Spektroskopische Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktion in mechanisch stimulierten Osteoblasten

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Physik

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jens Struckmeier

aus Hannover

Marburg/Lahn, 2001

Vom Fachbereich Physik
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
15.08.2001 angenommen.
Erstgutachter: Prof. Dr. Martin Hofmann
Zweitgutachter: Prof. Dr. David Jones
Tag der mündlichen Prüfung am 31.08.2001.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung **3**

2 Biophysik des Knochenaufbaus **7**

2.1 Der biomechanische Umbauprozess des Knochens 7

2.2 Funktion und Arten von Knochenzellen 12

2.3 Die Mechanosensitivität der Knochenzellen 13

2.4 Der Vorgang der Mechanotransduktion 14

2.5 Intrazelluläre Kalziumdynamik 21

3 Kalzium bindende Farbstoffe **25**

3.1 Der Kalzium-bindende Farbstoff Fura-2 25

3.2 Ca^{2+}-Kalibrierung bei Fura-2 28

3.3 Der Kalziumfarbstoff Indo-1 29

3.4 Zellfärbung mit Fura-2 bzw. Indo-1 30

4 Die Kalziumdynamik in Schwerelosigkeit **33**

4.1 Mikrogravität bei Parabelflügen 34

4.2 Das Fluoreszenzphotometer 35

4.2.1 Kalibration des Photometersystems 38

4.2.2 Die Hormonstimulation 41

4.2.3 Experimente bei Parabelflügen 44

4.2.4 Die Kalziumdynamik während der Parabelflüge 45

5 Direkte mechanische Stimulation von Knochenzellen **49**

5.1 Das Prinzip der Rasterkraftmikroskopie 49

5.1.1 Die Grenzen kommerzieller Systeme für Kräftebestimmungen . . . 51
5.1.2 Der experimentelle Aufbau . . . 55
5.1.3 Die Substitution der Cantileverspitzen durch eine Mikrosphäre . . . 61
5.2 Kalibration der Federkonstanten . . . 63
5.3 Das invertierte Fluoreszenzmikroskop . . . 65
5.4 Das Rasterkraft-Fluoreszenzmikroskop . . . 66
5.5 Auswertung der Piko- und Nanonewtonkräfte . . . 67
5.5.1 Aufnahme von Kraftkurven . . . 67
5.5.2 Die Kraftschwelle . . . 72
5.5.3 Die deponierte Energie . . . 76
5.5.4 Die Intrazelluläre Kalziumdynamik . . . 78
5.5.5 Die Signalweiterleitung . . . 80
5.5.6 Die Herkunft des Kalziums . . . 83
5.6 Quantifizierung von Zell- zu Substratkräften . . . 88

6 Zusammenfassung und Ausblick 91

7 Anhang 95
7.1 Kultivieren und Präpararieren der Zellen . . . 95
7.2 Methoden zur Bestimmung der Federkonstante . . . 97
7.2.1 Die Bestimmung der Federkonstante über das thermische Rauschen . . . 97
7.2.2 Die Federkonstantenbestimmung mittels angehängter Massen . . . 102
7.2.3 Federkonstantenbestimmung mittels Referenzcantilever 103

8 Danksagung 107

1 Einleitung

Aus der Physik heraus haben sich in den letzten Jahren eine Fülle neuer Techniken entwickelt, die in den Biowissenschaften erfolgreich angewendet werden konnten. Die vehement voranschreitende Weiterentwicklung physikalischer Technologien verspricht wesentliche Erkenntnisse über die Physik lebender Systeme zu liefern. In dieser Hinsicht hat die Entwicklung modernster Lichtquellen für die Fluoreszenzmikroskopie sowie die Miniaturisierung der Sensoren, die mit der Entwicklung des Rasterkraftmikroskops die nanoskopische Längenskala erreicht haben, der biologischen Forschung wesentlich weiterhelfen können. Insbesondere die mit der Miniaturisierung verbundene präzise Bestimmung von Kräften ermöglicht neue Einblicke in komplexe biomechanische Systeme. Wir werden uns diese Technologien konkret zu Nutze machen, um Mechanismen des Knochenumbaus genauer zu verstehen.

Der Aufbau und das Wachstum des biomechanischen Systems *Knochen* wird von hormonellen, insbesondere aber auch von mechanischen Faktoren reguliert. Es ist allgemein akzeptiert, dass der krankhafte Abbau von Knochen, der als Osteoporose bezeichnet wird, die Konsequenz mangelnder mechanischer Belastung ist. Der genaue Mechanismus, der sich dabei im Knochen abspielt, war bisher unklar.

Man weiß zwar, dass unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit ein Abbau von Knochensubstanz stattfindet. Ob dieser Abbau auf fehlende Gravitation oder auf fehlende mechanische Belastung zurückzuführen ist, konnte bislang nicht geklärt werden. Der Auf- und Abbau des Knochens wird von den Knochenzellen geregelt. Daher stellt sich die Frage, welche Prozesse sich auf mikroskopischer, d.h. auf zellulärer Ebene abspielen. Es ist bekannt, dass Knochenzellen, wie viele andere Zellen auch (z.B. Endothelzellen), auf

mechanische Belastung mit einer Modulation der intrazellulären Kalzium-Ionenkonzentration reagieren. Mit geeigneten Kalzium-sensitiven Farbstoffen lassen sich diese Vorgänge in lebenden Zellen in einer Zellkultur sichtbar machen.

Aus bisherigen Veröffentlichungen geht hervor, dass ein intrazellulärer Kalziumanstieg in einer Zellkultur nach Dehnung oder Scherung beobachtet wurde. Jedoch war bei all diesen Experimenten die Kraft, die auf eine einzelne Zelle wirkt, nicht oder nur unzureichend quantifizierbar. Geeignete Messaufbauten für Experimente in Schwerelosigkeit und zur exakten Applikation von sehr kleinen Kräften auf einzelne lebende Zellen und der gleichzeitigen Beobachtung der zellulären Reaktion sind bislang nicht etabliert.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, entsprechende Systeme zu entwickeln und das Verhalten der Zellen zum Einen als Reaktion auf Schwerelosigkeit und zum Anderen auf mechanische Belastung zu untersuchen.

Für Experimente in Schwerelosigkeit musste ein Echtzeit-Photometersystem entwickelt werden, das mit Hilfe modernster Lichtquellen intrazelluläre Kalziumdynamiken spektroskopisch erfassen kann.

Um in terrestrischen Experimenten auftretende Kräfte zu quantifizieren sowie definierte Kräfte auf Zellen auszuüben, wurde das Prinzip der Rasterkraftmikroskopie verwendet, das 1986 entwickelt und deren Erfinder mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden. Die Rasterkraftmikroskopie eignet sich nicht nur zu Abbildung, sondern auch in besonderer Weise zur präzisen Applikation kleiner Kräfte bis in den Piko-Newton-Bereich. Wird ein solches Kraftmikroskop mit der Echtzeit-Fluoreszenzspektroskopie kombiniert, so erhält man ein leistungsstarkes Instrument, um Reaktionen von Zellen auf mechanische Reize in Echtzeit zu beobachten. Damit wird es erstmals möglich, Kräfte zu quantifizieren, die zu einer Aktivierung und damit Modulation der intrazellulären Kalzium-Ionenkonzentration erforderlich sind.

Mit Hilfe dieser neuen physikalischen Methoden sollen die folgenden Fra-

gen beantwortet werden: Hat die Schwerelosigkeit einen unmittelbaren Einfluss auf die intrazelluläre Reaktion der Knochenzelle? Gibt es eine Kraftschwelle, ab der es zu einer Aktivierung der Zelle kommt? Wie schnell wird die mechanische Stimulation in eine Kalziumkonzentrationsänderung umgesetzt? Ist eine einzelne stimulierte Zelle in der Lage ihre Information an Nachbarzellen weiterzugeben?

Dazu werden in Kapitel 2 zunächst der makroskopische und mikroskopische Aufbau des Knochens erklärt. Eine Einführung in zelluläre Prozesse erklärt die Bedeutung des Botenstoffs Kalzium. Das anschließende Kapitel 3 zeigt, auf welche Weise sich dieser mit Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar machen lässt. Wie sich die nun beobachtbare Kalziumkonzentration in Osteoblasten unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit bei Parabelflügen verhält, ist Gegenstand von Kapitel 4. Im Vergleich dazu werden in Kapitel 5 Experimente mit einem selbst entwickelten Rasterkraftmikroskop vorgestellt. Mit Hilfe dieses Instruments können einzelne lebende Zellen gezielt mechanisch stimuliert und deren Reaktion beobachtet werden. Das Kapitel 6 umfasst die Ergebnisse der Experimente, die in Schwerelosigkeit vorgenommen wurden und stellt diese der direkten mechanischen Stimulation zusammenfassend gegenüber.

2 Biophysik des Knochenaufbaus

2.1 Der biomechanische Umbauprozess des Knochens

Der Knochen hat aufgrund seiner hohen Festigkeit eine stützende und schützende Funktion. Zudem dient er als Stoffwechselreservoir für Mineralsalze. Wie bei vielen anderen Gewebearten und Organismen passt sich die Struktur und der Aufbau eines Knochens den Gegebenheiten der Umgebung an. Man geht davon aus, dass dieser Umbauprozess mechanisch induziert wird. Deshalb wird am Anfang dieser Untersuchung dargelegt, wie ein solcher Umbau auf zellulärer Ebene stattfindet und welche Signalwege von Zellen verwendet werden.

Julius Wolff hat bereits 1892 in seinem Buch *'Das Gesetz der Transformation der Knochen'* beschrieben, dass sich die Architektur des Knochens den äußeren mechanischen Belastungen anpasst [Wolff(1892)]. Er stellte ein Gesetz auf *(Wolff's law)* in dem die Form des Knochens in einen mathematischen Zusammenhang zur mechanischen Kraft steht. Auch wenn wir heute wissen, dass viele der Folgerungen von Wolff nicht korrekt waren [Hert(1990)], so wird dennoch seine Idee, dass mechanische Belastung die Form des Knochens verändert, heute als Tatsache allgemein anerkannt. Die Fähigkeit der flexiblen Anpassung des Knochens hat im Laufe der Evolution dazu geführt, dass landlebende Wirbeltiere einen möglichst leicht gebauten passiven Bewegungsapparat herausbildeten. So konnte der Energiebedarf für die Knochenernährung und für den Halteapparat minimiert werden. Beim Menschen ermöglicht diese Konzept der Leichtbauweise, dass nur etwa 10% des Ge-

samtkörpergewichts, nämlich $7kg$, auf das Skelett entfallen.

Diese Leichtbauweise wird möglich dadurch, dass der Knochen auch noch nach Abschluss des Wachstums in ständigem Umbau ist. Der Ort des Umbaus wird ähnlich wie bei Muskelzellen durch mechanische Belastungen beeinflusst. Fehlende mechanische Belastung, wie z.B. durch Bettlägerigkeit oder bei längerer Ruhigstellung durch einen Gipsverband, führt zu einer Reduktion des Mineralgehalts in den Knochen, was zu einer Verminderung ihrer Festigkeit führt. Diese verminderte Knochenbildung, sowie eine verminderte Matrixproteinproduktion wurde auch bei Astronauten nach einen längerem Aufenthalt in Schwerelosigkeit beobachtet [Morey und Baylink(1978)]. Regelmäßige Belastung kann die Geschwindigkeit des Knochenschwunds reduzieren, bis heute ist jedoch nicht bekannt, wie sich dieser vollständig verhindern lässt. Hat mangelnde mechanische Belastung einerseits eine nachteilige Wirkung auf den Knochen, so wird andererseits durch stärkere mechanische Belastung die Bildung von Knochenmasse erhöht [Lanyon(1987)]. Deshalb wird beispielsweise körperliches Training therapeutisch eingesetzt, um den Knochenverlust zu reduzieren. Überschreitet der Knochenverlust das normale Maß, so wird er klinisch als Osteoporose bezeichnet. Ein als Osteoporose bezeichneter Knochenschwund wird nicht nur bei Astronauten beobachtet, sondern tritt insbesondere bei älteren Menschen sehr häufig auf. Als Folge tritt bei dieser Altersgruppe häufig eine Oberschenkelhalsfraktur auf.

Eine Erweiterung des Wolff'schen Gesetzes hat Frost [Frost(1983)] vorgenommen. Ihn interessierte vor allem, wie es zu einer signifikanten Veränderung des Knochen kommt. Deshalb quantifizierte er die Längenänderungen des Knochens und entwickelte seine so genannte „Mechanostat - Hypothese". Diese Hypothese beschreibt Schwellwerte für den Beginn der Neusynthese von Knochenmatrix [Frost(1987)]. Damit stellte Frost eine Verbindung zwischen der Längenänderung des Knochens und dem Ab- und Aufbau der Knochenmatrix her.

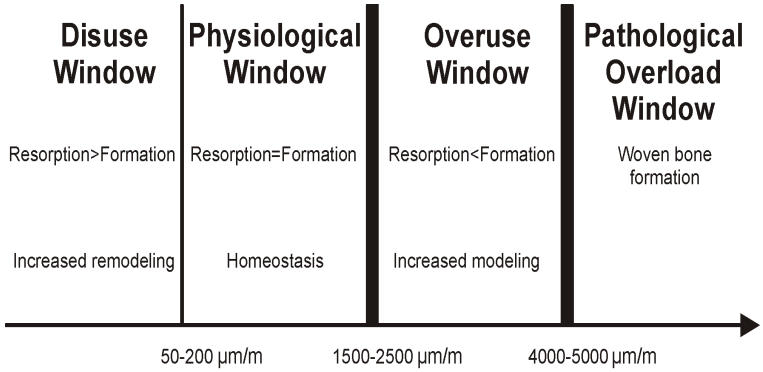

Abbildung 2.1: Differenzierung der mechanischen Belastung in vier Bereiche nach der Mechanostat-Theorie von Frost [Frost(1987)]. Der mechanische Bereich der Längenänderung (in $\mu m/m$) ist in vier Fenster unterteilt. Als Schwelle zum nächsten Fenster wird eine minimale effektive Belastung (MES = minimal effective strain) definiert.

Seine Theorie (siehe Abbildung 2.1) kategorisiert die mechanische Längenänderungen in verschiedene Fenster. Eine mechanische Belastung, welche im normalen also physiologischen Bereich liegt bezeichnet er als *"Physiological Window"*. Der damit verbundene normale Knochenumbau findet bei relativen Längenänderungen von $1500 - 2000 \mu m/m$ statt. Dabei ist die Bilanz von Resorption und Synthese ausgeglichen. Wenn die lokalen mechanischen Signale im Knochen eine bestimmte physiologische Schwelle (*'Minimum Effective Strain (MES)'*) überschreiten, vollzieht der Knochen einen internen Umbau, um die lokalen Belastungen unterhalb der MES - Schwelle zu bringen (*"Overuse Window"*). Knochensubstanz wird dabei netto produziert, d.h. es findet eine erhöhte Syntheseleistung statt. Wird die mechanische Belastung noch weiter erhöht, kann dies zu einer pathologischen Veränderung des Knochens führen (*"woven bone"*).

Frosts Theorie besagt weiterhin, dass es eine untere Reizschwelle gibt, unterhalb derer der Knochenabbau stärker als der Knochenaufbau vollzo-

gen wird. Netto wird folglich Knochensubstanz abgebaut, bis sich die lokalen Kräfte erhöhen. Frost schloss aus diesen Erkenntnissen, dass Knochen einen hypothetischen Längensensor besitzen und schlug weiterhin vor, dass bestimmte Hormone oder biochemische Stoffe diesen Längensensor beeinflussen und damit die Grenzen des physiologischen Fensters verschieben können. Die Grenzen dieses Modells liegen allerdings in der Vereinfachung, nur die Längenänderung als Regulator der Nettoknochenbilanz zu berücksichtigen.

Die Mechanismen, mit denen der 'Mechanostat' arbeitet, sind noch immer unbekannt. Um ein besseres Verständnis von den Abläufen im Knochen zu bekommen, schauen wir uns zunächst den strukturellen Aufbau des Knochens an. Einen detaillierteren Überblick bietet z.B. Junqueira [Junqueira(1996)]. In Abbildung 2.2 ist ein Ausschnitt eines Röhrenknochens schematisch dargestellt. Der Knochen besteht aus Zellen, aus faserartigen Strukturen und aus seiner Mineralsubstanz. Die hier dargestellte zirkulare Struktur der Lamellenknochen ist typisch für einen erwachsenen Menschen. Die Lamellen stellen deutlich von einander abgesetzte Knochenschichten dar, deren Dicke durchschnittlich $3 - 7\mu m$ beträgt. Die zirkular angeordnete und regelmäßig wiederkehrende Struktur der schwarz dargestellten Hohlräume beinhaltet die Knochenzellen. Im Zwischenraum befindet sich die Interzellularsubstanz, die so genannte Knochenmatrix. Zur Versorgung der Zellen sind die sehr stoffwechselaktiven Knochen von Kanälen durchzogen. Diese sind durchblutet und beliefern die Zellen mit Sauerstoff und mit allen erforderlichen Nährstoffen. Außerdem sorgen sie für den An- und Abtransport von Stoffwechselprodukten.

Der Knochen besteht im wesentlichen aus Knochenhartsubstanz und Zellen. Ein Umbau des Knochens erfolgt durch den Abbau und die Neusynthese dieser Knochenhartsubstanz. Diesen Auf- und Abbau regeln die Knochenzellen. Es macht daher Sinn, anzunehmen, dass ein mechanisch induzierter Umbau des Knochens auf eine mechanische Ak-

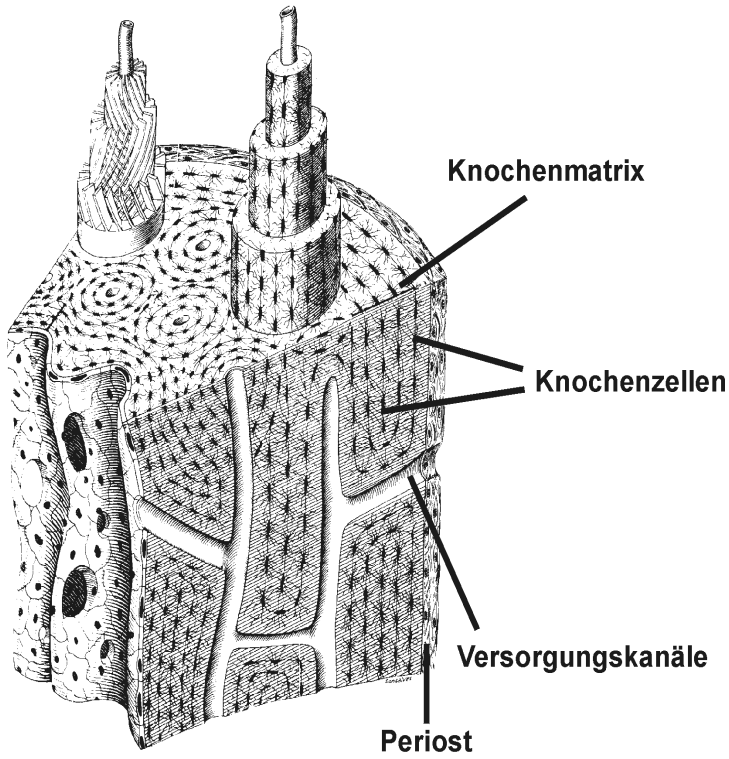

Abbildung 2.2: Schematische Zeichung eines Ausschnitts der Substantia compacta der Diaphyse eines Röhrenknochens aus [Junqueira(1996)].

tivierung der Zellen zurückzuführen ist. Tatsächlich wurde eine erhöhte Teilungsrate und damit eine vermehrte Aktivität bei mechanisch stimulierten Zellen beobachtet [Jones et al.(1991), Burger und Veldhuijzen(1993), Vandenburgh et al.(1989)]. Welche Zellarten primär für den Knochenaufbau und welche für die Knochenerhaltung und für den Abbau zuständig sind, erläutert das folgende Kapitel.

2.2 Funktion und Arten von Knochenzellen

Zellen sind die kleinsten selbständig lebensfähigen Einheiten im Organismus. Jede Zelle grenzt sich durch eine Zellmembran von ihrer Umgebung ab. In ihrem Inneren befindet sich der Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum und der Golgiapparat die jeweils von einer eigenen Membran umgeben sind. Mit Ausnahme von den einfacher strukturierten Blutzellen, ist dieser Aufbau für alle Zellen charakteristisch. Im Organismus sind die Zellen auf verschiedene Aufgaben spezialisiert. Im Knochen lassen sich im wesentlichen vier spezialisierte Zelltypen unterscheiden:

- Vorläuferzellen,
- Osteoblasten,
- Osteozyten und
- Osteoklasten.

Die Vorläuferzellen sind eine Vorstufe der eigentlichen Knochenzellen. Wenn sie sich spezialisieren, entwickeln sie sich zu Osteoblasten, die für den Knochenaufbau verantwortlich sind. Sie produzieren die organischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz und wirken bei der Synthese der Hartsubstanz mit. Das von den Osteoblasten frisch gebildete Material (Osteoid) wird durch Einlagerung von Kalziumphosphatkristallen in harte Knochensubstanz überführt. Die sich einlagernden Osteoblasten differenzieren hierbei weiter aus und entwickeln sich zu Osteozyten, die untereinander einen Zell-Zell-Kontakt aufrechterhalten. Die Kommunikation erfolgt über interzelluläre Verbindungen, die so genannten *gap junctions*. Osteozyten produzieren im Vergleich zu Osteoblasten keine Knochenhartsubstanz mehr, haben einen Großteil ihres endoplasmatischen Retikulums und Golgi-Apparates verloren und können sich nicht mehr teilen.

Der vierte Zelltyp im Knochen, die Osteoklasten, sind vielkernige Riesenzellen. Sie resorbieren Knochensubstanz, indem sie sich an die Knochenoberfläche anhaften und durch Abbau der Knochenhartsubstanz tiefe Tunnel in den Knochen graben.

Der ständig stattfindende Knochenumbau gliedert sich in zwei Phasen. Zuerst kommt es zur Resorption von bestehender Knochenmatrix durch die Osteoklasten. Im zweiten Schritt wird eine neue Knochensynthese von den Osteoblasten durchgeführt. Die Tätigkeit der Osteoblasten und Osteoklasten ist charakteristisch für den bei Säugetieren ständig stattfindenden Knochenumbau.

Da verschiedene Zellen diesen mechanisch beeinflussten Umbauprozess regulieren, liegt die Vermutung nahe, dass die Zellen selbst einen Sensormechanismus für Kräfte besitzen.

2.3 Die Mechanosensitivität der Knochenzellen

Die Sensitivität von Zellen auf äußere mechanische Stimulationen ist schon lange bekannt. Anhand von Pflanzenzellen hat man beispielsweise nachgewiesen, dass sie auf mechanische Berührungen reagieren [Wehner und Gehring(1995)]. Auch im menschenlichen Organismus sind solche mechanosensitiven Zellen vorhanden, beispielsweise in Skelett- und Herzmuskeln [Sadoshima und Izumo(1997)], in Blutgefäßen (Endothelzellen) [Ishida et al.(1997), Malek und Izumo(1995), Naruse und Sokabe(1993)], im Haut- [Kolega(1986)] und Lungenepithel und im Knochen [Jones und Bringmann(1991), Banes et al.(1995)]. Ist eine Zelle oder ein Zellverbund in der Lage auf mechanische Reize zu reagieren, so sprechen wir von einer Mechanosensitivität der Zellen. Die Wahrnehmung und anschließende Reaktion auf diesen Reiz wird Mechanorezeption genannt.

Betrachtet man den Knochen als einen Verbund von Zellen, so liegt es

nahe, zu vermuten, dass nicht nur der Verbund auf mechanische Kräfte reagieren kann, sondern auch einzelne Zellen in der Lage sind, mechanische Reize wahrzunehmen.

Ob und wie eine solche Wahrnehmung auf zellulärer Ebene in Osteoblasten stattfindet, ist Gegenstand dieser Arbeit. Da vermutlich intrazelluläre Signalkaskarden zur Wahrnehmung von Kräften eine Rolle spielen, werden wir im folgenden Kapitel mögliche Signalwege aufzeigen.

2.4 Der Vorgang der Mechanotransduktion

Wenn ein extrazellulärer mechanischer Reiz eine intrazelluläre Signalkaskade auslöst, bezeichnen wir den Prozess als Mechanotransduktion. Die Mechanotransduktion selbst kann dabei in drei Bereiche unterteilt werden:

1. *biomechanische Kopplung*
2. *Signalweiterleitung*
3. *effektive Zellantwort*

1. Die *biomechanische Kopplung* beschreibt Mechanismen, bei denen die Zelle die mechanischen Reize in intrazelluläre biomechanische Signale umwandelt. Eine Kraftkopplung kann dabei geschehen durch:

   (a) die Integrin-Zytoskelett-Kern-Kopplung: Die Zellmembran ist von Proteinen (Integrinen) durchzogen, die einen mechanischen Kontakt vom Aussenraum der Zelle zum Zytoskelett und damit zum Kern herstellen.

   (b) dehnungsabhängige Ionenkanäle innerhalb der Zellmembran

   (c) G-Protein abhängige Signalkaskaden

Signal cascade in mechano-transduction.

1) Transducer
   - One
   - Multiple

2) 2nd Messenger
   - One
   - Multiple (this is most likely)

3) Immediate effects (within 1 s)
   - PLC activation
   - Gap-junction communication
   - Ion-channel activation

4) Release of signalling molecules (e.g., NO through Ca^{2+})

5) Intermediate effects within 1–2 min
   - Arachidonic acid metabolism
   - cAMP (Ca^{2+} or PGE2)
   - cGMP (through NO)

6) Late effects (2 min – 6 h)
   - Gene activation (*Egr-1*? *cfos*)

7) Secondary effects
   - Effects due to release of translated genes e.g., TGFß, IGF

Abbildung 2.3: Übersicht der an der Mechanotransduktion teilhabenden Signalkaskaden aus [Jones et al.(1995)].

(d) eine Ankopplung des Zytoskeletts an die Phospholipase C oder die Phospholipase A

Die Abbildung 2.3 zeigt tabellarisch eine Zusammenstellung der Signalkaskaden, die infolge mechanischer Stimulation in Gang gesetzt werden können. Die auftretenden Effekte sind in chronologischer Reihenfolge aufgelistet. Die hier aufgeführten Botenstoffe stehen untereinander in Verbindung. Die Interaktion ist sehr komplex und nur in Teilbereichen verstanden. Einen grafischen Überblick der Signalkaskaden, die bei der Mechanotransduktion in Knochenzellen eine Rolle spielen, ist in Abbil-

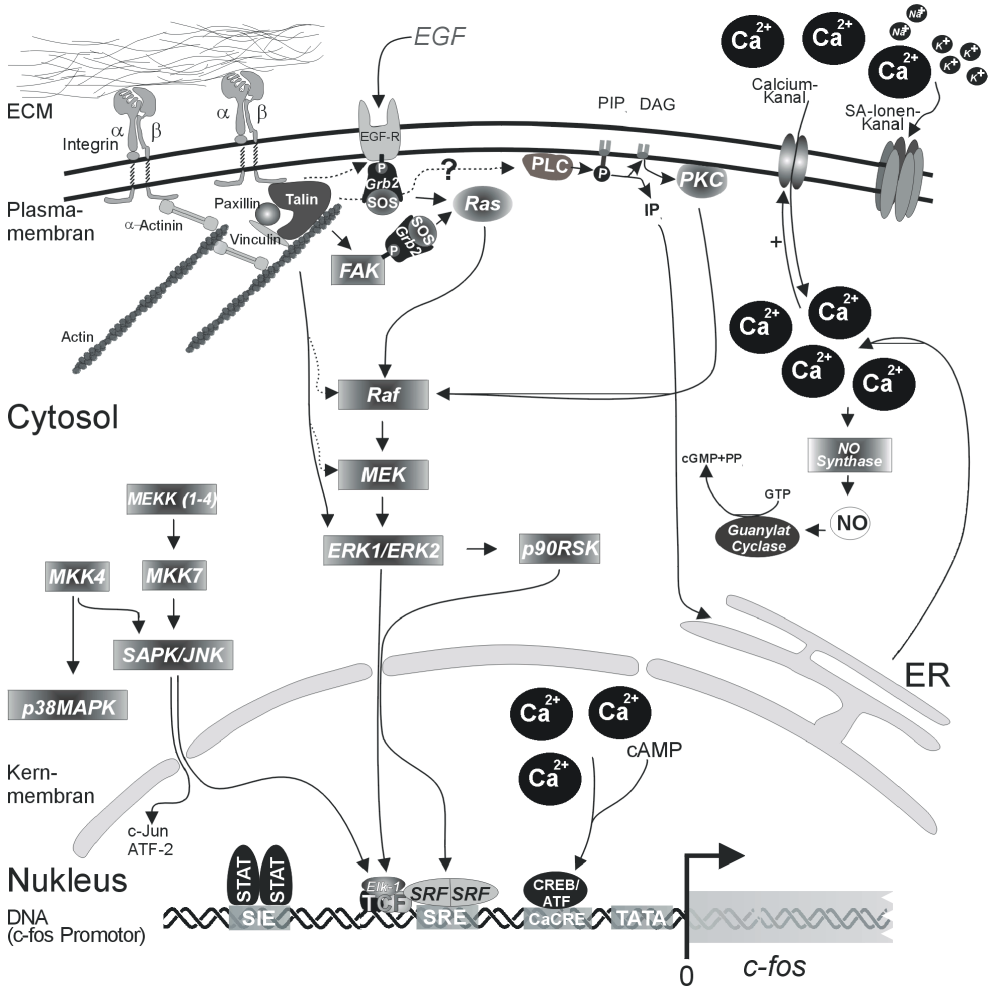

Abbildung 2.4: Übersicht der an der Mechanotransduktion teilhabenden Signalwege: aus [Tenbosch(1999)].

dung 2.4 dargestellt. Auch ohne auf alle Einzelheiten einzugehen, so vermittelt dieser Überblick doch einen Einblick in die Mannigfaltigkeit der Botenstoffe und die Komplexität der Signalwege, die gegenwärtig diskutiert werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass diese Pfade zudem untereinander interagieren, postulierte Duncan [Duncan und Turner(1995)] dass die ganze Zelle selbst als Mechanorezeptor fungiert und dass mehrere Möglichkeiten für die Weiterleitung des mechanischen Reizes an das Zellinnere existieren.

Weiterhin berücksichtigt Duncan [Duncan und Turner(1995)] die Kommunikation der verschiedenen im Knochen vorhandenen Zellen untereinander und vermutet folgenden Mechanismus, der durch mechanische Kräfte ausgelöst wird:

Die mechanischen Belastungen in vivo erzeugen eine Deformation des Knochens. Diese Deformation führt zu einem Druckgradient, der Flüssigkeitsströmungen in den Verbindungskanälen (Canaliculi) der Knochenzellen auslöst (Vgl. Abbildung 2.5). Die Flüssigkeitsströmungen ihrerseits üben Scherspannungen und damit auch Scherkräfte auf die Zellmembran der dort vorhandenen Osteozyten aus [Weinbaum et al.(1994)]. Weinbaum et. al. haben für dieses Modell minimale Scherspannungen von 0,8 $\frac{N}{m^2}$ bis 3 $\frac{N}{m^2}$ (entspricht $8 - 30\frac{dyne}{cm^2}$) berechnet, die zur Aktivierung der Zellen notwendig sind. Für den lebenden Knochen in vivo konnten diese Werte noch nicht bestätigt werden, da geeignete Messverfahren zur Quantifizierung des Flüssigkeitsstromes in den Verbindungskanälen bislang fehlen. Dass Zellen auf Kräfte, die durch Scherspannungen verursacht wurden, reagieren, konnte bei Scherflußexperimenten in Zellkulturen bestätigt werden. Bei Scherspannungen im Bereich von 0,8 $\frac{N}{m^2}$ bis 3 $\frac{N}{m^2}$ wurden Veränderungen der intrazellulären Kalziumdynamik an Osteoblasten beobachtet [Tenbosch(1999), Jacobs et al.(1998)].

Auch bei Untersuchungen an Osteozyten konnte Lean eine Reaktion auf mechanische Belastung nachweisen [Lean et al.(1995)]. Er beobachtete, dass sechs Stunden nach mechanischer Belastung eines Rattenknochens

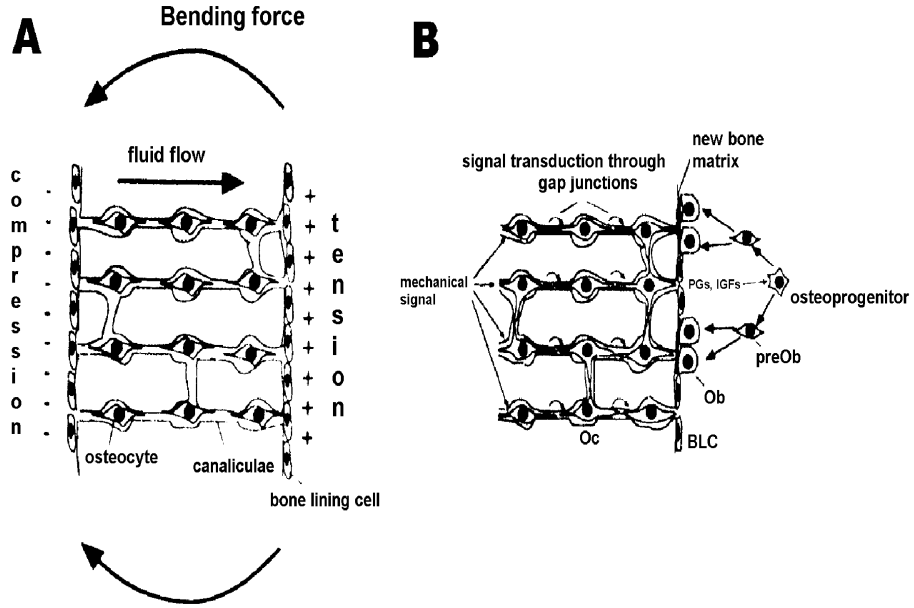

Abbildung 2.5: Vorgänge im Knochenkortex bei mechanischer Belastung. (A) Eine Biegung des Knochens führt zu einer Kompressionsspannung auf der einen, und zu einer Zugspannung auf der anderen Seite. Ein resultierender Druckgradient in den Verbindungskanälen (Canaliculi) treibt Flüssigkeit von der Seite der Kompression zur Seite der Zugspannung. Der Flüssigkeitsstrom überströmt die Osteozyten und versorgt sie dadurch mit Nährstoffen. Ein zweiter Effekt ist die Entstehung einer Scherkraft an der Zellmembran. Der physiologische Wert dieser Scherspannung liegt nach einem Modell von Weinbaum bei $0,8 - 3,0\ \frac{N}{m^2}$ (entspricht $8 - 30 \frac{dyne}{cm^2}$) [Weinbaum et al.(1994)]. (B)Vorgeschlagener Signalweg nach einem mechanischen Stimulus: Osteozyten übertragen das Signal über Verbindungskanäle (gap junctions) zu den Vorläuferzellen (Bone lining cell), die wiederum Signale, wie zum Beispiel Wachstumshormone an Nachbarzellen aussenden und damit freie Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) stimulieren, sich an die Knochenhaut anzulagern, sich zu teilen und zu Osteoblasten zu differenzieren, die dann Knochenmatrix produzieren. Aus:[Duncan und Turner(1995)].

in den Osteozyten höhere Werte des Wachtumshormons IGF 1 (Insulin like Growth Faktor) zu messen waren. 48 Stunden nach der Belastung konnte er eine Freisetzung von Ausgangsstoffen der Knochenhartsubstanz (Kollagen und Osteocalcin) an der Knochenoberfläche feststellen. Diese Anlagerung von Kollagen und Osteocalcin sind wichtige Prozesse bei der Knochensynthese und zeigen, dass die mechanische Belastung zum Knochenaufbau führt. Diese aktive Produktion von knochenaufbauenden Stoffen nach mechanischer Belastung ist insbesondere bei früh entwickelten Osteozyten zu beobachten [Mikuni-Takagaki(1999)]. Wenn die Osteozyten in die Knochenmatrix eingebettet sind geht die Sensitivität zurück. Da früh entwickelte Osteozyten aus Osteoblasten hervorgehen, bleibt ihnen vermutlich die Fähigkeit, auf mechanische Reize zu reagieren, erhalten.

2. Signalweiterleitung: Osteoblasten, Osteozyten und osteogene Vorläuferzellen können als Sensor fungieren und die Signale über interzelluläre Verbindungskanäle *(gap junctions)* an andere Zellen weiterleiten. Im Falle des mechanosensitiven Knochens könnten nach der These von Duncan et al. [Duncan und Turner(1995)] Osteozyten dabei durch die Wahrnehmung der Flüssigkeitsströmung eine mechanische Belastung registrieren und diese Information über gap junctions zu den Vorläuferzellen (Bone lining cells) weitergeben, die ihrerseits beispielsweise durch Wachstumsfaktoren Osteoblasten zur Teilung und nachfolgender Knochenmatrixproduktion anregen.

3. effektive Zellantwort: nach der biomechanischen Aktivierung von Zellen und der Signalweiterleitung kommt es zur effektiven Zellantwort. Die aktivierten Osteoblasten produzieren Knochenmatrix und bauen so Knochensubstanz auf.

Wir haben drei mögliche Schritte bei der Wahrnehmung, Weiterleitung und Umsetzung äußerer mechanischer Kräfte kennengelernt: die biomechanische Kopplung, die Signalweiterleitung und die effektive Zellantwort. Da die hier diskutierten Prozesse auf zellulärer Ebene stattfinden können, statt Experimenten im Gesamtorganismus, hier Experimente in Zellkultur zur Aufklärung der fundamentalen Fragen der Signalwahrnehmung beitragen. Aus diesem Grund wurden die Experimente, die in dieser Arbeit vorgestellt werden an Zellkulturen durchgeführt. Da reife Osteozyten sich nicht mehr teilen und die Freisetzung von Osteozyten aus Knochen schwer möglich ist, konzentrieren wir uns in dieser Arbeit auf Untersuchungen an Osteoblasten, die sich aus der Haut (Periost) der Knochen freisetzen lassen. Eine Übertragung der so gewonnenen Ergebnisse auf Osteozyten darf aufgrund ihrer starken Ähnlichkeit (Osteozyten gehen aus Osteoblasten hervor) vollzogen werden.

Nun stellt sich die Frage, wie sich solche Prozesse untersuchen lassen und wie wir detailliertere Informationen zur z.B. zeitlichen Dynamik gewinnen können. Von besonderem Interesse sind dabei sehr frühe und zeitlich schnelle Zellreaktionen, denen dann später die Aktivierung von Genen (Minuten bis Stunden) und die Herstellung von Knochenmatrix (Stunden bis Tage) folgt. Die erste Reaktion der Zelle, nämlich die Aktivierung des Mechanorezeptionsmechanismus ist experimentell nicht oder zumindest schwer zugänglich, da weder Aussehen, noch Ort, noch die Funktionsweise des direkten Rezeptors (*"first messenger"*) bekannt ist. Experimentell einfacher zu untersuchen ist der durch den Rezeptor freigesetzte Botenstoff (*"second messenger"*). Da in vielen Zellen Kalzium-Ionen eine wichtige Rolle als "second messenger" Botenstoff spielen, werden wir im nächsten Kapitel auf die intrazelluläre Kalziumdynamik näher eingehen.

2.5 Intrazelluläre Kalziumdynamik

Kalzium-Ionen regeln viele zelluläre Prozesse, wie zum Beispiel die Befruchtung, die Fortpflanzung, die Kontraktion (z.B. bei Muskeln) und neuronale Signalweiterleitung [Clapham(1995), Putney(1998), Berridge et al.(1998), Berridge(1997), Berridge(1993), Rottingen und Iversen(2000)]. Bei all diesen Prozessen verwenden die Zellen Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) als Botenstoffe, um beispielsweise Informationen an den Zellkern zu übermitteln. $Ca^{2+}-$Ionen sind für alle Zellarten lebensnotwendig. Da $Ca^{2+}-$Ionen nicht metabolisiert werden können, regeln Zellen die Kalziumkonzentration sehr präzise mit Hilfe einer Vielzahl von Bindungsproteinen und spezialisierten Transportproteinen. Typische intrazelluläre $Ca^{2+}-$Ionenkonzentrationen liegen im Bereich von $100\frac{nmol}{l}(= 100nM)$. Damit liegt die Konzentration um den Faktor 20000 niedriger als im extrazellulärem Raum ($2mM$).

Es gibt verschieden Mechanismen, durch die es zu einem temporären intrazellulären Kalziumanstieg im Zytoplasma kommen kann. Kalzium kann entweder von außen in die Zelle eindringen oder von internen Speichern freigesetzt werden. Dabei tritt Kalzium entweder durch die äußere Zellmembran ins Zellinnere, da die extrazelluläre Kalziumkonzentration um ein vielfaches höher ist als die intrazelluläre Konzentration oder es wird von intrazellulären Speichern freigesetzt. Als interner Kalziumspeicher ist das endoplasmatischen Retikulum (ER) bekannt, das über Ionenkanäle Kalzium ins Zytoplasma freisetzen kann.

In Bezug auf die Kalziumfreisetzung unterscheidet man zwei Mechanismen in Zellen. Zellen, die durch spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle, einen rapiden Ca^{2+}-Anstieg erlauben bezeichnet man als erregbare Zellen (*engl. excitable cells*). Die wichtigsten Vertreter erregbarer Zellen sind Nerven [Ghosh und Greenberg(1995)] und Muskelzellen [Nelson et al.(1995), Tsugorka et al.(1995)].

Zu den nicht über spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle erregbaren

Zellen (*non excitable cells*) gehören z.B. Blutzellen, Endothelzellen [Malek und Izumo(1996), Ishida et al.(1997), Barbee et al.(1994), Ando et al.(1994)] und auch die von uns untersuchten Knochenzellen. Eine Kalzium-Antwort wird hier häufig durch den wasserlöslichen Botenstoff Inositol (1,4,5)-trisphosphat (*IP3*) vermittelt. Die Signalkaskarde einer möglichen Ca^{2+}-Freisetzung war bereits in Abbildung 2.4 aufgeführt. Der entsprechende Ausschnitt ist in Abbildung 2.6 vergrößert dargestellt. Die Signalkaskarde läuft folgendermassen ab: ein externes Signal löst über verschiedene Mechanismen (z.B. die Freisetzung bestimmter Proteine (G-Protein)) die Aktivierung des in der Zellmembran lokalisierten Proteins, der Phospholipase C (PLC) aus. Dieses aktivierte Protein wirkt dann in Form eines Katalysators auf eine chemische Reaktion ein, bei der ein Fett der Zellmembran in Inositoltriphosphat (*IP3*) und Diazylglyzerin umgewandelt wird. *IP3* ist ein wasserlösliches Protein, das von der Zellmembran ins Zellinnere diffundiert. Es wirkt hauptsächlich, indem es Kalzium aus dem endoplasmatischen Reticulum, also aus den intrazellulären Speichern, freisetzt. Das freigesetzte Kalzium kann nun Proteine aktivieren, was zu einer Antwort der Zelle, z.B. den Aufbau von Knochensubstanz führt. In einigen Veröffentlichungen wurde auch bei nicht erregbaren Zellen ein Öffnen von Ionenkanälen beobachtet [Naruse und Sokabe(1993), Morris(1990), Duncan et al.(1998)].

Wir haben gesehen, dass Kalzium eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signalweiterleitung spielt. Nun stellt sich jedoch die Frage, ob es nach mechanischer Belastung tatsächlich zu einer Aktivierung des Botenstoffs Kalzium kommt. Wenn ja, wie schnell vollzieht sich die Aktivierung und welcher Dynamik folgt sie? Welche Kräfte sind nötig, um Knochenzellen zu stimulieren?

Zur Beantwortung dieser Fragen müssen wir eine geeignete Methode anwenden, um die Kalziumdynamik an lebenden Zellen untersuchen zu können. Im folgenden Kapitel werden wir Farbstoffe vorstellen, die durch Verände-

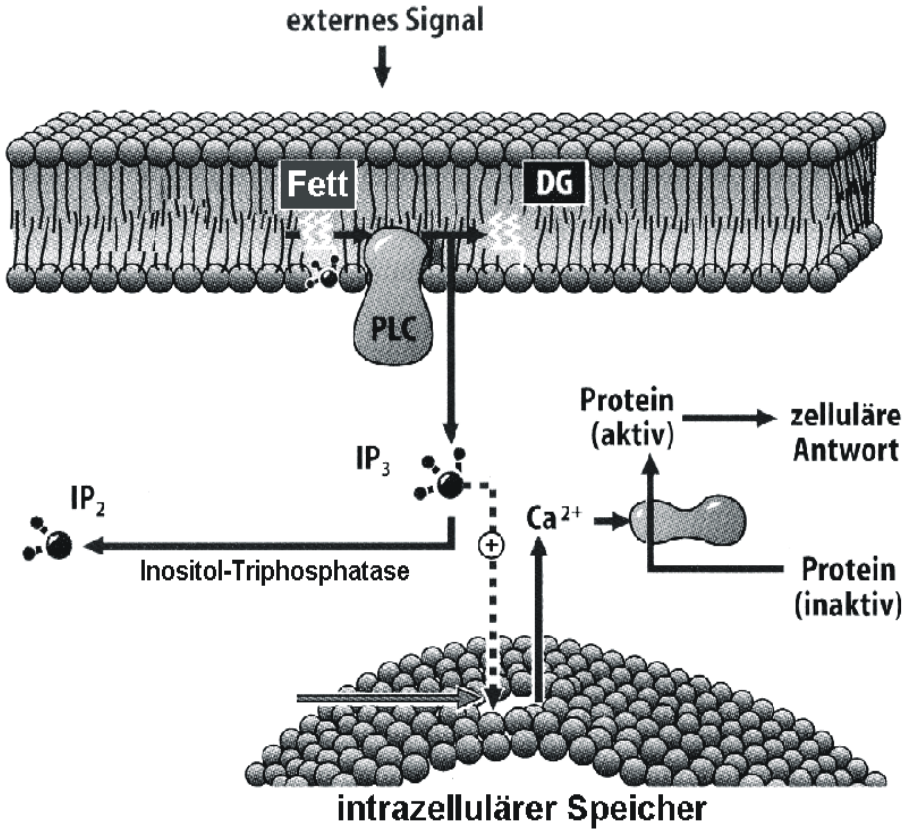

Abbildung 2.6: Übersicht eines intrazellulären Signalweges: Ein externes Signal (z.B. ein mechanischer Reiz) aktiviert Phospholipase C (PLC) diese setzt Inositoltriphosphat frei, das seinerseits intrazelluläre Calcium Speicher öffnet. Die freigesetzten $Ca^{2+}-$Ionaktivieren ein Protein, und führen so zu einer zellulären Antwort.

rung ihrer optischen Eigenschaften in der Lage sind, Kalziumveränderungen im Inneren lebender Zellen sichtbar zu machen.

3 Kalzium bindende Farbstoffe

Die Entwicklung neuartiger Fluoreszenzfarbstoffe hat maßgeblich zum besseren Verständnis der Strukturen und Prozesse in der Zellbiologie beigetragen. Zum einen können spezifischen Strukturen, wie z.B. das Zytoskelett, gezielt eingefärbt und damit sichtbar gemacht werden. Zum anderen können dynamische Prozesse untersucht werden. Die Visualisierung dynamischer Veränderungen in lebenden Zellen ermöglicht einen genaueres Verständnis intrazellulärer Abläufe, die von äußeren Reizen ausgelöst oder beeinflusst werden.

Wir haben die dynamische Fluoreszenzspektroskopie eingesetzt, um intrazelluläre Veränderungen infolge mechanischer Belastung zu untersuchen. Bereits Kapitel 2.5 hat gezeigt, dass $Ca^{2+}-$Ionen eine wichtige Rolle bei intrazellulären Prozessen spielen. Aus diesem Grund verwendeten wir kalziumsensitive Fluoreszenzfarbstoffe, die in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden [Tsien und Pozzan(1989)].

3.1 Der Kalzium-bindende Farbstoff Fura-2

Dynamische Messungen der intrazellulären Kalziumdynamik wurden erstmals möglich durch die Entwicklung kalziumbindender Fluoreszenzfarbstoffe wie Quin-2 [Tsien und Pozzan(1989)] und später Indo-1 (siehe Kapitel 3.3) und Fura-2 [Grynkiewicz et al.(1985)] [Tsien et al.(1985)]. Quin-2 ändert seine Fluoreszenzintensität unter Anwesenheit von freien $Ca^{2+}-$Ionen und wird daher als Einzel-Wellenlängen-Farbstoff bezeichnet. Der verbesserte Farbstoff Indo-1 wird als Zwei-Wellenlängen-Farbstoff bezeichnet. Er

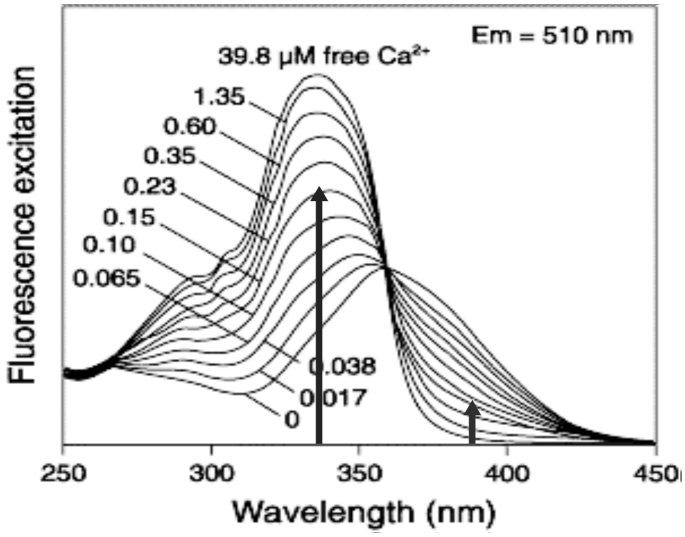

Abbildung 3.1: Absorptionsspektrum von Fura-2 (*Molecular Probes, USA*).

wird bei *einer* Wellenlänge ($355nm$) angeregt und zeigt eine Verschiebung des Emissionsmaximums von $480nm$ (ohne freie $Ca^{2+}-$Ionen) auf $405nm$ (bei $1\mu M$ freier $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration). Hingegen zeigt der am weitesten verbreitete Zwei-Wellenlängen-Farbstoff Fura-2 eine Verschiebung der Absorptionseigenschaften. Abbildung 3.1 zeigt das Absorptionsspektrum für Fura-2. Das Maximum der Anregungsintensität verschiebt sich von $363nm$ für $Ca^{2+}-$Ionfreien Farbstoff auf $335nm$ für Kalzium gebundenen Farbstoff. Die Wellenlänge des Emissionsmaximums ist unabhängig von der $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration. Der höchste Dynamikbereich für Ca^{2+} - abhängige Konzentrationsmessungen wird für Anregung bei $340nm$ und $380nm$ und Detektion bei $510nm$ erzielt. Dabei alterniert die Wellenlänge des Anregungslichtes mit einer Periodendauer von $80ms$ zwischen $(340 \pm 10)nm$ und $(380 \pm 10)nm$. In unseren Experimenten wurde die vom Farbstoff emittierte Fluoreszenz bei $(510 \pm 40)nm$ mit einer intensivierten Kamera aufgezeichnet. Das Transmissionsspektrum des dazu verwendeten Emissions-

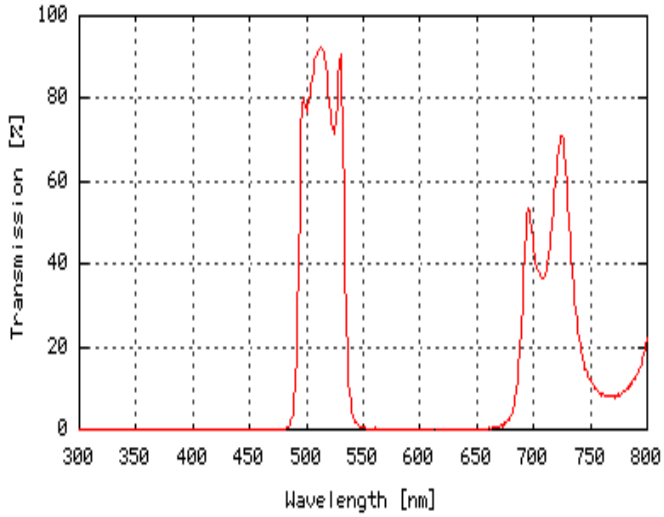

Abbildung 3.2: Transmissionsspektrum des Emissionsfilters 510WB40 (XF3043) (*Omega Optical*).

filters 510WB40 (*Iomega Optical, USA*) ist in Abbildung 3.2 dargestellt. Wird im Anschluss das Verhältnis der beiden Fluoreszenzintensitäten berechnet, so zeigt sich der entscheidende Vorteil dieser Zwei-Wellenlängen-Farbstoffe im Vergleich zu den Ein-Wellenlängen Farbstoffen. Die beim Ein-Wellenlängenfarbstoff störenden Einflüsse des Streulichts, der Dickenvariation der Zellen, der Farbstoffmenge, der Diffusion, des Ausbleichens und der instrumentellen Empfindlichkeit können nahezu eliminiert werden, da sie durch Quotientenbildung weitestgehend herausgerechnet werden können. Somit lässt sich - eine entsprechende Kalibrierung vorausgesetzt - die intrazelluläre $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration quantifizieren. Im folgenden Abschnitt wird ein entsprechendes Verfahren, das von uns verwendet wurde, vorgestellt.

3.2 Ca^{2+}-Kalibrierung bei Fura-2

Eine Kalibrierung des Farbstoffes zur quantitativen Bestimmung der $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration kann erfolgen, indem die freie Salzform des Indikatorfarbstoffs in eine zellfreie Lösung genau bekannter $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration gegeben wird. Dabei muß die Kalibrationslösung der späteren experimentellen Umgebung möglichst ähnlich sein, da die Kalzium-Affinität des Farbstoffs von vielen Faktoren abhängig ist. Zu diesen zählen der pH-Wert, die Viskosität, die Temperatur, die Konzentration von Proteinen und Ionen. Um eine reproduzierbare Quantifizierung der $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration zu erzielen, verwendeten wir ein fertiges Kalibrationsset (Calcium Calibration Buffer Kit C-6775, *Molecular Probes, USA*). Es enthält elf fertig angesetzte Lösungen mit $Ca^{2+}-$Ionenkonzentrationen von $1\mu M$ bis $1mM$. Das diesem Kalibrationsset zugrunde liegende "in vitro" Verfahren ist von Tsien entwickelt worden [Tsien und Pozzan(1989)]. Wir haben unser System entsprechend kalibriert. Dazu wurden die Proben gemäß der Vorschrift des Herstellers präpariert, und es wurden zu jeder $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration je ein Satz Fluoreszenzbilder sowie das Verhältnisbild abgespeichert. In Abbildung 3.3 ist das Verhältnis (Ratio) der Fluoreszenz zu den beiden Anregungsintensitäten gegen die Kalziumkonzentration aufgetragen. Nach der Kalibration können die Intensitätsverhältnisse über die folgende Formel in die freie $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration umgerechnet werden:

$$[Ca^{2+}] = K_d Q \frac{(R - R_{min})}{(R_{max} - R)} \tag{3.1}$$

R ist das Verhältnis (Ratio) der Fluoreszenzintensitäten F_{340}/F_{380} zur Anregung bei $340nm$ und $380nm$. Q ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten F_{min380}/F_{max380} (bei minimaler und maximaler $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration) gemessen bei einer Anregungswellenlänge von $380nm$. K_d ist die Dissoziationskonstante des Farbstoffs. Zur Kalibrierung des Farbstoffes ist al-

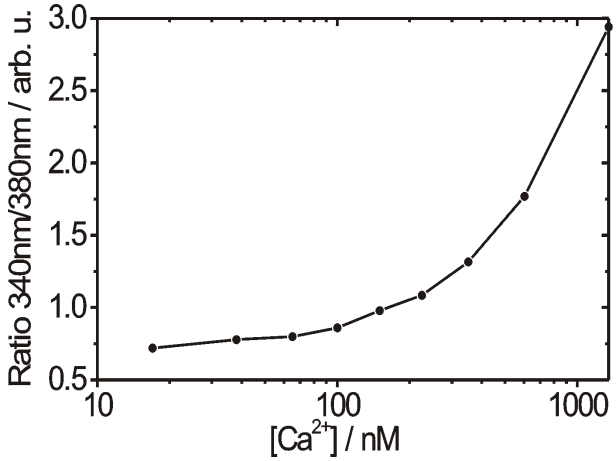

Abbildung 3.3: Kalibrieren des Farbstoffes Fura-2: Für definierte $Ca^{2+}-$Ionenkonzentrationen ist das ermittelte Verhältnis (Ratio) der Fluoreszenz zu den beiden Anregungsintensitäten aufgetragen.

so eine Messung mit einer komplett $Ca^{2+}-$Ionenfreien und einer komplett $Ca^{2+}-$Ionengesättigten Farbstofflösung erforderlich, um daraus die Werte $F_{min380}, F_{max380}, (F_{340}/F_{380})_{min}, (F_{340}/F_{380})_{max}$ zu bestimmen. Weitere Messungen mit bekannten $Ca^{2+}-$Ionenkonzentrationen ermöglichen dann die Bestimmung von K_d.

Im folgenden Kapitel werden wir einen weiteren Zwei-Wellenlängen-Farbstoff vorstellen, der statt des Absorptions- sein Emissionsverhalten bei Kalzium Anwesenheit ändert.

3.3 Der Kalziumfarbstoff Indo-1

Neben dem im Kapitel 3.1 beschrieben Farbstoff Fura-2 gibt es noch einen weiteren Zwei-Wellenlängen-Farbstoff Indo-1, der zur Untersuchung der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration eingesetzt werden kann. Er wird im Vergleich zu Fura-2 nur bei einer Wellenlänge im ultravioletten (UV)

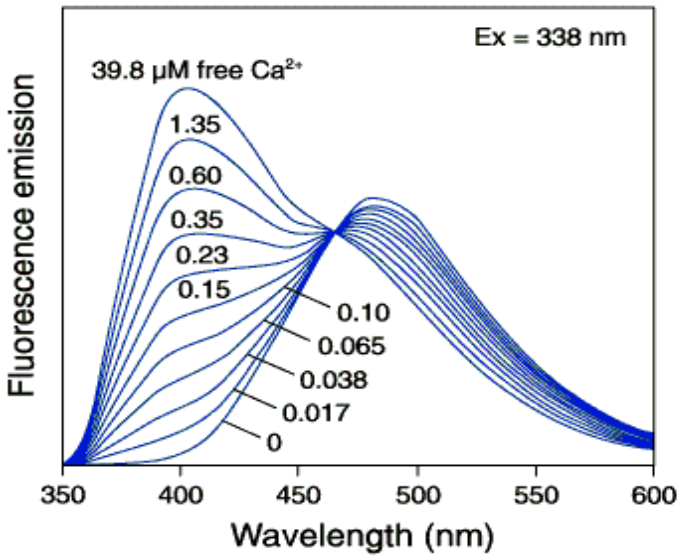

Abbildung 3.4: Emissionsverhalten von Indo-1 bei verschiedenen $Ca^{2+}-$Ionenkonzentrationen (*Molecular Probes*).

Spektralbereich bei $345nm \pm 10nm$ angeregt. Des Maximum der Emission jedoch verschiebt sich von $480nm \pm 10nm$ (ohne freie $Ca^{2+}-$Ionen) auf $405nm \pm 10nm$ ($1\mu M$ freie $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration), so dass die Fluoreszenz bei diesen zwei Wellenlängen beobachtet werden muss. Abbildung 3.4 zeigt das Emissionsspektrum für freie $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration von $0-39,8\mu M$. Wie das folgende Kapitel zeigt, ermöglichen membranpermeable Derivate dieser Farbstoffe (Acetoxymethylester) ein problemloses Einbinden des Farbstoffes ins Zellinnere [Tsien(1981)].

3.4 Zellfärbung mit Fura-2 bzw. Indo-1

Zur Färbung der Zellen mit den kalziumsensitiven Farbstoffen Fura-2 bzw. Indo-1 verwendeten wir eine Esterfärbetechnik, die von Tsien et al.

[Tsien(1981)] beschrieben wurde. Nach Zugabe des zellpermeablen Esterfarbstoffs (Fura-2 AM bzw. Indo-1 AM) auf das Medium der Zellen diffundiert dieser Farbstoff durch die Zellmembran und wird von intrazellulären Esterasen umgewandelt (hydrolisiert). Dabei geht er in die kalziumsensitive Form über, die nach ihrer Umwandlung die Zellmembran nicht mehr passieren kann. Durch Akkumulation wird eine intrazelluläre Farbstoffkonzentration von ca. $50\mu M$ erreicht.

Wir erzielten die besten Färbungen durch Zugabe einer Farbstoffkonzentration im Bereich von $1-10\mu M$ und bei einer Inkubationszeit von ca. 60 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Färbung verwendeten wir FCS-freies (ohne fetales Kälberserum) Medium. Zur Entfernung extrazellulärer Farbstoffreste wurden die Zellen im Anschluss gewaschen und dann für die Experimente eingesetzt. Als Versuchsmedium wurde HBS, PBS oder HAM's Hepes ohne FCS [Tenbosch(1999)] verwendet.

Mit Hilfe dieser Färbetechnik und der Ca^{2+}-sensitven Farbstoffe besteht nun die Möglichkeit zelluläre Reaktionen in Echtzeit zu beobachten. In den folgenden Kapiteln werden wir intrazelluläre Ca^{2+}-Veränderungen an Zellen untersuchen, die einerseits der Schwerelosigkeit und andererseits einer direkten mechanischen Stimulation ausgesetzt werden.

4 Die Kalziumdynamik in Schwerelosigkeit

Längere Aufenthalte in Schwerelosigkeit führen zu einer Veränderung des Knochens. Bereits bei den ersten Apollo-Missionen wurde ein massiver Knochenverlust am Skelett der Astronauten beobachtet [Rambaut und Johnston(1979)]. Weitere Untersuchungen in Schwerelosigkeit zeigten eine Veränderung der Knochendichte und der Knochensynthese [Morey und Baylink(1978), Wronski und Morey(1983), Matsumoto et al.(1998)].

Auf zellulärer Ebene konnte bei diesen Untersuchungen eine Reduktion der Teilungsrate bei Osteoblasten [Carmeliet et al.(1997)] sowie eine Veränderung der Expression von Genen beobachtet werden [Bikle et al.(1994), Carmeliet et al.(1998)]. Diese Experimente ließen jedoch keinen Rückschluss auf einen möglichen Gravitationssensor auf zellulärer Ebene zu.

Ob und wie diese beobachteten Veränderungen des Zellverhaltens in Schwerelosigkeit mit dem wichtigen zellulären Botenstoff Kalzium in Verbindung stehen, ist bislang noch nicht untersucht worden. Bekannt ist lediglich, dass Osteoblasten auf mechanische Belastung mit einem Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration reagieren (vgl. Kapitel 5.5.4).

Um die Frage zu klären, ob der gleiche oder ein ähnlicher Mechanismus unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit abläuft, wurden im Rahmen dieser Arbeit Zellexperimente zur Kalziumdynamik in Schwerelosigkeit durchgeführt.

Wie der Zustand der Schwerelosigkeit erzielt werden konnte, wird im folgenden Kapitel beschrieben.

4.1 Mikrogravität bei Parabelflügen

Folgt ein Flugzeug mit seiner Flugbahn einer Wurfparabel, so heben sich die resultierenden Kräfte im Bezugssystem des Flugzeuges gegenseitig auf. Ein im Flugzeug befindlicher Beobachter empfindet dann den Zustand der Schwerelosigkeit. Die Flugparabel muss so geflogen werden, dass die auftretenden Beschleunigungskräfte die Gravitationskräfte exakt kompensieren. Ein Beispiel für eine solche Flugparabel ist in Abbildung 4.1 skizziert. Das Flugzeug wird nach Erreichen einer Flughöhe von $7200m$ in einen dynamischen Steigflug überführt, bis ein Neigungswinkel von 50° erreicht wird. Die dabei auftretenden, senkrecht zur Flugzeugsachse stehenden Beschleunigungen betragen $1,7\frac{m}{s^2}(1,8g)$ für eine Dauer von ca. $20s$. Bei einem Neigungswinkel von $+50^o$ in ca. $8400m$ wird der eigentliche Parabelflug eingeleitet, in dem für ca. $22s$ der Zustand der Schwerelosigkeit auftritt. Dabei wird jede der drei Flugzeugachsen von drei Piloten separat mit Beschleunigungssensoren überwacht. Die auftretenden Beschleunigungen werden durch Steuerbewegungen korrigiert und der Luftwiderstand wird durch entsprechende Triebwerksleistung kompensiert. Nach Erreichen des Neigungswinkels von -50° wird ein zweites Mal eine Hypergravitationsphase von 20 Sekunden mit Beschleunigungen von $1,7\frac{m}{s^2}(1,8g)$ durchflogen. Dieses Flugprofil wird von einem speziell zu diesem Zweck umgebauten Airbus A-300 (Zero-g) im Auftrag der europäischen Weltraumorganisation ESA (European-Space-Agency) in Zusammenarbeit mit der französischen Novespace geflogen. Diese Flüge starten vom französischen Flughafen Bordeaux. Je Flug wurden 31 Parabeln geflogen.

Ein herkömmliches invertiertes Fluoreszenzmikroskop (s. Kapitel 5.3), war unter den experimentellen Bedingungen, wie sie im Rumpf des Flugzeuges herrschen, nicht einsetzbar. Da entsprechend robuste Systeme kommerziell nicht verfügbar waren, wurde ein eigenes Fluoreszenzsystem aufgebaut, das in der Lage ist, mit Hilfe des Farbstoffs Indo-1 dynamisch intrazellulä-

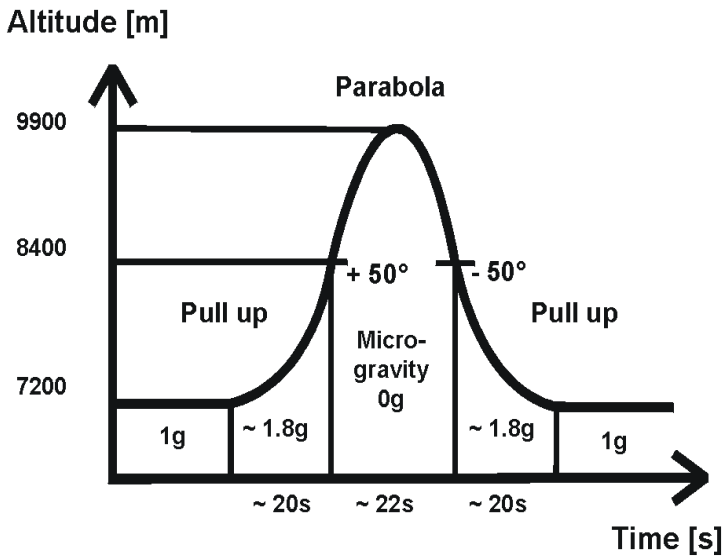

Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Flugprofils zur Erzeugung von Schwerelosigkeit.

re Konzentrationsänderungen der Kalzium-Ionen während der verschiedenen Flugphasen zu beobachten. Das für diese Experimente von uns entwickelte Fluoreszenzphotometersystem wird im folgenden Kapitel beschrieben.

4.2 Das Fluoreszenzphotometer

Das für die Parabelflüge entwickelte Fluoreszenzsystem bestand aus drei Einheiten: Der Lichtquelle, der Zellkammer und der Detektoreinheit. Das System wurde speziell für die Bedingungen in Schwerelosigkeit konstruiert und ist daher kompakt, effizient und sehr zuverlässig [Struckmeier et al.(2000)]. Kommerzielle Systeme waren für Experimente in Parabelflügen nicht geeignet, da sie üblicherweise teure und empfindliche Hochdruck Xenon- oder Quecksilberdampflampen verwenden. Aus diesem Grund wurde als Schlüs-

selkomponente unseres kostengünstigen Systems eine Lichtquelle entwickelt, die aus Halbleiterbauelementen bestand. Sowohl Leuchtdioden als auch Laserdioden kamen hier prinzipiell als lichtemittierende Halbleiterbauelemente in Frage. Beide sind extrem klein, robust, kosteneffizient und lassen sich durch Modulation des Stromes in ihrer Lichtintensität steuern. Dennoch stehen bislang keine Leucht- und Laserdioden mit einer Emissionswellenlänge von $343nm$ kommerziell zur Verfügung.

Um jedoch auf die Vorzüge der Halbleiterbauelemente nicht verzichten zu müssen, bedienen wir uns des Prinzips der nicht-linearen Frequenzverdopplung. Mit Hilfe dieses Prinzips kann im nicht-linearen Kristall ein Teil des Laserlichtes in Laserlicht der doppelten Frequenz, also der halben Wellenlänge umgewandelt werden. Verwenden wir rote Laser, so können wir damit eine Lichtquelle im ultravioletten Spektralbereich entwickeln. Laserdioden mit hohen optischen Ausgangsleistungen (>50mW) im roten Spektralbereich sind kommerziell verfügbar. Wir verwendeten eine Laserdiode mit einer Emissionswellenlänge von $685nm$ in Kombination mit einem nicht-linearen Kristall, um auf diese Weise Licht der halben Wellenlänge bei $343nm$ zu erzeugen. Als Material für den nicht-linearen Kristall wurde Lithiumjodat ($LiJO_3$) gewählt, da es im Vergleich zu anderen verfügbaren nicht-linearen Kristallen die höchsten nicht-linearen Koeffizienten besaß, gleichzeitig im ultravioletten Spektralbereich transparent war und somit in unserer Anwendung optimal eingesetzt werden konnte. Um das Eindringen von Wasser in den hygroskopischen Kristall zu verhindern, wurde der Kristall unter Schutzatmosphäre in einer gasdichten Kammer montiert. Sowohl der Kristall als auch die Glasfenster der Kammer wurden speziell beschichtet, um Reflexe für das eingestrahlte fundamentale Licht bei $685nm$ und für das bei $343nm$ erzeugte ultraviolette Licht zu verhindern. Wir setzten eine Laserdiode mit einer Emissionswellenlänge von $685nm$ und einer optischen Ausgangsleistung von $50mW$ ein. Die Laserdiode wurde temperaturstabilisiert und die optische Ausgangslei-

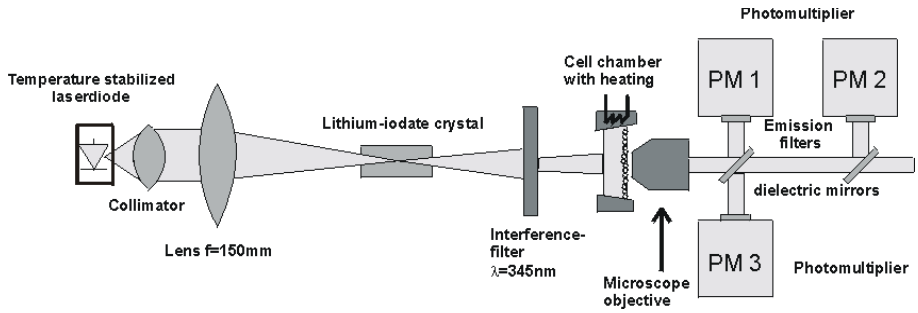

Abbildung 4.2: Fluoreszenzphotometersystem für den Farbstoff Indo-1 zur Untersuchung der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration.

stung konstant gehalten. Dazu wurde die in das Lasergehäuse eingebaute Fotodiode ausgelesen und so mit Hilfe einer Regelelektronik die Ausgangsleistung konstant gehalten. Die Regelelektronik ermöglicht zudem ein Pulsen der optischen Ausgangsleistung. Der Ausgangsstrahl der Diode wurde kollimiert (Brennweite $f = 2,75mm$, Numerische Apertur $NA = 0,65$) und in den nichtlinearen Kristall (Länge $l = 15mm$) mit einer zweiten Linse ($f = 150mm$) fokussiert (s. Abbildung 4.2). Ein nachgeschaltetes Interferenzfilter ist nur im ultravioletten Spektralbereich transparent.

Das so ausgekoppelte UV Licht gelangte in die Zellkammer, welche die lebenden Knochenzellen enthielt. Die Kammer bestand aus rostfreiem Edelstahl und war mit Leitungen versehen, die eine Zufuhr von Nährmedien, Sauerstoff und chemischen Stoffen erlaubten. Die Unterseite der Kammer enthielt ein Deckgläschen (Dicke $0,16mm$), auf der die Zellen kultiviert wurden. Die Oberseite der Kammer wurde ebenfalls mit einer Dichtung und einem Deckgläschen verschlossen. Ein mikroprozessorgesteuertes Heizungssystem stabilisierte die Temperatur in der Zellkammer auf $37,0 \pm 0,1^oC$.

Der Farbstoff Indo-1 erfordert eine Detektion bei den Emissionswellenlängen $405nm$ und $495nm$. Dabei sollten auch sehr schwache Signale noch zuverlässig aufgelöst werden. In diesem Spektralbereich sind Photomulti-

plier die empfindlichsten Detektoren, da von ihnen sogar einzelne Photonen noch nachgewiesen werden können. In unserem Aufbau verwendeten wir drei ultrakompakte Photomultiplier mit entsprechender Elektronik, so dass wir bei niedrigen Fluoreszenzleistungen einzelne Photonen zählen konnten. Wir zeichneten die Intensität der UV Strahlung (Photomultiplier PM3) und Fluoreszenz bei beiden Emissionswellenlängen auf. Aufgrund der mechanischen Belastung während des Flugs kam es zu leichten Schwankungen der Anregungsintensität und damit auch zu Schwankungen der Fluoreszenzintensität. Zur Reduktion dieser Schwankungen wurde die Anregungsintensität simultan zur Fluoreszenz mit dem dritten Photomultiplier (PM3) gemessen und von den beiden Fluoreszenzintensitäten abgezogen. Im Anschluss wurde das Verhältnis der beiden Emissionswellenlängen berechnet. Eine Faltung der so ermittelten Verhältniswerte mit einer vorhergehenden Kalibrierungsmessung ermöglicht eine Quantifizierung der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration. Abbildung 4.3 zeigt ein Foto des Photometersystems wie in Parabelflügen eingesetzt wurde.

4.2.1 Kalibration des Photometersystems

Das Photometersystem ist in der Lage, Fluoreszenzänderungen des Farbstoffs Indo-1 vor, während und nach den Schwerelosigkeitsphasen zu messen. Um von diesen Fluoreszenzänderungen auf die intrazelluläre $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration schließen zu können, mussten wir das System zuvor kalibrieren (vergleichbar mit der Kalibrierung für Fura-2 in Kapitel 3.2). Ein entsprechend vorgefertigtes Kalibrationsset von *Molecular Probes* (Calcium Calibration Buffer Kit No.2 C-3009) wurde von uns verwendet und enthält elf verschiedene Werte für die freie Kalzium-Ionenkonzentrationen ($[Ca^{2+}]_{free} = 0, 17, 38, 65, 100, 150, 225, 351, 602, 1350$ und $39800nM$). Zu diesen Lösungen wurde jeweils die Salzform des Indo-1 Farbstoffes mit einer Konzentration von $9\mu M$ hinzugegeben.

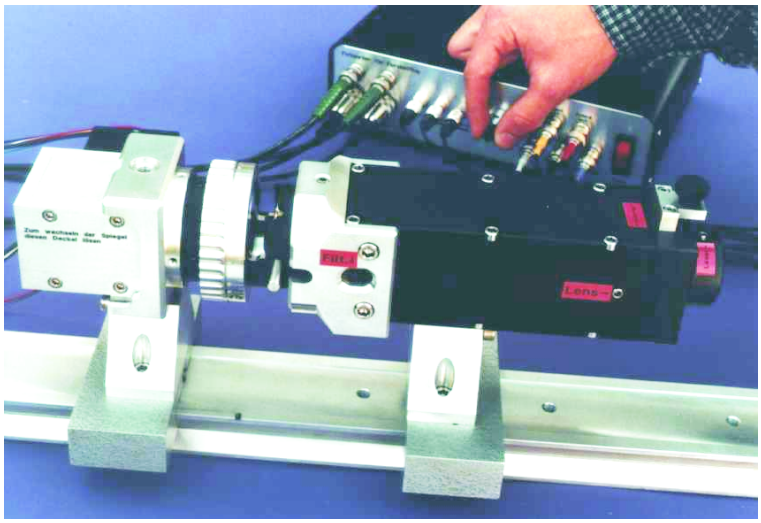

Abbildung 4.3: Foto des in Parabelflügen eingesetzten Fluoreszenzphotometersystem für den Farbstoff Indo-1 zur Untersuchung der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration.

Diese Lösungen wurden in das Photometersystem eingebracht und das Verhältnis der Fluoreszenzintensität (Ratio) bei $405nm$ und $495nm$ gemessen. Eine so gemessene Kalibrierungskurve ist in Abbildung 4.4 dargestellt. Die Fehlerbalken resultieren aus den statistischen Schwankungen der Zählrate. Aus diesen Daten kann die Dissoziationskonstate von Indo-1 nach Formel 3.1 einfach bestimmt werden. Dazu wird in der logarithmischen Darstellung in Abbildung 4.5 der Schnittpunkt der Kurve mit der x-Achse berechnet. In unserem Fall liegt der Schnittpunkt bei $log(-6,37)$. Der Wert der Dissoziationskonstante beträgt demnach: $K_d^{Indo-1} = 426nM$

Ändern sich die Lichtintensitäten der Anregungslichtquelle, beispielsweise durch Justage des nichtlinearen Kristalls, so ist eine neue Kalibration des Systems notwendig. Für feste Einstellungen des Systems liefern aufeinander folgende Messungen den gleichen Kalibrationsfaktor. Für drei aufeinander folgende Kalibrationsmessungen mit einer $1\mu M$ Farbstofflösung sind die ge-

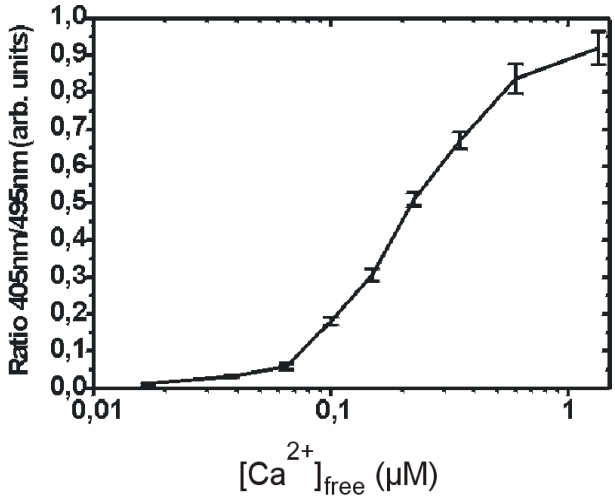

Abbildung 4.4: Kalibrationsmessungen an Indo-1 für jeweils 11 verschieden $Ca^{2+}-$Ionenkonzentrationen.

messenen Werte in Abbildung 4.6 dargestellt. Die Abweichungen der Kurven voneinander liegen innerhalb weniger Prozent und damit innerhalb der Fehlerbalken. Die Kurven zeigen erstens, dass das Photometersystem technisch in der Lage ist, eine Variation der $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration aufzulösen, und zweitens, dass es für aufeinander folgende Experimente reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Die Vergleichbarkeit von $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration in der Kalibrierungslösung mit den $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration in den Zellen setzt einen konstanten pH-Wert, gleiche Ionenstärke und Temperatur voraus. Wir wählten unsere experimentellen Bedingungen so, dass der pH-Wert und die Ionenkonzentrationen, sowie die Temperatur möglichst konstant gehalten wurde. Da diese Parameter im Zellinnern variieren können, müssen Quantifizierungen der $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration jedoch immer kritisch betrachtet werden. Trotz dieser Nachteile ist eine Kalibrierung sinnvoll, da sich Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration auch mit unterschiedlichen experimentellen

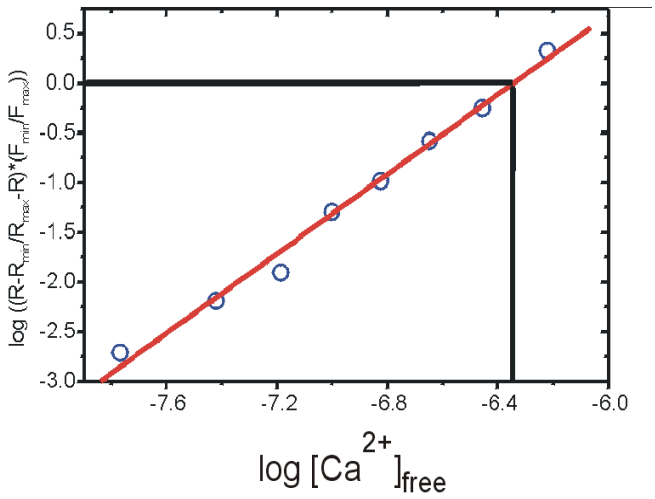

Abbildung 4.5: Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Indo-1 aus der Kalibrationsmessung für 11 verschiedene $Ca^{2+}-$Ionenkonzentrationen.

Aufbauten sowie mit Ergebnissen aus anderen in der Literatur beschriebenen Experimenten leichter vergleichen lassen.

4.2.2 Die Hormonstimulation

Um die Verwendbarkeit des Photometersystems zur Beobachtung der intrazellulären Kalziumantwort zu testen, wurden Knochenzellen mit einem Peptit-Hormon, das aus den Aminosäuren 1-34 des Parathormons (*Calbiochem, USA*) bestand, stimuliert. Nach Zugabe initiiert das Parathormon (PTH) in der Zelle eine durch den Ligand-Rezeptor vermittelte Signalkaskade [Wiltink et al.(1993), van Leeuwen et al.(1988), Fujimori et al.(1991)]. Bei diesem Prozess kommt es zur Bildung von Inositoltriphosphat , das schließlich Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum freisetzt. Wir untersuchten das Verhalten von Osteosarkomazellen und von Osteoblasten

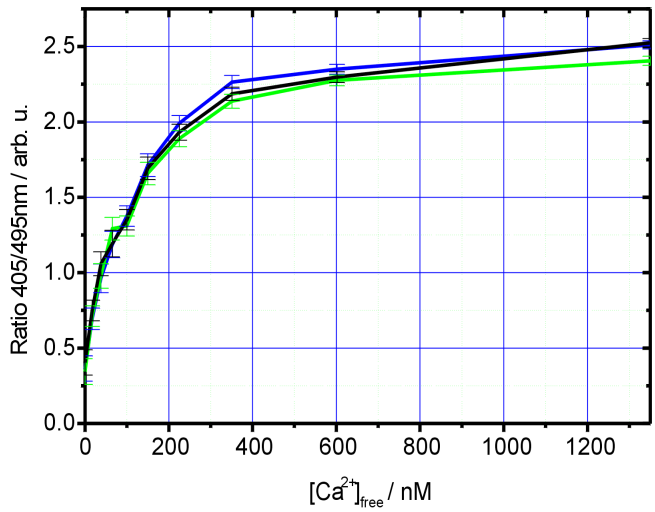

Abbildung 4.6: Drei aufeinander folgende Kalibrierungsmessungen des Photometersystems mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Indo-1 ($1\mu M$).

auf die Stimulation mit dem Parathormon (PTH). Dazu wurden die Zellen auf Deckgläschen mit einer Dichte von $20000 Zellen/cm^2$ ausgesät. Nach 2 Tagen Wachstum wurden sie für $1,5h$ mit $9\mu M$ Indo-1 Esterfarbstoff bei einer Temperatur von 25 ^oC gefärbt und im Anschluß ins Photometersystem eingebaut. Während des Experiments kam als Medium isotonische Hank Salzlösung zum Einsatz, um den pH-Wert konstant zu halten.

Zunächst untersuchten wir die Osteosarkomazelllinie MG-63. Die Vergrößerung des optischen Systems wurde so eingestellt, dass eine Gruppe von ca. 200 Zellen im Detektionsfeld der Photomultiplier lag. Damit beinhalten die aufgezeichneten Fluoreszenzkurven gewissermaßen eine Mittelung über 200 Zellen. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde das Parathormon ($25nM$) über das Versorgungsystem der Zellkammer injiziert. Diese Injektion fand mit niedriger Flußgeschwindigkeit statt, um eine Aktivierung der Zellen durch auftretende Scherkräfte zu verhindern, da ab einer Scherspannung von $2N/m^2 (20 dynes/cm^2)$ eine mechanische Aktivierung der Zelle erfolgen kann.

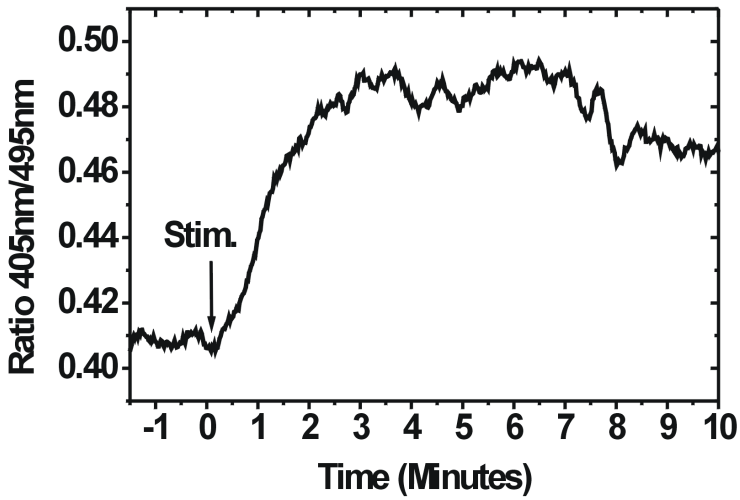

Abbildung 4.7: Dynamik der $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration von Osteosarkomazellen nach Parathormonzugebe gemessen mit dem Photometer-System.

Die Abbildung 4.7 zeigt den Anstieg des intrazellulären Kalziums nach Zugabe des Parathormons. Der Pfeil kennzeichnet den Zeitpunkt, an dem das Parathormon hinzu gegeben wurde. Die Zählraten des Photomultipliers bei $405nm \pm 10nm$ stiegen von 1130 auf 1260 Ereignisse pro Sekunde. Die Zählraten bei $495nm \pm 10nm$ fielen von 2780 auf 2550 Ereignisse pro Sekunde. Als Folge davon stieg der Wert für das Verhältnis um 21% von 0,406 auf 0,493. Mit Hilfe der zugehörigen Kalibrationsmessung aus der Abbildung 4.4 bestimmten wir damit eine Änderung der durchschnittlichen intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration um 16%, also von $188nM$ auf $218nM$.

Als weitere Zelllinie untersuchten wir das Verhalten der Kalziumdynamik von Osteoblasten auf die Stimulation mit dem Parathormon. Die Abbildung 4.8 zeigt einen Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses um $5,2\%$ von 3,26

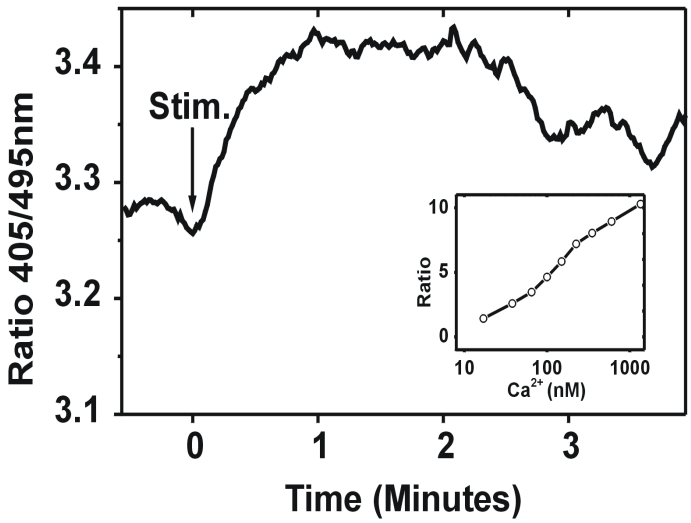

Abbildung 4.8: Dynamik der $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration von Osteoblasten nach Zugabe von Parathormon gemessen mit dem Photometer-System.

auf 3,43 was einer Änderung der $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration um 11% (von $57,2nM$ auf $63,5nM$) entspricht. Die beiden hier exemplarisch aufgeführten Experimente zeigen die prinzipielle Verwendbarkeit der Photometersystems zur Beobachtung intrazellulärer Kalzium-Ionenveränderungen. Im folgenden werden Experimente an Osteoblasten beschrieben, die mit dem Photometersystem in Schwerelosigkeit durchgeführt wurden.

4.2.3 Experimente bei Parabelflügen

Das speziell für Parabelflüge entwickelte Photometersystem wurde im Frühjahr 1999 erstmals bei Erprobungsflügen eingesetzt. Während dieser Flüge wurden Schwankungen der Leistung des Anregungslichtes beobachtet. Aufgrund fehlender Konvektionsströmung während der Schwerelosigkeitsphasen, sowie einer deutlichen Erwärmung des Versuchsaufbaus während

des Flugs, kam es zu Temperaturschwankungen der Laserdiode. Diese führen bei Laserdioden typischerweise zu einer Veränderung der Emissionswellenlänge. Da die Effizienz der Frequenzverdopplung durch den nichtlinearen Kristall aufgrund der Phasenanpassung stark wellenlängenabhängig ist, konnten Temperaturveränderungen Schwankungen des UV-Anregungslichtes auslösen. Zur Reduktion dieser Schwankungen wurde das System verbessert. Dazu wurde die Temperatur des Gehäuses der Laserdiode mit einem Peltier-Heizungssystem stabilisiert. Durch den Einbau eines dritten Photomultipliers konnte die UV-Anregungsleistung simultan gemessen werden und eventuell auftretende Schwankungen aus den Fluoreszenzdaten heraus gerechnet werden.

Nach Umsetzung dieser Verbesserungen wurde im Mai 2000 während der *28th ESA Parabolic Flight Campaign* eine weitere Parabelflugkampagne geflogen. Der Verlauf und Ergebnisse des Flugs werden im folgenden vorgestellt.

4.2.4 Die Kalziumdynamik während der Parabelflüge

Während es Flugs wurde die Beschleunigung (senkrecht zur Flugzeugachse) sowie die Fluoreszenz der Zellen gemessen und aufgezeichnet. Das Verhalten der Zellen sollte unter zwei Gesichtspunkten untersucht werden.

Erstens: Lässt sich während oder unmittelbar nach einer Parabel eine intrazelluläre Kalziumerhöhung beobachten? Zweitens: Reagieren die Zellen während der Parabelflüge auf eine Hormonstimulation? Aus diesem Grund wurde während des Flugs zwischen der 15. und 16. Parabel das Hormon PTH über das Versorgungssystem den Zellen zugeführt. In Abbildung 4.9 sind die Fluoreszenzverhältnisse und die Gravitationsänderungen dargestellt. Der Pfeil kennzeichnet die Hormonzugabe. Direkt nach Zugabe des Hormons lässt sich ein deutlicher Anstieg der Verhältnisse von 1,4 auf 1,9 beobachten. Dieser Anstieg fällt damit deutlicher aus als unter terrestrischen Bedingungen. Auch die Dauer der Antwort von ca. 30 Minuten ist ungewöhnlich lang

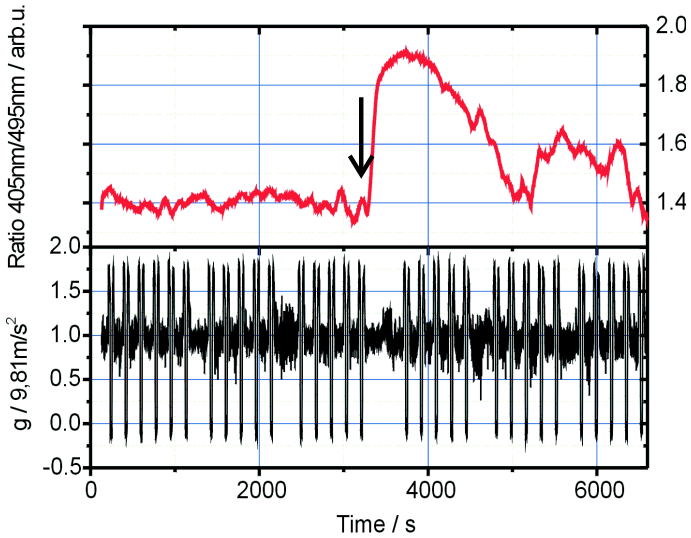

Abbildung 4.9: 3. Flugtag: Aufgetragen ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten und die Beschleunigung gegen die Zeit.

verglichen mit einer terrestrischen Hormonantwort von 3 bis 10 Minuten. Die veränderte Reaktion der Zellen auf das Parathormon könnte auf den Einfluss der Schwerelosigkeit auf die Zellphysiologie zurückzuführen sein.

Eine Frequenzanalyse zeigt eine Oszillation der Fluoreszenzverhältnisse mit einer Periodendauer von 220s. Die Parabeln wurden jeweils in Fünferblöcken geflogen und weisen in den entsprechenden Abschnitten eine Periodendauer von 180s auf. Die Oszillationen lassen sich nicht mit den Parabeln korrelieren und treten auch während der Hormonstimulation auf. Sie liegen in der Größenordnung von 3% und sind damit geringer als Fluoreszenzänderungen, die bei einer bestimmten Stimulation beobachtet worden sind (vgl. Kapitel 4.2.2). Wahrscheinlich sind diese Oszillationen auf Schwankungen der experimentellen Bedingungen zurückzuführen, wie beispielsweise eine Regelschwingung der Temperaturstabilisierung.

In unseren Fluoreszenzexperimenten können wir keine eindeutige physiologische Antwort der Zellen auf die Gravitationsänderungen beobachten. Die

deutliche Reaktion der Zellen auf eine Hormonstimulation zeigt jedoch, dass die Zellen in unserem Experiment lebend und prinzipiell stimulierbar sind. Eine direkte mechanische Aktivierung der Zellen, gefolgt von einer Kalziumantwort, konnte nicht beobachtet werden.

Folgende Hypothesen ergeben sich aus diesem Verhalten:

1. Schwerelosigkeitsphasen haben keinen Einfluß auf intrazelluläre Kalziumionen. Die beobachtete Reduktion der Knochenmasse wird durch Signalwege gesteuert, in denen Kalziumionen nicht beteiligt sind.

2. Der Knochenabbau wird über Kalziumionen reguliert. Die Schwerelosigkeitsphasen von $22s$ sind jedoch zu kurz, um eine Kalziumionenveränderung auszulösen. Ob eine längere Schwerelosigkeitsphase über Stunden oder Tage zu einer Veränderung der Kalziumdynamik führt, ist bisher nicht untersucht worden und wird vermutlich Gegenstand zukünftiger Experimente, beispielsweise in der Internationalen Raumstation (*ISS*) sein.

3. Nicht die Schwerelosigkeit selbst, sondern die fehlende mechanische Belastung (Längenänderungen, Kräfte und Beschleunigungen), die beispielsweise beim Laufen auf die Knochen des Bewegungsapparats wirkt, führt zum Abbau des Knochens.

Wie können wir die Belastungen, die während eines Fluges auftreten, abschätzen? Betrachten wir dazu die Gewichtskraft, die aufgrund der Gravitation auf eine Zelle wirkt. Diese liegt diese bei ca. $14 \cdot 10^{-12} N$ $(14pN)$ wenn wir einen Durchmesser der Zelle von $30\mu m$ und eine durchschnittliche Höhe von $2\mu m$ annehmen. Berechnen wir die Kraft die die gesamte über ihr liegende Wassersäule (h= $4mm$) ausübt, so beträgt die Kraft $28nN$. In den Hypergravitationsphasen $(1,8g)$ erhöht sich die Kraft auf $50,4nN$.

Diese Experimenten schließt sich also die Frage an, ob die aufgrund der Schwerelosigkeit und Hypergravität wirkenden Kräfte zu gering sind. Wie

hoch muss die Kraft sein, um eine Knochenzelle mechanisch zu stimulieren? Um diese Kraft exakt bestimmen zu können, ab der es zu einer Reaktion der Knochenzelle kommt, entwickelten wir einen speziellen Kraft-Apparat, dem das Prinzip der Rasterkraftmikroskopie zugrunde liegt. Wir werden im folgenden mit einem solchen Instrument untersuchen, ab wann und wie eine Zelle auf eine definierte mechanische Stimulation reagiert.

5 Direkte mechanische Stimulation von Knochenzellen

In diesem Kapitel wird ein System vorgestellt, das auf dem Prinzip der Rasterkraftmikroskopie beruht. Es erlaubt, äußerst präzise Kräfte im Nanonewtonbereich zu messen. Das System wurde hinsichtlich der Möglichkeit, einzelne Knochenzellen mechanisch zu stimulieren, optimiert.

Erstmalig wurde ein solches System mit einem dynamischen Fluoreszenzmikroskop kombiniert und ermöglicht so die simultane Beobachtung intrazellulärer Kalziumveränderungen, während und nach einer mechanischen Stimulation.

5.1 Das Prinzip der Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (*engl.: Atomic Force Microscope AFM*) wurde 1986 von Binning, Gerber und Quate [Binnig et al.(1986)] aus dem Rastertunnelmikroskop (*engl.: Scanning Tunneling Microscope STM*) entwickelt. Die Rasterkraftmikroskopie ermöglicht es, die Oberflächentopographie auch nichtleitender Oberflächen mit sehr hoher Ortsauflösung bis in den atomaren Bereich abzubilden. Im Vergleich zum optischen Lichtmikroskop erreicht das Rasterkraftmikroskop eine 100fach höhere Auflösung. Dies wurde durch den Einsatz moderner Nanopositioniertechniken auf der Basis von Piezokeramiken möglich. Ebenso konnten mit Hilfe moderner Mikrostrukturiertechniken kleine empfindliche mechanische Sensoren reproduzierbar hergestellt werden [Alexander et al.(1989)].

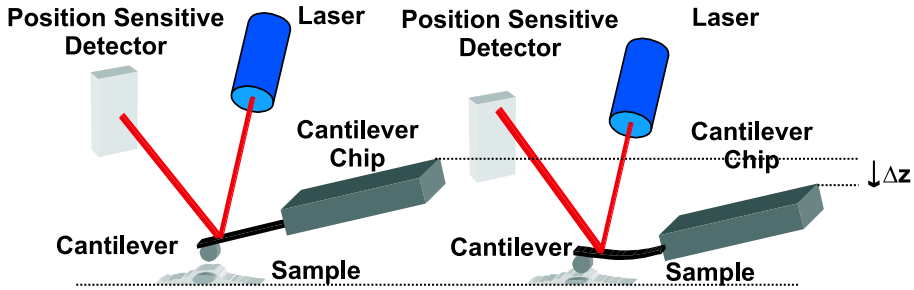

Abbildung 5.1: Grundprinzip des Rasterkraftmikroskops: Bestehend aus Laser, Cantilever, und Positionsdetektor.

Das Rasterkraftmikroskop misst lokale Höheninformationen mittels einer mikroskopischen Blattfeder, welche im folgenden als *Cantilever* bezeichnet wird. Die Funktionsweise ist bestechend einfach. Ein Laserstrahl wird auf den Cantilever fokussiert. Der Lichtstrahl wird am Cantileve reflektiert und trifft auf einen positionsempfindlichen Detektor [Putman et al.(1992)] . Kleine Auslenkungen des Cantilevers werden somit in große Auslenkungen des Laserstrahls am Detektor übertragen (s. Abbildung 5.1).

Wenn nun der Cantilever über die Oberfläche gefahren wird, so tritt er in Wechselwirkung mit der Oberfläche und lenkt sich entsprechend der Oberflächentopographie aus. Diese Auslenkung führt damit zu einer Ablenkung des an der Cantileveroberseite reflektierten Laserstrahls. Vergleichbar mit mechanischen Hebelgesetzen spiegeln sich sehr kleine Auslenkungen des Cantilevers stark vergrößert am Detektor wieder. Dieser Detektor der meist in Form einer Quadrantendiode oder als positionsempfindlicher Detektor ausgelegt ist, kann Verschiebungen des Lichtschwerpunktes von weniger als 10μm problemlos auflösen. Mit Hilfe dieser Hebeltechnik lassen sich sehr kleine Auslenkungen des Cantilevers schon in der Größenordnung eines einzelnen Atomdurchmessers (ca. $0,1nm$) mit dem Detektor messen. Am Ende des Cantilevers, der typischerweise $200\mu m$ lang ist, befindet sich häufig eine kleine Tastspitze, die sich so verjüngt, dass sich

an dessen Ende nur noch ein Atom befindet. Tastet man nun die Probe rasterförmig ab und stellt die gemessene Auslenkung des Laserreflexes gegen die Position der Spitze dar, so entsteht ein topographisches Abbild der Oberfläche. Mit Cantilevern, deren Spitze nur aus einem Atom besteht, und geeigneten Proben, lässt sich so eine Auflösung bis hin zu atomaren Mikrostrukturen erzielen. Mittlerweile sind zahlreiche Arbeiten über die Abbildung von unterschiedlichen Zelltypen veröffentlicht worden [Hofmann et al.(1997), Nagao und Dvorak(1999), Lal und John(1994), Lal et al.(1995), Barbee et al.(1994), Pietrasanta et al.(1994), Schoenenberger und Hoh(1994)]. In Abbildung 5.2 ist eine rasterkraftmikroskopische Abbildung von lebenden Endothelzellen dargestellt. Im Vergleich zum optischen Mikroskop sind die feinen Ausläufer der Zellen noch gut zu erkennen. Die wässrige Oberfläche der Zellen ist jedoch zu weich, um echte atomare Auflösung zu erreichen.

Mit einem Rasterkraftmikroskop lassen sich nicht nur kleine Strukturen abbilden, sondern auch die elastischen Eigenschaften u.a. von Zellen [Schneider et al.(1997), Putman et al.(1994), Shroff et al.(1995), Hassan et al.(1998), Sasaki et al.(1998), Henderson et al.(1992), Haydon et al.(1996)] oder Knochensubstanz [Hengsberger et al.(2001)] untersuchen. Darüber hinaus lassen sich gezielt kleine Kräfte auf Oberflächen ausüben, die je nach Federkonstante des verwendeten Cantilevers von einigen μN bis hinunter in den einstelligen pN Bereich reichen [Xu et al.(1994), Weyn et al.(1998), Heinz und Hoh(1999), Lehenkari und Horton(1999)].

5.1.1 Die Grenzen kommerzieller Systeme für Kräftebestimmungen

Wir wollen nun der Frage nachgehen, mit welcher Kraft sich einzelne Knochenzellen gezielt mechanisch stimulieren lassen. Um eine mechanische Belastung auf einzelne Zellen auszuüben, bietet der Cantilever mit seiner Mi-

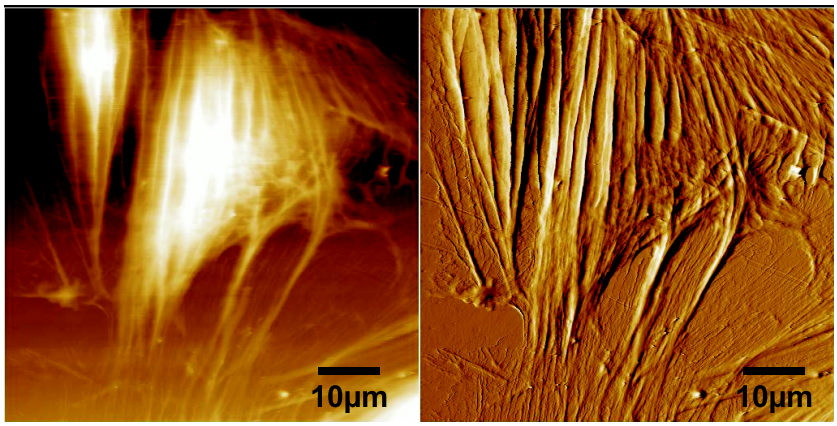

Abbildung 5.2: Rasterkraftmikroskopische Abbildung von Endothelzellen: links ist die Höhenverteilung der Zelloberfläche dargestellt. Weiße Bereiche entsprechen einer Höhe von $2\mu m$. Im rechten Bild ist das Korrektursignal des Kraftmikroskops aufgetragen. Das Bild wurde im *contact mode* mit einem kommerziellen AFM (Bioscope, Digital Instruments) mit Cantileverkräften von ca. $200pN$ aufgenommen.

kromanipulationsmöglichkeit ein ideales Werkzeug. Bei der Durchbiegung verhält sich der Cantilever annähernd wie eine ideale Feder und erlaubt es, nach der Bestimmung der Federkonstanten, die auf die Oberfläche ausgeübte Kraft quantitativ zu bestimmen. Kommerzielle Rasterkraftmikroskope sind speziell ausgelegt für eine bildgebende Darstellung der Oberflächentopographie und nur eingeschränkt zur Kräftemessung einsetzbar. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein System entwickelt und aufgebaut, das im Hinblick auf quantifizierbare Kräftemessungen an lebenden Zellen optimiert wurde. Folgende Punkte sprechen für einen Eigenbau:

- In kommerziellen Systemen erfolgt die Positionierung des Cantilevers durch Anlegen periodischer Spannungen an eine Piezokeramik. Bei der Aufnahme von Kraftkurven wird jedoch ein nicht-periodisches Spannungsprofil durchlaufen. Normale Piezos wie sie in Rasterkraftsyste-

men eingesetzt werden zeigen beim Anlegen eines Spannungsverlaufs in die Vorwärtsrichtung eine andere Positionscharakteristik als in der Rückwärtsrichtung. Dieses störende Verhalten wird als *Hystereseeffekt* bezeichnet.

Zusätzlich lässt sich beim Anlegen einer konstanten Spannung beobachten, dass erst nach einer gewissen Zeit die endgültige Position erreicht wird. Dieses Verhalten wird als *Schleicheffekt* bezeichnet.

Mit unserem selbst entwickelten Instrument lassen sich beide Effekte vermeiden, da der Piezo mit einem zusätzlichen unabhängigen Längendetektor, der die Piezoausdehnung misst und mit einer Regelschleife kombiniert wird.

- Bei herkömmlichen Rasterkraftmikroskopen wird eine segmentierte Fotodiode zur Positionsbestimmung des Laserreflexes verwendet. Sowohl die geringe Größe der Detektorfläche, als auch das nichtlineare Verhalten bei größeren Auslenkungen schränkt den Dynamikbereich der Kräftemessung erheblich ein. Somit sind Messungen von großen Cantileverauslenkungen, wie sie zur Durchführung der mechanischen Stimulation von Knochenzellen notwendig sind, mit kommerziellen Rasterkraftmikoskopen nicht möglich. Anstatt einer vergleichsweise kleinen Quadrantendiode verwendeten wir einen grossflächigen positionsempfindlichen Detektor [Craig et al.(1996)] und konnten so einen großen dynamischen Bereich erfassen.

- Der maximale Piezoverstellweg in z-Richtung liegt bei kommerziellen Systemen bei $6\mu m$. Da aber lebende Knochenzellen bis zu $10\mu m$ hoch sein können, sollte der maximale Verstellweg deutlich größer als $10\mu m$ sein.

- In kommerziellen Systemen (z.B. *Multimode, Digital Instruments, USA*) wird häufig statt des Cantilevers die Probe mittels des Piezos

bewegt. Diese Lösung erwies sich aber für die hier zu erläuternde Problematik als nicht akzeptabel, da die Knochenzellen gleichzeitig zur Mechanostimulation mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht werden sollen. Die Probe (Zelle) muss deshalb in ihrer Position fixiert sein.

- Der Zugang zu den Regelalgorithmen, die bei Aufnahme von Kraftkurven verwendet werden, ist bei kommerziellen Systemen sehr eingeschränkt. Unsere Experimente erfordern jedoch eine sehr flexible Positionierung des Cantilevers, um bestimmte Stimulationsprofile zu durchfahren, zum Beispiel, um die Frequenzabhängikeit der mechanischen Eigenschaften zu untersuchen.

- Experimente an lebenden Zellen erfordern neben einer genauen Temperaturstabilisierung eine Versorgung der Zellen mit einem Nährmedium. Ein entsprechendes Heizungs- und Versorgungssystem ist aber bei kommerziellen Systemen nicht vorhanden.

- Da die Experimente in flüssigem Medium stattfinden erfordern sie die Verwendung einer Zellkammer, die gründlich gereinigt und sterilisiert werden kann.

- Auf ortsauflösende Messungen zur Bildgebung kann verzichtet werden. Der Verzicht auf die Rastermöglichkeit für die Bildgebung und die rationelle Realisierung der mechanischen Komponenten reduziert die Kosten für ein selbst entwickeltes Instrument auf rund ein Zehntel im Vergleich zu kommerziellen Systemen.

All diese Gründe sprachen dafür, im Rahmen dieser Forschungen einen eigenen Messaufbau herzustellen, um quantifizierbare Kräftemessungen an lebenden Knochenzellen durchzuführen.

5.1.2 Der experimentelle Aufbau

Der eigentliche Messkopf zur Kräftemessung (s. Abbildung 5.3), dessen prizipieller Aufbau bereits in Kapitel 5.1 beschrieben wurde, besteht im wesentlichen aus der Lasereinheit einer Halbleiterlaserdiode (1), dem Cantileverhalter samt Cantilever (4), sowie der Positionsdetektoreinheit (6). Der gesamte Messkopf hängt an der unteren planparallelen Platte und kann mechanisch bewegt werden. Die Grobverstellung, also das Eintauchen des Messkopfes in die Zellkammer, erfolgt durch verschieben der planparallelen Platte mit einem Schrittmotor (9). Die Feinverstellung erfolgt durch das angehängte Piezosystem (7) mit dessen kapazitiv gekoppelten Abstandssensor. Das kompakte System steht stabil auf den drei vertikalen Führungsstangen. Damit kann das System problemlos auf ein optisches invertiertes Mikroskop gestellt werden. Abbildung 5.4 zeigt ein Foto des von uns erstellten Aufbaus. Im folgenden werden die einzelnen Komponenten des Systems genauer vorgestellt:

Die Laserdiode und der Detektor

Um die Auslenkung des Cantilevers mit hoher Präzision zu messen, verwenden wir einen Lichtzeiger. Dieser Lichtzeiger besteht in unserem Aufbau aus einer Halbleiterlaserdiode mit einer Wellenlänge von $650nm$. Der mit einer Linse parallel gebündelte (kollimierte) Strahl tritt durch eine Linse der Brennweite $f = 50mm$ und wird auf die Cantileveroberseite fokussiert. Der reflektierte Strahl trifft auf einen Umlenkspiegel, der aus einer goldbedampften Glasplatte besteht und gelangt schließlich auf den Messkopf. Als Messkopf verwenden wir eine eindimensionale positionsempfindliche Silizium Fotodiode (*1L30 PSD, SiTek, Schweden*), die eine aktive Fläche von $30mm$ x $4mm$ besitzt. Diese Fotodiode hat über den gesamten Bereich eine sehr hohe Linearität (Die Nichtlinearität ist kleiner $0,1\%$). Eine Magnethalterung ermöglicht die einfache Positionierung des Detekors in den Laserstrahl. Ist der Detektor in den Lichtstrahl positioniert, so kann jede Auslenkung des

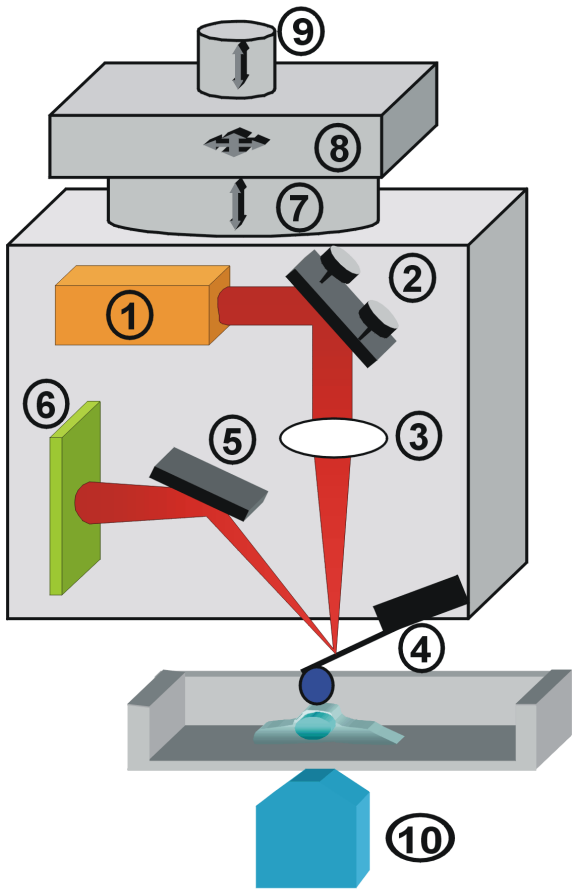

Abbildung 5.3: Experimenteller Aufbau zur Kräftemessung bestehend aus: Halbleiterlaserdiode mit Kollimationsoptik (1) , Verstellbarem Spiegel (2), Fokussierlinse ($f = 50mm$) (3), Mikrocantilever (4), Spiegel (5), Positionsempfindlichem Detektor (PSD) (6), Piezokeramik mit kapazitiv gekoppeltem Abstandssensor (7), einem motorisierten x-y-Verschiebetisch (8) und einem Schrittmotor für die z-Achse (9), sowie dem angekoppelten Fluoreszenzmikroskop (10).

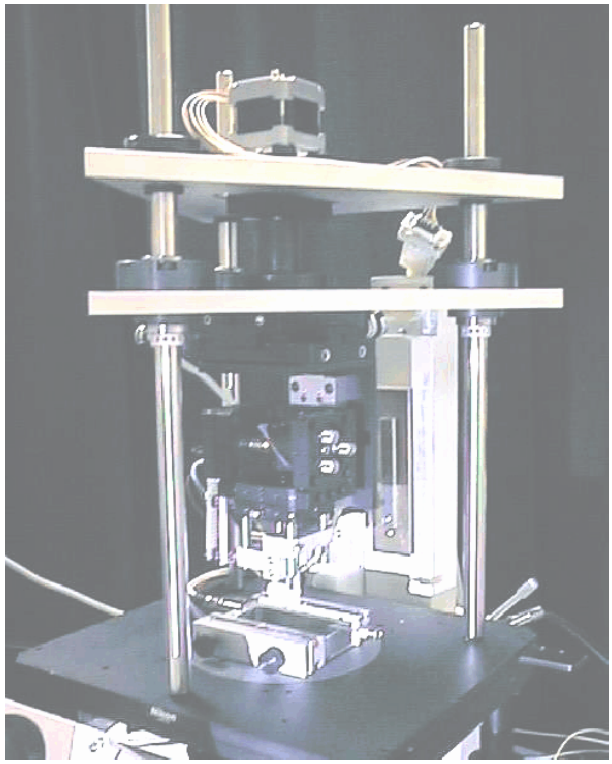

Abbildung 5.4: Foto des selbst entwickelten Rasterkraftmikroskops.

Cantilevers präzise gemessen werden.

Die Einrichtung des Cantileverhalters

Um die winzig (ca. $200\mu m$ lang) kleinen Cantilever handhaben zu können, hängen diese an einem wesentlich größeren (ca. $1,5mm$ x $4mm$) Chip. Diesen Mikrocantilever-Chip klemmten wir einen geschlitzten Halter ein. Der Halter ist unter einem Winkel von 13° geneigt. Der Einbau unter einem Winkel führt dazu, dass der Cantilever, der sich am Rand des Cantilever-Chips befindet, weiter nach unten ragt als jeder andere Teil des Chips oder des Halters. Erreicht der Cantilever die Oberfläche der Probe, dann kann er sich so weit durchbiegen, bis auch der Cantilever-Chip die Oberfläche berührt. Ist das der

Fall, werden die auf den Cantilever wirkenden Biegekräfte lokal so groß, dass ein Abbrechen des Cantilevers droht. In unseren Experimenten verwendeten wir Cantilever mit einer Länge von $200\mu m$. An dessen Spitze befand sich eine Kugel mit einem Durchmesser von $4\mu m$. Die Cantileverspitze kann um maximal $24\mu m$ ausgelenkt werden, bevor der Chip die Probe berührt und der Cantilever abbricht. Die Auslenkungen die bei unseren Experimenten beobachtet wurden lagen mit $1 - 8\mu m$ (entspricht etwa $100nN$ bis $800nN$ ausgeübter Kraft) deutlich unter diesem Maximalwert.

An der Vorderseite des Halters befindet sich ein planparalleles Glasklötzchen, durch das der Laserstrahl aus der umgebenden Luft in die Flüssigkeit ein- und ausgekoppelt wird. Durch diese Anordnung wird vermieden, dass sich die Richtung des Strahls, der die Flüssigkeit-Luft Grenzfläche passieren muss verändert. Kleine Veränderungen der Flüssigkeitsoberfläche z.B. durch Luftbewegungen, würden die Messergebnisse sonst verfälschen. Um den Cantilever über der Zelle exakt positionieren zu können, ist eine präzise Positioniermechanik erforderlich.

Die Schrittmotorpositionierung

Die "Grob"-Positionierung des Messkopfes erfolgt mit einem Schrittmotor. Dieser kann den Kraftmesskopf komplett aus der Zellkammer heraus fahren und ermöglicht so das einfache Wechseln der Zellkammer und des Cantilevers. Dazu ist der Messkopf samt Piezo an einem Tisch befestigt. Dieser wird an drei vertikalen Führungsstangen bewegt und dabei durch einen spezielles Kugellager (Kugelkäfig) präzise geführt. Der gesamte Tisch hängt an einer Spindel, die an einen Schrittmotor gekoppelt ist. Durch Verwendung einer Mikroschrittmotorsteuerkarte (*SM30, OWIS, Staufen*) kann der Messkopf um insgesamt $50mm$ bewegt werden. Bemerkenswert ist, dass in unserer Eigenkonstruktion schon alleine die Grobpositionierung durch den Schrittmotor eine mechanische Auflösung von $100nm$ erzielt. Die Wiederholgenauigkeit

über große Strecken ist kleiner als 1μm. Die Schrittmotorsteuerkarte kann dabei durch Phasenansteuerung jeden Schritt, der in unserem Aufbau einer Verschiebung von 1μm entspricht, in 64 Mikroschritte von je $15,6nm$ unterteilen. Die maximale Schrittfrequenz für Vollschritte beträgt $16kHz$ und ist durch den induktiven Spannungsabfall an der Motorinduktivität begrenzt.

Um den Cantilever noch einmal um drei Größenordnungen exakter zu positionieren, kombinieren wir die Schrittmotorverstellung mit einem Piezoversteller.

Die Funktion des Niederspannungspiezo mit einem kapazitivem Sensor

Der Piezoversteller ist das Schlüsselelement für eine quantifizierbare Kräftemessung, die bis in den sub-Nanonewton Bereich reichen kann. Daher verwendeten wir für die exakte z-Positionierung des Cantilevers den Niederspannungspiezo P-753.31C (*LISA Linear PZT Stage Actuator, Physik Instrumente*). Er zeichnet sich durch einen hohen Stellweg von 38μm, eine Auflösung von $0,2nm$ sowie eine Wiederholgenauigkeit von $3nm$ aus. Diese hohe Auflösung wird erzielt durch Verwendung eines kapazitiven Wegaufnehmers. Der Wegaufnehmer wird mit dem Regelkreis eines Steuergerätes *(E-661.CP, Physik Instrumente)* verbunden. Dadurch können Hysterese- und Schleicheffekte kompensiert werden. Der Piezo kann mit einer Frequenz bis zu zehn Zyklen in der Sekunde den gesamten Messkopf und damit den Cantilever in der Zellkammer bewegen. Die Maximalfrequenz wird begrenzt durch die am Piezo auftretenden (Beschleunigungs-)Kräfte. Sie dürfen einen Maximalwert von $100N$ als Druckkraft und $20N$ als Zugkraft nicht übersteigen.

Die Zellkammer

Eine temperaturstabilisierte Zellkammer, in der Zellen mit einem Rasterkraftsystem mechanisch stimuliert werden können, war kommerziell nicht

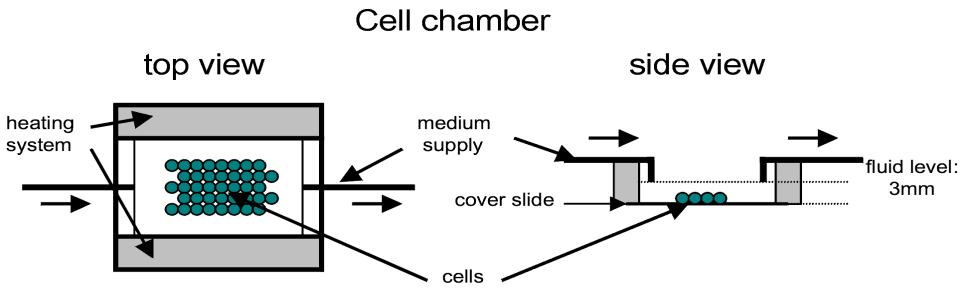

Abbildung 5.5: Schematischer Aufbau der Zellkammer.

verfügbar. Aus diesem Grund wurde von uns eine neue Zellkammer konstruiert, die auf der einen Seite einen Zugang für das Kraftmikroskop von oben durch das Nährmedium erlaubt, und zum anderen auf der Unterseite die Möglichkeit bietet, die Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop zu beobachten. In Abbildung 5.5 ist der Aufbau der Zellkammer schematisch dargestellt. Die Kammer besteht aus Edelstahl, an deren Unterseite das Deckgläschen eines Mikroskops angeschraubt wird (Länge x Breite x Dicke = $60mm$ x $24mm$ x $0,16mm$). Als Dichtung wird ein Silikonring verwendet. Die Kammer ist auf der Oberseite offen, so dass der Cantilever samt Halterung in die Zellkammer hineinfahren kann. Im Rand der Zellkammer sind Versorgungskanäle eingelassen, durch die ein kontinuierlicher Austausch des Nährmediums erfolgt. Die Absaugöffnung ist höhenverstellbar und ermöglicht die Einstellung der Mediumhöhe zwischen einem und fünf Millimeter. In unseren Versuchen wurde eine Mediumhöhe von ca. drei Millimetern eingestellt.

An den Längsseiten der Zellkammer sind Ohmsche Widerstände angebracht, die das Aufheizen der Zellkammer ermöglichen. Die Temperatur der Zellkammer wurde mit einem Temperaturfühler (PT100) gemessen. Mit diesen Messwerten stabilisierte eine Mikroprozessorsteuerung die Zelltemperatur. Das Auftreten von Überschwingern beim Aufheizen, wie sie beispielsweise bei proportionalen, integralen und differentialen (PID) Regelungen auftre-

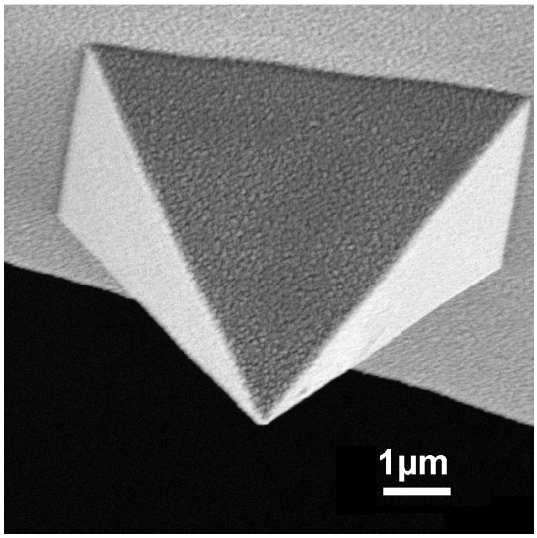

Abbildung 5.6: Mikrocantilever mit pyramidaler Meßspitze.

ten, wurden dabei unterdrückt. Zellschädigende Temperaturspitzen konnten so vermieden werden. Die Zellen selbst wachsen auf dem in die Zellkammer eingebauten Deckgläschen und bilden eine einlagige Zellschicht aus.

Um eine einzelne Zelle aus dieser Zellschicht kontrolliert zu stimulieren, ohne sie zu zerstören, musste die Cantileverspitze modifiziert werden. Im nächsten Kapitel werden wir ein Verfahren beschreiben, um die pyramidenartige Spitze durch eine Mikrokugel zu ersetzen.

5.1.3 Die Substitution der Cantileverspitzen durch eine Mikrosphäre

Typische Cantileverspitzen, wie sie beispielsweise zum Abbilden verwendet werden, bestehen aus einer pyramidalen Spitze (s. Abbildung 5.6). Dieser pyramidalen Spitze kann im Kontaktbereich ein Krümmungsradius zugeordnet werden, der klein und - wenn überhaupt - nur schwer bestimmbar ist. Laut Herstellerangabe (*Digital Instruments, USA*) beträgt der Radius zwischen

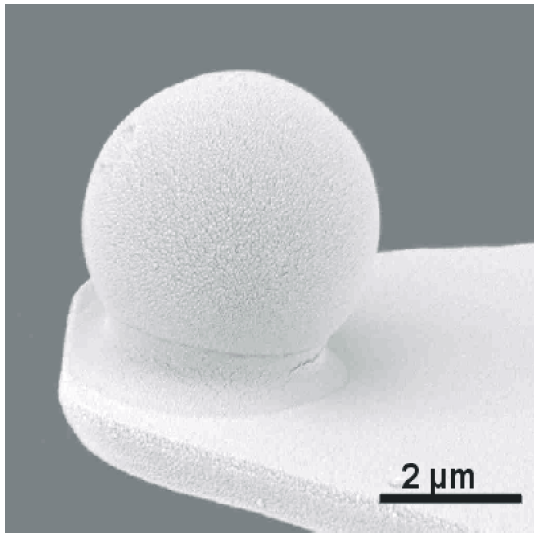

Abbildung 5.7: Mikrocantilever mit angeklebtem kolloidalen Teilchen.

$5nm$ und $40nm$ (für Cantilever des Typs NP-S). Die Gefahr einer Verletzung der weichen Zellmembran durch die verhältnismäßig scharfe Spitze ist sehr groß. Diese Verletzung lässt sich vermeiden, wenn die Spitze durch ein größeres kugelförmiges Teilchen ersetzt wird. Durch die damit verbundene größere Kontaktfläche reduziert sich sich zwar die Auflösung, gleichzeitig wird aber die Kraft auf eine größere Fläche gleichmäßig verteilt. Diese kugelförmigen kolloidalen Teilchen *(engl. Microspheres)* können an eine Cantileverspitze angeklebt werden. Dazu haben wir spezielle Cantilever ohne pyramidale Spitze vom Hersteller erworben und mit einer Mikrokugel versehen. Einen solchen Cantilever mit angeklebter Kugel zeigt Abbildung 5.7. Die Kugel hat einen Durchmesser von $4\mu m$.

Wie lässt sich diese sehr kleine, mit dem blossen Auge nicht sichtbare Kugel an der Cantileverspitze befestigen? In der Literatur beschreiben Ducker et al. [Ducker et al.(1991)] erstmals ein Verfahren, um eine Mikrokugel an an der Cantileverspitze zu befestigen. Eine von Preuß und Raiteri [Raiteri et al.(1998)] vereinfachte Methode findet in unseren Experimenten

Anwendung. Die Vorgehensweise wird im folgenden skizziert.

Die Silika Mikrokugeln mit einem Durchmesser von $4\mu m$ (*Bangs Inc., Carmel, USA*) werden durch Adhäsion an die Unterseite eines Deckgläschens geheftet und so an ein optisches Mikroskop montiert. Auf diese Weise kann eine Beobachtung von oben erfolgen. Von unten wird mittels eines x-,y- und z-Verschiebetisches der Cantilever (*Digital Instruments, USA, V-shaped,* $100/200\mu m$) an eine Mikrokugel gezielt angenähert. Zuvor musste noch Epoxy-Heißkleber (*Epikote 1004, Shell*) an die Cantileverspitze angebracht werden. Zu diesem Zweck wird neben den Kugeln auch eine kleine Menge Epoxidharz auf die Unterseite des Deckgläschens angebracht. Um dieses Harz zum Schmelzen bringen zu können, ist an das Deckgläschen ein Golddraht angebracht, der beim Anlegen eines Stromes als Widerstandsheizung fungiert.

Das Ankleben einzelner Partikel verläuft dann folgendermaßen: Ein Mikrocantilever wird mit seinem vorderen Ende vorsichtig an den erhitzten flüssigen Kleber angenähert, und eine winzige Menge wird aufgenommen. Nach Abschalten des Stromes und darauf folgendem Erhärten einer kleinen Menge Klebers am Cantilever wird an dessen Spitze eine Mikrosphäre plaziert und vom Glasplättchen heruntergenommen. Anschließend wird der Cantilever samt der lose aufsitzenden Sphäre in die Nähe des Heizdrahtes gebracht und so miteinander verklebt. Damit haben wir einen Cantilever zu Stimulation präpariert. Um ihn zur Kräftebestimmung einzusetzen, muss nun noch seine Federkonstante bestimmt werden.

5.2 Kalibration der Federkonstanten

Ein für uns entscheidendes Kriterium zur Verwendung der Rasterkraftmikroskopie ist die Möglichkeit der Quantifizierung der aufgretenden Kräfte. Um von der Auslenkung des Cantilevers auf die ausgeübte Kraft zu schließen,

muss seine Federkonstante bekannt sein. Aufgrund von Fertigungstoleranzen konnten die Hersteller der Cantilever keine exakten Werte für die Federkonstante angeben. Folglich mussten wir für jeden verwendeten Cantilever die Federkonstante neu bestimmen. Ist die Federkonstante *eines* Cantilevers exakt bestimmt, so lässt sich dieser als Referenzcantilever verwenden. In Kapitel 7.2.3 wird beschrieben, wie sich mit diesem Cantilever weitere Cantilever kalibrieren lassen.

Die Bestimmung der Federkonstanten eines Referenzcantilevers kann auf verschiedene Arten erfolgen. In der Literatur werden unterschiedliche Methoden vorgeschlagen [Hutter und Bechhoefer(1993), Cleveland et al.(1993), Senden und Ducker(1994), Sader et al.(1995), Torii et al.(1996), Gibson et al.(1996)]. Die nachfolgend aufgeführten zwei Methoden werden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Diese Methoden finden zunehmend auch in anderen Forschungsgruppen Anwendung, da sie mit vertretbarem Aufwand reproduzierbare Ergebnisse erzielen:

1. Bestimmung der Federkonstante über die Messung des thermischen Rauschens des Cantilevers [Hutter und Bechhoefer(1993)]

2. Bestimmung der Federkonstante aus der Verschiebung der Resonanzfrequenz beim Anhängen verschiedener Massen (*added mass method*) [Cleveland et al.(1993)].

Eine genauere Beschreibung der von uns verwendeten Methoden befindet sich im Anhang 7.2. Typische Werte für die Federkonstante der $200\mu m$ langen Cantilever liegen zwischen $0,07\frac{N}{m}$ und $0,11\frac{N}{m}$. Mit diesen Cantilevern und unserem System konnten wir Kräfte zwischen $250pN$ und $800nN$ ausüben.

Nachdem wir mit der Rasterkraftmikroskopie eine Methode für quantitative Kraftexperimente kennengelernt haben, werden wir in den folgenden Kapiteln vorstellen, wie wir die Reaktion der Zelle simultan zur mechanischen Stimulation beobachten können. Als Indikator für eine Zellantwort untersu-

chen wir die Dynamik der Kalzium-Ionen. Dazu verwenden wir den bereits in Kapitel 3.1 vorgestellten Zwei-Wellenlängen Farbstoff Fura-2. Ein für diesen Farbstoff optimiertes Fluoreszenzmikroskopsystem wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

5.3 Das invertierte Fluoreszenzmikroskop

Unsere Untersuchung dynamischer Fluoreszenzänderungen nach mechanischer Stimulation erfolgt hauptsächlich mit dem invertierten Mikroskop Nikon Diaphot in Kombination mit dem Bildanalyse-System Quanticell 700 *(Visitech International, Sunderland UK)*. Das Bildanalyse-System besteht aus einem Zentralrechner, einem motorisierten Monochromator mit einer Xenon-Lichtquelle und einer doppelt intensivierten Kamera *(Extended ISIS, Photonic Science, England)*. Die Videobilder werden während der Messung digitalisiert und im Speicher *(128 MB Video RAM)* abgelegt. Zu den Bilddaten werden die entsprechenden Einstellungen des Monochromators gespeichert, so dass dem jeweiligen Fluoreszenzbild die entsprechende Anregungswellenlänge zugeordnet werden kann. Die maximal mögliche Bildwiederholrate beträgt 25 Bilder/s. Die zugehörige auf UNIX-basierende Software Quanticell 700m (Ver. 2.20) ermöglicht das Verarbeiten der digitalisierten Bilddaten. Die Digitalisierung beinhaltet eine Beschreibung des Bildes in Pixel mit 256 Intensitätsstufen. Den einzelnen Intensitätsstufen werden bestimmte Falschfarben zugeordnet. Die vorhandene Hardware erlaubt sowohl eine Hintergrundsubtraktion als auch eine Verhältnisbildung von Intensitäten bei bis zu drei Anregungswellenlängen. Die Software ermöglicht es, durch schnelle Steuerung des Monochromators bis zu 12 mal pro Sekunde verschiedene Anregungswellenlängen zu schalten und gestattet damit Verhältnismessungen mit hoher Zeitauflösung bis zu $80ms$. Um die Datenmenge zu reduzieren, wurden die Informationen von mehr als 32 Einzelbildern gemittelt und die

entsprechenden Fluoreszenzbilder zur Anregung bei $340nm$ und Anregung bei $380nm$, sowie das Verhältnis der beiden Intensitätsbilder, abgespeichert. Auf diese Weise wurde alle $1420ms$ eine Bildersequenz aufgezeichnet. Aus diesen Verhältnisbildern kann nach Kalibrierung des Systems (vgl. Kapitel 3.2) auf die intrazellulären Kalzium-Ionenkonzentration geschlossen werden. Ein solches Fluoreszenzmikroskop in Verbindung mit dem kalziumsensitiven Farbstoff Fura-2 ermöglicht es uns also, die Zeitabhängigkeit der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionen zu untersuchen.

5.4 Das Rasterkraft-Fluoreszenzmikroskop

Kombinieren wir die Fluoreszenzmikroskopie mit der Rasterkraftmikroskopie (Kapitel 5) so können wir erstmalig das Verhalten einer einzelnen Zelle auf einen quantifizierbaren mechanischen Reiz mit hoher Zeitauflösung untersuchen. Der dazu notwendige experimentelle Aufbau wird im folgenden beschrieben.

Der gesamte experimentelle Eigenbau besteht aus dem in Kapitel 5.1.1 detailliert beschriebenen Kraftmikroskop, das mit dem Fluoreszenzmikroskop (Kapitel 5.3) kombiniert wird. Eine schematische Darstellung des Aufbaus ist in Abbildung 5.8 skizziert. Die Steuereinheit (Controller) des Kraftmikroskops ist über einen Personal Computer (PC) mit dem Bildaufnahme- und Bildanalysesystem verbunden. Bei Erreichen der Zelloberfläche sendet das Kraftmikroskop ein Synchronisationssignal an das Bildanalysesystem, so dass die zu jeder Messung aufgenommenen Bilddaten mit den Kraftkurven synchronisiert werden können. Um mechanische Schwingungen und die damit verbundenen Störungen des Kraftmikroskops zu minimieren, wurde der gesamte Messaufbau auf einen schwingungsgedämpften Tisch (*Linos, Deutschland*) aufgebaut.

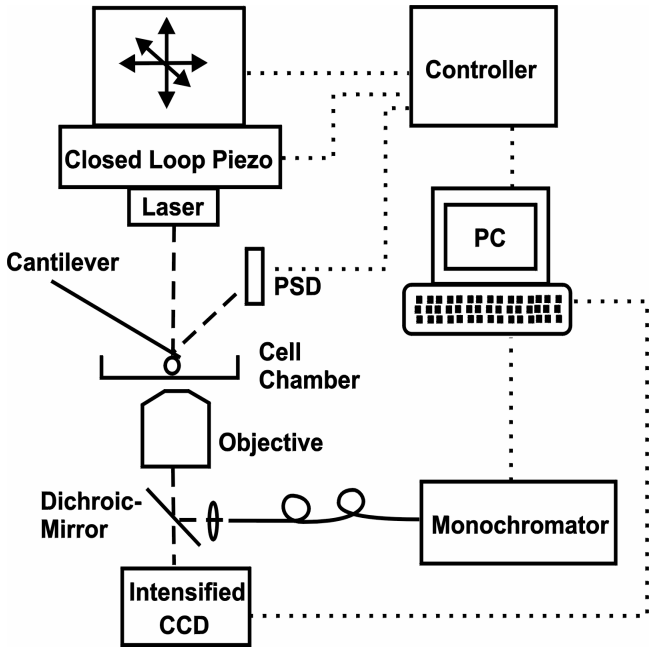

Abbildung 5.8: Schematische Darstellung des kombinierten Kraft-Fluoreszenzmikroskops: Das Fluoreszenz- und das Kraftmikroskop wurden über eine gemeinsame Datenverarbeitung synchronisiert.

5.5 Auswertung der Piko- und Nanonewtonkräfte

5.5.1 Aufnahme von Kraftkurven

Die Ausübung eines mechanischen Reizes auf Knochenzellen in Kultur kann auf vielfältige Weise geschehen (z.B. durch Ausüben eines Dehnungsreizes durch Längenänderung des Zellsubstrates [Jones et al.(1991)], durch flüssigkeitsinduzierte Scherkräfte [Usami et al.(1993), Pavalko et al.(1998), Weinbaum et al.(1994)] oder durch Schwerelosigkeit). Diese Reize wirken dabei immer auf die gesamte Zellschicht und lassen sich für einzelne Zellen

schwer quantifizieren. Mit der Rasterkraftmikroskopie, wie wir sie bereits in Kapitel 5 erläutert haben, ist es allerdings möglich, Kräfte auf einzelne Zellen auszuüben und zu quantifizieren. Damit wird es möglich, z.B. systematisch nach einer Kraftschwelle zu suchen, ab der es zu einer mechanischen Aktivierung der Zellen kommt.

Um also herauszufinden, ob, wann und wie primäre Osteoblasten auf eine äußere mechanische Belastung reagieren, sind wir bei unseren Experimenten folgendermaßen vorgegangen. Nach einer Annäherung des Cantilevers an die Zelle wurde ein zyklischer mechanischer Reiz auf die Zelle ausgeübt. Dabei wurden verschiedene Parameter, wie z.B. die Frequenz, die maximale Kraftamplitude und die Anzahl der Stimuli variiert. Im Zuge der zunehmenden Verbreitung von rasterkraftmikroskopischen Systemen werden in jüngster Zeit erste Charakterisierungen mechanischer Eigenschaften verschiedener Zelltypen vorgenommen [Hassan et al.(1998), Haydon et al.(1996), Henderson et al.(1992), Langer et al.(2000), Putman et al.(1994)]. Wegen der Komplexität des experimentellen Aufbaus sind Experimente mit gleichzeitiger dynamischer Fluoreszenzmikroskopie allerdings nur vereinzelt vorhanden [Tamiya et al.(1997), Neagu et al.(1994)]. Nach unserem Kenntnisstand gibt es bislang keine rasterkraftmikroskopischen Untersuchungen zur Mechanosensitivität an Zellen. So stand für uns der Aufbau eines entsprechenden experimentellen Systems im Vordergrund, mit dem sich quantifizierbare Kraftuntersuchungen durchführen lassen. Mit diesem System wurde zunächst die 'Minimal'-Kraft bestimmt, ab der es zu einer ersten Reaktion der Zellen kam. Als früher Indikator zellulärer Reaktionen untersuchten wir dabei die intrazelluläre Kalziumdynamik, da $Ca^{2+}-$Ionen als Botenstoffe eine zentrale Rolle in intrazellulären Signalkaskaden spielen (vgl. Kapitel 2.5). Um eine klare Unterscheidung von statistischen Schwankungen und realem Kalziumanstieg zu bekommen, interpretieren wir einen Anstieg des Verhältniswertes, der mehr als 20% über dem Grundniveau liegt, als eine Kalziu-

mantwort der Zelle. Wir haben im Detail untersucht, ab welcher Kraft es zu einer Antwort der Zelle kommt und wie die zeitliche Dynamik der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration verläuft. Das Ergebnis dieser Untersuchungen wird im Kapitel 5.5.4 vorgestellt.

Der Annäherungsalgorithmus

Um eine Zelle stimulieren zu können, muss der Cantilever zunächst vorsichtig an die Oberfläche angenähert werden. Dies vollzog sich in unseren Experimenten folgendermaßen: Zunächst wurde der Piezo voll heruntergefahren und die Auslenkung des Cantilevers gemessen. Wurde die Oberfläche noch nicht erreicht, so kam es zu keiner messbaren Auslenkung des Cantilevers und der Piezo wurde wieder heraufgefahren. Daraufhin wurde der Messkopf mit Hilfe des Schrittmotors gesenkt und damit der Abstand des Cantilevers zur Oberfläche verkleinert. Dieser gesamte Vorgang wurde solange wiederholt, bis eine Berührung des Cantilevers mit der Oberfläche erfolgte. Die Annäherungsprozedur wurde automatisch gestoppt und der Piezo zurückgezogen und somit die Oberfläche entlastet. Um die Oberfläche zu detektieren, reichen bereits sehr kleine Auslenkungen aus. Die Kraft, die der Cantilever nach Annäherung auf die Oberfläche ausübt liegt zwischen $2nN$ und $10nN$. Selbst wenn die sich unter dem Cantilever eine Zelle befindet, so wird diese durch diese geringe Kraft nachweislich nicht stimuliert, so das die Annäherung unser Messergebnis nicht verfälscht.

An jedem neuen Versuchstag wurde ein neuer Cantilever in das System eingebaut und der Laserstrahl auf die Cantileverspitze neu fokussiert. Nach einer solchen Veränderung des optischen Strahlengangs musste die PSD-Detektorempfindlichkeit erneut ermittelt werden.

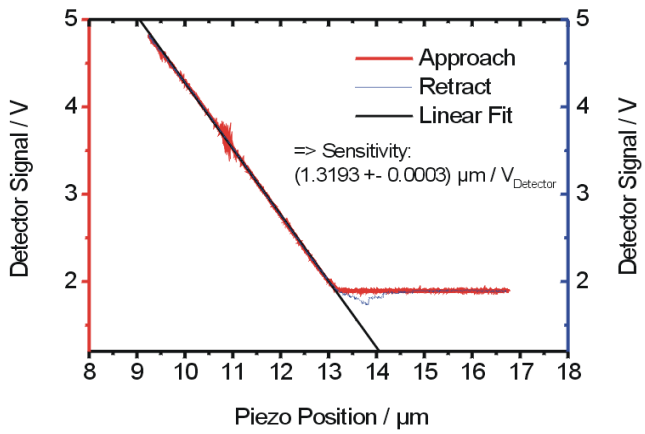

Abbildung 5.9: Kalibrierung des Detektorsignals durch Messung einer Kraft- Abstandskurve gegen eine harte Oberfläche (Deckgläschen).

Die PSD-Detektorempfindlichkeit

Zur Bestimmung der PSD-Detektroempfindlichkeit wurde auf einer zellfreien Fläche auf dem Deckgläschen eine Kraft-Abstandsmessung gegen eine harte Oberfläche aufgenommen. In der entsprechenden Kraft-Abstandskurve lässt sich durch den Kontaktbereich des Cantilevers mit der Oberfläche eine Gerade legen und aus dessen Steigung die PSD-Detektorempfindlichkeit mit der Einheit [nm/V] bestimmen. Die Abbildung 5.9 zeigt eine Kraftkurve gegen das im Vergleich zu Zellen starre Deckgläschen. Um elektrostatische Kräfte zu reduzieren, wurde die Messung im Medium durchgeführt. In einem zweiten Schritt musste nun die Zelloberfläche gefunden werden. Dazu wurden alternierend der Cantilever und der Schrittmotor zyklisch der Oberfläche angenähert. Zunächst senkte der Schrittmotor den Messkopf um $30\mu m$. Anschließend wurde der Piezo mit konstanter Geschwindigkeit bis zu einer Länge von $38\mu m$ ausgefahren. Bei diesem Vorgang wurde das Positionsdetektorsi-

gnal abgefragt. Sobald der Cantilever die Zelloberfläche berührte, begann er sich zu biegen. Die damit einher gehende Änderung des Detektorsignals wurde gemessen. Der Piezo wurde nun so lange weiter gestreckt, bis es zu einer Detektorsignaländerung kam, die der gewünschten Kraft entsprach. Da das Detektorsignal interaktiv ausgelesen werden musste, war die Geschwindigkeit durch die Wandlerkarte (AD), die das analoge Signal in ein digitales verwandelte, limitiert. Diese Abfrage lieferte im interaktiven Modus 10 Werte pro Sekunde. Beim Erreichen der Maximalkraft wurde der interaktive Modus verlassen. Nach ca. 1 Sekunde wurde die schnelle Datenaufnahme mit einer Samplingrate von 1kHz initialisiert und ein Triggersignal an das Bildanalysesystem übergeben. Auf diese Weise wurden pro Sekunde 1000 Werte der Piezoposition und des PSD-Detektorsignals aufgezeichnet.

Der Piezo wurde nun so gedehnt und gestaucht, dass sich der Cantilever mit konstanter Geschwindigkeit auf und ab bewegte und somit eine zyklischen Belastung auf die Zellen ausübte. Die gemessenen Werte der Piezoposition (Piezo Control Voltage) sind in der oberen Kurve in Abbildung 5.10 dargestellt. Die untere Kurve zeigt den Verlauf des simultan erfassten PSD-Detektorsignals. Bei jeder Annäherung des Piezos an die Oberfläche kommt es zu einer positiven Auslenkung des Cantilevers und damit zu einem Anstieg des Positionsdetektorsignals. Durch die Auslenkung des Cantilevers wird eine Kraft auf die Oberfläche, in diesem Fall die Zelloberfläche, ausgeübt. Um aus den so erhaltenen Werte die Kräfte zu bestimmen, berechnen wir zunächst die Auslenkung des Cantilevers, indem wir die Detektorspannung mit der zuvor ermittelten PSD-Detektorempfindlichkeit (s. Kapitel 5.5.1) multiplizieren. Multiplizieren wir diese Auslenkung mit dem Wert der Federkonstante so erhalten wir den Wert für die ausgeübte Kraft.

Wir können die beiden so erhaltenen Kurven in einem Graphen darstellen, indem wir die Kraft in Abhängigkeit von der Piezoposition auftragen. Für die in Abbildung 5.10 aufgezeichneten Daten erhielten wir die in Abbildung

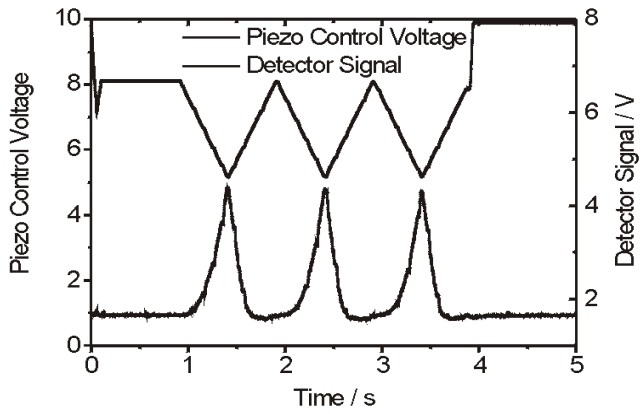

Abbildung 5.10: Gemessene Piezoposition und gemessenes Detektorsignal in Abhängigkeit der Zeit während der mechanischen Stimulation eines Osteoblasten.

5.11 dargestellte Kraft-Abstands-Kurve.

Aus der so erhaltenen Kraftkurve bestimmten wir charakteristische Werte, wie z.B. die Maximalkraft und die deponierte Energie.

5.5.2 Die Kraftschwelle

Eine zentrale Frage, die im Rahmen dieser Arbeit angegangen wird, lautet, ob sich eine charakteristische Kraft nachweisen lässt, ab der es zu einer Antwort der Zelle über den Botenstoff (*second messenger*) Kalzium kommt. Um diese Frage zu klären, wurde jeweils eine Zelle mechanisch stimuliert und dabei die Kraft graduell erhöht, bis entweder eine Kalzium-Antwort beobachtet oder die Maximalkraft von $700nN$ erreicht wurde. Bei einer Kraft von über $700nN$ beobachteten wir häufig ein Zerstören der Zellmembran. Der Farbstoff verlässt bei einer solchen Zerstörung das Zellinnere. Dieses führte zu

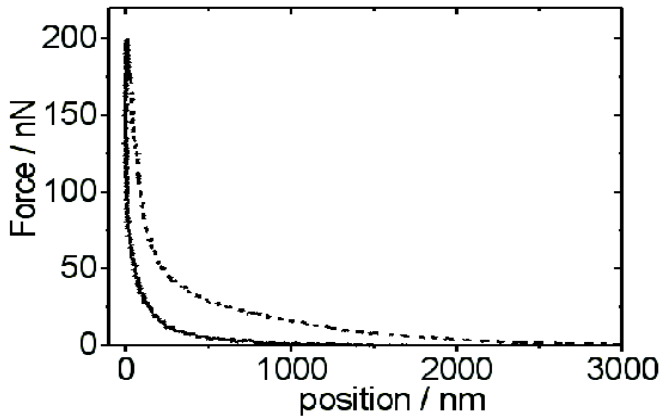

Abbildung 5.11: Kraft- Abstandskurve, gemessen auf einer Zelle.

einem schnellen Abfall der gesamten Fluoreszenzintensität der Zelle. Aus diesem Grund wurde bei weiteren Experimenten die Stimulation beendet, wenn eine Maximalkraft von $700nN$ erreicht wurde, und keine Kalzium-Antwort der Zelle beobachtet wurde.

Kommt es jedoch zu einer Antwort der Zelle, so zeigt die intrazelluläre $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration einen typischen Verlauf. Einen für unsere Experimente charakteristischen Verlauf zeigt Abbildung 5.12. Dargestellt ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Abhängigkeit der Zeit nach einer mechanischen Stimulation mit einer Maximalkraft von $266nN$. Wir beobachteten einen Anstieg des Fluoreszenzquotienten von $1,3$ auf $2,5$, der einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Ionenkonzentration von $330nM$ auf $970nM$ entspricht. Der Anstieg bis zum Maximum erfolgte innerhalb von 12s nach dem mechanischen Reiz. Die weitere Dynamik zeigt einen exponentiellen Abfall und erreicht die Ruhekonzentration nach $200s$.

Die Kräfte, bei denen es zu einer typischen Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration kommt, variieren. Da zelluläre Prozesse sehr kom-

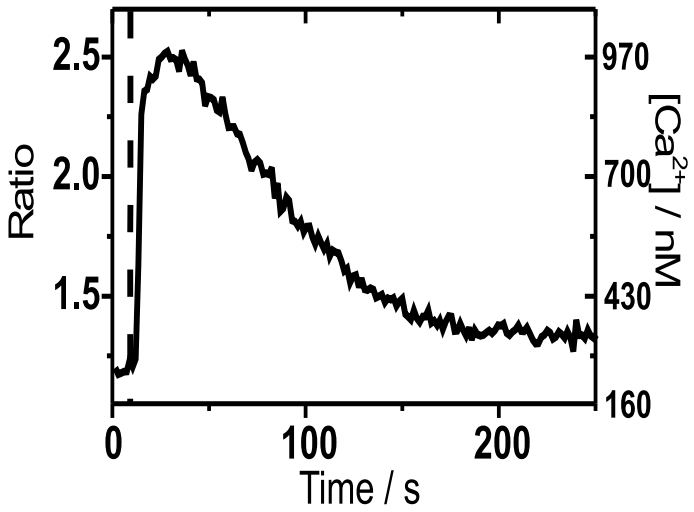

Abbildung 5.12: Typischer Verlauf einer intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration eines mechanisch stimulierten Osteoblasten.

plex sind, kann vom Verhalten einer einzelnen Zelle nicht auf das Verhalten aller Zellen geschlossen werden. Aus diesem Grund war es notwendig, eine Reihe von Experimenten durchzuführen, um so über eine Häufigkeitsverteilung Aussagen über die erforderlichen Stimulationskräfte zu treffen.

Von insgesamt 72 untersuchten Zellen haben 57 mit einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Ionen nach Ausübung eines mechanischem Reizes reagiert. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Schwellkräfte sind in der Abbildung 5.13 zusammengefasst. Dargestellt ist jeweils die Anzahl der Zellen, die auf eine applizierte Kraft reagiert haben, welche schrittweise von 0 bis $700nN$ erhöht wurde. Desweiteren haben wir die Anzahl der Stimuli variiert. In der Abbildung ist dieses durch unterschiedliche Schattierungen aufgeschlüsselt. Unsere bisherigen Ergebnisse zeigen keine signifikante Abhängigkeit von diesem Parameter. Aus diesem Grund stellten wir alle Messungen in einem Histogramm dar und interpretieren sie als ein Ganzes.

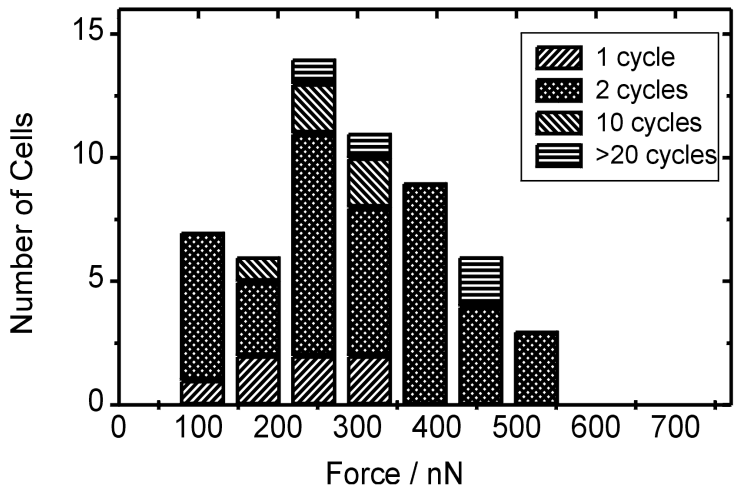

Abbildung 5.13: Histogramm der Schwellkräfte. Osteoblasten wurden einer Mikrokugel ($D = 4\mu m$) und einer Frequenz von 10Hz stimuliert.

Für Stimulationskräfte, die geringer als $110nN$ sind, konnten wir in keinem Fall einen Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration beobachten. Die durchschnittliche Schwelle, bei der eine Antwort beobachtet wurde, beträgt $300nN$. Jedoch reagieren nicht alle untersuchten Zellen mit einer $Ca^{2+}-$Ionenfreisetzung nach einer mechanischen Stimulation: 21% der Zellen zeigten überhaupt keine signifikante $Ca^{2+}-$Ionenkonzentrationsänderung bei Kräften bis zu $700nN$. Die Daten, die in Abbildung 5.13 dargestellt sind, wurden mit einer konstanten Stimulationsfrequenz von $10Hz$ (Periodendauer 0,1s) aufgenommen. Diese Frequenz wurde gewählt, da erste empirische Messungen gezeigt haben, dass sie am effizientesten zur Anregung verwendet werden kann.

Mit diesen Ergebnissen ist es erstmalig möglich die Kräfte zu bestimmen, die notwendig sind, eine einzelne Zelle direkt mechanisch zu stimulieren. Wir beobachteten eine intrazelluläre $Ca^{2+}-$Ionenkonzentrationsänderung infolge einer mechanischen Belastung im Bereich von $110nN$ bis $550nN$. Bei Stimu-

lationskräften unter $110nN$ konnten wir keine Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration feststellen. Daraus folgern wir, dass ein potentieller Mechanorezeptor nur durch Reize aktiviert werden kann, die über einer Aktivierungsschwelle von mindestens $110nN$ liegen.

Künftige Experimente könnten die hohe Genauigkeit des Rasterkraftmikroskops nutzen, um z.B. die Hypothese zu verifizieren, dass die Kalziumfreisetzung in Knochenzellen über Sensoren verläuft, die an das G-Protein gekoppelt sind. Dazu könnte ein G-Protein direkt mechanisch stimuliert werden, indem die Cantileverspitze mit G-Protein spezifischen Rezeptoren versehen wird.

5.5.3 Die deponierte Energie

Mit Hilfe unseres experimentellen Aufbaus konnten nicht nur Informationen über Kräfte, sondern auch über die Energie, die in der Zelle deponiert wurde, gewonnen werden. Diese Energie korreliert mit der Steifigkeit des mechanosensitiven Systems und dessen Aktivierungsenergie.

Die in die Zellen eingebrachte Energie entspricht der Fläche zwischen Annäherungskurve und der Entfernungskurve des Cantilevers. Für die in Abbildung 5.11 exemplarisch dargestellte Kurve erhalten wir eine eingebrachte Energie von $0,44pJ$.

Abbildung 5.14 zeigt eine Häufigkeitsverteilung der dissipierten Energien. Bei den 72 untersuchten Zellen lag der Mittelwert der dissipierten Energie bei $0,89pJ$. Aus diesen Werten können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Die Zellen verhalten sich nicht rein elastisch, denn dann wäre die dissipierte Energie gleich null. Ein elastisches Modell zur Beschreibung des mechanischen Verhaltens der Zellen kann daher nicht verwendet werden.

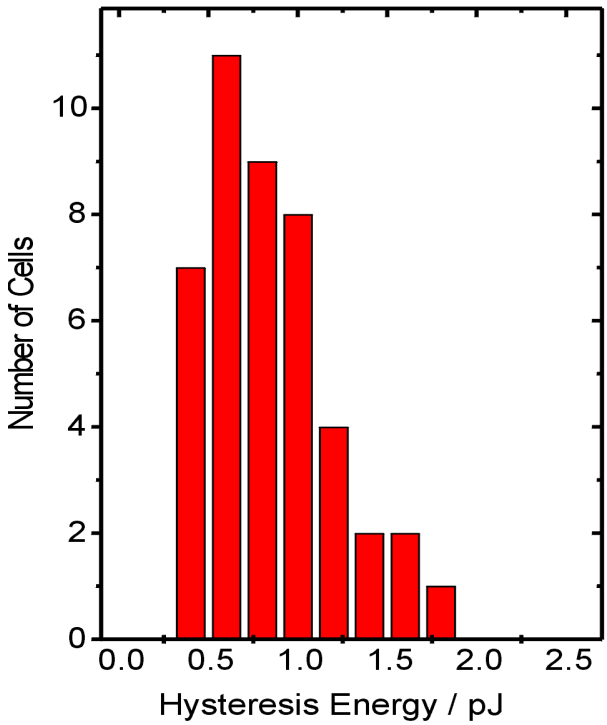

Abbildung 5.14: Histogramm der dissipierten Energie. Osteoblasten wurden einer Mikrokugel ($D = 4\mu m$) und einer Frequenz von 10Hz stimuliert.

2. Die dissipierte Energie ist deutlich höher, als die typische Aktivierungsenergie, die benötigt wird, um einen einzelnen Ionenkanal zu öffnen.

Die Aktivierungsenergie zur Öffnung eines Ionenkanals beträgt nach Sukharev et al. [Sukharev et al.(1999)] $19kT = 8 \cdot 10^{-5} pJ$. Die Energie, die in unseren Experimenten zur Aktivierung benötigt wird, ist vergleichbar mit Energien, wie sie von intrazellulären Actin- und Myosin-Filamenten erzeugt werden [Dembo und Wang(1999b)]. Unsere Experimente lassen vermuten, dass die Energien, die mit zellulären Antworten verbunden sind, einige Größenordungen höher liegen als für die Aktivierung eines einzelnen Ionenkanals

oder Proteins. Das lässt darauf schliessen, dass ein möglicher Mechanorezeptor nicht nur aus einem einzelnen Ionenkanal oder Protein besteht. Dieser Zusammenhang könnte als Indikator dafür dienen, dass es sich bei dem durch einen solchen Rezeptor freigesetzten Kalzium um intrazelluläres Kalzium handelt. Experimente zum Ursprung des Kalziums, wie sie in Kapitel 5.5.6 vorgestellt werden, werden genau diese These bestätigen.

5.5.4 Die Intrazelluläre Kalziumdynamik

Über den genauen zeitlichen Verlauf typischer zellulärer Kalziumantworten sind uns keine quantitativen Untersuchungen bekannt. Durch die Vielzahl an Mechanismen, die in die Kalziumdynamik involviert sind (Ionenpumpen, Kalziumkanäle, Kalziumpuffer und Kalziumspeicher) ist es sehr schwierig, ein einfaches geeignetes Modell zur Beschreibung der Dynamik einer Kalziumantwort aufzustellen. Um dennoch Aussagen zur Dynamik treffen zu können, definieren wir charakteristische Punkte in unseren Fluoreszenzkurven (Anwortzeiten, Verhältnisänderungen und Abklingzeiten), auf die wir im folgenden genauer eingehen.

Um die Antwortzeiten der mechanisch induzierten intrazellulären Kalziumantwort zu quantifizieren, definieren wir die *Antwortzeit* $\Delta t = t_0 - t_{\frac{1}{2}}$. Zum Zeitpunkt t_0 wurde das Maximum der Stimulationskraft erreicht. $t_{\frac{1}{2}}$ ist die Zeit, bei der die Kalziumkonzentration die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht hat. Ein Histogramm der von uns beobachteten *Antwortzeiten* ist in Abbildung 5.15 dargestellt.

40Zellen (56% aller untersuchten Zellen) zeigen einen Kalziumanstieg in weniger als 10 Sekunden. Es wurde ein unmittelbarer schneller Anstieg der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration beobachtet. Weitere 13(18%) Zellen reagierten mit einer Verzögerung zwischen $10s$ und $20s$. Bei drei (4%) Zellen beobachteten wir eine Verzögerungszeit von $20s$ bis $30s$. Bisher konnten wir in unseren Daten keine Abhängigkeit der Antwortzeit von der Stimu-

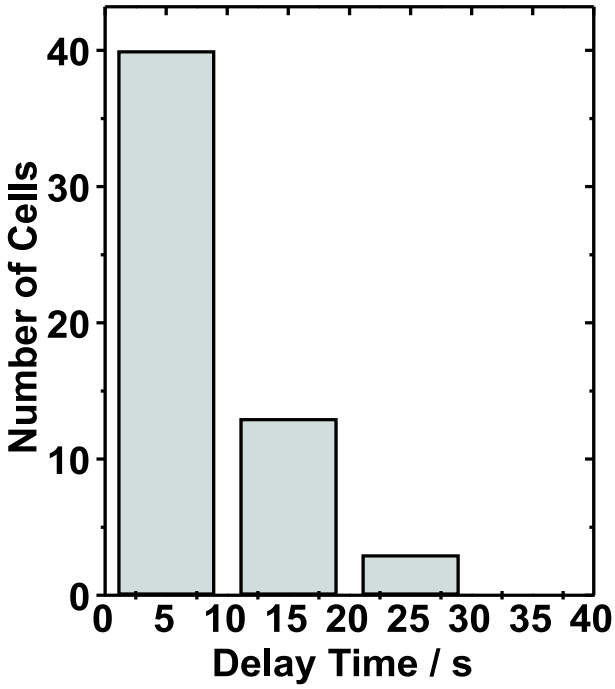

Abbildung 5.15: Histogramm der Antwortzeiten. Aufgetragen ist die Anzahl der Zellen, gegen die Zeit zwischen dem Erreichen des Maximum der Stimulationskraft und der Zeit, bei der die $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration die Hälfte ihres Maximalwertes erreicht hat. Osteoblasten wurden einer Mikrokugel ($D = 4\mu m$) und einer Frequenz von $10Hz$ stimuliert.

lationskraft beobachten.

Wenige Minuten nach Erreichen des Maximums ist die intrazelluläre $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration wieder auf ihr Normalniveau zurückgegangen (vgl. Abbildung 5.12). Dabei befördern Ionenpumpen das freigesetzte Kalzium zurück in intrazelluläre Speicher oder in den extrazellulären Raum. Wir legten eine Kurve mit exponentiellen Verlauf durch den abfallenden Bereich der Fluoreszenzkurve und bestimmten so eine durchschnittliche *Abklingzeit* von $38s$. Wir beobachten, dass Zellen schon nach einigen Minuten die Kalzium-

Ionenkonzentration ihres Ruhezustands wiederherstellen. Ob Zellen unmittelbar nach Erreichen dieses Ruhezustands wieder stimulierbar sind oder eine längere Latenzzeit benötigen bevor sie sich erneut stimulieren lassen ist noch unbekannt. In ersten Untersuchungen konnten wir beobachten, dass Zellen, die binnen zehn Minuten ein zweites Mal mechanisch stimuliert wurden, in der Regel keinen erneuten Kalziumfreisetzung zeigen. Nach Erhöhung der Kraft konnte dennoch in einigen Experimenten bereits nach 3 Minuten mit einer erneuten mechanischen Stimulation ein zweiter Kalziumanstieg und -abfall hervorgerufen werden.

5.5.5 Die Signalweiterleitung

Eine weitere und sehr wichtige Fragestellung, die wir mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Versuchsaufbau angehen konnten, ist die Frage, ob und auf welche Weise eine Zelle, die einem mechanischen Reiz ausgesetzt ist, diese Information an benachbarte Zellen weitergeben kann [Donahue(1998)]. Mit Stimulationsmethoden, wie dem Erzeugen von Scherkräften durch Flüssigkeitsströmungen und Dehnungsexperimente, lassen sich Effekte der Signalweiterleitung nur schwer untersuchen, da nicht eine einzelne Zelle stimuliert werden kann, sondern immer nur eine Vielzahl von Zellen.

Aus diesem Grund wurde in der Vergangenheit versucht, einzelne Zellen mit einer Mikropipette zu stimulieren, um die Signalweiterleitung an Nachbarzellen anhand der Kalziumdynamik zu untersuchen [Newman und Zahs(1997), Xia und Ferrier(1992), Boitano et al.(1992), Schirrmacher et al.(1992)]. Wird aber diese Methode angewendet, so ist es nicht möglich, den mechanischen Reiz, der auf die Zelle ausgeübt wird, exakt zu dosieren oder gar zu quantifizieren.

Bei unseren Experimenten waren wir mit Hilfe des Mikrocantilevers in der Lage, eine einzelne Zelle im Zellverbund zu stimulieren und die ausgeübten Kräfte zu quantifizieren. Die Fluoreszenzbilder erlauben nicht nur

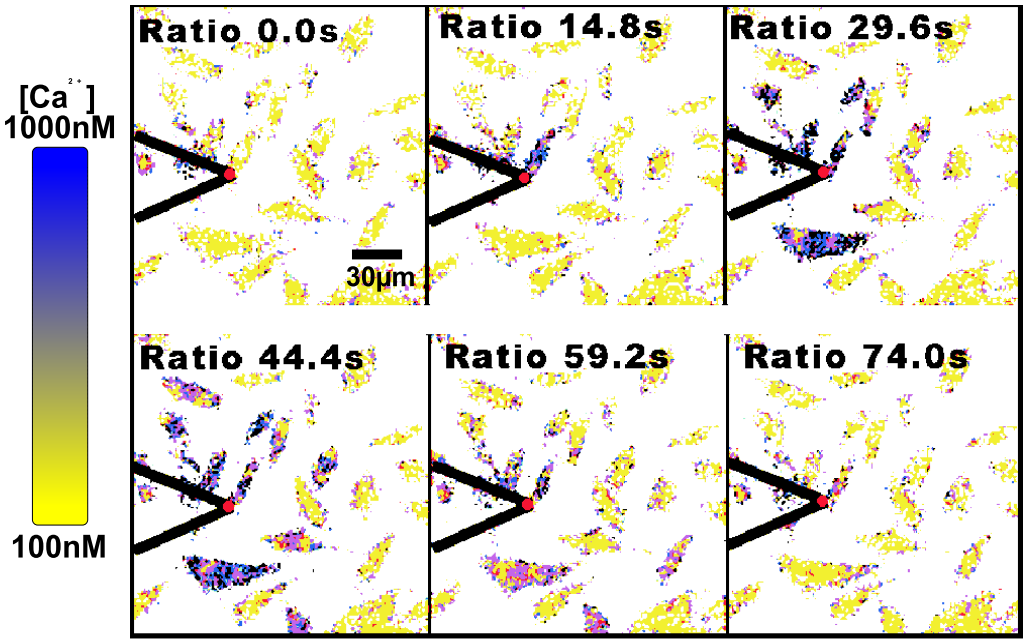

Abbildung 5.16: Mechanisch induzierte intrazelluläre Kalziumfreisetzung mit aufeinanderfolgender Reaktion benachbarter Zellen infolge der Signalweiterleitung. Dargestellt ist hier der Quotient der Fluoreszenzintensitäten in Falschfarbendarstellung als Maß für die intrazelluläre $Ca^{2+}-$Ionenkonzentration. Der Cantilever mit der Mikrokugel an dessen Spitze ist in die Fluoreszenzbilder eingezeichnet. Die Zelle unmittelbar unterhalb des Cantilevers wird zum Zeitpunkt $t = 0$ stimuliert. In den fünf folgenden Bildern lässt sich ein Kalziumanstieg von 13 benachbarten Zellen beobachten.

die Analyse der Kalziumdynamik der Zelle, die sich unmittelbar unterhalb des Cantilevers befand und durch diesen stimuliert wurde, sondern auch der Kalziumdynamik der benachbarten Zellen. Abbildung 5.16 zeigt einen Satz von 6 Fluoreszenzaufnahmen. Zum Zeitpunkt $t = 0s$ wurde eine Kraft von $230nN \pm 10nN$ ausgeübt. Wir beobachteten eine Stimulation der Zelle di-

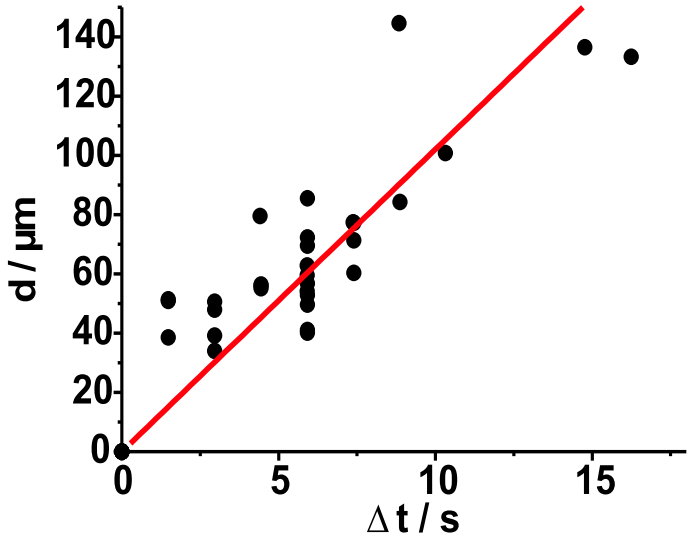

Abbildung 5.17: Signalweiterleitung von Zelle zu Zelle. Dargestellt ist der Abstand zur stimulierten Zelle gegen die Zeit, nach der es zu einer Kalziumantwort kommt.

rekt unterhalb des Cantilevers und einen nachfolgenden Kalziumanstieg von 13 benachbarten Zellen. Um die Geschwindigkeit der Signalausbreitung zu bestimmen, ermittelten wir den Abstand zwischen dem Zentrum des Zellkerns der stimulierten Zelle zum Zentrum des Kerns der umgebenden Zelle sowie die Zeit, bis das halbe Maximum der Zellantwort erreicht wurde. Für eine Serie von sieben unterschiedlichen Experimenten ist der Abstand gegen die Zeit in Abbildung 5.17 aufgetragen. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit lag im Bereich zwischen 3 und $15\frac{\mu m}{s}$. Der durchschnittliche Wert für die Ausbreitungsgeschwindigkeit lag bei $8,6 \pm 0,7\frac{\mu m}{s}$. Mit diesen Experimenten können wir zeigen, dass Osteoblasten in der Lage sind, einen mechanischen Stimulus, der zu einer intrazellulären Antwort führt, weiter zu leiten und benachbarte Zellen ebenfalls zu einer Freisetzung von intrazellulärem Kalzium anzuregen. Diese Erkenntnis liefert einen wichtigen Beitrag zu der weitaus allgemeineren Frage, wie der Gesamtknochen auf mechanische Reize reagiert. Wir können

daraus folgern, dass aufgrund der Signalweiterleitung nicht zwangsläufig jede Zelle, die an der Knochensynthese beteiligt ist, mechanosensitiv sein muss. Vielmehr kann nun eine einzelne Zelle den mechanischen Reiz wahrnehmen und durch Kommunikation mit dem Zellnetzwerk diese Information von Zelle zu Zelle weitergeben und so in einem größeren Bereich Knochenwachstum anregen.

5.5.6 Die Herkunft des Kalziums

Eine für die Aufklärung des potenziellen Mechanorezeptionsmechanismus sehr wichtige Frage ist der Ursprung der ins Zytoplasma freigesetzten $Ca^{2+}-$Ionen. Diese Frage wurde in der Literatur sehr kontrovers diskutiert [Berridge(1993), Sukharev et al.(1999)]. Mindestens zwei Quellen für freie $Ca^{2+}-$Ionen sind bekannt: Dabei können $Ca^{2+}-$Ionen entweder vom extrazellulären Bereich einströmen oder aber von intrazellulären Speichern freigesetzt werden. Im ersten Fall können die $Ca^{2+}-$Ionen die Zellmembran durch spezifische Ionenkanäle passieren. Im zweiten Fall werden $Ca^{2+}-$Ionen von intrazellulären Speichern, z.B. aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzt.

Um den Ursprung des Kalziums zu bestimmen, verwendeten wir ein $Ca^{2+}-$Ionen freies Nährmedium, d.h., dass alle Kalzium-Ionen durch Mangan-Ionen substituiert wurden. Da in der natürlichen Umgebung der Zellen Mangan nur in äußerst geringen Konzentrationen vorkommt und seine Elektronenverteilung und damit seine chemischen Eigenschaften vergleichbar mit denen von Kalzium sind, verhält sich Mangan in zellulären Prozessen äquivalent zu Kalzium-Ionen. Dieses Prinzip machen wir uns in den folgenden Experimenten zu Nutze. Anhand der Fluoreszenzänderung kann nun bestimmt werden, ob es sich um intrazelluläre (Kalzium) Ionen handelt. Wie bereits im Kapitel 3.1 beschrieben, verschiebt sich das Emissionsmaximum des Farbstoffs Fura-2 zu längeren Wellenlängen beim Einbinden von

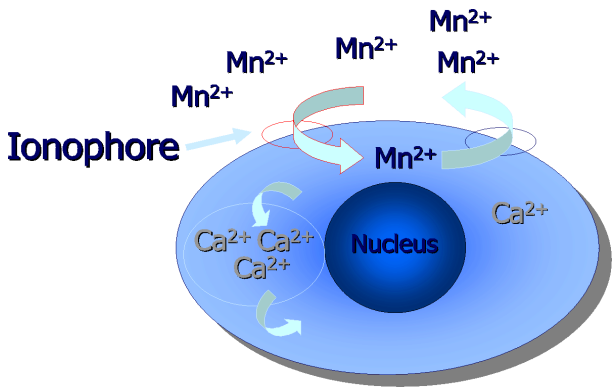

Abbildung 5.18: Schematische Darstellung des Einflusses von Ionophor auf die Kationenverteilung.

Ca^{2+}−Ionen. Was passiert nun, wenn sich statt Kalzium-Ionen Mangan-Ionen an den Farbstoff binden? Binden sich Mangan-Ionen an den Farbstoff, so ändert sich die Elektronenverteilung im Farbstoff, so dass die Fluoreszenz zerstört wird (*engl.: quenching*). Nachdem wir das extrazelluläre kalziumhaltige Nährmedium durch manganhaltiges Medium ersetzt haben, zeichnen wir das Fluoreszenzverhalten des Farbstoffs auf. Während des Experimentes geben wir Ionophor A23187 *Molecular Probes* [Deber et al.(1985)] auf die Zellen. Dieses bildet Ionenkanäle für zweiwertige Kationen in der Zellmembran aus und stimuliert damit über den Konzentrationsausgleich den Einfluß von extrazellulärem Mangan in die Zelle. Die Abbildung 5.18 zeigt schematisch die intra- und extrazelluläre Ionenverteilung bei Anwesenheit von extrazellulärem Mangan. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität bei 340nm, 380nm sowie das Verhältnis dieser Intensitäten ist in Abbildung 5.19 dargestellt. Ein unmittelbarer Abfall beider Intensitäten nach Zugabe von Ionophor zeigt die Zerstörung der Fluoreszenz durch die ins Zellinnere eintretende Mangan-Ionen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem Ionophor dem Medium zugegeben wurde. Im Vergleich zum Ionophor-induzierten Kalziumanstieg zeigt das Schema in Abbildung 5.20 die Ionenverteilung und

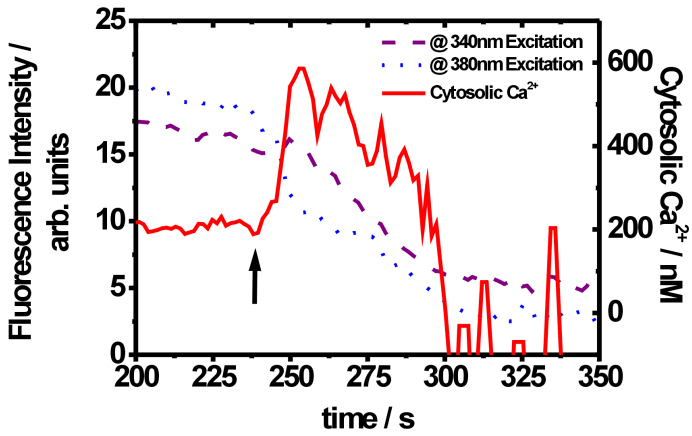

Abbildung 5.19: Fluoreszenzauslöschung von Fura-2 durch einfließende Mangan-Ionen in das Zytoplasma des Osteoblasten. Die Graphen repräsentieren den Fluoreszenzverlauf zur Anregung bei $340nm$ (gestrichelt) und bei $380nm$ (punktiert), sowie das Verhältnis der beiden Intensitäten (durchgezogen).

Abbildung 5.21 den Verlauf der Fluoreszenz infolge einer mechanischer Stimulation, die mit einer Kraft von $170nN \pm 10nm$ ausgeübt wurde. Im Gegensatz zum vorhergehenden Experiment, steigt unmittelbar nach der mechanischen Stimulation die Fluoreszenz zur Anregung bei $340nm$ an, während die Fluoreszenz zur Anregung bei 380nm abfällt. Dieser Verlauf ist charakteristisch für das Binden von $Ca^{2+}-$Ionen an den Farbstoff Fura-2 (vgl. auch Abbildung 5.12). Da bei diesen Experimenten die $Ca^{2+}-$Ionen des Mediums durch $Mn^{2+}-$ Ionen ersetzt wurden, kann der hier beobachtete Verlauf nur mit der Freisetzung von $Ca^{2+}-$Ionen aus *intrazellären* Speichern erklärt werden.

Im Vergleich zu einem Experiment ohne Anwesenheit von Mangan-Ionen (vgl. Abbildung 5.12) beobachten wir hier jedoch auch eine leichte Reduk-

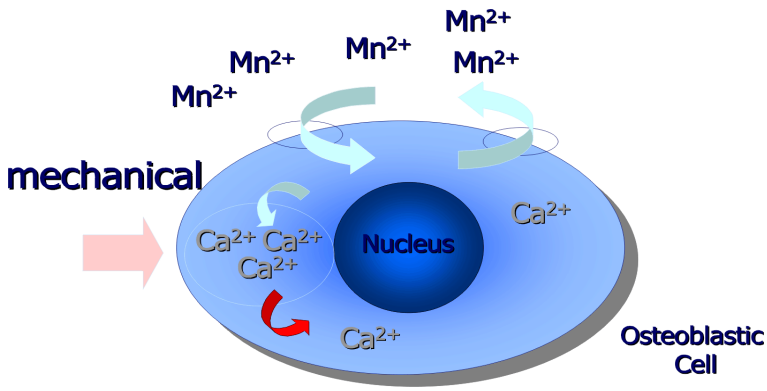

Abbildung 5.20: Schematische Darstellung der Kationenverteilung bei mechanischer Stimulation.

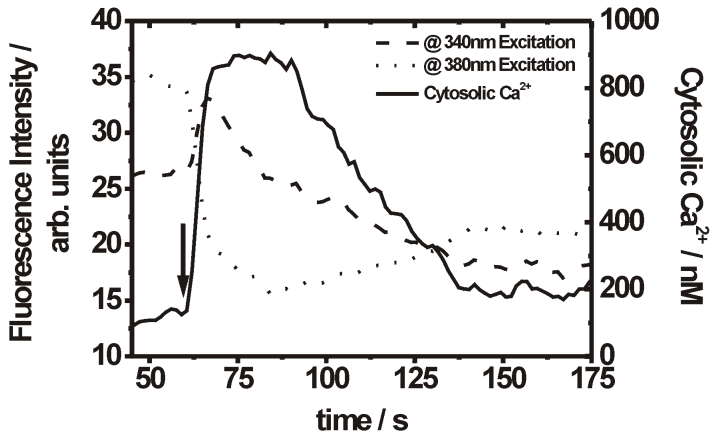

Abbildung 5.21: Mechanisch stimulierter Kalzium-Anstieg unter Anwesenheit von extrazellulärem Mangan. Die Graphen repräsentieren den Fluoreszenzverlauf zur Anregung bei $340nm$ (gestrichelt) und bei $380nm$ (punktiert), sowie das Verhältnis der beiden Intensitäten (durchgezogen).

tion der Fluoreszenzintensität. Dieses deutet darauf hin, dass auch einige $Mn^{2+}-$Ionen aus dem extrazellulären Raum in das Zellinnere gelangt sind. Ob dieses vor, während oder nach der Stimulation des Kalzium-Anstiegs geschieht, konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise erzeugt die mechanische Stimulation eine leichte lokale Erhöhung der intrazellulären Mangankonzentration, die ihrerseits die beobachtete Kalziumfreisetzung stimuliert. Insbesondere bei Experimenten mit niedrigen Kräften und ohne das Vorhandensein von Mangan-Ionen lies sich in der Nähe des Cantilevers eine vorübergehende leichte Erhöhung der intrazellulären $Ca^{2+}-$Ionen beobachten. Unmittelbar nach der Stimulation stellte sich wieder die Ruhekonzentration ein, oder aber es kam zu einer zu einer lawinenartigen Auslösung einer Kalziumfreisetzung. Dieses Phänomen ist als "Calcium induced Calcium release" von anderen Zellen bekannt. Möglicherweise handelt es sich bei der oben beschriebenen Kalziumfreisetzung unter Anwesenheit von extrazellulären Mangan-Ionen um eine durch Mangan-Ionen stimulierte Kalziumfreisetung die dann mit "Mangan induced Calcium release" bezeichnet werden könnte.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Experimente ermöglichen uns Aussagen zu treffen, woher die Kalzium-Ionen stammen, die als intrazelluläre Botenstoffe dienen. Aus unseren Experimenten können wir schließen, dass der größte Teil der freigesetzten $Ca^{2+}-$Ionen nicht etwa durch Ionenkanäle von Extrazellularraum ins Zellinnere gelangt, sondern vielmehr aus intrazellulären Speichern freigesetzt wird. Bisher ist über den Ursprung des Kalziums wenig bekannt. In der Literatur finden sich Untersuchungen von Lee et. al. [Lee et al.(1999)] über mechanisch stimulierte Hautzellen von Fischen (epitheliale Keratozyten). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, berichtet Lee jedoch vom Einströmen extrazellulärer $Ca^{2+}-$Ionen durch Ionenkanäle in der Zellmembran. Offensichtlich gibt es zwischen verschiedenen Zellarten Unterschiede in der Kalziumfreisetzung nach mechanischer Stimulation.

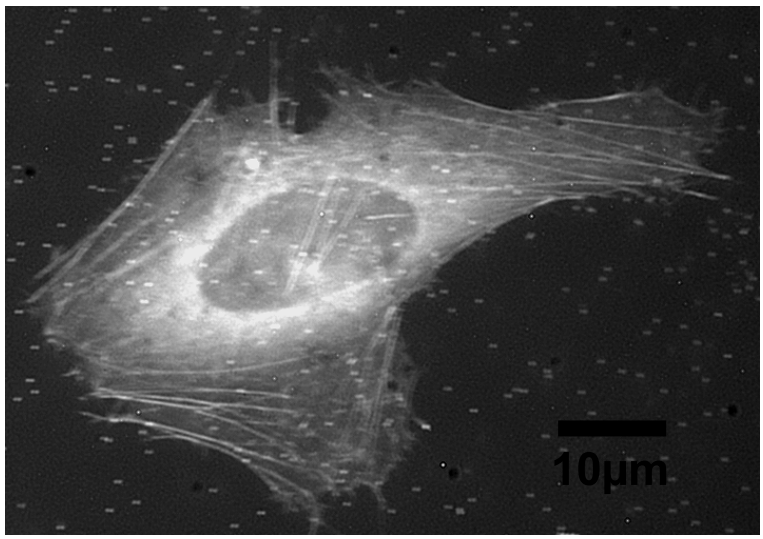

Abbildung 5.22: U2 Osteosarcoma (U2os) Zellen befinden sich auf einem Polyacrylamid Substrat, das fluoreszierende Partikel enthält. Die Actin-Filamente der Zellen wurden zusätzlich mit dem grün fluoreszierenden Proteinfarbstoff gefärbt (GFP von Clontech).

5.6 Quantifizierung von Zell- zu Substratkräften

Einen neuen Ansatz zur Quantifizierung intrazellulär auftretender Kräfte liefert eine Methode von Dembo et al. [Dembo und Wang(1999a), Lo et al.(2000)]. Wir haben mit dieser Methode untersucht, welche Kraft eine Knochenzelle auf ihr Substrat ausübt. Dazu wurden fluoreszierende Kugeln in ein elastisches Polyacrylamidgel eingebettet. Nach dem Anwachsen der Zellen auf dem Gel konnte mit einem Fluoreszenzmikroskop eine Verschiebung der Kugeln beobachtet werden. Abbildung 5.22 zeigt eine Osteosarkoma-Zelle deren Actin- und Myosin-Filamente mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt wurden und deren Substrat mit fluoreszierenden Kugeln

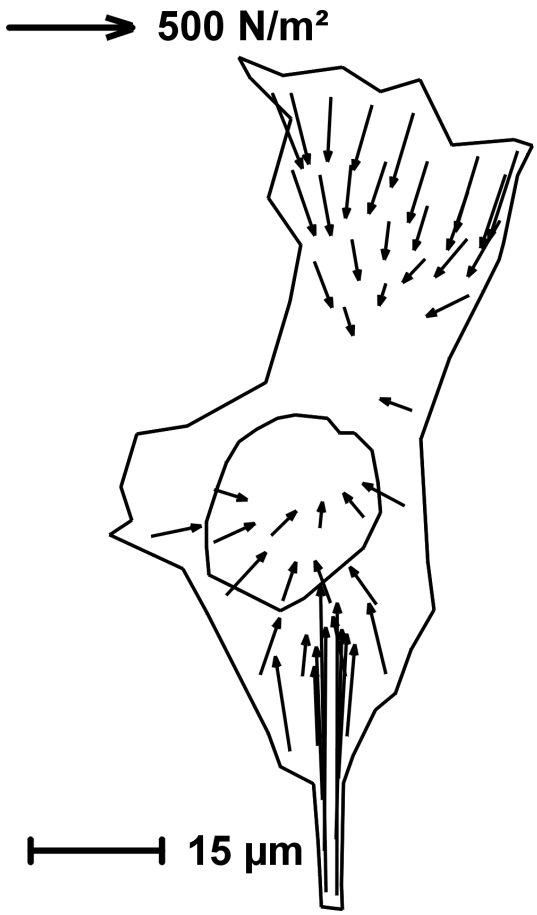

Abbildung 5.23: Die Vektorpfeile geben Richtung und Größe der aus einer Verschiebung von Fluoreszenzpartikeln berechneten Kräfte an, die ein Osteoblast auf sein Substrat (Polyacrylamid) ausübt.

versehen war. Nach Anwachsen der Zellen konnte die Position der Kugeln gemessen werden. Wurden die Zellen im Anschluss vom Substrat abgelöst, so relaxierte das Substrat in seine ursprüngliche Form, und die Position der Kugeln veränderte sich. Durch Bestimmung der Verschiebung der Kugeln konnte also die lokale Verformung des Substrates bestimmt werden. Sind nun die elastischen Eigenschaften des Substrates bekannt (z.B. durch Bestimmung

des Youngs Moduls mit dem Rasterkraftmikroskop), so kann jeder Verschiebung einer Kugel eine Kraft zugeordnet werden, deren Größe und Richtung berechnet wurde. Das Ergebnis einer derartigen Berechnung ist in Abbildung 5.23 dargestellt. Die Gesamtfläche des Osteoblasten beträgt $1946\mu m^2$. Jüngste Experimente mit einer zusätzlichen Färbung der Actin-Filamente zeigten, dass die Zelle die Kräfte in Richtung der Actin- und Myosin-Filamente ausbildet. Um einen Eindruck von der Gesamtkraft zu bekommen, die die Zelle auf ihr Substrat ausüben kann, summieren wir alle Kräfte.

Die auf diese Weise ermittelte Gesamtkraft beträgt $293nN$ und hat eine vergleichbare Größenordnung, wie die von uns mit dem Rasterkraftmikroskop ausgeübten Kräfte. Dieses legt die Vermutung nahe, dass ein Mechanorezeptor in Knochenzellen an die Actin- und Myosin-Filamente gekoppelt sein kann. Es sind weitere Experimente in Vorbereitung, bei denen dieses Verfahren mit der gleichzeitigen mechanischen Stimulation durch das Rasterkraftmikroskop kombiniert wird. Damit ließe sich die interessante Frage untersuchen, ob die mechanische Belastung direkt auf die Actin- und Myosin-Filamente wirkt, und wenn ja, welche minimalen Verschiebungen von Actin- und Myosin-Filamenten notwendig sind, um eine Zelle mechanisch zu stimulieren.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit entstand im Rahmen einer interdisziplinären Kooperation zwischen dem Fachbereich Physik und dem Fachbereich experimentelle Orthopädie und Biomechanik der Philipps-Universität Marburg, sowie dem Fachbereich Physikalische Chemie der Universität-GH Siegen.

Die mikroskopischen Abläufe während des Knochenumbaus waren bisher noch nicht hinreichend verstanden, um krankhafte Veränderungen ursächlich behandeln zu können, wie sie bei der weit verbreiteten Krankheit Osteoporose auftreten. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein genaueres Verständnis zellulärer Prozesse in mechanisch stimulierten Knochenzellen zu erlangen.

Aus diesem Grunde wurden im Rahmen dieser Arbeit experimentelle Aufbauten entwickelt, mit denen sich Reaktionen von Knochenzellen sowohl auf Schwerelosigkeit als auch unter Einwirkung mechanischer Belastung untersuchen ließen. Da es bekannt ist, dass Kalzium-Ionen eine wichtige Rolle in Signalübertragungsprozessen in Zellen spielen, untersuchten wir die intrazelluläre Kalziumdynamik als Indikator für eine Zellreaktion.

Zunächst wurde die intrazelluläre Kalziumdynamik während und nach Phasen der Schwerelosigkeit in Parabelflügen untersucht. Ein von uns speziell für diese Experimente entwickeltes Fluoreszenzphotometersystem kann durch Verwendung des Farbstoffs Indo-1 intrazelluläre Kalzium-Ionenkonzentrationen zeitaufgelöst erfassen. Obwohl die Vitalität der Zellen während des Flugs durch Hormonstimulation sicher nachgewiesen wurde, konnte dennoch weder während der Schwerelosigkeitsphasen, noch während der Hypergravitationsphasen eine signifikante Veränderung der intrazellulären Kalzium-Ionenkonzentration festgestellt werden. Eine obere Abschätzung der maximalen Kraft, die aufgrund von Gravitationsänderungen auf

eine Zelle wirken kann, liegt bei $50nN$.

Die fehlende Antwort der Zellen auf Gravitationsänderungen stellte uns vor die Frage, ob die Kräfte zu gering waren. Daher interessierte uns die minimal notwendige Kraft, mit der eine mechanische Stimulation einer Knochenzelle erreicht werden kann. Zur Klärung dieser Fragestellung entwickelten wir eine neuartige Kraftapparatur, die auf dem Prinzip der Rasterkraftmikroskopie beruht und uns erlaubte quantitativ Kräfte im Bereich von $250pN$ bis $800nN$ auf eine lebende Zelle auszuüben. Die bei der Rasterkraftmikroskopie üblicherweise eingesetzten Prüfspitzen (Cantilever) wurden mit einer Mikrokugel versehen, um eine definierte Stimulationsfläche zu erhalten. Gleichzeitig konnte die zelluläre Kalziumveränderung spektroskopisch beobachtet werden.

Somit waren wir mit dieser Anordnung erstmalig in der Lage, frühe zelluläre Prozesse (Fluoreszenzänderungen des Farbstoffs Fura-2 in Folge der Freisetzung von intrazellulärem Kalzium) während und nach quantifizierbarer mechanischer Stimulation zu beobachten. Mit diesem System konnten folgende neue Erkenntnisse gewonnen werden:

1. Knochenzellen (Osteoblasten) zeigen eine direkte Antwort auf mechanische Stimuli. Bei einer durchschnittlichen Kraft von $300nN$ reagierten die Zellen mit einem intrazellulären Kalziumanstieg. Kräfte unter $110nN$ führten nicht zu einer Antwort der Zellen. Von allen untersuchten Zellen ließen sich ca. 20% überhaupt nicht stimulieren.

2. Untersuchungen zur zeitlichen Dynamik der Zellantwort zeigen, dass drei Viertel der reagierenden Zellen unmittelbar, d.h. innerhalb von $10s$ nach dem Reiz reagieren.

3. Der Ursprung des freigesetzten Kalziums liegt hauptsächlich in intrazellulären Speichern.

4. Zellen können die Reiz-Information an Nachbarzellen weitergeben. Die durchschnittliche Signalgeschwindigkeit liegt bei $8,6 \pm 0,7 \frac{\mu m}{s}$.

Diese Ergebnisse unterstützen weiterhin unsere Experimente in Schwerelosigkeit, die eine fehlende Kalziumantwort der Zellen zeigten, da die bei den Parabelflügen auftretenden Maximalkräfte von $50nN$ sowohl deutlich unter dem Mittelwert von $300nN$ als auch sicher unterhalb der von uns bestimmten minimalen Kraftschwelle von $110nN$ liegen. Wir folgern daraus, dass eine minimale Kraftschwelle existiert, ab der es erst zu einer intrazellulären Kalziumantwort kommen kann.

Warum es dennoch bei längeren Aufenthalten in Schwerelosigkeit zum Knochenabbau kommt kann zwei Gründe haben. Zum Einen könnte das Fehlen kurzzeitiger hoher Beschleunigungen, die beispielsweise beim Treppensteigen auftreten, einen Rückgang der Knochensynthese durch Osteoblasten zur Folge haben. Zum Anderen könnte ein möglicher mechanischer Sensor kleine Kraftänderungen integrieren, wenn diese Änderungen über längere Zeit wirken. Diese mögliche Fähigkeit der Langzeitwahrnehmung sollte in künftigen terrestrischen Laborexperimenten untersucht werden, bei denen eine konstante Kraft über längere Zeit mit dem Rasterkraftmikroskop ausgeübt wird.

Interessant ist die Beobachtung, dass Zellen aktiv eine Kraft auf Oberflächen, an die sie sich anheften, ausüben. Diese Kraft liegt in der gleichen Größenordnung, wie die Kraft, die zur mechanischen Aktivierung einer Zelle notwendig ist. Messungen an Osteoblasten zeigen, dass diese Kräfte in Richtung der Actin- und Myosin-Filamente verlaufen. Dieser Prozess legt die Vermutung nahe, dass ein potentieller Mechanorezeptor an die Actin- und Myosin-Filamente gekoppelt ist. Weiterführende Experimente, bei denen die Substratkräfte simultan zur mechanischen Stimulation gemessen werden (vgl. Kapitel 5.6), können diese Hypothese stärken.

Später stellten wir uns die Frage, ob jede Zelle autonom und selbständig

auf Reize von außen reagiert, oder ob es eine wie auch immer geartete Kommunikation zwischen den Zellen gibt, die sie zu einer konzertierten Reaktion befähigt. Aus unseren Experimenten zur Reizweiterleitung an nicht mechanisch stimulierten Nachbarzellen lässt sich folgern, dass Osteoblasten im Zellverbund miteinander kommunizieren. Erste Untersuchungen der Reihenfolge der Zellantworten lassen vermuten, dass von der stimulierten Zelle keine zentralen Signalstoffe per Diffusion durch das Medium ausgeschüttet werden, sondern dass der Reiz über zelluläre Ausläufer übertragen wird. Weitere Experimente sollen die Mechanismen der zellulären Informationsweiterleitung genauer klären.

Ein weiteres bis vor kurzem unbekanntes Phänomen ist von Rotsch et al. an Fibroblasten [Rotsch et al.(1999)] und von uns an Endothelzellen beobachtet worden. Lässt man den Cantilever auf der Zelloberfläche ruhen, so beobachtet man ein Pulsieren der Zelloberfläche. Es wäre nun interessant zu klären, ob die Anwesenheit des Cantilevers das Pulsieren auslöst und ob dieses Pulsieren mit intrazellulären Kalziumveränderungen korreliert, wie sie bei mechanischer Stimulation auftreten (ein entsprechender Versuchsaufbau mit einem Doppel-Cantilever wird bereits erprobt). Möglicherweise nehmen Zellen Veränderungen der Umgebung nicht rein passiv wahr, sondern überprüfen durch regelmäßige Oberflächenveränderung aktiv, ob sich die mechanische Umgebung verändert hat.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Rasterkraft-Fluoreszenzsystem konnte wesentliche neue Erkenntnisse über das Verhalten von Knochenzellen nach direkter mechanischer Stimulation liefern und stellt damit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Knochenauf und -abbaus dar. Diese und weiterführende Experimente lassen hoffen, künftig die mikroskopischen Vorgänge der Osteoporose zu verstehen und in diese Vorgänge gezielt eingreifen zu können.

7 Anhang

7.1 Kultivieren und Präpararieren der Zellen

Die in dieser Arbeit überwiegend verwendeten bovinen Osteoblasten wurden von ca. 18 Monate alten Rindern nach dem Auswachsverfahren, das von Jones et al. [Jones et al.(1991)] beschrieben wurde, gewonnnen. Unter sterilen Bedingungen wurde dabei das Periost vom freipräparierten Knochen in Form von Streifen entfernt und in $5mm$ x $5mm$ große Stückchen zerteilt. Nach Überführung in Pufferlösung (Earles Puffer) wurden die Perioststückchen drei mal jeweils 10 Minuten gewaschen und abschließend mit $250U/ml$ Penicillin und $375U/ml$ Streptomycin für $20Minuten$ behandelt. Die Temperatur der Medien wurde bei 37^oC gehalten. Je $1cm^2$ Perioststückchen wurde in eine Kulturfläche von $15cm^2$ gelegt und mit dem HiGEM (High Growth Enhancement Medium) versorgt. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um Fette abzuspülen. Ein Mediumwechsel fand während der weiteren Kultivierung 1 Mal pro Woche statt. Nach 4 - 5 Wochen erreichte die Kultur einen vollen Bedeckungsgrad (Konfluenz) der Kulturfläche und wurde für Experimente verarbeitet bzw. für eine Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen wurden durch eine Collagenase-Behandlung geteilt (passagiert) und jede Charge phänotypisiert. Die Zellkulturen wurden als Monolayer in speziell dafür vorgesehenen Kulturflaschen bzw. Petrischalen kultiviert. Als Medium wurde HiGEM bzw Ham's F10 mit einem 10% igem Anteil an FCS (Fetales Kälberserum) verwendet. Ham's F10 enthielt $10mM$ HEPES, 10% fetales Kälberserum ($10\mu g/ml$) sowie Vitamin-C Phosphate. HiGEM erfordert wegen seiner hohen Pufferkapazität den Einsatz

eines CO_2-Begasungsbrutschrankes (5% CO_2) zur Einstellung des pH-Werts. Zusätzlich wurden dem Medium für Primärkulturen noch Antibiotika und Antimykotika zugesetzt. Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde im wesentlichen nach den Vorschlägen von Lindl u. Bauer [Lindl und Bauer(1994)] verfahren. Ein möglichst reproduzierbares Verhalten der Zellen in den Experimenten wurde dadurch gewährleistet, dass für unsere Experimente eine größere Menge Zellen eingefroren und jeweils vor den Experimenten aufgetaut wurde. Um die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196^oC einfrieren zu können, mussten sie zuvor von der Oberfläche gelöst (Trypsinieren bzw. Collagenasebehandlung) werden. Im Anschluß wurde ein Einfriermedium dazugegeben, um die Bildung von zellzerstörenden Eiskristallen zu verhindern. Nach Überführung in Kryoröhrchen wurden die Zellen auf Eis gestellt, und dann in einen Styroporbehälter eingebracht. Anschließend erfolgte eine langsame Abkühlung der Zellen (mit ca. 1^oC pro Minute) in einem 80^oC -Gefrierschrank. Nach 12 Stunden wurden die Zellen dann in einen Flüssigstickstoffbehälter überführt. Zum Auftauen von Zellen wurde ein Gefrierröhrchen direkt aus dem Stickstoffbehälter in ein 37^oC Wasserbad gestellt und nach Zugabe eines vorgewärmten Mediums sedimentiert (200g). Die Zellen wurden nun in ein Kulturgefäß gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen erneut gelöst und für die Experimente in der Zellkammer (s. Abschnitt 5.1.2) auf Deckgläschen ausgesät. Die Osteoblasten wurden in einer Dichte von 15.000$Zellen/cm^2$ für einen Tag kultiviert und unmittelbar vor den Experimenten gefärbt.

7.2 Methoden zur Bestimmung der Federkonstante

7.2.1 Die Bestimmung der Federkonstante über das thermische Rauschen

Der Cantilever kann vereinfacht als schwingender und einseitig eingespannter Balken betrachtet werden. In der Mechanik deformierbarer Körper lässt er sich wie eine Federschwingung mit angehängter Masse beschreiben und folgt damit dem Hookschen Gesetz. Durch thermische Anregung hat der Cantilever immer eine gewisse potenzielle und kinetische Energie. Ein ruhendes Federpendel hat allein aufgrund thermischer Anregung eine mittlere Energie von k_BT (T: absolute Temperatur, k_B: Boltzmannkonstante). Nach dem Gleichverteilungssatz der Thermodynamik muss auf die potentielle und auf die kinetische Energie im Mittel $\frac{1}{2}k_BT$ entfallen. Da die potenzielle Energie eines Federbalkens $\frac{1}{2}c_F \cdot x^2$ ist (K: Federkonstante x: Auslenkung), gilt also:

$$\langle e_{pot} \rangle_t = \frac{1}{2} c_F \cdot \langle x^2 \rangle_t = \frac{1}{2} k_B T \tag{7.1}$$

($\langle x^2 \rangle$ ist der zeitliche Mittelwert von x^2). Für ein ruhendes Federpendel gilt dann die einfache Beziehung

$$c_F = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \tag{7.2}$$

Im Folgenden werden wir ein Verfahren beschreiben, wie sich die Größe $\langle x^2 \rangle$ experimentell bestimmen lässt.

Die Experimentelle Bestimmung der mittleren quadratischen Auslenkung

Um über diesen Ansatz die Federkonstante zu bestimmen, muss die mittlere quadratische Auslenkung $\langle x^2 \rangle$ experimentell ermittelt werden. Sie ergibt sich

aus dem Mittelwert der zu verschiedenen Zeiten gemessenen, thermisch bedingten Auslenkungen des Cantilevers. Auf dem direkten Weg lässt sich der Wert $\langle x^2 \rangle$ nur sehr ungenau bestimmen, da der Mikrocantilever ständig um die Ruhelage driftet. Das elektrische Signal des oszillierenden Cantilevers ist von einem niederfrequentem Rauschen überlagert, das auf die Elektronik und auf den Drift der Mechanik zurückzuführen ist. Vergleicht man die Amplitude dieses Rauschens mit den zu erwartenden thermischen Rauschamplituden ist dieser Drift so groß, dass die mittlere Ruhelage nur mit einem großen Fehler ermittelt werden kann. Werden nun aber die Auslenkungsdaten nach einer Fouriertransformation in der Frequenzdarstellung betrachtet, lässt sich $\langle x^2 \rangle$ zuverlässig bestimmen. In der Frequenzdarstellung wird der auf ein Frequenzintervall entfallende Anteil der sich überlagerten Schwingungen des Cantilevers dargestellt. Dabei werden die scheinbar stochastischen Schwankungen des Mikrocantilevers in einzelne Frequenzanteile aufgeteilt.

Um $\langle x^2 \rangle$ zu bestimmen, führten wir eine Fouriertransformation des Positionsdetektorsignals durch. Wir verwendeten dazu einen Spektrum-Analysator (*Hewlett Packard, HP89410A*).

Statt eines Spektrum-Analysators kann jedoch auch mit einer Wandlerkarte, die die analogen Signale in digitale überführt das Frequenzspektrum untersucht werden. Dazu wird das Detektorsignal zunächst aufgezeichnet und dann mit den Daten eine Spektralanalyse durchgeführt.

Um die gemessene Spannung in eine Auslenkung in Nanometer umzurechnen, muss zuvor eine Kraftkurve gegen eine nicht deformierbare Fläche gemessen werden. Aus der Steigung ermitteln wir die PSD-Detektorempfindlichkeit und können damit die gemessenen Detektorwerte umrechnen. Anschließendes Quadrieren der Werte liefert dann die Leistungsdichteverteilung (*Power Spectrum Density, PSD*). Abbildung 7.1 zeigt eine Spektralanalyse des thermischen Rauschens in Luft eines $100\mu m$ langen Silizium-Nitrid Cantilevers.

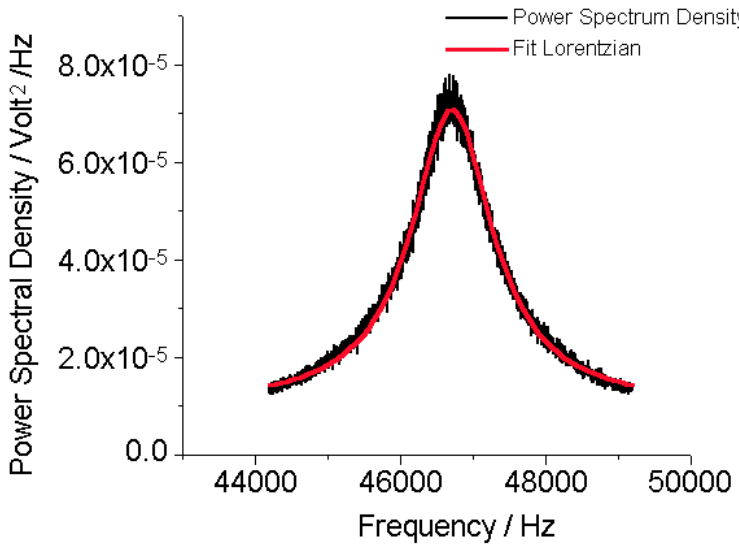

Abbildung 7.1: Thermisch induzierte Schwingung (1.Ordung) eines $100\mu m$ langen Silizium Nitrid Cantilevers. Dargestellt ist die Spektralanalyse des Positions-Detektorsignals.

Im Bereich der Resonanzfrequenz des Cantilevers lässt sich eine typische Resonanzkurve beobachten. Die Fläche unter der Kurve entspricht der mittleren Auslenkung $\langle x^2 \rangle$. Um die Fläche genau zu bestimmen, lässt sich durch die Resonanzkurve eine Lorentzkurve *(Lorentian)* legen. Der Lorentzkurve ist noch ein kontinuierlicher Untergrund überlagert, der aus dem Rauschen des Detektors, des Lasers und der Elektronik resultiert. Die Fläche unter der Lorentzkurve ist gleich der gesuchten Größe $\langle x^2 \rangle$, denn nach dem "Parseval-Theorem" ist die Fläche unter der Lorentzkurve in der Darstellung der Leistungsdichte gerade gleich dem mittleren Schwankungsquadrat der zugehörigen Schwingungsmode. Setzt man die so ermittelte mittlere Auslenkung in die Formel 7.2 ein, so kann die Federkonstante berechnet werden.

Ein Vorteil dieser Methode ist es, dass sie sich relativ schnell durchführen

lässt, wenn ein Spektrumanalysator oder eine entsprechend schnelle Datenaufzeichnung vorhanden ist. Die Aufnahmerate muss dabei nach dem Nyquist Theorem mindestens doppelt so hoch wie die höchste noch aufzulösende Frequenz sein. Möchte man also das spektrale Rauschen eines $200\mu m$ langen Siliziumnitrid Cantilevers mit seiner Resonanzfrequenz erster Ordnung von ungefähr $20kHz$ noch darstellen, so benötigt man eine Datenaufnahme mit einer Aufzeichnungsrate von mindestens $40kHz$.

Hauptnachteil dieser Methode ist die schlechte Genauigkeit der Bestimmung der Federkonstanten. Der von M. Preuß in seiner Dissertation ermittelte Fehler beträgt 30% [Preuss(1999)].

Die folgenden zwei Punkte erschweren zusätzlich die Auswertung:

1. Erstens schwingt der Cantilever nicht nur in der Grundmode, sondern auch in höheren Moden. Die Gesamtenergie ist also verteilt auf verschiedenen Moden. Eine analytische Lösung findet sich bei Butt und Jaschke [Butt und Jaschke(1995)]. Sie konnten zeigen, dass auch die höheren Schwingungsmoden unabhängige Beiträge zur Gesamtenergie liefern. Nach dem Gleichverteilungssatz trägt jede weitere Oberschwingung des thermisch angeregten Federbalkens mit $\frac{1}{2}k_bT$ zur mittleren potenziellen Energie des Cantilevers bei. Die Beiträge der einzelnen Schwingungsmoden tauchen in der Darstellung der Leistungsdichte als unabhängige Lorentzkurven bei den jeweiligen Resonanzfrequenzen auf. Der Federbalken kann nun als Superposition vieler Federpendel betrachtet werden, die jeweils eigene Resonanzfrequenzen besitzen. Für jedes dieser Federpendel lässt sich aus der Lorentzkurve der Wert der mittleren quadratischen Auslenkung $\langle x^2 \rangle$ und damit die Federkonstante bestimmen. Wir haben jeweils nur die Grundmode zur Bestimmung der Federkonstante verwendet. Jedoch führt die Überlagerung verschiedener Schwingungsmoden zu einem verfälschten Detektorsignal. Grund dafür ist, dass die Richtung des refektierten Strahls aufgrund der Form

der Durchbiegung bei höheren Schingungsmoden sehr von der Position des Fokus auf dem Cantilever abhängt.

2. Zweitens wird nicht die Auslenkung des Cantilevers, sondern nur die Steigung am Ende des Cantilevers gemessen. Greift eine Kraft am Ende eines einseitig eingespannten Balkens statisch an, so sind Auslenkung des Cantilevers und Position des reflektierten Laserstrahls einander proportional. Dieser statische Fall tritt auch auf, wenn die Höhenkalibrierung vorgenommen wird, d.h. der Cantilever gegen eine harte, nicht deformierbare Fläche gedrückt wird. Wird die Piezospannung gegen die Detekorauslenkung aufgetragen, dann beschreibt der Graph im Kontaktbereich eine Gerade konstanter Steigung. Ein frei schwingender Cantilever weist eine andere dynamische Deformation auf als ein statisch belasteter Cantilever. Für den Federbalken konnten Butt und Jaschke [Butt und Jaschke(1995)] zeigen, dass sich dieser Fehler durch Einführung eines multiplikativen Korrekturfaktors a_{korr} korrigieren lässt.

$$c_F = a_{korr} \cdot \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle} \tag{7.3}$$

Dieser Korrekturfaktor a_{korr} hängt von der Cantilevergeometrie ab. Für rechteckige Cantilever ist er berechenbar und beträgt ungefähr 0.85. Experimentell wurde dieser Wert von Walters et al [Walters et al.(1996)] bestätigt. Für V-förmige Cantilever, wie wir sie verwendet haben, liegt noch keine Berechnung vor. M. Preuß hat jedoch Werte für a_{korr} durch Vergleich mit anderen Methoden empirisch bestimmt. Für V-förmige Cantilever ermittelte er einen Korrekturfaktor von $1,4 \pm 0,4$.

Wegen des relativ großen Fehlers benutzten wir daher, trotz des größeren Aufwands, meistens die Methode angehängter Massen, wie sie im folgenden beschrieben wird (7.2.2).

7.2.2 Die Federkonstantenbestimmung mittels angehängter Massen

Die nachfolgend beschriebene Methode angehängter Massen [Cleveland et al.(1993)] ist recht aufwendig, liefert aber sehr genaue Werte der Federkonstante. Sie beruht auf der Änderung der Resonanzfrequenz eines schwingenden Balkens, dessen Masse sich ändert. Der Cantilever wird bei dieser Methode wie ein ideales Federpendel betrachtet. Für die Resonanzfrequenz ν_0 gilt dann:

$$\nu_0 = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{c_F}{m_{eff}^{Feder}}} \tag{7.4}$$

c_F ist die Federkonstante und m_{eff}^{Feder} ist die effektive Federmasse. Diese hängt beim realen Federpendel von dessen Geometrie und Materialeigenschaften ab.

Wird nun eine zusätzliche Masse m_{add} am Federende angebracht, so reduziert sich die Resonanzfrequenz auf:

$$\nu = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{c_F}{m_{eff}^{Feder} + m_{add}}}. \tag{7.5}$$

Löst man die Gleichung nach m_{add} auf, so ergibt sich die lineare Gleichung 7.6 mit m_{add} als Funktion von $\frac{1}{\nu^2}$ mit den beiden unbekannten Koeffizienten c_F und m_{eff}^{Feder}:

$$m_{add} = \frac{c_F}{4\pi^2}\cdot\frac{1}{\nu^2} - m_{eff}^{Feder} = \frac{c_F}{4\pi^2}\cdot\left(\frac{1}{\nu^2} - \frac{1}{\nu_0^2}\right) \tag{7.6}$$

ν_0 ist die Resonanzfrequenz der Feder ohne angehängte Massen. Trägt man nun m_{add} gegen $\frac{1}{\nu^2}$ auf, so beträgt die Steigung der Geraden $c_F/4\pi^2$. Die effektive Masse taucht darin als Ordinatenabschnitt auf. Die Ermittlung der Resonanzfrequenzen für mindestens zwei verschiedene Massen liefert die gesuchte Federkonstante.

In unseren Experimenten gingen wir folgendermaßen vor: Mit einem Aufbau wie er bereits in Kapitel 5.1.3 beschrieben ist, wurden Wolframkugeln

verschiedenen Durchmessers ($1 - 30\mu m$) an die Cantileverspitze angebracht und anschließend die jeweilige Resonanzfrequenz gemessen. Die Kugeln hafteten dabei durch Adhäsion an der Spitze und wurden nach der Resonanzmessung an einem Streifen Epoxidharz abgelegt. Danach wurde der Radius der in Harz eingeklebten Kugeln mit einem Rasterelektronenmikroskop bestimmt. Für die Masse m_k der Kugeln gilt dann $m_k = \frac{4}{3}\pi r^3 \cdot \rho_W$. Die Dichte des Wolframs beträgt $\rho_W = 19,25 \frac{g}{cm^3}$. Zur Bestimmung der Federkonstanten wurde für jeweils 10 verschiedene angehängte Kugeln die Resonanzfrequenz des Cantilevers gemessen und die Masse der Kugeln bestimmt. Abbildung 7.2 zeigt eine typische Messung für 10 verschiedene angehängte Massen. Zur Bestimmung der Federkonstanten ist die Methode der angehängten Massen im Vergleich zur Messung des thermischen Rauschens zwar aufwendiger, erlaubt jedoch eine Bestimmung der Federkonstanten mit einem statistischen Fehler von lediglich $4\% - 6\%$ im Gegensatz zu einem Fehler von 30% bei der erstgenannten Methode.

7.2.3 Federkonstantenbestimmung mittels Referenzcantilever

Um den Aufwand der Federkonstantenbestimmung der Cantilever etwas reduzieren zu können, verwendeten Cantilever die zuvor mit der Methode der angehängten Massen kalibrierten wurden. Diese dienten als Referenz, um weitere Cantilever zu kalibrieren. Dazu wurde eine Kraftkurve mit einem Cantilever unbekannter Federkonstante aufgenommen, indem er gegen die Richtung des Referenzcantilevers gefahren wurde. Die unbekannte Federkonstante wird bestimmt, indem eine Kraft-Abstandskurve des zu kalibrierenden Cantilevers gegen den Referenzcantilever aufgenommen wird. Aus der Steigung der Geraden im Kontaktbereich wird die Sensitivität $s_{Ref}(nm/V_{Detektor})$ ermittelt. Die Messung wird wiederholt, indem nun der Referenzcantilever gegen eine harte Oberfläche ausgetauscht und ebenfalls aus der Steigung der

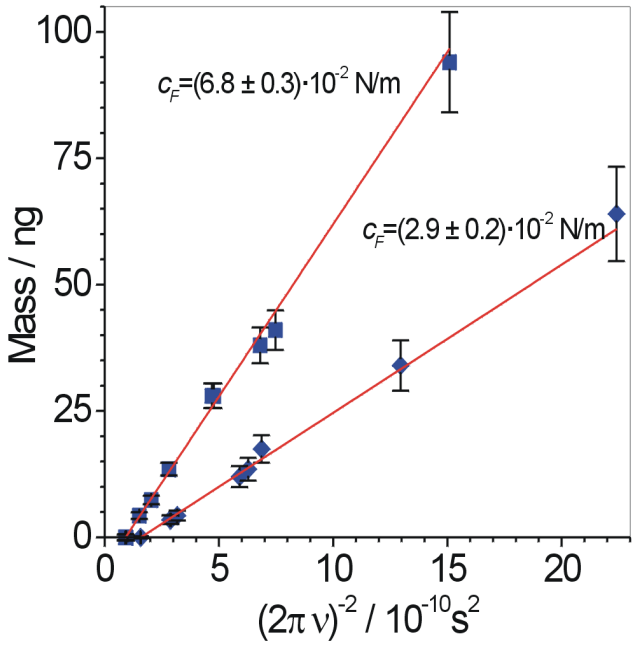

Abbildung 7.2: Bestimmung der Federkonstanten mit der Methode der angehängten Massen und Messung der Resonanzfrequenz. Die Werte der Federkonstante c_F stammen aus einer mit dem Fehler gewichteten linearen Regression. Die Fehlerbalken resultieren aus der kleinen Abweichung der Wolframkügelchen von der idealen Kugelform aus [Preuss(1999)].

Gerade in Kontaktbereich die Sensitivität s_0 bestimmt wird. Die Federkonstante c_{neu} des neuen Cantilevers lässt sich nun berechnen, da die Federkonstante c_{Ref} des Referenzcantilevers bekannt ist:

$$c_{Neu} = \frac{s_{Ref} - s_0}{s_0} \cdot c_{Ref} \tag{7.7}$$

Der Gesamtfehler der Bestimmung der Federkonstanten mittels eines Referenzcantilevers liegt bei unter 10% und ist damit deutlich genauer als die Methode der Cantileverkalibrierung durch die Methode des thermischen Rauschens. Aus diesem Grund wurde die Federkonstante bei den in dieser Ar-

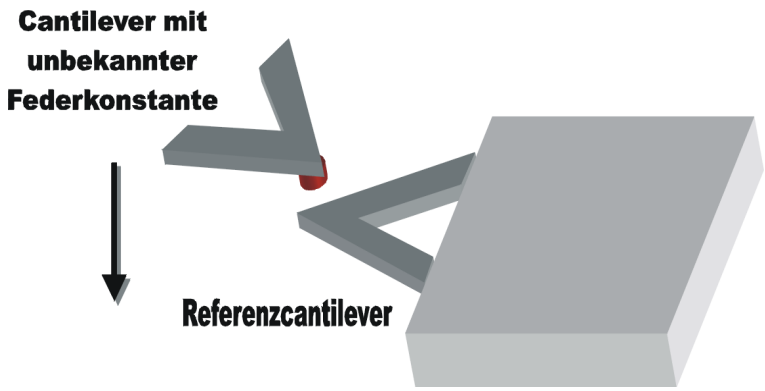

Abbildung 7.3: Anordnung der Cantilever zur Bestimmung der Federkonstanten. Der obere Cantilever befindet sich im Halter mit einer Inklination von 13° und kann so gegen den unteren Cantilever bewegt werden. Der untere Cantilever liegt mit dem Substrat auf ebenen Untergrund.

beit vorgestellten Kräftemessungen überwiegend mittels Referenzcantilever bestimmt.

8 Danksagung

An dieser Stelle sei allen gedankt, die mich in fachlicher und menschlicher Hinsicht unterstützt und so einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben:

- Prof. Dr. Wolfgang Rühle für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Ermöglichung dieser interessanten Arbeit.
- Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Martin Hofmann für die vorbildliche Betreuung und sein Engagement, mir sehr viel zu ermöglichen.
- Prof. Dr. David Jones mit dem die Zusammenarbeit mal schwer und mal schwerelos, jedoch immer spannend war, für die freundliche Betreuung insbesondere in biologischen Fragen und für die Aufnahme in seine Labors.
- Dipl. Phys. Erk Klopp, Katja Hohenberger, Damaris Rink und Daniel Graff für die Geduld auch in langen Labornächten und in luftiger Höhe durchzuhalten.
- Torsten Pohl von dem ich viel über Feinmechanik und korrekter Beschriftung lernen konnte.
- Marita Kratz und Weng Tang für den unerbittlichen Fleiß die Osteoblasten am Leben zu erhalten und ihnen Farbstoff einzutrichtern.
- Dr. Matthias Born und Dipl. Ing. Gerd Ehlers von denen ich viel gelernt und ohne deren vortreffliche Elektronikentwicklung diese Ergebnisse nicht entstanden wären.

- Den freundlichen Mitarbeitern der Werkstätten, deren schnelle Hilfe oft ein Experiment gerettet hat.

- Sami Curtze und Dr. Jochen Tenbosch, von denen ich viel von der Zellbiologie lernen konnte.

- Meinen Büromitstreitern Dipl. Phys. Eckhard Finger (Ecki), Dipl. Phys. Anke Wagner, Dipl. Phys. Andre Christ, Dipl. Phys. Sebastian Kraft, Dr. Martin Vollmer, Dr. Detlef Weber und Dipl. Phys. Jasper Möbius für die unterhaltsame Zeit im Büro

- Allen Parabelfliegern, insbesondere den *Orthopädies*, mit denen ich eine unvergessliche Zeit verbracht habe.

- Martin Breede für die neuen Erkenntnisse und die Weiterentwicklung unseres ETECAL's (Electronically tunable external cavity laser).

- Dipl. Phys. Stefan Hoffmann und Dipl. Phys. Rüdiger Thul für die interessante gemeinsame Entwicklung eines neuartigen Laserscanners.

- Prof. Harald Giessen, Prof. Peter Thomas, Dr. habil. Wolfgang Stolz, Frau Anne Ehlers, Dipl. Phys. Markus Bender, Dipl. Phys. Mirko Leuschner, Dr. Arno Euteneuer, Dr. Georg Wegmann, Dr. Martin Schüttler, Dipl. Phys. Christian Bauer, Dr. Daniel Hägele, Dipl. Phys. Andreas Hansch, Dr. Markus Hopmeier, Dipl. Phys. Jens Hübner, Dr. Christian Lerner, Dipl. Phys. Markus Lipitz, Dr. Sven Müller, Dr. Carsten Reh, Dr. Gunter Urbasch, Dipl. Phys. Rainer Zimmermann Dr. Markus Ziegler, Dipl. Phys. Xingping Zhang und allen anderen die mich in den letzten vier Jahre begleitet haben für die interessanten fachlichen Diskussionen und ein angenehmes Arbeitsklima.

- Prof. Dr. Hans-Jürgen Butt von der Universität-GH Siegen für die fruchtbare Kooperation und Dipl. Phys. Stefan Ecke der mir die Kunst

des *force pushing* mit Rasterkraftmikroskopen beigebracht hat und dessen Freundschaft mich persönlich bereichert.

- Allen Mitarbeitern von Sacher Lasertechnik die uns materiell und fachlich unterstützt haben.

- Allen Mitarbeitern von Digital Instruments, insbesondere Ken Babcock, Irene Revenko, Paul Fowler, Sophia Hohlbauch, Ben Ohler, James Massie, Dough Gotthard, Carolin Tolksdorf, Richard Puestow, Elke Brazel, Steve Markakis, sowie Bernd und Nadja Maringer für deren freundliche Integration in die Geburtsstätte des AFM's.

- Allen, die mich auf meinem Weg begleitet haben und die nicht namentlich erwähnt wurden.

- Dipl. Phys. Jens Förstner und Dipl. Phys. Jörg Zimmermann (Zimmi) deren Freundschaft an meinem ersten Tag in Marburg begann.

- Dr. Bernd Smarsly für die enge Verbundenheit und Unterstützung.

Für eine Unterstützung im Leben außerhalb der Physik danke ich vor allem meiner Mutter Elizabeth und meinem Vater Hans-Jürgen, meinem Bruder Martin und meiner Oma Anneliese Struckmeier die nicht nur finanziell sondern auch privat die guten Voraussetzungen für mein Studium und die Promotion geschaffen haben. Danke für alles.

Meinen ganz besonderen Dank gilt meiner geliebten Frau Claudia für die schöne Zeit in Marburg und die liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen.

Literaturverzeichnis

[Alexander et al.(1989)] S. Alexander, L. Hellemans, O. Marti, J. Schneir, V. Elings, P. K. Hansma, M. Longmire und J. Gurley. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *J.Appl.Phys.*, **65**(1): 164–167, 1989.

[Ando et al.(1994)] J. Ando, A. Ohtsuka, Y. Katayama, R. Korenaga, C. Ishikawa und A. Kamiya. Intracellular calcium response to directly applied mechanical shearing force in cultured vascular endothelial cells. *Biorheology.*, **31**(1): 57–68, 1994.

[Banes et al.(1995)] A. J. Banes, M. Tsuzaki, J. Yamamoto, T. Fischer, B. Brigman, T. Brown und L. Miller. Mechanoreception at the cellular level: the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem.Cell Biol.*, **73**(7-8): 349–365, 1995.

[Barbee et al.(1994)] K. A. Barbee, P. F. Davies und R. Lal. Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ.Res.*, **74**(1): 163–171, 1994.

[Berridge(1993)] M. J. Berridge. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, **361**(6410): 315–325, 1-28-1993.

[Berridge(1997)] M. J. Berridge. The AM and FM of calcium signalling [news; comment]. *Nature*, **386**(6627): 759–760, 4-24-1997.

[Berridge et al.(1998)] M. J. BERRIDGE, M. D. BOOTMAN und P. LIPP. Calcium–a life and death signal [news]. *Nature*, **395**(6703): 645–648, 10-15-1998.

[Bikle et al.(1994)] D. D. BIKLE, J. HARRIS, B. P. HALLORAN und E. MOREYHOLTON. Altered skeletal pattern of gene-expression in response to spaceflight and hindlimb elevation. *American Journal Of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, **30**: E 822–E 827, 1994.

[Binnig et al.(1986)] G. BINNIG, C. F. QUATE und C. GERBER. Atomic force microscope. *Phys.Rev.Lett.(USA)*, **56,**(9): 930–3, 1986.

[Boitano et al.(1992)] S. BOITANO, E. DIRKSEN und M. SANDERSON. Intercellular propagation of calcium waves mediated by Inositol Triphosphate. *Science*, **258**: 292–295, 1992.

[Burger und Veldhuijzen(1993)] E. BURGER und J. VELDHUIJZEN. Influence of mechanical factors on bone formation, resorption and growth in vitro. *Bone, CRC Press, Boca Raton, FL*, **7**: 37–56, 1993.

[Butt und Jaschke(1995)] H. BUTT und M. JASCHKE. Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, **6**: 1, 1995.

[Carmeliet et al.(1997)] G. CARMELIET, G. NYS und R. BOUILLON. Microgravity reduces the differentiation of human osteoblastic MG-63 cells. *Journal Of Bone And Mineral Research*, **12**(5): 786–794, 1997.

[Carmeliet et al.(1998)] G. CARMELIET, G. NYS, I. STOCKMANS und R. BOUILLON. Gene Expression related to the differentiation of osteoblastic cells is altered by microgravity. *Bone*, **22**(5): 139S–143S, 1998.

[Clapham(1995)] D. E. CLAPHAM. Calcium signaling. *Cell*, **80**(2): 259–268, 1-27-1995.

[Cleveland et al.(1993)] J. P. CLEVELAND, S. MANNE, D. BOCEK und P. K. HANSMA. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev.Sci.Instrum.(USA)*, **64,**(2): 403–5, 1993.

[Craig et al.(1996)] V. CRAIG, A. HYDE und R. PASHLEY. Application of the light-lever technique to the study of colloidal forces. *Langmuir*, **12**: 3357, 1996.

[Deber et al.(1985)] C. M. DEBER, J. TOM-KUN, E. MACK und S. GRINSTEIN. Bromo-A23187: a nonfluorescent calcium ionophore for use with fluorescent probes. *Anal.Biochem.*, **146**(2): 349–352, 5-1-1985.

[Dembo und Wang(1999a)] M. DEMBO und Y. WANG. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophysical Journal*, **76**: 2307–2316, 1999a.

[Dembo und Wang(1999b)] M. DEMBO und Y.-L. WANG. Stresses at the cell-to-surface interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J.*, **76**: 2307–2316, 1999b.

[Donahue(1998)] H. J. DONAHUE. Gap junctional intercellular communication in bone: a cellular basis for the mechanostat set point. *Calcif.Tissue Int.*, **62**(2): 85–88, 1998.

[Ducker et al.(1991)] W. DUCKER, T. SENDEN und R. PASHLEY. Direct measurement of colloidal forces using an atomic force microscope. *Nature*, **353**: 239, 1991.

[Duncan et al.(1998)] R. L. DUNCAN, K. A. AKANBI und M. C. FARACH-CARSON. Calcium signals and calcium channels in osteoblastic cells. *Semin.Nephrol.*, **18**(2): 178–190, 1998.

[Duncan und Turner(1995)] R. L. DUNCAN und C. H. TURNER. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int.*, **57**(5): 344–358, 1995.

[Frost(1983)] H. FROST. A determinant of bone architecture. The minimum effective strain. *Clin. Orthop.*, **200**: 198–225, 1983.

[Frost(1987)] H. FROST. Bone 'Mass' and the 'mechanostat': a proposal. *Anat. Rec.*, **219**: 1–9, 1987.

[Fujimori et al.(1991)] A. FUJIMORI, S. L. CHENG, L. V. AVIOLI und R. CIVITELLI. Dissociation of second messenger activation by parathyroid hormone fragments in osteosarcoma cells. *Endocrinology*, **128**(6): 3032–3039, 1991.

[Ghosh und Greenberg(1995)] A. GHOSH und M. E. GREENBERG. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, **268**(5208): 239–247, 4-14-1995.

[Gibson et al.(1996)] C. GIBSON, G. WATSON und S. MYRHA. Determination of the spring constants of probes for force microscopy/spectroscopy. *Nanotechnology*, **7**: 259, 1996.

[Grynkiewicz et al.(1985)] G. GRYNKIEWICZ, M. POENIE und R. Y. TSIEN. A new generation of Ca2+ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, **260**(6): 3440–3450, 3-25-1985.

[Hassan et al.(1998)] E. HASSAN, W. F. HEINZ, M. D. ANTONIK, N. P. D'COSTA, S. NAGESWARAN, C. A. SCHOENENBERGER und J. H. HOH. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys. J.*, **74**(3): 1564–1578, 1998.

[Haydon et al.(1996)] P. G. HAYDON, R. LARTIUS, V. PARPURA und S. P. MARCHESE-RAGONA. Membrane deformation of living glial cells using atomic force microscopy. *J.Microsc.*, **182 (Pt 2)**: 114–120, 1996.

[Heinz und Hoh(1999)] W. F. HEINZ und J. H. HOH. Spatially resolved force spectroscopy of biological surfaces using the atomic force microscope. *Trends Biotechnol.*, **17**(4): 143–150, 1999.

[Henderson et al.(1992)] E. HENDERSON, P. G. HAYDON und D. S. SAKAGUCHI. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*, **257**(5078): 1944–1946, 1992.

[Hengsberger et al.(2001)] S. HENGSBERGER, A. KULI und P. ZYSSET. A combined atomic force microscopy and nanoindentation technique to investigate the elastic properties of bone structural units. *Eur.Cells and Materials*, **1**: 12–17, 2001.

[Hert(1990)] J. HERT. Wolff's law of transformation after 100 years. *Acta Chir Orthop.Traumatol.Cech.*, **57**(6): 465–476, 1990.

[Hofmann et al.(1997)] U. G. HOFMANN, C. ROTSCH, W. J. PARAK und M. RADMACHER. Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope. *J.Struct.Biol.*, **119**(2): 84–91, 1997.

[Hutter und Bechhoefer(1993)] J. HUTTER und J. BECHHOEFER. Calibration of atomic force microscope tips. *Rev. Sci. Instrum.*, **64**: 1868, 1993.

[Ishida et al.(1997)] T. ISHIDA, M. TAKAHASHI, M. A. CORSON und B. C. BERK. Fluid shear stress-mediated signal transduction: how do endothelial cells transduce mechanical force into biological responses? *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **811**: 12–23, 4-15-1997.

[Jacobs et al.(1998)] C. R. JACOBS, C. E. YELLOWLEY, B. R. DAVIS, Z. ZHOU, J. M. CIMBALA und H. J. DONAHUE. Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells. *J.Biomech.*, **31**(11): 969–976, 1998.

[Jones et al.(1995)] D. JONES, G. LEIVSETH und J. TENBOSCH. Mechanoreception in osteoblast-like cells. *Biochem.Cell Biol.*, **73**(7-8): 525–534, 1995.

[Jones und Bringmann(1991)] D. B. JONES und D. BRINGMANN. How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? *Cells and.Methods*, **1**: 329–340, 1991.

[Jones et al.(1991)] D. B. JONES, H. NOLTE, J. G. SCHOLÜBBERS, E. TURNER und D. VELTEL. Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials*, **12**(2): 101–110, 1991.

[Junqueira(1996)] JUNQUEIRA. Histologie. *Springer Verlag*, **4. Auflage**: 190–217, 1996.

[Kolega(1986)] J. KOLEGA. Effects of Mechanical Tension on Protrusive Activity and Microfilament and Intermediate Filament Organization in an Epidermal Epithelium Moving in Culture. *The Journal of Cell Biology*, **102**(4): 1400–1411, 1986.

[Lal et al.(1995)] R. LAL, B. DRAKE, D. BLUMBERG, D. R. SANER, P. K. HANSMA und S. C. FEINSTEIN. Imaging real-time neurite outgrowth and cytoskeletal reorganization with an atomic force microscope. *Am.J.Physiol*, **269**(1 Pt 1): C275–C285, 1995.

[Lal und John(1994)] R. LAL und S. A. JOHN. Biological applications of atomic force microscopy. *American J.Physiol.*, **35**(4): C1–C21, 1994.

[Langer et al.(2000)] M. G. LANGER, A. KOITSCHEV, H. HAASE, U. REXHAUSEN, J. K. HORBER und J. P. RUPPERSBERG. Mechanical stimulation of individual stereocilia of living cochlear hair cells by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, **82**(1-4): 269–278, 2000.

[Lanyon(1987)] L. E. LANYON. Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodelling. *J.Biomech.*, **20**(11-12): 1083–1093, 1987.

[Lean et al.(1995)] J. M. LEAN, C. J. JAGGER, T. J. CHAMBERS und J. W. CHOW. Increased insulin-like growth factor I mRNA expression in rat osteocytes in response to mechanical stimulation. *Am.J.Physiol.*, **268**(2 Pt 1): E318–E327, 1995.

[Lee et al.(1999)] J. LEE, A. ISHIHARA, G. OXFORD, B. JOHNSON und K. JACOBSON. Regulation of cell movement is mediated by stretch-activated calcium channels. *Nature*, **400**(6742): 382–386, 1999.

[Lehenkari und Horton(1999)] P. P. LEHENKARI und M. A. HORTON. Single integrin molecule adhesion forces in intact cells measured by atomic force microscopy. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **259**(3): 645–650, 6-16-1999.

[Lindl und Bauer(1994)] T. LINDL und J. BAUER. Zell- und Gewebekultur. *Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena-New York*, 1994.

[Lo et al.(2000)] C. LO, G. WANG, M. DEMBO und Y. WANG. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical Journal*, **79**: 144–152, 2000.

[Malek und Izumo(1995)] A. M. MALEK und S. IZUMO. Control of endothelial cell gene expression by flow. *J.Biomech.*, **28**(12): 1515–1528, 1995.

[Malek und Izumo(1996)] A. M. MALEK und S. IZUMO. Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *J.Cell Sci.*, **109 (Pt 4)**: 713–726, 1996.

[Matsumoto et al.(1998)] T. MATSUMOTO, K. NAKAYAMA, Y. KODAMA, H. FUSE, T. NAKAMURA und S. FUKUMOTO. Effect of mechanical unloading and reloading on periosteal bone formation and gene expression in tail-suspended rapidly growing rats. *Bone*, **22**(5): 89S–93S, 1998.

[Mikuni-Takagaki(1999)] Y. MIKUNI-TAKAGAKI. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J.Bone Miner.Metab*, **17**(1): 57–60, 1999.

[Morey und Baylink(1978)] E. R. MOREY und D. J. BAYLINK. Inhibition of bone formation during space flight. *Science*, **201**(4361): 1138–1141, 9-22-1978.

[Morris(1990)] C. E. MORRIS. Mechanosensitive ion channels. *J.Membr.Biol.*, **113**(2): 93–107, 1990.

[Nagao und Dvorak(1999)] E. NAGAO und J. A. DVORAK. Phase imaging by atomic force microscopy: analysis of living homoiothermic vertebrate cells. *Biophys.J.*, **76**(6): 3289–3297, 1999.

[Naruse und Sokabe(1993)] K. NARUSE und M. SOKABE. Involvement of stretch-activated ion channels in Ca2+ mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *Am.J.Physiol*, **264**(4 Pt 1): C1037–C1044, 1993.

[Neagu et al.(1994)] C. NEAGU, K. O. VAN DER WERF, C. A. PUTMAN, Y. M. KRAAN, B. G. DE GROOTH, N. F. VAN HULST und J. GREVE.

Analysis of immunolabeled cells by atomic force microscopy, optical microscopy, and flow cytometry. *J.Struct.Biol.*, **112**(1): 32–40, 1994.

[Nelson et al.(1995)] M. T. NELSON, H. CHENG, M. RUBART, L. F. SANTANA, A. D. BONEV, H. J. KNOT und W. J. LEDERER. Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks [see comments]. *Science*, **270**(5236): 633–637, 10-27-1995.

[Newman und Zahs(1997)] E. NEWMAN und K. ZAHS. Calcium waves in retinal glial cells. *Science*, **275**: 844–847, 1997.

[Pavalko et al.(1998)] F. M. PAVALKO, N. X. CHEN, C. H. TURNER, D. B. BURR, S. ATKINSON, Y. F. HSIEH, J. QIU und R. L. DUNCAN. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions. *Am.J.Physiol*, **275**(6 Pt 1): C1591–C1601, 1998.

[Pietrasanta et al.(1994)] L. I. PIETRASANTA, A. SCHAPER und T. M. JOVIN. Imaging subcellular structures of rat mammary carcinoma cells by scanning force microscopy. *J.Cell Sci.*, **107 (Pt 9)**: 2427–2437, 1994.

[Preuss(1999)] M. PREUSS. Untersuchung der Wechselwirkung zwischen kolloidalen Teilchen und Luftblasen. *Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Fachbereich Chemie*, 1999.

[Putman et al.(1994)] C. A. PUTMAN, K. O. VAN DER WERF, B. G. DE GROOTH, N. F. VAN HULST und J. GREVE. Viscoelasticity of living cells allows high resolution imaging by tapping mode atomic force microscopy. *Biophys.J.*, **67**(4): 1749–1753, 1994.

[Putman et al.(1992)] C. A. J. PUTMAN, N. F. GROOTH, VAN HULST und J. GREVE. A detailed analysis of the optical beam deflection techniques

for use in atomic forcs microscopy. *Appl.Phys.Lett.*, **72**(1): 6–12, 3-30-1992.

[Putney(1998)] J. W. PUTNEY. Calcium signaling: up, down, up, down...what's the point? *Science*, **279**(5348): 191–192, 1-9-1998.

[Raiteri et al.(1998)] R. RAITERI, M. PREUSS, M. GRATTAROLA und H.-J. BUTT. Preliminary results on the electrostatic double-layer force between two surfaces with high surface potentials. *Colloids and Surf. A*, **136**: 191–197, 1998.

[Rambaut und Johnston(1979)] P. C. RAMBAUT und R. S. JOHNSTON. Prolonged weightlessness and calcium loss in man. *Acta Astronautica*, **6**: 1133–1122, 1979.

[Rotsch et al.(1999)] C. ROTSCH, K. JACOBSON und M. RADMACHER. Dimensional and mechanical dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by using atomic force microscopy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **96**(3): 921–926, 2-2-1999.

[Rottingen und Iversen(2000)] J. ROTTINGEN und J. IVERSEN. Ruled by waves? Intracellular and intercellular calcium signalling. *Acta Physiol Scand*, **169**: 203–219, 2000.

[Sader et al.(1995)] J. SADER, I. LARSON und P. MULVANEY. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers. *Rev. Sci. Instr.*, **66**: 3789, 1995.

[Sadoshima und Izumo(1997)] J. SADOSHIMA und S. IZUMO. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu.Rev.Physiol*, **59**: 551–571, 1997.

[Sasaki et al.(1998)] S. SASAKI, M. MORIMOTO, H. HAGA, K. KAWABATA, E. ITO, T. USHIKI, K. ABE und T. SAMBONGI. Elastic properties

of living fibroblasts as imaged using force modulation mode in atomic force microscopy. *Arch.Histol.Cytol.*, **61**(1): 57–63, 1998.

[Schirrmacher et al.(1992)] K. SCHIRRMACHER, I. SCHMITZ, E. WINTERHAGER, O. TRAUB, F. BRUMMER, D. JONES und D. BINGMANN. Characterization of gap junctions between osteoblast-like cells in culture. *Calcif.Tissue Int.*, **51**(4): 285–290, 1992.

[Schneider et al.(1997)] S. W. SCHNEIDER, Y. YANO, B. E. SUMPIO, B. P. JENA, J. P. GEIBEL, M. GEKLE und H. OBERLEITHNER. Rapid aldosterone-induced cell volume increase of endothelial cells measured by the atomic force microscope. *Cell Biol.Int.*, **21**(11): 759–768, 1997.

[Schoenenberger und Hoh(1994)] C. A. SCHOENENBERGER und J. H. HOH. Slow cellular dynamics in MDCK and R5 cells monitored by time-lapse atomic force microscopy. *Biophys.J.*, **67**(2): 929–936, 1994.

[Senden und Ducker(1994)] T. SENDEN und W. DUCKER. Experimental determination of spring constants in atomic force microscopy. *Langmuir*, **186**: 1003, 1994.

[Shroff et al.(1995)] S. G. SHROFF, D. R. SANER und R. LAL. Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy. *Am.J.Physiol*, **269**(1 Pt 1): C286–C292, 1995.

[Struckmeier et al.(2000)] J. STRUCKMEIER, E. KLOPP, M. BORN, M. HOFMANN, J. TENBOSCH und D. JONES. Portable fluorescence photometer for monitoring free calcium. *Rev Sci Inst*, **71**: 4531–4533, 2000.

[Sukharev et al.(1999)] S. I. SUKHAREV, W. J. SIGURDSON, C. KUNG und F. SACHS. Energetic and spatial parameters for gating of the bacte-

rial large conductance mechanosensitive channel. *J.Gen.Physiol.*, **113**: 525–540, 1999.

[Tamiya et al.(1997)] E. TAMIYA, S. IWABUCHI, N. NAGATANI, Y. MURAKAMI, T. SAKAGUCHI, K. YOKOYAMA, N. CHIBA und H. MURAMATSU. Simultaneous topographic and fluorescence imagings of recombinant bacterial cells containing a green fluorescent protein gene detected by a scanning near-field optical/atomic force microscope. *Anal.Chem.*, **69**(18): 3697–3701, 9-15-1997.

[Tenbosch(1999)] J. TENBOSCH. Untersuchungen zum Einfluß mechanischer Deformationen auf Osteoblasten. *Dissertation Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Fachbereich Biologie*, 1999.

[Torii et al.(1996)] A. TORII, M. SASAKI, K. HANE und S. OKUMA. A method for determining the spring constant of cantilevers for atomic force microscopy. *Meas Sci. Technol.*, **7**: 179, 1996.

[Tsien(1981)] R. Y. TSIEN. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, **290**(5806): 527–528, 4-9-1981.

[Tsien und Pozzan(1989)] R. Y. TSIEN und T. POZZAN. Measurements of Cytosolic Free Ca2+ with Quin2. *Methods in Enzymology*, **172**: 230–262, 1989.

[Tsien et al.(1985)] R. Y. TSIEN, T. J. RINK und M. POENIE. Measurement of cytosolic free Ca2+ in individual small cells using fluorescence microscopy with dual excitation wavelengths. *Cell Calcium*, **6**(1-2): 145–157, 1985.

[Tsugorka et al.(1995)] A. TSUGORKA, E. RIOS und L. A. BLATTER. Imaging elementary events of calcium release in skeletal muscle cells. *Science*, **269**(5231): 1723–1726, 9-22-1995.

[Usami et al.(1993)] S. USAMI, H. H. CHEN, Y. ZHAO, S. CHIEN und R. SKALAK. Design and construction of a linear shear stress flow chamber. *Ann.Biomed.Eng*, **21**(1): 77–83, 1993.

[van Leeuwen et al.(1988)] J. P. VAN LEEUWEN, M. P. BOS, C. W. LOWIK und M. P. HERRMANN-ERLEE. Effect of parathyroid hormone and parathyroid hormone fragments on the intracellular ionized calcium concentration in an osteoblast cell line. *Bone Miner.*, **4**(2): 177–188, 1988.

[Vandenburgh et al.(1989)] H. VANDENBURGH, S. HATFALUDY, P. KARLISCH und J. SHANSKY. Skeletal muscle growth is stimulated by intermittent stretch- relaxation in tissue culture. *Am.J.Physiol.*, **256, 3 Pt 1**: C674–C682, 1989.

[Walters et al.(1996)] D. WALTERS, J. CLEVELAND, N. THOMSON, P. HANSMA, M. WENDMAN, G. GURLEY und V. ELINGS. Short cantilevers for atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, **67,**: 3583, 1996.

[Wehner und Gehring(1995)] R. WEHNER und W. GEHRING. Zoologie. *Georg Thieme Verlag, Stuttgart*, 1995.

[Weinbaum et al.(1994)] S. WEINBAUM, S. C. COWIN und Y. ZENG. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J.Biomech.*, **27**(3): 339–360, 1994.

[Weyn et al.(1998)] B. WEYN, W. KALLE, S. KUMAR-SINGH, E. VAN MARCK, H. TANKE und W. JACOB. Atomic force microscopy: influence of air drying and fixation on the morphology and viscoelasticity of cultured cells. *J.Microsc.*, **189 (Pt 2)**: 172–180, 1998.

[Wiltink et al.(1993)] A. WILTINK, A. M. VAN DEN BRINK, M. P. HERRMANN-ERLEE, J. M. VAN DER MEER, P. A. VAN DER, P. H. WILLEMS, B. VAN DUIJN, P. J. NIJWEIDE und D. L. YPEY. Heterogeneity of intracellular calcium responses to parathyroid hormone and thrombin in primary osteoblast-like cells and UMR106-01 cells: correlations with culture conditions, intracellular calcium concentration and differentiation state. *Cell Calcium*, **14**(8): 591–600, 1993.

[Wolff(1892)] J. WOLFF. Das Gesetz der Transformation der Knochen. *Kirschwald*, 1892.

[Wronski und Morey(1983)] T. J. WRONSKI und E. R. MOREY. Alterations in calcium homeostasis and bone during actual and simulated space flight. *Medicine And Science In Sports And Exercise*, **15**: 410–414, 1983.

[Xia und Ferrier(1992)] S. L. XIA und J. FERRIER. Propagation of a calcium pulse between osteoblastic cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **186**(3): 1212–1219, 8-14-1992.

[Xu et al.(1994)] W. XU, P. J. MULHERN, B. L. BLACKFORD, M. H. JERICHO und I. TEMPLETON. A new atomic force microscopy technique for the measurement of the elastic properties of biological materials. *Scanning Microsc.*, **8**(3): 499–506, 1994.