

Aus dem der Institut für
Experimentelle Orthopädie und Biomechanik
Geschäftsführender Direktor: Prof. David B. Jones Ph.D.
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Zugkraftanalyse an Osteoblasten nach mechanischer Stimulation

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Humanmedizin



dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Tim Lautenschläger

aus Erbach

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 22.02.2007.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. D.B. Jones PhD

Korreferent: Prof. Dr. M. Schnabel

Inhalt

1	EINLEITUNG.....	6
1.1	REMODELING.....	6
1.2	MECHANISCHE STIMULATIONSARTEN	8
1.3	MECHANOTRANSDUKTION.....	10
1.3.1	<i>Relevanz der Mechanotransduktion</i>	<i>10</i>
1.3.2	<i>Integrine</i>	<i>11</i>
1.3.3	<i>Fokale Kontakte.....</i>	<i>11</i>
1.3.4	<i>Downstream-Effekte</i>	<i>12</i>
1.4	ZUGKRAFTMESSUNGEN	14
1.4.1	<i>Was sind Zugkräfte?</i>	<i>14</i>
1.4.2	<i>Die Geschichte der Zugkraftmessung.....</i>	<i>15</i>
1.4.3	<i>Die hier verwendete Art der Zugkraftmessung.....</i>	<i>16</i>
1.4.4	<i>Das Prinzip der Zugkraftmessung</i>	<i>16</i>
1.5	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
2	MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1	DEHNUNGS-EXPERIMENTE	18
2.1.1	<i>Versuchsaufbau</i>	<i>18</i>
2.1.2	<i>Funktionsweise der Dehnungsmaschine.....</i>	<i>19</i>
2.2	KRAFTMIKROSKOP-EXPERIMENTE.....	20
2.2.1	<i>Versuchsaufbau</i>	<i>20</i>
2.2.2	<i>Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops</i>	<i>21</i>
2.2.3	<i>Auswertung der Kraft-Abstandskurven</i>	<i>24</i>
2.3	VORARBEITEN FÜR DIE VERSUCHE	28
2.3.1	<i>Präparation der Aclar-Folien mit Zellkammer</i>	<i>28</i>
2.3.2	<i>Gießen der Polyacrylamidgele</i>	<i>28</i>
2.3.2.1	<i>Technische Aspekte der Gelherstellung auf Aclar</i>	<i>28</i>
2.3.2.2	<i>Herstellung der Polyacrylamidgele</i>	<i>31</i>
2.3.3	<i>Beschichten der Polyacrylamidgele mit Kollagen.....</i>	<i>34</i>
2.3.4	<i>Sterilisieren der Polyacrylamidgele</i>	<i>34</i>
2.3.5	<i>Bestimmung des Elastizitätsmoduls der Polyacrylamidgele</i>	<i>35</i>
2.4	ZELLKULTUR.....	36
2.4.1	<i>Präparation der primären bovinen Osteoblasten.....</i>	<i>37</i>

2.4.2	<i>Passagieren der primären bovinen Osteoblasten</i>	38
2.4.3	<i>Aussäen der Zellen auf den Substraten</i>	38
2.4.4	<i>Kryokonservierung der primären bovinen Osteoblasten</i>	39
2.4.5	<i>Phänotypisierung der Osteoblasten</i>	39
2.4.5.1	Immunzytochemischer Nachweis von Osteocalcin.....	39
2.4.5.2	PTH-Stimulationstests	40
2.4.5.3	MTT-Tests	40
2.4.6	<i>Calciumuntersuchungen</i>	41
2.4.6.1	Calciumfarbstoff Fura-2	41
2.4.6.2	Thapsigargin- und EGTA-Behandlung	42
2.5	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG.....	43
2.5.1	<i>Zugkraftmessungen</i>	43
2.5.2	<i>Durchführung der Dehnungsexperimente</i>	44
2.5.3	<i>Durchführung der Kraftmikroskopexperimente</i>	45
2.5.3.1	Zyklische Stimulation.....	45
2.5.3.1.1	Zugkraftmessungen	45
2.5.3.1.2	Calciummessungen.....	46
2.5.3.2	Konstante Stimulation - Krafttransmissionsmessungen	46
2.6	ANALYSE DER ZUGKRÄFTE.....	48
2.6.1	<i>Erstellung der Deformationsmatrix</i>	49
2.6.2	<i>Festlegen der Zellumrisse</i>	53
2.6.3	<i>Ursprungsknoten der Kraftvektoren</i>	53
2.6.4	<i>Berechnung der Kraftvektoren für jeden Knotenpunkt</i>	54
2.7	STATISTIK.....	62
2.8	GRAPHEN.....	62
3	ERGEBNISSE	63
3.1	PHÄNOTYPISIERUNG PRIMÄRER OSTEOLASTEN	63
3.1.1	<i>Immunzytochemischer Osteocalcinnachweis</i>	63
3.1.2	<i>PTH-Stimulation</i>	64
3.1.3	<i>MTT-Test</i>	65
3.2	DEHNUNGSVERSUCHE	65
3.2.1	<i>Zugkräfte vor und nach Dehnung</i>	65
3.2.2	<i>Analyse der Reaktionstypen</i>	66
3.2.3	<i>Zeitaufgelöste Analyse</i>	70

3.2.4	<i>Orientierungsanalyse der Zugkräfte</i>	72
3.3	KRAFTMIKROSKOPVERSUCHE.....	73
3.3.1	<i>Zugkräfte nach zyklischer Stimulation</i>	73
3.3.2	<i>Zugkräfte nach konstanter Stimulation - Krafttransmissionsmessungen</i> ...	76
3.3.3	<i>Calciumuntersuchungen nach zyklischer Stimulation</i>	79
4	DISKUSSION	82
4.1	ZELLULÄRE ADHÄSIONSKRÄFTE NACH MECHANISCHER STIMULATION	82
4.1.1	<i>Zelluläre Adhäsionskräfte nach zyklischer Stimulation</i>	82
4.1.2	<i>Zelluläre Adhäsionskräfte im Kontext</i>	83
4.1.3	<i>Zelluläre Adhäsionskräfte nach konstanter Stimulation - Krafttransmissionsmessungen</i>	85
4.2	GIBT ES EINE FREQUENZABHÄNGIGKEIT?	87
4.3	ZUGKRAFT-UNTERSCHIEDE IN DEN EXPERIMENTEN.....	89
4.4	SIND DIE ZUGKRAFTÄNDERUNGEN EIN AKTIVER PROZESS?.....	90
4.5	GIBT ES EINEN ZUGKRAFT-SOLLWERT?.....	91
4.6	WELCHE ROLLE SPIELT CALCIUM...?.....	92
4.6.1	<i>Calcium und Zugkraftänderungen nach Dehnung?</i>	92
4.6.2	<i>Calcium und Zugkraftänderungen nach Kraftmikroskop-Stimulation?</i>	94
4.7	AUSBLICK.....	95
5	ZUSAMMENFASSUNG	97
6	ANHANG	99
6.1	LITERATUR	99
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	112
6.3	VERZEICHNIS MEINER AKADEMISCHEN LEHRER	114
6.4	DANKSAGUNG	115

1 Einleitung

Der Knochen stellt das mechanische Gerüst des Säugetierkörpers dar. Er kann sich veränderten Bedingungen und Anforderungen anpassen. So nimmt die Knochendichte und Knochensteifigkeit bei gesteigerter Belastung zu und wird dabei der erhöhten Belastung gerechter. Der Knochen ist außerdem ein Teil des Bewegungsapparates und Schutz für innere Organe. Darüber hinaus ist er Speicherort für Mineralien, vor allem für Calcium und Phosphat, und ist in diesem Sinne Zielorgan für verschiedene Hormone. In diesem Kontext wird in der hier vorliegenden Arbeit versucht, mit verschiedenen *in vitro* Stimulationsapparaturen die mechanische Belastung *in vivo* nachzuahmen und einen Beitrag zur Aufklärung der zellulären Mechanismen des Remodeling zu leisten.

1.1 Remodeling

Der Einfluss von Kräften auf die Struktur des Knochens und die Anpassungsfähigkeit des Knochens wurde bereits im Jahre 1892 von Julius Wolf¹⁵ beschrieben. Unter Remodeling versteht man die Anpassung des Knochens durch Ab- und Aufbau von Knochensubstanz. Eine gekoppelte Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten ermöglicht so eine Umstrukturierung, die veränderten Ansprüchen an den Knochen gerechter wird. Diese Kopplung und die genauen Mechanismen des Remodeling scheinen äußerst komplex. Osteoblasten sind im Wesentlichen für die Produktion von Knochengrundsubstanz verantwortlich; wie sie aber das Signal zu gesteigerter Proliferation und Produktion bekommen, ist noch Gegenstand aktueller Forschung. So besteht die Möglichkeit, dass dem Remodeling bei pathologischen Zuständen wie nach einer Fraktur oder bei Osteoporose andere Mechanismen zu Grunde liegen als in nicht-pathologischer Situation.

Remodeling scheint außer mechanischen auch hormonellen und immunologischen Einflüssen zu unterliegen. Prostaglandin E, Parathormon, Interleukin 1, TGF- β und IGF konnte ein Einfluss auf das Remodeling nachgewiesen werden^{99,103,111}. Osteoblasten scheinen nach PTH-Stimulation über Interleukin-6 die Osteoklastenbildung zu fördern^{81,82} und Östrogenmangel ist als Osteoporose auslösender Faktor anerkannt. Auch ein Einfluss von apoptotischen Knochenzellen auf lokales Remodeling wurde publiziert¹⁶.

In vitro zeigen sich sowohl Osteoblasten als auch Osteozyten mechanosensibel⁵¹, allerdings scheinen sie unterschiedlich auf bestimmte Arten von mechanischer Stimulation zu reagieren⁸⁰. Eine Interaktion zwischen den beiden Zelltypen wurde bereits mehrfach publiziert. Kommunikation über gap junctions¹⁰⁰ oder über parakrin sezernierte Substanzen⁹², eventuell unter Einbindung immunologischer Zellen⁸⁸, scheinen eine Rolle zu spielen. Welche Knochenzellen aber unter welchen Bedingungen in vivo für Remodeling oder pathologische Veränderungen verantwortlich sind, oder in wie weit eine Interaktion der beiden Zelltypen für Remodeling notwendig ist, ist noch unklar.

Besondere Bedeutung hat immer noch die von Frost vorgestellte Mechanostat-Hypothese aus dem Jahre 1987^{33,34} (s. Abb. 1). Darin wird ein Zielbereich für die mechanische Belastung des Knochens postuliert. Durch strukturellen Umbau des Knochens wird versucht, die Belastung im Knochen immer im sogenannten „physiologischen Bereich“, entsprechend eines Sollwertes, zu halten (50 - 200 bis 1500 - 2500 μ str). Bei erhöhter mechanischer Belastung (Overuse, 1500 -2500 bis 4000 - 5000 μ str) wird die Steifigkeit des Knochens erhöht, bis die Belastung in den physiologischen Bereich abgesunken ist. Bei reduzierter mechanischer Belastung (Disuse, geringer als 100 bis 200 μ str) resultiert eine Resorption von Knochen mit der Folge von erniedrigter Steifigkeit, aber mit einer Erhöhung der lokalen mechanischen Belastung bis in den physiologischen Bereich. Oberhalb 4000 bis 5000 μ str Belastung spricht Frost von einem „pathologic overload window“, in dem die Steifigkeit des Knochens nicht weiter erhöht wird.

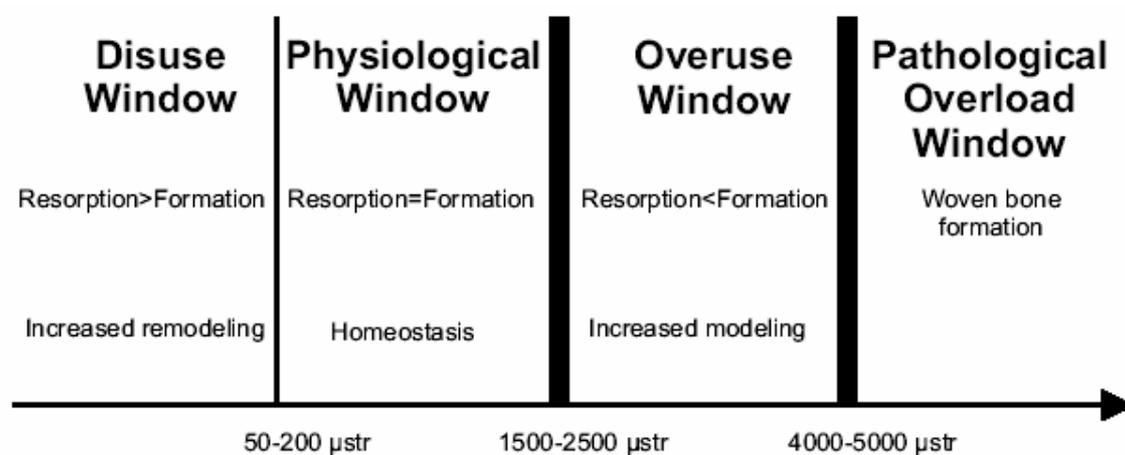


Abbildung 1. Die Mechanostat-Hypothese von Harald Frost. 1000 μ str entsprechen einer Dehnung von 0,1%. (aus²⁸)

Der Komplexität des Remodeling kann die Mechanostat-Hypothese aber nicht gerecht werden. So hat sich gezeigt, dass die Dynamik der mechanischen Belastung sehr wichtig für das Adaptationsverhalten des Knochens ist. Sowohl die mechanische Gesamtbelastung als auch die Stimulationsfrequenz und das Vorhandensein von Pausen sind entscheidend für die Anpassung des Knochens^{55,89}. Eine genaue Charakterisierung der Reaktionen nach speziellen Stimulationsprofilen steht noch aus. Auch andere Modelle wie ein hydrostatisches Druck-Modell oder ein Modell, das auf elektromechanischer Kopplung basiert, wurden diskutiert. Auch wenn Frost 1995 mit der Einführung des Utah Paradigmas, dessen Hauptaussage es ist, dass die mechanischen Faktoren die biologischen im Remodeling kontrollieren, die Belastungsschwellenwerte relativierte und bereits hormonelle Einflüsse vermutete³⁵, scheint ein einfaches Schwellenwertmodell nicht mehr der Komplexität des Remodeling gerecht zu sein. Trotz neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet bleibt die Mechanostat-Hypothese mit Ihrer Kernaussage, dass sich die Knochenbelastung selbst auf ein physiologisches Niveau reguliert, sehr aktuell.

1.2 Mechanische Stimulationsarten

Welche Arten der mechanischen Stimulation für das Remodeling verantwortlich sind, ist noch unklar. Um Fragen rund um die Mechanotransduktion zu klären, werden als Modell meist Dehnungs- oder Scherkraftstimulationen für in vitro-Experimente verwendet (s. Abb. 2).

Die in vitro Scherkraftstimulation wird durch Flüssigkeitsströme in den Canaliculi, die Scherkräfte auf Osteozyten ausüben, motiviert. Allerdings ist nicht geklärt wie dadurch eine gerichtete Knochenumstrukturierung erfolgt. Flüssigkeitsströme werden primär durch die bereits vorhandene Struktur der Canaliculi und Knochentrajektorien bestimmt. Duncan und Turner²⁸ schlugen eine parakrine Sekretion von scherkraftstimulierten Osteozyten vor, die via bone-lining Zellen, eine Form von Osteoblasten an der Knochenoberfläche, die Differenzierung von Osteoblasten stimulieren. Auch konnte eine erhöhte Insulin-like-Growth-Factor-1 (ILGF-1) Produktion von Osteozyten nach Scherkraftstimulation nachgewiesen werden⁵⁷. Trotzdem bleibt die Art der Signalweiterleitung zu den Knochen aufbauenden Osteoblasten ungeklärt. Aber auch die Scherkräfte, die bei Biegung des Knochens an den Knochenoberflächen auf die Osteoblasten entstehen, motivieren Untersuchungen in Scherkraftstimulationsapparaten.

1.2 Mechanische Stimulationsarten

Dehnungsexperimente werden durch die Vorstellung motiviert, dass die an der Oberfläche lokalisierten Osteoblasten bei Biegung des Knochens gedehnt werden. In vitro kommt es nach Dehnungsstimulation zur Proliferationssteigerung⁵³, zur Stimulierung der Knochengrundsubstanzproduktion und zur Ausschüttung von Mediatoren wie NO oder PGE2^{1,70}. Diese Zeichen des verstärkten Knochenaufbaus führen im Modell dann zu einer Steifigkeitszunahme des gebogenen Knochenbälkchens mit in der Folge niedrigerer Biegung bei gleicher Belastung (vgl. Mechanostat-Hypothese). Ebenso führt im Modell eine Minderstimulation zu reduzierter Produktion von Knochengrundsubstanz und hat eine reduzierte Zellproliferation zur Folge. Dann überwiegt der Einfluss der Osteoklasten und es resultiert eine lokale Abnahme der Knochensubstanz mit erniedrigter Steifigkeit des Knochenbälkchens.

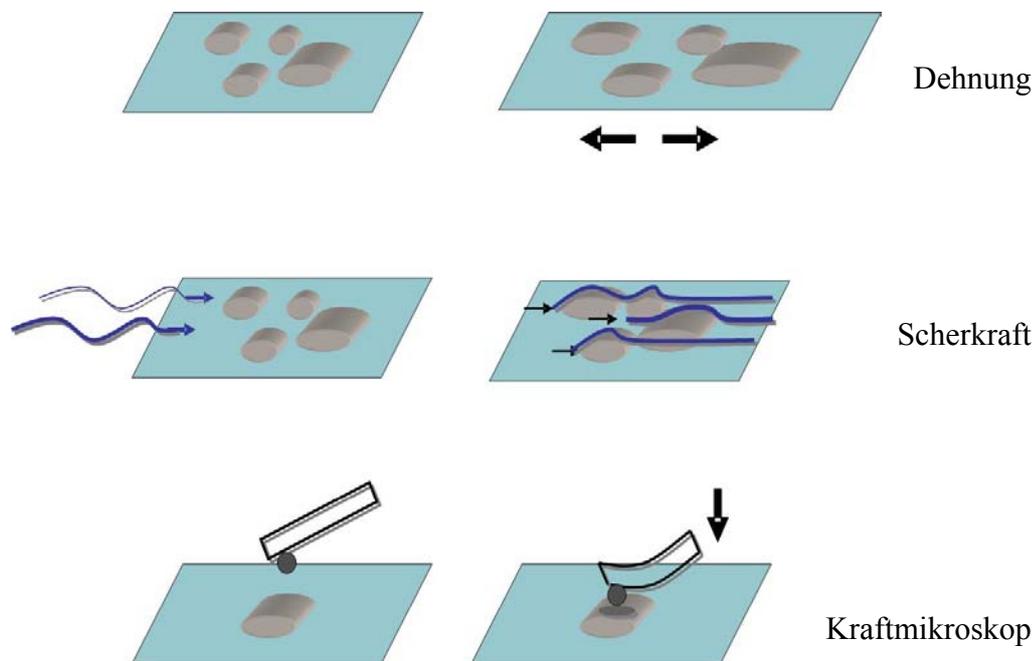


Abbildung 2. Mechanische Stimulationsarten. Oben: Dehnungsstimulation. Durch Dehnung des Substrates werden die darauf angewachsenen Zellen mit gedehnt. Mitte: Scherkraft-Stimulation. Ein Flüssigkeitsfluss strömt an den Zellen vorbei. Unten: Kraftmikroskop-Stimulation. Eine weiche Blattfeder mit Kugel an der Spitze komprimiert die Zelle in vertikaler Richtung.

In der EOBM (Experimentelle Orthopädie und Biomechanik) wird auch eine dritte Art der mechanischen Stimulation verwendet (s. Abb. 3). Im Eigenbau wurde ein Kraftmikroskop zur Stimulation von Zellen mit erweiterter Erfassung von Variablen entwickelt. Es handelt sich dabei um ein in Anlehnung an ein Rasterkraftmikroskop (engl. Atomic-Force-Microscope, AFM) gebautes Instrument zur Applikation von

Kraft-kontrollierten mechanischen Stimuli und zur Erfassung von Steifigkeitsänderungen des zellulären Stützapparates.

In der EOBM werden alle drei genannten Arten der mechanischen Stimulation, die Dehnungs-Stimulation, die Scherkraft-Stimulation und die Stimulation durch vertikale Kompression mit dem Kraftmikroskop, genutzt. Für die hier vorliegende Arbeit wurden Dehnungsexperimente und vertikale Kompressions-Experimente mit dem Kraftmikroskop an Osteoblasten durchgeführt.

1.3 Mechanotransduktion

Ein zelluläres mechanisches Phänomen besteht nach Vogel¹⁰⁸ aus drei auf einander folgenden Elementen: Dem Erkennen einer Veränderung des mechanischen Ist-Zustandes (mechanosensing), der Konvertierung der wirkenden Kraft in ein biochemisches Signal und letztlich einer mechanischen Antwort. Die generierten biochemischen Signale führen aber nicht nur direkt oder indirekt zu einer mechanischen Antwort, sondern modulieren auch zahlreiche andere Signalwege. Die zelluläre Wahrnehmung und Konvertierung einer Kraft in biochemische Signale nennt man Mechanotransduktion.

1.3.1 Relevanz der Mechanotransduktion

Das Erkennen von mechanischen Reizen und eine adäquate Reaktion darauf sind essentiell für die Funktion unseres Organismus. Mechanotransduktion ist außer für Knochenentwicklung und –anpassung auch für die Funktion und das Remodeling von Endothelzellen der Gefäße^{91,93}, Herz, und für große Teile der embryonalen Entwicklung⁵⁸ unabdingbar. Im Knochen ist Mechanotransduktion die Grundlage des Remodeling. So ist moderates Training eine wirksame Frakturprophylaxe¹¹³, auch wenn noch kein umfassendes Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Prozesse vorhanden ist. Untersuchungen zur Mechanotransduktion von Knochenzellen bilden die molekulare Basis für die klinische Osteoporoseforschung.

Die ablaufenden Prozesse in Endothelzellen bei Aktivierung nach Scherkraft-Stimulation spielen eine wichtige Rolle in der Artherogenese¹⁰⁷.

Untersuchungen zur Mechanotransduktion scheinen auch zunehmend interessanter für die Krebsforschung zu werden⁷⁵. So hat die Steifigkeit der Zellumgebung entscheidende Einflüsse auf Wachstum und Morphologie einer Zelle^{31,62,116}. Auch die FAK-Expression

(Focal Adhesion Kinase) ist in bestimmten Tumorzellen erhöht¹¹ und hat Einflüsse auf die Invasivität^{41,44,68}.

1.3.2 Integrine

Einige für Mechanorezeption notwendige Bausteine sind bereits identifiziert. So sind die Integrine, die den Kontakt der Zellen mit der Extrazellulärmatrix herstellen, für eine Aktivierung der Mechanotransduktionskaskade, also für die Mechanorezeption notwendig. Es konnte ein Einfluss des Besetzungsverhältnisses von Integrinen mit extrazellulärem Kollagen I gezeigt werden³⁸. Auch gelang nach direktem Ziehen von Integrinen der Nachweis der Aktivierung von Elementen der Mechanotransduktionskaskade⁷⁹. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der gleiche mechanische Stimulus abhängig von der Beschaffenheit der Extrazellulärmatrix zu unterschiedlichen Reaktionen in der Zelle führen kann⁴⁹.

1.3.3 Fokale Kontakte

Das Transmembranprotein Integrin stellt also den Kontakt zwischen Extrazellulärmatrix und Zelle her. Intrazellulär findet man an diesen Stellen zahlreiche Proteine, die eine Rolle in der Mechanotransduktion spielen. Diese Stellen nennt man fokale Kontakte und werden als ein wahrscheinlicher Ort der Mechanorezeption in Osteoblasten verstanden. Eine lokal hohe Dichte des Transmembranproteins Integrin und weiterer Bestandteile der fokalen Kontakte transmittieren dabei die Kräfte von der Extrazellulärmatrix auf Zytoskelettbestandteile.

Abhängig vom Reifestand der fokalen Kontakte werden sie auch fokale Komplexe oder fokale Adhäsionen genannt.

Viele Proteine konnten mit fokalen Kontakten in Verbindung gebracht werden, aber die genauen Mechanismen und die Proteine, die letztendlich die Mechanorezeption in zelluläre Antwort übertragen, bleiben unbekannt. Aktuell geht man davon aus, dass die Integrin-bindenden Proteine Paxillin und Tallin die Focal Adhesion Kinase (FAK) und Vinculin binden. Die FAK phosphoryliert dann alpha-Actinin, das so an Vinculin bindet und damit Actin-Myosin-Fasern quervernetzt und zu fokalen Kontakten zusammenzieht. Zyxin ist nur in reifen fokalen Kontakten vorhanden. Die Tyrosinkinase Src und das Adapter Protein p130Cas befinden sich zeitweise ebenso wie Erk2 (Extracellular signal-Regulated Kinase 2) an fokalen Kontakten. Die FAK wirkt aber auch über die Rho-

GTPasen RhoA, Rac und Cdc42 indirekt auf Actin-Fasern und Mikrotubuli und spielt somit eine wichtige Rolle in der Migration von Zellen⁶⁸.

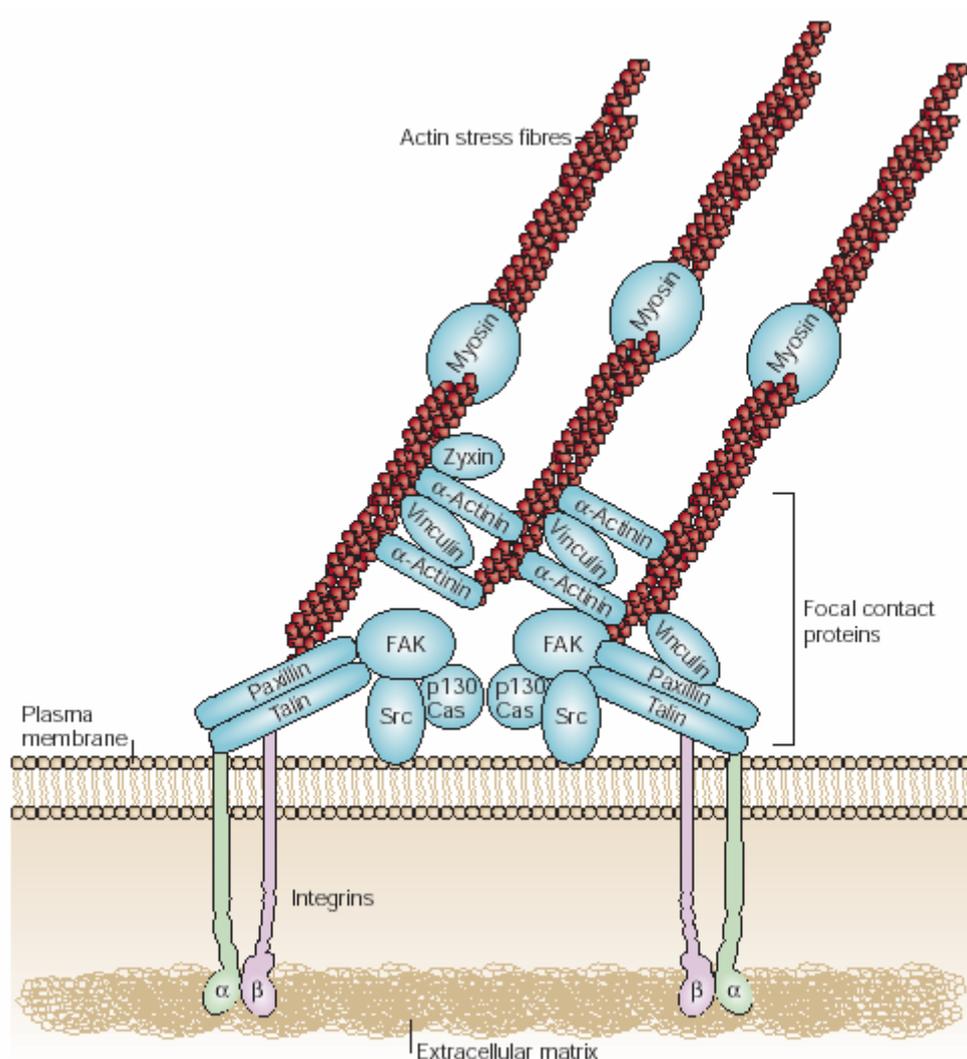


Abbildung 3. Fokaler Kontakt. Integrine bilden den Kontakt zwischen Extrazellulärmatrix und Zellinnerem. Die Integrin-bindenden Proteine Talin und Paxillin rekrutieren die FAK und Vinculin. Alpha-Actinin wird von der FAK phosphoryliert, bindet an Vinculin und quervernetzt Actin-Myosin-Bündel. Durch Zusammenziehen mehrerer dieser Bündel entstehen fokale Kontakte. Dort assoziieren dann Src und p130 Cas. Viele andere Proteine wie Erk2 können vorübergehend an fokalen Kontakten gefunden werden. (aus⁶⁸)

1.3.4 Downstream-Effekte

Neben der Kenntnis der beteiligten Proteine stellt sich die ebenso wichtige Frage wie nun eine Krafteinwirkung, ob von extern oder intern, in ein biochemisches Signal umgewandelt werden kann. Aktuell wird ein direktes Entfalten oder Auseinanderziehen von Proteinen nach externer Krafteinwirkung diskutiert. Durch das Entfalten könnten funktionelle Abschnitte des Proteins zugänglich werden oder sich bilden¹⁰⁸.

Nach Umwandlung der Kraft in ein erstes biochemisches Signal werden verschiedene Signalwege aktiviert. So konnten bereits einige biochemische Downstream-Effekte identifiziert werden (s. Abb. 4). So kann nach mechanischer Stimulation eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC) $\beta 2$ in Osteoblasten beobachtet werden⁴³.

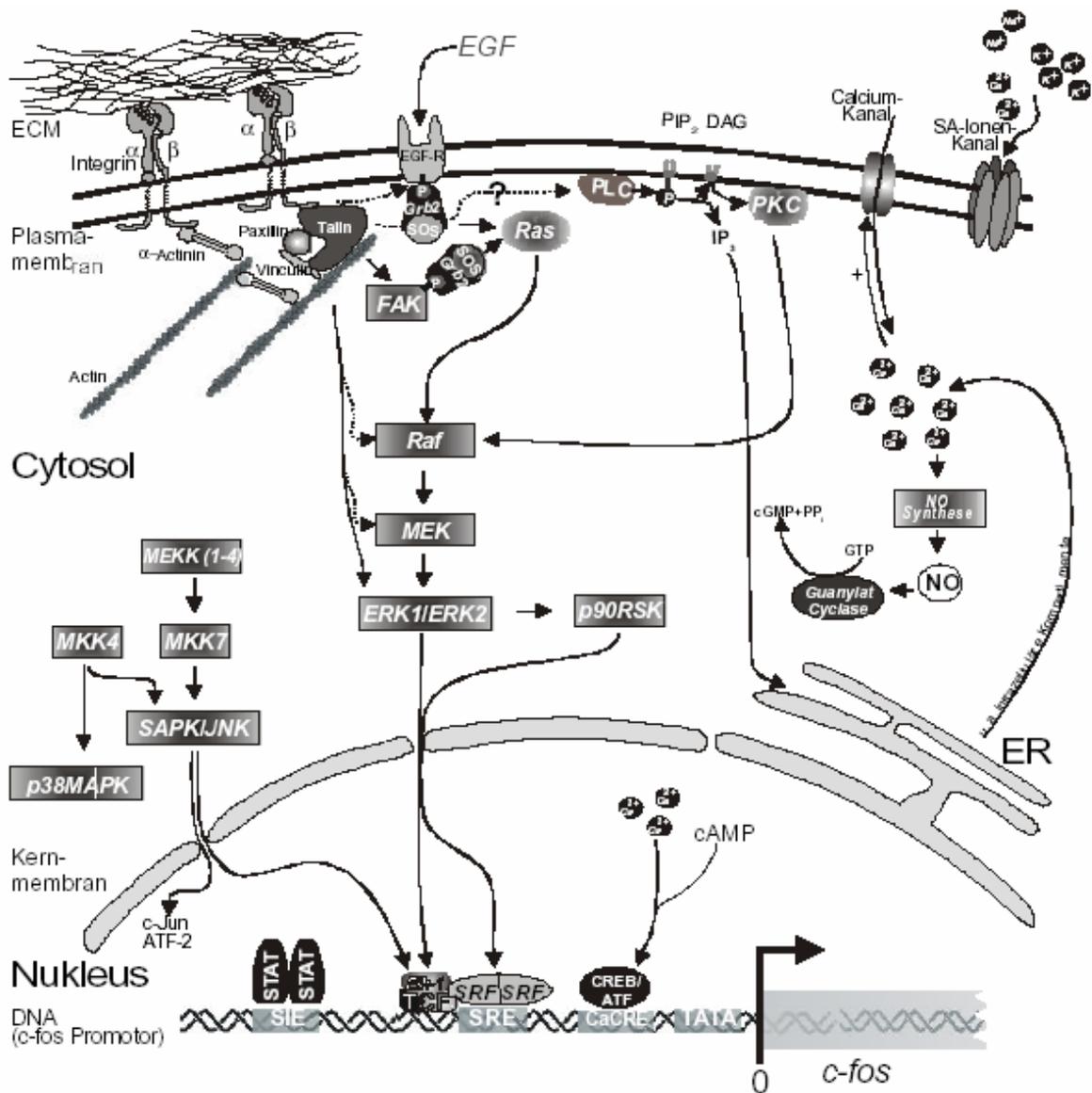


Abbildung 4. Mechanotransduktionskaskade. Von oben links. An den fokalen Kontakten kommt es zur Aktivierung von zur ras-Familie gehörendem rho, das via Erk1/2 in die Transkription eingreift. Ebenso kommt es auf noch unklare Weise zur Aktivierung der PLC beta2, die über IP₃ zu einer Calciumausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum und via DAG zu einer Aktivierung der PKC und ebenfalls Erk1/2 führt. (aus 101)

Für einige PLC-Isoenzyme wurde bereits eine Assoziierung mit fokalen Adhäsionen gezeigt¹¹⁰. Die PLC spaltet das membranständige Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) zu den Second Messengern Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃) und

Diacylglycerol (DAG). IP3 führt dann zur Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. Ein Einfluss der Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels auf die Kraftverteilung innerhalb der Zelle konnte nachgewiesen werden²⁶. Das nach Aktivierung der PLC freigesetzte DAG aktiviert die Protein Kinase C (PKC), welche über die Threonin-/Serin-Kinase raf und MEK zur Aktivierung der MAPKs ERK1 und ERK2 führt. Die MAPKs führen zu Phosphorylierungen von direkt genregulatorischen Proteinen^{14,47}.

Mechanorezeption durch mechanosensible Ionenkanäle¹⁸ scheint ein möglicher Mechanismus in Osteozyten⁴⁷ zu sein. So wurde ein Calcium-vermittelter Calcium-Einstrom¹¹⁴ beschrieben. Hierbei setzten die endoplasmatischen Speicher Calcium frei und der intrazelluläre Calciumspiegel erhöht sich. Durch diese Erhöhung des Calciumspiegels öffnen sich dann Ionenkanäle der Zellmembran und dies führt dann zum Calciumeinstrom vom Extrazellulärraum. Diese Art des Einstroms von extrazellulärem Calcium ist für Osteozyten beschrieben worden⁶⁶.

Ionenkanalgesteuerte Mechanotransduktion scheint allerdings keine Rolle für die Mechanotransduktion in Osteoblasten zu spielen⁴⁷.

1.4 Zugkraftmessungen

1.4.1 Was sind Zugkräfte?

Alle Zellen üben Kräfte auf ihre Umgebung aus. Nicht nur Muskelzellen, die makroskopische Bewegungen bewirken können und Fibroblasten, die für den Wundverschluss verantwortlich sind, generieren große Kräfte. Scheinbar nehmen alle Zellen die Beschaffenheit ihrer Umgebung wahr, in etwa so wie Menschen eine Berührung wahrnehmen. Welche Informationen aber neben der Festigkeit oder Steifheit der Umgebung detektiert werden können, ist Gegenstand aktueller Forschung. Ebenso liegt noch kein Modell vor, das die Mechanismen dieser Detektion ausreichend erklären kann.

Die Erfassung von mechanischen Eigenschaften der Zellumgebung und von extern auf die Zelle wirkenden Kräften und die Umwandlung dieser biophysikalischen Signale in biochemische oder elektrophysiologische Signale, nennt man Mechanotransduktion. Neben den beobachtbaren biochemischen Veränderungen kann Mechanotransduktion auch zu Veränderungen der biophysikalischen Eigenschaften, des biophysikalischen Verhaltens der Zelle selber führen. Biophysikalische Eigenschaften der Zelle sind unter

anderem ihre Steifigkeit (ist die Zelle weich wie ein Schwamm oder hart wie Kork?) und die Stärke und Art, wie sie Kräfte auf ihre Umgebung ausübt (wie stark zieht die Zelle an ihrem Nachbarn und in welche Richtung?).

Untersucht man Zellen in Kultur, liegen diese in der Regel einschichtig nebeneinander vor. Ist die Zelldichte dabei noch gering (semi-konfluente Kultur), bilden die Zellen nur wenig Kontaktfläche mit ihren Nachbarn aus. Dann kann man sich leicht vorstellen, dass der Hauptteil der Kräfte, die die Zellen ausüben, in dem Fall auf das Material, auf dem sie angewachsen sind, ausgeübt wird. Diese Kräfte können dann zuverlässig mit Zugkraftmessungen bestimmt werden.

Die Steifheit einer Zelle kann lokal durch Bestimmung der Eindringtiefe einer Probe in die Zelle bei gleichzeitiger Registrierung der dabei nötigen Kraft berechnet werden. Dies ist mit dem Kraftmikroskop möglich.

Zugkraftmessungen sind ein sehr gutes Mittel, um zelluläre Adhäsionskräfte zu messen. Mit dieser Technik konnten bereits nähere Einblicke in die Abläufe während der Migration gewonnen^{27,87} und Einflüsse der Extrazellulärmatrix auf die zellulären Adhäsionskräfte beschrieben werden^{38,85}. Auch konnten mit dieser Technik Gründe für die erhöhte Steifheit von Tumoren gefunden und unter anderem ein Zusammenhang zwischen Steifheit des Substrates und Phänotyp von Acinus-Zellen der Mamma hergestellt werden⁷⁵.

1.4.2 Die Geschichte der Zugkraftmessung

Harris stellte 1980 die Messung von zellulären Zugkräften mittels Silikonsubstraten vor⁴⁰. Zellen werden auf einem weichen Silikonsubstrat ausgesät. Durch die von der Zelle generierten Zugkräfte wirft das Silikongel während des Anwachsens und durch Zellbewegung Falten (s. Abb. 5). Die Zugkräfte können mit dieser Methode allerdings nur begrenzt abgeschätzt oder quantifiziert werden. Als entscheidende Weiterentwicklung dieser Technik wurde das Silikon vorgespannt, um Faltenbildung zu vermeiden und Marker in das Silikon eingebracht, die durch Zellkräfte verschoben werden⁵⁹. So wurde es durch die Beobachtung der Marker möglich, die auftretenden Kräfte genauer abzuschätzen.

Oliver⁷³ und Balaban² fertigten Substrate aus soliden Elastomeren und brachten mittels Photolithographie Vertiefungen in diese ein, deren Verschiebungen und Verzerrungen unter dem Mikroskop visualisiert werden konnten. Galbraith und Sheetz³⁶ entwickelten

eine Mikroapparatur, in der tausende kleinster Hebel das Substrat bildeten. Allerdings sind bei dieser Methode nur vertikale Kräfte auf das Substrat messbar, nicht aber Zugkräfte in horizontaler Richtung, die innerhalb der Zelle auftreten und auf das Substrat übertragen werden.

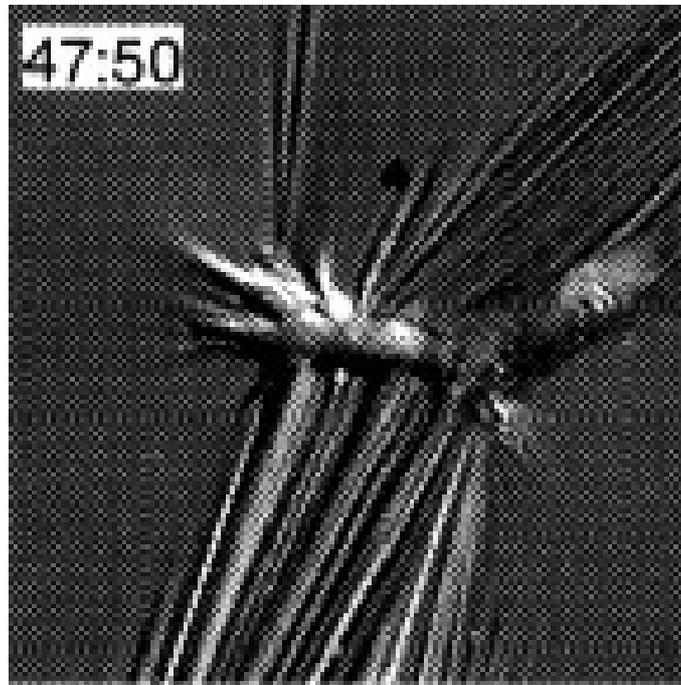


Abbildung 5. Zugkraftmessung nach Harris mittels Silikonsubstraten. Beim Anwachsen generiert die Zelle Kräfte, die das Substrat unter ihr verformt. Harris konnte diese Zugkräfte durch ein Falten werfendes Silikonsubstrat visualisieren. (aus ⁴⁰)

1.4.3 Die hier verwendete Art der Zugkraftmessung

Seit Ende der 90er Jahre Pelham und Wang^{76,77,78,112} mehrere Arbeiten veröffentlichten, in denen sie Polyacrylamid-Gele als Substrat verwendeten, erfreut sich diese Methode immer größerer Beliebtheit. Diese Gele sind relativ untoxisch für Zellen und lassen sich in ihren Eigenschaften durch geringe Veränderungen in den Konzentrationen der verwendeten Substanzen gezielt verändern und gut kontrollieren. Durch Einbringen von fluoreszierenden Kügelchen in das Polyacrylamidgel können die durch die Zellkräfte ausgelösten Deformationen des Gels gut beobachtet und anschließend in Zellkräfte umgerechnet werden.

1.4.4 Das Prinzip der Zugkraftmessung

Ein elastisches Gel mit gleichmäßig darin verteilten Fluoreszenzkügelchen dient den Zellen als Oberfläche zum Anwachsen, im folgenden Substrat genannt. Während des

Anwachsens beginnen die Zellen, Kräfte auf das Substrat auszuüben, die das weiche Gel leicht verformen. Diese Deformationen führen zu Verschiebungen der in das Gel eingebrachten Fluoreszenzmarker. Nimmt man nun mehrere Bilder dieser Marker auf, stellt man fest, dass diese sich zu verschiedenen Zeitpunkten an gering unterschiedlichen Stellen befinden. Löst man die Zelle anschließend von dem Gel ab, stellt man fest, dass die Fluoreszenzmarker sich an deutlich unterschiedlichen Stellen befinden (s. Abb. 6). Diese Verschiebungen der Fluoreszenzmarker können dann in Zellkräfte umgerechnet werden.

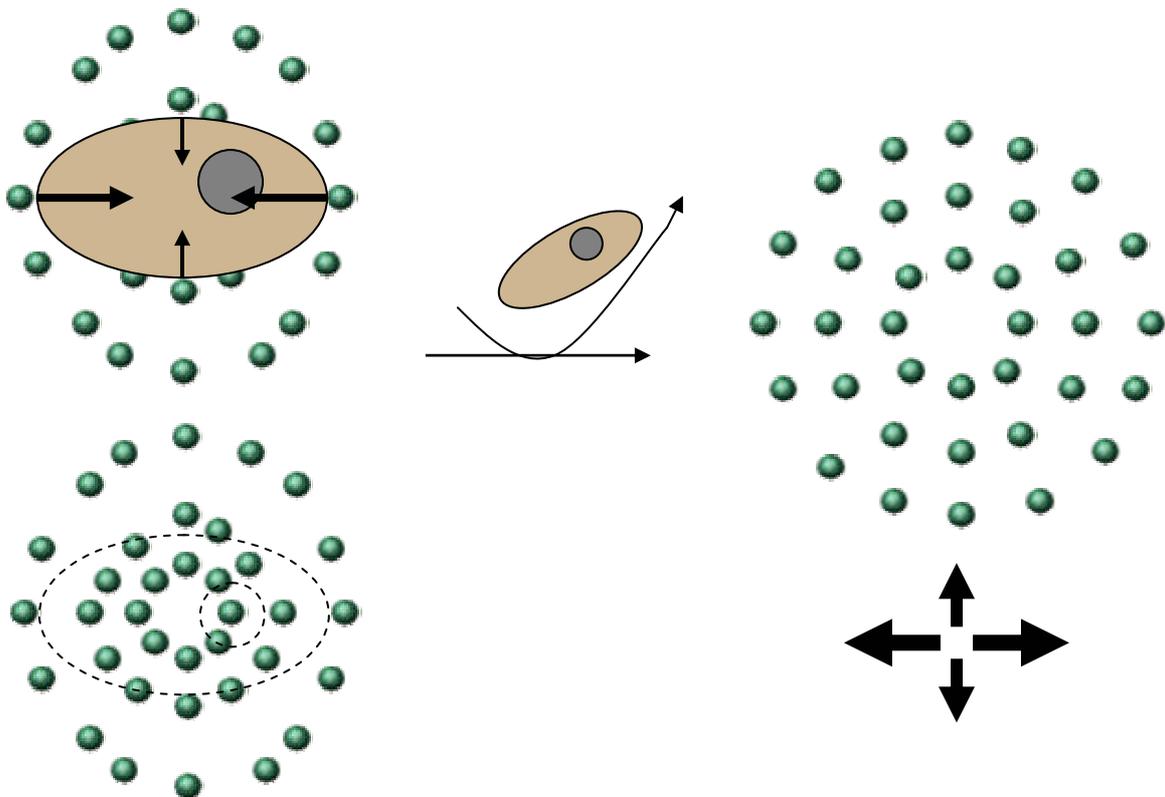


Abbildung 6. Prinzip der Zugkraftmessungen. Links: Eine auf einem Gel mit Fluoreszenzmarkern angewachsene Zelle übt Adhäsionskräfte auf ihr Substrat aus. Dabei baut die Zelle Spannung über Aktin-Myosin-Fasern zwischen den fokalen Kontakten an den Zellrändern aus. Diese Kräfte führen zur Verschiebung der Fluoreszenzmarker an der Oberfläche des Gels. Rechts: nach Entfernen der Zellen entspannt sich das Gel und kehrt in seinen ursprünglichen Zustand zurück. Die Verschiebung der Fluoreszenzmarker bildet die Grundlage für die anschließende Berechnung der von der Zelle ausgeübten Kräfte.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen zelluläre Adhäsionskräfte nach mechanischer Stimulation mit Hilfe der Technik der Zugkraftmessung beobachtet werden. Es ist noch immer nicht geklärt, unter welchen Umständen Zellen überhaupt auf Kompressions- oder Dehnungsreize reagieren und wie sie dies tun. Wann und wie - oder ob überhaupt - Zellen mit Veränderungen in ihren Adäsionskräften auf mechanische Stimulation reagieren, ist Gegenstand der aktuellen Forschung und der hier vorliegenden Arbeit.

In dieser Arbeit wird eine Methode zur quantitativen Untersuchung von mechanischen Zellantworten nach mechanischer Stimulation vorgestellt. Hierzu wurde die für Osteoblasten adaptierte Methode^{19,20} zur Zugkraftmessung^{22,23} für Dehnungsversuche angepasst. Am Beispiel von Osteoblasten wird dann das mechanische Verhalten nach Dehnung und vertikaler Kompression beschrieben. Die Dynamik der zellulären Adhäsionskräfte wird in den Kontext der Mechanotransduktionskaskade eingeordnet, im besonderen im Vergleich zur Aktivierung von Calcium und der MAPK ϵ Erk1/2.

2 Material und Methoden

Neu genannte Materialien werden am Ende des jeweiligen Unterkapitels aufgeführt.

2.1 Dehnungs-Experimente

2.1.1 Versuchsaufbau

Für die Dehnungsexperimente wird eine von Jones⁵² entwickelte Dehnungsmaschine verwendet (s. Abb. 7). Sie wurde im experimentellen Aufbau und den verwendeten Materialien angepasst, um zeitnahe Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskopie zu ermöglichen.

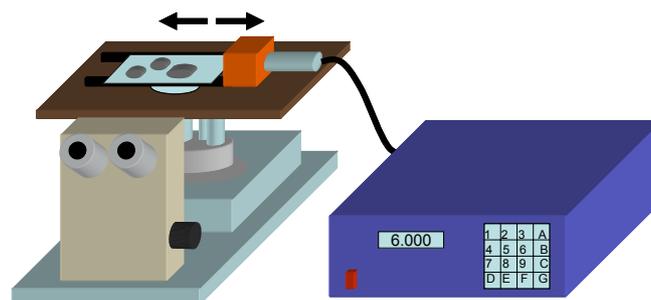


Abbildung 7. Versuchsaufbau für Dehnungsexperimente.

Für die Berechnung der zellulären Adhäsionskräfte der Zellen werden die Verteilungen der Fluoreszenzmarker im Polyacrylamidgel auf der Aclar-Folie beobachtet. Da der Zugang zur Zellkammer von oben durch die Zellkammer behindert ist, ist es nötig die Dehnungsmaschine auf einem inversen Mikroskop zu befestigen. Der verwendete Träger der Polyacrylamidgele (hier die Aclar-Folie) muss sowohl elastisch als auch transparent für Anregungs- und Emissionslicht der Fluoreszenzmarker sein und soll gut mit den Polyacrylamidgelen verträglich sein. Außerdem muss sichergestellt sein, dass sich die zu untersuchenden Zellen nah genug am Objektiv befinden und der Fokus vor und nach Dehnung der gleiche ist.

Material:

- Nikon Diaphot IM
- Dehnungsmaschine⁵²

2.1.2 Funktionsweise der Dehnungsmaschine

Es handelt sich hierbei um zwei die eigentliche Zellkammerhalterung tragende Schlitten (Aclar-Klemm-Halterung), die auf gegenläufigen Gewinden gelagert sind. Durch Umkehrung der Drehrichtung nähern sich die zuvor voneinander entfernten Schlitten wieder an. Ein elektronisch gesteuerter Elektromotor überträgt über das Getriebe die Rotation auf die zuvor beschriebenen Gewinde und erlaubt die Auslenkung und deren Frequenz zu kontrollieren. In der ACLAR-Klemmhalterung wird die Aclar-Folie, auf der die eigentliche Zellkammer aufgebracht ist, zwischen zwei Klemmpunkten eingespannt.

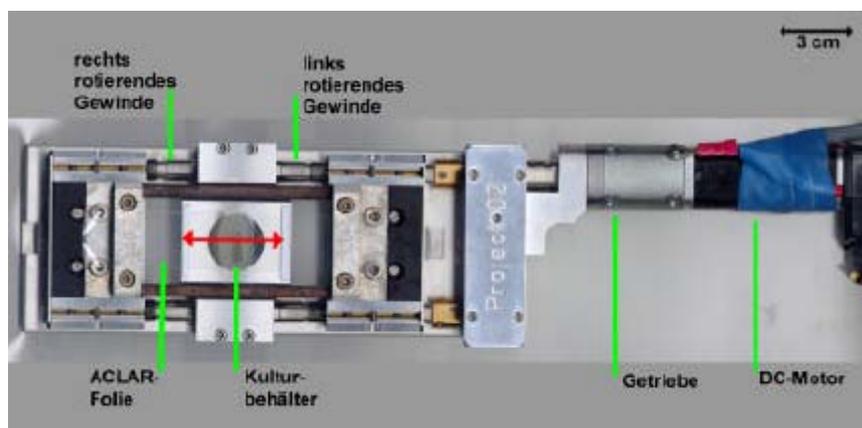


Abbildung 8. Foto der Dehnungsmaschine.

Zwei Teflonerhöhungen, über die die Aclar-Folie leicht gespannt ist, gewährleisten einen konstanten Abstand zwischen Zellen und Objektiv. Aclar-Folie verhält sich im Bereich der verwendeten Dehnstärke voll elastisch. Bei Dehnung von 40.000 μstr (4%) und mehr reißt sie.

Zur Überprüfung der Genauigkeit der Dehnungsmaschine wurde diese auf einem inversen Mikroskop mit 20x-Objektiv befestigt und ein mit Polyacrylamidgel (siehe 2.3.2) präparierter Dehnungsstreifen eingespannt. Mit einer CCD Kamera wurden Fluoreszenzbilder vor und nach Dehnung aufgenommen, um die Dehnung des Gels aus den unterschiedlichen Abständen bestimmter Fluoreszenzmarker vor und nach Dehnung zu bestimmen. Die Genauigkeit der Motorsteuerung ist sehr hoch. Mit der verwendeten Kamera und deren Auflösungsvermögen in diesem Versuchsaufbau ist die Dehnungsmaschine auf weniger als ein Pixel exakt.

Material:

- 8 Bit 1306 x 1032 Pixel CCD Kamera Xillix microImagerMI1400
- Objektiv 20x: Fluor 20 Ph3DL, NA=0,75

2.2 Kraftmikroskop-Experimente

1986 wurde von Binnig, Gerber und Quate die Rasterkraftmikroskopie (Atomic Force Microscope = AFM) vorgestellt⁸. Es handelt sich dabei um eine Abwandlung des Scanning Tunneling Microscope (STM, Nobelpreis für Rohrer und Binnig, 1986) zur Vermessung nicht geladener Oberflächen. Während beim STM die Topographie der Probe über die Ladungsverteilung einer Oberfläche durch Anlegen einer elektrischen Spannung an der Spitze der Abtastvorrichtung gemessen wird, wird mit einem Rasterkraftmikroskop durch direkten Kontakt die physische Oberfläche einer Probe mit atomarer Auflösung vermessen.

2.2.1 Versuchsaufbau

Das Rasterkraftmikroskop ist auf einem inversen Mikroskop befestigt. Das Mikroskop kann trotz aufgebaumtem Kraftmikroskop mit wenigen Einschränkungen als Lichtmikroskop benutzt werden. Es dient neben der Beobachtung von Zellen oder deren

Substraten der exakten Positionierung der Mess- und Stimulationsvorrichtung des Kraftmikroskops über einer Zelle. Das Kraftmikroskop funktioniert, sobald der Mess- und Stimulationskopf exakt positioniert ist, unabhängig vom Mikroskop und erlaubt so dessen Verwendung zur Zellbeobachtung.

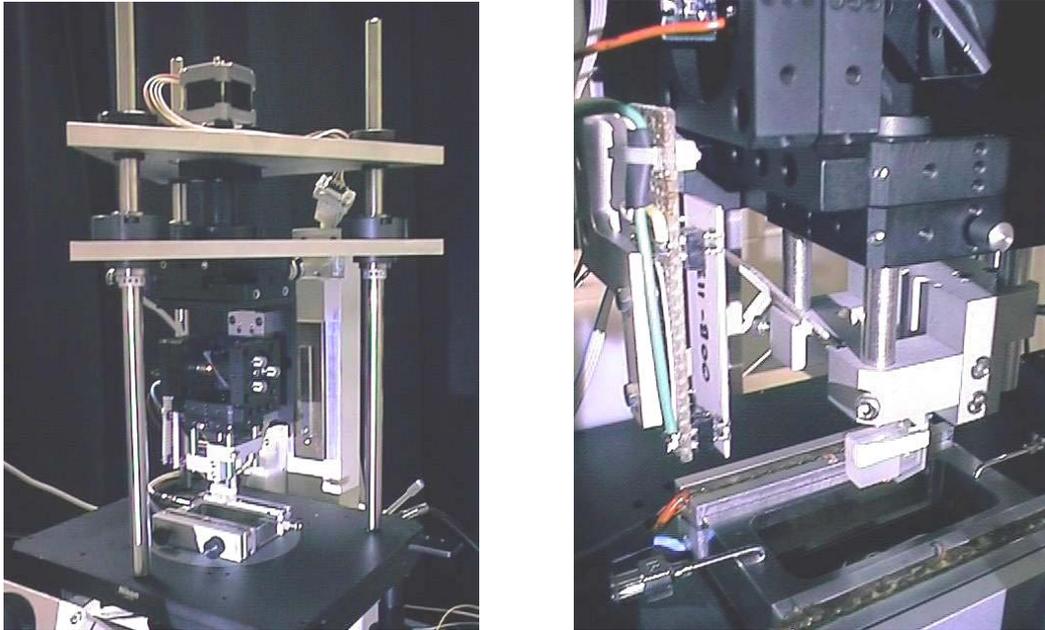


Abbildung 9. Fotografien des Kraftmikroskops. Links: Das Kraftmikroskop steht auf einem inversen Mikroskop. Rechts: Nahaufnahme der Zellkammer im Heizungsblock mit noch nicht ins Medium eingetauchtem Cantilever-Substrat.

Material:

- Nikon TE-2000 U
- Kraftmikroskop aus Eigenbau^{65,96,97,98}

2.2.2 Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops

Rasterkraftmikroskope detektieren Höheninformation über die Auslenkung einer geeigneten Blattfeder, die über die zu untersuchende Oberfläche bewegt wird (Kontaktmodus, engl. contact mode). Je nach Höhe der Probe wird diese Blattfeder, im folgenden Cantilever (engl. für Ausleger) genannt, unterschiedlich stark ausgelenkt (s. Abb. 10). Die Messung dieser Biegung erfolgt mittels eines Lasers, der an der Oberseite der Blattfeder reflektiert wird und dessen Position sich durch die Biegung des

Cantilevers auf dem positionsempfindlichen Detektor (Position Sensitive Detector = PSD) verändert.

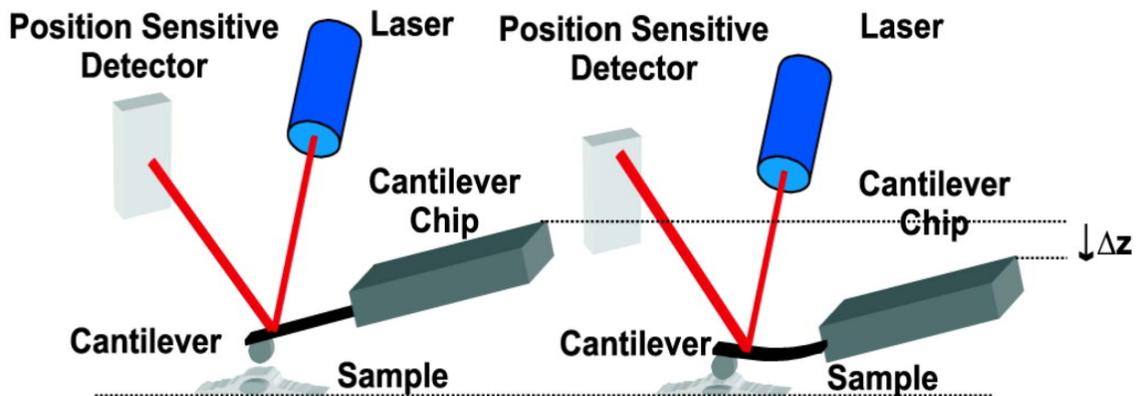


Abbildung 10. Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops. Bei Kontakt mit der Probe kommt es zur Auslenkung des Cantilevers. Dadurch verändert sich der Reflexionswinkels des Lasers und dieser trifft an einer anderen Stelle auf das PSD (position sensitive detector). (nach ⁹⁶)

Die Verschiebungen des Lasers hängen nur von der Winkeländerung an der ausgelenkten Cantileverspitze ab. Die Größe des Cantilevers spielt dabei prinzipiell keine Rolle. So werden die geringen Höhenunterschiede, der zu untersuchenden Probe stark vergrößert auf dem PSD dargestellt. Kennt man die Federkonstante des verwendeten Cantilevers, lassen sich die Messdaten in Höhenunterschiede oder für Kraftspektroskopie auch in die applizierte Kraft zurückrechnen.

Rasterkraftmikroskope zur Vermessung von Oberflächen verwenden Cantilever mit Spitzen mit Krümmungsradien von unter 10 nm, um eine möglichst hohe Ortsauflösung der gerasterten Oberfläche zu erreichen (bis 0,1 nm vertikal und 1 nm horizontal). Bei der Vermessung von biologischen Proben kann dies allerdings bedingt durch die weiche Beschaffenheit und wässrige Umgebung nicht erreicht werden.

Außer der genauen topographischen Vermessung von Oberflächen kann man ein Rasterkraftmikroskop auch zur Bestimmung der elastischen Eigenschaften einer Oberfläche verwenden. Bei vertikaler Annäherung des Cantilevers an ein elastisches Material (z.B. Zelle) verformt eine atraumatische Kugel an der Cantileverspitze die Zelle. Bei hoher Steifigkeit der Zelle am Ort der Stimulation wird der Cantilever dann beim Herunterfahren seiner Halterung stärker ausgelenkt als bei lokal geringerer Steifigkeit (s. Abb. 11).

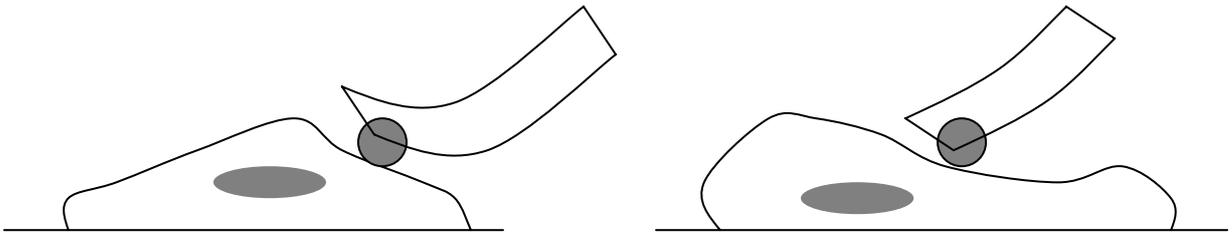


Abbildung 11. Steifheit der Zelle. Eine unterschiedliche Steifheit der Zelle führt zu unterschiedlichen Stimulations-Kräften obwohl die Cantileverbasis sich gleich weit an die Zelle angenähert hat. Durch die unterschiedliche Steifheit der Zelle kommt es zu unterschiedlich starkem Verdrängen der Zelle. Ist die Zelle sehr steif (links), verdrängt der Cantilever die Zelle kaum und es kommt zu einer starken Auslenkung des Cantilevers. Ist die Zelle weich (rechts), wird die Zelle verdrängt und es kommt nur zu einer geringen Auslenkung des Cantilevers. Die wirkenden Kraft ist links deutlich größer als rechts.

Das von der Experimentellen Orthopädie und Biomechanik im Eigenbau erstellte Rasterkraftmikroskop dient aber primär nicht der Vermessung von Oberflächen. Vielmehr wird es dazu genutzt, exakt definierte, kleinste Kräfte (pN – nN-Bereich) auf Zellen auszuüben. Aus diesem Grund nennt man es auch nur Kraftmikroskop (und nicht Rasterkraftmikroskop).

Während des Annäherungsalgorithmus an eine Oberfläche muss die vertikale Position der Halterung des kraftausübenden Cantilevers über Regelkreise mit dem PSD-Signal sehr exakt gesteuert werden. Die vertikale Annäherung erfolgt durch Steuerung einer long-distance piezoelektrischen Keramik (38 μm bei 10 V) unter Kontrolle des PSD-Signals. Erfolgt kein Kontakt des Cantilevers mit der Oberfläche und somit keine Änderung des PSD-Signals während der Piezo-Annäherung, wird anschließend die Piezo-Spannung wieder erhöht, der Piezo also zurückgefahren und mit einem Schrittmotor ein Teil der Distanz, 20 μm vorgefahren. Anschließend erfolgt wieder die Piezo-Annäherung unter PSD-Signal Kontrolle. Auf diese Weise kann über die für den Ein- und Ausbau der Zellkammer notwendige Freiheit von mindestens 2 cm sicher angenähert werden.

Eine bestimmte Kraftapplikation geht mit einer entsprechenden Veränderung der Laserposition auf dem PSD einher. So wird bei der vertikalen Annäherung die Cantileverhalterung so lange herunter gefahren, bis der Cantilever die Oberfläche berührt, also eine eingestellte minimale Auslenkung des Lasers auf dem PSD erreicht ist. Ist dies geschehen, beginnt die entfernungskontrollierte vertikale Stimulation. Hierbei wird der Piezo eine eingestellte Distanz herunter- und wieder hochgefahren. Das

entspricht dann der Applikation einer vorher indirekt über die Piezo-Spannung eingestellten Kraft.

Die Cantileverspitze kommerziell erhältlicher Cantilever wird mit 5 bis 40 nm angegeben (veeco, USA). Diese feinen Spitzen sind für die hier durchgeführten Experimente aber nicht verwendbar, da bei der Stimulation die Zellmembran verletzt werden kann. Deshalb wurden Cantilever ohne Spitze erworben und an der Spitze eine Kugel (Durchmesser 10 μm) aus Silika-Glas angeklebt.

Bei bekannter Federkonstante des typischerweise 200 μm langen Cantilevers lassen sich dann die applizierte Kraft auf die Zelle, die von der Zelle dissipierte Energie und die Steifigkeit der Zelle berechnen. Die Federkonstante der verwendeten Cantilever wird von den Herstellern angegeben, weist aber beträchtliche Schwankungen auf. So wurde die Federkonstante jedes Cantilevers durch Referenzcantilever bestimmt (Standardabweichung 10%¹⁰⁶). Die Federkonstanten dieser Referenzcantilever werden nach der von Cleveland¹⁷ vorgestellten Methode der Resonanzfrequenzverschiebung durch Anheftung zusätzlicher Massen bestimmt (Standardabweichung 5%).

Die genaue Funktionsweise des Kraftmikroskops und die verwendeten Methoden werden detailliert von Struckmeier^{96,97,98} beschrieben.

2.2.3 Auswertung der Kraft-Abstandskurven

Die mit dem Kraftmikroskop gewonnen Daten bestehen aus dem Wertepaar Piezo-Spannung und PSD-Spannung. Die Piezo-Spannung entspricht der Ausdehnung der piezoelektrischen Keramik und die PSD-Spannung codiert für die Laserverschiebung auf dem PSD, die wiederum durch die Auslenkung des Cantilevers entsteht.

Vor jeder Messreihe muss die Sensitivität der Apparatur und der PSD neu kalibriert werden, da sich die genaue Ruheposition des Lasers auf Cantilever und PSD sowie die Sensitivität der Apparatur durch geringe Veränderungen der Umgebung leicht verändert (z.B. geringe Temperaturschwankungen). Unter Sensitivität wird das Verhältnis aus Piezo-Ausdehnung und PSD-Spannungsveränderung verstanden. Mit ihr kann man für elastische und viskoelastische Materialien die durch das PSD-Signal registrierte Cantileverauslenkung bei Kenntnis der Federkonstante des Cantilevers in die applizierte Kraft zurückrechnen. Die Kalibrierung erfolgt durch eine Referenzmessung auf einer Glasoberfläche, an einer zell- und gelfreien Stelle des Zellkammerbodens.

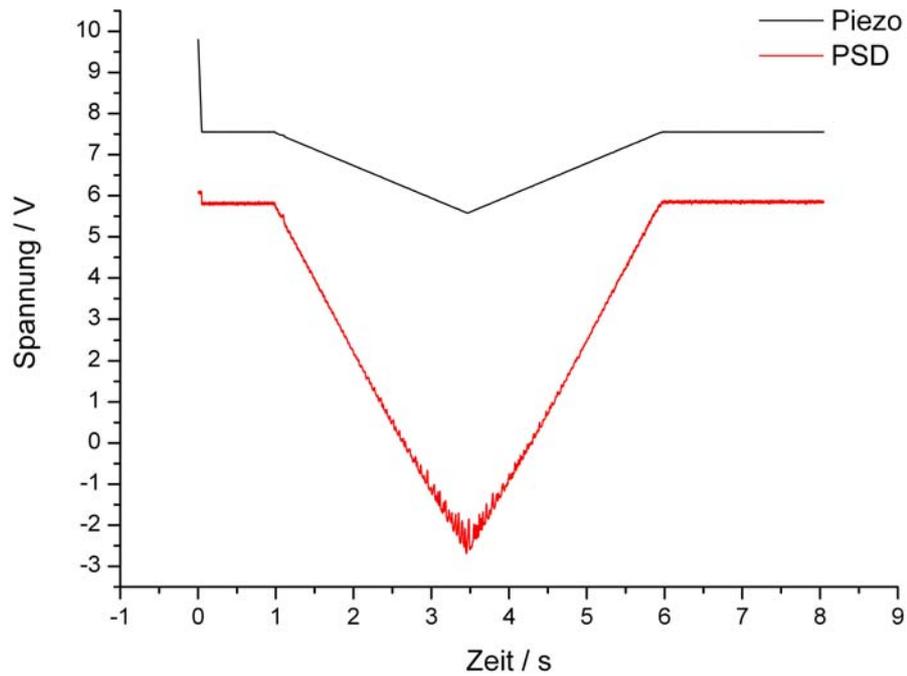


Abbildung 12. Graph der Kraftmikroskop-Rohdaten einer Glasmessung.

Bei einer Referenzmessung auf Glas, einem sehr harten Material, herrscht ein streng linearer Zusammenhang zwischen der Piezospannung und der PSD-Spannung (s. Abb. 13).

$$V(PSD) = A + B \cdot V(Piezo) \quad (1)$$

Die Steigung dieser Geraden ist die Sensitivität B (s. Abb. 13).

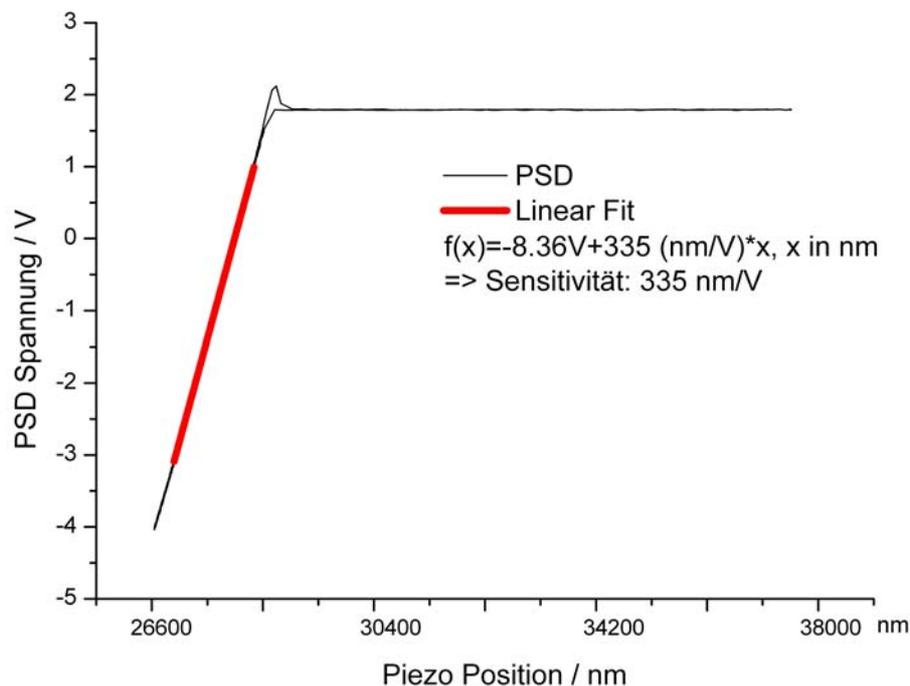


Abbildung 13. Beispiel der Sensitivitätsbestimmung. Die Steigung des linearen Teils des Graphen gibt die Sensitivität an. Die Kurve setzt sich aus zwei Teilen zusammen, einem während der Stimulation und einem während des Rückzuges. Während der Rückzugsphase führen Adhäsionskräfte zwischen Oberfläche und Cantileverspitze kurzzeitig zu einer über die ursprüngliche Position hinausgehenden negativen Auslenkung (bei 28500 nm).

Die bei Stimulation eines Osteoblasten gewonnenen Daten werden in Form von Kraft-Abstandskurven dargestellt (s. Abb. 14). Als Substrat der Osteoblasten diente für alle Versuche ein im Vergleich zu Glas sehr weiches Polyacrylamidgel.

Bei konstanter Annäherungsgeschwindigkeit der Cantileverbasis ist die Auslenkung des Cantilever zunächst gering. Die Zelle hat bei geringer Kompression einen noch sehr kleinen Elastizitätsmodul, ist also noch weich. Dies sieht man an der bei Beginn der Stimulation geringen Steigung der Kurve (s. Abb. 14, rote Kurve, rechter Teil), die ja gerade das Verhältnis von applizierter Kraft pro Annäherungsstrecke darstellt. Bei zunehmend stärkerer Kompression erhöht sich der Elastizitätsmodul, die Zelle wird also steifer. Dies erkennt man an der nun deutlich größeren Steigung der Kurve (s. Abb. 14, rote Kurve, linker Teil). Wird die vorher indirekt über eine PSD-Spannungs-Schwelle festgelegte Kraft erreicht, beginnt die entfernungskontrollierte Annäherungsphase der Stimulation. Diese PSD-Schwelle wird festgelegt, um den Zeitpunkt des Zellkontaktes zu definieren.

So bald eine Auslenkung des Cantilevers erfolgt, die zu PSD-Spannungsveränderungen oberhalb dieser PSD-Schwelle führt, ist man sicher, dass Zellkontakt besteht. Dann wird der Piezo eine vorher festgelegte Spannung heruntergefahren und direkt wieder hochgefahren. Der Rückzug oder das Wiederhochfahren des Piezos wird durch den schwarzen Teil der Kurve repräsentiert. Die Zelle wird durch die applizierte Kraft verformt und verharrt vorübergehend in ihrer Position; die Zelle ist viskoelastisch verformt. Die von der Zelle dissipierte Energie entspricht der Fläche zwischen Annäherungs- und Retraktionskurve. Am Ende der Rückzugsphase während des Loslösens des Cantilevers von der Zelloberfläche werden negative Kräfte gemessen (s. schwarze Kurve, Abb.14). Dies repräsentiert den Zeitraum in dem der Cantilever die ursprüngliche Ruheposition erreicht hat, die Adhäsionskräfte den Cantilever aber noch an der Zelle binden und so zu dieser negativen Cantileverauslenkung führen.

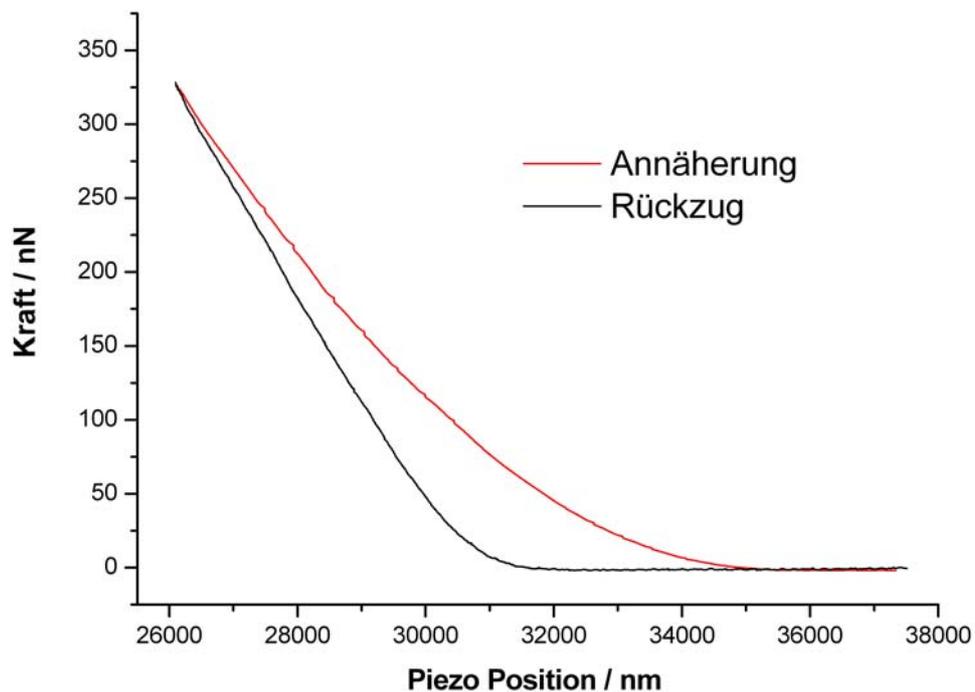


Abbildung 14. Kraft-Abstands-Kurve einer Zellmessung.

Die detaillierte Beschreibung der Auswertung kann Arbeiten von Struckmeier^{96,98} und Mennenga-Klopp⁶⁵ entnommen werden.

2.3 Vorarbeiten für die Versuche

2.3.1 Präparation der Aclar-Folien mit Zellkammer

Aclar-Folie ist ein dem Teflon ähnliches biologisch inertes Material. In der verwendeten Stärke von 198 μm verhält sich die Folie bei Dehnung bis über 1% (10000 μstr) elastisch. Sie ist außerdem transparent und erlaubt damit, obwohl im Versuchsaufbau zwischen Zellen und Lichtquelle und Kamera gelegen, einen ungestörten Strahlengang. Eine runde Zellkammer wird aus Silikonmatten ausgestanzt und mit Silikonkleber auf die Aclar-Folie geklebt. Es muss darauf geachtet werden, dass keine Silikonkleberrückstände im Inneren des Silikonringes verbleiben, da sie das Anhaften der Polyacrylamidgele beeinträchtigen. Nach Trocknung bei Raumtemperatur für 24 Stunden, wird die Folie mit der aufgeklebten Zellkammer für mindestens 24 Stunden in destilliertem Wasser getränkt und danach 2 Stunden in 65°C heißem Leitungswasser gewaschen. Nach Trocknung über Nacht werden die präparierten Folien zur Sterilisation für 20 Minuten in 70% Alkohol getränkt und anschließend in ultrafiltriertem Wasser gewaschen.

Material:

- ACLAR 33C Honeywell
- Silikonmatten, med. Qualitätsgrad, 55 Shore A
- Silikonstanze Boehm, Frankreich, PL320CM
- Silikonkleber Marina klar, Belgien
- Isopropanol
- Destilliertes Wasser

2.3.2 Gießen der Polyacrylamidgele

2.3.2.1 Technische Aspekte der Gelherstellung auf Aclar

Die für Glas bekannte Methode zum Gele-Gießen nach Pelham und Wang^{76,112} ist nicht geeignet, wenn statt Glas Aclar als Untergrund verwendet wird. Erste Versuche zeigten, dass keines der Gele auf Aclar, die mit der Methode nach Wang hergestellt wurden, für die geplanten Versuche geeignet war. Die Oberflächen der Gele waren sehr uneben und häufig lösten sich die Gele in der Zellkultur oder während des Versuchs von der Aclar-Folie ab. Die Gele müssen aber sehr eben sein, um die Zugkräfte der Zellen erfolgreich

berechnen zu können. Unebenheiten der Geloberfläche führen zu starken Fehlern während der Kraftberechnung, so dass keine Ergebnisse erzeugt werden.

Die Polyacrylamid-Gel-Lösung verhält sich entsprechend Ihrer Oberflächeneigenschaften auf Aclar-Folie hydrophob und bildet einen Kontaktwinkel von über 80°. Legt man die Deckgläschen auf den noch flüssigen Polyacrylamid-Gel-Tropfen um eine konstante Gelhöhe zu gewährleisten, ist eine leichte Manipulation nötig, um die Flüssigkeit zwischen Glas und Aclar-Folie gleichmäßig zu verteilen.

Zur Verbesserung des Kontaktes zwischen Glas und Polyacrylamidgel wurde Glas mit 3-Aminopropyltrimethoxysialine und Glutardialdehyd vorbehandelt. 3-Aminopropyltrimethoxysialine beschädigt aber selbst bei kurzer Kontaktzeit von unter 10 Sekunden die Aclar-Oberfläche merklich und ist deshalb nicht verwendbar, um die Oberflächeneigenschaften der Aclar-Folie zu verändern. Schwer abschätzbare Veränderungen des Materials und seiner Eigenschaften sind die Folge und reproduzierbare Versuche sind nicht mehr durchführbar. Glutardialdehyd alleine, also ohne vorherige Verwendung von 3-Aminopropyltrimethoxysialine verändert die Oberflächeneigenschaften der Aclar-Folie und damit den Kontakt zum Polyacrylamidgel nicht entscheidend. Da auf die Chemikalienkombination zur Verbesserung der Haftung des Gels auf Aclar-Folie verzichtet werden musste, ist es auch nicht unerwartet, dass die Gele relativ schlecht auf der Aclar-Folie haften und sich häufig ablösen.

Eine Veränderung der physikalischen Oberflächeneigenschaften durch Anrauen mit feinem Schmirgelpapier führt zu deutlich reduziertem Kontaktwinkel. Da um die Vergleichbarkeit der Zugkraftberechnungen zu gewährleisten aber identische Bedingungen herrschen müssen, also Gele mit sehr ähnlichen Eigenschaften verwendet werden müssen, kann diese einfache, aber wenig exakte Methode zur Verbesserung der Ausbeute fehlerfreier Gele nicht angewendet werden.

Eine einfache Temperaturbehandlung zur Verbesserung der Oberflächeneigenschaften ist ebenfalls nicht möglich. Bei trockenem Erhitzen bis ca. 70°C ändert Aclar-Folie die für den Versuch relevanten Oberflächeneigenschaften nicht entscheidend. Stärkeres Erhitzen bis 130 - 180°C beschädigt die Aclar-Folie. Sie zeigt dann kein reproduzierbar elastisches Verhalten mehr nach entsprechender Dehnung.

Säurebehandlung mit HCl (2 M und 10 M) und H₃PO₄ (4 M) beschädigen wie erwartet nicht die Aclar-Folien, führen aber auch nicht zu einer verbesserten Ausbeute fehlerfreier Gele.

Denkbar ist auch eine sogenannte Korona-Behandlung (engl. Corona-treatment, oder auch Niederdruck-Plasmatechnologie) bei der die zu behandelnde Oberfläche einem Gas im Hochspannungsfeld (10 - 20 kV) ausgesetzt wird. Dabei kommt es zu Gasentladungen an der Oberfläche und es bilden sich bei Verwendung von Sauerstoff als Gas polare und radikalische Stellen an der Oberfläche. Allerdings ist dieses Verfahren nur in wenigen Zentren kommerziell verfügbar und mit hohen Kosten bei den benötigten geringen Mengen verbunden.

Auch verschiedene Lösungsmittel können den Kontakt zwischen Polyacrylamidgel und Aclar-Folie verbessern, sind aber wegen ihrer zelltoxischen oder Aclar-beschädigenden Wirkung nicht einsetzbar.

Die Verwendung von Fluoreszenzmarkern verschiedener Hersteller führt zu veränderter Polymerisationsgeschwindigkeit und hat Auswirkung auf die Qualität der polymerisierten Gele. Auch ist eine Ansammlung der verwendeten Fluoreszenzmarker an der Aclar-Oberfläche, also der Kontaktebene zwischen Polyacrylamidgel und Aclar-Folie zu beobachten. Durch Erhöhung der verwendeten Fluoreszenzmarker konnte leicht eine ausreichende Dichte der Fluoreszenzmarker an der Oberfläche des Gels, also der späteren Kontaktfläche zwischen Polyacrylamidgel und Zelle, erreicht werden. Die erhöhte Affinität der Fluoreszenzmarker und der Aclar-Folie kann mit dem unpolaren Charakter beider Materialien erklärt werden.

Durch Erhöhung der Polymerisationsgeschwindigkeit durch vermehrte Zugabe von Amoniumpersulfat, dem Radikalbildner und somit Polymerisationsstarter, und TEMED, dem Katalysator der Radikalbildung, kann ebenso wie durch Variation der Temperatur während der Polymerisation die Ausbeute an fehlerfreien Gelen leicht erhöht werden. Durch Verkürzung der Polymerisationszeit verringert sich allerdings die Konzentration an Fluoreszenzmarkern an der Geloberfläche stark, so dass auf diese Maßnahme verzichtet wurde.

Die Anwendung des Protokolls zur Gelherstellung für Glasoberflächen führte auf Aclar-Folie zu keinem benutzbaren Gel. Durch Modifikationen des Protokolls konnte letztlich einer Steigerung der Erfolgsquote bei der Gelherstellung auf Aclar-Folie auf etwa 70% erreicht werden.

Steifere Gele weisen auf Aclar-Folie weniger Unebenheiten auf, so dass für die Versuche Gele mit 0,06%-bis-Acrylamid-Anteil verwendet wurden. Anpassungen des pH-Wertes der verwendeten Grundsubstanzen des Polyacrylamidgels, nämlich einer 10% Acrylamidlösung und einer 2% bis-Acrylamid-Lösung auf pH 8,5, erhöhen außerdem die Ausbeute fehlerfreier Gele auf Aclar und reduzieren diese nicht auf Glas.

2.3.2.2 Herstellung der Polyacrylamidgele

Das Gießen der Gele auf Glas erfolgte nach Pelham und Wang^{76,112} und das Gießen auf Aclar-Folie als eine Abwandlung dieser Prozedur. Die Steifigkeit des Polyacrylamidgels lässt sich durch den Gehalt an BIS-Acrylamid variieren. Für noch nicht verwendete Zelltypen muss die Festigkeit des Substrates neu ausgetestet werden. Für bovine Osteoblasten hat sich eine Konzentration von 0,04% - 0,06% BIS-Acrylamid im Gel bewährt. Da die Qualität der Gele auf Aclar-Folie bei Verwendung von höherem BIS-Acrylamid-Anteil besser ist, wurden Gele mit 0,06% BIS-Acrylamid-Anteil gegossen.

Die 24x60 mm großen Glas-Deckgläser werden 3 mal durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen und anschließend mit 0,1 N NaOH behandelt. Nach dem Trocknen wird ein Tropfen 3-Aminopropyltrimethoxysilane auf der Oberfläche verteilt. Nach 5 Minuten wird 3 x 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und die Deckgläser anschließend in 0,5% Glutardialdehyd in PBS eingelegt. Nach 30 Minuten werden die Deckgläser 3x10 Minuten in Wasser eingelegt um überschüssiges Glutardialdehyd zu entfernen. Auf die so präparierten Deckgläser, sowie die wie oben beschrieben präparierten Aclar-Folien können dann die Polyacrylamid-Gele gegossen werden.

Für die Gele auf ACLAR werden die 10%ige Acrylamid-Stammlösung und die 2% BIS-Acrylamid-Stammlösung auf einen pH von 8,5 eingestellt. Es werden zu 2 ml 10% Acrylamidlösung mit 0,06% BIS-Acrylamid-Anteil die Fluoreszenzpartikel hinzugegeben. Da eine hohe Affinität der verwendeten Fluoreszenzpartikel zur Aclar-Folie die im Gel verbleibende Menge an Fluoreszenzpartikel reduziert, wird eine erhöhte Menge für Gele auf Aclar-Folien zugegeben. 40 µl der 500 nm großen und 80 µl der 200 nm großen Fluoreszenzpartikel werden hinzugegeben. Für die Gele auf Glas werden 20 µl der 500 nm großen und 30 µl der 200 nm großen Fluoreszenzpartikel zugegeben. Nach gründlichem Durchmischen wird zur Entfernung von Luftblasen mit

einer Wasserstrahlpumpe evakuiert. Der Polymerisationsvorgang wird mit 1 μl TEMED und 10 μl frisch angesetztem APS gestartet. TEMED wirkt dabei als Katalysator für die APS-Radikalbildung und beschleunigt den Start der Polymerisation. Direkt nach Polymerisationsstart werden je 14 μl dieser Lösung auf die präparierten Aclar-Folien oder Glas-Objektträger getropft und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Lösung breitet sich dann gleichmäßig unter dem Deckglas aus und dadurch wird bei gleicher Lösungsmenge eine konstante Gelhöhe gewährleistet.

Bei einem Volumen V von 14 mm^3 ergibt sich nach

$$V = h \cdot A \quad \text{mit} \quad A = \pi \cdot r^2 \quad (2)$$

die Höhe zu:

$$h = \frac{V}{\pi \cdot r^2} = \frac{14 \text{mm}^3}{\pi \cdot (8 \text{mm})^2} = 70 \mu\text{m} \quad (3)$$

Dabei ist A die Fläche und $r = 8 \text{mm}$ der Radius des Gel-Zylinders.

Um eine befriedigende Konzentration der Fluoreszenzkügelchen an der Oberfläche des Gels zu erhalten, werden die Aclar-Folien oder die Glas-Objektträger mit dem polymerisierenden Gel um 180° gedreht. Dabei sammeln sich die Fluoreszenzmarker, die eine höhere Dichte als das Polyacrylamidgel besitzen, der Schwerkraft folgend an der nach unten zeigenden Geloberfläche. An der Kontaktfläche von Gel und Aclar-Folie sammelt sich trotzdem ein großer Teil der Fluoreszenzkügelchen an. Dies führt aber nicht zu einer erniedrigten Bildqualität durch das starke Streulicht der Fluoreszenzkugelschicht. Die Geschwindigkeit der Polymerisation kann durch Temperaturabsenkung verlangsamt werden. Dadurch lässt sich die Konzentration der Fluoreszenzkugeln an der nach unten gerichteten Geloberfläche weiter erhöhen. Allerdings führte eine verzögerte Polymerisation bei Gebrauch der Aclar-Folien zu starker Wellenbildung an der Geloberfläche. Für Gele auf Aclar-Folie ließ sich bei normaler APS- und TEMED-Konzentration durch Erhöhung der Fluoreszenzkugelanzahl im Polymerisat eine befriedigende Dichte an der Geloberfläche, die bei nicht erniedrigter Polymerisationsdauer ausreichend eben ist, erreichen. Nach

erfolgter Polymerisation werden die Gele in 50mM HEPES-Lösung (pH 8,5) für 2 mal 15 Minuten gewaschen.

Material:

- Für Kraftmikroskop-Experimente:
 - Deckgläser: Marienfeld No. 1; 24 x 60 mm
 - 3-Aminopropyltrimethoxysialine 97%; $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$; Sigma-Aldrich; A3648 034K0610
 - PBS Lösung Gibco REF14190-094 Lot 3106682
 - Glutardialdehyde 0,5% in PBS aus Glutardialdehyd sol. 25%: Merck 1.04239
- Für Dehnungs-Experimente:
 - Präparierte Aclar-Folien
- Acrylamide; $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$; Serva 10676
- BIS-Acrylamide: N,N'-Methylene-bis-Acrylamide 98%; $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$; 2% sol in water. Sigma 29197 Lot P060010
- Fluoreszenzpartikel: Fluosphere Carboxylate-modified 2% Solids; Molecular Probes (Leiden, Netherlands)
 - Durchmesser Katalognr. Excitation Emission Farbe
 - 0,2 μm F-8811 505 515 Gelb-grün
 - 0,5 μm F-8813 505 515 Gelb-grün
 - 2,0 μm F-8823 505 515 Gelb-grün
 - 2,0 μm F-8826 580 605 Rot
- Ammonium Persulfat (APS); $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$; Fluka 09913 Lot 453008/1 12903451
 - 10% w/v 0.1 g in 1 ml ddH₂O
- TEMED p.a. 99% $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$; Carl Roth GmbH Art 23673, Charge 40628335
- Deckgläser Marienfeld No. 1; (rund) Ø 16 mm
- 50 mM HEPES, pH 8.5
 - 11,9 g N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]); Sigma H-3375 Charge #118H5413
 - 1 l ddH₂O
 - KOH Mit Kaliumhydroxid Pellets wird der pH auf 8.5 titriert.

2.3.3 Beschichten der Polyacrylamidgele mit Kollagen

Unbeschichtetes Polyacrylamid hat eine sehr glatte Oberfläche, die die Haftung der Zellen kaum ermöglicht. Durch Beschichtung mit Kollagen I wird versucht, die natürliche Umgebung nachzuahmen.

Auf das Gel werden 200 µl frisch angesetzte Sulfo-SANPAH-Lösung gegeben und 10 Minuten unter einer 60 W UV-Lampe aktiviert. Dabei bindet das Sulfo-SANPAH an die Polyacrylamidoberfläche. Nach einer zweiten Photoaktivierung wurden die Gele mit HEPES-Lösung gespült und dann mit Kollagen I überschichtet. Während 6 bis 12 Stunden Inkubationszeit bei 4°C bindet Kollagen I an Sulfo-SANPAH. Danach wurde 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen.

Material:

- Sulfo-SANPAH: Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-phenylamino)hexanoate, Pierce Perbio BL, Art. 22589, Lot HC103730
- 1 mM in 50 mM HEPES, pH 8.5
- Kollagen: Kollagen Lösung Type 1 (Calf Skin); 0.1%ige Kollagenlösung in 0.1 N acetic acid; Sigma-Aldrich Nr. C-8919, Charge #65K2434

2.3.4 Sterilisieren der Polyacrylamidgele

Zur Sterilisation werden die Gele eine Stunde UV-Licht ausgesetzt. Hierzu werden die Gele mit PBS bedeckt und mit geringem Abstand an die UV-Lampe einer Sterilwerkbank gestellt. Das zusätzliche Sterilisieren der Aclar-Folien mit aufgebrachtener Zellkammer in Alkohol in einem früheren Schritt ist notwendig, da diese unsteril bezogen wurden und bei der Herstellung durch intensiven Kontakt unter einer hohen Keimbelastung leiden. Eine Stunde unter UV-Licht wäre ohne diesen vorherigen Schritt nicht ausreichend, um alle Keime abzutöten. Eine längere Sterilisationszeit der fertigen Aclar-Folien, auf denen dann bereits das Gel aufgebracht ist, würde zu einem Ausbleichen der Fluoreszenzkugeln führen.

Material:

- UV-Temperatur-Werkbank Edmund Bühler TH 25

2.3.5 Bestimmung des Elastizitätsmoduls der Polyacrylamidgele

Für die Zugkraftberechnung aus der Verschiebung der Fluoreszenzmarker unterhalb der Zellen ist die Kenntnis des Elastizitätsmoduls, des Young's modulus der Gele notwendig. Pelham und Wang^{76,112} haben die Eigenschaften der Polyacrylamidgele wie sie in den hier beschriebenen Versuchen verwendet wurden, genauer charakterisiert. Die Gele sind über einen weiten Bereich vollelastisch und erfüllen damit die notwendigen Kriterien zur Anwendung des Hertz-Modells zur Berechnung des Young's modulus mit der Kraftmikroskop-Methode und zur eigentlichen Berechnung der Zugkräfte. Es hat sich gezeigt, dass die Bestimmung des Young's modulus mit der Kraftmikroskop-Methode geringere Standardabweichungen liefert²⁰ als die Münz- oder Mikrobalken-Methode.

Bei der ungenauen Münz-Methode bestimmt man das Young's Modulus durch Messung der Komprimierung des gesamten Geles durch Nachfokussieren mit dem Mikroskop nach Entfernen von Münzen oder anderen Gewichten von einer das Gel bedeckenden dünnen steifen Platte.

Bei der Mikrobalken-Methode⁶² üben Stahlkugeln eine definierte Gewichtskraft direkt auf das Gel aus. Auch hier wird durch Nachfokussieren mit dem Mikroskop die Eindellung durch die Stahlkugeln vor deren Entfernung mit einem Magneten gemessen. Das Young's Modulus wird dann ebenfalls nach der Hertz-Theorie⁸⁴ berechnet.

Die Elastizitätsmodule der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Polyacrylamidgele wurden mit der Kraftmikroskop-Methode bestimmt²⁰. Im Wesentlichen wird dabei das Elastizitätsmodul ebenfalls nach der Hertz-Theorie mittels

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

berechnet. Dabei ist F die Kraft und r der Radius der Kugel an der Cantileverspitze. Die Poisson-Zahl ν für Polyacrylamidgele liegt bei 0,3⁶⁰. Die Eindringtiefe d des Cantilevers in das Polyacrylamidgel kann aus den bekannten Parametern und der gemessenen PSD-Spannung berechnet werden.

Die Bestimmung des Elastizitätsmoduls der verwendeten Polyacrylamidgele mit dem Rasterkraftmikroskop liefert Werte von 6200 N/m² mit geringen Standardabweichungen.

2.4 Zellkultur

Für diese Arbeit wurden primäre bovine Osteoblasten⁵¹ verwendet. Die Arbeit mit diesen Zellen wurde an Lindl und Bauer⁶¹ und Spector⁹⁵ angelehnt. Im Wesentlichen wurden Perioststreifen ausgelegt, um durch Auswachsverfahren eine konfluente Kultur innerhalb der Kultivierungszeit zu erreichen. Die gewonnen Kulturen wurden nach Aufbereitung im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ gezüchtet. Als Medium wurde HAM'S F10 mit Vitamin C, Glutamin, Antibiotika und 10%FCS-Zusatz verwendet.

Kulturmedien:

- Fetales Kälberserum (FCS) der Firma Seromed (Chargennummer 615B)
- Hams F10 + FCS
 - 10 ml/l einer 200 mM L- Glutamin Stammlösung (PAA; Nr. M11-004)
 - 10 mg/l das sind 2 ml/l Vitamin C Stammlösung
 - 110 ml/l FCS (=10% FCS)
 - 50000U/l Penicillin/Streptomycin (PAA Nr. P11-010)
- Vitamin C Stammlösung:
 - 5 g L Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n-Hydrate (WAKO013-12061)
 - 1 l ddH₂O

Geräte für die Zellkultur:

- Begasungsbrutschrank für die Zellkultur Heraeus Instruments
- Autoklav Varioklav Dampfsterilisator Tpp 250T mit Mikroprozessorsteuerung
- Sterilisationsofen Heraeus Instruments
- Zellzähler CASY 1 Schärfe System
- Sterilfilter 0,2 µM Porengröße Schleicher & Schuell
- Sterilwerkbank Gelaire BSB
- Zentrifuge Hettich universal

- Phasenkontrastmikroskop Olympus CK2(BH2-RFCA) Olympus mit Objektiven A 10PL, LWD CA 20PL, LWD CD Plan 40PL
- Gewebekulturschalen für die Zellkultur Ø 5,7 cm Nalge Nunc International
- Gewebekulturschalen für die Zellkultur Ø 14 cm Nalge Nunc International
- Gewebekulturflasche 50 ml Greiner Bio-one
- Gewebekulturflaschen 250 ml Greiner Bio-one

2.4.1 Präparation der primären bovinen Osteoblasten

Vom lokalen Schlachthof wurden die Metakarpalen von frisch geschlachteten Jungbullen bezogen. Die Knochen wurden unter sterilen Bedingungen frei präpariert und Perioststreifen vom Knochen abgezogen. Diese Perioststreifen wurden 3 mal 10 Minuten in Earles Puffer bei 37°C gewaschen. Nach 20-minütiger Behandlung mit Earles mit Penicillin (250 U/ml), Streptomycin (0,25 mg/ml) und 0,4% Amphotericin B bei 37°C werden die Perioststreifen auf 5 x 5 mm große Stücke zurecht geschnitten und in einer Dichte von 1 pro 15 cm² in Petrischalen ausgelegt und mit HMEM versorgt. Nach einem ersten Mediumwechsel am folgenden Tag wird das Medium einmal pro Woche gewechselt. Nach drei bis fünf Wochen erreichen die Zellen Konfluenz und werden sie für Experimente verwendet oder kryokonserviert.

Medien:

- Earles 1x
 - 100 ml Earles 10x (Biochrom KG, No. L 1925, Lot 1109G)
 - 894 ml ddH₂O
 - 6 ml 7,5% NaHCO₃ Lösung aus NaHCO₃ (Merck 6329 Lot 241K17 943529)
- Earles + Antibioticum (Pro 1 l Earles-Lösung):
 - 500000 IE Penicillin/ Streptomycin –Stammlösung (BioWest L0022 Lot S05063L022)
 - 4000 g Amphotericin B (Sigma, A2942, Lot 6142383)
- High Growth Enhancement Medium (Biowhittaker; Nr. BESP055):
 - 110 ml/l FCS (= 10% FCS)

- 10 ml/l einer 200 mM L- Glutamin Lösung (PAA M11-004, Lot J04123-394)
- 10 mg/l das sind 2 ml/l Vitamin C Stammlösung
- 50000 IE Penicillin / Streptomycin - Stammlösung (BioWest L0022 Lot S05063L022)

2.4.2 Passagieren der primären bovinen Osteoblasten

Nach Absaugen des Mediums werden die konfluenten Osteoblasten 2 x mit PBS gespült und mittels EDTA/Trypsin-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst (20 Minuten Inkubation bei 37°C). HMEM-Medium wird zugegeben und 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wird resuspendiert, die Zellzahl bestimmt, auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt und für Experimente ausgesät. Alternativ können die Zellen in diesem Stadium auch kryokonserviert werden.

Material:

- Trypsin / EDTA-Lösung
 - 100 ml Stammlösung (Sigma X0930 Lot S03928X0930)
 - 900 ml PBS Lösung Gibco

Medium:

- Einfriermedium
 - Hams F10 Gibco
 - 10% (v/v) DMSO (Dimethylsulfoxid) (Roth A994.1)

2.4.3 Aussäen der Zellen auf den Substraten

Für Experimente, bei denen Zugkraftmessungen durchgeführt werden sollen, werden semi-konfluente Kulturen angestrebt. Durch Aussäen der Zellen in einer Dichte von ca. 3000 – 5000 /cm² und Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 36 h – 60 h wird dies erreicht.

2.4.4 Kryokonservierung der primären bovinen Osteoblasten

Die Zellen werden auf eine Konzentration von 10^6 /ml eingestellt, in ein Kryoröhrchen überführt und 1 ml Einfriermedium (HAM's F10 + 10% v/v DMSO) zugefügt. Dann werden die Zellen im geschlossenen Styroporgefäß in -80°C -Umgebung langsam eingefroren. Nach 12 Stunden können die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Die kryokonservierten Zellen werden im 37° -Wasserbad aufgetaut, mit vorgewärmtem HAM's F10 - Medium versetzt und 10 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das Pellet wird in frisches Medium überführt, resuspendiert, und in gewünschter Zellkonzentration in Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 h wird das Medium ein erstes Mal gewechselt.

2.4.5 Phänotypisierung der Osteoblasten

2.4.5.1 Immunzytochemischer Nachweis von Osteocalcin

Zur Phänotypisierung wurde das osteoblastenspezifische Protein Osteocalcin in den Zellen immunhistochemisch nachgewiesen. Zellen werden auf Deckgläsern ausgesät und bei Erreichen der Konfluenz (ca. 2 Tage) mit PBS gespült und bei -20°C mit einem Acteon-Methanol-Gemisch (1:1) fixiert. Nach dreimaligem Waschen werden die endogenen Peroxidasen durch 10 Minuten langes Bedecken mit 0,3 % H_2O_2 blockiert. Nach Waschen werden die Zellen mit dem primären spezifischen Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vorsichtigem Waschen wird mit dem sekundären Biotin-konjugierten Antikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen wird mit Peroxidase konjugiertem Streptavidin inkubiert und im Anschluss, nach weiterem Waschen mit Färbelösung (10-minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur) sichtbar gemacht. Nach 10-minütigem Spülen mit H_2O werden die Proben luftgetrocknet und mit Glycerin/Gelantine konserviert. Für die positiv-Kontrolle wird statt des Primärantikörpers für Osteocalcin ein Anti-Vimentin-Antikörper verwendet. Vimentin kommt in allen mesenchymalen Zellen vor. Für die Negativ-Kontrolle wird anstatt des Primärantikörpers mit Mausserum inkubiert.

Material:

- Antikörper in Verdünnung
 - anti-Vimentin (mouse) Boehringer Mannheim; Clone V9 #814318 1:4
 - anti-Osteocalcin (mouse) Larry Fisher (NIH) 1:50

- anti-Osteocalcin (goat) Fitzgerald 1:50
- Biotin-konjugierte AK
 - anti-Mouse Boehringer #1089285 1:50
 - anti-Goat Sigma B6523 1:50
- Peroxidase-konjugiertes Streptavidin
 - Streptavidin Boehringer #1089153 1:30
- Färbelösung

2.4.5.2 PTH-Stimulationstests

Für PTH-Stimulationstests werden die Zellen mit Fura-2 gefärbt (siehe Calcium-Imaging). Nach 20-minütiger Beruhigung wird der intrazelluläre Calciumspiegel beobachtet und die Zellen mit 400 nM PTH stimuliert.

Material:

- PTH, Sigma P3671, Lot 128H49x01

2.4.5.3 MTT-Tests

Zur Phänotypisierung wird der MTT-Test verwendet, um eine Proliferationssteigerung von Osteoblasten nach mechanischer Stimulation nachzuweisen. Im quantitativen und spektroskopischen Assay nach Mosmann⁶⁹ wird durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase das gelbe Tetrazoliumsalz MTT in das wasserunlösliche blaue Formazan gespalten. Dies kann nur in lebenden Zellen geschehen⁹⁴. Nach Lösen des Formazans in Isopropanol wird die optische Dichte der Lösung bestimmt. Diese korreliert mit der Menge metabolisch aktiver Zellen.

Die Zellen werden in einer Dichte von 20.000 /cm² auf 9-Loch Dehnungsplatten ausgesät. Am den beiden folgenden Tagen werden die Zellen mit 4.000 μ str bei 1 Hz 30 Zyklen gedehnt. Die Kontrollplatten werden gleich behandelt, aber nicht gedehnt. Nach Dehnung am ersten Dehnungstag erfolgt ein Mediumwechsel. Nach Dehnung am zweiten Tag wird das Medium entfernt, 100 μ l MTT-Lösung (Lsg 2) zugefügt und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wird die MTT-Lösung gegen Lösungsmittel ausgetauscht und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

Überführen der Proben auf eine Mikrotiterplatte werden die Exktinktionen bei 580 nm photometrisch bestimmt. Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Wilcoxon-Test.

Material:

- MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
- Lösung 1 MTT-Stammlösung 5 mg/ml MTT in PBS
- Lösung 2 MTT-Lösung 1:10 Verdünnung aus MTT-Stammlösung in Nährmedium ohne Zusätze
- Lösung 3 Lösungsmittel 20% SDS (w/v)
- Isopropanol

2.4.6 Calciumuntersuchungen**2.4.6.1 Calciumfarbstoff Fura-2**

Der 1985 von Grynkiewicz³⁹ vorgestellte Farbstoff Fura-2 ist ein Verhältnis-Farbstoff. Durch Bindung eines Calciumions an das Farbstoffmolekül kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums. Der ungebundene Farbstoff hat ein Maximum bei Licht der Wellenlänge 363 nm und der gebundene bei 335 nm. Die Eigenschaften des Emissionsspektrums bleiben hierbei unberührt. Das Maximum liegt bei 510 nm. Durch abwechselnde Anregung bei 340 und 380 nm werden die Lichtintensitäten des calciumgebundenen oder calciumungebundenen Farbstoffes gemessen und das Verhältnis bestimmt (engl. ratio-imaging). Dieses Verhältnis erlaubt qualitative Aussagen über die intrazelluläre Calciumkonzentration. Ein großer Vorteil von Ratio-Farbstoffen ist, dass schwankende Farbstoffkonzentrationen über einen großen Bereich nicht zu Schwankungen des Ratio-Signals führen. Auch ist diese Art der Fluoreszenzmessung nicht so anfällig gegenüber Streulicht und Ausbleichen des Farbstoffes.

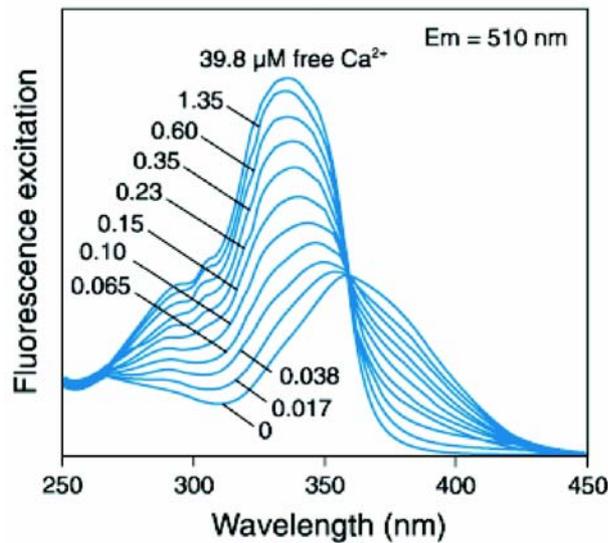


Abbildung 15. Der Calcium-Farbstoff Fura-2.

Die Zellen wurden für eine Stunde mit 3 μM Fura-2-AM inkubiert, danach mit PBS gewaschen und mit 10 mM HEPES gepuffertem FCS-freiem Medium für das Experiment aufgebaut.

Die Calciummessungen wurden mit einer stark lichtempfindlichen 512x512 Pixel CCD-Kamera durchgeführt. Ein Monochromator liefert das 340 nm- und das 380 nm-Wellenlängen-Licht. Die Daten werden mit einem Qanticell 700-System aufgenommen und prozessiert.

Material:

- Fura-2-AM, Molecular Probes, 300 μM Stammlösung in DMSO
- 512 x 512 Pixel CCD-Kamera Extended ISIS von Photonic Science, UK
- Monochromator von Visitech, Sunderland, UK
- Qanticell 700-System von Applied Imaging-Visitech, Sunderland UK

2.4.6.2 Thapsigargin- und EGTA-Behandlung

Thapsigargin¹⁰² ist ein Blocker der Ca-ATPase des endoplasmatischen Retikulums. Durch die Blockade des Enzyms wird die Aufnahme von Calciumionen in das endoplasmatische Retikulum unterbunden. Da es physiologischerweise nach IP₃-Freisetzung zu einem Ausstrom von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol kommt, hilft Thapsigargin den Ursprung intrazellulärer Calciumerhöhungen zu finden. Falls die beobachteten Calciumerhöhungen nach Thapsigargin-Behandlung

ausbleiben, nimmt man an, dass der Ursprung des Calciums das endoplasmatische Retikulum ist. Die Inkubation mit Thapsigargin erfolgt für 20 min vor Experimentbeginn in einer Konzentration von 5 μM .

Mittels EGTA kann die Calciumkonzentration im Extrazellulärmedium eingestellt werden⁴. Wird die Calciumkonzentration sehr niedrig gewählt, und kann dadurch die Calciumaktivierung nach Stimulation unterbunden werden, liegt der Ursprung des für die Aktivierung nötigen Calciums in diesem Falle im Extrazellulärraum. Hier wurde für 30 Minuten mit EGTA in einer Konzentration von 5 μM inkubiert, wodurch die extrazelluläre Calciumkonzentration auf etwa 100 nM eingestellt wurde. Dies entspricht auch der intrazellulären Konzentration, so dass der Calciumkonzentrationsgradient über die Zellmembran in diesen Experimenten ausgeglichen war.

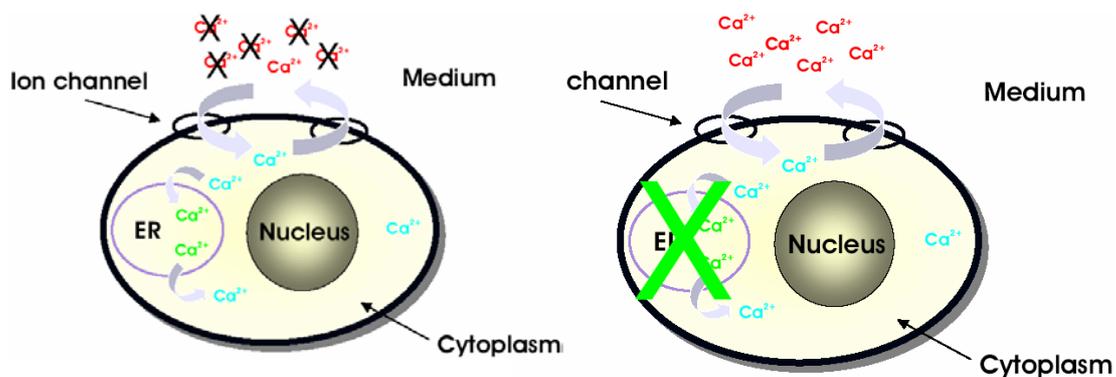


Abbildung 16. Funktion von EGTA und Thapsigargin. Links: Mit EGTA wurde der extrazelluläre Calciumspiegel dem intrazellulären angeglichen. Rechts: Thapsigargin blockt die endoplasmatische Calcium-ATPase und leert so die intrazellulären Calciumspeicher. (aus ⁶⁴)

Material:

- Thapsigargin Molecular Probes T-7459
- EGTA Sigma E3885, Lot 50H-562416

2.5 Versuchsdurchführung

2.5.1 Zugkraftmessungen

Um die Zugkräfte zuverlässig berechnen zu können, müssen die zu untersuchenden Zellen sorgfältig ausgewählt werden. So ist für Zugkraftmessungen darauf zu achten, dass sich in direkter Umgebung der zu untersuchenden Zelle möglichst keine anderen Zellen befinden, da diese aus Sicht der untersuchten Zelle externe Kräfte generieren

(Verletzung der Randbedingung (8), siehe 2.6.4) und dies zu Störungen in der Kraftberechnung führt. Andererseits ist es zu vermeiden, unphysiologisch isolierte Zellen zu untersuchen. Für die Messung geeignete Zellen wiesen 1-3 direkte Kontakte zu Nachbarzellen auf, deren Zellkörper sich aber in deutlicher Entfernung zu einander befanden. Nach mindestens 20-minütiger Pause zur Beruhigung der transportierten Zellen wurden über zwei Minuten die Fluoreszenzmarker unter der Zelle registriert. Diese Zugkraftmessungen dienen als Baseline, um einen Vergleich für die veränderten Zugkräfte nach Stimulation zu haben.

2.5.2 Durchführung der Dehnungsexperimente

Die Zellen in ihren Zellkammer auf den Aclar-Klemmhalterungen wurden nach 36 bis 60 Stunden aus dem Inkubator herausgenommen, das Kulturmedium durch HEPES gepuffertes Ham's F 10-Medium ersetzt und die Aclar-Klemmhalterungen in die Dehnungsmaschine eingebaut. Es wurde ein geeignetes Sichtfeld eingestellt und die Dehnungsmaschine auf dem Mikroskopisch fixiert. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten begann das Experiment.

Es wurde ein inverses Mikroskop mit 40x-Objektiv verwendet. Zur Datenaquisition wurden digitale Bilder mit einer CCD Kamera aufgenommen. Die Pixellänge der Bilder aus diesem Versuchsaufbau wurde zu $0.276 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ bestimmt.

Nach Fokussieren auf die an der Oberfläche des Gels gelegenen Fluoreszenzmarker wurden im Abstand von 10 Sekunden Fluoreszenzbilder aufgenommen. Eine höhere zeitliche Auflösung war wegen der benötigten langen Belichtungszeiten und der zeitaufwendigen Analyse der Bilder nicht im sinnvollen Rahmen durchzuführen. Nach 2 Minuten wurde der Dehnungsreiz appliziert und zwölf weitere Fluoreszenzbilder aufgenommen. Danach wird die untersuchte Zelle vom Gel mit Hilfe von Trypsin entfernt und ein weiteres Fluoreszenzbild aufgenommen. Dieses Bild ohne Zelle dient als sogenanntes „Nullbild“ zur Berechnung der absoluten Kräfte der Zelle.

Die vor der Stimulation aufgenommen Bilder liefern die Baseline-Werte für den Vergleich mit den Zugkräften nach Dehnung.

Material:

- Nikon Diaphot
- Nikon Fluor 40x, NA = 0.85
- 8 Bit CCD Kamera, die Xillix microImager MI1400 mit 1306 x 1032 Pixeln

2.5.3 Durchführung der Kraftmikroskopexperimente

2.5.3.1 Zyklische Stimulation

2.5.3.1.1 Zugkraftmessungen

Kulturmedium oder Färbemedium wurde abgesaugt, die Zellen mit PBS vorsichtig gewaschen und serumfreies, HEPES-gepuffertes Medium verwendet. Das Deckglas mit den Zellen wurde in die Zellkammer auf dem Mikroskoptisch unter dem Kraftmikroskop eingebaut. Nach Positionierung der Zellkammer auf dem Mikroskoptisch wurde mit der manuellen Annäherungsprozedur des Kraftmikroskops begonnen. Wenn der Polycarbonatblock über der Cantileverbasis in die Flüssigkeit eingetaucht ist, muss der Laser auf die Cantileverspitze positioniert werden. Danach wird die Oberfläche des Gels mit der automatischen Annäherungsprozedur gefunden. Anschließend wird, um Beschädigungen des Cantilevers zu vermeiden, der Mess- und Stimulationskopf mindestens 10.000 Motorschritte (entsprechen 150µm) von der Geloberfläche entfernt und ein geeignetes Fenster mit einer geeigneten Zelle zur Stimulation eingestellt. Dazu wurde die zu stimulierende und untersuchende Zelle direkt unter die Kugel an der Cantileverspitze positioniert.

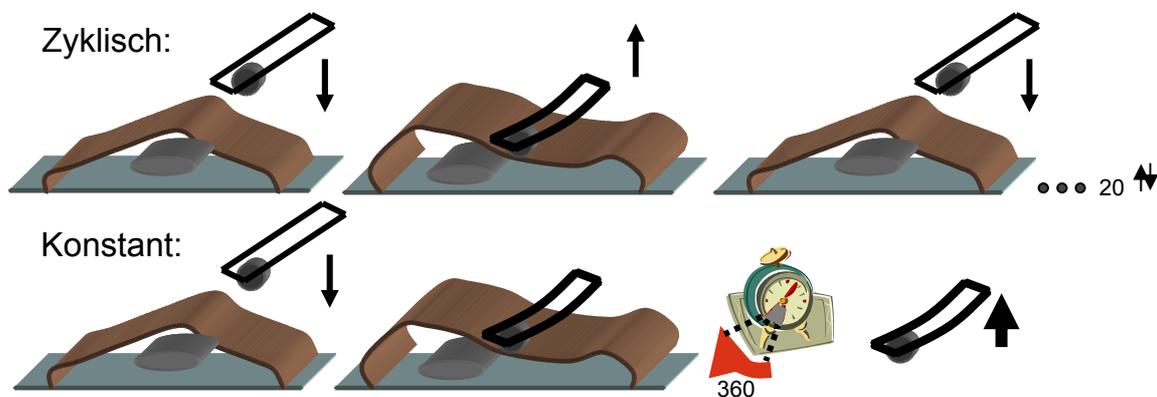


Abbildung 17. Stimationsarten zyklisch vs. konstant. Oben: Zyklisch: Der Cantilever wird 20 Mal bei 10Hz hoch und runter gefahren und komprimiert so die Zelle zyklisch. Unten: Konstant: Der Cantilever wird herunter gefahren bis die voreingestellte Kraft erreicht wird. Dort verbleibt er dann für 360 Sekunden und wird anschließend wieder hoch gefahren.

Nach 10 Aufnahmen der Fluoreszenzverteilung vor Stimulation wurde anschließend die Oberfläche der zu stimulierenden Zelle automatisch detektiert und sofort mit der Stimulation begonnen (20 Zyklen bei 10 Hz mit ca. 150 nN). Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Zugkraftuntersuchungen nach zyklischer Stimulation die Cantileverbasis mit konstanter Geschwindigkeit angenähert, was zu einem dreiecksähnlichen

Stimulationsprofil im Abstand-Zeit-Diagramm führt und zu einem stark abgerundeten Dreiecksprofil im Kraft-Zeit-Diagramm.

Während der Stimulation ist es nicht möglich, die Verteilung der Fluoreszenzmarker zu beobachten, da das Laserlicht des Kraftmikroskops und der sich bewegende fluoreszierende Cantilever zu Artefakten in den Kraftvektorkarten führt. Nach Stimulation wurden alle 30 Sekunden Fluoreszenzbilder der Marker im Gel aufgenommen und anschließend nach Ablösen der Zelle mehrere Nullbilder gewonnen.

Material:

- Nikon TE-2000 U
- Long distance Objektiv 40x: Plan Fluor ELWD 40x / 0.60
- 8 Bit 1306 x 1032 Pixel CCD Kamera Xillix microImager MI1400

2.5.3.1.2 Calciummessungen

Nach mindestens 20-minütiger Pause zur Beruhigung der transportierten Zellen und gegebenenfalls Inkubation mit EGTA oder Thapsigargin wurde über mehrere Minuten der Calciumspiegel der Zellen beobachtet und anschließend die Stimulation gestartet. Es wurde das identische Stimulationsprofil wie für die zyklische Stimulation für Zugkraftmessungen gewählt. Falls keine Calciumerhöhung visualisiert werden konnte, wurde ein weiterer Stimulationszyklus mit erhöhter Kraft gefahren bis eine Calciumerhöhung beobachtet wurde oder die Stimulationskraft $1\mu\text{N}$ erreichte.

Material:

- Nikon TE-2000 U inverses Mikroskop
- Long distance Objektiv 40x: Plan Fluor ELWD 40x / 0.60
- 512 x 512 Pixel CCD-Kamera Extended ISIS von Photonic Science, UK

2.5.3.2 Konstante Stimulation - Krafttransmissionsmessungen

Um festzustellen, ob die Frequenz der Stimulation zu unterschiedlichen mechanischen Antworten führt, wurden neben Messungen nach zyklischer Stimulation auch Messungen nach Stimulation mit konstanter Kompression durchgeführt. Messungen der

Zugkräfte nach konstanter Stimulation wurden entfernungskontrolliert durchgeführt. Nach Positionierung des Cantilevers über der zu untersuchenden Zelle wurden mindestens zehn Aufnahmen der Fluoreszenzmarker direkt unter der Zelle vor Stimulation durchgeführt. Dann wurde der Cantilever mit der festgelegten Kraft auf der Zelle abgelegt und die Position seiner Basis arretiert. Im Abstand von 20 Sekunden wurde jeweils ein Fluoreszenzbild der Marker im Gel aufgenommen. Nach 360 Sekunden wurde der Cantilever entfernt und weitere zehn Bilder der Fluoreszenzmarker aufgenommen. Anschließend wurde die Zelle abgelöst und das Nullbild gewonnen.

Bei der Berechnung der Zugkräfte musste bedacht werden, dass die sonst verwendete Randbedingung (Gleichung 8, siehe 2.6.4) nicht erfüllt wird. Durch das Auflegen des Cantilevers wirkt in diesem Experiment eine äußere Kraft und die Summe aller Nettokräfte ist nicht gleich null. Die Nebenbedingungen (Gleichungen 7,8,9, siehe 2.6.4) dienen aber in diesem Fall lediglich dazu, die Rechenzeit drastisch zu verkürzen, indem sie viele Kraftvektorfelder im Näherungsverfahren (10, siehe 2.6.4) gar nicht erst zulassen. Damit benötigt man für diese Berechnungen deutlich mehr Rechenzeit.

Im Fokus des Interesses in diesem Versuchteil steht die Frage, inwieweit die durch vertikale Kompression übertragene Kraft sich auf die Zugkräfte der Zelle auswirkt. Es soll geklärt werden, ob die vertikale Kompression unmittelbar durch direkte Krafttransmission bis zu den fokalen Kontakten zu Änderungen in den Zugkraftwerten führt. Dann gilt es zu klären, ob die Zellen im weiteren Verlauf mit Änderungen in ihren Zugkräften auf die vertikale Kompression reagieren. Um beide Fragestellungen zu beantworten, ist es nötig die Zugkräfte der Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten zu vergleichen. Da in diesem Versuch eine äußere Kraft wirkt und damit die berechneten Zugkräfte nicht nur die von Zelle generierten Zugkräfte repräsentieren, und da außerdem die Zugkraftänderungen teilweise sehr gering sind, ist es sinnvoll für die Auswertung dieser Versuche auch differentielle Zugkraftänderungen zu betrachten. Hierunter versteht man die Auswertung der Zugkräfte nicht gegen das Nullbild sondern direkt gegen das zu vergleichende Bild. Die berechneten Kraftvektorkarten zeigen dann nur die Kraftänderungen zwischen zwei Zeitpunkten an und geben keinen Anhaltspunkt mehr auf die absoluten von der Zelle generierten Adhäsionskräfte. Die beiden Vorteile dieser Methode liegen in der hohen Kraftauflösung und in der gut visualisierten Richtungsinformation der beobachteten Zugkraftänderungen.

Material:

- Nikon TE-2000 U inverses Mikroskop
- Long distance Objektiv 40x: Plan Fluor ELWD 40x / 0.60
- 8 Bit 1306 x 1032 Pixel CCD Kamera Xillix microImager MI1400

2.6 Analyse der Zugkräfte

Zur Berechnung der von der Zelle generierten Zugkräfte aus den aufgenommenen Fluoreszenzbildern wird zuerst die Verschiebung der Fluoreszenzmarker mit einem optischen Fluss Algorithmus in einer Deformationsmatrix visualisiert. Um aus den Fluoreszenzbildern die Gesamtzellkräfte, die natürlich von der Fläche der Zelle abhängen, zu berechnen, muss auch der Zellumriss bekannt sein. Da zur Berechnung der Zellkräfte numerische Verfahren verwendet werden, ist es sinnvoll (und auch kaum anders durchführbar) die Kräfte für diskrete Punkte innerhalb der Zelle in ausreichender Dichte zu berechnen und nicht die Kraftverteilung für die kontinuierliche Fläche der Zelle. Dazu wird die Zelle in 200 bis 2000 Rechtecke eingeteilt, wobei jeder Knotenpunkt als Ursprung für die zu berechnenden Kraftvektoren dient. Danach folgen die mathematischen Operationen, die aus der Deformationsmatrix ein Kraft-Vektor-Feld erzeugen (siehe auch 2.6.4). Zur Vorbereitung werden hierbei analytisch die Elemente des Green'schen Tensors im Kraft und Deformation verknüpfenden Integral (Gleichung 11, Kap. 2.6.4) mit den Boussinesq Formeln (Gleichungen 12, Kap. 2.6.4) angenähert. Da es sich bei dem umformulierten Problem um ein Rückwärts-Problem handelt, das analytisch nicht gelöst werden kann, wird nun für jede Zelle und jeden Zeitpunkt das zu berechnende Kraftfeld iterativ angenähert. Hierbei fließt die intrinsische Wahrscheinlichkeit möglicher Kraftfelder in die Abschätzung ein. Es wird also für ein Kraftfeld mit hoher a priori Wahrscheinlichkeit die resultierende Deformation des Gels berechnet. Anschließend wird mit dem Chi-Quadrat-Test die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der die durch das angenommene Kraftfeld ausgelöste Deformation der tatsächlich gemessenen Deformation übereinstimmt. Danach wird die bedingte Wahrscheinlichkeit, dass ein Kraftfeld tatsächlich für die beobachtete Deformation verantwortlich ist, maximiert und so das einfachste mögliche ursächliche Kraftfeld bestimmt.

Diese Art der Maximierung einer Wahrscheinlichkeitsdichte nennt man Bootstrapping-Methode. Dabei handelt es sich um eine sequenzielle Monte-Carlo-Methode.

Das libtrc-Software-Paket zur Erstellung der Deformationsmatrix und der Kraftvektorkarten wurde freundlicherweise von Prof. Dembo (Dept. of Biomedical Engineering, Boston University) zur Verfügung gestellt.

2.6.1 Erstellung der Deformationsmatrix

Die Methode der Zugkraftmessung erlaubt die Berechnung von absoluten Kräften. Dazu wird die Verformung des Gels durch die Zelle mit Hilfe der Fluoreszenzmarker bestimmt. Optische Fluss-Ansätze (engl. Optical-flow) werden häufig in der Analyse bewegter Bilder verwendet. Die Grundidee dieses optischen Fluss Algorithmuses ist es, die Identitätsmuster der Fluoreszenzmarker in den zu vergleichenden Bildern zur Deckung zu bringen (sogenannte Schablonenanpassung oder blockmatching), um so die dabei nötigen Verschiebung zu quantifizieren. Dabei gilt mit dem Bild g und der Schablone h :

$$K(m,n) = \sum_{x=-K_x}^{K_x} \sum_{y=-K_y}^{K_y} g(x+m, y+n) \bullet h(x,y) \quad (5)$$

Im folgenden seien (u,v) die Koordinaten eines Fluoreszenzpartikels in dem deformierten Gel unter der Zelle und (x,y) die Koordinaten desselben Markers im relaxierten Gel, nachdem die Zelle entfernt worden ist. Zuerst werden die Helligkeiten der zu vergleichenden Fluoreszenzbilder angeglichen. Dies geschieht, indem die durchschnittliche Intensität aller Bildpunkte des jeweiligen Bildes von jedem Bildpunkt abgezogen wird. Um zu testen, ob der Fluoreszenzmarker (x,y) tatsächlich nach (u,v) verschoben worden ist, werden die Intensitätsmuster in der Umgebung um (x,y) und (u,v) (Korrelationsfenster, siehe Abb. 18) erfasst und deren Ähnlichkeit bestimmt. Um die Ähnlichkeit zwischen zwei Bildern zu bestimmen, gibt es mehrere mathematische Möglichkeiten, deren Eignung und Aufwand von Barron³ abgeschätzt wurden.

Im Falle der hier vorliegenden typischen Fluoreszenzbilder mit hohem Kontrast wird die Ähnlichkeit am besten mit dem so genannten normierten Kreuzkorrelationskoeffizienten R bestimmt.

$$R(x, y, u, v, \delta_x, \delta_y) \equiv \frac{\sum_{\delta_x} \sum_{\delta_y} P_0(x + \delta_x, y + \delta_y) \cdot P_1(u + \delta_x, v + \delta_y)}{\sqrt{\sum_{\delta_x} \sum_{\delta_y} P_0^2(x + \delta_x, y + \delta_y) \cdot \sum_{\delta_x} \sum_{\delta_y} P_1^2(u + \delta_x, v + \delta_y)}} \quad (6)$$

Hierbei sind die $P_k(x, y)$ die Intensitätswerte der Fluoreszenzmarker am Punkt (x, y) , wobei P_k über $k = 1, 2$, also die beiden zu vergleichenden Bilder, läuft. Summiert wird über alle δ_x und δ_y , so dass alle Punkte innerhalb der Korrelationsbox durchlaufen werden.

Im Falle einer totalen Übereinstimmung ist der Kreuzkorrelationskoeffizient $R = 1$, falls die Intensitätsmuster genau entgegengesetzt sind ist $R = -1$ und falls die Intensitätsmuster in den beiden Korrelationsfenster gar nicht korrelieren ist $R = 0$. Die hier verwendete Art der Ähnlichkeitsbestimmung hat durch die Normierung der Intensitäten den großen Vorteil, dass geringe Schwankungen in den Intensitäten, wie sie durch unterschiedliche Belichtungszeiten oder Ausbleichen der Fluoreszenzmarker entstehen, das Ergebnis nicht verfälschen.

Nun wird eine Umgebung um (x, y) festgelegt (Suchbox, siehe Abb. 18), in der die Korrelationsbox im Fluoreszenzbild des deformierten Geles verschoben werden soll. In dieser Umgebung wird R für alle Positionen der Korrelationsbox berechnet. Für die maximale Übereinstimmung in diesem Bereich hat R ein Maximum.

Im nächsten Schritt wird die Suchbox um das Zentrum des Punktes mit maximalem R gelegt und R für alle Positionen der Korrelationsbox in der Suchbox berechnet. Gehört das maximale R wieder zum gleichen Punkt, wird die Suche abgebrochen und eine Übereinstimmung des Fluoreszenzmarkers auf beiden Bildern wird angenommen; ansonsten wird der Vorgang für den gleichen Punkt (x, y) wiederholt. Auf diese Art werden für alle Punkte (x, y) die korrespondierenden Punkte (u, v) gefunden.

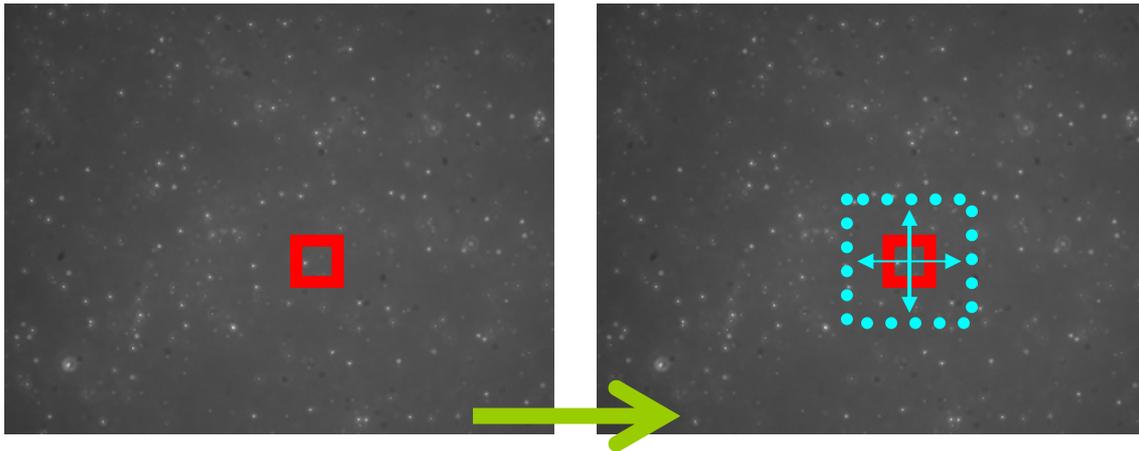


Abbildung 18. Korrelationsbox und Suchbox. Links: Die Größe der Korrelationsbox (rot) wird festgelegt. Die Fluoreszenzmarkerverteilung dieser Box wird innerhalb der Suchbox (blau) im zu vergleichenden Bildes wieder gesucht.

Marganski⁶³ gibt für diese Methode eine theoretische Genauigkeit von 0,1 Pixeln an und warnt aber gleichzeitig vor der Fehlerquelle Mensch. So sei in der Praxis der Fehler der Methode hauptsächlich auf ungenaues Fokussieren des Experimentators auf die Fluoreszenzpartikel zurückzuführen. In dem hier durchgeführten Experiment wurde aber bewusst darauf verzichtet, auf mehrere Fokusebenen einzustellen, um diesen Fehler zu vermeiden. Es kann zu ebenfalls zweifelhaften Ergebnissen kommen, wenn die Verformung des Geles sehr stark ist, die Dichte der Fluoreszenzmarker an der Geloberfläche zu niedrig ist oder Marker auf einem der beiden Bilder nicht existieren. Letzteres Problem kann durch Auswaschen von Partikeln, Fluoreszenz von umherschwebenden Zellbestandteilen oder auch durch eine schlechte Ausleuchtung, in der dann einige Marker eine zu geringe Helligkeit aufweisen, entstehen. Der Programmalgorithmus bezieht nur Fluoreszenzpartikel in die Untersuchung ein, deren Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N) einen zuvor eingestellten Wert nicht unterschreitet. So kommt es bei unregelmäßiger Ausleuchtung zu einer unterschiedlichen Intensität der Fluoreszenzmarker, und damit zu sehr unterschiedlichen (S/N). Dies führt gelegentlich dazu, dass auf einem der zu vergleichenden Bilder ein Fluoreszenzpartikel nicht als solcher erkannt wird. Daher wurde für zu niedrige Kreuzkorrelationskoeffizienten ein weiterer Schwellenwert eingeführt. Ist das maximale R für einen Fluoreszenzpartikel zu gering, wird er nicht in die Berechnung der Deformationsmatrix mit einbezogen. Translationale Bewegungen des gesamten Geles (registration artifact), wie sie durch Verschiebung der Messapparatur oder durch Wackeln am Mikroskopoptisch verursacht

werden können, werden erkannt und ausgeglichen. Zur Fehlervermeidung werden die Kreuzkorrelationskoeffizienten von Markern, deren Verschiebung relativ zur direkten Umgebung sehr groß ist, durch eine Vergrößerung der Korrelationsbox Neuberechnet. Als Zentrum der Suchbox wird der bis dahin naheste unsuspekte Knoten gewählt. Marker, deren absolute Verschiebungen sehr groß sind, die also nur durch Kräfte verursacht sein könnten, die weit außerhalb des physiologischen Bereichs liegen, werden ebenfalls neu berechnet. Nachdem dann für alle Fluoreszenzmarker die Verschiebungen berechnet worden sind, werden diese als 2000 bis 30000 Deformationsvektoren pro Zelle dargestellt. Diese Deformationsvektoren stellen den Datensatz für die Berechnung der Kraft-Vektor-Karten dar.

Die hier erläuterte Methode wird von den Autoren des Programms in Marganski et al.⁶³ detailliert beschrieben.

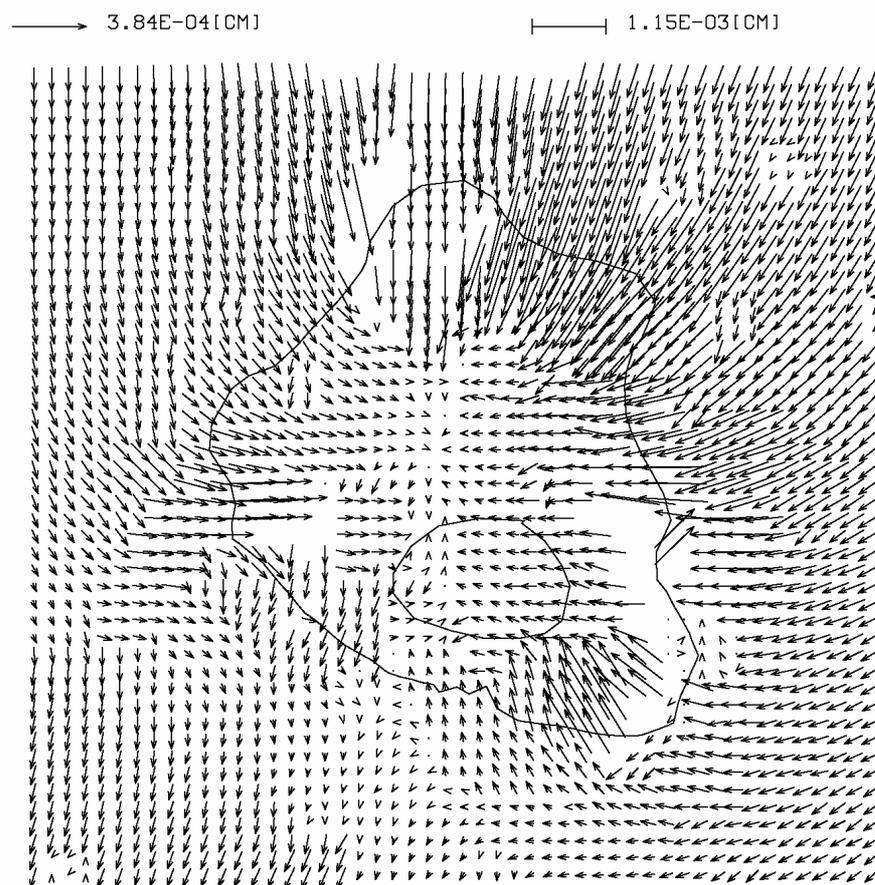


Abbildung 19. Deformationsmatrix. Typische Deformationsmatrix eines weichen Gels. Die Pfeile repräsentieren die Verschiebungen der Fluoreszenzmarker des Gels, das durch die Zelle deformiert wird.

2.6.2 Festlegen der Zellumrisse

Die Berechnung der Zellkräfte erfolgt flächennormiert, also in Einheiten Kraft pro Fläche, was einem Druck entspricht. Dies ist sinnvoll, da Zellen unterschiedlich groß sind, und man nicht davon ausgehen kann, dass die Zellen Kräfte unabhängig von ihrer Größe generieren. Die Zellumrisse müssen so exakt wie möglich zur Kraftberechnung bekannt sein. Denn Deformationen des Gels, die nicht direkt unterhalb der Zelle liegen, werden ebenfalls durch die Zelle verursacht. Würde man die Geldeformation außerhalb des Zellumrisses nicht in die Kraftberechnung einbeziehen wären die Kräfte zu niedrig, würde der Zellumriss automatisch über die Verschiebung der Fluoreszenzmarker erfasst, würde die Zelle als zu groß angenommen und die von der Zelle generierten Zugkräfte (in Einheiten Kraft pro Fläche) wären ebenfalls zu niedrig. Falls der Zellumriss als zu klein angegeben wird, werden die Kräfte, die von den äußeren Zellflächen generiert werden, der Fläche innerhalb des angegebenen Zellumrisses zugeschrieben und somit ist die Zugkraft letztlich zu groß. Wird der Zellumriss zu groß angegeben, ist letztendlich die berechnete Zugkraft zu klein.

Die Zellumrisse wurden in Image-Pro plus 4.1 (Media Cybernetics) gezeichnet und mit Hilfe eines Makros exportiert.

2.6.3 Ursprungsknoten der Kraftvektoren

Die Zelle, also die Fläche innerhalb des erstellten Zellumrisses, wird für die weiteren Berechnungen in 100 bis 2000 Unterregionen geteilt. Dies geschieht, indem ein großzügiges Rechteck, das die Zelle um 30% umragt, gezeichnet wird. Das Rechteck wird anschließend in vier gleich große Teile geteilt und die vier entstehenden Rechtecke werden dann wiederum geviertelt. Rechtecke, die vollständig außerhalb der Zellgrenze liegen, werden nicht weiter beachtet. Vierecke, die die Zellgrenze schneiden, werden durch Verformung von beiden Seiten an diese angepasst. Die Vierecke werden nun weiter geviertelt und Zellgrenzen angepasst bis die eingestellte Anzahl an Knotenpunkten erreicht ist. In einem letzten Schritt werden gegebenenfalls die Ränder der Vierecke noch manuell an die Zellgrenze angepasst. Die entstandenen Schnittpunkte der Vierecke, die Knotenpunkte des entstandenen Gitters dienen im Folgenden als Ursprung für die Kraftvektoren.

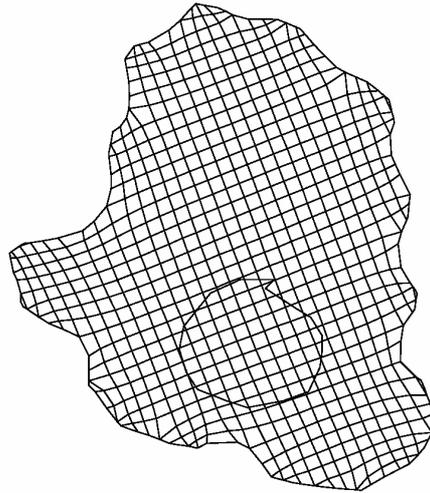


Abbildung 20. Ursprung der Kraftvektoren. Die Zellfläche wird in kleine Rechtecke unterteilt, die an die Zellgrenze angepasst werden. Jeder Knotenpunkt dient als Ursprungspunkt für die zu berechnenden Kraftvektoren.

2.6.4 Berechnung der Kraftvektoren für jeden Knotenpunkt

Mit der erstellten Deformationsmatrix kann im Folgenden das wahrscheinlichste verursachende Kraftfeld berechnet werden. Vor der eigentlichen Formulierung des Problems stellt sich allerdings die Frage, ob ein zwei- oder drei-dimensionales Problem vorliegt. Da die Zellen flach auf dem Gel angewachsen sind, keine äußeren (also nicht durch die Zelle verursachten) Kräfte wirken und von der Zelle generierte Zugkräfte hauptsächlich in der Ebene Ihres Substrates auftreten sollten, ist man verleitet, ein zwei-dimensionales Problem anzunehmen. Allerdings ist zu bedenken, dass bei einer Fokustiefe des verwendeten Mikroskopsystems von $5\ \mu\text{m}$ durchaus eine drei-dimensionale Komponente vorliegt. Bei Fokussierung auf die oberste Ebene der Fluoreszenzmarker, die die Geloberfläche repräsentiert, nimmt man auch die unteren $2,5\ \mu\text{m}$ der Zelle, die aber nicht autofluoresziert, also nicht auf den Bildern zu sehen ist, auf. Man nimmt aber auch Fluoreszenzmarker in bis zu $2,5\ \mu\text{m}$ Tiefe des Geles auf. Eine detaillierte Begründung warum ein solches Problem doch zwei-dimensional behandelt werden darf (plane stress approximation), findet man in Landau-Lifshitz⁵⁴.

Im Folgenden wird der Algorithmus zur Zugkraftberechnung skizziert. Die hier vorgestellten Formeln müssen, um mit numerischen Verfahren Lösungen zu liefern, teilweise umformuliert werden.

In kartesischen Koordinaten (x_1, x_2, x_3) sei eine isotrope, elastische Membran (in unserem Fall das Polyacrylamidgel) mit ihrem Zentrum in der Ebene $x_3 = 0$. Für ein

allgemeines Zugkraftproblem seien $\sigma_{\alpha\beta}$ Komponenten des Spannungstensors (stress tensor), T_α die Komponenten der von der Zelle applizierten Zugkraft und h die Dicke der verformten Membran. $\alpha, \beta = 1, 2, 3$ sind die Richtungen. Dann gilt im Spannungsgleichgewicht

$$h(\partial_1 \sigma_{\alpha 1} + \partial_2 \sigma_{\alpha 2}) + T_\alpha = 0. \quad (7)$$

Durch die von der Zelle verursachte Verformung wird ein Punkt bei $x = (x_1, x_2)$ auf dem elastischen Substrat nach Applikation einer Kraft bei $x' = x + d$ gefunden, wobei d dann der, durch die Kraft verursachte Verschiebungsvektor ist.

Mit dem kartesischen Verzerrungstensor

$$\varepsilon_{\alpha\beta} \equiv 0,5(\partial_\alpha d_\beta + \partial_\beta d_\alpha) \quad (8)$$

ergibt sich aus dem dreidimensionalen Hooke Gesetz unter Beachtung, dass es sich lediglich um ein zwei-dimensionales Problem handelt, die folgende Beziehung zwischen Spannung (stress) und Dehnung (strain):

$$\sigma_{\alpha\beta} = \frac{E}{(1+\nu)} \varepsilon_{\alpha\beta} + \frac{E\nu(\varepsilon_{11} + \varepsilon_{22})}{(1-\nu^2)} \delta_{\alpha\beta} + \bar{\sigma} \delta_{\alpha\beta} \quad (9)$$

Hierbei sind die Konstanten ν das Poission ration, E das Young's modulus und $\bar{\sigma}$ der Grad der Vorspannung. δ ist das Kronecker-Delta, welches für $\alpha = \beta$; $\delta = 1$, sonst $\delta = 0$.

Einsetzen in (7) liefert gekoppelte Differentialgleichungen 2. Ordnung für die Mittelschicht des Substrates.

$$\begin{aligned} \frac{E_s}{1-\nu^2} \partial_1 \partial_1 d_1 + \frac{E_s}{2(1+\nu)} \partial_2 \partial_2 d_1 + \frac{E_s}{2(1-\nu)} \partial_1 \partial_2 d_2 &= -T_1 \\ \frac{E_s}{1-\nu^2} \partial_2 \partial_2 d_2 + \frac{E_s}{1(1+\nu)} \partial_1 \partial_1 d_2 + \frac{E_s}{2(1-\nu)} \partial_2 \partial_1 d_1 &= -T_2 \end{aligned} \quad (10)$$

Dabei ist $E_s = Eh$ das Oberflächen - Young's Modul. Durch Lösen dieser Gleichungen bekäme man direkt das gesuchte Kraftfeld T . Diese gekoppelten Differentialgleichungen 2. Ordnung sind aber analytisch nicht lösbar. Bei der hier vorgestellten Methode zur numerischen Lösungsfindung wird das zu lösende Problem zuerst in ein Rückwärtsproblem umgewandelt und die Lösung iterativ bestimmt.

Für bestimmte Randbedingungen und Kraftverteilungen existieren für diese Differentialgleichungen elegante Lösungen für die Verschiebefunktion der Fluoreszenzmarker. Für ein unendlich dickes Substrat und große Verschiebungen kann dann das Verschiebefeld als Oberflächenintegral ausgedrückt werden¹⁰⁴:

$$d_{p\alpha} = \iint g_{\beta\alpha}(m_p - r) T_\beta(r) dr_1 dr_2 \quad (11)$$

Hierbei bleibt d die Verschiebung eines Fluoreszenzmarkers am Knotenpunkt p und T das wirkende Kraftfeld. Die Richtungen α, β nehmen die Werte 1, 2, 3 an. $g_{\beta\alpha}(m_p - r)$ sind die Koeffizienten des Green'schen Tensors. Sie beschreiben die Deformation des Substrates am Punkt m in Richtung α , verursacht durch eine Kraft am Punkt r in Richtung β .

Verschiebungen der Fluoreszenzmarker im Gel sind in der Regel geringer als $1 \mu\text{m}$ und sind gegenüber der Geldicke von $70 \mu\text{m}$ klein. Der Green'sche Tensor kann in diesem Fall, das Gel im Vergleich zu den Verschiebungen der Fluoreszenzmarker als unendlich dickes Substrat angenommen, nach der Theorie über elastische Festkörper im Halbraum von Boussinesq (1895) angenähert werden⁵⁴:

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

$$\begin{aligned}
g_{22} &= \frac{1+\nu}{2\pi E} \left(\frac{(2r(1-\nu) - x_3)}{r(r-x_3)} + \frac{(2r(\nu-x_3) + x_3^2)x_2^2}{r^3(r-x_3)^2} \right) \\
g_{32} &= \frac{1+\nu}{2\pi E} \left(\frac{x_2x_3}{r^3} + \frac{(1-2\nu)x_2}{r(r-x_3)} \right) \\
g_{13} &= \frac{1+\nu}{2\pi E} \left(\frac{x_1x_3}{r^3} + \frac{(1-2\nu)x_1}{r(r-x_3)} \right) \\
g_{23} &= \frac{1+\nu}{2\pi E} \left(\frac{x_2x_3}{r^3} + \frac{(1-2\nu)x_2}{r(r-x_3)} \right) \\
g_{33} &= \frac{1+\nu}{2\pi E} \left(\frac{2(1-\nu)}{r} + \frac{x_3^2}{r^3} \right)
\end{aligned} \tag{12}$$

Hierbei ist $r \equiv \sqrt{x_1^2 + x_2^2 + x_3^2}$ der Betrag des kartesischen Vektors $x \equiv (x_1, x_2, x_3)$, E das Young's Modul und ν die Poisson Zahl.

Die Verschiebung ist also mit dem Integral (11) bei bekannter Zugkraftverteilung T zu lösen. Dieses Vorwärtsproblem stellt aber nicht das zu lösende Problem dar, da die Zugkraftverteilung T gesucht ist, während die Verschiebung ja als Deformationsmatrix bereits bekannt ist. Die Formulierung als Vorwärtsproblem (10) war aber nicht lösbar. Das zu lösende Problem wurde also in ein im Folgenden beschriebenes numerisch lösbares Rückwärtsproblem umgewandelt.

Dabei wird als erster Schritt das unbekannte Zugkraftfeld T geschätzt, danach das Oberflächenintegral (11) berechnet und abgeschätzt, wie wahrscheinlich die durch das geschätzte Feld T verursachten Deformationen mit den tatsächlich gemessenen Deformationen übereinstimmen.

Es gelten die Nebenbedingungen:

$$T(r) = 0 \text{ für } r \notin \Omega, \tag{13}$$

wenn Ω die Kontaktfläche zwischen Zelle und Substrat ist. Alle auftretenden Kräfte werden also von der Zelle generiert.

$$F = \int T(r) dr \stackrel{!}{=} 0 \quad (14)$$

Da keine äußeren Kräfte wirken, muss die Summe aller Kräfte nach dem dritten Newton'schen Axiom null ergeben.

$$\Phi = \int r \times T(r) dr \stackrel{!}{=} 0 \quad (15)$$

Ebenso muss das Moment null sein.

Mit diesen Nebenbedingungen werden die Kraftvektorenkomponenten für die innerhalb des Zellumrisses liegenden Knoten $k = 1, 2, 3 \dots N$ abgeschätzt als:

$$T_\beta(r) \approx T_{k\beta} H_k(r) \quad (16)$$

H_k ist dabei eine standard-bilineare Umrissfunktion und die $T_{k\beta}$ sind die Zugkraftkomponenten in Richtungen β am Knoten k . Einsetzen von Gleichung (16) in Gleichung (11) liefert:

$$d_{p\alpha} = d_\alpha(m_p) = T_{k\beta} \iint g_{\alpha\beta}(m_p - r) H_k(r) dr_1 dr_2 \quad (17)$$

Da die Verschiebung nur linear von der applizierten Kraft abhängt, kann man (17) auch so schreiben:

$$d_{p\alpha} = d_\alpha(m_p) = T_{k\beta} \iint g_{\alpha\beta}(m_p - r) H_k(r) dr_1 dr_2 = A_{k\beta p \alpha} T_{k\beta} \quad (18)$$

Dabei ist A nur abhängig von der Geometrie der Knotenpunkte und den Materialeigenschaften des Substrates. p läuft von $p = 1, 2, 3 \dots N$ über alle Punkte m der Deformationsmatrix.

Zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit, in wie weit die berechnete und experimentelle Deformation übereinstimmen, wird ein χ^2 -Quadrat-Test durchgeführt.

$$\chi^2 \equiv \sum_{p=1}^{N_p} \|d_p^{\text{exp}} - d_p^{\text{theo}}\| \leq \chi_{\text{crit}}^2 \quad (19)$$

Hierzu schreibt man

$$\chi^2 \equiv (d_{p\alpha}^{\text{exp}} - d_{p\alpha})^2 \sigma_{p\alpha}^{-2} = (d_{p\alpha}^{\text{exp}} - A_{k\beta p\alpha} T_{k\beta})^2 \sigma_{p\alpha}^{-2} . \quad (20)$$

d^{exp} entspricht der experimentellen Verschiebung und $\sigma_{p\alpha}$ dem entsprechenden Fehler zwischen berechneter und experimenteller Verschiebung.

Die Komplexität eines solchen Kraftvektorbildes wird bestimmt durch:

$$\varphi^2 \equiv \int_{\Omega} (\delta_{\alpha} T_{\beta} + \delta_{\beta} T_{\alpha}) (\delta_{\alpha} T_{\beta} + \delta_{\beta} T_{\alpha}) dr_1 dr_2 \quad (21)$$

Durch Ersetzen aus (16) und Integration erhält man:

$$\varphi^2 = C_{i\alpha j\beta} T_{i\alpha} T_{j\beta} \quad (22)$$

Hier ist C nur noch von der Geometrie des Knotennetzes abhängig. Fasst man (20) und (22) zusammen, kann man mit der Gleichung von Bayes die Wahrscheinlichkeit für $T_{k\beta}$ bestimmen.

$$L_B(T_{k\beta} | d_{p\alpha}^{\text{exp}}) = \exp[-(\chi^2 + \lambda \varphi^2)] \quad (23)$$

Lambda ist eine positive reelle Zahl und wird nach den Kriterien der maximalen Entropie bestimmt. Um die Wahrscheinlichkeit L für die T zu maximieren muss $\chi^2 + \lambda \varphi^2$ minimiert werden. Einsetzen solcher T mit maximaler Wahrscheinlichkeit in (20) und (22) liefert χ^2 und φ^2 . Variation von λ führt unter der Bedingung, dass die Wahrscheinlichkeit L maximal ist, zu Variation von χ^2 und φ^2 . Bei steigendem λ steigt χ^2 und φ^2 fällt. χ^2 wird gewöhnlich nicht mehr akzeptierbar genannt, wenn

$\chi^2 > N_p + \sqrt{N_p}$. Das Vektorbild für $\chi^2 \approx N_p + \sqrt{N_p}$ ist dann das Kraftfeld mit minimierter Komplexität, das mit den experimentellen Daten vereinbar ist.

Die hier vorgestellten Formeln dienen der Erklärung der Lösungsfindung, müssen aber, um die Lösungen mit numerischen Verfahren zu erhalten, noch umformuliert werden. So werden die zu berechnenden Integrale mit Hilfe der Gauß-Quadratur bestimmt, der χ^2 -Quadrat-Test wird in seiner diskreten Form benutzt und zur Wahrscheinlichkeitsberechnung wird die angegebene Formel über Logarithmieren und Differenzieren in ein lineares Gleichungssystem überführt.

→ 1.91E+04[DYN/CMSQ] |——| 1.15E-03[CM]

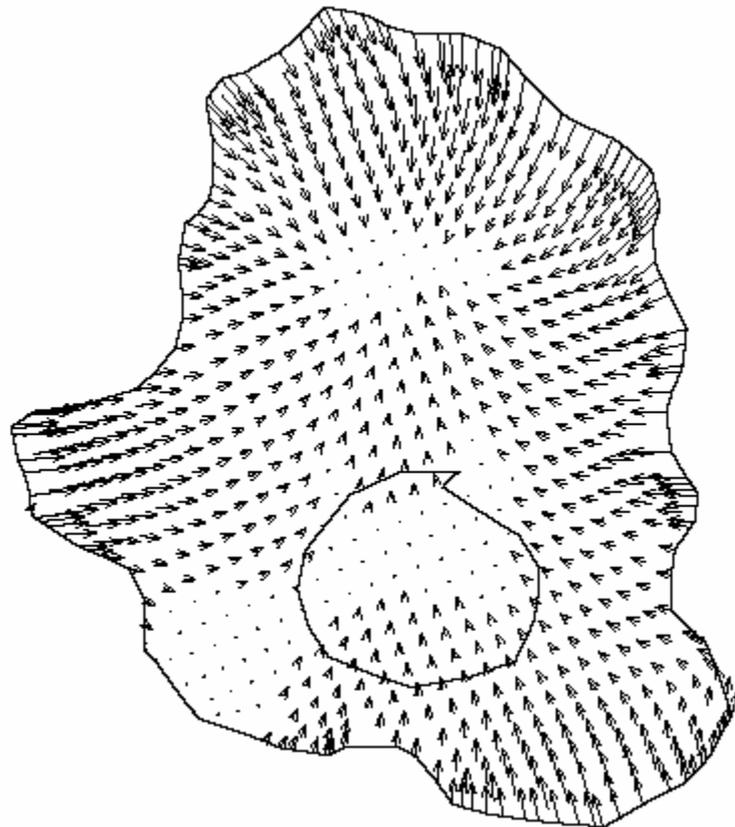


Abbildung 21. Kraftvektorkarte. Typische Kraftvektorkarte wie sie aus der Deformationsmatrix berechnet wird.

Die so in einem ersten Schritt ermittelten Kraftvektoren werden nun mit der Bootstrap-Methode³⁰ iterativ den tatsächlichen Kraftvektoren angenähert²². Grundidee der Methode ist es, zu der errechneten Kraftvektorverteilung ein Rauschen hinzuzufügen, das Oberflächenintegral (11) zu lösen und mit der so gewonnenen Verschiebefunktion, also einer errechneten Deformationsmatrix den Programmalgorithmus erneut zu

durchlaufen und sich dabei an die wahrscheinlichste Kraftvektorverteilung schrittweise anzunähern.

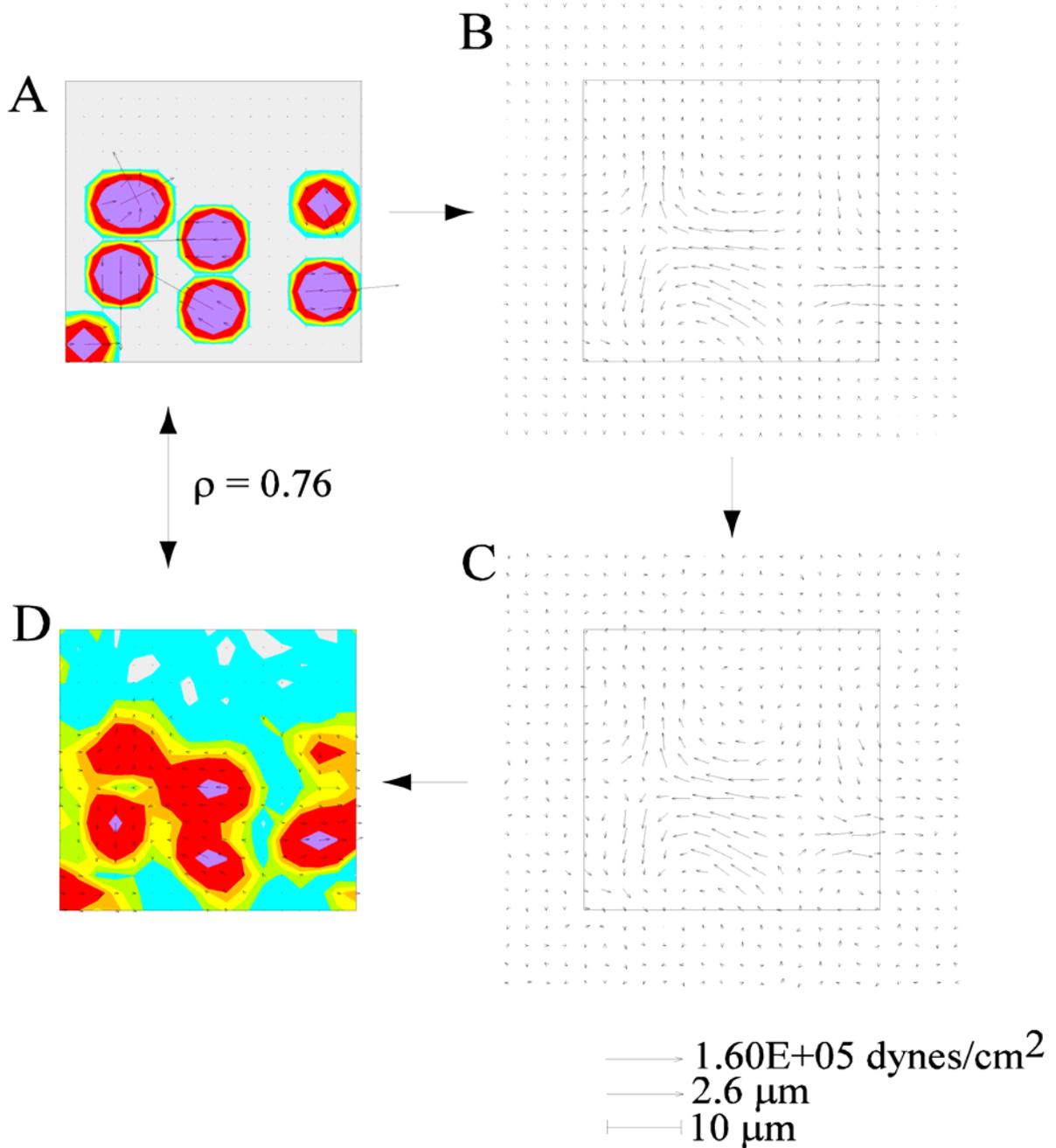


Abbildung 22. Illustration der Bootstrapping-Methode (stark vereinfacht). A ist eine theoretische Kraftverteilung, die dem Ergebnis eines im ersten Durchgang ausgewerteten Versuches entspricht. Mit Gleichung (11) wird aus dem Kraftvektorfeld die Verschiebefunktion, also die Deformationsmatrix, berechnet (B). Von B nach C wird nun ein Rauschen hinzugefügt. Dies erkennt man an den etwas weniger geordneten Deformationsvektoren in C im Vergleich zu B. Anschließend wird der Programmalgorithmus zur Berechnung der Kraftvektoren aus der Deformationsmatrix durchlaufen und es entsteht D. Anschließend werden die Kraftvektoren in A und D verglichen und mit der angepassten neuen Kraftvektorverteilung wird der Zyklus erneut durchlaufen. (mit freundlicher Genehmigung von M. Dembo)

Die Bootstrap-Methode ist eine sequenzielle Monte-carlo-Methode und dient der Zustandschätzung in dynamischen Prozessen. Sie wird wie in diesem Fall erfolgreich benutzt, um ein Bays'sches Modell abzuschätzen und wird im allgemeinen häufig zum Abgleich beim Verfolgen von bewegten Objekten (tracking) benutzt.

2.7 Statistik

Mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Gruppen werden Mittelwerte vor und nach Stimulation auf Signifikanzunterschiede geprüft. Es werden signifikante Unterschiede für $p < 0.05$ angenommen.

2.8 Graphen

Um die Zugkräfte vor und nach Stimulation graphisch darzustellen, werden Balkendiagramme erstellt. Die Daten werden als Mittelwertvergleich der absoluten Zugkräfte vor und nach Stimulation präsentiert.

Vergleicht man die Zugkräfte verschiedener Zellen, stellt man fest, dass diese sehr unterschiedlich sind. Eine Gruppe von Zugkräften verschiedener Zellen ist nicht normalverteilt, während die Zugkräfte einer einzelnen Zelle dies in der Regel sind. Um das Verhalten verschiedener Zellen miteinander vergleichen zu können, wurden deshalb die Zugkräfte jeder Zelle auf ihren Mittelwert vor Stimulation normiert. Die Darstellung der Zugkräfte mehrerer Zellen vor und nach Stimulation erfolgt in diesen Fällen also als Mittelwerte der normierten Daten.

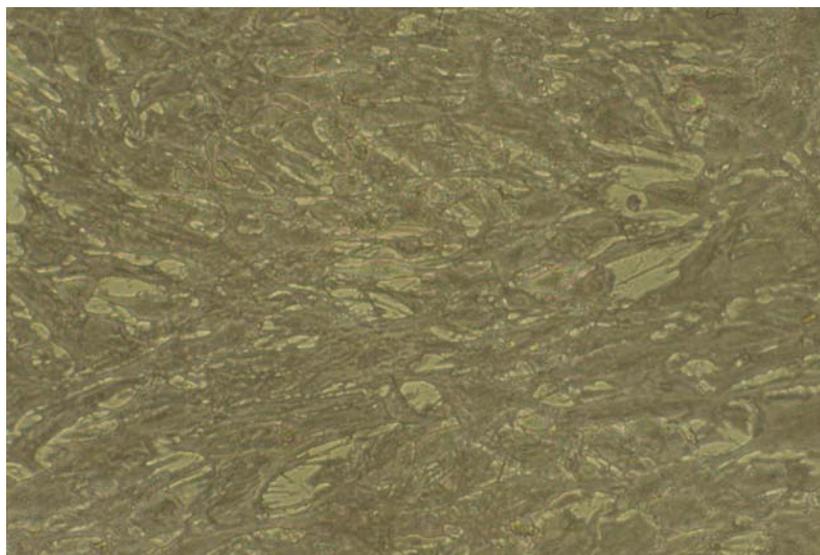
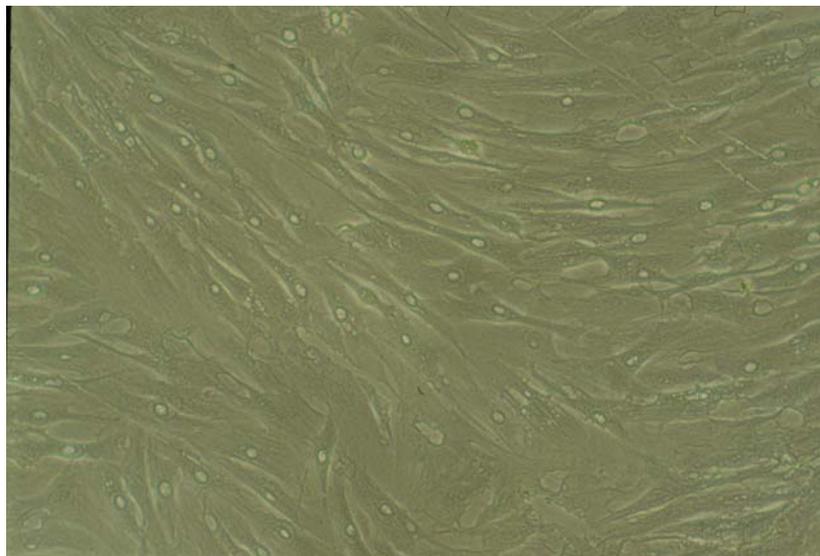
3 Ergebnisse

3.1 Phänotypisierung primärer Osteoblasten

Als Teil der vollständigen Phänotypisierung der Zellcharge²⁹ wurden Zellen immunzytochemisch auf Osteocalcin untersucht und PTH-Stimulations-Experimente und MTT-Tests durchgeführt.

3.1.1 Immunzytochemischer Osteocalcinnachweis

In den Zellen wurde immunzytochemisch das osteoblastenspezifische Protein Osteocalcin nachgewiesen (s. braune Färbung, Abb. 23 unten). Durch eine FACS-Analyse (von Weng Tan durchgeführt) konnte dies bestätigt werden.



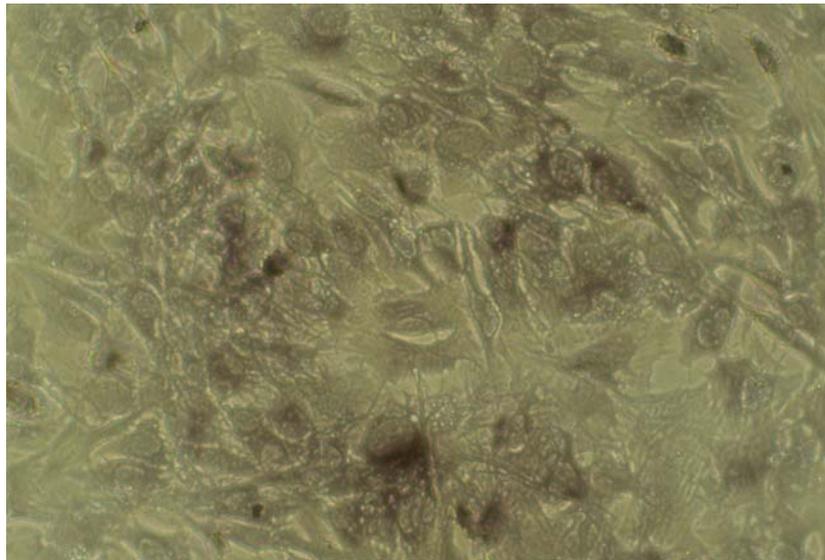
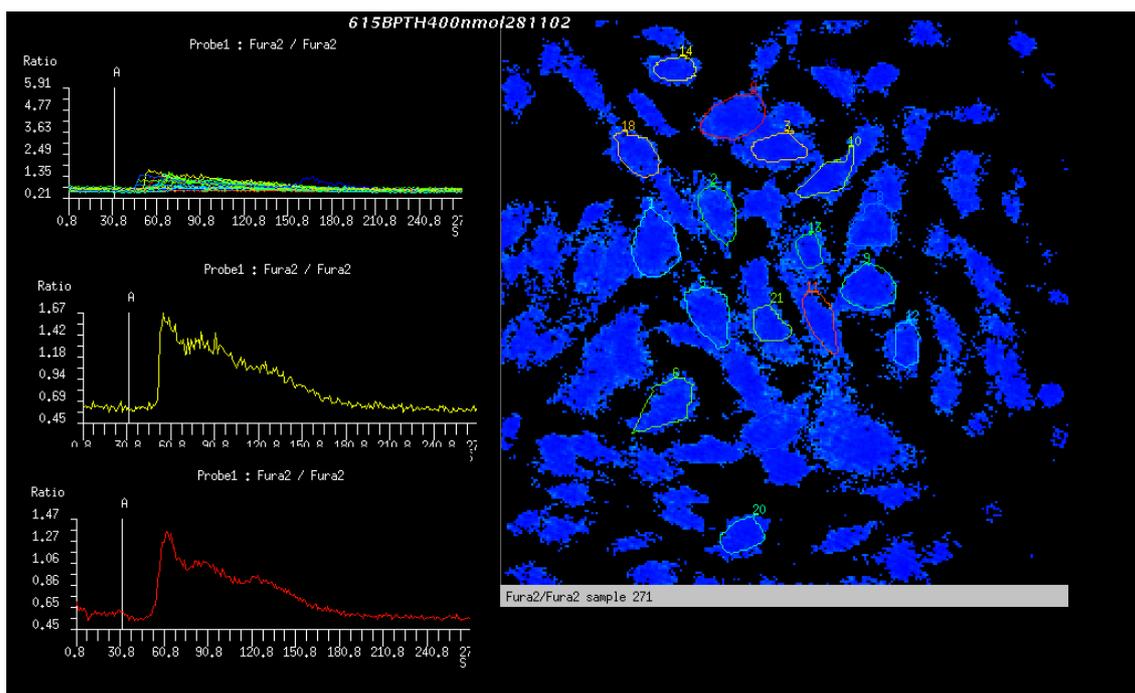


Abbildung 23. Immunzytochemischer Osteocalcin-Nachweis. Oben: Negativkontrolle mit Mausserum, Mitte: Positivkontrolle mit primärem Vimentin-Antikörper. Unten: positiver Osteocalcin-Nachweis.

3.1.2 PTH-Stimulation

Nach PTH-Stimulation ist bei 94,4% der Zellen der verwendeten Charge ein intrazellulärer Calciumanstieg zu beobachten. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass durch PTH-Stimulation verursachte intrazelluläre Calciumerhöhungen, sich teilweise mittels gap-junctions ausbreiten.



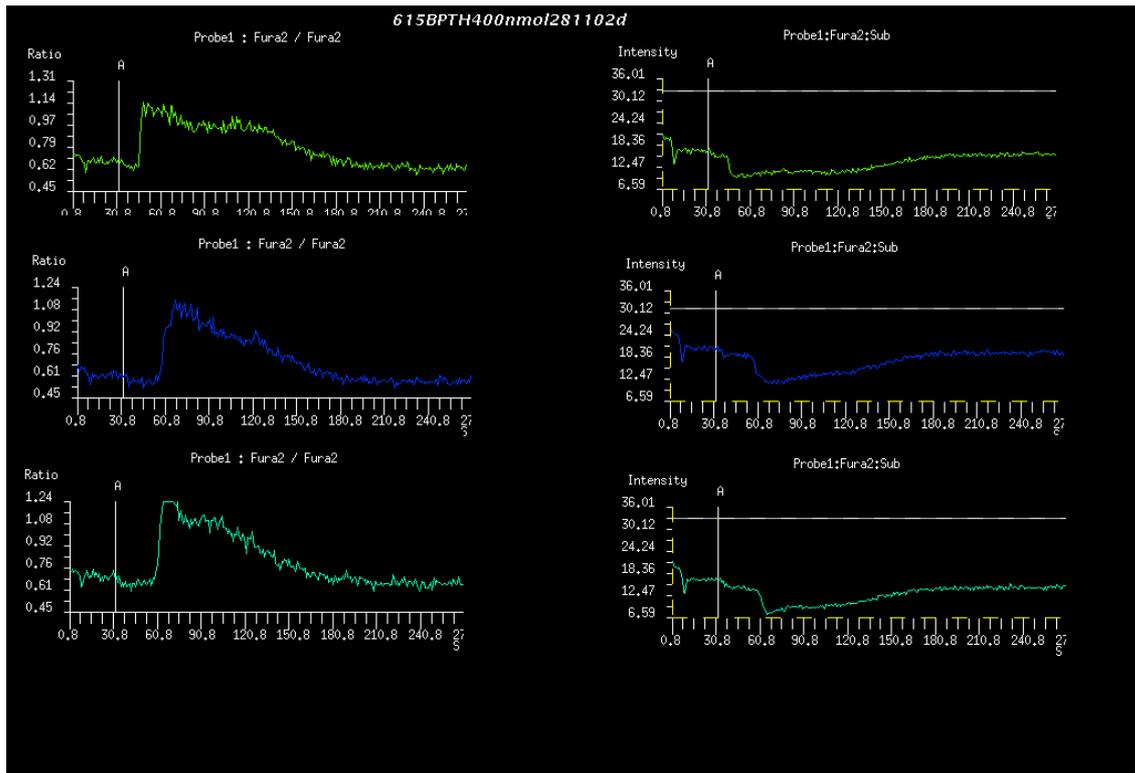


Abbildung 24. PTH-Stimulations-Experimente zur Phänotypisierung der Zellen. Nach PTH-Zugabe kommt es in Osteoblasten zu intrazellulären Calciumanstiegen.

3.1.3 MTT-Test

Der MTT-Test zeigte eine signifikante Aktivitätssteigerung nach zwei Dehnungszyklen von 19,6% \pm 4,8% (n=6) gegenüber der Kontrollgruppe. Dehnung führt also zur Aktivitätssteigerung der Zellkultur, die ein Indikator für eine vermehrte Zellproliferation in den gedehnten Kulturen ist.

3.2 Dehnungsversuche

3.2.1 Zugkräfte vor und nach Dehnung

In dieser Versuchsreihe wurden die Zugkräfte von 17 Zellen nach Dehnung mit denen vor Dehnung verglichen.

Die Kräfte, die einzelne Zellen auf ihr Substrat ausüben, schwanken extrem. So wurden durchschnittliche Zugkräfte pro Zelle und Zeitpunkt zwischen 113 dyn/cm² und 8946 dyn/cm² gefunden. Die Zugkräfte einer einzelnen Zelle dagegen schwanken während des Beobachtungszeitraumes (zwei Minuten) wenig.

Vor Stimulation findet man einen Median von 1306 dyn/cm² (3.Quartil 3677 dyn/cm², 1.Quartil 456 dyn/cm²), nach Stimulation einen Median von 1386 dyn/cm² (3.Quartil 4416 dyn/cm², 1.Quartil 630 dyn/cm²). Der Wilcoxon-Test für nicht normalverteilte

Daten für abhängige Gruppen zeigt, dass sich die absoluten Zugkräfte vor und nach Dehnung nicht unterscheiden.

Durch die erheblichen Unterschiede in den Zugkräften verschiedener Zellen bereits vor Stimulation ist es jedoch sinnvoll, nicht die absoluten Differenzen der Zugkräfte vor und nach Stimulation zu analysieren, sondern zunächst die Zugkräfte einer jeden Zelle auf ihren Mittelwert vor Stimulation zu normieren. Dadurch werden die Zugkraftänderungen aller Zellen unabhängig von deren absoluten Höhen gleich gewichtet. Vergleicht man dann die normierten Zugkräfte aller Zellen vor und nach Dehnung, findet man eine Erhöhung der Zugkräfte nach Dehnung um über 100%. Dies bedeutet, dass Zellen unabhängig von ihren absoluten Zugkräften, diese nach Dehnung durchschnittlich mehr als verdoppeln.

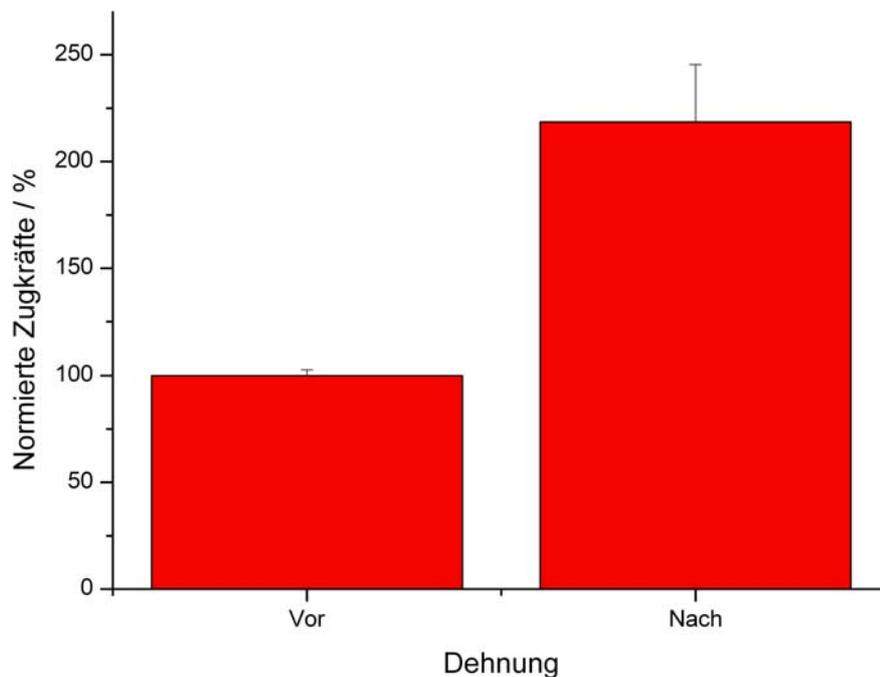


Abbildung 25. Normierte Zugkräfte vor und nach Dehnung. Die Zugkräfte einer jeden Zelle wurden auf ihren Mittelwert vor Dehnung normiert. Die Zellen generieren nach Dehnung um 119% erhöhte Zugkräfte.

3.2.2 Analyse der Reaktionstypen

Bei der Zugkraftanalyse einzelner Zellen zeigt sich, dass die getesteten Osteoblasten unterschiedlich auf den ausgeübten Stimulus reagieren. Die statistische Untersuchung der Zugkräfte einzelner Zellen zeigt, dass 82% der Zellen (14/17) signifikante Unterschiede in ihren Zugkräften nach Stimulation aufweisen. Diese Zellen können in

zwei Gruppen unterteilt werden, nämlich in eine Gruppe, die nach Stimulation signifikant höhere Zugkräfte und in eine Gruppe, die nach Stimulation signifikant niedrigere Zugkräfte generiert.

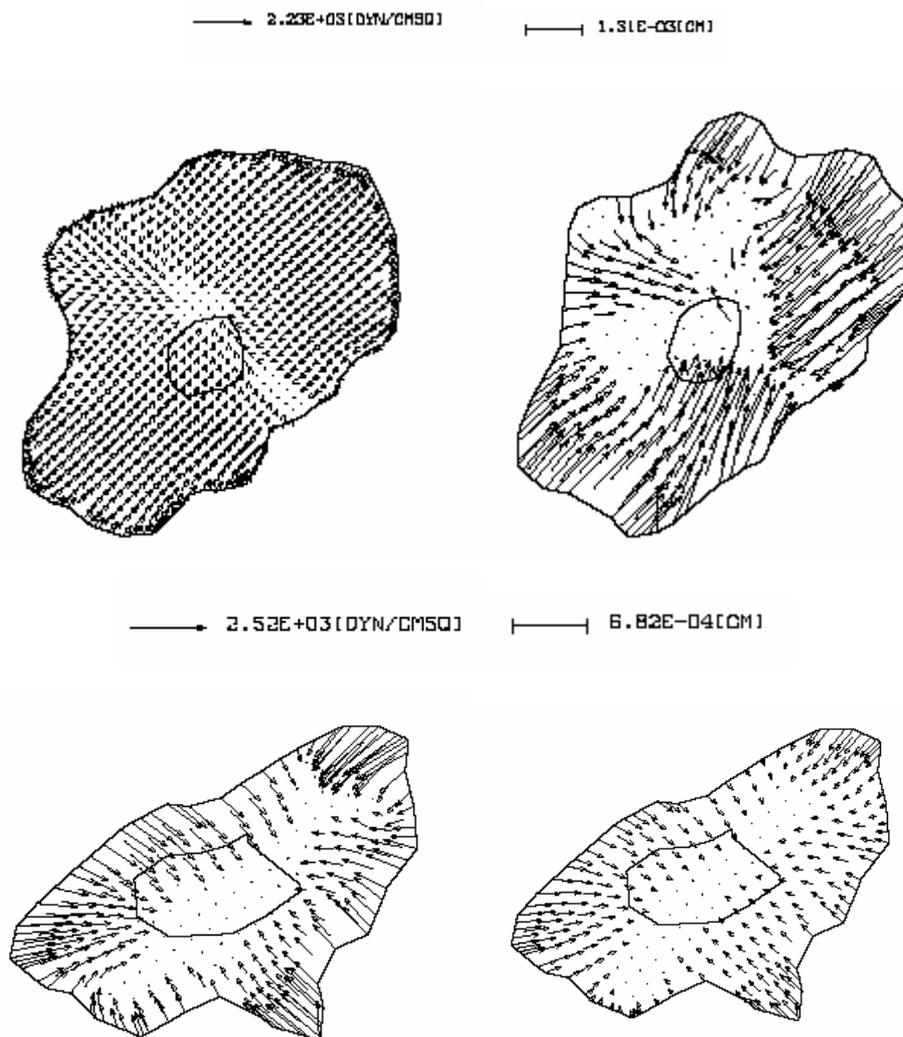


Abbildung 26. Beispielzellen mit nach Dehnung erhöhten und erniedrigten Zugkräften. Oben: Zelle mit erhöhten Zugkräften, links vor Dehnung, rechts nach Dehnung. Unten: Zelle mit erniedrigten Zugkräften, links vor Dehnung, rechts nach Dehnung.

Die Zellen verteilen sich also auf drei Gruppen (s. Abb. 27): Eine Gruppe, die keine signifikanten Unterschiede in ihren traction Forces zeigt (n=3), eine Gruppe, die nach Stimulation signifikant höhere Zugkräfte aufweist (n=7) und eine Gruppe von sieben Zellen, die nach Stimulation signifikant niedrigere Zugkräfte aufweist (n=7).

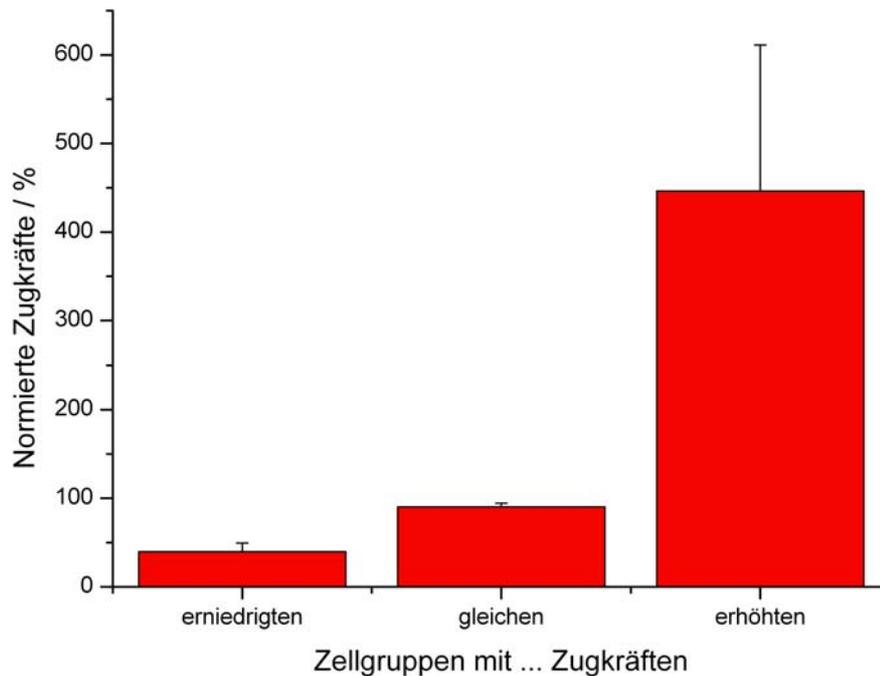


Abbildung 27. Mittlere normierte Zugkräfte der Zellen nach Gruppen. Alle Zellen, die nach Dehnung signifikant niedrigere Zugkräfte generieren sind in der Gruppe „mit erniedrigten Zugkräften“, alle Zellen mit signifikant erhöhten Zugkräften in der Gruppe „mit erhöhten Zugkräften“ zusammengefasst. Die Gruppe „mit gleichen Zugkräften“ vor und nach Dehnung bildet sich aus den Zellen, deren Zugkräfte sich vor und nach Dehnung nicht signifikant änderten.

Die Zugkräfte verschiedener Zellen sind sehr unterschiedlich. Um das Ausmaß der Änderung der Zugkräfte zu vergleichen, wurden daher die Kräfte einer jeden Zelle auf die durchschnittliche Zugkraft der Zelle vor Stimulation normiert. Man findet in der Zellgruppe mit erhöhten Zugkräften eine durchschnittliche Erhöhung nach Stimulation auf 446% der durchschnittlichen Zugkräfte vor Stimulation. Die Zellen zeigen dabei eine große Streuung der Zugkraft-Erhöhung (+19% bis +1285%). Ebenso zeigen die Zellen, die eine signifikante Erniedrigung ihrer Zugkräfte erfahren haben, eine Breite Streuung in ihrer Erniedrigung (-28% bis -80%) mit einem Mittel nach Dehnungsstimulation auf 40% der Zugkräfte vor Stimulation.

Dennoch wird insgesamt deutlich, dass das Ausmaß der relativen Zugkrafteerhöhung das Ausmaß der Zugkrafterniedrigung um ein Vielfaches übersteigt und somit zu einem deutlichen Kraftanstieg in der Gesamtgruppe der Zellen führt.

Untersucht man nun exploratorisch die Zellen in ihren Gruppen findet man, dass die Zellen, die ihre Zugkräfte nach Stimulation erhöhen, vor Stimulation deutlich niedrigere Zugkräfte aufweisen als in den anderen Gruppen. Entsprechend findet man, dass Zellen,

die ihre Zugkräfte nach Stimulation erniedrigen, vor Stimulation höhere Zugkräfte aufweisen. Die vor Stimulation gemessenen Zugkräfte erlauben also eine gewisse Voraussage, wie sich die Zugkräfte der Osteoblasten nach Dehnung entwickeln. Die Gruppe der Zellen, die keine signifikanten Unterschiede ihrer Zugkräfte nach Stimulation aufweist, hatte vor und nach Stimulation die höchsten Zugkräfte.

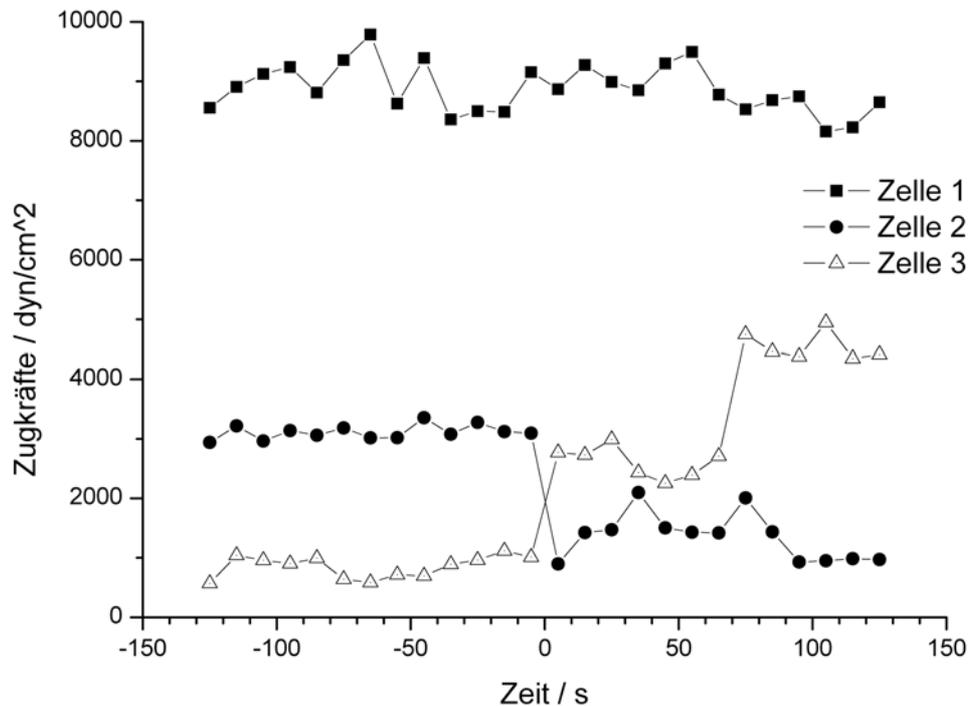


Abbildung 28, Absolute Zugkräfte dreier Zellen über die Zeit. Die Dehnungsstimulation erfolgte bei null Sekunden. Zelle 1 weist sehr hohe Zugkräfte auf und ändert ihre Zugkräfte nach Dehnung nicht. Zelle 2 generiert vor Dehnung hohe Zugkräfte und nach Dehnung deutlich niedrigere während Zelle 3 ihre Zugkräfte nach Dehnung deutlich erhöht.

Die soweit vorgestellten Daten werfen die Frage auf, ob die Höhe der Zugkräfte nach Dehnung voraussagbar ist, wenn man die Zugkräfte vor Dehnung kennt. Hierzu sind die Zugkräfte nach Dehnung über denen vor Dehnung aufgetragen. Einige Zellen mit sehr geringen Zugkräften vor Dehnung generieren deutlich höhere Zugkräfte nach Dehnung und Zellen, die vor Dehnung hohe Zugkräfte aufweisen, reduzieren diese nach Dehnung auf etwa 1000 dyn/cm².

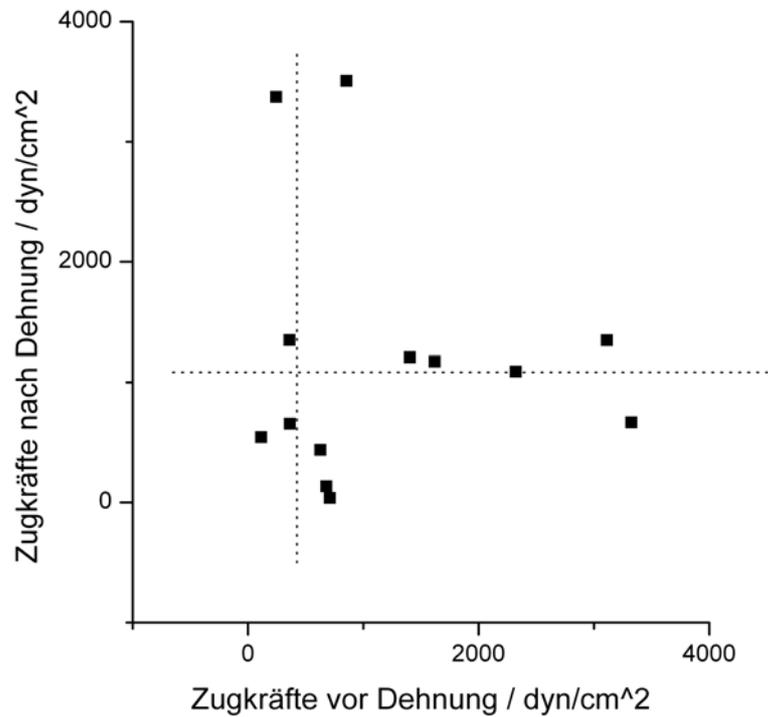


Abbildung 29. Zugkräfte vor und nach Dehnung im Überblick. Jeder Punkt in diesem Ausschnitt repräsentiert eine Zelle.

3.2.3 Zeitaufgelöste Analyse

Die zellulären Adhäsionskräfte einzelner Zellen ändern sich nach Dehnung. Zur genaueren Untersuchung dieses Phänomens wurden die Zugkräfte für zwei Minuten nach Dehnung alle zehn Sekunden bestimmt. Es zeigt sich, dass nach Dehnung starke Veränderungen der Zugkräfte auftreten. So zeigt die erste Momentaufnahme nach Dehnung die stärksten Zugkraft-Änderungen. Aber auch im weiteren Verlauf nach Dehnung weisen Zellen, die erhöhte Zugkräfte nach Stimulation auf ihr Substrat ausüben, eine im Vergleich zur Kontrollphase höhere Variabilität in den Zugkräften auf.

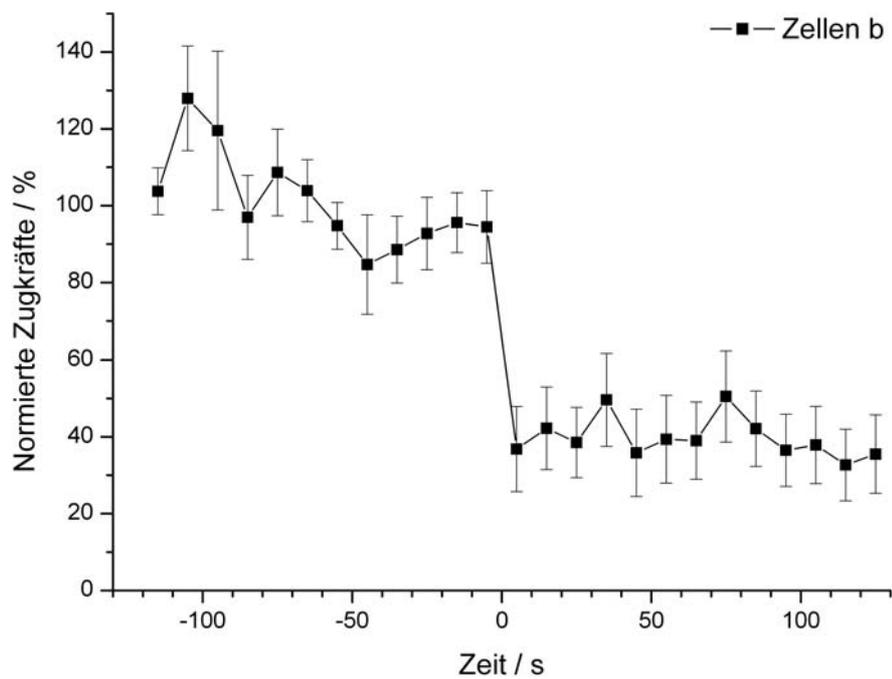
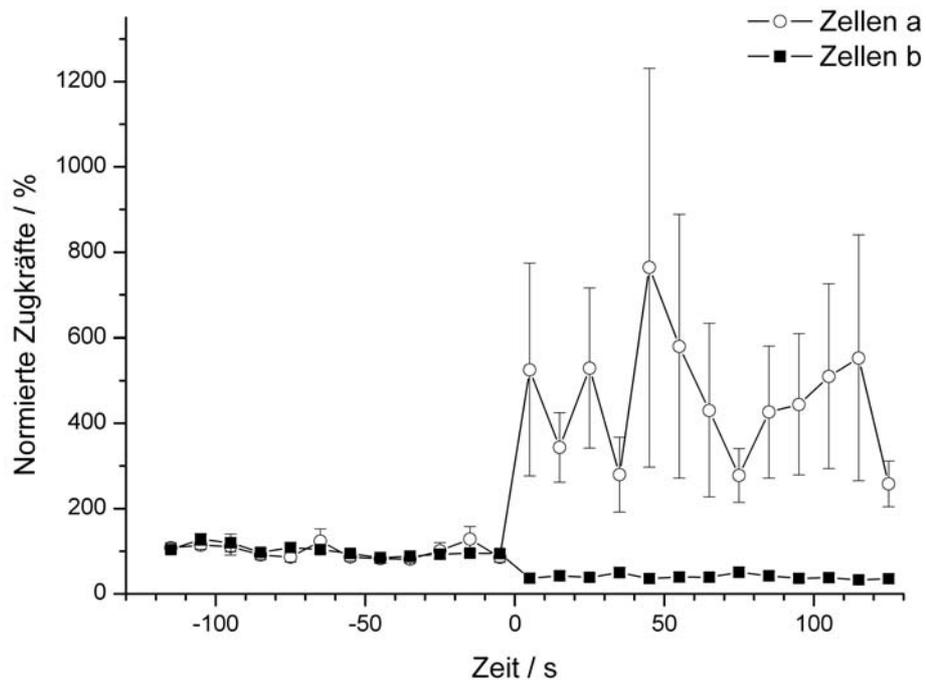


Abbildung 30. Normierte Zugkräfte über Zeit. Die Dehnung erfolgte bei null Sekunden. Die Graphen zeigen die Mittelwerte der normierten Zugkräfte über die Zeit. Oben: „Zellen a“ zeigt die Mittelwerte der Zellen mit erhöhten Zugkräften. „Zellen b“ mit erniedrigten. Unten: reskalierte Kurve der Zugkräfte von Zellen mit erniedrigten Zugkräften.

3.2.4 Orientierungsanalyse der Zugkräfte

Die Kraftvektoren der Zellen haben außer dem Betrag auch eine Richtungsinformation. Diese Richtungsinformation oder Orientierung entspricht den gedachten Linien innerhalb der Zellen, an denen die Kräfte wirken.

Für die Orientierungsanalyse wurden die Kraftvektoren in Komponenten parallel und senkrecht zur Dehnungsrichtung zerlegt. Eine Analyse zeigt, dass es den Zellen, die eine signifikante Änderung der Zugkräfte nach Dehnung zeigen, keine signifikanten Unterschiede nach Dehnung in den beiden Kraftkomponenten gibt. Dagegen zeigt die Gruppe der Zellen, die nicht mit signifikanter Zugkraft-Änderung nach Dehnung reagieren, deutlich höhere Kraftkomponenten parallel zur Dehnungsrichtung. Morphologische Besonderheiten konnten im Beobachtungszeitraum damit nicht in Zusammenhang gebracht werden.

Im Falle erniedrigter Kraftkomponenten parallel zur Dehnungsrichtung hätte man ein passives Abreißen der fokalen Kontakte vermuten können. Dies wurde aber nicht beobachtet.

Zellgruppen nach Zugkraftveränderung	Kraftkomponenten im Verhältnis zur Dehnung in dyn/cm ²			
	parallel		senkrecht	
	Vor Dehnung	Nach Dehnung	Vor Dehnung	Nach Dehnung
Alle	2468	2476	2135	2252
Keine	5345	5207	2898	2925
Erhöhte	811	2461	888	2605
Erniedrigte	3457	1282	3579	1520

Abbildung 31. Aufschlüsselung der Kräfte nach ihren Komponenten. Die berechneten Kraftvektoren wurden in zwei rechtwinkelige Komponenten, parallel und senkrecht zur Dehnungsrichtung, zerlegt. Die Kraftkomponenten sind aufgeschlüsselt nach Gruppen und nach vor und nach Dehnung aufgezeigt. Die Kräfte erhöhen oder erniedrigen sich nach Dehnung gleichmäßig in ihren Komponenten. Auffällig ist jedoch, dass Zellen, deren Zugkräfte sich vor und nach Dehnung nicht signifikant unterschieden, deutlich höhere Kraftkomponenten parallel zur Dehnungsrichtung aufwiesen. Dies änderte sich nach Dehnung auch nicht.

3.3 Kraftmikroskopversuche

3.3.1 Zugkräfte nach zyklischer Stimulation

Mit dem in der EOBM (Experimentelle Orthopädie und Biomechanik) im Eigenbau erstellten AFM-basierten Kraftmikroskop wurden Osteoblasten in einer zweiten Versuchsreihe aus vertikaler Richtung mittels Kompression stimuliert und ein Profil ihrer Zugkräfte bestimmt. Die Stimationsparameter wurden dabei analog zu den Dehnungsversuchen (20 Zyklen bei 10Hz) gewählt.

Es wurden Kräfte von 150 nN mit einer 10 μm -Silika-Kugel an der Spitze des Cantilevers appliziert, da bei dieser Stärke und der verwendeten Stimulations-Kugel eine Perforation der Zellmembran sehr unwahrscheinlich ist. Erst bei Applikation von über 500 nN über eine 10 μm -Kugel wurden solche Perforationen beobachtet. Als Stimationsprofil wurde eine Annäherung mit konstanter Geschwindigkeit gewählt. Im Orts-Zeit-Diagramm ist dies ein Dreiecksprofil.

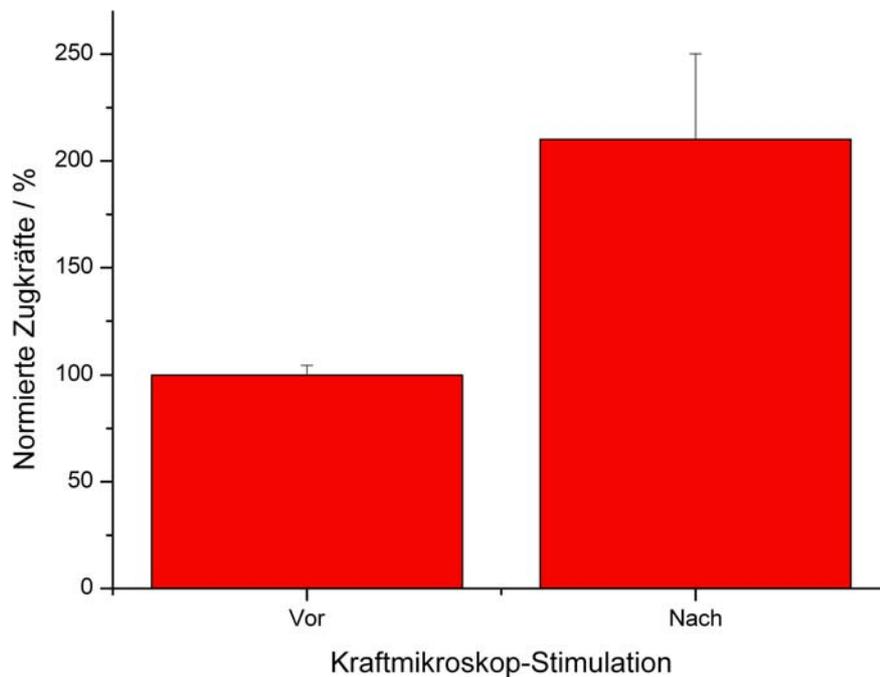


Abbildung 32. Normierte Zugkräfte vor und nach zyklischer Kraftmikroskop-Stimulation. Die Zugkräfte einer jeden Zelle wurden auf ihren Mittelwert vor Stimulation normiert. Die Zellen generieren nach zyklischer Kraftmikroskop-Stimulation um 110% erhöhte Zugkräfte.

Durchschnittliche Zugkräfte in dieser Versuchsreihe lagen zwischen 893 und 2 dyn/cm². Diese Schwankungen sind bekannt. Allerdings ist die absolute Höhe der Kräfte in diesem Fall niedriger als in der Versuchsreihe der Dehnungsexperimente, obwohl die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele identisch war. Der Median der Kontrollgruppe vor Stimulation liegt bei 129 dyn/cm² (3. Quartil 212 dyn/cm², 1. Quartil 64 dyn/cm²). Nach Stimulation liegt der Median bei 136 dyn/cm² (3. Quartil 192 dyn/cm², 1. Quartil 81 dyn/cm²). Ein statistisch signifikanter Unterschied der absoluten Zugkräfte der gesamten Zellgruppe vor und nach Stimulation besteht nicht (Wilcoxon-Test).

Da die Zugkräfte vor Stimulation sehr unterschiedlich sind, normiert man analog zu Dehnungs-Experimenten jede Zelle auf ihre Zugkräfte vor Stimulation und vergleicht dann die so normierten Zugkräfte aller Zellen nach Stimulation.

In der Einzelzell-Analyse zeigen acht der elf untersuchten Zellen signifikante Unterschiede in ihren Zugkräften vor und nach Stimulation (s. auch Abb. 33). Vier Zellen zeigten eine Verringerung der Zugkräfte, wobei drei Zellen diese Kräfte sprunghaft nach Stimulation und eine Zelle diese Kräfte kontinuierlich über mehrere Minuten reduzierten. Bei vier Zellen wurden signifikant erhöhte Zugkräfte nach Stimulation gemessen; zwei Zellen wiesen einen sprunghaften Anstieg der Zugkräfte, zwei Zellen einen kontinuierlichen auf.

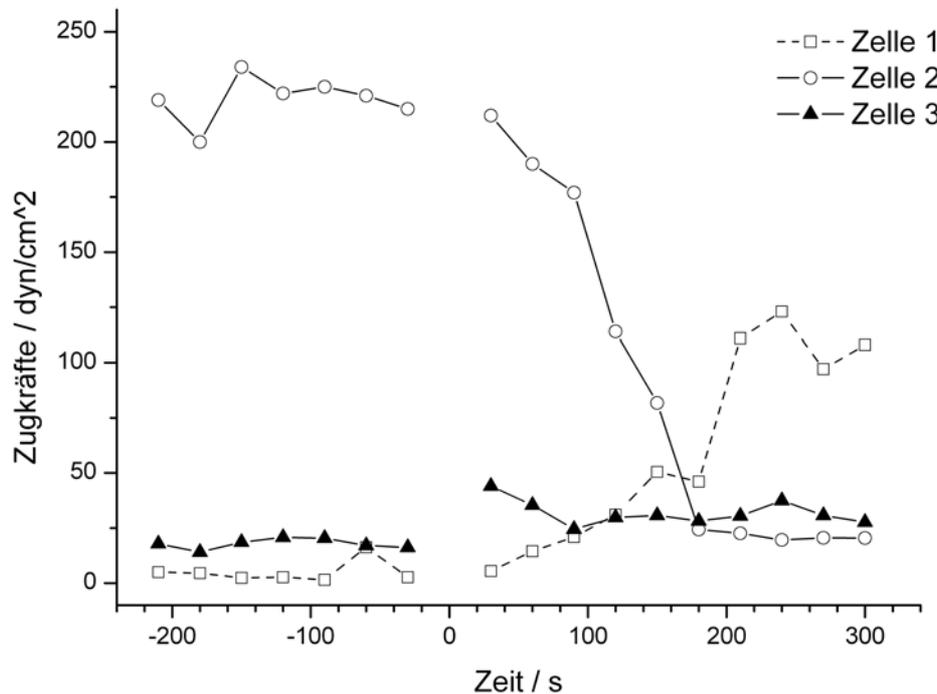


Abbildung 33. Zugkräfte nach Kraftmikroskop-Stimulation. Zelle 1: Zelle mit langsam erhöhten Zugkräften nach vertikaler Kompression mit dem Kraftmikroskop. Zelle 2: Zelle mit langsam erniedrigten Zugkräften. Zelle 3: Zelle mit schnell erhöhten Zugkräften.

Interessanterweise scheinen auch bei Stimulation mit dem Kraftmikroskop die absoluten Zugkräfte der Zellen eine gewisse Voraussage auf den Reaktionstyp nach Stimulation zu erlauben. So reagieren Zellen mit niedrigen Zugkräften mit einer Erhöhung der zellulären Adhäsionskräfte nach Stimulation und Zellen mit höheren Zugkräften vor Stimulation mit einer Erniedrigung. Die Zellen, deren Zugkräfte sich nach Stimulation nicht signifikant änderten, wiesen aber im Gegensatz zu den Dehnungsmessungen keine besonders hohen, sondern für die Gesamtpopulation durchschnittliche Zugkräfte auf.

Um das Ausmaß der Änderung der Zugkräfte vor und nach Stimulation zu vergleichen, wurden die stark unterschiedlichen Zugkräfte vor Stimulation auf den Mittelwert normiert (s. Abb. 34). So steigen die Zugkräfte der Zellen mit erhöhten Zugkräften nach Stimulation um durchschnittlich 360%. Die Zugkräfte der Zellen mit erniedrigten Zugkräften fallen auf durchschnittlich 40%. Die Zellen, die keine signifikanten Änderungen in ihren Zugkräften aufweisen, generieren nach Stimulation durchschnittlich 97% ihrer Ausgangszugkräfte.

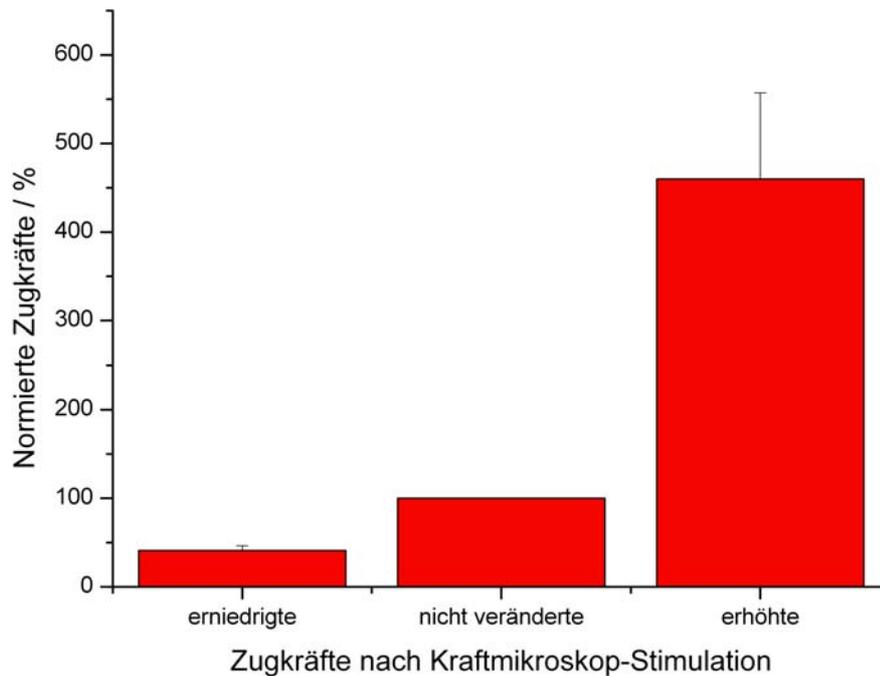


Abbildung 34. Normierte Zugkräfte nach Kraftmikroskop-Stimulation. Zellen sind entsprechend Erniedrigung, Erhöhung oder keiner Änderung ihrer Zugkräfte gruppiert.

3.3.2 Zugkräfte nach konstanter Stimulation - Krafttransmissionsmessungen

Neben den Zugkraftuntersuchungen nach zyklischen Stimulationen ist es wichtig zu wissen, wie sich die Zellen im Vergleich unter konstanter Kompression verhalten. Krafttransmissionsmessungen wurden mit vertikal applizierten Kräften von 50nN, 150nN und 300nN an 11 Zellen durchgeführt. Bei der Stimulation mit kleiner Kraft (50nN) wurden keine signifikanten Änderungen der Zugkräfte beobachtet. Die mittlere differentielle Zugkraftänderung lag bei 100dyn/cm² bei einer Standardabweichung von 50 dyn/cm². Das bedeutet, dass die Zugkräfte zwischen zwei Messpunkten im Schnitt um 100 dyn/cm² von einander abwichen. Gerichtete Zugkraftänderungen wurden nicht beobachtet. Die Gesamtzugkräfte der Zellen änderten sich dabei nicht signifikant und lagen zwischen 1000 dyn/cm² und 3000 dyn/cm².

Im Gegensatz zu den Messungen nach zyklischer Stimulation, bei denen es zu einer schnellen Erhöhung der standardisierten Zugkräfte um über 100% kam, zieht eine konstante Stimulation keine schnellen Änderungen der Zugkraft nach sich. Die Zellen reagieren also auf eine zyklische Stimulation mit einer schnellen biophysikalischen

Antwort. Nach konstanter Stimulation wurde aber nur ein langsamer Abfall der Zugkräfte um 20 – 30 % bei Stimulation mit hohen Kräften beobachtet.

Zur Abschätzung wie stark eine applizierte Kraft von 50 nN die Zugkräfte beeinflussen kann, muss die Kontaktfläche zwischen Zelle und Cantileverspitze bekannt sein. Die Silika-Kugel an der Spitze des Cantilevers hat einen Durchmesser von 10 μm . Da die Zelle im Vergleich zur Silika-Kugel sehr weich ist, kann man davon ausgehen, dass die Kugel die Zellmembran verformt und sich bei Applikation von maximaler Kraft unter dem ursprünglichen Niveau der Zellmembran befindet. In diesem Fall ist nach dem Hertz-Modell die Kontakt-Fläche kleiner als der projizierte Kreis der Kugel mit dem Radius r .

$$A_{\text{Kontakt}} = \pi \cdot r^2 \quad (24)$$

Wirkt dann die applizierte Kraft F auf diese maximale Kontaktfläche A_{Kontakt} wirkt lokal ein Druck von

$$P = \frac{F}{A_{\text{Kontakt}}} = \frac{50\text{N}}{78,5\mu\text{m}^2} = 637\text{N}/\text{m}^2 = 6370\text{dyn}/\text{cm}^2 \quad (25)$$

Bei mittleren Zellgrößen um $1000\mu\text{m}^2$ beträgt die zu erwartende Zugkraftänderung der ganzen Zelle durch den Stimulus dann

$$P = \frac{F}{A_{\text{Zelle}}} = \frac{50\text{N}}{1000\mu\text{m}^2} = 500\text{dyn}/\text{cm}^2 \quad (26)$$

Bei einer Stimulation mit 50nN ist also in einem homogenen, rein passiven System eine geschätzte Zugkraftänderung von $500\text{ dyn}/\text{cm}^2$ zu erwarten. Da die normalen Schwankungen der Zugkräfte geringer sind, hätte man erwartet, die durch Stimulation applizierte Kraft in Form von Zugkraftänderungen zu beobachten.

Bei Stimulation mit 150 nN wäre entsprechend (26) eine Zugkraftänderung um $1500\text{ dyn}/\text{cm}^2$ zu erwarten. Die Stimulation von mittleren Kräften (150 nN) führte auch zu messbar unterschiedlichen Zugkraftänderungen direkt nach Auflegen und direkt nach dem Entfernen des Cantilevers. Hier wurden differentielle Zugkraftänderungen von 200

bis 300 dyn/cm^2 gemessen. Der Großteil dieser Kraftänderungen tritt lokal an der Stelle der Stimulation auf (siehe Abb. 35). Allerdings besteht auch hier eine große Diskrepanz zwischen Schätzung und beobachteten Zugkraftänderungen.

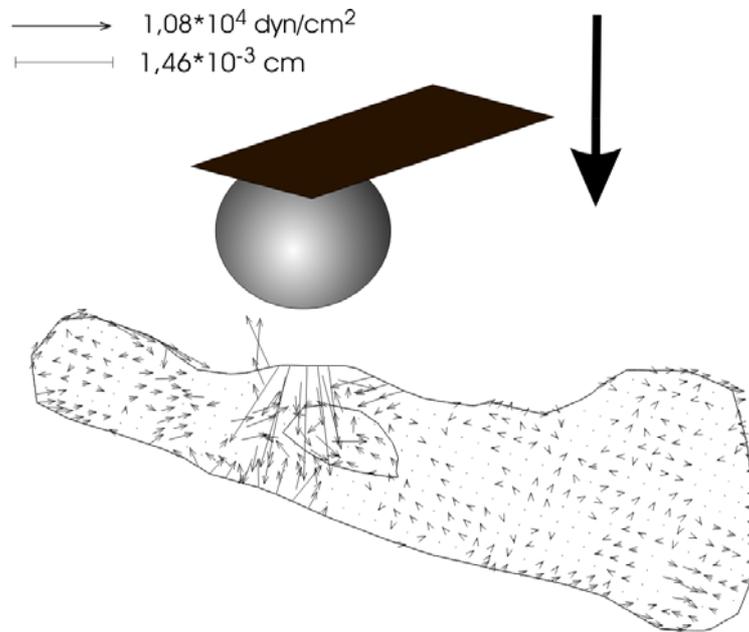


Abbildung 35. Differentielles Kraftvektorfeld einer Zelle nach konstanter Stimulation mit mittlerer Kraft. Es kommt zu großen Kraftänderungen im Bereich der Stimulation mit dem Kraftmikroskop. Der Grossteil der Kraftvektoren zeigt zum Zentrum der Stimulation (in Zusammenarbeit mit E. Mennenga-Klopp).

Beim Vergleich der Zugkräfte zwischen allen anderen Zeitpunkten wurde wieder eine mittlere Änderung von 100 dyn/cm^2 mit einer Standardabweichung von 50 dyn/cm^2 bei nicht signifikant veränderten Mittelwerten von 1000 bis 2500 dyn/cm^2 gemessen. Nach Stimulation mit hoher Kraft (300 nN) wurde direkt nach Auflegen des Cantilevers und nach dessen Entfernen Zugkraftänderungen von 800 bis 1500 dyn/cm^2 gemessen (siehe Abb. 36). Nach Gleichung (26) schätzt man die erwartete Zugkraftänderung auf ca. 3000 dyn/cm^2 . Interessanterweise weicht bei Stimulation mit hohen Kräften die einfache Schätzung deutlich geringer ab als für Stimulation mit kleinen oder mittleren Kräften. Zu allen anderen Zeitpunkten lag die mittlere Schwankung der Zugkräfte wie in den anderen Krafttransmissionsmessungen bei 100 dyn/cm^2 bei gleicher Standardabweichung. Allerdings verringerten sich die Zugkräfte während der sechsminütigen Stimulationsdauer mit hoher Kraft um 20% bis 30% .

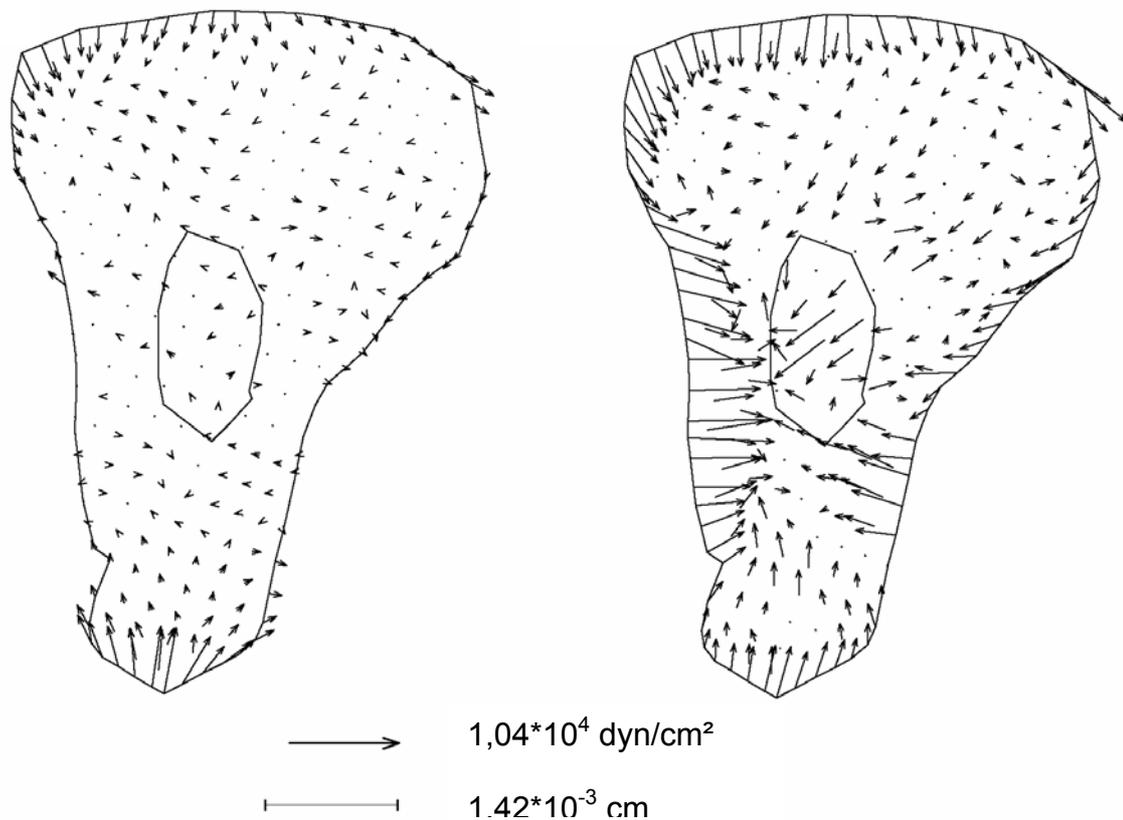


Abbildung 36. Kraftvektorfeld vor und während der konstanten vertikalen Kompressions-Stimulation. Links: Zelle vor Stimulation. Die Gesamtzugkraft zu diesem Zeitpunkt betrug 750 dyn/cm^2 Rechts: Zelle nach Auflage des Cantilevers. Hierbei wurde mit einer Kraft von 300 nN stimuliert und die Transmission dieser Kräfte gemessen. Die Gesamtzugkraft betrug 2200 dyn/cm^2 . Die Erhöhung der Zugkräfte in diesem Experiment lag also bei 1450 dyn/cm^2 bei einer durch vertikale Kompression verursachten geschätzten Ausübung von 3000 dyn/cm^2 (in Zusammenarbeit mit E. Mennenga-Klopp).

3.3.3 Calciumuntersuchungen nach zyklischer Stimulation

Nach Stimulation mit dem AFM wurden bei über 90% der Zellen Calcium Signale beobachtet (siehe Abb. 37). Bei genauerer Betrachtung zeigt sich jedoch dass diese Aktivierungen erst nach Stimulationen mit Kräften ab ca. 500 nN beobachtet werden. Experimente mit Thapsigargin konnten den Anstieg des Fura-2-ratios nicht unterbinden, so dass der Ursprung der Calciumerhöhung bei Stimulation mit hohen Kräften nicht das endoplasmatische Retikulum war. Im Kontext mit den anderen Versuchen zu Abklärung des Calciumursprungs nach Stimulation mit hoher Kraft ergab sich der Verdacht, dass es zu unphysiologischen Calciumerhöhungen durch Mikroperationen kommt (s. Abb. 37).

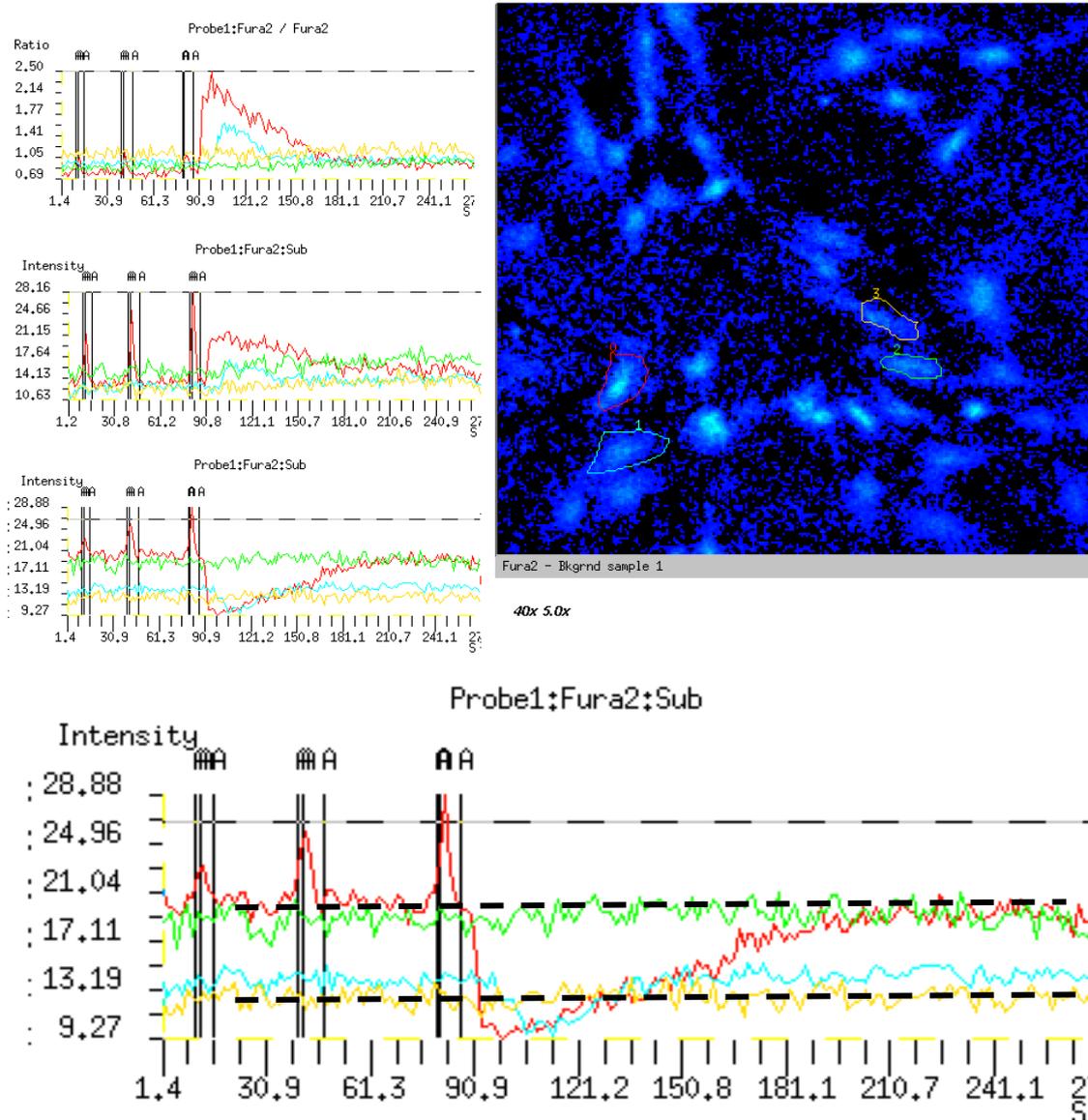


Abbildung 37. Unphysiologische Calciumaktivierung nach Stimulation mit hoher Kraft. Oben: 340 nm/380 nm ratio-Bild, ein Calciumanstieg (rote Zelle) weitergeleitet zur Nachbarzelle (türkis), 2. von oben: 340 nm-Anregung, Anstieg von calciumgebundenem Fura-2, 3. von oben: 380 nm-Anregung, Abfall von calciumungebundenem Fura-2. Auf allen drei Bildern ist zu erahnen, dass im Beobachtungszeitraum die Kurven nicht auf ihre ursprünglichen Werte zurückgehen. Unten: Ausschnittsvergrößerung des oberen Bildes erhärtet den Verdacht.

19 durchgeführte EGTA-Experimente bestätigten, dass es bei Applikation von Kräften über 500 nN zu einer Mikroporation der Zellen kommt. EGTA hebt den intra-/extrazellulären Calciumgradienten auf, dass es bei einem eventuellen Einstrom von Calcium aus dem Extrazellulärraum nicht zu Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration kommt. So kommt es unter Verwendung von EGTA nach Stimulation zu keiner Veränderung des Ratios, wohl aber fallen die Intensitäten der beiden einzelnen Wellenlängen ab. Im Kontext mit den anderen in der Abteilung durchgeführten Versuchen muss man nach der Bestätigung durch die EGTA-

Experimente von einer Mikroporation der Zellmembran und einer dadurch ausgelösten unphysiologischen intrazellulären Calciumerhöhung bei Stimulation mit hohen Kräften ausgehen.

Bei Stimulation mit niedrigeren Kräften wurde keine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels beobachtet.

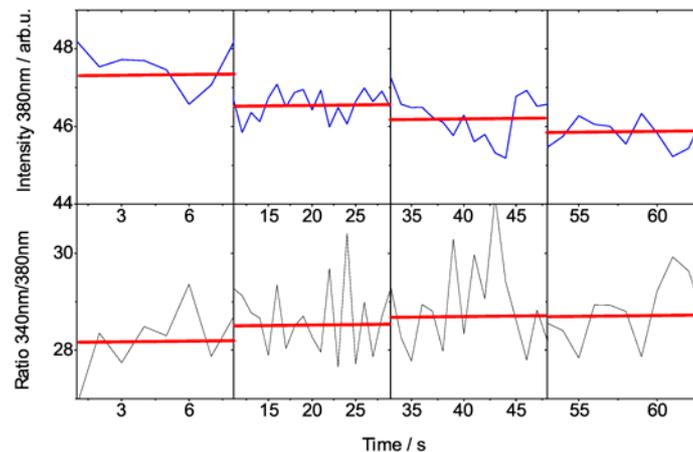


Abbildung 38. Intensität des Calcium-Farbstoffs Fura-2 während und nach Kraftmikroskop-Stimulation unter EGTA-Inkubation. Die schwarze Linie (unten) stellt das Ratio dar, die blaue Linie (oben) die Anregung des calciumungebundenen Farbstoffs bei 380nm. Die roten Linien veranschaulichen den jeweiligen Mittelwert im entsprechenden Zeitabschnitt.

Es ist gut zu erkennen, dass ein leicht ansteigendes Ratio-Signal (unten) mit einem Abfall des 380nm-Anregungs-Signals einhergeht (oben). Da während der EGTA-Experimente der Calciumgradient aufgehoben ist, können Änderungen des Signals nur durch Veränderungen der Farbstoffkonzentration erklärt werden. Die Veränderungen des Signals weisen auf ein Zelleck hin, durch das Farbstoff aus der Zelle strömt. (erstellt in Zusammenarbeit mit E. Mennenga-Klopp)

4 Diskussion

4.1 Zelluläre Adhäsionskräfte nach mechanischer Stimulation

In dieser Arbeit gelang es, mechanische Antworten in Form von Änderungen der zellulären Interaktionskräfte mit ihrer Umgebung nach mechanischer Stimulation quantitativ zu erfassen. So wurde gezeigt, dass Osteoblasten mit starken Zugkraftänderungen sowohl auf Dehnung als auch auf vertikale Stimulation reagieren. Dies geschieht teilweise sehr schnell. Die Zugkräfte von Osteoblasten unterlagen nach Dehnung starken Fluktuationen. Nach vertikaler Stimulation wurden zudem bei einem Teil der Zellen langsame Zugkrafteerhöhungen und –erniedrigungen beobachtet. Eine konstante vertikale Kompression führt nur zu einer langsamen Abnahme, nicht aber zu schnellen Änderungen der Gesamtzugkraft.

Eine zyklische Stimulation mittels Dehnung oder vertikaler Kompression führt zu einer mittleren Erhöhung der standardisierten zellulären Adhäsionskräfte um über 100%, wobei sich die absoluten Zugkräfte vor und nach Dehnung aufgrund der großen Streuung der Anfangswerte aber nicht unterscheiden.

Die initiale Höhe der Zugkräfte einer Zelle scheint außerdem einen Einfluss auf die Art der mechanischen Antwort nach mechanischer Stimulation zu haben. So erhöhen einige Zellen mit niedrigen initialen Zugkräfte ihre Zugkräfte nach Dehnung sehr stark und Zellen mit initial hohen Zugkräften erniedrigen tendenziell ihre Zugkräfte nach Dehnung auf etwa 1000 dyn/cm².

4.1.1 Zelluläre Adhäsionskräfte nach zyklischer Stimulation

Osteoblasten reagieren nicht alle in ähnlicher Weise auf zyklische Stimulationen, wie sie hier durchgeführt wurden. Bedenkt man aber, dass verschiedene Zellen einer Zellart generell sehr unterschiedliche Adhäsionskräfte generieren (bis Faktor 100), ist es weniger verwunderlich, dass mechanische Stimulation zu keiner uniformen mechanischen Antwort führt. Besonders wenn man sich vor Augen führt, dass die durchschnittlichen Zugkräfte für eine bestimmte Zellart im Beobachtungszeitraum erstaunlich stabil waren, wird klar, dass es trotz extremer Schwankungen der Zugkräfte verschiedener Zellen sehr wahrscheinlich einen stabilen Regelmechanismus für alle Zellen gibt. Ob diese Regelung aber auf rein biophysikalischen Mechanismen beruht oder biochemisch gesteuert ist, ist noch nicht geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung. So muss in einem ersten Schritt eine korrekte phänomenologische

Beschreibung von möglichen mechanischen Antworten erfolgen, und diese nach Möglichkeit in einem zweiten Schritt getrennt nach mechanischen Antworttypen biochemisch charakterisiert werden, um eventuelle Unterschiede in den aktivierten Signalwegen feststellen zu können.

In den hier durchgeführten Experimenten konnten für Dehnungsreize von bis zu 6.000 μstr keine morphologischen Veränderungen im Beobachtungszeitraum festgestellt werden. Bei Applikation von deutlich höheren zyklischen Dehnungsreizen von 4% (= 40.000 μstr) richteten sich Osteoblasten aber rechtwinklig zur Dehnungsrichtung aus⁷². Auch zeigten die Zugkraftverteilungen innerhalb der Zellen nach Dehnung keine spezifischen Muster oder eine bevorzugte Orientierung, so dass man vermuten kann, dass Dehnungen geringerer Stärke nicht zu orientierungsspezifischen Reaktionen führen. Nach Kraftmikroskop-Stimulation wurden erwartungsgemäß keine Orientierungsreaktionen beobachtet.

4.1.2 Zelluläre Adhäsionskräfte im Kontext

Welche Bedeutung Zugkräfte und deren Regulierung für Zellen oder ganze Organismen haben und welche Relevanz unterschiedliche Zugkräfte auf Zellsysteme haben, kann momentan nur vermutet werden. Neben Zellen des Knochengewebes scheinen unter anderem Endothelzellen, Herzmuskelzellen, alle Zellen während der Entwicklungsphase und alle malignen Zellen in besonderer Weise einen Bezug zu ihrer biophysikalischen Umgebung zu haben. Interessanterweise weisen MG63-Osteosarkomzellen deutlich niedrigere Zugkräfte als Osteoblasten auf¹⁹, und für experimentelle Brustkrebsarten konnte eine erhöhte zelluläre Steifigkeit, die mit den Zugkräften positive korrelierte, auf erhöhte rho- und ERK-Aktivierung zurückgeführt werden⁷⁵. Hierbei wurde gezeigt, dass die malignen Zellen auf steiferem Substrat mit deutlich gesteigerter Proliferation und Verlust der Zellpolarität auf EGF-Stimulation reagieren. Auf Reduzierung der rho-rock abhängigen Zytoskelettspannung reagierten sie wieder mit geringerer Proliferation und wiederhergestellten Zell-Zell-Interaktionen. Hierbei wird deutlich, welche Rolle die Zytoskelettspannung, die über die Verknüpfung mit zellulären Adhäsionskräften berechnet werden kann, für das maligne Verhalten von Zellen spielt. Ebenso ist die Rolle von Zugkräften und deren Änderung innerhalb der Mechanotransduktionskaskade unklar. Zugkraftänderungen könnten auch durchaus nicht nur eine Art Endergebnis einer erfolgten Mechanotransduktion sein, sondern auch eine regulierende Rolle in der Mechanotransduktion spielen. So können Zellen über ihre Zugkräfte die Steifigkeit ihrer

Umgebung beeinflussen. Diese veränderten Steifigkeiten können in der Folge durotaktische Phänomene nach sich ziehen.

Die verschiedenen mechanischen Antworten, die in den hier durchgeführten Versuchen identifiziert wurden, könnten durchaus physiologische Relevanz haben. So gibt es einen Zusammenhang zwischen Motilität und zellulären Adhäsionskräften^{7,86,87} und zwar derart, dass Zellen mit hohen Adhäsionskräften weniger motil sind als Zellen, die niedrigere Adhäsionskräfte generieren^{38,71}. So könnten die Zugkraftänderungen nach Stimulation Konsequenz oder Ursache einer durch die Stimulation beeinflussten Motilität sein. Dies könnte motile Zellen dazu bringen, an einem Ort hoher mechanischer Belastung zu verweilen und dort zur ersten Stabilisierung selbst hohe Zugkräfte zu entwickeln und dann durch Beginn der Produktion von Knochengrundsubstanz zur weiteren Stabilisierung bei zu tragen. Ebenso ist es denkbar, dass Zellen auf diese Art Stellen mit hoher mechanischer Belastung finden, um dann gezielt Knochenmatrix synthetisieren zu können. Dieser Mechanismus könnte außer im Knochen auch während der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielen.

Die unterschiedlichen mechanischen Zellantworten könnten auch auf dem Phänomen der Durotaxis beruhen⁶². Hierbei handelt es sich um die Beschreibung, dass Zellen ein steiferes Substrat einem weicherem vorziehen und sich tendenziell in Richtung des steiferen Substrates bewegen. In den durchgeführten Versuchen werden durch Dehnung oder Kompression teilweise die mechanischen Eigenschaften des Gels verändert, was prinzipiell zu durotaktischem Verhalten der Zellen führen könnte.

Eine besondere Bedeutung kommt ebenfalls der Geschwindigkeit der mechanischen Antwort zu. Da die mechanischen Antworten nach weniger als fünf Sekunden nach Stimulation beobachtet werden, kann die Aktivierung von Signalwegen mit längerer Verzögerung die mechanischen Antworten nicht erklären. Dies wird in den Kapiteln „Rolle von Calcium“ näher erklärt. In den durchgeführten Experimenten wurden außer den schnellen Zugkraftänderungen nach den zyklischen Stimulationen auch langsame Änderungen nach zyklischer AFM-Stimulation beobachtet. Geht man davon aus, dass die Zugkraftänderungen auf in biochemische Signale konvertierte Kräfte zurückzuführen sind, muss man davon ausgehen, dass durch die unterschiedlichen Stimulationen unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert worden sind. Dies könnte auf verschiedene Mechanosensoren, unterschiedliche Aktivierung desselben Mechanosensors oder Einflüsse, die den Signalweg an späterer Stelle beeinflussen, zurückgeführt werden.

4.1.3 Zelluläre Adhäsionskräfte nach konstanter Stimulation - Krafttransmissionsmessungen

Nach konstanter lokaler Stimulation von Osteoblasten mit dem Kraftmikroskop wurden nicht die in den anderen Experimenten beobachteten unterschiedlichen Arten von Zugkraftänderungsprofilen gefunden. Es kommt lediglich zu einer langsamen Minderung der Gesamtzugkräfte unter konstanter vertikaler Belastung.

Bei Stimulation durch vertikale Kompression mit dem Kraftmikroskop mit 50 nN wirken um 500 dyn/cm² Druck. Da diese Druckerhöhung aber nicht bei den Zugkraftmessungen festgestellt werden konnte, wird die Kraft also nicht direkt bis zu den fokalen Kontakten weitergeleitet. Dabei ist zu bedenken, dass die normalen Schwankungen der Zugkräfte bereits 100 ± 50 dyn/cm² betragen. Viskoelastische Effekte der Zellmembran oder des Zytosols könnten die Deformationsenergie absorbieren, ohne dabei direkt auf das Zytoskelett zu wirken. Bei Untersuchungen mit Rasterkraftmikroskopen⁸³ und magnetischen Pinzetten⁵ wurde das viskoelastische Verhalten der Zellen der Zellmembran³², Teilen des Zytosols und Aktin-Filamenten³⁷ oder den Intermediärfilamenten⁴⁸ zugeordnet. Dabei könnte die Energie von Proteinen der Plasmamembran oder des Zytosols absorbiert werden, so dass keine Energie mehr vorhanden ist, um direkte, beobachtbare Zugkraftveränderung nach sich zu ziehen. Auch bei Stimulation mit mittlerer Kraft fällt auf, dass nur ein Teil des applizierten Druckes (1500 dyn/cm²) bis zu den fokalen Kontakten reicht und mit den Zugkraftmessungen beobachtet werden kann (200 bis 300 dyn/cm² Erhöhung). So scheint bei Stimulation mit mittleren Kräften ein Teil der applizierten Kraft über das Zytoskelett auf die fokalen Kontakte übertragen zu werden. Die Veränderungen der Kraftverteilung sind wahrscheinlich auf lokale Phänomene zurückzuführen, da in den differentiellen Kraftvektorkarten am projizierten Ort der Stimulation große Kraftvektoren zu finden sind, während nur geringe Kraftänderungen in der Zellperipherie auftreten. Mehrmals wurde am Ort der Stimulation eine konzentrische Anordnung von differentiellen Kraftvektoren gefunden. Diese zeigten entweder überwiegend nach innen oder überwiegend nach außen. Die nach innen gerichteten Kräfte können erklärt werden, indem man die Zelle als elastischen Körper annimmt. Durch die Kompression wird dann lokal die Steifigkeit erhöht und so wird die Kraft bis zum Substrat übertragen. Nimmt man jedoch an, die Zelle bestehe aus einem nicht kompressiblen Material, kann man sich leicht vorstellen, dass durch die mit der Kompression einhergehende Abflachung der Zelle, nach außen gerichtete Kräfte erzeugt

werden. In der Literatur werden Mikrotubuli häufig als Kompressions-widerstehende Filamente beschrieben⁹, so dass man vermuten kann, dass je nach lokaler Beschaffenheit des Zytoskeletts Kräften bis zu einer bestimmten Höhe widerstanden wird, die Zelle sich also wie ein nicht kompressibles Material verhält und letztlich nach außen gerichtete differentielle Zugkräfte gemessen werden. Kann das Mikrotubuli-Netz den applizierten Kräften nicht widerstehen, verhält sich die Zelle wie ein elastisches Material und nach innen gerichtete differentielle Kräfte werden beobachtet. Vermutlich stehen beide Mechanismen in Konkurrenz. So wirken durch Kompression des Zytoplasmas nach außen gerichtete Kräfte, während durch Belastungen des Zytoskeletts nach innen gerichtete Kräfte entstehen. Bei sehr hohen Kräften ist allerdings eine direkte Transmission der Kräfte durch die Zelle hindurch ohne großen Einfluss von zellulären Strukturen zu erwarten.

Bei Stimulation mit hohen Kräften (300nN) wirken bis 3000 dyn/cm². Nach Auflegen des Cantilevers wurden um 800 – 1500 dyn/cm² erhöhte Zugkräfte gemessen. Hierbei sind die Zugkraftänderungen auch auf lokale Kraftänderungen am Ort der Stimulation zurückzuführen. Allerdings beobachtet man bei Kompression mit hoher Kraft am Ort der Stimulation hauptsächlich nach außen gerichtete differentielle Zugkräfte. Während bei Stimulation mit mittlerer und kleiner Kraft an den Zellrändern ungerichtete Zugkraftänderungen auftreten, findet man bei Stimulation mit hoher Kraft hauptsächlich nach innen gerichtete Zugkraftänderungen. Nach Entfernen des Cantilevers findet man ein invertiertes Bild. Am Ort der Stimulation findet man nach innen gerichtete und an den Zellrändern nach außen gerichtete differentielle Zugkräfte. Diese Ergebnisse können mit einer kleinen Erweiterung des eben vorgestellten einfachen Modells erklärt werden. Die applizierte Kraft ist in diesen Versuchen so hoch, dass es zu einer lokalen Verdrängung des Zytosols kommt und dabei dann Kräfte nach außen wirken. Andererseits kommt es durch die direkte Kompression von gespannten Zytoskelettbestandteilen zu deren Verkürzung, was direkt einer nach innen gerichteten Kraft an den Ursprüngen dieser Zytoskelettbestandteile an den Zellrändern entspricht. Auch wenn die Beobachtungen gut von dem beschriebenen Modell erklärt werden können, müssen selbstverständlich viele Teile dieses Modells erst bestätigt werden. So könnte durch Depolymerisation des Mikrotubuliskeletts mit Nocodazol festgestellt werden, ob es tatsächlich die Mikrotubuli sind, die in diesem Versuchsaufbau dafür sorgen, dass bei Stimulation mit mittleren Kräften nach innen gerichtete Kräfte beobachtet werden. Ebenso würde ein Polymerisationsstop von Aktinfasern vor

mechanischer Simulation dabei helfen, herauszufinden, ob die nach innen gerichteten Kräfte in der Zellperipherie tatsächlich auf Kompression und somit Spannungserhöhung von Aktinfasern beruhen. Ebenso könnte die Stimulation von elastischen und nicht komprimierbaren Modell-Zellen weitere Erkenntnisse liefern.

Da bei Stimulation mit geringen Kräften praktisch keine Krafttransmission nachgewiesen werden konnte, können durch die Kraftmikroskop-Stimulation bei diesen Kräften auch keine signifikanten Kräfte direkt auf das Substrat wirken. Somit ist es praktisch ausgeschlossen, dass durch die Kraftmikroskop-Stimulation die mechanischen Eigenschaften des Gels verändert werden. Daher kann man davon ausgehen, dass die mechanischen Antworten nach Kraftmikroskop-Stimulation nicht die Reaktionen auf lokale Veränderungen der Steifigkeit des Gels sind.

Nach den Beobachtungen dieser Experimente stellt sich aber die Frage, welche Einflüsse die hier gefundenen Ergebnisse auf die zyklischen Kompressions-Experimente haben. Da bei Applikation von geringen Kräften keine Transmission bis zum Substrat erfolgt, muss man davon ausgehen, dass die gesamte Stimulationsenergie von der Zelle absorbiert wurde. Daher ist es vorstellbar, dass auch nur ein Anteil der applizierten Kräfte auf Zytoskelettbestandteile wirkt und der Rest von anderen zellulären Strukturen aufgenommen wird. Da der Mechanosensor bzw. das mechanosensorische System höchstwahrscheinlich mit dem Zytoskelett assoziiert ist, wird man bei nur geringer Stimulation des Zytoskelettes auch nur eine geringe Aktivierung des Mechanosensors erwarten. Dieser Sensorkomplex konnte aber noch nicht vollständig identifiziert werden, und seine Funktionsweise ist noch nicht bekannt. Daher sind eine stufenweise oder alles-oder-nichts-Aktivierung des Sensors durch eine Kraft über einem Schwellenwert genauso vorstellbar wie eine Integration von Stimulationssignalen bis zum Erreichen eines Schwellenwertes. Auch ist es möglich, dass die von nicht Zytoskelettbestandteilen absorbierte Energie zu Modifikationen des Antwortverhaltens des Mechanosensors führt. Der Vergleich der mechanischen Antworten nach zyklischer Stimulation mit denen nach konstanter Stimulation - insbesondere die Frequenzabhängigkeit - gibt allerdings bereits erste Hinweise darauf, dass mechanische Signale vermutlich integrativ verarbeitet werden.

4.2 Gibt es eine Frequenzabhängigkeit?

Die Frequenz einer mechanischen Stimulation ist ein sehr wichtiger Parameter von in vivo-Experimenten zur Erhöhung der Knochendichte^{42,56}. Es ist zwar wahrscheinlich, dass auch Stimulationen auf zellulärem Niveau frequenzabhängig sind, aber dies ist

4.2 Gibt es eine Frequenzabhängigkeit?

noch nicht geklärt. Die Wahl eines geeigneten Messparameters ist hierbei besonders schwierig. Vorläufige Ergebnisse einer aktuellen klinischen Studie zeigen eine signifikante Erhöhung der Knochendichte premenopausaler Frauen nach mechanischer Stimulation (0,2 g, 30 Hz) für 2 x 10 Minuten täglich⁶. Für in vitro-Experimente bieten sich Proliferationsmessungen, Zytokinausschüttung oder Enzymaktivierungen als Messgrößen an. Durch die hier vorgestellte Möglichkeit, die mechanische Antwort einer Zelle nach mechanischer Stimulation zu messen, liegt nun ein weiterer geeigneter Parameter vor. Die hier durchgeführten Versuche zeigen bereits, dass mechanische Antworten durchaus davon abhängen, ob zyklisch oder konstant stimuliert wird. Da schnelle mechanische Antworten nur nach zyklischen Stimulationen beobachtet wurden, muss man annehmen, dass das mechanosensorische System entweder außer der wirkenden Kraft auch die Frequenz einer Stimulation messen kann oder die auftretenden Energien aufintegriert werden können. Letzteres scheint der Fall zu sein. Durch die Beschreibung von stufenweise entfaltbaren Proteinen¹⁰⁸ kennt man nun Moleküle, die eine Kraft durch Konformationsänderungen und Freilegen von funktionellen Gruppen potentiell in biochemische Signale umwandeln können. Interessanterweise ist die Rückfaltungsdauer auch abhängig von dem Grad der Entfaltung. Je mehr Stufen entfaltet sind, desto länger dauert es bis das Protein zurückgefaltet ist. Durch die stufenweise Entfaltung und einem möglichen Freilegen von funktionellen Gruppen erst ab einer höheren Entfaltungsstufe, kann man sich so sehr anschaulich einen integrativen Mechanosensor vorstellen. Experimentell konnte bereits eine frequenzabhängige Weiterleitung von Kräften innerhalb des Zytosols festgestellt werden. Hierbei stieg die Reichweite einer applizierten Kraft bei Frequenzerhöhung (von 0,3 Hz) bis zu einem Frequenzmaximum, während bei höheren Frequenzen (30 Hz) die Reichweite wieder geringer war⁴⁵. Weitere Untersuchungen sind aber nötig, um eine Frequenzabhängigkeit zu bestätigen und näher zu charakterisieren. Leider war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, die zu den Krafttransmissionsmessungen korrespondierenden Dehnungsversuche, also die Zugkraftmessung im gedehnten Zustand, durchzuführen. Die vorhandene Software ist in dieser Form nicht in der Lage, die durch Dehnung verursachte Verschiebungen und Verzerrungen der Fluoreszenzmarkerverteilung herauszurechnen, so dass die zellulären Adhäsionskräfte in diesen Versuchen mit denen aus anderen vergleichbar wären. Stimulation mit verschiedenen Amplituden und Frequenzen könnte unterschiedliche Typen von mechanischen Antworten der Zellen zur Folge haben. Unterschiedliche

4.2 Gibt es eine Frequenzabhängigkeit?

Stimulationsfrequenzen könnten bevorzugt bestimmte Typen von mechanischen Antworten nach sich ziehen. In dieser Arbeit konnten nun Hinweise gefunden werden, dass die bereits *in vivo* bekannte Abhängigkeit von Stimulationsfrequenz und unterschiedlich erfolgreichem Aufbau von Knochendichte auch auf zellulärem Level existiert. Sollte sich dies bestätigen, wäre eine effiziente Möglichkeit geschaffen, Stimulationsprofile nicht nur am makroskopischen Knochen²¹ oder im Tiermodell zu testen, sondern zuerst auch am einfacher zu handhabenden und wirtschaftlicheren zellulären Modell.

4.3 Zugkraft-Unterschiede in den Experimenten

Es ist bekannt, dass die Zugkräfte von Zellen im Allgemeinen sehr unterschiedlich sind. Im Vergleich zu den hier durchgeführten Versuchen schwanken die Zugkräfte einer zufälligen Gruppe ($n=21$) aus dem Pool bereits ausgewerteter Experimente, in dem das Polyacrylamidgel nicht auf Aclarfolie, sondern auf Glas aufgebracht ist, zwischen 51 dyn/cm^2 und 6757 dyn/cm^2 . Die Zugkräfte von Osteoblasten selber sind aber über eine längere Zeit relativ stabil und sind in der Regel für eine einzelne Zelle normalverteilt. Trotzdem ist es natürlich auffällig, dass die Zellen, die für die Stimulationsexperimente mit dem AFM verwendet wurden, im Mittel um einen Faktor 10 niedrigere Zugkräfte aufweisen. Trotz der geringen Anzahl an untersuchten Zellen mit dem AFM muss nach dem Grund für diesen Unterschied gesucht werden. Vergleicht man die Zugkräfte, in den hier vorgestellten Experimenten mit Zugkräften aus anderen Experimenten, die teilweise auch mit deutlich anderen Versuchsaufbauten gewonnen wurden, stellt man fest, dass die Zugkräfte der Zellen, die zyklisch mit dem AFM stimuliert wurden, ungewöhnlich niedrig sind. Um den Grund für diese Abweichung zu verstehen, muss man den genauen Versuchsablauf und den Algorithmus zur Berechnung der Zugkräfte näher beleuchten. In allen Versuchen, in denen die Zugkraft bestimmt werden soll, werden Bilder der obersten Fluoreszenzmarkerschicht aufgenommen. Das Mikroskop hat aber im verwendeten Versuchsaufbau eine Fokustiefe von $5 \mu\text{m}$. So werden genaugenommen, bei Fokussierung auf eine Ebene die optischen Informationen von $5 \mu\text{m}$, also von $2,5 \mu\text{m}$ unterhalb und $2,5 \mu\text{m}$ oberhalb der Fokusebene, aufgenommen. Bei Fokussierung auf die oberste Fluoreszenzmarkerschicht werden also immer auch die Marker bis in $2,5 \mu\text{m}$ Geltiefe mit aufgenommen. Dies ist mit konventioneller Mikroskoptechnik auch nicht zu vermeiden und kann nur durch Verwendung eines konfokalen Mikroskops beseitigt werden. Wenn nun bei einem Dehnungsversuch auf die obersten Fluoreszenzmarker fokussiert wird, gibt es keine Störungen. In den

Versuchen, in denen das AFM verwendet wird, führt jedoch der Cantilever zu Licht-Reflexionen, die das Fokussieren auf die Fluoreszenzmarker stören. Die relative Ausgangsposition des Cantilevers vor zyklischer Stimulation ist mit der hier verwendeten Software nicht veränderbar. Bei Verwendung des AFM wird so die Bildqualität generell durch vermehrtes Streulicht leicht gemindert. Fokussiert man tiefer in das Gel hinein, entfernt man sich vom Cantilever und das Streulicht ist in dieser Ebene deutlich niedriger, die Fluoreszenzmarker erscheinen also schärfer. Fokussiert man allerdings minimal tiefer in das Gel, hat man zwar die oberste Fluoreszenzmarkerschicht noch im Bild, allerdings befinden sich dann auch deutlich mehr Marker aus tieferen Gelschichten auf dem Bild. Polyacrylamidgele sind vollelastisch und somit führt eine starke Verformung an der Oberfläche des Gels nur zu einer schwachen Verformung in der Tiefe des Gels. Da die verwendeten Gele sehr weich sind, ist dieser Effekt besonders stark ausgeprägt. Die Deformationsmatrix stellt wie beschrieben lediglich eine zweidimensionale Projektion der Fluoreszenzmarkerverschiebung dar, und in die aus der Deformationsmatrix zu berechnende Kraftvektorkarte gehen alle Verschiebungen gleich gewichtet ein. So werden bei Fokussierung auf gering tiefere Gelschichten letztendlich deutlich niedrigere Kräfte berechnet. Es muss aber festgehalten werden, dass die Beurteilung von relativen Änderungen von Zugkräften dadurch nicht beeinflusst werden sollte. Bei den Krafttransmissionsmessungen mit dem AFM wurden die Kräfte korrekt berechnet, da für die Aufnahmen der Fluoreszenzmarker der Cantilever zur Vermeidung von Lichtreflexionen weiter entfernt ist.

4.4 Sind die Zugkraftänderungen ein aktiver Prozess?

Die nach Stimulation beobachteten Zugkraftänderungen können prinzipiell ein Resultat eines aktivierten Signalwegs sein, also das Ergebnis einer in biochemische Signale konvertierten Kraft, oder ein rein passives Geschehen durch die bei Stimulation applizierte Kraft sein. So ist es denkbar, dass durch Dehnung oder Kraftmikroskop-Stimulation krafttragende Strukturen zerstört werden, was in einer sofortigen passiven Minderung der Zugkräfte resultieren würde. Ebenso ist es denkbar, dass durch Zerstörung von Teilen der Zellspannung tragenden Strukturen, die auf das Substrat wirkenden Zugkräfte sprunghaft erhöht werden. Es wird auch vermutet, dass Zellen, um fokale Kontakte von ihrem Substrat zu lösen, die Kraft auf diese stark erhöhen bis die fokalen Kontakte abreißen⁷⁹. Dieser schnelle Prozess würde nach initialer Erhöhung zu einer Erniedrigung der Gesamtzugkraft führen und wäre mit einer höchst

4.4 Sind Zugkraftänderungen ein aktiver Prozess?

lichtempfindlichen Kamera, die nur geringe Belichtungszeiten erfordert, vermutlich über sich ändernde Zugkräfte beobachtbar.

Da in den durchgeführten Experimenten die Kräfte nach Stimulation sowohl ansteigen als auch abfallen und dies auch mit sehr unterschiedlichen Geschwindigkeiten, kann man davon ausgehen, dass eine aktive Reaktion der Zellen nach Stimulation vorliegt. Weiterhin sind die Schwankungen der Zugkräfte nach Stimulation deutlich höher, was auf anhaltende Zugkraftanpassungen hindeutet. Auch wurde durch den Vergleich zwischen Zugkraftänderungen nach zyklischer und nach konstanter Stimulation mit dem AFM eine Frequenzabhängigkeit nachgewiesen, die durch passive Prozesse schwer zu erklären ist. Eine Analyse der Kraftkomponenten parallel und senkrecht zur Dehnungsrichtung würde bei passivem Abreißen von fokalen Kontakten oder Zytoskelettbestandteilen außerdem einen verstärkten Abfall der Zugkraftkomponenten parallel zur Dehnungsrichtung aufzeigen. Dies wurde nicht festgestellt. Außerdem wurde nach Dehnungsstimulation bereits eine Aktivierung von Second Messenger Systemen nachgewiesen¹⁰¹, so dass die beobachteten Zugkraftänderungen höchst wahrscheinlich nicht nur auf rein biophysikalische sondern auch auf biochemische Prozesse zurückzuführen sind.

4.5 Gibt es einen Zugkraft-Sollwert?

Weshalb Zellen einer Zellpopulation stark unterschiedliche Zugkräfte generieren, ist noch nicht geklärt. Der bis jetzt einzige bekannte Einfluss auf die Stärke der Zugkräfte einer Zelle ist die Steifigkeit des Substrates. Zellen scheinen ein steiferes Substrat einem weicheren vorzuziehen. Dies nennt man Durotaxis^{62,24}. Zellen können Unterschiede in der Steifigkeit von Fibronectin-beschichteten Polyacrylamidgelen nach antikörpervermitteltem α 5 β 1-Block nicht mehr erfassen, ebenso können Rezeptor Protein Tyrosin Phosphatase α –knock-out-Zellen dies nicht⁵⁰. Auch wenn erste beteiligte Moleküle identifiziert sind bleibt es unklar, wieso verschiedene Zellen auf dasselbe Substrat so unterschiedliche Zugkräfte ausüben.

Die Zugkräfte von Osteoblasten ohne Stimulation sind zwar sehr unterschiedlich, aber relativ stabil im Beobachtungszeitraum. Jede Zelle hat also einen stabilen Wert für Ihre Gesamtzugkraft mit geringen Schwankungen, „ihren Sollwert“. Es stellt sich nun die Frage, ob und unter welchen Bedingungen eine Zelle ihren Sollwert ändert. Nach zyklischer Stimulation wurden bei dem Großteil der untersuchten Zellen signifikant unterschiedliche Zugkräfte gemessen. Dehnung, und tendenziell auch zyklische Kraftmikroskop-Stimulation, können also zu einer Veränderung des Sollwertes für

Zugkräfte einer Zelle führen. Allerdings weisen die Zellen, die nach Dehnung deutlich höhere Zugkräfte generieren, auch sehr starke Schwankungen in Ihren Zugkräften auf. Diese Schwankungen sind sowohl auf die unterschiedlich erhöhten Zugkräfte verschiedener Zellen nach Dehnung als auch auf Schwankungen der Zugkräfte einzelner Zellen zurückzuführen. Es liegt die Vermutung nahe, dass nach Stimulation eine Phase erhöhter Modifikation der Zugkräfte und damit der Anpassung erfolgt. Die Zellen, deren Zugkräfte nach Dehnung niedriger sind, weisen keine unterschiedlich starken Schwankungen in ihren Zugkräften vor und nach Dehnung auf.

Viele Zellen mit hohen Zugkräften vor Dehnung scheinen nach Dehnung Zugkräfte von etwa 1000 dyn/cm^2 zu generieren. Wenn tatsächlich nach Dehnung ein für einen großen Teil der Zellen geltender Sollwert existiert, wäre dies ein erster Hinweis auf einen Regelwert oder Schwellenwert für Zugkräfte von Zellen. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse können aber nur eine erste Annäherung an diese Fragestellung zu sein. Durch deutlich längere Beobachtungszeiten und mehrfache mechanische Stimulation könnte man dieses Phänomen bestätigen und genauer charakterisieren.

Falls der Trend, dass Zellen mit hohen Zugkräften nach Dehnung eine Erniedrigung der Zugkräfte auf etwa 1000 dyn/cm^2 aufweisen, sich nicht bestätigen sollte, das Konzept des Sollwertes also nicht existieren sollte, kann man dann trotzdem von einer durch Dehnung ausgelösten Neueinstellung der Zugkräfte ausgehen.

4.6 Welche Rolle spielt Calcium...?

4.6.1 Calcium und Zugkraftänderungen nach Dehnung?

Erste Zugkraftänderungen nach Dehnungsstimulation wurden nach fünf Sekunden beobachtet, zum Zeitpunkt der ersten Bildaufnahme. Untersuchungen von Kollegen der EOBM zur Calciumdynamik nach Dehnungs-Stimulation zeigten eine verzögerte Ausschüttung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum nach Dehnung¹⁰⁰. Die Verzögerung liegt im Durchschnitt bei deutlich über einer Minute. Da die ersten Zugkraftänderungen also vor der Calciumaktivierung liegen, ist davon auszugehen, dass diese ersten Zugkraftänderungen calciumunabhängig ablaufen. Lokale Calciumaktivierungen ($< 0,2 \mu\text{m}^3$) und sehr kleine Änderungen des Calciumspiegels (nM) konnten aber mit dem verwendeten Kamera/Mikroskopsystem nicht dargestellt werden. Die ersten Zugkraftänderungen sind daher also unabhängig von einer globalzellulären Calciumerhöhung.

Calciumunabhängige Umbauten des Zytoskelettes sind bereits bekannt^{11,74}. Curtze et al.²⁰ zeigten, dass erste Zugkraftänderungen nach Elektrofild-Stimulation nach etwa 30 Sekunden auftreten, Erhöhungen des intrazellulären Calciumspiegels aber erst nach 85 Sekunden nachgewiesen werden konnten. In MC3T3-E1 Osteoblasten-ähnlichen Zellen wurde eine verzögerte Calcium-Antwort nach Scher-Fluss-Stimulation beobachtet¹⁴. Nach lokaler Stimulation von Epithelzellen wurden ebenfalls calciumunabhängige erste Kraftänderungen im Zytoskelett nachgewiesen⁶⁴. In der hier vorgestellten Arbeit wurden die zytoskelett-basierten Kraftänderungen bereits nach fünf Sekunden nachgewiesen, mit dem gleichen Versuchsaufbau jedoch Calciumantworten mit einer Verzögerung von über einer Minute registriert.

Es wurden aber auch mehrere Arbeiten publiziert, in denen von einer sofortigen Calciumerhöhung nach Stimulation die Rede ist. So wurde 1996 von Hung et al.⁴⁶ eine sofortige Calciumantwort nach Scher-Fluss-Stimulation publiziert. In einer späteren Diskussion wurden die unterschiedlichen Zeitpunkte der Calciumantwort durch unterschiedliche Kulturzeiten der Zellen erklärt¹⁴. Obwohl Matthews et al.⁶⁴ Kraftänderungen des Zytoskelettes nach lokaler Stimulation mit magnetischen Integrin-gebundenen Markern mit kleinen Kräften als calciumunabhängig einstufen, berichten sie eine sofortige intrazelluläre Calciumerhöhung durch das Öffnen mechanosensitiver Calciumkanäle nach lokaler Stimulation mit hohen lokalen Kräften (1 – 5 nN). Interessanterweise war aber der Anpassungsprozess der zellulären Steifigkeit, ausgelöst durch eine Stimulation mit kleinen Kräften, calciumabhängig. So wurde zwar bei Stimulation kein globaler Calcium-Anstieg beobachtet, durch Blockade mechanosensitiver Calciumkanäle konnten aber die verzögerten Anpassungsprozesse (bis 90 Sekunden) verhindert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch sehr lokale oder sehr geringe Änderungen des Calciumspiegels eine entscheidende Rolle in der Mechanotransduktionskaskade spielen können. Ein Einstrom von extrazellulärem Calcium nach mechanischer Stimulation wurde auch für Osteoblasten publiziert^{25,13}, obwohl man momentan annimmt, dass dieser in Osteoblasten nicht vorkommt⁴⁷.

Der Calciumanstieg, der bei Experimenten mit dem gleichen experimentellen Aufbau beobachtet wurde, hatte seinen Ursprung im endoplasmatischen Retikulum und mechanosensitive Calciumkanäle waren für den gemessenen Calciumanstieg nicht verantwortlich. Da erste Zugkraftänderungen vor einem Calciumanstieg auftraten, besteht die Möglichkeit, dass die Zugkraftänderungen für eventuelle Calciumanstiege verantwortlich sind. Die später auftretenden Calciumanstiege können dann ihrerseits

wieder die Spannungen im Zytoskelett und damit auch die gemessenen Zugkräfte beeinflussen. In epithelialen Fisch-Keratozyten lösten Calciumanstiege deutlich messbare Zugkraftänderungen nach vier bis zehn Sekunden aus²⁶. Die starken Fluktuationen der Zugkräfte in den Zellen, die nach Dehnung deutlich erhöhte Zugkräfte aufwiesen, könnten demnach teilweise mit durch Calcium beeinflusst sein.

Der Zeitpunkt der Aktivierung der MAPK Erk1/2 (mitogen activated phosphat kinase extracellular related kinase1/2) wurde in 4-Punkt-Beugungs-Versuchen auf nicht unter einer Minute bestimmt¹⁰. Eine Aktivierung von Erk1/2 kann über veränderte Integrinexpression das Migrationsverhalten von Keratinozyten beeinflussen¹⁵ und führt daher sicherlich auch zu messbaren Zugkraftänderungen. In einer Studie an malignen Zellen wurden erhöhten Zytoskelettspannungen unter anderem auf die Aktivierung von Erk zurückgeführt⁷⁵. Eine Aktivierung der Erk1/2 könnte also ebenfalls einen Einfluss auf die langdauernden Zugkraftanpassungen haben.

Gesicherte Erklärungen für eine verzögerte Calciumantwort gibt es bis jetzt nicht. Denkbar wäre eine Aktivierung von parakrin wirkenden Substanzen wie beispielsweise Interleukinen. So konnte eine Il-4-Ausschüttung von Chondrozyten⁶⁷ und die Ausschüttung von PTHrP von Alveolar Zellen Typ II¹⁰⁵ nach mechanischer Stimulation nachgewiesen werden.

Auch wenn die zellulären Adhäsionskräfte sich deutlich vor einer beobachtbaren Calciumaktivierung ändern, bleibt es trotzdem ungeklärt, welchen Einfluss sehr lokale oder sehr kleine Calciumerhöhungen auf die zellulären Adhäsionskräfte von Dehnungs-stimulierten Osteoblasten haben. Lediglich die starken Fluktuationen der Zugkräfte der Zellen, die nach Dehnung erhöhte Zugkräfte aufweisen, nicht aber die schnellen Zugkraftänderungen selber, könnten ihren Ursprung in einer Calciumaktivierung haben.

4.6.2 Calcium und Zugkraftänderungen nach Kraftmikroskop-Stimulation?

Um die Kraftschwelle für eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zu finden, wurde ausgehend von der Stimulation mit wenigen 100pN von Zyklus zu Zyklus die aufgewendete Kraft erhöht. Erst bei Applikation von Kräften über 500nN wurden Erhöhungen des intrazellulären Calciumspiegels beobachtet. Zwischen 500 und 800nN wurde bei über 90% der Zellen eine Erhöhung des Calciumspiegels gemessen. Diese sehr hohen Kräfte führen allerdings zu einer Beschädigung der Zellmembran und zu einem unphysiologischen Einstrom von Calciumionen aus dem Extrazellulärraum. Eine

Erhöhung des Fura-2-Ratios bei gleichzeitigem Abfall der Intensität des 340-nm- und 380-nm-Signals deuten darauf hin. Inkubation mit Thapsigargin, das die intrazellulären Calciumspeicher durch Block der Calcium-ATPase des endoplasmatischen Retikulums leert, und das Einstellen des extrazellulären Calciumspiegels mittels EGTA bestätigen ebenso wie von Kollegen durchgeführte Quenching-Versuche mit Manganionen, dass die Calciumerhöhung aus dem Extrazellulärraum kommt. Durch Einsatz von Lanthanum und Cadmium, Blocker für calciumsensitive Ionenkanäle, konnte eine Beteiligung von calciumsensitiven Ionenkanälen an den beobachteten Calciumsignalen ebenfalls ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse erhärten den Verdacht, dass bei Stimulation mit sehr großen Kräften mit dem AFM die Zellmembran beschädigt wird und es durch diese Mikroporation zu einem unphysiologischen Calciumeinstrom in die Zelle kommt, während es bei Stimulation mit geringeren Kräften zu keiner beobachtbaren Calciumaktiverung kommt.

Im Widerspruch dazu berichteten Charras et al von Calciumerhöhungen in Ratten-Osteoblasten nach Stimulation mit einem AFM¹³. Die Verwendung des Ein-Wellenfarbstoffes Fluo3-AM in einem artefaktanfälligen Meßsystem, eine eventuell ungenügende Phänotypisierung (Test auf Osteoblasten von Charras et al. nur durch alkalischen Phosphatase-Nachweis) oder ein spezie-spezifisches Verhalten der Osteoblasten könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

4.7 Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit gelang es, eine Methode zur Beobachtung von mechanischen Antworten von Zellen nach Dehnung zu etablieren und diese mit den mechanischen Antworten von Zellen nach vertikaler Kraftmikroskop-Stimulation zu vergleichen. Im Folgenden müssen an der mechanischen Antwort nach Dehnung beteiligte Moleküle identifiziert werden. Durch Verwendung kommerziell erwerbbarer Blocker für rhoA, MLCK und Depolymerisation oder Ausfällen von Mikrotubuli oder Stoppen der Polymerisation von Aktin wird man mögliche erste Kandidaten ausfindig machen können. Ein Einsatz von Proteomics nach verschiedenen Arten mechanischer Stimulation würde zahlreiche eventuell in die Mechanotransduktion eingebundene Enzyme identifizieren können. Auch Einzelzell-Gen-Expressionsstudien nach mechanischer Stimulation, wie bereits an Chondrozyten durchgeführt wurden⁹⁰, würden tiefere Einblicke in die molekularen Vorgänge nach mechanischer Stimulation erlauben. Western Blot Untersuchungen können anschließend die Aktivierung von speziellen Enzymen zu bestimmten Zeitpunkten bestätigen.

Ebenso wichtig wäre auch eine Wiederholung der Experimente mit deutlich erhöhter zeitlicher Auflösung. Nach Anschaffung einer EMCCD-Kamera (Electronically Multiplied CCD), bei der durch elektronische Verstärkung direkt auf dem lichtempfindlichen Chip eine deutliche Verkürzung der Belichtungszeit bei erhöhter Auflösung möglich ist, wurden diese Experimente bereits begonnen. Dadurch kann die mechanische Antwort exakter charakterisiert werden und so werden weitere Hinweise auf die zugrunde liegenden Mechanismen oder beteiligten Biomolekülen erwartet. Durch die ständig steigende verfügbare Rechenleistung kann die bis jetzt künstlich begrenzte örtliche Kraftauflösung erhöht werden, wovon man sich Einblicke in lokale Kraftgenerierungsprozesse und detailliertere Kraftverteilungsmuster innerhalb verschiedener Zelltypen erhofft. Durch alternative Verfahren zur Lösung der Differentialgleichungen (10), wie beispielsweise durch Verwendung von NURBS, könnte ebenfalls eine deutliche Einsparung der Rechenzeit bei möglicherweise höherer Genauigkeit erreicht werden.

Untersuchungen von mechanischen Antworten von Osteoblasten in Cokultur mit verschiedenen Zellen nach mechanischer Stimulation sind ebenfalls vielversprechend, neue Erkenntnisse bezüglich den notwendigen Interaktionen für funktionierendes Remodeling zu liefern. Untersuchungen zur Mechanosensitivität von invasiv wachsenden Zellen sind mit der hier etablierten Methode ebenso denkbar. Eventuelle Besonderheiten im mechanischen Antwortverhalten nach mechanischer Stimulation könnten auf neue Ziele auf dem Weg zu neuen Therapien hinweisen.

Auch müssen die mechanischen Antworten nach Dehnung und Kraftmikroskop-Stimulation in Abhängigkeit von Frequenz und Amplitude näher charakterisiert werden und im Kontext mit mechanischen Antworten nach Scherfluss-Stimulationen interpretiert werden. Im nächsten Schritt soll dann die Frequenz- und Amplitudenabhängigkeit der mechanischen Antwort nach zellulärer Stimulation mit dem frequenz- und amplitudenabhängigen Verhalten von makroskopischen Knochenzylindern nach makroskopischen Belastungen verglichen werden. Diese Untersuchungen sollen dann auch zu optimalen Stimulationsprofilen zur Osteoporoseprophylaxe und -therapie führen.

5 Zusammenfassung

Der Knochen ist in der Lage, sich veränderten mechanischen Bedingungen anzupassen. Bei verminderter Belastung stehen degenerative Prozesse im Vordergrund, bei erhöhter Belastung kommt es zu einer Zunahme der Knochensteifigkeit. Die zellulären Prozesse, die der Wahrnehmung von mechanischen Stimuli und einer veränderten mechanischen Umgebung zu Grunde liegen, sind erst teilweise bekannt. Es gibt wenig Hinweise inwiefern Zellen ihre eigene Umgebung mechanisch mitgestalten oder unter welchen Bedingungen Zellen wie auf mechanische Stimulation reagieren. Im besonderen stellte sich die Frage, ob Zellen auf mechanische Stimulation mit einer mechanischen Antwort reagieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktionskräfte von Osteoblasten mit ihrer Umgebung nach mechanischer Stimulation zu charakterisieren. Die Zugkraftmikroskopie ermöglicht es diese Kräfte zu messen. Dazu werden Zellen auf Kollagen-beschichteten weichen Polyacrylamidgelen mit darin enthaltenen Fluoreszenzmarkern ausgesät. Die Zelle verformt das unter ihr liegende weiche Substrat und dabei verschieben sich die darin enthaltenen Fluoreszenzmarker. Diese Verschiebungen dienen als Ausgangspunkt für die Berechnungen der Zugkräfte.

In dieser Arbeit werden Zugkräfte von Osteoblasten nach zwei verschiedenen Arten der mechanischen Stimulation bestimmt. Zur Applikation von vertikalen Kompressionsreizen auf einzelne Zellen wurde ein Kraftmikroskop, das nach den Prinzipien der Rasterkraftmikroskopie funktioniert, verwendet. Mittels einer Dehnungsmaschine wurden Zellkulturen gleichmäßig uniaxial gedehnt. Für Dehnungsversuche musste dazu die Methode der Zugkraftmikroskopie den veränderten Gegebenheiten angepasst werden. Im Experiment wird eine Zellpopulation auf einem physiologisch weichen Untergrund zyklisch gedehnt (20 Zyklen, 10 Hz, 0,6%) und die Zugkräfte einer einzelnen Zelle quantitativ über die Zeit bestimmt. In einer zweiten Versuchsreihe wurden Zellen mit dem Kraftmikroskop vertikal komprimiert (20 Zyklen, 10 Hz, 300 nN) und die Zugkräfte im zeitlichen Verlauf beobachtet.

Ein Großteil der zyklisch stimulierten Zellen (22/28) weist signifikante Änderungen in den Zugkräften vor und nach Stimulation auf. Standardisiert man die Zugkräfte vor und

nach Stimulation, findet man für beide Versuchsreihen eine Erhöhung der Zugkräfte um über 100%, wobei sich die absoluten Zugkräfte vor und nach Stimulation aber nicht unterscheiden. Osteoblasten reagieren also auf mechanische Stimulationen auch mit einer mechanischen Antwort. Neben den schnellen Zugkraftänderungen konnte nach beiden Arten der zyklischen mechanischen Stimulation nach Stimulation mit dem Kraftmikroskop bei einem Viertel der stimulierten Zellen eine langsame stetige Erhöhung oder Verminderung der Zugkräfte über mehrere Minuten beobachtet werden. Nach Dehnungsstimulation ist bei solchen Zellen, die nach Stimulation erhöhte Zugkräfte aufweisen, eine hohe Varianz der Zugkräfte auffällig. Osteoblasten reagieren also nicht uniform auf alle Arten der mechanischen Stimulation. Dies könnte durch Aktivierung von verschiedenen Signalwegen oder durch Aktivierung unterschiedlicher Mechanosensoren erklärt werden. Nach nicht-zyklischer Stimulation mit dem Kraftmikroskop wurden dagegen nur langsame Änderungen der Zugkräfte beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Frequenz einer mechanischen Stimulation auch eine wichtige Rolle auf zellulärem Niveau spielt.

Nach Dehnungsstimulation traten die stärksten Änderungen der Zugkräfte direkt nach Dehnung auf - meist innerhalb von fünf Sekunden. Calciumaktivierungen und Aktivierung der Erk1/2 MAPKs werden aber erst nach einer Verzögerung von über einer Minute beobachtet. Nach Stimulation mit dem Kraftmikroskop konnten keine physiologischen Calciumaktivierungen beobachtet werden, obwohl Zugkraftänderungen bereits direkt nach Stimulation zu beobachten waren. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen im Kontext, dass erste Zugkraftänderungen nach mechanischer Stimulation unabhängig von einer ganz-zellulären Calciumaktivierung auftreten.

Die hier vorliegende Arbeit gewährt tiefere Einblicke in das zellmechanische Verhalten unter äußerer Belastung. Durch die Anpassung und Etablierung der Zugkraftmikroskopie für mechanische Stimulationsexperimente steht nun ein vielseitiges Instrument zur Verfügung, um Änderungen der zellulären Interaktionskräfte mit ihrer Umgebung nach mechanischer Stimulation genauer zu untersuchen. Auf den hier vorgestellten Ergebnissen aufbauend, wird man daran arbeiten, die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen dieser Kraftänderungen aufzuklären.

6 Anhang

6.1 Literatur

- [1] A.D. Bakker, M. Joldersma, J. Klein-Nulend, and E.H. Burger. Interactive effects of PTH and mechanical stress on nitric oxide and PGE2 production by primary mouse osteoblastic cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285(3):E608-13, 2003.
- [2] N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, D. Rivelino, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol*, 3(5):466-72, 2001.
- [3] J. L. Barron, D. L. Fleet, and S. S. Beauchmin. Performance of Optical flow Techniques. *International Journal of Computer Vision*. 12:43-77, 1994
- [4] T. Bartfai. Preparation of metal-chelate complexes and the design of steady state kinetic experiments involving metal nucleotide complexes. *Advances in Cyc& Nucleic Research*, 10:219-242. Raven Press, New York, 1979
- [5] A.R. Bausch, W. Moller, and E. Sackmann. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers. *Biophys J*, 76(1 Pt 1):573-9, 1999.
- [6] B.R. Beck, K. Kent, L. Holloway, and R. Marcus. Novel, high-frequency, low-strain mechanical loading for premenopausal women with low bone mass: early findings. *J Bone Miner Metab*, 24(6):505-7, 2006.
- [7] J. Bereiter-Hahn. Mechanics of crawling cells. *Med Eng Phys*, 27(9):743-53, 2005.
- [8] Binnig, G., Quate, C., and Gerber, C. *Phys Rev Lett*, 56:930–933, 1986.
- [9] C.P. Brangwynne, F.C. MacKintosh, S. Kumar, N.A. Geisse, J. Talbot, L. Mahadevan, K.K. Parker, D.E. Ingber, D.A. Weitz. Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J Cell Biol*, 173(5):733-41. 2006.

[10] B. Bromme. Charakterisierung der mechanosensitiven Signaltransduktion in Osteoblasten anhand der Extrazellulär Regulierten Kinase / ERK. MD thesis, Philipps-University Marburg, 2000.

[11] M.J. Brown and L.M. Loew. Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent. *J Cell Biol*, 127(1):117-28, 1994.

[12] W.G. Cance, J.E. Harris, M.V. Iacocca, E. Roche, X. Yang, J. Chang, S. Simkins, and L. Xu. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res*, 6(6):2417-23, 2000.

[13] G.T. Charras and M.A. Horton. Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation. *Biophys J*, 82(6):2970-81, 2002.

[14] N.X. Chen, K.D. Ryder, F.M. Pavalko, C.H. Turner, D.B. Burr, J. Qiu, and R.L. Duncan. Ca(2+) regulates fluid shear-induced cytoskeletal reorganization and gene expression in osteoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278(5):C989-97, 2000.

[15] A.I. Chernyavsky, J. Arredondo, E. Karlsson, I. Wessler, and S.A. Grando. The Ras/Raf-1/MEK1/ERK signaling pathway coupled to integrin expression mediates cholinergic regulation of keratinocyte directional migration. *J Biol Chem*, 280(47):39220-8, 2005.

[16] W.D. Clark, E.L. Smith, K.A. Linn, J.R. Paul-Murphy, P. Muir, and M.E. Cook. Osteocyte apoptosis and osteoclast presence in chicken radii 0-4 days following osteotomy. *Calcif Tissue Int*, 77(5):327-36, 2005.

[17] J.P. Cleveland, S. Manne, D. Bocek, and P.K. Hansma. A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy. *Rev of Sci Instruments*, 64:403-405, 1993.

- [18] D.P. Corey. New TRP channels in hearing and mechanosensation. *Neuron*, 39(4):585-8, 2003.
- [19] S. Curtze. Zugkraftanalyse an Osteoblasten. MD thesis, Philipps-University Marburg, 2006.
- [20] S. Curtze, M. Dembo, M. Miron, and D.B. Jones. Dynamic changes in traction forces with DC electric field in osteoblast-like cells. *J Cell Sci*, 117(Pt 13):2721-9, 2004.
- [21] C.M. Davies, D.B. Jones, M.J. Stoddart, K. Koller, E. Smith, C.W. Archer, and R.G. Richards. Mechanically loaded ex vivo bone culture system 'Zetos': systems and culture preparation. *Eur Cell Mater*, 11:57-75; discussion 75, 2006.
- [22] M. Dembo, T. Oliver, A. Ishihara, and K. Jacobson. Imaging the traction stresses exerted by locomoting cells with the elastic substratum method. *Biophys J*, 70(4):2008-22, 1996.
- [23] M. Dembo and Y.L. Wang. Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys J*, 76(4):2307-16, 1999.
- [24] D.E. Discher, P. Janmey, and Y.L. Wang. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751):1139-43, 2005.
- [25] S.W. Donahue, C.R. Jacobs, and H.J. Donahue. Flow-induced calcium oscillations in rat osteoblasts are age, loading frequency, and shear stress dependent. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281(5):C1635-41, 2001.
- [26] A.D. Doyle and J. Lee. Simultaneous, real-time imaging of intracellular calcium and cellular traction force production. *Biotechniques*, 33(2):358-64, 2002.
- [27] O. du Roure, A. Saez, A. Buguin, R.H. Austin, P. Chavrier, P. Silberzan, and B. Ladoux. Force mapping in epithelial cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(7):2390-5, 2005.

- [28] R.L. Duncan and C.H. Turner. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, 57(5):344-58, 1995.
- [29] S. Eckert, Einfluß fetaler Kälberseren als Medienzusatz auf Differenzierung und Proliferation von primären bovinen Osteoblasten. MD thesis, Philipps-University Marburg, 2005.
- [30] B. Efron and R. Tibishirani. Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. *Statistical Science*, 1:54-77, 1986.
- [31] A.J. Engler, M.A. Griffin, S. Sen, C.G. Bonnemann, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or sti- microenvironments. *J Cell Biol*, 166(6):877-87, 2004.
- [32] W. Feneberg, M. Aepfelbacher, and E. Sackmann. Microviscoelasticity of the apical cell surface of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) within confluent monolayers. *Biophys J*, 87(2):1338-50, 2004.
- [33] H.M. Frost. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec*, 219(1):1-9, 1987.
- [34] H.M. Frost. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner*, 2(2):73-85, 1987.
- [35] H.M. Frost. Perspectives: on a "paradigm shift" developing in skeletal science. *Calcif Tissue Int*, 56(1):1-4, 1995.
- [36] C.G. Galbraith and M.P. Sheetz. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(17):9114-8, 1997.

- [37] M.L. Gardel, J.H. Shin, F.C. MacKintosh, L. Mahadevan, P. Matsudaira, and D.A. Weitz. Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science*, 304(5675):1301-5, 2004.
- [38] C. Gaudet, W.A. Marganski, S. Kim, C.T. Brown, V. Gunderia, M. Dembo, and J.Y. Wong. Influence of type I Collagen surface density on fibroblast spreading, motility, and contractility. *Biophys J*, 85(5):3329-35, 2003.
- [39] G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R.Y. Tsien. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260(6):3440-50, 1985.
- [40] A.K. Harris, P. Wild, and D. Stopak. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*, 208(4440):177-9, 1980.
- [41] C.R. Hauck, D.A. Hsia, X.S. Puente, D.A. Cheresh, and D.D. Schlaepfer. FRNK blocks v-Src-stimulated invasion and experimental metastases without effects on cell motility or growth. *EMBO J*, 21(23):6289-302, 2002.
- [42] J. Hert, M. Liskova, and J. Landa. Reaction of bone to mechanical stimuli. 1. Continuous and intermittent loading of tibia in rabbit. *Folia Morphol (Praha)*, 19(3):290-300, 1971.
- [43] M. Hoberg, H.H. Gratz, M. Noll, and D.B. Jones. Mechanosensitivity of human osteosarcoma cells and phospholipase C beta2 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 333(1):142-9, 2005.
- [44] D.A. Hsia, S.K. Mitra, C.R. Hauck, D.N. Strelbow, J.A. Nelson, D. Ilic, S. Huang, E. Li, G.R. Nemerow, J. Leng, K.S. Spencer, D.A. Cheresh, and D.D. Schlaepfer. Differential regulation of cell motility and invasion by FAK. *J Cell Biol*, 160(5):753-67, 2003.
- [45] S. Hu and N. Wang. Control of stress propagation in the cytoplasm by prestress and loading frequency. *Mol Cell Biomech*, 3(2):49-60, 2006

- [46] C.T. Hung, F.D. Allen, S.R. Pollack, and C.T. Brighton. Intracellular Ca^{2+} stores and extracellular Ca^{2+} are required in the real-time Ca^{2+} response of bone cells experiencing fluid flow. *J Biomech*, 29(11):1411-7, 1996.
- [47] J. Iqbal and M. Zaidi. Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun*, 328(3):751-5, 2005.
- [48] P.A. Janmey, J.V. Shah, K.P. Janssen, and M. Schliwa. Viscoelasticity of intermediate filament networks. *Subcell Biochem*, 31:381-97, 1998.
- [49] J.H. Jansen, F.A. Weyts, I. Westbroek, H. Jahr, H. Chiba, H.A. Pols, J.A. Verhaar, J.P. van Leeuwen, and H. Weinans. Stretch-induced phosphorylation of ERK1/2 depends on differentiation stage of osteoblasts. *J Cell Biochem*, 93(3):542-51, 2004.
- [50] G. Jiang, A.H. Huang, Y. Cai, M. Tanase, and M.P. Sheetz. Rigidity sensing at the leading edge through α 5 β 3 integrins and RPTP α . *Biophys J*, 90(5):1804-9, 2006.
- [51] D. Jones and D. Bingmann. How do osteoblasts respond to mechanical stimulation? *Cells And Materials*, 1: 329-340. 1991
- [52] D.B. Jones, G. Leivseth, Y. Sawada, J. Sloten, and D. Bingmann. Application of homogenous, defined strains to cell cultures, pp. 197-219. Society for Experimental Biology, Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
- [53] D.B. Jones, H. Nolte, J.G. Scholubbers, E. Turner, and D. Veltel. Biochemical signal transduction of mechanical strain in osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 12(2):101-10, 1991.
- [54] L.D. Landau and E.M. Lifshitz. Theory of Elasticity, volume 7. Pergamon Press, Oxford, UK, 1986.

- [55] L.E. Lanyon. Using functional loading to influence bone mass and architecture: objectives, mechanisms, and relationship with estrogen of the mechanically adaptive process in bone. *Bone*, 18(1 Suppl):37S-43S, 1996.
- [56] L.E. Lanyon and C.T. Rubin. Static vs dynamic loads as an influence on bone remodelling. *J Biomech*, 17(12):897-905, 1984.
- [57] J.M. Lean, C.J. Jagger, T.J. Chambers, and 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):E318-27, 1995.
- [58] V. Lecaudey and D. Gilmour. Organizing moving groups during morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 18(1):102-7, 2006.
- [59] J. Lee, M. Leonard, T. Oliver, A. Ishihara, and K. Jacobson. Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J Cell Biol*, 127(6 Pt 2):1957-64, 1994.
- [60] Y. Li, Z. Hu, and C. Li. New Method for Measuring Poisson's Ratio in Polymer Gels. *Journal Of Applied Polymer Science*, 50(6):1107-1111, 1993.
- [61] T. Lindl and J. Bauer. Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart-Jena-New York. 1994.
- [62] C.M. Lo, H.B. Wang, M. Dembo, and Y.L. Wang. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*, 79(1):144-52, 2000.
- [63] W.A. Marganski, M. Dembo, and Y.L. Wang. Measurements of cell-generated deformations on flexible substrata using correlation-based optical flow. *Methods Enzymol*, 361:197-211, 2003.
- [64] B.D. Matthews, D.R. Overby, R. Mannix, and D.E. Ingber. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci*, 119(Pt 3):508-18, 2006.

- [65] E. Mennenga-Klopp. Kombinierte Rasterkraft-, Zugkraft-, Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der Mechanotransduktion in Knochenzellen. PhD thesis, Philipps-University Marburg 2005.
- [66] Y. Mikuni-Takagaki. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab*, 17(1):57-60, 1999.
- [67] S.J. Millward-Sadler, M.O. Wright, H. Lee, K. Nishida, H. Caldwell, G. Nuki, and D.M. Salter. Integrin-regulated secretion of interleukin 4: A novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. *J Cell Biol*, 145(1):183-9, 1999.
- [68] S.K. Mitra, D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1):56-68, 2005.
- [69] T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2):55-63, 1983.
- [70] M.G. Mullender, S.J. Dijcks, R.G. Bacabac, C.M. Semeins, J.J. Van Loon, and J. Klein-Nulend. Release of nitric oxide, but not prostaglandin E2, by bone cells depends on fluid flow frequency. *J Orthop Res*, 24(6):1170-7, 2006.
- [71] S. Munevar, Y. Wang, and M. Dembo. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys J*, 80(4):1744-57, 2001.
- [72] C. Neidlinger-Wilke, E.S. Grood, J.H.-C. Wang, R.A. Brand, and L. Claes. Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates. *J Orthop Res*, 19(2):286-93, 2001.
- [73] T. Oliver, M. Dembo, and K. Jacobson. Traction forces in locomoting cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 31(3):225-40, 1995.
- [74] A.M. Palmer, M.A. Messerli, and K.R. Robinson. Neuronal galvanotropism is independent of external Ca(2+) entry or internal Ca(2+) gradients. *J Neurobiol*, 45(1):30-8, 2000.

- [75] M.J. Paszek, N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D.A. Hammer, and V.M. Weaver. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3):241-54, 2005.
- [76] R.J. Pelham, Jr and Y. Wang. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate -exibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(25):13661-5, 1997.
- [77] R.J. Pelham, Jr and Y. Wang. High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Mol Biol Cell*, 10(4):935-45, 1999.
- [78] R.J. Pelham, Jr and Y.L. Wang. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *Biol Bull*, 194(3):348-9; discussion 349-50, 1998.
- [79] H. Pommerenke, E. Schreiber, F. Durr, B. Nebe, C. Hahnel, W. Moller, and J. Rychly. Stimulation of integrin receptors using a magnetic drag force device induces an intracellular free calcium response. *Eur J Cell Biol*, 70(2):157-64, 1996.
- [80] S.M. Ponik, J.W. Triplett, and F.M. Pavalko. Osteoblasts and osteocytes respond differently to oscillatory and unidirectional fluid flow profiles. *J Cell Biochem*, 2006.
- [81] J.M. Radeff, Z. Nagy, and P.H. Stern. Involvement of PKC-beta in PTH, TNF-alpha, and IL-1 beta effects on IL-6 promoter in osteoblastic cells and on PTH-stimulated bone resorption. *Exp Cell Res*, 268(2):179-88, 2001.
- [82] J.M. Radeff, Z. Nagy, and P.H. Stern. Rho and Rho kinase are involved in parathyroid hormone-stimulated protein kinase C alpha translocation and IL-6 promoter activity in osteoblastic cells. *J Bone Miner Res*, 19(11):1882-91, 2004.
- [83] M. Radmacher, M. Fritz, C.M. Kacher, J.P. Cleveland, and P.K. Hansma. Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys J*, 70(1):556-67, 1996.

- [84] M. Radmacher, R.W. Tillamnn, M. Fritz, and H.E. Gaub. From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science*, 257(5078):1900-5, 1992.
- [85] P. Rajagopalan, W.A. Marganski, X.Q. Brown, and J.Y. Wong. Direct comparison of the spread area, contractility, and migration of balb/c 3T3 fibroblasts adhered to fibronectin- and RGD-modified substrata. *Biophys J*, 87(4):2818-27, 2004.
- [86] C.A. Reinhart-King, M. Dembo, and D.A. Hammer. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophys J*, 89(1):676-89, 2005.
- [87] J.P. Rieu, C. Barentin, Y. Maeda, and Y. Sawada. Direct mechanical force measurements during the migration of Dictyostelium slugs using flexible substrata. *Biophys J*, 89(5):3563-76, 2005.
- [88] M. Robbie-Ryan, R. Paci-ci, and M.N. Weitzmann. IL-7 drives T cell- mediated bone loss following ovariectomy. *Ann N Y Acad Sci*, 1068:348-51, 2006.
- [89] L.K. Saxon, A.G. Robling, I. Alam, and C.H. Turner. Mechanosensitivity of the rat skeleton decreases after a long period of loading, but is improved with time off. *Bone*, 36(3):454-64, 2005.
- [90] A.C. Shieh and K.A. Athanasiou. Dynamic compression of single cells. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006.
- [91] A.E. Silver and J.A. Vita. Shear-stress-mediated arterial remodeling in atherosclerosis: too much of a good thing? *Circulation*, 113(24):2787-9, 2006.
- [92] N.A. Sims, B.J. Jenkins, A. Nakamura, J.M. Quinn, R. Li, M.T. Gillespie, M. Ernst, L. Robb, and T.J. Martin. Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res*, 20(7):1093-102, 2005.

- [93] T.C. Skalak and R.J. Price. The role of mechanical stresses in microvascular remodeling. *Microcirculation*, 3(2):143-65, 1996.
- [94] T.F. Slater, B. Sawyer, and U. Strauli. Studies On Succinate-Tetrazolium Reductase Systems III. Points Of Coupling Of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta*, 77:383-93, 1963.
- [95] D. Spector, R. Goldman, and L. Leinwand. *Cells : a laboratory manual*, volume v. 1. Culture and biochemical analysis of cells. Cold Spring Harbor Laboratory, 1998.
- [96] J. Struckmeier. Spektroskopische Untersuchung Intrazellulärer Signaltransduktion in Mechanisch Stimulieren Osteoblasten. PhD thesis, Philipps-Universität Marburg, 2001.
- [97] J. Struckmeier, E. Klopp, M. Born, M. Hofmann, D. Rink, D.B. Jones, and H. Butt. Real-time atomic force -uorescence microscopy on living cells. Proceedings- SPIE the International Society for optical engineering, (4434):142-149, 2001.
- [98] J. Struckmeier, E. Klopp, M. Born, M. Hofmann, J. Tenbosch, and D. Jones. *Rev of Sci Instruments*, 71:4531-4534, 2000.
- [99] N. Tanabe, M. Maeno, N. Suzuki, K. Fujisaki, H. Tanaka, B. Ogiso, and K. Ito. IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. *Life Sci*, 77(6):615-26, 2005.
- [100] A.F. Taylor, M.M. Saunders, D.L. Shingle, J.M. Cimbala, Z. Zhou, and H.J. Donahue. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006.
- [101] J. Tenbosch. Untersuchungen zum Einfluss mechanischer Deformation auf Osteoblasten. PhD thesis, Philipps-University Marburg 1999.

- [102] O. Thastrup, A.P. Dawson, O. Scharff, B. Foder, P.J. Cullen, B.K. Drobak, P.J. Bjerrum, S.B. Christensen, and M.R. Hanley. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions*, 27(1-2):17-23, 1989.
- [103] S. Theoleyre, Y. Wittrant, S.K. Tat, Y. Fortun, F. Redini, and D. Heymann. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15(6):457-75, 2004.
- [104] S. Timonshenko. Theory of elasticity. McGraw-Hill New York, 1934.
- [105] J.S. Torday, J. Sanchez-Esteban, and L.P. Rubin. Paracrine mediators of mechanotransduction in lung development. *Am J Med Sci*, 316(3):205-8, 1998.
- [106] M. Tortonese and M. Kirk. Characterization of application specific probes for SPMs. *SPIE*, 3009:53–60, 1997.
- [107] E. Tzima, M. Irani-Tehrani, W.B. Kiosses, E. Dejana, D.A. Schultz, B. Engelhardt, G. Cao, H. DeLisser, and M.A. Schwartz. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 437(7057):426-31, 2005.
- [108] V. Vogel. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 35:459-88, 2006.
- [109] V. Vogel and M. Sheetz. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(4):265-75, 2006.
- [110] Q. Wang, G.P. Downey, M.T. Herrera-Abreu, A. Kapus, and C.A. McCulloch. SHP-2 modulates interleukin-1-induced Ca²⁺ flux and ERK activation via phosphorylation of phospholipase Cγ1. *J Biol Chem*, 280(9):8397-406, 2005.
- [111] Y. Wang, S. Nishida, H.Z. Elalieh, R.K. Long, B.P. Halloran, and D.D. Bikle. Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*, 21(9):1350-8, 2006.

[112] Y.L. Wang and R.J. Pelham, Jr. Preparation of a flexible, porous polyacrylamide substrate for mechanical studies of cultured cells. *Methods Enzymol*, 298:489-96, 1998.

[113] S.J. Warden, J.A. Hurst, M.S. Sanders, C.H. Turner, D.B. Burr, and J. Li. Bone adaptation to a mechanical loading program significantly increases skeletal fatigue resistance. *J Bone Miner Res*, 20(5):809-16, 2005.

[114] M. Wiemann, D. Busselberg, K. Schirmacher, and D. Bingmann. A calcium release activated calcium influx in primary cultures of rat osteoblast-like cells. *Calcif Tissue Int*, 63(2):154-9, 1998.

[115] J. Wolf. Das Gesetz der Transformation der Knochen. Hirschwild, Berlin, 1892.

[116] T. Yeung, P.C. Georges, L.A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, and P.A. Janmey. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. *Cell Motil Cytoskeleton*, 60(1):24-34, 2005.

6.2 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung 1. Die Mechanostat-Hypothese	7
Abbildung 2. Mechanische Stimulationsarten.....	9
Abbildung 3. Fokaler Kontakt.....	12
Abbildung 4. Mechanotransduktionskaskade.....	13
Abbildung 5. Zufkraftmessung nach Harris	16
Abbildung 6. Prinzip der Zugkraftmessungen.....	17
Abbildung 7. Versuchsaufbau für Dehnungsexperimente.....	18
Abbildung 8. Foto der Dehnungsmaschine.....	19
Abbildung 9. Photographien des Kraftmikroskops.....	21
Abbildung 10. Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops.....	22
Abbildung 11. Steifheit der Zelle.....	23
Abbildung 12. Graph der Kraftmikroskop-Rohdaten einer Glasmessung.....	25
Abbildung 13. Beispiel der Sensitivitätsbestimmung.....	26
Abbildung 14. Kraft-Abstands-Kurve einer Zellmessung.....	27
Abbildung 15. Der Calcium-Farbstoff Fura-2.....	42
Abbildung 16. Funktion von EGTA und Thapsigargin.....	43
Abbildung 17. Stimulationsarten zyklisch vs. konstant.....	45
Abbildung 18. Korrelationsbox und Suchbox.....	51
Abbildung 19. Deformationsmatrix.....	52
Abbildung 20. Mesh.....	54
Abbildung 21. Kraftvektorkarte.....	60
Abbildung 22. Illustration der Bootstrapping-Methode.....	61
Abbildung 23. Immunhistochemischer Osteocalcin-Nachweis.....	64
Abbildung 24. PTH-Stimulations-Experimente.....	65
Abbildung 25. Normierte Zugkräfte vor und nach Dehnung.....	66
Abbildung 26. Beispielzellen mit erhöhten und erniedrigten Zugkräften.....	67
Abbildung 27. Mittlere normierte Zugkräfte der Zellen nach Gruppen.....	68
Abbildung 28. Absolute Zugkräfte dreier Zellen über die Zeit.....	69
Abbildung 29. Zugkräfte vor und nach Dehnung im Überblick.....	70
Abbildung 30. Normierte Zugkräfte von Beispielzellen über die Zeit.....	71
Abbildung 31. Aufschlüsselung der Kräfte nach ihren Komponenten.....	72
Abbildung 32. Normierte Zugkräfte vor und nach zyklischer Kraftmikroskop- Stimulation.....	73

Abbildung 33. Zugkräfte nach Kraftmikroskop-Stimulation.	75
Abbildung 34. Normierte Zugkräfte nach Kraftmikroskop-Stimulation nach Gruppen.	76
Abbildung 35. Differentielles Kraftvektorfeld einer Zelle nach konstanter Stimulation mit mittlerer Kraft.....	78
Abbildung 36. Kraftvektorfeld vor und während der konstanten vertikalen Kompressions-Stimulation.	79
Abbildung 37. Unphysiologische Calciumaktivierung nach Stimulation.	80
Abbildung 38. Intensität des Calcium-Farbstoffs Fura-2 während und nach Kraftmikroskop-Stimulation unter EGTA-Inkubation.	81

6.3 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Agius, Arnold, Aumüller, Babin, Barth, Basler, Baum, Behr, Berger, Bertalanffy, Beyer, Bien, Cetin, Chakravarti, Christiansen, Czubayko, Daut, Dominguez, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Fauchere, Feuser, Fruhstorfer, Geks, Gemsa, Gerdes, Geus, Gotzen, Gress, Griss, Grzeschik, Gudermann, Hamer, Happle, Hasilik, Heeg, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jones, Jacquemin, Jungclas, Kern, Kienapfel, Klenk, Klingmüller, Klose, Köhler, Koolman, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lammel, Lang, Lange, Lengsfeld, Levillain, Lill, Löffler, Lohoff, Louis-Simonet, Maier, Maisch, Max, Moll, Moosdorf, Müller, Nendaz, Neubauer, Noble, Novelline, Oertel, Pagenstecher, Paltiel, Perault-Pochat, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Seitz, Simpson, Sommer, Steiniger, Stiletto, Suske, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wilke, Wirth, Wulf

6.4 Danksagung

Ich danke allen Personen, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit fachlich und menschlich unterstützt haben.

Im besonderen danke ich

- Prof. David B. Jones dafür, dass er mein Interesse an wissenschaftlicher Arbeit gefördert und mich eigenständiges wissenschaftliches Arbeiten gelehrt hat. Zahlreiche, hilfreiche Diskussionen haben zusammen mit der herzlichen Aufnahme in die Arbeitsgruppe entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.
- Dr. Erk Mennenga-Klopp für die Einführung in die Kraftmikroskopie, zahlreiche Diskussionen und für seine „kleine Einführung in das Lösen technischer Probleme“.
- Dr. Sami Curtze für die Einführung in die Zugkraftanalyse und hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen.
- Weng Tan für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussion, die Einführung in die Zellkultur und in die Herstellung der Polyacrylamidgele.
- Marita Kratz, Thorsten Pohl und allen anderen Mitarbeitern und Doktoranden der Experimentellen Orthopädie für deren Hilfe und die kollegiale Zusammenarbeit in stimulierender Atmosphäre.

Ganz besonders danke ich meiner Mutter Marianne Lautenschläger für ihre grenzenlose Unterstützung und meinen lieben Freunden für ihre Unterstützung, den fortwährenden Erfahrungsaustausch und Korrekturlesen.