und trotzdem ein Skelett wie ein Bodybuilder hätten. Damit läge ein ineffizientes System vor, da die Natur bei der genetischen Vorgabe des Skeletts von der maximal möglichen Erzeugung von Muskelmasse ausgehen müsste.

Um diesem Problem zu begegnen, hat sich evolutionär ein Knochen entwickelt, der in der Lage ist, sich den äußeren mechanischen Umgebungsbedingungen anzupassen. Die resultierende Knochenstärke wird der physiologischen Krafteinwirkung gerecht. Dieses Prinzip wurde schon vor mehr als einhundert Jahren von Julius Wolff erkannt. Er beschrieb in seinem Buch „Das Gesetz der Transformation der Knochen“ die Anpassungsfähigkeit des Knochens in Folge von äußeren mechanischen Belastungen [247]. In der von ihm aufgestellten Hypothese beschreibt Wolff den mathematischen Zusammenhang zwischen der Form eines Knochens und der mechanischen Krafteinwirkung und damit seiner Deformation. Zwar sind viele Folgerungen inzwischen als falsch anerkannt [99], jedoch die Hypothese, dass der Knochen seine Architektur den äußeren mechanischen Bedingungen anpasst, ist allgemein bestätigt.

Eine Deformation des Knochens wird zum einen durch eine direkte Krafteinwirkung auf das Skelett, zum Anderen durch eine muskuläre Kraftübertragung generiert, da die Knochen den Ansatzpunkt und den Ursprung für die Muskulatur bilden. Nach dem Abschluss der Wachstumsphase befindet sich der Knochen fortwährend in einem Umbauprozess. Dieser ständige Auf- und Abbau wird als *„Bone-remodelling“* bezeichnet. Während eine hohe physikalische Aktivität eine starke Belastung des Knochens hervorruft und die Bildung

von Knochenmasse induziert [135, 182], löst der Aufenthalt in Schwerelosigkeit Knochenschwund aus [159], der die Abnahme der mechanischen Stabilität verursacht [232]. Wird ein bestimmtes Maß an Knochenschwund überschritten, spricht man von Osteoporose. Dieser krankhafte Prozess tritt vor allem bei Frauen mit zunehmendem Lebensalter auf. Der Verlauf der Osteoporose kann bis heute kaum durch äußere Maßnahmen beeinflusst werden. Eine mechanische Belastung der Knochen osteoporotischer Patienten führt zwar zu einer Verlangsamung der Krankheit, eine Heilung ist aber nicht möglich [136, 209].

Eine zentrale Frage hierbei ist die nach dem mechanischen Reiz, der das *„Bone-remodelling“* induziert. Durch eine äußere Krafteinwirkung auf das Skelett wird an jedem Knochen eine physikalische Größe messbar: die durch die Belastung induzierte relative Längenänderung des Knochens. Frost zog diese Größe heran und erweiterte damit das Wolff´sche Gesetz [66]. Die von ihn umschriebene „Mechanostat-Hypothese“ gibt an, ab welcher Längenänderung eine signifikant veränderte Knochensynthese initiiert wird [67]. Hierfür unterteilte er die relative Längenänderung (engl. *„strain“*) des Knochens und dessen physiologische Antworten auf einen entsprechenden mechanischen Reiz in vier Kategorien (siehe Abbildung 3). Die relative Längenänderung des Knochens wird dabei in

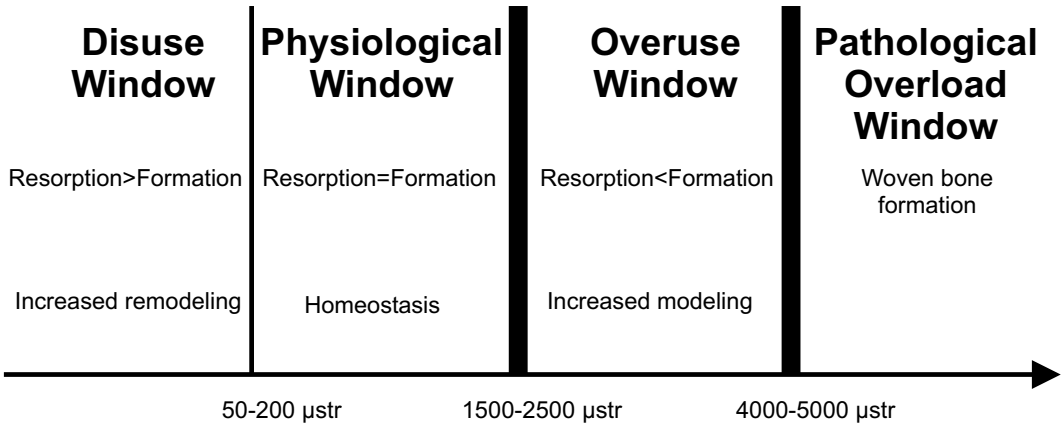

Abbildung 3: *Die Abbildung zeigt die Differenzierung der physiologischen Antworten auf unterschiedliche mechanische Reize. Diese erfolgt nach der Mechanostat-Theorie in vier Belastungsbereiche. Die relative Längenänderung wird in μ-strain (μstr) angegeben (1.000μstr entsprechen einer relativen Längenänderung von 0,1%). Die Schwelle zum jeweils nächsten Fenster wird als minimale effektive Belastung (MES: minimal effective strain) bezeichnet.*

„Microstrain“ (μstr oder $\mu\epsilon$) angegeben. Dabei bedeuten 1.000$\mu\epsilon$ eine relative Längenänderung des Knochens von 0,1%. Die Schwellen zu dem jeweils nächsten Fenster werden durch die Änderung des physiologischen Verhaltens des Knochens auf den mechanischen Reiz charakterisiert.

Die Mechanostat-Theorie besagt, dass sich der Knochen durch eine Änderung seiner Architektur dem mechanischen Reiz derart anpasst, dass die innerhalb des Knochens entstehende lokale Belastung in einem physiologischen Bereich bleibt (*„Physiological Window“*). Überschreitet der Reiz eine bestimmte physiologische Schwelle (*„Minimum effective strain“ [MES]*), so dass relative Längenänderungen im Bereich des *„Overuse Windows“* auftreten, dann wird zur Erhöhung der Steifigkeit in verstärktem Maße Knochenhartsubstanz produziert. Diese erhöhte Syntheseleistung kann so lange beobachtet werden, bis die lokale Belastung in den physiologischen Bereich zurückkehrt. Liegen die Deformationen des Kno-

chens jedoch in einem pathologischen Fenster (*„Pathologic Overload Window“*), kann eine krankhafte Veränderung der Knochenstruktur resultieren (*„Woven Bone“*). Im Gegensatz hierzu führen geringe Deformationen im Bereich des *„Disuse Window“* zu einer erhöhten Resorption von Knochenmaterial und in der Folge zu einem Verlust an Knochendichte und Steifigkeit.

Bezüglich der Wahrnehmung mechanischer Reize postulierte Frost, dass der Knochen über einen Längensensor verfügt, der die in Abbildung 3 dargestellten Belastungsbereiche definiert. Unter dieser Annahme könnten Hormone die Grenzen des physiologischen Fensters verschieben, so dass beispielsweise die Osteoporose durch eine hormonell bedingte Fehlfunktion des Längensensor erklärt werden könnte. Dabei würden relative Längenänderungen, die eigentlich im physiologischen Fenster liegen, zu einem verstärkten Abbau von Knochenmaterial führen. Allerdings ist zu bedenken, dass die Mechanostat-Theorie im Hinblick auf einen Längensensor und dessen Auswirkung auf die Nettoknochenbilanz stark vereinfacht ist und damit den komplexen Abläufen des menschlichen Organismus nicht gerecht wird.

Tatsächlich wird das *„Bone-remodelling“* des Knochens generell durch die Knochenzellen geregelt (siehe Kapitel 2.2.2). Dieser induzierte Auf- beziehungsweise Abbau der Knochensubstanz muss durch eine äußere mechanische Aktivierung der Zellen erfolgen. Letztere findet in Folge einer Deformation des Knochens statt. Die von Frost postulierte Funktionsweise eines Längensensors müsste also in die Knochenzellen integriert sein.

Mittels der „Mechanostat-Hypothese“ können zwar die makroskopischen Prozesse im gesunden Knochen einigermaßen gezielt vorhergesagt werden, die mikroskopischen Vorgänge sind jedoch mit dieser Theorie nicht beschreibbar. Allerdings wird anhand der oben genannten Gründe deutlich, wie wichtig das Verständnis der Vorgänge innerhalb des Knochens und seines fortwährenden Umbauprozesses für die Medizin ist. Daher wurden die zellulären Prozesse zur Wahrnehmung mechanischer Reize im Rahmen dieser Arbeit mit physikalischen Methoden untersucht, um so beispielsweise Krankheiten wie Osteoporose verstehen zu können.

2.2 Die Knochenzellen

Für das Verständnis zellulärer Prozesse ist es wichtig, den generellen Aufbau und die Funktionsweise von Knochenzellen zu kennen. Diese besitzen, wie für Eukaryonten charakteristisch, einen Zellkern und ein so genanntes intrazelluläres Zytoskelett, in das die Strukturen der Zellen, die so genannten Organellen, eingebettet sind. Der generelle Aufbau einer Eukaryontenzelle wird im Folgenden beschrieben.

2.2.1 Der generelle Aufbau einer Zelle

Die Zellmembran und der Ionenaustausch Die Zellmembran ist als äußere, physikalische Abgrenzung der Zelle gegenüber ihrer Umgebung (Extrazellulärraum) definiert und besteht bei den Eukaryonten aus einer Lipiddoppelschicht. Auf Grund ihrer hydrophoben, nach außen gerichteten Grenzschicht ist sie für große und hydrophile Moleküle wie zum Beispiel Zucker nicht permeabel. Nur kleine, ungeladene Moleküle sind in der Lage,

die Zellmembran mittels Diffusion zu passieren. Um in Folge dieser Eigenschaften den Austausch geladener Ionen wie Calcium oder Kalium zu gewähren, ist die Zellmembran mit so genannten spezifischen und unspezifischen Ionenkanälen (Poren) versehen. Diese ändern auf Grund eines Stimulus ihre Konformation und ermöglichen so die Diffusion bestimmter Moleküle entlang eines Konzentrationsgradienten, der durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen im Intra- und Extrazellulärraum der Zelle existiert. Im Gegenzug können Ionen-Pumpen (Membrantransportproteine) unter dem Verbrauch von Energie, die in Form von Adenosin-Triphosphat (ATP) bereitgestellt wird, die Ionen gegen das Konzentrationsgefälle (Antiport), das heißt gegen die elektromotorische Kraft (EMK), aus der Zelle heraus befördern. Eines der wichtigsten Mineralien, das auf diese Art der Zelle zur Verfügung gestellt wird, ist Calcium. Die intrazelluläre Konzentration an Calciumionen beträgt circa 100nM (das entspricht einer Konzentration von $100*10^{-9}$ Mol pro Liter; 1 Mol entspricht $6{,}022*10^{23}$ Teilchen), die extrazelluläre liegt bei einem zehntausendfach höheren Wert. In der Folge kann Calcium durch geöffnete Calcium-spezifische Ionenkanäle in das eingeschlossene Volumen der Zelle, das Zytosol, einströmen und dort die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen (siehe Kapitel 2.3).

Die Ionenkanäle der Zellmembran könnten also eine wichtige Rolle in der Rezeption und Umwandlung mechanischer Reize spielen. Eine genauere Beschreibung ihrer Funktionsweise im Rahmen der Wahrnehmung mechanischer Reize erfolgt in einem späteren Abschnitt (siehe Kapitel 2.3.6).

Zellorganellen und Zytosol Die Zellmembran grenzt den Zellinnenraum (Intrazellularraum) ab. Dieser enthält neben dem Zellkern, der die genetische Information in Form der DNA trägt, die Zellorganellen. Hierzu zählen unter anderem die Mitochondrien und das Endoplasmatische Retikulum (ER). Beide übernehmen in der Zelle spezifische Funktionen. So dienen die Mitochondrien als Kraftwerk, indem sie Energie in Form von ATP (Adenosin-Triphosphat) bereitstellen. Das Endoplasmatische Retikulum seinerseits ist in der Nähe des Zellkerns lokalisiert und bildet den wichtigsten Calciumspeicher der Zelle. Alle drei, der Zellkern, die Mitochondrien und das ER, sind von einer eigenständigen Membran umgeben und liegen im Zytosol (Zellplasma). Das Zytosol weist einen fluiden Charakter auf. Es enthält eine Vielzahl verschiedener Mineralstoffe, Proteine und anderer Botenstoffe. Seine Zusammensetzung ändert sich auf Grund äußerer biologischer Signale ständig. Die Zelle ist also fortwährend aktiv und passt die Konzentration der Proteine und Ionen an den aktuellen Bedarf an.

Das Zytoskelett Das Zytoskelett ist - vergleichbar dem Skelett des Menschen - das tragende Gerüst der Zelle. Hierfür ist es im Wesentlichen aus den drei Strukturproteinen Aktin, Tubulin und Vimentin aufgebaut. Diese ordnen sich jeweils zu Filamenten (Mikrofilamenten) an und bilden in der Zelle ein Netzwerk aus. Da ihr Durchmesser und ihre physikalischen Eigenschaften variieren, kommen diesen Filamenten unterschiedliche Aufgaben zu.

Die Aktinfilamente durchspannen den gesamten Zellkörper und bilden direkt unter der Zellmembran ein mantelartiges, so genanntes „kortikales“ Netzwerk. Durch den An- oder Abbau einzelner Aktin-Bausteine (Monomere) ist eine Anpassung des Zytoskeletts an die

jeweiligen physiologischen Erfordernisse möglich. Aktinfilamente weisen einen Durchmesser von wenigen Nanometern auf und sind in der Lage, durch so genannte *„Crosslinker“* Querverbindungen zu etablieren. Das entstehende Netzwerk aus Aktinfasern gleicht in seinen physikalischen Eigenschaften einem Polymer. Daneben kann durch die Zusammenlagerung mehrerer parallel verlaufender Aktinfilamente die Bildung von Aktin-Bündeln beobachtet werden. Tritt Aktin in Verbindung mit dem Motorprotein Myosin auf, können unter dem Verbrauch von ATP Kräfte auf die Aktinfilamente übertragen werden. Diese Funktionsweise ist der Kontraktion von Muskelfasern ähnlich: das Myosin-Köpfchen lagert sich an das Aktinfilament an und vollzieht - mit konstanter Schrittweite - eine definierte Bewegung in eine bestimmte Richtung. So kann eine Zugkraft auf das Aktinfilament ausgeübt und dieses unter eine Zugspannung gesetzt werden.

Das Strukturprotein Tubulin lagert sich wie Aktin in langen Ketten zu Mikrotubuli an. Diese bilden ein komplexes, zelldurchspannendes Netzwerk aus und dienen in erster Linie dem intrazellulären Transport. Beispielsweise können über die Motorproteine verschiedene Moleküle entlang der Mikrotubulifasern transportiert werden. In ihrer Struktur gleichen letztere einer Röhre, die einen Durchmesser von circa 24nm aufweist. Dieser Bau verleiht ihnen im Vergleich zu Aktinfasern eine relative Stabilität gegenüber kompressiven Kräften. Es ist anzunehmen, dass es in der Zelle Proteine gibt, die eine Verbindung zwischen den Tubulinfasern und den Aktinfilamenten erlauben und damit die Ausbildung eines komplexen Netzwerkes verschiedener Filamente mit charakteristischen physikalischen Eigenschaften ermöglichen.

Die dritte Struktur stellen die so genannten Intermediärfilamente dar. Sie werden in den meisten Zellen aus Vimentin generiert, weisen einen sehr geringen Durchmesser auf und sind überwiegend in der Nähe des Zellkerns lokalisiert. Dort bilden sie ein engmaschiges Netz aus, das aus zahlreichen Querverbindungen besteht und hochelastische Eigenschaften hat. Dieses Netz dient der stabilen Einbettung des Zellkerns in die Zelle.

Die beschriebenen Filamente werden zusammengefasst als Zytoskelett bezeichnet, das für die Strukturerhaltung der Zelle, für die intrazelluläre Krafterzeugung sowie für intrazelluläre Transportvorgänge verantwortlich ist. Des Weiteren determiniert das Zytoskelett größtenteils die mechanischen Eigenschaften der Zelle (siehe Kapitel 2.3.5).

Physikalische Zellkontakte Zellen sind mittels membrandurchspannender Proteine in der Lage, eine Verbindung zu anderen Zellen oder einem Substrat einzugehen. Hierbei wird zwischen einer festen Zell-Zell-(interzellulären)-Verbindung (der so genannten Desmosome) und einer „molekularen“ Verbindung unterschieden. Letztere kann über so genannte *„gap-junctions“* realisiert werden. An diesen Stellen liegen die Membranen benachbarter Zellen nur circa 2nm auseinander und spezifische Membranproteine stellen kanalförmige Verbindungen (Konnexone) her. Diese verbinden die Zellen durch den Interzellularraum hindurch miteinander und dienen zur interzellulären Kommunikation, da kleine Moleküle die *„gap-junctions“* leicht passieren können.

Um im Verband wachsen zu können, müssen die Zellen eine Verbindung mit einem festen Untergrund (Substrat) eingehen. Dieser Kontakt wird wie oben erwähnt in der Regel über Proteine realisiert, die die Zellmembran durchspannen. Hierzu gehören die Integrine, die auf der Zellinnenseite über Adapterproteine mit dem Zytoskelett verbunden sind [252].

Ihre physikalische Bindung zur Außenseite (Extrazellularmatrix = ECM) erfolgt durch Proteindomänen (Bindungsstellen), die auf der Zelloberfläche im extrazellulären Raum vorliegen. Auch Knochenzellen können wie oben beschrieben über solche Anhaftpunkte (Adhäsionspunkte) eine feste Bindung mit der Knochensubstanz eingehen. Diese Verbindung ermöglicht, dass die durch eine mechanische Belastung hervorgerufene Deformation des Knochens direkt an die Zellen weitergegeben wird und diese damit beeinflusst werden können. Erst die Ausbildung solcher Adhäsionspunkte ermöglicht den Zellen das Anhaften auf einer Oberfläche (Adhäsion). Durch die hierbei entstehende physikalische Bindung können Kräfte, die innerhalb des Zytoskeletts erzeugt wurden, auf das Substrat übertragen werden. Diese Kraftübertragung ermöglicht es der Zelle, aus ihrer energetisch günstigen Kugelform in eine flache, adhärente Zelle überzugehen.

Sowohl das Zytoskelett als auch die Adhäsionspunkte scheinen an der Umwandlung mechanischer Reize beteiligt zu sein. Die Relevanz dieser Zellstrukturen für die Mechanotransduktion wurde im Rahmen dieser Arbeit mit physikalischen Methoden untersucht.

2.2.2 Die Knochenzellen

Bis heute sind vier verschiedene Arten von Knochenzellen bekannt: Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und Bone-Lining-Cells.

Die Osteoblasten Die Osteoblasten stellen die primären, undifferenzierten Zellen des Knochens dar. Sie sind für den Aufbau des Knochenmaterials, insbesondere für die Synthese von speziellen Knochenstrukturproteinen verantwortlich und stehen über *„gap-junctions“* untereinander in Kontakt [52]. Die Osteoblasten differenzieren sich im Laufe der Zeit zu den anderen Zellen des Knochens. Da sie für den Knochenaufbau verantwortlich sind und gerade bei Osteoporosepatienten der Knochenaubau gestört zu sein scheint, wurden in dieser Arbeit vor allem Osteoblasten verwendet.

Die Osteozyten Osteozyten sind ausgewachsene Osteoblasten, die keine Proteine und Knochenmatrix mehr synthetisieren. Sie bilden den größten Teil der Zellen des Knochens [171] und stehen wie die Osteoblasten über *„gap-junctions“* untereinander in Kontakt.

Die Bone-Lining-Cells Die Bone-Lining-Cells gehen ebenfalls aus den Osteoblasten hervor. Diese Differenzierung ist allerdings nicht von Dauer, und die Zellen können unter bestimmten Umständen wieder in Osteoblasten zurückgeführt werden [47]. Ihre Hauptfunktion stellt vermutlich die interzelluläre Signalübertragung im Knochen dar.

Die Osteoklasten Bei Osteoklasten handelt es sich um hochspezialisierte Riesen-Zellen, die für den Abbau des Knochens verantwortlich sind. Sie sind relativ groß und weisen zwischen 10 und 100 Zellkerne auf. Diese große Anzahl an Kernen lässt darauf schließen, dass die Osteoklasten eine hohe Stoffwechselaktivität besitzen, die zum Abbau von Knochenmaterial notwendig ist.

2.3 Die Mechanotransduktion

Die Regulation der Knochensynthese erfolgt, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, durch die Knochenzellen. Um diese Syntheseleistung erbringen zu können, müssen die Zellen in der Lage sein, mechanische Signale aufzunehmen und zu verarbeiten (*„Mechanotransduktion“*).

Dieses Kapitel dient dazu, die Sensitivität insbesondere der Knochenzellen gegenüber äußeren mechanischen Reizen darzustellen und die intrazellulären Signalwege zu erläutern. Damit wird der biologische Hintergrund dieser Arbeit auf zellulärer Ebene beschrieben und die Notwendigkeit der Entwicklung und Anwendung des Kraftmikroskops zur mechanischen Stimulation von Zellen aufgezeigt.

2.3.1 Intrazelluläre Signaltransduktion

Zur Aufrechterhaltung der normalen Körperfunktionen müssen von der Zelle fortwährend viele verschiedene Botenstoffe generiert werden. Zu diesen Botenstoffen gehören beispielsweise Hormone. Sie können an Zellen, die über den passenden Rezeptor (Bindemolekül) verfügen, binden. Diese Bindung entspricht einem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“: durch das Andocken an den transmembranen Rezeptor ändert dieser seine Konformation (Struktur), so dass in der Folge beispielsweise die intrazellulär lokalisierte Rezeptordomäne (Bindungsstelle) andere Botenstoffe beeinflussen kann. Es kommt zu einer intrazellulären Signalkaskade (Signaltransduktion), an deren Ende eine zelluläre Antwort steht (siehe Abbildung 4). Bei dieser Art der Signalweitergabe spielen zellinterne Stoffe und Strukturen eine wichtige Rolle und vor allem Calciumionen sind daran beteiligt (siehe Kapitel 2.3.8 und [14]). Calcium agiert hier als so genannter „second-messenger“, indem es die Antwort der Zelle auf den ankommenden Reiz beeinflusst. Über solche Signalkaskaden werden beispielsweise andere Hormone produziert, die ihrerseits in den Extrazellulärraum sezerniert (ausgeschüttet) werden und den Organismus beeinflussen können.

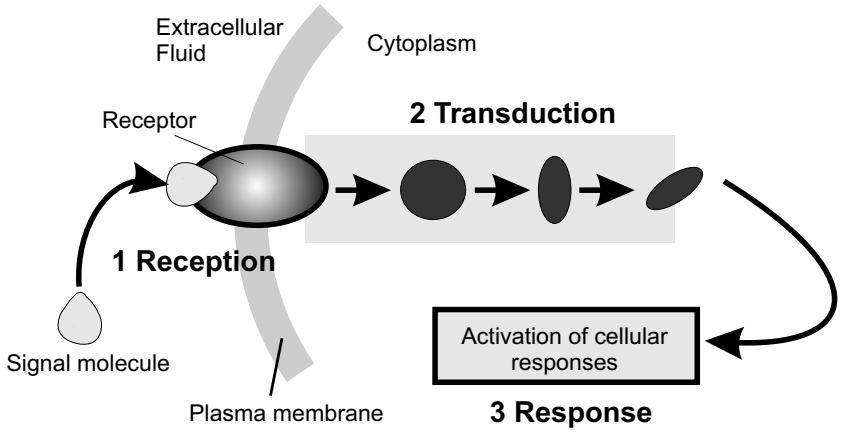

Abbildung 4: *Die Abbildung zeigt in schematisierter Weise eine mögliche intrazelluläre Signaltransduktion, die aus der Bindung eines Botenstoffes an seinen Rezeptor resultiert. Dargestellt ist der Ablauf einer zellulären Signaltransduktion. Sie setzt sich aus drei Schritten zusammen: der Rezeption des Signalmoleküls (Reception), der Signalweiterleitung (Transduction) und der zellulären Reizantwort (Response).*

2.3.2 Die Mechanotransduktion

Handelt es sich bei dem Auslöser der intrazellulären Signalkaskade nicht um einen klassischen molekularen Botenstoff, sondern um einen mechanischen Reiz, so wird von der Mechanotransduktion gesprochen. Der Ablauf einer Mechanotransduktion ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt und lässt sich physikalisch in drei Schritte unterteilen. Zunächst erfolgt die biomechanische Kopplung des mechanischen Reizes an die Zelle, also die Rezeption des mechanischen Signals durch einen entsprechenden Rezeptor (Empfänger oder Mechanosensor). Nach der Rezeption wird der Reiz, genauer gesagt das durch den Reiz entstandene Signal, weitergeleitet (Signalweiterleitung oder Transduktion). Am Ende der Weiterleitung erfolgt schlussendlich die effektive Zellantwort. Hierbei handelt es sich beispielsweise um die Produktion bestimmter Proteine. Die biomechanische Kopplung beschreibt bei diesem Prozess den Mechanismus (oder die Mechanismen), der zur Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade (Signalweiterleitung) führt. Ähnlich den molekularen Botenstoffen, denen zum Teil mehrere Rezeptoren zur Verfügung stehen, könnten auch hier unterschiedliche mechanische Reize von verschiedenen Mechanosensoren detektiert und entsprechende Signalkaskaden ausgelöst werden. Damit kann die am Ende stehende effektive Antwort der Zelle je nach Art des mechanischen Reizes divergieren. Das beschriebene Phänomen wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Kraftmikroskops untersucht.

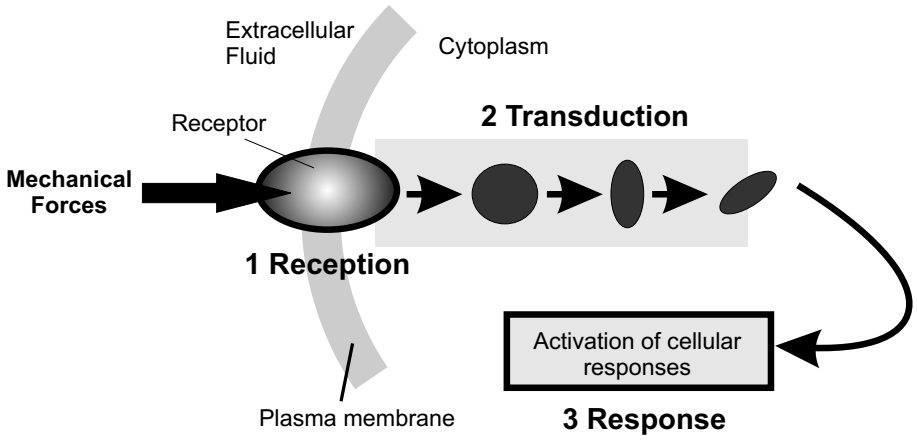

Abbildung 5: *Dargestellt ist der Ablauf einer zellulären Mechanotransduktion. Sie setzt sich aus drei Schritten zusammen: der biomechanischen Kopplung oder Reizrezeption (Reception), der Signalweiterleitung (Transduction) und der zellulären Reizantwort (Response).*

2.3.3 Die Relevanz der Mechanotransduktion

Damit sich der Knochen den geforderten mechanischen Bedingungen anpassen kann, müssen die Knochenzellen in der Lage sein, mechanische Signale zu detektieren und diese in biologische Signale umzusetzen (Mechanotransduktion).

Die Mechanotransduktion ist jedoch kein Knochenzellen-spezifisches Phänomen. So können beispielsweise auch Pflanzenzellen mechanische Reize detektieren [238] und entsprechend der Schwerkraft wachsen (*Gravitropismus*) [223, 18]. Die Haarzellen des Inne-

nohrs ermöglichen die Detektion von Schallwellen durch Calcium-sensitive Ionenkanäle [33]. Aber auch Skelett- und Herzmuskelzellen sind mechanosensitiv [198] und ihre Mechanotransduktion ist eng an Calcium-abhängige Signalkaskaden gekoppelt [219, 216]. Blutgefäßzellen (Endothelzellen) können ebenfalls die auf sie wirkenden Scherkräfte (Blutstrom) in intrazelluläre Signalkaskaden umwandeln [147], die an der Krankheit Arteriosklerose beteiligt sein könnten [237].

Mechanische Kräfte können jedoch nicht nur durch externe Reize, sondern auch zellintern durch das Zytoskelett erzeugt und mittels Zell-Substrat- oder Zell-Zell-Kontakten auf die Umgebung übertragen werden. Hierbei sind einige Zellen in der Lage, ihren Untergrund „abzutasten“ und dabei die Steifigkeit des Substrats zu bestimmen [174, 62]. Es ist zu vermuten, dass dieses Phänomen eng mit der eigentlichen Mechanotransduktion verknüpft ist, so dass ein zellulärer Mechanosensor nicht nur eine externe Deformation, sondern in Rückkopplung auch eine Reaktion des zellunterliegenden Substrates auf die durch die Zelle übertragenen internen Kräfte messen kann.

Wie oben beschrieben gibt es eine offensichtliche biologische und klinische Relevanz für die Mechanotransduktion verschiedener Zelltypen [116]. Obwohl in den letzten Jahren die Mechanotransduktion an verschiedenen Zellarten intensiv erforscht wurde, konnte bis heute kein spezieller Mechanosensor identifiziert werden. Die Beschreibung der Transduktionsmechanismen und das Verständnis der Arbeitsweise eines Mechanosensors könnte jedoch helfen, einen Ansatzpunkt zur Behandlung spezieller Krankheiten, die auf die mechanische Belastung des entsprechenden Gewebes zurückzuführen sind, zu finden (siehe oben). Diese Relevanz verdeutlicht die Notwendigkeit, die Mechanotransduktion von Knochenzellen zu untersuchen.

2.3.4 Die Physik der Mechanotransduktion in Zellen

Um eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen zu können, muss zunächst der mechanische Reiz von der Zelle detektiert werden. Die Struktur, die für die Einleitung der Mechanotransduktion verantwortlich ist, heißt Mechanosensor (siehe oben). Die Untersuchung seiner Funktionsweise und damit seiner mechanischen Eigenschaften ist mit biologischen Methoden nur eingeschränkt möglich. Deshalb kommen im Rahmen dieser Arbeit die Prinzipien der Rasterkraftmikroskopie zum Einsatz. Wie die folgenden Abschnitte deutlich zeigen werden, sind für den Ablauf der Mechanotransduktion vor allem die mechanischen Eigenschaften der Zelle von Bedeutung, da diese die mechanische Kopplung des Reizes an den Mechanosensor determinieren. Daher wurden in dieser Arbeit auch die mechanischen Eigenschaften der Zelle mit dem Kraftmikroskop untersucht.

Es gibt vielfältige Möglichkeiten, Zellen zu belasten, um auf diesem Wege eine Mechanotransduktion hervorzurufen. Da die hierbei augelösten zellulären Antworten mannigfaltig sind, wäre es denkbar, dass mehrere Mechanosensoren (also unterschiedliche strukturelle Einheiten der Zelle) existieren, die auf die verschiedenen mechanischen Reize reagieren und deren Transduktion in ein biologisches Signal initiieren. Die Mechanosensoren könnten dabei, um unterschiedliche Krafteinwirkungen aufnehmen zu können, an verschiedenen Orten der Zelle lokalisiert sein. Außerdem besteht die Möglichkeit, dass nur ein Mechanosensor existiert, der jedoch auf die Unterschiede in der mechanischen Belastung mit

Variationen in der Zellantwort reagiert. Letzteres würde allerdings voraussetzen, dass unterschiedliche mechanische Reize die gesamte Zelle derart beeinflussen, dass ein räumlich gebundener Mechanosensor unabhängig vom Stimulationsort aktiviert wird oder nur bestimmte Arten der Stimulation zu einer Mechanotransduktion führen.

Die Reaktion des Mechanosensors auf äußere mechanische Reize ist also nicht nur von seinen strukturellen Eigenschaften und damit von seiner Funktionsweise abhängig, sondern auch von den internen mechanischen Eigenschaften der Zelle. Letztere bestimmen die intrazelluläre Weiterleitung der extern applizierten Kräfte zu einem örtlich lokalisierten Mechanosensor. Damit stellt sich die Frage nach der Kopplung externer mechanischer Reize an die Zelle und ihre Zellstrukturen. Neben den molekularen Abläufen der Mechanotransduktion ist also ein tieferes Verständnis der mechanischen Eigenschaften von Zellen notwendig, um die mechanische Kopplung externer Reize und die Beeinflussung möglicher Mechanosensoren erklären zu können.

2.3.5 Modellierung der Zellmechanik

In den vergangenen Jahren wurden mathematische Modelle erstellt, um das mechanische Verhalten von Zellen unter externen Kräften zu beschreiben, die Kopplung des mechanischen Reizes zu verstehen und die Identifizierung der mechanosensorischen Zellstrukturen zu vereinfachen. An dieser Stelle wird eine kurze Einführung in die unterschiedlichen Konzepte und deren experimentelle Grundlagen gegeben, da sie zum Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit notwendig sind.

Kontinuumsmodelle Kontinuumsmodelle sehen die Zelle als mehr oder weniger homogenen Körper, dessen Mikrostrukturierung wie beispielsweise das Zytoskelett (Mikrofilamente) im einzelnen keine Beachtung findet [128]. So können zwar die globalen mechanischen Eigenschaften der Zelle durch das Zytoskelett determiniert sein, jedoch wird in der mathematischen Beschreibung die Mechanik der einzelnen Filamente nicht berücksichtigt. Die Verteilung der applizierten Kraft in der Zelle ist generell durch die Größen „stress“ (Belastung) und „strain“ (Verformung oder Dehnung) gekennzeichnet. Diese Größen werden über eine Distanz gemittelt, die wesentlich größer ist als die charakteristische Längenskala der Mikrostrukturierung. Der Vorteil eines solchen Modells ist, dass damit etablierte Methoden zur Berechnung der innerhalb der Zelle auftretenden Verformungen zur Verfügung stehen.

Mikrostrukturierte Modelle / Tensegrity-Modell Ein Modell, das zur Beschreibung des mechanischen Verhaltens auch die Mikroelemente (das Zytoskelett) der Zellen berücksichtigt, ist beispielsweise unter dem Namen *„Tensegrity“* [36] bekannt. Beim Tensegrity-Modell wird dem diskreten Verhalten der Mikrofilamente des Zytoskeletts und deren mechanischen Eigenschaften sowie der Kraftverteilung innerhalb der Zelle Rechnung getragen. Tensegrity setzt sich aus den Wörtern „tension“ (Spannung) und „Integrity“ (Integrität) zusammen und bezeichnet das mechanische Verhalten des Zytoskeletts. Während hierbei die Aktinfilamente des Zytoskeletts ein dichtes, unter kontinuierlicher Spannung stehendes Netzwerk darstellen, bilden die Mikrotubuli durch ihre Kompressions-widerstehenden

Eigenschaften eine „diskrete“ Stabilisierung des Aktin-Netzwerkes [114, 115].

Zellmodelle im experimentellen Kontext Das kortikale Zytoskelett wird in Schalenmodellen, die zu den Kontinuumsmodellen gezählt werden, häufig als hochelastische Schale der Zelle beschrieben, die wesentlich für die Kraftweiterleitung und die Deformationseigenschaften der Zelle verantwortlich ist. Dem inneren Zytoskelett hingegen kommt nur eine untergeordnete Rolle zu und es wird eine schwache Kopplung zum kortikalen Netzwerk angenommen. Deshalb sagen solche Kontinuumsmodelle nur eine lokale Deformation unter externen Kräften voraus [128]. Eine durch äußere Kräfte hervorgerufene Verschiebung der Zellmembran verschwindet in einigem Abstand vom Stimulationsort [108]. Die hierbei beobachteten inhomogenen Deformationen unter äußeren Kräften widersprechen allerdings den Vorhersagen eines Kontinuummodells.

Im Gegensatz zu den Kontinuumsmodellen postulieren Tensegrity-Modelle eine starke Kopplung zwischen dem kortikalen und dem internen Zytoskelett. Beide werden als multimodulares Netzwerk beschrieben, das ausschließlich Tensegrity-Eigenschaften besitzt. Auf Grund dieser besonderen Bauweise kommt dem Zytoskelett bei der Kraftweiterleitung unter externen Kräften eine besondere Bedeutung zu: lokal applizierte Kräfte führen zu einer kompletten Verformung des gesamten Filamentsystems (*„action at a distance“*). Hierzu schlugen Davies et al. erstmals vor, die Mechanotransduktion nicht nur am Ort der Stimulation zu betrachten, sondern auch die Auswirkung auf weiter entfernt liegende Bereiche mit einzubeziehen [42]. Es zeigte sich, dass die Stimulationskräfte an den Zellkern, die Zell-Adhäsionen und die Zell-Zell-Kontakte durch die zellinterne Weiterleitung der applizierten Deformation vermittelt werden. Außerdem konnten einige Arbeitsgruppen zeigen, dass es an den Adhäsionspunkten zu einer Verstärkung der auf die Zelle übertragenen Kraft (*„strain-amplification“*) kommen kann [107, 97, 98, 240, 90]. Dieser Effekt ist mit Kontinuumsmodellen nicht zu erklären, könnte aber bei der Applikation von Dehnungsreizen eine wichtige Rolle spielen. Dehnt man eine Zelle von 40μm Durchmesser um 4.000$\mu\epsilon$, so entspricht das einer effektiven Längenänderung von etwa 160nm. Wäre die Zelle ein mechanisch homogener Körper, würde diese Dehnung keine signifikante Längenänderung eines möglichen Mechanosensors verursachen. Stellt jedoch das Zytoskelett einen unter hoher Spannung stehenden elastischen Teil der Zelle dar, so würde es unter einer äußeren Dehnung maximal beeinflusst und es könnte zu einer verstärkten Deformation an den Verankerungspunkten kommen [223, 125].

Die beschriebene Komplexität und Divergenz der Kraftverteilung innerhalb der Zelle und des Zytoskeletts erschwert die Analyse des mechanischen Verhaltens einer Zelle unter den Einwirkungen äußerer Kräfte. Kein Modell ist in der Lage, allen Beobachtungen gerecht zu werden, zudem bislang keine aktiven Mechanismen wie die interne Krafterzeugung des Zytoskeletts implementiert wurden. Des Weiteren erlauben die Modelle keine Vorhersage molekularer Prozesse der Zelle, wodurch die Identifizierung eines Mechanosensors eher schwierig ist. Um die gängigen Modelle optimal anpassen zu können, wäre eine genaue Analyse der Größe der auf die einzelnen Strukturen wirkenden Kräfte von Nöten. Die Messung molekularer Kräfte im Piko-Newton-Bereich könnte beispielsweise durch optische Pinzetten („optical tweezers“) erfolgen. Diese ermöglichen unter anderem die Untersuchung der Kraftgenerierung und der Schrittweite von Motor-Proteinen wie Kinesin [16].

Da die Zellmechanik wie beschrieben bei der Mechanotransduktion eine wesentliche Rolle

spielt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente durchgeführt, in denen die Kraftverteilung in der Zelle unter mechanischer Belastung beobachtet wurde. Diese Messungen wurden erst durch die Realisierung eines Kraftmikroskops ermöglicht, das die gleichzeitige Stimulation und Beobachtung der Zelle erlaubt.

2.3.6 Die Mechanismen der Mechanorezeption

Bislang konnte die Frage nach dem Mechanosensor oder den Mechanosensoren hinsichtlich der Identifizierung, der örtlichen Lokalisierung und der Funktionsweise noch nicht beantwortet werden. Auch wenn die beschriebenen, sich widersprechenden Zellmodelle nur wenig Aufschluss über die intrazelluläre Kraftverteilung geben, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Mechanismen gefunden, die an der Mechanotransduktion beteiligt sind und unter Umständen einen Mechanosensor darstellen. Da die Physik des Mechanosensors in dieser Arbeit untersucht wurde, werden die Mechanismen im Folgenden beschrieben. Dabei kommen den membrangebundenen Ionenkanälen und dem Zytoskelett-Adhäsions-Komplex eine besondere Bedeutung zu.

Die Rolle der Zellmembran in der Mechanorezeption Einen möglichen Kandidaten für die Rezeption mechanischer Reize und deren Transduktion in intrazelluläre Signalkaskaden stellt die Zellmembran dar. Dabei handelt es sich um eine aus Phospholipid-Bausteinen aufgebaute Lipid-Doppelschicht. An der Zellmembran werden auf Grund ihrer amphiphatischen (hydrophilen und hydrophoben) Eigenschaften ohne äußere Krafteinwirkung zwei laterale, entgegengesetzte Kräfte generiert: eine nach außen zeigende versucht, die Zellmembran zu vergrößern und eine entgegenwirkende ist in das Zellinnere gerichtet. Die nach außen zeigende Kraft entsteht in Folge der strukturbedingten Entropie der hydrophoben Ketten der Lipidschichten; die nach innen wirkende durch den Verlust an freier Energie, der durch die Exposition hydrophober Gruppen zu Wasser an der Membran-Grenzschicht verursacht wird. Beide Kräfte sind von den Eigenschaften der Lipid-Ketten und der Membrankrümmung abhängig [175]. In der unstimulierten Zelle stehen membrandurchspannende Proteine mit beiden im Gleichgewicht.

Durch eine Deformation der Zellmembran könnten die lateralen Kräfte in der Lipid-Doppelschicht verändert und in der Folge Transmembranproteine beeinflusst werden. Hierbei könnte die Krafteinwirkung entweder zu einer Konformationsänderung eines Membranproteins führen und es so aktivieren (simuliert in [88]) oder die in der Membran enthaltenen Lipide umstrukturieren [6]. Die in der Membran sitzenden Ionenkanäle sind aus Untereinheiten aufgebaut. Diese durchspannen die Membran und bilden im Ruhezustand einen geschlossenen Kanal (Pore). Durch eine Deformation der Zellmembran besteht die Möglichkeit, diese Pore auf physikalischem Wege zu beeinflussen und so den Ionenkanal in einen geöffneten Zustand zu überführen. Man spricht von einem mechanosensitiven Ionenkanal [160]. Dieser Vorgang kann als Mechanotransduktion verstanden werden [32] und ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt. Es bleibt jedoch unklar, inwiefern hierbei die direkte physikalische Stimulation die Ionenkanal-Aktivität reguliert oder beispielsweise Inositol-Phospholipide (Signalmoleküle) eine Rolle spielen [31].

Bereits in den achtziger Jahren konnten mechanisch aktive Kaliumkanäle identifiziert

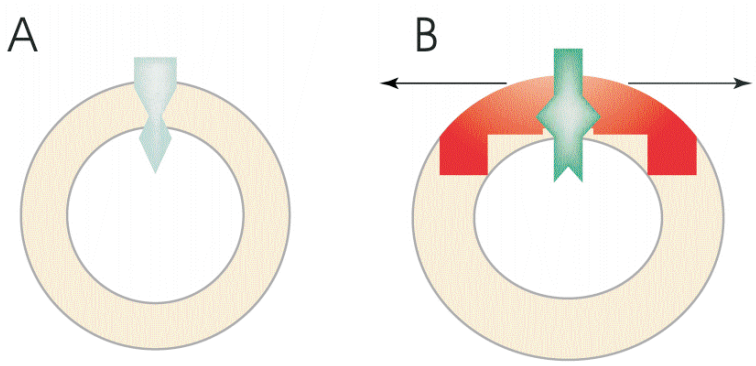

Abbildung 6: *Die Abbildung zeigt schematisch die mechanische Aktivierung eines Ionenkanals. (A) Die Zelle befindet sich im Ruhezustand, der Ionenkanal liegt in einer geschlossenen Konformation (grün) vor. (B) Durch eine äußere Deformation der Membran werden in dieser laterale Kräfte induziert (rot und durch Pfeile gekennzeichnet, letztere zeigen die Richtung der lateralen Kraftkomponente), die den Ionenkanal in einen geöffneten Zustand überführen (aus [121]).*

werden [87, 129]. Eine andere Arbeitsgruppe führte die Aktivität mechanosensitiver Kanäle auf äußere Krafteinwirkungen zurück, indem sie mit Hilfe einer Mikropipette die Membranspannung kontrollierten und gleichzeitig den Durchfluss von Ionen mit Hilfe der so genannten *„Patch-Clamp-Technik“* maßen [89]. Auch in Haarzellen konnten mechanosensitive Ionenkanäle identifiziert werden, deren Aktivierung über die Bewegung der Stereocilia (Haare, die mit den Haarzellen physikalisch gekoppelt sind) erfolgt [33] und die eine direkte Verbindung zum Zytoskelett der Zelle aufweisen (im Überblick in [89]). Neben den Haarzellen besitzen auch die Endothelzellen der Gefäße Ionenkanäle, die auf äußere mechanische Kräfte reagieren [148]. In Osteoblasten wurden mechanosensitive Kationenkanäle gefunden [55, 41, 250], deren Öffnung möglicherweise über die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) reguliert wird [123, 105]. Es bleibt aber grundsätzlich die Frage offen, ob die mechanische Aktivierung der Ionenkanalproteine für die Öffnung der Poren verantwortlich ist oder ob andere Proteine der Zellmembran die Aktivität der Ionenkanäle steuern. Somit ist zu klären, ob mechanosensitive Ionenkanäle als Mechanosensor fungieren können oder ob deren Öffnung nur als sekundärer Effekt auftritt. Des Weiteren bedarf es einer genauen Analyse der auf die Ionenkanäle wirkenden externen Kräfte [143].

Die Protein-vermittelte Mechanorezeption Auf Grund ihrer funktionellen Eigenschaften sind dem Zytoskelett und den Adhäsionspunkten wichtige Rollen bei der Mechanotransduktion zuzuschreiben. Wie in Abschnitt 2.2.1 dargestellt werden die Adhäsionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix in der Regel von membrandurchspannenden Integrinen realisiert. Durch diese komplexe physikalische Verknüpfung der Proteine des Zytoskeletts mit der Extrazellularmatrix ist die Zelle nicht nur in der Lage, interne Kräfte auf ihr Substrat (Adhäsionskräfte) oder benachbarte Zellen zu übertragen, sondern umgekehrt auch externe Kräfte, zum Beispiel über ein dehnbares, flexibles Substrat, über Adhäsionspunkte aufzunehmen und an das Zytoskelett weiterzugeben.

In Folge dieser Kraftübertragung zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Matrix sind die beteiligten Proteine erhöhten Kräften ausgesetzt. Hierdurch können sie als

Mechanosensor fungieren, da eine aus der Kraft resultierende Änderung der Molekülstruktur zu einer Freilegung zusätzlicher Bindungsstellen führen und eine Signalkaskade einleiten kann. Dabei kann die Mechanotransduktion in vier unterschiedlichen funktionalen Bereichen der Adhäsion-Zytoskelett-Struktur stattfinden. Der komplexe Aufbau der Adhäsionspunkte kann vereinfacht als Reihenschaltung verschiedener Proteine angesehen werden, die mit dem Zytoskelett koppeln. Diese Reihenschaltung und ihre Beeinflussung durch eine externe Kraft ist in Abbildung 7 schematisch gezeigt. Die Kraft- und Defor-

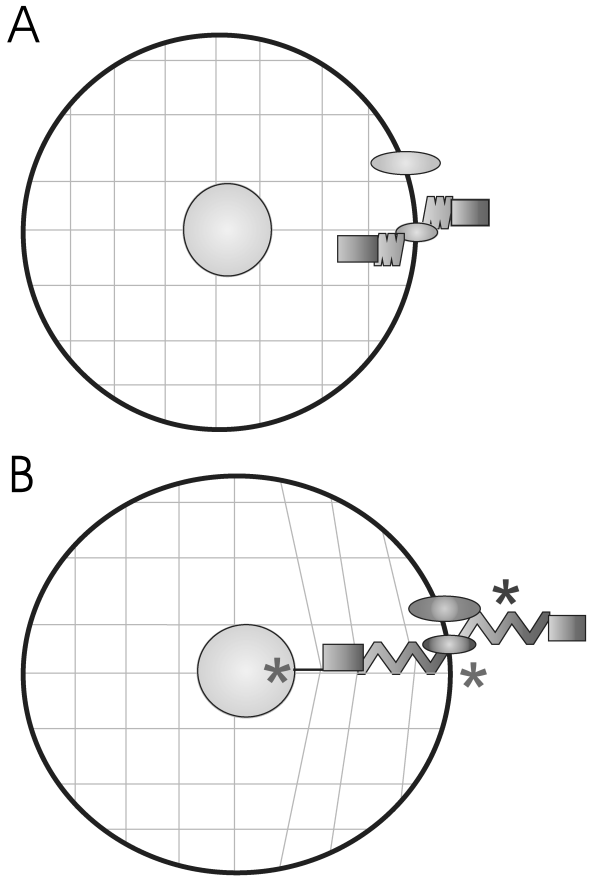

Abbildung 7: *In der Abbildung sind die Auswirkungen äußerer Kräfte auf die Adhäsionspunkte und das Zytoskelett einer Zelle schematisch dargestellt. (A) Die Adhäsionspunkte und das Zytoskelett befinden sich auf Grund fehlender Krafteinwirkung in ihrer ursprünglichen Konformation. Das Zytoskelett ist über Brückenproteine wie Talin und Vinculin mit der intrazellulären Domäne des Transmembranproteins Integrin verbunden. Integrin seinerseits bindet mit seiner Extrazellulärdomäne an die Extrazellularmatrix (zum Beispiel Fibronektin). (B) Die Zelle wird durch eine äußere Kraft deformiert, so dass unterschiedliche Konfigurationsänderungen bei den Proteinen auftreten können und eine Mechanotransduktion ausgelöst werden kann. Hierbei ist denkbar, dass i) die Dehnung eines extrazellulären Matrixproteins erfolgt, so dass ein weiterer transmembraner Rezeptor beeinflusst wird; ii) die Aktivierung des transmembranen Integrins, das mit dem Zytoskelett verbunden ist, erfolgt; iii) die Dehnung der Brückenproteine, die das Membranprotein mit dem Zytoskelett verbindet, resultiert, oder iv) die Kraft direkt das Zytoskelett deformiert und die Deformation zum Zellkern weitergeleitet wird (aus [121]).*

mationsübertragung der Zelle erfolgt hierbei vermittelt über das in der extrazellulären Matrix verankerte Protein Fibronektin auf das Transmembranprotein Integrin, weiter zu

intrazellulären Brückenproteinen wie Vinculin oder Talin und von dort auf die Filamente des Zytoskeletts, so dass eine Deformation des Zellkerns resultieren kann.

Das extrazelluläre Bindungsprotein Fibronektin kann hierbei als Mechanosensor fungieren, da schon die Applikation einer äußeren Kraft von wenigen Piko-Newton ausreicht, um neue Bindungsstellen freizulegen [166, 72]. Eine Kraft von 5pN bewirkt hierbei eine Längenänderung des Moleküls um das Fünffache seiner Ursprungslänge [73, 233].

Werden die äußeren Kräfte auf die membrandurchspannenden Integrine weitergeleitet, wie in Abbildung 7 gezeigt, können diese eine Konformationsänderung vollziehen und eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzen, an der beispielsweise Calcium beteiligt ist [177]. Die Integrine wurden schon vor vielen Jahren als funktionelle Transduktionsproteine (Mechanosensoren) in Betracht gezogen [113, 112]. So konnte durch direktes Ziehen an der Zellmembran mit Mikropipetten [189] oder Laserfallen [71] eine Signaltransduktion ausgelöst werden [83].

Des Weiteren können über eine äußere Krafteinwirkung die mit den Integrinen intrazellulär assozierten Moleküle entfaltet werden (siehe Abbildung 7) und eine Konformationsänderung erfahren [25]. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass möglicherweise fast alle Adhäsionsproteine die Rolle eines Mechanosensors übernehmen könnten [254]. Neben den Brückenproteinen α-Aktinin [202, 145] und Vinculin [211, 82], deren kryptische (verborgene) Bindungsstellen durch die Einwirkung äußerer Kräfte aktiviert werden können, scheint auch Talin ein wichtiger Vermittler bei der mechanisch initiierten Signalkaskade zu sein [78]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass weitere intrazelluläre Bindungsproteine wie Src, mDia, ROCK und WASP als molekulare Schalter dienen können, indem ihre Bindungsstellen unter externen Kräften freigelegt werden [77]. So kommt es beispielsweise in Folge von Dehnungsreizen zu einer verstärkten Anlagerung von FAK (*„Focal Adhesion Kinase“*) und Paxillin an den Adhäsionspunkten, wobei FAK bereits als Vermittler der Mechanotransduktion beschrieben wurde [234].

Durch die physikalische Kopplung des Zytoskeletts an die Adhäsionspunkte können applizierte Kräfte auf dieses übertragen und zu entfernten Orten in der Zelle weitergeleitet werden (siehe Abbildung 7). Dabei kann die Signalinitiierung durch das deformierte Zytoskelett selbst erfolgen. So binden bestimmte Proteine besser an ein gedehntes Zytoskelett, während andere teilweise ihre Bindungsaffinität verlieren [204]. Weiterhin wurde beobachtet, dass zelluläre Organellen unter externen Kräften translokiert werden, so dass vermutet wird, dass ein erstes biologisches Signal auch räumlich entfernt vom Ort der Stimulation auftreten kann [43, 96, 107]. Auf diesem Wege wird beispielsweise der Zellkern durch transmittierte Kräfte deformiert, wodurch die Genexpression verändert werden kann [149].

Der vorangegangene Abschnitt zeigt, wie essentiell die Untersuchung der Mechanotransduktion im Hinblick auf die Adhäsionsseite und das Zytoskelett ist. Um jedoch solche zellbiologischen Fragestellungen im mikroskopischen Bereich untersuchen zu können, ist die Anwendung physikalischer Methoden notwendig, da herkömmliche biologische Methoden hierzu nicht geeignet sind. In dieser Arbeit kommen die Prinzipien der Rasterkraftmikroskopie (siehe Kapitel 4) und der Zugkraftmikroskopie (siehe Kapitel 5) zur Anwendung, um die Kraftverteilung auf das Zytoskelett und die Adhäsionspunkte unter externen Kräften gezielt untersuchen zu können. Neben der Evaluierung zellmechanischer Modelle kann mit

diesen Methoden analysiert werden, wie äußere Reize in der Zelle weitergeleitet werden und ob eine Deformation der Adhäsionsseite für die Initiierung der Mechanotransduktion notwendig ist. Außerdem können auf diesem Weg die Auswirkungen unterschiedlicher mechanischer Reize auf die Zelle untersucht werden.

2.3.7 Physiologische Reize auf Knochenzellen

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Physik der Mechanotransduktion beziehungsweise des Mechanosensors von Knochenzellen. Daher ist es sinnvoll zu überlegen, welche Kraftarten auf die Zellen im Knochen wirken, um diese im Experiment simulieren zu können.

Die mechanische Stimulation führt zu einer Krümmung des Knochens, in deren Folge auf der einen Seite eine Kompression und auf der anderen Seite eine Zugspannung auftritt. Der hierbei entstehende Druckgradient treibt interstitielle Flüssigkeit von der Seite der Kompression zur Seite der Zugspannung durch die Knochenkanälchen (Canaliculi). Dabei werden die eingelagerten Knochenzellen überströmt und mit Nährstoffen versorgt (siehe Abbildung 8). Durch den Flüssigkeitsstrom werden die in den Kanälen liegenden Knochenzellen Scherkräften ausgesetzt [239], die nach dem Modell von Weinbaum (siehe Abbildung 8) bei den Zellen eine Scherspannung zwischen 0,8N/m^2 und 3N/m^2 hervorrufen. Diese Werte konnten jedoch bisher im Experiment am Knochen nicht bestätigt werden, da keine Messverfahren zur in-vivo-Bestimmung der Strömungsgeschwindigkeit zur Verfügung stehen. Allerdings war es in Zellkultur möglich, eine Reaktion von Zellen auf Flüssigkeitsströme, die Scherspannungen zwischen 0,8N/m^2 und 3N/m^2 hervorriefen, zu zeigen. Beispielsweise reagieren Osteoblasten auf solche Scherflüsse mit einer veränderten Calciumdynamik [221, 118].

Auch wenn der beschriebene interstitielle Flüssigkeitsfluss von vielen Wissenschaftlern als die wichtigste mechanische Kopplung zwischen der Belastung des Knochens und der Deformation der Knochenzellen angesehen wird [169], kann dieses Modell unter Berücksichtigung der trajektoriellen Bauweise des Knochens (siehe Kapitel 2.1) nicht herangezogen werden. So trägt der durch die Deformation entstehende Flüssigkeitsfluss beispielsweise keine Information über die Belastungsrichtung des Knochens und die Flussrichtung, die lediglich durch die Architektur der Knochenkanälchen bestimmt wird.

Nicht nur Scherkräfte wirken auf die Knochenzellen, sondern auch eine aus der Verbiegung des Knochens resultierende direkte Kraft. Die Krümmung des Knochens wird über zelluläre Adhäsionspunkte übertragen, die eine Verbindung zur Knochenmatrix herstellen. Damit wirkt die Knochendeformation direkt auf die Integrine und in der Folge auf das Zytoskelett [26], so dass die oben diskutierten möglichen Mechanismen zur Mechanotransduktion aktiviert werden könnten. Des Weiteren führt die Verbiegung des Knochens und die damit verursachte Längenänderung bestimmter Knochenfragmente zu einer Dehnung der Zelle. Solche Dehnungsreize sind in der Lage, in Osteoblasten eine Mechanotransduktion unter Beteiligung von Calcium auszulösen. Auf die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Dehnungs- und Scherflussexperimente und deren Ergebnisse wird in einem der folgenden Kapitel (siehe 2.3.8) eingegangen.

Zwar kann die Stimulation mit einem Kraftmikroskop nicht die physiologischen Verhält-

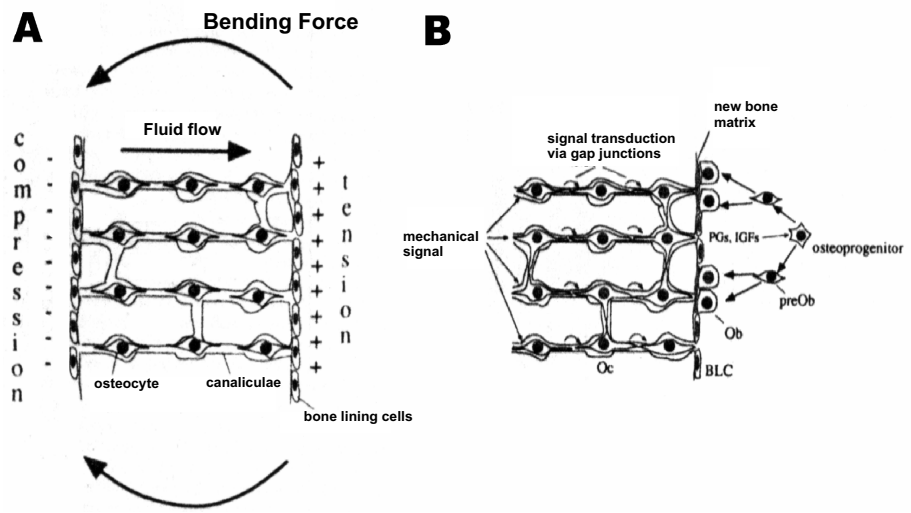

Abbildung 8: *Dargestellt sind die Vorgänge, die im Knochenkortex nach einer mechanischen Belastung resultieren. (A) Die mechanische Stimulation führt zu einer Krümmung des Knochens, in deren Folge ein Druckgradient entsteht. Dieser treibt interstitielle Flüssigkeit („fluid-flow") durch die Canaliculi, die die eingelagerten Knochenzellen überströmt und mit Nährstoffen versorgt. (B) Ein möglicher Signalweg besteht darin, dass das Signal nach einer mechanischen Stimulation von Osteozyten via „gap-junctions" zu den Bone-lining-cells übertragen wird. Diese senden Botenstoffe an Nachbarzellen aus und stimulieren so freie Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen). Die Vorläuferzellen lagern sich an die Knochenhaut an und differenzieren sich zu Osteoblasten (aus: [56]).*

nisse im Knochen exakt abbilden, die Quantifizierung der angewandten Kräfte und der resultierenden Zelldeformation wird jedoch möglich. Diese physikalischen Größen können nicht unter Scherflüssen oder Dehnungsreizen gewonnen werden, sind aber notwendig, um die Mechanik des Mechanosensors hinsichtlich äußerer Kräfte zu untersuchen und die mechanischen Eigenschaften der Zelle unter äußerer Deformation ergründen zu können.

2.3.8 Molekulare Prozesse der Mechanotransduktion und Calcium

Auch wenn in dieser Arbeit die physikalischen Aspekte der Mechanotransduktion im Vordergrund stehen, so ist doch die Betrachtung der biologischen Aktivität nach erfolgreicher Mechanorezeption unerlässlich. Die durch die Aktivierung eines Mechanosensors ausgelösten Signalkaskaden sind sehr komplex und interagieren vermutlich untereinander. Dabei spielt im Rahmen dieser Arbeit vor allem die intrazelluläre Calciumkonzentration eine wichtige Rolle, die als Hinweis auf eine erfolgreich eingeleitete Mechanotransduktion herangezogen wird.

Die Untersuchung der Reaktion auf äußere mechanische Reize findet in der Regel in Zellkultur statt (siehe Kapitel 3). Um bei den durchgeführten Experimenten den physiologischen Gegebenheiten der mechanischen Stimulation von Zellen im Organismus gerecht zu werden, wurden bislang Apparaturen verwendet, die die kultivierten Zellen einem bestimmten Scherfluss (Scherflusskammer) oder einem definierten Dehnungsreiz (Dehnungsmaschine) aussetzen können (Beschreibung der Apparaturen in den Kapiteln 3.7 und 3.8).

Calcium als Botenstoff Calcium tritt in vielen intrazellulären Signalkaskaden als so genannter *„second-messenger“* auf. Dabei steuert Calcium neben grundlegenden Funktionen wie der Zellteilung, der Migration und dem Zelltod auch die Befruchtung, die Muskelkontraktion und die neuronale Signalweiterleitung [12, 27, 48, 14, 217]. Außer Calcium ist an diesen Signalkaskaden häufig auch der Botenstoff Inositoltriphosphat (IP_3) beteiligt. IP_3 steuert die Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum [220]. Dabei kann die intrazelluläre Calciumkonzentration kurzzeitig von etwa 100nM auf über 1μM ansteigen [27]. Das Gleichgewicht wird anschließend durch Ionenpumpen wieder hergestellt. Neben der Vermittlung vieler physiologischer Funktionen ist Calcium auch am programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt [14].

Die Bedeutung der Calciumdynamik für intrazelluläre Signalkaskaden Um diese große Bandbreite an Signalkaskaden und dementsprechend vielen Zellantworten mit nur einem Botenstoff - den Calciumionen - erreichen zu können, muss die Zelle Calciumsignale bezüglich ihrer Frequenz, Amplitude und Dauer exakt kodieren und dekodieren können. Die Frequenzmodulation des Calciumsignals wird beispielsweise mit der „Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II“ dekodiert [181]. Neben der Frequenz hat vor allem die Amplitude einen Einfluss auf die physiologische Aktivität der Zelle und steuert zum Beispiel die Proteinsynthese [124, 13]. Auch die räumlich begrenzte Ausbreitung von Calciumsignalen spielt bei der Kodierung eine wichtige Rolle [11]. Calciumoszillationen sind in Zellen häufig zu beobachten [155] und auch für die interzelluläre Kommunikation relevant [17]. Die Signalvermittlung findet hierbei vermutlich durch IP_3 über *„gap-junctions“* statt. Die bei dieser Weiterleitung entstehenden Calciumwellen scheinen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Calcium-initiierten Signaltransduktion einzunehmen [193], sondern können auch ihrerseits Calciumoszillationen generieren [165].

Calciumsignale in der Mechanotransduktion Auch bei der Mechanotransduktion erfolgt die Signalweiterleitung über Calcium. So werden zum Beispiel in Endothelzellen Calciumoszillationen durch mechanische Reize hervorgerufen [106]. Für die Generierung der intrazellulären Calciumsignale spielen dabei sowohl die zellinternen Calciumspeicher als auch die extrazelluläre Calciumkonzentration eine Rolle ([110] und siehe Kapitel 2.2.1).

Das intrazelluläre Calcium ist beispielsweise für die mechanische Aktivität von Muskelzellen [217] und für die Regulation der Genexpression von Zellen unter dem Einfluss von Scherkräften verantwortlich [249]. Die Arbeitsgruppe um Reich zeigte, dass definierte Scherflüsse Calciumantworten in Osteoblasten auslösen [188]. Dabei werden durch den Scherfluss nicht nur mechanosensitive und spannungsabhängige Ionenkanäle aktiviert [195], sondern auch Calciumoszillationen hervorgerufen [50]. Dehnungsreize, die durch die Verwendung von Mikropipetten [248] und magnetischen Mikrokugeln [84, 83] auf die Knochenzellen und Keratozyten [139] ausgeübt werden, sind ebenfalls in der Lage, Calciumsignale zu erzeugen, die wiederum andere Signalwege regulieren [40]. In Endothelzellen hingegen lösen zyklische Dehnungsreize intrazelluläre Calciumantworten aus, bei denen sowohl intrazellulär freigesetzte als auch von außen einströmende Calciumionen zur Erhöhung der zellulären Konzentration beitragen [191].

Unlängst in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente zeigen, dass auch primäre

Osteoblasten auf mechanische Reize mit der Aktivierung eines speziellen Signalweges reagieren. Dieser läuft unter der Beteiligung von intrazellulär freigesetzten Calciumionen ab [123]. Für diese Versuche wurden die primären Osteoblasten sowohl definierten Scherflüssen (siehe Kapitel 3.8) als auch definierten Dehnungsreizen (siehe Kapitel 3.7) ausgesetzt. Die resultierende Signaltransduktion konnte inzwischen weiter aufgeklärt werden [221]. Die Abbildung 9 zeigt den Teil der Signalkaskade, der an der Generierung der Calciumsignale beteiligt ist. Damit der dargestellte Mechanotransduktionsweg initiiert werden kann,

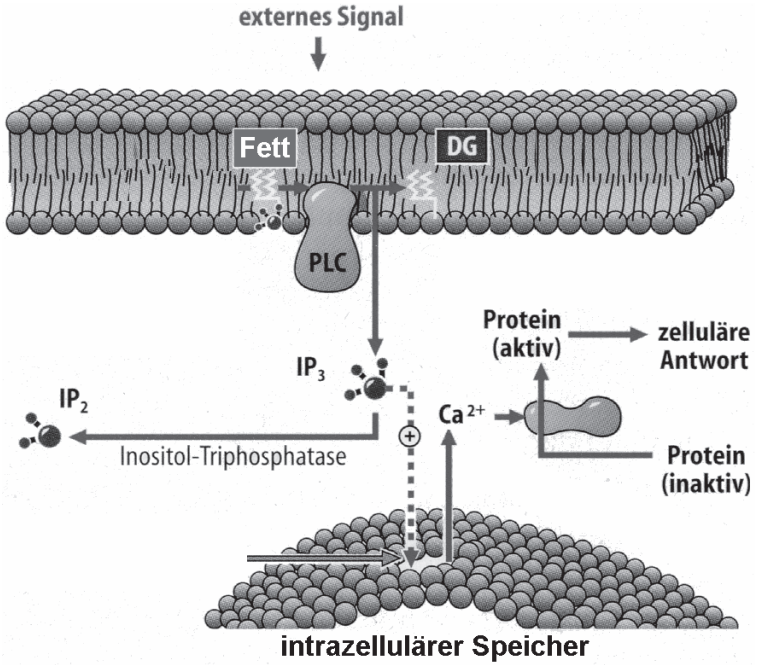

Abbildung 9: *Gezeigt ist die schematische Darstellung des Mechanotransduktionsweges, der nach mechanischer Stimulation eines Osteoblasten durch applizierte Dehnungsreize beziehungsweise Scherflüsse resultiert. Die Beteiligung von Calciumionen wird in der Abbildung deutlich. Die Stimulation führt zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die ihrerseits membranständige Fettsäuren zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diazylglyzerin (DG) spaltet. IP_3 bindet an rezeptorgesteuerte Ionenkanäle des Endoplasmatischen Retikulums (intrazellulärer Speicher) und führt zur Freisetzung von Calciumionen. Calcium aktiviert wiederum Proteine, die die zelluläre Antwort auf den Reiz bilden. Das ausgelöste Signal kann, vermittelt über „gap-junctions“, an benachbarte Zellen weitergeleitet werden.*

müssen die Zellen Dehnungsreizen von $4000\mu\epsilon$ bis $6000\mu\epsilon$ ($1.000\mu\epsilon$ entspricht einer relativen Längenänderung von 0,1%) oder Scherflüssen zwischen $0{,}3\mathrm{N/m^2}$ und $3\mathrm{N/m^2}$ ausgesetzt werden. Die Dehnungsreize wurden mit einer Frequenz von 1Hz bis 10Hz appliziert.

In Folge der mechanischen Stimulation wird ein in der Zellmembran lokalisiertes Protein, die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Die PLC ihrerseits kann die Reaktion membranständiger Fettsäuren zu Inositoltriphosphat (IP_3) und Diazylglyzerin katalysieren. Anschließend diffundiert IP_3 durch den Zellinnenraum und geht eine Verbindung mit den Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ein. Die Rezeptoren führen zur Öffnung der im ER liegenden membranständigen Ionenkanäle und führen so zur Freisetzung von Calciumionen in das Zytoplasma. Die Calciumerhöhung tritt etwa zwischen 90 und 150 Sekunden nach der Applikation des mechanischen Reizes, also deutlich zeitverzögert

zur initialen Mechanorezeption auf [221]. Diese Tatsache ist auf den Ablauf der Signalkaskade zurückzuführen, da unter anderem IP_3 zunächst zum Endoplasmatischen Retikulum diffundieren muss. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass - vermutlich über *„gap-junctions“* - eine interzelluläre Signalweiterleitung zu benachbarten Zellen stattfindet. Die durch die mechanische Stimulation von Zellen freigesetzten Calciumionen können ihrerseits beispielsweise zur Regulation des Zytoskeletts und der Genexpression dienen [24].

Auf Grund der Beteiligung von Calciumionen an der Mechanotransduktion wurde die intrazelluläre Calciumkonzentration in der vorliegenden Arbeit beobachtet. Sie diente dazu, unter der mechanischen Stimulation mit dem Kraftmikroskop eine erfolgreich initiierte Mechanotransduktion zu identifizieren. Des Weiteren kann durch die Beobachtung der intrazellulären Calciumkonzentration analysiert werden, ob die Art des mechanischen Reizes einen Einfluss auf die Calciumdynamik hat und in der Folge zu differenzierten Zellantworten führt. Ein solches Ergebnis könnte dann wiederum auf die Aktivität verschiedener Mechanosensoren schließen lassen.

2.4 Motivation dieser Arbeit

Nachdem in den letzten Abschnitten eine ausführliche Einführung zum biologischen Hintergrund dieser Arbeit gegeben wurde, soll nun die Notwendigkeit von zellbiologischen Experimenten unter Anwendung physikalischer Prinzipien dargelegt werden.

Grenzen etablierter Methoden Trotz zahlreicher Arbeiten zu diesem Thema ist die Identifizierung eines Mechanosenors bislang nicht gelungen. Auch seine genaue Funktionsweise bleibt unklar. Zwar bieten Scherflüsse und Dehnungsreize die Möglichkeit, Zellen mechanisch zu stimulieren, allerdings kann die applizierte Kraft und die daraus resultierende Deformation nicht quantitativ bestimmt werden. Mathematische Modelle die zur Berechnung der Wandscherkraft auf Zellen in einem Flüssigkeitsstrom dienen helfen hier nur bedingt (siehe Kapitel 3.8), da beispielsweise die tatsächliche Form der Osteoblasten und deren viskoelastische Eigenschaften nicht berücksichtigt werden. Des Weiteren können Stimulationsparameter wie die Frequenz, die Amplitude und die Dauer der Stimulation mit herkömmlichen Belastungssystemen nicht adäquat variiert werden (siehe Kapitel 3.8 und 3.7).

Quantifizierung der Belastung Insbesondere die Quantifizierung der einwirkenden Kräfte und der resultierenden Deformationen ist notwendig, um einen Einblick in die Funktionsweise und die Lokalisierung eines Mechanosensors zu erhalten. Denkbar wäre zum Beispiel, das der Mechanosensor in Folge der äußeren Kraft entfaltet wird und seine verborgenen Bindungsstellen freilegt (siehe Kapitel 2.3.6). Die hierbei auftretende reversible Entfaltung von Molekülen würde zu viskoelastischen Effekten und damit zur Energiedissipation in der Zelle führen. Dabei bliebe der Mechanosensor zunächst deformiert, bis es beispielsweise unter Energieverbrauch (ATP) zur aktiven Relaxation des Moleküls kommt.

Ein physikalisches System zur Analyse der Mechanotransduktion Die bislang verwendeten molekular- und zellbiologischen Methoden sind nicht in der Lage die bestehenden Fragestellungen zu beantworten. Hochsensible Messsysteme müssen eingesetzt werden, damit die Mechanik der Mechanotransduktion im zellulären Bereich untersucht werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das physikalische Prinzip der Rasterkraftmikroskopie für biologische Fragestellungen adaptiert und eingesetzt. Das neu entwickelte Kraftmikroskop bietet die Möglichkeit, einzelne Zellen gezielt zu stimulieren und dabei die applizierte Kraft eindeutig zu quantifizieren sowie die elastischen und viskoelastischen Eigenschaften der Zelle zu messen (zum Beispiel die Energiedissipation durch die Deformation der Zelle). Des Weiteren können neben der exakten Wahl der Amplitude der Kraft auch die Frequenz der Stimulation und die Zyklenzahl nahezu beliebig variiert werden. Das Kraftmikroskop erlaubt die Applikation von Kräften zwischen einigen Piko-Newton und einigen Mikro-Newton.

Die Mechanik des Mechanosensors Bei der Stimulation von Knochenfragmenten wurde gezeigt, dass nur die zyklische Stimulation eine erhöhte Knochensynthese auslöst [136], statische Belastungen hingegen nicht. Dabei spielen sowohl die Frequenz als auch die Amplitude eine wichtige Rolle, da der Knochen in erster Linie häufig auftretenden kleinen Deformationen ausgesetzt ist [194, 65]. So konnten Qin et al. an Hühnerknochen ermitteln, dass eine minimale effektive Belastung von $70\mu\epsilon$ mit 100.000 Belastungszyklen bei 30Hz notwendig ist, um das Wachstum von Knochen anzuregen [182]. Es stellt sich daher die Frage, ob eine solche makroskopische Beobachtung auch auf mikroskopischer, also zellulärer Ebene wiederzufinden ist. Der Mechanosensor könnte einem akkumulativen Prozess unterworfen sein, indem er durch schnell (Frequenz) wiederkehrende kleine Deformationen (Amplitude) immer weiter „gespannt“ wird, bis eine Signalkaskade ausgelöst wird.

In dieser Arbeit wurden die biologischen und physikalischen Abläufe im Knochen auf zellulärer Ebene untersucht, um die gewonnen Erkenntnisse im makroskopischen System anwenden zu können. Die Analyse der Mechanik des Mechanosensors erfolgte mit Hilfe des Kraftmikroskops durch die Variation der Stimulationsparameter. Dabei spielt der Botenstoff Calcium eine wichtige Rolle. Durch die Beobachtung des intrazellulären Calciumspiegels mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden kann kontrolliert werden, ob durch die mechanische Stimulation mit dem Kraftmikroskop eine Mechanotransduktion bei den Zellen initiiert wird. Des Weiteren kann die Abhängigkeit des Calciumsignals gegenüber den Stimulationsparametern (Frequenz, Amplitude und Zyklenzahl) und im Vergleich zu Dehnungsreizen und Scherflüssen untersucht werden. Die Ergebnisse der Calciummessungen sind in den Kapiteln 6.2, 6.3 und 6.4 zu finden.

Die Mechanik der Zelle Bei der Analyse der Mechanotransduktion nimmt die Zellmechanik eine wichtige Rolle ein. Da das Wissen um die Kräfteverteilung in der Zelle unter einer externen Belastung notwendig ist, um die Weiterleitung der Deformation zu einem möglichen Ort des Mechanosensors zu klären, wurde in dieser Arbeit das zellmechanische Verhalten mit Hilfe des Kraftmikroskops untersucht. Hierzu werden die auf die Adhäsionsseite der Zelle übertragenen Kräfte analysiert. Die Analyse erfolgt mit der so genannten *„Zugkraft-Mikroskopie“* (siehe Kapitel 5), die die Quantifizierung der auf das Zellsubstrat übertragenen Kräfte erlaubt (siehe Kapitel 6.6). Mit Hilfe dieser Messungen können die

Vorhersagen der gängigen Zellmodelle evaluiert werden (siehe Kapitel 7).

Die Beobachtung der internen Kraftweiterleitung ermöglicht zudem die Analyse der Auswirkungen verschiedener Stimulationsarten auf den möglicherweise auf der Adhäsionsseite lokalisierten Mechanosensor. Während die Darstellung der Auswirkung von Dehnungsreizen auf die Adhäsionsseite der Zellen aus theoretischen Überlegungen heraus erfolgt, werden Krafttransmissionsmessungen an Osteoblasten durchgeführt, die unter dem Einfluss von Scherkräften stehen (siehe Kapitel 6.7). Auf diesem Wege wird ein direkter Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsarten auf die interne Kraftweiterleitung möglich und auftretende Variationen der Zellantwort können hinsichtlich der Zellmechanik analysiert werden.

Aktive Antworten der Zelle in Korrelation mit Calcium und Vinculin Da Calciumsignale teilweise den Umbau des Zytoskeletts regulieren und an der Generierung von Substratkräften beteiligt sind, ist es denkbar, dass durch die Mechanotransduktion die auf das Substrat übertragenen Kräfte aktiv beeinflusst werden. Um dies zu untersuchen, wurden Osteoblasten mittels des Kraftmikroskops und der Dehnungsmaschine mechanisch stimuliert und gleichzeitig die wirkenden Adhäsionskräfte beobachtet (siehe Kapitel 6.5.1). Hiermit können möglicherweise weitere Unterschiede bei der Mechanotransduktion unter verschiedenen Stimulationen analysiert werden. Die zusätzlich durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen des Adhäsionsproteins Vinculin können außerdem helfen, die Rolle der Adhäsionspunkte in der Mechanotransduktion besser zu verstehen (siehe Kapitel 6.8).

Die Analyse verschiedener Aspekte der Mechanotransduktion wie die Calciumkonzentration, die aktive Kraftgenerierung, das Verhalten der Adhäsionspunkte und deren zeitlich Kopplung kann dazu dienen, einen besseren Einblick in den Ablauf der Mechanotransduktion zu erhalten.

3 Fluoreszenzmikroskopie und zellbiologische Methoden

3.1 Einleitung

Im Rahmen dieser Arbeit werden zellbiologische Fragestellungen mit physikalischen Systemen untersucht. Dabei stehen die mechanischen und physikalischen Aspekte der Mechanotransduktion im Vordergrund. Da hierbei die Anwendung zellbiologischer Methoden unumgänglich ist, werden diese im folgenden Kapitel dargestellt.

Zunächst wird eine Einführung in die Zellkultivierung gegeben, die für die zellbiologische Arbeit unabdingbar ist.

3.2 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden bovine, dass heißt von Rindern stammende, primäre Osteoblasten verwendet. Ihre Gewinnung und Kultivierung wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.2.1 Zellpräparation

Die Osteoblasten müssen für die Experimente zunächst aus Rinderknochen gewonnen werden. Diese Präparation erfolgt mit Hilfe des Auswachsverfahrens aus dem Periost der Metakarpalen (äußere Knochenhaut) von circa 18 Monate alten Jungbullen [123]. Unter sterilen Bedingungen werden hierfür Streifen des frisch präparierten Knochens entfernt, in 5x5mm große Stückchen zerteilt und anschließend in Earles Puffer überführt. Nach dem Waschen der Periststückchen (dreimal für 10 Minuten bei 37°C) werden diese unter Zugabe von Penicillin und Streptomycin für 20 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend im Verhältnis 1:15 (Fläche Periost zu Kulturfläche) in HiGEM (High Growth Enhancement Medium) kultiviert. Der Wechsel des Mediums erfolgt zunächst nach 24 Stunden und anschließend im Abstand von einer Woche bis zur vollständigen Konfluenz der Zellen (4-5 Wochen).

3.2.2 Kryokonservierung

Damit die gewonnen Zellen über einen längeren Zeitraum verwendet werden können, erfolgt eine Langzeitkonservierung bei -196°C in flüssigem Stickstoff. Hierzu werden die Zellen mittels Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, in Medium aufgenommen und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wird mit Medium auf eine Konzentration von $10x10^6$ Zellen/ml resuspensiert und nach Zugabe von Einfriermedium in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen werden sukzessiv (ca. 1°C pro Minute) auf -20°C tiefgekühlt und nach 12 Stunden in Flüssigstickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgt durch schnelles Aufwärmen der Gefrierröhrchen in einem 37°C-Wasserbad. Die Zellen werden anschießend in vorgewärmtes Medium aufgenommen

und für zehn Minuten bei 200g zentrifugiert. Das Pellet wird in frischem Medium resuspensiert und in Zellkulturflaschen überführt.

3.2.3 Phänotypisierung

Um sicherstellen zu können, dass es sich bei den präparierten Zellen tatsächlich um primäre Osteoblasten handelt, werden diese phänotypisiert. Die Phänotypisierung erfolgt mittels spezifischer Antikörper durch den immunozytochemischen Nachweis der osteoblastenspezifischen Proteine Osteokalzin und Prokollagen Typ-I. Hierzu werden auf 60x24mm großen Deckgläsern gewachsene, konfluente Zellkulturen zunächst dreimal mit PBS gespült und anschließend für zehn Minuten mit einem kalten Gemisch aus Methanol und Aceton (Mischungsverhältnis 1:1) bei -20°C fixiert. Nach Blockade der endogenen Peroxidase mittels 0,3% H_2O_2 (10 Minuten bei Raumtemperatur) werden die Zellen erneut dreifach mit PBS gewaschen und anschließend mit den spezifischen Erst-Antikörpern gegen Osteokalzin und Prokollagen Typ-I inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur werden die Zellen wieder dreimal mit PBS gewaschen, der konjugierte Zweitantikörper (siehe Tabelle 1) zugegeben und das ganze für eine weitere Stunde inkubiert. Für die Detektion der Proteine erfolgt zunächst die Behandlung der Zellen mit einer Färbelösung (zehn Minuten bei Raumtemperatur) und die Konservierung mit Glyzerin und Gelatine. Im Anschluss werden die Proben mit Hilfe der Hellfeldmikroskopie im Vergleich zu einer Positivkontrolle (anti-Vimentin als spezifischen Antikörper) und einer Negativkontrolle (Mausserum statt des spezifischen Antikörpers) beurteilt. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper wird in Tabelle 1 gegeben.

Neben dem cytochemischen Proteinnachweis erfolgt die Phänotypisierung der Osteozyten durch den Nachweis des Parathormon-Rezeptors, der in großer Anzahl von ausdifferenzierten Osteoblasten exprimiert wird [221]. Hierfür folgt auf die Stimulation der Zellen mit Parathormon (PTH-Konzentration von 10-800nM) eine bildtechnische Analyse (siehe 3.5) der intrazellulären Calciumkonzentration mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 (siehe 3.3.1).

- spezifische Erst-Antikörper:
  - anti-Vimentin (mouse); Boehringer Mannheim, Clone V9 #814318
  - anti-Osteokalzin (mouse); Larry Fisher (NIH)
  - anti-Osteokalzin (goat); Fitzgerald
  - anti-Pro-Kollagen I (rabbit); Larry Fisher LF41
- Biotin-konjugierte Zweit-Antikörper:
  - anti-Mouse; Boehringer #1089285
  - anti-Rabbit; Boehringer #1214659
  - anti-Goat; Sigma B6523
- Peroxidase-konjugierte Zweit-Antikörper:
  - Streptavidin Boehringer #1089153

Tabelle 1: *Übersicht über die zur Phänotypisierung verwendeten Antikörper*

3.2.4 Aussaat und Färbung der Zellen

Nach der Phänotypisierung der primären Osteoblasten können die Zellen auf Deckgläser ausgesäht und im Experiment verwendet werden. Der Umgang mit Zellkulturen findet dabei weitestgehend unter sterilen Bedingungen und im Wesentlichen nach Lindl u. Bauer statt Lindl1994. Abweichungen hiervon werden im Folgenden beschrieben.

Für die Experimente werden die Zellen in einer Dichte von 5.000 bis 60.000 Zellen/cm^2 auf den entsprechenden Deckgläsern in HiGEM beziehungsweise HAM's Hepes F10 mit einem 10%igem Anteil an FCS (fötales Kälberserum) in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 für 24 bis 72 Stunden kultiviert.

Die Beobachtung der intrazellulären Calciumkonzentration der Osteoblasten erfolgt mittels des calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 (siehe 3.3). Hierfür werden die Zellen mit 1 bis 3 μM Farbstoff (in Medium ohne FCS) für 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verwendung der Ester-From des Farbstoffes (durch den Zusatz AM gekennzeichnet) ermöglicht, dass eine große Anzahl an Zellen gleichzeitig nicht-invasiv gefärbt werden kann [228]. Der Farbstoff gelangt in das Zytosol, da die Zellmembran für seine Esterform permeabel ist. Im Zytosol wird der Ester mittels spezieller Enzyme, den Esterasen, hydrolytisch gespalten und kann daraufhin die Zellmembran nicht mehr passieren. Um ein mögliches Ausfällen des Farbstoffes zu verhindern, erfolgt die Zugabe von 0,1% Pluronic F-127 zum Medium [176].

3.3 Fluoreszenzfarbstoffe

In dieser Arbeit werden Zellen mechanisch mit einem Kraftmikroskop stimuliert, um so die Mechanik des Mechanosensors untersuchen zu können. Zur Evaluierung einer ausgelösten Mechanotransduktion wird die intrazelluläre Calciumkonzentration während des Experimentes beobachtet. Die Calciumkonzentration wird auf Grund einer mechanischen Stimulation temporär verändert (siehe Kapitel 2.3.8). Mit Hilfe von Calcium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen kann die intrazelluläre Calciumkonzentration mit fluoreszenzmikroskopischen Systemen (siehe Kapitel 3.5) gemessen werden. Diese Farbstoffe weisen eine hohe Affinität zu Calciumionen auf und ändern unter der Bindung von einzelnen Calciumionen ihre optischen Eigenschaften .

Im den folgenden Abschnitten wird der hier verwendete „Verhältnis-Farbstoff“ Fura-2 vorgestellt.

3.3.1 Die Eigenschaften des Farbstoffs Fura-2

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 wurde 1985 von Grynkiewicz entwickelt [86]. Er ist heute der am häufigsten verwendete intrazelluläre Calciumfarbstoff. Durch die Bindung eines Farbstoffmoleküls an ein Calciumion kommt es im Absorptionsspektrum zu einer Verschiebung des Maximums (siehe Kapitel 10). Während das Anregungsmaximum für den ungebundenen Farbstoff bei etwa 363nm liegt, verschiebt es sich nach der Bindung an ein Calciumion auf circa 335nm. Die Eigenschaften des Emissionsspektrums und damit die

Lage des Emissionsmaximums bei 510nm bleiben hierbei erhalten. Durch eine wechselnde

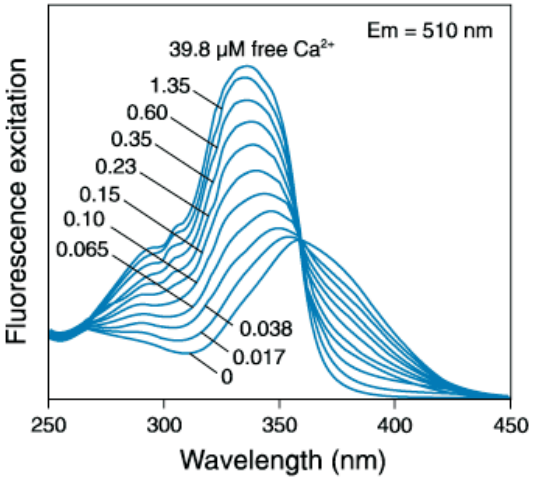

Abbildung 10: *Die Abbildung zeigt das Absorptionsspektrum von Fura-2 für verschiedene Calciumkonzentrationen von 0,065µM bis 39,8µM.*

Anregung des Farbstoffes bei 340nm beziehungsweise bei 380nm können die Fluoreszenzintensitäten (I_{340nm} und I_{380nm}) für den Calcium-gebundenen und -ungebundenen Zustand gemessen und das Verhältnis (I_{340nm}/I_{380nm}) bestimmt werden (engl. *Ratio-Imaging*). Letzteres ermöglicht eine qualitative Aussage über die intrazelluläre Calciumkonzentration. Ein wesentlicher Vorteil von Fura-2 ist seine charakteristische Eigenschaft als Verhältnis-Farbstoff (*„Ratio-Farbstoff“*). Im Gegensatz zu Einzelwellenlängen-Farbstoffen führen hier schwankende Farbstoffkonzentrationen in einem großen dynamischen Bereich innerhalb der Zelle nicht zu scheinbaren Calciumschwankungen im Ratio-Signal (Artefakten). Des Weiteren können verschiedene Störsignale, wie Streulicht, das in die Detektion der Fluoreszenz einkoppelt, oder auch das Ausbleichen des Farbstoffes sowie mechanische und elektronische Instabilitäten des Messsystems, durch die Verhältnismessung eliminiert werden.

Zur Messung der Fluoreszenz finden unterschiedliche Methoden Anwendung. Am häufigsten werden jedoch Photomultiplier oder CCD-Kameras eingesetzt (siehe Kapitel 3.5).

3.3.2 Die Kalibrierung von Fura-2

Da in dieser Arbeit die Dynamik der Calciumsignale Aufschluss über die unterschiedlichen Auswirkungen diverser mechanischer Reize auf die Mechanotransduktion liefern soll, ist auch die quantitative Calciumkonzentration interessant. Hierfür wird im folgenden Abschnitt die Bestimmung der tatsächlichen Calciumkonzentration beschrieben.

Die Quantifizierung der intrazellulären Calciumkonzentration kann nach Kalibrierung des Systems erfolgen. Die freie Calciumkonzentration errechnet sich aus:

$$[Ca_{2+}]_{free} = K_d Q \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \tag{1}$$

Dabei ist K_d die Dissoziationskonstante des Farbstoffes Fura-2, Q der Quotient aus den Fluoreszenzintensitäten F_{min380}/F_{max380} (bei minimaler und maximaler Calciumkonzentra-

tion), R das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten bei vorliegender Calciumkonzentration und R_{min} bzw. R_{max} die Verhältnisse bei minimaler beziehungsweise maximaler, dass heisst gesättigter Calciumionenkonzentration.

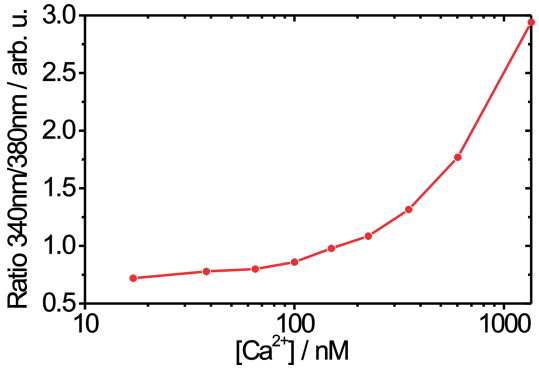

Abbildung 11: *Die Abbildung zeigt eine Kalibrierungskurve von Fura-2. Aufgetragen ist das Verhältnissignal der Fluoreszenz gegenüber der Calciumkonzentration.*

Das an dieser Stelle beschriebene in-vitro-Verfahren zur Kalibrierung eines Ratio-Farbstoffes wurde von Tsien und Pozzan entwickelt [229]. Zur Erstellung einer Kalibrierungskurve werden Lösungen verwendet, die eine definierte Calciumkonzentration aufweisen. Diese Lösungen müssen die intrazellulären Bedingungen möglichst physiologisch abbilden, da die Affinität des Farbstoffes zum Calcium durch verschiedene Faktoren stark variiert (beispielsweise pH-Wert, Temperatur, Viskosität der Lösung und Ionenstärke). Um diese differenziellen Faktoren möglichst gut beherrschen zu können, wird ein Kalibrierungs-Kit von Molecular Probes verwendet (Calcium Calibration Buffer Kit C-6775, Molecular Probes, Niederlande), das Lösungen mit verschiedenen Calciumkonzentrationen von 15nM bis 1mM bereithält. In diese zellfreien Lösungen wird die Salzform des Indikators (Fura-2) gegeben und die entsprechenden Messungen werden durchgeführt (siehe Abbildung 11). Nach Kalibrierung des Systems kann die quantitative Messung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgen.

3.4 GFP-Transfektionen

In dieser Doktorarbeit wurden mit dem Kraftmikroskop Zellen mechanisch stimuliert und gleichzeitig die Auswirkung dieser Belastung auf die Adhäsionsseite der Zellen untersucht. Dabei ist nicht nur die Messung der weitergeleiteten Kräfte interessant (siehe Kapitel 5), sondern auch die Auswirkung auf die Adhäsionsstellen selbst und deren Funktion im Mechanotransduktionsprozess. Daher werden die Adhäsionspunkte durch eine so genannte *„GFP-Vinculin-Transfektion“* sichtbar gemacht. Nun kann mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden (siehe Kapitel 3.5) die Größe und die Lage der Adhäsionsstellen und deren Änderung unter der mechanischen Stimulation beobachtet werden. Im Folgenden wird die GFP-Vinculin-Transfektion beschrieben.

3.4.1 Das „Green-Fluorescent-Protein“

Die Beobachtung von biologischen Prozessen in lebenden Zellen erfolgt heute weitestgehend mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Hierbei können bestimmte Proteine durch die Ankopplung eines fluoreszierenden Moleküls (*„Fluoreszenz-Tag“*) in der Zelle sichtbar gemacht werden. Das am häufigsten verwendete Fluoreszenzmolekül ist das *„Green-Fluorescent-Protein“* (GFP), ein Photoprotein der Quallenart Aequorea. Das Absorptionsmaximum von GFP liegt bei circa 488nm, während das Emissionsmaximum bei 508nm liegt [226].

Um das Vinculin als GFP-Fusionsprotein zu erhalten, muss in die Zelle die DNA-Sequenz des GFP-Vinculin-Fusionsproteins eingebracht werden. Dieser Prozess wird als Transfektion bezeichnet. Der Träger der DNA ist ein so genanntes Plasmid. Hierbei handelt es sich um eine ringförmige DNA, die die DNA des Proteins und des GFPs trägt. Beide DNAs sind so aneinander gekoppelt (*„tagged“*), dass in der Folge ein Fusionsprotein gebildet wird. Nun kann das Verhalten des Vinculins in der lebenden Zelle unter Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden.

3.4.2 Transiente Transfektion mit dem GFP-Vinculin-Vektor

Da in dieser Arbeit primäre Osteoblasten untersucht werden, kommt nur eine transiente (zeitlich begrenzte) Transfektion mit dem GFP-Vinculin-Plasmid in Frage. Eine stabile (dauerhafte) Transfektion, in der die Fremd-DNA in das Genom der Zelle eingebaut wird, ist nicht möglich, da zur Erzeugung solcher Zellen häufiges Passagieren notwendig wäre. Hierbei würden sich jedoch die primären Zellen zum Beispiel zu Osteozyten differenzieren.

Da bei der wesentlich einfacheren transienten Transfektion die eingebrachte Fremd-DNA neben der zelleigenen DNA (extrachromosomal) zeitlich begrenzt vorliegt, können die Zellen lediglich ein bis drei Tage verwendet werden. Im Laufe der Zeit geht die transfizierte DNA durch zellinterne Prozesse (Abbau, Zellteilung, Ausschleusung) verloren.

Das zur Transfektion benötigte GFP-Vinculin-Plasmid (siehe Abbildung 12) wurde freundlicherweise von Professor Benjamin Geiger aus dem Weizman Institut, Israel zur Verfügung gestellt. Das von diesem Plasmid aus gebildete GFP-Vinculin wurde in die Adhäsionspunkte der Zelle eingebaut.

Zur Transfektion des Plasmids in die primären Osteoblasten wurde das FuGENE 6 Transfection Reagent der Firma Roche (Indianapolis, USA) verwendet. Eine genauere Beschreibung ist auf Grund des molekularbiologischen Charakters dieser Methode nicht sinnvoll. Für weitere Informationen kann die gängige Literatur zu Rate gezogen werden.

3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Beobachtung der beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffe verwendet man in der Regel ein invertiertes Mikroskop, dessen prinzipieller Strahlengang in Abbildung 13 gezeigt ist.

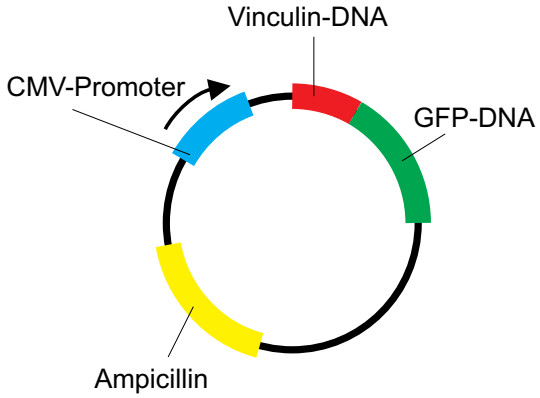

Abbildung 12: *Schematische Darstellung des GFP-Vinculin-Vektors zur transienten Transfektion von Osteoblasten. Hervorgehoben sind der CMV-Promoter, der die Bildung des Vinculin-GFP kontrolliert, das Resistenz-Gen Ampicillin, das Vinculin-Gen sowie die GFP-Sequenz.*

In dieser Arbeit wurde ein NIKON TE-2000U-Mikroskop benutzt, das die Möglichkeit bietet, das Emissionslicht auf verschiedene Ausgänge umzuleiten. Bei der verwendeten Lichtquelle handelt es sich um eine Xenon- oder Quecksilber-Kurzbogendampflampe. Das zur Anregung des Farbstoffes benötigte Spektrum wurde über Interferenzfilter oder einen Monochromator in das Mikroskop eingekoppelt und das Anregungslicht anschließend über einen dichroitischen Spiegel durch das Objektiv auf die Probe geleitet. Die von der Probe ausgesandte Fluoreszenz wurde ihrerseits vom Mikroskopobjektiv eingefangen und gelangte in die Detektionseinheit.

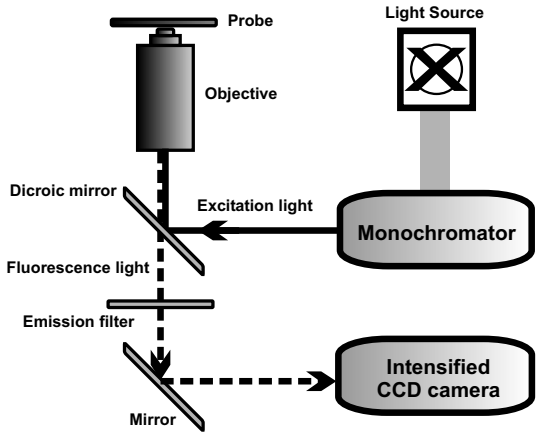

Abbildung 13: *Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau eines invertierten Mikroskops zu Fluoreszenzmessungen. Der Monochromator selektiert auf Grund der Gitterstellung das Anregungslicht bezüglich der Wellenlänge. Es wird über einen dichroitischen Spiegel durch das Mikroskopobjektiv auf die Probe geleitet. Die Fluoreszenz wird eingesammelt und gelangt durch den dichroitischen Spiegel auf einen Interferenzfilter, der Störsignale eliminiert. Die Detektion findet mit einer CCD-Kamera statt.*

3.5.1 Die Detektionseinheit

Die höchste Quanteneffizienz zur Detektion optischer Strahlung weisen Photomultiplier auf. Durch ihre kompakte Bauweise können sie in den meisten Applikationen problemlos

verwendet werden. Mit ihrer Hilfe wurde ein kompaktes, kostengünstiges und energiesparendes Fluoreszenzsystem aufgebaut, das im Rahmen von Parabel- und Raketenflügen zum Einsatz kam, um die Calciumkonzentration von Osteoblasten unter Schwerelosigkeit zu untersuchen [215].

Die Anwendung von Photomultipliern ermöglicht jedoch nicht die räumliche Abbildung einzelner Zellen. Auf Grund der schwachen Fluoreszenz der calciumsensitiven Farbstoffe kam eine doppelt-intensivierte CCD-Kamera zur Anwendung (Extended ISIS, Photonic Science, UK), deren Quanteneffizienz bei etwa 30% liegt und die eine Auflösung von 512x512 Bildpunkten liefert. Seit kurzem sind zusätzlich so genannte Electron-Multiplying-CCD-Chips (EMCCD-Chips) auf dem Markt verfügbar (beispielsweise der „Impactron“ von Texas Instruments). EMCCD-Chips basieren im Bau und in der Funktion auf dem Prinzip herkömmlicher CCD-Chips, verfügen jedoch über eine zwischen dem Verschiebe-Register und dem Ausgangverstärker zusätzlich eingefügte Verstärkungs-Struktur. Letztere dient der Vervielfachung der Elektronen, vermittelt durch Stoßionisation (siehe Abbildung 14), so dass deutlich höhere Quanteneffizienzen erreicht werden können (bis zu 60%). Die Stoßionisation wird durch das Anlegen einer Spannung von 40V bis 50V erreicht und ist damit wesentlich höher als zum einfachen Ladungstransport notwendig wäre. Auf diesem Weg können neben dem Ausleserauschen auch der dynamische Bereich und die Quanteneffizienz erheblich verbessert werden.

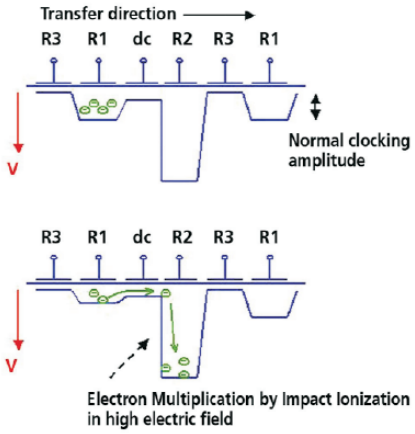

Abbildung 14: *Funktionsweise eines EMCCD-Chips: Durch Anlegen einer hohen Spannung am Register 2 (R2) des CCD-Chips kommt es zur Elektronen-Vervielfachung durch Stoßionisation (aus: Preliminary Specifications, Texas Instruments)*

Bei der Verwendung von Farbstoffen die eine deutlich höhere Emissionsintensität aufweisen kann auf den Einsatz einer intensivierten Kamera verzichtet werden. So wurde zur Abbildung von Mikrokugeln innerhalb von Polyacrylamidgelen (siehe Kapitel 5) eine Xilix Microimager 1400-10S-Kamera mit einem nicht intensivierten CCD-Chip verwendet. Diese Kamera besitzt einen CCD-Sensor mit 1300x1000 Bildpunkten. Sie wurde ebenfalls zur in-vivo-Darstellung GFP-fusionierter zellulärer Proteine (siehe Kapitel 3.4) und für Phasenkontrastaufnahmen von Zellen verwendet.

3.5.2 Die Lichtquelle

Die in der Fluoreszenzmikroskopie am häufigsten verwendeten Lichtquellen sind Quecksilber- oder Xenon-Kurzbogen-Hochdruckdampflampen. Beide weisen ein breites Emissionsspektrum (330nm bis 800nm) sowie eine hohe Lichtausbeute auf. Sie können daher für jeden erhältlichen Farbstoff verwendet werden.

Im Folgenden werden zwei Systeme vorgestellt, die je nach der Art des verwendeten Farbstoffes zur Anwendung kommen.

Die Xenondampflampe Für die Messung von Einzelwellenlängenfarbstoffen ist nur ein einfaches System, bestehend aus einer Xenondampflampe mit elliptischem Reflektor (300 Watt) und einem Interferenzfilter von Nöten. Bei diesem System wird das Licht über einen Quarz-Lichtleiter in das Mikroskop eingekoppelt und gefiltert, so dass das benötigte Anregungslicht zur Verfügung steht.

Das Quanticell-System Beim Quanticell-System (Visitech, UK) handelt es sich um ein Bildanalyse-System, das mit einem Monochromator arbeitet (siehe Abbildung 13), der von einer Quecksilberdampflampe beleuchtet wird und über ein motorisiertes Gitter verfügt. Letzteres ermöglicht einen schnellen Wechsel des Anregungsspektrums auch ohne den Austausch von Filtern. Mittels der zugehörigen „Quanticell 700m“-Software kann die gewünschte Wellenlänge selektiv innerhalb weniger Millisekunden neu gewählt werden. Das System ermöglicht damit die Messung der intrazellulären Calciumkonzentration mittels Fura-2 unter einer hohen Zeitauflösung. Hierbei wurden zur Verbesserung des Signal- zu Rauschverhältnisses mehrere Aufnahmen gemittelt, so dass eine Zeitauflösung von circa einem Bild pro Sekunde erreicht wurde.

3.6 Entwicklung einer Lichtquelle

Da das etwa 10 Jahre alte Quanticell-System hinsichtlich seiner Aufnahmekapazität beschränkt ist und deshalb die zeitliche Auflösung der Fluoreszenzexperimente limitiert, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Lichtquelle entwickelt. Diese Lichtquelle arbeitet mit aktueller Bildanalyse-Software und ist nicht nur kostengünstig, sondern auch einfach zu bedienen. Ihre Entwicklung und ihr Aufbau wird im Folgenden beschrieben.

3.6.1 Wahl einer geeigneten Lichtquelle

Zur Durchführung von Verhältnismessungen, wie beispielsweise mit dem Farbstoff Fura-2, muss das verwendete Beleuchtungssystem einen schnellen Wechsel zwischen verschiedenen Wellenlängenbereichen ermöglichen. Aus diesem Grund wäre die Anwendung von Leuchtdioden oder Laserdioden sinnvoll, da diese mit der entsprechenden Elektronik schnell an- und wieder ausgeschaltet werden können. Allerdings fiel die Entscheidung zur Entwicklung einer neuen Lichtquelle zu einem Zeitpunkt, zu dem keine Halbleiterkomponenten zu beziehen waren, die im Bereich von 340nm eine ausreichende optische Ausgangsleistung

besitzen. Des Weiteren wiesen die erhältlichen Leuchtdioden ein Strahlprofil auf, das nur schwer in herkömmliche Fluoreszenzmikroskope eingekoppelt werden konnte.

Neben den Dioden standen alternativ Kurzbogen-Hochdruckdampflampen zur Verfügung. Sie können über einen großen Spektralbereich hinweg Licht emittieren. Da das Leistungsspektrum von Xenon-Lampen im Vergleich zu Quecksilber-Lampen kontinuierlicher zwischen 340nm und 800nm verteilt ist und des Weiteren von diesen Lampen ein geringeres gesundheitliches Risiko ausgeht, fiel die Wahl auf eine Xenon-Kurzbogen-Hochdruckdampflampe (Leistungsaufnahme zwischen 150W und 500W).

3.6.2 Dynamischer Wechsel des Spektralbereichs

In dem in Kapitel 3.5 beschriebenen Quanticell-System (siehe Kapitel 3.5) wird ein motorisiertes Gitter verwendet, um mit diesem für Quotientenmessungen schnell zwischen verschiedenen Spektralbereichen wechseln zu können. Aus mechanischen Gesichtspunkten ist die Nutzung eines motorisierten Gitters allerdings problematisch: durch den innerhalb einer Sekunde mehrmaligen Wechsel der Anregungswellenlänge wirken hohe Kräfte auf die Komponenten. Da jedoch ein möglichst kostengünstiges und wartungsfreies System realisiert werden sollte, wurde von der Verwendung eines motorisierten Gitters abgesehen. Auch Filterräder weisen ein ähnliches Problem auf und sind nicht in der Lage, die Anregungswellenlänge bis zu 30 mal in der Sekunde zu verändern, um so beispielsweise die zeitlich hochaufgelöste Beobachtung der Calciumdynamik mit Fura-2 zu ermöglichen. In der Folge wurde ein System entwickelt, wie es bislang kommerziell nicht erhältlich ist. Hierbei handelt es sich um ein Lampengehäuse, das auf zwei senkrecht zueinander stehenden optischen Achsen das Licht der Dampflampe auskoppelt. Dadurch entfällt die komplizierte Justage von Lichtteilern, die außerhalb des Lampengehäuses die Aufteilung der Lichtwege ermöglichen würden.

3.6.3 Aufbau der Lichtquelle zur Quotientenmessung

In Abbildung 15 ist der prinzipielle Strahlengang der entwickelten Lichtquelle gezeigt. Die Xenon-Dampflampe strahlt in der Ebene des Lampenkolbens gleichmäßig, so dass in dieser Ebene zwei senkrecht zueinander stehende optische Achsen zur Auskopplung des Anregungslichts möglich sind. Damit das abgestrahlte Licht möglichst effektiv eingesammelt wird, sollte mit asphärischen Linsen gearbeitet werden. Auf Grund des benötigten Spektrums können jedoch nur Linsen aus Quarzglas oder BK7 (Transmission >95% bei 340nm) verwendet werden. Beide lassen sich nicht in einem Pressverfahren herstellen und sind standardmäßig nur mit einem Durchmesser von einigen Millimetern zu erhalten. Des Weiteren kann die Sammellinse wegen der Größe des Glaskolbens (Duchmesser etwa 2cm) nicht beliebig nah an der Lichtquelle positioniert werden. Deshalb ist ein größerer Durchmesser der Linse notwendig, um möglichst viel Licht einsammeln zu können. Auf Grund dieser Probleme wurde aus Kostengründen auf die Verwendung von asphärischen Linsen verzichtet. An ihrer Stelle kam eine zuvor berechnete Kombination aus insgesamt drei konvexen und einer konkaven Linse zum Einsatz (Linos, Deutschland, siehe Abbildung 15). Mit dieser kostengünstigen Lösung können auch randständige Strahlen zu einem großen Teil eingesammelt und annähernd kollimiert werden (Verminderung der sphärischen Abberati-

on auf Grund der Linsenanordnung). Die Kollimierung ist notwendig, da das Licht durch einen Interferenzfilter mit schmaler Bandbreite fällt und so das benötigte Anregungslicht herausgefiltert wird. Allerdings hängt dabei die spektrale Selektion vom Einfallswinkel des Lichts ab. Nach dem Interferenzfilter passiert das Licht die Öffnung eines magnetischen Verschlusses (engl. *„Shutter“*, Nr. 016, Prontor, Deutschland), um anschließend mit Hilfe einer weiteren Sammellinse auf einen Quarzglas-Lichtleiter von 3,4mm Durchmesser fokussiert zu werden (Spezialanfertigung, Schott, Deutschland). Über den Lichtleiter wird das Anregungslicht in das Mikroskop eingekoppelt.

Auf der Rückseite der Lampe wurde ein parabolischer Spiegel montiert. Dieser reflektiert das rückwärtig zur Auskopplungsrichtung abgestrahlte Licht der Lampe und fokussiert es in die Lampe zurück. Dabei wird zwar ein Teil des Lichts durch den Lichtbogen der Xenondampflampe absorbiert, die Lichtausbeute konnte jedoch trotzdem auf Grund dieses optischen Aufbaus um circa 60% gesteigert werden. Der Einbau eines manuellen Shutters (M32-615, Edmund Optics, USA) direkt vor dem parabolischen Spiegel sorgt zudem für die zur Justage der Auskopplungslinsen notwendige Eliminierung des rückwärtigen Lichts. Des Weiteren sind die Linsen und der parabolische Spiegel auf der optischen Achse (z-Achse) zum Teil gegeneinander verschiebbar (siehe Abbildung 15). Dadurch kann die chromatische Abberation des Lichts für verschiedene Spektralbereiche minimiert und damit eine effiziente Fokussierung des Lichts auf die Glasfaser für alle Wellenlängen gewährleistet werden. Daneben sind das gesamte Linsensystem und der parabolische Spiegel getrennt voneinander in der x- und y-Achse verschiebbar, so dass eine optimale Justierung auf die Ebene der maximalen Lichtausbeute der Xenon-Dampflampe erfolgen kann.

Beide Lichtwege sind identisch aufgebaut und koppeln jeweils das Anregungslicht in eines der Enden des dreiarmigen Lichtleiters ein (der dritte Arm steht für einen weiteren Ausbau des Systems zur Verfügung; in der Abbildung 15 nicht gezeigt). Auf Grund der durch die parabolischen Spiegel verursachten doppelten Refokussierung in den Glaskolben wurde ein leistungsstarker Ventilator in das Lampengehäuse integriert (7806 ES, Papst, Deutschland). Dieser sorgt durch einen maximalen Volumenstrom von bis zu $380 m^2/h$ für eine niedrige Sockeltemperatur der Dampflampe. Diese darf auf der Anodenseite 200°C und auf der Kathodenseite 160°C nicht übersteigen. Die an den Sockeln angebrachten Kühlrippen (nicht gezeigt) verbessern hierbei die Wärmeabfuhr. Mittels zweier NTC1000 können die Sockeltemperaturen mit einem elektronischen Thermometer abgelesen werden.

Die Ansteuerung der magnetischen Shutter erfolgt mittels der Bildanalyse-Software *„Metafluor 4“*. Sie ermöglicht die stufenlose Einstellung der Öffnungszeiten und sendet über die parallele Schnittstelle TTL-Signale an eine entsprechend entwickelte Elektronik. Letztere wiederum stellt an die Shutter die erforderliche Spannung, so dass diese geöffnet und geschlossen werden können. Gleichzeitig wird mittels der Software das Signal der CCD-Kamera aufgezeichnet und als Bilddatei auf der Festplatte gespeichert. Im Falle von Fura-2 werden die Shutter abwechselnd geöffnet und dabei die Fluoreszenz nach Anregung bei 380nm und Anregung bei 340nm aufgezeichnet. Anschließend wird aus den aufgenommen Bildern zu jedem Zeitpunkt das Verhältnis berechnet.

Die Entwicklung des beschriebenen Systems ermöglicht auch bei zeitlich hochaufgelösten Messungen eine Langzeitmessung über mehrere Stunden, da die Aufzeichnungslänge nur von der Größe der Festplatte begrenzt wird.

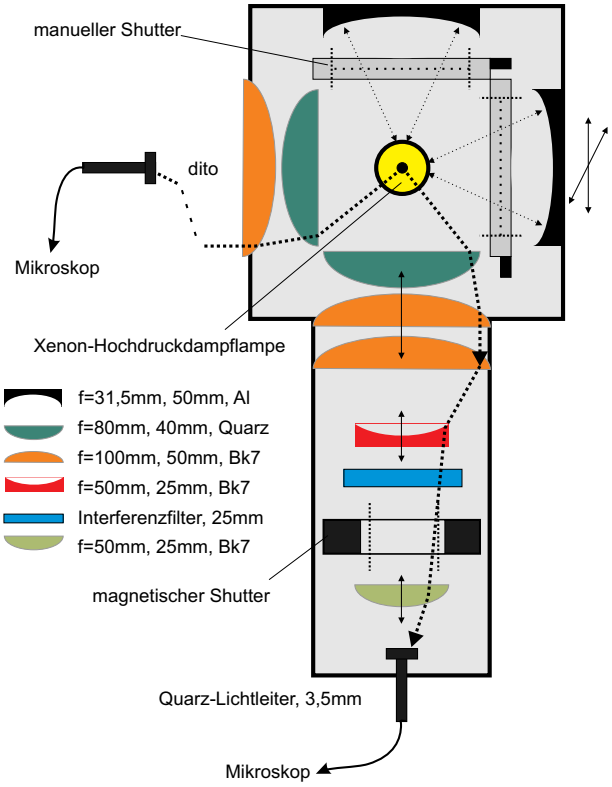

Abbildung 15: *Schematische Darstellung der Lichtquelle für Quotientenmessungen. Der zweite Lichtweg ist nur ansatzweise abgebildet. Die Pfeile mit durchgezogenen Linien geben die Verstellmöglichkeiten der Linsen und Hohlspiegel an, während die Pfeile mit unterbrochenen Linien den Weg des abgestrahlten Lichts beschreiben.*

3.7 Die ACLAR-Dehnungsapparatur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung verschiedener mechanischer Reize auf Osteoblasten untersucht, um damit die Frage beantworten zu können, ob unterschiedliche mechanische Reize eine differenzierte Zellantwort auslösen und wenn ja, ob das an einer unterschiedlichen Beeinflussung intrazellulärer Strukturen liegt. Für diese Experimente wird hier eine Dehnungsapparatur vorgestellt [125], mit der die gezielte Applikation von Dehnungsreizen auf die Zellen möglich ist. Sie erlaubt die Dehnung eines elastischen Substrates zwischen zwei Klemmpunkten mittels eines DC-Elektromotors (siehe Abbildung 16).

Als Substrat diente den Zellen ACLAR-Folie (Aclar, Honeywell, England). Bei ACLAR handelt es sich um ein biologisch inertes Material mit homogen-elastischen Eigenschaften bei einer Stärke zwischen 51 μm und 198 μm. Des Weiteren weist ACLAR-Folie keine Autofluoreszenz auf und verfügt über sehr gute Transmissionseigenschaften auch im nahen ultravioletten Bereich. Diese Eigenschaften sind für die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wie Fura-2 entscheidend. Mit der Dehnungsapparatur können Dehnungszyklen bis 20.000$\mu\epsilon$ ($\mu\epsilon$ = relative Längenänderung; 1$\mu\epsilon$ entspricht einer Längenänderung von 0,0001%) und 10 Hz gefahren werden, ohne plastische oder viskoelastische Verformungen des Substrates zu beobachten. Zur Untersuchung der Zellen unter physiologischen Bedingungen wird auf die ACLAR-Folie ein Silikonring geklebt, der einen Mediumsstand von

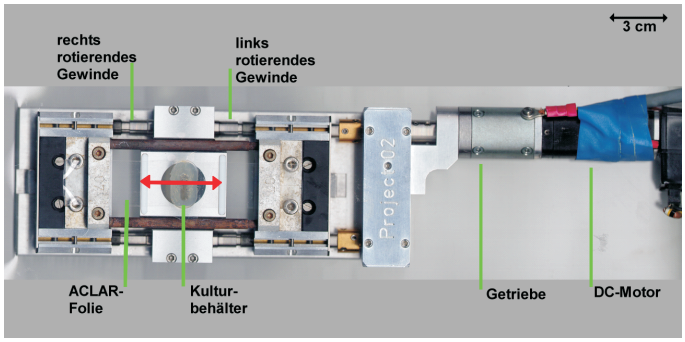

Abbildung 16: *Die motorisierte Dehnungsmaschine im Detail: die zwischen zwei Klemmpunkten befestigte ACLAR-Folie wird mittels eines DC-Motors zyklisch in der Länge gedehnt. Die Zellen befinden sich dabei innerhalb eines Silikonrings, der als Zellkammer dient.*

circa 3 mm Höhe erlaubt.

3.8 Die parallele Scherflusskammer

Eine andere Möglichkeit, Zellen mechanisch zu stimulieren, sind Scherflüsse. Sie treten im Knochen durch einen Flüssigkeitsstrom in den Canaliculi auf. In dieser Arbeit wurden Scherflussexperimente durchgeführt, um einen weiteren Vergleich zwischen verschiedenen Stimulationsarten und deren Auswirkung auf die Adhäsionsseite und damit einen Rückschluss auf einen möglichen Mechanosensor der Zelle zu erhalten.

Damit Zellen einer bestimmten Scherkraft ausgesetzt werden können, muss die Strömungsgeschwindigkeit und deren Auswirkung auf die Zellen bekannt sein. Die exakte Beschreibung laminarer und turbulenter Strömungen ist trotz zahlreicher Modelle schwierig. Im Folgenden wird die Physik und der Aufbau einer parallelen Scherflusskammer und die Berechnung der resultierenden Scherkräfte beschrieben.

3.8.1 Laminare Strömungen in abgegrenzten Volumina

Die parallele Scherflusskammer besteht aus zwei einander gegenüberliegenden Platten, die im Vergleich zur Kammer-Länge nur einen geringen Abstand von h<<L aufweisen (siehe Abbildung 17). Für die Zellexperimente wurden auf einer der beiden innenliegenden Platten Zellen kultiviert, so dass diese in die Zellkammer hinein zeigen. Der Flüssigkeitsstrom durch die Kammer entsteht in Folge eines Druckgradienten. Zur Berechnung der auf die Zellen wirkenden Scherkraft wird eine Newtonsche Flüssigkeit angenommen, so dass sich die Wandscherkraft (bei unendlich großer Breite der Platten und konstantem Fluss) ausgehend von der Navier-Stokes-Gleichung für Flüssigkeiten aus der Flussrate Q wie folgt ergibt:

$$\tau_w = \frac{6\eta Q}{h^2 b} \tag{2}$$

Dabei charakterisiert η die Viskosität der Flüssigkeit und b beziehungsweise w das Maß der Flusskammer (siehe 17). Die Kammerabmessungen sind realistisch betrachtet natürlich nicht unendlich groß, sondern weisen definierte Längen auf, so dass das Geschwindig-

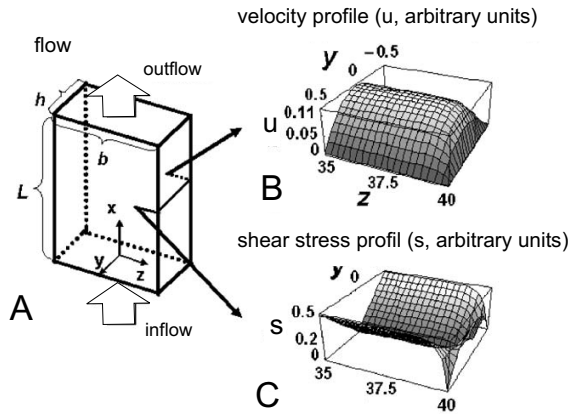

Abbildung 17: *Berechnung der Scherkräfte in der parallelen Scherflusskammer. (A) Zeichnung der Kammer (b: Breite, h: Höhe, L: Länge). (B) und (C): Geschwindigkeits- beziehungsweise Scherkraftprofil für ein Längenverhältnis b/h = 80. Die Pfeile zeigen an, an welcher Stelle die Profile genommen wurden (aus [4]).*

keitsprofil zwar in parabolischer Form erhalten bleibt, jedoch an den Grenzen des rechteckigen Kanals verschwindet. Das Scherkraftprofil, das mittels des Geschwindigkeitsgradienten berechnet wird, weist ein Maximum an den Plattenoberflächen auf, während es in den Ecken der Kammer verschwindet.

Ein Maß für die Art eines in einem abgegrenzten Volumen vorliegenden Flüssigkeitsflusses ist die Reynoldszahl. Sie ist von der Beschaffenheit des Flusskörpers abhängig und gibt den Umschlagspunkt an, ab dem eine laminare in eine turbulente Strömung übergeht. So sind beispielsweise in der Literatur Reynoldszahlen von 1160 bis 2300 zu finden, ab denen bei glatten Rohren keine laminare Strömung mehr vorliegt. Die Berechnung der Reynoldszahl eines Flüssigkeitsflusses erfolgt nach folgender Formel:

$$Re = \frac{\rho \overline{u} d_{gl}}{\eta} \tag{3}$$

Dabei stellt ρ die Dichte der Flüssigkeit dar, $\overline{u}$ die Geschwindigkeit (die sich aus der Gesamtmenge an Flüssigkeit ergibt, die durch die Kammer geflossen ist) und d_{gl} den hydraulischen Durchmesser. Das Design der Scherflusskammer wurde so gewählt, dass mit physiologischen Strömungsgeschwindigkeiten eine laminare Strömung garantiert ist.

3.8.2 Design der Scherflusskammer

Die Entwicklung einer Gradienten-Scherflusskammer wurde von Usami beschrieben [230]. Bei dieser Kammer ändert sich die Kammerbreite graduell mit der Länge (siehe Abbildung 18), so dass ein ortsabhängiges Geschwindigkeitsprofil der Strömung resultiert. Die Form der Kammer ist so gewählt, dass die Fließgeschwindigkeit in Bezug zur Kammerlänge linear zu- beziehungsweise abnimmt.

Der Nachteil der Gradienten-Scherflusskammer liegt in der komplizierten Bestimmung der Position der beobachteten Zelle während der Stimulation. Um diesem Problem zu begegnen, wird eine Scherflusskammer verwendet, deren Breite über die Länge der Kammer

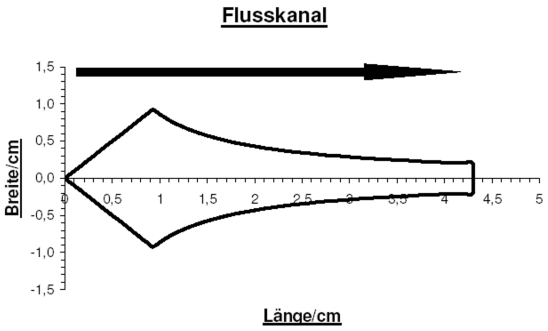

Abbildung 18: *Schematische Darstellung der Breite des Flusskanals der Gradienten-Scherflusskammer und der Flussrichtung.*

konstant bleibt (b = 6 mm). Auch die Höhe (130 μm) und die Länge (6 cm) der Kammer sind definierte Parameter. Die Höhe und das Kammerprofil werden durch eine Metallfolie vorgegeben. Diese befindet sich zwischen zwei Deckgläsern, von denen eins mit Zellen kultiviert wurde.

Der für die Messung notwendige konstante Flüssigkeitsstrom kann auf zwei Arten erzeugt werden. Zum einen können kalibrierte Perfusionspumpen das Medium in die Scherflusskammer pumpen. Zum anderen bietet sich die Möglichkeit der Nutzung einer Potentialdifferenz, die zwischen einem Mediumbehälter und der Flusskammer besteht als treibende Kraft an.

Die Berechnung der Reynoldszahl der verwendeten Scherflusskammer zeigte, dass diese deutlich unter zwanzig liegt. Folglich bildet sich bei der eingestellten Flussgeschwindigkeit eine laminare Strömung aus.

3.9 Molekular- und Zellbiologische Methoden

Obwohl im Rahmen dieser Arbeit in erster Linie physikalische Methoden verwendet wurden, um hiermit biologische und physikalische Sachverhalte auf der zellulären Ebene klären zu können, sind auch einige molekular- und zellbiologische Methoden notwendig.

Die Mechanik des Mechanosensor wurde mit Hilfe eines Kraftmikroskops untersucht. Hierbei diente die intrazelluläre Calciumdynamik als Merkmal für eine initiierte Mechanotransduktion. Es besteht die Möglichkeit, dass unterschiedliche Stimulationsarten verschiedene Mechanotransduktionswege in Gang setzen und damit auch die Calciumdynamik beeinflussen können. Diese soll in dieser Arbeit genauer untersucht und die Herkunft der für eine Calciumantwort benötigten Calciumionen geklärt werden. Entweder stammen die zusätzlichen Calciumionen aus dem intrazellulären Speicher (ER) oder strömen durch Ionenkanäle in die Zelle ein. So konnte mit Thapsigargin geklärt werden, ob intrazelluläre Speicher an der Generierung von Calciumsignalen beteiligt sind. Mit Manganionen, Cadmium, Lanthan und EGTA wurde hingegen überprüft, ob und auf welchem Wege die Calciumionen aus dem Extrazellulärmedium in die Zelle einströmen.

Des Weiteren wurden zur erweiterten Analyse der Calciumdynamik Vergleichsmessungen mit dem Parathormon PTH durchgeführt, das eine intrazelluläre Calciumantwort auslöst.

Wie in Kapitel 2.3.6 erwähnt kann die mechanische Stimulation von Knochenzellen zu einer aktiven Antwort des Zytoskeletts führen. In der Folge war für die Messung der zellinternen Kraftweiterleitung eine Blockade der aktiven Kraftgeneration durch ML-7 notwendig. Auf diesem Weg wurde es möglich, nur die passive Zellmechanik untersuchen zu können.

3.9.1 Thapsigargin

Thapsigargin ist ein Tumor-Promoter, der die Aktivität der Ca^{2+}-ATPase des Endoplasmatischen Retikulums (ER) unterbindet. Der Funktionsverlust dieses Enzyms führt zu einer Blockade der Aufnahme freier Calciumionen in das ER. Da Calcium im Zuge physiologischer Prozesse in das Zytosol abgegeben wird, kommt es zur Entleerung dieses intrazellulären Calciumspeichers: ein endogenes Leck entsteht [227, 212, 222].

Zur Messung der intrazellulären Calciumkonzentration wurden die Zellen zunächst mit Fura-2 gefärbt und anschließend mit 5μM Thapsigargin (Calbiochem, USA) inkubiert. Innerhalb von 30 bis 60 Minuten kam es zu einer vollständige Entleerung des ERs.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, ob die Stimulation der Zellen zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels durch die Freisetzung von Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum führt.

3.9.2 Parathormon (PTH)

Das Parathormon (PTH) ist ein Hormon der Nebenschilddrüse, das unter anderem zur Regulation des Calcium- und Phosphathaushalts benötigt wird. Setzt man dem Zellmedium PTH zu, so kommt es zu einer intrazellulären Signalkaskade, bei der eine Botenstoff-Rezeptor-vermittelte Signalkette die Bildung von Inositoltriphosphat initiiert. Inositoltriphosphat seinerseits bindet an die Rezeptoren des Endoplasmatischen Retikulums und aktiviert hier Calciumkanäle. In der Folge wird die Calciumkonzentration in den Zellen erhöht (siehe 3.9.1) [246, 68]. Im Gegensatz zu anderen Zellen besitzen Osteoblasten eine große Anzahl an PTH-Rezeptoren, so dass durch die Stimulation mit PTH (Endkonzentration zwischen 10nM und 800nM) bei gleichzeitiger Beobachtung der Calciumkonzentration die Phänotypisierung von Osteozyten erfolgen kann (siehe Kapitel 3.2.3).

3.9.3 Manganionen

Da das physiologische Verhalten der Manganionen dem der Calciumionen ähnelt, sind sie in der Lage, die Calcium-spezifischen Ionenkanäle zu passieren. Auch Manganionen binden, jedoch mit einer 42-fach höheren Affinität, den Farbstoff Fura-2 [86]. Bei dieser Bindung werden die Fluoreszenz-Eigenschaften von Fura-2 zerstört; der Farbstoff wird „gequencht“. Dieses Phänomen macht man sich zur Untersuchung der Aktivität von Calciumkanälen zu Nutze [244]. Hierfür wurden die Zellen im Rahmen dieser Arbeit zunächst mit Fura-2 gefärbt und anschließend mit 2mM Manganionen für wenige Minuten inkubiert. Durch den ständigen Austausch intra- und extrazellulärer Ionen (Lecks, Ionenpumpen und -kanäle) werden die intrazellulären Calciumionen im Laufe der Zeit durch Manganionen substituiert. Folglich steht für die eigentlichen Experimente in der Regel nur eine halbe Stunde zur

Verfügung, bevor die Fluoreszenz des Farbstoffes zu stark abgenommen hat. Beobachtet man mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops den Einstrom von Calciumionen durch die Ionenkanäle, so kann ein starker Abfall der Fluoreszenzintensität verzeichnet werden, da die einströmenden Manganionen zum Quenchen von Fura-2 führen. Diese Methode ermöglichte neben der Untersuchung der Herkunft der Calciumionen bei einer intrazellulären Konzentrationserhöhung auch die Unterscheidung zwischen zellinternen und -externen Quellen des Calciums [156].

3.9.4 Cadmium und Lanthan

Cadmium und Lanthan sind Schwermetalle, die zur Untersuchung der Aktivität von Calciumkanälen verwendet werden. Cadmium ist ein zweiwertiges Kation, das den Einstrom von Calciumionen via Calciumkanälen in die Zelle unterbinden kann [103, 157]. Schon geringe Konzentrationen von weniger als 10 μM führen zur Blockade der spannungsabhängigen Calciumkanäle. Da jedoch bei den durchgeführten Experimenten eine Blockade aller Calciumkanäle der Zelle erwünscht war, wurde Cadmium mit einer Konzentration von 10mM dem Medium zugesetzt [104].

Bei Lanthan handelt es sich um ein dreiwertiges Kation, das - im Gegensatz zu Cadmium - auf Grund des elektrochemischen Gradienten über der Plasmamembran, extrazellulär an die Membran gebundenes Calcium ersetzt. Durch diesen Ionenaustausch werden alle aktiven und passiven Transportvorgänge von Calciumionen in die Zelle unterbunden [104]. Um eine vollständige Blockade aller Calcium-Transportvorgänge zu erreichen, wurde einem „reduzierten Zellmedium“ (siehe Kapitel 3.10) Lanthan in einer Endkonzentration von 100μM zugesetzt. Das „reduzierte Zellmedium“ enthielt keine Bikarbonate und Phosphate [196], da ansonsten sowohl Cadmium als auch Lanthan auf Grund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften zu einer Ausflockung im Medium führen würden.

3.9.5 EGTA

Hinter der Abkürzung EGTA verbirgt sich der Chelator (Komplexbildner) „EthyleneGlycol-bis(beta-aminoethylether)-N,N'-Tetra-acetic-Acid“. EGTA ist in der Lage, freie Calciumionen zu einem Komplex zu binden und ermöglicht damit die Einstellung der Calciumkonzentration in einem Medium [3]. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um im Experiment die extrazelluläre Calciumkonzentration auf den intrazellulären Wert einzustellen, so dass es zur Aufhebung des Konzentrationsgradienten kam. Der Wegfall des Gradienten war zur Klärung der Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration von Nöten. Für diese Experimente wurde dem Medium EGTA in Konzentrationen von 1μM bis 5μM zugesetzt.

3.9.6 ML-7

Das Zytoskelett dient neben der Adhäsion auch der aktiven Formveränderung, der Zytoplasmabewegung sowie den Transportvorgängen in der Zelle. Die Erzeugung der für diese Prozesse notwendigen Kräfte erfolgt durch die Interaktion von Aktinfilamenten und

Myosin-II. Letzteres wird durch die Calcium/Calmodulin-abhängige Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK) mobilisiert, deren Funktion durch ML-7 (Sigma Aldrich, USA) unterbunden werden kann.

ML-7 ist eine synthetische Verbindung, die an die ATP-Bindungsstelle der MLCK bindet und diese blockiert [201, 81]. Hierdurch wird die zur Aktivierung von Myosin-II notwendige Umlagerung eines Phosphations an der MLCK verhindert. Zur Blockade der MLCK-Aktivität wurden die Zellen mit ML-7 in Konzentrationen von 1μM bis 10μM für eine Stunde inkubiert.

3.10 Zellmedien

Experimente mit den Schwermetallen Cadmium und Lanthan erfolgten in reduziertem Medium (in der Tabelle als *„red. Medium“* bezeichnet). Der pH-Wert der Medien wurde auf 7,4 eingestellt. Da die Pufferkapazität der Medien durch den stetigen CO_2-Austausch an der Medium-Luft-Schicht begrenzt ist, musste bei der Verwendung offener Zellkammern die Perfusionsrate so gewählt werden, dass der pH-Wert 7,8 nicht überstieg.

Die in der Arbeit verwendeten Zellmedien sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

	PBS(Dulbecco)	**HAM´s F10**	**red. Medium**
Stoff	mg/ml	mg/ml	mg/ml
NaCl	8000	7400	7400
KCl	200	285	373
NaH_2PO_4	1150	154	-
$NaH_2PO_4xH_2O$	-	-	-
KH_2PO_4	200	83 -	-
$MgCl_2x6H_2O$	100	-	407
$MgSO_4x7H_2O$	-	153	-
$CaCl_2$	100	44	222
Glucose	-	1100	1800
Phenolrot	-	1,2	1,2
$NaHCO_3$	-	1200	-
$FeSO_4$ $7H_2O$	-	0,834	-
$CuSO_4$ $5H_2O$	-	0,00249	-
$ZnSO_4$ $7H_2O$	-	0,0288	-
Na-Pyruvat	-	110	-
Hepes	2380	2380	2380

4 Das Kraftmikroskop

In diesem Kapitel wird eine Einführung in die Rasterkraftmikroskopie (*engl. „Atomic Force Microscopy“ - AFM)* und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Biologie gegeben. Daneben erfolgt die Darstellung eines Kraftmikroskops, das zur gezielten mechanischen Stimulation einzelner Zellen unter Berücksichtigung verschiedener Stimulationsparameter auf der Basis der Rasterkraftmikroskopie entwickelt wurde [214, 130]. Des Weiteren werden die in dieser Arbeit erfolgten Weiterentwicklungen des Kraftmikroskops besprochen, die zur Untersuchung der Mechanotransduktion in Osteoblasten notwendig waren.

4.1 Einleitung

Die Basis des AFMs bildet die Rastertunnelmikroskopie (*engl. „Scanning Tunelling Microscopy“ - STM*), die topographische Abbildungen von elektrisch leitenden Oberflächen in atomarer Auflösung ermöglicht. Das STM wird vor allem zur Charakterisierung von Halbleiteroberflächen verwendet. Der entscheidende Nachteil, dass mittels des STMs nur leitende Materialien untersucht werden können, führte im Jahr 1986 zur Entwicklung des Rasterkraftmikroskops durch Binnig, Gerber und Quate [15]. Binnig wurde für diese Erfindung mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Die Funktionsweise des AFMs ähnelt der eines STMs: eine Spitze mit möglichst geringem Durchmesser wird über die zu untersuchende Oberfläche der Probe bewegt. Die Spitze befindet sich dabei an dem einen Ende eines Auslegers (Cantilever). Im Gegensatz zum STM werden die topographischen Änderungen jedoch nicht durch ein zwischen Spitze und Probe angelegtes elektrisches Feld, sondern direkt über die Auslenkung des Cantilevers bestimmt. Diese wird durch die Wechselwirkung zwischen Spitze und Probenoberfläche hervorgerufen und mit Hilfe eines auf den Rücken des Cantilevers gelenkten Laserstrahls erfasst. Die Rasterkraftmikroskopie ermöglicht in lateraler Richtung eine Auflösung bis in den Sub-Nanometer-Bereich und ist damit um ein Vielfaches besser als die Lichtmikroskopie. In vertikaler Richtung kann die Auflösung bis in den atomaren Bereich erhöht werden [80]. Mit der Entwicklung des AFMs gelang es erstmals, Oberflächen von nicht-leitenden Materialien mit einer Genauigkeit von 10^{-10}m abzubilden [167].

Das physikalische Prinzip des Rasterkraftmikroskops gleicht dem einer Feder. Durch die Interaktion zwischen Oberfläche und Cantilever-Spitze, die in Abhängigkeit vom Abstand durch verschiedene Kräfte (zum Beispiel van-der-Waals- oder Coulomb-Kräfte) unterschiedlich stark beeinflusst wird, kommt es zu einer Auslenkung des Cantilevers. Diese kann mittels eines Laserstrahls und einer Vier-Quadranten-Photodiode auf weniger als einen Nanometer genau bestimmt werden. Wird die Härte des Cantilevers und damit die Federkonstante im Hinblick auf die Materialeigenschaften der zu untersuchenden Oberfläche richtig gewählt, so können auch sehr weiche Oberflächen einer strukturellen Beobachtung unterzogen werden. Mit einem System, das die Auslenkungen der Feder zur topographischen Darstellung nutzt, können, wenn die Federkonstante des Cantilevers bekannt ist, auch Kräfte im Bereich von einigen Piko-Newton (pN) gemessen oder appliziert werden. Auf dieser Kraftskala spielen sich unter anderem molekulare Bindungs- und intrazelluläre Vorgänge ab. Trotz dieser Möglichkeiten erfolgte erst vor einigen Jahren die

Adaption und Anwendung der Rasterkraftmikroskopie auf biologische und chemische Fragestellungen [91, 132, 141].

In den letzten Jahren hat sich das Rasterkraftmikroskop für Zellbiologen als ein wichtiges Werkzeug etabliert. Es dient unter anderem der topographischen Abbildung einzelner Zellen oder deren Strukturen [85, 133, 179] wie dem Zytoskelett [192]. Aber auch einzelne Teile der Zellstrukturen [127] und sogar DNA-Stränge konnten dargestellt [208] und letztere hinsichtlich ihrer mechanischen Stabilität untersucht werden [28]. Hierbei wird die Sensibilität der Kraftmessung unter anderem zur Bestimmung von zellulären [200] und bakteriellen Adhäsionskräften [59] sowie von Bindungskräften zwischen einzelnen Proteinen oder Molekülen genutzt [199, 142]. Die Möglichkeit, extrem kleine Kräfte exakt messen zu können, macht man sich auch bei der Erforschung der mechanischen Eigenschaften von Zellen zu Nutze. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen sollen helfen, das Verhalten von Zellen physikalisch besser zu verstehen [184, 203, 22]. Auch dynamische Vorgänge in Zellen [218] sowie die Kraftverteilung innerhalb der Zelle und deren Weiterleitung zum Substrat [152] werden untersucht. Trotz der genannten Beispiele steht die Anwendung der Rasterkraftmikroskopie in der Zellbiologie aber noch immer an ihren Anfängen.

Die in dieser Arbeit beschriebene Planung und Entwicklung eines Kraftmikroskops zur gezielten Stimulation einzelner Osteoblasten erfolgte zu einem Zeitpunkt, zu dem kommerzielle Systeme nicht für kombinierte Anwendungen mit invertierten Mikroskopen hergestellt wurden. Das hier verwendete Kraftmikroskop ist für die mechanische Stimulation von biologischem Gewebe bei simultaner Fluoreszenzmessung optimiert. Inzwischen sind auf dem Markt kommerzielle Systeme zur Anwendung in der Biologie erhältlich (z.B. Bioscope, Veeco, USA).

Im folgenden Abschnitt wird zunächst der Aufbau des eindimensionalen Kraftmikroskops vorgestellt, das die vertikale Stimulation (bedeutet hier: relativ zur Adhäsionsrichtung) einzelner Zellen ermöglicht. Die Weiterentwicklung zu einem dreidimensionalen Kraftmikroskop und der damit verbundenen Möglichkeit, die Richtung der Stimulation beliebig zu wählen, sowie prinzipiell topographische Messungen durchführen zu können, wird in dem darauf folgenden Kapitel besprochen. In einem weiteren Punkt werden die notwendige Kalibrierung des Kraftmikroskops für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen und die Bestimmung der Federkonstanten der Cantilever beschrieben. Am Ende erfolgt die Darstellung der externen Frequenzgenerierung, die eine entscheidende Verbesserung des Kraftmikroskops darstellt.

4.2 Das eindimensionale Kraftmikroskop

Das eindimensionale Kraftmikroskop ermöglicht - in Bezug auf adhärente Zellen - eine gezielte mechanische Stimulation aus vertikaler Richtung. Die Apparatur wurde entsprechend den Prinzipien eines Rasterkraftmikroskops entwickelt (siehe Abbildung 19).

4.2.1 Die Detektionseinheit

Die Detektionseinheit besteht aus einem Laser, der auf den Rücken des Cantilevers fokussiert wird. Von hier gelangt das reflektierte Licht über einen Goldspiegel auf einen posi-

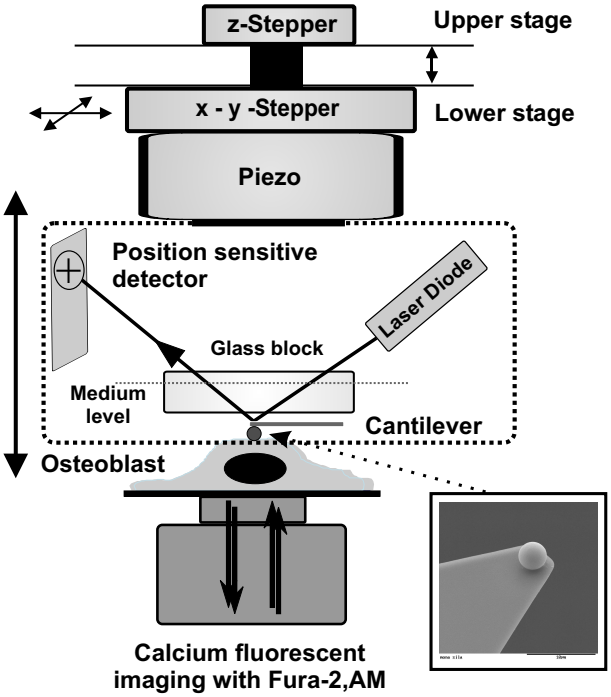

Abbildung 19: *Schematische Darstellung des Kraftmikroskops zur eindimensionalen Stimulation von Zellen. Das Licht einer Laserdiode wird auf den Cantilever fokussiert und das reflektierte Licht so auf einen positionsempfindlichen Detektor geleitet, dass die Auslenkung des Cantilevers bestimmt werden kann. Ein Glasblock dient zur Stabilisierung der Brechungsebenen im Medium. Die gesamte Detektionseinheit ist zur groben Positionierung oberhalb der Probe an drei Schrittmotoren befestigt. Der eindimensionale piezoelektrische Verschiebetisch steuert die vertikale Positionierung der optischen Detektionseinheit. Das System ist auf einem invertierten Fluoreszenzmikroskop aufgebaut und anstelle einer möglichst kleinen Spitze befindet sich an dem einen Ende des Cantilevers eine 10µm messende Silika-Kugel.*

tionsempfindlichen Detektor (*engl. „Position Sensitive Device“ - PSD*). Ein PSD (1L30, SiTek, Schweden) ist einer Vier-Quadranten-Photodiode [180] vorzuziehen, da mit ersterem auch große Auslenkungen ohne Nichtlinearitäten detektiert werden können [37]. Kleine Auslenkungen des Cantilevers werden auf Grund des langen Lichtweges am Detektor in große Auslenkungen des Laserstrahls umgesetzt (siehe Abbildung 20). Der positionsempfindliche Detektor liefert Photoströme, die mit der Lichtverteilung korrelieren. Mit dieser lässt sich die Auslenkung des Cantilevers bis in den atomaren Bereich bestimmen. Um bei den Messungen den Kontakt des Substrates mit der Deckglasoberseite zu vermeiden, befindet sich der Ausleger in einer Halterung, die eine Inklination von 13° aufweist.

Da die Messung an Zellen in einer Flüssigkeitskammer erfolgt, ist direkt oberhalb des Cantilevers ein Block aus Polykarbonat positioniert. Dieser wird verwendet, um den Durchgang des Laserstrahls durch die Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht zu vermeiden. Letztere könnte zu ungewollten Variationen der Lichtverteilung auf dem PSD und somit zu scheinbaren Auslenkungen des Cantilevers führen. Beispielsweise könnte schon eine geringe Änderung des Flüssigkeitsstandes in der Zellkammer die Reflektions- und Brechungseigenschaften und damit den Ort des Laserspots so verändern, dass Artefakte in der Messung entstünden.

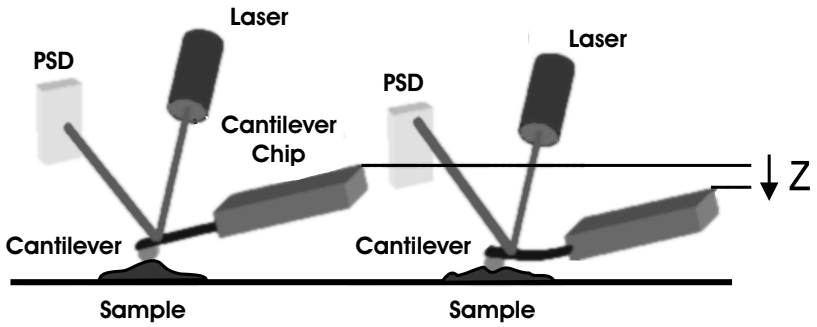

Abbildung 20: *Grundprinzip der optischen Detektion des Kraftmikroskops. Dargestellt ist der Strahlengang ohne Deflektion des Auslegers (linkes Bild) und nachdem der Cantilever durch eine z-Verschiebung der Detektionseiheit ausgelenkt wurde (rechtes Bild). Durch die Auslenkung ändert sich die Lichtverteilung auf dem PSD.*

4.2.2 Positionierung des Detektors

Zur lateralen Positionierung der Detektionseinheit relativ zu der zu untersuchenden Oberfläche, ist diese an zwei elektrischen Schrittmotoren (SM30, OWIS, Deutschland) befestigt. Mittels eines dritten Schrittmotors können zwei planparallele Platten, die die Basis der Kraftapparatur bilden, vertikal zueinander verschoben werden. Da die komplette Detektionseinheit an der unteren Platte befestigt ist, kann eine grobe vertikale Positionierung oberhalb der zu untersuchenden Probe vorgenommen werden.

Um den Betrieb des Kraftmikroskops auf einem invertierten Fluoreszenzmikroskop zu ermöglichen, wurde das System so entworfen, dass es stabil auf drei vertikalen Führungsstangen steht, an denen die planparallelen Platten befestigt sind. Die Zellkammer besitzt ein integriertes Perfusionssystem, das einen kontinuierlichen Austausch des Nährmediums gewährleistet (siehe Abbildung 21). Die innerhalb der Zellkammer erforderliche Temperatur von 37°C wird mittels eines elektronischen Regelkreises am Rand der Kammer von Ohmschen Widerständen erzeugt.

Die Fein-Positionierung des Cantilevers und damit des Detektionskopfes erfolgt mittels einer piezoelektrischen Keramik (P-753.31C, Physik Instrumente, Deutschland). Diese ermöglicht die Positionsänderung des Messkopfes in vertikaler Richtung relativ zur Flüssigkeitskammer (und damit zu den Zellen) mit einer Genauigkeit von 0,2nm. Hysterese- und Schleicheffekte können dabei nahezu ausgeschlossen werden, da der piezoelektrische Kristall über einen kapazitiv gekoppelten Abstandssensor verfügt. Der Verstellweg beträgt 38μm, so dass große Auslenkungen des Cantilevers ermöglicht werden. Über eine Regelschleife (Steuergerät: E-661.CP, Physik Instrumente, Deutschland) lassen sich gezielt Positionen mit einer Wiederholungsgenauigkeit von 3nm ansteuern. Durch die Integration der piezoelektrischen Keramik im Detektionskopf kann das System mit einem invertierten Mikroskop kombiniert werden. Dabei ist im Gegensatz zu herkömmlichen Rasterkraftmikroskopen, die das Anbringen der Probe auf dem Piezo voraussetzen, die piezoelektrische Keramik vor Flüssigkeiten aus der Zellkammer geschützt. So kann einer Zerstörung des Piezos vorgebeugt werden.

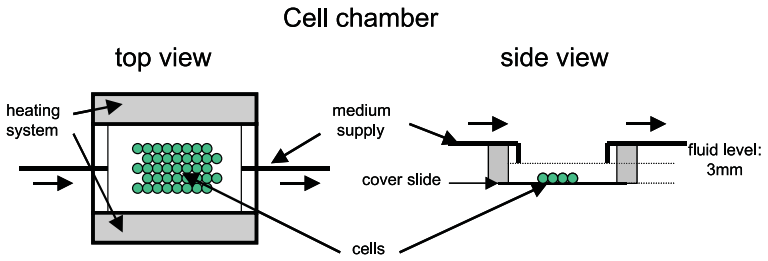

Abbildung 21: *Schematische Darstellung der Zellkammer mit Perfusionssystem und Temperaturstabilisierung.*

4.2.3 Ansteuerung des Kraftmikroskops

Sowohl der piezoelektrische Kristall als auch die Schrittmotoren werden über einen Computer angesteuert. Auch das Auslesen der analogen PSD-Signale erfolgt rechnergestützt. Das hierfür erforderliche Programm wurde in Delphi 5.0 (Borland, USA) geschrieben und erlaubt das Programmieren beliebiger Stimulationsprofile. Die Umwandlung analoger Signale vom PSD (± 10V) und vom kapazitiven Sensor des piezoelektrischen Kristalls in digitale Werte erfolgt mit der MAD-16 in Kombination mit einer PCI-Base-300 (BMC Schetter, Deutschland). Die für den Piezo-Kristall generierten digitalen Stellsignale werden über die MDA-16 (BMC Schetter, Deutschland) analog gewandelt. Da die PCI-Base-300 auf Grund ihrer Treiberkonfiguration ein direktes Schreiben der Werte auf die Festplatte (*engl. streaming*) ermöglicht, stellt eine Abtastrate von 1kHz kein Problem dar. Alle notwendigen Kalibrierungsmethoden wurden in die Software integriert. Des Weiteren erfolgte die Automatisierung vieler Messroutinen, so dass das System eine Reihe von Messungen autonom, ohne benutzerbedingte Eingriffe durchführen kann. Hierdurch können äußere Störeinflüsse minimiert werden. Der Zugang zu allen Regelalgorithmen erlaubt außerdem eine flexible und individuelle Anpassung der Apparatur und der Stimulationsprofile.

4.2.4 Der Cantilever

Sofern nicht anders erwähnt wurden in dieser Arbeit Cantilever des Typs NP-S der Firma Veeco (USA) verwendet. Ihre Federkonstante beträgt 0,075N/m, so dass sie mit dem Kraftmikroskop eine Kraftauflösung von circa 200pN ermöglichen. Die Cantilever weisen eine dreieckige Form (V-Form) auf. Bisher nahm man an, dass diese soll Vergleich zur rechteckigen Form eine höhere Stabilität gegenüber lateralen Kräften (Torsion) gewährleistet. Diese Annahme wurde jedoch in letzter Zeit auf Grund präziserer Messungen in Frage gestellt. Diese zeigten, dass die Torsionssteifigkeit von V-Cantilevern nur unter bestimmten Voraussetzungen höher ist [197].

Für hochauflösende topographische Messungen besitzen die Cantilever eine scharfe Spitze, die im Idealfall an ihrem äußersten Ende nur ein Atom aufweist. Die kommerziellen Cantilever haben laut Hersteller (Veeco, USA) einen Radius zwischen 5nm und 40nm. Da ein solcher Radius die Zellmembranen zu schnell verletzen würde, wurden Cantilever ohne Spitze erworben und jeweils mit einer kleinen Mikrokugel mit einem Durchmesser zwischen 4μm und 20μm versehen (siehe Abbildung 19). Die Mikrokugeln bestehen aus Silika-Glas und wurden mit Epoxy-Heißkleber in einem Verfahren nach Raiteri und Preuß [186] an

die Cantilever geklebt; für eine ausführlichere Beschreibung siehe [214].

4.3 Das dreidimensionale Kraftmikroskop

In diesem Kapitel erfolgt die Beschreibung der in dieser Arbeit durchgeführten Weiterentwicklung des eindimensionalen Kraftmikroskops zu einem dreidimensionalen Kraftmikroskop, das zur Untersuchung der richtungsspezifischen Mechanotransduktion diente.

Während nicht-adhärente Zellen ein dreidimensionales, fast isotropes System darstellen, besitzen adhärente Zellen eine ausgezeichnete Richtung. Das lässt die Vermutung zu, dass nicht nur Stimulationsfrequenz und -amplitude beziehungsweise die Zyklenzahl einen Einfluss auf die Mechanotransduktion haben, sondern auch eine Richtungsabhängigkeit existiert. Um die eventuelle Richtungsabhängigkeit der Mechanotransduktion untersuchen zu können, war die Weiterentwicklung des Kraftmikroskops zu einer dreidimensionalen Messeinheit notwendig (siehe Abbildung 22). Das dreidimensionale Kraftmikroskop wird im Folgenden beschrieben.

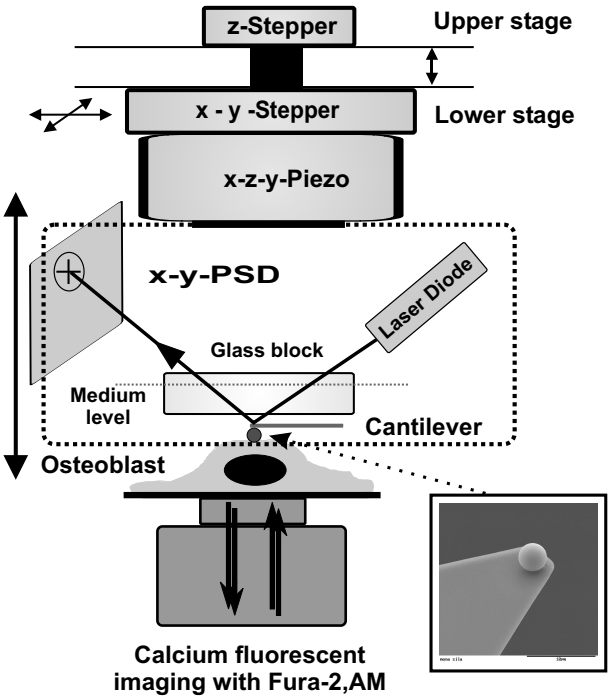

Abbildung 22: *Schematische Darstellung des Kraftmikroskops für die dreidimensionale Stimulation: Das Licht einer Laserdiode wird auf den Cantilever fokussiert und das reflektierte Licht so auf einen dreidimensionalen, positionsempfindlichen Detektor geleitet, dass sowohl die vertikale Verbiegung als auch die laterale Torsion des Cantilevers bestimmt werden kann. Ein Glasblock dient zur Stabilisierung der Brechungsebenen im Medium. Die gesamte Detektionseinheit ist zur groben Positionierung oberhalb der Probe an drei Schrittmotoren befestigt. Die Kombination aus ein- und zweidimensionalen piezoelektrischen Verschiebetischen ermöglicht die dreidimensionale Positionierung der optischen Detektionseinheit und damit die Stimulation der Probe. Das gesamte System ist auf einem invertierten Fluoreszenzmikroskop aufgebaut und anstelle einer möglichst kleine Spitze befindet sich an dem einen Ende des Cantilevers eine 10µm messende Silika-Kugel.*

4.3.1 Prinzip der Detektionseinheit

Zur topographischen Vermessung einer Oberfläche wird in kommerziellen Systemen die Spitze eines Cantilevers über die Probe gerastert. Das Rasterkraftmikroskop kann hierbei, je nach Material und Umgebungsbedingungen, in verschiedenen Modi betrieben werden. Im Kontaktmodus (*„contact-mode“*) steht der Cantilever permanent mit der Probenoberfläche in Verbindung und wird seitlich über die Probe gefahren. Dabei erfolgt eine vertikale Auslenkung des Cantilevers. Mittels der hierbei gewonnenen Daten kann die Topographie der Probe bestimmt werden. Die auf Grund von Reibungskräften zwischen Spitze und Oberfläche zusätzlich auf den Cantilever wirkenden lateralen Kräfte verursachen eine Verdrehung (Torsion). Obwohl solche torsionalen Effekte bei topographischen Messungen eher unerwünscht sind, hat sich hieraus ein weiteres Spezialgebiet, die Nanotribologie, etabliert. Sie untersucht Reibung auf der Nanometerskala. Hierbei zeigen sich völlig andere physikalische Effekte als aus der makroskopischen Analyse der Reibung bekannt sind [131]. Die laterale Kraft auf den Cantilever kann unter Zuhilfenahme der torsionalen Federkonstante bestimmt werden.

Das beschriebene Prinzip wurde auf die Kraftapparatur übertragen, um laterale Kräfte auf Zellen ausüben zu können. Die exakte Bestimmung der vertikalen Auslenkung des Cantilevers kann im Prinzip weiterhin mit Hilfe eines eindimensionalen PSDs (siehe Kapitel 4.2) erfolgen. Stößt der Cantilever nun jedoch lateral gegen eine Zelle, so wird er verdreht. In der Folge kommt es, im Vergleich zur Änderung der Lichtverteilung auf dem PSD bei vertikaler Auslenkung des Cantilevers, zu einer orthogonalen Auslenkung des Laserstrahls. Sie ist in Abbildung 23 dargestellt: der Cantilever befindet sich zunächst, aus der Rich-

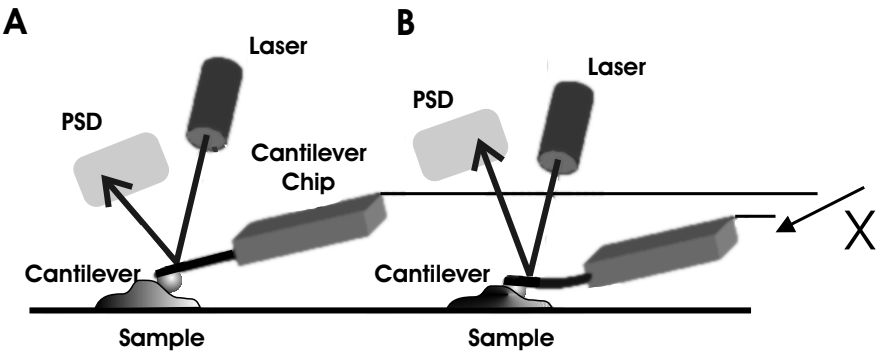

Abbildung 23: *Das Grundprinzip der optischen Detektion des Kraftmikroskops ist in der Abbildung schematisch dargestellt. (A) Der Cantilever befindet sich aus der Sicht des Betrachters hinter der Probe (Sample) und steht mit dieser nicht in Kontakt. Folglich liegt keine Torsion vor. (B) Der Cantilever tritt durch die laterale Verschiebung der Detektionseinheit in x-Richtung mit der Probe in Kontakt und wird dabei verdreht. An dem positionsempfindlichen Detektor kann in der Folge eine laterale Auslenkung des Laserstrahls beobachtet werden.*

tung des Betrachters, hinter der Probe (A). Beim Auftreffen auf die Probe (B) ändert sich durch die Torsion des Cantilevers die laterale Deflektion des Laserstrahls. Letztere kann mit einem eindimensionalen PSD durch eine Drehung des Detektors um 90° gemessen werden. Neben der lateralen Deflektion des Cantilevers treten aber zusätzlich vertikale Kräfte auf. Damit bei den Messungen beide Achsen synchron beobachtet werden können, muss ein zweidimensionaler positionsempfindlicher Detektor zum Einsatz kommen. Das

hierfür verwendete PSD registriert die Lichtintensität in zwei Ebenen und hat eine aktive Fläche von 20x20mm (2L20-CP7, SiTek, Schweden). Die durch Lichteinfall entstehenden Photoströme werden über vier Kontakte abgeleitet. Aus der Differenz- und Summenbildung dieser Photoströme kann die x- und y-Position des Laserspots (der Lichtverteilung) wie folgt berechnet werden:

$$X = \frac{I_{a1} - I_{a2}}{I_{a1} + I_{a2}} \tag{4}$$

$$Y = \frac{I_{c1} - I_{c2}}{I_{c1} + I_{c2}} \tag{5}$$

Ähnlich dem eindimensionalen PSD besitzt der zweidimensionale PSD über den gesamten Detektions-Bereich eine hohe Linearität. Um die Detektion bezüglich des neuen Freiheitsgrades zu optimieren, wurden einige Bauteile wie zum Beispiel die Spiegelhalterung modifiziert.

4.3.2 Positionierung des Detektors

Um aus dem eindimensionalen Kraftmikroskop ein dreidimensionales zu erhalten, wurde ein zweiter piezoelektrischer Kristall eingebaut, der einen Verstellweg von 100μm in zwei zusätzlichen Ebenen ermöglicht (P-734.2CL, Physik Instrumente, Deutschland). Die Ansteuerung der beiden Achsen erfolgt mittels Regelungen des Typs E612.C0 (Physik Instrumente, Deutschland), die in ein gemeinsames Chassis (E501.10 Physik Instrumente, Deutschland) integriert werden. Durch kapazitive Sensoren wird ein *„Close-Loop-Betrieb“*, wie er in Kapitel 4.2 beschrieben ist, ermöglicht. Da die *„out-of-face“*-Bewegung des Piezos maximal zwei Nanometer beträgt, wird die vertikale Positionierung kaum beeinflusst.

4.3.3 Ansteuerung des Kraftmikroskops

Die rechnergestützte Ansteuerung aller Komponenten und das Auslesen der Messwerte des eindimensionalen Kraftmikroskops erfolgen über eine PCI-Schnittstelle (PCI-Base-300) und mittels der AD/DA-Wandler MAD16 und MDA16 (siehe Kapitel 4.2). Die Erweiterung des Systems auf drei Dimensionen erforderte zusätzliche Ein- und Ausgangs-Kanäle. Diesen waren notwendig, um die Ansteuerung des piezoelektrischen Verschiebetisches, das Auslesen des Monitorsignals der kapazitiven Sensoren und das Auslesen des zweidimensionalen PSDs zu ermöglichen.

Da zwei PCI-Base-300-Karten nicht gleichzeitig in einem Rechner betrieben werden können, wurde auf das Nachfolgemodell (PCI-Base-1000) zurückgegriffen. In der Praxis zeigte sich jedoch, dass dieses System kein „streaming“, das heißt ein „fließendes“ Wegschreiben der Eingangsdaten auf die Festplatte erlaubt. Das wäre jedoch zum Erhalt einer Abtastrate des PSD-Signals von 1000Hz notwendig. Um nicht auf wesentlich teurere Hersteller zurückgreifen zu müssen, wurde eine alternative Lösung realisiert: das Stellsignal des Piezos wird zunächst für jeden Zeitpunkt der Stimulation vom Computer berechnet, anschließend alle anderen laufenden Prozesse gestoppt und ein so genannter „Thread“ gestartet. Dieser übermittelt die für die Zeitpunkte berechneten Stellsignale in Echtzeit an den Piezo. Um das beschriebene Prinzip auf alle drei Dimensionen übertragen zu können,

wurde ein zweiter Rechner (Nebenrechner) mit einer PCI-Base-300 und entsprechenden AD/DA-Karten bestückt, der zweidimensionale piezoelektrische Verstelltisch angeschlossen und ein rudimentäres Windows 98 installiert. Eine direkte Netzwerkverbindung zwischen den beiden Computern erlaubt den Austausch von Daten. Die Idee hierbei war es, mit Hilfe einer schnellen Datenverbindung auch die Funktionen des Nebenrechners und damit die Ansteuerung des zweidimensionalen Piezos über den Hauptrechner zu ermöglichen. Wie Tests zeigten, können kurze Zeichenketten (Strings) über das TCP/IP-Protokoll mit Verzögerungen von deutlich unter 5ms übertragen und vom Computer befehlsorientiert zerlegt und ausgeführt werden. Damit kann die Ansteuerung des zweidimensionalen Piezos durch den Hauptrechner über die Netzwerkverbindung zum Nebenrechner nahezu in Echtzeit erfolgen und auch kombinierte Stimulationen (laterale und vertikale Richtungskomponenten) können ohne signifikante Phasendifferenz durchgeführt werden. Die Programmierung aller Routinen erfolgte auch hier in Delphi 5.

Die beschriebene Messanordnung stellte sich als sehr effizient, kostengünstig und sicher heraus. Durch die Einbindung neuer Routinen, zum Beispiel der Kalibrierung der Cantilever innerhalb des Hauptprogramms gelang es, viele Prozesse zu automatisieren und zu vereinfachen. So konnten alle Messungen im kalibrierten Zustand durchgeführt und gespeichert werden.

4.4 Kraft-Abstands-Kurven, Kalibrierung und Federkonstante

Die Kraft-Abstands-Kurven stellen typische Datensätze von Messungen mit dem Kraftmikroskop dar. Sie ermöglichen zahlreiche Analysen. Um Kräfte aus diesen Kurven ablesen zu können, muss einer bestimmten Auslenkung des Cantilevers eine bestimmte Kraft zugeordnet werden. Diese Kalibrierung erfordert ebenfalls die Erzeugung von Kraft-Abstands-Kurven.

Da zur Kalibrierung der Cantilever deren Federkonstanten erforderlich sind, werden anschließend unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der vertikalen und lateralen Federkonstanten dargestellt.

4.4.1 Kraft-Abstands-Kurven und Kalibrierung

Jede zyklische Stimulation ermöglicht die Messung des Wertepaares „Abstand“ (die Piezoauslenkung) und „Auslenkung“ (das PSD-Signal). Dieses Wertepaar dient der Generierung einer Kraft-Abstands-Kurve. Für die Messung wird der Cantilever an die Oberfläche angenähert und nach Erreichen des maximalen Ausschlags zurück in die Ausgangsstellung gebracht. Ist die Position der Oberfläche bekannt, kann der absolute Abstand zwischen Cantileverspitze und Oberfläche berechnet werden.

Bei Messungen auf einem festen Substrat wie beispielsweise Glas erhält man eine Kraft-Abstands-Kurve wie in Abbildung 24 dargestellt: die rote Kurve (Annäherungskurve) zeigt die Auslenkung des Cantilevers, die während der Annäherung an die Oberfläche auftritt. Da kein Kontakt zur Oberfläche besteht, ist die Steigung der Kurve zunächst Null. Ist das Substrat erreicht, wird der Cantilever ausgelenkt. Dabei ist die Änderung der Ausgangsspannung am PSD linear an die Auslenkung des Cantilevers und damit an den Stellwert

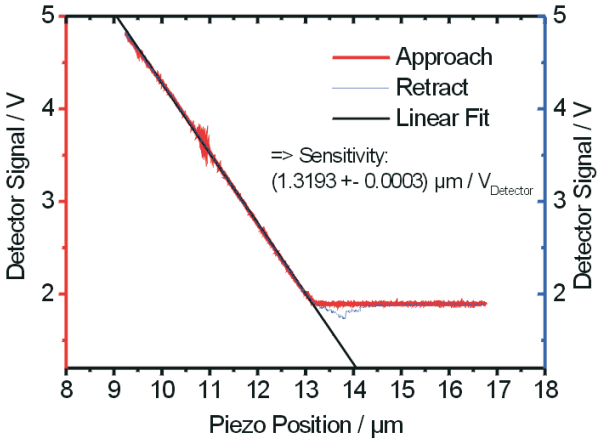

Abbildung 24: *Kraft-Abstands-Kurve auf einer harten Oberfläche (Glas). Aufgetragen ist die Auslenkung des Cantilevers (Detector Signal) gegenüber der Piezoausdehnung (Piezo Position). Die rote Kurve entsteht durch die Annäherung des Cantilevers an die Glasoberfläche, bis es durch den Kontakt zur Auslenkung kommt. Die blaue Kurve beschreibt den Rückzug des Cantilevers von der Oberfläche. Die in schwarz dargestellte lineare Ausgleichsgerade dient der Berechnung der Sensitivität der Apparatur. Ist diese bekannt, so können Auslenkungen am PSD direkt in eine Kraft umgerechnet werden.*

des Piezos gekoppelt (siehe linearen Fit in Abbildung 24). Die blaue Kurve der Graphik zeigt die Verbiegung des Cantilevers während des Rückzugs von der Oberfläche nach Erreichen der maximalen Auslenkung an (Rückzugskurve). Die hierbei zwischen der Spitze und der Oberfläche auftretenden Adhäsionskräfte führen so lange zu einer negativen Verbiegung, bis die Adhäsionskräfte überwunden sind und der Cantilever in seine Ruhestellung zurückkehrt. Durch die Steigung der Kraft-Abstands-Kurve im Kontaktbereich kann die Sensitivität der Apparatur, das heißt das Verhältnis von der Piezoverschiebung zur Änderung des PSD-Signals [nm/V] ermittelt werden. Mit Hilfe der Sensitivität kann bei elastischen und viskoelastischen Materialien die nichtlineare Deflektion des Cantilevers in eine Kraft umgerechnet werden. Hierfür muss die Federkonstante bekannt sein. Je kleiner der Wert der Sensitivität und der Federkonstanten ist, desto besser ist die Kraftauflösung des Systems.

Nach der oben beschriebenen Kalibrierung des Systems können Zellen mechanisch stimuliert werden. Die Stimulation führt zu Kraft-Abstands-Kurven, wie sie exemplarisch in Abbildung 25 gezeigt ist: zu Beginn der Stimulation sind die applizierten Kräfte zunächst gering und die Zelle ist sehr weich (kleines Elastizitätsmodul), so dass eine kleine Steigung der Annäherungskurve (rot) resultiert. Mit zunehmender Deformation der Zelle nimmt ihre Steifigkeit zu. Nach Erreichen der maximalen Auslenkung wird der Cantilever mit dem gleichen Geschwindigkeitsprofil wie bei der Annäherung in seine Ausgangsstellung zurückgebracht (schwarze Rückzugskurve), wobei die Zelle teilweise deformiert bleibt. Diese viskoelastische Deformation kann am Abstand zwischen Annäherungs- und Rückzugs-Kurve abgelesen werden. Unter Zuhilfenahme der zuvor bestimmten Sensitiviät und der Federkonstanten kann jetzt das PSD-Signal in eine Kraft umgerechnet werden (Y-Achse der

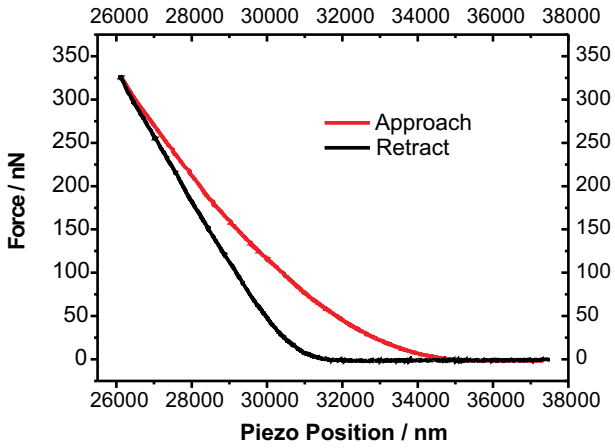

Abbildung 25: *Kraft-Abstands-Kurve auf einer Zelle, aufgenommen mit dem Kraftmikroskop. Die am PSD registrierte Auslenkung des Cantilevers wurde direkt in eine Kraft umgerechnet. Die rote Kurve gibt die Annäherung des Cantilevers auf die Zelloberfläche wieder. Die schwarze Kurve stellt den Rückzug des Cantilevers dar. Durch die viskoelastischen Eigenschaften der Zelle liegt die Rückzugskurve unterhalb der Annäherungskurve. Aus der Fläche zwischen den beiden Kurven kann die dissipierte Energie berechnet werden.*

Abbildung 25).

Neben der maximalen Kraft kann aus den Kraft-Abstands-Kurven auch die graduelle Steifigkeitszunahme der Zelle und die in das Zellsystem eingebrachte Energie berechnet werden. Letztere wird durch die Fläche zwischen Annäherungs- und Rückzugs-Kurve repräsentiert.

Die Kraft-Abstands-Kurven zeigen teilweise höherfrequente Rauschanteile, die von äußeren Störeinflüssen herrühren. Hierfür sind neben dem Anwender in erster Linie Gebäudeschwingungen - hervorgerufen zum Beispiel durch Klimaanlagen - verantwortlich. Diese Rauschquellen begrenzen die Kraftauflösung des Systems erheblich. Um das Rauschen möglichst gut eliminieren zu können, wurde ein mit Luft gedämpfter Schwebetisch (500er Serie, TMC, USA) verwendet. Jedoch weist der Frequenzgang des Tisches Tiefpass-Eigenschaften auf, so dass Schwingungen unter 30Hz nur schlecht gedämpft werden (siehe Abbildung 26). Hier entsteht ein Problem, da die Gebäudeschwingungen im Bereich zwischen 20 und 25 Hz liegen. Selbst eine Optimierung des Schwebetisches konnte dieses Problem nur zum Teil beheben, da die größten Amplituden in lateraler Schwingungsrichtung auftreten. Letztere werden jedoch deutlich schlechter gedämpft als vertikale Schwingungen. Der Einsatz eines aktiv-gedämpften Schwebetisches, beispielsweise auf der Basis piezoelektrischer Verstelleinheiten, könnte das Problem lösen, scheiterte jedoch an Kostengründen.

4.4.2 Bestimmung vertikaler Federkonstanten

Die vertikale Federkonstante eines Cantilevers kann häufig dem Datenblatt des Herstellers entnommen werden. Die Produktion der Cantilever erfolgt in großer Stückzahl auf Wafern. Da Ihre Federkonstante mit der Position auf dem Wafer um bis zu 20% variieren kann, ist die Kalibrierung jedes einzelnen Cantilevers notwendig. Im Folgenden werden die

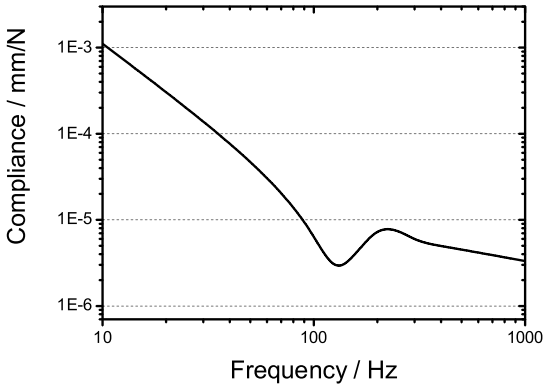

Abbildung 26: *Dämpfungseigenschaften des Schwebetisches von TMC (Quelle: TMC)*

wichtigsten Kalibrierungsmethoden erläutert.

Thermisches Rauschen und Substrat-Kopplung Die Federkonstante eines Cantilevers kann durch die Analyse des thermischen Rauschens bestimmt werden. Da sich ein Cantilever wie ein Federpendel mit angehängter Masse verhält, folgt dieser dem Hook´schen Gesetz. Dieses besagt, dass die Rückstellkraft einer Feder proportional zu deren Auslenkung ist. Auf Grund der thermischen Anregung hat ein solcher harmonischer Oszillator immer eine mittlere Energie, die sich nach dem Gleichverteilungssatz der Thermodynamik zu gleichen Teilen auf potentielle und kinetische Energie aufteilt:

$$H = \frac{p^2}{2m} + \frac{1}{2} m \omega_0^2 q^2 \tag{6}$$

Mittels der Boltzmann-Konstanten ergibt sich damit für die Federkonstante der Cantilever:

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle} \tag{7}$$

Dabei charakterisiert $\langle q^2 \rangle$ die mittlere quadratische Auslenkung des Oszillators. Quadriert man das Schwingungsspektrum, so ergibt sich das Leistungsdichtediagramm. Nach dem Parsevalschen Theorem entspricht dabei die Fläche unter der Kurve der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle q^2 \rangle$. Durch Anfitten mit einer Lorentzkurve kann die Fläche bestimmt werden. Eine detailliertere Beschreibung der Berechnung erfolgte durch Hutter [111]. Der Nachteil bei der Verwendung des thermischen Rauschens zur Bestimmung der Federkonstanten liegt in der verhältnismäßig großen Ungenauigkeit. Der Standardfehler beträgt bis zu 30% [178]. Der Vorteil ist jedoch, dass mit dieser Methode Cantilever mit angeklebten Mikrokugeln, wie sie im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kamen, kalibriert werden können. Der verwendete Kleber beeinflusst die Federkonstante des Cantilevers und wird beispielsweise in der Berechnung der Federkonstanten nicht berücksichtigt (siehe folgenden Abschnitt).

Alternativ zu der oben vorgestellten Methode des thermischen Rauschens kann die von Craig beschriebene Prozedur zu Kalibrierung von Cantilevern angewendet werden [38]. Bei

dieser Methode wird unter dem zu kalibrierenden Cantilever ein Substrat mit harmonischen Oszillationen angeregt. Die Schwingungen des Substrates koppeln über viskoelastische Effekte mit der kolloidalen Sonde des Cantilevers. Dessen dynamische Antwort kann daraufhin zur Bestimmung der Federkonstanten herangezogen werden. Auch wenn hier die am Cantilever angeklebten Partikel zur Bestimmung der Federkonstanten berücksichtigt werden, ist diese Methode jedoch experimentell zu aufwendig.

Berechnung der Federkonstanten Die einfachste Möglichkeit, die Federkonstante eines Cantilevers zu bestimmen, ist die Berechnung mit Hilfe seiner physikalischen Eigenschaften [205]. Jedoch ist auch diese Methode mit großen Fehlern behaftet. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$k = \frac{Ew}{4}\left(\frac{t}{l}\right)^3 \tag{8}$$

Dabei symolisiert k die Federkonstante für balkenförmige Cantilever, w, t und l seine Breite, die Höhe und die Länge. E charakterisiert das Elastizitätmodul des Auslegers. Letzteres lässt sich allerdings nur schwer bestimmen. Die Höhe stellt einen kritischen Parameter dar, da sie in der dritten Potenz in die Berechnung eingeht. So führen kleine Variationen bei der Herstellung bereits zu einer erheblichen Änderung der Federkonstanten. Schon das Bedampfen mit Gold führt zu einem signifikanten Einfluss auf das Elastizitätsmodul des Cantilevers und damit auf die Federkonstante. Außerdem wurden in der vorgestellten Kraftapparatur überwiegend V-förmige Cantilever verwendet, so dass eine weitere Näherung in die Berechnung einfließen müsste.

Verschiebung der Resonanzfrequenz Eine wesentlich genauere Methode zur Bestimmung der Federkonstanten wurde von Cleveland vorgestellt [29]. Durch das Anhängen kleiner Partikel an die Spitze des Cantilevers wird dessen Masse verändert (engl. *„added mass method“*). Die Änderung der Masse bewirkt eine Verschiebung der Resonanzfrequenz des Cantilevers. Wird der Cantilever als ideales Federpendel betrachtet, so kann die Resonanzfrequenz durch folgende Formel errechnet werden:

$$\nu = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{k}{M + m^*}} \tag{9}$$

In dieser Formel wird die effektive Masse des Cantilevers durch m^* und die an der Spitze angebrachte zusätzliche Masse durch M charakterisiert. Die Änderung der Masse erfolgt durch die Adhäsion kleiner Partikel, deren Größen im Elektronenmikroskop bestimmt werden. Über die Dichte der Partikel wiederum kann ein Rückschluss auf deren Masse gezogen werden. Die Bestimmung der Resonanzfrequenz erfolgt durch einen Spektrum-Analysator. Trägt man die effektive Masse gegen $1/\nu^2$ auf, so kann an mindestens zwei Messpunkten eine lineare Regression durchgeführt und die Federkonstante bestimmt werden.Der Vorteil dieser Methode liegt mit einer Standardabweichung von etwa 5% in der relativ hohen Genauigkeit. Da jedoch der experimentelle Aufwand sehr hoch ist, ist es sinnvoll, mit diesem Verfahren nur einen Referenz-Cantilever zu kalibrieren und diesen zur Bestimmung der Federkonstanten anderer Cantilever zu benutzen.

Kalibrierung mit Referenzcantilevern Der mit Clevelands Methode erstellte Referenz-Cantilever dient der Kalibrierung anderer Cantilever. Hierzu wird die Spitze des zu kalibrierenden Cantilevers gegen den Referenz-Cantilever gedrückt (siehe Abbildung 27) und eine Kraft-Abstands-Kurve aufgenommen. Anschließend wird die Sensitivität des zu kali-

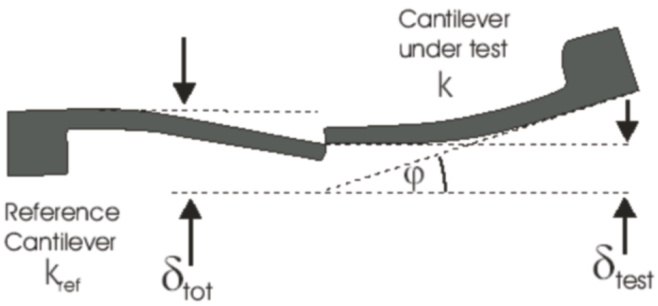

Abbildung 27: *Schnelle Bestimmung der Federkonstanten mit Hilfe eines Referenzcantilevers. Dabei wird der zu kalibrierende Cantilever gegen einen kalibrierten Referenzcantilever gedrückt. Aus den Verschiebewegen δ_{tot} und δ_{test} sowie dem Inklinationswinkel φ kann nach der Gleichung 10 die Federkonstante des Cantilevers berechnet werden.*

brierenden Cantilevers bestimmt, indem eine Kraft-Abstands-Kurve auf einer harten Oberfläche aufgenommen wird. Aus den Steigungen der zwei Kraft-Abstands-Kurven kann mit Hilfe der Federkonstanten des Referenzcantilevers die Federkonstante des zu kalibrierenden Auslegers bestimmt werden:

$$k = k_{ref} \frac{C_{Glas} - C_{Cl}}{C_{Cl} cos\varphi} \tag{10}$$

Dabei charakterisieren C_{Cl} und C_{Glas} die Steigungen der Kraft-Abstands-Kurven, die aus der Sensitivitätsmessung (Cantilever gegen Glas) und der Referenz-Cantilever-Messung (Cantilever gegen Referenzcantilever) gewonnen wurden [79, 225]. φ kennzeichnet den Inklinationswinkel des Referenzcantilevers (siehe Abbildung 27). Die Standardabweichung liegt bei unter 10% und der Einfluss der angeklebten Partikel wird berücksichtigt.

Die Methode bietet eine gute Möglichkeit, schnell und verhältnismäßig genau die Federkonstanten einer größeren Anzahl von Cantilevern zu ermitteln und wurde deshalb in dieser Arbeit verwendet.

4.4.3 Bestimmung lateraler Federkonstanten

Im Vergleich zu vertikalen Federkonstanten ist die Messung lateraler (torsionaler) Federkonstanten ungleich schwieriger.

„wedge“-Kalibrierung Eine Methode zur Ermittlung der torsionalen Federkonstanten stellt die so genannte *„wedge-calibration“* dar [60]. Unter Verwendung kommerziell hergestellter Substrate, die zwei Steigungen definierter Größe aufweisen, wird die Kontaktantwort des Cantilevers gemessen. Die Kalibrierungsgitter [207] konnten bis vor kurzem wegen des kleinen Abstands der für die Kalibrierung notwendigen Strukturen nur für Cantilever

mit feinen Spitzen verwendet werden. Neuerdings können jedoch Substrate erworben werden, die eine Kalibrierung kollodialer Cantilever erlauben [231].

Berechnung lateraler Federkonstanten Die apparativen Voraussetzungen zur Bestimmung der lateralen sind im Vergleich zu der vertikaler Federkonstanten deutlich anspruchsvoller. Da jedoch in erster Linie qualitative laterale Stimulationen durchgeführt wurden, genügt hier eine ungefähre Bestimmung der lateralen Federkonstanten. Sie kann aus den Materialeigenschaften des Cantilevers gewonnen werden:

$$k_\Phi = \frac{D_0 c}{6\,(1+\nu)\,(L-\Delta L)} \times \left\{ 1 - \frac{\tanh\left(\frac{L-\Delta L}{c}\sqrt{6\,(1-\nu)}\right)}{\sqrt{6\,(1-\nu)}} \frac{c}{L-\Delta L} \right\} \tag{11}$$

Dabei ist D_0=Et^3 (E: Elastizitätsmodul), t die Dicke des Cantilevers, ν das Poissonverhältnis und ΔL die Strecke zwischen dem Befestigungspunkt der Mikrokugel (Sonde des Cantilevers) und dem äußeren Ende des Cantilevers. Die Formel wurde aus der Scheibentheorie abgeleitet [190, 197] und diente in dieser Arbeit der einfachen Abschätzung lateraler Federkonstanten rechteckiger Cantilever.

4.5 Externe Frequenzgenerierung

In diesem Abschnitt wird eine wesentliche Weiterentwicklung sowohl des eindimensionalen als auch des dreidimensionalen Kraftmikroskops beschrieben, die in der Möglichkeit zur externen Generierung der Stimulationszyklen liegt.

Problemstellung Die Schwachstellen des auf Windows 98 basierenden Kraftmikroskop-Systems offenbarten sich in Verzögerungen der Datenübertragung zum piezoelektrischen Verstelltisch, die während der Stimulation auftraten. Um diesem Problem zu begegnen, wurden alle nicht System-relevanten Prozesse angehalten und es wurde ein auf Leistung optimierter Personalcomputer verwendet. Trotzdem kam es bei der Bereitstellung von 1000 Stellwerten pro Sekunde am DA-Wandler zu Verzögerungen, die periodisch auftraten und deren Ursache nicht identifiziert werden konnte. Sie verursachten in einem dreieckigen Stimulationsprofil innerhalb des Stellsignals Sprünge. Diese sind in Abbildung 28 dargestellt: wie hier deutlich zu erkennen ist, wurde der Verschiebetisch zu bestimmten Zeitpunkten für circa 20 bis 30ms nicht auf seine vorgesehene Position gefahren, sondern verblieb in der zuletzt berechneten Position (markiert durch senkrechten Pfeil in Abbildung 28). Somit differierten die SOLL- und IST-Signale und es kam zu einem Sprung der Piezo-Ausdehnung, der sich graphisch in einer steilen Flanke äußert. Der Abstand dieser Aussetzer betrug etwa 450ms und veränderte unter anderem das Frequenzspektrum, mit dem die Anregung durchgeführt wurde, weshalb ein Einfluss auf die Mechanotransduktion nicht ausgeschlossen werden konnte. Zelluläre Effekte, die sich in zeitlich aufgelösten Kraftkurven wiederfinden lassen, wie beispielsweise der Bruch intrazellulärer Strukturen, könnten durch solche Aussetzer ebenfalls maskiert werden.

Durch die Auslagerung der Anregungsprozedur in einen externen Frequenzgenerator

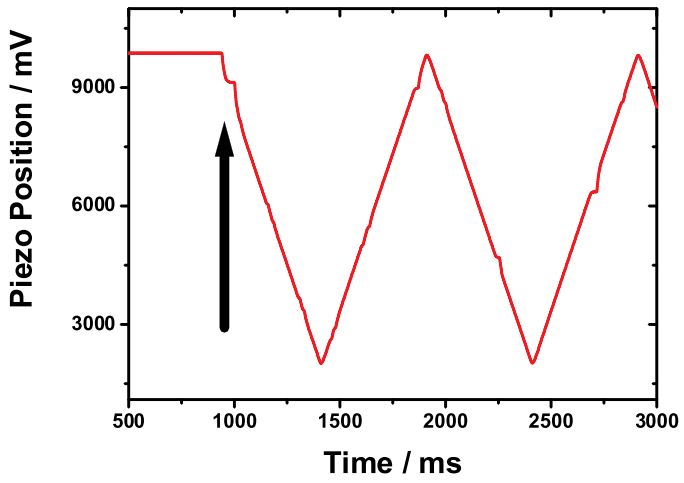

Abbildung 28: *Die Graphik zeigt das IST-Signal des piezoelektrischen Verschiebetisches als Positionsangabe gegenüber der Zeit.*

konnte das Problem behoben werden.

Die externe Frequenzgenerierung Die Berechnung zeitlich aufgelöster Piezo-Stellwerte erfolgt auch hier weiterhin mit Hilfe eines Computers. Über eine serielle Schnittstelle werden die Daten unter Berücksichtigung der Zeitabhängigkeit in den Speicher (Dual-RAM) des entwickelten Frequenzgenerators übertragen. Die aktuelle Position des piezoelektrischen Verschiebetisches (Sollwert) ist durchgeschleift. Damit ist eine Anfangs-Positionierung und die Verwendung des Annäherungsalgorithmus zur Bestimmung des Startwertes mittels der vorhandenen Software weiterhin möglich. Das eingebaute Additionselement des Frequenzgenerators verrechnet Startwert und Sollwert der Stimulation zur Einstellung des Piezos. Die Amplitude kann über ein Dämpfungsglied manuell nachjustiert werden. Damit der Frequenzgenerator seine Arbeit zu einem bestimmten Zeitpunkt aufnimmt, wird über die serielle Schnittstelle ein Trigger-Signal gesendet (schematische Darstellung siehe Abbildung 29). Mit der externen Frequenzgenerierung können maximal 32000 Stellwerte gespeichert und zur Stimulation genutzt werden. Damit ergibt sich eine große Bandbreite von kurzen, zeitlich hoch aufgelösten bis hin zu extrem langen, mit geringerer temporaler Auflösung durchgeführten Stimulationen. Die Aufzeichnung der Ist-Position und des PSD-Signals erfolgt nach wie vor über die MAD16 direkt auf der Festplatte.

Auswirkungen der externen Frequenzgenerierung Durch die externe Frequenzgenerierung wurde nicht nur das Problem der Stellwertübermittlung an den Piezo-Controller gelöst, sondern auch die Empfindlichkeit und damit die Auflösung des gesamten Systems erheblich verbessert. Die Schwankungen des Piezo-IST-Signals betragen nun im Mittel nur noch 1mV, was in Kombination mit einer Federkonstanten des Cantilevers von 0,075N/m einer Kraftauflösung von etwa 100pN entspricht. Der Hub des piezoelektrischen Verstelltisches in der vertikalen Achse beträgt auch hier weiterhin 38μm. Durch die externe Fre-

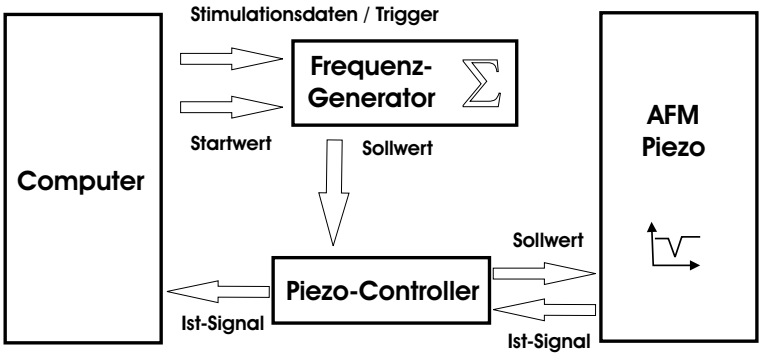

Abbildung 29: *Schematische Funktionsweise der externen Frequenzgenerierung. Der Frequenzgenerator berechnet, gesteuert über einen Computer, die SOLL-Werte der Stimulation und sendet diese zum Piezo-Controller. Dort werden sie verarbeitet und der SOLL-Wert wird an den Piezo gestellt. Das IST-Signal dient dem Computer zur Rückkopplung und wird auf der Festplatte gespeichert.*

quenzgenerierung können nun Stimulationsfrequenzen von deutlich über 100Hz verwendet werden, so dass eine Untersuchung der Mechanik des Mechanosensors auch für sehr hohe Frequenzen möglich ist.

5 Zugkraft-Mikroskopie

In diesem Kapitel wird die Technik der Zugkraftmessungen (engl. *„Traction-Force“*) vorgestellt. Die Traction-Force-Mikroskopie ermöglicht Messungen der Adhäsionskräfte, die von Zellen auf ein Substrat ausgeübt werden. In dieser Arbeit wurde diese Methode dazu verwendet, aktive Antworten von Osteoblasten auf einen mechanischen Reiz und die zellinterne Kraftweiterleitung unter externen Kräften zu untersuchen.

5.1 Einleitung

Die Erzeugung zellinterner Kräfte durch das Zytoskelett und deren Weiterleitung an die extrazelluläre Matrix, vermittelt über Adhäsionspunkte (siehe Kapitel 2.3), ist für viele physiologische Prozesse der Zellen essentiell. So werden beispielsweise Adhäsionskräfte generiert, die einen Kontakt zwischen der Zelle und einer externen Oberfläche herstellen und damit die Zelle aus ihrem energetisch günstigsten Zustand, der Kugelform, zu einer abgeflachten und ausgedehnten adhärenten Zelle werden lassen. Auch bei der Migration der Zellen werden die im Zytoskelett generierten Kräfte über fokale Adhäsionen an das Substrat übertragen, womit die Vorwärtsbewegung induziert wird [138, 206, 58]. Daneben bewirken uniaxiale Dehnungsreize die Ausrichtung der Zellen relativ zur Dehnungsrichtung [30, 164], so dass die mechanische Stimulation eine Bewegung der Zellen verursacht und intrazelluläre Kräfte erzeugt werden müssen.

Die mechanische Stimulation von Zellen führt also nicht nur zu den in Kapitel 2.3.6 besprochenen biochemischen, sondern auch zu mechanisch-aktiven Reaktionen, die durch eine Änderung der Zugkräfte zu beobachten ist. Daher ist die Messung der zellulären Adhäsionskräfte ein Ansatzpunkt, mit dem die Mechanotransduktion aus mechanisch-physikalischer Sicht untersucht und in Korrelation mit biologischen Beobachtungen (zum Beispiel Calciumantworten) gestellt werden kann. Die biologischen und physikalischen Methoden zur Messung zellulärer Zugkräfte werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

5.1.1 Silikon-Substrate

Schon vor über 25 Jahren kam Harris auf die Idee, elastische Substrate zur Untersuchung von Zellkräften zu verwenden [92]. Harris stellte hierfür hochflexible Substrate aus flüssigem Silikon her und polymerisierte deren Oberfläche mit der Flamme eines Bunsenbrenners. Kompressive Zugkräfte von Zellen, die auf dem Substrat kultiviert wurden, verursachten in diesem Falten, die unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden konnten. Die Darstellung komplexer Zugkraftmuster gelang jedoch erst durch die Verschmelzung der Silikonschicht mit den Wänden der Zellkammer. Damit war die Unterdrückung der Faltenbildung und die Einbettung kleiner Partikel in die oberste Silikonschicht und somit die Beobachtung der hervorgerufenen Deformationen möglich [140].Die Verwendung von ultraviolettem Licht zur Herstellung der polymerisierten Schicht erhöhte die Kraftauflösung bis in den Nano-Newton-Bereich [20, 19].

Eine neuere Entwicklung basiert auf der Präparation fester Elastomere mit verbesserten

mechanischen Eigenschaften [5]. Die Deformation der Oberfläche wird durch Mikrostrukturierungen beobachtet (Gitterkonstante 2 bis 4μm), die über ein lithographisches Verfahren (auf Silizium- oder Gallium-Arsenid basierend) erzeugt werden. Die physikalisch strukturierte Oberfläche des Substrats kann jedoch die Adhäsion und die Bewegung der Zellen unphysiologisch beeinflussen [241].

5.1.2 Mikrofabrizierte Cantilever

Galbraith und Sheetz verfolgten 1997 einen völlig anderen Ansatz zu Bestimmung zellulärer Zugkräfte [70]: auf der Basis von Silizium-Halbleiterscheiben werden kleine Cantilever in großer Stückzahl prozessiert, die senkrecht von der Scheibe abstehen. Zellen, die man auf den Cantilevern kultiviert, wachsen auf den freiliegenden Enden an und lenken folglich diese aus ihrer Ruhelage aus. Diese Auslenkung wird lichtmikroskopisch gemessen und anschließend wird unter zu Hilfenahme der Federkonstanten die applizierte Kraft analysiert. Allerdings sind solche Substrate in der Herstellung kompliziert. Des Weiteren kann die Dichte der Cantilever einen Einfluss auf die physiologischen Eigenschaften der Zellen haben. So wird beispielsweise die Beweglichkeit der Zellen durch die Vorgabe der Adhäsionsdichte verändert [75]. Des Weiteren können Zellen auf diesen nano-strukturierten Oberflächen nur dann anwachsen und sich ausbreiten, wenn die zur Verfügung stehenden Adhäsionspunkte maximal 58nm bis 73nm auseinander liegen [2].

5.1.3 Polyacrylamid-Substrate

Neben den Silikon-Substraten und mikrofabrizierten Cantilevern können auch Polyacrylamid-Gele zur Analyse zellulärer Zugkräfte verwendet werden. Deren Anwendung bietet viele Vorteile: neben der einfachen Herstellung der Gele kann ihr Elastizitätsmodul reproduzierbar und innerhalb einer großen Bandbreite festgelegt werden. Außerdem weisen die Gele hervorragende homogene mechanische und optische Eigenschaften auf und sind damit für die Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie bestens geeignet [174]. Die Deformationen des Substrats werden über die Verschiebung eingebetteter fluoreszierender Marker analysiert [9]. Eine detaillierte Beschreibung der Herstellung solcher Substrate und die Bestimmung der Adhäsionskräfte mittels eines optischen Fluss-Algorithmus erfolgt in den kommenden Abschnitten.

5.2 Die Traction-Force-Methode

Im Folgenden wird die Analyse zellulärer Zugkräfte unter der Verwendung von Polyacrylamid-Gelen dargestellt. Die Grundlage bilden die in den Gelen eingebetteten fluoreszierenden Marker, deren Verschiebung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie gemessen wird. Aus der Verschiebung werden Kraft-Vektor-Karten erstellt, die die zellulären Zugkräfte abbilden.

5.2.1 Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

Die Herstellung flexibler Substrate auf der Basis von Acrylamid ist ohne großen technischen Aufwand in jedem Labor durchführbar. Das Elastizitätsmodul dieser Gele wird über das Konzentrationsverhältnis von Acrylamid (8%) zu BIS-Acrylamid (0,03% bis 0,08%, Sigma, USA) eingestellt und liegt im Bereich zwischen 3000N/m und 15000N/m. Das Elastizitätsmodul der in dieser Arbeit verwendeten Gele lag bei 4000N/m. In die nicht polymerisierte Lösung werden Fluoreszenzkügelchen (Molecular Probes, Niederlande) mit einem Durchmesser von 0,2μm und 0,5μm eingegeben. Für die Experimente im Rahmen dieser Arbeit kamen in der Regel Partikel zum Einsatz, deren Anregungsmaximum bei 505nm und Emissionsmaximum bei 515nm liegt, da diese Fluoreszenzkügelchen die effizientesten optischen Eigenschaften aufweisen (F-8811 und F-8813; Molecular Probes, Niederlande). Sollte gleichzeitig die Beobachtung von GFP erfolgen, wurden Mikrokugeln verwendet, deren Absorptionsmaximum bei 580nm und Emissionsmaximum bei 605nm liegt (F-8810 und F-8812; Molecular Probes, Niederlande).

Die Konzentration der Fluoreszenzkügelchen muss so gewählt werden, dass die physikalischen Eigenschaften des Gels nicht verändert werden und das optische Hintergrundrauschen aus tieferen, außerhalb der Fokusebene liegenden Schichten möglichst gering ist. Idealerweise sollten die Mikrokugeln nur in der obersten Ebene des Gels vorhanden sein, da die Zugkräfte der Zellen fast ausschließlich eine laterale Komponente besitzen. Zur Vermeidung von Lufteinschlüssen ins Gel wird das Gemisch aus Acrylamid und BIS-Acrylamid durch Evakuierung entgast. Anschließend wird durch die Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS, Serva Feinbiochemica, Deutschland) und TEMED (Carl Roth GmbH, Deutschland) der Polymerisationsprozess in Gang gesetzt. Gegossen werden die Gele zwischen einen Objektträger und ein rundes Deckglas, das einen Durchmesser von 16mm aufwies. Durch die Verwendung eines Volumens von 14mm^2 entsteht ein Polyacrylamid-Gel mit einer Höhe von circa 70μm. Zum vollständigen Auspolymerisieren des Acrylamids wird der Objektträger für einige Stunden mit dem Deckglas nach unten im Kühlschrank gelagert. Hierdurch kann erreicht werden, dass die Fluoreszenzpartikel der Schwerkraft folgend an die spätere Oberfläche sinken. Nach der Polymerisation wird das Deckglas entfernt.

Damit Zellen auf dem Substrat anhaften können, muss das Gel zusätzlich mit einer Kollagenschicht versehen werden. Hierfür wird zunächst eine Sulfo-SANPAH-Lösung auf die Oberfläche des Substrats gegeben und anschließend diese für zehn Minuten mit einer 60 Watt UV-Lampe photoaktiviert. Der Aktivierungsprozess wird ein zweites Mal durchgeführt und bindet das Sulfo-SANPAH an das Polyacrylamid-Gel. Im Anschluss kann die Kollagenlösung auf die vorbereitete Oberfläche gegeben werden. Das Sulfo-SANPAH ermöglicht nun die Bindung der Kollagenmoleküle (Inkubation 6 Stunden bei 4°C) und damit die Adhäsion der Zellen auf der Oberfläche. Zur Wahrung der Sterilität werden die fertigen Gele für die Anwendung in der Zellkultur mit UV-Licht behandelt.

5.2.2 Bestimmung der physikalischen Eigenschaften

Polyacrylamid-Gele weisen sehr homogene physikalische Eigenschaften auf. So variieren beispielsweise die elastischen Eigenschaften über das gesamte Substrat nur marginal. Selbst bei einer Deformation des Gels um bis zu 30% gegenüber der ursprünglichen Form tre-

ten keine plastischen Effekte auf. Diese hochelastischen Eigenschaften erlauben sogar bei großen Deformationen die exakte Analyse der Zugkräfte (minimale hochfrequente, viskoelastische Eigenschaften wirken auf die Messungen nicht störend). Die Poisson-Zahl für Polyacrylamid-Gele liegt bei 0,3 [144].

Um die Zugkräfte der Zellen bestimmen zu können, ist die Kenntnis des Elastizitätsmoduls der Gele von Nöten. Dieses kann beispielsweise durch die Münzmethode [45] oder die Mikroballmethode [146] bestimmt werden. Die geringste Standardabweichung bei der Bestimmung des Elastizitätsmoduls bietet die Verwendung des Kraftmikroskops. Hierbei wird zunächst über dem zu bestimmenden elastischen Substrat eine Kraftkurve aufgenommen, aus der die Eindringtiefe und die maximale Kraft, die auf das Gel ausgeübt wurde, berechnet werden kann. Für diese spezielle Anwendung folgt nach der Theorie von Hertz [100] über elastische Körper:

$$E = \frac{3(1-\nu^2)f}{4d^{3/2}r^{1/2}} \tag{12}$$

Dabei bezeichnet f die Kraft, ν die Poisson-Zahl und d die Eindrücktiefe der Mikrokugel in das Gel. Der Radius der Kugel wird durch r charakterisiert. Auf Grund der hohen Genauigkeit der Messungen mit dem Kraftmikroskop können Messfehler minimiert werden [185].

5.2.3 Analyse der zellulären Zugkräfte

Zur Analyse von zellulären Zugkräften, die auf ein elastisches Substrat wirken, wird eine Kraft-Vektor-Karte erstellt. Sie gibt die Kräfte wieder, die eine adhärente Zelle auf ihr Substrat ausübt. Zur Berechnung der Karte wird zunächst eine Deformationsmatrix, die aus den Deformationen des Substrates gewonnen wird, generiert. Um die bildliche Darstellung der Deformation zu ermöglichen, wurden fluoreszierende Partikel in das Substrat eingebettet (siehe Kapitel 5.2.1). Diese dienen der Erstellung einer Fluoreszenzaufnahme des belasteten Gels mittels einer CCD-Kamera. Nach der Aufnahme wird die Zelle mit Hilfe von Trypsin gelöst und erneut die Verteilung der Partikel, jedoch jetzt im relaxierten Gel, gemessen. Durch den Vergleich beider Bilder können die Verschiebe-Vektoren der einzelnen Fluoreszenzkugeln bestimmt werden.

Der optische Fluss-Algorithmus für Zugkraftmessungen Die Bestimmung der Verschiebevektoren erfolgte in dieser Arbeit durch die Verwendung des „optischen Fluss“-Ansatzes (engl. *„optical-flow“*). Diese Methode wird vorrangig in der Analyse bewegter Bilder, zum Beispiel bei der Detektion, Lokalisierung und Verfolgung sich bewegender Objekte angewandt. Bestimmte Merkmale eines Bildes, deren Positionen sich zum nachfolgenden Bild geändert haben, können durch die so genannte „Schablonenanpassung“ (engl. *„Blockmatching“*) detektiert und die Verschiebung der Bildfragmente verfolgt werden. Dazu wird das Bild in viele kleine Rechtecke unterteilt, die ein möglichst einmaliges Intensitätsmuster aufweisen. Jedes einzelne Rechteck wird im nachfolgenden Bild mit verschiedenen Positionen verglichen und über Ähnlichkeitsmaße wird die Wahrscheinlichkeit, dass das Rechteck an diese neue Position verschoben wurde, bestimmt. Am häufigsten findet hierbei die Kreuzkorrelation zur Analyse der Übereinstimmung zweier Bilder An-

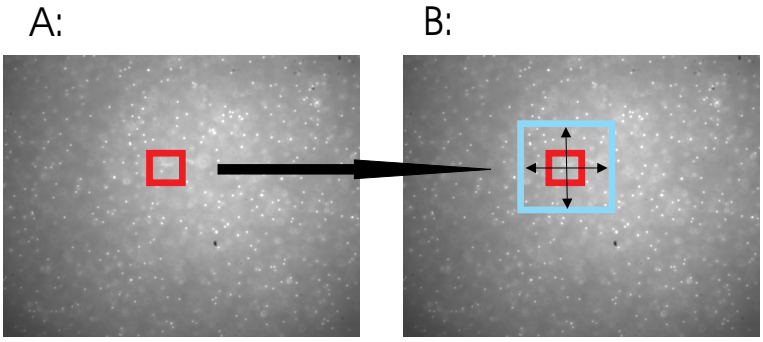

Abbildung 30: *Das Prinzip des optischen Fluss-Algorithmus: Dargestellt ist das elastische Substrat mit eingebetteten Fluoreszenzkugeln. Diese sind als helle Punkte zu erkennen. (A) Bild ohne Substratdeformation mit Korrelationsfenster (rot); (B) Bild mit Substratdeformation. Die Ähnlichkeit des Korrelationsfensters (rot) wird innerhalb des Suchfensters (blau) mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten berechnet.*

wendung. Dabei gilt mit dem Bild g und der Schablone h:

$$KK(m,n) = \sum_{x=-K_x}^{K_x} \sum_{y=-K_y}^{K_y} g(x+m, y+n) * h(x,y) \tag{13}$$

Zur Erstellung der Deformationsmatrizen dieser Arbeit wurde der optical-flow-Algorithmus verwendet. Die nötige Analyse-Software stellte freundlicherweise Professor Micah Dembo aus Boston zur Verfügung. Sie wird in [150] ausführlich beschrieben.

Um die Messdaten auswerten zu können, wird zunächst die Helligkeit der zu vergleichenden Bilder angepasst und ein Korrelationsfenster um den zu betrachtenden Bildpunkt des entspannten Bildes gelegt (siehe Abbildung 30). Die Maße des Korrelationsfensters sollten dabei so gewählt werden, dass die Wahrscheinlichkeit, diesen Bildausschnitt mehr als einmal im deformierten Bild wiederzufinden, infinitesimal klein ist; das heißt, dass der Inhalt des Korrelationsfensters einen eindeutigen Fingerabdruck darstellen sollte.

Unter der Annahme, dass der betrachtete Pixel nicht verschoben wurde, wird die Ähnlichkeit der Bilder mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten R bestimmt. Dieser nimmt Werte zwischen -1 und +1 an. Handelt es sich bei den Bildern um Positiv und Negativ, so ergibt sich der Koeffizient zu -1. Besteht keine Ähnlichkeit, nimmt er den Wert 0 an. Identische Bildausschnitte sind durch R gleich +1 gekennzeichnet. Innerhalb des angegebenen Fensters (siehe Abbildung 30) wird nach dem Maximum des Korrelationskoeffizienten gesucht und mit diesem die Verschiebung des betrachteten Pixels bestimmt. Hierbei können verschiedene Such-Algorithmen zum Einsatz kommen. Beispielsweise ermöglicht die „5-Punkt-Quadrat“-Methode durch das Interpolieren der Daten eine theoretische Genauigkeit von 0.1 Pixel [150].

Das Suchfenster wird so gewählt, dass gerade noch die maximale Deformation des Substrates berücksichtigt wird. Auf Grund der Tatsache, dass Adhäsionspunkte nicht beliebig große Kräfte übertragen [5], ist auch die Substratdeformation begrenzt. Damit wird der Aufwand, das Maximum von R zu finden, minimiert. Unter Berücksichtigung der eingeschränkten Rechenkapazität der Computer wird die räumliche Auflösung der Deformationsmatrix durch ein Gitter mit Knotenpunkten bestimmt. Da Deformationen des Sub-

strats nur im Bereich der Zelladhäsion vorliegen können, wird das Gitter mit Hilfe einer Phasenkontrastaufnahme der Zelle auf diese Region beschränkt, so dass lediglich für die Knoten des Gitters der korrespondierende Punkt im deformierten Bild gesucht wird. Des Weiteren ist der Durchmesser der Adhäsionspunkte wesentlich größer als die Größe eines einzelnen Bildpunktes, so dass es auch aus Sicht der Zellphysiologie nicht sinnvoll ist, die Berechnung des Korrelationskoeffizienten für jeden einzelnen Pixel durchzuführen.

Die Erstellung einer Kraft-Vektor-Karte Mittels der Deformationsmatrix kann die wahrscheinlichste Kraft-Vektor-Karte bestimmt werden, die zu den Deformationen des Substrats passt. Der Ursprung eines jeden Kraft-Vektors stellt dabei den potentiellen Ursprung einer auf das Substrat wirkenden Kraft dar. Für die Berechnung der Kraftvektoren wird erneut angenommen, dass die Deformation des Substrats nur von Kräften herrühren kann, die von der Zelle erzeugt werden. Dadurch beschränkt sich die Kraft-Vektor-Karte auf die Region, die unterhalb der Zelle liegt. Mit Hilfe einer Phasenkontrastaufnahme wird der Zellumriss bestimmt und diese Region, abhängig von der erforderlichen Genauigkeit und der zur Verfügung stehenden Rechenleistung, in 100 bis 2000 rechteckige Unterregionen unterteilt. Am Rand werden die Regionen so verbogen, dass sie komplett innerhalb des Zellumrisses liegen. Jeder Knotenpunkt des entstandenen Gitters stellt einen Ursprung der zu berechnenden Kraftvektoren der Kraft-Vektor-Karte dar. Im Folgenden wird der mathematische Hintergrund, der für die Berechnung der Kraftvektoren aus einer Deformationsmatrix nötig ist, kurz skizziert.

Die Fokustiefe der verwendeten Objektive betrug circa 5μm. Zur Aufnahme der im Gel eingebetteten Fluoreszenzkugeln wurde so auf die oberste Gelschicht fokussiert, dass 2,5μm der Ventralseite der Zelle sowie 2,5μm der fluoreszierenden Partikel im elastischen Substrat abgebildet wurden. Die Positionen der Marker im Substrat können dann als m_p=(m_{p1},m_{p2},ϵ_p) beschrieben werden, wobei p=1,2,...N_p und ϵ_p gleichförmig über ein Intervall von 0 bis -2,5μm verteilt sind. Da die Substratkräfte der Zelle nur auf die Oberfläche des elastischen Gels wirken, werden die Ursprungsknoten lediglich an der Oberfläche des Substrats definiert r=(r_1,r_2,0). Die Verschiebung des p-ten Markers korreliert auf Grund der linearen Antwort des Substrats mit dem Kraftfeld wie folgt:

$$d_{p\alpha} = \int\int g_{\beta\alpha}(m_p - r)T_\beta(r)dr_1dr_2 \tag{14}$$

Die griechischen Indizes der Formel nehmen die Werte 1, 2 und 3 an. Die Funktionen $g_{\beta\alpha}(m_p - r)$ werden als Koeffizienten des *„Green´schen Tensors“* bezeichnet. Sie beschreiben die Deformation des Substrats am Punkt m in Richtung α. Die Deformation erfolgt durch die Kraft am Punkt r in Richtung β. Da die Dicke des Substrats von 70μm - im Verhältnis zur maximalen Verschiebung einzelner Fluoreszenzpartikel um etwa 1μm - als unendlich angesehen werden kann, ist die präzise Annäherung von $g_{\beta\alpha}(m_p - r)$ aus Gleichung 14 mit Hilfe der Theorie über elastische Festkörper in einem Halbraum von Boussinesq möglich (detallierte Beschreibung siehe [45, 134]).

Um aus der großen Anzahl von Kraft-Vektor-Feldern das Feld herauszufinden, das die Deformationsmatrix am besten beschreibt, wird der implementierte Chi-Quadrat-Test (χ^2) eingesetzt: der Test wird auf jeden einzelnen Kraftvektor des Knotennetzes angewandt und damit das einfachste Kraft-Vektor-Verteilungsbild bestimmt, das mit den experimentellen

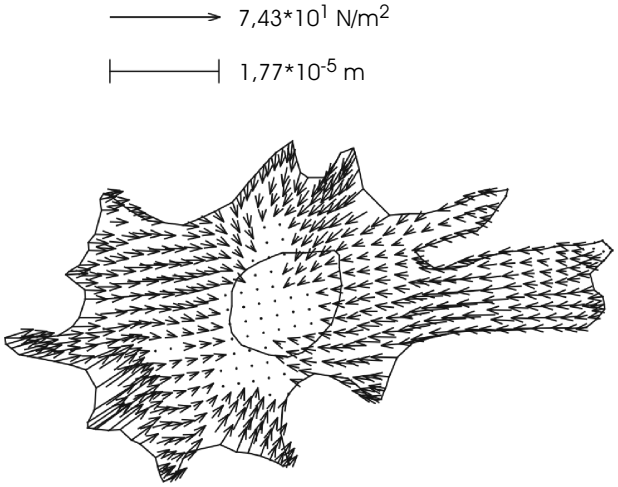

Abbildung 31: *Die Abbildung zeigt das typische Bild eines Kraft-Vektor-Feldes, das mittels einer Deformationsmatrix errechnet wurde. Die von der Zelle auf das Substrat übertragenen Kräfte zeigen in das Zellinnere.*

Daten vereinbar ist. Anschließend werden alle Vektoren des Kraft-Vektor-Feldes auf ihre statistische Signifikanz hin überprüft: mittels der *„Bootstrap-Methode“* [57] wird dem am wahrscheinlichsten zutreffenden Datensatz ein zusätzliches Grundrauschen aufgeprägt und anschließend neu berechnet. Um die statistische Signifikanz weiter erhöhen zu können, wird das Prozedere wiederholt [44].

Die gewonnenen Datensätze können nun der Darstellung der Kräfte dienen, die von einer Zelle auf das ihr unterliegende Substrat ausgeübt werden. Abbildung 31 zeigt ein typisches Kraft-Verteilungs-Muster einer adhärenten Knochenzelle: hierbei ist die Länge der Pfeile zur Kraft pro Flächeneinheit proportional.

5.3 Traction-Force-Messungen und mechanische Stimulation

Zugkraftmessungen, die in Kombination mit der Dehnungsmaschine, der Scherflusskammer und dem Kraftmikroskop erfolgten, werden im Folgenden beschrieben. Des Weiteren liefert das Kapitel eine Darstellung der Änderungen, die notwendig waren, um die Analyse der Zugkräfte unter Stimulation mit externen Kräften zu ermöglichen.

5.3.1 Die Dehnungsmaschine

Die Applikation von Dehnungsreizen erfolgte durch die Verwendung von ACLAR-Folien (siehe Kapitel 3.7). Auf deren Oberfläche musste zur Messung der Zugkräfte ein Polyacrylamid-Gel aufgebracht werden, auf dem die Zellen kultiviert werden. Jedoch stellt die Verbindung zwischen der ACLAR-Folie und dem Polyacrylamid-Gel ein Problem dar, weil die Oberflächenenergien beider Materialien sehr unterschiedlich sind. Eine einfache

Methode, um die Oberflächenenergien grob abschätzen zu können, ist die Messung des Kontaktwinkels. Hierfür wird ein Tropfen destilliertes Wasser auf die jeweilige Oberfläche gegeben und das Verhalten des Tropfens analysiert (siehe Abbildung 32): die Größe des Kontaktwinkels zwischen der Flüssigkeit und dem Feststoff ist ein Maß für die Wechselwirkung an der Berührungsfläche. Je geringer die Wechselwirkungen sind, desto größer ist der Kontaktwinkel. Wird Wasser verwendet, können die Oberflächen nach der Kontaktwinkelmessung in hydrophile oder hydrophobe Oberflächen kategorisiert werden (siehe Abbildung 32 (A) und (B)). Hydrophile Oberflächen sind durch sehr kleine Kontaktwinkel um 0° gekennzeichnet. Oberflächen mit Kontaktwinkeln um 90° hingegen können als hydrophob angesehen werden. Noch größere Winkel von etwa 160° charakterisieren den Lotuseffekt. Solche Oberflächen werden als superhydrophob bezeichnet, da ihre Benetzbarkeit unendlich klein ist.

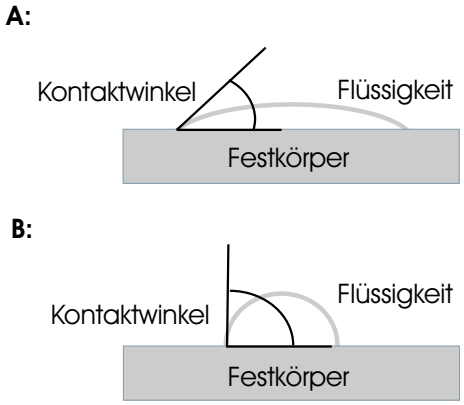

Abbildung 32: *Dargestellt ist die Messung des Kontaktwinkels einer Flüssigkeit auf einem Festkörper. A: aus einer hohen Oberflächenenergie des Festkörpers resultiert ein kleiner Kontaktwinkel. B: aus einer niedrigen Oberflächenenergie des Festkörpers resultiert ein großer Kontaktwinkel (jeweils im Vergleich zur Oberflächenenergie der Flüssigkeit)*

Die Benetzbarkeit eines Materials und damit die Größe der Wechselwirkung sind für viele Anwendungsbereiche essentielle Größen (Färbeindustrie, Klebstoffe). Verschiedene mechanische, chemische und physikalische Verfahren können die Oberflächenenergie eines Materials und damit die Benetzbarkeit und den Kontaktwinkel ändern. So können zum Beispiel Hilfsstoffe wie Lösungsvermittler die zu behandelnde Oberfläche maskieren und die Oberflächenenergie entscheidend beeinflussen. Auch das mechanische Anrauhen der Oberfläche verändert den Kontaktwinkel zwischen Flüssigkeit und Festkörper entscheidend, da hierbei in der Regel die Oberflächenenergie herabgesetzt wird. Eine andere Möglichkeit stellt die so genannte *„Korona-Behandlung“* (engl. *„corona-treatment“*) oder Niederdruck-Plasmatechnologie dar. Hier wird die Oberfläche in einer Gasumgebung einem Hochspannungsfeld ausgesetzt (10-20 kV). Letzteres führt bei Betrieb zu einer leuchtenden Entladung (daher: corona-treatment). Die entstehenden energiereichen Teilchen reinigen zum einen die Oberfläche, zum anderen werden, wenn beispielsweise Sauerstoff als Prozess-Gas verwendet wird, polare, bindungsfreudige Radikalstellen auf der Oberfläche erzeugt. Die Methode ist, da sie praktisch bei allen Kunststoffarten, Polymeren, Keramikverbunden und bei Glas eingesetzt werden kann, sehr vielseitig.

Im Falle des Polyacrylamid-Gels und der Aclar-Folie zeigte sich ein sehr großer Kontaktwinkel von mehr als 90°. Mittels Lösungsvermittlern könnte die Oberflächenenergie

der Aclar-Folie zwar verändert werden, jedoch ist der Einsatz von Lösungsmitteln in der Zellbiologie kritisch zu betrachten, da solche Substanzen meistens toxische Eigenschaften aufweisen. Folglich bot sich zur Verbesserung der Benetzungseigenschafen der Aclar-Folie lediglich die Korona-Entladung an, da bei diesem Verfahren kein Einfluss auf die Zellen zu erwarten war.

5.3.2 Das Kraftmikroskop und die Scherflusskammer

Da auf Grund der Konstruktion des Kraftmikroskops nicht auf Phasenkontrast-Bilder zurückgegriffen werden kann, müssen Zellaufnahmen möglichst vor dem Aufbau der Apparatur erfolgen. Hier kann sich jedoch zwischenzeitlich die Position der Zelle - durch Migration oder Stöße am Mikroskop-Tisch - verändert haben. Eine Möglichkeit, die Endposition der Zelle unmittelbar vor den Messungen bestimmen zu können, ist die Verwendung einer Beleuchtung mit indirektem Licht (engl. *„oblique-light“*). Da die Auflösung und Qualität der Bilder jedoch sehr schlecht ist, dienen sie nur zur groben Lokalisierung und zur Positionierung der Cantileverspitze oberhalb der Zelle. Des Weiteren werden bei Krafttransmissionsmessungen mit dem Kraftmikroskop und der Scherflusskammer externe Kräfte appliziert, die zum Zeitpunkt der Fluoreszenzaufnahmen wirken. Dadurch wird eine Anpassung der Auswerteroutinen erforderlich, die im Folgenden beschrieben wird.

5.3.3 Zugkraftmessungen mit externen Kräften

Bis heute wurden Zugkraftmessungen unter verschiedensten experimentellen Bedingungen durchgeführt. Hierzu zählen neben dem Einfluss unterschiedlicher Inhibitoren auf die Erzeugung von Zugkräften vor allem die Mechanik der Zellbewegung [161, 45].

In den meisten Fällen wirken auf die untersuchten Zellen keine äußeren Kräfte. Diese können beispielsweise durch mechanische Stimulation mit Scherkräften oder mit dem Rasterkraftmikroskop erzeugt werden. Da die Analyse der Deformationsmatrix unter anderem auf der Lösung unbestimmter Fredholm-Integral-Gleichungen beruht, ist es wichtig, so viele Randbedingungen wie möglich vorzugeben. So lange keine externen Kräfte auf die zu beobachtenden Zellen einwirken, müssen alle Deformationen des Substrates durch interne, das heißt in den Zellen erzeugte Kräfte hervorgerufen werden. Auf Grund der Gleichung *„actio = reactio“* muss hierbei die Summe aller Kraftvektoren Null ergeben. Folglich kann es also auch kein relatives Drehmoment geben, das von den Zellen erzeugt wird. Diese beiden physikalisch sinnvollen Annahmen sind als starke Randbedingungen zur Analyse der Deformationsmatrix und der Berechnung des Kraft-Vektor-Feldes zu berücksichtigen. Mit Hilfe der oben genannten Annahmen können aus der großen Anzahl möglicher Lösungen zahlreiche Vektor-Felder ausgeschlossen werden. Eine weitere Randbedingung ist, dass Kräfte nur im Bereich des Zell-Substrat-Kontaktes auftreten können und *„tractions at a distance“* ausgeschlossen werden können.

Zur Auswertung der Experimente, in denen die Zellen durch die Applikation äußerer Kräfte stimuliert wurden, musste die vorhandene Software dahingehend verändert werden, dass die Anwendung der Randbedingungen Netto-Kraft und Netto-Drehmoment gleich Null ausgeschaltet werden konnte. Diese Bedingung ist sowohl für die Krafttransmissions-

messungen mit dem Kraftmikroskop als auch für die Messungen in der Scherflusskammer notwendig.

5.3.4 Quantenpunkte

Wie das Absorptions- und Emissionsverhalten der hier verwendeten Mikrokugeln zeigt, beträgt die Stokes-Verschiebung der meisten Fluoreszenzfarbstoffe nur einige Nanometer. Damit trotzdem verschiedene Farbstoffe eingesetzt werden können, um so beispielsweise zelluläre Zugkräfte und die Calciumkonzentration simultan bestimmen zu können, kommen häufig dichroit Da sich hierbei allerdings mit der Anzahl der Spektralbänder die optischen Eigenschaften der Komponenten verschlechtern, können schwache Fluoreszenzintensitäten leicht durch Streulicht überlagert werden.

Eine Lösung dieses Problems stellen die seit kurzem erhältlichen Quanten-Kügelchen (engl. *„quantum-beads“*) dar. Sie bestehen aus einer Polystyren-Trägersubstanz, in die eine große Anzahl so genannter Quantenpunkte (engl. *„quantum-dots“*) eingebettet ist. Quantenpunkte sind fluoreszierende Halbleiter-Nanokristalle, die hier aus Cadmium und Selenid bestehen (CdSe) und einen Durchmesser von etwa 10nm aufweisen. Da der Vorteil dieser Quantenpunkte ist, dass das Anregungsspektrum unterhalb einer bestimmten Wellenlänge frei gewählt werden kann, sollten spezielle *„quantum-beads“* (TriLite, Crytalplex, USA) mit einer Emissionswellenlänge von über 600nm im Rahmen dieser Arbeit die herkömmlichen Mikrokugeln ersetzen. Damit hätte die gleichzeitige Beobachtung der Zugkräfte in Kombination mit der intrazellulären Calciumkonzentration mit Fura-2 erfolgen können, ohne auf Filtersätze mit Multibändern zurückgreifen zu müssen. Bei Probemessungen zeigte sich jedoch, dass die erhältlichen Nanokristalle gegenüber Phosphationen instabil sind. Allerdings enthält das zur Herstellung der Gele zwingend notwendige APS (Adenosin-Phosphosulfat) Phosphatverbindungen. Die Phosphationen ätzen die Oberfläche der Nanokristalle an und führen zu einer radikalen Polymerisierung. Da das Probleme bislang vom Hersteller nicht gelöst werden konnten, bleibt die Anwendung der *„quantum-beads“* für die Zugkraftmessungen zunächst versperrt. Es werden jedoch Versuche unternommen, die Herstellung der Polyacrylamid-Gele unter Ausschluss von Phosphationen zu ermöglichen.

6 Experimente und Ergebnisse

6.1 Einleitung

In diesem Kapitel erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten zellbiologischen Experimente, der daraus resultierenden Fragestellungen und einiger weiterführender Experimente. Eine ausführliche Diskussion der Ergebnisse bezüglich des zellmechanischen Kontextes findet in Kapitel 7 statt.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, die Mechanotransduktion an primären Osteoblasten zu untersuchen. Ausgehend von den Ergebnissen der Scherfluss- und Dehnungsexperimente anderer Arbeiten, die eine Calciumantwort 120 Sekunden nach mechanischer Stimulation zeigten, sollten hier in erster Linie die mechanischen Eigenschaften des Mechanosensors mittels lokaler Stimulation unter variierenden Stimulationsparametern analysiert werden. Hierfür wurde das in Kapitel 4 beschriebene Kraftmikroskop verwendet. Bei diesem kann die Frequenz, die Zyklenzahl und die Amplitude der Stimulation frei gewählt werden. Des Weiteren ermöglicht das Kraftmikroskop die Bestimmung der deponierten Energie. Parallel zur Stimulation wurde der Calciumhaushalt der Zellen mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffes Fura-2 beobachtet (siehe Kapitel 3.3). Auch die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im folgenden Abschnitt besprochen.

Der Aufbau des Kapitels ist so gewählt, dass die Experimente und deren Ergebnisse in chronologischer Reihenfolge aufgeführt werden. Anschließend werden die experimentell gewonnenen Daten analysiert und hinsichtlich der Mechanotransduktion diskutiert. Dabei werden neue Fragestellungen aufgeworfen, die mit weiteren Experimenten untersucht wurden und deren Ergebnisse diskutiert werden.

6.2 Vertikale Stimulation und Calcium

Die Stimulation der Osteoblasten erfolgte zunächst mit Hilfe des eindimensionalen Kraftmikroskops. Selbiges ermöglichte die Stimulation der Zellen aus vertikaler Richtung (relativ zur Substratoberfläche). Diese Art der mechanischen Belastung von einzelnen Knochenzellen wird im Folgenden als „vertikale Stimulation“ bezeichnet. Bei diesen Experimenten wurde die Kraftschwelle, die unter der Variation der Stimulationsparameter Frequenz und Zyklenzahl zum Auslösen einer Calciumantwort von Nöten ist sowie die Dynamik der Calciumerhöhung und die Signaltransduktion der Zelle untersucht.

6.2.1 Kraftschwelle und Dynamik der Calciumantwort

Die Charakteristik der Calciumantwort Die lokale mechanische Stimulation von Osteoblasten, die mittels eines Kraftmikroskops und einer 10μm Silika-Kugel erfolgte, löste bei den Zellen eine Calciumerhöhung mit einem charakteristischen Verlauf aus (siehe Abbildung 33). Unmittelbar nach Stimulation der Osteoblasten konnte beobachtet werden, dass die Intensität der Emission nach Anregung im spektralen Bereich von 340nm anstieg (siehe Abbildung 33, violette Kurve), wohingegen sie nach Anregung des Farbstoffes bei

einer Wellenlänge von 380nm fiel (siehe Abbildung 33, blaue Kurve). Die Berechnung des Verhältnisses beider Spektren (Ratio) macht deutlich, dass direkt auf die Stimulation eine intrazelluläre Erhöhung der Calciumionen-Konzentration folgte, die im weiteren Verlauf wieder sank (siehe Abbildung 33, rote Kurve).

Im Gegensatz zu der Calciumcharakteristik nach der Simulation mit Scherflüssen und Dehnungsreizen zeigte sich nach vertikaler Stimulation ein völlig anderer zeitlicher Ablauf des Calciumsignals. Anstatt einer verzögerten Calciumantwort trat hier die Calciumerhöhung sofort nach der Stimulation auf. Damit stellt sich die Frage, ob nach einer vertikalen Kraftapplikation ein anderer Mechanismus durch den mechanischen Reiz in der Zelle ausgelöst wird als nach Scherflüssen und Dehnungsreizen, und ob für die Reizaufnahme ein anderer Mechanosensor verantwortlich ist.

Die Dynamik der Calciumantwort Die lokale Stimulation mit dem Kraftmikroskop verursachte eine sofortige Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Die Calciumionen stammen hierbei entweder aus den intrazellulären Speichern (ER) oder gelangen aus dem Extrazellulärmedium in das Zytosol. Innerhalb von 40 bis 80 Sekunden nach dem spontanen Anstieg der Calciumkonzentration wird das überschüssige freie Calcium zum einen durch den passiven Transport durch die Zellmembran, zum anderen durch den aktiven Transport mittels Calciumpumpen (Calcium-ATPasen) in das Endoplasmatische Retikulum oder den Extrazellularraum zurückgeführt und damit das physiologische Gleichgewicht wieder hergestellt. Dem schnellen Anstieg der Calciumkonzentration folgt also ein Abfall mit einer deutlich größeren Zeitkonstante. Der auftretende quantitative Anstieg der Ionenkonzentration konnte durch die in Kapitel 3.3.2 beschriebene Kalibrierung von Ratio-Farbstoffen bestimmt werden. Während in der ruhenden Zelle die absolute Calcium-

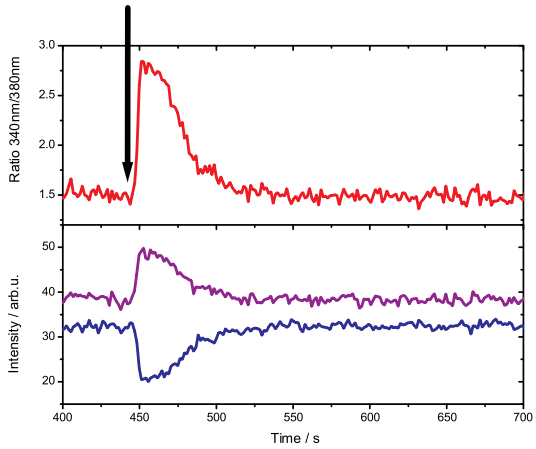

Abbildung 33: *Die Abbildung zeigt die charakteristische intrazelluläre Calciumantwort von Osteoblasten nach mechanischer Stimulation mit dem Kraftmikroskop. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Stimulation, die mit einer maximalen Kraft von 450nN erfolgte. Die rote Kurve zeigt das Verhältnis, das aus den Intensitäten nach Anregung bei 340nm beziehungsweise 380nm gebildet wurde. Die Intensität der Emission nach Anregung bei 340nm ist violett, die bei 380nm blau dargestellt.*

konzentration bei etwa 100nM lag, stieg sie in Folge der mechanischen Stimulation auf bis zu 1μM an. Dieses dynamische Verhalten ist für viele Calciumsignale typisch und kann, allerdings erst 90 bis 150 Sekunden nach Applikation des mechanischen Reizes, auch durch Scherflüsse und Dehnungsreize hervorgerufen werden.

Die Kraftschwelle in Abhängigkeit von den Stimulationsparametern Für die Zellstimulation mit dem Kraftmikroskop wurde zunächst die applizierte Maximalkraft, ausgehend von einigen 100pN, in jedem Stimulationszyklus sukzessiv erhöht. Dabei erfolgte nach jeder Stimulation mit einer definierten Kraft eine fünfminütige Pause, bevor die Stimulation mit einer erhöhten Kraftamplitude wiederholt wurde. Diese Prozedur wurde so lange fortgeführt, bis es bei der Zelle zu einer veränderten Calciumkonzentration kam (siehe Abbildung 33). Parameter wie die Zyklenzahl (20 Zyklen) und die Periodendauer (100ms) wurden hierbei zunächst konstant gehalten, um so eine mögliche Auswirkung dieser Stimulationsparameter auf die Calciumantwort zu unterbinden. Die Geschwindigkeit des Cantilevers war bei der Annäherung und der Rückzugsphase konstant, so dass in einem Ort-Zeit-Diagramm für den Abstand der Cantileverspitze von der Zelle ein Dreiecksprofil entstand. Als Sonde diente dem Cantilever eine 10μm große Silika-Kugel.

Etwa 98% der mechanisch stimulierten Zellen reagierten mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, wie sie in Abbildung 33 gezeigt ist. Die Kraftschwelle für die einzelnen Zellen lag hierbei zwischen 500nN und 800nN. Kräfte über 700nN erhöhten das Risiko einer Zellbeschädigung deutlich. Die Zerstörung einer Zelle kann daran erkannt werden, dass beide Fluoreszenzintensitäten des Farbstoffes stark abfallen, die Zelle kugelig wird und sich vom Substrat ablöst.

Die oben vorgestellten Experimente wurden anschließend mit variierender Zyklenzahl und Stimulationsfrequenz (Periodendauer) wiederholt, um so den Einfluss dieser Stimulationsparameter auf die Mechanotransduktion und damit die Mechanik des Mechanosensors zu untersuchen. Hierfür wurde die Frequenz zwischen 0,1Hz und 100Hz und die Zyklenzahl zwischen 1 und 100 Wiederholungen verändert. Die Variation der Stimulationsparameter innerhalb dieser Bandbreite ließ jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Dynamik der intrazellulären Calciumerhöhung und die Kraftschwelle erkennen.

Es scheint also unabhängig von der Frequenz und der Wiederholungsrate des mechanischen Reizes eine Mechanotransduktion ausgelöst zu werden, die eine instantane Calciumerhöhung bewirkt. Des Weiteren zeigte sich, dass verhältnismäßig hohe Kräfte von Nöten sind, um ein Calciumsignal nach erfolgter Stimulation auslösen zu können. Der dabei auf die Zellmembran applizierte Druck betrug circa 5.000Pa, während bei Scherflüssen zur Evokation einer Calciumantwort nur 0,8Pa bis 3Pa benötigt werden. Es musste daher genau analysiert werden, ob die induzierte Calciumerhöhung tatsächlich auf einem physiologischen Prozess (Mechanotransduktion) zurückzuführen ist.

6.2.2 Die interzelluläre Signalweiterleitung

Osteoblasten liegen im Knochen in einem Netzwerk, das heißt in einer direkten Interaktion vor. Hierfür stehen sie vor allem über so genannte *„gap-junctions“* untereinander in Kontakt. Diese membrandurchspannenden Kanäle ermöglichen zwischen den einzelnen

Zellen den Austausch von kleinen Signalmolekülen. Man vermutet, dass *„gap-junctions“* nicht nur für die Mechanotransduktion im Knochen, sondern auch für die Differenzierung der Knochenzellen eine wichtige Rolle spielen [49]. Auf Grund der Kommunikation der Zellen kann die Untersuchung der nach mechanischer Stimulation erfolgenden Signalweiterleitung an benachbarte Zellen dazu dienen, den Mechanismus der Mechanotransduktion im ganzheitlichen Knochen zu untersuchen. Schon eine Stimulation weniger Zellen könnte ausreichen, um eine interzelluläre Signalkaskade in Gang zu setzen, die beispielsweise eine Umstrukturierung des Knochenbaus zur Folge hat.

Da bei Scherkraft- und Dehnungsexperimenten die Stimulation vieler Zellen erfolgt, war es mittels dieser Methoden nicht geglückt, die Signalweiterleitung zwischen Zellen zu untersuchen. Dazu muss die Stimulation einzelner Zellen erfolgen. In der Vergangenheit wurden unter anderem Mikropipetten verwendet. Diese erlauben zwar nicht die Messung der applizierten Kraft, dienen aber dem Beweis, dass *„gap-junctions“* an der interzellulären Weiterleitung von Calciumsignalen beteiligt sind [64, 102, 255]. Im Gegensatz hierzu können jetzt mit Hilfe des Kraftmikroskops einzelne Zellen mit definierten Kräften gezielt stimuliert und gleichzeitig der Calciumhaushalt benachbarter Zellen beobachtet werden.

Die typische Reaktion der mechanisch mit dem Kraftmikroskop stimulierten Osteoblasten war eine Calciumerhöhung im Zytosol (siehe Abbildung 34, grün dargestellt). Zellen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu dieser Zelle lagen, zeigten hingegen eine deutlich zeitverzögerte Calciumantwort (siehe Abbildung 34, rot und schwarz dargestellt). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die stimulierte Zelle in Folge eines mechanischen Reizes Botenstoffe aussendet, die zu einer Calciumantwort in den Nachbarzellen führen. Durch die begrenzte Ausbreitungsgeschwindigkeit der Signalmoleküle, beispielsweise durch *„gap-junctions“* hindurch, ist die Zellantwort jedoch zeitlich verzögert. Diese Calciumreaktionen der Nachbarzellen traten in einigen Zelllängen Entfernung von der mechanisch stimulierten Zelle nicht mehr auf. Eine Erklärung hierfür könnte die Ausschüttung des Botenstoffs in den Extrazellularraum sein. Die Diffusion in den zellumgebenden Halbraum sorgt dafür, dass die Konzentration der Signalmoleküle mit dem Abstand vom Urspungsort mindestens zum Quadrat abnimmt und so die Auslöseschwelle einer Calciumantwort schnell unterschritten wird.

6.2.3 Die intrazelluläre Signalweiterleitung

Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Ergebnisse zeigen, dass untersucht werden muss, wie das Calciumsignal in den Knochenzellen zustande kommt. Für die Generierung von Calciumsignalen sind zum einen sehr hohe Kräfte notwendig. Da diese in keiner Relation zu Scherflusskräften stehen, kann die erhöhte Calciumkonzentration womöglich auf einen nicht-physiologischen Vorgang zurückgeführt werden. Zum anderen könnte ein anderer Mechanotransduktionsweg als der nach einer Stimulation mit Scherflüssen und Dehnungsreizen ausgelöst werden. Um diese Vermutungen zu klären, müssen die Prozesse, die zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bei lokaler Stimulation beitragen, untersucht werden.

Die Calciumkonzentration des Zytosols wird in erster Linie durch zwei Prozesse beeinflusst (siehe Abbildung 35). Auf der einen Seite kann Calcium auf Grund des zwi-

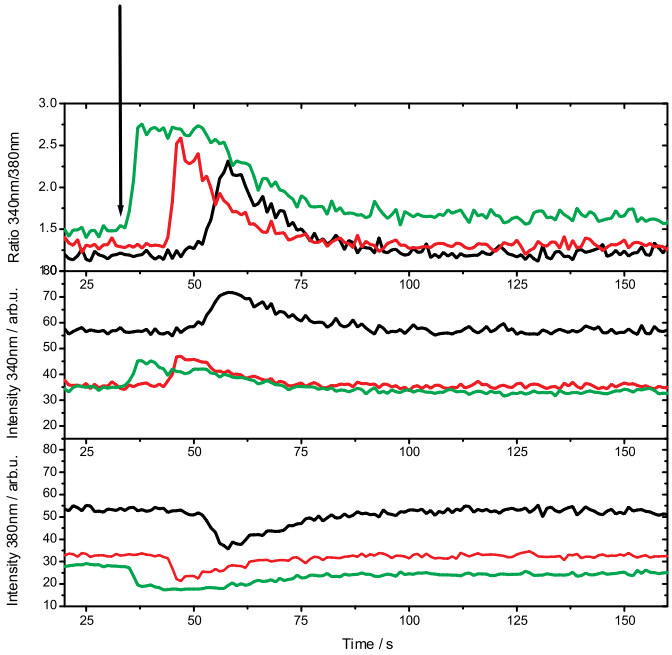

Abbildung 34: *Dargestellt ist eine typische Calciumantwort nach mechanischer Stimulation der Zellen mit dem Kraftmikroskop. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Stimulation. Die stimulierte Zelle ist grün, die Nachbarzellen sind rot und schwarz dargestellt. Die zeitliche Verzögerung des Calciumanstiegs der Nachbarzellen ist zu erkennen.*

schen Zytosol und Extrazellularraum vorliegenden Calciumgradienten durch das Öffnen Calcium-sensitiver Ionenkanäle in das Zellinnere einströmen (siehe Kapitel 2.2.1). Hierbei können unter anderem mechanosensitive Ionenkanäle eine wichtige Rolle spielen (siehe Kapitel 2.3.6). Auf der anderen Seite können die Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) freigesetzt werden, indem Inositol-(1,4,5)-Triphosphat (IP_3) an die entsprechenden Rezeptoren des ERs bindet [12] (siehe Kapitel 2.3.6).

Es konnte bereits beobachtet werden, dass das Calcium in Folge von Scherflüssen und Dehnungsreizen (vermittelt durch die Aktivierung der PLC, siehe Kapitel 9) aus den intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Nun ist fraglich, woher die Calciumionen stammen, die nach vertikaler Stimulation zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration beitragen. Diese Frage wurde in dieser Arbeit mit den folgenden Experimenten untersucht.

Thapsigargin-Experimente Thapsigargin führt durch die Blockade der Aufnahme freier Calciumionen aus dem Zytosol in das ER zu einer Entleerung des intrazellulären Speichers (siehe Kapitel 3.9.1). Folglich stehen dort keine weiteren Ionen zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Verfügung (siehe Abbildung 36). Für die Blockade der Calciumaufnahme in das ER wurden die Zellen für 60 Minuten mit 5μM Thapsigargin inkubiert und anschließend mit Hilfe des Kraftmikroskops stimuliert. Wie beschrieben blieben die Zyklenzahl und Periodendauer über die Stimulationsdauer konstant. Ledig-

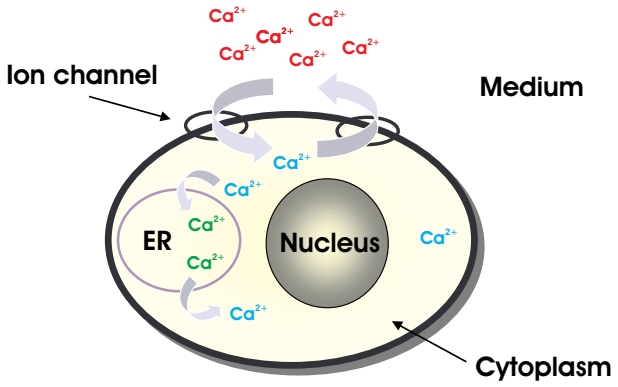

Abbildung 35: *Gezeigt ist die schematische Darstellung der Calciumionen-Verteilung zwischen Zytosol (Cytoplasm), Endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Extrazellularraum (Medium).*

lich die Kraft wurde zur Bestimmung der Kraftschwelle sukzessiv erhöht. Da auf Grund der Behandlung der Zellen mit Thapsigargin diesen keine Calciumionen zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zur Verfügung standen, konnte mit Hilfe der Experimente die Rolle des intrazellulären Speichers für die Calciumantwort der Zelle untersucht werden.

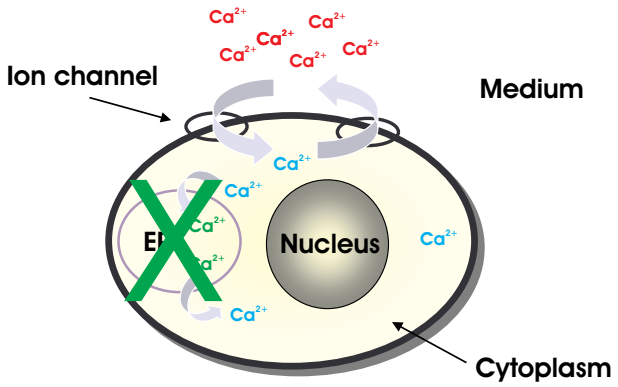

Abbildung 36: *In der Abbildung ist die Auswirkung von Thapsigargin auf den Zugriff auf ER-gespeicherte Calciumionen dargestellt. Thapsigargin blockiert die Rezeptoren des ER, so dass keine Calciumionen aus dem intrazellulären Speicher freigesetzt werden können.*

Die Zellen reagierten auf die vertikale mechanische Stimulation mit dem Kraftmikroskop wie zuvor mit einer charakteristischen Calciumantwort (siehe Abbildung 33). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Calciumionen, die zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels beitragen, nicht aus dem Endoplasmatischen Retikulum stammen, da trotz dessen Blockade die Calciumerhöhung der Zelle als Reaktion auf einen mechanischen Reiz stattfand.

Mit den Thapsigargin-Experimenten konnte also gezeigt werden, dass andere Prozesse zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führen als bei der Applikation von Scherflüssen und Dehnungsreizen (siehe Kapitel 2.3.8).

Quenching-Experimente Da auf Grund der Ergebnisse der Thapsigargin-Experimente das Endoplasmatische Retikulum als Quelle der Calciumionen, die nach einer mechanischen Stimulation vorliegen, auszuschließen ist, wurden die folgenden Experimente auf die Untersuchung des extrazellulären Einstroms der Calciumionen hin ausgerichtet. Hierfür können, wie in Kapitel 3.9.3 beschrieben, Manganionen verwendet werden. Diese Ionen besitzen die gleichen physiologischen Eigenschaften wie Calcium, jedoch mit dem Unterschied, dass der verwendete Farbstoff nicht mehr fluoresziert, sobald Mangan mit diesem eine Verbindung eingeht („Quenching“, siehe Kapitel 3.9.3). Für den Versuch wurden die im extrazellulären Medium vorliegenden Calciumionen durch Manganionen (2mM) substituiert (siehe Abbildung 37) und die Zellantwort nach Stimulation mit dem Kraftmikroskop wurde beobachtet.

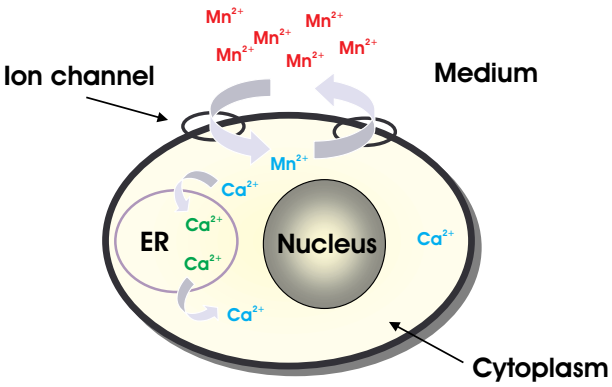

Abbildung 37: *Schematische Darstellung der intra- und extrazelluären Kationenverteilung mit Manganionen im Zellkulturmedium. Manganionen haben die gleichen physiologischen Eigenschaften wie Calcium und können durch Calcium-spezifische Ionenkanäle in die Zelle einströmen.*

Die mechanische Stimulation führte sowohl nach Anregung bei 340nm als auch nach Anregung bei 380nm zu einem starken Fluoreszenzverlust (siehe Abbildung 38). Die Manganionen strömten anstatt der Calciumionen durch Ionenkanäle in das Zytosol ein und quenchten die Farbstoffmoleküle. In der Folge änderte sich das chemische Gleichgewicht zwischen Farbstoff und den noch vorhandenen Calciumionen, so dass im Ratio-Signal eine scheinbare Calciumerhöhung zu beobachten war.

Die experimentelle Ergebnisse zeigen, dass der durch die mechanische Stimulation evozierte Calciumanstieg durch Ionen hervorgerufen werden muss, die durch Ionenkanäle aus dem Extrazelluärmedium in die Zelle einströmen.

Cadmium- und Lanthan-Experimente Um zu untersuchen, ob der Einstrom der Calciumionen über Calcium-sensitive Ionenkanäle vermittelt erfolgt, wurden dem extrazellulären Medium die Schwermetalle Cadmium oder Lanthan zugesetzt. Beide verhindern den Transport von Calciumionen in die Zelle. Dieser würde auf Grund des vorhandenen Konzentrationsgradienten bei geöffneten Ionenkanälen stattfinden (siehe Kapitel 3.9.4 und Abbildung 39).

Zur Inhibition der spezifischen Calciumkanäle wurden dem Medium entweder 10mM Cadmium oder 10μM Lanthan zugesetzt. Da diese Schwermetalle in Anwesenheit von

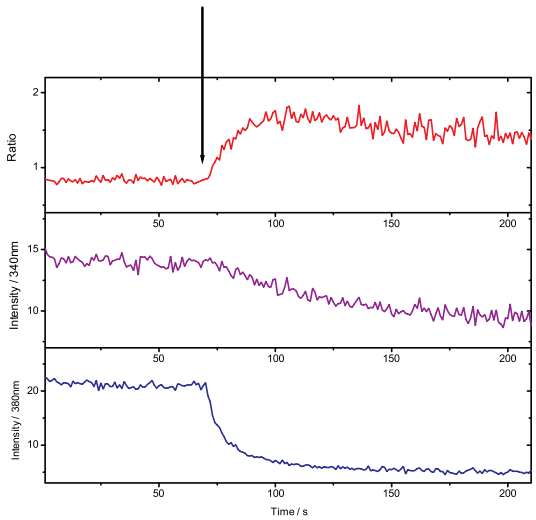

Abbildung 38: *Dargestellt ist eine klassische Calciumantwort nach mechanischer Stimulation mit dem Kraftmikroskop in Anwesenheit von Manganionen im Medium. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Stimulation. Rot gibt den Verlauf des Fluoreszenzverhältnisses wieder. Violett zeigt die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Fura-2 nach Anregung bei 340nm, blau die bei 380nm.*

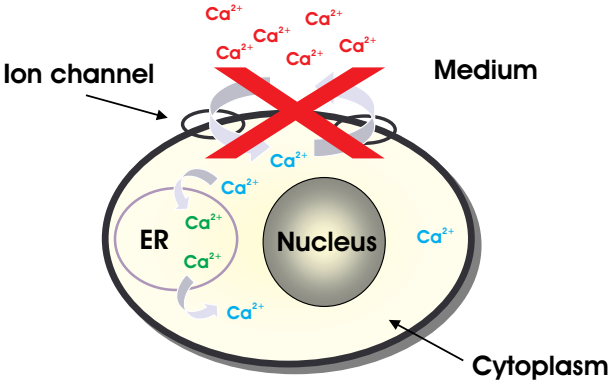

Abbildung 39: *Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung der intra- und extrazellulären Kationenverteilung in Osteoblasten in Verbindung mit Cadmium- beziehungsweise Lanthanionen. Sowohl Cadmium als auch Lanthan blockieren alle spezifischen Ionenkanäle, so dass Calcium nicht in die Zelle einströmen kann.*

Phosphaten und Bikarbonaten ausflocken, kamen Medien zum Einsatz, die solche Verbindungen nicht enthielten (siehe Kapitel 3.10).

Trotz der Blockade der Calcium-sensitiven Ionenkanäle war nach mechanischer Stimulation mit dem Kraftmikroskop eine Calciumantwort, wie sie auch ohne den Zusatz der Schwermetalle auftritt, messbar (siehe Abbildung 33). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Calciumionen, die zur intrazellulären Erhöhung der Konzentration beitragen, nicht durch Ionenkanäle in das Zytosol gelangen.

6.2.4 Mikroporation der Zellen

Mit Hilfe der oben beschriebenen experimentellen Ergebnisse konnte die Herkunft der Calciumionen, die zu einer intrazellulären Calciumerhöhung beitragen, geklärt werden: die Calciumionen strömen in Folge der lokalen Stimulation aus dem Extrazellulärmedium in das Zytosol ein und stammen nicht aus intrazellulären Speichern. Dabei sind keine Calcium-sensitiven Ionenkanäle an der Generierung der Calciumsignale beteiligt. Des Weiteren kann die beobachtete Calciumdynamik nicht durch den passiven Drift der Calciumionen über die Zellmembran oder durch den aktiven Ionentransport mittels Ionenpumpen erklärt werden, da diese Prozesse zu langsam ablaufen.

Die Vermutung, dass ein nicht-physiologischer Prozess für die intrazelluläre Calciumerhöhung in Folge der lokalen Stimulation verantwortlich ist und damit den Beobachtungen kein anderer Mechanotransduktionsweg zu Grunde liegt, wird durch die oben beschriebenen Messungen gestärkt. Die zur Auslösung der Calciumsignale notwendigen hohen Kräfte lassen vermuten, dass durch die mechanische Stimulation die Zellmembran kurzzeitig verletzt wird, so dass ein Ionenaustausch entlang des Konzentrationsgradienten erfolgen kann und damit eine scheinbare Calciumantwort auftritt.

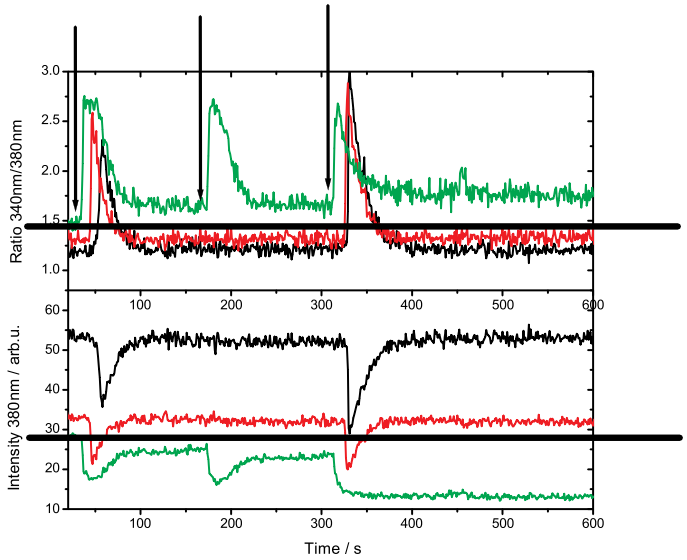

Abbildung 40: *Dargestellt sind charakteristische Calciumantworten nach mechanischer Stimulation mit dem Kraftmikroskop. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der drei Stimulationen. Die stimulierte Zelle ist grün, die Nachbarzellen sind rot beziehungsweise schwarz gekennzeichnet. Gezeigt sind das Ratio des Farbstoffes Fura-2 sowie die Fluoreszenzintensität nach Anregung bei 380nm. Die schwarzen Querbalken definieren das ursprüngliche Ratio- bzw. Fluoreszenzniveau der stimulierten Zelle. Nach jeder mechanischen Stimulation steigt das Ratio, während die Fluorezenzintensität nach Anregung bei 380nm fällt.*

Dieser Verdacht konnte erhärtet werden, indem die Calciumsignale nach vertikaler Stimulation genauer untersucht wurden. In Abbildung 40 ist eine solche typische Calciumantwort abgebildet. Die Intensität der Fluoreszenz nach Anregung des Farbstoffes Fura-2 bei

380nm und das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (siehe Kapitel 3.3) ist hier höher aufgelöst dargestellt (grün: stimulierte Zelle; rot und schwarz: Nachbarzellen). Wie im Anstieg des Ratios und im Abfall der Fluoreszenzintensität deutlich wird, reagiert die Zelle auf jeden Stimulus (siehe Pfeile in Abbildung 40) mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Die Nachbarzellen hingegen zeigen lediglich nach der ersten und der dritten Stimulation eine Calciumantwort, die eine interzelluläre Signalweiterleitung vermuten lässt. Es wird deutlich, dass die Fluoreszenzintensität der stimulierten Zelle nach Anregung des Calcium-ungebundenen Farbstoffes bei 380nm auf einem niedrigeren Niveau verbleibt. Da die Emissionsintensität des Calcium-gebundenen Farbstoffes annähernd unverändert bleibt (hier nicht dargestellt), kommt es im Ratio-Signal nach einer Calciumantwort zu einer scheinbar erhöhten Calciumkonzentration. Dieses Phänomen tritt bei den Nachbarzellen nicht auf. Des Weiteren zeigen auch Calciumantworten, die durch Dehnungsreize und Scherflüsse ausgelöst wurden, keinen Fluoreszenzverlust (siehe Abbildung 41). Auch die in dieser Arbeit durchgeführten PTH-Experimente (Eigenschaften von PTH siehe Kapitel 3.9.2) zeigen ebenfalls keine scheinbar erhöhte Calciumkonzentration nach Abklingen des ausgelösten Calciumsignals (siehe Abbildung 41).

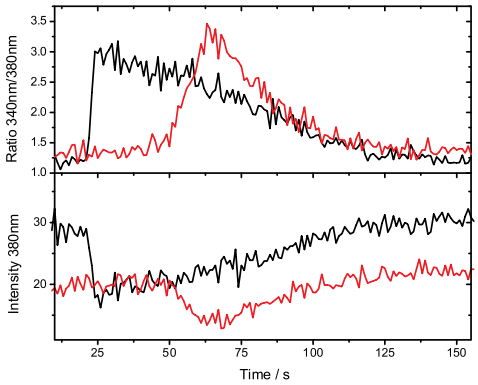

Abbildung 41: *Die Abbildung zeigt den charakteristischen Fluoreszenzverlauf nach Zugabe von PTH (rot) oder mechanischer Stimulation mit Scherflüssen beziehungsweise Dehnungsreizen (schwarz). Dargestellt sind das Verhältnis (Ratio) und die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Fura-2 nach Anregung bei 380nm.*

Der lediglich nach der mechanischen Stimulation auftretende Fluoreszenz-Verlust des Calcium-ungebundenen Farbstoffs kann durch eine Mikroporation der Zellmembran erklärt werden: durch zu hohe Kräfte wird die Membran kurzzeitig verletzt, so dass Calcium in die Zelle einströmen kann und eine physiologische Calciumantwort suggeriert. Im Gegenzug verlassen Farbstoffmoleküle auf Grund des Konzentrationsgradienten das Zellinnere und verringern so die zellinterne Farbstoff-Konzentration. In der Folge ändert sich das chemische Gleichgewicht zwischen Calcium und Fura-2 und im Verhältnis-Signal ist ein scheinbarer Anstieg des intrazellulären Grundlevels der Calciumkonzentration zu beobachten. Auch die zeitverzögerte Reaktion der Nachbarzellen lässt sich mit Hilfe der Mikroporation erklären, da neben dem Farbstoff auch andere Stoffe aus der stimulierten Zelle austreten können. Diese gelangen durch Diffusion durch den Extrazellularraum zu den Nachbarzellen und können dort eine Calciumantwort auslösen. Bei dieser Art der interzellulären Signalweiterleitung würde es sich jedoch um ein nicht-physiologisches Phänomen

handeln.

Erst nicht-physiologisch hohe Kräfte können scheinbare Calciumantworten auslösen. Sie entstehen jedoch in Folge einer durch die applizierte Kraft hervorgerufenen Mikroporation der Zellmembran. Eine Mechanotransduktion, in deren Folge die intrazelluläre Calciumkonzentration verändert wird, kann durch die lokale Stimulation nicht ausgelöst werden. Auf Grund der Tragweite dieses Ergebnisses ist eine eindeutige Verifikation notwendig. Deshalb werden in den kommenden Abschnitten Experimente und Überlegungen vorgestellt, die zur Bestätigung der Hypothese der Mikroporation der Zellmembran durch lokale Stimulationen mit einem Kraftmikroskop beitrugen.

EGTA-Experimente Zur Bestätigung der angenommenen Mikroporation der Zellmembran wurden Experimente mit EGTA durchgeführt. Diese sollten helfen, den parallel zum Calciumeinstrom vorhandenen Ausstrom von Fura-2 zu zeigen. Hierzu wurde dem Medium EGTA in einer Konzentration von 5μM zugesetzt. EGTA bindet die im Extrazellularraum befindlichen Calciumionen durch die Ausbildung eines Komplexes, so dass die extrazelluläre Calciumkonzentration auf die intrazelluläre Konzentration von circa 100nM eingestellt werden konnte (siehe Kapitel 3.9.5). In der Folge kam es zur Aufhebung des über der Zellmembran bestehenden Konzentrationsgradienten (siehe Abbildung 42).

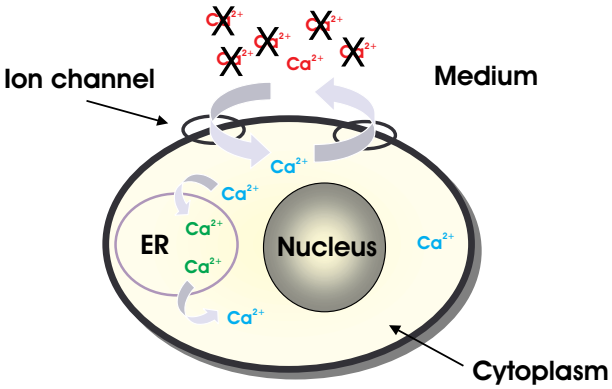

Abbildung 42: *Die intra- und extrazelluläre Kationen-Verteilung nach Zugabe von EGTA zum Extrazellulärmedium ist schematisch dargestellt. Durch EGTA wird die extrazelluläre Calciumkonzentration auf den intrazellulären Wert eingestellt und das Konzentrationsgefälle aufgehoben.*

Wie die Abbildung 43 verdeutlicht, konnte trotz des geringen Signal-Rausch-Abstandes in den einzelnen Experimenten der Abfall der Fluoreszenz und damit verbunden ein Anstieg des Ratios verzeichnet werden. Die Farbstoffmoleküle strömen also durch die Mikroporation der Membran aus der Zelle aus. In der Folge ändert sich das chemische Gleichgewicht zwischen Farbstoff- und Calciumkonzentration, so dass eine Abnahme der Calcium-ungebundenen Fluoreszenzintensität zu beobachten ist.

Die experimentellen Ergebnisse konnten die Hypothese, dass der Calciumanstieg in den Osteoblasten nach mechanischer Stimulation durch eine Perforation der Zellmembran ausgelöst wird, bestätigen. Die Mikroporation der Membran ist, da sich eine Zellmembran prinzipiell wie eine Flüssigkeit verhält und damit eine Regeneration ermöglicht, nur temporär. Aus diesem Grund können Farbstoffe direkt in einzelne Zellen injiziert werden, ohne dass der Zelltod eintritt [93].

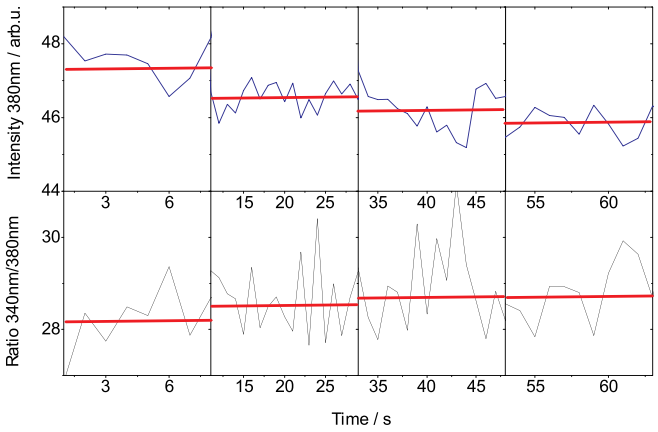

Abbildung 43: *Die Abbildung zeigt einen typischen Fluoreszenzverlauf nach mechanischer Stimulation der mit EGTA inkubierten Zellen und Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 bei 380nm. Dargestellt sind das Ratio (schwarz) und die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes nach Anregung bei 380nm (blau). Die roten Linien repräsentieren die Mittelwerte der dargestellten Größen für die jeweiligen Zeiträume nach der mechanischen Stimulation dar. Sie sind durch senkrechte Linien abgegrenzt (schwarz).*

6.2.5 Der Einfluss physiologischer Parameter auf die scheinbare Calciumkonzentration

Wie durch die Verwendung der Schwermetalle Cadmium und Lanthan gezeigt werden konnte, erfolgt der Einstrom von Calciumionen nicht durch spezifische Ionenkanäle. Die Zuverlässigkeit dieser Experimente bleibt allerdings fraglich, da die Auswirkungen der Schwermetalle auf die Ionenkanäle bis heute in der Literatur kontrovers diskutiert werden. Jedoch bildet dieses Experiment eine wichtige Grundlage für die Interpretation, dass die Mikroporation der Zelle die Ursache für den durch die lokale Stimulation induzierten Calciumeinstrom ist. Um sicherstellen zu können, dass die Mikroporation tatsächlich die Folge der lokalen Stimulation ist, wurden weitere Experimente durchgeführt. Diese erfolgten unter der Annahme, dass die Ergebnisse der Cadmium- und Lanthan-Experimente falsch sind und es sich bei der Beobachtung um eine physiologische Calciumerhöhung handelt, die in Folge der Öffnung von Calcium-sensitiven Ionenkanälen entsteht. Auch unter dieser Hypothese musste jetzt die Frage beantwortet werden, wie es - in Folge der lokalen Stimulation - zu einem Fluoreszenzverlust und damit verbunden zu einer scheinbaren Erhöhung des Calcium-Ruheniveaus kommen kann. Dazu wurde in erster Linie der Einfluss der physiologischen Umgebungsbedingungen auf die Eigenschaften des Farbstoffes Fura-2 betrachtet. Diese Experimente werden im Folgenden dargestellt und haben gezeigt, dass die Mikroporation unter den beobachteten Phänomenen die einzige Erklärung des induzierten Calciumeinstroms ist.

Farbstoff-Sequestration Die Dynamik von Calciumantworten kann durch die Sequestration des Farbstoffes verändert werden. Unter Sequestration versteht man den Einbau von

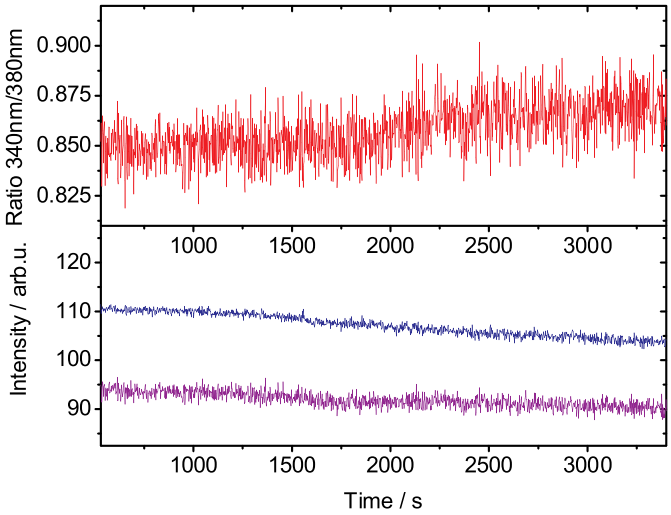

Abbildung 44: *Die Abbildung zeigt einen typischen Fluoreszenzverlauf unter der Langzeitbeobachtung von Zellen, die mit Fura-2 gefärbt wurden. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffes Fura-2 nach Anregung bei 380nm ist blau, die Fluroeszenzintensität nach Anregung bei 340nm violett und das Verhältnis aus beiden Intensitäten (Ratio) rot aufgetragen.*

Farbstoffmolekülen in die einzelnen Zell-Kompartimente wie zum Beispiel die Mitochondrien [183]. Durch die Umlagerung des Farbstoffes Fura-2 in die Zellorganellen steht dieser nicht länger zur Messung der zytosolischen Calciumkonzentration zur Verfügung.

Sollte die Sequestration von Fura-2 tatsächlich die Charakteristik der Kraftmikroskop-Experimente beeinflussen, so hätte dieser Effekt auch bei anderen Calciumantworten zum Beispiel nach Stimulation mit PTH, Scherflüssen oder Dehnungsreizen zu beobachten sein müssen. Da dieses jedoch nicht der Fall war, sind Sequestrations-Effekte zur Erklärung der Calciumcharakteristik, die nach Stimulation mit dem Kraftmikroskop auftritt, auszuschließen.

Ausbleichen des Farbstoffes Neben der Sequestration könnte ein *„Farbstoff-Bleaching“* (Ausbleichen) ebenfalls zu scheinbaren Veränderungen der Calciumkonzentration führen. Fluoreszenzfarbstoffe reagieren auf intensives Licht empfindlich: die einzelnen Moleküle werden durch das Anregungslicht so verändert, dass sie ihre ursprünglichen optischen Eigenschaften verlieren, sie bleichen aus (engl. *„photobleaching“*). Dieser Effekt kann durch eine Verringerung der Lichtintensität und Sauerstoffkonzentration vermindert werden [8]. Auch Fura-2 ist, wenngleich weniger als andere Farbstoffe [245], gegenüber dem Photobleaching empfindlich [151]. In Abbildung 44 ist eine Langzeitmessung dargestellt, in der die Zellen unter hohen optischen Anregungsdichten über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden. Wie sich zeigte, wird die Fluoreszenz der Zellen mit zunehmender Bestrahlungsdauer verändert. Hierbei nimmt die Intensität der 380nm-Fluoreszenz schneller ab als die nach Anregung bei 340nm. In der Folge ist ein relativer Anstieg des Ratios beider Intensitäten zu beobachten, was auf eine scheinbare Calciumerhöhung schließen lässt. Diese kann jedoch durch eine veränderte Farbstoffkonzentration im Zytosol erklärt werden,

da hierbei das chemische Gleichgewicht zwischen Calcium-gebundenen und dissoziiertem Farbstoff verändert wird.

Wie die Abbildung 44 verdeutlicht, ist das Photobleaching ein langsamer Effekt. Daher kann er nicht den Fluoreszenzverlust erklären, der unmittelbar nach der mechanischen Stimulation auftritt.

Calcium-Puffer, Temperatur- und pH-Effekte Neben Sequestration und Photobleaching haben auch die Puffereigenschaften der im Zytosol vorliegenden Substanzen, die Umgebungs-Temperatur und der intrazelluläre pH-Wert einen Einfluss auf die Eigenschaften des Farbstoffes und damit verbunden auf die scheinbare Calciumkonzentration. Diese Einflüsse werden im Folgenden beschrieben.

Fluoreszenzfarbstoffe wie Fura-2 befinden sich mit den zytosolischen Calciumionen in einem chemischen Gleichgewicht. Die dabei auftretenden Puffereigenschaften stehen zu den endogenen Puffern in Konkurrenz. Da letztere jedoch im Vergleich zu Fura-2 durch wesentlich geringere Kapazitäten, Affiniäten und Mobilitäten gegenüber Calcium gekennzeichnet sind [163, 10], eignet sich Fura-2 bestens zur Detektion kleiner Änderungen in der intrazellulären Calciumkonzentration. Dem hingegen haben die endogenen Puffer nur einen minimalen Einfluss auf die Calciumdynamik, so dass der Abfall der Fluoreszenzintensitäten und die damit verbundene scheinbar erhöhte Calcium-Ruhekonzentration nicht mittels dieser Puffer erklärt werden kann.

Bei der Bindung von Calcium an Fura-2 spielt die Dissoziationskonstante K_D des Farbstoffes eine wichtige Rolle. Sie gibt nicht nur Aufschluss über die Fähigkeit von Fura-2, Calciumionen zu binden, sondern auch über das chemische Gleichgewicht zwischen dem dissoziiertem Farbstoff und den Farbstoffmolekülen, die Calciumionen gebunden haben. Auf Grund der Änderung des K_D-Wertes ändern sich auch die Fluoreszenzintensitäten für die Anregung bei 340nm respektive 380nm. Die Dissoziationskonstante wird dabei sowohl vom pH-Wert des Zytosols als auch von der Temperatur beeinflusst [137].

Der pH-Wert der Zelle ist unter anderem von der extrazelluären Kohlendioxidkonzentration und dem damit verbundenen extrazellulären pH-Wert abhängig [243]. Dieser nimmt mit der Zeit auf Grund des Gasaustausches an der Oberfläche des Mediums zu. Um daher bei den Experimenten den Einfluss des pH-Wertes auf die Zellen ausschließen zu können, erfolgte ein permanenter Wechsel des Kulturmediums. Dieser wurde durch die Verwendung einer Perfusionspumpe realisiert, mit der der pH-Wert konstant auf 7,4 gehalten wurde. Allerdings kann hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass die Änderung der Fluoreszenzeigenschaften von Fura-2 auf einer schnellen intrazellulären Akkumulation von Protonen beruht. Diese könnten als Antwort auf einen mechanischen Reiz über spannungsgesteuerte Protonen-Kanäle in die Zelle gelangen und dort eine spontane, wenn auch reversible pH-Änderung verursachen [162]. Um zu untersuchen, ob die veränderten Fluoreszenzeigenschaften einen Protonen-Einstrom zur Ursache haben, wurden Langzeitbeobachtungen der mechanisch stimulierten Zellen mit dem Kraftmikroskop durchgeführt. Bei diesen Experimenten konnte beobachtet werden, dass die nach der Stimulation erniedrigte Fluoreszenzintensität nicht auf ihr ursprüngliches Niveau zurückkehrte. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Beteiligung von H^+-Ionen ausgeschlossen werden kann. Die beobachtete Charakteristik der Calciumantwort kann also nicht mit der Änderung des pH-Wertes erklärt werden.

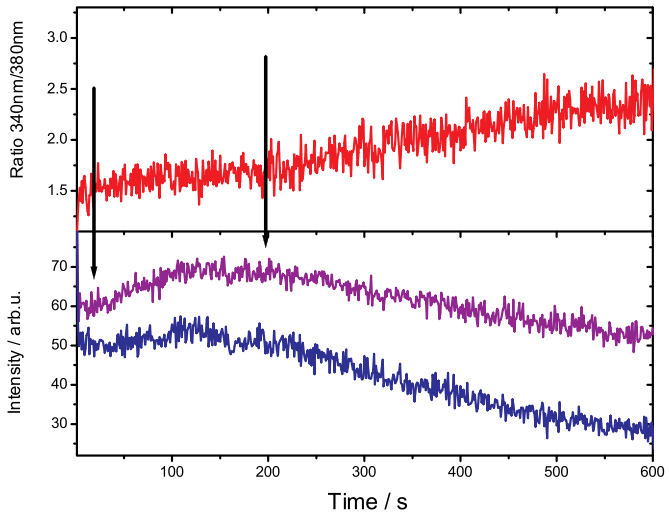

Abbildung 45: *Die Abbildung zeigt einen typischen Fluoreszenzverlauf unter Langzeitbeobachtung von Fura-2 und Variation der Umgebungstemperatur. Die rote Kurve charakterisiert das Verhältnis des Farbstoffes während violett und blau die Fluoreszenzintensitäten nach Anregung bei 340nm beziehungsweise 380nm wiedergeben. Die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt des graduellen Anstiegs der Temperatur beziehungsweise das Erreichen der Maximaltemperatur von 37°C.*

Neben dem pH-Wert hat auch die Umgebungstemperatur einen Einfluss auf die Dissoziationskonstante von Fura-2. In Abbildung 45 ist eine Langzeitmessung dargestellt, in der die Temperatur zwischen dem ersten und dem zweiten Pfeil von 25°C auf 37°C erhöht und dann konstant gehalten wurde. Wie deutlich zu erkennen ist, stiegen zunächst beide Fluoreszenzintensitäten. Die Emission nach Anregung bei 380nm nahm dabei schwächer zu. Der Anstieg ging anschließend in einen kontinuierlichen Abfall beider Kanäle über. Letzterer ist auf Photobleaching und eine erhöhte Exozytose des Farbstoffes in Folge der höheren Temperatur zurückzuführen. Der aus dem hierbei veränderten chemischen Gleichgewicht zwischen Farbstoff und Calciumionen resultierende scheinbare Calciumanstieg kann am Ratio abgelesen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die unterschiedlichen Temperaturen ein zusätzlich verändertes physiologisches Calcium-Grundniveau in der Zelle herbeiführen. Es ist jedoch nicht anzunehmen, dass die lokale mechanische Stimulation eine spontane signifikante Temperaturerhöhung auslöst.

Das Zusammenspiel der oben genannten simultanen Prozesse ergibt Fluoreszenzkurven, wie sie in Abbildung 45 dargestellt sind. Die einzelnen Prozesse und ihre zeitliche Relevanz sind nur schwer voneinander zu trennen. Jedoch laufen alle Prozesse auf einer Zeitskala ab, die nicht mit der Zeitskala der mechanischen Stimulation und deren Auswirkungen auf die Calciumkonzentration korreliert.

Sonstige Prozesse Der nach Anregung des Farbstoffes bei 380nm resultierende Abfall der Fluoreszenzintensität könnte eine Zerstörung interner Zellstrukturen zur Ursache haben, in deren Folge eine nicht-physiologische Signalkaskade ausgelöst wird.

Auch Mangan- oder andere Metallionen, die sich während der Stimulation an der Sonde des Cantilevers befinden und durch eine Verletzung der Zellmembran eindringen können, wären als Ursache des Farbstoffquenchings denkbar. Das Quenching wiederum ließe einen scheinbaren Calciumanstieg erkennen, wie er in Abbildung 37 dargestellt ist.

Außerdem muss der in der Mikroskopie auftretende *„Schichtdickeneffekt“* erwähnt werden. Er führt dazu, dass die Intensität der vom Objektiv eingesammelten Fluoreszenz variiert. Mikroskop-Objektive haben eine bestimmte Fokustiefe, die in der Regel (und bei den verwendeten Objektiven) bei circa 5μm liegt. Durch die Deformation der Zelle können das Zytosol und damit verbunden die fluoreszierenden Farbstoffmoleküle auf Grund dieser Fokustiefe aus der Betrachtungsebene heraus verschoben werden, so dass sich die Intensität der eingesammelten Fluoreszenz des Farbstoffes ändert. Das Hintergrundrauschen bleibt jedoch hierbei annähernd konstant. Die Folge wäre eine Änderung des Fluoreszenz-Verhältnisses des Quotientenfarbstoffes Fura-2 und eine scheinbar veränderte Calciumkonzentration. Jedoch zeigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen, dass dieser Effekt erst signifikant wird, wenn die Zellen um mehr als 10μm aus der Fokusebene heraus geschoben werden. Eine solche Verschiebung ist jedoch, da Zellen lediglich eine Höhe von 2μm bis 3μm aufweisen, durch eine mechanische Stimulation und die damit verbundene viskoelastische Verformung nicht möglich. Des Weiteren wäre nach einiger Zeit die ursprüngliche Zellform wieder hergestellt und der Schichtdickeneffekt hätte damit keinen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität mehr.

6.2.6 Die Osteosarkom-Stammzelllinie MG63

Um eine physiologische Spezifität der zellulären Antwort von Osteoblasten auf die lokale vertikale mechanische Stimulation ausschließen zu können, wurden die zuvor beschriebenen Experimente zusätzlich mit der Zelllinie MG63 durchgeführt.

Diese Osteosarkom-Zellen zeigten ab einer gewissen Schwellkraft (siehe Abbildung 40) das gleiche Verhalten in der Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration wie Osteoblasten. Auch hier kam es zu einer auf die Mikroporation der Zellmembran zurückführbare, nicht-physiologischen Erhöhung des Calciumlevels. Dieses Phänomen tritt dementsprechend nicht nur spezifisch bei primären Osteoblasten auf, sondern scheint ein grundlegendes Problem bei der gewählten Art der Stimulation zu sein.

6.2.7 Zusammenfassung

Die experimentellen Ergebnisse und Überlegungen dieser Arbeit zeigen, dass die vertikale mechanische Stimulation von Osteoblasten mit Hilfe des eindimensionalen Kraftmikroskops unter der Variation aller Stimulationsparameter (Frequenz, Amplitude, Zyklenzahl) keine physiologische Calciumerhöhung in der Zelle auslöst. Im Gegensatz zu Scherkräften und Dehnungsreizen kommt es hier nicht zu einer Aktivierung der Phospholipase C und nachfolgend zu einer verzögerten Calciumantwort. Der charakteristische Mechanotransduktionsweg kann also durch lokale vertikale Deformationen mit einer 10μm messenden Silika-Kugel nicht in Gang gesetzt werden. Des Weiteren kommt es in Folge der Stimulation mit dem Kraftmikroskop auch nicht zu einer Aktivierung mechanosensitiver Ionen-

kanäle.

Erst unphysiologisch große Kräfte führen zu einer scheinbaren Calciumantwort. Diese ist, da andere Erklärungsansätze auf Grund der Experimente und Überlegungen verworfen werden müssen, auf eine Mikroporation der Zelle zurückzuführen. Bei der Mikroporation wird die äußere Zellmembran kurzzeitig verletzt, so dass ein Ionenaustausch stattfinden und Farbstoff aus der Zelle austreten kann. Die Zellen sind zwar gegenüber äußeren Kräften relativ stabil [94], weisen jedoch lediglich ein Elastizitätsmodul von 1kPa bis 10kPa auf. Da die maximal applizierten Kräfte, die zu einer scheinbaren Calciumantwort führten, im Bereich von 10kPa lagen, können kleine temporäre Verletzungen der Membran nicht ausgeschlossen werden. Nur mit Hilfe der Mikroporation kann sowohl die spontane Calciumerhöhung als auch die Veränderung des Calcium-Ruheniveaus der Zelle erklärt werden.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgenommenen lokalen Stimulation der Osteoblasten widersprechen den Interpretationen, die Horton und seine Mitarbeiter auf Grund vergleichbarer Experimente machten [23]. Sie stimulierten unter zu Hilfenahme eines Rasterkraftmikroskops mit einer 10μm messenden Silika-Mikrokugel Osteoblasten, die aus Rattenknochen gewonnen wurden. Mittels der konfokalen Mikroskopie und dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo3-AM konnten sie bei Stimulationen mit Kräften von $>$ 10nN einen sofortigen intrazellulären Calciumanstieg, der wohl auf die Beteiligung von mechanosensitiven Ionenkanälen zurückzuführen ist, feststellen (siehe Abbildung 1E in [23]). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist die Verwendung des Einzelwellenlängen-Farbstoffes Fluo3-AM, der in Kombination mit einem Rasterkraftmikroskop auf Grund des auf den Cantilever fokussierten Laserstrahls zu Fluoreszenz-Artefakten führen kann. So fällt beispielsweise auf, dass die in [23] in der Abbildung 1E dargestellte intrazelluläre Calciumkonzentration schon etliche Sekunden vor dem Kontakt des Cantilevers mit der Zellmembran (TD) anstieg. Diese Beobachtung kann nicht als physiologisch angesehen werden und könnte in einer artifiziellen Messung der Farbstoff-Fluoreszenz begründet sein. Des Weiteren stellt sich auch hier die Frage nach der Mikroporation der Zellen. Allerdings scheinen Horton und seine Mitarbeiter mit deutlich niedrigeren Kräften gearbeitet zu haben. Diese wurden als $>$ 10nN beschrieben [23]. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit führten Kräfte, die in der Nähe von 10nN lagen, jedoch nie zu einer Mikroporation. Es wäre hingegen denkbar, dass eine Spezifität bezüglich der Zellkultur vorlag: so erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Phänotypisierung der Osteoblasten durch mehrere verschiedene Nachweise (siehe Kapitel 3.2.3); Horton und seine Mitarbeiter hingegen erbrachten diesen Nachweis lediglich über die alkalische Phosphatase. Hier besteht die Möglichkeit, dass die Arbeitsgruppe um Horton zwar eine vernünftige Interpretation der Ergebnisse vorgenommen hat, die sich jedoch nicht zwangsläufig auf Osteoblasten beziehen, sondern eventuell auf ausdifferenzierte Osteozyten. Letztere könnten auf lokale Reize mit einer spontanen Calciumanwort reagieren.

Beide Ergebnisse stehen sich also konträr gegenüber. Auf Grund der zahlreichen Kontrollexperimente, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, kann für Osteoblasten folgendes Ergebnis festgehalten werden: physiologisch verträgliche Kräfte sind nicht in der Lage, durch lokale vertikale Deformation den speziellen Mechanotransduktionsweg zu aktivieren, der eine verzögerte Calciumerhöhung bewirken würde. Der Mechanosensor, der für diese charakteristische Signalkaskade verantwortlich ist, wird anscheinend nicht ausreichend beeinflusst. Auch mechanosensitive Ionenkanäle können durch die lokale Stimulation

nicht aktiviert werden. Hier stellt sich die Frage nach grundlegenden Unterschieden der gewählten Stimulationsarten wie Scherflüssen, Dehnungsreizen und lokaler Stimulation. Deshalb wurde in den weiteren Experimenten untersucht, ob Osteoblasten externe Kräfte richtungsspezifisch detektieren können und in der Folge Calciumaktivierungen ausgelöst werden, wie sie bei Dehnungsreizen und Scherflüssen zu beobachten sind.

6.3 Laterale Stimulation und Calcium

Im Folgenden werden Experimente vorgestellt, die der Untersuchung der Richtungsabhängigkeit der mechanischen Stimulation und einer damit verbundenen möglichen verzögerten Calciumantwort dienten. Dabei konnte auf der Basis des dreidimensionalen Kraftmikroskops die lokale Stimulationsrichtung vorgegeben werden, um einen Vergleich zu Dehnungsreizen und Scherflüssen zu ermöglichen.

6.3.1 Einfluss der Stimulationsrichtung auf die Mechanotransduktion

Adhärente Zellen stellen aus physikalischer Sicht kein homogenes System dar. Im Gegenteil: durch das Anwachsen an einer planaren Oberfläche weisen sie eine ausgezeichnete Richtung auf. Damit stellt sich die Frage, ob die Richtung der lokalen Stimulation einen Einfluss auf die Mechanotransduktion in Osteoblasten hat.

Fokale Adhäsionen scheinen nicht nur eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion zu spielen [189], sondern werden selbst durch die mechanischen Eigenschaften des Substrates reguliert [174]. Während in Dehnungsexperimenten die Deformationen direkt auf die Ventralseite der Zellen wirken und damit die fokalen Adhäsionen und das assoziierte Zytoskelett beeinflussen, erzeugt das Kraftmikroskop Deformationen auf der Oberseite der Zelle. Wenn nun, wie vermutet wird, der Mechanosensor im Bereich der fokalen Adhäsionen lokalisiert ist [76], ist leicht einzusehen, dass die Kraftmikroskop-Stimulation möglicherweise eine Deformation generiert, die den Mechanosensor nicht beeinflusst. Letzteres hängt im Wesentlichen von den mechanischen Eigenschaften der Zelle ab, über die in Kapitel 2.3.5 gesprochen wurde. Die Funktionsweise des Mechanosensors wird häufig von einem Modell beschrieben, in dem der Mechanosensor durch ein Molekül repräsentiert wird, das durch äußere Kräfte seine Konformation und damit seine biochemische Aktivität ändert. Wirkt nun aber die Deformation der Zelle nicht bis zum Ort des Mechanosensors, kann dieser möglicherweise nicht aktiviert werden. Auch Scherkräfte können unter diesem Betrachtungwinkel in das Schema eingepasst werden. Sie bewegen die Zellen durch die vorgegebene Flussrichtung vermutlich in eine Richtung bewegt, so dass in der Folge Kräfte zwischen Zelle und Substrat und damit auf die fokalen Adhäsionen und einen dort lokalisierten Mechanosensor wirken.

6.3.2 Experimente mit Calcium

Um den Einfluss der Stimulationsrichtung untersuchen zu können, wurden mit dem dreidimensionalen Kraftmikroskop (siehe Kapitel 4.3) laterale Stimulationen durchgeführt. Während vertikale Stimulationen unter einem Winkel von 90° relativ zum Zell-Substrat

und damit zur Glasoberfläche appliziert wurden, erfolgte die laterale Stimulation in einem Winkel von 0°. Unter konstanter Periodendauer (100ms) und Zyklenzahl (20) wurde die Maximalkraft eines dreieckigen Stimulationsprofils so lange sukzessiv erhöht, bis eine intrazelluläre Calciumantwort auftrat. Dazu wurde der Cantilever zunächst neben der Zelle über den vertikalen Annäherungsalgorithmus auf die Glasoberfläche gefahren. Damit der Ausleger bei der lateralen Stimulation nicht direkt über die Oberfläche „schleift“ und Reibungskräfte zwischen Substrat und Cantilever wirken können, wurde dieser auf einen Abstand von 100nm bis 200nm über die Glasoberfläche zurückgenommen. Aus dieser Position startete die laterale Annäherungsprozedur, die so lange ausgeführt wurde, bis ein bestimmtes Schwellensignal des positionsempfindlichen Detektors überschritten und damit die Oberfläche der Zelle erreicht wurde. Nun konnte die eigentliche mechanische laterale Stimulation der Zellen beginnen.

Die Abbildung 46 zeigt den typischen Verlauf einer Calciumantwort nach lateraler mechanischer Stimulation mit dem Kraftmikroskop. Die Dynamik der Calciumsignale ist zu der nach vertikaler Stimulation vergleichbar (siehe Abbildung 33). Auch bei einer lateralen Stimulation kam es in Folge des mechanischen Reizes zu einem eindeutigen Fluoreszenzverlust von Fura-2 nach Anregung bei 380nm und damit verbunden zu einer scheinbaren Erhöhung der Calcium-Ruhekonzentration der stimulierten Zelle. Das Fluoreszenzsignal benachbarter Zellen blieb hingegen annähernd konstant. Lediglich ein minimales Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes war zu beobachten. Die Maximal-Kräfte auf die Zelle und die resultierenden Deformationen lagen im Bereich der für vertikale Stimulation erforderlichen Amplitude zur Evokation von Calciumantworten. Die Variation des Stimulationswinkels zwischen 90° (vertikale Stimulation) und 0° (laterale Stimulation) führte ebenfalls zu keinen physiologischen Calciumsignalen.

Da sowohl bei der vertikalen als auch bei der lateralen Stimulation vergleichbare Calciumantworten erst bei entsprechend hohen Kräften zu beobachten waren, muss auch hier von einer nicht-physiologischen Antwort durch eine Mikroporation der Zellmembran ausgegangen werden. Eine Calciumerhöhung konnte bei der Applikation physiologischer Kräfte nicht ausgelöst werden. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde auf weitere Messungen bezüglich der Herkunft der Calciumionen verzichtet.

6.3.3 Vertikale und laterale Stimulationen lösen keine Mechanotransduktion unter der Beteiligung von Calcium aus

Unabhängig vom Winkel der Stimulation und der damit verbundenen Stimulationsrichtung kann durch eine lokale Deformation der oberen Zellmembran adhärenter Zellen keine Mechanotransduktion ausgelöst werden, die zu einer verzögerten Calciumantwort führt, wie sie bei Scherkräften und Dehnungsreizen zu beobachten ist. Obwohl die laterale Stimulation mit dem dreidimensionalen Kraftmikroskop unter einem Winkel von 0° relativ zum Zellsubstrat im Prinzip die Verhältnisse von Scherkräften und Dehnungsreizen besser simuliert als die vertikale Stimulation bei 90°, scheint ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen diesen verschiedenen Stimulationsarten zu bestehen. Eine mögliche Ursache für das unterschiedliche Mechanotransduktions-Verhalten liegt in der Wahl des Cantilevers und der dazugehörigen Sonde. Die relativ hohe torsionale Federkonstante führte unter den verwendeten Kräften zu einer geringen Torsion des Cantilevers, so dass die tatsächlich

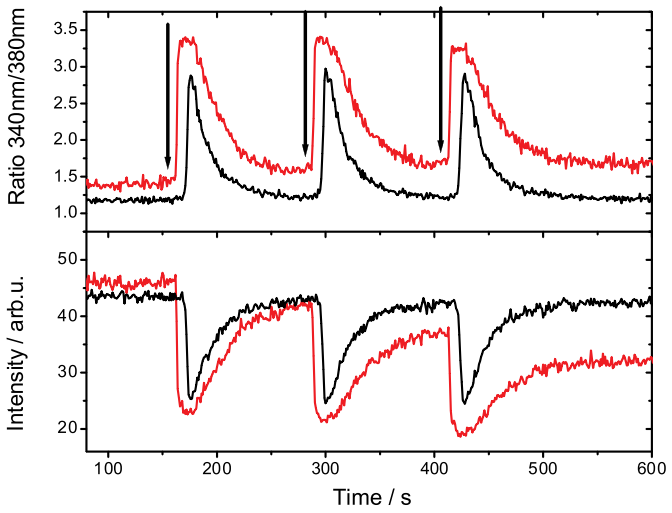

Abbildung 46: *Dargestellt ist ein typischer Fluoreszenzverlauf nach lateraler Stimulation mit dem Kraftmikroskop. Der untere Graph zeigt die Fluoreszenzintensität nach Anregung des Farbstoffes Fura-2 bei 380nm. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte, zu denen die Zelle mechanisch stimuliert wurde. Die rote Linie spiegelt den Verlauf der Calciumkonzentration der stimulierten Zelle wider, während die schwarze Linie die Calciumantwort einer nicht-stimulierten Nachbarzelle charakterisiert.*

applizierte Kraft nur ungenau bestimmt werden kann. Im Gegenzug bleibt jedoch die Kontaktfläche zwischen Zelle und Cantilever-Spitze nahezu unverändert. Des Weiteren war eine vollständige Entkopplung zwischen der vertikalen und der lateralen Auslenkung der Cantilever nicht zu realisieren, so dass eine durch laterale Deformation ausgehende Versteifung in senkrechter Richtung gemessen werden kann. Als Sonde wurde auch hier eine 10μm große Silika-Glas-Kugel verwendet. Das Größenverhältnis zwischen Zelle und Cantilever-Sonde ist in Abbildung 47 dargestellt. Der Durchmesser der Mikrokugel übersteigt die Höhe einer durchschnittlichen Zelle, die über dem Zellkern in der Regel 2μm bis 3μm beträgt, um das zwei- bis dreifache (siehe Abbildung 47). Die Topographie des übrigen Zellkörpers ist wesentlich flacher. Je größer der Durchmesser der Sonde ist, desto problematischer wird die Übertragung lateraler Kräfte auf die Zelle, da auf Grund der sphärischen Form die Zelle unter dem Cantilever hindurch gleiten kann. In der Folge wird die tatsächlich übertragene laterale Kraftkomponente kleiner. Auch eine im Gegenzug ansteigende vertikale Kraftkomponente konnte in den Experimenten beobachtet werden. Die Kugelgröße wurde jedoch gezielt gewählt, um sicherstellen zu können, dass das scharfkantige Substrat des Cantilevers keinen direkten Kontakt zur Zelle hat und die Zellmembran nicht verletzen kann.

Um eine bessere laterale Stimulation zu ermöglichen, wäre die Verwendung von kleinen Silika-Würfeln denkbar gewesen. Eine Würfelform hätte das Abtauchen der Zelle unter dem Cantilever vermindern können. Allerdings war es nicht möglich, auf kommerziellem Wege Würfel mit einer Kantenlänge von circa 10μm zu erhalten. Außerdem hätten die Kanten eines solchen Quaders ebenfalls eine Quelle für Mikroverletzungen der Membran darstellen können.

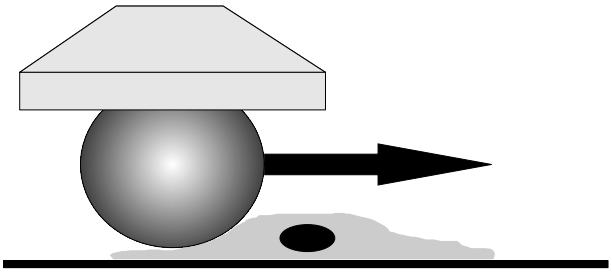

Abbildung 47: *Die Abbildung zeigt schematisch das Größenverhältnis eines Osteoblasten zu der zur Stimulation verwendeten Mikrokugel. Der Pfeil gibt die Stimulationsrichtung an.*

Trotz dieser experimentellen Probleme war es zumindest lokal möglich, laterale Kräfte auf die Zellmembran zu übertragen. Dass diese Kräfte im Gegensatz zu Scherflüssen und Dehnungsreizen keine Mechanotransduktion mit einer verzögerten Calciumantwort auslösen, könnte an der schwachen Kopplung zwischen Zellmembran und Zytoskelett liegen (siehe Kapitel 2.3.6). So kommt es durch die lateralen Kräfte lediglich zu einer Translokation der Zellmembran, ohne dabei das Zytoskelett und damit die Adhässionsseite wesentlich zu beeinflussen. Doch gerade die Weiterleitung applizierter Kräfte scheint für Frage, ob ein mechanischer Reiz verzögerte Calciumantworten auslösen kann oder nicht, wichtig zu sein. Die Kraftweiterleitung unter lokalen Stimulationen wird in Kapitel 6.6 eingehend untersucht, um so die Unterschiede der Stimulationsarten in der Mechanotransduktion ergründen zu können.

Um mögliche physiologische Ursachen - beispielsweise verschiedene Zellchargen - für die beobachteten Unterschiede zwischen lokaler Stimulation und Dehnungsreizen ausschließen zu können, wurden zunächst lokale Dehnungsexperimente durchgeführt. Sie werden im folgenden Kapitel dargestellt.

6.4 Dehnungsmessungen mit dem Kraftmikroskop

In diesem Kapitel werden Experimente vorgestellt, die eine möglichst genaue Imitation von Dehnungsreizen auf Osteoblasten mit Hilfe des Kraftmikroskops ermöglichen.

Wie die vorherigen Experimente gezeigt haben, wirken die verschiedenen applizierten Kräfte unterschiedlich auf die Zellen. So kann nach Dehnungsreizen die Aktivierung eines speziellen Mechanotransduktionsweges unter der Beteiligung von Calciumionen beobachtet werden, der nach lokalen Stimulationen nicht auftritt. Dies kann unter der Annahme der in dieser Arbeit mehrfach aufgestellten Hypothese, dass der Mechanosensor in der Nähe der fokalen Adhäsionen liegt und für die Rezeption mechanischer Signale verantwortlich ist, erklärt werden. Während Dehnungsreize direkt auf die Adhäsionsseite der Zellen wirken, findet die lokale Stimulation auf der Oberseite der Zellen statt. Wird diese Deformation nun nicht an den Ort des Mechanosensors übertragen, kann dieser nicht aktiviert werden. Daher wurde die bei lokaler Stimulation resultierende Kräfteverteilung innerhalb des Zytoskeletts und deren Weiterleitung auf das Zellsubstrat mit so genannten Krafttransmissionsmessungen untersucht (siehe Kapitel 6.6).

Zuvor erfolgten jedoch Experimente, die die Ergebnisse der Dehnungsreize verifizieren und die prinzipielle Mechanosensitivität der verwendeten Osteoblasten zeigen sollten. Die-

se Experimente waren erforderlich, da die verwendeten Knochenzellen aus verschiedenen Präparationen stammten. Die Vergleichsexperimente sollten helfen, einen möglichen Einfluss der Zellkultur und der Dehnungsapparatur (ACLAR-Folie) auf die Stimulationsexperimente ausschließen zu können.

6.4.1 Applikation lokaler Dehnungsreize mit dem Kraftmikroskop

Für die Vergleichsexperimente wurde mit dem Kraftmikroskop in den Verbindungsbereich zwischen Zelle und Substrat ein lokaler Dehnungsreiz appliziert. Dieser musste, damit der spezielle Mechanosensor aktiviert, die entsprechende Mechanotransduktion in Gang gesetzt wird und eine verzögerte Calciumantwort auftritt, im Prinzip mit der mechanischen Stimulation durch die Dehnungsmaschine vergleichbar sein. Zudem sollte eine Aussage über die Effektivität einer ganzheitlichen Dehnung im Vergleich zu der hier applizierten lokalen Dehnung bezüglich der Zelle getroffen werden können.

Für die Vergleichsexperimente wurden Zellen auf einem Polyacrylamid-Gel kultiviert, das ein Elastizitätsmodul zwischen 5.000 N/m^2 und 10.000 N/m^2 aufwies. Durch das Poisson-Verhältnis von etwa 0,3 blieb das Volumen des Gels unter Deformationen nahezu erhalten. Anschließend wurde der Cantilever, der eine Spitze mit einem Radius von circa 100nm besaß, mit einer definierten Kraft in der Nähe einer Zelle in das Gel gedrückt und dann lateral zur Adhäsionsrichtung der Zelle ausgelenkt. Waren die Haftreibung zwischen Gel und Cantilever und damit verbunden die Eindringtiefe in das Gel groß genug, so konnte das Polyacrylamid-Gel an der auslenkungsabgewandten Seite gedehnt werden. Hierbei wurde das Gel für eine Stimulation innerhalb von zwei Sekunden zwanzigmal gedehnt, so dass sich eine Stimulationsfrequenz von 10Hz ergab.

Die Beobachtung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte unter Verwendung des Farbstoffes Fura-2. Damit neben der Zelle auch die Dehnung ihres Substrates betrachtet werden konnte, wurden in das Polyacrylamid-Gel Fluoreszenzkugeln eingebettet, deren optische Anregung oberhalb der Emission von Fura-2 erfolgt. Die Fluoreszenz dieser Kügelchen liegt im roten Wellenlängenbereich. Sie haben jedoch Nachteil, dass ihre Fluoreszenzintensität deutlich schwächer ist als bei den Standard-Fluoreszenzkugeln (siehe Kapitel 5.2). So war die Messung der Dehnungsamplitude nur qualitativ möglich, da die verwendete CCD-Kamera ein stark verrauschtes Bild lieferte. Geschätzte Werte der Dehnungsamplitude lagen im Bereich von 0,1% bis 5% (entsprechend 1.000$\mu\epsilon$ bis 50.000$\mu\epsilon$).

Bei den achtzig durchgeführten Messungen wurde die Dehnung des Gels so lange suksessiv erhöht, bis der Cantilever das Gel zerstörte. Dabei zeigten lediglich in drei Experimenten die Zellen nach der mechanischen Stimulation eine verzögerte Calciumantwort. Wie in Abbildung 48 zu sehen ist, trat dabei die intrazelluläre Calciumerhöhung 70 bis 120 Sekunden nach dem mechanischen Reiz auf. Der linke Pfeil markiert den Zeitpunkt der ersten mechanischen Stimulation. Während diese noch eine verzögerte Calciumantwort hervorrief, wurde schon eine zweite Stimulation auf die gleiche Zelle appliziert (rechter Pfeil), so dass wiederum eine verzögerte Calciumantwort initiiert werden konnte.

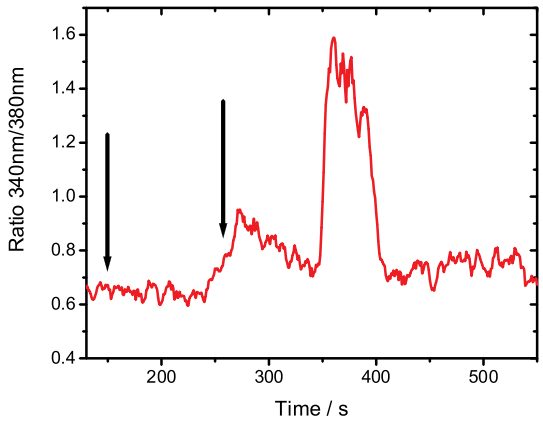

Abbildung 48: *Die Abbildung zeigt die Calciumantwort einer Zelle nach der Dehnung ihres Substrates mit dem Kraftmikroskop. Der linke Pfeil markiert den Zeitpunkt der ersten Stimulation. Der rechte Pfeil markiert den Zeitpunkt der zweiten Stimulation. Letztere erfolgte während der Calciumantwort auf den ersten Reiz.*

6.4.2 Lokale Dehnungsreize lösen verzögerte Calciumantworten aus

Im Vergleich zu den Experimenten mit der Dehnungsmaschine [221], in denen bis zu 50% der Zellen mit einer verzögerten Calciumerhöhung auf die Stimulation reagierten, war die Reaktionswahrscheinlichkeit nach einer Stimulation durch eine lokale Dehnung des Substrats mit drei aus achtzig Zellen sehr gering. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass Osteoblasten im Prinzip auf einen solchen Dehnungsreiz mit einer verzögerten intrazellulären Calciumerhöhung reagieren können. Die direkte vertikale und laterale Stimulation von Osteoblasten zeigte hingegen bei über 2000 Experimenten kein solches Verhalten.

Die im Vergleich zur Dehnungsapparatur geringe Reaktions-Wahrscheinlichkeit kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen wurde bereits erwähnt, dass die durch das Kraftmikroskop verursachte absolute Dehnung nur geschätzt, aber nicht adäquat gemessen werden konnte. Auch die Positionsbestimmung der Cantilever-Spitze war - auf Grund der geringen Auflösung der Kamera - nur mit einer begrenzten Genauigkeit bestimmbar. Diese Unwägbarkeiten könnten in vielen Fällen dazu geführt haben, dass die tatsächliche Dehnung im Bereich der Verbindungen zwischen Zelle und Substrat die Schwelle zur Auslösung der Mechanotransduktion nicht überschritten hat. Diese Schwelle liegt für die gesamte Zelle bei circa $4000\mu\epsilon$. Des Weiteren kann auch die Art der mechanischen Stimulation, hier die Dehnung, eine wichtige Rolle spielen. Während bei der Verwendung der Dehnungsmaschine die Zelle und damit, vermittelt über Adhäsionspunkte, das Zytoskelett (siehe Kapitel 2.3.5) als Ganzes eine Längenänderung erfährt, kann das bei einer Dehnung mittels der Kraftapparatur lokal begrenzt sein. Dabei tritt ein räumlich begrenzter Dehnungsgradient auf, der mit zunehmenden Abstand von der Cantilever-Spitze kleiner wird. Wie Abbildung 52 verdeutlicht, sind die größten Kraftvektoren jedoch gerade entlang der Längsachse von Osteoblasten zu finden (siehe Kapitel 6.5.2), so dass auch die Spannung, die über das Zytoskelett auf das Substrat vermittelt wird, in dieser Richtung am größten ist. In der Folge wäre eine mechanosensitive Vorzugsrichtung denkbar, die den Mechanosensor unter einer gewissen Vorspannung entlang der Längsachse der Zellen in das Zytoskelett integriert.

Um eine Aktivierung erfahren zu können, müsste die Zelle entlang dieser Achse signifikant gedehnt werden. Eine lokale Dehnung, die nicht entlang der Vorzugsrichtung auftritt, würde dementsprechend nur zu einer lokalen Veränderung der intrinsischen Spannungsverhältnisse des Zytoskeletts führen und damit nur in Ausnahmefällen eine ausreichende Deformation des Zytoskeletts bewirken. Tatsächlich treten bei Zellen nach mechanischer Stimulation Vorzugsrichtungen auf. So führt gerade die zyklische Dehnung zu einer Ausrichtung der Zellen [164]. Bei der Auswertung der Experimente, die mit der Dehnungsmaschine erfolgten [221], wurde allerdings keine richtungsabhängige Analyse durchgeführt. Mit dieser hätte, wenn vor allem Zellen mit einer definierten Ausrichtung gegenüber der Dehnungsrichtung mit einer Calciumantwort reagierten, eine solche Vermutung erhärtet werden können. Allerdings ist die lokale Dehnung des elastischen Substrates in der Lage, den Mechanosensor zu aktivieren. In Folge dieser Aktivierung tritt eine verzögerte intrazelluläre Calciumerhöhung auf. Hierbei scheint jedoch ein Dehnungsreiz, der die Länge der Zelle in einer Richtung ändert, deutlich besser geeignet die Mechanotransduktion in Zellen auszulösen.

Die Experimente zeigten, dass die Präparation der Zellen keinen Einfluss auf die Mechanotransduktion und damit auf die verzögerte Calciumfreisetzung hat. Es kann daher festgehalten werden, dass sowohl laterale als auch vertikale lokale Stimulationen mit dem Kraftmikroskop nicht in der Lage sind, die Osteoblasten in der Art zu beeinflussen, dass diese eine Mechanotransduktion initiieren, in deren Folge Calcium aus den intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Dieses Ergebnis ist unabhängig von den Stimulationsparametern wie der Frequenz, der Amplitude und der Zyklenzahl. Es stellt sich aber die Frage, ob in Osteoblasten unterschiedliche Mechanotransduktionswege und Mechanosensoren existieren, die auf die Art des mechanischen Reizes mit differenzierten Signalkaskaden reagieren. Die Untersuchung, ob die Zellen beispielsweise aktive mechanische Antworten auf äußere Stimulationen generieren, wird im folgenden Kapitel dargestellt.

6.5 Mechanische Stimulation und Zugkraftmessungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig Experimente durchgeführt, in denen mögliche aktive mechanische Antworten der Zellen nach lokaler Stimulation und Dehnungsreizen mittels der Zugkraft-Mikroskopie beobachtet wurden. Außerdem wurde untersucht, ob Dehnungsreize und lokale Stimulationen unterschiedliche Mechanotransduktionswege initiieren können.

Neben der Beteiligung an der Mechanotransduktion wird über die dynamische Calciumänderung beispielsweise auch die Migration der Zellen gesteuert [139]. Die Zusammenhänge zwischen den intrazellulären Calciumsignalen und ihre Interaktion mit dem Zytoskelett sind komplex [119]. So könnte ein durch die Mechanotransduktion hervorgerufenes Calciumsignal die Kraftverhältnisse innerhalb des Zytoskeletts aktiv beeinflussen. Aber auch Änderungen der Adhäsionskräfte ohne Beteiligung von Calcium sind denkbar. Um diese Hypothesen untersuchen zu können und damit mögliche weitere Unterschiede in der Reaktion der Zellen auf verschiedene mechanische Reize zu finden, sind Zugkraftmessungen an gedehnten und lokal stimulierten Osteoblasten erfolgt.

6.5.1 Dehnungsmaschine und Zugkraftmessungen

Die im Folgenden beschriebenen Dehnungsexperimente wurden im Wesentlichen von Tim Lautenschläger durchgeführt.

Für die Zugkraftmessungen wurden die Osteoblasten auf einem Polyacrylamid-Gel (Substrat) kultiviert. Damit die Änderung der Adhäsionskräfte der Zellen auf ihr Substrat sichtbar gemacht werden konnte, enthielt dieses Gel fluoreszierende Mikrokugeln (siehe Kapitel 5). Für die Experimente wurden die auf dem Substrat angewachsenen Osteoblasten mit Hilfe der Dehnungsmaschine (Kapitel 3.7) zwei Sekunden lang mit einer Frequenz von 10Hz stimuliert. Dabei betrug die Dehnungsamplitude $6.000\mu\epsilon$. Die Stimulationsparameter wurden gezielt so gewählt, da hohe Frequenzen vermutlich eine wichtige Rolle in der Knochensynthese spielen. Allerdings ist es mit der Dehnungsapparatur nicht möglich, höhere Frequenzen als 10Hz zu applizieren. Des Weiteren konnte ein Mitarbeiter zeigen, dass zur Auslösung von Calciumsignalen Dehnungsreize von $4.000\mu\epsilon$ bis $6.000\mu\epsilon$ notwendig sind [221]. Die Dehnungsapplikation musste außerdem manuell ein- und augeschaltet werden. Auf Grund dieser Bedingungen fiel die Wahl auf eine zwei Sekunden dauernde Stimulation. Auch die weiteren in dieser Arbeit mit dem Kraftmikroskop applizierten Belastungen wurden in der Regel mit den gleichen Parametern durchgeführt, um so eine Vergleichbarkeit der Experimente und Ergebnisse gewährleisten zu können. Vor und nach der Applikation der Dehnungsreize wurde im Abstand von fünfzehn Sekunden jeweils fünf Minuten lang die Verteilung der Fluoreszenzkugeln im Polyacrylamid-Gel bestimmt und es wurden Phasenkontrastaufnahmen von den Zellen angefertigt. Nach Beendigung des Experiments wurde die Zelle vom Substrat abgelöst und eine Fluoreszenzaufnahme des relaxierten Gels angefertigt. Das hierbei erhaltene Nullbild diente der Analyse der Gesamtzugkräfte der untersuchten Zellen zu jedem einzelnen Messzeitpunkt (siehe Kapitel 5).

Die siebzig stimulierten Zellen, die zur Analyse der Zugkräfte herangezogen wurden, ergaben ein differenziertes Bild. Vor der Stimulation schwankten die Zugkräfte nur wenig. Die Analyse der Zugkräfte, die direkt nach der Stimulation auftraten, erfolgte etwa sieben Sekunden nach Beendigung des Dehnungszykluss. Sie zeigten eine sprunghafte Erhöhung oder Verringerung der zellulären Adhäsionskräfte (Gruppen [t+] und [t-]). Nur bei wenigen Zellen war keine Änderung der Zugkräfte zu beobachten. Nach der sprunghaften Änderung verblieben die Zugkräfte auf dem neuen Niveau, wiesen jedoch größere Schwankungen als vor der Stimulation auf. In Abbildung 49 ist der spontane Anstieg der Adhäsionskräfte normiert aufgetragen. Während die Erhöhung der Substratkräfte der Zellen der Gruppe [t+] im Schnitt bei etwa 100% lag, wiesen die Zellen die Gruppe [t-] durchschnittlich eine um 50% verringerte Adhäsionskraft auf (Daten nicht gezeigt). Ob nach der Stimulation eine Erhöhung oder einer Verringerung der Substratkräfte zu beobachten war, hing von den initialen Zugkräften der Zelle vor der Stimulation ab: während die Zellen der Gruppe [t+] vor der Stimulation relativ niedrige Zugkräfte aufwiesen, übten Zellen der Gruppe [t-] verhältnismäßig große Adhäsionskräfte auf das Substrat aus. In Abbildung 50 ist die typische Kraft-Vektor-Karte einer gedehnten Zelle, die zur Gruppe [t+] gehört, dargestellt. Die Zugkrafterhöhung äußert sich in der Zunahme der in das Zellinnere gerichteten Kräfte (siehe Kraftvektoren in Abbildung 50).

Die Osteoblasten zeigten also nach mechanischer Stimulation mit physiologischen Deh-

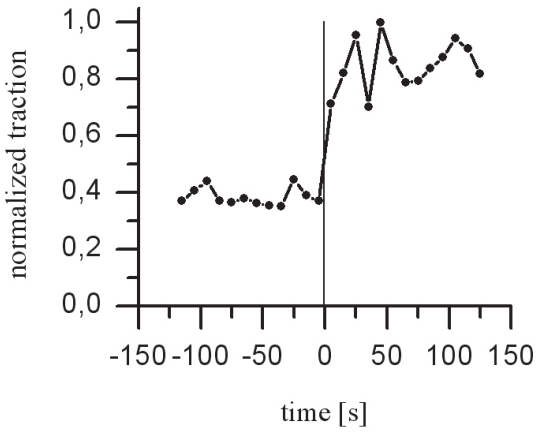

Abbildung 49: *Die Abbildung gibt die normierten Zugkräfte eines Osteoblasten vor und nach der mechanischen Stimulation wieder. Die senkrechte Linie markiert den Zeitpunkt der Dehnungsapplikation.*

nungsreizen eine Änderung der Adhäsionskräfte auf ihr Substrat. Diese Messergebnisse konnten durch Doyle et al. bestätigt werden [53]. Sie applizierten bei ihren Experimenten durch Ziehen eines elastischen Substrates mit einer Mikropipette Dehnungsreize an Keratozyten und maßen simultan die Zugkraft und die Calciumkonzentration [54]. Allerdings beobachteten sie dabei, dass die intrazelluläre Calciumerhöhung durch mechanosensitive Ionenkanäle erfolgte und mit der Änderung der Substratkräfte korrelierte. Diese Beobachtung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da die Calciumantworten nach Applikation von Dehnungsreizen in den zuvor durchgeführten Experimenten immer verzögert auftraten [221]. Im Gegenteil: Calcium spielt für die instantane Zugkraftänderung von Osteoblasten nach Dehnungsreizen keine Rolle und tritt erst als möglicher „downstream“-Effekt auf.

Ein ähnliches Verhalten konnte bereits ein Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe bei der Ausübung von elektrischen Feldern auf Osteoblasten beobachten [39]. Auch hier kam es zu einer schnellen Änderung der Zugkräfte, während sich die Dynamik der intrazellulären Calciumkonzentration erst etwa 90 Sekunden nach Anlegen des elektrischen Feldes änderte.

6.5.2 Kraftmikroskop und Zugkraftmessungen

Wie in Kapitel 2.3 dargestellt ist, können Zellen unterschiedlich auf mechanische Reize reagieren [109]. Dehnungsreize beispielsweise lösen direkt nach der mechanischen Stimulation eine Änderung der Zugkräfte aus. Dabei erfolgt erst circa 120 Sekunden später eine Calciumantwort. Trotz dieser zeitlichen Divergenz könnten die nach Dehnungsreizen auftretende Calciumantwort und die Änderung der zellulären Zugkraft Komponenten desselben Mechanotransduktionsweges sein. Alternativ hierzu besteht die Möglichkeit, dass zwei unterschiedliche Signalkaskaden ablaufen, die von zwei unabhängigen Transduktionsmechanismen gesteuert werden. Es stellt sich also die Frage, ob die lokale mechanische

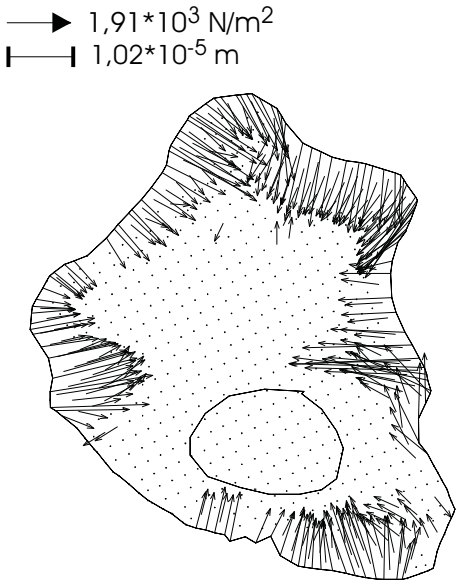

Abbildung 50: *Die Kraft-Vektor-Karte stellt das typische Kraftverteilungsmuster einer gedehnten Zelle dar. Die Kraft-Vektoren zeigen ausschließlich in das Zellinnere. Die Länge der Vektoren ist ein Maß für die Kraft der Zelle, die pro Flächeneinheit auf das Substrat übertragen wurde.*

Stimulation mit dem Kraftmikroskop einen anderen Signaltransduktionsweg auslöst, in dem Calcium nicht als Botenstoff auftritt, die Zugkräfte jedoch trotzdem verändert werden.

Diese Fragestellung wurde in den folgenden Experimenten untersucht.

Änderung der Zugkräfte Die Osteoblasten wurden auf einem Polyacrylamid-Gel kultiviert, in das Fluoreszenzkugeln eingebettet waren (siehe Kapitel 5). Anschließend wurden die Zellen mit Kräften von circa 150nN lokal mit dem Kraftmikroskop aus vertikaler Richtung stimuliert. Bei diesen Kräften kann eine Perforation der Zellmembran ausgeschlossen werden, da diese erst bei wesentlich höheren Kräften von etwa 800nN auftritt. Um die Ergebnisse der Messungen besser mit den vorangegangenen Experimenten vergleichen zu können, betrug die Stimulationsdauer auch hier zwei Sekunden. In dieser Zeit wurden 20 Zyklen durchfahren, so dass die Stimulationsfrequenz bei 10Hz lag. Vor und nach der Stimulation wurde im Abstand von 30 Sekunden drei beziehungsweise fünf Minuten lang die Verteilung der Fluoreszenzkugeln im Gel bestimmt. Nach Beendigung des Experiments erfolgte das Ablösen der Zellen und anschließend eine Aufnahme des relaxierten Gels. Die Analyse der zellulären Gesamt-Zugkräfte mit externen Kräften wurde wie in Kapitel 5 beschrieben durchgeführt.

Lediglich 20 der insgesamt 36 Experimente konnten auf Grund des komplizierten Versuchsaufbaus analysiert werden. Die mangelhafte Stabilität der Fokusebene und durch den Cantilever verursachte Artefakte verhinderten bei den übrigen Experimenten die Auswertung.

Bei 14 der 20 Zellen kam es nach der lokalen Stimulation zu einer signifikant verringerten (Gruppe [t-]) beziehungsweise erhöhten (Gruppe [t+]) Zugkraft. Zwei der stimulier-

ten Zellen zeigten kein eindeutiges Verhalten und weitere vier Osteoblasten zeigten keine Zugkraftänderung und wurden der Gruppe [t0] zugeordnet. Für jeden Messzeitpunkt wurden die Zugkräfte normiert aufgetragen. Die Normierung erfolgte für jede Zelle in Bezug zum Mittelwert der Substratkräfte vor der mechanischen Stimulation. Aus den normierten Werten der verschiedenen Zellen wiederum wurden zu jedem Zeitpunkt der Messung der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet (siehe Abbildung 51). Letztere bezieht sich damit auf die Schwankungen der Zugkräfte zu einem beliebigen Zeitpunkt innerhalb einer Zellgruppe.

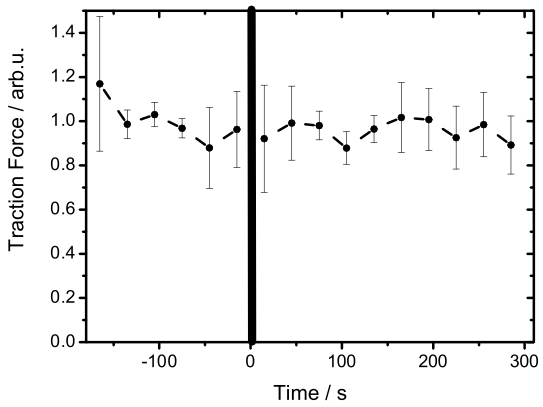

Abbildung 51: *In der Abbildung sind die Mittelwerte der normierten Zugkräfte der vier Zellen, die nach der mechanischen Stimulation keine Änderung der Zugkräfte zeigten, gegen die Zeit aufgetragen. Der lokale Reiz wurde zum Zeitpunkt t=0 Sekunden appliziert. Es ist keine signifikante Änderung der Zugkräfte zu erkennen.*

Die initialen Zugkräfte der Gruppe [t0] lagen im Mittel bei 25N/m^2. Eine aktive Änderung der Zugkräfte trat nach lokaler Stimulation nicht auf.

Verringerung der Zugkräfte Acht der zwanzig Zellen zeigten nach der mechanischen Stimulation eine Verringerung der zellulären Adhäsionskräfte. Vier der acht Experimente wiesen wiederum einen stetigen Verlust der Substratkräfte auf.

Auf Grund der großen Streuung der Gesamtkräfte zwischen den einzelnen Zellen und des kleinen Grundensembles von vier Zellen ist eine statistische Signifikanz nur bei der Analyse einzelner Zellen zu erkennen. Da aber jede Zellmessung für sich eine deutliche Signifikanz aufwies und die Zugkräfte während der Messung im Schnitt auf etwa 50% des ursprünglichen Wertes fielen, ist es sinnvoll, diese Zellen in eine eigene Gruppe [ts-] (s: „slow“) einzuteilen. In Abbildung 52 ist der stetige Verlust an Zugkraft einer Zelle exemplarisch mit Hilfe von Kraft-Vektor-Karten dargestellt. Vor der mechanischen Stimulation schwankten die Zugkräfte zwischen den einzelnen Aufnahmen nur wenig (siehe Abbildung 52, unterer Graph) und waren entlang der Zell-Hauptachse am größten (siehe Abbildung 52 A). Die durchschnittliche Gesamtkraft der unstimulierten Zellen betrug 25,8N/m^2.

Die vier weiteren Zellen der Gruppe [t-] reagierten auf den lokalen Reiz mit einer sofortigen, sprunghaften und signifikanten Verringerung der Gesamtzugkräfte (siehe Abbildung

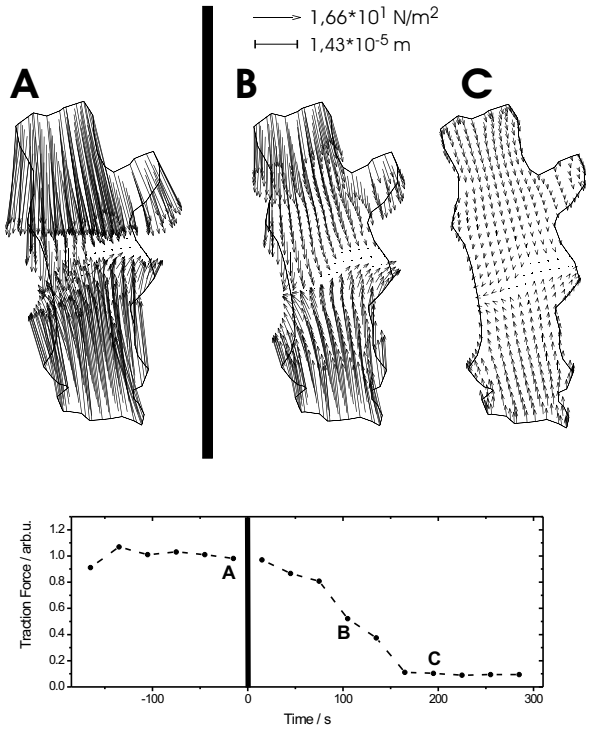

Abbildung 52: *Dargestellt ist der Verlauf der Zugkräfte nach der mechanischen Stimulation in Form von Vektor-Karten. (A) zeigt die Kraftvektoren vor der Stimulation, (B) und (C) zu zwei Zeitpunkten nach der Stimulation. Im Graphen sind die normierten Zugkräfte der Zelle aufgetragen. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt t=0.*

53). Dabei nahmen die Adhäsionskräfte innerhalb der ersten 15 Sekunden nach der mechanischen Stimulation im Mittel um etwa 50% des Ausgangswertes ab und gingen im weiteren Verlauf der Messung auf circa 40% zurück. Die Einteilung dieser Zellen erfolgte in die Gruppe [tj-] (j: "jump"). Die Zugkräfte betrugen hier vor der Stimulation im Mittel 43N/m^2.

Erhöhung der Zugkräfte Vier der sechs Zellen der Gruppe [t+] wiesen einen signifikanten Anstieg der zellulären Zugkräfte nach der mechanischen Belastung auf (siehe Abbildung 54). Dabei erfolgte der Anstieg stetig innerhalb von drei bis vier Minuten nach dem Stimulus (Gruppe [ts+]). Die maximale Änderung der Zugkräfte pro Zeiteinheit wurde nach etwa drei Minuten erreicht. Nach durchschnittlich vier Minuten endete der Anstieg der zellulären Zugkräfte in einem Plateau. Die mittlere Erhöhung betrug hierbei etwa das Zehnfache des ursprünglichen Niveaus. Die Adhäsionskräfte der Zellen der Gruppe [ts+] lagen vor der Stimulation im Mittel bei 6,1N/m^2.

Auch in der Gruppe [t+] kann zwischen einem langsamen und einem instantanen Anstieg der zellulären Kräfte unterschieden werden. Hier zeigten zwei weitere Zellen eine sprunghafte Erhöhung der auf das Substrat übertragenen Kräfte (siehe Abbildung 55). Auf Grund der starken Schwankungen der einzelnen Messwerte ist die Standardabweichung verhältnismäßig hoch. Trotzdem kann die sprunghafte Änderung der Kräfte, die innerhalb von 15 Sekunden nach der mechanischen Stimulation bei der Gruppe [tj+] auftrat, als signifikant

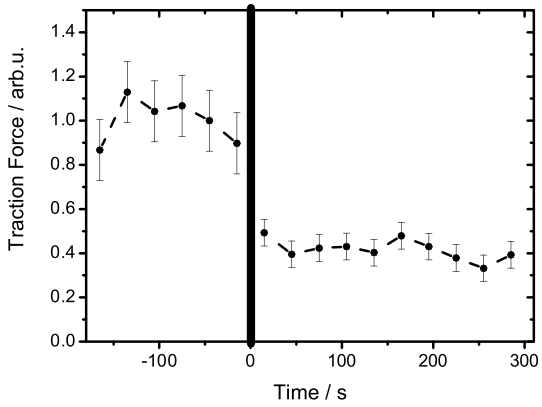

Abbildung 53: *Die Abbildung zeigt die Auftragung der Mittelwerte der normierten Zugkräfte der vier Zellen, die nach der mechanischen Stimulation mit einer sprunghaften Erniedrigung der Zugkräfte reagierten. Der lokale Reiz wurde zum Zeitpunkt t=0 Sekunden appliziert.*

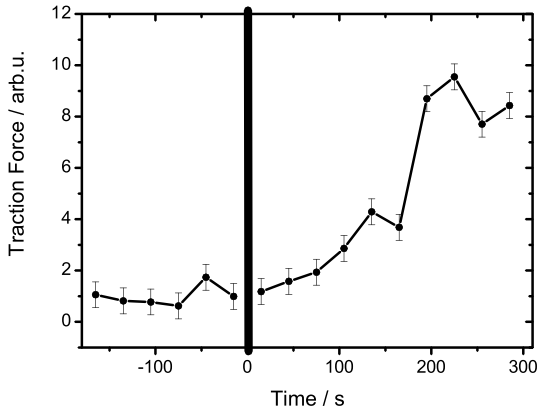

Abbildung 54: *In der Abbildung sind die Mittelwerte der normierten Zugkräfte der vier Zellen, die nach der mechanischen Stimulation mit einer stetigen Erhöhung der Zugkräfte reagierten, aufgetragen. Der lokale Reiz wurde zum Zeitpunkt t=0 Sekunden appliziert.*

angesehen werden. Die Zugkräfte stiegen dabei im Mittel um 100% an. Die Gruppe [tj+] wies im Durchschnitt eine initiale Adhäsionskraft von 4,1N/m^2 auf.

Einfluss der initialen Zugkräfte Wie beschrieben konnten die beobachteten Zellen im Wesentlichen in drei Hauptgruppen [t0], [t+] und [t-] unterteilt werden. Die letzten beiden wurden ihrerseits auf Grund der Dynamik der Zugkraftänderung jeweils in die Untergruppen [ts+], [tj+], [ts-] und [tj-] eingeteilt. Bei diesen trat also entweder eine stetige Änderung über mehrere Minuten hinweg ([ts+] und [ts-]; „s“: slow) oder eine sprunghafte Änderung ([tj+] und [tj-]; „j“: jump) ein.

Trägt man anstelle der normierten initialen Zugkräfte der Zellen die tatsächlichen Messwerte in ein Histogramm ein, so ergibt sich ein Bild, wie in Abbildung 56 dargestellt ist. Die quergestreiften Balken geben hier die Gesamtkräfte der Zellen wieder, die

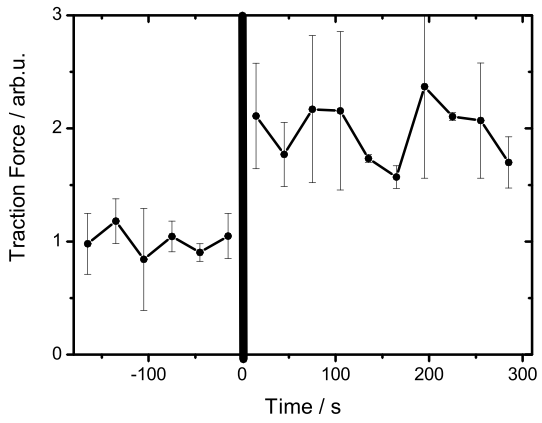

Abbildung 55: *Die Abbildung gibt die Mittelwerte der normierten Zugkräfte der zwei Zellen wieder, die nach der mechanischen Stimulation mit einer sprunghaften Erhöhung der Zugkräfte reagierten. Der lokale Reiz wurde zum Zeitpunkt t=0 Sekunden appliziert.*

nach der mechanischen Stimulation eine Erhöhung der zellulären Substratkräfte aufwiesen. Die Zugkräfte lagen zwischen 5 und 9,7N/m^2 und betrugen im Mittel 5,1N/m^2. Zellen, deren Adhäsionskraft nach der Belastung absanken, sind durch die Balken mit rechteckigem Muster repräsentiert. Hier lagen die Zugkräfte zwischen 9,3N/m^2 und 80,7N/m^2 und der Mittelwert betrug 33,9N/m^2.

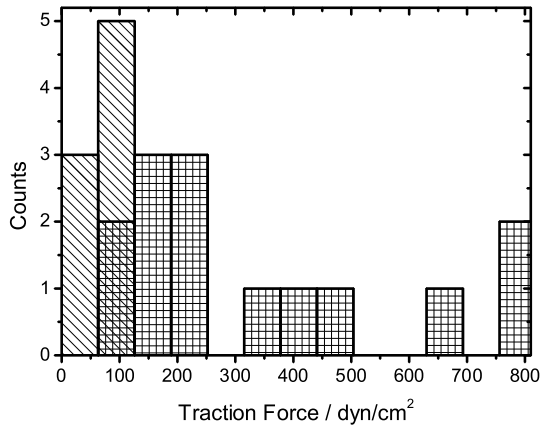

Abbildung 56: *Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Zugkräfte für alle Messzeitpunkte vor der mechanischen Stimulation. Sie sind in Form eines Histogramms dargestellt. Das diagonale Muster repräsentiert die Zellen, deren Zugkraft in Folge der Belastung anstieg. Das rechteckige Muster beschreibt die Zellen, deren Zugkraft nach der Belastung abfiel.*

Die Analyse der Daten zeigte eine signifikante Unabhängigkeit der berechneten Mittelwerte der Gruppen [t+] und [t-] (ANOVA, Daten nicht gezeigt). Damit ließen sich die Zellen sinnvollerweise in Gruppen mit geringen und hohen initialen Zugkräften einteilen. Diese entsprachen den Hauptgruppen [t+] und [t-] und reagierten damit in Folge eines mechanischen Reizes, abhängig von der ursprünglichen Adhäsionskraft, mit einer Erhöhung

oder Verringerung der Zugkräfte.

Interpretation der Ergebnisse Die langsame Änderung der Zugkräfte in den Gruppen [ts+] und [ts-] kann nur auf einen aktiven Umbauprozess innerhalb des Zytoskeletts - ähnlich mobilen Zellen bei Vorwärtsbewegungen - zurückgeführt werden [206]. Jedoch konnte während des Experiments keine dem Stimulationsort zugeordnete Bewegung oder charakteristische Veränderung der zellulären Topographie bestimmt werden. Gegen diese Beobachtung der aktiven Antworten spricht, dass keine Korrelation der mechanischen Zellantworten mit Calciumsignalen vorhanden ist. Zwar zeigen Dehnungsreize etwa 90 bis 150 Sekunden nach der Stimulation eine intrazelluläre Calciumerhöhung, jedoch sind zu diesem Zeitpunkt die Zugkräfte der Zelle schon auf einem konstant höheren oder niedrigeren Niveau, das nicht mehr von der Calciumkonzentration beeinflusst wird. Allerdings konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass Calcium für die Aktivierung des Aktin-Mysoin-Komplexes und damit zur aktiven Kraftgenerierung notwendig ist [213, 187]. Hier könnte also ein völlig anderer, Calcium-unabhängiger Prozess zum Umbau des Zytoskeletts und für die Generierung von Zugkräften verantwortlich sein.

Der signifikante spontane Verlust an Zugkraft der Zellen der Gruppe [tj-] kann sowohl auf aktive Zugkrafterhöhungen, als auch auf das passive Abreißen einiger Zell-Substrat-Kontakte (fokale Adhäsionen) zurückzuführen sein. Letzterer Mechanismus hat wahrscheinlich physiologische Relevanz: es wird vermutet, dass die Zellen die Zugkräfte auf einzelne fokale Adhäsionen erhöhen, um so das Abreißen dieser Kontakte zu ermöglichen [122]. Auch der sprunghafte Anstieg der Zugkräfte in Gruppe [tj+] kann durch die Zerstörung von internen Zellstrukturen, zum Beispiel den Mikrotubuli, hervorgerufen werden [236, 210]. Alternativ hierzu sind die Osteoblasten möglicherweise in der Lage, innerhalb weniger Sekunden die Zugkräfte um 100% zu erhöhen. Solch eine schnelle aktive Antwort könnte, da die Adhäsionspunkte sowieso schon unter einer hohen Spannung stehen, wiederum zum Abreißen der fokalen Adhäsionen in der Gruppe [tj-] führen und damit die erkennbare diskrete Zugkraftverringerung bewirken. Um dieser Vermutung auf den Grund zu gehen, ist ein Mess-System von Nöten, das eine höhere zeitliche Auflösung und damit die Untersuchung insbesondere der ersten Sekunden nach der mechanischen Stimulation ermöglicht. Die zeitliche Auflösung der Messung wurde in erster Linie durch die verwendete CCD-Kamera beschränkt. Ihre Lichtempfindlichkeit war zu niedrig, so dass lange Integrationszeiten (mehrere Sekunden) zur Aufnahme der Fluoreszenzbilder gewählt werden mussten. Durch die Verwendung einer EMCCD-Kamera (siehe Kapitel 3.5) könnte die Belichtungszeit auf weniger als 100ms reduziert und damit eine hohe zeitliche Auflösung der Zugkräfte gewährleistet werden. Eine solche Kamera konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr bezogen und eingesetzt werden.

Die Beobachtung, dass die Änderung der Zugkräfte von den initialen Zugkräften abhängt, könnte biologische Relevanz aufweisen. So könnte beispielsweise die Stärke der auf das Substrat übertragenen Zugkräfte von der Aktivität der Osteoblasten abhängen, Knochenmaterial zu synthetisieren. Da auch die Beweglichkeit von Zellen deren Adhäsionskräfte beeinflusst, wäre denkbar, dass Osteoblasten durch die selektive Auswirkung der Mechanotransduktion auf ihre momentanen Substratkräfte in ihrer Beweglichkeit gehemmt werden. In der Folge würden sie in einer Region des Knochens verharren, die durch weiteren Aufbau an Knochenmaterial verstärkt werden muss.

Zwischen den beiden Hauptgruppen [t+] und [t-] ist ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zu beobachten: so zeigte sich bei dem Versuch, den Stimulationsort der Silika-Kugel zu quantifizieren, dass die Zellen der Gruppe [t+] direkt am Zellkern oder in dessen Nähe stimuliert wurden. Die Bedeutung des Zellkerns in der Mechanotransduktion wurde bereits in Modell-Analysen berücksichtigt [173]. Der Zellkern ist durch Intermediärfilamente in das Zytoskelett integriert und weist eine direkte Verbindung zur äußeren Zellmembran auf [115, 149]. Modell-Berechnungen zeigten, dass beispielsweise durch einen äußeren Scherfluss der Zellkern schneller deformiert wird als die Elemente des Zytoskeletts [154]. Vielleicht kann die mechanische Kopplung zwischen Zellkerns, Zytoskelett und Zellmembran eine Erklärung für die veränderte Gen-Expression bei mechanischen Stimulationen, ausgelöst durch die Änderung der Zellform, liefern [153]. Es ist denkbar, dass der Zellkern seine Funktionalität und damit die Mechanotransduktion in Folge der mechanischen Stimulation auf biochemischem Wege direkt beeinflusst. Aber auch die mechanische Rückkopplung, die durch die Deformation des Zellkerns auf das umliegende Zytoskelett und die äußere Zellmembran erfolgt, kann möglicherweise den Mechanosensor und damit die Mechanotransduktion beeinflussen und unterschiedliche Signalkaskaden in Gang setzen. Die Verifizierung dieser Hypothesen ist schwierig, da der Stimulationsort nur ungenau bestimmt werden konnte. Weitere Experimente, die zur Verfolgung dieser Ansätze durchgeführt werden müssten, gestalten sich jedoch schwierig, da unter anderem eine entkoppelte mechanische Stimulation des Zellkerns (um dessen Relevanz in der Mechanotransduktion untersuchen zu können) nahezu unmöglich ist.

Im Vergleich der experimentellen Ergebnisse der mechanischen Stimulation mittels des Kraftmikroskops mit denen der Dehnungsmaschine sind Gemeinsamkeiten festzustellen. So ist bei beiden die sprunghafte Änderung der Zugkräfte Calcium-unabhängig und tritt abhängig von der Höhe der initialen Adhäsionskräfte auf. Da allerdings die Dehnungsreize zu einer verspäteten Calciumantwort führen können, sind mindestens zwei unabhängig arbeitende Mechanotransduktions-Systeme, die in den Osteoblasten die mechanischen Reize rezeptieren und in biologische Signale umsetzen, zu vermuten. Darüber hinaus deuten die zusätzlichen langsamen Änderungen der Zugkräfte der Gruppen [ts-] und [ts+] auf einen weiteren Mechanismus zur Verarbeitung mechanischer Reize hin. So könnte es in den Osteoblasten beispielsweise verschiedene Mechanosensoren geben, die - je nach Art des mechanischem Reizes - aktiviert werden oder nicht. Des Weiteren wäre denkbar, dass nur ein übergreifendes System und damit nur ein Mechanosensor existiert, der die Zellantwort auf unterschiedliche externe Reize variiert.

Unter der Annahme, dass der die Mechanotransduktion initiierende Mechanosensor auf der Adhäsionsseite lokalisiert ist, wirken die an der Zelloberseite applizierten vertikalen und lateralen Kräfte anscheinend anders auf die Adhäsionsseite der Zelle als Dehnungsreize. Diese Annahme wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Experimenten untersucht, in denen die Kraftweiterleitung unter mechanischer Stimulation mit dem Kraftmikroskop gemessen wurde. Die hierbei erhaltenen Ergebnisse werden im folgenden Kapitel dargestellt.

6.6 Krafttransmission bei vertikaler Stimulation

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Experimente zur Messung der Kraftweiterleitung innerhalb des Zytoskeletts nach vertikaler Stimulation mit dem Kraftmikroskop vorgestellt. Die Experimente dienten der Bestimmung der Kraftverteilung im Bereich der fokalen Adhäsionen. Mit ihnen sollte die Frage beantwortet werden, ob die vertikale lokale Stimulation in der Lage ist, einen möglichen Mechanosensor des Zytoskeletts, der sich im Bereich der fokalen Adhäsionen befindet, zu aktivieren, und welche generellen Unterschiede zwischen lokalen Stimulationen und Dehnungsreizen existieren. Des Weiteren sollten diese Experimente helfen, über die zellinterne Kraftweiterleitung das zellmechanische Verhalten zu ergründen und Zellmodelle zu evaluieren.

6.6.1 Experimenteller Aufbau

Um die Spezifität der lokalen Stimulation in Bezug auf die interne Kraftverteilung und Kraftweiterleitung auf die Adhäsionsseite der Zelle untersuchen zu können, wurden die Zellen auf einem elastischen Substrat kultiviert, mittels des Kraftmikroskops mechanisch stimuliert und die auftretenden Zugkräfte parallel gemessen. Hierfür wurde ein Cantilever, der mit einer 10μm messenden Silika-Kugel besetzt war, wenige Mikrometer oberhalb der zu stimulierenden Zelle positioniert. Anschließend wurde vor der Applikation der externen Kräfte alle zwanzig Sekunden die Verteilung der Fluoreszenzkugeln innerhalb des Gels bestimmt, um so die Zugkräfte der nicht stimulierten Zelle ermitteln zu können. Nach zehn bis zwanzig Aufnahmen wurde der Cantilever mit einer zuvor gewählten Kraft auf der Oberfläche der Zelle abgelegt und dort für 360 Sekunden belassen. Die Position des Cantilevers wurde in diesem Zeitraum relativ zur Glasoberfläche, auf der die Zellen angewachsen sind, nicht verändert und alle zwanzig Sekunden die Verteilung der Fluoreszenzkugeln im Gel aufgenommen. Anschließend wurde der Cantilever von der Zelloberfläche entfernt und im Abstand von zwanzig Sekunden erneut weitere zehn bis zwanzig Bilder mit der CCD-Kamera aufgenommen. Im Anschluss an die Messung wurde die Zelle vom Gel gelöst und mit Hilfe des relaxierten Gels ein Nullbild gewonnen.

Bei der Berechnung der Zugkraftmuster war darauf zu achten, dass die Randbedingungen zur Lösung der Fredholm-Integrale in der Bewertung der Deformationsmatrizen richtig gewählt werden. Auf Grund der extern applizierten Kräfte ist die Netto-Kraft der Zelle auf das Substrat nicht notwendigerweise gleich Null. Auch eine Rotation um die Hochachse ist bei unsymmetrisch wirkenden Kräften denkbar. Deshalb dürfen die Netto-Kraft und die Rotation nicht als Randbedingungen zur Lösung der Fredholm-Integrale eingesetzt werden, um verlässliche Kraft-Vektor-Karten unter äußeren Kräften zu erhalten (siehe Kapitel 5.3.3).

Die auf das Substrat übermittelten Zugkräfte der Zellen können auf verschiedene Weise bestimmt werden. In jedem Fall ist jedoch zur Bestimmung der Gesamtzugkräfte der Zelle eine Auswertung gegenüber dem Nullbild, also dem relaxierten Gel, von Nöten. Durch die Applikation externer Deformationen ist zu erwarten, dass Kräfte durch das Zytoskelett oder andere mechanische Eigenschaften auf die Adhäsionsseite der Zelle übertragen werden und hier die Gesamt-Zugkraft beeinflussen. Diese zusätzlichen Zugkräfte können jedoch gegenüber den physiologischen Adhäsionskräften der Zelle sehr klein sein, so dass

sie in der Analyse der Gesamt-Zugkräfte nicht signifikant messbar sind. Des Weiteren sind die von der Zelle generierten Adhäsionskräfte in das Zellinnere gerichtet. Im Gegensatz hierzu kann eine äußere Krafteinwirkung in Abhängigkeit vom tatsächlichen physikalischen Verhalten der Zelle zu unterschiedlich gerichteten zusätzlichen Zugkräften führen. In den Kraft-Vektor-Karten der Gesamt-Zugkraftanalyse wäre so eine Längen- und Richtungsänderung der durch die Adhäsionskraft der Zelle hervorgerufenen Kraftvektoren erkennbar. Um unmittelbar nach Auflage des Cantilevers die Variation der Gesamt-Zugkraft, also die *„differenzielle“* Zugkraft, die zwischen zwei Zeitpunkten auftreten, bestimmen zu können, kann eine „Bild-zu-Bild“-Analyse durchgeführt werden. Für diese wurde die Verteilung der Fluoreszenzkugeln im Gel zweier aufeinanderfolgender Bilder verglichen, so dass die berechneten Kraft-Vektor-Karten nur die Änderung der Zugkräfte von einem Zeitpunkt zum nächsten darstellen. Die Analyse der differenziellen Zugkräfte ermöglichte damit, sowohl kleine Änderungen der Gesamt-Zugkräfte quantitativ darzustellen als auch die Richtung der Änderungszugkräfte - ohne nachträgliche Analyse der Kraft-Vektor-Karten - zu erfassen.

6.6.2 Krafttransmission durch externe Kräfte

Bei insgesamt 26 durchgeführten Experimenten konnte eine Krafttransmission beobachtet werden. Hierbei betrugen die durch den Cantilever auf die Zelloberfläche übertragenen Maximalkräfte zu Beginn des Experiments 50nN, 150nN beziehungsweise 300nN. Diese Kräfte werden im Folgenden als kleine, mittlere und große Kräfte bezeichnet. Während der Stimulation war in den meisten Fällen eine kontinuierliche Abnahme der zwischen Cantilever und Zelle wirkenden Kraft um 20 bis 30% zu beobachten. Da bei der gesamten Stimulationsdauer von 360 Sekunden die Position des Cantilevers relativ zur Glasoberfläche nicht verändert wurde, kann dieser Effekt nur auf den aktiven Umbau des Zytoskeletts der Zelle oder viskoelastische Effekte mit einer großen Zeitkonstante zurückgeführt werden. Es ist also anzunehmen, dass sich durch die Deformation der Zelle die Kraftverhältnisse innerhalb des Zytoskeletts derart ändern, dass das physiologische Ruheniveau verlassen wird. So kann beispielsweise unter externen Scherflüssen der Umbau des Zytoskeletts sowie die Ausrichtung der Zelle und damit verbunden der Aktinfilamente entlang der Flussrichtung beobachtet werden [46, 24]. Auch für eine lokale Stimulation mit dem Kraftmikroskop ist zu erwarten, dass die Zelle auf Grund der äußeren Kräfte das Zytoskelett umbaut. Die Zelle weicht dabei der applizierten Belastung lokal aus und wird scheinbar weicher.

Kleine Kräfte Für die Krafttransmissionsmessungen wurden den Zellen, wie bereits oben beschrieben, zunächst externe Kräfte in der Größenordnung von 50nN appliziert (7 Experimente). Bei solchen kleinen Kräften konnten sowohl in differenziellen Kraft-Vektor-Karten als auch in den Gesamtkraft-Vektor-Karten keine signifikanten Änderungen der Zugkräfte beobachtet werden. Die differenziellen Zugkräfte lagen vor, während und nach der mechanischen Stimulation im Mittel bei circa $10\mathrm{N/m^2}$ und wiesen eine Standardabweichung von $5\mathrm{N/m^2}$ auf. Das bedeutet, dass die Zugkräfte sich innerhalb des Zeitraums von zwanzig Sekunden um durchschnittlich $10\mathrm{N/m^2}$ änderten. Hierbei blieben die Gesamtzugkräfte nahezu unbeeinflusst bei $100\mathrm{N/m^2}$ bis $300\mathrm{N/m^2}$. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass es sich bei den differenziellen Zugkräften lediglich um eine Änderung der auf das

Substrat übertragenen Kraftverteilung handelt. Bei letzterer findet eine Umorganisation der Zugkräfte und damit verbunden des Zytoskeletts statt, während die Gesamtzugkraft annähernd konstant bleibt. Da während des gesamten Experiments die differenziellen Zugkräfte die gleiche Größenordnung aufwiesen, kann geschlossen werden, dass die mechanische Belastung der Zellen allem Anschein nach zu keiner verstärkten Umbauphase beim Zytoskelett führt. Des Weiteren ließen die differenziellen Zugkräfte nur in den seltensten Fällen eine bestimmte Richtung erkennen. Dies könnte dann der Fall sein, wenn die Zelle richtungsorientiert migriert oder kleine Membranausstülpungen generiert, da in beiden Fällen das Zytoskelett eine gerichtete Aktion durchführen und gezielt Kräfte auf das Substrat ausüben muss. Beispielsweise zeigte die Arbeitsgruppe um Collinsworth, dass durch die mechanische Stimulation von Zellen eine Änderung ihrer Ausrichtung auftritt [30].

Die Applikation einer Kraft von 50nN überträgt einen Druck von 15N/m^2 bis 30N/m^2 in Relation zur Zellfläche auf die Zellmembran. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass geringe Drücke und die damit verbundenen geringen Deformationen von der Zelle „absorbiert“ und deshalb keine zusätzlichen Kräfte auf das Substrat weitergeleitet werden. So wäre es denkbar, dass viskoelastische Effekte der Zellmembran und des Zytosols die Deformationenergie absorbieren, ohne dabei die intrinsischen Spannungsverhältnisse des Zytoskeletts (kortikales und zelldurchspannendes Netzwerk) zu beeinflussen. Tatsächlich war bei den Experimenten dieser Arbeit ein viskoelastisches Verhalten der Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 25). Andere Arbeitsgruppen untersuchten das viskoelastische Verhalten der Zellen mit Rasterkraftmikroskopen [184] und optischen Pinzetten [7]. Die viskoelastischen Eigenschaften werden dabei der Zellmembran [61], Teilen des Zytosols sowie den Aktin-Filamenten [74] und Intermediär-Filamenten [120] zugeschrieben. Damit wäre es auch denkbar, dass lokal applizierte Kräfte relativ ortsgebunden in viskoelastische Deformationen des Zytoskeletts umgewandelt werden, ohne dabei zusätzlichen Kräfte auf das Substrat zu übertragen.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Deformationsenergie, die bei der Stimulation mit kleinen Kräften entsteht, an zytoplasmatische oder membranständige Proteine abgegeben wird und diese in der Folge ihre Konformation (Struktur) ändern. Hierbei könnte die gesamte Deformationsenergie zur Ent- und Umfaltung proteinartiger Strukturen dienen, ohne dass bei diesem Prozess zusätzliche Zugkräfte auf das Substrat übertragen werden.

Mittlere Kräfte Werden mittlere Kräfte von 150nN auf die Zelloberfläche appliziert, so konnten zu Beginn und zum Ende der Stimulation Änderungen in den Kraftverteilungsmustern der differenziellen Zugkräfte beobachtet werden (11 Experimente). Zu allen anderen Zeitpunkten der Messungen lagen die differenziellen Zugkräfte, wie auch bei der Applikation von kleinen Kräften zu beobachten war, bei circa 10N/m^2 und wiesen eine Standardabweichung von 5N/m^2 auf. Diese Umbauaktivität des Zytoskeletts beziehungsweise die stetige Änderung der internen Kraftverhältnisse war nicht durch eine Vorzugsrichtung gekennzeichnet. Folglich war auch keine Änderung der Gesamtzugkräfte zu beobachten.

Wurde der Cantilever mit einer Kraft von 150nN, also einem von der Zellgröße abhängigen Druck von 38N/m^2 bis 80N/m^2 abgelegt, konnte ein Anstieg der differenziellen Zugkräfte um 20N/m^2 bis 30N/m^2 beobachtet werden. Hier wird deutlich, dass nur ein kleiner Teil des applizierten Drucks auf das Zytoskelett übertragen wird, das in der Folge die

intrinsischen Spannungsverhältnisse ändert. Letztere können zu erhöhten Zugspannungen auf das Substrat führen. Eine Erklärung dieser Diskrepanz kann mit den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Mechanismen der viskoelastischen Deformation und der Entfaltung zytoplasmatischer Proteine gegeben werden. Bevor die hervorgerufene Deformation also auf dem Substrat zu zusätzlichen Zugspannungen führt, wird ein Teil der Deformationsenergie absorbiert.

Die größten Zugkraftänderungen waren im Bereich der Stimulation zu finden (siehe Abbildung 57). Dabei zeigte die Orientierung der induzierten differenziellen Zugkräfte ein

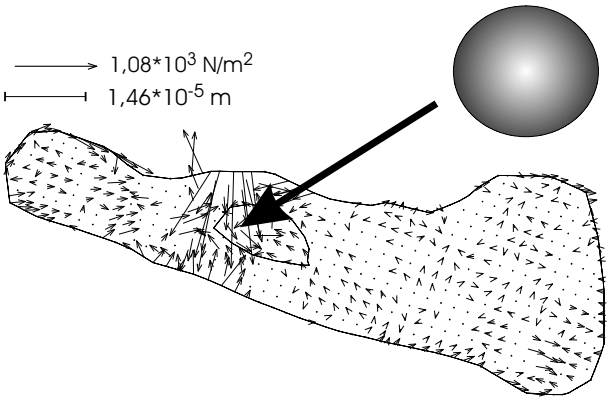

Abbildung 57: *Die Abbildung zeigt die differenziellen Zugkräfte unmittelbar nach Beginn der Stimulation der Zelle mit 150nN. Der Kreis dient der Darstellung des Größenverhältnisses zwischen der Silika-Kugel (Durchmesser: 10µm) und der Zelle. Der Pfeil markiert den Mittelpunkt der Stimulation. Die Kraftvektoren sind im Bereich der Stimulation am größten.*

indifferentes Bild. In einigen Experimenten ließen sich im Bereich der Projektionsfläche der Silika-Kugel auf die Adhäsionsseite der Zelle annähernd konzentrische Kraftmuster erkennen. Letztere wiesen entweder überwiegend nach innen (siehe Abbildung 57) oder nach außen (siehe Abbildung 58) gerichtete Kräfte auf. Eine mögliche Erklärung für lokal nach innen gerichteten Kräfte ist die Annahme eines kontinuierlichen elastischen Materials. Dessen Steifigkeit wird unter einer äußeren Deformation lokal erhöht und damit die direkte Übertragung der Deformation auf das Substrat ermöglicht. Durch die Annahme nicht-kompressibler Strukturen hingegen können durch die lokale Deformation des Zytoskeletts und die damit verbundende Abflachung nach außen gerichtete Kräfte auf das umliegende Zytoskelett und damit das Substrat übertragen werden. So werden Mikrotubuli in der Literatur häufig als Kompressions-widerstehende Komponenten des Zytoskeletts beschrieben [115], die in Tensegrity-Modellen der Stabilisierung des Zytoskeletts dienen. In Abhängigkeit von den lokalen physikalischen Eigenschaften scheint eine dieser mechanischen Eigenschaften zu überwiegen, so dass im Bereich der Stimulation entweder nach innen oder nach außen zeigende Kräfte auftreten.

Auch in den Bereichen, die nicht auf der Projektionsfläche der Silika-Kugel lagen, war die Orientierung der differenziellen Kraftvektoren nicht eindeutig. Allerdings war hier zu beobachten, dass die Regionen, die in unmittelbarer Nähe zur Projektionsfläche liegen, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Kraftvektoren aufweisen, die in das Innere der Zelle gerichtet sind. Je größer dabei die Entfernung zwischen dem Ort der Stimulation und den betrachteten Zugkräften wurde, desto indifferenter war deren Verteilung und umso

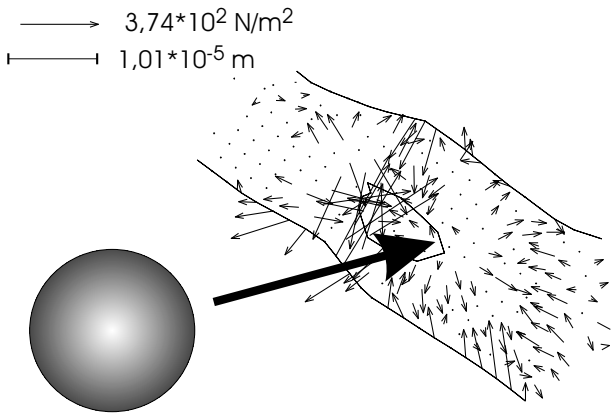

Abbildung 58: *Die Abbildung zeigt die konzentrischen differenziellen Zugkräfte im Bereich des Stimulationsortes. Sie traten unmittelbar nach Beginn der Stimulation der Zelle mit einer Kraft von 150nN auf. Der Kreis dient der Darstellung des Größenverhältnisses zwischen der Silika-Kugel (Durchmesser: 10µm) und der Zelle. Der Pfeil markiert den Mittelpunkt der Stimulation.*

seltener traten erhöhte Zugkräfte auf. Das zeigt, dass eine wie bei den Tensegrity-Modellen beschriebe Fernwirkung bei den hier applizierten Drücke nicht auftritt.

Die Gesamt-Zugkräfte der Zellen lagen zwischen 100N/m^2 und 250N/m^2 und wurden, im Gegensatz zu den differenziellen Zugkräften, durch eine Belastung von 150nN nicht verändert. Allerdings traten Änderungen in der Verteilung der Zugkraftmuster auf. Wurde der Cantilever nach 360 Sekunden von der Zelle entfernt, wurden die Gesamtzugkräfte teilweise verringert. Eine mögliche Begründung hierfür könnte der oben beschriebene Umbau des Zytoskeletts sein. Jedoch wirkte sich dieser erst auf die Gesamt-Zugkräfte aus, sobald der Cantilever von der Zelle entfernt wurde.

Da die Gesamt-Zugkräfte nahezu unverändert blieben und die differenziellen Zugkraftmuster ein indifferentes Bild bezüglich der Orientierung der Zugkräfte aufwiesen, ist davon auszugehen, dass während der Belastung unterschiedliche mechanische Eigenschaften der Zelle in den Vordergrund treten und miteinander konkurrieren. So könnte durch die applizierte Kraft das Zytoplasma lokal verdrängt werden und hierbei, da das Zellvolumen erhalten bleibt, nach außen gerichtete Kräfte generiert werden. Gleichzeitig könnte die zunehmende Belastung des Zytoskeletts zu nach innen gerichteten Zugkräften führen. Diese unterschiedlichen Mechanismen stünden untereinander in Konkurrenz und könnten teilweise gekoppelt sein: werden auf Grund der Volumenkompression nach außen gerichtete Kräfte auf das Substrat übertragen, so werden umgekehrt durch die fokalen Adhäsionen Kräfte an das Zytoskelett weitergegeben. Letztere ändern das intrinsische Spannungsverhältnis im Zytoskelett und können lokal zu nach innen gerichteten Zugkräften führen. Weisen die nach innen und nach außen gerichteten Kräfte auf Grund der Inhomogenität der Zelle ein zufälliges Verteilungsmuster auf, so können sich die entstehenden Zugkräfte bei der Berechnung der Gesamt-Zugkraft gerade aufheben. Im Gegensatz hierzu werden im differenziellen Zugkraftbild alle Änderungen der Zugkräfte im Vergleich zu dem vorangegangenen nicht-stimulierten Bild berücksichtigt. Das Modell der konkurrierenden mechanischen Eigenschaften der Zelle ist also in der Lage, eine Begründung für das indifferente Verteilungsmuster der differenziellen Kraft-Vektor-Karten sowie für die unveränderten Gesamt-Zugkräfte zu liefern.

Große Kräfte Bei acht Zellen erfolgte eine Belastung der oberen Zellmembran mit Kräften von etwa 300nN. Im Mittel lagen die resultierenden differenziellen Zugkräfte der Osteoblasten vor, während und nach Applikation des mechanischen Reizes bei circa 10N/m^2 und wiesen eine Standardabweichung von 5N/m^2 auf. Auch hier war in den Kraft-Vektor-Bildern keine beschleunigte Neuorganisation des Zytoskeletts und damit verbunden keine Variation der Adhäsionskräfte der Zelle zu erkennen.

Wurde der Cantilever mit einer Kraft von 300nN auf eine Zelloberfläche gefahren, entspricht das in Abhängigkeit von der Zellfläche einem Druck von 110N/m^2 bis 220N/m^2. Letzteres entspricht auch der Größenordnung der durch die Deformation der Zellen bei der Auflage des Cantilevers auf dem Substrat erzeugten differenziellen Zugkräfte. Deshalb spielt hier, im Gegensatz zu kleinen und mittleren Kräften, die Absorption der Deformationsenergie durch bestimmte Zellstrukturen eine untergeordnete Rolle.

Die Orientierung der differenziellen Zugkräfte in Abbildung 59 zeigt im Bereich der Projektionsfläche der Silika-Kugel überwiegend konzentrisch nach außen. Es scheint also, als ob die Übertragung der Deformation auf umliegende Zellbereiche und damit die Kraftübertragung auf das Substrat in den Vordergrund träte (siehe Beschreibung bei mittleren Kräften). Weiterhin ist zu erkennen, dass außerhalb der Projektionsfläche der Silika-

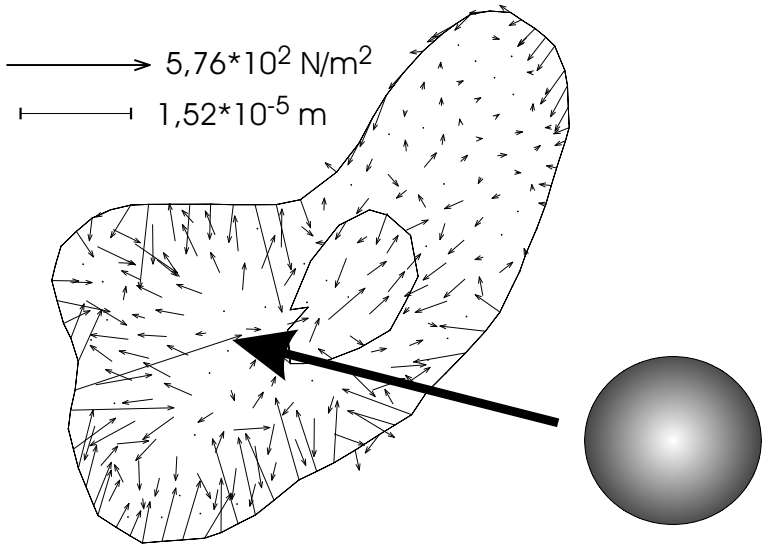

Abbildung 59: *In der Abbildung ist die Krafttransmission dargestellt, die während der Stimulation mittels einer Kraft von 300nN auftrat. Gezeigt ist das differenzielle Kraft-Vektor-Bild einer Zelle nach der Ablage des Cantilevers auf der Zelloberfläche. Der Kreis gibt das Größenverhältnis zwischen der Silika-Kugel (Durchmesser: 10μm) und der Zelle wieder. Die Pfeile markieren jeweils den Mittelpunkt der Stimulation.*

Kugel die Kraftvektoren eine Orientierung fast ausschließlich in das Zellinnere aufwiesen. Dabei wurden die nach innen gerichteten Kräfte umso kleiner, je größer der Abstand zum Stimulationsort war. Eine Ausnahme stellten hierbei die Hauptachse (Längsachse) begrenzenden Zellränder dar. Diese Beobachtung könnte durch das Vorhandensein von kortikalen Aktin-Filamenten erklärt werden. Letztere sind vor allem entlang der Hauptachse von Zellen ausgerichtet und werden beispielsweise durch kortikale Membranmodelle beschrieben (genauere Beschreibung in Kapitel 7). Wurde am Ende der Stimulation der Cantilever entfernt, zeigte das differenzielle Kraft-Vektorbild eine inverse Verteilung der Zugkräfte

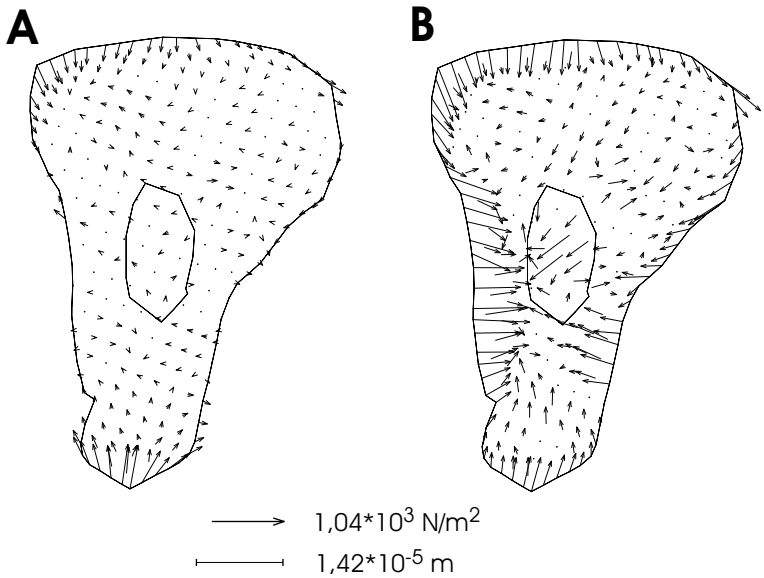

Abbildung 60: *Dargestellt ist die während der Stimulation mit einer Kraft von 300nN auftretende Krafttransmission. (A) zeigt die Gesamt-Zugkräfte der Zelle vor der Stimulation (75N/m^2); (B) gibt die Gesamt-Zugkräfte nach Auflage des Cantilevers auf die Zelle wieder (220N/m^2). Die Zunahme der Adhäsionskräfte durch die Stimulation ist deutlich zu erkennen.*

(nicht gezeigt).

Berechnet man nun durch den Vergleich mit einem nicht deformierten Substrat die Gesamt-Zugkräfte, so wird auch hier die Änderung der Adhäsionskraft durch die Auflage des Cantilevers deutlich (siehe Abbildung 60). Durch diese Belastung trat eine Erhöhung der Gesamt-Zugkräfte zwischen 80N/m^2 und 150N/m^2 auf. Damit trug ein großer Teil des applizierten Druckes zur Beeinflussung der auf das Substrat übertragenen Adhäsionskraft der Zelle bei. Die konkurrierenden mechanischen Eigenschaften, die bei mittleren Kräften diskutiert wurden, können diese Diskrepanz erklären. Ab einer bestimmten Deformation tritt allerdings eine bestimmte mechanische Eigenschaft in den Vordergrund und führt zur Änderung der Gesamt-Zugkräfte. Anscheinend werden durch die Belastung vor allem die intrinsischen Spannungsverhältnisse des Zytoskeletts verändert, so dass in der Folge erhöhte nach innen gerichtete Kräfte auftreten (siehe Abbildung 60).

Des Weiteren war bei der Applikation großer Kräfte zu beobachten, dass die Höhe der Adhäsionskraft mit fortschreitender Stimulationsdauer abnahm, so dass die Zugkräfte nach 360 Sekunden um 20% bis 30% vermindert waren. Zusätzlich induzierte Gesamtzugkräfte werden also hier in direkter Weise von der Zelle aktiv verändert, um so das physiologische Zugkraftniveau wiederherstellen zu können. Bei kleinen und mittleren Zugkräften hingegen versucht die Zelle vor allem, die lokale Belastung auszugleichen, indem sie weicher wird, ohne die Gesamtzugkräfte zu verändern (siehe oben).

6.6.3 Interpretation der Ergebnisse

Das vorrangige Ziel der oben beschriebenen Experimente war es, die Transmission der applizierten Kräfte durch das Zytoskelett zu den Adhäsionspunkten und damit auf das Substrat zu bestimmen. Hier sollte unter der Annahme, dass der Mechanosensor von Osteobla-

sten in der Nähe der fokalen Adhäsionen lokalisiert ist, untersucht werden, warum Osteoblasten auf einen Dehnungsreiz mit einer verzögerten Calciumantwort reagieren und auf die lokale Stimulation mit dem Kraftmikroskop nicht. In den folgenden Abschnitten erfolgt die Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich dieser Fragestellung. Des Weiteren dienen die durchgeführten Experimente zur Interpretation des zellmechanischen Verhaltens unter äußeren Kräften. Eine ausführliche Diskussion der erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der gängigen Zellmodelle und ihrer Evaluierung erfolgt in Kapitel 7.

Kleine und mittlere Kräfte Tatsächlich lässt sich feststellen, dass Osteoblasten die durch kleine Kräfte von etwa 50nN hervorgerufen Deformationen absorbieren. Diese Kräfte haben keinen signifikanten Einfluss auf die Substratkräfte. Die Beobachtung lässt vermuten, dass die Deformationsenergie im Wesentlichen für eine viskoelastische, lokale Deformation der Zellmembran, des Zytosols und des Zytoskeletts sowie einer Konformationsänderung zellinterner Proteine verwendet wird. Dabei werden keine zusätzlichen Kräfte auf das Substrat übertragen. Erst höhere Kräfte - von bis zu 150nN - lassen in den differenziellen Zugkraftbildern Zugkraftänderungen erkennen. Da diese sind jedoch fast vollständig ungerichtet sind, haben sie keine Auswirkung auf die Gesamt-Zugkraft. Hier scheinen unterschiedliche mechanische Eigenschaften der Zelle zu konkurrieren, in deren Folge es zu lokalen Unterschieden der Orientierung der differenziellen Zugkräfte (nach innen und nach außen gerichtete Kräfte) und damit zu entsprechenden Unterschieden der Kräfteverhältnisse des Zytoskeletts kommt.

Große Kräfte Appliziert man hingegen lokal auf die Oberseite eines Osteoblasten Kräfte von 300nN, so wird die vermittelt über Adhäsionspunkte auf das Substrat erfolgende Kraftübertragung verstärkt. Hier scheinen auf Grund der großen Deformation spezielle mechanische Eigenschaften der Zelle zu dominieren. Dabei resultieren vor allem nach innen gerichtete Kräfte auf das Substrat. Diese treten sowohl im differenziellen, als auch im Gesamt-Zugkraftbild auf, sind aber nicht über die gesamte Zelle verteilt. Andere Effekte, die nach Applikation kleiner und mittlerer Kräfte zu beobachten waren, treten hier in den Hintergrund. Obwohl die eindeutige Deformation des Substrats zeigt, dass auf eine kraftabhängige Beeinflussung bestimmter Zellteile wie des Zytoskeletts und der Adhäsionspunkte zurückgeschlossen werden kann, kommt es hier im Gegensatz zu den Dehnungsreizen nicht zum Auslösen einer Calciumantwort.

Kraftverteilung im Vergleich zu Dehnungsmessungen Die Kraftverteilung in der Zelle scheint sich nach Applikation von Dehnungsreizen grundlegend von der Kraftverteilung nach einem mechanischen Reiz durch das Kraftmikroskop zu unterscheiden: die uniaxiale Dehnung führt zu einer Streckung der kompletten Zelle entlang der Dehnungsachse. Auf Grund dieser Längenänderung werden Kräfte auf alle Adhäsionspunkte und damit auf die gesamte Zelle ausgeübt. Parallel zur Dehungsachse treten erhöhte, nach innen gerichtete Zugkräfte auf. Im Gegensatz hierzu können die senkrecht zu dieser Achse nach innen gerichteten Kräfte auf Grund der Volumenerhaltung abgeschwächt werden. Die lokalen Stimulationen hingegen zeigen ein anderes Bild: hier erfolgt die Erhöhung der Zugkräfte auf das Substrat vor allem in örtlicher Nähe zur mechanischen Stimulation und die auftretenden Zugkräfte sind in das Innere der Zelle gerichtet, so dass von einer mehr oder

weniger lokalen, kreissymmetrischen Manipulation der Zelle und damit des Zytoskeletts ausgegangen werden kann. Der Mechanosensor, der eine verzögerte Calciumantwort hervorruft, scheint derart in die Zelle integriert zu sein, dass eine mechanische Stimulation auf der Adhäsionsseite der Osteoblasten entlang einer bestimmten globalen Achse erfolgen muss, um diesen Mechanosensor aktivieren zu können. Die Experimente bestärken die Hypothese der Kopplung eines speziellen Mechanosensors mit der Adhäsionsseite der Zelle.

Die konstante lokale Deformation erzeugt keine aktiven Zugkräfte Die experimentellen Ergebnisse führen zu der grundsätzlichen Frage, ob die Änderung der Zugkräfte durch eine passive Krafttransmission zustande kommt oder ob aktive Mechanismen der Kraftgenerierung (siehe Kapitel 6.5) beteiligt sind.

In den Experimenten aus Kapitel 6.5 wurden die Zellen mit etwa 150nN und einer Frequenz von 10 Hz für zwei Sekunden mit dem Kraftmikroskop lokal belastet. Hierbei sollte die aktive Antwort der Zelle auf die mechanische Stimulation untersucht werden. Bei diesen Experimenten waren verschiedene Änderungen in den Gesamt-Zugkräften zu beobachten: so wurden die Zugkräfte einerseits innerhalb weniger Sekunden nach der mechanischen Stimulation entweder abrupt erhöht oder verringert. Andererseits wurde auch eine langsame Änderung der Gesamt-Zugkräfte nach der lokalen Stimulation erkennbar.

Die Experimente, die zur Bestimmung der Krafttransmission durchgeführt und deren Ergebnisse in diesem Kapitel vorgestellt wurden, zeigten im Gegensatz dazu eine Gemeinsamkeit: die Stimulation führte hier, sofern die Kräfte groß genug waren, sofort nach Ablage des Cantilevers zur Erhöhung der Zugkräfte. Hierbei blieb der Cantilever allerdings für 360 Sekunden an einer vorherbestimmten Position. Die Änderung der Zugkräfte hing nun, im Gegensatz zur vertikalen Stimulation, die mit einer Frequenz von 10Hz erfolgte, nicht von den initialen Zugkräften ab. Des Weiteren zeigten die aktiven Zugkrafterhöhungen aus Kapitel 6.5 eine gleichförmige Erhöhung oder Verringerung der nach innen gerichteten Zugkräfte über die ganze Zelle verteilt. Die Krafttransmissionsmessungen hingegen wiesen nur eine lokale Kraftänderung in den Zugkraftmustern auf.

Auf Grund der oben beschriebenen Beobachtungen ist zu schließen, dass die langsame Auflage des Cantilevers und die sich anschließende Dauerstimulation keine aktive Antwort der Zelle hervorruft.

Frequenzabhängigkeit der Mechanotransduktion Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Beobachtungen lassen vermuten, dass der Mechanosensor eine Frequenzabhängigkeit besitzt. Dieses Phänomen kann auch bei der Stimulation ganzer Knochenfragmente beobachtet werden (siehe Kapitel 2.4). Dabei scheint das Knochenwachstum vor allem mit kleinen Amplituden, aber hohen Frequenzen stimuliert werden zu können. Der zelluläre Mechanismus, der auf solche Reize mit der Initiierung der Mechanotransduktion reagiert, könnte also ähnlich dem Aktin-Myosin-Komplex des Zytoskeletts eine Art Vorspanneinrichtung sein. Das Zytoskelett kann unter ATP-Verbrauch Aktinfilamente um eine bestimmte Schrittweite bewegen und unter erhöhte Zugspannungen setzen (siehe Kapitel 2.2.1). Der Mechanosensor könnte ähnlich funktionieren: durch wiederholte äußere Krafteinwirkung wird die Molekülstruktur des Mechanosensors schrittweise so lange

entfaltet, bis neue Bindungsstellen freigelegt sind, die eine Signalkaskade in Gang setzen. Die Stimulationsfrequenz definiert also nicht nur auf Knochenebene die Syntheseleistung, sondern spielt auch auf zellulärer Ebene anscheinend eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion.

Zusammenfassung Wie die Krafttransmissionsmessungen zeigten, können das Zytoskelett und die Adhäsionspunkte der Osteoblasten durch eine lokale Stimulation beeinflusst werden. Allerdings führt die mechanisch hervorgerufene Deformation zu einer Kraftverteilung in der Zelle, die sich wesentlich von der durch Dehnungsreize hervorgerufenen Kraftverteilung unterscheidet. Das kann erklären, warum durch die lokale Stimulation keine verzögerte Calciumerhöhung, wie sie bei Dehnungsreizen zu beobachten ist, aktiviert wird. Die Gemeinsamkeit von Dehnungsreizen und lokalen Stimulationen besteht hingegen darin, dass bei beiden als Reaktion auf den mechanischen Reiz eine instantane Änderung der Zugkräfte auftritt (siehe Kapitel 6.5). Nach wie vor konnte jedoch die Existenz eines oder mehrerer Mechanosensoren in Osteoblasten nicht bestätigt werden. Wäre nur ein Mechanosensor in Osteoblasten für die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden verantwortlich, so müsste dieser in der Lage sein, unterschiedliche Kraftverteilungen im Zytoskelett und an den fokalen Adhäsionen zu detektieren und abhängig von der mechanischen Belastung differenzierte Zell-Antworten initiieren zu können. Allerdings zeigte sich, dass die lokale Belastung mit dem Kraftmikroskop in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz eine aktive Zugkraftänderung erzeugt. Wie die Krafttransmissionsmessungen zur Analyse der zellmechanischen Eigenschaften in Hinblick auf Modelle der Zellmechanik diskutiert werden können, wird ausführlich in Kapitel 7 besprochen.

Um die Frage, warum Scherflüsse genauso wie Dehnungsreize verzögerte Calciumantworten auslösen, klären zu können, wurde die Krafttransmission von Osteoblasten auf die Adhäsionsseite der Zellen unter der Einwirkung eines äußeren Scherflusses untersucht. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel dargestellt und diskutiert.

6.7 Krafttransmission bei Scherflüssen

Zur Bestimmung der Unterschiede zwischen der lokalen Stimulation mit dem Kraftmikroskop und den Scherflüssen wurden Krafttransmissionsmessungen an Osteoblasten unter Scherfluss durchgeführt. Damit sollte die Frage geklärt werden, warum Scherflüsse eine verzögerte Calciumantwort auslösen, lokale Stimulation mit dem Kraftmikroskop aber nicht. Die Beobachtung und Analyse der Zugkraftmuster auf das Substrat erfolgt wie in Kapitel (siehe Kapitel 6.6.1) beschrieben.

6.7.1 Applikation von Scherkräften

Um die Zellen einem gezielten Scherfluss aussetzen zu können, wurde eine parallele Scherflusskammer verwendet (siehe Kapitel 3.8). Diese ermöglichte durch die Wahl der Flussgeschwindigkeit die gezielte Applikation mechanischer Scherkräfte auf die in der Kammer angewachsenen Zellen. Als Substrat diente den Zellen ein Polyacrylamid-Gel, in das Fluoreszenzkügelchen eingebettet waren. Sie ermöglichten die Messung der durch

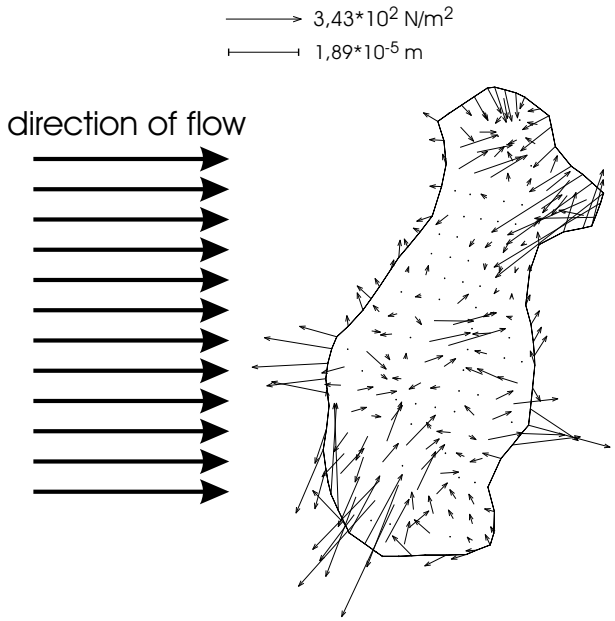

Abbildung 61: *In der Abbildung ist die Krafttransmission durch die Zelle während der Applikation eines Scherflusses mit einer Kraft von 3N/m^2 dargestellt. Die Flussrichtung zeigt von links nach rechts. Eine bestimmte Richtung der transmittierten Zugkräfte die mit der Flussrichtung korrelieren ließ sich nicht beobachten.*

die mechanische Belastung auf das Substrat übertragenen Kräfte (siehe Kapitel 5). Die Flussgeschwindigkeit des Mediums durch die Kammer wurde so gewählt, dass die Zellen einer Scherkraft zwischen 3N/m^2 und 6N/m^2 ausgesetzt waren. Die Verteilung der Fluoreszenzkugeln wurde zunächst bei ausgeschaltetem Fluss und anschließend unter Flussbedingungen bestimmt. Auf diesem Weg konnten differenzielle Zugkraftbilder, in denen die Änderung der Zugkraft durch die wirkenden Scherkräfte beobachtet werden konnte, gewonnen werden.

Da bei der Scherflussapplikation die Möglichkeit einer aktiven mechanischen Zellantwort bestand, wurden die Zellen durch die Zugabe einer 4% Formalin-Lösung fixiert. Die Zellen gelangten so in einen „festen Zustand“, in dem biologische Prozesse inhibiert sind, jedoch die Steifigkeit der Zelle zunimmt. Dieser Prozess wurde mit dem Kraftmikroskop gemessen. Der ermittelte Steifigkeitswert der fixierten Zelle nahm etwa den vierfachen Wert gegenüber der nicht fixierten Zelle an. Damit war ein Einfluss auf die Zugkraftmuster nicht auszuschließen. Um diesem Problem begegnen zu können, wurde alternativ zu Formalin mit dem Reagenz ML-7 gearbeitet (siehe Kapitel 3.9.6). ML-7 führt bei den Zellen zu einer Inaktivierung der Myosin-Light-Chain-Kinase (MLCK). Die MLCK aktiviert Mysoin und stellt damit die Zellbewegung vermittelt durch das Zytoskelett sicher. Durch ihre Inhibierung konnten also aktive, durch Aktin-Myosin-Aktivität ausgelöste Zugkraftänderungen, ausgeschlossen werden. Bei der Bestimmung der Zugkräfte war darauf zu achten, dass externe Kräfte auf die Zelle wirken und daher die Analyse der Zugkräfte mit definierten Randbedingungen erfolgen musste (siehe Kapitel 5.3.3).

Die experimentellen Ergebnisse zeigten, dass die Verteilung der differenziellen Zugkraftmuster sehr indifferent ist. Die Abbildung 61 gibt eine Beispielmessung wieder, die die sehr ungleichmäßige, differenzielle Kraftverteilung nach Scherflussapplikation zeigt. Trotz der

Vorzugsrichtung des Scherflusses (in der Abbildung von links nach rechts) konnte keine spezielle Ausrichtung der Kraftvektoren beobachtet werden. Die Erhöhung der Zugkräfte durch Aktivierung des Scherflusses lag in den differenziellen Zugkraftbildern bei Kräften zwischen 10N/m^2 und 100N/m^2 (siehe Abbildung 61).

6.7.2 Die Krafttransmission zeigt keine Vorzugsrichtung

Die differenziellen Kraft-Vektor-Karten der acht durchgeführten Experimente zeigen keine ausgezeichnete Richtung der Kraftvektoren. Da diese jedoch auf Grund eines gerichteten Scherflusses zu erwarten gewesen wäre, kann die Frage, warum nur die durch Scherfluss und Dehnung stimulierten Osteoblasten mit einer verzögerten Calciumantwort reagierten nicht beantwortet werden. Im Gegenteil: die durch Scherflüsse hervorgerufenen differenziellen Zugkraftmuster sind eher mit denen, die auf Grund lokaler Stimulationen durch mittlere Kräfte entstehen, zu vergleichen. Folglich wäre anzunehmen, dass auch Scherflüsse nicht zu einer Calciumantwort führen, wie dies nach Stimulationen mit dem Kraftmikroskop zu beobachten ist.

Kraftübertragung im ganzheitlichen Knochen Eine wichtige Frage für den Vergleich zwischen makroskopischen und mikroskopischen Vorgängen der Mechanotransduktion ist, wie die Deformation eines Knochens auf dessen Zellen übertragen wird. Wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben wurde, sind dafür im Wesentlichen der durch hydrostatischen Druck verursachte Flüssigkeitsfluss und die direkte Übertragung der Deformation an die Adhäsionspunkte der Zellen verantwortlich. Unter der Annahme, dass die im Rahmen dieses Kapitels erhaltenen Ergebnisse die physiologischen Vorgänge korrekt widerspiegeln, scheinen vor allem Dehnungsreize die Adhäsionsseite der Zelle zu beeinflussen. Damit wäre die direkte Kopplung des mechanischen Reizes an die Adhäsisonsseite der Zelle ein wesentlich besserer Reiz, um eine Mechanotransduktion auszulösen als mechanische Belastungen, die auf der nicht adhärenten Seite der Zelle wirken. Demnach ist für den ganzheitlichen Knochen vor allem die direkte Übertragung zwischen der Knochenhartsubstanz und den Knochenzellen entscheidend und der durch hydrostatischen Druck ausgelöste Flüssigkeitsstrom weniger wichtig.

Berechnung der Wandscherkraft und experimentelle Daten im Vergleich Des Weiteren ist auffällig, dass die Änderung der Zugkräfte durch den Scherfluss weit oberhalb der theoretisch durch die Flussgeschwindigkeit berechneten Scherkraft lag. Da jedoch auf Grund der Formalin-Fixierung beziehungsweise der Behandlung der Zellen mit ML-7 keine aktiven Antworten auftreten konnten, wäre zu erwarten gewesen, dass maximal der durch die Stimulation aufgebaute Druck als zusätzliche Zugspannung durch die Zelle auf das Substrat übertragen wird. Dass allerdings differenzielle Zugkräfte auftraten, die die applizierten Kräfte um den Faktor zehn übertreffen, kann wenigstens zwei unterschiedliche Ursachen haben: zum einen kann eine stark fehlerbehaftete Berechnung der Kraft-Vektor-Karten. Zum anderen könnte auf Grund eines falschen Modells die Berechnung der durch den Scherfluss auf die Zellen wirkenden Scherkraft fehlerhaft erfolgt sein (siehe Kapitel 3.8).

Auch wenn die Scherflussexperimente zunächst nicht zur Klärung der Unterschiede der Mechanotransduktion beitragen, so konnte doch der Einfluss von lokalen Stimulationen, Scherkräften und Dehnungsreizen auf die Adhäsionseite gezeigt werden (siehe Kapitel 6.6). Die mögliche Rolle der Adhäsionspunkte in der Mechanotransduktion wurde in Kapitel 2.3.6 eingehend beschrieben, weshalb der Umbauprozess der Adhäsionsstellen unter lokalen Stimulationen mit der Transfektionstechnik (siehe Kapitel 3.4) in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Die Ergebnisse werden im folgenden Kapitel beschrieben.

6.8 Vertikale Stimulation und Vinculin-Konzentration

In diesem Kapitel wird die Auswirkung der mechanischen Stimulation auf die fokalen Adhäsionen aus einem biochemischen Blickwinkel untersucht.

Zellen gehen vermittelt über Adhäsionspunkte eine Verbindung mit ihrer Umgebung ein. Die hierbei auftretenden Integrin-Adhäsionen wurden auf Grund ihrer molekularen Unterschiede von Zamir et al. [251] in drei Gruppen aufgeteilt: die klassischen fokalen Adhäsionen (FA) sind vor allem in der Zellperipherie zu finden und enthalten unter anderem die Proteine Vinculin und Paxillin. Tensin hingegen kommt in erster Linie in zentral lokalisierten fibrilliären Adhäsionen, die die zweite Gruppe bilden, vor [252]. Die letzte Gruppe bilden die fokalen Komplexe (engl. *focal complexes* - FX). Sie weisen eine Punkt-ähnliche Struktur auf und sind vor allem im Bereich der vorderen Front einer sich in Vorwärtsbewegung befindlichen Zelle zu finden. Hier beginnt die Erzeugung neuer Adhäsionspunkte durch die Bildung kleiner fokaler Komplexe, die unter mechanischer Belastung in fokale Adhäsionen übergehen können [71, 189]. Fibrilliäre Adhäsionen können wiederum durch die induzierte zentripetale Verschiebung von extrazellulär gekoppelten Fibronektin-Rezeptoren aus den fokalen Adhäsionen entstehen [170, 253].

Da die Adhäsionspunkte durch biologische und physikalische Aktivität beeinflusst werden [5], wurde die Bildung und die Größe der fokalen Adhäsionen unter mechanischer Stimulation beobachtet. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

6.8.1 Aktivität der fokalen Adhäsionen unter mechanischer Belastung

Für die Vinculin-Experimente wurden die Osteoblasten zunächst auf einer Glasoberfläche kultiviert und anschließend mit Hilfe des Kraftmikroskops mechanisch stimuliert. Damit weiterhin die Vergleichbarkeit der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente gewährleistet werden konnte, wurden zur Stimulation der Zellen die folgenden Parameter verwendet: zwanzig dreiecksförmige Stimulationszyklen wurden mit einer Maximalkraft von 150nN bis 300nN innerhalb von zwei Sekunden appliziert. Damit betrug die Stimulationsfrequenz 10Hz. Um den Einfluss der Stimulation auf die Adhäsionspunkte der Zelle beurteilen zu können, wurden die Zellen transient mit dem Plasmid transfiziert, das das Vinculin gekoppelt an das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) trägt (Beschreibung siehe 3.4). Die Transfektion ermöglichte die Dokumentation der Vinculin-Verteilung. Letztere erfolgte vor und nach der mechanischen Stimulation fünf Minuten lang, alle 30 Sekunden mit einer CCD-Kamera.

Wie sich zeigte, erfolgt der Umbau der fokalen Adhäsionen auf einer Zeitskala, die nicht

mit der verwendeten Kamera aufgelöst werden konnte. Die geringe Lichtempfindlichkeit des eingebauten CCD-Chips erforderte Integrationszeiten von mehr als zwanzig Sekunden. Da sich jedoch auf dieser Zeitskala die Morphologie der einzelnen Adhäsionspunkte wesentlich änderte, ist die erhaltene Adhäsions-Größe nur ein Mittelwert der tatsächlichen Ausdehnung zu den verschiedenen Zeitpunkten. Um bessere Aufnahmen erhalten zu können, ist eine Reduktion der Belichtungszeit von Nöten. Hierfür wäre die Verwendung eines neueren EMCCD-Chips, dessen Licht-Sensitivität deutlich besser ist, denkbar (siehe Kapitel 3.5). Eine solche Kamera stand im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung, so dass die oben genannten Experimente wiederholt werden müssen.

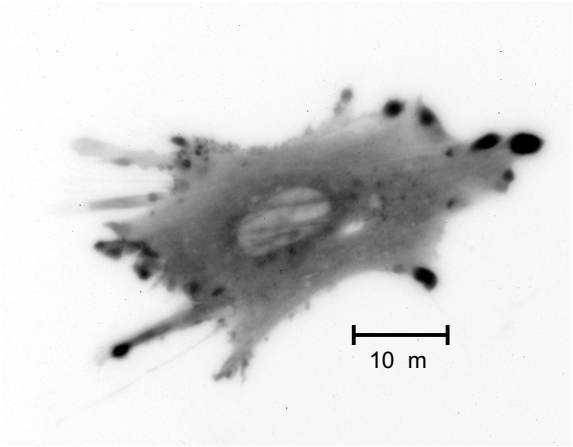

Abbildung 62: *Die Abbildung zeigt die Verteilung des Vinculins in der Zelle. Die dunklen Bereiche entsprechen einer hohen Konzentration an Vinculin und charakterisieren damit die Adhäsionspunkte der Zelle zum Substrat.*

Die fokalen Adhäsionen waren vor allem in den peripheren Bereichen der Zelle lokalisiert (siehe Abbildung 62). Dabei war die größte Dichte an den die Längsachse begrenzenden Zellrändern zu finden. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der zellulären Zugkraftmessungen überein. Sie zeigten, dass die Zugkräfte im Wesentlichen parallel zur Hauptachse der Zelle auftreten (siehe Zusammenfassung Kapitel 6.5 sowie [70, 146, 168]). Fokale Adhäsionen und fokale Komplexe werden an Hand ihrer Flächenausdehnung unterschieden. So weisen fokale Komplexe in etwa einen Durchmesser von 1μm auf [189], während die fokalen Adhäsionen wesentlich größer sind. In dieser Arbeit war jedoch auf Grund der oben genannten Probleme diese Unterscheidung nicht möglich. Auch die Übergänge zwischen den einzelnen Adhäsionsstadien konnten dementsprechend nicht beobachtet werden.

Es konnte jedoch qualitativ beobachtet werden, dass Zellen, die mit Kräften zwischen 150 und 300nN stimuliert wurden, häufig die Dichte ihrer Adhäsionspunkte änderten. Die Abbildung 63 zeigt im linken Bild die Verteilung der fokalen Adhäsionen der nicht-stimulierten Zelle und im rechten Bild die Verteilung nach der Stimulation. Deutlich ist hier eine Erhöhung der Dichte der Adhäsionspunkte zu erkennen, die fünf Minuten nach der mechanischen Stimulation auf das ursprüngliche Niveau zurückkehrte. Allerdings konnte die Dynamik aus oben genannten Gründen nicht quantitativ bestimmt werden.

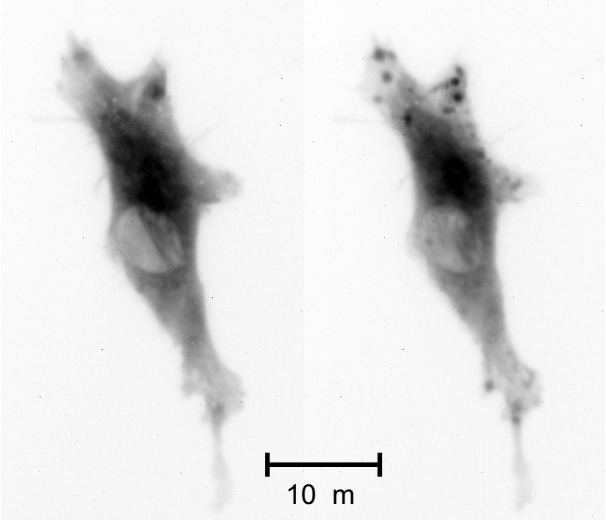

Abbildung 63: *In der Abbildung ist die Verteilung des Vinculins über die Zelle invers dargestellt. Die dunklen Bereiche entsprechen einer hohen Vinculin-Konzentration. Die linke Seite zeigt die Zelle vor der Stimulation, die rechte Seite nach der Stimulation, die mit einer Kraft von 300nN erfolgte. Deutlich ist hier die erhöhte Konzentration an Adhäsionspunkten zu erkennen.*

6.8.2 Die Dynamik der fokalen Adhäsionen steigt nach mechanischer Belastung

Das oben beschriebene Ergebnis korreliert mit den Zugkraftänderungen nach mechanischer Stimulation: die Stimulation bewirkt eine sprunghafte Erhöhung oder Verringerung der zellulären Zugkräfte, in deren Folge sich auch die Kraftverteilung auf die fokalen Adhäsionen verändert (siehe Kapitel 6.5). Auch andere Arbeitsgruppen zeigten unlängst, dass die Dynamik der fokalen Adhäsionen und deren Morphologie durch externe oder durch im Aktin-Myosin-Netzwerk erzeugte interne Kräfte beeinflusst wird. Jedoch verharren die Zellen hier auf dem neuen, erhöhten oder verringerten Zugkraftniveau, während die Dynamik und die Anzahl der fokalen Adhäsionen innerhalb von fünf Minuten nach der Stimulation auf den ursprünglichen Wert zurückgeht.

Als Erklärung für diese Beobachtung wäre zum Beispiel folgender Mechanismus denkbar: das durch die Stimulation erzeugte höhere oder geringere Zugkraftniveau stellt einen veränderten „Ruhezustand“ innerhalb des Zytoskeletts der Zelle dar. Hierfür erfolgt zunächst eine instantane Änderung der Spannungsverhältnisse des bestehenden Zytoskeletts, vermittelt durch die Aktivierung der Aktin-Myosin-Komplexe . Um dem neuen Zugkraftniveau der Zelle zu entsprechen, beginnt anschließend die Umorganisation des Zytoskeletts. In deren Folge ändern sich die lokalen Kraftverhältnisse in der Zelle, während die auf das Substrat übertragene Gesamt-Zugkraft konstant bleibt. Diese Beobachtung konnte auch bei den Krafttransmissionsmessungen gemacht werden. Entsprechend der Remodellierung des Zytoskeletts und der Variation der Kraftverteilung ändert sich die Dynamik der fokalen Adhäsionen. Nach Abschluss des Umbau-Prozesses geht der Auf- und Abbau der fokalen Adhäsionen auf das ursprüngliche Niveau zurück. Die Zugkräfte der Zelle weisen jetzt ein verändertes Grundniveau auf. Auch das Zytoskelett wurde an die veränderten Anforderungen angepasst.

Da die dynamischen Änderungen der Adhäsionsgröße und -zahl in einem sehr begrenzten

Zeitfenster erfolgen (externe Kräfte ändern die Morphologie von fokalen Adhäsionen innerhalb weniger Sekunden [5]), müssen letztendlich diese spekulativen Mechanismen durch Messungen mit einer Zeitauflösung, in der die einzelnen Prozesse zeitlich aufgelöst dargestellt werden können, verifiziert werden. Eine zeitliche Auflösung von deutlich unter einer Sekunde könnte hierbei helfen, die Entstehung und die Umwandlung fokaler Komplexe in fokale Adhäsionen zu zeigen.

7 Diskussion

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nochmals aufgegriffen, um sie vor dem Hintergrund der mechanischen Eigenschaften von Zellen und deren Modellierung zu diskutieren.

7.1 Die Notwendigkeit der Modellierung der Zellmechanik

Wie die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, sind Zellen in der Lage, unterschiedliche mechanische Reize zu detektieren. Hierbei können sie zwischen verschiedenen mechanischen Deformationen unterscheiden und mit einer entsprechenden Veränderung in der Zellantwort auf diese reagieren.

Die Weiterleitung externer Kräfte wird von den mechanischen Eigenschaften der Zelle determiniert. Unter Zuhilfenahme mathematischer Modelle wird versucht, das mechanische Verhalten der Zelle zu beschreiben (siehe Kapitel 2.3.6), um so die Vorhersage zellulärer Prozesse zu ermöglichen. Gerade für die Interpretation der Mechanotransduktion und die Suche nach dem Mechanosensor können solche adäquaten Zellmodelle hilfreich sein. Auf den folgenden Seiten soll zunächst ein kurzer Überblick über die gängigen Modelle gegeben werden; im Anschluss folgt ein Vergleich der in dieser Arbeit erhaltenen experimentellen Ergebnisse mit diesen Modellen und ein Mischmodell wird vorgeschlagen.

7.2 Modelle der Zellmechanik

Eine Unterscheidung der mathematischen Modelle, die der Beschreibung des mechanischen Verhaltens adhärenter Zellen dienen, kann bezüglich des jeweils benutzten Maßstabs getroffen werden. Dabei wird zwischen Kontinuumsmodellen und mikrostrukturierten Modellen differenziert. Im Folgenden werden verschiedene Ansätze dargestellt.

7.2.1 Das Tensegrity-Modell

Schon vor vielen Jahren schlugen Ingber et al. vor, dass das mechanische Verhalten von Zellen mittels des architektonischen Konzepts *„Tensegrity“* beschrieben werden müsste [115]. Dieses architektonische Konzept wurde ursprünglich von Fuller entworfen [69], um hiermit eine bestimmte Baustruktur zu beschreiben, die auf dem Gleichgewicht zwischen einzelnen Struktur-Elementen beruht. Das Wort *„Tensegrity“* ist ein Kunstbegriff, der sich aus den Worten „Tension“ (Spannung) und „Integrity“ (Integrität) zusammensetzt. Die so bezeichneten Strukturen sind hierarchisch aufgebaut und bestehen neben *„Kabeln“*, die unter Zugspannung stehen und ein kontinuierliches Netzwerk bilden, aus diskret verteilten, Kompressions-widerstehenden *„Streben“*. Auf Grund der bei den Strukturen eingeprägten Vorspannung, die entlang der Spannungs-Elemente erfolgt, sind diese selbsttragend und gegenüber äußeren Kräften stabil. Eine einfache Tensegrity-Struktur ist in Abbildung 64 dargestellt.

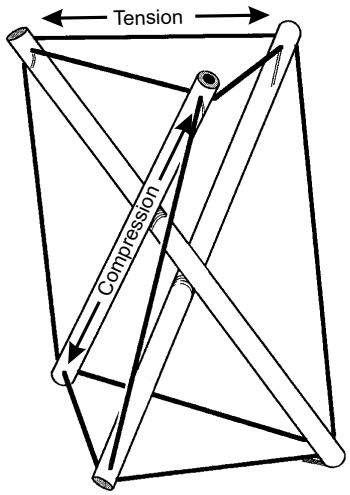

Abbildung 64: *Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung einer Tensegrity-Struktur, bestehend aus unter Spannung stehenden Kabeln und Kompressions-widerstehenden Streben (zum Teil aus [115]).*

Das Prinzip *„Tensegrity“* kann unter Berücksichtigung des kortikalen Netzwerkes, das direkt unterhalb der Zellmembran liegt, und des zelldurchspannenden Filamentsystems auf das Zytoskelett übertragen werden. Während hierbei die Aktinfilamente die *„Kabel“* repräsentieren, die gegenüber Zugspannungen stabil sind, bilden die Mikrotubuli die *„Kompressions-widerstehenden Elemente“*, da sie sich in Folge einer großen Persistenzlänge durch eine hohe Steifigkeit auszeichnen. Dabei steht die gesamte Struktur unter einer vom Aktin-Myosin-System der Zelle erzeugten Vorspannung, die zum einen zur Stabilisierung beiträgt [116] und zum anderen die elastischen Eigenschaften des Zytoykeletts und damit der Zelle determiniert. Das hieraus resultierende Kraftgleichgewicht der Tensegrity-Struktur wird allerdings nicht nur durch die gegensätzlichen Eigenschaften der Aktinfilamente und Mikrotubuli bestimmt, sondern auch durch die Zell-Matrix-Kontakte der adhärenten Zellen.

Eine weitere Charakteristik der Tensegrity-Strukturen ist, dass sie nach Applikation äußerer Kräfte eine Fernwirkung („action at a distance“) aufzeigen [117]. Das heißt, dass eine lokal begrenzte Belastung der Tensegrity-Struktur in der Lage ist, die Spannungsverhältnisse und die Morphologie der gesamten Struktur und damit die Kraftübertragung auf das Substrat zu beeinflussen. Die Kopplung applizierter Kräfte erfolgt hierbei hauptsächlich über die starke Bindung zwischen den Integrinen und dem Zytoskelett. Inzwischen nutzten auch andere Arbeitsgruppen das Konzept der Tensegrity-Strukturen, um damit das Verhalten von Zellen zu beschreiben [34, 35, 242]. Alle Gruppen verwendeten dabei Modelle, die aus 24 Spannungs- (Aktin) und 6 Kompressionselementen (Mikrotubuli) aufgebaut sind.

7.2.2 Das Percolation-Modell

Das Percolation-Modell [63] geht nicht von der Bildung hierarchischer Strukturen aus, sondern von einer großen Anzahl an zufällig verteilten Strukturelementen, die im Wesentlichen durch die Aktinfilamente des Zytoskeletts dargestellt werden. Zur Ausbildung

eines Percolation-Netzwerkes werden zufällige Verbindungen zu den benachbarten Aktinfilamenten generiert, wozu jedoch eine gewisse Mindestkonzentration von Strukturelementen notwendig ist [63]. Das Percolation-Modell scheint die physiologischen Vorgänge der Zelle besser beschreiben zu können. Im Gegensatz zu den hochkomplexen Tensegrity-Strukturen wird nur wenig Zeit und Energie zum Umbau des Zytoskeletts benötigt. Das Percolation-Modell ermöglicht stetige Übergänge der mechanischen Eigenschaften von Zellen, die durch eine veränderte Anzahl an Querverbindungen zwischen den einzelnen Strukturelementen erfolgen. Auch die Percolation-Struktur steht unter einer internen Vorspannung. Diese wird allerdings überwiegend durch die Adhäsion der Zelle auf einem Substrat realisiert; vergleichbar einem Spinnensetz, das zur Aufrechterhaltung der Form einige Verbindungspunkte zur Umgebung benötigt. Das mechanische Verhalten eines zellulären Percolation-Netzwerks ist dem von Polymeren ähnlich.

7.2.3 Kortikale Membranmodelle / Kontinuumsansätze

Wird die Mikrostrukturierung nicht berücksichtigt, so spricht man von Kontinuumsmodellen, die beispielsweise ein homogenes Verhalten des Zytosols voraussetzen. So wurde zum Beispiel zu Beginn der siebziger Jahre vorgeschlagen, Erythrozyten durch eine viskose Flüssigkeit zu beschreiben, die von einer festen Schale umgeben ist. Die Arbeitsgruppe um Heidemann [95] erweiterte auf Grund der Ergebnisse ihrer Experimente ein solches kortikales Membranmodell auf ein „Drei-Schalen-Modell“, wie es zuvor schon beschrieben wurde [51]. Hierbei wird ein hochelastisches kortikales Zytoskelett angenommen, das sowohl die Elastizität der Zelle als auch ihre Fähigkeit, äußeren Kräften widerstehen zu können, beschreibt. Neben diesem Netzwerk wird im „Drei-Schalen-Modell“ auch der Kern als hochelastische Struktur beschrieben. Dieser ist von einer Gel-artigen, viskosen Flüssigkeit umgeben, deren Eigenschaften durch zytoplasmatische Mikrotubuli bestimmt werden. Bei diesen Betrachtungen wird das interne Zytoskelett nicht explizit berücksichtigt [1], es taucht lediglich implizit in den viskoelastischen Eigenschaften des Zytosols auf.

7.3 Analyse der Ergebnisse dieser Arbeit im Rahmen der Zellmodelle

In den folgenden Abschnitten werden die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen experimentellen Ergebnisse mit Hilfe der oben vorgestellten mathematischen Modelle diskutiert und der Versuch unternommen, die Zellmechanik auf dieser Basis genauer zu beschreiben.

7.3.1 Lokale Stimulation und Calciumantworten

Das Tensegrity-Modell scheint zunächst zur Erklärung der Zellmechanik ein sehr plausibler Ansatz zu sein, da die propagierten Eigenschaften der Aktinfilamente und der Mikrotubuli in verschiedenen Experimenten bestätigt werden konnten [224, 158]. Auf Grund der Eigenschaften eines solchen vorgespannten Tensegrity-Netzwerkes wäre bei einer an beliebiger Stelle erfolgenden Krafteinwirkung zu erwarten, dass sich die internen Spannungsverhältnisse des Zytoskeletts und die Morphologie der Zelle global ändern („action at a distance“).

Wäre der Mechanosensor tatsächlich im Bereich des Zytoskeletts oder der Adhäsionspunkte lokalisiert, so würde das für die Aktivierung der Mechanotransduktion bedeuten, dass diese unabhängig von der Art des mechanischen Reizes und vom Applikationsort initiiert werden würde. Dabei müssten die folgenden Signalkaskaden miteinander vergleichbar sein. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass lediglich Dehnungsreize eine verzögerte Calciumantwort auslösen, aber lokale Stimulationen mit dem Kraftmikroskop die intrazelluläre Calciumkonzentration nicht beeinflussen.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass die Kraftübertragung ausgehend von der stimulierten Zellmembran und dem darunter liegenden kortikalen Netzwerk zum internen Zytoskelett nur unzureichend stattfindet. Wie verschiedene Untersuchungen zeigten, richtet sich die Stärke der mechanischen Kopplung danach, ob die Zelle Adhäsionskomplexe zu einem Substrat ausbilden kann oder nicht. Fehlt den Zellen hierfür ein Bindungsparameter, wie zum Beispiel das Aktin-Bindungsprotein Vinculin, so kann lediglich eine schwache transmembrane Kopplung ausgebildet werden [235]. Dabei erfolgt der Aufbau der fokalen Adhäsionen zum einen über die Erhöhung der Zugspannung im Zytoskelett, zum anderen durch äußere, auf die Integrine übertragene Kräfte [189]. Folglich wäre die schwache mechanische Kopplung zwischen Membran und Zytoskelett auf der nicht-adhäsiven Seite eine Erklärung dafür, dass das interne Zytoskelett der Zelle durch lokale Stimulationen nicht beeinflusst und der Mechanosensor nicht aktiviert wird. Da jedoch vertikale Stimulationen durchgeführt wurden, die eine signifikante Deformation der Zelle verursachten, muss das interne Zytoskelett in jedem Fall beeinflusst worden sein, so dass nach der Tensegrity-Theorie eine Fernwirkung auf der Adhäsionsseite der Zelle zu erwarten gewesen wäre.

Auf Grund der oben genannten Aspekte scheint ein Kontinuumsansatz besser geeignet zu sein, um die Unterschiede zwischen lokaler Stimulation und Dehnungsreizen zu beschreiben. Kontinuumsmodelle sagen nämlich eine Abnahme der induzierten Deformation mit dem Abstand zum Stimulationsort voraus. Damit könnte auch der Unterschied zwischen globalen und lokalen Dehnungsreizen erklärt werden. Während globale Dehnungsreize bei 50% der Osteoblasten eine verzögerte Calciumantwort auslösten [221], waren lokale Dehnungsreize dazu nur in seltenen Fällen in der Lage (siehe Kapitel 6.4). Die lokalen Dehnungsreize scheinen also nicht zu einer globalen Beeinflussung der Zelle zu führen.

Des Weiteren können unter der Annahme eines viskosen Zytosols [101] auch die beobachteten viskoelastischen Effekte der Zellstimulation (siehe Kraftkurven 4.4.1) erklärt werden. Hierbei würden Deformationen der Zelle zu einer Verdrängung der zytosolischen Flüssigkeit durch das engmaschige Netzwerk des internen Zytoskeletts führen. An den Strukturen des Zytoskeletts treten auf Grund der relativ hohen Dichte der zytosolischen Flüssigkeit Scherkräfte auf, die zu einer Energie-Dissipation führen. Allerdings wird inzwischen versucht, auch das Tensegrity-Modell zur Beschreibung von viskoelastischen Effekten zu nutzen [21], indem den einzelnen Strukturelementen viskoelastische Eigenschaften zugeschrieben werden.

7.3.2 Kraft-Weiterleitung

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Krafttransmissions-Messungen (siehe Kapitel 6.6) zeigten, dass die Adhäsionsseite der Zelle durch lokale Stimulationen anders beeinflusst wird als durch Dehnungsreize. Im Folgenden werden jetzt diese Ergebnisse verwendet, um das zellmechanische Verhalten und die Gültigkeit der gängigen Zellmodelle zu evaluieren.

Wenn es sich bei Zellen um Tensegrity-Strukturen handeln würde, dann wären zwei Beobachtungen zu erwarten: zum einen müssten bei einem vorgespannten Zytoskelett schon kleine Kräfte ausreichen, um signifikante Änderungen der Adhäsionskräfte auf das Substrat zu bewirken, und zum anderen würden die resultierenden Substratkräfte über die gesamte Zelle verteilt auftreten („action at a distance“). Insbesondere letzteres stellt eine der wichtigsten Eigenschaften des Tensegrity-Modells dar. Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass das Substrat nur lokal beeinflusst wird und dementsprechend die lokale Stimulation nicht zu einer Änderung der internen Kräfteverhältnisse innerhalb des gesamten Zytoskeletts führt; ein Phänomen, das auch Heidemann und seine Mitarbeiter beobachteten [95]. Darüber hinaus führen erst sehr hohe Stimulationskräfte, die einem Druck von etwa $50\mathrm{N/m}^2$ entsprechen, zu signifikanten Änderungen der Substratkräfte. Bei einer Tensegrity-Struktur sollte jedoch, so lange das zellmechanische Verhalten einer Zelle nicht überwiegend durch andere mechanische Eigenschaften bestimmt wird, auf Grund der hohen Vorspannung schon bei kleineren Stimulationskräften eine Änderung der Adhäsionskräfte erkennbar werden.

Die lediglich lokale Kraft-Weiterleitung und die hohe Absorption der externen Deformationen sprechen dafür, dass die Zelle nicht hinreichend durch ein Tensegrity-Modell beschrieben werden kann. Ein Kontinuums-Modell oder ein Drei-Schalen-Modell könnte die beobachteten Phänomene besser erklären, da diese Modelle unter anderem das Zytoplasma als eine viskose Flüssigkeit und die Zellmembran und das kortikale Aktin-Netzwerk als einen elastischen Kortex ansehen. Eine lokale Deformation würde nur zu einer lokalen Beeinflussung der Zelle führen. Das Zytoskelett spielt zwar in diesen Modellen für die interne Krafterzeugung noch eine wichtige Rolle, allerdings ist die Art der internen Kraftweiterleitung grundlegend von der der Tensegrity-Strukturen verschieden und zum Teil auf das kortikale Aktin-Netzwerk beschränkt.

Die Krafttransmissions-Messungen zeigten unter Verwendung großer Stimulationskräfte, dass an den die Hauptachse begrenzenden Zellrändern hohe Zugspannungen auftreten (siehe Kapitel 6.6). Dieses Phänomen spricht zwar für eine Fernwirkung des Zytoskeletts bei der Kraftweiterleitung und damit für Tensegrity-Eigenschaften der Zelle, allerdings kann es auch auf zelldurchspannende Aktin-Bündel, die entlang der Hauptachse im kortikalen Aktin-Netzwerk liegen, zurückzuführen sein. Solche Aktinfasern könnten die hochelastischen Eigenschaften der kortikalen Membran in einem „Drei-Schalen-Modell“ symbolisieren. Ihre Deformation würde die Länge der Fasern im Verhältnis zur Länge der Zelle verkleinern, so dass an den Adhäsionspunkten, an denen die Aktinfilamente verankert sind, eine zusätzliche Übertragung von Zugkräften auf das Substrat erfolgen würde. Allerdings müsste unter der Annahme einer hochelastischen Schale dieses Phänomen auch schon bei kleinen Deformationen auftreten, es sei denn, die Schale besitzt außerdem gewisse viskoelastische Eigenschaften.

Die Richtung der Substratkräfte Durch die Applikation von kleinen Stimulationskräften waren auf der Adhäsionsseite vor allem nach außen gerichtete Zugkräfte zu beobachten. Dieses Verhalten könnte durch fluide Eigenschaften des Zytoplasmas beschrieben werden, das von einer elastischen Schale, der Zellmembran, umgeben ist. Durch die Erhaltung des Zellvolumens bei dessen gleichzeitiger Kompression durch äußere Kräfte würde das Zytoplasma nach außen gedrängt, so dass der Druck auf die innere Zellmembran in den Zellrandbereich verstärkt werden würde. Die dort lokalisierten Adhäsionspunkte würden somit auf das Substrat eine nach außen gerichtete Kraft übertragen. Auch mit Hilfe des Tensegrity-Modells kann dieses Verhalten beschrieben werden: durch die Deformation der Zelle wird das Zytoskelett ähnlich der initialen Adhäsion einer Zelle abgeflacht. Bei diesem Prozess werden zum einen die intrinsischen Zugspannungen des Zytoskeletts erhöht (bei der Adhäsion durch die aktive Kraftgenerierung des Aktin-Myosin-Komplexes). In der Folge würden höhere, nach innen gerichtete Zugkräfte auf das Substrat übertragen. Zum Anderen würde durch die Abflachung des Zytoskeletts dessen laterale Ausdehnung und damit die Auflagefläche auf dem Substrat vergrößert. Allerdings könnte sich hierbei die Adhäsionsfläche der Zelle durch die „feste“ Anordnung der Adhäsionspunkte nicht sofort ändern, so dass an den Adhäsionspunkten nach außen gerichtete Kräfte auftreten würden. Die beiden beschriebenen Effekte konkurrierten miteinander. Dabei würden die nach außen gerichteten Kräfte dominieren, so lange keine neuen Adhäsionen gebildet worden sind.

Erhöht man die externe Deformation weiter, so treten an den Zellrändern fast ausschließlich nach innen gerichtete Kraftvektoren auf, während die Kraftvektoren am Ort der Deformation überwiegend nach außen zeigen. Zur Erklärung dieser Kräfte könnte das Tensegrity-Modell eingesetzt werden, sofern der Tensegrity-Struktur nur lokale Wirkungen zuzuschreiben wären. Die zusätzlich nach innen zeigenden Kräfte an den Zellrändern sprechen zwar für eine Fernwirkung wie von Tensegrity-Strukturen erwartet, die Richtung der Substrat-Kräfte ist allerdings damit nicht vereinbar. Betrachtet man die Beobachtung unter Zuhilfenahme eines kortikalen Membranmodells mit zelldurchspannenden Aktinfasern, so könnte zwar die Richtung der beobachteten Kräfte erklärt werden, allerdings müsste hier auch bei kleineren Kräften dieses Verhalten auftreten oder es müssten der Schale viskoelastische Eigenschaften bis zu einem gewissen Grad zugesprochen werden. Eine Alternative, die nach innen gerichteten Kraftvektoren zu erklären, bietet das Percolation-Modell: durch die lokale Deformation des internen Zytoskeletts würden dabei ab einer bestimmten äußeren Kraft die hervorgerufenen Deformationen durch das gesamte Zytoskelett weitergeleitet. Ähnlich zu den Aktinfasern käme es entlang der Längsachse zu einer scheinbaren Verkürzung und damit zu nach innen gerichteten Kräften.

7.3.3 Aktive Zellantworten unter mechanischer Stimulation

Die Experimente aus Kapitel 6.5.2 zeigten, dass die externe lokale Stimulation bei Osteoblasten Zugkraftänderungen hervorruft. Unter der Annahme, dass es sich dabei um aktive Prozesse handelt, die durch Motorproteine wie Myosin und Kinesin bestimmt werden, können diese Zugkraftänderungen mit keinem der gängigen Modelle beschrieben werden.

Nur spontane Zugkraftänderungen, die direkt nach der Stimulation beobachtet wurden, können mittels Tensegrity-Strukturen ansatzweise erklärt werden: der Bruch oder die Wegnahme von Mikrotubuli würde zu einer erhöhten Zugkraft der Zelle auf das Substrat führen.

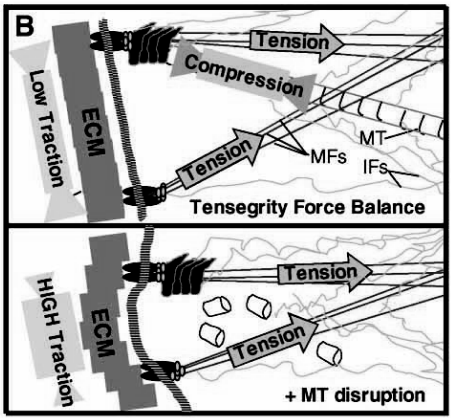

Abbildung 65: *Schematische Darstellung der zellulären Zugkräfte auf ein Substrat. Die einzelnen Strukturen des Zytoskeletts stehen dabei in einem Kräftegleichgewicht (MT: Mikrotubuli; MF: Mikro-(Aktin-)filamente; IF: Intermediärfilamente). Oberes Bild: Tensegrity-Struktur mit Mikrotubuli. Unteres Bild: Tensegrity-Struktur ohne Mikrotubuli. Durch die Wegnahme der Kompressions-widerstehenden Struktur werden die Substratkräfte erhöht (aus [116]).*

Dieser Mechanismus ist in Abbildung 65 schematisch dargestellt. Hier wird deutlich, dass durch die Interaktion von Mikrotubuli und Aktin-Filamenten ein Kräfte-Gleichgewicht im Zytoskelett hergestellt wird, das durch die über fokale Adhäsionen vermittelte Kopplung zur extrazellulären Matrix zu einer bestimmten Zugkraft auf das Substrat führt. Durch die Wegnahme der Kompressions-widerstehenden Struktur - des Mikrotubulis - kommt es zu einer Erhöhung der zellulären Substratkräfte. Hierdurch könnte erklärt werden, warum die mechanische Stimulation von Osteoblasten zu erhöhten Zugkräften führt, ohne dabei eine aktive Kraftgenerierung durch den Aktin-Myosin-Komplex anzunehmen. Im Gegensatz dazu könnte das durch die Stimulation verursachte Abreißen der Spannungs-widerstehenden Strukturen, also der Aktin-Filamente, zu einer Verringerung der Adhäsionskräfte führen. Diese Hypothese erhält weitere Unterstützung durch die Betrachtung der vor der Stimulation auf das Substrat übertragenen initialen Zugkräfte der Zellen. Waren die Zugkräfte der Zellen im Vergleich der Experimente zunächst gering, kam es durch die Stimulation zu einer Erhöhung der Adhäsionskräfte. Dabei könnten die geringen initialen Zugkräfte daher rühren, dass entweder das Aktin-Netzwerk lediglich unter einer geringen Vorspannung stand oder die Mikrotubuli auf Grund ihrer Anordnung im Zytoskelett den größten Teil der internen Zugspannungen „absorbiert“ haben. Durch letzteres stünden die Mikrotubuli unter sehr hohen kompressiven Kräften. Induzierte man nun zusätzlich von außen weitere Kräfte in das Zytoskelett, so könnte es zum Bruch der Mikrotubuli kommen und die Zugkräfte auf das Substrat könnten dadurch spontan erhöht werden. Dementsprechend stünden in Zellen mit hohen initialen Zugkräften die Aktin-Fasern der Tensegrity-Struktur unter hohen Zugkräften, so dass eine weitere Belastung zu deren Abreißen führte und dadurch eine instantane Verringerung der zellulären Zugkräfte zu beobachten wäre.

7.4 Vorschlag eines Mischmodells

7.4.1 Kein Modell beschreibt das zellmechanische Verhalten vollständig

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass keines der bisher bekannten Modelle die Zellmechanik vollständig beschreibt. Damit stellt sich die Frage, wie ein zellmechanisches Modell prinzipiell aufgebaut sein müsste, um die Zelle korrekt zu beschreiben.

7.4.2 Das Mischmodell

Die experimentellen Ergebnisse legen nahe, dass die mechanischen Eigenschaften der einzelnen Zellbestandteile durch unterschiedliche Modelle zusammengefasst in einem Mischmodell beschrieben werden müssen.

In dem hier skizzierten Mischmodell wird angenommen, dass sich das interne Zytoskelett wie eine Tensegrity-Struktur mit gewissen viskoelastischen Eigenschaften verhält. Diese werden zusätzlich durch ein die Hohlräume des Zytoskeletts durchdringendes viskoses Zytosol determiniert. Die komplette Struktur ist von einer elastischen Schale umgeben.

Appliziert man nun - wie in Kapitel 6.6 beschrieben - auf die äußere Zellmembran kleine Kräfte, so erfährt diese eine lokale Verformung. Hierbei wird möglicherweise auch das kortikale Netzwerk lokal deformiert, jedoch ohne dabei die zelldurchspannenden Aktinfasern signifikant zu beeinflussen. Des Weiteren ist die Verdrängung des Zytosols unterhalb des Cantilevers minimal, so dass insgesamt keine zusätzlichen Kräfte auf das Substrat übertragen werden.

Erst nach der Erhöhung der applizierten Kraft, in deren Folge der äußere Druck auf die Zelle steigt, ist eine Veränderung der auf das Substrat übertragenen Kräfte zu verzeichnen (siehe Kapitel 6.6.2). Nun wird das interne Zytoskelett im Bereich der Stimulation deformiert, so dass die Tensegrity-Eigenschaften des Zytoskeletts in nach außen gerichteten Kräften sichtbar werden (siehe Abbildung 58). Die Deformation des internen Zytoskeletts ist dabei auf Grund der viskoelastischen Eigenschaften lokal begrenzt. Gleichzeitig wird durch die Deformation der Zelle das Zytosol aus dem Bereich der Stimulation verdrängt. In der Folge treten an den Zellrändern nach außen gerichtete Kräfte auf, die aus der Volumenerhaltung resultieren (siehe Abbildung 57). Neben dem eben Beschriebenen führt die erhöhte Deformation der Zellschale zur relativen Verkürzung der Aktinfasern und damit auf dem Substrat zu nach innen gerichteten Zugkräften (siehe Abbildung 57). Hierbei ist, auf Grund der zum Teil viskoelastischen Eigenschaften der Aktinfasern beziehungsweise deren Kopplung an das interne Zytoskelett, die Kraftweiterleitung an die Zellränder und die hier lokalisierten Adhäsionspunkte lokal begrenzt. Da die Verdrängung des Zytosols und die Verkürzung der Aktinfasern miteinander konkurrieren, werden die in der Summe auf das Substrat wirkenden Gesamt-Zugkräfte nicht verändert (siehe Kapitel 6.6.2).

Erhöht man die applizierte Kraft noch weiter, treten charakteristische mechanische Eigenschaften der Zelle in den Vordergrund: zum einen führt die erhöhte Deformation des internen Zytoskeletts im Bereich der Stimulation zu noch größeren nach außen gerichteten Kräften (siehe Abbildung 59). Zum anderen werden die Aktinfasern des kortikalen Netzwerks unter eine höhere Spannung gesetzt, so dass auch an den die Längsachse der Zelle

begrenzenden Zellrändern nach innen gerichtete Kräfte generiert werden (siehe Abbildung 59). Auf Grund der Deformationstiefe ist hierbei die Verdrängung des viskosen Zytosols aus dem Bereich der Stimulation fast vollständig abgeschlossen und spielt deshalb nur noch eine untergeordnete Rolle.

Es sind jedoch weiterführende Experimente notwendig, um das skizzierte Modell zu evaluieren und zu verbessern. Hierbei kann eine tiefergehende Analyse der zellulären Vorgänge mittels molekularer Techniken zur Inhibition einzelner Zellprozesse weiteren Einblick gewährleisten. Allerdings spricht vieles dafür, dass eine physiologische Beschreibung der Zelle nur durch die dargestellte oder eine ähnliche Kombination der momentan diskutierten Modelle zu erreichen ist.

8 Zusammenfassung und Ausblick

Die vorliegende Doktorarbeit wurde durch die interdisziplinäre Zusammenarbeit der Fachbereiche Physik und Medizin der Philipps-Universität Marburg sowie dem Institut für Werkstoffe und Nanoelektronik in Bochum realisiert. Ziel der Arbeit war es, zelluläre Vorgänge im Knochen zu analysieren und damit das Verständnis des krankhaften Knochenschwundes, der Osteoporose, auf makroskopischer Ebene zu vertiefen. Hierbei stand die Untersuchung der Mechanotransduktion von Osteoblasten mit Hilfe der Rasterkraft- und Zugkraftmikroskopie, sowie diverser Methoden der Fluoreszenzmikroskopie im Mittelpunkt. Mittels dieser Techniken konnten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Rezeption mechanischer Reize auf zellulärer Ebene sowohl aus biologischer, als auch aus physikalischer Sicht gewonnen werden. Darüber hinaus wurde das zellmechanische Verhalten unter äußeren Kräften analysiert und auf der Basis der hierbei gewonnenen experimentellen Ergebnisse ein neues zellmechanisches Modell postuliert.

Um die gezielte mechanische Stimulation einzelner Knochenzellen zu ermöglichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit ein dreidimensionales Kraftmikroskop, sowie eine neue Beleuchtungsquelle für Verhältnismessungen mit Fluoreszenzfarbstoffen entwickelt. Durch die Weiterentwicklung der Zugkraft-Mikroskopie konnte ein tieferer Einblick in das zellmechanische Verhalten unter externen Belastungen gewährt werden.

Wie frühere Untersuchungen der Mechanotransduktion in Osteoblasten zeigten, wird nach Applikation von Scherflüssen und Dehnungsreizen ein spezieller Mechanotransduktionsweg initiiert, der eine verzögerte Calciumantwort vermittelt durch die Aktivierung der Phospholipase C (PLC) hervorruft. In dieser Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass die lokale Stimulation von Osteoblasten mit dem Kraftmikroskop - unabhängig von den Stimulationsparametern Frequenz, Amplitude und Zyklenanzahl - keine Calciumantworten auslöst. Weder die Aktivierung der PLC, noch das Öffnen mechanosensitiver Ionenkanäle waren zu beobachten. Ein spezieller Mechanosensor, der für die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentation verantwortlich sein könnte, wird also durch die lokale Stimulation nicht beeinflusst.

Beide Stimulationsarten - Dehnungsreize und lokale Stimulationen mit dem Kraftmikroskop - haben gemeinsam, dass sie eine spontane Änderung der auf ein Substrat übertragenen zellulären Adhäsionskräfte von Osteoblasten hervorrufen. Die lokalen Stimulationen verursachen darüber hinaus einen langsamen Anstieg oder Abfall der zellulären Adhäsionskräfte. Insgesamt sind die aktiven Zellantworten von der intrazellulären Calciumkonzentration unabhängig.

Die Ergebnisse der Calcium- und Zugkraftmessungen zeigten, dass durch äußere Belastungen verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden und damit möglicherweise unterschiedliche Mechanosensoren der Zelle aktiviert werden können. Hierbei hängt die zelluläre Reaktion von der Art des mechanischen Reizes ab. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Aktivierung der zellmechanischen Antworten und in Folge die Art einer speziellen Mechanotransduktion von der Frequenz der lokalen Stimulation abhängig ist - ein Phänomen, das auch bei der Stimulation von Knochenfragmenten beobachtet werden konnte.

Um zu klären, warum die zelluläre Antwort der Osteoblasten auf unterschiedliche me-

chanische Reize variiert, wurde die Kraftweiterleitung innerhalb der Zelle mit Hilfe von Zugkraftmessungen bestimmt. Während Dehnungsreize die Adhäsionsseite der Zelle global beeinflussen, sind lokale Reize dazu nur bedingt in der Lage. Die Vermutung, dass ein Mechanosensor in der Nähe der Adhäsionspunkte oder des Zytoskeletts lokalisiert ist, erhält damit weitere Bestätigung und liefert eine Erklärung für das beobachtete Phänomen der divergierenden Zellantworten. Schlussendlich spielt vermutlich für die Induzierung der Knochensynthese die direkte Übertragung der Knochendeformation auf die Knochenzellen eine wichtige Rolle, während der durch hydrostatischen Druck verursachte Flüssigkeitsfluss in den Knochenkanälchen zu vernachlässigen ist.

Da die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit den gängigen zellmechanischen Modellen widersprechen, wird in dieser Arbeit ein kombiniertes zellmechanisches Modell postuliert, dass das physiologische Verhalten der Zelle besser beschreibt. Jedoch ist die weitere Erforschung der Mechanotransduktion zum Verständnis der Knochensynthese eminent wichtig und es sollte mit weiterführenden Experimenten an die Ergebnisse dieser Arbeit angeknüpft werden. Im Vordergrund steht dabei die Weiterentwicklung des Kraftmikroskops zu einem System, das Experimente in Kombination mit der konfokalen Mikroskopie ermöglicht. Eine solche Apparatur könnte dazu dienen, mit Hilfe von Transfektionstechniken die Morphologie der Zellen unter mechanischer Stimulation zu beobachten und auf diesem Weg eine weiterführende Analyse der zellmechanischen Prozesse ermöglichen. Es bleibt zu hoffen, dass die Fortführung dieser interdisziplinären Forschung in naher Zukunft neue Ansätze zur Therapie des krankhaften Knochenschwundes hervorbringt.

Literatur

[1] Albrecht-Buehler, G. *Cell Motil Cytoskeleton*, 7:54–67, 1987.

[2] Arnold, M., Cavalcanti-Adam, E., Glass, R., Bluemmel, J., Eck, W., Kantlehner, M., Kessler, H., and P. Spatz, J. *ChemPhysChem*, 5:383–388, 2004.

[3] Arslan, P., Di Virgilio, F., and Beltrame, M. *J Biol Chem*, 260:2719–2729, 1985.

[4] Bacabac, R., Smit, T., Cowin, S., Van Loon, J., Nieuwstadt, F., Heethaar, R., and Klein-Nulend, J. *J Biomech*, 38:159–167, 2005.

[5] Balaban, N., Schwarz, U., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., and Geiger, B. K. *Nat Cell Biol*, 3:466–472, 2001.

[6] Baumgart, T., Hess, S., and Webb, W. *Nature*, 425:821–824, 2003.

[7] Bausch, A., Moeller, W., and Sackmann, E. *Biophys J*, 76:573–579, 1999.

[8] Becker, P. and Fay, F. *Am J Physiol*, 253:C613–C618, 1987.

[9] Beningo, K., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J., and Wang, Y. *J Cell Biol*, 153:881–888, 2001.

[10] Berlin, J. and Konishi, M. *Biophys J*, 65:1632–1647, 1993.

[11] Berridge, M., Lipp, P., and Bootman, M. *Curr Biol*, 9:R157–R159, 1999.

[12] Berridge, M. *Nature*, 316:315–325, 1993.

[13] Berridge, M. *Nature*, 386:759–760, 1997.

[14] Berridge, M., Bootman, M., and Lipp, P. *Nature*, 395:645–648, 1998.

[15] Binnig, G., Quate, C., and Gerber, C. *Phys Rev Lett*, 56:930–933, 1986.

[16] Block, S., Goldstein, L., and Schnapp, B. *Nature*, 348:348–352, 1990.

[17] Boitano, S., Dirksen, E., and Sanderson, M. *Science*, 258:292–295, 1992.

[18] Brinkmann, M., Oliver, D., and Thurm, U. *Journal Of Comparative Physiology A-Sensory Neural And Behavioral Physiology*, 178:125–138, 1996.

[19] Burton, K., Park, J., and Taylor, D. *Molecular Biology of the Cell*, 10:3745–3769, 1999.

[20] Burton, K. and Taylor, D. *Nature*, 385:450–454, 1997.

[21] Canadas, P., Laurent, V., Oddou, C., Isabey, D., and Wendling, S. *J Theor Biol*, 218:155–173, 2002.

[22] Charras, G. and Horton, M. *Biophys J*, 83:858–879, 2002.

[23] Charras, G. and Horton, M. *Biophys J*, 82:2970–2981, 2002.

[24] Chen, N., Ryder, K., Pavalko, F., Turner, C., Burr, D., Qiu, J., and Duncan, R. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278:C989–C997, 2000.

[25] Chicurel, M., Singer, R., Meyer, C., and Ingber, D. *Nature*, 392:730–733, 1998.

[26] Chiquet, M. *Matrix Biol*, 18:417–426, 1999.

[27] Clapham, D. *Cell*, 80:259–268, 1995.

[28] Clausen-Schaumann, H., Rief, M., Tolksdorf, C., and Gaub, H. *Biophys J*, 78:1997–2007, 2000.

[29] Cleveland, J., Manne, S., Bocek, D., and Hansma, P. *Rev of Sci Instruments*, 64:403–405, 1993.

[30] Collinsworth, A., Torgan, C., Nagda, S., Rajalingam, R., Kraus, W., and Truskey, G. *Cell Tissue Res*, 302:243–251, 2000.

[31] Corey, D. *Nat Rev Neurosci*, 2:387–396, 2001.

[32] Corey, D. *Neuron*, 39:585–588, 2003.

[33] Corey, D. and Hudspeth, A. *J Neurosci*, 3:962–976, 1983.

[34] Coughlin, M. and Stamenovic, D. *ASME J Biomech Eng*, 120:770–777, 1998.

[35] Coughlin, M. and Stamenovic, D. *ASME J Biomech Eng*, 120:770–777, 1998.

[36] Coughlin, M. and Stamenovic, D. *Biophys J*, 84:1328–1336, 2003.

[37] Craig, V., Hyde, A., and Pashley, R. *Langmuir*, 12:3357, 1996.

[38] Craig, V. *Rev of Sci Instruments*, 74:4026–4032, 2003.

[39] Curtze, S., Dembo, M., Miron, M., and Jones, D. *J Cell Sci*, 117:2721–2727, 2004.

[40] Danciua, T., Adamb, R., Narusec, K., Freemanb, M., and Hauschkaa, P. *FEBS Letters*, 536:193–197, 2003.

[41] Davidson, R., Tatakis, D., and Auerbach, A. *Pflugers Arch*, 416:646–651, 1990.

[42] Davies, P., Barbee, K., Volin, M., Robotewskyj, A., Chen, J., Joseph, L., Griem, M., Wernick, M., Jacobs, E., Polacek, D., dePaola, N., and Barakat, A. *Annu Rev Physiol*, 59:527–549, 1997.

[43] Davies, P., Shi, C., Depaola, N., Helmke, B., and Polacek, D. *Ann NY Acad Sci*, 947:7–17, 2001.

[44] Dembo, M., Oliver, T., Ishihara, A., and Jacobson, K. *Biophys J*, 70:2008–2022, 1996.

[45] Dembo, M. and Wang, Y. *Biophys J*, 76:2307–2316, 1999.

[46] Dewey, C., Bussolari, S., Gimbrone, M., and Davies, P. *J Biomech Eng*, 103:177–185, 1981.

[47] Dobnig, H. and Turner, R. *Endocrinology*, 136:3632–3638, 1995.

[48] Dolmetsch, R., Lewis, R., Goodnow, C., and Healy, J. *Nature*, 386:855–858, 1997.

[49] Donahue, H. *Bone*, 26:417–422, 2000.

[50] Donahue, S., Jacobs, C., and Donahue, H. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281:C1635–C1641, 2001.

[51] Done, C., Skalag, R., and Sung, K. *Biorheol*, 28:557–567, 1991.

[52] Doty, S. *Calcif Tissue Int*, 33:509–512, 1981.

[53] Doyle, A., Marganski, W., and Lee, J. *J Cell Sci*, 117:2203–2214, 2004.

[54] Doyle, A. and Lee, J. *Nature*, 400:382–386, 2002.

[55] Duncan, R. and Misler, S. *FEBS Lett*, 251:17–21, 1989.

[56] Duncan, R. and Turner, C. *Calcif Tissue Int*, 57:344–358, 1995.

[57] Efron, B. and Tibishirani, R. *Statistical Science*, 1:54–77, 1986.

[58] Elson, E., Felder, S., Jay, P., Kolodney, M., and Pasternak, C. *Biochem Soc Symp*, 65:299–314, 1999.

[59] Fang, H., Chan, K.-Y., and Xu, L.-C. *Journal of Microbiological Methods*, 40:89–97, 2000.

[60] Feiler, A., Attard, P., and I., L. *Rev of Sci Instruments*, 71:2746–2750, 2000.

[61] Feneberg, W., Aepfelbacher, M., and Sackmann, E. *Biophys J*, 87:1338–1350, 2004.

[62] Flanagan, L., Ju, Y., Marg, B., Osterfield, M., and Janmey, P. *Neuroreport*, 13:2411–2415, 2002.

[63] Forgacs, G. *Journal of Cell Science*, 108:2131–2143, 1995.

[64] Frame, M. and de Feijter, A. *Exp Cell Res*, 230:197–207, 1997.

[65] Fritton, S., McLeod, K., and Rubin, C. *J Biomech*, 2:317–325, 2000.

[66] Frost, H. *Clin Orthop*, 200:198–225, 1983.

[67] Frost, H. *Anat Rec*, 219:1–9, 1987.

[68] Fujimori, A., Cheng, S., Avioli, L., and Civitelli, R. *Endocrinilogy*, 128:3032–3039, 1991.

[69] Fuller, B. *Portfolio Artnews Annual*, 4:112–127, 1961.

[70] Galbraith, C. and Sheetz, M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:9114–9118, 1997.

[71] Galbraith, C., Yamada, K., and Sheetz, M. *J Cell Biol*, 159:695–705, 2002.

[72] Gao, M., Craig, D., Lequin, O., Campbell, I., Vogel, V., and Schulten, K. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:14784–14789, 2003.

[73] Gao, M., Craig, D., Vogel, V., and Schulten, K. *J Mol Biol*, 323:939–950, 2002.

[74] Gardel, M., Shin, J., MacKintosh, F., Mahadevan, L., Matsudaira, P., and Weitz, D. *Phys Rev Lett*, 29:188102, 2004.

[75] Gaudet, C., Marganski, W., Kim, S., Brown, C., Gunderia, V. Dembo, M., and Wong, J. *Biophys J*, 85:3329–3353, 2003.

[76] Geiger, B. and Bershadsky, A. *Curr Opin Cell Biol*, 13:584–592, 2001.

[77] Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2:793–805, 2001.

[78] Giannone, G., Jiang, G., Sutton, D., Critchley, D., and Sheetz, M. *J Cell Biol*, 163:409–419, 2003.

[79] Gibson, C., Watson, G., and Myhra, S. *Nanotechnology*, 7:259–262, 1996.

[80] Giessibl, F. *Science*, 267:68–71, 1995.

[81] Gillespie, G. Y., Soroceanu, L., Manning Jr., T., Gladson, G., and Rosenfeld, S. *Cancer Res*, 59:2076–2082, 1999.

[82] Gilmore, A. and Burridge, K. *Nature*, 373:197, 1995.

[83] Glogauer, M., Arora, P., Yao, G., Sokholov, I., Ferrier, J., and McCulloch, C. *J Cell Sci*, 110:11–21, 1997.

[84] Glogauer, M., Ferrier, J., and McCulloch, C. *Am J Physiol Cell Physiol*, 269:C1093–C1104, 1995.

[85] Grimellec, C., Lesniewska, E., Giocondi, M.-C., Finot, E., Vie, V., and Goudonnet, J.-P. *Biophys J*, 75:695–703, 1998.

[86] Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. *J Biol Chem*, 260:3440–3450, 1985.

[87] Guharay, F. and Sachs, F. *J Physiol Lond*, 352:685–701, 1984.

[88] Gullingsrud, J. and Schulten, K. *Biophys J*, 85:2087–2099, 2003.

[89] Hamill, O. *Physiol Rev*, 81:685–740, 1984.

[90] Han, Y., Cowin, S., Schaffler, M., and Weinbaum, S. *PNAS*, 101:16689–16694, 2004.

[91] Hansma, H. and Hoh, J. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 23:115–139, 1994.

[92] Harris, A., Wild, P., and Stopak, D. *Science*, 208:177–179, 1980.

[93] Haskins, J. and Moss, R. *Brain Res Bull*, 7:479–485, 1981.

[94] Haydon, P., Lartius, R., Parpura, V., and Marchese-Ragona, S. *J.Microsc.*, 182:114–120, 1996.

[95] Heidemann, S., Lamoureux, P., Buxbaum, R., and Ingber, D. *J Appl Physiol*, 89:1670–1678, 1999.

[96] Helmke, B. and Davies, P. *Ann Biomed Eng*, 30:284–296, 2002.

[97] Helmke, B., Rosen, A., and Davies, P. *Biophys J*, 84:2691–2699, 2003.

[98] Helmke, B., Thakker, D., Goldman, R., and Davies, P. *Biophys J*, 80:184–194, 2001.

[99] Hert, J. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 1:465–476, 1990.

[100] Hertz, H. *J Reine Angew Math*, 92:156–171, 1881.

[101] Heuser, J. and Kirschner, M. *J Cell Biol*, 86:212–234, 1980.

[102] Himpens, B., Stalmans, P., Gomez, P., Malfait, M., and Vereecke, J. *FASEB J*, 13:S63–S68, 1999.

[103] Hinkle, P., Kinsella, P., and Osterhoudt, K. *J Biol Chem*, 262:16333–13337, 1987.

[104] Hinkle, P., Shanshala, E., and Nelson, E. *J Biol Chem*, 267:25553–25559, 1992.

[105] Hoberg, M., Gratz, H.-H., Noll, M., and Jones, D. *Biochem Biophys Res Comm*, 333:142–159, 2005.

[106] Hoyer, J., Koehler, R., and Distler, A. *FASEB J*, 12:359–366, 1998.

[107] Hu, S., Chen, J., Fabry, B., Numaguchi, Y., A., G., Ingber, D., Fredberg, J., Butler, J., and Wang, N. *Am J Physiol Cell Physiol*, 285:C1082–C1090, 2003.

[108] Huang, H., Dong, C., Kwon, H., Sutin, J., Kamm, R., and So, P. *Biophys J*, 82:2211–2223, 2002.

[109] Huang, H., Kamm, R., and Lee, R. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287:C1–C11, 2004.

[110] Hung, C., Allen, F., Pollack, S., and Brighton, C. *J Biomech*, 29:1411–1417, 1996.

[111] Hutter, J. and Bechhoefer, J. *Rev of Sci Instruments*, 64:1868–1873, 1993.

[112] Hynes, R. *Cell*, 48:549–554, 1987.

[113] Ingber, D. *Current Opinion Cell Biology*, 3:841–848, 1991.

[114] Ingber, D. *J Cell Sci*, 104:613–627, 1993.

[115] Ingber, D. *Annu Rev Physiol*, 59:575–599, 1997.

[116] Ingber, D. *Ann Med*, 35:564–577, 2003.

[117] Ingber, D., Heidemann, S., Lamoureux, P., and Buxbaum, R. *J Appl Physiol*, 89:1670–1678, 2000.

[118] Jacobs, C., Yellowley, C., Davis, B., Zhou, Z., Cimbala, J., and Donahue, H. *J Biomech*, 31:969–976, 1998.

[119] Janmey, P. *Physiol Rev*, 78:763–781, 1998.

[120] Janmey, P., Shah, J., Janssen, K., and Schliwa, M. *Subcell Biochem*, 31:381–397, 1998.

[121] Janmey, P. and Weitz, D. *Trends in Biochem Sci*, 29:364–370, 2004.

[122] Jay, P., Pham, P., Wong, S., and Elson, E. *J Cell Sci*, 108:387–393, 1995.

[123] Jones, D. and Bingmann, D. *Cells And Materials*, 1:329–340, 1991.

[124] Jones, D., Leivseth, G., and Tenbosch, J. *Cell Biology-Biochimie Et Biologie Cellulaire*, 73:525–534, 1995.

[125] Jones, D., Leivseth, G., Sawada, Y., van der Sloten, J., and Bingmann, D. *Society for Experimental Biology*, pages 197–219, 1993.

[126] Junquiera, L. and Carneiro, J. *Histologie*. Springer Verlag, 1996.

[127] Kacher, C. M., Weiss, I. M., Stewart, R. J., Schmidt, C. F., Hansma, P. K., Radmacher, M., and Fritz, M. *Eur Biophys J*, 28:611–620, 2000.

[128] Karcher, H., Lammerding, J., Huang, H., Lee, R., Kamm, R., and Kaazempur-Mofrad, M. *Biophys J*, 85:3336–3349, 2003.

[129] Kim, Y., Dirksen, E., and Sanderson, M. *Am J Physiol*, 265:C1306–C1318, 1993.

[130] Klopp, E., Graff, D., Struckmeier, J., Born, M., Curtze, S., Hofmann, M., and Jones, D. *J Gravitational Phys*, 9:269–270, 2002.

[131] Krim, J., Solina, D., and Chiarello, R. *Phys Rev Lett*, 66:181–184, 1991.

[132] Lal, R. and John, S. *Am J Physiol*, 266:C1–C21, 1994.

[133] Lal, R. and Lin, H. *Microsc Res Tech*, 52:273–288, 2001.

[134] Landau, L. and Lifshitz, E. *Pergamon Press, Oxford, UK*, 7, 1986.

[135] Lanyon, L. *J Biomech*, 20:1083–1093, 1987.

[136] Lanyon, L. and Rubin, C. *J Biomech*, 17:897–905, 1984.

[137] Larsson, D., Larsson, B., Lundgren, T., and Sundell, K. *Analytical Chemistry*, 273:60–65, 1999.

[138] Lauffenburger, D. and Horwitz, A. *Cell*, 84:359–369, 1996.

[139] Lee, J., Ishihara, A., Oxford, G., Johnson, B., and Jacobson, K. *Nature*, 400:382–386, 1999.

[140] Lee, J., Leonard, M., Oliver, T., Ishihara, A., and Jacobson, K. *J Cell Biol*, 127:1957–1964, 1994.

[141] Lehenkari, P., Charras, G., Nykanen, A., and Horton, M. *Ultramicroscopy*, 82:289–295, 2000.

[142] Lehenkari, P. and Horton, M. *Biochem Biophys Res Commun*, 259:645–650, 1999.

[143] Lehoux, S. and Tedgui, A. *J Biomech*, 36:631–643, 2003.

[144] Li, Y., Hu, Z., and Li, C. *J Appl Polymer Sci*, 50:1107–1111, 1993.

[145] Liu, S., Calderwood, D., , and Ginsberg, M. *J Cell Sci*, 113:3563–3571, 2000.

[146] Lo, C., Wang, H., Dembo, M., and Wang, Y. *Biophys J*, 79:144–152, 2000.

[147] Malek, A. and Izumo, S. *J Biomech*, 28:1515–1528, 1995.

[148] Malek, A. and Izumo, S. *J Cell Sci*, 109:713–726, 1996.

[149] Maniotis, A., Chen, C., and Ingber, D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:849–854, 1997.

[150] Marganski, W., Dembo, M., and Wang, Y. *Methods Enzymol*, 361:197–211, 2003.

[151] Mathies, R. and Stryer, L. *Applications of Fluorescence in the Biomedical Sciences, New York: Liss*, pages 129–140, 1986.

[152] Mathur, A., Truskey, G., and Reichert, W. *Biophys J*, 78:1725–1735, 2000.

[153] Maxwell, C. and Hendzel, M. *Biochem Cell Biol*, 79:267–274, 2001.

[154] Mazzag, B., Tamaresis, J., and Barakat, A. *Biophys J*, 84:4087–4101, 2003.

[155] Meldolesi, J. *Nature*, 392:863–866, 1998.

[156] Merrit, J., Ron, J., and Hallam, T. *J Biol Chem*, 264:1522–1527, 1989.

[157] Miller, R. *Science*, 235:46–52, 1987.

[158] Mizushima-Sugano, J., Maeda, T., and Miki-Noumura, T. *Biochim Biophys Acta*, 755:257–262, 1983.

[159] Morey, E. and Baylink, D. *Science*, 201:1138–1141, 1978.

[160] Morris, C. *J Membrane Biol*, 113:93–107, 1990.

[161] Munevar, S., Wang, Y.-L., and Dembo, M. *Biophys J*, 80:1744–1757, 2001.

[162] Murphy, R., Cherny, V., Morgan, D., and deCoursey, T. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288:L398–L408, 2005.

[163] Neher, E. and Augustine, G. *J Physiol*, 450:273–301, 1992.

[164] Neidlinger-Wilke, C., Grood, E., Wang, J.-C., Brand, R., and Claes, L. *J Orhtop Res*, 19:286–293, 2001.

[165] Newman, E. and Zahs, K. *Science*, 275:844–847, 1997.

[166] Oberhauser, A., Badilla-Fernandez, C., Carrion-Vazquez, M., and Fernandez, J. *J Mol Biol*, 319:433–447, 2002.

[167] Ohnesorge, F. and Binnig, G. *Science*, 260:1451–1456, 1993.

[168] Oliver, T., Dembo, M., and Jacobson, K. *J Cell Biol*, 145:590–604, 1999.

[169] Owan, I., Burr, D., Turner, C., Qiu, J., Tu, Y., Onyia, J., and Duncan, R. *Am J Physiol*, 273:C810–C815, 1997.

[170] Pankov, R., Cukierman, E., Katz, B., Matsumoto, K., Lin, D., Lin, S., Hahn, C., and Yamada, K. *J Cell Biol*, 148:1075–1090, 2000.

[171] Parfitt, A. *Telford Press*, pages 351–429, 1990.

[172] Pauwels, F. *Gesammelte Abhandungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1965.

[173] Pavalko, F., Norvell, S., Burr, D., Turner, C., Duncan, R., and Bidwell, J. *J Cell Biochem*, 88:104–112, 2003.

[174] Pelham, R. and Wang, Y.-L. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:13661–13665, 1997.

[175] Perozo, E., Kloda, A., Cortes, D., and Martinac, B. *Nat Struct Biol*, 9:696–703, 2002.

[176] Poenie, M., Alderton, J., Steinhardt, R., and Tsien, R. *Science*, 233:886–889, 1986.

[177] Pommerenke, H., Schreiber, E., Durr, F., Nebe, B., Hahnel, C., Moller, W., and Rychly, J. *Eur J Cell Biol*, 70:157–164, 2002.

[178] Preuss, M. *Untersuchung der Wechselwirkung zwischen kollodialen Teilchen und Luftblasen*. Dissertation, University of Mainz, 1993.

[179] Putman, C., van der Werf, K., de Grooth, B., van Hulst, N., and Greve, J. *Biophys J*, 67:1749–1753, 1994.

[180] Putman, C., Grooth, N., van Huelst, N., and Greve, J. *Appl Phys Lett*, 72:6–12–3–30, 1992.

[181] Putney, J. *Science*, 279:191–192, 1998.

[182] Qin, Y., Rubin, C., and McLeod, K. *J Orthop Res*, 16:482–489, 1998.

[183] Quintana, A. and Hoth, M. *Cell Calcium*, 36:99–199, 2004.

[184] Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C. M., Cleveland, J. P., and Hansma, P. K. *Biophys J*, 70:556–567, 1996.

[185] Radmacher, M., Tillamnn, R., Fritz, M., and Gaub, H. *Science*, 257:1900–1905, 1992.

[186] Raiteri, R., Preuss, M., Grattarola, M., and Butt, H.-J. *Colloids and Surf.*, 136:191–197, 1998.

[187] Rees, D., Charlton, J., Ataliotis, P., Woods, A., Stones, A., and Bayley, S. *Cell Motil Cytoskeleton*, 13:112–122, 1989.

[188] Reich, K., McAllister, T., Gudi, S., and Frangos, J. *Endocrinology*, 138:1014–1018, 1997.

[189] Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N., Schwarz, U., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A. *The Journal of Cell Biology*, 153:1175–1185, 2001.

[190] Roark, R. and Young, W. *Formulas for Stress and Strain*. McGrawhill, New York, 1975.

[191] Rosales, O.R. and. Isales, C., Barrett, P., Brophy, C., and Sumpio, B. *Biochem J*, 326:385–392, 1997.

[192] Rotsch, C. and Radmacher, M. *Biophys J*, 78:520–535, 2000.

[193] Rottingen, J. and Iversen, J. *Acta Physiol Scand*, 169:203–219, 2000.

[194] Rubin, C. and McLeod, K. *Clin Orthop Relat Res*, 298:165–174, 1994.

[195] Ryder, K. and Duncan, R. *J Bone Miner Res*, 16:240–248, 2001.

[196] Sachs, F. and Morris, C. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 132:1–77, 1998.

[197] Sader, J. *Rev. Sci. Instr.*, 74:2438–2443, 2003.

[198] Sadoshima, J. and Izumo, S. *Annu Rev Physiol*, 59:551–571, 1997.

[199] Sagvolden, G. *Biophys J*, 77:526–532, 1999.

[200] Sagvolden, G., Giaever, I., Pettersen, E., and Feder, J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:471–476, 1999.

[201] Saitoh, M., Ishikawa, T., Matsushima, S., Naka, M., and Hidaka, H. *J Biol Chem*, 262:7796–7801, 1987.

[202] Sampath, R., Gallagher, P., and Pavalko, F. *J Biol Chem*, 273:33588–33594, 1998.

[203] Sato, M., Nagayama, K., Kataoka, N., Sasaki, M., and Hane, K. *J Biomech*, 33:127–135, 2000.

[204] Sawada, Y. and Sheetz, M. *J Cell Biol*, 156:609–615, 2002.

[205] Senden, T. and Ducker, W. *Langmuir*, 10:1003–1004, 1994.

[206] Sheetz, M., Felsenfeld, D., and Galbraith, C. *Trends Cell Biol.*, 8:51–54, 1998.

[207] Sheiko, S., Möller, M., Reuvekamp, E., and Zandbergen, H. *Phys. Rev. B*, 48:5675–5678, 1993.

[208] Shlyakhtenko, L. S., Gall, A. A., Weimer, J. J., Hawn, D. D., and Lyubchenko, Y. L. *Biophys J*, 77:568–576, 1999.

[209] Smith, E. and Raab, D. *Acta Med Scand*, 711:149–156, 1986.

[210] Stamenovic, D., Mijailovich, S., Tolic-Norrelykke, I., Chen, J., and Wang, N. *Physiol Cell Physiol*, 282:C617–C624, 2002.

[211] Steimle, P., Hoffert, J., Adey, N., and Craig, S. *J Biol Chem*, 274:18414–18420, 1999.

[212] Strayer, D. S., Hoek, J., Thomas, A., and White, M. *Biochem J*, 344:39–46, 1999.

[213] Strohmeier, R. and Bereiter-Hahn, J. *Exp Cell Res*, 154:412–420, 1984.

[214] Struckmeier, J. *Spektroskopische Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktion mechanisch stimulierter Osteoblasten*. Dissertation, University of Marburg, 2001.

[215] Struckmeier, J., Klopp, E., Born, M., Hofmann, M., Tenbosch, J., and Jones, D. *Rev of Sci Instruments*, 71:4531–4534, 2000.

[216] Sussman, M., McCulloch, A., and Borg, T. *Circ Res*, 91:888–898, 2002.

[217] Sykes, B. *Nat Struc Biol*, 10:588–589, 2003.

[218] Szabo, B. and Selmeczi, D. *Physical Review E*, 65:041910–1–041910–6, 2002.

[219] Tavi, P., Laine, M., Weckstrom, M., and Ruskoaho, H. *Trends Pharmacol Sci*, 22:254–260, 2001.

[220] Taylor, C. and Thorn, P. *Curr Biol*, 11:R352–R355, 2001.

[221] Tenbosch, J. *Untersuchungen zum Einfluß mechanischer Deformationen auf Osteoblasten.* Dissertation, University of Marburg, 1999.

[222] Thastrup, O., Cullen, P., Drobak, B., Hanley, M., and Dawson, A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:2466–2470, 1990.

[223] Thurm, U. *Mechano-electric Transduction. Biophysics (ed. by Hoppe W., Lohman W., Markl H. and Ziegler H.),.* Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1998.

[224] Tomasek, J. and Hay, E. *J Cell Biol*, 99:536–549, 1984.

[225] Tortonese, M. and Kirk, M. *SPIE*, 3009:53–60, 1997.

[226] Tsien, R. *Annu Rev Biochem*, 67:509–544, 1998.

[227] Tsien, R. W. and Tsien, R. Y. *Annu Rev Cell Biol*, 6:715–760, 1990.

[228] Tsien, R. *Nature*, 290:527–528, 1981.

[229] Tsien, R. and Pozzan, T. *Methods in Enzymology*, 172:230–262, 1989.

[230] Usami, S., Chen, H., Zhao, Y., Chien, S., and Skalak, R. *Ann Biomed Eng*, 21:77–83, 1993.

[231] Varenberg, M., Etsion, I., and Halperin, G. *Rev of Sci Instruments*, 74:3362–3367, 2003.

[232] Vico, L., Chappard, D., Palle, S., Bakulin, A., Novikov, V., and Alexandre, C. *Am J Physiol*, 255:R243–R247, 1988.

[233] Vogel, V., Thomas, W., Craig, D., Krammer, A., and Baneyx, G. *Trends Biotechnol*, 19:416–423, 2001.

[234] Wang, H.-B., Dembo, M., Hanks, S., and Wang, Y.-L. *PNAS*, 98:11295–11300, 2001.

[235] Wang, N., Butler, J., and Ingber, D. *Biochem Biophys Res Commun*, 277:93–99, 2000.

[236] Wang, N., Tolic-Norrelykke, I., Chen, J., Mijailovich, S., Butler, J., Fredberg, J., and Stamenovic, D. *Physiol Cell Physiol*, 282:C606–C616, 2002.

[237] Wasserman, S., Mehraban, F., Komuves, L., Yang, R., Tomlinson, J., Zhang, Y., Spriggs, F., and Topper, J. *Physiol Genomics*, 12:13–23, 2002.

[238] Wehner, R. and Gehring, W. *Zoologie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995.

[239] Weinbaum, S., Cowin, S., and Zeng, Y. *J Biomech*, 27:339–360, 1994.

[240] Weinbaum, S., Guo, P., and You, L. *Biorheology*, 38:119–142, 2001.

[241] Weiss, P. *Int. Rev. Cytol.*, 7:391–423, 1958.

[242] Wendling, S., Oddou, C., and Isabey, D. *J Theor Biol*, 196:309–325, 1998.

[243] Wiemann, M., Baker, R., Bonnet, U., and Bingman, D. *Neuroreport*, 9:167–170, 1998.

[244] Wiemann, M., Büsselberg, D., Schirrmacher, K., and Bingmann, D. *Calc Tiss Int*, 63:154–159, 1998.

[245] Williams, D., Becker, P., and Fay, F. *Science Wash DC*, 235:1644–1648, 1987.

[246] Wiltink, A., van der Brink, A., Herrmann-Erler, M., van der Meer, J., Willems, P., van Duijn, B., Nijweide, P., and Ypey, D. *Biochem J*, 344:39–46, 1999.

[247] Wolf, J. *Kirschwald*, 1892.

[248] Xia, S. and Ferrier, J. *Biochem Biophys Res Commun*, 186:1212–1219, 1992.

[249] You, J., Reilly, G., Zhen, X., Yellowley, C., Chen, Q., Donahue, H., and Jacobs, C. *J Biol Chem*, 276:13365–13371, 2001.

[250] Ypey, D., Weidema, A., Hold, K., Van der Laarse, A., Ravesloot, J., van der Plas, A., and Nijweide, P. *J Bone Miner Res*, 7:S377–S387, 1992.

[251] Zamir, E. and Geiger, B. *J Cell Sci*, 114:3583–3590, 2001.

[252] Zamir, E., Katz, B., Aota, S., Yamada, K., Geiger, B., and Kam, Z. *J Cell Sci*, 112:1655–1669, 1999.

[253] Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K., Katz, B., Lin, S., Lin, D., Bershadsky, A., and Kam, Z. *Nat Cell Biol*, 2:191–196, 2000.

[254] Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A., and Burridge, K. *J Cell Biol*, 141:539–551, 1998.

[255] Ziambaras, K., Lecanda, F., Steinberg, T., and Civitelli, R. *J Bone Miner Res*, 13:218–228, 1998.

A Anhang

A.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die im Laufe der letzten Jahre sowohl in menschlicher, als auch in fachlicher Hinsicht einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben:

- Herrn Prof. Dr. Wolfgang Rühle für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, diese Arbeit zu schreiben.
- Für die vorbildliche Betreuung und sein überdurchschnittliches Engagement, auch in schwierigen Zeiten das Maximale zu ermöglichen, gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Martin Hofmann. Des Weiteren bin ich dankbar für das jederzeit vorhandene offene Ohr auch bei nicht-wissenschaftlichen Problemen.
- Prof. Dr. David Jones für die freundliche Aufnahme in seine Labors, die jederzeit fruchtbaren Diskussionen und seine Ratschläge bezüglich biologischer Fragestellungen.
- Dr. Jens Struckmeier, Dipl.-Phys. Daniel Graff, Damaris Rink, Sami Curtze und Tim Lautenschläger für die interessante und kooperative Zusammenarbeit im Labor.
- Toh Weng Tan und Marita Kratz für ihre unermüdliche Betreuung der zellbiologischen Experimente und für die fruchtbaren Diskussionen.
- Thorsten Pohl für seine exzellente feinmechanische Arbeit und die Erkenntnis, wie wichtig Kabelbinder sind.
- Rüdiger Rink und Hermann Gunther sowie den Mitarbeitern der feinmechanischen Werkstatt im Laborbau II für die Entwicklung komplizierter feinmechanischer Systeme.
- Ein besonderer Dank geht an Dr. Matthias Born für seine unermüdliche und kompetente Unterstützung zahlreicher Projekte, den exzellenten elektronischen Support und die Einführung in Delphi.
- Den Mitarbeitern der Elektronik-Werkstatt für ihre jederzeit hilfsbereite und freundliche Unterstützung zur Lösung elektronischer Probleme.
- Prof. Dr. Hans-Jürgen Butt und Dr. Elmar Bonaccurso vom MPI in Mainz für ihre freundliche Unterstützung in Fragen der Rasterkraftmikroskopie.
- Nadja Schwarzwäller, für das unermüdliche Suchen nach grammatikalischen Fehlern.
- Allen, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben und hier nicht namentlich erwähnt wurden.

Für die Unterstützung im Leben außerhalb der Physik danke ich vor allem meinen Eltern, die mir nicht nur finanziell, sondern vor allem auch privat die Vorraussetzungen für ein Studium der Physik und die Promotion geschaffen haben.

Mein ganz besonderer Dank geht an meine geliebte Frau Trientje, die mich in allen Lebenslagen liebevoll unterstützt.

A.2 Publikationsliste

- Mennenga-Klopp, E., T. Lautenschläger, M. Born, M. Hofmann, D.B. Jones (2005). Mechanotransduction in osteoblastic-like cells measured via Atomic-Force-, Traction-Force- and Fluorescence-Microscopy. Scanning Probe Microscopy in Life Sciences, Workshop, Berlin.
- Jones, D.B., E. Klopp, J. Leitsch, M. Hoberg, and C. Westermann (2003). Dynamic Measurements of Osteoblast Mechanosensing. European Cells and Materials 6(2):6.
- Jones, D.B., et al. (2003). Dynamic Fluorescent Imaging and Photometry of Cells in Microgravity. Proceedings RMS 38(2): 67-73.
- Klopp, E., D. Graff, J. Struckmeier, M. Born, S. Curtze, M. Hofmann, and D.B. Jones (2002). The Osteoblast Mechanoreceptor, Microgravity Perception and Thermodynamics. Journal of Gravitational Physiology 9(1):269-270.
- Struckmeier, J., E. Klopp, M. Born, D. Rink, J. Tenbosch, S. Ecke, H.-J. Butt, M. Hofmann, and D.B. Jones (2001). Dynamic studies on living cells with an atomic force fluorescence-microscope. Proceedings - SPIE the International Society for optical engineering 4260:7-15.
- Struckmeier, J., E. Klopp, M. Born, M. Hofmann, D. Rink, D.B. Jones, and H.-J. Butt (2001). Real-time atomic force fluorescence microscopy on living cells. Proceedings - SPIE the International Society for optical engineering 4434:142-149.
- Struckmeier, J., J. Tenbosch, E. Klopp, M. Born, M. Hofmann, and D.B. Jones (2000). Portable time-resolved photometer for monitoring the calcium dynamics of osteoblasts under mechanical and zero-gravity stimulation. Proceedings - SPIE the International Society for optical engineering 3921:114-123.
- Struckmeier, J., E. Klopp, M. Born, M. Hofmann, J. Tenbosch, and D.B. Jones (2000). Portable fluorescence photometer for monitoring free calcium. Rev. of Sci. Instruments 71:4531-4534.

A.3 Wissenschaftlicher Werdegang

08/2001-11/2005	Promotion am Fachbereich Physik der Philipps-Universität Marburg
07/2003-06/2005	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Ruhr-Universität Bochum am Institut für Werkstoffe und Nanoelektronik
01/2003-06/2003	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe für experimentelle Orthopädie und Biomechanik
06/2002-12/2002	wissenschaftlicher Mitarbeiter des wissenschaftlichen Arbeitskreises Osteologieverein eV. an der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe für experimentelle Orthopädie und Biomechanik
03/2002-05/2002	Stipendiat im Rahmen des Graduiertenkollegs „Nanoelektronische, mikromechanische und mikrooptische Systeme“ an der Ruhr-Universität Bochum
01/2002-02/2002	wissenschaftlicher Berater an der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe für experimentelle Orthopädie und Biomechanik
08/2001-12/2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Philipps-Universität Marburg in der Arbeitsgruppe für experimentelle Halbleiter

A.4 Eidesstattliche Versicherung

„Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Kombinierte Rasterkraft-, Zugkraft- und Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mechanotransduktion in Knochenzellen“ selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.“

(Datum) (Unterschrift)