

# **- Mechanik biologischer Materialien - Von der Zelle zum Gewebe**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

von  
Mathias Daniel Sander

Saarbrücken

2017

Tag des Kolloquiums: 31.05.2017

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Guido Kickelbick

Mitglieder des Prüfungsausschusses:

Univ.-Prof. Dr. Albrecht Ott

Jun.-Prof. Dr. Franziska Lautenschläger

Univ.-Prof. Dr. Ralf Seemann

Dr. Thomas John

---

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

---

---

---

---

# Zusammenfassung

## - **Mechanik biologischer Materialien - Von der Zelle zum Gewebe**

Die mechanischen Eigenschaften lebender Zellen sind grundlegend für biologische Prozesse, wie die Wundheilung oder die Embryogenese. Zellen zeigen eine komplexe, nichtlineare mechanische Antwort, die sich sowohl als zunehmende als auch als abnehmende Steifigkeit äußern kann. Die auftretenden Nichtlinearitäten in der mechanischen Zellantwort und im besonderen ihre Abhängigkeit von Stimulus und Messmethode sind noch nicht verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die nichtlineare mechanische Antwort lebender Fibroblasten auf oszillatorische Stimuli mit steigender Amplitude charakterisiert. Die Resultate zeigen, dass die nichtlineare Zellantwort von der Verformungsgeschichte abhängt. Je nach Vorgeschichte zeigen lebende Zellen unterschiedliche Antworten auf den gleichen oszillatorischen Stimulus. Intrazyklische Versteifungen und interzyklisch abnehmende Steifigkeiten können im gleichen Experiment beobachtet werden. Analogien zu vernetzten Biopolymergelen legen eine inelastische Umordnung des Zytoskeletts und eine resultierende pfadabhängige mechanische Adaption der Zellen als Grundlage der Abhängigkeit der Zellantwort von der Verformungsgeschichte nahe. Eine Modellierung der Ergebnisse mit einem elastoplastischen Kontinuumsmodell und einem dynamischen Filamentmodell unterstützt das mikroskopische Modell der inelastischen Umordnung. Adaptionen des Zytoskeletts können eine wichtige Rolle für einzelne Zellen, Gewebe und Organismen spielen.

## - **Mechanical properties of biological materials - From single cells to tissues**

The mechanical properties of living cells are a major determinant for biological processes, such as wound healing and embryogenesis. Cells exhibit a complex nonlinear mechanical response, including stiffening, softening and an adaptation of cytoskeletal structure. Nonlinearities in the cell mechanical response and especially their dependence on the stimulus and the experimental technique are not yet understood. In this thesis, the nonlinear response of living fibroblast cells is characterized using large amplitude oscillatory shear. The results show that nonlinear cell response depends on the strain history. Cells can exhibit different mechanical responses to identical oscillatory excitations. Fibroblast cells exhibit a superposition of intercycle softening and intracycle stiffening. Analogies to experimental and theoretical work on crosslinked biopolymer gels suggests that inelastic rearrangements of the cytoskeleton and resulting path-dependent mechanical adaptations are responsible for the strain history dependence. Modeling approaches using an elastoplastic continuum model and a dynamic, crosslinked filament model support the microscopic picture of inelastic rearrangements. Adaptations of the cytoskeleton can have an important role for single cells, tissues as well as whole organisms.

---

---

# Danksagung

Ich möchte allen Menschen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Dem Lehrstuhl für biologische Experimentalphysik, und im besonderen Dr. Aravind Pasula, möchte ich für die Hilfe, die Diskussionen und Anregungen danken. Danke an Prof. Dr. Albrecht Ott für die Betreuung und Unterstützung der Arbeit.

Meinen Eltern und meinem Bruder möchte ich für die Unterstützung, den Rückhalt und die Geduld über all die Jahre danken, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht zustande gekommen wäre.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Lieben, Heike und Henrietta, einfach für **alles** was ihr für mich getan habt.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1. Biologische Grundlagen . . . . .	3
2.1.1. Die Zelle . . . . .	3
2.1.2. Modifikation von Zellen . . . . .	8
2.1.3. Gewebe . . . . .	10
2.1.4. Hydra - Modellorganismus zur Untersuchung der Achsenbildung in Zellkollektiven . . . . .	12
2.2. Grundlagen der Rheologie . . . . .	14
2.2.1. Rheologische Modelle . . . . .	15
2.2.2. Das Rotationsrheometer . . . . .	17
2.2.3. Nichtlineare Rheologie . . . . .	21
2.2.4. Nichtlineare Rheologie von Biopolymergelen und Zellen . . . . .	25
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>29</b>
3.1. Zellkultur . . . . .	29
3.1.1. Kultur und Passagierung . . . . .	29
3.1.2. Kryokonservierung . . . . .	30
3.1.3. Medien . . . . .	31
3.1.4. Visualisierung und Veränderungen des Aktin Zytoskeletts . . . . .	32
3.1.5. Kalziumchloridgestützte Transfektion von Zellen . . . . .	33
3.2. Rheometrie . . . . .	34
3.2.1. Einzelzellscherung im Mikroplattenrheometer . . . . .	34
3.2.2. Zellmonoschichtrheologie (ZMR) . . . . .	37
3.3. Mechanik der Atherosklerose in Mäusen . . . . .	42
3.3.1. Präparation der Aortaproben . . . . .	42
3.3.2. Exzentrisches Platte-Platte-Rheometer . . . . .	42
3.3.3. Zugversuche im Rheometer . . . . .	43
3.4. Hydra . . . . .	44
3.4.1. Hydrakultur . . . . .	44
3.4.2. Präparation . . . . .	44

3.4.3. Mikroskopie . . . . .	45
3.4.4. Spezifische Färbung von F-Aktin in Hydra . . . . .	45
3.5. Datenanalyse . . . . .	45
<b>4. Teil I: Mechanik lebender Zellen</b>	<b>47</b>
4.1. Zellmonoschichtrheologie im Haake Mars II Rheometer . . . . .	50
4.1.1. Zellmedium hat keinen Einfluss auf die Messungen an lebenden Zellen . . . . .	50
4.1.2. Rohdaten . . . . .	50
4.1.3. Oszillatorische Anregung - Deformations- und Schubspannungssteuerung . . . . .	52
4.1.4. Einfluss der Trägheit der Messgeometrie . . . . .	58
4.1.5. Verschiebung des Oszillationsnullpunkts . . . . .	59
4.1.6. Einfluss der Zellzahl . . . . .	62
4.1.7. Von der Monoschicht zur einzelnen Zelle . . . . .	62
4.1.8. Diskussion . . . . .	72
4.2. Mechanische Charakterisierung von MCF-7 Brustkrebszellen . . . . .	76
4.2.1. Diskussion und Zusammenfassung . . . . .	80
4.3. Einfluss der Überexpression des TES Proteins auf die Mechanik von HELA Zellen . . . . .	85
4.3.1. Diskussion und Zusammenfassung . . . . .	87
4.4. Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten . . . . .	91
4.4.1. <i>Softening</i> lebender Zellen ist abhängig von der Deformationshistorie . . . . .	92
4.4.2. Einfluss der Anregung auf die Zellantwort . . . . .	96
4.4.3. Intrazyklische Nichtlinearität ist abhängig von der Art der Anregung . . . . .	111
4.4.4. Reversibilität der mechanischen Änderungen . . . . .	120
4.4.5. Fouriertransformationsrheologie - Zellen zeigen mechanische Symmetriebrechung . . . . .	124
4.4.6. Einfluss von pharmakologischen Veränderungen des Zytoskeletts . . . . .	134
4.4.7. Einfluss der Oszillationszeit . . . . .	139
4.4.8. Energiedissipation in LAOS-Anregung lebender Fibroblasten . . . . .	145
4.4.9. Einzelzellscherung im Mikroplattenrheometer . . . . .	150
4.5. Modellierung der nichtlinearen Mechanik von Fibroblasten . . . . .	155
4.5.1. Plastizität und kinematisches Härten - Zelle als Kontinuum . . . . .	155
4.5.2. Filamentnetzwerk - Geometrie der Nichtlinearität . . . . .	162
4.6. Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	176
<b>5. Teil II: Mechanik der Atherosklerose</b>	<b>183</b>
5.1. Exzentrisches Rheometer . . . . .	184
5.2. Zugmessung an Aortastücken . . . . .	185
5.3. Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	189
<b>6. Teil III: Mechanobiologie der Hydraregeneration</b>	<b>191</b>
6.1. Dynamik der ks1 Expression . . . . .	192

---

## Inhaltsverzeichnis

---

6.2. Einfluss des Aktinzytoskeletts auf die Symmetriebrechung . . . . .	194
6.3. Zusammenfassung und Diskussion . . . . .	195
<b>7. Fazit</b>	<b>197</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>199</b>
A.1. Material und Methoden . . . . .	199
A.1.1. Medien . . . . .	199
A.1.2. Herstellung der Mikroplatten . . . . .	199
A.1.3. Präparation der Zellmonoschichtreologie . . . . .	200
A.2. Datenanalyse . . . . .	202
A.2.1. Berechnung mechanischer Größen aus den elektrischen Rohdaten des Rheometers . . . . .	202
A.2.2. Berechnung Schubmodule Einzelzellen . . . . .	206
A.3. Ergebnisse . . . . .	208
A.3.1. Messprotokolle . . . . .	208
A.3.2. Verallgemeinerte Module . . . . .	209
A.3.3. Einzelzellmessungen an RPE-1 Zellen . . . . .	210
A.4. Modelle . . . . .	212
A.4.1. Modifiziertes Eulerverfahren mit variabler Schrittweite zur Lösung des Kontinuumsmodells . . . . .	212
A.4.2. Ergebnisse des Kontinuumsmodells . . . . .	215
A.4.3. Numerische Lösung des Filamentmodells . . . . .	217
A.4.4. Ergebnisse des Filamentmodells . . . . .	223
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>227</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>233</b>

---

# 1. Einleitung

Multizelluläre Lebewesen sind komplexe, hierarchisch strukturierte Systeme [1], [2]. Sie bestehen aus einzelnen Zellen, die sich zu Geweben zusammenlagern. Verschiedene Gewebe bilden Organe und Organsysteme, welche den gesamten Organismus konstituieren. Jeder Teil eines Organismus erfüllt spezifische, strikt regulierte, Aufgaben, die in Wechselwirkung mit der Umgebung ausgeführt werden. Fehlregulationen können zum Entstehen von Krankheiten, wie z.B. Atherosklerose [3] oder Krebs [4, 5] führen. Der Fokus der Forschung liegt häufig auf genetischen Ursachen von Erkrankungen [6, 7, 8, 9]. Seit einigen Jahren etabliert sich allerdings auch das Feld der Mechanobiologie [10], [11], [12]. Diese untersucht die mechanischen Aspekte in biologischen Systemen [13]. Es zeigt sich, dass Änderungen in der Mechanik von einzelnen Zellen häufig Ausgangspunkt von entwicklungsbiologischen Prozessen [14, 15, 16, 17] oder Ursache bzw. Symptom von Krankheiten sind [3, 7, 14, 18, 19, 20, 21]. Trotz großer Anstrengungen steht das Feld der Mechanobiologie noch am Anfang. Dies ergibt sich nicht zuletzt aus der Tatsache, dass die zugrundeliegende Mechanik einzelner Zellen noch nicht vollständig verstanden ist. Dies wiederum erschwert das Verständnis des Zusammenwirkens vieler Zellen mit der extrazellulären Matrix in Geweben und im gesamten Organismus. Es bedarf somit der Untersuchung der Biomechanik auf allen Hierarchieebenen, um die Mechanobiologie tiefgreifend verstehen zu können.

In dieser Arbeit werden Aspekte der Mechanik auf der Ebene der einzelnen Zelle, des Gewebes und des sich regenerierenden Organismus untersucht. Im Folgenden wird kurz der Aufbau der Arbeit dargestellt. Zunächst werden in Kapitel 2 die biologischen und mechanisch-rheologischen Grundlagen zusammengefasst. Im Anschluß werden in Kapitel 3 die verwendeten Materialien und experimentellen Methoden detailliert beschrieben, bevor die Ergebnisse vorgestellt werden. In Kapitel 4 wird die Mechanik einzelner Zellen unter Verwendung der Zellmonoschicht-rheologie untersucht. Der Fokus liegt auf der nichtlinearen Antwort lebender Fibroblasten auf Oszillationen mit großen Amplituden. In Kapitel 5 wird der Einfluß atherosklerotischer Läsionen und des Medikaments Ivabradin auf die Mechanik der Aorta von Mäusen charakterisiert. In Kapitel 6 wird die Mechanobiologie der Hydra Regeneration untersucht. Das Augenmerk liegt dabei auf der Dynamik des Proteins  $\text{ks1}$  und der suprazellulären Aktinstrukturen (Myoneme) während der Hydra Regeneration. Den Abschluß der Arbeit bildet Kapitel 7 mit einem Fazit.



## 2. Grundlagen

### 2.1. Biologische Grundlagen

In diesem Abschnitt werden die Grundlagen der Zell- und Gewebebiologie, sowie der Hydraregeneration vorgestellt.

#### 2.1.1. Die Zelle

Zellen sind die kleinsten Einheiten des Lebens. Sie bestehen aus dem membranumschlossenen Zytosol, einer wässrigen Lösung in die die Zellorganellen eingebettet sind. Zellorganellen sind durch Membranen abgegrenzte Intrazellularräume, in denen bestimmte Aufgaben des Zellstoffwechsels ausgeführt werden. Der Zellkern enthält die genetische Information der Zelle in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNS) Doppelhelix. Mit dem Zellkern verbunden ist das endoplasmatische Retikulum (ER). Das ER ist eine weitverzweigte membranbegrenzte Struktur, die für die Proteinsynthese und -modifikation zuständig ist. Die Synthese der Proteine wird dabei von den in die ER-Membran eingebetteten oder frei im Cytosol verfügbaren Ribosomen übernommen. Des Weiteren dient das ER auch als intrazellulärer Kalziumspeicher und ist somit ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktionswege. Im Golgi-Apparat werden sekretorische Vesikel synthetisiert, die Signalmoleküle aus der Zelle heraus transportieren. Außerdem werden dort Teile der Zellmembran synthetisiert. In den Mitochondrien wird, für die Zelle nutzbare, Energie in Form von Adenosin-triphosphat (ATP) aus den aufgenommenen Nährstoffen hergestellt. Das Zytoskelett verleiht der Zelle mechanische Stabilität und die Fähigkeit Kräfte auszuüben und ihnen zu widerstehen [22], [12]. Zellen sind auf eine streng kontrollierte Interaktion mit ihrer Umgebung angewiesen. Um diese zu gewährleisten wird jede Zelle von der sogenannten Zellmembran, einer 10 nm dicken Lipiddoppelschicht, umschlossen. In die Membran eingebettete Proteinkomplexe erlauben es der Zelle mit ihrer Umgebung zu interagieren. Dies geschieht sowohl in Form von mechanischer Kontaktaufnahme bei der Zelladhäsion und -migration als auch durch den Austausch von Nährstoffen und Signalmolekülen [23, 24].

### 2.1.1.1. Genetische Information - Von der DNS zum Protein

Die genetische Information der Zelle steckt in der Abfolge der Basen innerhalb der DNS-Doppelhelix. Ein DNS-Abschnitt, der für ein Protein codiert wird Gen genannt. Drei Basen bilden dabei ein sogenanntes Codon, welches für eine bestimmte Aminosäure innerhalb des später zu synthetisierenden Proteins steht. Neben den Genen gibt es die regulatorischen Abschnitte der DNS. Sie bilden Bindungsstellen für verschiedenste Moleküle wie Transkriptionsfaktoren, RNS Polymerasen, Helikasen usw. und dienen somit der Regulation der Genexpression und der Proteinsynthese einer Zelle. Die Ribonukleinsäure (RNS) dient u.a. der kurzzeitigen Speicherung und der Übertragung der genetischen Information vom Zellkern zu den Ribosomen. Die genetische Information wird zunächst durch eine RNA-Polymerase in eine *messenger* RNS (mRNS) transkribiert. Die mRNS ist dabei komplementär zu der DNS-Sequenz, wobei die Base Thymin durch Uracil ersetzt ist. Diese mRNS wird aus dem Zellkern geschleust und an den Ribosomen in ein Proteinmolekül übersetzt. Dies geschieht mit Hilfe von Transfer-RNS-Molekülen (tRNS). Diese bestehen aus drei Basen, die komplementär zu einem Codon der mRNS sind. An einem tRNS Molekül ist jeweils die zum komplementären Codon passende Aminosäure angebracht. An den Ribosomen werden dann die tRNS und mRNS zusammengeführt und die an den tRNS-Stücken befindlichen Aminosäuren verbunden. So wird nach und nach das neue Protein aufgebaut.

Proteine erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben in der Zelle. Sie katalysieren biochemische Reaktionen und ermöglichen als Transmembranproteine die Kommunikation mit der Umwelt. Proteinkinasen sind Proteine, die andere Proteine modifizieren können, indem sie an bestimmte Aminosäuren binden und diesen eine Phosphatgruppe hinzufügen. Diese Phosphorylierung ändert die biologischen Eigenschaften eines Proteins. Proteinkinasen ermöglichen somit u.a. die Steuerung der Enzymaktivität einer Zelle. Nicht zuletzt bilden Proteine auch das Zytoskelett, welches im Folgenden näher betrachtet wird. [23, 24].

### 2.1.1.2. Das Zytoskelett

Das Zytoskelett ist ein dynamisches Biopolymernetzwerk, das der Zelle mechanische Stabilität verleiht. Darüber hinaus versetzt es die Zelle in die Lage Kräfte auszuüben und auf äußere mechanische Reize zu reagieren (in Form von Änderungen in der Genexpression, dem Differenzierungszustand oder der mechanischen Polarisierung) [22]. Die drei filamentösen Hauptbestandteile sind die Mikrotubuli, Intermediärfilamente und das Aktin [25], [22], [23].

#### 1. Mikrotubuli

##### **Aufbau**

Mikrotubuli sind starre, röhrenförmige Proteinfilamente mit einem Durchmesser von 25 nm. Sie werden durch die Polymerisation von  $\alpha$ - $\beta$ -Tubulindimeren gebildet. Dreizehn solcher Dimere bilden den Umfang des Tubulus. Durch die Aneinanderreihung von Tubulindimeren ergibt sich ein positives  $\beta$ - und ein negatives  $\alpha$ -Ende. Es entsteht ein polarer Strang, dessen

## 2.1 Biologische Grundlagen

---

„+“-Ende eine höhere Polymerisationsrate aufweist als das „-“-Ende. Das negative Ende der Mikrotubuli ist meist im *microtubule organizing center* (MTOC), welches sich nahe beim Zellkern findet, verankert. Ausgehend vom MTOC erstrecken sich Filamente durch den intrazellulären Raum und können bis zur Zellmembran reichen. Die Mikrotubulidichte ist aufgrund des Ausgangspunkts der Filamente um den Zellkern am höchsten. Da innerhalb der Zelle ein dynamisches Gleichgewicht zwischen monomerem und polymerisiertem Tubulin aufrecht erhalten wird, kann ein sehr schneller Aufbau, aber auch ein rapider Zerfall von Mikrotubulisträngen beobachtet werden (dynamische Instabilität). Die Zelle verfügt darüber hinaus über eine Vielzahl von Proteinen, welche es ihr erlauben, die (De-)Polymerisation zu steuern [26], [23], [24], [27].

### **Aufgaben**

Mikrotubuli bilden „Transportwege“, entlang derer Vesikel und Organellen transportiert werden können [28]. Der aktive Transport erfolgt mit Hilfe der mikrotubuliassoziierten Motorproteine, den Kinesinen und Dyneinen. Diese können eine „Fracht“ aufnehmen und durch ATP-Hydrolyse eine gerichtete Bewegung ausführen. Kinesine bewegen sich dabei zum Plusende, die Dyneine zum Minusende, was einen bidirektionalen Transport erlaubt, der wesentlich schneller ist als die Diffusion.

Mikrotubuli bilden außerdem den Spindelapparat aus, der während der Zellteilung für die exakte Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen sorgt [27]. Des Weiteren spielen Mikrotubuli eine Rolle in der Zellmechanik und der Polarisierung von Zellen während der Migration [28] oder der Entwicklung von Organismen [29], [30].

## 2. Intermediärfilamente

### **Aufbau**

Intermediärfilamente (IF) sind seilartige Filamente mit einem Durchmesser von etwa 10 nm, die ausschließlich in tierischen Zellen vorkommen. IF bilden eine Proteinfamilie, die anhand der strukturellen Unterschiede in fünf Klassen unterteilt werden kann. Beispiele sind Keratin, Vimentin, Desmin und Lamin. Gemeinsam ist eine superspiralisierte (*coiled coil*) Domäne bestehend aus  $\alpha$ -Helices. Bis auf dieses zentrale Motiv unterscheiden sich die Intermediärfilamente strukturell sehr stark. Sie bestehen meist aus monomeren Filamenten, die zunächst zu Dimeren verdrillt werden. Zwei Dimere werden leicht versetzt angeordnet und zu einem Tetramer verknüpft. Acht dieser Tetramere bilden ein seilartiges Filament, welches dann als Intermediärfilament bezeichnet wird. Intermediärfilamente zeigen eine wesentlich langsamere (De-)Polymerisation als Mikrotubuli und Aktinfilamente. Sie sind jedoch ebenso als dynamische Strukturen anzusehen. Intermediärfilamente weisen keine Polarität auf. Bisher wurden keine assoziierten Motorproteine gefunden. IF sind die am wenigsten charakterisierten Zytoskelettbestandteile, weshalb auch einige Unklarheit über die genauen Aufgaben herrscht. [31], [32], [23], [24]

### **Aufgaben**

Lamine bilden ein dem kortikalen Zytoskelett ähnliches Gerüst im Zellkern, welches diesen

stabilisiert. Intermediärfilamente finden sich aber auch im Zytosol. Sie tragen zur mechanischen Stabilität der Zellen [33] bei und sind Teil der Desmosomen, die Zellen in Gewebe verbinden [32]. Neuere Arbeiten zeigen, dass IF auch eine Rolle in dynamischen Prozessen, wie der Zelladhäsion [34] und -migration [35] spielen.

Das IF-Zytoskelett ist stark mit den anderen Zytoskelettbestandteilen vernetzt.

### 3. Aktinfilamente

#### **Aufbau**

Aktinfilamente, auch Mikrofilamente genannt, sind dünne semiflexible Strukturen mit einem Durchmesser von etwa 7 nm. Ein Filament besteht aus zwei Ketten von aneinandergereihten Aktinmonomeren, dem sogenannten globulären Aktin (G-Aktin), die sich in einer Helixstruktur anordnen [36]. Es ergibt sich ein polares Filament, das durch Hinzufügen von Monomeren wachsen kann. Am Plusende des Filaments überwiegt die Polymerisation, während am Minusende die Depolymerisation dominiert. Dadurch ergibt sich der sogenannte Tretmühlenmechanismus (*treadmilling*), der ein gerichtetes Wachstum des Stranges zur Folge hat [23, 24, 37, 38]. Es existiert eine Vielzahl von assoziierten Proteinen (*actin binding proteins*, ABPs), die eine Kontrolle und Steuerung des Aktinwachstums und der Vernetzung erlauben.

#### **Aufgaben**

Mikrofilamente verleihen einer Zelle mechanische Stabilität. Auf der Zytosolseite der Zellmembran bildet Aktin ein dichtes, engmaschiges Netz, das sogenannte kortikale Zytoskelett mit einer Maschenweite von wenigen Nanometern [39]. Im Zellinnern findet sich ein Netzwerk aus Aktinfilamenten und -bündeln, das eine wesentlich größere Maschenweite und wesentlich längere Filamente aufweist [22, 38]. Gemeinsam stabilisieren diese Aktinstrukturen die Form der Zelle [39]. Die Polymerisation von Aktinfilamenten ermöglicht die Ausbildung von Filopodien, die während der Zellmigration von entscheidender Bedeutung sind. Das Aktinzytoskelett wird durch eine Vielzahl an Proteinen, wie z.B. Filamin oder  $\alpha$ -Aktinin vernetzt. Mikrofilamente besitzen, wie Mikrotubuli, assoziierte Motorproteine (Myosine) [40, 41]. Das Zusammenspiel aus dynamischer Vernetzung und der Bewegung durch Motorproteine erlaubt es der Zelle auf mechanische Stimuli aus der Umwelt zu reagieren und auch Kräfte auszuüben [42]. Die Kontraktion einer Zelle basiert auf der, durch Motorproteine verursachten, relativen Translation von Aktinfilamenten innerhalb des kortikalen Zytoskeletts, innerhalb von Stressfasern (Abschnitt 2.1.1.3) oder von Sarkomerstrukturen [38, 43]. Der kontraktile Ring, der eine Zelle in zwei Tochterzellen teilt, besteht aus Aktinfilamenten und Motorproteinen [23, 37].

#### **2.1.1.3. Stressfasern (*stress fibres*)**

Zellkontraktilität in Nichtmuskelzellen basiert hauptsächlich auf Stressfasern. Stressfasern bestehen aus 10-30 Aktinfilamenten, die durch  $\alpha$ -Aktinin und Myosin II Motoren vernetzt sind [44, 45]. Fluoreszenzaufnahmen zeigen, dass sich Myosin- und  $\alpha$ -Aktinin Bündel abwechseln [44].

## 2.1 Biologische Grundlagen

In unipolaren Fasern (Aktinfilamente sind alle parallel angeordnet) können die Motoren Proteine transportieren [44]. Dies ist ein wichtiger Schritt im Reifungsprozess von fokalen Adhäsionen (Siehe Abschnitt 2.1.1.4). In Fasern mit antiparallelen Aktinfilamenten können die Motoren eine Kontraktion der Faser hervorrufen und so z.B. über die Integrinkontakte Kräfte auf die extrazelluläre Matrix ausüben (Siehe Abbildung 2.1) [44], [46], [42]. Man unterscheidet drei Arten von Stressfasern, die dorsalen, ventralen und die transversalen [44]. Erstere sind an einem Ende mit einem fokalen Adhäsionskontakt verbunden, während das andere Ende frei im Zytosol verbleibt. Ventrale Fasern sind mit beiden Enden in Adhäsionen verankert. Transversale Fasern kommen hauptsächlich in motilen Zellen vor. Sie stehen parallel zur Bewegungsfront (*leading edge*) der Zelle [44, 45].

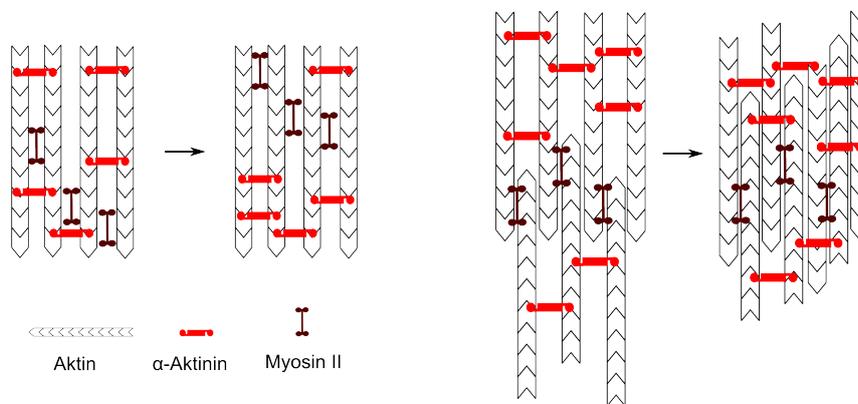


Abbildung 2.1.: Aufbau und Funktionsweise von Aktin Stressfasern nach [44]. Links: Aktinfilamente sind parallel angeordnet. Motorproteine können entlang der Filamente wandern und Frachten transportieren. Eine relative Verschiebung der Filamente durch die Motoren ist nicht möglich. Rechts: Aktinfilamente mit paralleler und antiparalleler Ausrichtung. Motoren können die Filamente gegeneinander verschieben. Bei koordinierter Aktivität kommt es zu einer Verkürzung der Stressfaser.

### Entstehung

Dorsale Stressfasern entstehen an fokalen Adhäsionskontakten. Aktinfilamente, die mit  $\alpha$ -Aktinin vernetzt sind wachsen in das Zytosol. Nach und nach wird Myosin II in die Struktur eingebaut, wobei  $\alpha$ -Aktinin teilweise verdrängt wird [45].

Ventrale Stressfasern entstehen durch das Zusammenwachsen zweier dorsaler Fasern. Die genaue Entstehung der transversalen Fasern ist noch nicht vollständig geklärt [45]. Diese sind für diese Arbeit unwichtig, da sie nur in motilen Zellen vorkommen und werden daher nicht weiter besprochen.

#### 2.1.1.4. Zelladhäsion auf Oberflächen

Zellmembranen enthalten Transmembranproteine, wie z.B. die Integrine, welche an Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM), wie Fibronectin und Kollagen, binden können [23]. Im Innern der Zelle sind die Integrine über ein komplexes Proteingerüst mit dem Aktinzytoskelett, und somit dem kontraktilem Apparat der Zelle verbunden. Somit wird die Zelle in ihrer Umgebung verankert und in die Lage versetzt mechanische Stimuli zu spüren und auszuüben [11, 23, 24, 42].

Der Prozess der Zelladhäsion wird in drei Phasen aufgeteilt [47]. In der ersten Phase entsteht eine schwache Adhäsion dadurch, dass die extrazelluläre Domäne des Integrins an Fibronectin oder Laminin bindet. Im Innern der Zelle verbindet das Protein Talin die Zytosoldomäne des Integrins mit dem Aktinzytoskelett. Diese *nascent adhesion* genannten Strukturen können entweder dissoziieren oder zunächst zu fokalen Kontakten und dann zu fokalen Adhäsionen reifen [47]. Im Verlauf dieser Reifung werden weitere Proteine, wie Vinculin,  $\alpha$ -Aktinin und Myosin II rekrutiert, die eine Vernetzung mit dem Zytoskelett bewerkstelligen und schlussendlich eine Verbindung mit kontraktilem *stress fibres* (Siehe Abbildung 2.2) herstellen [47, 48]. Außerdem findet eine weitere Rekrutierung von Integrinen statt [49].

Die Dynamik von Adhäsionskontakten wird durch mechanische Stimuli beeinflusst [42, 50, 51, 52]. Das Protein Zyxin spielt eine wichtige Rolle bei der Reparatur von *stress fibres*, die durch mechanische Beanspruchung zerstört wurden [53].

#### 2.1.2. Modifikation von Zellen

Um den Einfluss bestimmter Bestandteile (Proteine, RNS-Moleküle usw.) der Zelle auf die Zelleigenschaften zu untersuchen, wurden in der Molekularbiologie verschiedene Methoden entwickelt, um Zellen zu modifizieren [54, 55]. Die Expression bestimmter Gene kann ausgeschaltet oder verstärkt werden. Ein Gen kann jedoch auch nach Wunsch verändert werden, indem es z.B. mit der DNA-Sequenz eines Fluoreszenzfarbstoffs gekoppelt wird. Somit kann das exprimierte Protein später per Fluoreszenzmikroskopie betrachtet werden. Im Folgenden werden die Grundlagen der in dieser Arbeit verwendeten pharmakologischen Wirkstoffe und der Transfektionsmethoden erläutert.

##### 2.1.2.1. Pharmakologische Wirkstoffe

- Glutaraldehyd

Glutaraldehyde ist eine organische Verbindung (Strukturformel  $CH_2(CH_2CHO)_2$ ), die bei der industriellen Herstellung einiger Chemikalien anfällt. Es wird in der Biologie z.B. zur Fixierung von Gewebe verwendet. Glutaraldehyd vernetzt dabei die in der Zelle vorhandenen Proteine und fixiert somit das Zytoskelett [56, 57].

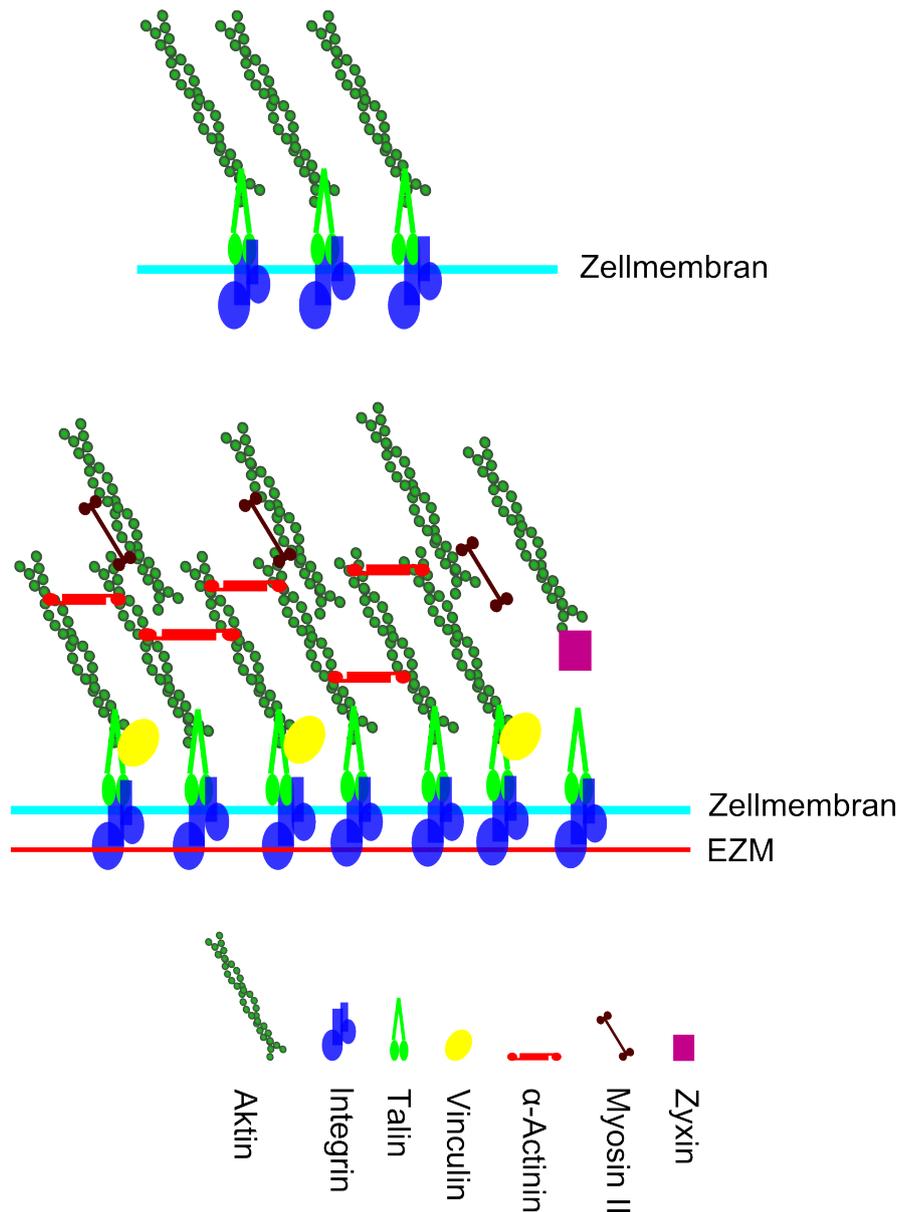


Abbildung 2.2.: Schematische Darstellung der Entstehung fokaler Adhäsionen nach [47]. Oben: Initialer Adhäsionskontakt (*nascent adhesion*). Die extrazelluläre Domäne des Integrins ist mit der extrazellulären Matrix verbunden. Im Innern der Zelle verbindet das Protein Talin die Zytosoldomäne des Integrins mit dem Aktinzytoskelett. Mitte: Während der Reifung der Adhäsionskontakte werden weitere Proteine, wie Vinculin,  $\alpha$ -Aktinin und Myosin II rekrutiert. Dadurch werden die Adhäsionskontakte verstärkt und es entstehen Stressfasern, die die EZM mit dem kontraktilem Apparat der Zelle verbinden. Unten: Legende.

- Y27632  
Y27632 ist ein selektiver *Rho associated protein kinase* (Rock) Inhibitor. Rock ist eine Proteinkinase (Siehe Abschnitt 2.1.1.1), die bei der Bildung von Stressfasern und fokalen

Adhäsionen eine wichtige Rolle spielt. Y27632 führt zu einem Abbau der Stressfasern und einer verringerten Kontraktilität der Zellen [58, 59, 60].

### 2.1.2.2. Transfektion mit DNA-Vektoren

Zirkulare DNA-Stücke, sogenannte DNA-Vektoren, können in Zellen eingeschleust werden, um die Proteinexpression eines bestimmten Proteins zu verstärken, oder eine modifizierte Form eines Proteins in die Zelle einzubringen (z.B. fluoreszenzmarkierte Proteine). Ein DNA-Vektor besteht aus einem für die Zelle lesbaren Promotor (zum Starten der Transkription) und der Sequenz des gewünschten Gens. Es kann noch die Sequenz für eine Antibiotikaresistenz hinzugefügt werden [54].

Der Vektor wird mit Hilfe eines Transfektionsreagens, durch Mikroinjektion oder Elektroporation in die Zelle eingebracht [54]. Ist dies gelungen, so wird die Gensequenz transkribiert und schließlich in das gewünschte Protein translatiert. Durch die Zugabe des gewählten Antibiotikums zum Zellmedium können die Zellen selektiert werden, die den Vektor aufgenommen haben [61] (Volume 3).

### 2.1.3. Gewebe

Gewebe ist ein Zusammenschluss vieler Zellen und einer diese umgebenden extrazellulären Matrix. Es gibt verschiedene Arten von Gewebe. Das Epithelgewebe bildet die inneren und äußeren Oberflächen eines Organismus. Bindegewebe sorgt für den strukturellen Zusammenhalt des Organismus. Muskelgewebe kann durch Kontraktion Kräfte ausüben und Bewegungen ausführen. Nervengewebe bildet das Gehirn und den sensorischen Apparat [23, 62].

#### 2.1.3.1. Aufbau

Gewebe besteht aus einzelnen Zellen, die untereinander und mit der vorhandenen extrazellulären Matrix verbunden sind. Die Adhäsion erfolgt im Falle der extrazellulären Matrix analog zu den in Abschnitt 2.1.1.4 vorgestellten Mechanismen, wobei noch sogenannte Hemidesmosomen hinzukommen, die eine Verbindung der Proteine der EZM mit den Intermediärfilamenten herstellen. Zellen eines Gewebes sind untereinander über die Wechselwirkung spezieller Transmembranproteine, den Cadherinen, verbunden. Im Innern der Zellen binden die Cadherine über Proteine wie z.B. Vinculin und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin an das Aktinzytoskelett. Letzteres bildet einen Adhäsionsgürtel, der dem Epithel seine Zugfestigkeit verleiht. Zusätzlich existieren sogenannte Desmosomen, Zell-Zell-Verbindungen, die mit den Intermediärfilamenten verbunden sind. *Tight junctions* stellen Verbindungen mit dem Aktinzytoskelett her. Sie führen zu einer „Abdichtung“ des Gewebes indem sie eine starke Annäherung der Zellen herstellen. Dadurch können durch das Epithel Konzentrationsunterschiede zwischen verschiedenen Bereichen des Organismus aufgebaut und kontrolliert

## 2.1 Biologische Grundlagen

---

werden [23, 24, 62]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Messungen an Aortenstücken von Mäusen durchgeführt. Daher soll die Aorta im Folgenden genauer betrachtet werden.

### 2.1.3.2. Aorta

Im menschlichen Körper wird durch das Schlagen des Herzens ein steter Blutstrom durch die Blutgefäße gewährleistet. Dies ermöglicht den Transport von lebenswichtigen Nährstoffen durch den ganzen Organismus [62]. Die Aorta ist ein großes Blutgefäß, welches direkt aus der linken Herzkammer entspringt. Durch die Kontraktion des Herzmuskels wird Blut in die Aorta und somit in den Blutkreislauf gepumpt [63]. Die Aorta, wie alle größeren Blutgefäße, besteht aus drei Schichten [62, 63, 64]:

- *Tunica interna*  
Diese besteht aus einer Schicht von Endothelzellen, die auf einer Basalmembran verankert sind. Die Endothelzellen sind entlang des Blutflusses ausgerichtet und regeln den Stoffaustausch mit dem umliegenden Gewebe. Es folgt eine Schicht aus Bindegewebezellen und häufig eine Membran, die die *Tunica interna* von der angrenzenden *Tunica Media* abgrenzt.
- *Tunica media*  
Die *Tunica media* besteht aus einer, je nach Gefäßart unterschiedlich ausgeprägten, Schicht von Muskelzellen. Die absteigende Aorta gehört zu den muskulären Gefäßen, bei denen die Schicht der Muskelzellen stark ausgeprägt ist. Bei den Blutgefäßen nahe des Herzens (aufsteigende Aorta) handelt es sich um elastische Gefäße, bei denen die Muskelzellschicht weniger ausgeprägt ist. Die *Tunica media* wird durch eine Membran von der folgenden *Tunica externa* abgetrennt.
- *Tunica externa*  
Die *Tunica externa* besteht aus lockerem Bindegewebe, welches das Blutgefäß in umgebendes Gewebe einbettet. Im Falle großer Blutgefäße enthält es auch kleine Blutgefäße zur Nährstoffversorgung des Bindegewebes.

Durch den Herzschlag und den entstehenden Blutfluss ist die Aorta ständiger mechanischer Spannung ausgesetzt [63]. Um ein fehlerfreies Funktionieren des Blutkreislaufs zu gewährleisten sind definierte mechanische Eigenschaften der Aorta unabdingbar [64]. Diese Eigenschaften werden aber von einigen Krankheiten verändert, so zum Beispiel im Falle der Atherosklerose [20, 65].

### 2.1.3.3. Atherosklerose

Erkrankungen der Koronararterie durch Atherosklerose gehören mit zu den häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt [66]. Atherosklerose ist eine chronische Entzündung der Blutgefäße, die durch eine Fehlregulierung des Lipidmetabolismus und eine dadurch verursachte unangepasste

Immunreaktion entsteht [66, 67]. Wie in Abschnitt 2.1.3 erläutert wurde sind Endothelien für den gezielten und selektiven Stofftransport durch das Gewebe verantwortlich. Eine Fehlsteuerung dieser Selektivität markiert den Beginn von Atherosklerose. *Low density lipoproteins* (LDLs) gelangen durch die Endothelbarriere in den subendothelialen Raum, wo sie modifiziert, z.B. oxidiert, werden können. Dadurch werden sie zu Zielen für das Immunsystem des Körpers [66, 67]. Das Endothel wird lokal aktiviert. Immunzellen werden rekrutiert und migrieren in das subendotheliale Gewebe. Dort differenzieren sie zu Phagozyten, nehmen die oxidierten Lipoproteine auf und werden zu cholesterinbeladenen Schwammzellen (*foam cells*) [68]. Das erste Stadium einer atherosklerotischen Lesion besteht aus ebendiesen Schwammzellen, die das subendotheliale Gewebe nicht mehr verlassen können. Nach und nach akkumulieren sich apoptotische Schwammzellen, Zellfragmente und Cholesterinkristalle und bilden einen nekrotischen Kern der Lesion. Es werden immer weiter Immunzellen rekrutiert, so dass die Lesion nach und nach wächst. Hinzu kommen noch glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells* SMCs) und von diesen produzierte extrazelluläre Matrix. Zusammen ergibt sich dann eine sogenannte fibröse Lesion. Diese Läsionen führen zu einer mechanischen Beanspruchung des Blutgefäßes und zu einer erhöhten Scherspannung durch den Blutfluß, was das Blutgefäß anfälliger für Rissbildung werden lässt. Blutgefäße spielen durch ihre elastischen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Blutflusses und des Blutdrucks. Durch die Entstehung fibröser Läsionen mit nekrotischem Kern werden diese Eigenschaften jedoch verändert. Das Gefäß verliert an Elastizität und kann seine Regulationsaufgaben nicht mehr korrekt erfüllen [20, 66, 67].

#### **2.1.4. Hydra - Modellorganismus zur Untersuchung der Achsenbildung in Zellkollektiven**

Hydra ist ein Süßwasserpolyt und gehört zum Stamm der Nesseltiere (*Cnidaria*) [69, 70, 71]. Der Organismus besteht aus einem zylinderförmigen Körper. Dieser besteht aus zwei Zellschichten, dem Ektoderm und Endoderm, welche durch eine, Mesoglea genannte, Membran bestehend aus Proteinen der extrazellulären Matrix getrennt sind. Der Körper der Hydra hat an einer Seite einen Fuß zur Verankerung in der Umgebung, und an der anderen einen „Kopf“ mit einer Körperöffnung, die von etwa 5-12 Tentakeln umgeben ist. Mit Hilfe der Tentakeln kann eine Hydra Beute fangen und diese über die Mundöffnung zur Verdauung in die Körperhöhle befördern. Die Vermehrung erfolgt meist asexuell über sogenannte Knospung (*budding*). Es kommt zu einer Gewebeausstülpung bei etwa 1/3 der Körperlänge. Dieses Gewebe wächst und entwickelt sich nach und nach zu einer vollständigen Hydra, die sich vom Ursprungsorganismus abtrennt. Bei ungünstigen Umgebungsbedingungen kann sich eine Hydra auch auf sexuell Weg reproduzieren. [69]. Die sexuelle Reproduktion von Hydra spielt für diese Arbeit keine Rolle und wird daher nicht weiter betrachtet. Hydren zeigen eine erstaunliche Regenerationsfähigkeit. Sie können abgetrennte Körperteile ersetzen. Darüber hinaus können sich kleine Gewebestücke zu einer kompletten Hydra regenerieren [72, 73, 74]. Die Regeneration von Gewebestücken ist die Basis der hier vorgestellten Arbeit.

## 2.1 Biologische Grundlagen

---

### 2.1.4.1. Regeneration von Gewebestücken

Der Ausgangspunkt der betrachteten Regenerationen ist ein kleines Gewebestück aus dem mittleren Teil des zylindrischen Körpers einer Hydra. Das Gewebestück formt innerhalb von ein bis zwei Stunden eine Hohlkugel. Diese Hohlkugel besteht aus den zwei ursprünglichen Zellschichten und der Mesoglea. Die Kugel beginnt nach einiger Zeit zu oszillieren. Durch osmotisch generierten Zufluss von Wasser ins Innere der Kugel erfolgt eine Zunahme des Volumens bis es zum Reißen der Zellschicht und einem Austritt der Flüssigkeit aus der Kugel kommt. Das Aufblähen erfolgt isotrop und wiederholt sich etwa 3-5 mal (Phase 1). Dann kommt es zu anisotropen Oszillationen (Phase 2). Das Gewebe ist jetzt nicht mehr kugelförmig, sondern oszilliert in einer ellipsoiden Form. Es findet also ein sehr abrupter Übergang zwischen einem isotropen und einem anisotropen Zustand statt. Mit diesem Übergang hat sich die Achse, der sich regenerierenden Hydra, gebildet [72, 73, 75, 76]. Es ist immer noch unklar, wie es ausgehend von einem isotropen Ausgangszustand zur Bildung einer Achse kommt und wie deren Ausrichtung determiniert wird. Der Prozess der Musterbildung und auch der Achsenbildung wurde vielfach über Reaktions-Diffusions-Modelle beschrieben [77]. Durch die Wechselwirkung zweier *Morphogene*, die unterschiedliche Diffusionskonstanten besitzen, kommt es zur Bildung charakteristischer Muster (*Turing patterns*) [77, 78]. In der Hydra konnten bisher jedoch keine solchen Mechanismen gefunden werden, die zu Beginn der Achsenbildung vorhanden wären. Daher wurde vorgeschlagen, dass es sich um einen Prozess kritischer Selbstorganisation (*Self Organized Criticality*) handeln könnte [73].

### 2.1.4.2. Selbstorganisierte Kritikalität

Der abrupte Übergang zwischen isotropen und anisotropen Oszillationen, an dem die Achse der Hydra fixiert wird, führte zu der Idee dass die Hydra während der isotropen Oszillationen ohne äußere Einflüsse (selbstorganisiert) einem kritischen Punkt entgegenstrebt [73]. Ein kritischer Punkt bezeichnet in der Physik den Übergangspunkt zwischen zwei Phasen (z.B. flüssig-gasförmig), an dem der Unterschied zwischen den Phasen verschwindet. In der Nähe eines kritischen Punktes wird das System durch langreichweitige Potenzgesetze (im Unterschied zu kurzreichweitigen Exponentialgesetzen) beschrieben. Eine kleine Störung des Systems führt dann zu einer systemweiten Antwort und kann beispielsweise zum Phasenübergang führen. Für die Hydra würde dies bedeuten, dass sie am Übergang von Phase 1 zu Phase 2 für kleinste Störungen empfindlich sein sollte. Dies wurde mit Hilfe von Experimenten gezeigt, die die Achsenbildung in einem Temperaturgradienten untersuchen [73]. Selbst für kleine Gradienten (0,6 °C) richtet sich die Achse der Hydra parallel zum Gradienten aus. Der Kopf bildet sich dabei für kleine Gradienten vorzugsweise auf der wärmeren Seite. Der Gradient hat jedoch nur einen Einfluss, wenn er noch in der Phase 1 angelegt wird.

Ein weiterer wichtiger Punkt im Rahmen der selbstorganisierten Kritikalität sind Fluktuationen innerhalb des Systems. Die Auftrittswahrscheinlichkeit von Fluktuation größer als  $s$  nimmt mit

steigender Größe  $s$  ab und zwar mit einem Exponentengesetz  $P(s \geq) \propto s^{-\beta}$ , wobei  $\beta < 0$ . Das einfachste Modell, das dieses Verhalten zeigt ist das sogenannte Sandhaufenmodell. Man betrachtet dabei ein Schachbrettmuster. Zu jedem Zeitpunkt  $t_i$  wird ein Sandkorn zufällig an einer Stelle platziert. Befinden sich auf einem Feld mehr als vier Sandkörner, so kommt es zu einer Umverteilung. Die Körner werden auf die vier benachbarten Felder verteilt. Nun kann es durch diese Umverteilung dazu kommen, dass ein benachbartes Feld auch die kritische Sandkornzahl erreicht und es wiederum zu einer Umverteilung kommt. Nach und nach kommt es somit zur Entstehung großer *Lawinen*. Eine kleine Störung (die Zugabe eines Sandkorns) kann also zu einer systemweiten Reaktion führen, was man als kritisches Verhalten bezeichnet. Dabei strebt das System von selbst dem kritischen Punkt zu. Es kann gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Lawine, die größer als  $s$  Felder ist einem Potenzgesetz  $P(s \geq) \propto s^{-\beta}$  folgt [79].

In der Hydra konnten skalenfreie Verteilungen der mRNS des *ks1*-Gens beobachtet werden, die einem solchen Potenzgesetz folgen [73]. Die genauen Aufgaben, die *ks1* übernimmt sind immer noch unklar. Es ist jedoch bekannt, dass *ks1* als sehr frühes Anzeichen für die Kopfbildung gesehen werden kann (*head forming potential*) [80, 81]. Gamba et al. haben daher ein Modell basierend auf der Idee des Sandhaufenmodells vorgeschlagen [82]. Die Hydrakugel wird in hexagonale Zellen aufgeteilt. Ein (unbekannter) Faktor  $X$  wird mit einer Rate  $\nu$  innerhalb der Zellen produziert und mit einer Rate  $\mu$  wieder abgebaut. Überschreitet die Konzentration von  $X$  einen Schwellenwert, kommt es zur Umverteilung auf die benachbarten Zellen, wobei ein gewisser Prozentsatz  $C$  verloren geht. Außerdem beginnt die Zelle, die den Schwellenwert überschritten hat, *ks1* zu produzieren. Das Modell gibt die skalenfreie Verteilung der mRNS sehr gut wieder. Die Natur des Faktors  $X$  ist bisher jedoch nicht bekannt.

## 2.2. Grundlagen der Rheologie

Die Rheologie ist die Lehre vom Fließ- und Verformungsverhalten von Materialien. Sie umfasst eine Vielzahl von Methoden zur Untersuchung der Mechanik verschiedenster Materialien, angefangen von Stahl bis hin zu Hautcremes, Ketchup uvm. Die relevanten Messgrößen sind die wirkende Kraft bzw. die mechanische Spannung, die Verformung und die Verformungsgeschwindigkeit des Materials. Bei der Bestimmung der Materialeigenschaften wird entweder eine Kraft aufgebracht und die entstehende Verformung bestimmt oder umgekehrt die Kraft gemessen, die für eine definiert aufgebrachte Verformung nötig ist [83]. Für diese Arbeit sind zwei Arten der Verformung relevant:

### 1. Zug und Kompression

Beim Zug oder Kompressionsversuch führt eine Krafteinwirkung zu einer Verlängerung oder einer Stauchung der Probe bzw. umgekehrt. Die Kraft wirkt dabei senkrecht zur Probenoberfläche. Die relevanten Größen sind die Kraft  $F$  oder mechanische Spannung  $\sigma = \frac{F}{A}$  (Kraft pro Fläche), die Streckung  $\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$  mit der Ruhelänge  $l_0$ , der Längenänderung  $\Delta l$  und die

## 2.2 Grundlagen der Rheologie

---

Streckungsgeschwindigkeit  $\dot{\epsilon}$ .

### 2. Scherung

Bei der Scherung wirkt die angelegte Kraft parallel zur Probenoberfläche. Die relevanten Größen sind die Schubspannung  $\tau = \frac{F}{A}$  (Kraft pro Fläche), die Deformation  $\gamma = \frac{s}{h}$  und die Deformationsrate  $\dot{\gamma}$ .  $s$  bezeichnet dabei die Scherstrecke,  $h$  die Probenhöhe.

Im nächsten Abschnitt werden zunächst die grundlegenden rheologischen Modelle zur Beschreibung der Mechanik von Materialien vorgestellt. Anschließend wird das Rotationsrheometer vorgestellt.

### 2.2.1. Rheologische Modelle

Mittels rheologischer Messungen kann für ein gegebenes Material die wirkende Kraft als Funktion der Verformung und der Verformungsgeschwindigkeit oder umgekehrt bestimmt werden. Um Materialverhalten vorhersagen zu können, werden rheologische Modelle entwickelt, die die Kraft/Spannung und den Verformungszustand funktional miteinander verknüpfen. Im Folgenden werden die grundlegenden Elemente dieser vereinfachten Modelle erläutert. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf Schermessungen. Daher werden die rheologischen Modelle für Scherungen vorgestellt. Sie gelten analog für Streckungen.

#### 2.2.1.1. Elastizität

Elastizität, dargestellt durch ein Federelement, bezeichnet die Eigenschaft eines Materials, sich unter Krafteinwirkung zu verformen und bei Wegfall der Kraft wieder in seinen Ursprungszustand zurückzukehren. Im einfachsten Falle gilt ein linearer Zusammenhang zwischen Kraft und Verformung (Hooke'sches Gesetz) [84]:

$$\tau = G\gamma \quad (2.1)$$

$G$  ist im Falle von Scherungen der Schubmodul.

#### 2.2.1.2. Viskosität

Im Falle von viskosen Materialien hängt die Kraft/Spannung von der Verformungsgeschwindigkeit ab. Für Newton'sche Fluide gilt ein linearer Zusammenhang

$$\tau = \eta\dot{\gamma} \quad (2.2)$$

mit der Viskosität  $\eta$ , die unabhängig von der Schergeschwindigkeit ist. Viskoelastizität verbindet Elastizität und Viskosität durch eine Serien- oder Parallelschaltung mehrerer Elemente. Im einfachsten Fall der Serienschaltung von viskosem und elastischem Element kann die Schubspannung

als Summe aus elastischem und viskosem Beitrag geschrieben werden [83, 84]

$$\tau = G\gamma + \eta\dot{\gamma} \quad (2.3)$$

### 2.2.1.3. Plastizität

Unter Plastizität versteht man die Eigenschaft eines Stoffes, sich unter Krafteinwirkung irreversibel zu verformen. Wird eine Feder nur wenig verformt, kehrt sie bei Wegfall der Kraft wieder zu ihrer Ursprungslänge zurück, sie verhält sich ideal elastisch. Wird die wirkende Kraft zu groß, verformt sich die Feder jedoch plastisch. Dies bedeutet, dass die Feder für verschwindende Kraft  $F=0$  N eine Ruhelänge hat, die größer als die Ursprungslänge ist. Den Unterschied dieser beiden Ruhelängen nennt man plastische Verformung [84]. Um ein Material mit elastischen und plastischen (elastoplastischen) Eigenschaften zu beschreiben wird die Deformation  $\gamma$  meist in einen elastischen und einen plastischen Anteil zerlegt:

$$\gamma = \gamma_{el} + \gamma_{pl} \quad (2.4)$$

Die Schubspannung  $\tau$  ist eine Funktion der elastischen Deformation  $\tau = \tau(\gamma_{el})$ . Im einfachsten Fall gilt ein linearer Zusammenhang

$$\tau = G \cdot \gamma_{el} \quad (2.5)$$

Die plastische Deformation ändert sich als Funktion der anliegenden Schubspannung und der Fließspannung  $\tau_F$ .  $\tau_F$  gibt an, ab welcher Schubspannung die plastische Deformation einsetzt.

$$\dot{\gamma}_{pl} = \dot{\gamma}_{pl}(\tau, \tau_F) \quad (2.6)$$

Ein Großteil der Theorie der Plastizität wurde auf Basis von Messungen an Metallen entwickelt. Zunächst nahm man an, dass eine plastische Verformung durch das Gleiten von Atomebenen und die daraus entstehende relative Verschiebung von Teilen der kristallinen Struktur zustandekommt. Dieses einfache Modell, das auf einem perfekten, fehlerfreien Einkristall beruhte, lieferte jedoch Vorhersagen für Scherstärken, die nicht mit dem Experiment übereinstimmten. Realistischere Theorien berücksichtigten die Rolle von Fehlern im kristallinen Aufbau der Materialien. Entscheidend sind dabei fehlende oder überschüssige Atome (Punktdefekte) oder ganze Atomebenen (Liniendefekte oder Versetzungen). Heute nimmt man an, dass plastische Verformungen u.a. durch das Wandern und die Neubildung von Kristallfehlern hervorgerufen werden. Innerhalb dieses Modell kann auch die Beobachtung, dass viele Materialien mit wachsender plastischer Deformation härter werden verstanden werden. Mit größer werden plastischer Verformung entstehen immer mehr Kristallfehler, die sich gegenseitig in ihrer Bewegung behindern. Dies führt dazu, dass für weitere plastische Verformung eine immer größere Schubspannung aufgewandt werden muss. Es existieren viele Modelle, die dieses Verhalten modellieren. [84] Für diese Arbeit ist das sogenannte kinematische Härten wichtig. Liegt kinematisches Härten vor, so wird die Rolle der sich aufstau-

## 2.2 Grundlagen der Rheologie

---

enden Versetzungen und der Härtung des Materials durch eine entstehende Schubspannung  $\tau_B$ , *backstress* genannt modelliert, die im Falle der plastischen Verformung der anliegenden Schubspannung entgegenwirkt. Die Änderung der plastische Deformation hängt dann folgendermaßen von den gegebenen Größen ab:

$$\dot{\gamma}_{pl} = \dot{\gamma}_{pl}(\tau - \tau_B, \tau_F) \quad (2.7)$$

Diesen Zusammenhang nennt man das Fließgesetz. Der *backstress* wiederum hängt von der plastischen Deformation ab, wobei es verschiedene Modelle für den funktionalen Zusammenhang gibt.

$$\tau_B = \tau_B(\gamma_{pl}) \quad (2.8)$$

An dieser Stelle werden nur die Grundzüge der Plastizität dargestellt. Eine ausführliche Behandlung der Plastizität, die nicht Ziel dieser Arbeit ist, ist Gegenstand vieler Lehrbücher [84, 85].

### 2.2.2. Das Rotationsrheometer

Rotationsrheometer werden verwendet, um das mechanische Verhalten von Materialien unter Scherung zu untersuchen. Die Probe wird dabei in eine spezielle Geometrie eingebracht. Ein Teil dieser Geometrie ist mit dem Motor des Rheometers verbunden, und kann somit um die Symmetrieachse gedreht werden (Abbildung 2.3). Dies führt zu einer Scherung der Probe. Das Rheometer enthält zusätzlich einen Messkopf der eine Messung des Drehmoments ermöglicht. Somit kann man die Verformung des Materials und die wirkende Kraft messen und daraus Materialeigenschaften ableiten [83].

#### 2.2.2.1. Messgeometrien

Es existieren verschiedene Messgeometrien, die für unterschiedliche Proben geeignet sind (Platte-Platte-, Platte-Kegel- und Taylor-Couette-Geometrien). Für die Zellmonoschichtrheologie wurde eine Platte-Platte-Geometrie verwendet [87]. Die zu untersuchende Probe befindet sich zwischen zwei planparallelen Platten. Eine der Platten wird durch den Motor des Rheometers um seine Symmetrieachse gedreht, wodurch die Probe geschert wird. Die Deformation, ein Maß für die Verformung der Probe, berechnet sich aus

$$\gamma = \frac{s}{h} = \frac{\phi R}{h} \quad (2.9)$$

wobei  $s$  die Rotation der Platte,  $h$  den Spaltabstand und  $R$  den Plattenradius bezeichnet (Siehe Abbildung 2.4) [83]. Die Schubspannung die in einer Platte-Platte Geometrie auf die Probe wirkt kann im Falle eines linearen Mediums mit Hilfe des Drehmoments bestimmt werden [83]

$$\tau = \frac{M}{3\pi R^3} \quad (2.10)$$

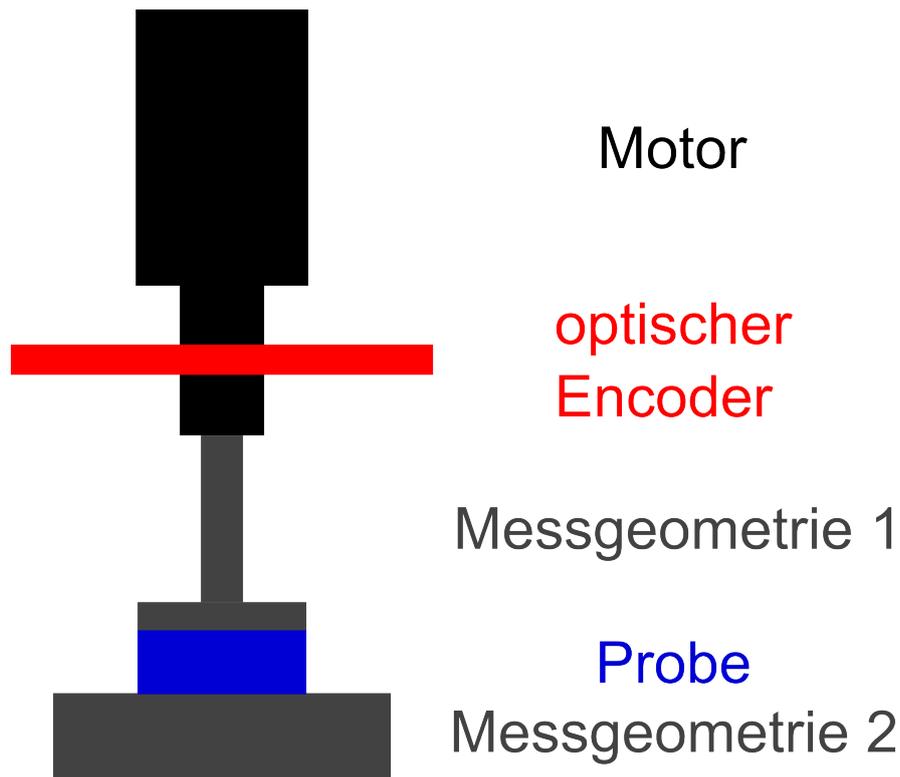


Abbildung 2.3.: Schematische Darstellung eines schubspannungsgesteuerten Rheometers. Die Probe wird in eine geeignete Messgeometrie eingebracht. Ein Teil der Messgeometrie (Messgeometrie 2) ist fixiert, der andere Teil (Messgeometrie 1) mit dem Motor des Rheometers verbunden. Durch Anlegen eines Stroms übt der Motor ein Drehmoment  $M$  auf die Geometrie und die Probe aus. Dies führt zu einer Drehung der Messgeometrie 1, welche mit Hilfe eines optischen Encoders gemessen wird [86].

Dabei wird angenommen, dass die Probe die Platte vollständig bedeckt. Der Nachteil dieser Geometrie ist, dass die Scherung der Probe in radialer Richtung variiert. Dieser Effekt wurde in dieser Arbeit durch die Verwendung eines Rings verringert. Aufgrund der geänderten Messgeometrie und der unvollständigen Bedeckung der Geometrie durch die Zellen, muss die Berechnung der Schubspannung für die vorgenommenen Messungen modifiziert werden (Siehe Abschnitt 4.1.7).

#### 2.2.2.2. Deformationsgesteuerte vs. schubspannungsgesteuerte Rheometer

Historisch unterscheidet man zwei Arten von Rheometern, deformationsgesteuerte und schubspannungsgesteuerte Rheometer. Klassische deformationsgesteuerte Rheometer haben einen Motor zur Vorgabe der gewünschten Deformation und getrennt davon einen Sensor zur Messung des Drehmoments. Schubspannungsgesteuerte Rheometer haben nur einen Motor, mit dessen Hilfe durch Vorgabe des Motorstroms ein definiertes Drehmoment ausgeübt wird. Über einen optischen Encoder wird gleichzeitig die hervorgerufene Rotation der Geometrie und damit die Deformation der Probe gemessen [86].

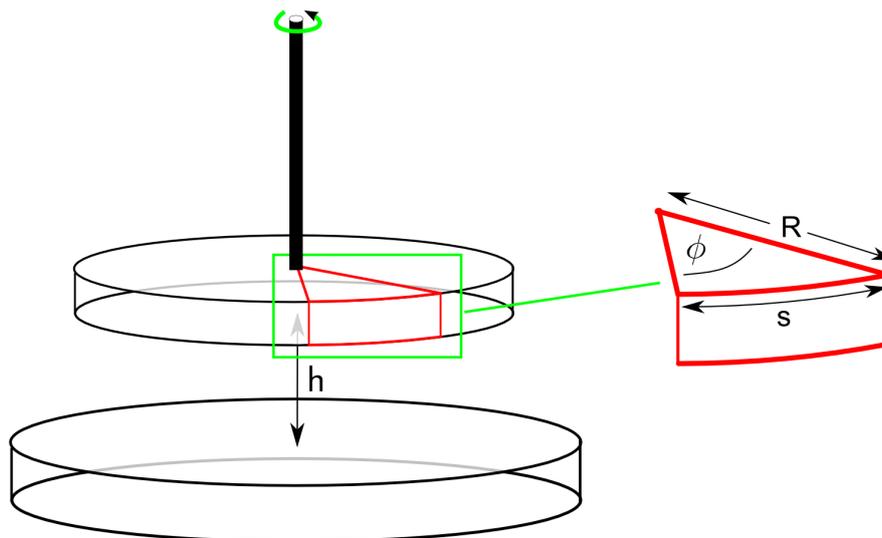


Abbildung 2.4.: Schematische Darstellung einer Platte-Platte-Geometrie. Die Deformation berechnet sich aus der Scherung  $s = \phi R$  und dem Spaltabstand  $h$ .

Neuere schubspannungsgesteuerte Rheometer bieten auch die Möglichkeit deformationsgesteuerte Messungen vorzunehmen [88]. Dazu ist ein elektronischer Regelkreis implementiert, der das Drehmoment so regelt, dass die gewünschte Deformation erreicht wird. Dadurch werden die gewünschten Deformationen mit einer gewissen Verzögerung eingestellt. Des Weiteren kann es bei oszillatorischen Anregungen dazu kommen, dass die Sinusform der Deformation nicht korrekt eingestellt wird [89]. Dies kann zu Problemen bei Messmethoden der nichtlinearen Mechanik (Siehe Abschnitt 2.2.3) führen, die auf eine exakt sinusförmige Anregung angewiesen sind.

Die Experimente in dieser Arbeit wurden mit einem Rotationsrheometer des Typs Haake Mars II der Firma Thermo Fisher durchgeführt. Es handelt sich um ein schubspannungsgesteuertes Rheometer, welches auch die Möglichkeit der Deformationssteuerung bietet.

### 2.2.2.3. Protokolle der linearen Rheologie

Die Messprotokolle können in statische und dynamische Messungen unterteilt werden [83].

- Statische Messungen

Kriechexperimente untersuchen den zeitlichen Verlauf der Probendeformation als Antwort auf eine zeitlich konstante Schubspannung  $\tau$ . Es können Experimente mit stufenweise steigender Schubspannung durchgeführt werden, wobei die Spannung am Ende eines Intervalls entweder sofort oder nach einem Erholungsschritt bei einer Schubspannung von null erhöht werden kann. Zur Auswertung der Kriechversuche wird die Nachgiebigkeit

$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau_0} \quad (2.11)$$

als Funktion der Zeit betrachtet.

- Dynamische Messungen

Es können Experimente mit konstanter Änderungsrate der Schubspannung  $\dot{\tau} = const$  durchgeführt. Man misst dabei die Deformation als Funktion der Zeit und erhält Schubspannungs-Deformations-Kurven. Aus diesen können differentielle Schubmodule  $\frac{\partial \tau}{\partial \gamma}$  berechnet werden. Bei oszillatorischen Experimenten wird die Deformation oder die Schubspannung sinusförmig variiert und die jeweils andere Größe gemessen. Die Dauer der Oszillationsserie kann je nach Fragestellung frei gewählt werden. Für eine sinusförmige Deformationsanregung gilt:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (2.12)$$

mit der Deformationsamplitude  $\gamma_0$  und der Kreisfrequenz  $\omega = 2\pi f$ . Im linear viskoelastischen Fall ergibt sich für die Schubspannung

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (2.13)$$

mit der Schubspannungsamplitude  $\tau_0$  und der Phasenverschiebung bzw. dem Phasenwinkel  $\delta$ . Man analysiert den dynamischen Schubmodul

$$|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \quad (2.14)$$

wobei  $\tau_0$  und  $\gamma_0$  die Amplituden der Deformation bzw. der Schubspannung sind. Im linearen Regime ist  $|G^*|$  unabhängig von der Anregungsamplitude. Mit Hilfe des Phasenwinkels kann der dynamische Schubmodul in ein Speichermodul (ein Maß für die Elastizität der Probe) und ein Verlustmodul aufgeteilt werden [83]

$$G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta) \quad (2.15)$$

$$G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin(\delta) \quad (2.16)$$

Der Phasenwinkel gibt somit Auskunft, ob die untersuchte Probe elastisch oder viskos dominiert ist. Ein Phasenwinkel  $\delta=0^\circ$  beschreibt ein rein elastisches,  $\delta=90^\circ$  ein rein viskoses Material.

Für eine sinusförmige Schubspannungsanregung gilt:

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t) \quad (2.17)$$

Im linear viskoelastischen Fall ergibt sich für die Deformation

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (2.18)$$

## 2.2 Grundlagen der Rheologie

---

Man analysiert die dynamische Nachgiebigkeit

$$|J^*| = \frac{\gamma_0}{\tau_0} \quad (2.19)$$

wobei  $\tau_0$  und  $\gamma_0$  die Amplituden der Deformation bzw. der Schubspannung sind. Mit Hilfe des Phasenwinkels kann die dynamische Nachgiebigkeit in eine Speichernachgiebigkeit und eine Verlustnachgiebigkeit aufgeteilt werden:

$$J' = \frac{\gamma_0}{\tau_0} \cos(\delta) \quad (2.20)$$

$$J'' = \frac{\gamma_0}{\tau_0} \sin(\delta) \quad (2.21)$$

Im linearen Regime gilt:

$$|G^*| = \frac{1}{|J^*|} \quad (2.22)$$

Für den Fall oszillatorischer Anregung werden vier Vorgehensweisen unterschieden [83]:

- Oszillationsserie (*Timesweep*)  
Es wird eine Oszillation mit konstanter Amplitude  $\gamma_0$  oder  $\tau_0$  und Frequenz  $f$  für eine Zeit  $t_0$  durchgeführt.
- Amplitudenvariation (*Amplitudensweep*)  
In diesem Falle werden mehrere Oszillationsserien hintereinander ausgeführt, wobei die Deformations- oder Schubspannungsamplitude stufenweise erhöht wird, während die Frequenz konstant bleibt.
- Frequenzvariation (*Frequenzsweep*)  
Mehrere Oszillationsserien werden hintereinander ausgeführt. Die Frequenz wird stufenweise erhöht, die Oszillationsamplitude bleibt konstant.
- konstante Deformationsrate (*Strain-Rate-Frequency-Superposition (SRFS)*)  
Um den Einfluss der Deformationsrate und die strukturelle Relaxation eines Materials zu untersuchen werden nach jeder Oszillationsserie Amplitude und Frequenz derart verändert, dass die Deformationsrate  $\dot{\gamma} = 2\pi f \gamma_0$  konstant bleibt [90].

### 2.2.3. Nichtlineare Rheologie

Im Abschnitt 2.2.2.3 wurde die Datenanalyse im Falle linear viskoelastischer Materialien behandelt. In diesem Abschnitt wird die Erweiterung der Analyse auf das nichtlineare Regime vorgestellt. Viele Materialien verhalten sich für kleine Stimuli linear, werden jedoch für große Stimuli nichtlinear. Dies kann mit Hilfe der Fourier Transformations Rheologie (FTR) charakterisiert werden [91], [92].

### 2.2.3.1. Fouriertransformationsrheologie (FTR)

Grundlage der FTR ist, dass eine harmonische Anregung eines linearen Systems auch eine harmonische (phasenverschobene) Antwort liefert [91, 92, 93, 94]. Regt man ein lineares Material sinusförmig an:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega_0 t) \quad (2.23)$$

so ergibt sich eine harmonische monofrequente Schubspannung

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega_0 t + \delta_0) \quad (2.24)$$

In diesem Falle können die viskoelastischen Module  $G'$  und  $G''$  analysiert werden (Siehe Abschnitt 2.2.2.3). Verhält sich das Material aber nichtlinear, so kommt es zu Beiträgen von ganzzahligen Vielfachen der Anregungsfrequenz  $\omega_n = n \cdot \omega_0$  mit  $n \in \mathbb{N}$ , sogenannten höheren Harmonischen (oder Obertönen), in der Materialantwort [91]. Eine Anregung

$$\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega_0 t) \quad (2.25)$$

führt zu einer Schubspannung

$$\tau(t) = \sum_n \tau_n \sin(n\omega_0 t + \delta_n) \quad (2.26)$$

Analoges gilt für eine Schubspannungsanregung

$$\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega_0 t) \quad (2.27)$$

Diese führt zu einer Deformationsantwort:

$$\gamma(t) = \sum_n \gamma_n \sin(n\omega_0 t + \delta_n) \quad (2.28)$$

Die Beiträge der Harmonischen können mit Hilfe einer Fouriertransformation des Antwortsignals quantifiziert werden [91]. Die relativen Intensitäten der höheren Harmonischen  $I_n = \frac{\tau_n}{\tau_1}$  bzw.  $I_n = \frac{\gamma_n}{\gamma_1}$  sind ein Maß für die Nichtlinearität eines Materials. Sie werden als Funktion der Anregungsamplitude aufgetragen [91, 94].

### 2.2.3.2. Symmetriebetrachtungen

Viele Materialien sind symmetrisch in Bezug auf die Scherrichtung. Dies bedeutet, dass kein Unterschied zwischen der positiven und der negativen Oszillationsrichtung besteht. Man kann mit einfachen Mitteln zeigen, dass dies dazu führt, dass nur ungerade Harmonische  $(2n+1) \cdot \omega_0$ ,  $n \in \mathbb{N}$  vorkommen [91]. Dies ist für die meisten Materialien der Fall, einige Arbeiten zeigen jedoch

## 2.2 Grundlagen der Rheologie

Beiträge von geraden Harmonischen. Deren Grundlage wird noch vielfach diskutiert. Sie werden häufig als Messartefakte durch unzureichend parallele Ausrichtung der Messgeometrie oder *wall slip* (ein Gleiten der Probe über die Messgeometrie) angesehen [92]. Es gibt jedoch Arbeiten, die theoretisch und experimentell Beiträge von geraden Harmonischen zeigen. Es handelt sich dabei um Materialien, deren Mikrostruktur sich aufgrund einer äußeren Scherung ausrichten kann [95]. Das Auftreten gerader Harmonischer ist ein Zeichen für eine Asymmetrie im mechanischen Materialverhalten. Abbildung 2.5 zeigt eine Grundschiwingung bei einer Frequenz von 0,5 Hz und die ersten beiden Obertöne bei 1 Hz und 1,5 Hz. Die Superposition von Grundschiwingung und erstem Oberton führt zu einer asymmetrischen Schwingung, während die Überlagerung der Grundschiwingung mit dem zweiten Oberton ein symmetrisches Signal liefert.

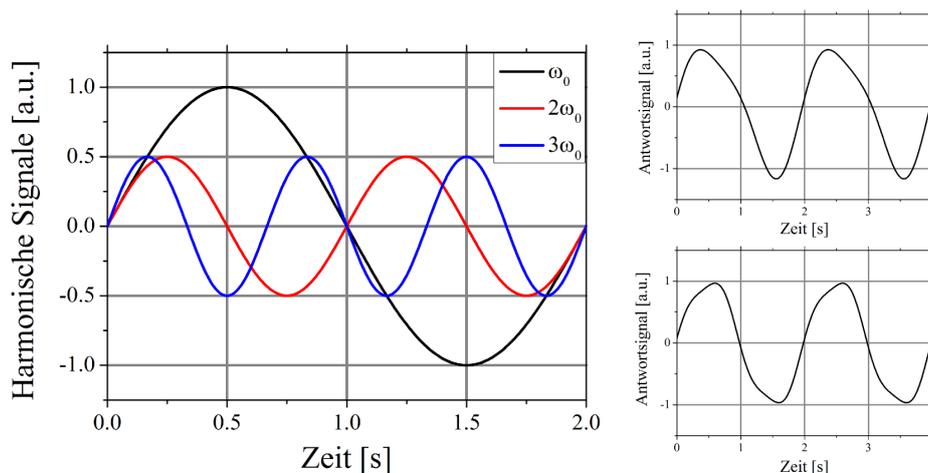


Abbildung 2.5.: Spektrale Zusammensetzung oszillatorischer Signale. Links: Grundschiwingung bei 0,5 Hz und die ersten beiden Obertöne 1 Hz und 1,5 Hz. Rechts oben: Überlagerung der Grundschiwingung mit dem ersten Oberton. Es ergibt sich ein asymmetrisches Signal. Rechts unten: Überlagerung der Grundschiwingung mit dem zweiten Oberton. Es ergibt sich ein symmetrisches Signal.

### 2.2.3.3. Verallgemeinerung der linearen Module

Die Fouriertransformationsrheologie bietet die Möglichkeit Nichtlinearitäten zu quantifizieren. Gerade Harmonische können als Asymmetrie des Materials interpretiert werden. Eine physikalische Interpretation der ungeraden Harmonischen ist dagegen nicht möglich. Ewoldt et al. haben daher eine Verallgemeinerung der linearen Module vorgeschlagen [96]. Sie basiert auf den sogenannten Lissajous-Graphen, bei denen die Schubspannung als Funktion der Deformation aufgetragen wird. Im linear viskoelastischen Fall, also im Falle zweier harmonischer, monofrequenter, phasenverschobener Signale, ergibt sich eine Ellipse. Sobald nichtlineare Beiträge zum Tragen kommen, ergeben sich Abweichungen von der Ellipse (Siehe Abbildung 2.6). Um diese zu quantifizieren, werden für deformationsgesteuerte Messungen  $\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t)$  verallgemeinerte Schubmodule  $G_s$  und  $G_L$

eingeführt [96], [97]

$$G_s = \frac{\partial \tau}{\partial \gamma}_{\gamma=0} \quad (2.29)$$

$$G_L = \frac{\tau}{\gamma}_{\gamma=\gamma_0} \quad (2.30)$$

für Schubspannungsgesteuerte Messungen  $\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t)$  Nachgiebigkeiten  $J_s$  und  $J_L$  [98]

$$J_s = \frac{\partial \gamma}{\partial \tau}_{\tau=0} \quad (2.31)$$

$$J_L = \frac{\gamma}{\tau}_{\tau=\tau_0} \quad (2.32)$$

Abbildung 2.6 zeigt die geometrische Interpretation der Größen.  $G_s$  und  $J_s$  sind die differentiellen Module für kleine Deformationen/Schubspannungen,  $G_L$  und  $J_L$  die Module für die Maximalwerte [98]. Mit Hilfe dieser Größen kann ein Nichtlinearitätsindex  $L_G = \frac{G_L}{G_s}$  oder  $L_J = \frac{J_L}{J_s}$  berechnet

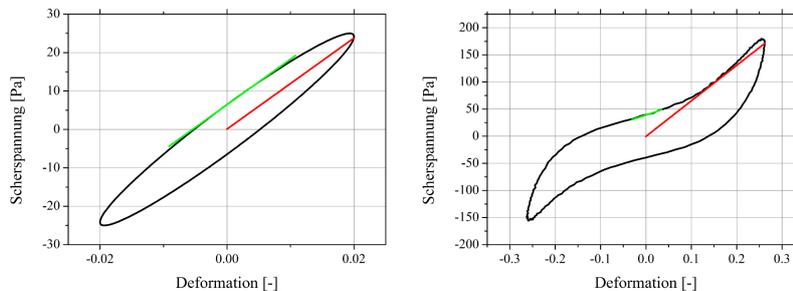


Abbildung 2.6.: Beispiele für Lissajousplots und graphische Interpretation der Module  $G_L$  (rot) und  $G_s$  (grün). Links: Lineares Regime. Der Schubspannungs-Deformations-Graph ist eine Ellipse. Die Werte für  $G_L$  und  $G_s$  sind in diesem Falle identisch. Rechts: Nichtlineares Regime. Es ergeben sich Abweichungen von der elliptischen Form.  $G_L$  und  $G_s$  nehmen unterschiedliche Werte an, die die Form der Kurve widerspiegeln.

werden, der folgende physikalische Interpretation zulässt:

$$\text{Material ist } \begin{cases} \textit{strain softening} & \text{für } L_G < 1 \\ \textit{linear} & \text{für } L_G = 1 \\ \textit{strain hardening} & \text{für } L_G > 1 \end{cases} \quad (2.33)$$

bzw.

$$\text{Material ist } \begin{cases} \textit{strain softening} & \text{für } L_J > 1 \\ \textit{linear} & \text{für } L_J = 1 \\ \textit{strain hardening} & \text{für } L_J < 1 \end{cases} \quad (2.34)$$

## 2.2 Grundlagen der Rheologie

---

### 2.2.3.4. Differentielle Module

Eine weitere Möglichkeit Nichtlinearitäten in Oszillationsmessungen zu quantifizieren sind die differentiellen Module

$$g = \frac{\partial \tau}{\partial \gamma} \quad (2.35)$$

$$j = \frac{\partial \gamma}{\partial \tau} \quad (2.36)$$

$g$  ist der differentielle Schubmodul für den Fall deformationsgesteuerter Anregungen,  $j$  die differentielle Nachgiebigkeit für schubspannungsgesteuerte Messungen.

### 2.2.4. Nichtlineare Rheologie von Biopolymergelen und Zellen

- **Biopolymergele**

Biopolymergele dienen u.a. als Modellsysteme zum besseren Verständnis der mechanischen Eigenschaften lebender Zellen [99]. Es konnte gezeigt werden, dass alle Biopolymere ein gemeinsames mechanisches Charakteristikum in Form von nichtlinearer Elastizität aufweisen [100]. Oberhalb eines kritischen Stimulus, der von der Art und der Struktur des Polymergels abhängt, steigt die Festigkeit von Biopolymergelen mit wachsendem Stimulus an (*strain stiffening*). Für Aktin gelee hängt die Steifigkeit des Gels und die auftretende Nichtlinearität von Netzwerkparametern, wie der mittleren Länge der Filamente und der Aktinkonzentration ab [101]. Je länger die Filamente und je höher die Aktinkonzentration sind, umso stärker ausgeprägt ist die Versteifung (*stiffening*). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die nichtlineare Mechanik von verwobenen (*entangled*) Aktin geelen stark von dem verwendeten Messprotokoll abhängt [101].

Neben reinen Aktin geelen wurden auch vernetzte Gele untersucht. Lieleg et al. haben gezeigt, dass mit Fascin vernetzte Gele eine Versteifung zeigen, die von der relativen Konzentration von Fascin und Aktin  $R = \frac{c_F}{c_A}$  abhängt [102]. Die kritische Deformation  $\gamma_c$ , bei der die Versteifung beginnt ist umgekehrt proportional zu  $R$  [102]. Es gilt also  $\gamma_c \propto R^{-1}$ . Dies unterstützt theoretische Arbeiten, die zeigen, dass in vernetzten Gelen die kritische Deformation  $\gamma_c \propto \frac{l_c}{l_p}$  von der Länge der Filamente  $l_p$  und dem mittleren Abstand der Vernetzungsproteine  $l_c$  abhängt [103]. Je kleiner die Konzentration der Vernetzer ist, umso größer wird  $\gamma_c$ , d.h. die nichtlineare Antwort verschiebt sich zu größeren Stimuli.

Theoretische Arbeiten sagen eine wichtige Rolle von Vernetzungsproteinen bei der mechanischen Antwort von Biopolymergelen und Zellen vorher. Zum Einen ist die Steifigkeit für kleine Stimuli direkt proportional zur Konzentration der Vernetzer [103]. Zum Anderen trägt das, durch mechanische Beanspruchung verursachte, Lösen (*unbinding*) von Vernetzerproteinen (*crosslinker*) zu einer abnehmenden Steifigkeit und einer mechanischen Stressrelaxation bei [104].

Neben den Netzwerkparametern spielen auch die Zeitskalen der mechanischen Anregung eine entscheidende Rolle [101, 105]. Die mechanische Antwort von Aktinellen unterliegt einem Alterungsprozess [101] und die nichtlineare Antwort ist umso ausgeprägter, je größer die Scherrate ist [101, 105].

▪ **Zellen**

Zellen zeigen stark nichtlineares mechanisches Verhalten. Es wurden abhängig von Stimulus und Messmethode Versteifung aber auch abnehmende Steifigkeit beschrieben. Versteifung wird in Zellen meist im Zusammenhang mit einer Vorspannung (*prestress*) beobachtet [106, 107, 108, 109]. Die Vorspannung kann von außen vorgegeben, oder von der Zelle selbst in Form von kontraktile Spannung generiert werden [108, 110]. Die Steifigkeit der Zelle nimmt oberhalb einer kritischen Spannung mit steigender Vorspannung linear zu [106], weshalb diese als Möglichkeit der mechanischen Stabilisierung der Zelle angesehen wurde. Ein weicher werden der Zellen und eine Verflüssigung wird beobachtet, nachdem die Zelle einer plötzlichen Streckung unterworfen wurde [111], [112]. Es folgt eine Erholung der Zellen, die innerhalb der folgenden fünf Minuten geschieht. Gavara et al. haben gezeigt, dass durch eine plötzliche Streckung zunächst eine Erhöhung der, von der Zelle ausgeübten, kontraktile Kraft erfolgt. Wird die Streckung jedoch rückgängig gemacht nimmt die Kontraktilität geringere Werte an, als vor der mechanischen Beanspruchung. Es kommt also zu einer Dissipation der Vorspannung, die umso größer ausfällt, je größer die initiale Vorspannung ist [113]. Dies widerspricht dem Bild der vorspannungsinduzierten mechanischen Stabilisierung. Gavara et al. argumentieren, dass eine Vorspannung die Steifigkeit im linearen Regime, für kleine Stimuli, vergrößert. Darüber hinaus treibt die Vorspannung die Zelle jedoch näher an die Fließgrenze und macht sie somit anfälliger für die Zerstörung der Netzwerkstruktur durch das Ablösen von Vernetzungsproteinen bei größeren Stimuli [113].

Die genauen Mechanismen, die für die Versteifung und die abnehmende Steifigkeit verantwortlich sind, sind noch nicht bekannt. Kroy et al. bezeichnen dies als das *stiffening-softening paradox* der Zellmechanik [114]. In [114] wurde vorgeschlagen, dass lebende Zellen keine reinen viskoelastischen, sondern teilweise inelastische „Materialien“ sind. Das Modell der *inelastic glassy wormlike chain* [115] sagt voraus, dass sowohl eine Versteifung, als auch eine abnehmende Steifigkeit möglich sind. Dies führt zu einem Bild der nichtlinearen Zellmechanik, die durch die Amplitude und die Rate des Stimulus definiert ist [114]. Abhängig vom Stimulus kann eine Zelle folgendermaßen reagieren

- linear viskoelastisch mit der wohlbekanntem *power law response*
- versteifend
- mit abnehmender Steifigkeit
- nichtlinear viskoelastisch
- klassisch plastisch mit kinematischen Härten

## 2.2 Grundlagen der Rheologie

---

- inelastisch verflüssigend

Der Übergang von Viscoelastizität zu Plastizität und inelastischen Beiträgen löst scheinbar das Paradoxon der Zellmechanik, zumindest auf theoretischer Basis [114].



## 3. Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die für diese Arbeit verwendeten Materialien und experimentellen Aufbauten beschrieben.

### 3.1. Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich immortalisierte Zelllinien verwendet (Siehe Tabelle 3.1). Diese können in, mit Zellmedium gefüllten, Kulturschalen aus Plastik über einen Zeitraum von einigen Wochen in einem Inkubator vermehrt werden. Der Inkubator stellt eine Umgebungstemperatur von  $37^{\circ}\text{C}$  und einen  $\text{CO}_2$  Gehalt von 5% sicher. Alle Arbeiten der Zellkultur wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen wurde nach Standardprotokollen durchgeführt [116].

Name	Zelltyp	Organismus
3T3	Fibroblasten	Maus
HELA	Epithel (Zervixkarzinom)	Mensch
MCF7	Epithel (Mammakarzinom)	Mensch
RPE-1	Epithel (Retina)	Mensch

Tabelle 3.1.: Zelltypen

#### 3.1.1. Kultur und Passagierung

Lebende Zellen werden in einer gepufferte Zellkulturlösung, die Salze und Nährstoffe in Form von Proteinen enthält, kultiviert. Ein Antibiotikum kann zum Verhindern von Kontaminationen hinzugefügt werden. Die genaue Zusammensetzung des Mediums kann sich von Zelltyp zu Zelltyp unterscheiden (Siehe Abschnitt 3.1.3).

Die hier verwendeten Zellen teilen sich etwa alle 24-48 Stunden. Wenn eine Zelldichte von 70-80% erreicht ist, müssen die Zellen passagiert werden [116]:

1. Waschen der Zellen mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Gibco)
2. Inkubation mit 1ml (für Zellkulturschalen mit  $A=25\text{ cm}^2$ ) 1x Trypsin-EDTA Lösung (Sigma Aldrich) zur Ablösung der Zellen von der Kulturschale

3. Zugabe von 5ml Zellmedium zur Inhibition des Trypsins
4. Zentrifugation für 5 Minuten bei 200 g
5. Überstand verwerfen
6. Resuspendieren der Zellen in 1 ml Zellmedium (Abschnitt 3.1.3)
7. Aufteilen der Zellen in neue Kulturgefäße

Mit jeder Zellteilung steigt die Wahrscheinlichkeit, dass die Zellen durch Fehler bei der DNA-Replikation während der Zellteilung entarten. Daher werden nur Zellen verwendet, die nicht öfter als 15-20 mal passagiert wurden.

### 3.1.2. Kryokonservierung

Zur Langzeitlagerung werden Zellen eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert [116]. Das Vorgehen ist größtenteils analog zur Passagierung:

1. Waschen der Zellen mit *Phosphate Buffered Saline* (PBS, Gibco)
2. Inkubation mit 1ml (für Zellkulturschalen mit  $A=25\text{ cm}^2$ ) 1x Trypsin-EDTA Lösung (Sigma Aldrich) zur Ablösung der Zellen von der Kulturschale
3. Zugabe von 5ml Zellmedium zur Inhibition des Trypsins
4. Zentrifugation für 5 Minuten bei 200 g
5. Überstand verwerfen
6. Resuspendieren der Zellen in 4°C kaltem Einfriermedium (Abschnitt 3.1.3)
7. Aufteilen der Zellen in Kryoröhrchen
8. Inkubation auf Eis für 10 Minuten
9. Lagerung in flüssigem Stickstoff

Das Auftauen von Zellen erfolgte nach folgendem Protokoll:

1. Erwärmen der Zellen im 37°C warmen Wasserbad
2. Verdünnung der Zellsuspension mit 10 ml 37°C warmem Zellmedium
3. Zentrifugation für 5 Minuten bei 200 g
4. Überstand verwerfen
5. Resuspendieren der Zellen in Zellmedium (Abschnitt 3.1.3)
6. Transfer der Zellen in Kulturgefäß

## 3.1 Zellkultur

---

### 3.1.3. Medien

1. *Phosphate buffered saline* (PBS) ohne Magnesium und Calcium (Gibco)
2. *Dulbecco's modified Eagles medium* mit  $4,5\frac{g}{l}$  Glukose, ohne L-Glutamin (DMEM, Gibco)
3. *Hanks buffered salt solution* (HBSS, Gibco)
4. *Eagle's Minimum Essential Medium* (EMEM, ATCC) für MCF7 Zellen
5. 1x Trypsin EDTA Lösung (Sigma Aldrich)
6. Antibiotikum Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich)
7. Antibiotikum Geneticin G418 (Sigma Aldrich)
8. Torpedo<sup>DNA</sup> (Ibidi GmbH)
9. HEPES (1M, Sigma Aldrich)
10. Fibronektin ( $1\frac{mg}{ml}$  Lösung, Sigma Aldrich)
11. *Bovine Insuline* (ATCC)
12. Foetales Kälberserum (FBS Gold, Gibco)
13. *Foetal Bovine serum* (ATCC) für MCF7 Zellen
14. 2x HBS (Siehe Anhang A.1.1)

Zellmedien unterscheiden sich je nach Zelltyp:

1. 3T3-Medium
  - 500 ml DMEM
  - 50 ml Foetales Kälberserum
  - 100  $\mu$ l Antibiotikum Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich)
2. 3T3 + Lifeact - Medium
  - 500 ml DMEM
  - 50 ml Foetales Kälberserum
  - 2 ml Antibiotikum G418
3. HELA-Medium
  - 500 ml DMEM
  - 50 ml Foetales Kälberserum
  - 6 ml Penicillin/streptomycin

- 6ml Glutamin

#### 4. MCF7-Medium

- 500 ml EMEM
- 50 ml Foetales Kälberserum (ATCC)
- 0,1  $\frac{g}{ml}$  Bovine Insulin

MCF7 Zellen wurden im Rahmen eines Projektes mit mehreren Arbeitsgruppen verwendet. Um gleiche Kulturbedingungen zu garantieren wurden die Bestandteile des Kulturmediums von einer vorgegebenen Firma (ATCC, USA) bezogen. Die Kultivierung und die Herstellung der verwendeten Medien erfolgten nach den durch die *American Type Culture Collection* (ATCC) vorgegebenen Richtlinien (*Product information sheet for ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>* und *Protocol for Propagation and Cryopreservation of NCI-PBCF-HTB-22 (MCF-7); Breast Adenocarcinoma (ATCC<sup>®</sup> HTB-22<sup>™</sup>)*).

### 3.1.4. Visualisierung und Veränderungen des Aktin Zytoskeletts

Um Rückschlüsse auf die dynamischen, zytoskelettären Grundlagen der nichtlinearen zellmechanischen Antwort ziehen zu können, wurde das Aktinzytoskelett mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um diese mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen.

#### 1. Färbung fixierter Zellen

Aktin kann mit Hilfe des Phallotoxins Phalloidin, welches spezifisch an F-Aktin bindet, gefärbt werden. Phalloidin kann mit einem fluoreszenten Farbstoff gekoppelt werden, um so fluoreszenzmarkiertes F-Aktin zu erhalten. Für diese Arbeit wurde der Farbstoff Rhodamine (Anregung: 540 nm, Emission: 565 nm) verwendet. Die Färbung erfolgte über eine Fixierung der Zelle mit Glutaraldehyde, Permeabilisierung der Zellmembran mit Triton-X-Lösung und eine Inkubation in der Rhodamin-Phalloidin-Lösung. Dabei wurde folgendes Protokoll verwendet:

- Inkubation der Zellen in 4%-igem Glutaraldehyde (in PBS) für 15 Minuten
- Waschen mit PBS
- Permeabilisierung mit 0,1%-iger Triton-X-Lösung (in PBS) für 10 Minuten
- Waschen mit PBS
- Färbung in 1%-iger Rhodamine-Phalloidin-Lösung (in 0,1%-iger Triton-X-Lösung) für 30 Minuten

### 3.1 Zellkultur

---

Aufgrund der Fixierung der Zellen erlaubt diese Art der Färbung keine Visualisierung der Aktindynamik.

#### 2. stabile Lebendfärbung

Daher wurde Aktin mit Hilfe eines in die Zelle eingebrachten DNA-Vektors gefärbt. Der kommerziell erhältliche DNA-Vektor (lifeact, Ibidi GmbH) enthält die DNA-Sequenz von Aktin gekoppelt mit einem fluoreszenten Farbstoff, einen Promotor und einen Selektionsmarker für ein Antibiotikum. Der Vektor wird durch ein Transfektionsmedium (Torpedo<sup>DNA</sup>, Ibidi GmbH) in die Zelle eingebracht, wo er an der Proteinbildung beteiligt wird, wodurch fluoreszenzmarkierte Proteine exprimiert werden. Nicht alle Zellen nehmen den Vektor während der Transfektionsphase auf. Daher fügt man dem Zellmedium nach Transfektion das Antibiotikum (hier Geneticin, Siehe Abschnitt 3.1.3) hinzu, das als Selektionsmarker mit Hilfe des Vektors definiert wurde. In der Folge überleben nur Zellen, die den Vektor aufgenommen haben. Das Transfektionsprotokoll wurde für 3T3 Fibroblasten optimiert:

- Tag 1
  - In jeder Schale einer 6 well Platte werden etwa 50.000 Zellen in 300  $\mu$ l Zellmedium (ohne Antibiotikum) ausgesät
- Tag 2
  - Für jede Schale der 6 well Platte:
    - Lösung 1: 2  $\mu$ g DNA in 100  $\mu$ l DMEM
    - Lösung 2: 5  $\mu$ l Torpedo-DNA in 100  $\mu$ l DMEM
    - Lösung 3: Lösung 1 wird zu Lösung 2 hinzugefügt
    - Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
    - unter leichtem schütteln: tröpfchenweise Zugabe von Lösung 3 zu den Zellen
    - Inkubation der Zellen im Inkubator für 48 Stunden
- Tag 5- $\infty$ 
  - Zellen werden nach Standardprotokollen mit 3T3 + lifeact Zellmedium (Siehe Abschnitt 3.1.3) kultiviert

#### 3.1.5. Kalziumchloridgestützte Transfektion von Zellen

Neben der direkten Beobachtung der Aktindynamik wurden auch Untersuchungen an Zellen durchgeführt, deren Aktindynamik mittels eines DNA-Vektors geändert werden kann. Dies erfolgte mit Hilfe eines Vektors, der das TES-Protein und einen Promotor enthält. Wird der Vektor in die Zelle eingeschleust, so ist das Gen mehrfach vorhanden. Es kommt zu einer Überexpression und damit zu

einer erhöhten Konzentration des TES-Proteins. Es handelt sich um eine transiente Transfektion. Es ist keine Antibiotikaresistenz in den Vektor eingebaut, mit deren Hilfe man stabile Transfektion erreichen kann. Daher musste die Transfektion für jedes Experiment erneut durchgeführt werden. Der Vektor wurde mit Hilfe einer Kalziumchloridtransfektion [61] nach folgendem Protokoll in die Zelle eingeschleust:

- Tag 1
  - Zellen werden in einer Petrischale (Durchmesser  $d=35$  mm) ausgesät, so dass diese am folgenden Tag eine 70-80%-ige Konfluenz erreicht haben
- Tag 2
  - 2-3 Stunden vor der Transfektion wird das Zellmedium erneuert
  - Lösung 1: 10-25  $\mu\text{g}$  DNA werden in 61,5  $\mu\text{l}$  2 molarer Kalziumchloridlösung gelöst. Die Lösung wird mit destilliertem Wasser auf 500  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Durch Auf- und Abpipettieren vermischen.
  - Lösung 2: 500  $\mu\text{l}$  von 2x HBS (Siehe Anhang A.1.1)
  - tröpfchenweise Zugabe von Lösung 1 zu Lösung 2 unter ständigem Schütteln. Die Mischung (Lösung 3) sollte noch etwas geschüttelt werden.
  - Lösung 3 wird tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Petrischalen werden leicht geschwenkt.
- Tag 3-4
  - Nach 24-48 Stunden kann die Transfektionsrate unter einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden. Bei ausreichender Transfektion (mindestens 70%) können die Zellen für Experimente verwendet werden.

## 3.2. Rheometrie

Die mechanischen Eigenschaften einzelner Zellen wurden in einem Mikroplattenrheometer untersucht. Ein kommerzielles Rotationsrheometer diente zur Vermessung von Zellmonoschichten und Gewebestücken. Im Folgenden sollen beide Messmethoden vorgestellt werden.

### 3.2.1. Einzelzellscherung im Mikroplattenrheometer

Im Mikroplattenrheometer adhäriert eine einzelne Zelle zwischen zwei aus Glas gefertigten Mikroplatten [117]. Die Platten können durch Piezoaktoren kontrolliert bewegt werden, was zu einer

## 3.2 Rheometrie

---

Dehnung oder Scherung der Zelle führt. Die Adhäsionsflächen der Platten sind parallel zur optischen Achse des Mikroskops ausgerichtet, so dass die Verformung der Zelle beobachtet werden kann.

### 3.2.1.1. Experimenteller Aufbau

Das Mikroplattenrheometer wurde analog zu früheren Arbeiten [110, 117] aufgebaut (Siehe Abbildung 3.1). Zwei x-y-z Scantische wurden auf einem invertierten Mikroskop (Zeiss) montiert. Jeder der Tische kann in einer Dimension mittels eines piezoelektrischen Aktuators (Physik Instrumente) bewegt werden. Die Ansteuerung der Aktuatoren wurde mit Hilfe eines Computers realisiert, was im Vorfeld frei wählbare automatisierte Scherungen und Streckungen einzelner Zellen ermöglichte. Ein Aktuator konnte direkt mit Hilfe einer von Physik Instrumente bereitgestellten Software bedient werden. Diese erlaubt die Definition vielfältiger komplexer Translationen des Piezos. Zur Ansteuerung des zweiten Aktuators wurde der Analogeingang der Ansteuerungseinheit verwendet. Durch Anlegen einer Spannung wird der Aktuator verfahren, wobei 10 Volt die maximale Translation erreicht. Die Spannungen konnten mit Hilfe einer LabJack-USB-Messstation und der zugehörigen Software generiert werden. Die hier verwendete Messstation konnte jedoch nur eine maximale Spannung von 5 Volt ausgeben. Daher wurde eine Operationsverstärkerschaltung mit einem Verstärkungsfaktor von  $V=2$  verwendet, um die maximale Reichweite des Piezoaktuators ausnutzen zu können. Die Positionierung in den verbleibenden zwei Raumrichtungen erfolgte mit Hilfe von Mikrometerschrauben. Die Mikroplatten, die mit Metallhalterungen auf den Scantischen fixiert werden, können mit einer Genauigkeit von unter einem Mikrometer positioniert werden.

Die Zellen befinden sich während eines Experimentes in einem Reservoir, welches mit HEPES (10  $\mu\text{M}$ ) gepuffertem DMEM gefüllt ist. Das Reservoir besteht aus einer runden 0,5 cm dicken Plexiglasplatte (Durchmesser 10 cm), mit einer runden Ausfräsung (Durchmesser 4 cm) in der Mitte. Eine 100  $\mu\text{m}$  dicke Glasplatte wird mit Silikonpaste unter der Aussparung der Plexiglasplatte befestigt, so dass ein abgedichtetes Reservoir entsteht (Siehe Abbildung 3.1). Die Glasplatte wird im Vorfeld mit *bovine serum albumin* Lösung (BSA, 2% in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur beschichtet.

Die Zellen wurden mit einem 40x Ölimmersionsobjektiv ( $\text{NA}=1,4$ ) der Firma Zeiss und einer EMCCD-Kamera der Firma Hamamatsu visualisiert.

### 3.2.1.2. Mikroplatten

Die Spitzen der Mikroplatten müssen eine Breite von etwa 20-30  $\mu\text{m}$  aufweisen, damit einzelne Zellen gefangen werden können. Mikroplatten (Länge 10 cm, Breite 2 mm, Dicke 1 mm) aus Borsilikatglas (Vitrocom) wurden mit Hilfe eines *pipette pullers* der Firma Sutter Instruments bearbeitet. Die Mikroplatte wurde in den *pipette puller* eingespannt, in der Mitte auf eine wählbare Temperatur erhitzt und dann langsam auseinandergezogen. Es bildeten sich schließlich zwei

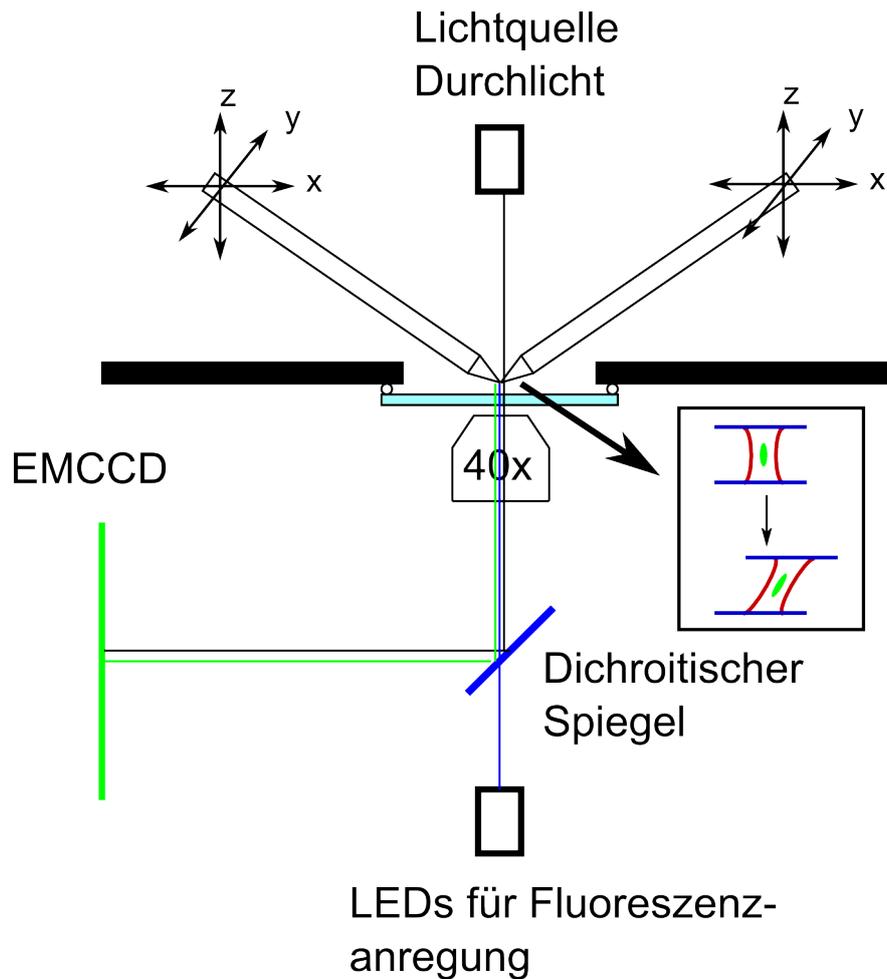


Abbildung 3.1.: Schematische Darstellung des Mikroplattenrheometers nach [110]. Zwei Mikroplatten sind mit verfahrbaren Tischen verbunden. Zwischen den Mikroplatten wird eine Zelle zum adhären gebracht. Mit Hilfe von computergesteuerten piezoelektrischen Aktuatoren können die Mikroplatten verfahren werden, so dass eine Scherung oder eine Streckung der Zellen erfolgt. Zellen in HEPES gepuffertem Medium werden in ein Reservoir gegeben, welches nach unten durch eine  $100\ \mu\text{m}$  dicke Glasplatte mit Silikonpaste dicht verschlossen wird. Die dünne Glasplatte ermöglicht die Benutzung eines  $40\times$  Ölimmersionsobjektivs für die Fluoreszenzmikroskopie.

Glasplatten mit spitz zulaufenden Enden. Das genaue Protokoll findet sich in Anhang A.1.2. Es erfolgte keine Kalibrierung der Steifigkeit der Mikroplatten [57, 117, 118], da ausschließlich eine Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskopie und keine Kraftmessung erfolgen sollte.

Die Platten wurden zunächst mit Sekundenkleber an Metallhalterungen geklebt, so dass sie im Aufbau fixiert werden konnten. Die Spitzen wurden mit 4%-iger Deconexlösung und reinem Ethanol gereinigt und für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Fibronektinlösung ( $10\ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ ) beschichtet. Abschließend wurden sie mit PBS gewaschen und in das Setup integriert. Die Spitzen mussten stets feucht gehalten werden, da ein Austrocknen die Zelladhäsion verhindert.

## 3.2 Rheometrie

---

### 3.2.1.3. Einfangen einer Zelle

Die Spitzen wurden derart in den Aufbau integriert, dass die Adhäsionsflächen senkrecht zur unteren Platte standen. Die Einzelzellen wurden in das Reservoir pipettiert, wo sie sedimentierten. Aufgrund der BSA-Beschichtung des Bodens des Reservoirs erfolgte keine Adhäsion der Zellen. Eine der Mikroplatten wurde in der Nähe der ausgewählten Zelle abgesenkt, bis sich die Spitze 1-2  $\mu\text{m}$  über der Oberfläche der Glasplatte befand. Die Mikroplatte wurde langsam mit einer Zelle in Kontakt gebracht. Nach einer kurzen Wartezeit von etwa 30 Sekunden wurde die Platte, an der die Zelle nun leicht anhaftete, etwa 10-20  $\mu\text{m}$  angehoben. Die zweite Platte wurde in Kontakt mit der Zelle gebracht, so dass die Zelle sichtbar deformiert wurde. Es folgte eine Wartezeit, in der die Zelle an beiden Platte adhären konnte. Für Experimente mit 3T3 Zellen wurde eine Adhäsionszeit von 1,5 Stunden analog zu den Monoschichtexperimenten (Abschnitt 3.2.2.3) gewählt, für RPE-1 Zellen 30 Minuten.

### 3.2.2. Zellmonoschichtreologie (ZMR)

#### 3.2.2.1. Experimenteller Aufbau

In den letzten Jahrzehnten wurden viele Methoden entwickelt, um die mechanischen Eigenschaften lebender Zellen zu untersuchen [119, 120]. Viele dieser Methoden untersuchen eine oder wenige Zellen pro Experiment [117, 121, 122, 123, 124, 125]. Der mikrofluidische optische Strecker kann mehr als 100 Zellen pro Sekunde vermessen [126], ist jedoch auf Suspensionszellen beschränkt. Einzelzellmethoden haben den Nachteil, dass viele Experimente durchgeführt werden müssen, um einen statistisch aussagekräftigen Mittelwert zu erhalten. Des Weiteren ergibt sich häufig das Problem, dass das Signal zu Rausch Verhältnis niedrig ist, so dass einige Auswertemethoden, wie z.B. die Fourierreologie nicht angewandt werden können. Um diese Probleme zu umgehen, wurde die Zellmonoschichtreologie (ZMR, [87, 110]) entwickelt.

Die Zellmonoschichtreologie (ZMR) nutzt ein kommerzielles Rotationsrheometer, um die mechanischen Eigenschaften von etwa  $10^5$ - $10^6$  Zellen gleichzeitig zu vermessen. Abbildung 3.2 zeigt eine schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. Die Zellen adhären an einer fixierten (unteren) Glasplatte und einer weiteren (oberen) Glasplatte, die mit dem Messkopf des Rheometers verbunden ist. Die obere Glasplatte kann mittels des Rheometermotors gedreht werden, was zu einer Scherung aller adhären Zellen führt. Ein in das Rheometer integriertes Mikroskop erlaubt die optische Kontrolle der Experimente und die Bestimmung von Zellzahl und Zellfläche (Siehe Abschnitt 4.1.7).

Durch die Nutzung eines kommerziellen Rheometers stehen die rheologischen Standardprotokolle, die zur Materialcharakterisierung verwendet werden können zur Verfügung. Es können somit Schubspannungs-, Deformations-, Frequenz- und Zeitabhängigkeit der Zellmechanik untersucht werden. Darüber hinaus ergibt sich durch die Messung vieler Zellen ein sehr gutes Signal zu Rausch

Verhältnis, welches speziell für die Anwendung sensitiver Analysemethoden wie der Fourierrheologie 2.2.3.1 unerlässlich ist.

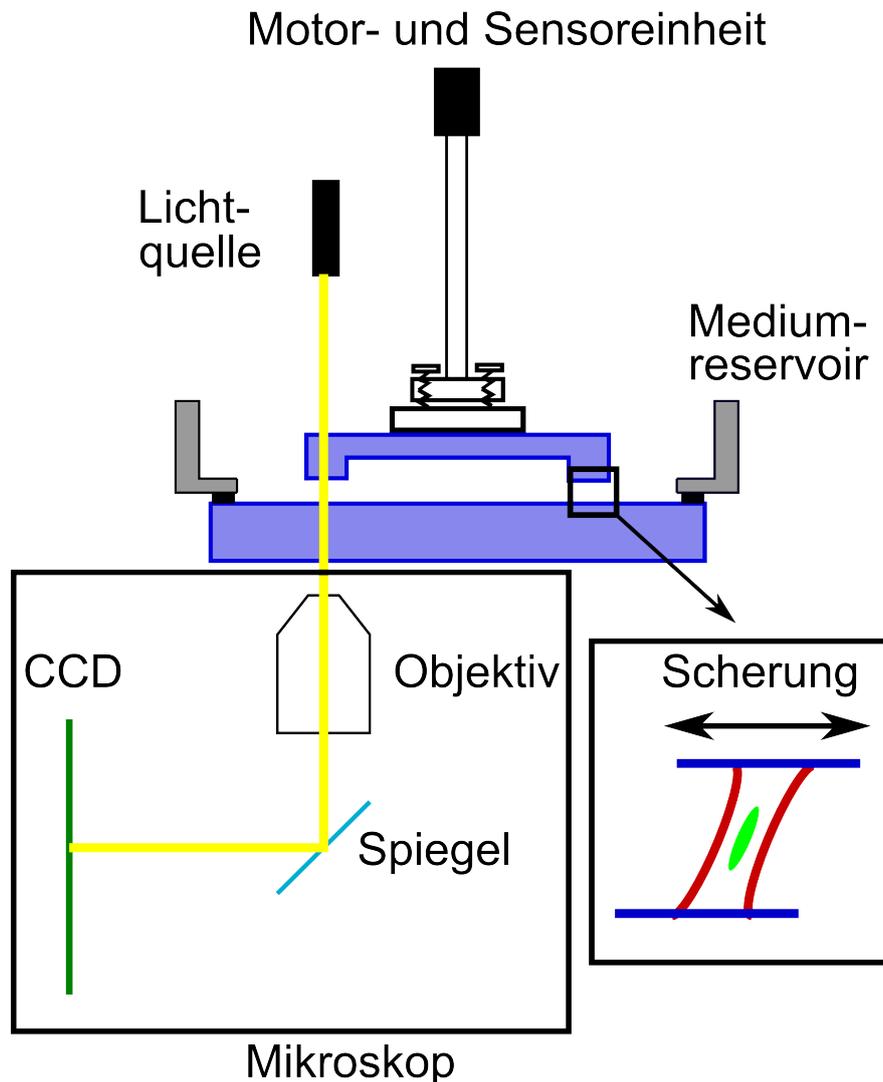


Abbildung 3.2.: Schemazeichnung des experimentellen Aufbaus nach [87, 127]: Zellen adhären zwischen einer fixierten Glasplatte und einer/einer Platte/Ring, der/die mit dem Messkopf des Rheometers verbunden ist. Inset: Durch eine Drehung der oberen Platte werden die adhären Zellen geschert. Ein Mikroskop ermöglicht die optische Kontrolle der Experimente.

### 3.2.2.2. Messgeometrie - Glasplatten

In vorangegangenen Arbeiten wurde eine Platte-Platte-Geometrie verwendet [87]. Der Nachteil dieser Geometrie ist, dass die Scherung abhängig von der radialen Position zwischen den Platten ist. Dies bedeutet, dass Zellen am äußeren Rand der Platte maximal geschert werden, während Zellen in der Mitte nicht geschert werden. Um diesen Einfluss der inhomogenen Scherung zu

## 3.2 Rheometrie

---

verringern, wurde die obere Glasplatte für diese Arbeit durch einen Glasring ersetzt (Abbildungen 3.2+3.3). Der Einfluss des Rings wird in Abschnitt 4.1.7.1 analysiert.

Zellen müssen an beiden Glasoberflächen adhären. Dies stellt hohe Anforderungen an die Oberflächenbeschaffenheit des Glases. Es wurden *Fused Silica* Glasplatten (Edmund Optics) verwendet. Die untere Glasplatte hatte einen Durchmesser von 5 cm, der Ring einen äußeren Durchmesser von 4 cm, einen inneren von 3,5 cm. Der Ring wurde durch eine 100-200  $\mu\text{m}$  tiefe Ausfräsung aus einer Glasplatte hergestellt (die Ausfräsungen wurden durchgeführt von Glasmalerei Frese, Saarbrücken).

### 3.2.2.3. Präparation

In diesem Abschnitt werden die Schritte zur Vorbereitung einer Messung erläutert. Zunächst wird auf die Messgeometrie, die Glasplatten, eingegangen, anschließend auf die Präparation der Zellen und die Vorbereitung der Monoschicht im Rheometer.

Die Glasplatten müssen für die Experimente sauber und frei von Staub und jeglichen Verschmutzungen sein. Sie wurden im Vorfeld zunächst mit Wasser abgespült, dann in 4%-iger Deconexlösung im Ultraschallbad bei 40°C gesäubert und schließlich mit reinem Ethanol abgespült. Eine Metallhalterung wurde aufgeklebt, um eine Verbindung zum Drehsensor herstellen zu können (Siehe Abbildung 3.3). Um die Zelladhäsion an Glas zu verbessern, wurden die Platten mit Fibronectin beschichtet. Dazu wurde eine Fibronectinkonzentration von etwa  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  auf die Platten aufgebracht, indem eine 4%-ige Fibronectinlösung in Hanks Buffered Salt Solution (HBSS) für eine Stunde auf den Platten inkubiert wurde.

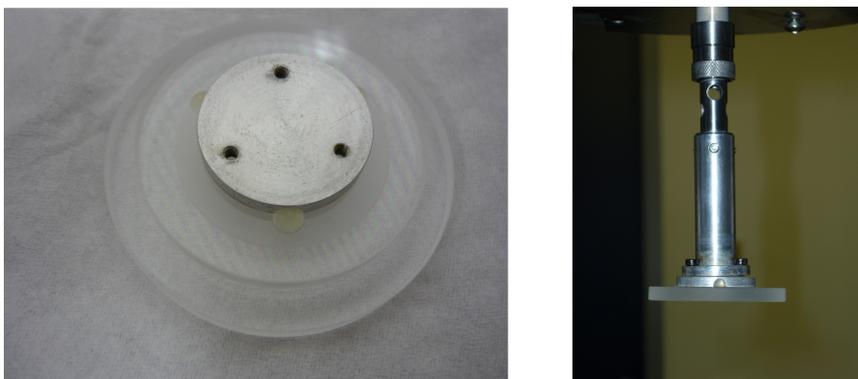


Abbildung 3.3.: Messgeometrie nach [128]. Links: Glasring mit aufgeklebtem Adapter in Kontakt mit der unteren Glasplatte. Der ausgefräste Mittelteil und die Newton'schen Interferenzstreifen sind erkennbar. Rechts: Glasring im Rheometer. Der Drehsensor ist lose an den Adapter des Glasrings geschraubt. Der Drehsensor ist mit dem Messkopf des Rheometers verbunden.

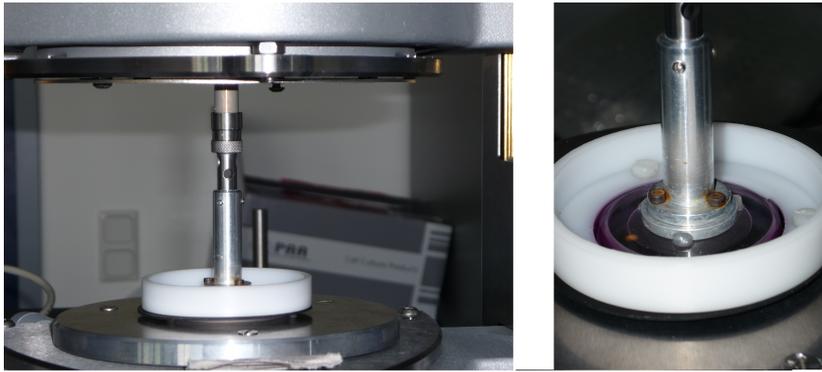


Abbildung 3.4.: Vorbereitung einer Messung [128]. Das Mediumreservoir fixiert die untere Platte. Der Glasring ist mit der Metallhalterung über den Drehsensor mit dem Messkopf des Rheometers verbunden und wird langsam auf die Zellen abgesenkt, bis diese gequetscht werden.

Es folgte die Vorbereitung der Zellen, die wie in Abschnitt 3.1.1 (Schritte 1 bis 6) beschrieben vorgenommen wurde. Der Zellsuspension wurde noch  $1 \mu\text{l}$  einer *microbead*-Suspension (Silica Kugeln mit einem Durchmesser  $d=6,89 \mu\text{m}$  in Wasser, Bangs Labs) hinzugefügt. Die Beads dienen als Abstandshalter und sollen verhindern, dass die Zellen bei der parallelen Einstellung der Platten zerquetscht werden (Siehe Abbildung 3.5).

Die untere Platte wurde mit Hilfe eines Teflonreservoirs im Rheometer fixiert und mit etwa  $500 \mu\text{l}$  Medium benetzt um ein Austrocknen zu verhindern. Nachdem die Zell-Bead-Suspension mehrmals auf und ab pipettiert wurde, um die Bildung von Zellaggregaten zu vermeiden, wurde diese gleichmäßig auf der Platte verteilt. Um eine Kontaktierung der Zellen mit beiden Platten zu ermöglichen, muss eine parallele Stellung der Platten gewährleistet sein. Die dazu verwendete Microbead Methode [127, 128, 129] (Siehe Abbildung 3.5) ist eine Modifikation der in [87] beschriebenen Präparation der Glasplatten.

Die obere Platte wurde lose an einen Schaft geschraubt und mit dem Sensor des Rheometers verbunden (Abbildung 3.3). Der Lift wurde langsam abgesenkt, bis die obere Platte auf den Beads auflag. Dieser Punkt wird durch einen plötzlichen, starken Anstieg der Normalkraft markiert. Bei einer Kraft von  $F=2 \text{ N}$  wurde der Lift gestoppt. Dadurch, dass die obere Platte nur lose an den Schaft geschraubt wird, stellt sich diese beim Zusammenfahren automatisch parallel zur unteren Platte ein. Die Kraft von  $F=2 \text{ N}$  ist notwendig, um sicher zu stellen, dass die Platte auf den Beads aufliegt und die Zellen gequetscht werden. Es folgte eine 45 minütige Wartezeit, während derer die Zellen adhärten. Anschließend wurde die Ausrichtung der oberen Platte mit UV-Kleber fixiert. Die Normalkraft verhindert, dass die parallele Stellung der Platten durch die Trocknung des Klebers verändert wird. Nach dem Härten des Klebers folgte eine weitere Wartezeit von 45 Minuten. Nach etwa 1,5 Stunden adhärten die Zellen fest an den Platten. Zuletzt wurde der Lift soweit angehoben ( $\approx 15 \mu\text{m}$ ), dass keine Normalkraft auf die Zellen wirkte. Dies stellt sicher, dass die Zellen nicht gequetscht oder gedehnt werden. Es ergibt sich ein Spalt von  $15\text{-}20 \mu\text{m}$ , was in etwa dem mittleren Durchmesser der Zellen entspricht (Vergleiche Abschnitt 4.1.7). Ein

### 3.2 Rheometrie

detailliertes Protokoll mit allen Schritten findet sich in Anhang A.1.3.

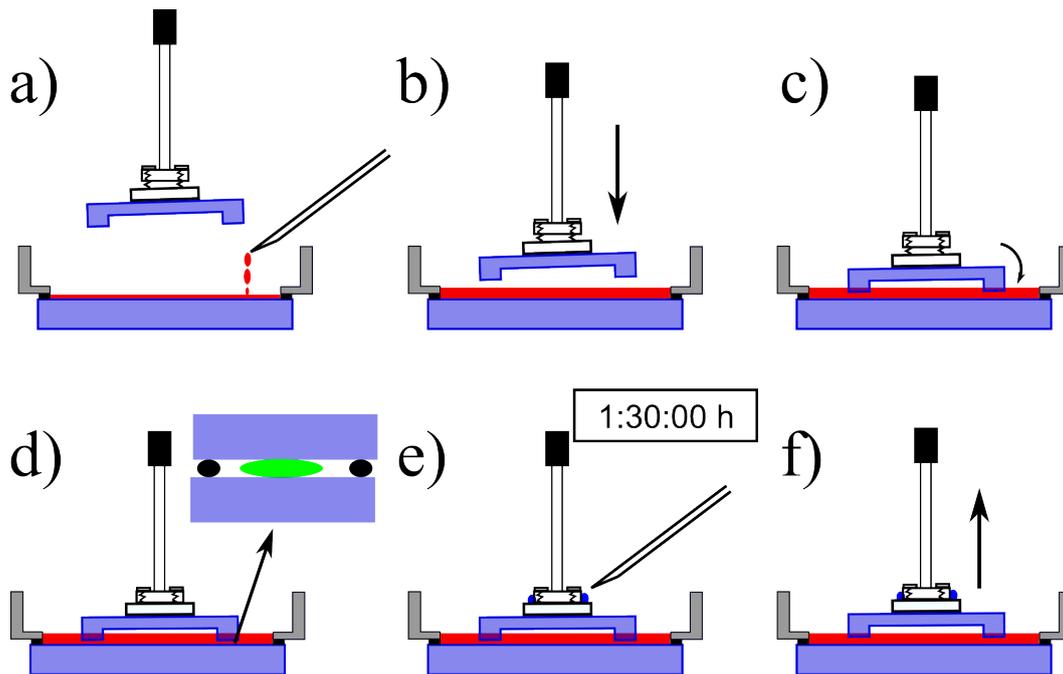


Abbildung 3.5.: Schematische Darstellung der Microbead Methode zur parallelen Einstellung der Messgeometrie nach [129]. a) Die mit Fibronectin beschichteten Platten werden ins Rheometer eingebracht. Die untere Platte wird mit Hilfe des Mediumreservoirs fixiert. Die obere Platte ist lose an einen Schaft geschraubt, der mit der Sensoreinheit des Rheometer verbunden ist. Dabei ist wichtig, dass die obere Platte beweglich bleibt. Eine Suspension, bestehend aus Zellen und *microbeads* (Durchmesser  $d=6,89 \mu\text{m}$ ) in Zellmedium, wird auf die untere Platte pipettiert. b-d) Der Lift wird langsam abgesenkt, bis die obere Platte auf den Beads aufliegt (d) inset). Dieser Punkt wird durch einen starken Anstieg der Normalkraft identifiziert. Bei einer Kraft von etwa  $F=2 \text{ N}$  wird der Lift gestoppt. Da die obere Platte sich frei bewegen kann, hat sich diese nun parallel zur unteren Platte eingestellt. e) Es folgt eine Wartezeit von etwa  $t=1,5 \text{ h}$ , damit die Zellen an den Platten adhären können. Während dieser Zeit wird die Ausrichtung der oberen Platte mit UV-Kleber fixiert. f) Der Spaltabstand wird auf etwa  $h=15-20 \mu\text{m}$  eingestellt, was ungefähr dem mittleren Zelldurchmesser entspricht. Es sollte keine Normalkraft auf die Zellen wirken. Dies stellt sicher, dass die Zellen nicht gequetscht oder gestreckt werden.

### 3.3. Mechanik der Atherosklerose in Mäusen

In diesem Abschnitt werden die Präparation der Aortaprobe und die verwendeten Messmethoden zu deren mechanischer Charakterisierung vorgestellt.

#### 3.3.1. Präparation der Aortaprobe

Die für die mechanischen Messungen an Aorten verwendeten Mäuse wurden am Universitätsklinikum Homburg gemäß den deutschen Tierschutzgesetzen gehalten und für die Experimente vorbereitet [130]. Um den Einfluss von Atherosklerose zu untersuchen, wurden Mäuse, denen das Apolipoprotein E Gen fehlt, über eine Zeit von sechs Wochen mit speziellem fett- und cholesterinreichem Futter gefüttert [130]. Dies führt zur Bildung atherosklerotischer Lesionen [130]. Der Hälfte der so behandelten Mäuse wurde zusätzlich das Medikament Ivabradin verabreicht [130, 131].

Die Präparation der Aortenstücke wurde unmittelbar vor Beginn der Messungen vorgenommen, um Artefakte durch Transport oder eine Kryokonservierung zu vermeiden. Die Mäuse wurden dazu mit einer hohen Dosis eines Narkotikums behandelt. Anschließend wurden die Aorten mittels eines Skalpell extrahiert. Dies erfolgte durch eine medizinisch technische Assistentin (Ellen Becker) im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz [130]. Die Aorten wurden jeweils in drei Stücke zerteilt, die getrennt untersucht wurden, um etwaige positionsabhängige Änderungen erfassen zu können. Für die Messungen mit exzentrischer Rheometrie wurden die zylinderförmigen Aortenstücke aufgeschnitten, so dass man ein rechteckiges Gewebestück zwischen die Rheometerplatten einbringen konnte.

Nach der Extraktion wurde das erste Aortenstück sofort ins Rheometer eingebracht. Die weiteren Stücke lagerten für maximal eine Stunde in Puffermedium auf Eis .

#### 3.3.2. Exzentrisches Platte-Platte-Rheometer

Die Aorten sollten mit Hilfe des Haake-Mars-Rheometers und einer Platte-Platte-Geometrie mit einem Durchmesser von 20 mm vermessen werden. Die Gewebeprobe hatten eine Fläche von wenigen  $\text{mm}^2$  und sind waren etwa 40-100  $\mu\text{m}$  dick. Die Probe füllten somit nicht die komplette Platte-Geometrie aus. Daher wurde sie am äußeren Rand der Platte platziert (Siehe Abbildung 3.6, links), der übrige Spalt wurde mit Puffermedium gefüllt. Der Spaltabstand wurde solange verringert, bis die Normalkraft leicht anstieg, um eine ausreichende Kontaktierung zu gewährleisten. Aufgrund der Abmessungen der Probe im Vergleich zur verwendeten Geometrie kann nicht die gewöhnliche Umrechnung vom Drehmoment zur Schubspannung verwendet werden, da diese von einer vollständigen Bedeckung der Geometrie durch die Probe ausgeht. Stattdessen wurde

### 3.3 Mechanik der Atherosklerose in Mäusen

---

die Schubspannung folgendermaßen berechnet:

$$\tau = \frac{M}{R \cdot A} \quad (3.1)$$

Durch die Verwendung des äußeren Radius  $R$  der Platte, entsteht ein Fehler bei der Berechnung, der jedoch für alle Proben gleich ist und somit den Vergleich der Proben nicht verfälscht. Beim Vergleich mit anderen Messungen muss darauf jedoch geachtet werden. Eine analoge Vorgehensweise wurde etwa zeitgleich in [132] vorgestellt, wobei sich die Berechnung der Schubmodule unterscheidet.

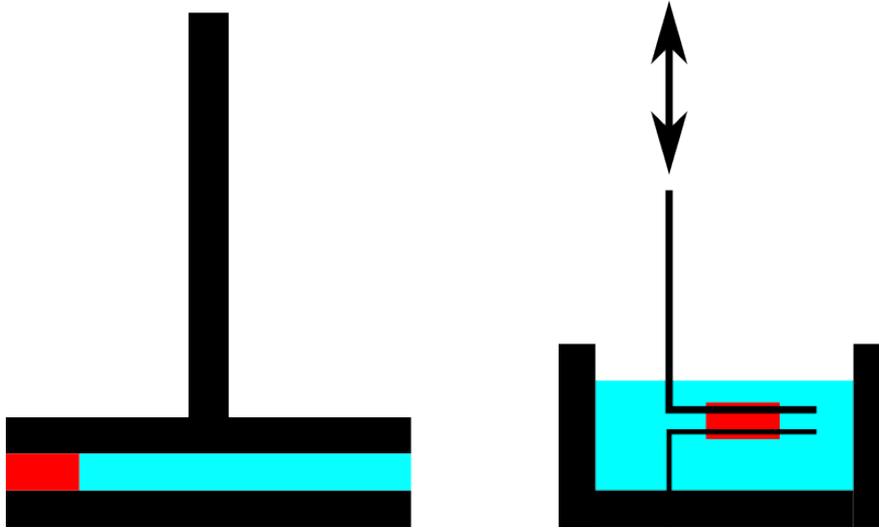


Abbildung 3.6.: Schematische Darstellung der Messmethoden zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften von Aortastücken. Links: Exzentrisches Platte-Platte-Rheometer analog zu [132]. Die Probe, die den Spalt der Geometrie nicht vollständig ausfüllt, wird am Rand der Platte platziert. Rechts: Zugversuch. Die Aortastücke werden mit Haken im Rheometer befestigt. Einer der Haken ist dabei fixiert, der andere mit dem Sensor des Rheometers verbunden. Dadurch kann der Rheometerlift verwendet werden, um die Aorta zu strecken und die entstehende Normalkraft zu messen.

#### 3.3.3. Zugversuche im Rheometer

Neben den Scherexperimenten wurden auch Zugexperimente an Aortastücken durchgeführt. Zylindrische Aortastücke wurden mit Haken innerhalb des Rheometers befestigt. Ein Haken wurde mit dem Sensor des Rheometers verbunden, während der andere fixiert wurde (Siehe Abbildung 3.6, rechts). Die Aortastücke wurden dabei in Puffermedium belassen. Mit Hilfe des Rheometerlifts konnte das zu untersuchende Aortastück gestreckt und die entstehende Kraft mittels des Normalkraftsensors des Rheometers gemessen werden. Die Aortastücke wurden einer konstanten Dehnungsgeschwindigkeit  $\dot{\epsilon}$  unterworfen, bis eine maximalen Dehnung  $\epsilon_{max}$  erreicht war. Es

ergaben sich Kraft-Dehnungs-Kurven aus denen ein differentielles Dehnungsmodul

$$E = \frac{\partial F}{\partial \epsilon} \quad (3.2)$$

bestimmt werden konnte.

## **3.4. Hydra**

Für die hier vorgestellten Experimente wurden *Hydra vulgaris* und *Hydra magnipapillata* verwendet. Letztere sind derart modifiziert, dass das Gen für das Protein ks1 [80, 81] mit der Basenabfolge für das grün fluoreszierende Protein (GFP) verknüpft wurde. Somit kann das ks1 Protein durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden.

### **3.4.1. Hydrakultur**

Alle Polypen wurden in Glasschalen, die mit Volvic Mineralwasser (Nestle Deutschland Ag) gefüllt sind gehalten. Eine Fütterung mit frisch geschlüpften Artemien erfolgte alle zwei bis drei Tage. Dazu wurden die Artemien mit destilliertem Wasser gewaschen und mit einer Pipette zu den Hydren pipettiert. Pro Hydra sollten etwa 2-3 Artemien vorhanden sein. Nach einer Stunde wurden die Hydren mit Volvic Mineralwasser gewaschen, um die restlichen Artemien zu entfernen. Nach etwa 4-8 Stunden erfolgte eine erneute Reinigung um die Ausscheidungsprodukte der Hydren zu entfernen. Die Waschschrte sind sehr wichtig, da es sonst durch die Artemien und die Artemienreste zu einer bakteriellen Kontamination der Hydrakultur kommen kann [69].

Artemien schlüpfen aus Artemieneiern, die für ein bis drei Tage in einer speziellen Salzlösung (30 Gramm Salz (Hobby Aquaristik) in 1 Liter destilliertem Wasser) inkubiert werden.

### **3.4.2. Präparation**

Experimente wurden an Gewebestücken von Hydren, die mindestens 24 Stunden lang nicht gefüttert wurden, durchgeführt. Hydrapolypen wurden auf eine Plastikpetrischale pipettiert. Unter einem Mikroskop wurden ringförmige Gewebestücke aus der Körpermitte der Polypen ausgeschnitten. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Stücke in der Nähe des Kopfes oder des Fußes geschnitten werden, da sich hier hauptsächlich differenzierte Zellen befinden. Die ringförmigen Gewebestücke wurden dann in vier bis acht Teile geschnitten. Es folgte eine einstündige Inkubation in Volvic Mineralwasser. In dieser Zeit bildete sich eine Hohlkugel, die den Ausgangspunkt für das Experiment bildete. Danach konnten die Hydrakugeln ins Mikroskop transferiert werden.

## 3.5 Datenanalyse

---

### 3.4.3. Mikroskopie

Hydra magnipapillata wurde verwendet, um die Dynamik des ks1 Proteins zu untersuchen. Dieses ist mit GFP gekoppelt und kann durch eine Anregung mit blauem Licht ( $\lambda \approx 365$  nm) sichtbar gemacht werden. Hydra reagiert jedoch auf kurzwelliges Licht und bewegt sich von der Lichtquelle weg. Daher war die Nutzung der im Mikroskop integrierten Quecksilberdampflampe nicht möglich. Diese wurde durch eine blaue LED (LUXEON Alustar) ersetzt. Ein IMAGEJ [133, 134] Skript wurde konzipiert, das zum einen die periodische Bildaufnahme steuert und zum anderen die LED synchron mit der Bildaufnahme an- und danach wieder ausschaltet. Die Hydrakugeln wurden mit einem 10-fach Objektiv auf eine Hamamatsu EMCCD Kamera abgebildet.

### 3.4.4. Spezifische Färbung von F-Aktin in Hydra

Um den Einfluss der Zytoskelettstruktur auf die Regeneration und speziell die Symmetriebrechung zu untersuchen wurde das Aktinzytoskelett mit Hilfe des Phallotoxins Phalloidin, welches mit dem Farbstoff Rhodamin gekoppelt ist, angefärbt. Es wurden 40-50 Hydrakugeln präpariert (Durchführung in Kooperation mit Heike Dobicki, Aravind Pasula und Julia Flesch). Um die Zytoskelettstruktur zeitaufgelöst betrachten zu können wurden die Gewebestücke aufgeteilt und in unterschiedliche *wells* einer 90-*well*-Platte zusammen mit Volvic Mineralwasser eingebracht. Die Färbung erfolgte dann nach 0h, 1h, 2h, 8h, 12h, 18h, 24h, und 32h. Diese wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit Heike Dobicki, Aravind Pasula und Julia Flesch durchgeführt. Die Färbung wurde nach einem modifizierten Protokoll nach [135] durchgeführt:

- Relaxation der Hydrakugel in 2%-iger Urethanlösung für 1-5 Minuten bei 4°C
- Waschen mit Volvic
- Fixierung mit 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung in Volvic für 1 Stunde bei 4°C
- Waschen mit Volvic
- Permeabilisierung mit 0,1%-iger Triton X-Lösung
- Waschen mit Volvic
- Färben mit 1:200 Rhodamine-Phalloidin in 0,1%-iger Triton X-Lösung für 30-45 Minuten
- Waschen mit Volvic

## 3.5. Datenanalyse

Die Rohdaten der rheologischen Messungen wurden mit Hilfe eines LabView Programms gespeichert. Dieses beinhaltet einen sogenannten *oversampling*-Algorithmus [128, 136], der die Signal-

qualität durch die Mittelung mehrerer Messwerte verbessert. Die Rohdaten der Messungen liegen als elektrische Spannungen vor. Diese wurden mit Hilfe von Matlab in mechanische Größen umgerechnet (Siehe Anhang A.2.1). Die Berechnung von Einzelzeleigenschaften (Siehe Abschnitt 4.1.7) erfolgte ebenfalls mit Matlab (Siehe Anhang A.2.2). Die Fourieranalyse mittels *fast fourier transform* (FFT) [137] und die weitere Auswertung der Lissajous-Graphen erfolgt mit dem Analyseprogramm Origin8.6G. Bildaufnahme und -analyse erfolgte mit ImageJ [133], Matlab und WASABI (Hamamatsu Photonics).

## 4. Teil I: Mechanik lebender Zellen

Die mechanischen Eigenschaften einzelner Zellen sind von entscheidender Bedeutung für viele biologische Prozesse. In der Wundheilung migrieren, proliferieren und differenzieren Fibroblasten aufgrund von mechanischen Stimuli und tragen zum Schließen der Wunde und zur Wundheilung bei [138, 139]. Die Bildung von Metastasen bei Krebserkrankungen wird eingeleitet durch eine Transformation von festen, stationären zu weicheren, motilen Zellen [19, 140]. In der Embryogenese sind die Kräfte, die von Zellen ausgeübt werden, ein entscheidender Bestandteil der komplexen Signalkaskaden, die zur korrekten Entwicklung eines Organismus beitragen [13, 15, 16]. Das grundlegende Verständnis der Zellmechanik ist Voraussetzung für das Verständnis komplexer mechanobiologischer Vorgänge innerhalb eines Organismus.

Grundlage der mechanischen Eigenschaften einer Zelle ist das Zytoskelett, ein dynamisches Polymernetzwerk bestehend aus Aktin-, Mikrotubuli- und Intermediärfilamenten, dessen Struktur durch eine Vielzahl assoziierter Proteine gesteuert werden kann. Es garantiert die mechanische Stabilität der Zelle. Transmembranproteine verbinden das Zytoskelett mit Proteinen der extrazellulären Matrix und bilden sogenannte Adhäsionskontakte. Diese verankern die Zelle in ihrer Umgebung [22] und geben ihr darüber hinaus die Möglichkeit Kräfte wahrzunehmen und auszuüben [7, 42, 52, 141].

In den letzten Jahrzehnten wurden viele verschiedene experimentelle Techniken zur Untersuchung der Zellmechanik entwickelt. Das Mikroplattenrheometer [117], *particle tracking microrheology* [123], *magnetic tweezer* [122, 124] und das *atomic force microscope* [125] können einzelne oder wenige Zellen pro Experiment vermessen. Der mikrofluidische optische Strecker kann mehr als 100 Zellen pro Sekunde analysieren, ist jedoch auf Suspensionszellen beschränkt [121, 126]. In [57] wurde eine Methode zur Vermessung einer Monoschicht von  $10^5 - 10^6$  adhären Zellen auf der Basis eines kommerziellen Rheometers vorgestellt (Zellmonoschichtrheologie).

Mit Hilfe der vielfältigen experimentellen Aufbauten wurden in den letzten Jahrzehnten sehr viele Erkenntnisse zur Zellmechanik gewonnen. Jedoch sind die Grundlagen der mechanischen Eigenschaften lebender Zellen aufgrund der Komplexität und der Dynamik des Zytoskeletts noch nicht vollständig verstanden.

Für kleine Stimuli sind Zellen linear [142]. Dies bedeutet, dass die Kraft proportional zur Verformung und somit die Steifigkeit unabhängig von der Größe des Stimulus ist. In diesem Regime zeigt sich eine breite Übereinstimmung bei der sogenannten *power law* Rheologie. Unabhängig von der Zellart und der Messmethode nimmt die Steifigkeit  $S$  der untersuchten Zelle mit der Frequenz zu und folgt einem Exponentengesetz  $S \propto f^\beta$ , wobei  $\beta$  Werte zwischen 0,05 und 0,5

annimmt [143, 144]. Die Absolutwerte der gemessenen Zellsteifigkeiten weichen jedoch um bis zu 4 Größenordnungen ab, je nachdem welche Messmethode verwendet wird [120].

Fabry et al. zeigen, dass Zellen bis zu Scherungen von etwa 200 Nanometern im linearen Regime bleiben [142]. Die Größe des Stimulus, bei dem der Übergang zu nichtlinearer mechanischer Zellantwort erfolgt, wurde bisher nicht exakt quantifiziert. Viele mechanische Stimuli unter physiologischen Bedingungen sind jedoch so groß, dass es sehr wahrscheinlich ist, dass Zellen außerhalb des linearen Regimes agieren [112]. Somit ist das Verständnis der nichtlinearen Zellantwort von fundamentaler Bedeutung und ist daher Gegenstand vieler Arbeiten [57, 108, 109, 113, 114]. In der Literatur werden sowohl zunehmende [57, 108, 109], als auch abnehmende [87, 108, 113] Steifigkeiten beschrieben. Wolff et al. bezeichnen dies als *stiffening softening paradox* [114] der Zellmechanik. Die zugrundeliegenden molekularen Ursachen sind noch nicht verstanden.

Die Zunahme der Steifigkeit einer Zelle kann durch eine steigende mechanische Vorspannung [106, 107, 108, 109, 113] hervorgerufen werden. Dabei ist es unerheblich, ob die Spannung von außen aufgebracht, oder durch myosininduzierte Kontraktilität von der Zelle generiert wird [110]. Die Rekrutierung von Proteinen an Adhäsionskontakten [50, 145, 146], Umordnungen des Zytoskeletts und Aktinpolymerisation als Antwort auf mechanische Stimuli [147] können ebenso zu einer Versteifung einer Zelle führen.

Die Abnahme der Zellsteifigkeit kann durch die Dissipation einer Vorspannung [113] oder das Ablösen von Vernetzern [102, 104] und den Abbau von Teilen des Zytoskeletts [111, 112, 148], hervorgerufen durch mechanische Stimuli, erfolgen. Darüber hinaus verflüssigen sich Zellen umso mehr, je elastischer sie zu Beginn der Messung sind [109, 149].

Der Ausgangszustand der Zelle ist eine wichtige Größe in Bezug auf die nichtlineare Mechanik. Er wird durch die Netzwerkstruktur des Zytoskeletts determiniert. Änderungen in der Netzwerkstruktur als Antwort auf äußere biochemische und mechanische Stimuli sind für die nichtlineare Zellantwort von entscheidender Bedeutung. Das Zusammenspiel zwischen abnehmender und zunehmender Steifigkeit und der Einfluss der Messmethode und des Messprotokolls sind noch nicht verstanden.

Ziel dieser Arbeit ist es mit Hilfe der Zellmonoschichtreologie die mechanische Antwort von 3T3 Fibroblasten auf mechanische Oszillationen mit großen Amplituden zu charakterisieren. Im Speziellen sollen der Übergang vom linearen zum nichtlinearen Regime und die Abhängigkeit der Nichtlinearitäten von der Anregung, u.a. in Anlehnung an die Ergebnisse der iGWLC von Wolff et al. [114], quantifiziert werden. Wolff et al. haben das Modell der inelastischen wurmartigen Kette (*inelastic glassy wormlike chain*, iGWLC) eingeführt, welches den Einfluss vereinfachter Filament- und Vernetzerdynamik, ohne Berücksichtigung der komplexen Netzwerkstruktur und der Effekte molekularer Motoren auf die mechanische Antwort einer Zelle simuliert [114, 150]. Die iGWLC liefert sowohl eine Versteifung, als auch eine abnehmende Steifigkeit, abhängig von der oszillatorischen Anregung. Darüber hinaus sagt das Modell drei verschiedene nichtlineare Regime, in Abhängigkeit von der Frequenz und Amplitude des oszillatorischen Stimulus voraus. Messungen an vernetzten Aktinfilamenten konnten Teile der Vorhersagen verifizieren. Die Bestätigung durch Messungen an lebenden Zellen steht noch aus. Das Modell liefert eine detaillierte *Landkarte* der

---

nichtlinearen Zellmechanik und ist somit ein interessanter Ansatzpunkt für Experimentatoren. Die Zellmonoschichtreologie hat den Vorteil, dass viele Zellen in einem Experiment vermessen werden, wodurch sich ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis ergibt. Dies ermöglicht den Einsatz sensibler Analysewerkzeuge, wie z.B. der Fouriertransformationsrheologie [91], zur Charakterisierung der nichtlinearen Mechanik einer Monoschicht von Zellen. Durch die ausführliche Analyse der mechanischen Zellantwort sollen Rückschlüsse auf die zugrundeliegende mikroskopische Dynamik ermöglicht werden.

Das Kapitel gliedert sich in 6 Abschnitte. Der experimentelle Aufbau musste gegenüber vorherigen Arbeiten modifiziert und anschließend validiert werden. Nichtlinearitäten sollten quantifiziert und die vermessenen zellmechanische Größen mit anderen Messmethoden verglichen werden. Daher war ein Ziel der Arbeit, von den Daten einer Monoschicht auf die mittleren mechanischen Eigenschaften der Einzelzelle zu schließen. Dies wird in Kapitel 4.1 vorgestellt. Eine Anwendung der Umrechnung von Monoschicht zu Einzelzelle wird in Kapitel 4.2 anhand der mechanischen Charakterisierung von MCF7 Brustkrebszellen vorgestellt. In Kapitel 4.3 wird der Einfluss des TES-Proteins auf die mechanischen Eigenschaften von HELA-Zellen untersucht. In Kapitel 4.4 werden die experimentellen Ergebnisse zur nichtlinearen Zellantwort auf oszillatorische Anregungen mit großer Amplitude vorgestellt. Kapitel 4.5 beinhaltet die Modellierung der experimentellen Ergebnisse unter Nutzung eines Kontinuumsmodells und eines Filamentmodells. Den Abschluss bildet Kapitel 4.6 mit einer Zusammenfassung, Interpretation und Einordnung der Ergebnisse und einem Ausblick auf mögliche zukünftige Arbeiten.

## 4.1. Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

Die Zellmonoschichtreologie wurde entwickelt, um die mechanischen Eigenschaften einer Monoschicht von  $10^5 - 10^6$  Zellen in einem Experiment zu untersuchen [87]. Dabei wurde ein Anton Paar Rheometer mit einer Platte-Platte-Geometrie verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden ein Haake Mars II Rheometer und eine Platte-Ring-Geometrie verwendet. Zusätzlich kommen Auswertemethoden zum Einsatz, für die eine Modifikation des Rheometers und der Datenanalyse notwendig waren 2.2.3. Die Modifikationen wurden im Rahmen vorangegangener Arbeiten begonnen [128, 151] und in dieser Arbeit abgeschlossen. Daher wurde zunächst eine Validierung der Messmethode vorgenommen, deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt sind.

### 4.1.1. Zellmedium hat keinen Einfluss auf die Messungen an lebenden Zellen

Um sicherzustellen, dass ausschließlich die mechanischen Eigenschaften von Zellen und nicht ebenfalls die des Zellmediums gemessen werden, wurden Messungen ohne die Zugabe von Zellen durchgeführt. Die Präparation erfolgte analog zur Präparation von Zellmessungen (Siehe Anhang A.1.3), nur wurde eine reine Bead-Zellmedium-Suspension (Leermessung ohne Zellen) zwischen die Platten gegeben. Es wurden deformationsgesteuerte Oszillationen mit einer Frequenz von 0,5 Hz und Amplituden von  $\gamma_0=0,001-0,1$  bei einem Spalt von  $h=12 \mu\text{m}$  und  $h=15 \mu\text{m}$  durchgeführt. Abbildung 4.1 zeigt die Ergebnisse der Leermessungen für zwei verschiedene Spaltabstände im Vergleich mit einer typischen Messung an lebenden 3T3-Fibroblasten. Die dynamischen Schubmodule für die Leermessung sind bei gleichem Spalt um den Faktor 1000 geringer als für Zellen. Damit kann der Einfluss des Zellmediums in der Analyse der Messdaten vernachlässigt werden.

### 4.1.2. Rohdaten

Das in dieser Arbeit verwendete Rheometer der Firma Thermo-Fisher Scientific bietet keinen Zugriff auf die vollständigen Daten der Messungen [128]. Für Oszillationsmessungen werden nur Mittelwerte der Oszillationsamplituden oder einzelne Oszillationsperioden gespeichert, um Schubmodule berechnen zu können. Zur vollständigen Analyse der nichtlinearen Zellmechanik (Siehe Abschnitt 2.2.3) wird der gesamte zeitliche Verlauf der Deformation und der Schubspannung benötigt [92, 152]. In früheren Arbeiten wurde daher die Möglichkeit etabliert die Rohdaten der Winkelkoordinate und des Drehmoments in Form von elektrischen Spannungswerten mittels eines LabView Programms zu speichern [128]. Eine verlässliche Umrechnung in mechanische Größen konnte nicht erreicht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Matlab-Skript erstellt, mit dessen Hilfe die elektrischen Spannungswerte in die Deformation umgerechnet werden können (Siehe Anhang A.2.1). Die Rohdaten des Drehmoments müssen ebenfalls in mechanische Schubspannungswerte konvertiert werden. Die vom Hersteller des Rheometers angegebene Umrechnungsfor-

#### 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

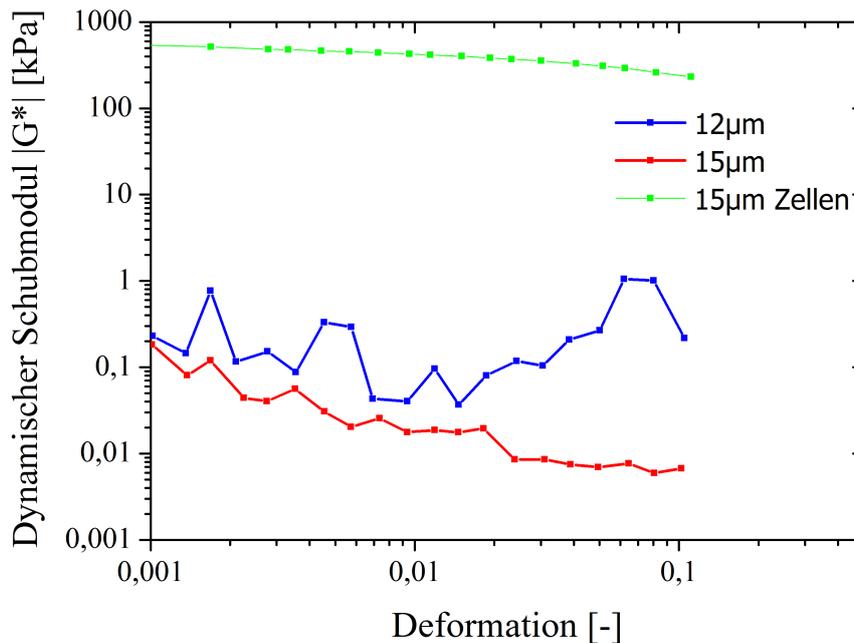


Abbildung 4.1.: Deformationsgesteuerte Oszillationsmessungen bei einer Frequenz von 0,5 Hz und Deformationsamplituden von  $\gamma_0=0,001-0,1$ . Der dynamische Schubmodul ist als Funktion der Oszillationsamplitude  $\gamma$  aufgetragen. Die Werte für die dynamischen Schubmodule sind für die Leermessung mit Zellmedium (rot und blau) um einen Faktor 1000 kleiner als für eine typische Messung an Zellen (grün). Der Einfluss des Zellmediums kann somit vernachlässigt werden.

mel

$$T = A \cdot (4,18 \cdot (U \cdot 0,84)^{0,4901} + 0,6564 \cdot (U \cdot 0,84)^{1,673}) \quad (4.1)$$

mit Vorzeichen A und elektrischer Spannung U lieferte aus unbekanntem Gründen falsche Werte [128]. Daher wurden mit Hilfe der Rheometersoftware bekannte Drehmomente eingestellt. Diese wurden als Funktion der gemessenen elektrischen Spannungsrohdaten aufgetragen. Durch eine Anpassung des Graphen konnte somit eine Umrechnungsformel bestimmt werden. Abbildung 4.2 (links) zeigt das Ergebnis und die daraus abgeleitete Umrechnung [128].

Um sicherzustellen, dass die Drehmomente korrekt wiedergegeben werden, wurde für diese Arbeit ein Drehmomentsensor (Modia GmbH) mit einer Messgenauigkeit von  $1 \mu\text{Nm}$  in das Rheometer integriert. Eine Platte-Geometrie (PP20) wurde in das Rheometer eingebracht und mit Hilfe des Rheometerlifts unter Aufwendung eines geringen Drucks mit dem Messkopf des Drehmomentsensors verbunden. Drehmomente wurden mit der Rheometersoftware eingestellt, und mit dem externen Drehmomentsensor vermessen. Die eingestellten und gemessenen Werte stimmen sehr gut überein (Abbildung 4.2, rechts). Für große Drehmomentwerte ergeben sich kleine Abweichungen. Dies ist durch Reibungsverluste (Kontaktierung zwischen PP20 und Drehmomentsensor erfolgt ausschließlich über leichten Druck) und die Ungenauigkeit des Drehmomentsensors zu erklären. Diese Ungenauigkeit kommt dadurch zustande, dass der Sensor mehrere Messbereiche hat,

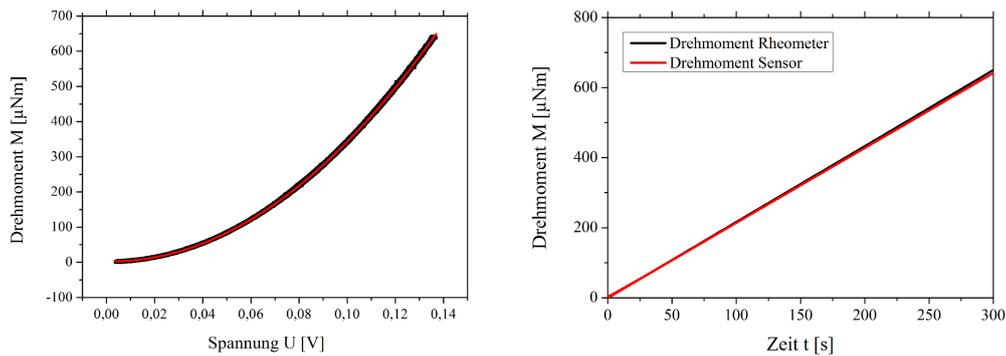


Abbildung 4.2.: Links: Drehmomente (mit der Rheometersoftware eingestellt) als Funktion der gemessenen Rohdaten (Spannung). Durch eine Anpassung (rot) der experimentellen Daten (schwarz) ( $R^2=0,99988$ ) ergibt sich die folgende Umrechnung:  $M(U) = 2,2 + 36196,53 \cdot |U - 0,0015|^{2,01}$ . Rechts: Vergleich des eingestellten Drehmoments mit dem mit Hilfe eines Drehmomentsensors (Modia GMBH) gemessenen Drehmoments. Es ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung, vor allem für kleine Drehmomente. Für Drehmomente größer als  $500 \mu Nm$  ergeben sich geringe Abweichungen, die durch die Kontaktierung der beiden Sensoren (Gleiten der sich berührenden Oberflächen) erklärt werden kann.

zwischen denen umgeschaltet werden musste. Üblicherweise erfolgt nach einer solchen Umstellung eine neue Kalibrierung des Nullpunkts, die hier während der Messung jedoch nicht vorgenommen werden konnte. Dies erklärt die Abweichung für große Drehmomente (nach dem Wechsel des Messbereichs).

Mit Hilfe der Drehmomentwerte und den mit Labview gemessenen elektrischen Spannungswerten von der Rheometerelektronik erhält man durch Anpassung eine Umrechnungsformel

$$M(U) = A \cdot (2,2 + 36196,53 \cdot |U - 0,0015|^{2,01}) \quad (4.2)$$

mit Vorzeichen A und elektrischer Spannung U. Die Umrechnung erfolgt ebenfalls mit Hilfe des Matlab-Skripts aus Anhang A.2.1. Somit konnten mit Hilfe des Drehmoment- und des Deformationssignals die mechanischen Eigenschaften einer Monoschicht berechnet werden, ohne auf die Rheometersoftware zurückzugreifen. Dies ist die Voraussetzung für die Anwendung der Fourierrheologie und der Berechnung der differentiellen und der verallgemeinerten Module (Siehe Abschnitt 2.2.3).

### 4.1.3. Oszillatorische Anregung - Deformations- und Schubspannungssteuerung

Das Haake Mars II Rheometer ist ein schubspannungsgesteuertes Rheometer. Es bietet jedoch die Möglichkeit sowohl schubspannungs-, als auch deformationsgesteuerte Messungen durchzuführen. Für schubspannungsgesteuerte Messungen kann der Motorstrom direkt eingestellt werden, was eine instantane Einstellung der Oszillationsanregung ermöglicht. Dies ist möglich, da eine

## 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

festen Beziehung zwischen Motorstrom und Motordrehmoment besteht [86]. Allerdings ist bei der Vermessung weicher Materie Vorsicht geboten, da das angelegte Drehmoment nicht zwingenderweise mit dem an der Probe anliegenden Drehmoment übereinstimmen muss [153]. Dies wird im Abschnitt 4.1.4 für den Fall der Vermessung von Zellen diskutiert.

Für deformationsgesteuerte Messungen wird ein elektronischer Regelkreis benötigt, der den Motorstrom, und damit die Schubspannung, derart einstellt, dass die gewünschte Deformation der Probe erfolgt [86]. Dies bedeutet, dass jede Messung mit einer Einregelphase beginnt, die im Folgenden näher betrachtet wird.

### 4.1.3.1. Deformationsgesteuerte Messungen

Es gibt zwei verschiedene deformationsgesteuerte Messmodi, die sich durch die Einregelphase unterscheiden.

- Langsames Annähern an die eingestellte Deformationsamplitude (Langsame Deformation **DL**)

Abbildung 4.3 zeigt die Einregelphase für eine Messung an Zellen. Die Schubspannungsamplitude wird langsam vergrößert, bis die gewünschte Deformationsamplitude erreicht ist. Dies dauert etwa 30 bis 40 Sekunden.

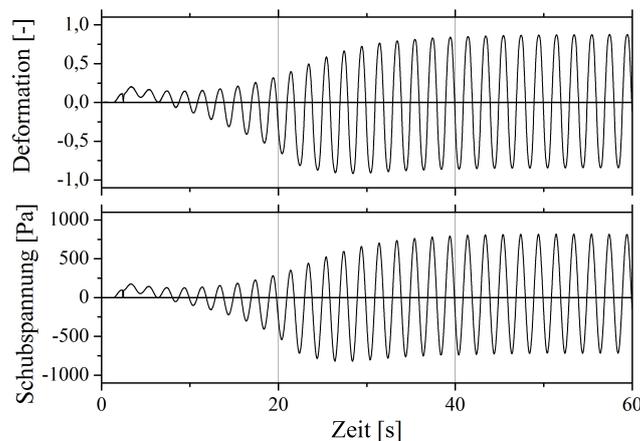


Abbildung 4.3.: Langsame Deformationsanregung (DL) mit einer Frequenz von  $f=0,5$  Hz und einer Amplitude von  $\gamma_0=0,6$ . Oben: Deformation als Funktion der Zeit. Die Deformationsamplitude steigt an, bis die gewählte Amplitude erreicht ist. Unten: Schubspannung als Funktion der Zeit. Die Schubspannungsamplitude wird langsam erhöht, bis die gewünschte Deformationsamplitude erreicht ist.

- Schnelles Anfahren der Deformationsamplitude (Schnelle Deformation **DS**)  
In diesem Modus schätzt die Regelung für jede neue Oszillationsserie die benötigte Schubspannungsamplitude durch eine Interpolation der Werte der vorangegangenen Oszillations-

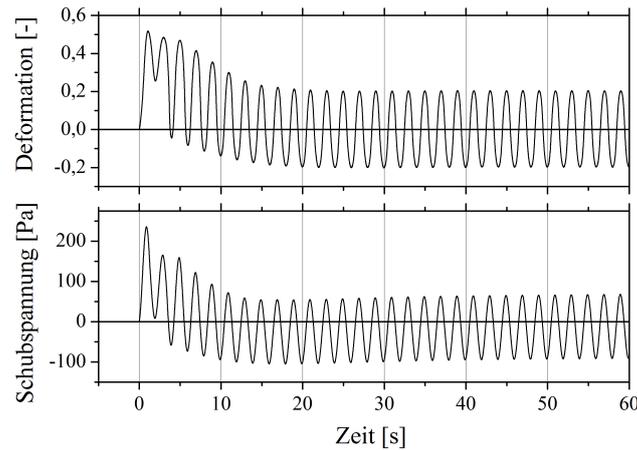


Abbildung 4.4.: Schnelle Deformationsanregung (DS) mit einer Frequenz von  $f=0,5$  Hz und einer Amplitude von  $\gamma_0=0,2$ . Oben: Deformation als Funktion der Zeit. Die Deformationsamplitude steigt schnell an, schießt über die eingestellte Amplitude hinaus und wird danach auf den eingestellten Wert zurückgeregelt. Unten: Schubspannung als Funktion der Zeit. Zunächst wird die interpolierte Schubspannungsamplitude eingestellt. Die Regelung erkennt das Überschießen der Deformation und verringert im Folgenden die Schubspannungsamplitude, so dass die eingestellte Deformation erreicht wird.

serie ab. Die Interpolation überschätzt die Schubspannung für Zellen und man erhält ein Überschießen (*overshoot*) zu Beginn der Messung (Siehe Abbildung 4.4). Die Einregelperiode dauert in diesem Modus etwa 10-15 Sekunden.

### Deformationssteuerung vs. Amplitudensteuerung

Im Falle einer Deformationsanregung wird die Amplitude  $\gamma_0$  und die Frequenz  $\omega_0 = 2\pi f_0$  vorgegeben. Man unterscheidet zwei Arten von Deformationsanregungen, die ein schubspannungsgesteuertes Rheometer mit Hilfe eines elektronischen Regelkreises realisieren kann.

#### 1. Deformationssteuerung

Es wird ein sinusförmiges Deformationssignal mit der gewünschten Amplitude eingestellt

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin(\omega_0 t) \quad (4.3)$$

Dies erfolgt durch eine Regelung des Schubspannungssignal, welches im Falle eines nichtlinearen Materials Abweichungen von der Sinusform aufweisen kann (Siehe Abschnitt 2.2.3.1).

$$\tau(t) = \sum_i \tau_i \cdot \sin(i \cdot \omega_0 t + \delta_i) \quad (4.4)$$

#### 2. Amplitudensteuerung

Es erfolgt ausschließlich ein Einstellen der Deformationsamplitude, die Sinusform der Defor-

## 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

mation wird nicht eingestellt. Die Regelung erfolgt durch eine Anpassung der Amplitude des sinusförmigen Schubspannungssignals, bis die gewünschte Deformationsamplitude erreicht ist. Es ergeben sich also

$$\gamma(t) = \sum_i \gamma_i \cdot \sin(i \cdot \omega_0 t + \delta_i) |_{\gamma_{max}=\gamma_0} \quad (4.5)$$

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \sin(\omega_0 t) |_{\tau_0 \rightarrow \gamma_0} \quad (4.6)$$

Laut Hersteller führt das Haake Mars Rheometer eine Deformationssteuerung durch. Die spektrale Analyse der Signale zeigt jedoch, dass das Rheometer im Falle von Zellen eine Amplitudensteuerung durchführt. Die Deformationsanregung im nichtlinearen Regime der Zellen weist somit keine monofrequente Sinusform auf. Die Schubspannung dagegen ist monofrequent und sinusförmig (Siehe Abbildung 4.5).

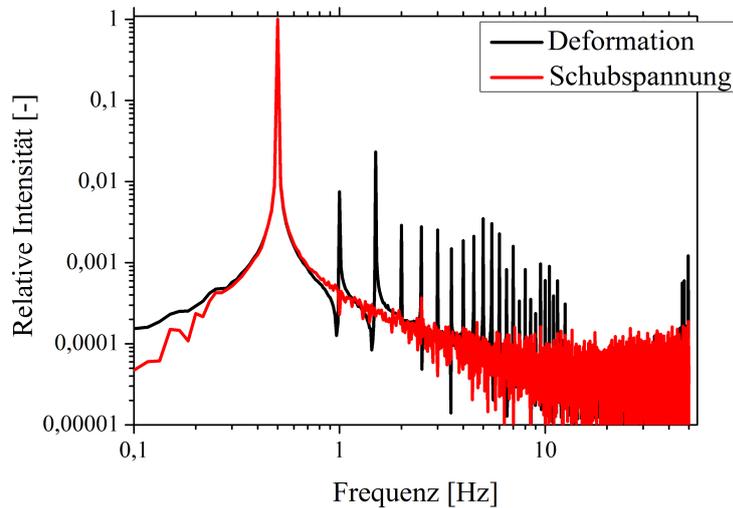


Abbildung 4.5.: Fouriertransformationen der Deformation (schwarz) und der Schubspannung (rot) für eine deformationsgesteuerte Oszillationsmessung an einer Zellmonoschicht von 3T3 Fibroblasten. Die relative Intensität  $I = \frac{I(f)}{I(f_0)}$  ist als Funktion der Frequenz  $f$  dargestellt. Die Schubspannung zeigt nur einen signifikanten Peak bei der Anregungsfrequenz  $f_0=0,5$  Hz. Die Deformation hingegen zeigt Beiträge von höheren Harmonischen im Bereich von 5%, obwohl es sich um eine deformationgesteuerte Messung handelt, die keine derartigen Beiträge aufweisen sollte.

Um Fehler bei der Umrechnung der Rohdaten und der Datenanalyse auszuschließen wurden Messungen an linear-viskoelastischen Polyethylenoxid-Gelen (PEO) durchgeführt. Damit sollte zum Einen sichergestellt werden, dass die Umrechnung ein sinusförmiges Deformationssignal liefern und die verwendete Geometrie ein lineares Gel charakterisieren kann. Zum Anderen sollte überprüft werden, ob die Geometrie oder die Zellen zum Versagen der Regelung führen.

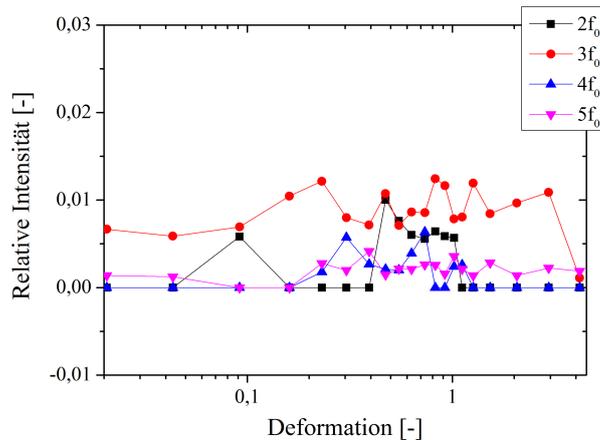


Abbildung 4.6.: Schubspannungsgesteuerte Oszillationsmessung an einem Polyethylenoxid-Gel. Aufgetragen sind die relativen Intensitäten der ersten vier höheren Harmonischen als Funktion der Deformationsamplitude. Die maximalen Beiträge liegen im Bereich von 1%. Es zeigt sich keine Abhängigkeit der Intensitäten von der Anregungsamplitude.

Es zeigt sich, dass die verwendete Ring-Geometrie ein lineares Gel charakterisieren kann. Es treten Obertöne im Bereich von nur einem Prozent (Abbildung 4.6) auf, die keine Abhängigkeit von der Anregungsamplitude zeigen. Die Fehlergrenze, ab welcher nichtlineare Beiträge ohne deutliche Anregungsabhängigkeit registriert werden, wird auf Basis der hier vorgestellten Ergebnisse auf 1% festgelegt.

#### **Auswirkungen der Amplitudensteuerung auf die Fourierreologie**

Die Auswertung von deformationsgesteuerten Fourierreologiemessungen geht von einer monofrequenten Deformationsanregung aus und analysiert die Beiträge höherer Harmonischer im Schubspannungssignal (Siehe Abschnitt 2.2.3.1). Bei einer Amplitudensteuerung treten die höheren Harmonischen im Deformationssignal auf, das Schubspannungssignal bleibt monofrequent. Daher wird im Rahmen der Fourierreologie die spektrale Analyse des Deformationssignals durchgeführt, sowohl für schubspannungs- als auch für deformationsgesteuerte Messungen.

#### **4.1.3.2. Schubspannungsgesteuerte Messungen**

Im Falle einer Schubspannungsanregung wird die Schubspannungsamplitude  $\tau_0$  und die Frequenz  $\omega_0 = 2\pi f_0$  vorgegeben. Da sich die Zellzahl von Experiment zu Experiment unterscheidet (Siehe Abschnitt 4.1.6) muss zunächst bestimmt werden, wie groß die anzulegende Schubspannung ist. Dies wird durch eine deformationsgesteuerte Oszillation bei einer Amplitude von 0,02 und einer Frequenz von 0,5 Hz bewerkstelligt. Die Ergebnisse dieser Oszillation liefern die Größenord-

## 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

nung der anzulegenden Schubspannung für die jeweilige Monoschicht. Es wurden zwei Arten der Schubspannungsanregung verwendet.

- Cosinusförmige Schubspannungsanregung (**SC**)

Im schubspannungsgesteuerten Modus wird die Schubspannung in Rheometern der Haake Mars Serie als Cosinus realisiert (Siehe Abbildung 4.7 oben)

$$\tau(t) = \tau_0 \cos(\omega_0 t) \quad (4.7)$$

Die Cosinusanregung (**SC**) bedingt einen Sprung der Schubspannung und damit auch der Deformation (Siehe Abbildung 4.7 unten). Dies führt häufig zu einem Abreißen der Zellen bei relativ geringen Schubspannungsamplituden ( $\tau_0 \ll 100$  Pa).

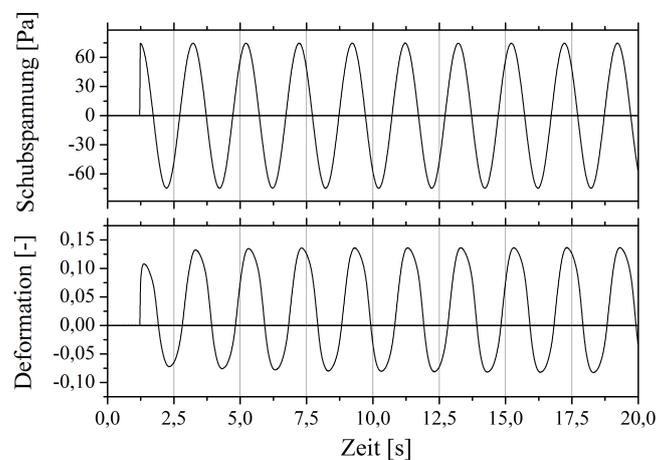


Abbildung 4.7.: Cosinusförmige Schubspannungsanregung (**SC**) mit einer Frequenz von  $f=0,5$  Hz und einer Amplitude von  $\tau_0=70$  Pa. Oben: Schubspannung als Funktion der Zeit. Die Messung beginnt mit einem Sprung der Schubspannung auf die gewählte Amplitude. Unten: Deformation als Funktion der Zeit. Aufgrund des Spannungssprungs ergibt sich auch ein großer Deformationsprung zu Beginn der Messung. Dies führt häufig schon bei relativ kleinen Schubspannungen ( $\tau_0 \ll 100$  Pa) zu einem Abreißen der Zellen aufgrund der hohen initialen Schergeschwindigkeit.

- Sinusförmige Schubspannungsanregung (**SS**)

Um das Abreißen der Zellen bei geringen Schubspannungsamplituden zu vermeiden, wurde eine von Thermo Fisher Scientific zur Verfügung gestellte Modifikation der Rheometerfirmware vorgenommen, die eine sinusförmige Schubspannungssteuerung (**SS**) ermöglicht (Siehe Abbildung 4.8).

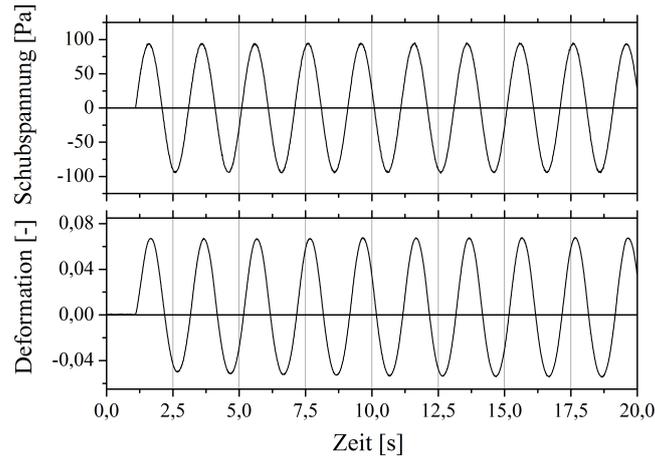


Abbildung 4.8.: Sinusförmige Schubspannungsanregung (**SS**) mit einer Frequenz von  $f=0,5$  Hz und einer Amplitude von  $\tau_0=100$  Pa. Oben: Schubspannung als Funktion der Zeit. Die Schubspannung ist sinusförmig. Unten: Deformation als Funktion der Zeit. Durch die sinusförmige Schubspannung entfällt der Anfangssprung der Deformation.

#### 4.1.4. Einfluss der Trägheit der Messgeometrie

Ein entscheidender Nachteil von schubspannungsgesteuerten Rheometern ist der mögliche Einfluss der Trägheit der Messgeometrie auf die Ergebnisse einer Messung [153]. Dieser Einfluss soll hier untersucht werden, um sicherzustellen, dass bei der nichtlinearen Analyse keine Beiträge der Messgeometrie als Nichtlinearitäten der Zellen fehlinterpretiert werden.

Die Schubspannung wird aus dem durch den Motor angelegten Drehmoment und einem geometriespezifischen Faktor (Siehe Abschnitt 2.2.2.1) berechnet. Das Drehmoment wiederum errechnet sich aus dem angelegten Motorstrom. Dieses Drehmoment führt zum einen zur Scherung der Probe, es muss aber auch für die Drehung der Messgeometrie sorgen. Somit stimmen das berechnete Drehmoment und das auf die Probe wirkende Moment nicht genau überein. Dies ist vor allem wichtig für große Scherraten und niedrigviskose Proben [153]. Es gilt [153]

$$I \cdot \frac{\partial^2 \theta}{\partial t^2} = M_{Motor} - M_{Probe} \quad (4.8)$$

mit Trägheitsmoment der Messgeometrie  $I$ , dem Rotationswinkel  $\theta$ , dem aus dem Motorstrom berechneten Drehmoment  $M_{Motor}$  und dem Drehmoment, welches auf die Probe wirkt,  $M_{Probe}$ . Soll nun die Abweichung in der berechneten Schubspannung ermittelt werden muss Gleichung 4.8 modifiziert werden

$$\alpha \frac{\partial^2 \gamma}{\partial t^2} = \tau_{Motor} - \tau_{Probe} = d\tau \quad (4.9)$$

mit  $\alpha = I \frac{F_\tau}{F_\gamma}$ .  $F_\tau$  und  $F_\gamma$  sind dabei die Geometriefaktoren zur Berechnung der Schubspannung und der Deformation. Für eine Platte-Platte-Geometrie gilt  $F_\tau = \frac{1}{3\pi R^3}$  und  $F_\gamma = \frac{R}{h}$  (vergleiche

## 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

---

Abschnitt 2.2.2.1) mit dem Radius  $R$  der Platte. Hier ist  $R=0,02$  m und  $h=20$   $\mu\text{m}$ . Das Trägheitsmoment der verwendeten Ring-Geometrie kann mit Hilfe des Rheometers experimentell ermittelt werden und beträgt  $I=3,247 \cdot 10^{-6}$   $\text{kgm}^2$ . Für die oszillatorischen Messungen unter Annahme einer rein sinusförmigen Deformation kann man  $\frac{\partial^2 \gamma}{\partial t^2}$  abschätzen durch

$$\frac{\partial^2 \gamma}{\partial t^2}_{max} = -\gamma_0 \omega^2 \quad (4.10)$$

mit der Deformationsamplitude  $\gamma_0$ . Um eine obere Schranke zu berechnen wird die maximale im Experiment realisierte Deformationsamplitude  $\gamma_0=1,4$  bei einer Frequenz von 0,5 Hz verwendet. Damit ergibt sich eine maximale Abweichung  $d\tau$  von 0,0006 Pa. Typische angelegte Schubspannungen liegen im Bereich von 1-500 Pa. Die Abweichung des Schubmoduls aufgrund der Trägheit der Messgeometrie ist somit vernachlässigbar.

### 4.1.5. Verschiebung des Oszillationsnullpunkts

Zu Beginn jeder Messung sind die Deformation und die Schubspannung gleich null. Abbildung 4.9 zeigt beispielhaft den vollständigen zeitlichen Verlauf der Deformation und der Schubspannung für eine Messung im DS-Modus mit Pausen. Am Ende jeder Oszillation wird die Schubspannung auf null gesetzt, was zu einer Erholung der Zellen führt. Die Deformation strebt in dieser Erholungsperiode asymptotisch gegen einen Deformationwert  $\langle \gamma \rangle_n$  der nicht notwendigerweise dem ursprünglichen Nullpunkt  $\langle \gamma \rangle_0 = 0$  entspricht. Somit verschiebt sich der Deformationsnullpunkt sukzessive. Die Verschiebung hängt davon ab, an welcher Stelle die Messung beendet wird, d.h. von welchem Schubspannungswert aus die Erholung erfolgt (Siehe Abbildung 4.10). Die Erholungszeit erlaubt nicht immer die vollständige Erholung der Zellen. Die Nullpunktverschiebung wird quantifiziert durch den Deformationswert  $\langle \gamma \rangle_n$ , der zu Beginn der Oszillation Nummer  $n$  angenommen wird. Die darauffolgende Oszillation erfolgt aufgrund der Regelung des Rheometers nicht zwingenderweise um diesen neuen Nullpunkt  $\langle \gamma \rangle_n$ , sondern um einen Wert  $\bar{\gamma}_n$  (Siehe Abbildung 4.11). Die Schubspannung zeigt im deformationsgesteuerten Modus häufig einen Offset  $\tau(t) = \tau_m + \tau_0 \sin(\omega_0 t)$ .  $\tau_m$  ist dabei die Schubspannung, die notwendig ist, um die Änderung der Deformation  $d\gamma_n = \bar{\gamma}_n - \langle \gamma \rangle_n$  zu erreichen. Auch bei schubspannungsgesteuerten Messungen tritt eine Nullpunktverschiebung statt. In diesem Fall gilt jedoch, dass  $\tau_m = 0$ . Es erfolgt also keine „aktive“ Nullpunktverschiebung durch die Regelung des Rheometers.

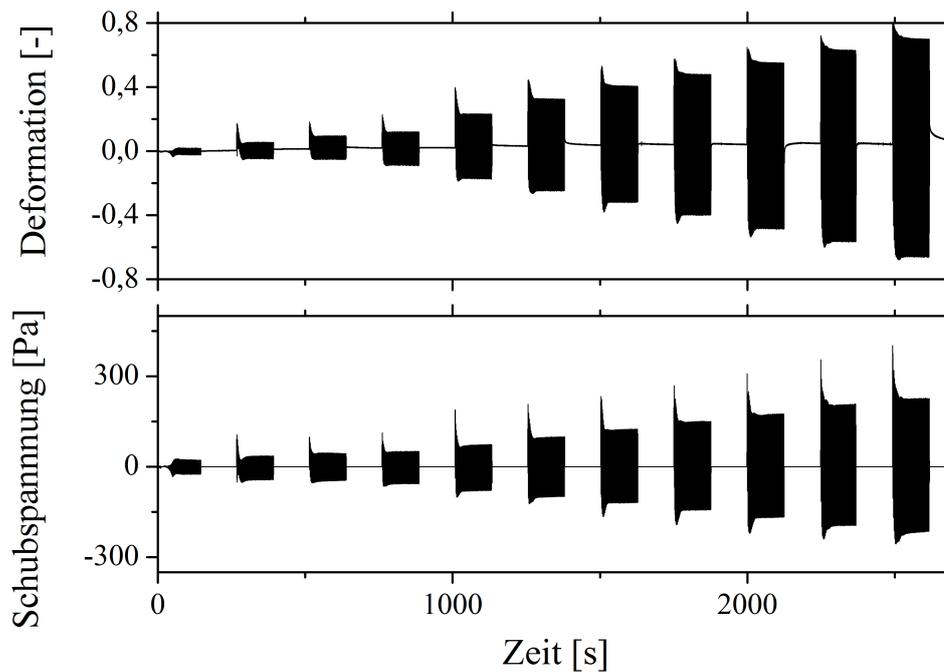


Abbildung 4.9.: Vollständige Oszillationsmessung bei einer Frequenz von 0,5 Hz im schnellen Deformationsmodus (DS). Oben: Zeitlicher Verlauf der Deformation. Die Messung beginnt bei  $\langle \gamma \rangle_1 = 0$ . Am Ende jeder Oszillationsmessung schließt sich eine Erholung an, bei der die Zelldeformation asymptotisch gegen einen Nullpunkt  $\langle \gamma \rangle_n$  ( $n$ =Zahl der Oszillation), der nicht unbedingt mit dem ursprünglichen  $\langle \gamma \rangle_1$  übereinstimmt (Siehe Abbildung 4.10). Der Mittelwert der Deformation während der Oszillationen erfolgt um eine Deformation  $\bar{\gamma}_n$ . Dabei gilt nicht notwendigerweise  $\langle \gamma \rangle_n = \bar{\gamma}_n$ . Das Überschießen zu Beginn der Messungen ist deutlich erkennbar. Unten: Schubspannung als Funktion der Zeit. Die Schubspannung zeigt häufig einen Mittelwert  $\langle \tau \rangle_n \neq 0$ .

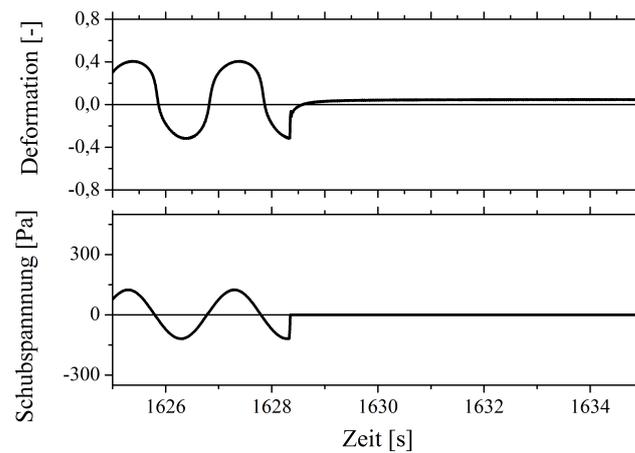


Abbildung 4.10.: Ausschnitt aus den deformationsgesteuerten Oszillationsmessungen aus Abbildung 4.9. Oben: Zeitlicher Verlauf der Deformation am Ende einer Oszillation. Sobald die Erholung beginnt strebt die Deformation asymptotisch gegen eine neue Deformation, die nicht unbedingt mit dem ursprünglichen Nullpunkt  $\langle \gamma \rangle_1 = 0$  übereinstimmt. Unten: Schubspannung als Funktion der Zeit. Am Ende einer Oszillation wird die Schubspannung vom aktuellen Wert aus auf null gesetzt. Dieser Wert kann nicht vorgegeben werden und unterscheidet sich für die verschiedenen Oszillationen innerhalb einer Messung.

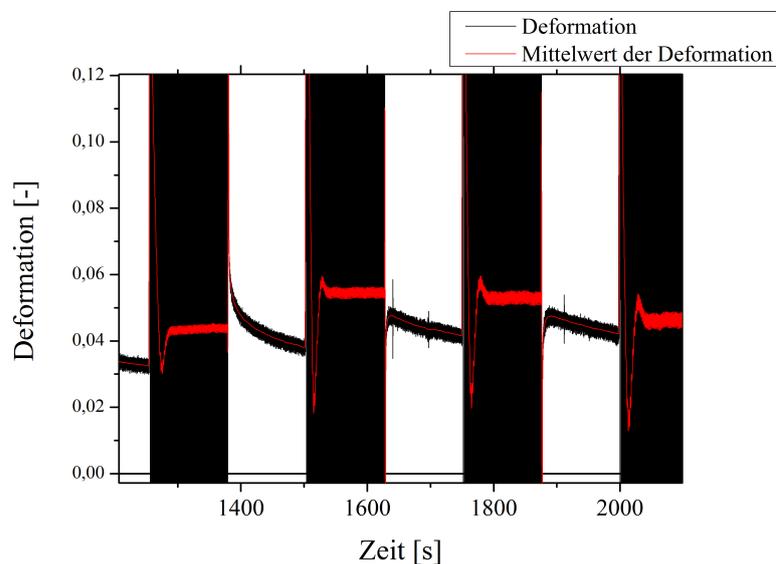


Abbildung 4.11.: Ausschnitt aus den deformationsgesteuerten Oszillationsmessungen aus Abbildung 4.9. Deformation (schwarz) und Mittelwert der Deformation (rot) sind als Funktion der Zeit aufgetragen. Die mittlere Deformation  $\bar{\gamma}_n$  während einer Messung stimmt nicht unbedingt mit dem vorherigen Nullpunkt  $\langle \gamma \rangle_n$  überein.

#### 4.1.6. Einfluss der Zellzahl

Präparationsbedingt variiert die Zellzahl von Monoschicht zu Monoschicht. Während der parallelen Einstellung der Platten mit der Microbead-Methode werden Zellen aus dem Spalt gespült. Daher ist es nicht möglich eine vordefinierte Anzahl von Zellen zwischen die Platten einzubringen. Die Abhängigkeit der Zellmechanik von Einflussgrößen wie der Frequenz, der Amplitude oder der Dauer des Stimulus hängen nicht von der Anzahl der Zellen, die zu einer Messung beitragen ab. Die absolute Größe der rheologischen Messgrößen, wie z.B. des dynamischen Schubmoduls oder der Nachgiebigkeit, ändern sich mit der Zellzahl [87].

Abbildung 4.12 zeigt die Ergebnisse von Oszillationsmessung an dreizehn Monoschichten. Die Oszillationsfrequenz beträgt 0,5 Hz, die Deformationsamplitude wird schrittweise vergrößert. Für alle Monoschichten zeigt sich eine Abnahme des Schubmoduls mit steigender Deformationsamplitude. Die absolute Größe der Schubmodule variiert jedoch um eine Größenordnung aufgrund der unterschiedlichen Zellzahl.

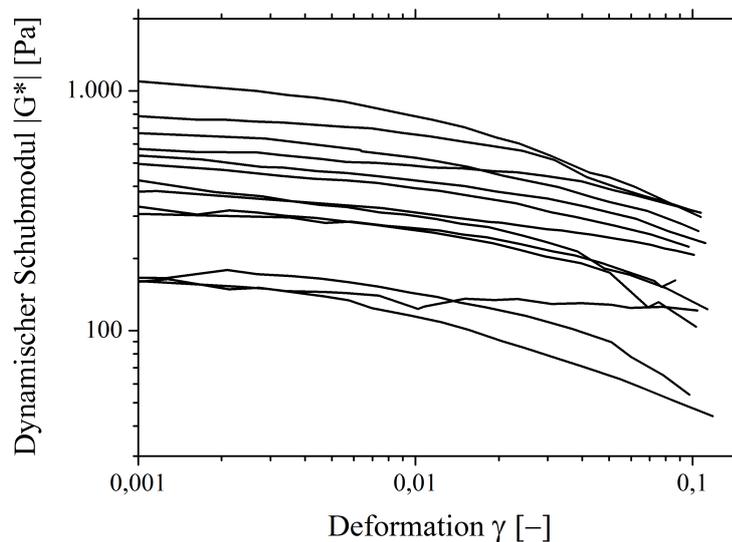


Abbildung 4.12.: *Amplitudensweeps* an 13 verschiedenen Monoschichten bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Der dynamische Schubmodul ist als Funktion der Deformationsamplitude aufgetragen. Der Schubmodul nimmt mit steigender Oszillationsamplitude für alle Monoschichten ab. Die Absolutwerte der Schubmodule variieren um eine Größenordnungen aufgrund der unterschiedlichen Zellzahl.

#### 4.1.7. Von der Monoschicht zur einzelnen Zelle

In vorangegangenen Arbeiten wurde die Zellmonoschichtreologie ausschließlich zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften einer Monoschicht verwendet [87, 128, 151]. Dies macht

## 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

---

einen quantitativen Vergleich mit Messungen an Einzelzellen unmöglich. Darüber hinaus spielt die Mechanik einzelner Zellen eine große Rolle in der Entwicklung von Organismen und in der Entstehung von Krankheiten [7, 14, 17, 18, 154]. Dabei sind auch insbesondere die Absolutwerte der Zelleigenschaften von Interesse. Daher war die Etablierung einer Methode zur Bestimmung von mittleren Einzelzeleigenschaften aus den Monoschichtdaten ein wichtiges Ziel dieser Arbeit [127].

Die mechanischen Eigenschaften einer Zellmonoschicht werden durch drei grundlegende Größen bestimmt. Dies sind das anliegende Drehmoment  $M$ , die Deformation  $\gamma$  und der Phasenwinkel  $\delta$ . Das Drehmoment muss noch in eine Schubspannung  $\tau$  umgerechnet werden. Dies erfolgt über die Gleichung

$$M = \int_A \tau \cdot d \cdot dA \quad (4.11)$$

mit der Fläche  $A$  des zu untersuchenden Materials, der Schubspannung  $\tau$ , dem radialen Abstand von der Rotationsachse  $d$  und dem infinitesimalen Flächenelement  $dA$ . Unter Annahme eines linearen Materials kann die Schubspannung geschrieben werden als  $\tau = G \cdot \gamma$  mit Schubmodul  $G$  und Deformation  $\gamma$ . Damit ergibt sich für Gleichung 4.11

$$M = G \int_A \gamma \cdot d \cdot dA = G \frac{\theta}{h} \int_A d^2 \cdot dA \quad (4.12)$$

unter Benutzung der Definition der Deformation  $\gamma = \frac{\theta d}{h}$  mit Rotationswinkel  $\theta$  und Plattenabstand  $h$ . Es wurde angenommen, dass  $G$  für eine gegebene Deformation konstant ist. Dies entspricht der Annahme, dass der Schubmodul unabhängig vom radialen Abstand von der Rotationsachse ist. In [132] wurde gezeigt, dass sich Gleichung 4.12 für ein kreisförmiges Material mit Radius  $r_M$  im Abstand  $d$  von der Rotationsachse vereinfacht zu

$$M(d) = G \frac{\theta}{h} \left( \frac{\pi}{2} r_M^4 + d^2 \frac{\pi}{2} r_M^2 \right) \quad (4.13)$$

Aus dieser Gleichung kann das Drehmoment  $M_{mono}$  für eine Monoschicht von Zellen berechnet werden, indem über alle Zellen zwischen den Platten summiert wird:

$$M_{mono} = G \frac{\theta}{h} \sum_i \left( \frac{\pi}{2} r_i^4 + d_i^2 \frac{\pi}{2} r_i^2 \right) \quad (4.14)$$

Das Drehmoment wird vom Rheometer bestimmt, und somit ergibt sich für das Schubmodul  $|G^*|_{Zelle}$  einer einzelnen Zelle:

$$|G^*|_{Zelle} = \frac{M_{mono}}{\frac{\theta}{h} \sum_i \left( \frac{\pi}{2} r_i^4 + d_i^2 \frac{\pi}{2} r_i^2 \right)} \quad (4.15)$$

Um das Schubmodul direkt berechnen zu können müsste für jede Zelle  $i$  die zugehörige Fläche  $A_i$  und radiale Distanz  $d_i$  bekannt sein. Bei  $N=10^5 - 10^6$  Zellen ist dies jedoch nicht möglich. Daher muss zunächst vereinfachend angenommen werden, dass

- Terme mit  $r_i^4$  vernachlässigt werden können, da  $r_i^4 \ll r_i^2$
- alle  $N$  Zellen am Rand der Platte sitzen, so dass  $d_i=R$ . Damit folgt, dass alle Zellen dieselbe Deformation  $\gamma_i = \gamma = \frac{\theta R}{h}$  erfahren.
- alle Zellen die mittlere Zellfläche  $\langle A \rangle$  haben

Somit ergibt sich aus Gleichung 4.15:

$$|G^*|_{Zelle} = \frac{M}{NR \langle A \rangle \gamma} \quad (4.16)$$

Zellzahl  $N$  und Zellfläche können mit Hilfe des Rheometermikroskops bestimmt werden.

- Bestimmung der Zellfläche

Die Zellfläche wird mit Hilfe von Bildern einer Monoschicht, die kurz vor Beginn der Messung aufgenommen wurden, bestimmt. Dazu wird das ImageJ *plugin* zur Partikelanalyse (*particle analysis*) verwendet. Abbildung 4.13 zeigt ein Histogramm der Zellfläche von 3T3 Fibroblasten. Es wurden Bilder von vier Monoschichten ausgewertet, was eine Gesamtzahl von  $N \approx 700$  Zellen lieferte. Die Zellfläche zeigt eine logarithmische Normalverteilung mit einem logarithmischen Mittelwerte  $\ln(\langle A \rangle) = 6,17$  und einer logarithmischen Standardabweichung von  $\ln(\text{STD}) = 0,26$ . Dies entspricht einer mittleren Zellfläche von  $\langle A \rangle = 478_{-102}^{+142} \mu\text{m}^2$ . Dabei ist zu beachten, dass Zellen, deren Durchmesser kleiner als der Spaltabstand ist, von der Analyse ausgeschlossen sind, da sie nicht an beiden Platten adhären können und somit nicht zur Messung beitragen.

- Bestimmung der Zellzahl

In einem ersten Versuch zur Bestimmung der Zellzahl wurden für jedes Experiment  $N = 10^6$  Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer präpariert und in das Rheometer eingebracht. Dies ergab keine Verbesserung gegenüber der Verwendung einer unbekanntes Zellzahl ( $10^5 < N < 10^6$ ). Die Absolutwerte der Schubmodule variierten in gleicher Größenordnung. Der Grund liegt in der Messvorbereitung. Die Zellen wurden in Kontakt mit beiden Platten gebracht, indem der Lift des Rheometers langsam zusammenfuhr, bis ein Kontakt hergestellt war (Siehe Abschnitt 3.2.2.3). Im Laufe dieses Prozesses wurden viele Zellen weggespült und trugen somit nicht mehr zur späteren Messung bei. Eine Zählung der Zellen vor der Kontaktierung mit den Platten ist somit zur Quantifizierung der Zellzahl während der Messung ungeeignet.

Es lag daher nahe, die Zellen nach der Monoschichtpräparation zu zählen. Die mit dieser einfachen Methode erhaltenen Ergebnisse waren ebenfalls sehr ungenau. Mit dem Mikroskop konnte nur ein kleiner Ausschnitt des Rings betrachtet werden. Die Zelldichte war jedoch nicht über den ganzen Ring konstant, so dass diese einfache Zählmethode sehr ungenau ist. Zur Verbesserung der Zellzahlbestimmung wurde schließlich ausgenutzt, dass die Zellzahl Einfluss auf die Absolutwerte der gemessenen mechanischen Eigenschaften hat.

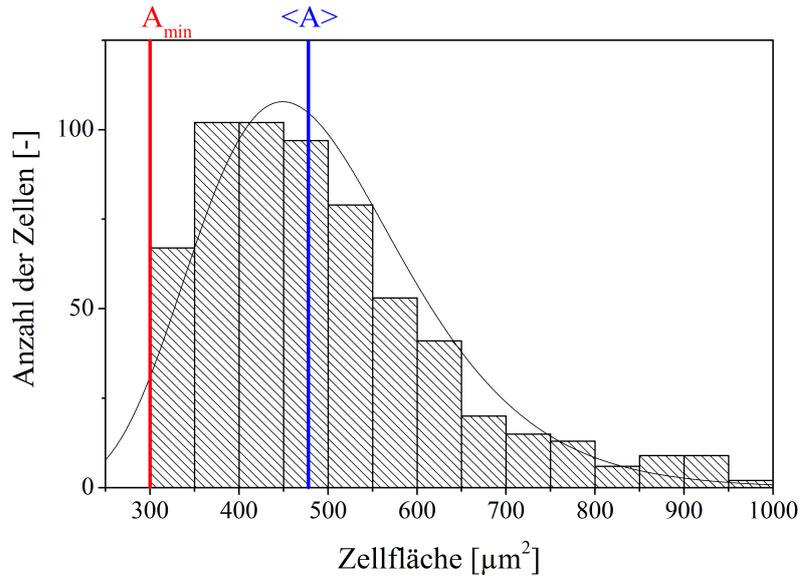


Abbildung 4.13.: Histogramm der Zellfläche mit Verteilungsfunktion. Gezeigt ist die Summe der Ergebnisse für vier Monoschichten (Zellzahl  $N \approx 700$ ). Die Zellfläche folgt einer logarithmischen Normalverteilung mit einem logarithmischen Mittelwert  $\ln(\langle A \rangle) = 6,17$  und einer logarithmischen Standardabweichung von  $\ln(\text{STD}) = 0,26$ . Umgerechnet entspricht dies  $\langle A \rangle = 478^{+142}_{-102} \mu\text{m}^2$  (blaue vertikale Linie). Zellen, deren Durchmesser kleiner als der Spaltabstand ist, können nicht an beiden Platten adhären. Sie werden somit nicht geschert und daher aus der Analyse ausgeschlossen. Dies führt zum *cutoff* bei  $A = 300 \mu\text{m}^2$  (rote vertikale Linie).

Je mehr Zellen sich zwischen den Platten befinden, desto größer muss das Drehmoment sein, welches für eine gewisse Deformation notwendig ist. Für jede Monoschicht wurde daher eine Oszillation mit einer Deformationsamplitude von 0,02 bei einer Frequenz von 0,5 Hz durchgeführt. Die Amplitude wurde gewählt, da sie groß genug ist, um ein sinnvolles Signal zu Rausch Verhältnis zu garantieren. Sie ist klein genug, um keine ausgeprägten Nichtlinearitäten hervorzurufen.

Abbildung 4.14 zeigt, dass die Drehmomentamplitude  $M_0$  umso größer wird, je größer die Zellzahl  $N$  ist. Zur Validierung der Methode wurde das Zytoskelett der Zellen mit 2% bzw. 4% Glutaraldehyd fixiert. Dies führte zu einer Zunahme der Drehmomentamplitude um den Faktor 10 bzw. 20. Die Messdaten für unbehandelte Zellen wurden linear angepasst ( $R^2 = 0,83$ ). Für die Zellzahl  $N$  ergibt sich

$$N(M_0) = (4051 \pm 400) \cdot M_0 \quad (4.17)$$

Somit kann die Zellzahl  $N$  aus der Drehmomentamplitude  $M_0$  mit einem Fehler von  $\approx 10\%$  bestimmt werden. Es muss jedoch in jedem Fall ein Vergleich der mit Gleichung 4.17 be-

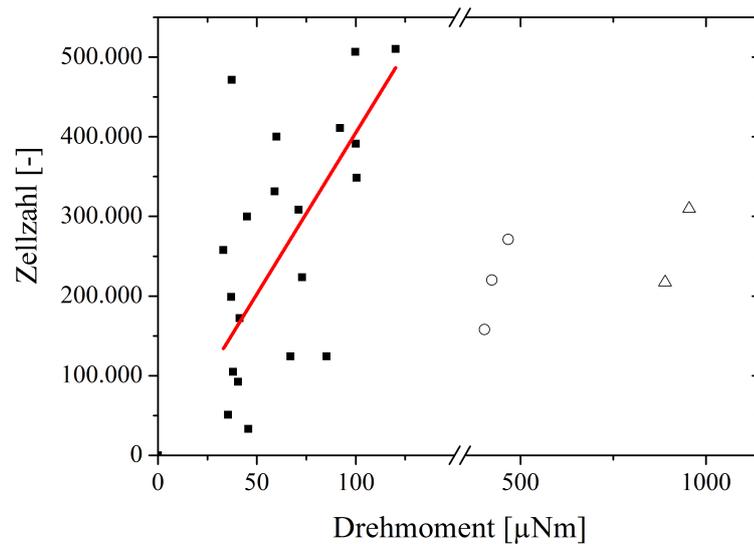


Abbildung 4.14.: Optisch bestimmte Zellzahl als Funktion der Drehmomentamplitude für eine deformationsgesteuerte Oszillation mit einer Amplitude von 0,02 und einer Frequenz von 0,5 Hz. Quadrate: Ergebnisse für 20 Monoschichten mit unbehandelten Zellen (Rot: Lineare Anpassung  $N(M_0) = (4051 \pm 400) \cdot M_0$ ,  $R^2=0,83$ .) Mit Hilfe der Anpassung kann die Zellzahl aus der Drehmomentamplitude bestimmt werden. Kreise: Messungen mit Zellen, die mit 2%-iger Glutaraldehyd Lösung fixiert wurden. Drehmomentwerte sind 10-fach erhöht gegenüber den Werten von nichtbehandelten Zellen. Dreiecke: Messungen mit Zellen, die mit 4%-iger Glutaraldehyd Lösung fixiert wurden. Drehmomentwerte sind 20-fach erhöht gegenüber den Werten von nichtbehandelten Zellen.

stimmten Zellzahl mit der optisch bestimmten Zellzahl erfolgen, um Fehler auszuschließen. Es konnten zwei signifikante Abweichungen von Gleichung 4.17 beobachtet werden.

1. Sehr große Drehmomentamplitude bei sehr geringer optisch bestimmter Zellzahl  
Während der Präparation einer Monoschicht wird der Spaltabstand nach der Zelladhäsionsphase solange vergrößert, bis die Zellen kräftefrei sind (Siehe Abschnitt 3.2.2.3). Dies kann dazu führen, dass der Glasring bei einer sehr geringen Zellzahl noch leicht in Kontakt mit den Beads steht, was zu sehr großen Drehmomentamplituden trotz geringer Zellzahl führt. Die Bildung von Zellaggregaten zwischen den Platten kann ebenfalls eine große Drehmomentamplitude bei scheinbar geringer Zellzahl ergeben.
2. Kleine Drehmomentamplituden trotz sehr großer optisch bestimmter Zellzahl  
Bei der Einstellung des Spaltabstandes kann es zur Ablösung der Zellen von den Platten kommen. Die tatsächlich zur Messung beitragende Zellzahl ist in diesem Fall geringer als die optisch bestimmte.

Monoschichten, die eine solche Abweichung aufwiesen, konnten nicht protokollgemäß ver-

## 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

---

messen werden. Es kam in diesen Fällen bei sehr geringen Deformationen von  $\gamma = 0,1-0,2$  zur Ablösung der Zellen von den Glasplatten. Daher wurden solche Messungen aussortiert.

### 4.1.7.1. Fehlerabschätzung

Bei der Berechnung der Schubmodule gibt es zwei Fehlerquellen. Zum Einen wurde bei der Herleitung der vollständigen Bestimmungsgleichung (Gleichung 4.15) angenommen, dass der Schubmodul unabhängig von der Deformation ist. Des Weiteren entsteht ein Fehler bei den Annahmen, die zu der vereinfachten Bestimmungsgleichung 4.16 führten. Diese beiden Fehler sollen im Folgenden betrachtet werden.

Eine Abschätzung des Fehler, der durch die Vereinfachungen, die zu Gleichung 4.16 führten, gemacht wurde, ist nicht ohne Weiteres möglich. Eine Abschätzung mittels Gauß'scher Fehlerfortpflanzung liefert

$$dG = -G \frac{dN}{N} - G \frac{dA}{A} - G \frac{dR}{R} = -G(10\% + 30\% + 25\%) = -G \cdot 65\% \quad (4.18)$$

und damit einen Fehler von 65%. Diese Abschätzung ist jedoch sehr ungenau, da Zellen umso weniger zum Gesamtdrehmoment beitragen

- je näher sie sich an der Rotationsachse befinden
- je kleiner ihre Fläche ist

Um eine bessere Fehlerabschätzung zu erhalten wurde Gleichung 4.15

$$|G^*|_{Zelle} = \frac{M_{mono}}{\frac{\theta}{h} \sum_i (\frac{\pi}{2} r_i^4 + d_i^2 \frac{\pi}{2} r_i^2)}$$

numerisch gelöst [127]. Dies wurde mit Hilfe eines Matlab-Skripts unter Verwendung der experimentell bestimmten Zellzahl  $N$  durchgeführt. Die  $N$  Zellen werden zufällig auf dem Ring, der eine Weite  $d$  aufweist, verteilt. In radialer Richtung können  $n \approx \frac{d}{\langle D \rangle}$  Zellen mit mittlerem Durchmesser  $D = 2\sqrt{\frac{\langle A \rangle}{\pi}}$  untergebracht werden. Jede dieser Zellen befindet sich im Abstand  $r_i = R - (2n + 1) \langle D \rangle$  von der Symmetrieachse des Rings. Im Abstand  $r_i$  können maximal  $N_i = \frac{2\pi r_i}{\langle D \rangle}$  Zellen Platz finden. Die Flächen der Zellen werden nach der experimentell bestimmten logarithmischen Normalverteilung (Siehe Abbildung 4.13) zufällig vergeben. Wird eine äußere Scherung  $\gamma = \frac{\Phi R}{h}$  angelegt, so wird eine Zelle, die sich bei  $r_i$  befindet eigentlich um den Betrag  $\gamma_i = \frac{\gamma}{R} r_i$  geschert.

In Abbildung 4.15 sind Schubmodule als Funktion der Deformation für die numerische Lösung von Gleichung 4.15 und verschiedene vereinfachende Annahmen gezeigt. Es ergeben sich Abweichungen von maximal 30%, die, wie zu erwarten, wesentlich geringer ausfallen, als von der Fehlerfortpflanzung vorhergesagt. Darüber hinaus zeigt sich, dass das Verhältnis aus Schubmodul ohne Vereinfachungen und Schubmodul mit Vereinfachungen konstant, also unabhängig von der

Deformation ist. Somit kann der Fehler der vereinfachenden Annahmen durch einen konstanten Korrekturfaktor  $K = \frac{G_{\text{vollständig}}}{G_{\text{vereinfacht}}}$ , der sich nur für die jeweilige Annahme unterscheidet, behoben werden. Für die Annahmen, die zu Gleichung 4.16 geführt haben ergibt sich ein Korrekturfaktor von  $1,212 \pm 0,002$  (berechnet für  $n=16$  numerische Berechnungen).

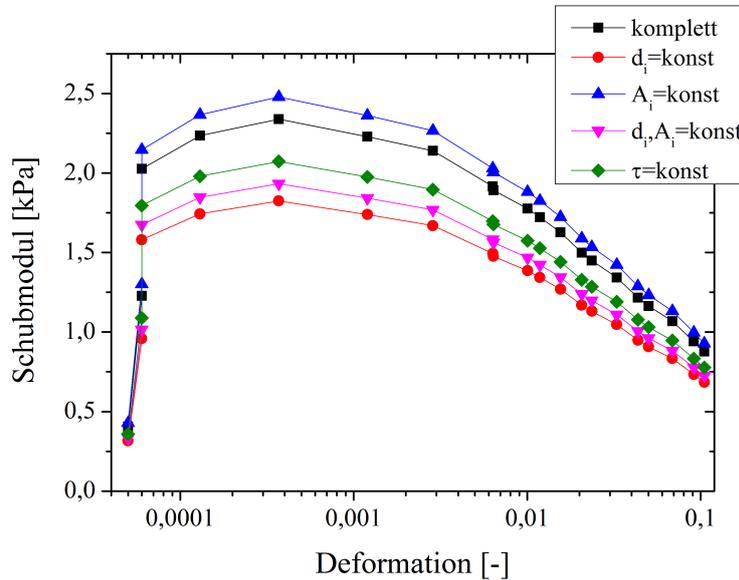


Abbildung 4.15.: Berechnetes Schubmodul als Funktion der Deformationsamplitude ( $f=0,5$  Hz) nach Gleichung 4.15 (schwarz), unter der Annahme  $d_i=R=konst$  (rot),  $A_i=\langle A \rangle=konst$  (blau),  $d_i=R=konst$  und  $A_i=\langle A \rangle=konst$  (rosa) und  $\tau=konst$  (grün). Es zeigen sich Abweichungen, die maximal bei 30% liegen. Der Einfluss einer vereinfachenden Annahme kann durch einen konstanten Skalierungsfaktor kompensiert werden. Dies ermöglicht die Benutzung einer vereinfachten Gleichung bei der Berechnung von Schubmodulen.

Trotz der zufälligen Verteilung der Zellen sind die Ergebnisse der numerischen Berechnung sehr gut reproduzierbar. Nacheinander durchgeführte Berechnungen für eine Monoschicht liefern Abweichungen von 0,1% ( $n=10$ ).

Aufgrund der sich ergebenden Skalierung kann das Schubmodul einer Monoschicht daher mittels

$$|G^*|_{singlecell} = 1,21 \cdot \frac{M}{\gamma NR \langle A \rangle} \tag{4.19}$$

berechnet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden ohne den Skalierungsfaktor berechnet, da die genaue numerische Umrechnung erst nach der Fertigstellung der Ergebnisse etabliert wurde. Da es sich jedoch um einen konstanten Vorfaktor für alle Messergebnisse handelt, beeinträchtigt dies die Ergebnisse in keiner Weise.

Auch für die Herleitung von Gleichung 4.15 wurde vereinfachend angenommen, dass der Schubmodul unabhängig vom radialen Abstand von der Rotationsachse  $d_i$  der Zelle  $i$  und damit der

#### 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

tatsächlichen Deformation  $\gamma_i = \frac{\theta d_i}{h}$  ist. Messungen an Zellen zeigen jedoch, dass der Schubmodul mit steigender Deformation abnimmt. Daher muss der Einfluss der vereinfachenden Annahme betrachtet werden [127].

Der Schubmodul für Zellen kann mit einer exponentiell-linearen Funktion  $|G^*(\gamma)| = A_0 \cdot e^{-\frac{\gamma}{\gamma_c}} + c_1 - c_2 \cdot \gamma$  angepasst werden, wobei sich  $R^2 > 0,9$  für alle Monoschichten ( $n=16$ ) ergibt. Abbildung 4.16 zeigt den Schubmodul als Funktion der Deformation für eine Messung an einer Monoschicht von 3T3 Fibroblasten.

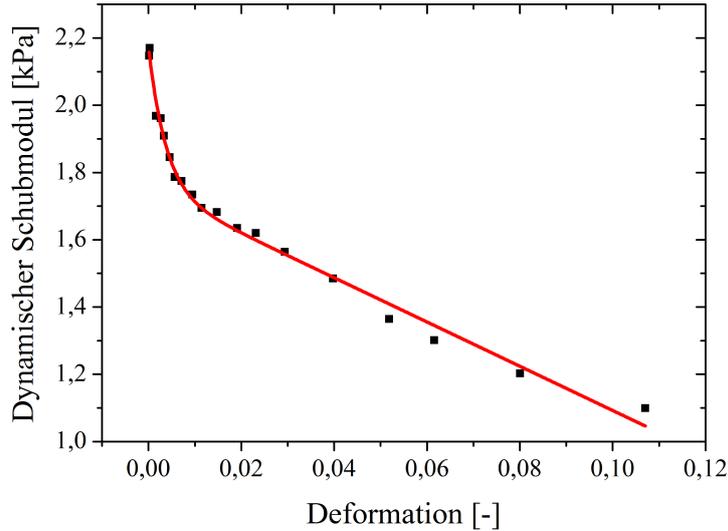


Abbildung 4.16.: Dynamischer Schubmodul als Funktion der Deformation für eine Oszillationsfrequenz von 0,5 Hz. Der Schubmodul nimmt mit steigender Deformation ab. Rot: Exponentiell-lineare Anpassung mit  $R^2 = 0,997$ . Es ergibt sich  $|G^*(\gamma)| = 422 \cdot e^{-\frac{\gamma}{0,0037}} + 1750 - 6579 \cdot \gamma$ .

Es soll nun im Folgenden betrachtet werden, welchen Unterschied die Annahme eines konstanten Schubmoduls für die Berechnung des Drehmoments einer Monoschicht macht. Dabei wird das Drehmoment für verschiedene Drehwinkelamplituden  $\theta$  und damit verschiedene Deformationen  $\gamma_0 = \frac{\theta R}{h}$  berechnet. Unter der Annahme, dass der Schubmodul  $G$  einer Zelle unabhängig von ihrem Abstand  $d_i$  von der Rotationsachse ist und damit  $G_i = G(\gamma) \neq G(\gamma_i = \frac{\theta d_i}{h})$ , gilt

$$M(\gamma) = G(\gamma) \frac{\theta}{h} \sum d_i^2 A_i = (A_0 e^{-\frac{\gamma}{\gamma_c}} + c_1 + c_2 \gamma) \frac{\theta}{h} \sum d_i^2 A_i \quad (4.20)$$

Dies entspricht der Annahme  $G=\text{konst}$  bei der Herleitung von Gleichung 4.15. Unter der Annahme, dass  $G_i$  von der Position der Zelle  $d_i$  abhängt and damit  $G_i = G(\gamma_i = \frac{\theta d_i}{h})$ , gilt

$$M(\gamma) = \frac{\theta}{h} \sum G_i d_i^2 A_i = \frac{\theta}{h} \sum (A_0 e^{-\frac{\theta d_i}{\gamma_c}} + c_1 + c_2 \frac{\theta d_i}{h}) d_i^2 A_i \quad (4.21)$$

Im Folgenden wird beispielhaft die Anpassungsgleichung aus Abbildung 4.16 zur Berechnung des Fehlers verwendet. Die Absolutwerte der Parameter  $A_0$ ,  $\gamma_c$ ,  $c_1$  und  $c_2$  spielen bei der Berechnung des auftretenden Fehlers keine Rolle. Es zeigt sich, dass sich geringe Abweichungen von etwa 2-4% ergeben (Siehe Abbildung 4.17).

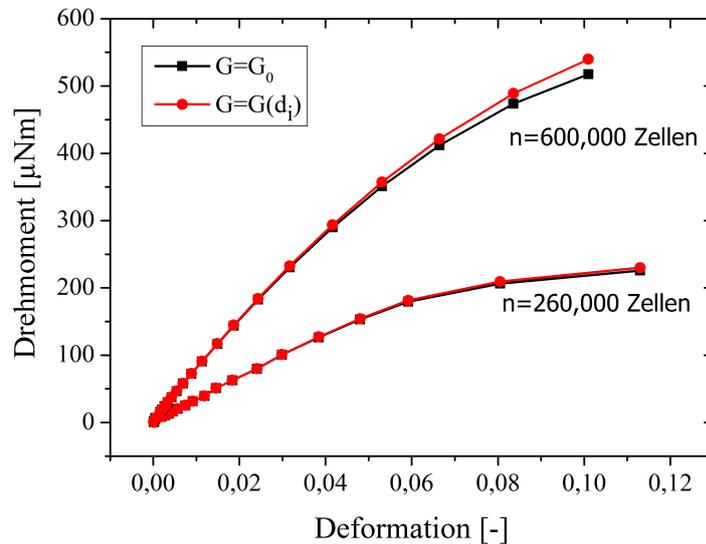


Abbildung 4.17.: Drehmoment als Funktion der Deformation für eine Oszillationsfrequenz von 0,5 Hz berechnet unter der Annahme eines konstanten Schubmoduls  $G \neq G(d_i)$  (schwarz) und eines positionsabhängigen Schubmoduls  $G = G(d_i)$  (rot). Es ergeben sich geringe Abweichungen von 2-4%. Somit ist die Annahme eines konstanten Schubmoduls bei der Herleitung von Gleichung 4.15 gerechtfertigt.

Der gesamte Fehler bei der Bestimmung des Schubmoduls ergibt sich somit aus dem Fehler bei der Zellzahlbestimmung ( $\approx 10\%$ ) und dem Fehler durch die Annahme des konstanten Schubmoduls ( $\approx 4\%$ ) bei der Herleitung von Gleichung 4.15.

#### 4.1.7.2. Validierung der Umrechnung

Im Folgenden soll die Anwendung der vereinfachten Umrechnung  $|G^*|_{Zelle} = \frac{M}{NR < A > \gamma}$  nach Gleichung 4.16 am Beispiel von Oszillationmessungen an 3T3 Fibroblasten erfolgen. Dazu wurden *Amplitudensweeps* bei einer Frequenz von 0,5 Hz durchgeführt. Der dynamische Schubmodul nimmt mit steigender Deformationsamplitude ab (Abbildung 4.12). Die Absolutwerte der Moduli variieren um fast zwei Größenordnungen, was durch die unterschiedliche Zellzahl zu erklären ist. Abbildung 4.18 zeigt die Ergebnisse nach der Umrechnung auf Einzelzellen. Die Absolutwerte der Schubmodule stimmen wesentlich besser überein. Abbildung 4.19 zeigt Mittelwert und Stan-

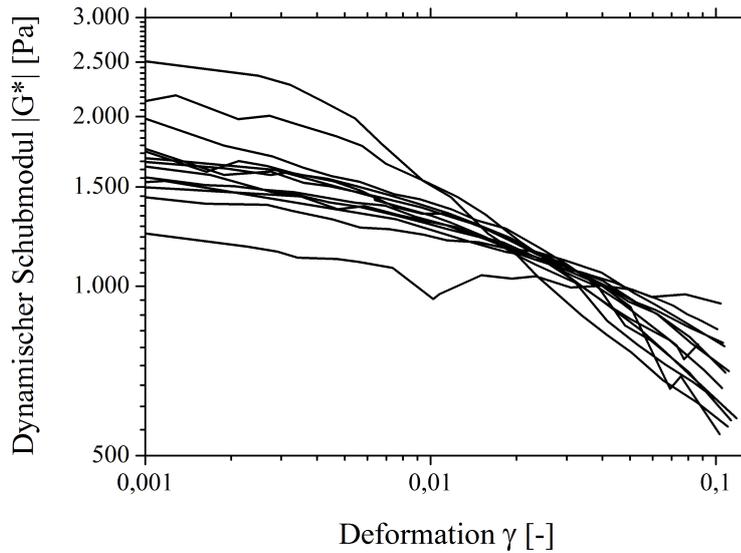


Abbildung 4.18.: Dynamischer Schubmodul in Abhängigkeit der Deformationsamplitude für Amplitudensweeps bei einer Frequenz von 0,5 Hz an 13 verschiedenen Monoschichten. Der Schubmodul nimmt mit steigender Oszillationsamplitude ab. Die Absolutwerte der Moduli stimmen sehr gut überein. Für sehr kleine Deformationen nimmt die Streuung zu. Dies ist dadurch zu erklären, dass das Signal zu Rauschen Verhältnis für sehr geringe Deformationen abnimmt und somit die Bestimmung der Module schwierig wird. Das niedrige Signal zu Rauschen Verhältnis kommt dadurch zustande, dass bei einer Deformation von 0,001 ein Scherweg von 15 nm am äußeren Rand des Ringes realisiert werden muss. Dies liegt in einem Messbereich, in dem der Regelkreis des Rheometers an seine Grenzen stößt.

dardabweichung der Einzelmessungen aus Abbildung 4.18. Es ergeben sich Schubmodule in der Größenordnung von 1 kPa. Unterschiedliche Monoschichten ergeben Resultate, die sich um eine Standardabweichung von maximal etwa 30% unterscheiden, was eine wesentliche Verbesserung gegenüber den Daten aus den nicht umgerechneten Monoschichtmessungen darstellt.

Es kann jedoch auch von Interesse sein, die Schubspannung  $\tau$ , die auf eine Einzelzelle wirkt zu berechnen. Dies kann mit Hilfe der Annahme  $d_i=R$  und  $r_i^4 \ll r_i^2$  erreicht werden. Man erhält

$$\tau = \frac{M}{R \sum_i (\frac{\pi}{2} r_i^2)} \quad (4.22)$$

Die Kraft  $F$  auf eine einzelne Zelle kann damit abgeschätzt werden über:

$$F \approx \tau \cdot \langle A \rangle \quad (4.23)$$

Dies ermöglicht die experimentelle Quantifizierung von Adhäsionsstärken von Zellen. In oszillatorischen Experimenten wird die Amplitude vergrößert, bis sich die Zellen von den Glasplatten lösen [129]. Dieser Punkt kann durch einen Sprung in der Deformations-Schubspannungskurve identifi-

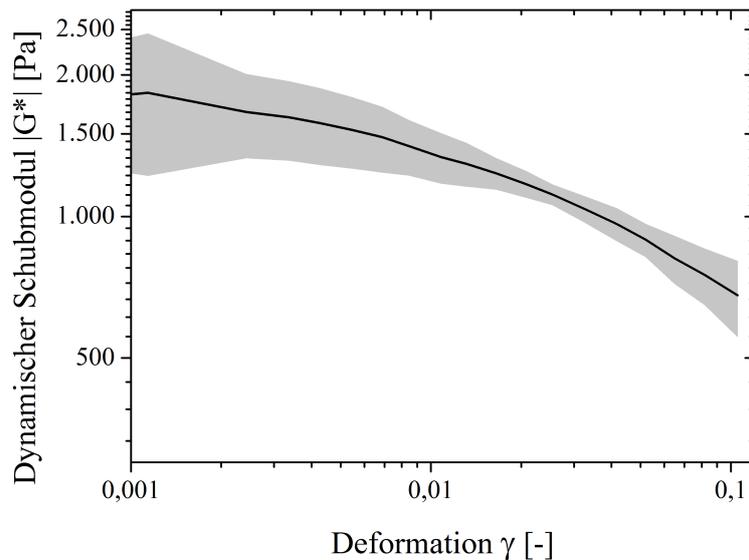


Abbildung 4.19.: Mittelwert und Standardabweichung des dynamischen Schubmoduls (Daten aus Abbildung 4.18) in Abhängigkeit der Deformationsamplitude. Der Schubmodul nimmt mit steigender Oszillationsamplitude ab. Die Fehlergrenzen sind kleiner als 30%, was eine signifikante Verbesserung gegenüber den Ergebnissen der Monoschichtmessungen darstellt.

ziert werden (Abbildung 4.20). In bisherigen Arbeiten wurde die Deformation, bei der die Adhäsion versagt als Maß für die Adhäsionsstärke angenommen [129]. Dies macht einen Vergleich mit anderen Messmethoden jedoch unmöglich, da diese im allgemeinen Adhäsionskräfte, -schubspannungen, oder -energien bestimmen. Die hier vorgestellte Umrechnung auf Einzelzellen ermöglicht es die Schubspannung, oder die Kraft, bei der die Zelladhäsion versagt als Maß für die Adhäsionsstärke heranzuziehen. Für Fibroblasten auf fibronectinbeschichtetem Glas ergibt sich eine mittlere kritische Schubspannung von  $\tau=232\pm 82$  Pa bzw. eine Adhäsionskraft von  $F=111\pm 39$  nN ( $n=10$ ) [127]. Dies stimmt gut mit Ergebnissen aus der Literatur überein [155, 156].

#### 4.1.8. Diskussion

In [87] wurde die Zellmonoschichtreologie unter Nutzung eines Anton Paar Rheometers als Methode zur Vermessung der mechanischen Eigenschaften einer Monoschicht vorgestellt. Es wurde gezeigt, dass die qualitativen Ergebnisse sehr gut mit Ergebnissen aus Einzelzellmessungen übereinstimmen. Durch die Vermessung vieler Zellen ( $\approx 10^6$ ) in einem einzigen Experiment ergibt sich eine sehr gute Reproduzierbarkeit und ein großes Signal zu Rauschen Verhältnis.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde vorgestellt, wie die Grundlagen für die nichtlineare Charakterisierung lebender Zellen im Haake Mars Rheometer geschaffen wurden.

In [128, 151] wurde die Zellmonoschichtreologie in einem Haake Mars II Rheometer der Firma Thermo Fisher etabliert. Das Rheometer speichert nur Mittelwerte der Oszillationsamplituden

## 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

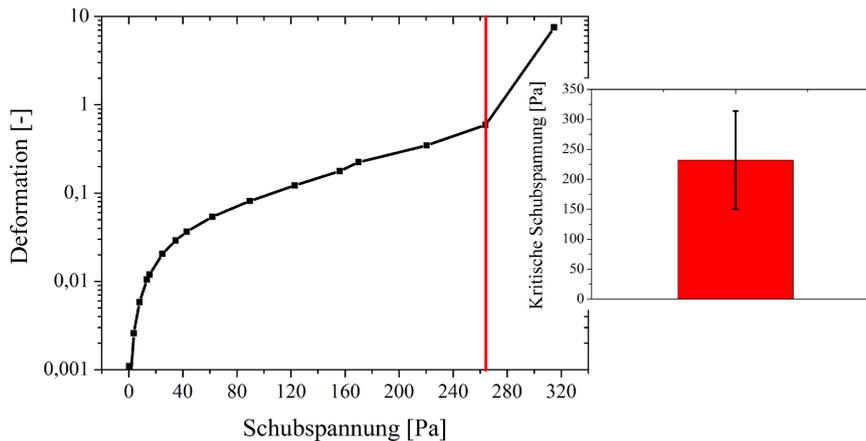


Abbildung 4.20.: Deformation als Funktion der Schubspannung aus einem Oszillationsexperiment mit langsamer Deformationsanregung. Ein Sprung im Verlauf des Graphen (rote Linie) markiert das Versagen der Adhäsionskontakte. Die zugehörige kritische Schubspannung (hier  $\tau=250$  Pa) ist ein Maß für die Adhäsionsstärke. Inset: Mittelwert der kritischen Schubspannung  $\tau=232\pm 82$  Pa aus  $n=10$  Experimenten.

oder einzelne Oszillationsperioden und eignet sich somit nicht für Auswertemethoden, für die der vollständige Signalverlauf über viele Perioden benötigt wird. Durch eine Modifikation des Rheometers [128, 151] konnten die Rohdaten des Winkels und des Drehmoments aufgenommen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine verlässliche Konvertierung der Rohdaten in die mechanischen Größen Deformation und Drehmoment etabliert. Dies ermöglicht die Anwendung von Auswertemethoden wie den Lissajous-Plots oder der Fourierreologie, welche zur Charakterisierung der nichtlinearen Zellmechanik verwendet werden (Siehe Abschnitt 2.2.3).

Zur Vermessung von Zellmonoschichten wurde eine speziell angefertigte Platte-Ring-Geometrie verwendet. Um eine Kontaktierung vieler Zellen zu gewährleisten muss eine präzise parallele Ausrichtung der Geometrie erfolgen. Die Ausrichtung erfolgte mit Hilfe der *microbead*-Methode [128, 129]. Um auszuschließen, dass Nichtlinearitäten aufgrund der Geometrie oder der Präparation auftreten, wurden Messungen an Polyethylenoxid-Gelen durchgeführt, die für kleine Anregungen ( $\gamma_0 < 1$ , abhängig von der Konzentration) linear sind [157]. Die Messungen ergeben nur geringe nichtlineare Beiträge im Bereich von etwa 1%, die nicht von der Anregungsamplitude abhängen. Die Schwelle für die Detektion von Nichtlinearitäten wird daher auf 1% festgesetzt. Von besonderer Bedeutung ist, dass keine ansteigenden Beiträge ungerader Obertöne auftreten. Ungerade Obertöne sind ein Zeichen einer mechanischen Asymmetrie und könnten im Falle des Gels von einer ungenügenden Parallelität der Platten stammen, wie in [94] gezeigt wurde. Dies konnte somit ausgeschlossen werden, was zeigt, dass die *microbead*-Methode eine parallele Ausrichtung der Platten garantiert.

Des Weiteren zeigt sich, dass der Einfluss des Zellmediums auf die Messergebnisse vernachlässigbar klein ist.

Bei der Vermessung weicher Materialien (Schubmodule kleiner als 500-1000 Pa) kann es, abhängig

von der untersuchten Deformationsrate oder Frequenz, zu Einflüssen der Trägheit der Messgeometrie kommen [153], die als Nichtlinearitäten fehlinterpretiert werden können. Um einen solchen Einfluss bei Messungen an Zellmonoschichten auszuschließen wurde der Beitrag der Geometrie nach [153] abgeschätzt. Dieser ist für die in dieser Arbeit verwendeten Messparameter vernachlässigbar klein (maximaler Beitrag von 0,6%) und muss nicht in die Ergebnisse eingerechnet werden. Für zukünftige Messungen bei höheren Frequenzen muss der Beitrag jedoch genau untersucht werden, da dieser mit der Scherrate ansteigt [153]. Dies gilt insbesondere für Kriechmessungen, die eine sehr große initiale Deformationsrate aufweisen. Besondere Vorsicht ist geboten, wenn die Monoschicht nur wenige Zellen ( $N < 200.000$ ) enthält. Bei geringer Zellzahl ist das benötigte Drehmoment zur Anregung der Zellen klein. Das Drehmoment, das aufgrund der Trägheit der Messgeometrie aufgewandt werden muss, ist jedoch in allen Messungen gleich. Somit nimmt der prozentuale Beitrag der Messgeometrie für geringer werdende Zellzahl zu und ist möglicherweise nicht mehr vernachlässigbar.

Das Haake Mars II Rheometer ist ein schubspannungsgesteuertes Rheometer, das die Möglichkeit bietet auch deformationsgesteuerte Messungen vorzunehmen. Es stehen vier Messmodi zur Verfügung, die sich zum einen in der Anregungsart (deformations- bzw. schubspannungsgesteuert) und zum anderen durch die initialen Oszillationszyklen unterscheiden:

- **Langsame Deformationsteuerung (DL)**
- **Schnelle Deformationsteuerung (DS)**
- **Sinusförmige Schubspannungssteuerung (SS)**
- **Cosinusförmige Schubspannungssteuerung (SC)**

Ein zentrales Unterscheidungsmerkmal ist die maximale Deformationsrate  $\dot{\gamma}_{max}$  bzw. die maximale Schubspannungsrate  $\dot{\tau}_{max}$  der initialen Oszillationszyklen. Es gilt:

$$\dot{\gamma}_{DL} \approx \dot{\gamma}_{SS} < \dot{\gamma}_{DF} \ll \dot{\gamma}_{SC} \quad (4.24)$$

Die Unterscheidung nach der maximalen Deformationsrate während der initialen Zyklen wird bei der Diskussion des nichtlinearen Verhaltens von entscheidender Bedeutung sein (Abschnitt 4.4).

Eine spektrale Analyse der Signale zeigte, dass bei deformationsgesteuerten, oszillatorischen Messungen nicht zwingend eine monofrequente Deformationsanregung erfolgt. Im nichtlinearen Fall bleibt die Schubspannung sinusförmig, es werden nur die korrekten Deformationsamplituden eingestellt. Die Deformationssteuerung des Haake Mars II Rheometers realisiert somit eine sogenannte Amplitudensteuerung [88]. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Auswertung der Fourierrheologie wichtig. Üblicherweise erfolgt in der Fourierrheologie für jede untersuchte Oszillationsamplitude eine monofrequente Anregung (Deformation oder Schubspannung). Die Informationen über Nichtlinearitäten werden durch eine spektrale Analyse des Antwortsignals gewonnen (Schubspannung oder Deformation) [91]. In den hier vorgenommenen Messungen muss jedoch bei deformationsge-

## 4.1 Zellmonoschichtreologie im Haake Mars II Rheometer

---

steuerter Anregung eine Fourieranalyse des Deformationssignales, und nicht des Schubspannungssignals, erfolgen.

Der Nullpunkt der Deformation verschiebt sich sukzessive während einer längeren oszillatorischen Messung. Dies hat drei wesentliche Gründe. Erstens wird durch die Regelung im deformationesteuerten Modus häufig eine Oszillation um einen Deformationsmittelwert ungleich null eingestellt. Zweitens regelt das Rheometer die Schubspannung nach jeder Oszillationsserie auf null. Es kommt zu einer unvollständigen Relaxation, in deren Verlauf die Deformation nicht mehr unbedingt ihren ursprünglichen Wert annimmt. Es verbleibt eine Restdeformation, die nichts anderes als eine Verschiebung der Nulllage bedeutet. Drittens verschiebt sich die Nulllage auch bei cosinusförmiger Schubspannungssteuerung. Zu Beginn der Messung wird die Schubspannung auf den Maximalwert geregelt und oszilliert dann symmetrisch um  $\tau=0$  Pa. Durch die hohe Deformationsrate zu Beginn der Messung oszilliert die Deformation jedoch nicht um den vor der Messung eingenommenen Nullpunkt. Der Nullpunkt verschiebt sich in Richtung der maximalen Deformationsrate. Der Einfluss dieser Nullpunktverschiebung auf die Zellmechanik wird an späterer Stelle genauer untersucht (Abschnitt 4.4.2.2).

Die Zellmonoschichtreologie liefert die mechanischen Eigenschaften einer ganzen Monoschicht von Zellen. Die Präparation einer Messung erlaubt keine präzise Kontrolle der zur Messung beitragenden Zellzahl. Daher variieren die Absolutwerte der gemessenen mechanischen Eigenschaften um mindestens eine Größenordnung. Dies erschwert einen quantitativen Vergleich mit Einzelzellmessungen. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Möglichkeit etabliert, um aus Eigenschaften einer Monoschicht auf die mittleren Eigenschaften der einzelnen Zelle zu schließen [127]. Der mittlere Schubmodul der einzelnen Zelle kann mit einem Fehler von etwa 15-20% bestimmt werden. Die Absolutwerte, die im Bereich von 1 kPa liegen, stimmen sehr gut mit anderen Messmethoden überein [108, 109, 146, 158]. Die hier vorgestellte Methode zur Berechnung von Einzelzeleigenschaften ermöglicht auch die Vermessung von Adhäsionskräften beziehungsweise -schubspannungen und erweitert somit frühere Methoden zur Bestimmung von Adhäsionsstärken mittels Zellmonoschichtreologie [129]. In der vorliegenden Arbeit wurden die kritischen Schubspannungen für 3T3 Fibroblasten auf fibronectinbeschichtetem Glas untersucht. Die ermittelten Werte stimmen gut mit der Literatur überein [156], [155].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Modifikationen der Zellmonoschichtreologie (ZMR) ermöglichen es, die Vorteile der Vermessung von vielen Zellen, wie die gute Reproduzierbarkeit und das gute Signal-zu-Rausch-Verhältnis, mit Ergebnissen auf Einzelzelebene zu verbinden. Durch die Analyse der Oszillationsrohdaten kann eine quantitative nichtlineare Analyse der Zellmechanik unter oszillatorischer Stimulation erfolgen. In Zukunft kann die ZMR für die qualitative, wie auch die quantitative, Untersuchung einer Vielzahl zellmechanischer Fragestellungen verwendet werden.

## 4.2. Mechanische Charakterisierung von MCF-7 Brustkrebszellen

In den letzten Jahrzehnten wurden viele verschiedene Methoden entwickelt um Zellmechanik zu untersuchen [117, 119, 121, 122, 123, 124]. Viele gewonnene Ergebnisse stimmen qualitativ sehr gut überein. Vor allem die Frequenzabhängigkeit zellmechanischer Module wird durch verschiedene Untersuchungsmethoden gleichermaßen bestätigt [87, 108, 143]. Betrachtet man jedoch die Absolutwerte der gemessenen Elastizitätsmodule, Schubmodule, Steifigkeiten usw., so ergeben sich Unterschiede von bis zu drei Größenordnungen [120]. Die Ursache dieser Unterschiede ist noch nicht vollständig geklärt, da die Studien meist, neben den unterschiedlichen Messtechniken, auch unterschiedliche Zelllinien und Präparationen verwenden.

Unter Leitung des *National Cancer Institute (NCI)* in den USA wurde daher das Projekt „*Comparative study of MCF-7 cancer cells subjected to different cell-mechanical measurements*“ ins Leben gerufen, welches Arbeitsgruppen mit verschiedenen zellmechanischen Messmethoden zusammenführte. Alle Arbeitsgruppen verwendeten die gleiche Zelllinie (MCF-7) und gleiche Kulturbedingungen. Alle benötigten Medien wurden vom gleichen Hersteller (ATCC) bereitgestellt. Dies sollte sicherstellen, dass ausschließlich der Einfluss der Messmethoden auf die gemessenen zellmechanischen Werte charakterisiert werden konnte.

Im Rahmen dieses Projekts wurden die MCF-7 Zellen auch mit der Zellmonoschichtreologie vermessen. Da die Absolutwerte der zellmechanischen Eigenschaften verglichen werden sollten, wurde eine Umrechnung von Monoschicht- auf Einzelzellwerte nach der Vorgehensweise aus Abschnitt 4.1.7 vorgenommen. Es wurde zunächst eine Bestimmungskurve für die Zellzahl aufgenommen ( $n=8$  Monoschichten). Abbildung 4.21 zeigt das Drehmoment für eine Oszillation mit einer Amplitude von 0,02 und einer Frequenz von 0,5 Hz als Funktion der optisch bestimmten Zellzahl für MCF-7 Zellen. Für die Zellzahl  $N$  ergibt sich  $N(M) = (3333 \pm 1000) \cdot M$  (Siehe Abschnitt 4.1.7). Die Zellfläche betrug im Mittel  $\langle A \rangle = 150 \mu\text{m}^2$ . MCF-7 Zellen sind somit deutlich kleiner als 3T3 Fibroblasten mit  $\langle A \rangle = 478 \mu\text{m}^2$ . Zur Charakterisierung der MCF7-Zellen wurden die rheologischen Standardprotokolle (Amplitudensweeps, Frequenzweeps, Kriechversuche und Kraftrampen) verwendet (Siehe Abschnitt 2.2.2.3). Im Folgenden werden die Ergebnisse vorgestellt.

- Amplitudensweeps

Es wurden Oszillationsexperimente mit einer Frequenz von 0,5 Hz und Amplituden  $\gamma_0=0,001-0,1$  durchgeführt. Der dynamische Schubmodul  $|G^*|$  liegt im Bereich von 4-10 kPa und nimmt mit steigender Oszillationsamplitude ab (Abbildung 4.22). Der dynamische Schubmodul  $|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$  kann mit Hilfe des Phasenwinkels  $\delta$  in einen elastischen Anteil, den Speichermodul  $G' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \cos(\delta)$ , und einen viskosen Anteil, den Verlustmodul  $G'' = \frac{\tau_0}{\gamma_0} \sin(\delta)$ , aufgespalten werden (Siehe Abschnitt 2.2.2.3). Abbildung 4.23 zeigt Speicher-, Verlustmodul und Phasenwinkel als Funktion der Deformation. Beide Module nehmen mit steigender Deformationsamplitude  $\gamma_0$  ab, der Phasenwinkel steigt an. Dies bedeutet, dass die Zellen mit größer werdender Oszillationsamplitude weicher, flüssiger und somit weniger elastisch werden.

## 4.2 Mechanische Charakterisierung von MCF-7 Brustkrebszellen

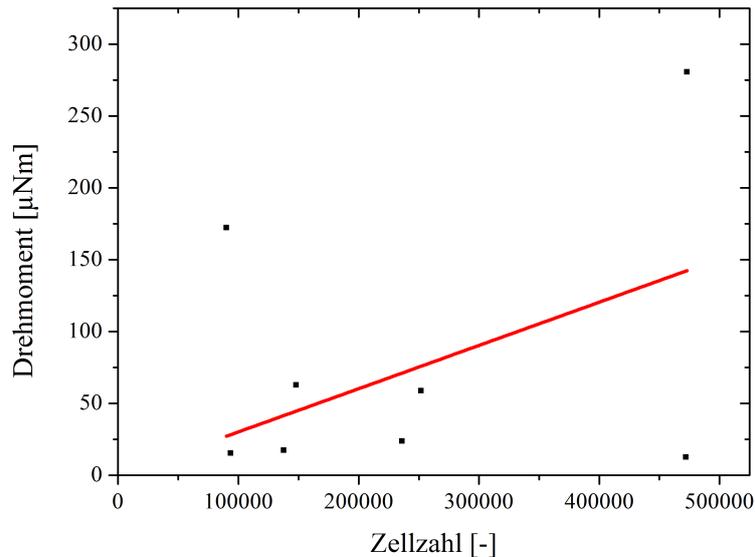


Abbildung 4.21.: Drehmomentamplitude für eine Oszillation mit einer Deformation von 0,02 und einer Frequenz von 0,5 Hz als Funktion der optisch bestimmten Zellzahl. Durch eine lineare Anpassung ( $R^2=0,42$ ) ergibt sich für die Zellzahl  $N(M) = (3333 \pm 1000) \cdot M$ . Dies stimmt gut mit dem Ergebnis für 3T3 Zellen überein. Der Fehler ist relativ groß, was durch die geringe Anzahl an Messungen zu erklären ist.

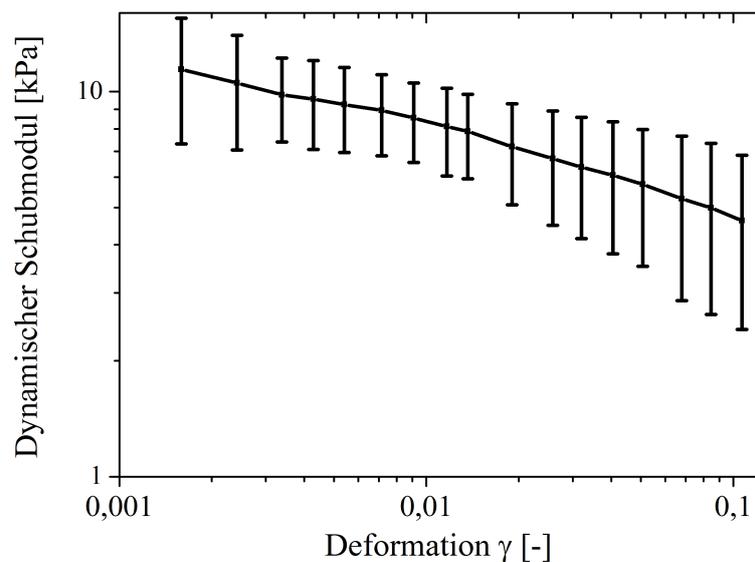


Abbildung 4.22.: Ergebnisse der Oszillationsmessungen bei einer Frequenz von 0,5 Hz und Deformationen von  $\gamma_0=0,001-0,1$ . Der Mittelwert des dynamischen Schubmoduls ist als Funktion der Deformationsamplitude aufgetragen ( $n=8$  Monoschichten).  $|G^*|$  nimmt mit steigender Deformation ab. Dies stimmt mit den Ergebnissen für 3T3 Zellen überein.

- Frequenzsweeps

Es wurden Oszillationsexperimente mit einer Deformationsamplitude von  $\gamma_0=0,02$  und Fre-

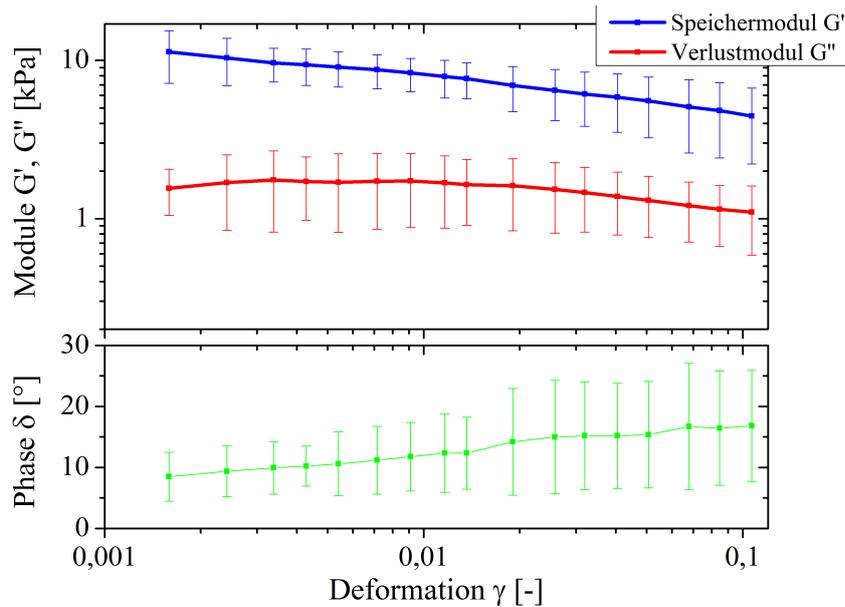


Abbildung 4.23.: Ergebnisse der Oszillationsmessungen bei einer Frequenz von 0,5 Hz und Deformationen von  $\gamma_0=0,001-0,1$ . Oben: Mittelwert des Speicher- (blau) und Verlustmoduls (rot) als Funktion der Deformationsamplitude ( $n=8$ ). Die Module nehmen mit steigender Amplitude ab. Der Phasenwinkel nimmt mit der Deformationsamplitude zu. Dies bedeutet, dass die Zellen flüssiger und weniger elastisch werden.

quenzen  $f=0,1-10$  Hz durchgeführt. Der dynamische Schubmodul  $|G^*|$  steigt mit steigender Frequenz an.  $|G^*|$  kann mit einem *power law*  $|G^*| \propto f^\beta$  mit Exponenten  $\beta=0,07$  angepasst werden (Siehe Abbildung 4.24). Abbildung 4.25 zeigt die Aufspaltung des dynamischen Schubmoduls in Speicher- und Verlustmodul und den dazugehörigen Phasenwinkel. Der Speichermodul steigt weniger stark mit der Frequenz an, als der Verlustmodul. Der Phasenwinkel ist bis zu einer Frequenz von  $f=1$  Hz konstant und steigt dann an.

- Kriechversuche

Zellen wurden für 10 Sekunden einer konstanten Schubspannung  $\tau_0$  ausgesetzt. Nach 10 Sekunden wurde die Schubspannung erhöht. Abbildung 4.26 zeigt beispielhaft eine Messung an einer Monoschicht. Die Nachgiebigkeit  $J(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau_0}$  nimmt mit der Zeit zu.  $J$  kann für jede Schubspannung mit einem *power law*  $J(t) = J_0 \cdot t^\beta$  angepasst werden, wobei  $\beta \approx 0,01-0,1$ . Der Exponent  $\beta$  nimmt mit der anliegenden Schubspannung  $\tau_0$  ab (Abbildung 4.27).

- Kraframpen

Die Schubspannung  $\tau$  wird mit konstanter Rate  $\dot{\tau}$  bis zu einem Maximalwert erhöht und anschließend mit der gleichen Rate verkleinert, bis  $\tau=0$  Pa. Die Schubspannungsraten wurden variiert. Für Raten kleiner als  $\dot{\tau} \approx 3 \frac{\text{Pa}}{\text{s}}$  ergibt sich eine nichtlineare Deformations-Schubspannungs Kurve und eine sehr ausgeprägte Hysterese (Abbildung 4.28, links). Die Hysterese zeigt sich daran, dass am Ende eines Rampenzyklus eine endliche Restdeforma-

## 4.2 Mechanische Charakterisierung von MCF-7 Brustkrebszellen

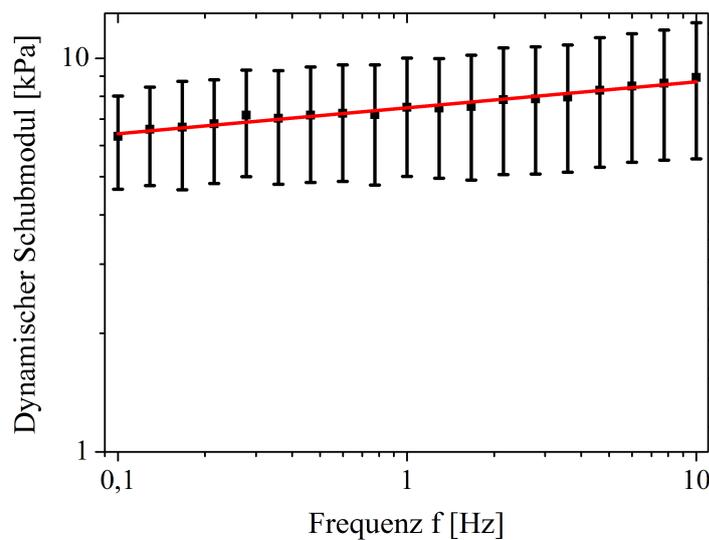


Abbildung 4.24.: Ergebnisse der Oszillationsmessungen bei einer Deformation von 0,02 und Frequenzen von  $f=0,1-10$  Hz. Der dynamische Schubmodul  $|G^*|$  ist als Funktion der Oszillationsfrequenz  $f$  aufgetragen.  $|G^*|$  steigt mit steigender Frequenz an. Rot: *Power law* Anpassung des dynamischen Schubmoduls ( $R^2=0,965$ ). Es ergibt sich ein Exponent  $\beta=0,07$ .

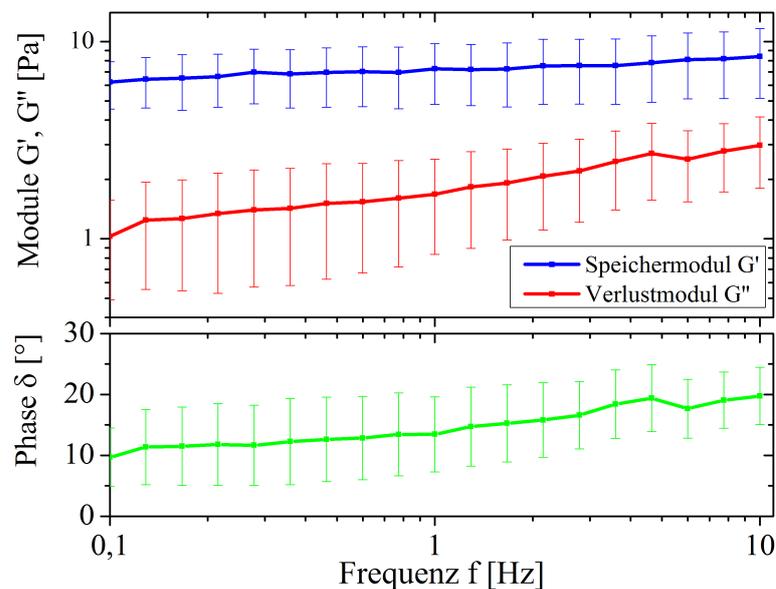


Abbildung 4.25.: Oben: Speicher- und Verlustmodul als Funktion der Oszillationsfrequenz für die Daten aus Abbildung 4.24. Der Verlustmodul steigt stärker mit steigender Frequenz als der Speichermodul. Unten: Der Phasenwinkel ist bis zu einer Frequenz von  $f=1$  Hz konstant und steigt danach an.

tion  $\gamma_0$  zurückbleibt, obwohl die Schubspannung verschwindet. Beginnt man mit höheren Raten von etwa  $\dot{\tau} > 4 \frac{\text{Pa}}{\text{s}}$ , so ist die Deformations-Schubspannungs Kurve fast linear und die Hysterese verschwindet (Abbildung 4.28, rechts).

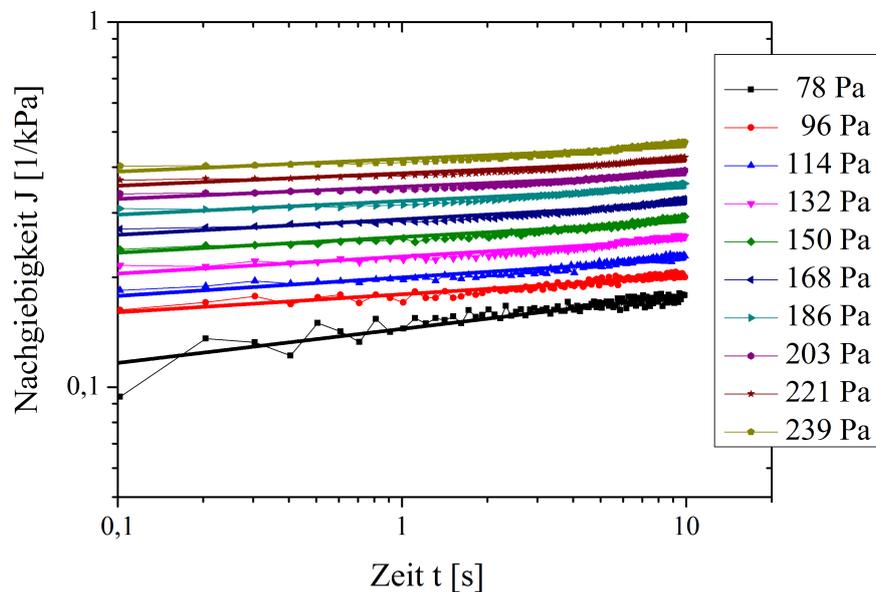


Abbildung 4.26.: Ergebnis einer Kriechmessung an einer Monoschicht für sukzessive ansteigende Schubspannungen  $\tau_0$  (Legende). Die Nachgiebigkeit  $J(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau_0}$  ist als Funktion der Zeit aufgetragen.  $J$  steigt in doppeltlogarithmischer Auftragung linear mit der Zeit an und kann mit einem *power law* angepasst werden. Die Exponenten liegen im Bereich von  $\beta \approx 0,1$ , abhängig von der anliegenden Schubspannung (Abbildung 4.27).

#### 4.2.1. Diskussion und Zusammenfassung

Im Rahmen eines Projektes, das den Vergleich zellrheologischer Messmethoden zum Ziel hatte, wurden MCF-7 Brustkrebszellen mittels Zellmonoschichtreologie charakterisiert. Es wurden Amplituden-, Frequenzsweeps, Kriechversuche und Krafterampen durchgeführt.

Die qualitativen Ergebnisse stimmen sehr gut mit vorherigen Messungen an Fibroblasten und anderen Zelltypen überein [87, 159, 160].

Der Schubmodul von MCF-7 Zellen nimmt mit steigender Oszillationsamplitude bei konstanter Frequenz ab, in guter Übereinstimmung mit Messungen an anderen Zelltypen [87, 108] und den in Abschnitt 4.1.7.2 vorgestellten Ergebnissen.

Bei einer konstanten Oszillationsamplitude von 0,02 nimmt der Schubmodul mit steigender Frequenz zu. Der Schubmodul folgt einem Exponentengesetz  $G = G_0 f^\beta$  (*power law*), mit einem Exponenten von  $\beta=0,07$ . Die *power law* Rheologie lebender Zellen wurde für eine Vielzahl von Zelltypen unter Verwendung unterschiedlicher Messmethoden beschrieben, wobei üblicherweise Exponenten zwischen 0,1-0,5 angegeben werden [108, 143]. Ein Exponent  $\beta=0$  bedeutet vollstän-

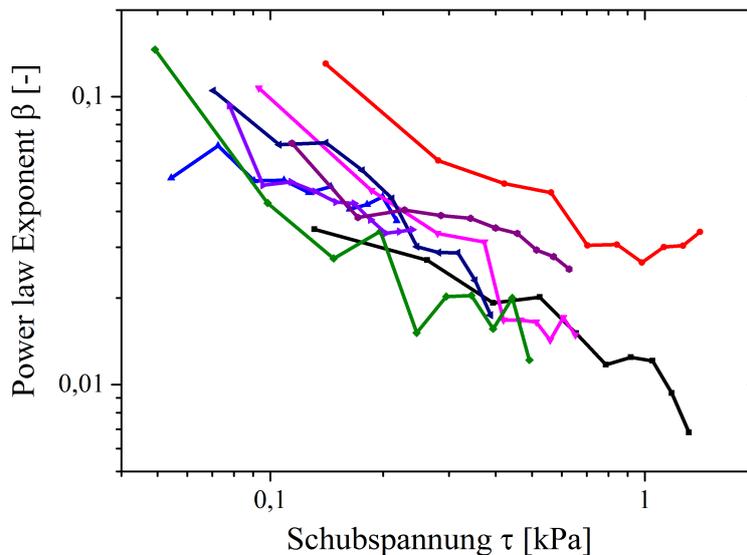


Abbildung 4.27.: Ergebnisse der Kriechmessungen an acht Monoschichten. Die *power law* Exponenten  $\beta$  sind als Funktion der Schubspannung aufgetragen.  $\beta$  nimmt in allen Experimenten ( $n=8$ ) mit steigender Schubspannung ab.

dig elastisches,  $\beta=1$  dagegen rein viskoses Verhalten. Der hier experimentell bestimmte Exponent ist gering, was auf eine sehr elastisch dominierte Antwort der Zelle schließen lässt. Dies ist ebenfalls am geringen Phasenwinkel  $5^\circ < \delta < 20^\circ$  bei oszillatorischen Messungen zu erkennen ( $\delta = 0^\circ$  entspricht rein elastischem,  $\delta = 90^\circ$  rein viskosem Verhalten).

Die Kriechversuche liefern Nachgiebigkeiten  $J(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau_0}$ , die einem Exponentengesetz  $J = J_0 t^\beta$  in der Zeit folgen. Die Exponenten liegen für kleine Schubspannungen  $\tau_0$  im Bereich von  $\beta=0,1$  in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den frequenzabhängigen Messungen. Dies ist zu erwarten, da im linearen Bereich für kleine Stimuli die Nachgiebigkeit und der Schubmodul über eine Laplace-Transformation verknüpft sind, die den Exponenten nicht ändert [160]. Für größere Schubspannungen nimmt der Exponent in Kriechversuchen mit wachsender Schubspannung ab. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen von Kollmannsberger et al. [109], die einen zunehmenden Exponenten erhalten. In [109] wurden die Ergebnisse mittels einer differentiellen Kriechfunktion angepasst, die die vorangegangene Historie berücksichtigt. Dies war notwendig, da sich für größere Kräfte eine deutliche Abweichung der Messdaten von der einfachen Kriechfunktion ergaben [109]. Für die vorliegende Arbeit konnten die aufeinanderfolgenden Kriechversuche als unabhängig angepasst werden, ohne dass sich eine zunehmende Abweichung von Experiment und Anpassung für größer werdende Schubspannungen zeigte. Eine Anpassung der Daten mit dem Modell aus [109] wurde nicht vorgenommen, da die Kriechversuche in dieser Arbeit nur von untergeordneter Bedeutung sind. Die unterschiedliche Anpassung der Messdaten in dieser Arbeit im Vergleich zu Kollmannsberger et al. kann jedoch das unterschiedliche Verhalten der Kriechexponenten als Funktion der anliegenden Spannung erklären. Die Nachgiebigkeit  $J_0$ , die aus der Anpassung der

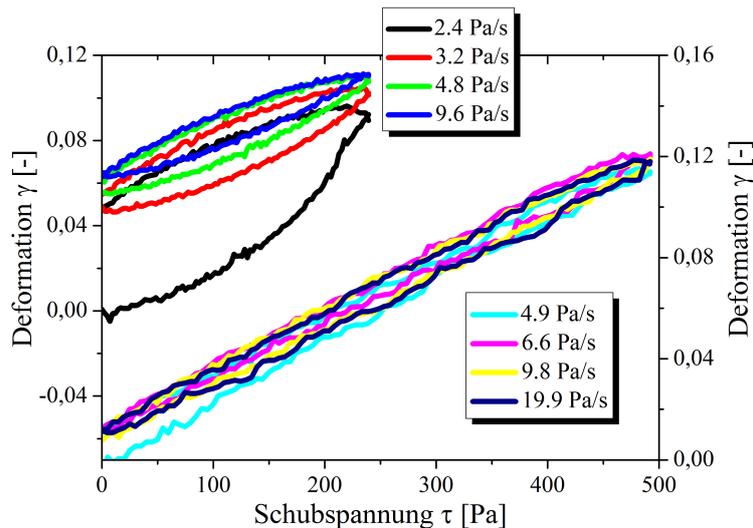


Abbildung 4.28.: Deformation  $\gamma$  als Funktion der anliegenden Schubspannung  $\tau$ . Insets: Raten, mit denen die Kraft vergrößert/verkleinert wird. Die Anfangsrate wird nach jedem Zyklus erhöht. Links: Es zeigt sich ein nichtlineares Deformations-Schubspannungs-Verhalten und eine ausgeprägte Hysterese. Rechts: Die Anfangsrate ist größer gewählt und wird sukzessive erhöht. Die Hysterese ist nur sehr schwach ausgeprägt.

Messdaten an das Exponentengesetz  $J = J_0 t^\beta$  resultiert, wird mit steigender Schubspannung größer. Dies steht ebenfalls im Widerspruch zu den Ergebnissen von Kollmannsberger et al., die einen abnehmenden Vorfaktor beschreiben. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen somit, dass die Zelle mit steigender Schubspannung weicher, aber zur gleichen Zeit immer mehr elastisch dominiert wird. Es ergeben sich somit gegenteilige Ergebnissen verglichen mit Kollmannsberger et al. Die auf die Zelle wirkenden Kräfte sind in beiden Arbeiten vergleichbar. Sie liegen bei der Arbeit von Kollmannsberger et al. bei etwa 1-20 nN, in der vorliegenden Arbeit bei 1-100 nN. Die unterschiedlichen Ergebnisse können, abgesehen von der unterschiedlichen Anpassung, auch auf die unterschiedlichen Messmethoden zurückzuführen sein. Die hier verwendete Zellmonoschicht-rheologie verformt die zu untersuchenden Zellen vollständig und homogen. Kollmannsberger et al. nutzen die magnetische Pinzette, bei der nur Teile der Zelle inhomogen verformt werden [124]. Fredberg et al. haben gezeigt, dass die Verfestigung von Zellen bei lokaler inhomogener Stimulierung von Zellen auftritt, während die abnehmende Steifigkeit charakteristisch für homogene mechanische Anregung der gesamten Zelle ist [112]. Dies könnte die Grundlage der gegensätzlichen Ergebnisse in Bezug auf die Zellsteifigkeit und den Kriechexponenten sein, die in dieser Arbeit und der in [109] beschrieben werden. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Experimente mit Kraframpen ergeben Ergebnisse analog zu den Ergebnissen mit Einzelzellen im Mikroplattenrheometer [57]. Die Schubspannungs-Deformations Kurve ist nichtlinear und weist eine Hysterese auf, die abhängig von der Schubspannungsrate ist. Die Hysterese ist umso schma-

## 4.2 Mechanische Charakterisierung von MCF-7 Brustkrebszellen

---

ler, je größer die Schubspannungsrate ist. Betrachtet man jedoch die Deformationsrate, so ist die Hysterese für schnellere Deformationsrate stärker ausgeprägt als für langsame. Dies wurde auch in Experimenten an Einzelzellen beschrieben [57].

Neben den qualitativen Aspekten der Zellmechanik ging es in diesem Projekt hauptsächlich um die Quantifizierung der mechanischen Eigenschaften von MCF-7 Zellen. Für eine Deformationsamplitude von 0,02 bei einer Frequenz von 0,5 Hz ergibt sich ein dynamischer Schubmodul von 7,2 kPa. Dieser ist um einen Faktor 7 größer als der Schubmodul für 3T3 Fibroblasten. Betrachtet man die Eichkurven zur Bestimmung der Zellzahl, so ergibt sich für MCF-7 Zellen eine Steigung von  $3333 \frac{\text{Zellen}}{\mu\text{Nm}}$  und damit ein Drehmomentzuwachs pro Zelle von 0,3 nNm. Für 3T3 Fibroblasten ergibt sich 0,25 nNm pro Zelle. Der Fehler bei der Bestimmung der Steigung der MCF-7 Zellen ergibt sich zu etwa 33%. Somit unterscheiden sich die Werte für Fibroblasten und MCF-7 Zellen im Mittel nicht signifikant. Die Unterschiede im Schubmodul kommen vor allem von den unterschiedlichen Zellflächen. Diese sind im Falle von MCF-7 Zellen  $A \approx 150 \mu\text{m}^2$  und für Fibroblasten  $A \approx 478 \mu\text{m}^2$ .

Der Grund für die großen Unterschiede in den Schubmodulen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Ein Vergleich mit Literaturwerten ist wenig hilfreich, da diese um bis zu zwei Größenordnungen streuen können, abhängig von der gewählten Messmethode [120]. Krebszellen sind im allgemeinen tendenziell weicher als gesunde Zellen [19, 161], wobei beachtet werden muss, dass sich auch Unterschiede zwischen transformierten und nicht transformierten Zellen in Bezug auf Steifigkeit ergeben [162] und ein direkter Vergleich somit zumindest mit Vorsicht zu betrachten ist. Besonders ausgeprägt ist die abnehmende Steifigkeit durch den Übergang von lokalisierten Zellen zu motilen Zellen, die invasiv in umliegende Gewebe eindringen können und somit zur Metastasenbildung beitragen [163, 164]. Somit wäre nicht zu erwarten, dass MCF-7 Zellen wesentlich steifer als gesunde 3T3 Zellen sein sollten. Ein Grund für diese Abweichung könnte die ausgeprägte Tendenz zur Aggregatbildung bei MCF-7 Krebszellen sein. Bei der Präparation von Monoschichten muss auf ausreichendes Pipettieren geachtet werden, um alle sich während der Zentrifugation bildenden Zellcluster aufzulösen (Siehe A.1.3). Dies stellte sich bei MCF7 Zellen als sehr schwierig heraus. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass sich trotzdem einige Zellcluster zwischen den Platten befanden. Diese würden stark gequetscht und somit versteift werden [87], was zum einen den großen mittleren Schubmodul und zum anderen auch die, im Gegensatz zu 3T3 Zellen, große Standardabweichung bei Messungen an MCF-7 Zellen erklären könnte. Die große Standardabweichung kommt vor allem durch die Ausreißer zustände (Abbildung 4.21). Wie in Abschnitt 4.1.7 erläutert wurde, entstehen diejenigen Ausreißer, die eine viel zu große Drehmomentamplitude gemessen an der optisch bestimmten Zellzahl aufweisen, durch Zellaggregate zwischen den Platten. Ausreißer mit zu geringem Drehmoment kommen durch ein Ablösen vieler Zellen von den Platten zustande, wodurch die zum Experiment beitragende Zellzahl wesentlich geringer als die optisch bestimmte Zellzahl ist.

Der Abschluss der Studie steht zum Zeitpunkt der Fertigstellung der Arbeit noch aus. Die Ergebnisse der beteiligten Arbeitsgruppen unterschieden sich, wie zu erwarten, stark. Es konnten jedoch einige wichtige Unterschiede der Messmethoden und ihre Auswirkung auf die Vermessung

der mechanischen Eigenschaften von lebenden Zellen ausgemacht werden. Dies sollte in Zukunft helfen verschiedene Messmethoden besser zu vergleichen und die richtige Wahl der Messmethode für die zu untersuchende Fragestellung zu treffen.

### 4.3. Einfluss der Überexpression des TES Proteins auf die Mechanik von HELA Zellen

Zellen werden häufig vereinfacht als viskoelastische Materialien beschrieben [19, 108, 109, 120, 165]. Es zeichnet sich jedoch immer mehr ab, dass viele experimentelle Ergebnisse nur im Rahmen einer inelastischen Zellantwort erklärt werden können [57, 60, 113, 114, 150]. Die inelastische Antwort erfolgt durch eine Anpassung der Struktur des Zytoskeletts, in Form von Änderungen des Vernetzungsgrades [104, 114, 150], der Aktin-Filamentdichte [111, 148] oder der Ausrichtung der Aktinfilamente [59, 166], an den mechanischen Stimulus.

Daher sollte untersucht werden, ob die Aktindynamik an fokalen Adhäsionskontakten einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften von HELA Zellen hat. Das TES Gen [167, 168, 169] kodiert für ein Protein (Testin), welches mit Proteinen der fokalen Adhäsionskontakte und dem assoziierten Aktinzytoskelett wechselwirkt. Wird TES überexprimiert, so kommt es zu einer veränderten Aktindynamik an den Adhäsionskontakten [51, 167, 169]. Um den Effekt dieser Zellveränderung auf die mechanischen Eigenschaften zu überprüfen, wurden *Amplitudensweeps*, *Frequenzweeps* und Kriechversuche durchgeführt. Die Monoschichtdaten wurden, wie in Abschnitt 4.1.7 vorgestellt, mit Hilfe einer Anpassungsgerade (Siehe Abbildung 4.29) in Einzelzelldaten umgerechnet.

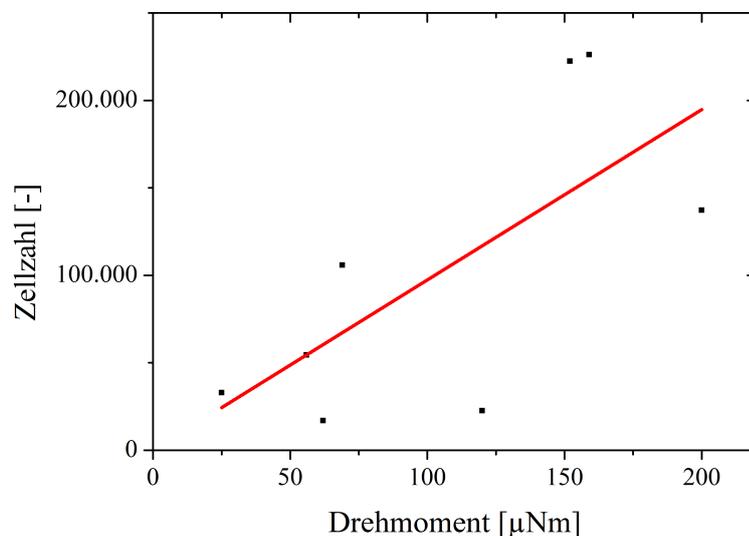


Abbildung 4.29.: Zellzahl als Funktion der Drehmomentamplitude bei einer Deformation von  $\gamma=0,02$  und einer Frequenz von  $f=0,5$  Hz für acht HELA-Zellmonoschichten. rot: Lineare Anpassung mit  $R^2=0,778$  ergibt  $N(M) = (951 \pm 181) \cdot M$ .

Abbildung 4.30 zeigt den dynamischen Schubmodul  $|G^*|$  als Funktion der Deformation  $\gamma$ . Der Schubmodul nimmt mit steigender Deformation ab, analog zu Ergebnissen von 3T3 und MCF-

7 Zellen. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten und transfizierten Zellen. Somit spielt die Aktindynamik für oszillatorische Anregungen mit kleiner Amplitude  $\gamma < 0,1$  bei einer Frequenz von  $f=0,5$  Hz auf der untersuchten Zeitskala ( $t < 5$  min) keine entscheidende Rolle.

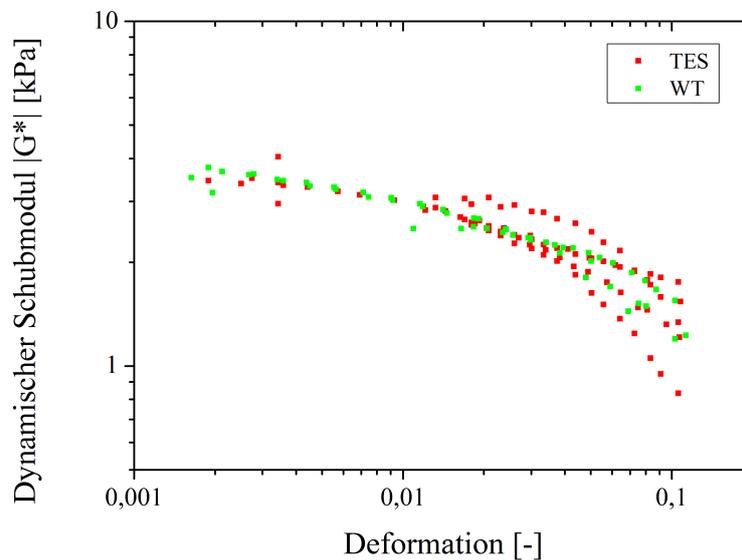


Abbildung 4.30.: Dynamischer Schubmodul als Funktion der Deformation für Messungen an Wildtypzellen (grün) und transfizierten Zellen (rot) bei einer Frequenz von  $f=0,5$  Hz. Für beide Zellarten nimmt der Schubmodul mit steigender Deformation ab, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für 3T3 und MCF-7 Zellen. Die Überexpression von TES führt nicht zu einer Änderung der Deformationsabhängigkeit des Schubmoduls für Deformationen  $\gamma < 0,1$ .

Die Frequenzabhängigkeit des dynamischen Schubmoduls für kleine Deformationsamplituden  $\gamma_0=0,02$  ändert sich ebenfalls nicht durch die Transfektion (Siehe Abbildung 4.31). Betrachtet man jedoch den Phasenwinkel als Funktion der Frequenz, so ergibt sich ein Unterschied zwischen Wildtypzellen und transfizierten Zellen (Siehe Abbildung 4.32). Der Phasenwinkel nimmt für unbehandelte Zellen ein Minimum bei einer Frequenz von  $f=0,5$  Hz an. Der Absolutwert des Minimums hängt von der Monoschicht ab. Dieses Minimum tritt nur bei einer von fünf Messungen an transfizierten Zellen auf, oder verschiebt sich zu Frequenzen  $f < 0,1$  Hz.

Auch die Antwort auf eine konstante Schubspannung  $\tau_0$  in Kriechversuchen ändert sich durch TES-Überexpression (Siehe Abbildung 4.33). Für Zeiten  $t < 60$  s folgen die Nachgiebigkeiten  $J(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau_0}$  einem *power law*  $J(t) \propto t^\beta$ . Bei Wildtypzellen gibt es einen Übergang zu einem größeren Exponenten bei  $t=60-100$  s. Dieser ist nur in einer von fünf Messungen an TES-Zellen zu verzeichnen. Es handelt sich um genau die Monoschicht, die auch in den Frequenzsweeps das Verhalten für Wildtypzellen gezeigt hat.

### 4.3 Einfluss der Überexpression des TES Proteins auf die Mechanik von HELA Zellen

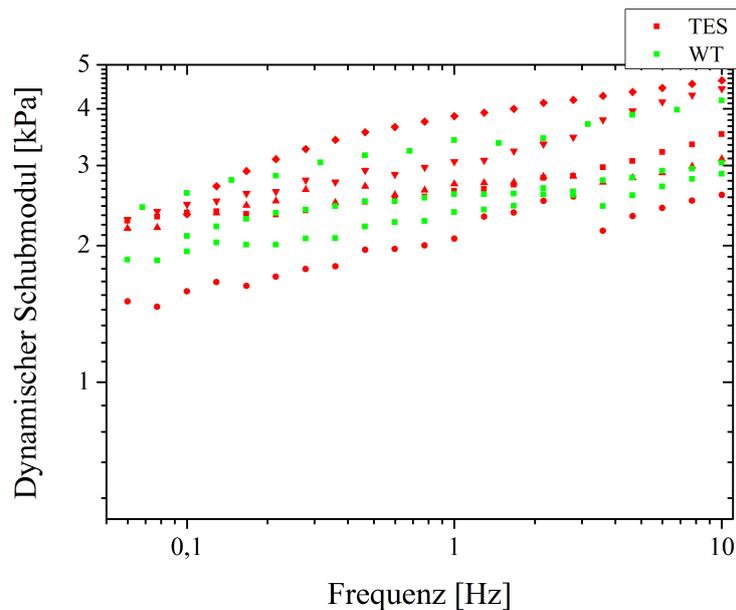


Abbildung 4.31.: Dynamischer Schubmodul als Funktion der Frequenz für Messungen an Wildtypzellen (grün) und transfizierten Zellen (rot) bei einer Deformation von  $\gamma=0,02$ . Für beide Zellarten nimmt der Schubmodul mit steigender Frequenz zu, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für 3T3 und MCF-7 Zellen. Die Überexpression von TES führt nicht zu einer Änderung der Frequenzabhängigkeit des Schubmoduls für Frequenzen von 0,1-10 Hz.

#### 4.3.1. Diskussion und Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt einer TES-Überexpression auf die mechanischen Eigenschaften von HELA-Zellen untersucht. Dazu wurden die HELA-Zellen mit einem TES-Vektor im Vorfeld der Messung transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie abgeschätzt. Nur bei einer Effizienz von mindestens 60-70% wurden die Zellen für Experimente verwendet. Es wurden die rheologischen Standardprotokolle verwendet.

Bei Amplitudensweeps zeigt sich kein Unterschied zwischen Wildtyp- und TES-Zellen. Es zeigt sich eine Abnahme der Zellsteifigkeit mit größer werdender Oszillationsamplitude in Übereinstimmung mit Messungen an anderen Zelltypen (Siehe Abschnitt 4.1.7.2 und 4.2).

Frequenzsweeps liefern eine unveränderte *power law*-Antwort für Wildtypzellen und transfizierte Zellen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Arbeiten, die zeigen, dass die *power law* Antwort sehr robust ist und unverändert von vielen pharmakologischen Änderungen des Zytoskeletts bestehen bleibt [170]. Betrachtet man den Phasenwinkel als Funktion der Frequenz zeigt sich, dass es für Wildtypzellen ein Minimum der Phase bei einer Frequenz von etwa 0,5 Hz gibt. Dieses Minimum findet sich nur bei einer von fünf TES-Messungen. Ansonsten verschiebt sich das Minimum für TES-Zellen offensichtlich zu geringeren Frequenzen oder verschwindet gänzlich. Anhand der vorliegenden Daten kann nicht entschieden werden, ob das Minimum verschwindet oder sich nur verschiebt, da das untersuchte Frequenzintervall bei zu großen Frequenzen beginnt.

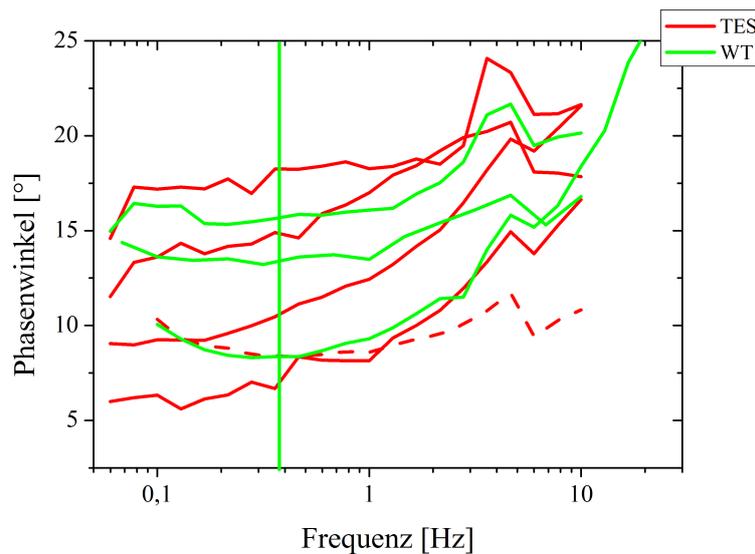


Abbildung 4.32.: Phasenwinkel als Funktion der Frequenz für Messungen an Wildtypzellen (grün) und transfizierten Zellen (rot) bei einer Deformation von  $\gamma=0,02$ . Die Überexpression von TES führt zu einer Änderung der Frequenzabhängigkeit des Phasenwinkels. Wildtypzellen zeigen ein Minimum des Phasenwinkels bei  $f=0,5$  Hz (verdeutlicht durch die grüne vertikale Linie). Dieses Minimum verschwindet bei TES-Zellen oder wird zu geringeren Frequenzen verschoben.

Das Frequenzintervall wurde vor Beginn der Messungen aus gutem Grund so gewählt. Zu Beginn der Messreihen war noch unklar, welche Änderungen der Zellmechanik sich durch die Zelltransfektionen ergeben könnten. Daher sollten für jede Monoschicht möglichst viele verschiedene Messprotokolle verwendet werden, die verschiedene Aspekte der Zellmechanik untersuchen. Die Messzeit für eine Monoschicht sollte jedoch auf etwa 2-3 Stunden begrenzt werden, um zu gewährleisten, dass intakte Zellen vermessen werden. Die Messzeiten für Frequenzsweeps werden groß ( $\approx > 1$  Stunde), wenn Frequenzen kleiner als 0,05 Hz untersucht werden sollen, da für jede Frequenz mindestens 10 Oszillationszyklen durchlaufen werden müssen, um einen soliden Mittelwert für die gemessenen rheologischen Größen zu erhalten. Daher wurde entschieden, die Frequenzsweeps erst bei 0,1 Hz zu beginnen, um noch andere Messungen an der Monoschicht durchführen zu können. Somit zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass eine Untersuchung geringerer Frequenzen  $< 0,05$  Hz von Interesse wäre.

Für Kriechversuche zeigt sich ebenfalls eine *power law*-Antwort. Für große Zeiten, gibt es bei 2 von drei Wildtypmessungen einen Übergang von einem Exponenten zu einem größeren Exponenten bei etwa  $t=60-100$  s. Dieser Übergang kommt bei TES-Zellen nur in einer von fünf Messungen vor. Es handelt sich dabei um die gleiche Messung, die bei der Analyse des Phasenwinkels Wildtypverhalten gezeigt hat. Somit war die Transfektionrate für diese Monoschicht trotz Fluoreszenzkontrolle eventuell nicht groß genug.

Zusammenfassend zeigt sich der Einfluss der Überexpression von TES bei kleinen Frequenzen ( $f < 0,1$  Hz) und großen Zeiten  $t > 100$  s. Auf diesen Zeitskalen spielen sich aktive Prozesse

#### 4.3 Einfluss der Überexpression des TES Proteins auf die Mechanik von HELA Zellen

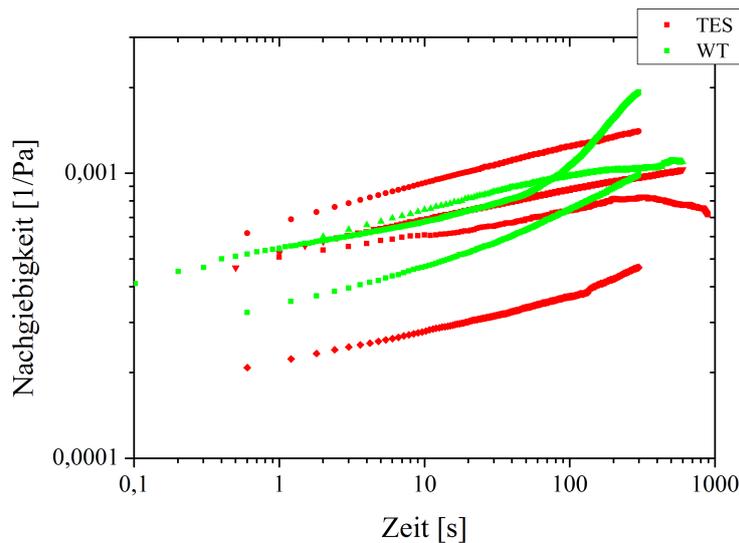


Abbildung 4.33.: Ergebnisse der Kriechversuche an HELA Wildtyp (grün) und TES modifizierten Zellen (rot). Die Nachgiebigkeit  $J$  ist als Funktion der Zeit aufgetragen. Für kleine Zeiten  $t < 60$  s folgen die Nachgiebigkeiten für alle Zellen einem *power law*. Für zwei von drei Wildtypmessungen findet sich bei etwa  $t = 60-100$  s ein Übergang zu einem *power law* mit größerem Exponenten. Dieser Übergang ist nur bei einer von fünf Messungen an TES-Zellen vorhanden. Es handelt sich dabei um die Monoschicht, die auch in Bezug auf die Frequenzabhängigkeit des Phasenwinkels Wildtypverhalten gezeigt hat.

innerhalb der Zelle ab [171], die durch die Überexpression beeinflusst werden können. Das Protein TES wechselwirkt mit fokalen Adhäsionskontakten und Aktin Stressfasern [167, 169]. Es interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen, u.a. mit Zyxin, welches für die Aufrechterhaltung und Reparatur von Stressfasern wichtig [53] ist und über die Änderung von Bindungskinetiken als Kraftsensor an fokalen Adhäsionen wirken kann [51]. Ein *knockdown* des TES Proteins mittels RNA-Interferenz führt zu einem Verlust von Stressfasern. Eine Überexpression von TES bedingt eine stärkere Ausbreitung und Adhäsion von Zellen auf Substraten bei gleichzeitig verminderter Zellmotilität [167, 169]. Somit spielt das TES Protein eine wichtige Rolle für die Aktindynamik an fokalen Adhäsionen und im speziellen bei Stressfasern. Dies legt nahe, dass die Änderung der Aktindynamik zu einer Änderung der mechanischen Antwort in Form einer Modifikation der Dissipation führt. Dies ist aus der Verschiebung des Minimums des Phasenwinkels bei frequenzabhängigen Oszillationen zu schließen. Ein solches Minimum der Dissipation ist aus vernetzten Aktinellen bekannt [172]. Diese liegen ebenfalls im Bereich von 0,01-0,5 Hz, abhängig vom Vernetzungsgrad des Gels [172, 173]. Das Minimum der Dissipation wird durch das Zusammenspiel zwischen lokaler Stressrelaxation und Reibung durch einzelne Filamente erklärt [172, 173]. Die Relaxations- und Filamentdynamik spielen somit eine wesentliche Rolle. Da TES auf die Aktindynamik und Stressfaserdynamik wirkt [51, 53, 167, 169] könnte eine Manipulation der TES-Expression zu der beobachteten Verschiebung des Dissipationsminimums führen.

TES-Überexpression führt zu einer verstärkten Ausbreitung von Zellen auf einem Substrat und einer stabileren Adhäsion [174]. Dies könnte der Grund dafür sein, dass bei Kriechversuchen der Übergang zu einem Regime mit größerem Exponenten verschwindet. Ein größerer Exponent bedeutet, dass die Zellen schneller fließen bis es schließlich zu einem Versagen der Adhäsion kommt. Durch die Überexpression von TES kommt es zu einer Verstärkung der Adhäsion und der Zellintegrität. Damit fließt die Zelle auch für große Zeiten mit konstantem Exponenten, der Übergang geht verloren.

In Zukunft wäre es interessant, die Messungen auf kleinere Frequenzen auszudehnen. Dies ist häufig problematisch, da kleine Frequenzen auch große Messzeiten bedeuten. Eine Alternative wäre die Nutzung der *strain rate frequency superposition* [90] (Abschnitt 2.2.2.2). Hier werden Frequenz und Amplitude verändert, um eine konstante Scherrate zu erhalten. Dadurch können strukturelle Relaxationen innerhalb eines Materials untersucht werden. Der Vorteil dieser Methode ist, dass durch die gleichzeitige Änderung von Frequenz und Amplitude die Relaxation zu größeren Frequenzen verschoben werden kann, die einfacher mit dem Rheometer zu vermessen sind [90]. Des Weiteren wäre die Untersuchung des Einflusses des TES-Proteins auf die nichtlinearen Eigenschaften bei großen Oszillationsamplituden interessant. Bei Amplituden größer als 5-10% kommt es zu Umordnungen des Aktinzytoskeletts, die die mechanischen Eigenschaften der Zelle verändern können [59, 166]. Es wäre interessant zu überprüfen, ob sich diese Dynamik ändert.

Die hier vorgestellten Messungen sind ein sehr guter Ausgangspunkt für weiterführende Messungen. Sie geben Hinweise, auf welchen Zeitskalen und in welchen Anregungsintervallen Effekte des TES Proteins auf die Zellmechanik zu finden sein können. Aufgrund der geringen Zahl der Experimente kann anhand der hier vorliegenden Daten keine signifikante Aussage getroffen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten keine weiterführenden Experimente mehr durchgeführt werden. Es müssen daher noch weitergehende Experimente vorgenommen werden, die den Einfluss des TES-Proteins genauer untersuchen. Es zeigen sich jedoch deutliche Hinweise auf einen Einfluss des TES Proteins. Ehrlicher et al. haben kürzlich die Rolle des aktinvernetzenden Proteins  $\alpha$ -Aktinin auf die Zellmechanik untersucht und ähnliche Ergebnisse zu den hier vorgestellten erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass die Änderung der Bindungsdynamik Einfluss auf die zellmechanischen Eigenschaften nehmen kann [175]. Dies hebt die wichtige Rolle einzelner struktureller Proteine und speziell deren Dynamik für die Zellmechanik hervor.

### 4.4. Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die nichtlineare Zellmechanik mit Hilfe der Zellmonoschichtreologie auf Basis von Oszillationen mit großer Amplitude untersucht. Das Augenmerk lag dabei auf dem Übergang von linearer zu nichtlinearer Zellantwort und der Abhängigkeit der nichtlinearen Beiträge von der Anregungsamplitude. Es wurden Oszillationen bei einer konstanten Frequenz von  $f=0,5$  Hz durchgeführt. Diese Frequenz wurde gewählt, da zum einen die Regelung des Rheometers mit dieser Frequenz die besten Ergebnisse lieferte. Zum anderen garantiert die Frequenz eine stabile Zelladhäsion bis zu Deformationsamplituden  $\gamma_0 > 0,5$ . Höhere Frequenzen bedingen eine höhere Verformungsgeschwindigkeit der Zellen, was zu einem Versagen der Adhäsion bei geringeren Deformationen  $\gamma_0 < 0,5$  führt. Da das Ziel der Arbeit die Charakterisierung der nichtlinearen Zellmechanik bei großen Amplituden ist, sollten daher möglichst kleine Frequenzen verwendet werden. Geringe Frequenzen bedeuten jedoch auch große Periodendauern einer Oszillation, was zu großen Messdauern führen kann. Denn um eine ein sinnvolles Signal zu Rausch Verhältnis für die Auswertung der Ergebnisse mittels Fourierreologie zu ermöglichen, hatte sich in Vorversuchen eine Mindestanzahl von  $\approx 30$  Oszillationsperioden als notwendig herausgestellt. Eine Frequenz von 0,5 Hz stellt somit einen Kompromiss aus guter Regelung des Rheometers, guter Zelladhäsion und geringer Messdauer dar. Um eine ausreichende Anzahl von Oszillationsperioden auswerten zu können wurden Messzeiten zwischen 80-120 Sekunden für jede Amplitude gewählt (Oszillationsserie). Jede Oszillationsserie beginnt mit den für den Messmodus charakteristischen initialen Zyklen (Einregelung) gefolgt von stationären Oszillationen, bei denen Anregung und Antwort stationär werden. Nach einer Oszillationsserie folgt eine Relaxation der Zellen bei einer Schubspannung von  $\tau=0$  Pa. Die Relaxationszeit wird an die Oszillationszeit angepasst. Sie soll den Einfluss vorheriger Oszillationen verringern. Eine Messung besteht aus einer Aneinanderreihung solcher Oszillations-Pause-Zyklen, wobei die Oszillationsamplitude nach jedem Zyklus erhöht wird, bis sich die Zellen von den Platten lösen. Abbildung 4.34 zeigt das Prinzip der Messungen und rekapituliert die verschiedenen Messmodi.

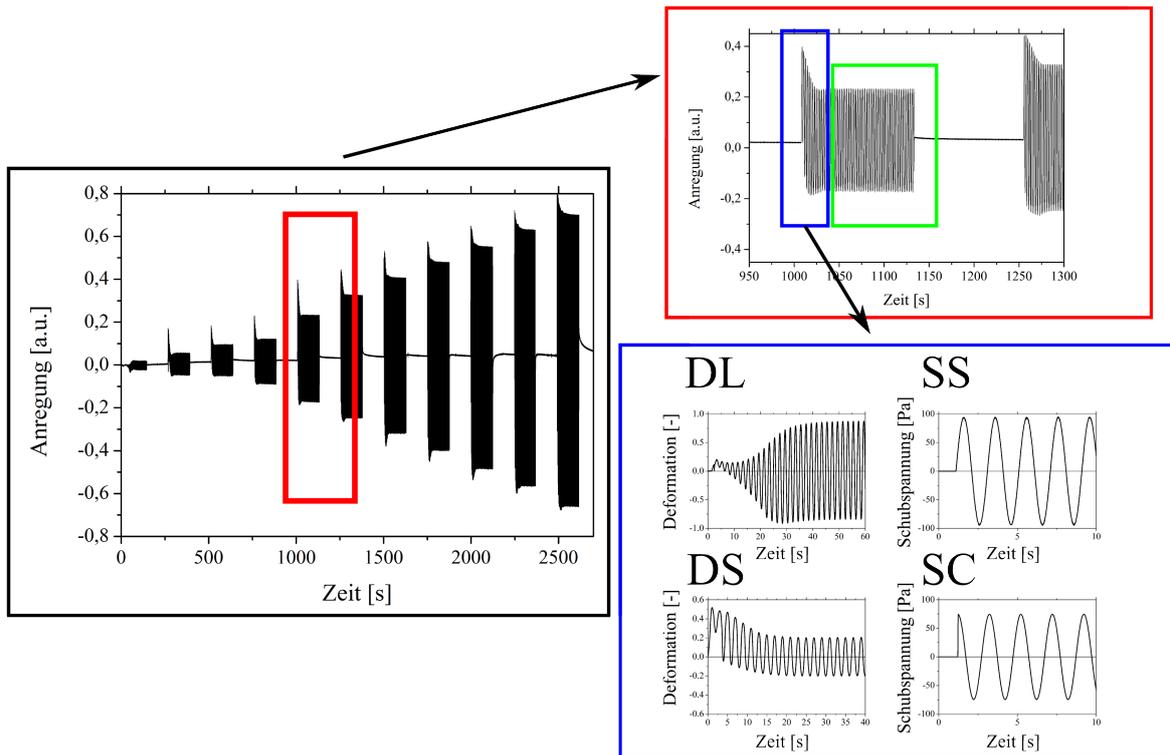


Abbildung 4.34.: Darstellung einer vollständigen Oszillationsmessung. Schwarze Box: Oszillatorische Anregung besteht aus der Aneinanderreihung mehrerer Oszillationsserien mit steigender Amplitude und Pausezyklen. Rote Box: Jeder Oszillationszyklus wird in die initialen Zyklen (blaue Box) und die stationären Oszillationen (grüne Box) unterteilt. Die Zellantwort stabilisiert sich während der initialen Zyklen und wird in den darauf folgenden Oszillationen stationär. Blaue Box: Die initialen Zyklen unterscheiden sich je nach Anregungsmodus. Es gibt langsame (DL) und schnelle (DS) Deformationsanregung, sinusförmige (SS) und cosinusförmige (SC) Schubspannungsanregung wie in Abschnitt 4.1.3 erläutert.

#### 4.4.1. Softening lebender Zellen ist abhängig von der Deformationshistorie

Um die Abhängigkeit der nichtlinearen Zellantwort von der Anregungsamplitude zu untersuchen wurden zunächst Messungen im langsamen Deformationsmodus DL (Siehe Abbildung 4.34) durchgeführt. Das Messprotokoll ist im Anhang in Tabelle A.2 gezeigt. Aus den Amplituden der Schubspannung  $\tau_0$  und der Deformation  $\gamma_0$  nach der Einregelphase kann der mittlere dynamische Schubmodul  $|G^*| = \frac{\langle \tau \rangle_0}{\langle \gamma \rangle_0}$  im stationären Zustand berechnet werden (Siehe Abschnitt 2.2.2.3). Abbildung 4.35 zeigt den dynamischen Schubmodul  $|G^*|$  als Funktion der Deformationsamplitude  $\gamma_0$ .  $|G^*|$  nimmt für alle fünf Monoschichten mit steigender Amplitude ab. Der Verlauf der Kurven unterscheidet sich von Monoschicht zu Monoschicht. Zwei Messungen (Abbildung 4.35 grün und rot) weichen besonders stark ab. Es stellt sich die Frage, woher die Streuung der Messungen kommt und vor allem was zu den zwei stark abweichenden Messungen führt. Bei gleicher Anregung könnten kleine Unterschiede in der Präparation ausschlaggebend sein.

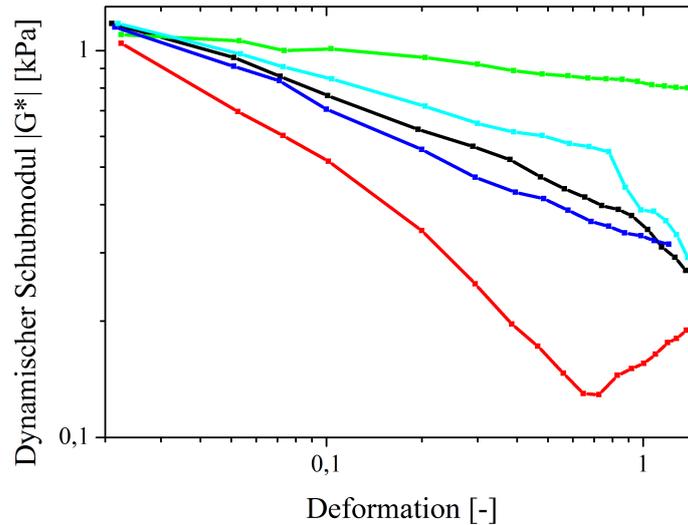


Abbildung 4.35.: Deformationsgesteuerte (DL) Oszillationen bei einer Frequenz von  $f=0,5$  Hz und stufenweise größer werdender Deformationsamplitude für fünf verschiedene Monoschichten (Farben). Aufgetragen ist der dynamische Schubmodul  $|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$  als Funktion der Deformationsamplitude. Die Schubmodule werden für alle Monoschichten mit steigender Deformation geringer, was einer verringerten Festigkeit der Zellen entspricht. Für eine Messung (rot) zeigt sich ein Anstieg der Schubmodule für große Deformationen. Die Abnahme der Schubmodule variiert zwischen den Monoschichten, trotz gleicher Anregungsart. Vor allem die Messungen grün und rot weichen deutlich ab.

Kritische Parameter sind die Kontaktierung der Zellen mit den Platten und die Einstellung der Normalkraft vor Beginn des Experiments, was durch das Anheben des Lifts erfolgt (Siehe Anhang A.1.3 und Abschnitt 3.2.2.3). Eine nicht ausreichende Kontaktierung der Zellen führt zu schwacher Adhäsion. Dies ist in keinem der Experimente der Fall, die Zellen haften bis zu sehr großen Deformationen. Es zeigen sich jedoch Unterschiede in der Normalkraft. Die Messung, welche eine sehr geringe Abnahme des Schubmoduls aufweist (Abbildung 4.35, grün), weist eine sukzessiv ansteigende Normalkraft  $F_N$  auf ( $\Delta F_N \approx 0,15$  N). In allen anderen Messungen nimmt die Normalkraft mit der Zeit ab ( $\Delta F_N \approx -0,05$  bis  $-0,2$  N). Dies könnte die unterschiedlichen nichtlinearen Antworten erklären.

Die Charakterisierung eines Materials mittels des Schubmoduls ist nur für das lineare Regime exakt definiert. Es existieren zahlreiche Auswertemethoden für nichtlineare Materialien (Siehe Abschnitt 2.2.3). Eine Möglichkeit ist die Auftragung der Schubspannung  $\tau(t)$  als Funktion der Deformation  $\gamma(t)$  in sogenannten Lissajous-Plots. Für lineare Systeme ergeben sich Ellipsen. Sobald ein Material nichtlinear reagiert treten Abweichungen von der elliptischen Form auf (Siehe Abschnitt 2.2.3.3) [91, 92]. Im Folgenden werden die Lissajous-Graphen für Messungen an Fibroblasten im langsamen Deformationsmodus DL vorgestellt.

Messungen an Zellen zeigen im langsamen Deformationsmodus DL für kleine Deformationsamplituden  $\gamma_0 < 0,1$  elliptische Lissajousplots und somit linear viskoelastisches Verhalten. Für  $\gamma_0 > 0,1$

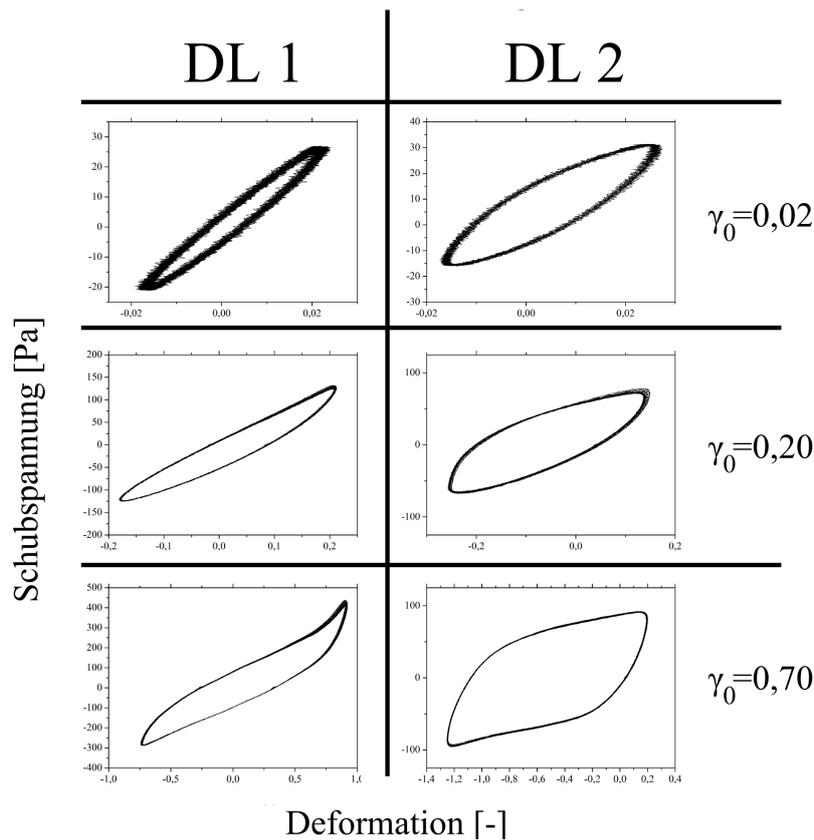


Abbildung 4.36.: Lissajous Kurven für zwei Monoschichten (links und rechts) im langsamen Deformationsmodus DL für jeweils drei Deformationsamplituden (von oben nach unten). Links findet sich der elastisch dominierte Fall, rechts der dissipativere, fluide Fall. Oben: Antwort für kleine Deformationsamplitude ( $\gamma_0=0,02$ ). Für beide Fälle erhält man eine Ellipse. Allerdings ist die umschlossene Fläche für die rechte Monoschicht größer, was einer größeren Dissipation entspricht. Mitte: Für Deformationsamplituden  $\gamma_0 = 0,2$  ergeben sich Abweichungen von der elliptischen Form. Unten: Für große Deformationen ( $\gamma_0 = 0,7$ ) sind stark ausgeprägte Nichtlinearitäten erkennbar. Die Lissajouskurven sehen trotz gleicher Anregung unterschiedlich aus. Es zeigt sich außerdem eine ausgeprägte Asymmetrie bezüglich des Mittelwerts der Deformation.

gibt es deutliche Abweichungen von der elliptischen Form, die ein Einsetzen von Nichtlinearitäten anzeigen (Abbildung 4.36, links). Die Zellantwort hängt, bei konstanter Anregungsfrequenz, nicht ausschließlich von der Amplitude der Anregung ab. Zellen können auf den gleichen Stimulus stark elastisch dominiert (Abbildung 4.36, links) oder dissipativ reagieren (Abbildung 4.36, rechts), was sich durch die Breite der Lissajous-Plots zeigt. Kleine eingeschlossene Flächen bedeuten kleine Dissipation, große Flächen eine große Dissipation. Die Unterschiede in der Dissipation zwischen den Messungen in Abbildung 4.36 zeigen sich vom Beginn der Messung an, was auf unterschiedliche Ausgangszustände der Monoschichten hindeutet. Während der Spalteinstellung bei der Messung, welche eine starke Dissipation aufweist (Abbildung 4.35, rot

## 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

---

und Abbildung 4.36, rechts), kam es zu einer sprunghaften Anhebung des Lifts, der den Spalt abrupt um  $4 \mu\text{m}$  vergrößerte. Dies führte zu einer sehr schnellen Streckung der Zellen, die für die dissipative Antwort sorgen könnte. In den anderen Messungen gab es nur Anhebungen mit Amplituden kleiner als  $1 \mu\text{m}$  oder Absenkungen. Absenkungen haben jedoch keinen Effekt auf die Zellen, da die Microbeads ein Verkleinern des Spalts und damit ein weiteres Quetschen der Zellen verhindern (Siehe Abschnitt 3.2.2.3). Die Ergebnisse in Abbildung 4.36 zeigen für große Deformationsamplituden eine ausgeprägte Asymmetrie bezüglich der Scherrichtung, auf die an späterer Stelle genauer eingegangen wird (Abschnitt 4.4.5).

### 4.4.1.1. Diskussion

Im linearen Regime ist der dynamische Schubmodul  $|G^*|$  unabhängig von der Anregungsamplitude (Siehe Abschnitt 2.2.2.3). Für 3T3 Fibroblasten existiert ein solches Regime für Deformationsamplituden  $\gamma_0 \geq 0,02$  nicht. Der Schubmodul  $|G^*|$  nimmt mit steigender Deformationsamplitude monoton ab, wie schon in [87, 108] gezeigt wurde. Zellen werden somit mit steigender Oszillationsamplitude weicher (*strain softening*). Dies deutet daraufhin, dass Zellen auch für kleine Deformationsamplituden nichtlineares Verhalten zeigen. Die Ausprägung der Abnahme des Schubmoduls ist von Monoschicht zu Monoschicht unterschiedlich, analog zu Messungen an Einzelzellen [108]. Für Einzelzellen könnten die Unterschiede durch die Zell-Zell Variabilität zustande kommen [108]. Hier werden jedoch Mittelwerte aus  $10^5 - 10^6$  Zellen bestimmt. Dies deutet auf eine nichtlineare Antwort hin, die sehr sensibel auf kleinste Abweichungen reagiert. Wird die Normalkraft, die auf Zellen wirkt im Laufe des Experiments größer, so ist die Abnahme des Schubmoduls sehr schwach ausgeprägt. Eine Kompression der Zellen ändert somit deren nichtlineare Antwort, was über den Mechanismus einer vorspannungsinduzierten (*prestress induced*) Versteifung geschehen könnte [108]. Ein Einfluss von Kompression auf die nichtlineare Mechanik wurde auch für Biopolymergele gezeigt [176]. Darüber hinaus zeigen Aktinegele eine Versteifung mit wachsender Kompression [177]. Somit könnte eine steigende Normalkraft zu einer Versteifung der Zellen führen [87], die der abnehmenden Steifigkeit durch die wachsende Oszillationsamplitude entgegenwirkt, so dass das *strain softening* abgeschwächt wird. Bei der Einstellung des finalen Spaltes während der Präparation einer Monoschicht kommt es in seltenen Fällen zu einem Sprung des Rheometerlifts, der zu einer instantanen Streckung der Zellen führen kann. Eine solche Streckung führt zu einer stark dissipativen Antwort der Zelle im nichtlinearen Regime. Es ist bekannt, dass Zellen sich durch eine Streckung mit hoher Geschwindigkeit verflüssigen [111, 112]. Die Zelle erholt sich von dieser Verflüssigung und wird innerhalb einiger Minuten wieder fester [111]. Der Verfestigung der Zellen wird in den hier durchgeführten Messungen durch die Oszillationen mit großer Amplitude entgegengewirkt. Der Einfluss einer Verflüssigung auf die nichtlineare Zellantwort wurde bisher nicht untersucht.

Die in diesem Abschnitt vorgestellten Messungen zeigen, dass die nichtlineare Zellantwort sehr

sensibel auf die genauen Messparameter reagiert. Dies stellt hohe Anforderungen an eine genaue und reproduzierbare Vorbereitung der Messungen. Vor allem die finale Einstellung des Messspaltes muss sehr sorgfältig vorgenommen werden. Um den Einfluss verschiedener Messparameter auf die Zellantwort genauer zu untersuchen, wurden Messungen mit verschiedenen Anregungsarten (Siehe Abschnitt 4.1.3) durchgeführt. Diese werden im folgenden Abschnitt vorgestellt und analysiert.

#### **4.4.2. Einfluss der Anregung auf die Zellantwort**

Messungen im langsamen Deformationsmodus zeigen, dass die nichtlineare Zellantwort stark von der Vorbehandlung der Zellen und dadurch vom Zellzustand zu Beginn der Messung abhängt. Semmrich et al. haben gezeigt, dass die nichtlineare Antwort verwobener Aktinseile (*entangled actin gels*) von dem verwendeten experimentellen Protokoll abhängt [101]. Daher soll im Folgenden der Einfluss der verschiedenen Anregungsarten (Siehe Abbildung 4.34 und Abschnitt 4.1.3) auf die nichtlineare Zellmechanik untersucht werden.

Es werden Oszillationsserien mit allen vorhandenen Anregungsarten bei einer Frequenz von 0,5 Hz durchgeführt. Um den Einfluss der initialen Zyklen (Abbildung 4.34) auf die stationären Oszillationen untersuchen zu können, werden die Maxima und Minima von Schubspannung und Deformation über die gesamten Oszillationsmessungen ermittelt.

Abbildung 4.37 zeigt die Schubspannungsamplituden als Funktion der Deformationsamplituden für Messungen in allen vier Messmodi. Es wurden alle Oszillationsperioden, inklusive der Einregelungen, aufgetragen. Für Deformationsamplituden  $\gamma_0 < 0,01$  strebt die Schubspannung asymptotisch gegen eine lineare Abhängigkeit  $\tau_0 \propto \gamma_0$ . Dies bedeutet, dass Zellen für sehr kleine Deformationsamplituden linear reagieren. In diesem Regime zeigt sich eine sehr geringe Abweichung zwischen unterschiedlichen Messungen, trotz unterschiedlicher Anregungsmodi. Wird  $\gamma_0 > 0,01$ , so weicht die Schubspannung vom linearen Verhalten ab und geht in das beobachtete *strain softening* über. Darüber hinaus wird die Streuung sehr groß, was die Sensibilität der nichtlinearen Antwort untermauert.

Um den Einfluss der Anregungen zu untersuchen, wurden die Schubspannungsamplituden als Funktion der Deformationsamplituden in Abbildung 4.38 nach Anregungen getrennt aufgetragen. Die deformationsgesteuerten Messungen (DL und DS) unterschieden sich vor allem durch das Vorhandensein der Einregelphase. Diese führt zu sichtbaren Hysteresesyklen, die umso ausgeprägter werden, je größer die Änderung der Schubspannungsamplitude zu Beginn eines Oszillationszyklus verglichen mit dem vorherigen Zyklus ist. Dies zeigt sich besonders deutlich an Messungen im schnellen Deformationsmodus DS. Durch den *overshoot* zu Beginn jedes Oszillationszyklus kann die maximale Schubspannungsänderung sehr groß werden. Dies führt zu sehr breiten Hysteresesyklen. Wird die Schubspannung langsam dem Maximalwert angenähert, so ist die Hysterese schmaler (Abbildung 4.38, unten links).

In schubspannungsgesteuerten Messungen fällt vor allem die Zunahme der Deformationsamplitude bei konstanter Schubspannungsamplitude auf. Dies deutet auf eine zyklische Abnahme der

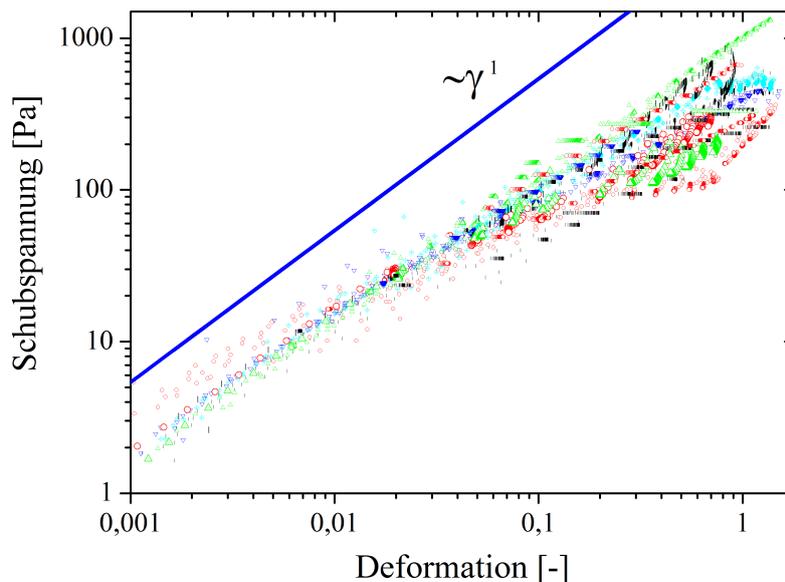


Abbildung 4.37.: Schubspannungsamplitude als Funktion der Deformationsamplitude für Messungen in allen vier Messmodi. Es sind alle Oszillationszyklen inklusive der Einregelungen berücksichtigt. Für kleine Deformationsamplituden ( $\gamma_0 < 0,01$ ) steigt die Schubspannung ungefähr linear mit der Deformation an, was ein lineares Regime für sehr kleine Oszillationsamplituden nahelegt. Die Abweichungen verschiedener Monoschichten sind in diesem Regime sehr gering, trotz unterschiedlicher Anregungen. Für größere Deformationen ( $\gamma_0 > 0,01$ ) erfolgt ein Übergang zu nichtlinearem Verhalten. Im nichtlinearen Regime wird die Abweichung verschiedener Messungen sehr groß.

Zellsteifigkeit hin (Abbildung 4.38, rechts).

Um diese Abnahme zu quantifizieren wird für jede Oszillationsperiode ein dynamischer Schubmodul  $|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$  berechnet. Die Schubspannungsamplitude  $\tau_0$  und die Deformationsamplitude  $\gamma_0$  berechnen sich als Mittelwert aus Maximum und Minimum einer Periode. Abbildung 4.39 zeigt den Schubmodul als Funktion der Zeit für Messungen mit allen vier Anregungsarten. Das Verhalten des Schubmoduls unterscheidet sich zwischen deformationsgesteuerten Messungen (DL und DS), die eine ausgeprägte Einregelphase aufweisen und schubspannungsgesteuerten Messungen (SS und SC). Während der Einregelphase nimmt der Schubmodul für langsame (DL) und schnelle (DS) Deformationssteuerung stark ab. Im DL-Modus nimmt die Deformationsamplitude langsam zu bis der eingestellte Wert erreicht wird. Im DS-Modus schießt die Deformationsamplitude über den eingestellten Wert hinaus und wird dann reduziert. Daher ist es bemerkenswert, dass sich die Schubmodule als Funktion der Zeit vergleichbar entwickeln. Zu Beginn eines Oszillationszyklus ist der Schubmodul größer als der stationäre Wert des vorangegangenen Zyklus. Dies deutet auf eine zumindest teilweise reversible Abnahme des Schubmoduls hin (Siehe Abschnitt 4.4.4). Schubspannungsgesteuerte Messungen zeigen eine Abnahme des Schubmoduls mit der Zeit. Diese Abnahme kann sehr ausgeprägt werden (Siehe Abbildung 4.39, blau) und zu einem Abreißen der

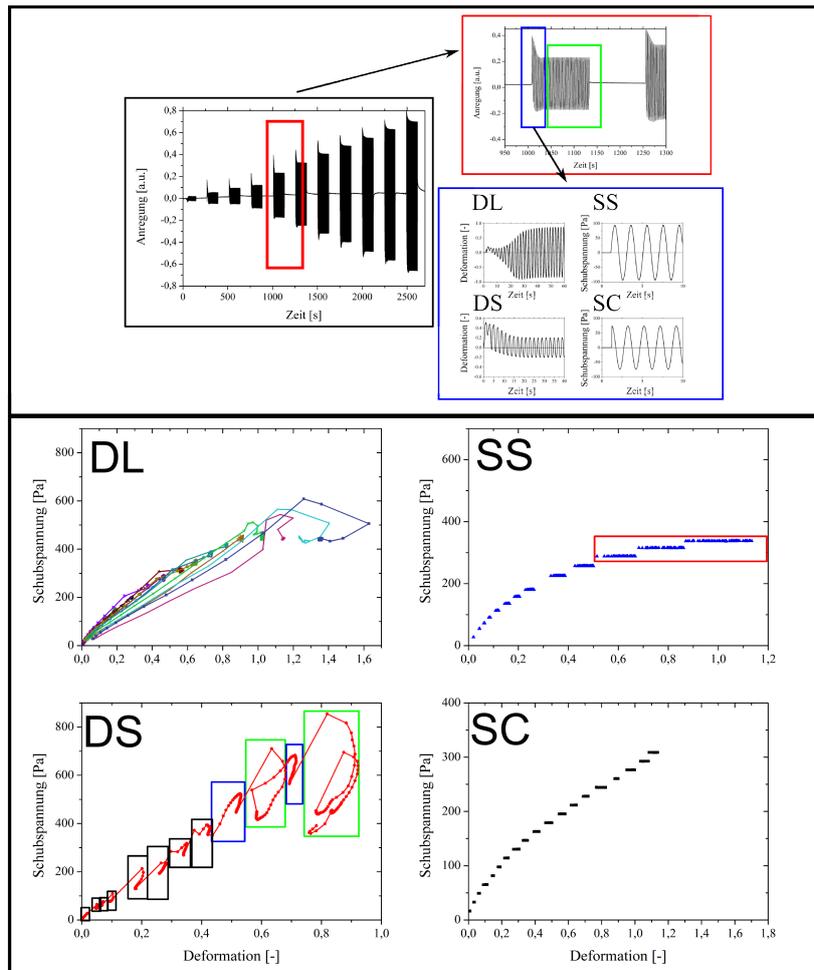


Abbildung 4.38.: Oben: Eine Darstellung der Anregung über eine gesamte Messung, während eines Oszillationszyklus und der vier Anregungsarten soll das Verständnis der unten gezeigten Graphen vereinfachen. Unten: Schubspannungsamplitude als Funktion der Deformationsamplitude getrennt nach den vier Messmodi für vollständige Oszillationsmessungen (inklusive der Einregelungszyklen). Für jeden Messmodus ist eine Oszillationsmessung an einer Monoschicht gezeigt. Im Falle der Messung im langsamen Deformationsmodus zeigen die Farben unterschiedliche Oszillationszyklen mit steigender Deformationsamplitude. Für schnelle Deformation sind die Oszillationszyklen durch Kästen getrennt. Für die Schubspannungsgesteuerten Messungen steht jede Schubspannungsamplitude für einen Oszillationszyklus. In deformationsgesteuerten Messungen (DL und DS) kommt es aufgrund der Einregelung zur Ausbildung von Hysteresezyklen. Die Breite der Hysterese wird dabei von der Größe der Schubspannungsänderung definiert. Je größer die Rate, umso ausgeprägter ist die Hysterese. Dies zeigt sich vor allem an Messungen im schnellen Deformationsmodus (DS, blaue Kästchen: Änderung der Schubspannung und schmale Hysterese, grüne Kästchen: große Schubspannungsänderung und breite Hysterese). Schubspannungsgesteuerte Messungen (SS und SC) zeigen trotz konstanter Schubspannungsamplituden eine sukzessive Zunahme der Deformation (sichtbar durch die Variation der Deformationswerte, rotes Kästchen).

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

Zellen führen. In solchen Messungen gibt es streng genommen keine stationären Oszillationen, in denen sowohl Anregung, als auch Antwort wirklich zeitlich stationär werden. Dies macht eine Auswertung schwierig und in einigen Fällen auch unmöglich.

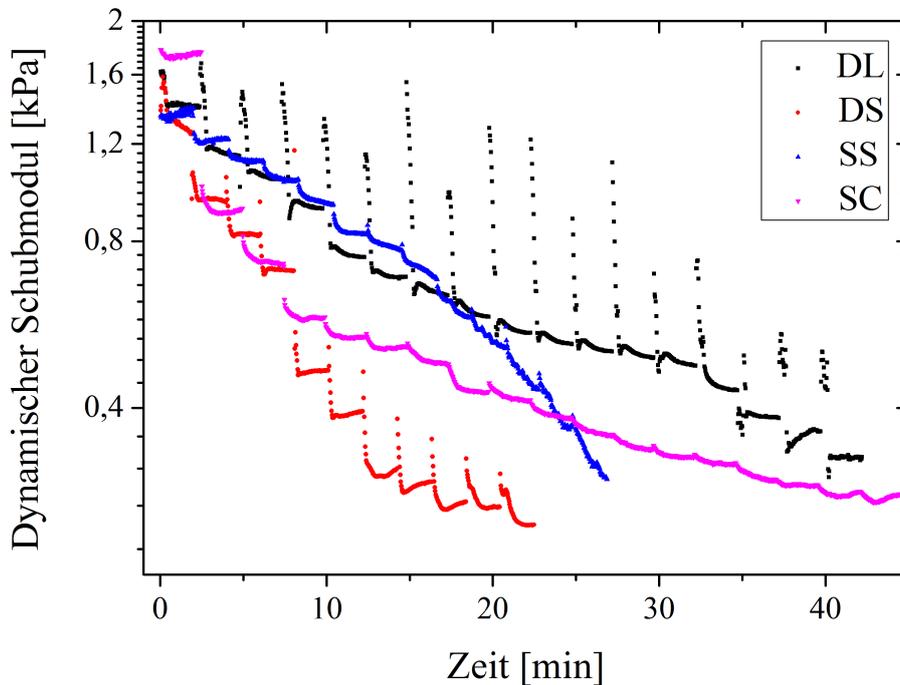


Abbildung 4.39.: Dynamischer Schubmodul als Funktion der Zeit für jeweils eine Messung aus allen vier Messmodi (schwarz: langsame Deformation DL, rot: schnelle Deformation DS, blau: Schubspannung sinus, magenta: Schubspannung cosinus). Man beachte, dass gleiche Zeiten bei unterschiedlichen Messungen nicht mit gleicher Anregungsamplitude gleichzusetzen sind. DL: In der Einregelphase nimmt der Schubmodul mit der Zeit ab, da die Deformationsamplitude mit der Zeit größer wird. In einigen Messungen kommt es zu einer Überschuss der Deformationsamplitude und einer darauffolgenden Reduktion auf den voreingestellten Wert. Dies führt zu einem kurzzeitigen Anstieg des Schubmoduls während der Einregelphase. Nach Beendigung der Einregelung nimmt der Schubmodul, trotz konstanter Deformationsamplitude, mit der Zeit ab und strebt gegen einen stationären Wert. Zu bemerken ist, dass der initiale Schubmodul zu Beginn eines neuen Oszillationszyklus größer ist als der stationäre Wert der vorherigen Messung. DS: In der Einregelphase zeigt sich ein analoges Bild zu Messungen im DL-Modus, obwohl hier die Deformationsamplitude zunächst überschießt und dann auf den eingestellten Wert verringert wird. Nach der Einregelphase kann es zur Abnahme oder zum Anstieg des Schubmoduls mit der Zeit kommen. SS+SC: Hier existiert keine Einregelphase. Es kommt zu einer Abnahme der Schubmodule mit der Zeit. Nur in wenigen Fällen kommt es zu einer leichten Zunahme des Schubmoduls mit der Zeit.

Im Folgenden soll die Amplitudenabhängigkeit des Schubmoduls für alle vier Messmodi untersucht

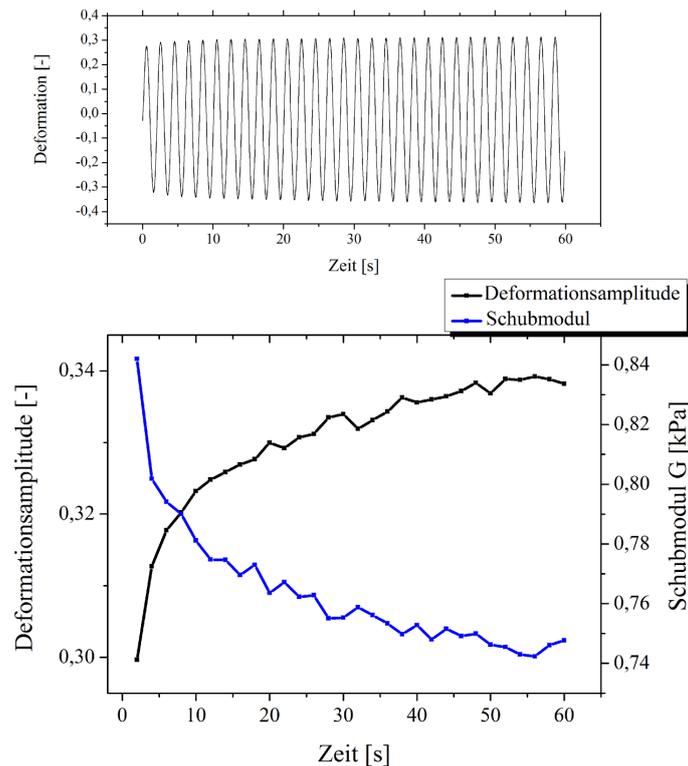


Abbildung 4.40.: Oszillationsserie bei  $f=0,5$  Hz und sinusförmiger Schubspannungssteuerung. Oben: Deformation als Funktion der Zeit. Die Amplitude steigt mit der Zeit an. Unten: Deformationsamplitude (schwarz) nimmt als Funktion der Zeit zu. Der Schubmodul (blau) nimmt mit der Zeit ab, was als *cyclic softening* [114] bezeichnet wird.

werden. Da die Abnahme des Schubmoduls in den ersten dreißig Sekunden der Messung besonders ausgeprägt ist (Siehe Abbildung 4.40), werden für die Analyse der stationären Werte die ersten dreißig Sekunden ausgespart.

Abbildung 4.41 zeigt die Schubmodule für Oszillationsmessungen mit allen vier Anregungsarten. In allen Fällen nehmen die stationären Schubmodule mit steigender Deformation ab. Bei einigen Messungen kommt es für große Deformationen zu einem Anstieg des Schubmoduls, der globale Trend des *softening* überwiegt jedoch. Wie zu erwarten war, zeigen sich sehr unterschiedliche Ausprägungen der Abnahme des Schubmoduls. Die Ausprägungen können anhand von Abbildung 4.41 jedoch nicht unmittelbar mit den Messmodi in Verbindung gebracht werden.

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Analyse von Lissajous-Plots Unterschiede in der nichtlinearen Zellantwort verdeutlichen kann (Siehe Abbildung 4.36). Abbildung 4.42 zeigt die Entwicklung der Lissajouskurven für steigende Anregungen für langsame Deformation DL, schnelle Deformation DS und Cosinusanregung SC. Die sinusförmige Schubspannungsanregung ist nicht gezeigt, da sich kein Unterschied zur langsamen Deformation ergibt.

In allen Fällen kommt es zu einem Übergang vom linearen zum nichtlinearen Regime bei einer De-

## 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

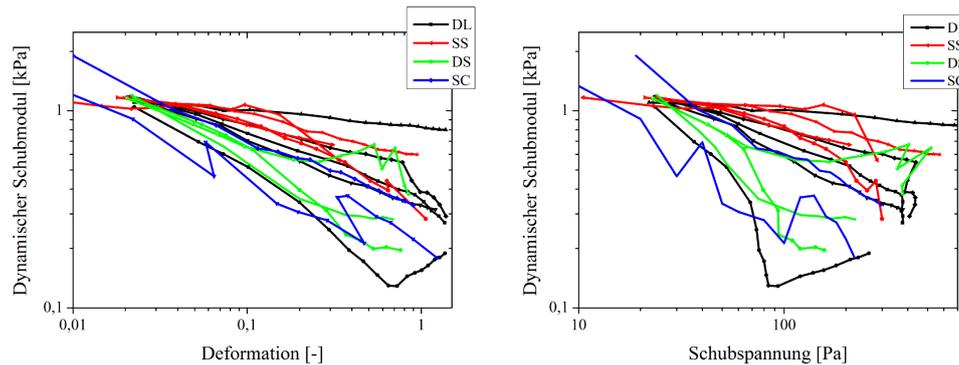


Abbildung 4.41.: Stationärer dynamischer Schubmodul  $|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$  als Funktion der Deformations- (links) und der Schubspannungsamplitude (rechts) für Oszillationsmessungen in allen vier Messmodi (schwarz: Langsame Deformation DL, rot: Schubspannung sinus SS, grün: Schnelle Deformation DS, blau: Schubspannung cosinus). Die Schubmodule werden für alle Anregungen mit steigender Deformation geringer, was einer verringerten Festigkeit der Zellen entspricht. Für einige Messungen zeigt sich ein Anstieg der Schubmodule für große Deformationen. Die Abnahme der Schubmodule variiert stark, sowohl zwischen verschiedenen Anregungen als auch innerhalb einer Anregungsart.

formationsamplitude von 0,05-0,1. Für kleinere Deformationamplituden zeigen 3T3 Fibroblasten eine linear viskoelastische Antwort. Die Art der nichtlinearen Antwort bei größeren Amplituden hängt jedoch von der Art der Anregung ab. Für schnelle Deformation DS wird die Steigung um den Mittelwert der Deformation sehr gering, die Nichtlinearitäten für große Deformationen erscheinen daher wesentlich ausgeprägter als für den Fall der langsamen Deformation DL. Am wenigsten ausgeprägt scheinen die Nichtlinearitäten für den Fall der cosinusförmigen Anregung SC zu sein. Hier wird die Dissipation jedoch sehr groß, was an der Breite der Lissajouskurven abzulesen ist. Die Zellen zeigen eine ausgeprägte Verflüssigung.

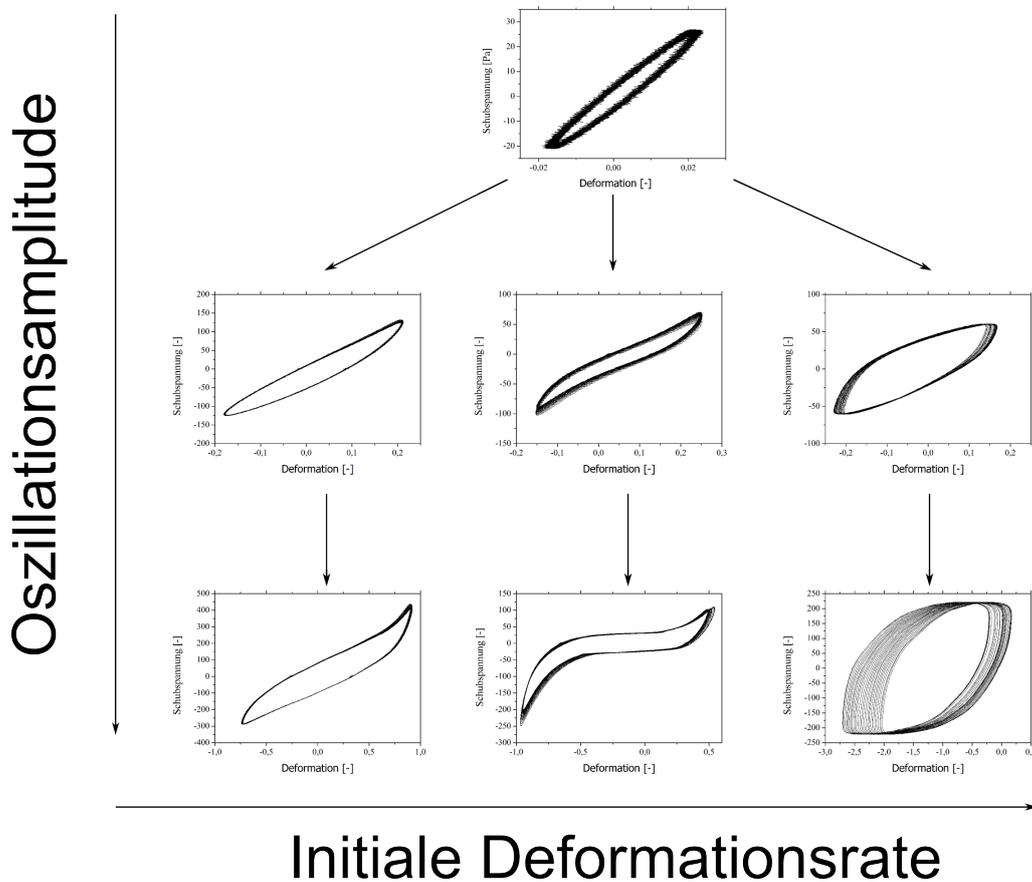


Abbildung 4.42.: Entwicklung der Lissajouskurven für steigende Oszillationsamplituden für den langsamen Deformationsmodus (links), den schnellen Deformationsmodus (Mitte) und die Cosinusanregung (rechts). Sinusförmige Schubspannungsanregung ist nicht dargestellt, da die Ergebnisse denen der langsamen Deformation entsprechen. Alle Messmodi zeigen einen Übergang von linearem zu nichtlinearem Verhalten. Es zeigen sich drei sehr unterschiedliche Antworten. Links: Nichtlinearitäten sind deutlich vorhanden. Die Dissipation bleibt gering. Mitte: Nichtlinearitäten sind wesentlich stärker ausgeprägt. Die Lissajouskurven haben für große Deformationen  $\gamma_0 = 0,7$  um den Mittelwert der Deformation eine sehr geringe Steigung. Die Zellen sind elastisch dominiert, die Dissipation ist gering. Rechts: Die Dissipation ist hier zu Beginn der Messung gering. Sie nimmt jedoch für größere Schubspannungsamplituden stark zu. Es zeigt sich also eine deutliche Verflüssigung aufgrund der hohen initialen Scherrate der Cosinusanregung. Alle Messungen bei größeren Amplituden zeigen eine Asymmetrie bezüglich der Scherrichtung.

### 4.4.2.1. Einfluss der initialen Scherrate und der initialen Zellsteifigkeit auf die nichtlineare Zellantwort

Die nichtlineare Zellantwort zeigt eine starke Abhängigkeit von äußeren Parametern, wie der exakten Präparation und der Anregung. Im Folgenden sollen die Einflussparameter untersucht werden, die zu einer Änderung der Zellantwort führen können.

Die Änderungen der Zellantwort können über die Änderungen des Schubmoduls mit der Anregungsamplitude quantifiziert werden. Als Referenz wird der initiale Schubmodul im linearen Regime, d.h. für sehr kleine Deformationsamplitude  $G_0 = G(\gamma_0 \rightarrow 0)$  verwendet. Eine lineare Auftragung der Schubmodule als Funktion der Deformation zeigt, dass sich die Schubmodule bei einer Deformation von 0,1-0,2 am meisten unterscheiden. Für sehr große Deformationen hingegen fallen die meisten Messungen in ein eher schmales Schubspannungsintervall von 200-400 Pa (Abbildung 4.43, Inset). Die Abnahme der Schubmodule  $\Delta G = G_0 - G_{0,1}$  wird mit Hilfe des linearen Schubmoduls  $G_0 = G(\gamma_0 \rightarrow 0)$  und des Schubmoduls bei einer Deformationsamplitude von 0,1  $G_{0,1} = G(\gamma_0 = 0,1)$  quantifiziert.

Die Anregungsart hat sich als wichtige Einflussgröße herausgestellt (Siehe Abbildung 4.36 und 4.42). Abbildung 4.43 zeigt  $\Delta G$  als Funktion der Anregungsart. Die Anregungen sind nach steigender maximaler Deformationsrate  $\dot{\gamma}_{max}$  geordnet. Für steigende maximale Deformationsrate zeigt sich eine tendenziell größer werdende Abnahme  $\Delta G$  der Schubmodule. Die Variation ist jedoch, auch bei gleicher maximaler Scherrate, sehr groß. Es sollte also noch weitere Einflussfaktoren geben.

Viele Arbeiten haben gezeigt, dass die nichtlineare Antwort lebender Zellen stark von den Anfangsbedingungen, wie der Vorspannung [108, 109], oder der initialen Fluidität [109, 149] abhängt. Je größer die Vorspannung ist, umso größer ist die Zellsteifigkeit für kleine Anregungen [106, 107]. Daher soll an dieser Stelle untersucht werden, inwiefern der Anfangszustand einer Monoschicht zur Abnahme des Schubmoduls beiträgt.

Es zeigt sich, dass der initiale Phasenwinkel  $\delta$  zu Beginn einer Messung keinen Einfluss auf das *softening* hat. Der initiale Zustand einer Monoschicht kann ebenfalls über den linearen Schubmodul  $G(\gamma_0 \rightarrow 0)$  quantifiziert werden. Abbildung 4.44 zeigt die Abnahme des Schubmoduls  $\Delta G = G_0 - G_{0,1}$  als Funktion des linearen Schubmoduls  $G_0$ . Je größer  $G_0$  ist, umso größer ist auch die Abnahme des Schubmoduls  $\Delta G$ .

### 4.4.2.2. Einfluss der Nullpunktverschiebung

In Abschnitt 4.1.3 wurde erläutert, dass es während einer Oszillationsmessung zu einer Verschiebung des Oszillationsnullpunkts kommen kann. Eine Oszillation erfolgt dann nicht mehr um  $\langle \gamma \rangle = 0$ , sondern man erhält  $\gamma = \langle \gamma \rangle + \gamma_0 \sin(\omega_0 t)$ . Der Einfluss dieser mittleren Deformation  $\langle \gamma \rangle$  auf die Nichtlinearitäten soll an dieser Stelle untersucht werden. Abbildung 4.45 zeigt die mittlere Deformation als Funktion der Deformationsamplitude für Messungen im langsamen

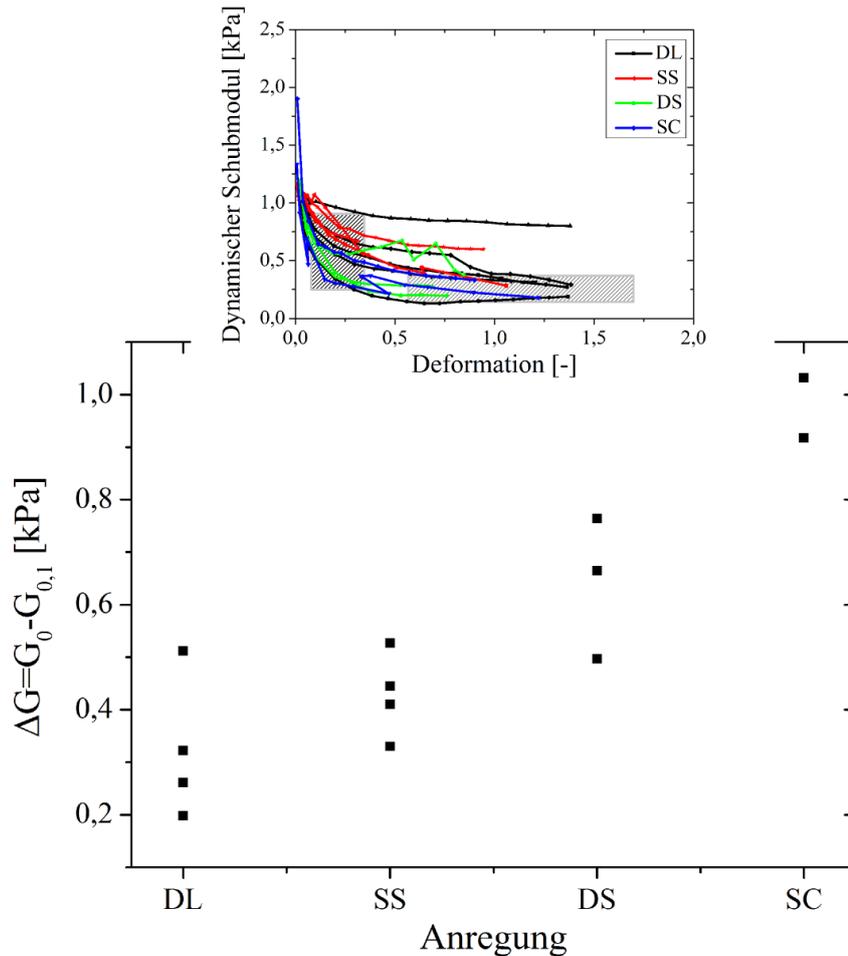


Abbildung 4.43.: Abnahme des Schubmoduls  $dG = G(\gamma \rightarrow 0) - G(\gamma = 0,1)$  in Abhängigkeit der Anregung (DL=langsame Deformation, SS=sinusförmige Schubspannung, DS=schnelle Deformation, SC=cosinusförmige Schubspannung). Die Anregungen sind nach steigender maximaler Scherrate geordnet. Es zeigt sich, dass die Abnahme mit steigender Deformationsrate zunimmt. Die Abnahmen der Schubmodule streuen jedoch auch stark innerhalb einer Anregung. Dies legt nahe, dass es noch andere Einflussgrößen gibt. Inset: Schubmodule als Funktion der Deformation nach Abbildung 4.41 in linearer Auftragung. Bei einer Deformation von 0,1-0,2 ist der Unterschied der Schubmodule am ausgeprägtesten. Für sehr große Deformationen fallen fast alle Messungen in ein kleines Schubmodulintervall von etwa 200-400 Pa.

Deformationsmodus. Ein Hinweis auf nichtlineares Zellverhalten ist der Abfall der Schubmodule mit steigender Deformationsamplitude. Dieser Abfall ist, wie auch die Intensität der Obertöne, ein Maß für die Nichtlinearität. Er variiert von Monoschicht zu Monoschicht (Siehe Abbildung 4.41). In allen Fällen findet eine harmonische Anregung statt. Unterschiede können nur vom Zustand der Zellmonoschicht, oder der Nullpunktverschiebung stammen. Die Schubmodule wurden nach

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

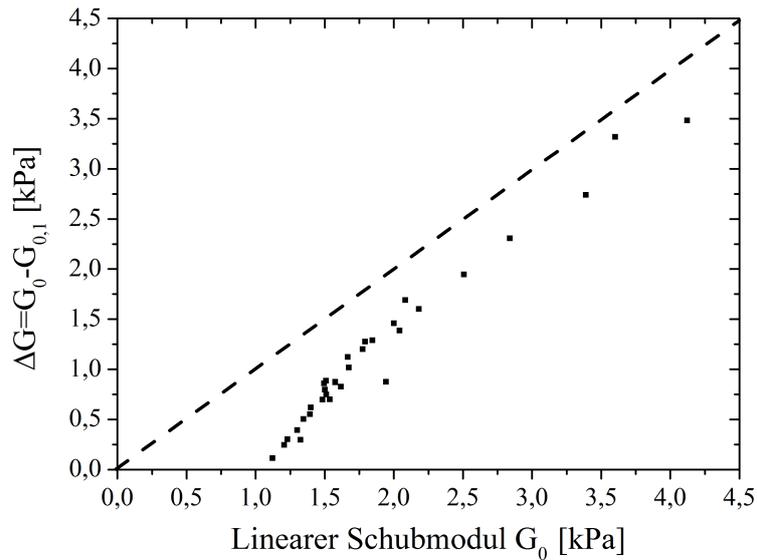


Abbildung 4.44.: Abnahme des Schubmoduls  $\Delta G = G_0 - G_{0,1}$ , wobei  $G_0 = G(\gamma_0 \rightarrow 0)$  der lineare Schubmodul und  $G_{0,1} = G(\gamma_0 = 0,1)$  der Schubmodul bei einer Deformationsamplitude von 0,1 ist, als Funktion des linearen Schubmoduls  $G_0$ . Je größer der lineare Schubmodul  $G_0$  wird, umso größer wird auch die Abnahme  $\Delta G$ . (Gestrichelte Linie:  $\Delta G = G_0$ ).

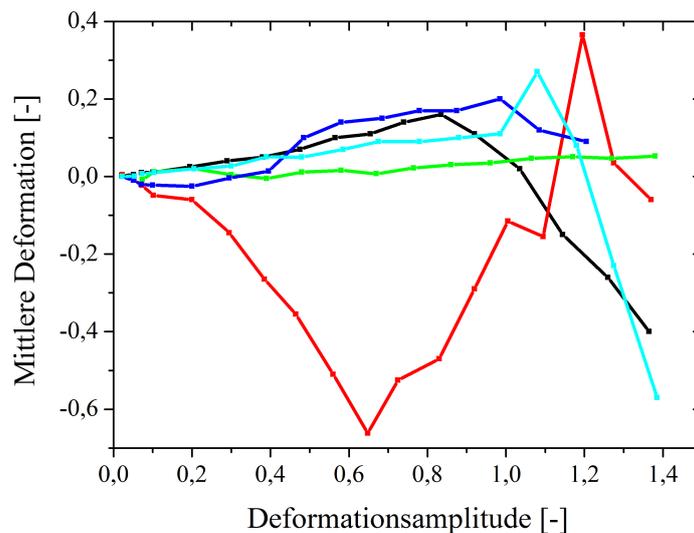


Abbildung 4.45.: Mittlere Deformation (Nullpunktverschiebung) als Funktion der Deformationsamplitude für Messungen im langsamen Deformationsmodus. Die mittlere Deformation nimmt zunächst monoton zu bis zur charakteristischen Deformation  $\gamma_0 \approx 0,6 - 0,8$ . Für größere Deformationsamplituden nimmt die mittlere Deformation wieder ab.

Deformationsamplitude aufgeteilt und als Funktion der Nullpunktverschiebung aufgetragen (Siehe Abbildung 4.46).

Es zeigt sich, dass der dynamische Schubmodul für eine feste Deformationsamplitude  $\gamma_0$  mit steigender mittlerer Deformation  $\langle \gamma \rangle$  abnimmt.

Eine weitere Möglichkeit den Einfluss der mittleren Deformation auf das Schubmodul zu untersuchen sind Langzeitexperimente, bei denen viele Oszillationen bei gleicher Deformationsamplitude durchgeführt werden. Durch die Relaxation am Ende jeder Oszillation findet eine sukzessive Verschiebung des Nullpunkts statt, deren Einfluss untersucht werden kann. Abbildung 4.47 zeigt den dynamischen Schubmodul als Funktion des Betrags der mittleren Deformation für die drei Deformationsamplituden  $\gamma_0=0,05$ ,  $\gamma_0=0,1$  und  $\gamma_0=0,15$ . Für  $\gamma_0=0,05$  zeigt sich im Rahmen der entstehenden Nullpunktverschiebung keine Änderung im Schubmodul. Für größere Deformationsamplituden findet ein Abfall des Schubmoduls oberhalb einer kritischen mittleren Deformation von  $\langle \gamma \rangle=0,03$  statt, der auch in 4.46 gezeigt wurde.

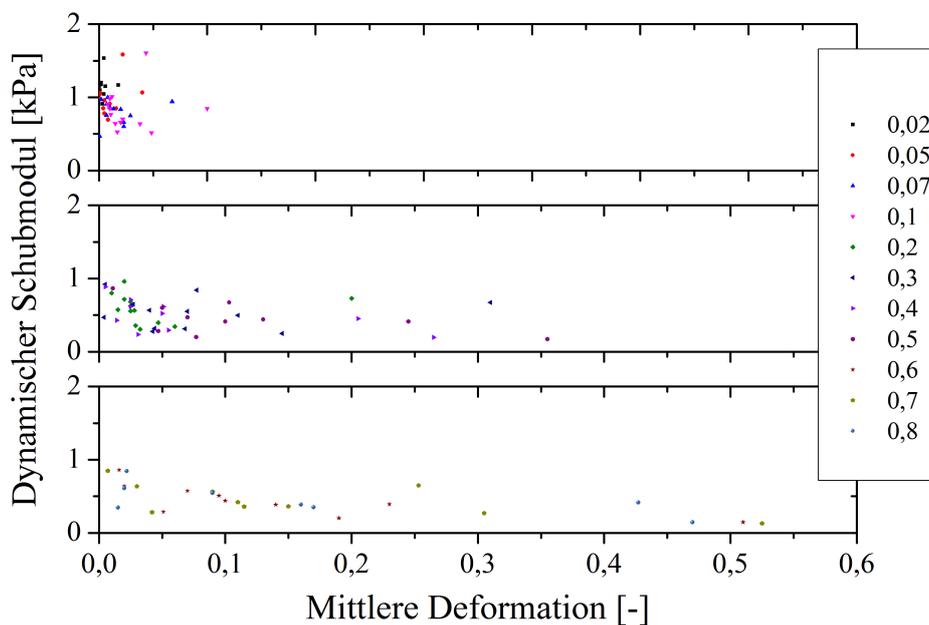


Abbildung 4.46.: Dynamischer Schubmodul  $|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$  als Funktion der mittleren Deformation (Nullpunktverschiebung) für Oszillationen aus Abbildung 4.41. Um die Lesbarkeit zu verbessern wurden die Ergebnisse auf drei Graphen aufgeteilt. Es zeigt sich, dass das Schubmodul für eine Deformationsamplitude (Legende) mit größer werdender mittlerer Deformation abnimmt.

#### 4.4.2.3. Diskussion

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die nichtlineare Antwort der Zellen auf oszillatorische Stimuli mit steigenden Amplituden und unterschiedlicher Anregungsart untersucht. Die Analyse erfolgte auf Grundlage der Deformations- und Schubspannungsamplituden und des dynamischen Schubmoduls.

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

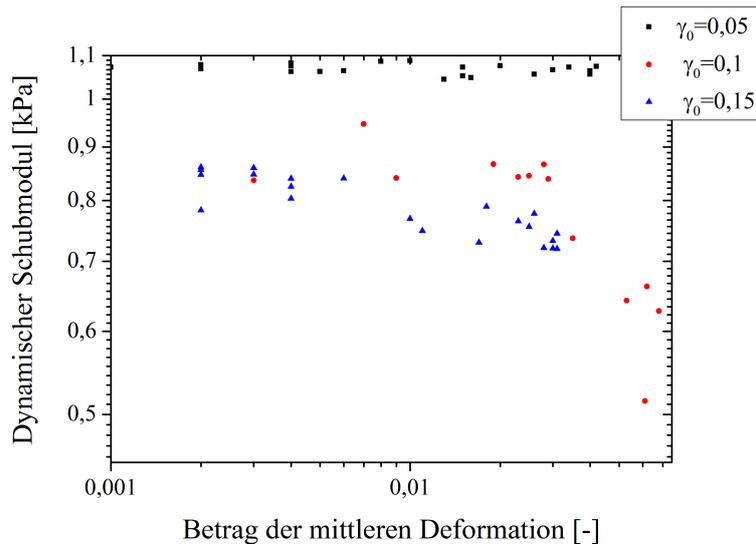


Abbildung 4.47.: Dynamischer Schubmodul  $|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$  als Funktion der mittleren Deformation (Nullpunktverschiebung) für Langzeitoszillationen mit den Deformationsamplituden  $\gamma_0=0,05$  (schwarz),  $\gamma_0=0,1$  (rot) und  $\gamma_0=0,15$  (blau). Es zeigt sich, dass der Schubmodul für  $\gamma_0=0,05$  im entstehenden Bereich der Nullpunktverschiebung konstant bleibt. Für Deformationsamplituden größer als  $\gamma_0=0,05$  fällt der Schubmodul oberhalb einer kritischen mittleren Deformation von  $\langle \gamma \rangle = 0,03$  ab. Dieses Ergebnis untermauert die Ergebnisse aus Abbildung 4.46.

Der Übergang von linearem zu nichtlinearem Verhalten erfolgt für Fibroblasten bei einer Deformation von  $\approx 0,01$ , was einer Scherung von  $s=150$  nm entspricht. Im linearen Regime zeigt sich eine sehr geringe Streuung zwischen verschiedenen Monoschichten. Im nichtlinearen Regime wird diese Streuung jedoch sehr ausgeprägt. Dies stützt die Hypothese, dass die nichtlineare Antwort lebender Zellen stark von der Präparation und der genauen Form der Anregung abhängt. Der geringe Wert der Übergangsdeformation erscheint auf den ersten Blick überraschend, stimmt jedoch gut mit Ergebnissen von Fabry et al überein [142], die zeigen, dass Zellen bis zu einer Scherung von etwa 200 nm linear reagieren. Auch Messungen an mit  $\alpha$ -Actinin vernetzten Aktinellen zeigen einen Übergang zu nichtlinearer Antwort (*strain hardening*) bei einer Deformation von etwa 0,01 [178].

Der Schubmodul berechnet sich aus den Amplituden der Schubspannung und der Deformation für jede Oszillationsserie. Somit werden die sogenannten interzyklischen Nichtlinearitäten beschrieben [98, 179, 180]. Der Schubmodul ist für kleine Anregungsamplituden zeitlich konstant. Oberhalb einer kritischen Amplitude, die hier nicht näher untersucht wurde, findet zunächst eine exponentielle Abnahme der Schubmodule mit der Zeit statt, bevor nach etwa 30 Sekunden ein stationärer Zustand erreicht wird. Im deformationsgesteuerten Modus äußert sich der abnehmende Schubmodul in einer mit der Zeit geringer werdenden Schubspannungsamplitude. In schubspannungsgesteuerten Messungen nimmt die Deformationsamplitude mit der Zeit zu. Dies führt dazu, dass in vielen schubspannungsgesteuerten Messungen keine großen, zeitlich konstanten Deformationsamplitu-

den erreicht werden können. Die Deformationsamplitude nimmt in diesem Anregungsregime stark mit der Zeit zu und es kommt zu einem Ablösen der Zellen von den Platten. Darüber hinaus kann in diesem Regime kein stationärer Schubmodul berechnet werden, da kein stationäres Regime existiert.

Eine Abnahme des Schubmoduls mit der Zeit findet sich ebenfalls für vernetzte Aktingele [114, 181]. Sie kann durch eine Anpassung der Netzwerkstruktur aufgrund der Vernetzerdynamik und einer passiven Stressrelaxation erklärt werden [114, 181]. In [182] wurde gezeigt, dass im Falle von Fibrin- und Kollagengelen die sukzessive Abnahme der Steifigkeit durch eine plastische Verlängerung einzelner Fasern hervorgerufen wird. Eine plastische Verformung lebender Zellen und speziell eine Zunahme der Ruhelänge aufgrund mechanischer Stimuli wurden in [57] beschrieben. Diese könnten durch die beschriebenen Mechanismen der Stressrelaxation durch Filamentgleiten und der Vernetzerdynamik hervorgerufen werden. Eine Änderung der Ruhelänge könnte auch aufgrund von Aktinpolymerisation stattfinden. Um die notwendige Polymerisation für die in Abbildung 4.40 gezeigte Abnahme (von 0,84 kPa auf 0,74 kPa in 60 Sekunden (es ergibt sich ein Verhältnis von  $0,84/0,74 \approx 0,88$ )) abzuschätzen wird die Zelle im Folgenden vereinfachend als wurmartige Kette mit einer Konturlänge von  $20 \mu m$  angenommen. Des Weiteren wird vereinfachend angenommen, dass die maximale Deformation konstant ist und die Kraft variiert. Die einheitenlose Kraft für eine wurmartige Kette ist dann  $\frac{F \cdot L_p}{k_B T} \approx \frac{1}{4(1-\frac{z}{L_0})^2} - \frac{1}{4} + \frac{z}{L_0}$  [183], wobei  $L_p$  die Persistenzlänge,  $k_B T$  die thermische Energie,  $L_0$  die Konturlänge der Kette und  $z$  die Streckung ist. Um ein Verhältnis der Kräfte und damit der Module von 0,88 zu erreichen müsste die wurmartige Kette und damit die Zelle auf der Zeitskala von etwa einer Minute um  $\approx 3-4 \mu m$  länger werden. Lehto et al. geben die Polymerisationsgeschwindigkeit in HELA Zell-extrakten bei Raumtemperatur mit  $0,09 \frac{\mu m}{min}$  an [184]. Wird dieser Wert zugrunde gelegt, so wäre eine maximale Verlängerung von etwa  $0,1 \mu m$  möglich, was einen Faktor 30 zu wenig wäre. Es wären somit Polymerisationsgeschwindigkeiten von  $3-4 \frac{\mu m}{min}$  notwendig, die in motilen Zellen bei  $37^\circ C$  durchaus vorkommen können. Bei den für diese Arbeit vorgenommenen Messungen bei Raumtemperatur sollte die Dynamik verlangsamt sein, so dass eine Abnahme der Schubmodule rein auf Grundlage der Aktinpolymerisation unwahrscheinlich ist. Jung et al. zeigen auf Grundlage eines theoretischen Modells, dass eine zeitliche Abnahme des Schubmoduls eines vernetzten Aktingels durch die sukzessive Zerstörung von komprimierten Aktinfilamenten (*severing of buckling filaments*) hervorgerufen werden kann [185].

Der stationäre Schubmodul (ohne Berücksichtigung der initialen Zyklen) nimmt mit steigender Anregungsamplitude, Schubspannung oder Deformation, ab, wie bereits in [87, 108] für kleine Amplituden ( $<10\%$ ) gezeigt wurde. Dies bedeutet, dass die Zellen weicher werden. Nur in seltenen Fällen zeigt sich ein Anstieg des Schubmoduls für sehr große Deformationen. Die monotone Abnahme des Schubmoduls lebender Zellen mit steigender Oszillationsamplitude ist unerwartet. Ähnliche Messungen an Biopolymerelementen zeigen für alle Filamenttypen (Aktin, Vimentin, Collagen) eine Zunahme des Schubmoduls (*strain stiffening*) oberhalb einer kritischen Deformation [100]. Es existieren auch Arbeiten, die eine Abnahme der Steifigkeit speziell von vernetzten Ak-

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

---

tingelen zeigen [186]. Darüber hinaus zeigen viele experimentelle Ergebnisse einen Übergang von einer Zunahme zu einer Abnahme der Steifigkeit, so dass beide Mechanismen, *softening* und *hardening*, abhängig von der Anregungsamplitude auftreten [178, 187]. Die grundlegenden Mechanismen sind trotz intensiver experimenteller und theoretischer Anstrengungen immer noch nicht vollständig verstanden, da speziell im Bereich der nichtlinearen Antwort die Abhängigkeit von der Netzwerkstruktur und der Art der Anregung die Analyse der Messungen und das Verständnis der zugrundeliegenden Dynamik erschweren [101, 105].

Die hier beobachtete Abnahme der Schubmodule variiert von Monoschicht zu Monoschicht, obwohl die Anregungen im stationären Bereich vergleichbar sind. Die Unterschiede lassen auf den Einfluss weiterer Parameter, neben Frequenz und Amplitude der stationären Oszillation, schließen. Es zeigt sich, dass die Anregungsart, im speziellen die initialen Zyklen mit unterschiedlichen maximalen Deformationsraten, eine wichtige Rolle spielt. Je größer die maximale Deformationsrate ist, umso ausgeprägter ist die Abnahme des Schubmoduls. Ein Einfluss der Deformationsrate auf die nichtlineare Mechanik ist auch für Aktinringe gezeigt worden. Je größer die Scherrate ist, umso ausgeprägter ist die Nichtlinearität in Form der Versteifung eines vernetzten Aktinrings [105]. Des Weiteren beeinflusst der initiale Schubmodul (Schubmodul für verschwindende Anregungsamplitude) die nichtlineare Zellantwort. Je größer der initiale Schubmodul ist, umso größer ist die Abnahme mit wachsender Anregungsamplitude. Der initiale Schubmodul entspricht dabei der Steifigkeit der Zelle im linearen Regime. Diese Steifigkeit hängt vom Vernetzungsgrad des Zytoskeletts [102] und von der mechanischen Vorspannung (*prestress*) [106, 108, 109] ab. Je größer der Vernetzungsgrad bzw. die Vorspannung sind, umso steifer ist die Zelle. Dies bedeutet aber auch, dass die Zelle mehr Steifigkeit *verlieren* kann. Gavara et al. haben gezeigt, dass durch mechanische Belastung die Dissipation der Vorspannung mit der initialen Vorspannung anwächst [113]. Analoges kann für den Vernetzungsgrad angenommen werden. Je mehr Vernetzer vorhanden sind, umso mehr können durch mechanische Stimuli abgelöst werden.

Für kleine Amplituden ( $\gamma < 0,1$ ) kann die Abnahme des Schubmoduls durch transiente Stressrelaxation, hervorgerufen durch passive Filamentumordnung oder Vernetzungsdynamik [186], erklärt werden. Diese Prozesse sind stark Ratenabhängigkeit, was für den Fall von vernetzten Aktinringen gezeigt wurde [172, 173]. Entscheidende Parameter in Aktinringen sind die Filamentstruktur und die Zeitskalen der Vernetzerdynamik [172, 173]. Je größer die Scherrate ist, umso ausgeprägter ist die Versteifung eines vernetzten Aktinrings [105].

Für Amplituden größer als 0,1 könnte die Abnahme des Schubmoduls durch eine Veränderung der Zytoskelettstruktur erfolgen. Eine solche Veränderung wiederum kann durch eine Zerstörung von Filamenten und Vernetzungsstrukturen, aber auch durch Umordnungsprozesse zustande kommen [59, 111, 112, 148, 166, 188].

Die Ergebnisse zeigen, dass die Schubmodule eine maximale Abweichung bei einer Deformation von 0,1-0,2 aufweisen. Für sehr große Deformationen strebt die überwiegende Zahl der Schubmodule in ein Schubspannungsintervall von 200-400 Pa. Eine mögliche Erklärung ist, dass bei sehr großen Deformationen ( $\gamma_0 > 0,3 - 0,5$ ) Teile der Zytoskelettstruktur zerstört wurden. Es wurde gezeigt, dass der F-Aktin Gehalt einer Zelle durch eine große Streckung abnimmt, was

zu einer Verflüssigung führt [111]. Außerdem ist bekannt, dass die verschiedenen Bestandteile des Zytoskeletts unterschiedliche maximale Streckungen tolerieren können [189]. Mikrotubuli und Aktin brechen weit vor Intermediärfilamenten wie Vimentin. Der sehr einheitliche Schubmodul könnte somit bedeuten, dass polarisierte Strukturen des Aktin- und Mikrotubulizytoskeletts, die für die stark unterschiedlichen Zellantworten verantwortlich sind, zerstört wurden und das Intermediärfilamentnetzwerk die mechanischen Eigenschaften bestimmt [189].

Der Deformationsnullpunkt kann sich innerhalb einer Messung verschieben. Wird die Nullpunktverschiebung größer als etwa  $\gamma=0,03$ , bei einer Deformationsamplitude größer als  $\gamma_0=0,02$ , so nimmt der Schubmodul mit wachsender Nullpunktverschiebung ab. Dieses Ergebnis ist zunächst unerwartet, da eine mittlere Deformation zu einer größeren, langsam relaxierenden Vorspannung der Zellen führen sollte [108, 110]. Es wurde vielfach gezeigt, dass mit größer werdender Vorspannung die Steifigkeit und damit auch der Schubmodul einer Zelle zunimmt [106, 107, 108, 109]. Ein Großteil der Nullpunktverschiebung ist jedoch passiv, in dem Sinne, dass keine assoziierte mittlere Schubspannung zur Aufrechterhaltung benötigt wird. Sie entsteht durch unvollständige Relaxation und plastische Verformung der Zellen. Es handelt sich also um einen neuen kräftefreien stationären Zustand. Die Versteifung der Zellen ist jedoch längenunabhängig, sie ist ausschließlich von der mittleren Kraft oder Vorspannung abhängig [57, 108, 110]. Eine Änderung der Nulllage ohne mittlere Schubspannung sollte also keine Versteifung bewirken. In deformationsgesteuerten Messungen kommt es jedoch häufig zu Anregungen, die eine mittlere Schubspannung  $\tau_m$  beinhalten. Diese Schubspannung ist jedoch meistens sehr gering  $\tau_m < 100$  Pa. In [108] wurde gezeigt, dass eine vorspannungsinduzierte Versteifung erst für Spannungen größer als etwa 70-100 Pa stattfindet. Somit sind die hier vorkommenden Vorspannungen im allgemeinen zu klein, um eine Versteifung zu induzieren. Dies wird durch die Ergebnisse aus [87] bestätigt, die zeigen, dass eine Versteifung erst ab einer mittleren Deformation von 1 auftritt. Diese Werte werden in den vorliegenden Messungen kaum erreicht. Die nullpunktabhängige Abnahme des Schubmoduls kann durch eine Schwächung der Zytoskelettstruktur durch die größer werdende Zelllänge während der plastischen Deformation erklärt werden. In [111, 112, 113] wurde gezeigt, dass eine Streckung der Zelle zu einer vergrößerten inneren Spannung führt und damit auch zu einer größeren Steifigkeit. Wird die Streckung jedoch rückgängig gemacht (wie dies in den hier vorgenommenen oszillatorischen Messungen periodisch geschieht), so fällt die Steifigkeit auf einen Wert, der kleiner als die ursprüngliche Steifigkeit ist, ab. Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch unklar. In [113] wird eine inelastische Reorganisation des Zytoskeletts vorgeschlagen. Eine solche Reorganisation wäre sehr gut im Einklang mit der Dynamik der nichtlinearen Zellantwort, wie sie in den vorherigen Abschnitten vorgestellt wurde und auch an späterer Stelle noch diskutiert wird.

Zusammenfassend liefert die Auswertung der Messdaten anhand der Schubmodule viele Hinweise auf eine nichtlineare Zellantwort, die von inelastischen Prozessen dominiert werden. Diese Prozesse können durch Filament- und Vernetzerdynamiken getrieben werden. Die Zelle scheint auf große Stimuli mit einer adaptiven Anpassung der Netzwerkstruktur zu reagieren. Diese Hypothese soll im Folgenden weiter untersucht werden.

### 4.4.3. Intrazyklische Nichtlinearität ist abhängig von der Art der Anregung

Bisher wurden zur quantitativen Auswertung die Amplituden der Deformation  $\gamma_0$  und der Schubspannung  $\tau_0$  und der daraus berechnete dynamische Schubmodul  $|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$  verwendet. Der zeitliche Verlauf der Signale wurde nur qualitativ anhand der Form der Lissajous-Kurven dargestellt. Die Lissajouskurven zeigen, neben des interzyklischen *softenings*, auch eine intrazyklische Nichtlinearität (innerhalb einer Oszillationsperiode) (Abschnitt 4.4.2, Abbildung 4.42). Diese Art der Auftragung liefert jedoch nur qualitative Ergebnisse.

Ewoldt et al. haben eine Methode zur Analyse von nichtlinearem Materialverhalten auf der Basis der Lissajouskurven eingeführt [96]. Die Module für große  $G_L$  und kleine  $G_s$  Deformation und der Nichtlinearitätsindex  $L = \frac{G_L}{G_s}$  (Siehe 2.2.3.3 und Abbildung 4.49) können zur Quantifizierung der Nichtlinearitäten verwendet werden. Aufgrund der Nullpunktverschiebung innerhalb der oszillatorischen Messungen (Abschnitt 4.1.5) mussten die Berechnungen, die in Abschnitt 2.2.3.3 vorgestellt wurden, angepasst werden. Für deformationgesteuerte Messungen ergibt sich

$$G_s = \frac{\partial \tau}{\partial \gamma_{\gamma = \langle \gamma \rangle}} \quad (4.25)$$

$$G_L = \frac{\tau}{\gamma_{\gamma = \gamma_0}} \quad (4.26)$$

und für schubspannungsgesteuerte Messungen

$$G_s = \frac{\partial \tau}{\partial \gamma_{\gamma = \langle \gamma \rangle}} \quad (4.27)$$

$$G_L = \frac{\tau}{\gamma_{\tau = \tau_0}} \quad (4.28)$$

$\gamma_0$  und  $\tau_0$  sind die Deformations- und Schubspannungsamplituden,  $\langle \gamma \rangle$  ist die mittlere Deformation. Der Modul für kleine Deformationen  $G_s$  wird hier nicht für  $\gamma=0$ , sondern für  $\gamma = \langle \gamma \rangle$  berechnet. Zunächst werden nur die stationären Oszillationen betrachtet, die initialen Zyklen werden ausgespart.

Beide Module  $G_s$  und  $G_L$  nehmen, analog zum dynamischen Schubmodul  $|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$  (Abschnitt 4.41), mit steigender Anregungsamplitude ab. Die Abnahmen von  $G_L$  und  $G_s$  sind jedoch nicht gleich (Siehe Anhang Abbildung A.1). Dies kann mit Hilfe des Nichtlinearitätsindex  $L = \frac{G_L}{G_s}$  quantifiziert werden (Siehe Abschnitt 2.2.3.3). Ein Nichtlinearitätsindex von eins bedeutet, dass Zellen linear reagieren.  $L > 1$  bedeutet eine Versteifung,  $L < 1$  eine abnehmende Steifigkeit.

Abbildung 4.48 zeigt die Nichtlinearitätsindizes  $L$  für die Messungen aus Abbildung A.1. Für Messungen im langsamen Deformationsmodus DL (Abbildung 4.48, oben links) bleibt  $L$  für kleine Deformationsamplituden  $\gamma_0 < 0.1$  konstant gleich eins und nimmt für größere Deformationen bis zu einem Maximum bei  $\gamma_0 = 0,6-0,8$  zu um danach wieder geringer zu werden. Die Werte von  $L$  sind immer kleiner als  $L=2$ . Für Messungen mit sinusförmiger Schubspannung SS ergibt sich ein ähnliches Bild. Für kleine Schubspannungsamplituden  $\tau_0 < 100$  Pa bleibt  $L \approx 1$ . Für große-

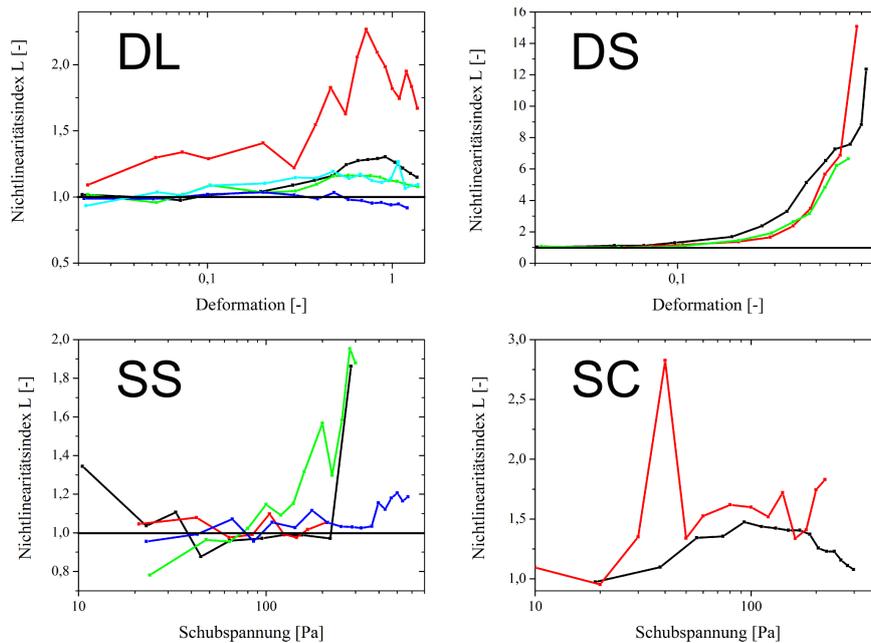


Abbildung 4.48.: Nichtlinearitätsindex  $L$  als Funktion der Anregungsamplitude. Oben links: Langsame Deformation DL.  $L$  nimmt zunächst ausgehend von  $L \approx 1$  mit der Deformationsamplitude bis zu einem Maximum zu und nimmt dann wieder ab. Die Werte des Index sind dabei immer kleiner als  $L=2$ . Für eine Messung (dunkelblau) wird  $L < 1$ . Oben rechts: Schnelle Deformation DS. Für Deformationsamplitude  $\gamma_0 < 0,1$  bleibt  $L$  konstant gleich eins. Für größere Deformationen steigt der Index sehr stark an. Die Maximalwerte liegen bei  $L=6-15$ . Unten links: Schubspannung sinus. Für Schubspannungsamplituden  $\tau_0 < 100\text{Pa}$  ist  $L \approx 1$ . Für größere Schubspannungen steigt  $L$  leicht an, wobei  $L < 2$  bleibt. Unten rechts: Schubspannung cosinus.  $L$  steigt bis zu einem Maximum von  $L \approx 1,5$  bei einer Schubspannungsamplitude von  $\tau_0 = 100\text{Pa}$  an und fällt für größere Schubspannungen wieder ab.

re  $\tau_0$  erfolgt ein leichter Anstieg bis zum Abreißen der Zellen. Messungen mit cosinusförmiger Schubspannung ergeben einen Index, der zunächst mit wachsender Schubspannungsamplitude bis zu einem Maximum bei  $\tau_0 \approx 100\text{Pa}$  anwächst, und anschließend wieder abnimmt.  $L$  ist ebenfalls immer kleiner als  $L=2$ . Für Messungen mit schneller Deformation DL ist  $L \approx 1$  für Deformationen  $\gamma_0 < 0,1$ . Danach erfolgt ein Anstieg bis zum Abreißen der Zellen. Der Index erreicht Werte bis  $L=15$ , also fast eine Größenordnung größer, als für die anderen Messmodi. Eine Betrachtung der Lissajous Graphen (Siehe Abbildung 4.49) zeigt, dass dies von der starken Abnahme von  $G_s$  im Falle der schnellen Deformation herrührt. Das Verhalten von  $G_L$  ist für alle Messungen analog.

Die verallgemeinerten Module greifen nur zwei Punkte einer Oszillationsperiode auf. In der nicht-linearen Analyse von Zellen und Biopolymergelen kommen häufig auch differentielle Module

$$g = \frac{\partial \tau}{\partial \gamma} \quad (4.29)$$

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

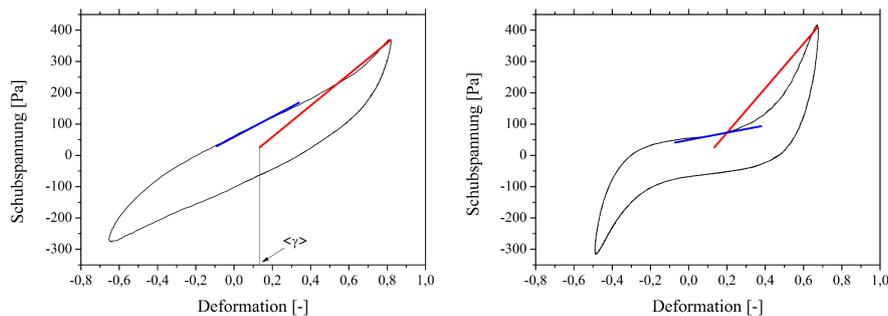


Abbildung 4.49.: Schubspannung als Funktion der Deformation. Die Steigungen der roten und blauen Linien ergeben  $G_L$  bzw.  $G_s$ . Links: Messung im langsamen Deformationsmodus DL.  $G_L$  und  $G_s$  unterscheiden sich nur geringfügig, was sich in einem Nichtlinearitätsindex nahe eins äußert. Rechts: Messung im schnellen Deformationsmodus DS.  $G_s$  wird sehr klein, was sich in einem großen Nichtlinearitätsindex äußert.

zum Einsatz. Diese können verwendet werden, um die Lissajousgraphen genauer zu analysieren. Beachtet werden muss jedoch, dass die differentiellen Module nicht die gesamte Lissajousfigur beschreiben können, da eine Divergenz  $g \rightarrow \infty$  für  $\gamma \rightarrow \gamma_{max}$  existiert. Daher wird hier nur  $g(\gamma=0)$  bis  $g(\gamma \rightarrow \gamma_{max,-})$  für die positive Oszillationsrichtung (oberer Ast der Lissajousfigur) und  $g(\gamma=0)$  bis  $g(\gamma \rightarrow -\gamma_{max,+})$  für die negative Oszillationsrichtung (unterer Ast der Lissajousfigur) betrachtet. Die Indizes + und - bedeuten dabei eine Annäherung an das Maximum von größeren bzw. von kleineren Deformationswerten.

Abbildung 4.50 zeigt eine Messung aus langsamen (DL) und schnellen (DS) Deformationsmodus, Abbildung 4.51 Messungen aus sinusförmigem (SS) sowie aus cosinusförmigem Schubspannungsmodus (SC). Für alle Anregungsamplituden und alle Messmodi ist der differentielle Modul für Deformationen  $\gamma < 0,1$  konstant  $g(\gamma < 0,1) = C$ . C entspricht dabei dem verallgemeinerten Modul für kleine Deformationen  $G_s$ . C nimmt, analog zu  $G_s$  mit steigender Anregungsamplitude ab. Dies ist Ausdruck der interzyklischen Abnahme der Zellsteifigkeit. Auch die Ausprägung der Abnahme von C ist abhängig vom Messmodus ist. Die Abnahme wird ausgeprägter mit steigender maximaler Scherrate in den initialen Zyklen. Sie ist am wenigsten ausgeprägt für sinusförmige Schubspannung, gefolgt von langsamer und schneller Deformation und ist am ausgeprägtesten für cosinusförmige Schubspannung. Das Verhalten ist somit analog zur Abnahme des Schubmoduls  $\Delta G$  (Siehe Abschnitt 4.4.2.1).

Für Deformationen größer als 0,1 zeigen sich, abhängig von der Art der Anregung, zwei unterschiedliche Verhaltensweisen. Im langsamen DL und schnellen DS Deformationsmodus, sowie bei sinusförmiger Schubspannung SS erfolgt eine Zunahme des differentiellen Moduls für  $\gamma > 0,1$ , was einer Zunahme der intrazyklischen Zellsteifigkeit entspricht (*strain stiffening*). Im Falle cosinusförmiger Schubspannungsanregung ist keine Zunahme des differentiellen Moduls zu finden. Es gibt somit keine intrazyklische Verfestigung.

Für langsame Deformation DL und sinusförmige Schubspannung SS nimmt der differentielle Mo-

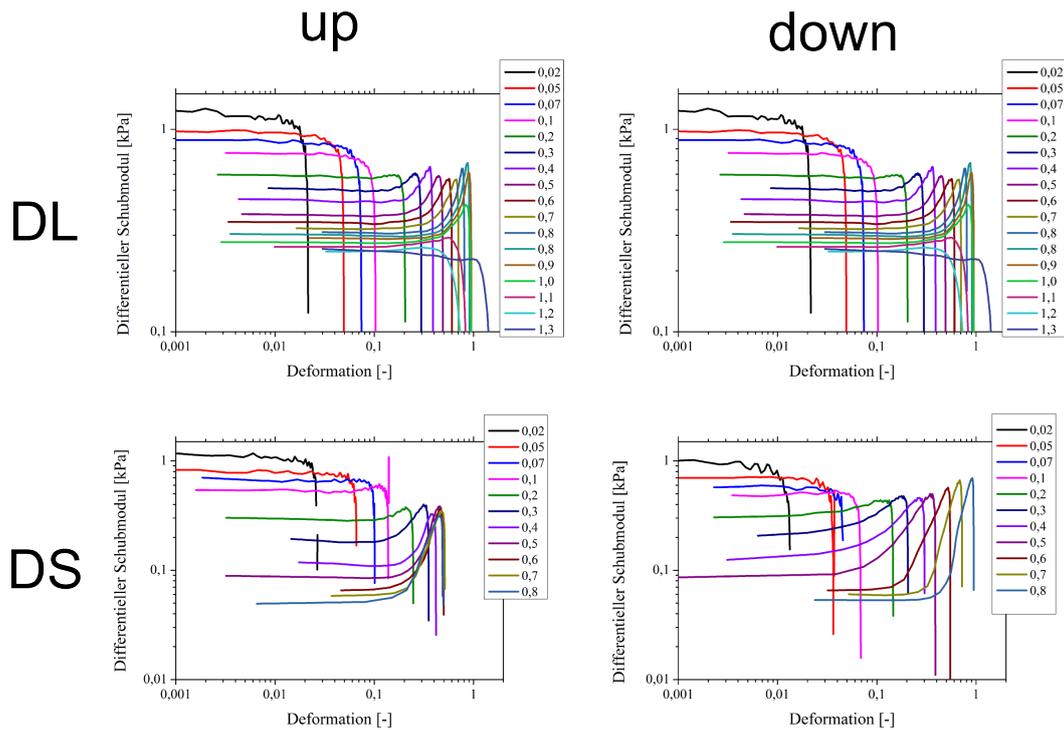


Abbildung 4.50.: Oszillationsmessungen bei einer Frequenz von 0,5 Hz und steigender Amplitude für langsame (oben) und schnelle (unten) Deformation. Gezeigt sind die differentiellen Module  $g$  als Funktion der Deformation für steigende Deformationsamplituden (Legende) für ansteigende Deformation ( $\gamma$  von 0 bis  $\gamma_0$ , links) und für abnehmende Deformation ( $\gamma$  von 0 bis  $-\gamma_0$ , rechts) (hier wird der Betrag der Deformation aufgetragen, um eine logarithmische Auftragung und einfache Vergleichbarkeit zu ermöglichen). Oben: Für Deformationen  $\gamma < 0,1$  ist das differentielle Modul für alle Deformationsamplituden konstant  $g=C(\gamma_0)$ .  $C$  nimmt mit steigender Anregungsamplitude ab. Für Deformationsamplituden  $\gamma_0 > 0,1$  steigt das differentielle Modul an, sobald die Deformation auf den Maximalwert zustrebt. Dies bedeutet, dass die Zellen innerhalb einer Oszillationsperiode fester werden. Der Maximalwert des differentiellen Moduls liegt für die Messungen, die eine Verfestigung aufweisen bei  $\approx 600$  Pa. Diese Verfestigung geht für sehr große Amplituden  $\gamma_0 > 1$  wieder verloren. Es zeigt sich auch hier eine Asymmetrie zwischen ansteigender (links) und absteigender (rechts) Deformation. Unten: Für die schnelle Deformation zeigt sich ein ähnliches Verhalten wie für langsame Deformation. Der Unterschied ist, dass die differentiellen Module für kleine Deformationen  $\gamma < 0,1$  ( $g=C(\gamma_0)$ ) mit steigender Amplitude stärker abfallen. Dadurch tritt die intrazyklische Verfestigung wesentlich deutlicher hervor. Der Maximalwert, den der differentielle Modul annimmt ist für die Oszillationsrichtungen unterschiedlich groß. Für die positive Richtung ergibt sich  $g_{max,+} \approx 400$  Pa, für die negative Richtung  $g_{max,-} \approx 600-700$  Pa.

dul Maximalwerte von etwa 600-700 Pa an, die für maximale Deformationen kleiner 1 unabhängig von der Anregungsamplitude sind. Im schnellen Deformationsmodus DS sind die Maximalwerte in positiver und negativer Richtung unterschiedlich ( $g_+ \approx 400$  Pa  $g_- \approx 600-700$  Pa). Während

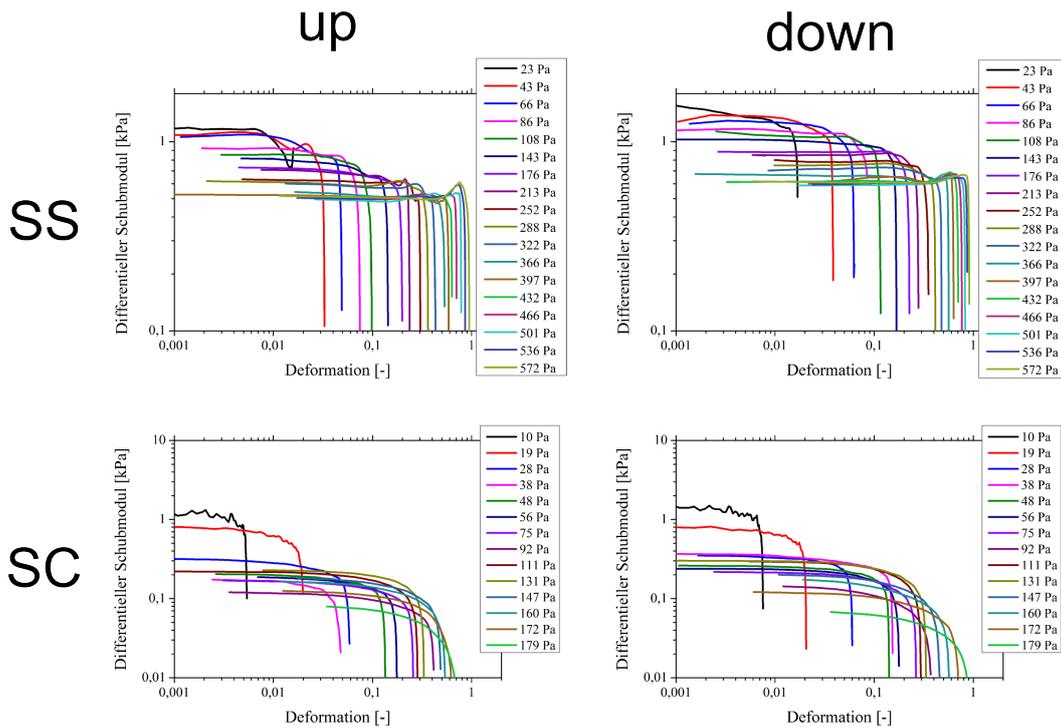


Abbildung 4.51.: Oszillationsmessungen bei einer Frequenz von 0,5 Hz und steigender Amplitude für sinusförmige (oben) und cosinusförmige (unten) Schubspannung. Gezeigt sind die differentiellen Module  $g$  als Funktion der Deformation für steigende Deformationsamplituden (Legende) für ansteigende Deformation ( $\gamma$  von 0 bis  $\gamma_0$ , links) und für abnehmende Deformation ( $\gamma$  von 0 bis  $-\gamma_0$ , rechts) (hier wird der Betrag der Deformation aufgetragen, um eine logarithmische Auftragung und einfache Vergleichbarkeit zu ermöglichen).. Oben: Für Deformationen  $\gamma < 0,1$  ist das differentielle Modul für alle Deformationsamplituden konstant  $g=C(\gamma_0)$ .  $C$  nimmt weniger stark ab als im deformationsgesteuerten Modus. Für Deformationsamplituden  $\gamma_0 > 0,1$  steigt das differentielle Modul ähnlich zu den deformationsgesteuerten Ergebnissen aus Abbildung 4.50 an, sobald die Deformation auf den Maximalwert zustrebt. Es zeigt sich somit ebenfalls eine intrazyklische Verfestigung, die jedoch wesentlich weniger ausgeprägt erscheint als im deformationsgesteuerten Fall. Der Maximalwert des differentiellen Moduls liegt für die Messungen, die eine Verfestigung aufweisen jedoch ebenfalls bei  $\approx 600-700$  Pa. Es zeigt sich auch hier eine Asymmetrie zwischen ansteigender (links) und absteigender (rechts) Deformation. Unten: Für den cosinusförmigen Schubspannungsmodus zeigt sich kein Anstieg des differentiellen Moduls und somit keine intrazyklische Versteifung.

$g(\gamma < 0,1)=C$  stetig mit steigender Anregungsamplitude abnimmt, so ist das Maximum des differentiellen Moduls für  $\gamma > 0,1$  unabhängig von der Anregungsamplitude.

Die Deformation, bei der die Zunahme des differentiellen Moduls und damit die intrazyklische Verfestigung einsetzt wird als kritische Deformation  $\gamma_c$  bezeichnet (Siehe Abbildung 4.52, oben). Die kritische Deformation  $\gamma_c$  nimmt mit steigender Anregungsamplitude zu (Siehe Abbildung 4.52

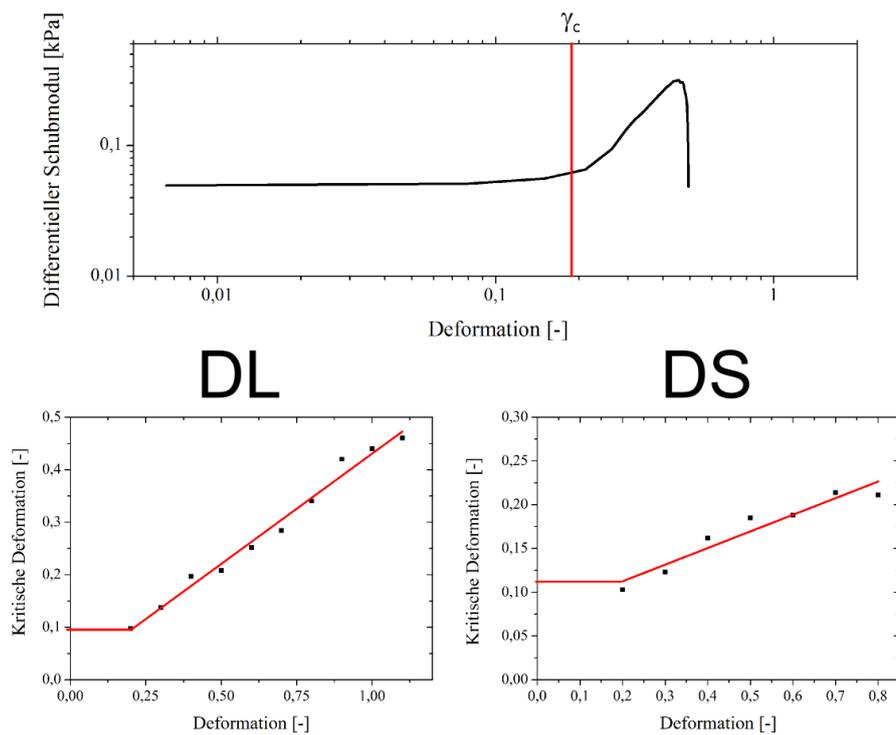


Abbildung 4.52.: Oben: Differentieller Schubmodul als Funktion der Deformation für ein Experiment im schnellen Deformationsmodus (DS). Rote Linie markiert den Übergang zu intrazyklischer Versteifung bei der kritischen Deformation  $\gamma_c$ . Unten links: Kritische Deformation als Funktion der Deformationsamplitude für langsame Deformationsanregung (DL). Eine Versteifung tritt für Deformationen größer als 0,1 auf.  $\gamma_c$  steigt, beginnend bei  $\gamma_c=0,1$  linear mit der Amplitude  $\gamma_0$  an. Die Steigung beträgt  $\frac{d\gamma_c}{d\gamma_0}=0,42$ . Unten rechts: Kritische Deformation als Funktion der Deformationsamplitude für schnelle Deformationsanregung (DS). Eine Versteifung tritt für Deformationen größer als 0,1 auf.  $\gamma_c$  steigt ebenfalls beginnend bei  $\gamma_c=0,1$  linear mit der Amplitude  $\gamma_0$  an. Die Steigung beträgt  $\frac{d\gamma_c}{d\gamma_0}=0,19$ .

für DS und DL). Die Verfestigung setzt bei immer größeren Deformationen ein, je größer die Deformationsamplitude  $\gamma_0$  ist. Der Übergang beginnt in beiden Fällen bei  $\gamma_c \approx 0,1$ . Die Steigungen  $\frac{d\gamma_c}{d\gamma_0}$  unterscheiden sich jedoch. Im Falle der langsamen Deformation DL nimmt  $\gamma_c$  stärker zu als bei schneller Deformation DS. Für den Fall sinusförmiger Schubspannung erfolgt ebenfalls eine Zunahme von  $\gamma_c$ . Diese folgt jedoch keiner eindeutigen Beziehung.

In allen Messungen zeigt sich eine Asymmetrie der differentiellen Module in Bezug auf die Scherrichtung. Die auftretende Versteifung ist für positive und negative Scherrichtung unterschiedlich ausgeprägt. Diese Asymmetrie wird an späterer Stelle genauer betrachtet und quantifiziert (Abschnitt 4.4.5)

### 4.4.3.1. Diskussion

Im vorangegangenen Abschnitt wurden die Nichtlinearitäten, die innerhalb einer Oszillationsperiode auftreten untersucht. Dazu wurden differentielle und verallgemeinerte Module verwendet. Diese zeigen, dass es neben der interzyklischen Abnahme der Zellsteifigkeit auch eine intrazyklische Zunahme der Steifigkeit geben kann. Diese Zunahme ist abhängig von der Anregungsart. Somit zeigen Zellen eine gleichzeitige Abnahme der interzyklischen und eine Zunahme der intrazyklischen Steifigkeit, je nach Art der Anregung.

Für lineare Materialien gilt, dass die Module für kleine ( $G_s$ ) und große ( $G_L$ ) Deformationen gleich sind. Der aus den verallgemeinerten Modulen bestimmte Nichtlinearitätsindex  $L = \frac{G_L}{G_s}$  ist in diesem Regime somit  $L=1$ . Dies ist für Zellen nur für kleine Stimuli  $\gamma_0 < 0,1$  bzw.  $\tau_0 < 100$  Pa gegeben. Oberhalb einer kritischen Amplitude wird  $L$  für alle Anregungen größer als  $L=1$ , was eine intrazyklische Versteifung der Zellen bedeutet. Für sehr große Stimuli  $\gamma_0 > 1$  nimmt  $L$  wiederum ab. Am stärksten ausgeprägt ist die Versteifung für schnelle Deformationsanregung. Für alle anderen Anregungen ist das Maximum von  $L$  ungefähr gleich groß. Ein analoges Verhalten des Nichtlinearitätsindex wurde auch für verwobene (*entangled*) Aktinengele [101] und für Kollagengele beschrieben. Im Falle des Aktinengels koexistieren ebenfalls eine interzyklische Abnahme des Schubmoduls und eine intrazyklische Zunahme der Steifigkeit [101]. Kollagengele wiederum zeigen eine nichtmonotone Abhängigkeit des Schubmoduls von der Anregungsamplitude [179] mit einer Zunahme des Schubmoduls für mittlere Deformationsamplituden.

Auch die differentiellen Module zeigen eine intrazyklische Versteifung für langsame und schnelle Deformation und für sinusförmige Schubspannung. Für Deformationen kleiner als eine kritische Deformation  $\gamma < \gamma_c$  ist der differentielle Modul innerhalb einer Oszillationsperiode, also intrazyklisch, konstant (Siehe Abbildung 4.52). Die intrazyklische Verfestigung zeigt sich durch einen Anstieg der differentiellen Module oberhalb von  $\gamma_c$ . Die Maximalwerte, die die differentiellen Module im nichtlinearen Regime annehmen sind unabhängig von der Anregungsamplitude, aber abhängig von der maximalen Scherrate. Je größer die Scherrate, umso kleiner ist der maximale Modul. Die kritische Deformation, bei der eine Versteifung einsetzt, vergrößert sich mit wachsender Anregungsamplitude, abhängig von der Art der Anregung. Für sehr große Raten im cosinusförmigen Schubspannungsmodus verschwindet die Zunahme des Moduls sogar vollständig und damit die intrazyklische Versteifung im Gegensatz zur Auswertung mit verallgemeinerten Modulen. Für alle Anregungsarten nimmt der Wert des differentiellen Moduls  $g(\gamma < \gamma_c)$  mit steigender Anregungsamplitude, also interzyklisch, ab, was ein Ausdruck der interzyklischen Abnahme der Zellsteifigkeit ist.

Ein analoges Verhalten lässt sich auch für vernetzte Aktinengele finden [12, 102, 103, 114]. Eine intrazyklische Versteifung kann durch entropische oder enthalpische Streckung [190, 191, 192] und auch durch Biegungen [108] von Netzwerksstrukturen, bestehend aus Filamenten und Vernetzern, verursacht werden. Die genauen Mechanismen sind jedoch noch nicht verstanden. Lieleg et al. zeigen, dass sich für mit Fascin vernetzte Aktinengele ein differentieller Modul ergibt, der oberhalb einer kritischen Deformation  $\gamma_c$  ansteigt. Die kritische Deformation ist dabei umgekehrt proportio-

nal zu einem Parameter  $R$ , der das Verhältnis aus Fascin-Konzentration und Aktinkonzentration beschreibt [102]. Je größer die Vernetzerkonzentration ist, umso größer wird die Steifigkeit für kleine Anregungen und umso geringer wird auch die kritische Deformation. Dies bedeutet, dass eine mit der Deformationsamplitude geringer werdende Vernetzeranzahl die Abnahme des differentiellen Moduls für kleine Deformationen und die Verschiebung der kritischen Deformationen erklären kann. Auch eine erhöhte Scherrate führt zu einer ausgeprägteren Versteifung [105], was zumindest teilweise mit den hier gezeigten Ergebnissen übereinstimmt ( $L=2$  für langsame Deformation, gegenüber  $L=15$  für schnelle Deformation). Heussinger et al. haben auf theoretischer Basis gezeigt, dass die Abnahme der Vernetzerkonzentration zu einer Abnahme des Schubmoduls führen kann [104]. Dalhaimer et al. haben auf Basis der Theorie der Flüssigkristalle gezeigt, dass die relativen Konzentrationen von Filamenten und Vernetzern eine wesentliche Rolle für die mechanischen Eigenschaften von Zellen spielen können [193]. Darüber hinaus wurde dort gezeigt, dass die mittlere Ausrichtung der Filamente (der nematische Ordnungsparameter) entscheidend für die mechanische Zellantwort sein kann. In vielen Arbeiten wurde gezeigt, dass sich die Ausrichtung von Aktinfilamenten aufgrund mechanischer Stimuli ändern kann, wobei die Änderungen ratenabhängig sind [59, 166, 188]. Eine Kombination aus Vernetzer- und Filamentdynamik kann somit die Ratenabhängigkeit der intrazyklischen Nichtlinearitäten erklären.

Das Verschwinden des Anstiegs des differentiellen Moduls bei sehr hohen Scherraten in cosinusförmiger Schubspannungsanregung kann durch eine Abnahme der Vernetzerkonzentration und eine Abnahme der mittleren Filamentlänge erklärt werden. Es wurde gezeigt, dass die Länge von Filamenten einen Einfluss auf die intrazyklische Verfestigung hat. Je länger die Filament, umso ausgeprägter ist die Versteifung [105]. Durch eine hohe Scherrate kann es in Zellen zu einer Zerstörung von Aktinfilamenten kommen [148]. Dies betrifft vor allem längere Filamente, die stärker gestreckt werden. Dadurch bleiben vor allem kürzere Filamente zurück, was zu einer reduzierten intrazyklischen Versteifung führen kann [105]. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme der Vernetzerdichte, was zu einer Verschiebung der kritischen Deformation, ab der eine Versteifung einsetzt, führt [102, 103]. Diese Verschiebung könnte derart ausgeprägt sein, dass die kritische Deformation stets größer als die maximale Deformation ist, so dass keine intrazyklische Versteifung auftreten kann.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sowohl interzyklische, als auch intrazyklische Nichtlinearitäten von der Art der Anregung abhängen. Diese Abhängigkeit kann als ausgeprägte Pfadabhängigkeit der nichtlinearen Mechanik lebender Zellen interpretiert werden. Die Pfadabhängigkeit eines dynamischen Systems beschreibt, dass die Systemantwort von dem initialen Systemzustand und dem genauen Weg, auf dem dieser Zustand verändert wird, abhängt. Die Änderungen können dynamisch erfolgen und transienten Charakter haben. Die Geschichte des Systems kann aber auch in der internen *Struktur* gespeichert werden. Ein bekanntes Beispiel aus der Physik ist die Hysterese bei der Magnetisierung von Materialien.

Dies wiederum legt nahe, dass die beschriebenen Nichtlinearitäten von der Netzwerkstruktur des Zytoskeletts abhängen. Die Netzwerkstruktur kann sich dynamisch entwickeln, was zu einer Ände-

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

---

rung der mechanischen Zellantwort führen kann. Änderungen der Netzwerkstruktur sind abhängig von der Zeitskala auf dem sich mechanische Stimuli abspielen. Somit erklärt sich die Abhängigkeit der nichtlinearen Zellantwort von der genauen Art der Anregung, die sich hauptsächlich in der maximalen Scherrate während der initialen Zyklen unterscheidet. In [114] wurden die hier für lebende Zellen gefundenen nichtlinearen Regime aus einem theoretischen Modell vorhergesagt. Dabei sind die Frequenz und die Amplitude der Oszillationen die bestimmenden Parameter [114]. In dieser Arbeit zeigt sich jedoch, dass nicht nur die Parameter der Oszillationen im stationären Zustand, nach erfolgter Einregelung, die nichtlineare Zellantwort bestimmen. Vielmehr muss die gesamte Deformationshistorie berücksichtigt werden, speziell im Hinblick auf die maximale auftretende Scherrate. Es spielt dabei keine Rolle, ob diese maximale Scherrate nur für einen kurzen Augenblick anliegt (wie z.B. bei cosinusförmiger Schubspannungsanregung). Analoge Einflüsse initialer Deformationszyklen auf die mechanischen Eigenschaften sind aus der experimentellen Gewebemechanik bekannt [194]. Experimentelle Protokolle sehen solche initiale Zyklen vor, um einen reproduzierbaren Referenzzustand des zu untersuchenden Gewebes zu erzeugen. Dieser Vorgang wird Präkonditionierung genannt [194, 195, 196]. Im vorliegenden Falle wirken die initialen Oszillationszyklen somit als eine ratenabhängige mechanische Präkonditionierung des Zytoskeletts. Eine mechanische Präkonditionierung lebender Zellen wurde erstmals von Matthews et al. postuliert, jedoch nicht weiter verfolgt [60].

Änderungen der Zytoskelettstruktur werden häufig mit aktiver Umordnung auf der Zeitskala einiger Minuten assoziiert. Solche Effekte können jedoch nicht die einzige Grundlage der hier beobachteten Präkonditionierung sein. Die Präkonditionierung erfolgt innerhalb der initialen Zyklen, die nur wenige Sekunden oder sogar im Bereich von Mikrosekunden (cosinusförmige Schubspannung) wirken. Eine Änderung der Zellmechanik auf diesen Zeitskalen wurde schon beschrieben [111]. In [60] wurde gezeigt, dass sich eine mechanische Adaption der Zelle auf verschiedenen Zeitskalen abspielen kann, beginnend von einer instantanen Reaktion hin zu einer aktiven Antwort auf der Zeitskala von Minuten. Die Reorientierung des Aktinzytoskeletts auf einer Skala von Minuten wurde ausführlich beschrieben [59, 188], deren Einfluss auf die Zellmechanik jedoch noch nicht quantitativ untersucht. In den hier vorliegenden Messungen spielen adaptive Reaktionen des Zytoskeletts auf Zeitskalen von weniger als einer Sekunde bis zu einer Stunde eine Rolle, was die Interpretation der Daten erschwert.

Die starke Abhängigkeit der nichtlinearen Zellantwort von der Zytoskelettstruktur könnte den fehlenden Konsens in der Literatur erklären. Dieser erscheint zunächst als Paradox (Siehe *the stiffening softenin paradox in cell mechanics* [114]). Wolff et al. haben gezeigt, dass das Paradoxon jedoch durch die Betrachtung von Filamentdynamik mit metastabilen, glasartigen Zuständen unter Berücksichtigung von Vernetzerdynamik, zumindest auf theoretischer Basis gelöst werden kann. Dies besagt nichts anderes, als dass die Netzwerkstruktur und ihre dynamische Adaption an gegebene mechanische Stimuli für die unterschiedlichen beschriebenen Nichtlinearitäten verantwortlich sein können. Dies wird im Folgenden durch eine Betrachtung der Reversibilität der mechanischen Änderungen noch genauer untersucht.

#### 4.4.4. Reversibilität der mechanischen Änderungen

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die mögliche Rolle der Zytoskelettstruktur im allgemeinen und im speziellen von Filament- und Vernetzerdynamik für die nichtlineare Zellantwort diskutiert. Wären passive Filamentrelaxationen und der Verlust von Vernetzungsproteinen für die beobachtete Abnahme der Zellsteifigkeit in Form des Schubmoduls und des differentiellen Moduls für kleine Deformationen verantwortlich, so sollte die Abnahme zumindest teilweise reversibel sein. Vernetzerdynamik beschränkt sich nicht auf eine Abnahme der Konzentration. Es kann sowohl zum Verlust, als auch zum erneuten Binden von Vernetzern kommen, was zu einer Zunahme der Zellsteifigkeit führen sollte und auch zu einer Verschiebung der kritischen Deformation zu kleineren Deformationen. Dies soll im Folgenden untersucht werden.

In [57] wurde gezeigt, dass eine Zelldeformation im Mikroplattenrheometer bis zu einer Streckung von etwa 10% reversibel, für größere Streckungen jedoch irreversibel ist.

In Analogie dazu wurden hier Oszillationsserien bei einer Frequenz von 0,5 Hz mit einer Dauer von 120 Sekunden und Deformationsamplituden, die stufenweise von  $\gamma_0=0,02$  bis zu einem Maximum von  $\gamma_{0,max}$  erhöht und anschließend wieder verringert wurden durchgeführt. Um den Einfluss der Zeitskala zu untersuchen wurde darüber hinaus eine Oszillationsserie mit sprunghaftem Anstieg von  $\gamma_0=0,02$  auf  $\gamma_{0,max}=0,5$  und stufenweiser Verringerung der Amplitude durchgeführt (Protokoll Siehe Abbildung 4.53, rechts). Diese Experimente wurden mit Hilfe des dynamischen Schubmoduls  $|G^*| = \frac{\tau_0}{\gamma_0}$ , der aus den Deformationsamplituden  $\gamma_0$  und den Schubspannungsamplituden  $\tau_0$  im stationären Zustand berechnet wurde, analysiert.

Die auf den dynamischen Schubmodul bei einer Deformation von 0,02 normalisierten Schubmodule  $G_{norm} = \frac{G_{\gamma_0}}{G(\gamma_0=0,02)}$  als Funktion der Deformationsamplitude sind in Abbildung 4.53 gezeigt. Für maximale Amplituden  $\gamma_{max} < 0,1$  (4.53, schwarz) ist die Abnahme des Schubmoduls reversibel. Für größere maximale Amplituden (hier  $\gamma=0,8$  (4.53, rot)), und stufenweise Erhöhung, ergibt sich eine irreversible Abnahme. Der Schubmodul bei  $\gamma=0,02$  erreicht am Ende der Messung nur noch 40% des Werts zu Beginn der Messung. Wird die maximale Amplitude (hier  $\gamma_{max}=0,5$ ) sofort angefahren, so wird der Schubmodul für  $\gamma=0,02$  etwa doppelt so groß wie der initiale Wert, es ergibt sich eine Versteifung (4.53, blau).

Bei Messungen im langsamen Deformationsmodus wird die Deformationsamplitude für jede neue Oszillationsserie nach und nach an die maximale Amplitude angenähert. Wird für die gesamte Oszillationsserie, inklusive Einregelphase, ein Schubmodul bestimmt, so kann für jede Oszillationsserie der Schubmodul als Funktion der aktuell anliegenden Anregungsamplitude berechnet werden. Eine Analyse der Schubmodule kann ebenfalls Aufschluss über die Reversibilität der Abnahme des Schubmoduls liefern.

Abbildung 4.54 zeigt den Schubmodul für eine Oszillationsmessung im langsamen Deformationsmodus. Es wurden alle Oszillationszyklen, inklusive der Einregelung berücksichtigt. Auch hier zeigt sich, dass die Abnahme des Schubmoduls teilweise reversibel ist. Für jeden neuen Oszillationszyklus ergibt sich eine Abnahme des Schubmoduls mit ansteigender Amplitude. Der Wert des Schubmoduls für sehr kleine Deformationen nimmt dabei nach und nach ab (Abbildung 4.54

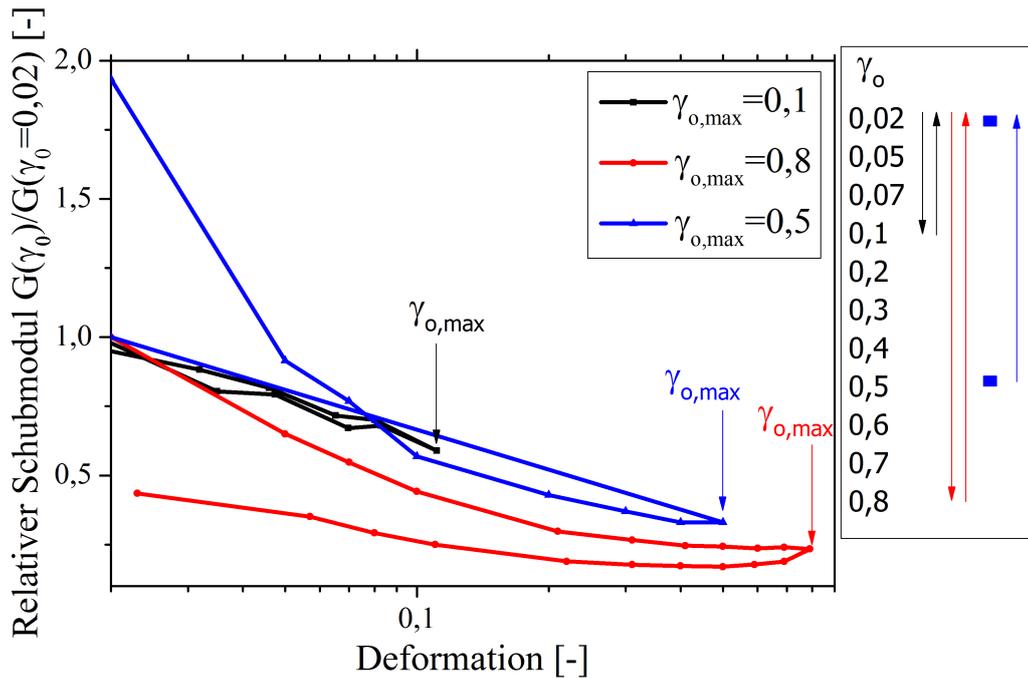


Abbildung 4.53.: Links: Relativer Schubmodul  $G_{norm} = \frac{G_{\gamma_0}}{G(\gamma_0=0,02)}$  als Funktion der Deformationsamplitude  $\gamma_0$  für Experimente an drei Monoschichten (Farben) im langsamen Deformationsmodus (DL). Die Amplitude wird schrittweise (schwarz und rot) auf ein Maximum erhöht und wieder auf den Ursprungswert verringert. Für kleine maximale Amplituden  $\gamma_{0,max} < 0,1$  ist die Abnahme des Schubmoduls reversibel, für größere Amplituden entsteht eine irreversible Abnahme. Bei der Messung in blau wurde die Amplitude sprunghaft vom Minimum  $\gamma_0=0,02$  auf das Maximum  $\gamma_0=0,5$  erhöht und wieder schrittweise verringert. In diesem Fall ergibt sich ein zunehmender Schubmodul, also eine Versteifung der Zellen. Rechts: Schematische Darstellung des Messprotokolls. Für jede Amplitude wurde eine Oszillationsserie bei einer Frequenz von 0,5 Hz mit einer Dauer von 120 Sekunden durchgeführt. Pfeile bedeuten eine schrittweise Erhöhung/Verringerung der Amplitude. Rechtecke bedeuten, dass eine einzige Oszillationsserie bei der jeweiligen Amplitude durchgeführt wurde.

Pfeil), ist jedoch größer als der stationäre Wert des vorangegangenen Oszillationszyklus (Abbildung 4.54 *inset*). Dies zeigt die partielle Reversibilität der Abnahme des Schubmoduls.

Durch Analyse der Einregelzyklen kann auch die Reversibilität der Verschiebung der kritischen Deformation, bei der der Übergang zum intrazyklischen *strain stiffening* erfolgt, untersucht werden. Dazu wird für jede Oszillationsserie und jede Oszillationsperiode, inklusive der Einregelphase, der differentielle Modul bestimmt. Der Verlauf des differentiellen Moduls wird im Folgenden analysiert (Abbildung 4.55). Es zeigt sich, dass die Verschiebung der kritischen Deformation  $\gamma_c$  fast vollständig reversibel ist. Für jede neue Oszillationsserie beginnt der Übergang bei der minimalen kritischen Deformation  $\gamma_{c,min}$  und steigt mit der Deformationsamplitude an.

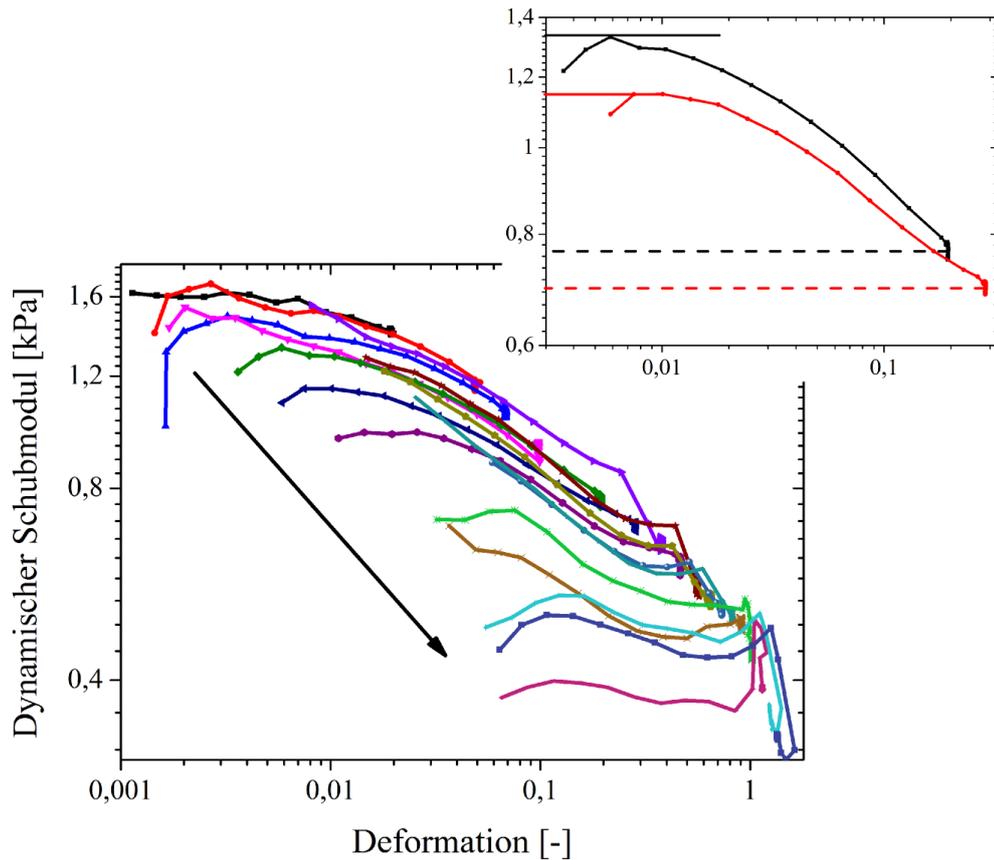


Abbildung 4.54.: Normierter Schubmodul  $G_{norm} = \frac{G(\gamma_0)}{G(\gamma_0=0,02)}$  als Funktion der Deformationsamplitude für ein Experiment im langsamen Deformationsmodus (DL). Die Einregelphasen sind mit berücksichtigt. Daher beginnt jeder Oszillationszyklus (farbcodiert) bei geringen Deformationen, die sukzessive zunehmen. Jeder Zyklus zeigt eine Abnahme des Schubmoduls mit steigender Amplitude. Die Abnahme ist jedoch teilweise reversibel. Zu Beginn eines neuen Oszillationszyklus ist der Schubmodul größer, als im stationären Zustand der vorhergehenden Oszillation. Der Schubmodul für kleine Stimuli nimmt jedoch sukzessive ab (siehe Pfeil), was eine, auf den betrachteten Zeitskalen, irreversible Abnahme der Zellsteifigkeit bedeutet. Oben rechts: Zwei aufeinanderfolgende Oszillationszyklen ( $\gamma_0=0,2$  und  $\gamma_0=0,3$ ) wurden herausgestellt. Es zeigen sich reversible (Differenz zwischen gestrichelter schwarzer und durchgezogener roter Linie) und irreversible Abnahmen (Differenz zwischen durchgezogener schwarzer und durchgezogener roter Linie). Die Abnahme der stationären Schubmodule aufgrund steigender Oszillationsamplitude zeigt sich in der Differenz zwischen den gestrichelten Linien.

#### 4.4.4.1. Diskussion

Die bisher hier beschriebenen Änderungen der Zellantwort auf Anregung mittels Oszillationen mit großer Amplitude umfassen eine interzyklische Abnahme der Zellsteifigkeit und eine Zunahme der kritischen Deformation, bei der eine intrazyklische Zunahme der differentiellen Steifigkeit einsetzt,

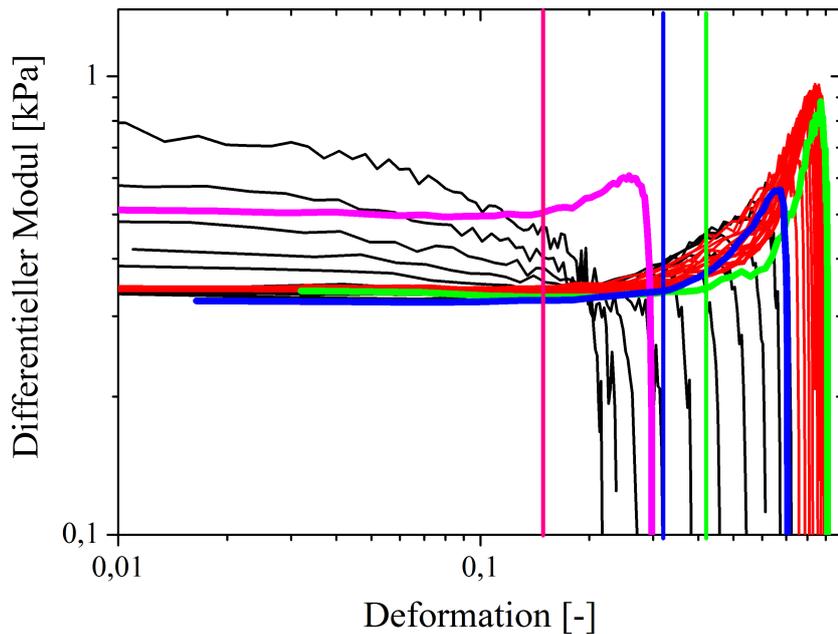


Abbildung 4.55.: Differentieller Schubmodul als Funktion der Deformation für drei Oszillationszyklen eines Experiments im langsamen Deformationsmodus (DL). Aufgetragen sind ein Zyklus im stationären Zustand für eine Deformationsamplitude von  $\gamma_0=0,3$  (magenta),  $\gamma_0=0,7$  (blau) und  $\gamma_0=0,9$  (grün). Schwarz und rot zeigen die Einregelungszyklen für den Zyklus  $\gamma_0=0,9$  (grün) (Es wurden zwei Farben aufgrund der besseren Übersicht verwendet). Es zeigt sich die im vorherigen Kapitel beschriebene Verschiebung der kritischen Deformation im stationären Zustand (verdeutlicht durch die vertikalen Linien). Anhand der Einregelphase lässt sich erkennen, dass diese Verschiebung fast vollständig reversibel ist (schwarz).

mit zunehmender Deformationsamplitude. Für beide Fälle zeigt sich, dass die Änderungen auf den betrachteten Zeitskalen zumindest teilweise reversibel sind.

Der Schubmodul nimmt zwar für Oszillationen mit großer Amplitude ab, werden jedoch im Anschluss Oszillationen mit kleiner Amplitude ausgeführt, so wird der Schubmodul wieder größer, nimmt jedoch für maximale Deformationen größer als 0,1 nicht mehr den ursprünglichen Wert an. Dies gilt zumindest für die hier gewählten Zeitskalen. Die untersuchten Zellen haben zwischen zwei Oszillationsserien 120 Sekunden Zeit zur mechanischen Erholung. Diese Zeitspanne ist eventuell nicht ausreichend, um eine vollständige Erholung zu gewährleisten.

Ein ähnliches Verhalten von Zellen wurde in [111] beschrieben. Durch eine instantane Streckung der Zellen kommt es zu einer Abnahme der Zellsteifigkeit. In der Folgezeit erholen sich die Zellen, die Steifigkeit nimmt zu und erreicht nach einigen Minuten wieder ihren ursprünglichen Wert. Ein solcher Verflüssigungs-Verfestigungs-Mechanismus (*fluidization-resolidification* [111]) könnte auch die Grundlage für die hier beschriebene partielle Reversibilität der Abnahme der Zellsteifig-

keit sein. Als Grundlage dessen wurde ebenfalls das Vorhandensein von Vernetzern vorgeschlagen, die sich leicht ablösen lassen (Bindungsstärken nur etwas größer als die thermische Energie  $k_B T$ ), die aber auch wieder neu vernetzen können.

Die kritische Deformation nimmt mit der maximalen Deformation zu. Diese Zunahme ist beinahe vollständig reversibel. Der irreversible Anteil ist wesentlich geringer, als im Falle der Abnahme der Zellsteifigkeit. Die Zunahme kann ebenfalls vom Ablösen von Vernetzungsproteinen herrühren [102]. Eine vollständige Reversibilität der Zunahme würde somit bedeuten, dass beinahe alle Vernetzer wieder binden. Wäre die Vernetzerdynamik der einzige ausschlaggebende Mechanismus, so sollte auch die Abnahme der Zellsteifigkeit beinahe vollständig reversibel sein, was jedoch nicht der Fall ist. Somit müssen noch weitere Mechanismen, wie z.B. die Filamentdynamik, an der Änderung der mechanischen Zellantwort beteiligt sein. Das Zusammenspiel dieser beiden Mechanismen wurde schon in [114] auf Basis eines Modells als Grundlage der nichtlinearen Zellantwort vorgeschlagen. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen dieses Modell.

#### 4.4.5. Fouriertransformationsrheologie - Zellen zeigen mechanische Symmetriebrechung

Differentielle und verallgemeinerte Module quantifizieren die Nichtlinearitäten von lebenden Zellen. Allerdings fangen diese Methoden nicht alle Aspekte der Nichtlinearität ein. So zeigt sich eine mechanische Asymmetrie, die bisher nicht quantifiziert wurde (Siehe Abschnitt 4.4.2 und 4.4.3). Die Fouriertransformationsrheologie bietet die Möglichkeit die Antwort eines Systems auf eine harmonische, monofrequente Anregung (Deformation oder Schubspannung) zu untersuchen. Die spektrale Zusammensetzung des Deformationssignales (bei einer Schubspannungsanregung) oder des Schubspannungssignales (bei einer Deformationsanregung) wird analysiert und auf das Auftreten von Frequenzbeiträgen, die nicht der Anregungsfrequenz entsprechen, hin untersucht. Die Antwortsignale werden als Summe aus spektralen Anteilen, die einem ganzzahligen Vielfachen der Anregungsfrequenz (hier  $f_0=0,5$  Hz) entsprechen dargestellt. Es ergibt sich für die Deformation

$$\gamma(t) = \sum_n \gamma_n \sin(n \cdot 2\pi f_0 + \delta_n) \quad (4.30)$$

und für die Schubspannung

$$\tau(t) = \sum_n \tau_n \sin(n \cdot 2\pi f_0 + \theta_n) \quad (4.31)$$

wobei  $\gamma_n$  und  $\tau_n$  die Amplitude des spektralen Anteils der Frequenz  $n \cdot f_0$  angibt.  $\delta_n$  und  $\theta_n$  sind die Phasen. Die Amplituden- und Phaseninformationen können mittels einer schnellen Fouriertransformation (*Fast Fourier Transform*, FFT) in Origin8.6. ermittelt werden. Zur Quantifizierung der Nichtlinearitäten werden die normierten Intensitäten der spektralen Anteile  $I_{n,\tau} = \frac{\tau_n}{\tau_1}$  oder  $I_{n,\gamma} = \frac{\gamma_n}{\gamma_1}$  als Funktion der Anregungsamplitude betrachtet. Zu beachten ist, dass in dieser Arbeit aufgrund der Regelung des Rheometers sowohl bei einer Schubspannungsanregung, als auch bei einer Deformationsanregung Obertöne im Deformationssignal auftreten. Das Schubspannungssignal

## 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

bleibt monofrequent. Somit wird in beiden Fällen die spektrale Zusammensetzung des Deformationssignales untersucht (Siehe Abschnitt 4.1.3).

### Benennung

Der Index  $n$  gibt die Ordnung des spektralen Anteils an.  $n=1$  ist die Grundfrequenz oder Anregungsfrequenz  $f_0=0,5$  Hz. Anteile  $n > 1$  werden als Obertöne bezeichnet. Die Nummerierung der Obertöne folgt also mit einem Index  $i=n-1$ . Der erste Oberton hat somit also Ordnung 2. Darüber hinaus wird zwischen geraden und ungeraden Obertönen unterschieden. Gerade Obertöne haben  $n=2,4,6,\dots$ , welche den asymmetrischen Anteil der Nichtlinearität beschreiben (Siehe Abschnitt 2.2.3.1). Ungerade Obertöne mit  $n=3,5,7,\dots$  beschreiben den symmetrischen Teil der Nichtlinearität.

Durch die Analyse der geraden Obertöne  $n \cdot f_0$  (mit  $n$  geradzahlig) kann somit die auftretende Asymmetrie quantifiziert werden (Siehe Abschnitt 2.2.3.1).

Abbildung 4.9 zeigt die Deformations- und Schubspannungsdaten für eine vollständige Oszillationsmessung im schnellen Deformationsmodus DS. Analoge Messungen wurden für alle vier Messmodi (Siehe Abschnitt 4.1.3) durchgeführt. Die auftretenden Nichtlinearitäten wurden mittels Fouriertransformation (Siehe Abschnitt 2.2.3.1) analysiert und quantifiziert. Die Ergebnisse der Fouriertransformationen für die Messung aus Abbildung 4.9 sind beispielhaft in Abbildung 4.56 gezeigt.

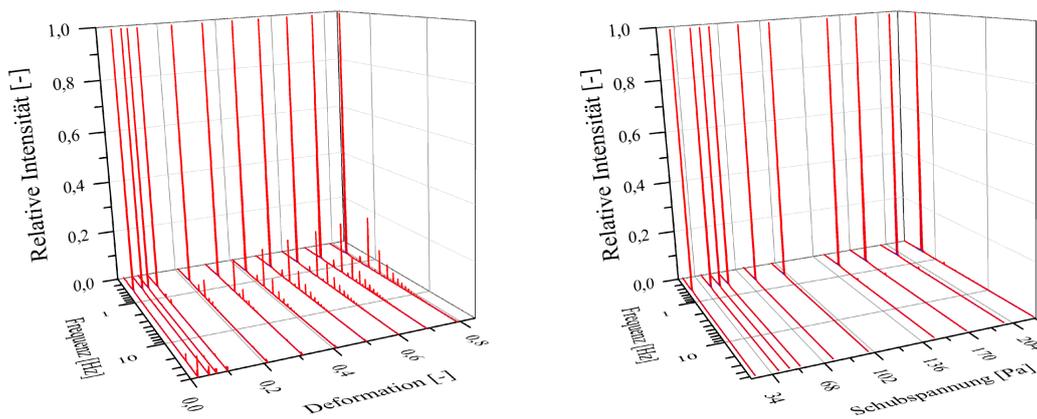


Abbildung 4.56.: Oszillationsmessung aus Abbildung 4.9 im schnellen Deformationsmodus (DS) bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Links: Fouriertransformation der Deformationssignale. Die normierten Intensitäten sind als Funktion der Frequenz und der Deformationsamplitude aufgetragen. Für kleine Amplituden sind die Beiträge höherer Harmonischer nicht zu erkennen. Für Deformationen größer als 0,1 treten deutliche Beiträge höherer Harmonischer auf. Rechts: Fouriertransformation der Schubspannungssignale. Die normierten Intensitäten sind als Funktion der Frequenz und der Schubspannungsamplitude aufgetragen. Es zeigen sich keine Beiträge höherer Harmonischer.

Für kleine Deformationsamplituden zeigen sich im Deformationssignal keine nennenswerten Obertonbeiträge. Für Stimuli größer als  $\gamma=0,1$  steigen die normierten Intensitäten der Obertöne an. Im

Schubspannungssignal zeigen sich keine Obertöne, wie schon in Abschnitt 4.1.3 gezeigt wurde. Für die Quantifizierung der Nichtlinearitäten von lebenden Zellen soll die Abhängigkeit der Obertonbeiträge von der Anregungsamplitude untersucht werden. Daher werden die normierten Intensitäten der Obertöne als Funktion der Anregungsamplitude aufgetragen. Dies ist in Abbildung 4.57 für die Messung aus Abbildung 4.56 beispielhaft gezeigt.

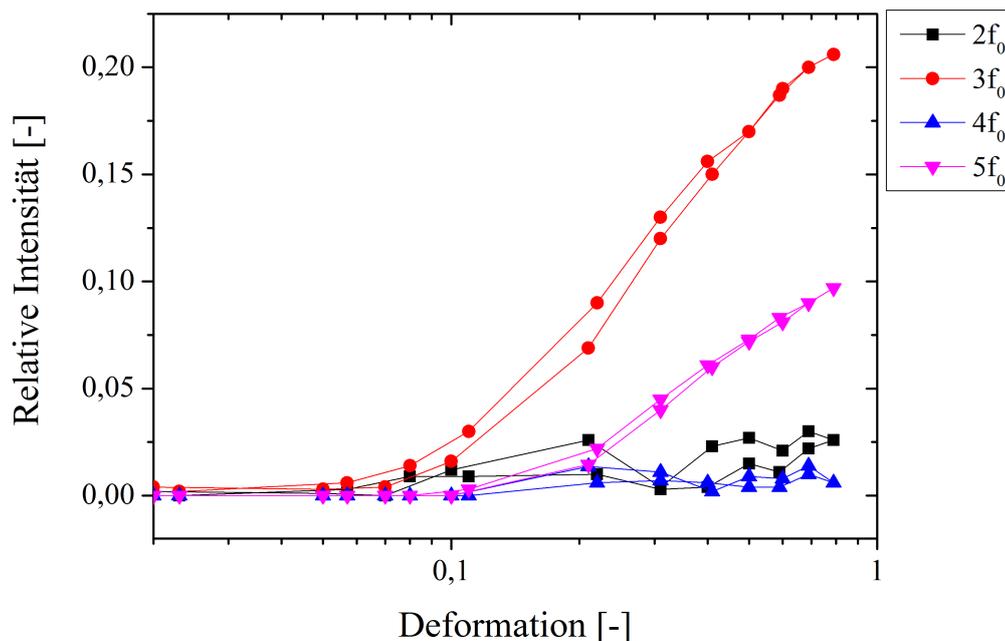


Abbildung 4.57.: Normierte Intensität der Beiträge der ersten vier Obertöne ( $n=2-5$ ) als Funktion der Anregungsamplitude. Die Beiträge ungerader Obertöne ( $n=3,5$ ) steigen für Deformationen größer 0,1 an, die Beiträge gerader Obertöne sind für diese Messung vernachlässigbar. Für steigende Ordnung  $n$  nehmen die Intensitäten der Obertöne  $nf_0$  stark ab. Darüber hinaus ist der Verlauf der geraden und ungeraden untereinander jeweils identisch. Daher werden im Folgenden nur der erste ( $n=2$ ) und zweite ( $n=3$ ) Oberton untersucht.

Die geradzahigen Vielfachen der Grundfrequenz  $f_0$  zeigen in dieser Messung nur vernachlässigbare Beiträge. Die ungeraden Obertöne steigen ab einer Deformationsamplitude von  $\gamma_0=0,1$  an. Die normierte Intensität der Beiträge  $nf_0$  nimmt mit steigender Ordnung  $n$  stark ab. Der Verlauf der geraden und ungeraden Harmonischen als Funktion der Anregungsamplitude ist jeweils identisch. Daher werden im Folgenden nur die ersten beiden Obertöne (gerade:  $n=2$  und ungerade:  $n=3$ ) für alle vier Messmodi analysiert. Dabei quantifiziert  $n=2$  die Asymmetrie,  $n=3$  den symmetrischen Anteil der Nichtlinearität.

### 4.4.5.1. Erster Oberton - Asymmetrie der nichtlinearen Zellantwort

Abbildung 4.58 zeigt die normierte Intensität des ersten Obertons (gerade,  $n=2$ ) als Funktion der Anregungsamplitude für Messungen im langsamen Deformationsmodus DL- (oben links), schnellen Deformationsmodus DS- (oben rechts), cosinusförmigem Schubspannungsmodus SC- (unten links) und im sinusförmigen Schubspannungsmodus SS-Modus (unten rechts). Die Abbildung zeigt somit die Abhängigkeit der Asymmetrie von der Anregung.

Außer im schnellen Deformationsmodus zeigt die normierte Intensität des ersten Obertons, und damit die Asymmetrie, eine nichtmonotone Abhängigkeit von der Anregungsamplitude mit ein bis zwei Maxima, je nach Anregung. Es kommt somit zu Verstärkungen und Schwächungen der Asymmetrie. Der genaue Verlauf wird im Folgenden detailliert diskutiert.

- **Langsame Deformation (DL)**  
Messungen mit langsamer Deformation (Abbildung 4.58, oben links) zeigen Beiträge des ersten Obertons, die zunächst mit größer werdender Deformation ansteigen. Vier von fünf Messungen weisen ein Maximum bei einer Deformationsamplitude von  $\gamma_0=0,2$  mit relativen Intensitäten von  $I=0,04-0,06$  auf. Die zugehörigen Schubspannungsamplituden der Maxima liegen zwischen  $\tau_0 \approx 70$  Pa und  $\tau_0 \approx 150$  Pa. Danach kommt es bei diesen Messungen zu einer Abnahme der Intensität, bis zu einem erneuten Anstieg mit einem zweiten Maximum bei einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,8-1$  ( $\tau_0 \approx 300-400$  Pa). Eine Messung (schwarz) zeigt einen Anstieg mit steigender Deformation bis zu einem einzigen Maximum bei  $\gamma_0 \approx 0,8$  ( $\tau_0 \approx 300$  Pa) und danach einen monotonen Abfall.
- **Schnelle Deformation (DS)**  
Zwei Messungen mit schneller Deformation (DS) wurden ohne Pausezyklen zwischen den einzelnen Oszillationsserien durchgeführt (Abbildung 4.58, oben rechts, schwarz und rot). Diese zeigen einen geringen Anstieg des Beitrags des ersten Obertons mit steigender Deformationsamplitude bis  $\gamma_0 \approx 0,2$  ( $\tau_0 \approx 100$  Pa). Für größere  $\gamma_0$  steigen die Beiträge stark an, bis sich die Zellen von den Platten lösen. Die maximalen Intensitäten vor dem Abreißen der Zellen liegt bei 0,25. Die Messung mit Pause (grün) zeigt im gesamten untersuchten Deformationsintervall nur einen geringfügigen Anstieg der Intensität des ersten Obertons, die normierten Intensitäten bleiben im Bereich von 0,02.
- **Schubspannungssteuerung cosinus (SC)**  
Für schubspannungsgesteuerte Messungen mit Cosinusanregung (SC) steigt die Intensität des ersten Obertons bis zu einem Maximum bei  $\tau_0 \approx 200$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,3$ ) (schwarz) bzw.  $\tau_0 \approx 70$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,1$ ) mit steigender Schubspannungsamplitude an (Abbildung 4.58, unten links). Für größere Schubspannungen werden die Beiträge geringer. Die Messung in rot zeigt noch ein zweites Maximum bei  $\tau_0 \approx 120$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,3$ ). Die Maxima weisen normierte Intensitäten von 0,05-0,06 auf.

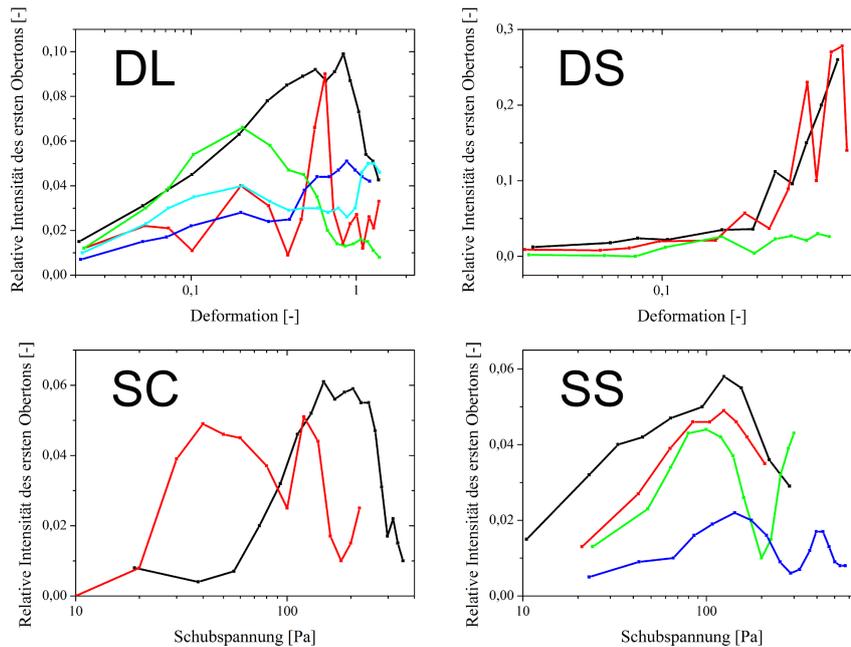


Abbildung 4.58.: Normierte Intensität des ersten Obertons (gerade,  $n=2$ ) als Funktion der Anregungsamplitude für Messungen an mehreren Monoschichten in den vier Messmodi. Jede Kurve beschreibt eine einzige Monoschicht. Oben Links: Langsame Deformation (DL). Normierte Intensität des ersten Obertons als Funktion der Deformationsamplitude für Messungen an fünf Monoschichten. Die Intensität der Obertöne steigt zunächst für alle Messungen mit steigender Deformationsamplitude bis zu einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,2$  an. Die zugehörigen Schubspannungsamplituden der Maxima liegen zwischen  $\tau_0 \approx 70$  Pa und  $\tau_0 \approx 150$  Pa. Danach kommt es bei diesen Messungen zu einer Abnahme der Intensität, bis zu einem erneuten Anstieg mit einem zweiten Maximum bei einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,8-1$  ( $\tau_0 \approx 300-400$  Pa). Für die Messung in schwarz existiert nur ein Maximum bei einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,8$  ( $\tau_0 \approx 300$  Pa). Oben rechts: Schnelle Deformation (DS). Normierte Intensität des ersten Obertons als Funktion der Deformationsamplitude. Alle drei Messungen zeigen bis zu einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,2$  ( $\tau_0 \approx 100$  Pa) einen schwachen Anstieg. Für größere Deformationen nimmt die normierte Intensität für die Messungen ohne Pausezyklen zwischen den Oszillationsserien stark zu, während für die Messung mit Pause kein weiterer Anstieg zu verzeichnen ist. Unten links: Schubspannungssteuerung Cosinus (SC). Die Intensität des ersten Obertons steigt mit steigender Schubspannungsamplitude bis zu einem Maximum bei  $\tau_0 \approx 100-150$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,08-0,17$ ) an. Für größere Amplituden nehmen die Beiträge des ersten Obertons ab. Zwei Messungen zeigen einen erneuten Anstieg für große Schubspannungen  $\tau_0$  (blau+grün) und ein weiteres Maximum (blau) bei  $\tau_0 \approx 400$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,7$ ). Unten rechts: Schubspannungssteuerung Sinus (SS). Die normierte Intensität des ersten Obertons steigt mit steigender Schubspannungsamplitude bis zu einem Maximum bei  $\tau_0 \approx 100-150$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,08-0,17$ ) an. Für größere Amplituden nehmen die Beiträge des ersten Obertons ab. Zwei Messungen zeigen einen erneuten Anstieg für große Schubspannungen  $\tau_0$  (blau+grün) und ein weiteres Maximum (blau) bei  $\tau_0 \approx 400$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,7$ ).

- Schubspannungssteuerung sinus (SS)

Für Schubspannungssteuerung mit Sinusanregung (Abbildung 4.58, unten rechts) steigt der Beitrag des ersten Obertons mit wachsender Schubspannungsamplitude zunächst an (Abbildung 4.58, unten rechts), bis zu einem Maximum bei  $\tau_0 \approx 100\text{-}150\text{ Pa}$  ( $\gamma_0 \approx 0,08\text{-}0,17$ ). Die Intensitäten der Maxima liegen bei  $I=0,02\text{-}0,06$ . Für größere Schubspannungsamplituden werden die Beiträge wieder geringer. Zwei der Messungen (grün und blau) zeigen einen erneuten Anstieg der relativen Intensität für Schubspannungen  $\tau_0 > 200\text{-}300\text{ Pa}$ . Eine Messung (blau) zeigt ein zweites Maximum bei  $\tau_0 \approx 400\text{ Pa}$  ( $\gamma_0 \approx 0,7$ ) mit einer normierten Intensität von  $I=0,02$ .

### 4.4.5.2. Zweiter Oberton - Symmetrische Nichtlinearität

Abbildung 4.59 zeigt die normierte Intensität des zweiten Obertons (ungerade,  $n=3$ ) als Funktion der Anregungsamplitude für Messungen im DL- (oben links), DS- (oben rechts), SC- (unten links) und im SS-Modus (unten rechts). Bis auf Messungen mit sinusförmiger Schubspannungsanregung zeigen alle Messungen eine nichtmonotone Abhängigkeit der Nichtlinearität von der Anregung. Zellen zeigen somit zunächst ansteigende nichtlineare Beiträge in der mechanischen Antwort, die für sehr große Stimuli wieder abnehmen.

- Langsame Deformation (DL)

Die normierte Intensität des zweiten Obertons (Abbildung 4.59, oben links) steigt bis zu einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,1\text{-}0,3$  ( $\tau_0 \approx 80\text{-}100\text{ Pa}$ ) zunächst nur geringfügig mit steigender Deformationsamplitude an. Für größere Deformationen erfolgt ein starker Anstieg der Intensität bis zu einem Maximum bei  $\gamma_0 \approx 0,6\text{-}0,9$ . Die zugehörigen Schubspannungswerte variieren zwischen  $\tau_0 \approx 100\text{-}500\text{ Pa}$ . Die normierte Intensitäten der Maxima liegen zwischen  $0,04$  und  $0,14$ . Für größere Anregungsamplituden erfolgt ein Abfall der normierten Intensität.

- Schnelle Deformation (DS)

Die normierten Intensitäten des zweiten Obertons (Abbildung 4.59, oben rechts) steigen bis zu einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,06\text{-}0,1$  ( $\tau_0 \approx 40\text{-}50\text{ Pa}$ ) geringfügig an. Für größere Deformationsamplituden erfolgt ein starker Anstieg der normierte Obertonintensität bis zu einem Maximum bei  $\gamma_0 \approx 0,5\text{-}0,6$  ( $\tau_0 \approx 100\text{-}300\text{ Pa}$ ), gefolgt von einem Abfall bis zum Versagen der Zelladhäsion. Die Maxima weisen eine Intensität von  $0,15\text{-}0,2$  auf.

- Schubspannungssteuerung cosinus (SC)

Die normierte Intensität des zweiten Obertons steigt mit steigender Schubspannungsamplitude an (Abbildung 4.59, unten links). Bei  $\tau_0 \approx 80\text{-}100\text{ Pa}$  ( $\gamma_0 \approx 0,2\text{-}0,4$ ) wird ein Maximum mit normierte Intensitäten von  $0,07\text{-}0,08$  erreicht. Für Schubspannungen größer als  $100\text{ Pa}$  zeigt eine Messung einen Abfall des Beitrags des zweiten Obertons (schwarz), die zweite Messungen einen Anstieg.

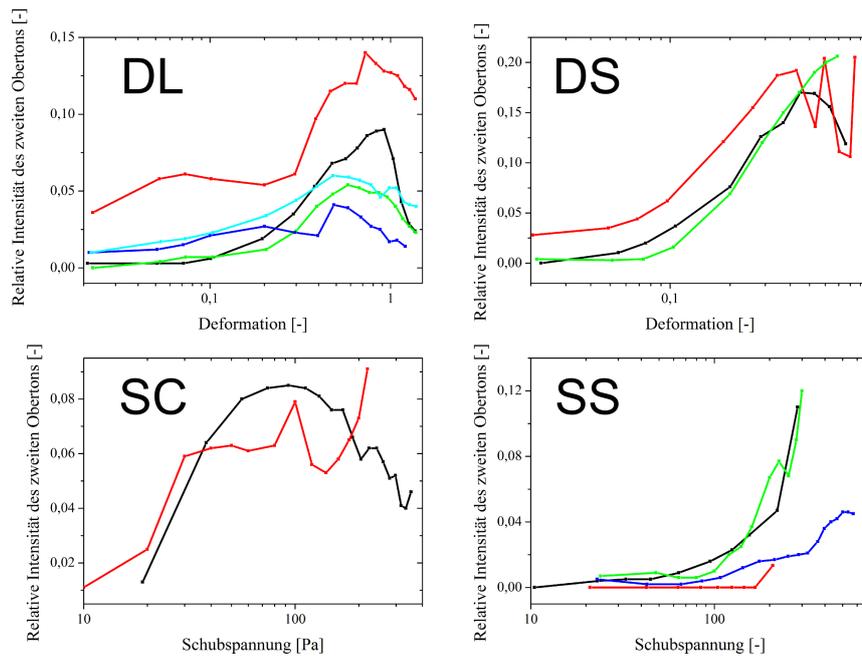


Abbildung 4.59.: Normierte Intensität des zweiten Obertons (ungerade,  $n=3$ ) als Funktion der Anregungsamplitude für Messungen an mehreren Monoschichten in den vier Messmodi. Es wurde der gleiche Farbcode wie in Abbildung 4.58 verwendet, so dass gleiche Farben bei gleichen Messmodi von einer Messung an der gleichen Monoschicht stammen. Oben Links: Langsame Deformation (DL). Die normierte Intensität des zweiten Obertons steigt zunächst geringfügig für alle Messungen mit steigender Deformationsamplitude bis zu einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,1-0,3$  ( $\tau_0 \approx 80-100$  Pa) an. Danach kommt es zu einem starken Anstieg bis zu einem Maximum bei  $\gamma_0 \approx 0,6-0,9$ , gefolgt von einem Abfall für Deformationsamplituden  $\gamma_0 > 1$ . Die Schubspannungsamplituden  $\tau_0$  bei denen die Maxima auftreten variieren von 100-500 Pa. Die normierten Intensitäten der Maxima liegen zwischen 0,04 und 0,14. Oben rechts: Schnelle Deformation (DS). Messungen in schwarz und rot wurden ohne Pause zwischen den Oszillationen durchgeführt. Alle drei Messungen zeigen bis zu einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,06-0,1$  ( $\tau_0 \approx 50-60$  Pa) einen schwachen Anstieg. Für größere Deformationen nimmt die normierte Intensität für die Messungen stark zu bis zu einem Maximum bei  $\gamma_0 \approx 0,5-0,6$  ( $\tau_0 \approx 100-300$  Pa) (schwarz und rot). Für eine Messung (grün) existiert kein Maximum. Die maximalen normierten Intensitäten liegen bei 0,17-0,2. Unten links: Schubspannungssteuerung Cosinus (SC). Die normierte Intensität des zweiten Obertons steigt stark an, bis zu einem Maximum bei  $\tau_0 \approx 100$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,2$  und 0,5). Eine Messung (schwarz) zeigt für größere Schubspannungsamplituden einen monotonen Abfall der normierten Intensität, die zweite zeigt einen erneuten Anstieg für  $\tau_0 > 150$  Pa ( $\gamma_0 > 0,7$ ). Unten rechts: Schubspannungssteuerung Sinus (SS). Die normierte Intensität des zweiten Obertons bleibt bis zu einer Schubspannungsamplitude von  $\tau_0 \approx 50-100$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,02-0,1$ ) konstant und steigt dann stark an. Eine Messung weist ein Maximum und einen darauffolgenden Abfall der normierten Intensität bei  $\tau_0 \approx 500$  Pa ( $\gamma_0 \approx 0,8$ ) auf. Die maximalen Beiträge des zweiten Obertons liegen bei 0,02-0,12.

## 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

---

- Schubspannungssteuerung sinus (SS)

Für Schubspannungsamplituden kleiner als  $\tau_0 \approx 50-150$  Pa zeigen sich nur geringfügige Beiträge ( $I < 0,02$ ) des zweiten Obertons (Abbildung 4.59, unten rechts). Für größere Schubspannungen erfolgt ein starker Anstieg der normierte Intensität bis die Zellen sich von der Glasplatte lösen. Eine Messung (blau) weist ein Maximum der normierten Intensität bei  $\tau_0 \approx 500$  Pa auf. Die maximal auftretenden Beiträge des zweiten Obertons liegen bei 0,03-0,12.

Zusammenfassend zeigt sich, dass sich die Ergebnisse sowohl für unterschiedliche Anregungsarten, als auch für eine Anregungsart teilweise stark unterscheiden.

### 4.4.5.3. Einfluss der Nullpunktverschiebung

Die Intensitäten der Obertöne und die zugehörigen Deformations- und Schubspannungswerte variieren von Monoschicht zu Monoschicht, auch bei gleicher Anregung. Daher wurde untersucht, ob die mittlere Deformation einen Einfluss auf die Intensitätsmaxima und die zugehörigen Deformationsamplituden hat. Für den ersten Oberton wurden ein Maximum bei einer Deformationsamplitude von  $\gamma_0 \approx 0,2$  und ein weiteres bei  $\gamma_0 \approx 0,8$  getrennt betrachtet. Für den zweiten Oberton existiert nur ein Maximum (Siehe Abschnitt 4.4.5.4). Es zeigt sich, dass ausschließlich die Intensität des 2. Maximums des ersten Obertons von der Nullpunktverschiebung abhängt (Siehe Abbildung 4.60). Je größer die mittlere Deformation  $\langle \gamma \rangle$  ist, umso größer ist die maximale Intensität des ersten Obertons, und damit der Asymmetrie, für große Deformationsamplituden  $\gamma_0$ . Das erste Maximum des ersten Obertons und der zweite Oberton hängen hingegen nicht von der Nullpunktverschiebung ab.

### 4.4.5.4. Diskussion

Nichtlineares Materialverhalten kann mit Hilfe der Fouriertransformationsrheologie (FTR) [91] untersucht werden. Die Antwort des Systems auf eine monofrequente, harmonische Anregung wird dabei mittels Fouriertransformation in seine spektralen Bestandteile zerlegt. Das Auftreten von Obertönen, Beiträgen ganzzahliger Vielfacher der Anregungsfrequenz  $n \cdot f_0$ , in Abhängigkeit von der Anregungsamplitude quantifiziert die auftretende Nichtlinearität [91, 92]. Gerade Vielfache ( $n=2,4,6,\dots$ ) der Anregungsfrequenz beschreiben eine Asymmetrie der Materialantwort, ungerade Vielfache ( $n=3,5,7,\dots$ ) beschreiben eine symmetrisch auftretende Nichtlinearität, wie z.B. eine intrazyklische Versteifung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur der erste ( $n=2$ ) und der zweite ( $n=3$ ) Oberton analysiert. Höhere Obertöne haben eine wesentlich geringere Intensität, ihre Abhängigkeit von der Anregung ist analog zu den Obertönen niedrigerer Ordnung.

Coughlin et al. haben die Fourieranalyse auf das Studium der Mechanik verschiedener Krebszelllinien angewandt. Es wurde jedoch ausschließlich ein Index berechnet, der die Abweichung von einer

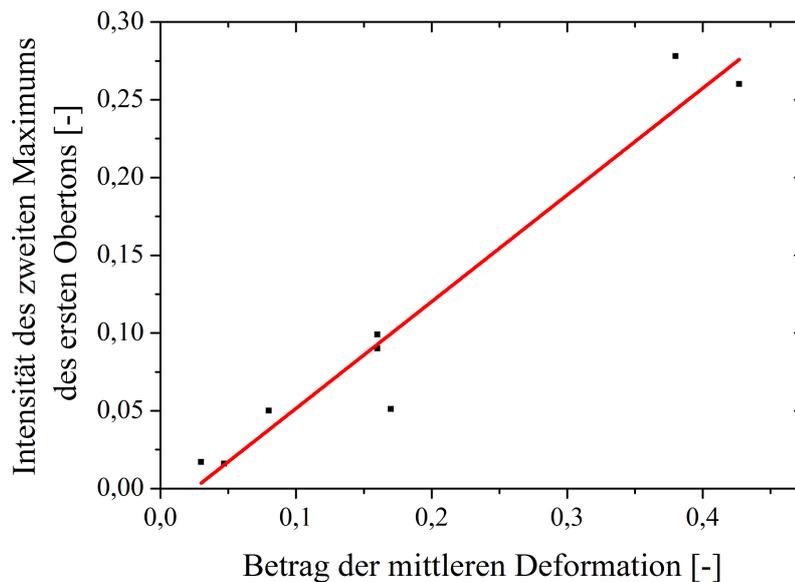


Abbildung 4.60.: Intensität des 2. Maximums des 1. Obertons als Funktion der mittleren Deformation  $\langle \gamma \rangle_n$  gewonnen aus Daten aus Abbildung 4.58. Die Intensität steigt linear mit der Nullpunktverschiebung an (Rot: lineare Anpassung mit  $R^2 = 0.9358$ ).

harmonischen Antwort quantifiziert. Die Beiträge einzelner Obertöne wurden nicht getrennt betrachtet. Die Abweichung von der harmonischen Antwort nahm für die untersuchten Spannungen mit wachsender Spannung zu. Eine genaue Analyse erfolgte nicht [197].

Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse diskutiert. Es zeigen sich ausgeprägte Unterschiede zwischen verschiedenen Monoschichten, was die in vorherigen Abschnitten schon diskutierte Sensibilität der nichtlinearen Zellantwort zeigt. Während die bisher vorgestellten Analysemethoden meist Teile der mechanischen Antwort herausgreifen und analysieren, analysiert die Fourierrheologie die vollständige Zellantwort. Dies erklärt die ausgeprägteren Variationen der Ergebnisse im Vergleich zu den vorher beschriebenen Methoden. Allerdings ergeben sich auch deutliche Gemeinsamkeit, die interpretiert werden können.

Ungerade Vielfache der Grundfrequenz geben den symmetrischen Teil der Nichtlinearität an. Sie enthalten somit die gleiche Information, wie auch der Nichtlinearitätsindex aus Abschnitt 4.4.3. Dies spiegelt sich in der Analogie der Verläufe der Graphen wider. Daher werden die ungeraden Obertöne an dieser Stelle nicht ausführlich diskutiert, da sie keine neue Information gegenüber den vorher beschriebenen Methoden der differentiellen und verallgemeinerten Module bringen, die schon ausführlich diskutiert wurden (Siehe Abschnitt 4.4.3.1). Im Gegenteil haben letztere sogar den Vorteil, dass sie eine physikalisch interpretierbare Aussage liefern [98].

Für lebende Fibroblasten zeigt sich eine nichtmonotone Abhängigkeit des ersten (geraden,  $n=2$ ) Obertons von der Anregungsamplitude. Es zeigen sich ein oder zwei Maxima der normierten Intensität, eines bei Deformationen von 0,1-0,3 und ein weiteres bei 0,8-1. Das Auftreten gerader

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

---

Obertöne bedeutet, dass die mechanische Antwort von Fibroblasten eine Asymmetrie aufweist (Siehe Abschnitt 2.2.3.1). Das Auftreten gerader Obertöne wurde in der Literatur vielfach diskutiert [92, 94, 95]. Meist wurden diese als experimentelle Artefakte aufgrund von mangelhafter Ausrichtung der Messgeometrie im Rheometer oder einem Gleiten der Probe über die Geometrie (*wall slip*) angesehen. Die parallele Ausrichtung der Glasplatten im Rheometer mit Hilfe der Microbead Methode wurde durch Messungen an Polyethylenoxidgelen nachgewiesen (Siehe Abschnitt 4.1.3). Bei diesen Messungen zeigte sich keine signifikante Asymmetrie. Wäre eine Fehlstellung der Platten für die Asymmetrie verantwortlich, so sollte der Beitrag linear mit der Deformationsamplitude zunehmen [94]. Dies ist jedoch für Zellen nicht der Fall (Siehe Abbildung 4.58). Somit kann eine Fehlstellung der Platten als Grund für die Asymmetrie ausgeschlossen werden. In Abschnitt 4.1.7.2 wurde darüber hinaus gezeigt, dass Zellen eine stabile Adhäsion aufweisen, bis es zu einem kollektiven Versagen der Adhäsion der ganzen Monoschicht kommt. Dies führt zum sofortigen Ende der Messung. Damit kann *wall slip* ebenfalls nicht für die Asymmetrie verantwortlich sein. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass das Auftreten des ersten Obertons (gerade,  $n=2$ ) ein Messartefakt ist.

Wilhelm et al. haben die Möglichkeit vorgeschlagen, dass mechanische Asymmetrien durch Gedächtniseffekte oder eine nichtlineare Elastizität des zu untersuchenden Materials zustandekommen [91]. Sowohl Biopolymere [100], als auch lebende Zellen [108] zeigen eine nichtlineare Elastizität, die somit für die Asymmetrie verantwortlich sein könnte. Eine Form von Gedächtniseffekt, die zum Auftreten asymmetrischer mechanischer Antworten führen kann ist die nematische Ausrichtung eines Materials auf mikroskopischer Ebene.

Neuere experimentelle und theoretische Untersuchungen zeigen, dass ein Auftreten gerader Obertöne in Materialien mit orientierbarer Mikrostruktur möglich ist [95]. Eine nematische Ausrichtung und Umorientierung speziell des Aktinzytoskeletts als Antwort auf mechanische Stimuli wurden vielfach beschrieben [59, 188]. Somit ist die Ausbildung einer mechanischen Asymmetrie als Antwort auf eine symmetrische harmonische Anregung durch eine Orientierung bzw. Polarisierung des Zytoskeletts denkbar. Diese Möglichkeit wird im Folgenden näher ausgeführt:

Abhängig von der Größe des Stimulus, reagieren das Aktinzytoskelett und Stressfasern auf mechanische Stimuli mit einer Versteifung oder einer Zerstörung. Ein Stimulus der eine minimale Asymmetrie aufweist könnte somit zu einer asymmetrischen Verstärkung oder Schwächung des Zytoskeletts führen. Diese Verstärkung kann sich im Folgenden im Sinne einer Rückkopplungsschleife selbst verstärken. Eine Verstärkung kann für kleine Stimuli bis zu einer gewissen kritischen Stimulusgröße erfolgen, oberhalb derer eine Zerstörung erfolgt. Oberhalb eines kritischen Stimulus geht die Asymmetrie somit wieder verloren. Dieser Mechanismus könnte zum ersten Maximum der Asymmetrie führen. Es stellt sich die Frage, woher die initiale Asymmetrie kommt. Während der Adhäsion auf ausreichend steifen Substraten breiten sich Zellen aus und polarisieren sich [147]. Sie generieren somit eine zufällig orientierte Asymmetrie. Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Asymmetrie handelt es sich um einen kollektiven Effekt einer ganzen Monoschicht von etwa  $10^5$  Zellen. Im Mittel erwartet man daher eine symmetrische Ausgangskonfiguration, so dass eine zufällige initiale Asymmetrie unwahrscheinlich ist. Die Anregung der Zellen kann jedoch eine globale

Asymmetrie hervorrufen. Die Anfangsrichtung der Oszillation gibt eine initiale Asymmetrie vor, die sich zunächst sukzessive verstärken könnte. Werden die Stimuli zu groß, werden die verstärkten Strukturen wieder zerstört, was wiederum die Abnahme der Intensität der Asymmetrie erklärt. Neben der ansteigenden Asymmetrie nimmt der Schubmodul der Zellen mit steigender Amplitude monoton ab. Das obige Modell muss somit auch den abnehmenden Schubmodul, und damit eine abnehmende Zellsteifigkeit erklären. Die postulierte asymmetrische Verstärkung muss somit dergestalt sein, dass die Zellen mit steigender Amplitude global weicher werden. Eine Möglichkeit hierfür wären Umorientierungen der Filamente. Es wurde gezeigt, dass Filamente sich von der maximalen Scherung weg orientieren, um ihre mechanische Deformation zu minimieren [59, 166]. Diese Umorientierung, die in asymmetrischer Weise erfolgen kann, würde gleichzeitig zu der beobachteten abnehmenden Steifigkeit der Zellen und einer asymmetrischen mechanischen Antwort führen.

Das erste Maximum der Asymmetrie verschwindet für Messungen mit schneller Deformation (DS). Dies kann durch den regelungsbedingten *overshoot* im initialen Oszillationszyklus erklärt werden. Während die Oszillationsamplitude im stationären Zustand gering sein kann, wird die maximale, von den Zellen erforderte, Deformation durch den *overshoot* zu Beginn des Oszillationszyklus schon wesentlich größer. Dies führt dazu, dass die sich entwickelnde Asymmetrie für kleine stationäre Anregungen durch den *overshoot* zerstört wird, bevor sie sich aufbauen und verstärken kann.

Es stellt sich die Frage, warum es nach dem ersten Maximum zu einem erneuten Anstieg und einem zweiten Maximum der Intensität der Asymmetrie kommt. Die maximale Intensität des zweiten Maximums steigt linear mit der Nullpunktverschiebung an, wobei die Intensität null wird, wenn die Nullpunktverschiebung kleiner als  $\langle \gamma \rangle = 0,03$  wird. Bei verschwindender Nullpunktverschiebung steht die Zellachse im Mittel senkrecht zu den Platten. Eine Nullpunktverschiebung führt zu einer Drehung der Zellachse weg von der ursprünglichen senkrechten Ausrichtung. Dies bedeutet, dass das Zytoskelett bei positiver und negativer Oszillationsrichtung unterschiedlich belastet wird, was zu einer asymmetrischen Antwort, trotz symmetrischer Anregung, führt. Wie in Abschnitt 4.4.2.3 diskutiert, rührt die Verschiebung der Nulllage von einer plastischen Verformung der Zellen her. Die Plastizität der Zellen führt somit zu einer asymmetrischen mechanischen Antwort. In Übereinstimmung dazu sagen Missel et al. ebenfalls eine Abhängigkeit der mechanischen Antwort von der relativen Orientierung der Scherung zur Symmetrieachse eines anisotropen, nichtaffinen Biopolymergels voraus [198].

#### **4.4.6. Einfluss von pharmakologischen Veränderungen des Zytoskeletts**

Die bisher vorgestellten Ergebnisse deuten auf eine nichtlineare Zellantwort hin, die durch den Anfangszustand der Zellen (Siehe Abschnitt 4.4.2.3) und durch Veränderungen und Anpassungen des Zytoskeletts (Siehe Abschnitte 4.4.2.3 und 4.4.3.1) bestimmt wird. Um die Hypothese zu bestätigen wurden Experimente mit pharmakologischen Wirkstoffen durchgeführt, die die genannten

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

Einflussgrößen verändern können. Es wurden oszillatorische Messungen im DL Modus (langsame Deformation) mit zwei verschiedenen Wirkstoffen, Glutaraldehyd und Y27632 (Abschnitt 2.1.2), durchgeführt. Das Fixativ Glutaraldehyd ändert die initiale Steifigkeit der Zellen und unterdrückt passive Stressrelaxationen durch irreversible Vernetzung des Zytoskeletts. Y27632 ist ein Rho-Kinase Inhibitor, der Aktin Stressfasern und somit auch Teile der Zellkontraktilität zerstört [58]. Abbildung 4.61 (links) zeigt den Einfluss der Wirkstoffe auf den Schubmodul. Glutaraldehyd führt zu einer ausgeprägten Versteifung der Zellen um einen Faktor 10-20. Y27632 hat hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die Größe des Schubmoduls. Um die Abhängigkeit der Schubmodule von der Deformation besser vergleichen zu können werden in Abbildung 4.61 (rechts) die relativen Schubmodule  $\frac{G}{G(\gamma_0=0,02)}$  als Funktion der Deformation aufgetragen. Für Deformationen  $\gamma_0 < 0,2-0,3$  gibt es keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Für größere Deformationen kommt es bei Glutaraldehyd zu einer stärkeren Abnahme des Schubmoduls mit der Deformation bzw. zu einer Ablösung der Zellen von der Glasplatte. Im Falle von Y27632 versagt die Zelladhäsion für kleine Deformationen von  $\gamma_0=0,2-0,3$ . Somit kann der Einfluss von Y27632 auf die Zellantwort bei großen Oszillationsamplituden nicht untersucht werden.

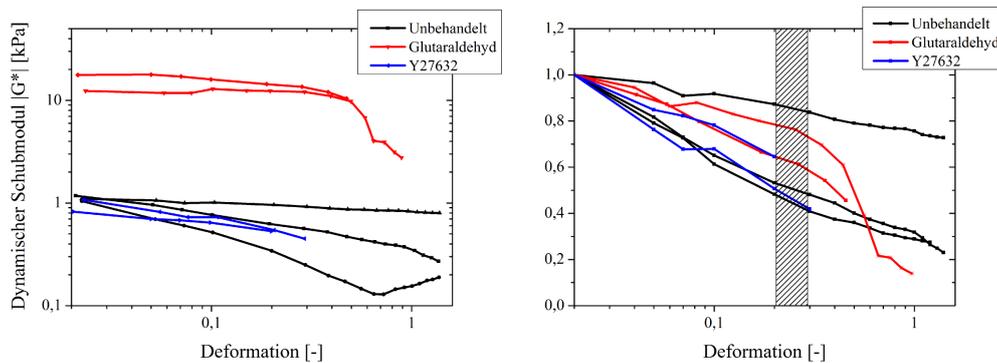


Abbildung 4.61.: Links: Dynamischer Schubmodul als Funktion der Deformation (schwarz: unbehandelte Zellen, rot: Glutaraldehyd, blau: Y27632). Glutaraldehyd führt zu einer Versteifung der Zellen um den Faktor 10-20. Y27632 ändert die Absolutwerte des Schubmoduls nicht. Rechts: Relativer Schubmodul  $\frac{G}{G(\gamma_0=0,02)}$  als Funktion der Deformation (schwarz: unbehandelte Zellen, rot: Glutaraldehyd, blau: Y27632). Für Deformationen  $\gamma_0 < 0,2-0,3$  nimmt der Schubmodul für behandelte und unbehandelte Zellen mit steigender Deformation in gleicher Weise ab. Für größere Deformationen zeigen glutaraldehydbehandelte Zellen einen wesentlich stärkeren Abfall des Schubmoduls. Die Zellen zeigen also eine ausgeprägtere Abnahme der Steifigkeit. Im Falle von Y27632 kommt es zu einem Versagen der Adhäsion. Somit können keine größeren Deformationen angelegt werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Fourieranalyse und der verallgemeinerten Module vorgestellt.

- Glutaraldehyd

Abbildung 4.62 zeigt die Intensitäten des ersten (links) und des zweiten (rechts) Obertons als

Funktion der Deformationsamplitude. Der Beitrag des ersten Obertons steigt mit der Defor-

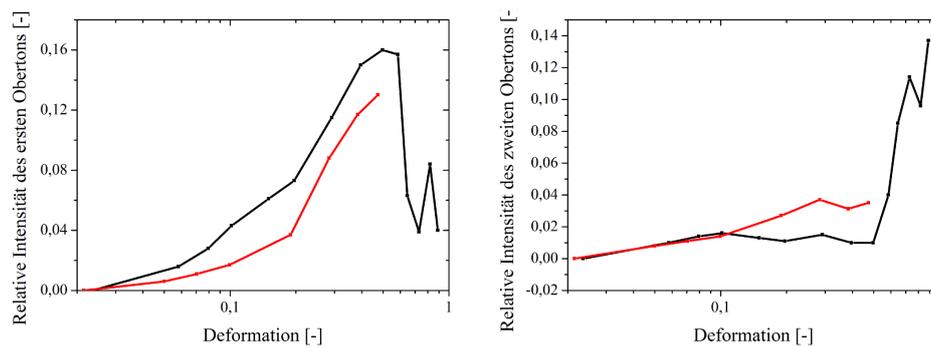


Abbildung 4.62.: Ergebnisse der Fourierreologiemessungen an mit Glutaraldehyd behandelten Zellen. Links: Intensität des ersten Obertons als Funktion der Deformationsamplitude. Die Intensität steigt bis  $\gamma_0 \approx 0,5$  an. Bei einer Messung lösen sich die Zellen bei dieser Deformation. Bei der zweiten Messung erfolgt eine Abnahme der Intensität mit der Deformation. Die maximalen Beiträge der asymmetrischen Nichtlinearität liegen bei 0,13-0,16. Rechts: Intensität des zweiten Obertons als Funktion der Deformationsamplitude. Für Deformationsamplituden  $\gamma_0 < 0,5$  treten nur geringe Beiträge  $I < 0,04$  der symmetrischen Nichtlinearität auf. Für größere Deformationen (schwarz) steigt die Intensität stark an. Die maximale Intensität liegt bei  $I \approx 0,13$ .

mationsamplitude bis  $\gamma_0 = 0.5$  an. Danach nimmt der Beitrag für eine Messung ab (schwarz), die andere Messung zeigte ein Abreißen der Zellen (rot). Die maximalen Intensitäten liegen bei  $I \approx 0,13-0,16$ . Der zweite Oberton zeigt einen sehr geringen Beitrag  $I < 0,04$  für  $\gamma_0 < 0,5$ . Eine Messung zeigt einen starken Anstieg des Beitrags für  $\gamma_0 > 0,5$ . Die maximale Intensität liegt bei  $I \approx 0,13$ . Abbildung A.2 (Anhang) zeigt die verallgemeinerte Module  $G_s$  und  $G_L$ . Beide Schubmodule sind um einen Faktor 10 größer, als für nichtbehandelte Zellen.  $G_s$  und  $G_L$  nehmen mit steigender Deformation ab. Der Nichtlinearitätsindex L (Siehe Abbildung 4.63) ist bis zu einer Deformationsamplitude von  $\gamma_0 \approx 0,1$  nahezu konstant bei  $I \approx 1$ . Für größere Deformationen nimmt der Index zu bis  $L = 1,7-2,5$ .

- Rho Kinase Inhibitor Y27632

Abbildung 4.64 zeigt die Intensitäten des ersten (links) und des zweiten (rechts) Obertons als Funktion der Deformationsamplitude. Y27632 führt zu einer Auflösung der Stressfasern und einer damit verbundenen Schwächung der Adhäsion. Daher lösen sich die Zellen auch schon bei relativ kleinen Deformationen  $\gamma_0 = 0,2-0,3$  von den Glasplatten. Die symmetrische Nichtlinearität ist bis zu einer Deformationsamplitude von  $\gamma_0 \approx 0,1$  konstant und steigt für größere  $\gamma_0$  stark an bis zu Intensitäten von  $I = 0,09-0,1$ . Der Beitrag der symmetrischen Nichtlinearität wächst in der semilogarithmischen Auftragung linear mit steigender Deformation. Abbildung A.3 zeigt die verallgemeinerte Module  $G_s$  und  $G_L$ . Beide Schubmodule sind kleiner, als für nichtbehandelte Zellen.  $G_s$  und  $G_L$  nehmen mit steigender Deformation ab. Der Nichtlinearitätsindex L (Siehe Abbildung 4.65) ist bis zu einer Deformationsamplitude

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

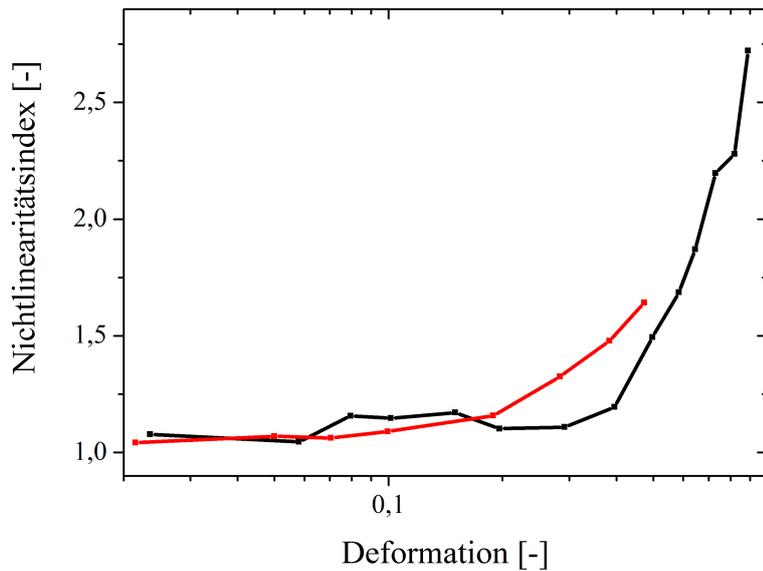


Abbildung 4.63.: Nichtlinearitätsindex  $L$  für mit Glutaraldehyd behandelte Zellen als Funktion der Deformationsamplitude.  $L$  ist bis zu einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,1$  konstant gleich 1. Für größere Deformationen erfolgt eine Zunahme auf  $L=1,7-2,5$ .

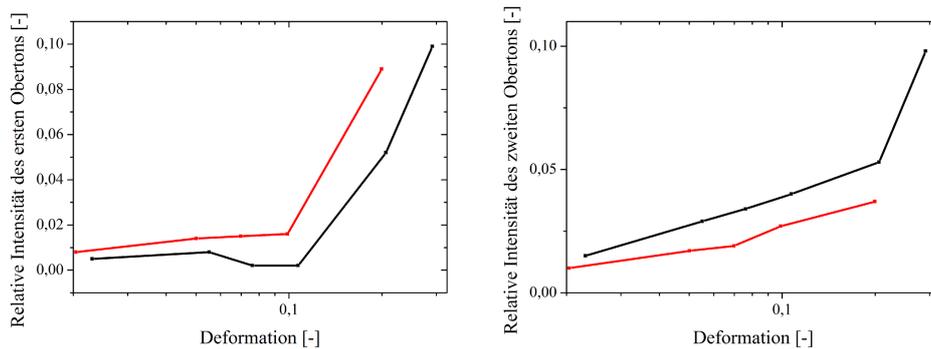


Abbildung 4.64.: Ergebnisse der Fourieranalyse der Messungen an mit Y27632 behandelten Zellen. Links: Intensität des ersten Obertons als Funktion der Deformationsamplitude. Die Intensität ist bis  $\gamma_0 \approx 0,1$  konstant und steigt für größere Deformationen stark an. Die maximal realisierbaren Deformationen liegen bei  $\gamma_0 \approx 0,3$ . Die maximalen Beiträge der asymmetrischen Nichtlinearität liegen bei 0,09-0,1. Rechts: Intensität des zweiten Obertons als Funktion der Deformationsamplitude. In der semilogarithmischen Auftragung steigt der Beitrag der symmetrischen Nichtlinearität für Deformationen  $\gamma_0 < 0,2$  linear an. Die Intensitäten liegen im Bereich von 0,03-0,05.

von  $\gamma_0 \approx 0,2$  nahezu konstant bei  $L \approx 1$ . Für größere Deformationen steigt Index in einer Messung auf zu bis  $L=1,9$ . Bei der zweiten Messung lösten sich die Zellen von den Platten.

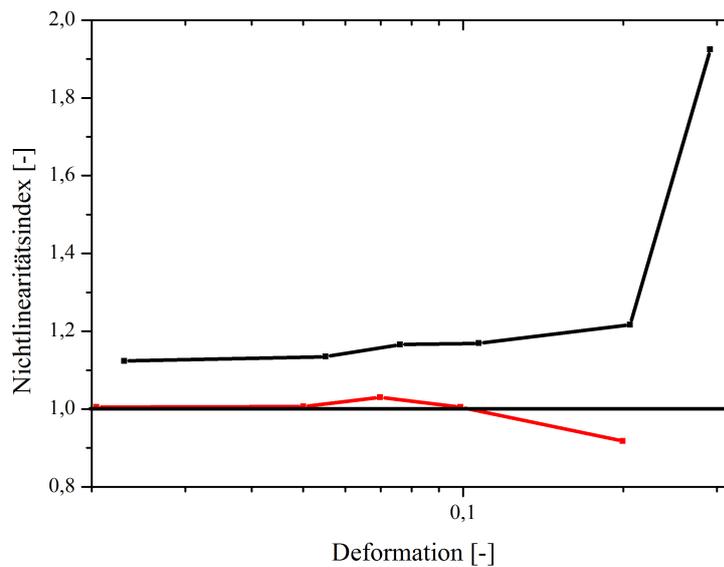


Abbildung 4.65.: Nichtlinearitätsindex  $L$  als Funktion der Deformationsamplitude für mit Y27632 behandelte Zellen.  $L$  ist bis zu einer Deformation von  $\gamma_0 \approx 0,2$  konstant. Für größere Deformationen (schwarz) erfolgt eine sprunghafte Zunahme auf  $L=1,9$ .

#### 4.4.6.1. Diskussion

Die nichtlineare Antwort von Fibroblasten ändert sich durch die Verwendung der pharmakologischen Wirkstoffe Glutaraldehyd und Y27632.

Glutaraldehyd führt zu einer festen Vernetzung (Fixierung) des gesamten Zytoskeletts, wodurch es passive Relaxationen in Form von Filamentgleiten und Ablösen von Vernetzern unterdrückt. Der Schubmodul der fixierten Zellen ist bei Verwendung einer 2%-igen Glutaraldehyd Lösung 10-20 mal so groß, wie der Schubmodul unbehandelter Zellen [127]. Mit steigender Oszillationsamplitude kommt es zu einer Abnahme des Schubmoduls. Diese Abnahme wird ab einer Deformation von 0,3 sehr viel ausgeprägter als für Wildtypzellen oder es kommt sogar zu einem Versagen der Adhäsion bzw. der Netzwerkstruktur des Zytoskeletts. Ohne Glutaraldehyd kann eine Stressrelaxation erfolgen, und die Zellen widerstehen Deformationen bis zu  $\gamma_0=1,4$ . Wird das Zytoskelett fixiert, so wird die Zellsteifigkeit für kleine Deformationen wesentlich größer, die Zelle wird aber auch fragiler und die Netzwerkstruktur wird schon für wesentlich kleinere Deformationen als im nicht fixierten Fall zerstört. Dies betont die Rolle von Relaxationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der mechanischen Integrität lebender Zellen unter dem Einfluss von Oszillationen mit großen Amplituden. Ähnliches wird auch für die mechanische Vorspannung in Zellen beobachtet. Wird die Vorspannung größer, so steigt die Zellsteifigkeit für kleine Stimuli, die Zelle wird jedoch auch fragiler [113].

Y27632 führt zu einem Versagen der Zelladhäsion bei Deformationsamplituden von 0,2-0,3. Ob

## 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

---

die Adhäsion auf extra- oder intrazellulärer Seite zerstört wird kann anhand der Daten nicht entschieden werden. Y27632 wurde erst vor Beginn der Messung dazugegeben, so dass sich Adhäsionskontakte bereits gebildet hatten. Diese waren eventuell nicht stabil genug, um große Oszillationsamplituden zu tolerieren. Im Rahmen der Messung zur Charakterisierung der Nichtlinearitäten von 3T3 Wildtypzellen sollte die Abhängigkeit der auftretenden Nichtlinearitäten von der Anregungshistorie untersucht werden. Es sollten ursprünglich auch Experimente unternommen werden, in denen oszillatorische Messungen beginnend bei einer Deformationsamplitude von 0,8 mit stufenweise kleiner werdender Amplitude durchgeführt werden sollten. Die Zelladhäsion zu Beginn einer Messung ist jedoch nicht ausreichend stark, um eine solche Amplitude zu tolerieren. Beginnt man bei kleinen Amplituden und vergrößert diese langsam, so können die Zellen eine maximale Deformation von bis zu 1,4 tolerieren. Dies weist auf eine Verstärkung der Adhäsionskontakte oder eine Anpassung der Netzwerkstruktur des Zytoskeletts während der Messung hin. Es ist möglich, dass diese Mechanismen durch Y27632 unterdrückt werden, wodurch die Zellen nur kleine Stimuli tolerieren.

Die Adhäsion versagt an dem Punkt ( $\gamma_0 = 0,2-0,3$ ), an dem die intrazyklische Nichtlinearität einsetzt. Eine mögliche Erklärung ist, dass Y27632 die Bildung der Strukturen verhindert, die für die intrazyklische Nichtlinearität verantwortlich sind. Diese Strukturen wären somit entscheidend dafür, dass Zellen große Stimuli tolerieren können. Es wurde gezeigt, dass Y27632 große Aktinstrukturen, u.a. Stressfasern, auflöst und die Zelladhäsion schwächt [52, 58]. Daher kann spekuliert werden, dass eine Scherung bzw. Streckung großer Aktinstrukturen zu den intrazyklischen Nichtlinearitäten beiträgt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit theoretischen und experimentellen Arbeiten an Aktinellen, die für große Stimuli die Ausbildung eines sogenannten mechanischen Stresspfades voraussagen, der den Großteil der mechanischen Last trägt [199]. Es kommt somit nicht zu einer homogenen (affinen), sondern zu einer nichtaffinen Belastung der Netzwerkstruktur. Stresspfade können netzwerkdurchziehende Strukturen aus Filamenten und Vernetzern sein. Die Ausbildung des jeweiligen Stresspfades hängt vom mechanischen Stimulus (Größe und Rate) und der Netzwerkstruktur ab [199]. In [200, 201] wird gezeigt, dass eine an die Zelle angelegte lokale mechanische Spannung zu einer lokalisierten Deformation innerhalb der Zelle führt, nicht jedoch zu einer homogenen Belastung. Dies ist vor allem wichtig für die Mechanobiologie. Sollen Zellen einen extrazellulären mechanischen Stimulus in eine biochemische Antwort übersetzen, so ist eine Kopplung des Extrazellulärraums an den Nukleus oder an spezielle Proteinstrukturen unerlässlich. Um eine schnelle Signalübertragung zu gewährleisten sind vorgespannte Filamentpfade entscheidend [200]. Solche Stresspfade könnten also auch entscheidend für die mechanische Antwort der Zelle auf große Stimuli und im speziellen die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität sein.

### 4.4.7. Einfluss der Oszillationszeit

Zu Beginn jeder Oszillationsmessung gibt es eine Zeitspanne, die das Messsystem und die Zellen benötigen, um einen stabilen Zustand zu erreichen (Einregelphase Abschnitt 4.1.3 und zyklische

Abnahme des Schubmoduls Abschnitt 4.4.2).

Um ausschließen zu können, dass es sich bei den in den vorherigen Abschnitten vorgestellten Nicht-linearitäten um transiente Vorgänge handelt, wurden Langzeitoszillationen im langsamen Deformationsmodus (DL) mit konstanter Deformationsamplitude durchgeführt. Eine Langzeitmessung bestand, in Analogie zu den in vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Oszillationsmessungen (Protokoll Siehe Anhang A.3.1), aus einer Aneinanderreihung von Oszillations- und Pausezyklen mit einer Dauer von je zwei Minuten. Zu Beginn der Messung wurde die Amplitude sukzessive erhöht (analog zum Protokoll aus Anhang A.3.1), bis die finale, zu untersuchende Amplitude ( $\gamma_0=0,05$ ,  $\gamma_0=0,1$  und  $\gamma_0=0,15$ ) erreicht wurde, die in den darauffolgenden Oszillationen konstant gehalten wurde. Die gesamte Messzeit betrug 2 Stunden, ab Erreichen der finalen Amplitude. Die Experimente bei  $\gamma_0=0,1$  und  $\gamma_0=0,15$  wurden in Zusammenarbeit mit Julia Flesch durchgeführt. Im Folgenden werden die zeitlichen Änderungen des dynamischen Schubmoduls  $|G^*|$  und des ersten und zweiten Obertons bei konstanter Anregungsamplitude betrachtet. Die Auftragungen beinhalten alle durchgeführten Oszillationen, wobei bei  $t=0$  die finale Amplitude erreicht ist. Der dynamische Schubmodul ist für die ersten zwanzig Minuten ( $t=0-20$  min) konstant (Abbildung 4.66). Für längere Messzeiten ändern sich die Absolutwerte des Schubmoduls. Es zeigen sich sowohl monoton fallendes, steigendes, als auch oszillatorisches Verhalten. Die Änderungen können bis zu 300 Pa groß werden.

Der erste Oberton ändert sich für Messzeiten kleiner als zwanzig Minuten nur geringfügig (weni-

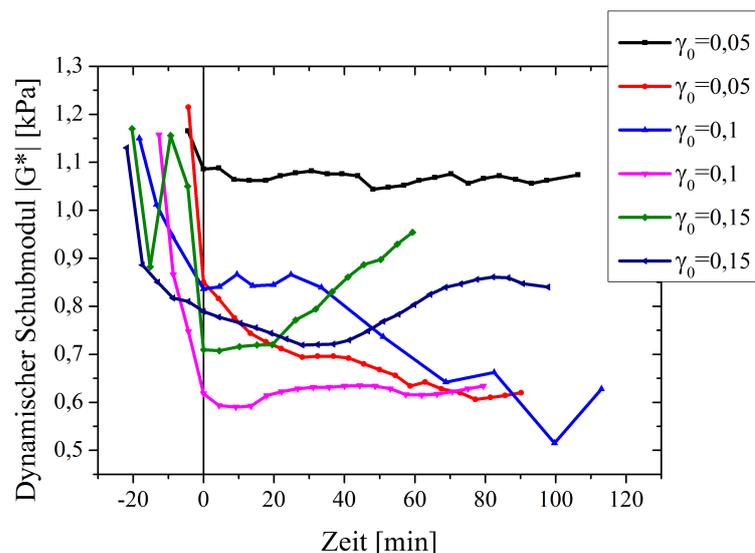


Abbildung 4.66.: Dynamischer Schubmodul als Funktion der Zeit für Langzeitmessungen mit Deformationsamplituden von  $\gamma_0=0,05$  (schwarz + rot),  $\gamma_0=0,1$  (blau + rosa) und  $\gamma_0=0,15$  (grün und dunkelblau). Für  $t<0$  wird die Amplitude sukzessive erhöht, bis bei  $t=0$  die finale Amplitude erreicht ist. In den ersten zwanzig Minuten sind die Schubmodule konstant. Für größere Messdauern ergeben sich deutliche Änderungen, die von monoton steigend oder fallend zu oszillatorisch reichen.

## 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

ger als 1%) (Abbildung 4.67, links). Für größere Messzeiten kommt es jedoch mitunter zu relativ starken Schwankungen, es zeigen sich Anstiege und Abfälle der Intensität. Die Änderungen liegen im Bereich von maximal 0,05. Der zweite Oberton zeigt ein einheitlicheres Verhalten (Abbildung 4.67, rechts). Die Intensität steigt mit der Zeit monoton an, wobei die Änderungen für eine Messdauer von zwei Stunden bei etwa 1% liegt. Es stellt sich die Frage, wodurch die Änderungen des

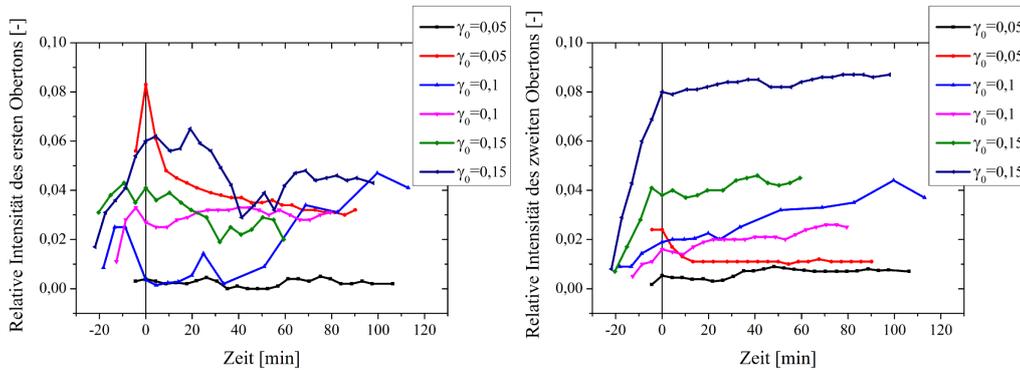


Abbildung 4.67.: Links: Relative Intensität des ersten Obertons als Funktion der Zeit. Für kleine Messzeiten ( $t < 20$  min) ergeben sich nur geringfügige Änderungen der Intensität (ausgenommen ist die Messung in rot, die eine größere Änderung aufweist). Für größere Messzeiten können sich signifikante Änderungen von einigen Prozent ergeben. Rechts: Relative Intensität des zweiten Obertons als Funktion der Zeit. Die Intensitäten steigen monoton mit der Zeit. Für eine Messdauer von zwei Stunden ergibt sich ein maximaler Anstieg von etwa 1%, was für die Fragestellung dieser Arbeit vernachlässigbar ist. Eine Ausnahme stellt die Messung in rot dar. Hier zeigt sich für kleine Messzeiten eine Abnahme der Intensität. Für große Zeiten ergibt sich eine konstante Intensität. Der Grund für die Abweichung in der Messung (rot) ist unbekannt.

Schubmoduls und der Obertöne zustande kommen. In vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass eine Änderung der Normalkraft (Siehe Abschnitt 4.4.1.1) und Änderungen der mittleren Deformation (Verschiebung des Nullpunktes, Siehe Abschnitt 4.4.2.3) Einfluss auf die besagten Größen haben. Abbildung 4.68 zeigt die Änderung der Normalkraft pro Zelle (links) und die mittlere Deformation (rechts) als Funktion der Zeit für die in diesem Abschnitt vorgestellten Messungen. Die Normalkraft ändert sich um etwa 300-500 nN auf einer Zeitskala von etwa einer Stunde. Die mittlere Deformation ändert sich maximal um etwa 0,03-0,07. Es zeigt sich keine einfache Abhängigkeit zwischen den Änderungen der Schubmodule, der Obertöne, der Normalkraft und der mittleren Deformation. Es existieren Korrelationen, so zum Beispiel zwischen der Deformation und der Normalkraft. Wird eine konstante Schubspannung an eine Zellmonoschicht angelegt, so steigt die Deformation mit der Zeit an (Kriechversuch, Siehe Abschnitt 4.2, Abbildung 4.69). Für große Deformationen nimmt die Normalkraft für Zellen mit steigender Deformation ab. Solche auftretenden negativen Normalkräfte sind charakteristisch für Biopolymersysteme [176, 202].

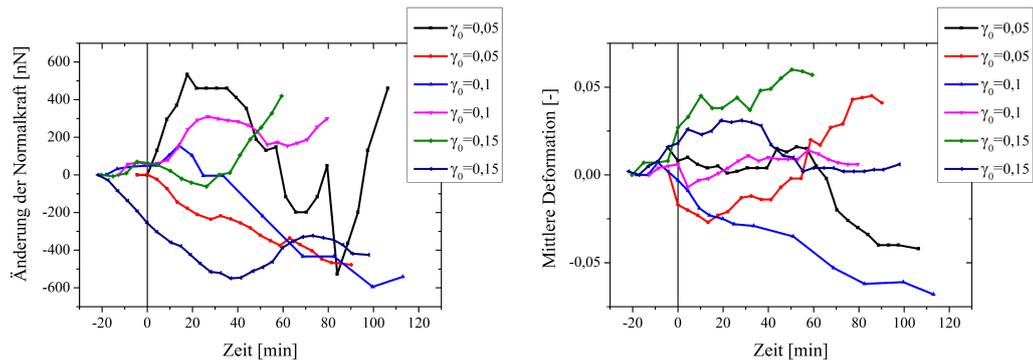


Abbildung 4.68.: Normalkraft (links) und mittlere Deformation (rechts) für Langzeitmessungen bei Deformationsamplituden von  $\gamma_0=0,05$  (schwarz + rot),  $\gamma_0=0,1$  (blau + rosa) und  $\gamma_0=0,15$  (grün und dunkelblau). Links: Änderung der Normalkraft pro Zelle als Funktion der Zeit. Die maximalen Änderungen liegen zwischen  $\pm 300$ -600 nN auf einer Zeitskala von etwa einer halben Stunde. Rechts: Mittlere Deformation als Funktion der Zeit. Es zeigt sich eine Änderung der mittleren Deformation mit der Zeit (Verschiebung des Oszillationsnullpunkts) (vergleiche 4.4.2.2).

#### 4.4.7.1. Diskussion

Um auszuschließen, dass die beschriebenen Nichtlinearitäten nur transiente Effekte sind, wurden Messungen analog zu Oszillationsmessungen aus vorherigen Abschnitten nur mit konstanter Deformationsamplitude über eine Zeitdauer von zwei Stunden durchgeführt.

Der dynamische Schubmodul ändert sich mit der Zeit um maximal 300 Pa, wobei sowohl monoton fallendes, monoton steigendes, als auch oszillatorisches Verhalten beobachtet wurde. In Messungen mit steigender Amplitude (Abschnitt 4.4.2.1) ergeben sich im gleichen Zeitraum ausschließlich monotone Abnahmen des Schubmoduls um bis zu 800 Pa. Somit ist diese Abnahme zum einen wesentlich ausgeprägter als die zeitliche Variation und zum anderen für alle Monoschichten qualitativ gleich. Die zeitliche Variation kann zu den unterschiedlich ausgeprägten Abnahmen des Schubmoduls von Monoschicht zu Monoschicht beitragen (Siehe Abschnitt 4.4.2.1), ändert aber nicht die Abhängigkeit des Schubmoduls von der Anregungsamplitude.

Der erste und zweite Oberton ändern sich ebenfalls mit der Zeit. Der erste Oberton zeigt dabei eine stärkere Variation um bis zu 0,05. Analog zum Schubmodul können Zu-, Abnahmen und Oszillationen der Intensität beobachtet werden. Wird die Oszillationsamplitude sukzessive vergrößert ergibt sich jedoch eine einheitliche Abhängigkeit des ersten Obertons von der Anregungsamplitude (Siehe Abschnitt 4.4.5). Nur die Absolutwerte der Intensitäten variieren von Monoschicht zu Monoschicht. Der hier beobachtete Zeiteffekt kann eine Grund für diese Variation sein.

Der zweite Oberton nimmt in den hier vorgestellten Langzeitmessungen für alle Messungen um etwa 0,01 in zwei Stunden zu. Diese geringen Änderungen sind somit vernachlässigbar.

Es stellt sich die Frage, woher die Änderungen in den Schubmodulen und Obertönen kommen. In vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, dass die Normalkraft und die mittlere Deformation einen

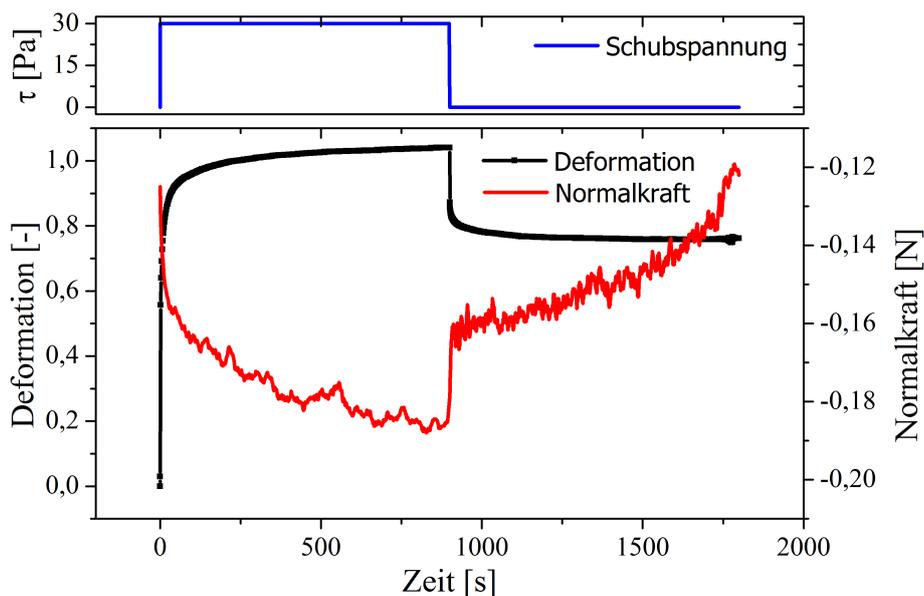


Abbildung 4.69.: Kriechversuch an einer Zellmonoschicht. Oben: zeitlicher Verlauf der Schubspannung. Für 900 Sekunden wird eine konstante Schubspannung von 30 Pa angelegt. Danach wird die Schubspannung auf null reduziert. Unten: Deformation (schwarz) und Normalkraft (rot) als Funktion der Zeit. Aufgrund der konstanten Schubspannung wächst die Deformation mit der Zeit an. Sie folgt dem üblichen Potenzgesetz  $\propto t^\beta$  [143, 160]. Aufgrund der Deformation kommt es zu einer abnehmenden Normalkraft, die durch den Zug der Zellen an der oberen Platte hervorgerufen wird. Die Normalkraft wird wieder größer, sobald die Deformation, aufgrund der verschwindenden Schubspannung, kleiner wird. Das System strebt einem neuen Nullpunkt zu, sowohl in Bezug auf die Deformation, als auch auf die Normalkraft. Der neue Nullpunkt entsteht durch die plastische Deformation der Zellen.

Einfluss auf Schubmodule und Obertöne haben können. Die Normalkraft und die mittlere Deformation ändern sich ebenfalls mit der Zeit.

Ein Grund für eine Änderung der Normalkraft könnten Temperaturschwankung und eine damit verbundene Normalkraftänderung aufgrund der thermischen Ausdehnung der Messgeometrie sein. Dies wurde jedoch durch eine Gegenüberstellung von Temperatur- und Normalkraftänderungen während mehrerer Messungen ausgeschlossen [203]. Die Änderungen der Normalkraft pro Zelle liegen im Bereich von 300-500 nN auf einer Zeitskala von etwa einer halben Stunde. Sowohl die Größe der Änderung, als auch die Zeitskala liegen im Bereich von aktiven Zellantworten in Form von Änderungen der myosininduzierten Zellkontraktilität [108]. Änderungen in der Kontraktilität bedingen Änderungen im Schubmodul bzw. in der Zellsteifigkeit [106, 108, 109].

Änderungen des Schubmoduls bzw. der Steifigkeit lebender Zellen mit der Zeit sind in der Literatur beschrieben. Na et al. zeigen, dass glatte Muskelzellen auf biaxiale Streckung mit einer kurzfristigen Versteifung auf der Zeitskala von 2 Minuten reagieren, bevor die ursprüngliche Stei-

figkeit wieder angenommen wird [145]. Schillers et al. beschreiben oszillatorische Änderungen in der Zellelastizität, ebenfalls auf einer Zeitskala von 2-3 Minuten [204]. Die Änderungen liegen in beiden Arbeiten in der Größenordnung von 300-1000 Pa. Schillers et al. zeigen, dass die Oszillationen in der Zellelastizität von oszillatorischer Myosinaktivität, und damit der Kontraktilität, hervorgerufen werden [204].

Schillers et al. betrachten die Änderungen der Zellkontraktilität auf der Ebene der einzelnen Zelle. Hier wird die Änderung der Normalkraft jedoch von allen Zellen der Monoschicht kollektiv hervorgerufen. Es muss somit eine Synchronisierung der Kontraktilität vorhanden sein. Wäre dies nicht der Fall, so würde die Kontraktilität eines Teils der Zellen abnehmen und eines weiteren Teils der Zellen zunehmen, so dass im Mittel keine signifikante Änderung zu verzeichnen sein dürfte. Die Synchronisierung kann über die kollektive mechanische Anregung aller Zellen bewerkstelligt werden. Eine analoge Synchronisierung findet sich bei der Reorientierung von Aktinfilamenten innerhalb von Zellen bei kollektiver Streckung vieler Zellen auf einem flexiblen Substrat. Hier orientieren sich durch den kollektiven Stimulus alle Zellen in die gleiche Richtung [59, 166].

Die Zeitskala der in dieser Arbeit beschriebenen Änderung ist wesentlich größer (Faktor 20-30), als die Zeitskala von Schillers und Na et al. [145, 204]. Sind Motorproteine für die Änderungen verantwortlich, so handelt es sich um aktive Prozesse, die temperaturabhängig sind. Die Unterschiede können daher von den unterschiedlichen Messtemperaturen herrühren. Na und Schillers messen bei 37° C, während hier bei 21° C gemessen wurde.

Neben der Normalkraft kann auch die mittlere Deformation den Schubmodul (Siehe Abschnitt 4.4.2.2) beeinflussen. Die mittlere Deformation kann aber auch die Normalkraft beeinflussen.

Zusammenfassend zeigen die in diesem Abschnitt vorgestellten Ergebnisse, dass sich zellmechanische Größen, wie der Schubmodul und die Intensität der Obertöne mit der Zeit bei gleichbleibender Oszillationsamplitude ändern. Aufgrund der wechselseitigen Abhängigkeiten kann mit den vorhandenen Daten der Grund hierfür nicht ermittelt werden. Die zeitlichen Änderungen können zumindest teilweise die Variationen zwischen Messungen an verschiedenen Monoschichten erklären, sie sind jedoch nicht derart ausgeprägt, dass sie die Ergebnisse der nichtlinearen Analyse verzerren. Darüber hinaus zeigt sich, dass die Nichtlinearitäten keine transienten Vorgänge sind. Speziell der zweite Oberton, und damit die symmetrische Nichtlinearität, ist zeitlich sehr stabil. Die Asymmetrie zeigt eine ausgeprägtere Variation. Die Amplitude ist jedoch so gering und die Zeitskala so groß, dass die zeitlichen Änderungen der Intensität nicht derart ausgeprägt sind, dass sie die Ergebnisse der Fourierreologie in Bezug auf die Amplitudenabhängigkeit der Asymmetrie verfälschen, da der Amplitudeneinfluss wesentlich stärker ist.

Der Einfluss der Zellkontraktilität auf die zeitabhängige Zellmechanik kann in Zukunft durch Langzeitmessungen mit pharmakologischen Wirkstoffen, die die Kontraktilität beeinflussen, näher untersucht werden. Dies könnte Aufschlüsse über die Grundlagen der zeitlichen Variation liefern.

### 4.4.8. Energiedissipation in LAOS-Anregung lebender Fibroblasten

Bei der mechanischen Anregung viskoelastischer und plastischer Materialien geht ein gewisser Anteil der aufgewandten mechanischen Arbeit als dissipierte Energie verloren. Im linearen Regime sind der viskose Schubmodul und der Phasenwinkel ein Maß für die dissipierte Energie. Im nicht-linearen Regime ist dies nicht mehr zwingend der Fall. Die dissipierte Energie pro Volumen kann allgemein über die eingeschlossene Fläche innerhalb der Lissajouskurven berechnet werden:

$$\epsilon = \frac{E}{V} = \oint \tau d\gamma \quad (4.32)$$

Die Dissipation in der LAOS-Anregung lebender Zellen und die zugrundeliegenden Mechanismen können Informationen über die Grundlagen der nichtlinearen Zellmechanik und im speziellen der inter- und intrazyklischen Ab- und Zunahme der linearen oder differentiellen Module liefern.

Die Berechnungen wurden mit Hilfe der numerischen Integration in Matlab durchgeführt, wobei eine Mittelung über 20 Oszillationsperioden im stationären Zustand erfolgte. Zur Berechnung des Zellvolumens wurden Zellen vereinfachend als Kugeln mit einem mittleren Radius von 12  $\mu\text{m}$  angenommen.

Die Dissipation pro Oszillationsperiode nimmt mit steigender Deformationsamplitude zu (Abbildung 4.70, links). Der Anstieg folgt einem Potenzgesetz  $P \propto \gamma^\phi$ , wobei  $\phi = 1,78 \pm 0,28$  ( $n=13$ ). Es zeigt sich kein Einfluss des Anregungsmodus. Trägt man jedoch die Dissipation als Funktion der Schubspannungsamplitude auf, so ergibt sich eine Separierung anhand der Anregung. Die geringste Dissipation erhält man für sinusförmige Schubspannungsanregung, gefolgt von langsamer Deformation, schneller Deformation und cosinusförmiger Schubspannung. Es finden sich nur zwei Ausnahmen. Eine Messung aus langsamer Deformationsanregung findet sich innerhalb der cosinusförmigen Messungen, eine weitere innerhalb der sinusförmigen Schubspannung. Es handelt sich um die abweichenden Messungen, die bereits in Abschnitt 4.4.1.1 diskutiert wurden. Bei ungefähr gleicher maximaler Rate ( $\dot{\gamma}_{max,SS} \approx \dot{\gamma}_{max,DL}$ ) weist die schubspannungsgesteuerte Messung eine etwas niedrigere Dissipation auf. Ansonsten wird die Dissipation für eine feste Schubspannungsamplitude umso größer, je größer die maximale Deformationsrate in den initialen Zyklen ist. Die Dissipation pro Oszillationsperiode nimmt mit steigender Frequenz zu (Abbildung 4.71). Der Anstieg kann mit einem Exponentengesetz  $P \propto f^\theta$  angepasst werden, wobei  $\theta \approx 0,3$ . Der Exponent ist für Deformationsamplituden  $\gamma_0 < 0,2$  konstant.

#### 4.4.8.1. Diskussion

Die Dissipation von Fibroblasten unter oszillatorischer Anregung nimmt mit steigender Deformationsamplitude unabhängig von der genauen Anregungsart zu. Betrachtet man die Dissipation als Funktion der Schubspannungsamplitude, so zeigt sich, dass für eine Schubspannungsamplitude die Dissipation umso größer ist, je größer die maximale Scherrate ist. Dies lässt sich folgendermaßen verstehen: je größer die Scherrate ist, umso ausgeprägter ist die Abnahme des Schubmoduls

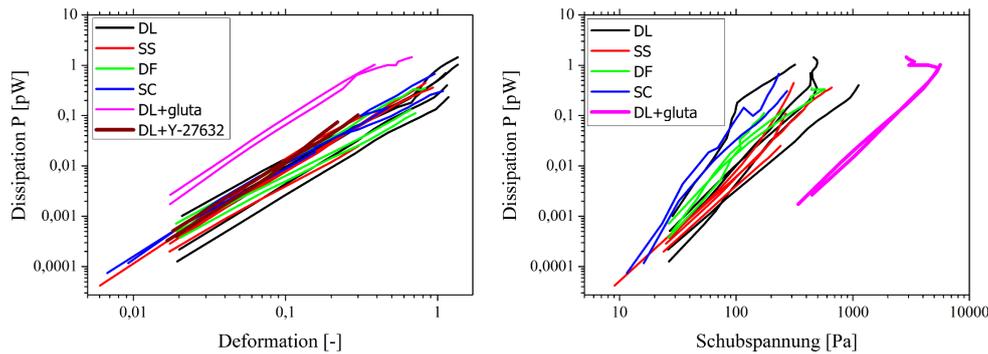


Abbildung 4.70.: Dissipation als Funktion der Deformationsamplitude (links) und der Schubspannungsamplitude für Experimente mit langsamer Deformation (DL, schwarz), sinusförmiger Schubspannung (SS, rot), schneller Deformation (DS, grün), cosinusförmiger Schubspannung (SC, blau), langsamer Deformation mit Glutaraldehyde (DL+gluta, magenta) und langsamer Deformation mit Y-27632 (DL+Y-27632, braun). Links: Die Dissipation steigt in allen Fällen mit der Deformation an. In der doppelt-logarithmischen Auftragung zeigt sich ein linearer Anstieg, der mit einer Potenzfunktion  $P \propto \gamma^\phi$  angepasst werden kann. Der mittlere Exponent liegt bei  $\phi = 1,78 \pm 0,28$  ( $n=13$ ). Es zeigt sich keine Separation nach der Anregung. Die Dissipation für mit Glutaraldehyd fixierte Zellen ist bei gegebener Deformation wesentlich größer als für unbehandelte Zellen, während sich durch Y-27632 kein wesentlicher Unterschied ergibt. Rechts: Die Dissipation steigt mit der Schubspannungsamplitude an. Hier zeigt sich eine Aufteilung der Ergebnisse nach Anregungsmodi (um diese besser zu Visualisieren werden die Ergebnisse mit Y27632 behandelten Zellen nicht gezeigt, da diese sich ohnehin nicht von den Wildtyp-Zellen unterscheiden). Die Dissipation nimmt beginnend mit sinusförmiger Schubspannung über langsame und schnelle Deformation, bis zu cosinusförmige Schubspannung zu. Zwei Messungen in langsamer Deformation weichen von diesem Verhalten ab. Diese Messungen wurden schon in Abschnitt 4.4.1.1 diskutiert.

(Siehe Abschnitt 4.4.2.1). Je kleiner der Schubmodul ist, umso größer ist die Deformation für eine gegebene Schubspannung. Für eine gegebene Schubspannung ist somit die Deformationsamplitude umso größer ist, je größer die Scherrate ist. Dies impliziert eine Verbindung zwischen der Abnahme des Schubmoduls und der Dissipation. Je größer die Abnahme des Schubmoduls ist, umso größer ist auch die Dissipation.

Die Abnahme des Schubmoduls wurde in vorherigen Abschnitten dem Ablösen von Vernetzerproteinen und der Filamentumordnung zugeschrieben. Eine analoge Argumentation erfolgte in [114]. Anhand der *inelastic glassy wormlike chain* wurde gezeigt, dass eine exponentielle Abnahme der Vernetzeranzahl mit steigender Amplitude erfolgt. Durch einen Deformationspuls kann eine Fluidisierung erfolgen, die zu einer Abnahme des Schubmoduls und einer gleichzeitigen Zunahme des Phasenwinkels und damit der Dissipation führt [114]. Die Abnahme des Schubmoduls wird dominiert von der vernetzerinduzierten Abnahme des elastischen Anteils  $G'$ . Nach Beendigung des

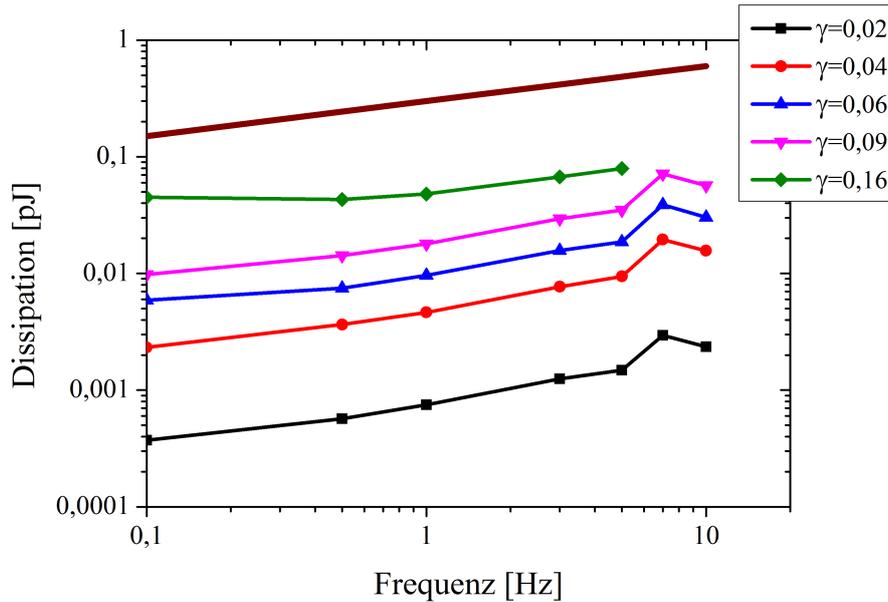


Abbildung 4.71.: Dissipation als Funktion der Frequenz für ein Experiment an einer Monoschicht mit schneller Deformation (DS). Für jede Deformation (Farbcodierung) wurden Messungen bei sieben Frequenzen durchgeführt (bei der größten Deformation lösten sich die Zellen von den Platten, weshalb nur fünf Frequenzen untersucht werden konnten). Die Dissipation steigt als Funktion der Frequenz an und folgt einem Exponentengesetz mit einem Exponenten von etwa 0,3 (braune Linie).

Deformationspulses findet eine Relaxation statt, bei der die Vernetzer wieder binden können, was einen Anstieg des elastischen Anteils bedingt und somit auch eine Abnahme des Phasenwinkels und der Dissipation. Somit gehen die Abnahme des elastischen Anteils des Schubmoduls aufgrund sinkender Vernetzeranzahl und steigende Dissipation Hand in Hand.

Moeendarbary et al. beschreiben das Zytoplasma als poroelastisches Material [205]. Das Zytoskelett wird dabei als elastisches Netzwerk beschrieben, das in eine wässrige Lösung eingebettet ist. Für große Deformationen und hohe Frequenzen kann es zu einer Verformung und Volumenänderung der Zelle kommen, die einen Fluss des Zytosols durch die Poren des Zytoskeletts notwendig macht. Dieser dissipationsbehaftete Mechanismus ist von der Netzwerkstruktur und im speziellen der mittleren Porengröße abhängig, die im Gegenzug aber auch die Zellsteifigkeit definiert [205]. Die Poroelastizität liefert somit eine weitere Kopplung zwischen der Netzwerkstruktur des Zytoskeletts und der mechanischen Dissipation.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen eine schwache Abhängigkeit der Dissipation  $P \propto f^{0,3}$  von der Frequenz  $f$ . In [57] wurde gezeigt, dass die Dissipation von Zellen unter uniaxialer Streckung umso größer wird, je größer die Streckrate ist. Kim et al. sagen auf der Grundlage eines theoretischen Modells ebenfalls eine ratenabhängige Dissipation von vernetzten Gelen voraus [206].

Die hier berechnete Dissipation lebender Fibroblasten liegt im Bereich von 0,0001 bis zu etwa einem Picojoule. Dies entspricht einer Leistung von  $\frac{1pJ}{2s} = 0,5 \text{ pW} = 5 \cdot 10^{-13} \text{ W}$ . In [207] wurde eine

Abschätzung der zellulären Dissipation von etwa  $6 \cdot 10^{-20}$  W vorgenommen, die somit um viele Größenordnungen niedriger ist. Die Abschätzung erfolgte für eine Zelle unter konstanter mechanischer Spannung und basierte auf der Auswertung eines klassisch viskoelastischen Körpers. Hier handelt es sich um eine Auswertung für oszillatorische Stimuli innerhalb des plastischen Regimes, in dem die Dissipation somit erwartungsgemäß wesentlich höher ist.

Im Folgenden soll überprüft werden, ob die Vernetzerdynamik für die beobachtete Dissipation verantwortlich sein kann. Um eine grobe Abschätzung der Vernetzeranzahl in einer Zelle zu erhalten wird das Zytoskelett als Aktinringel mit einer Maschenweite von 100 Nanometern (analog zum kortikalen Zytoskelett [39]) angesehen. Die Struktur wird vereinfachend als kubisch angenommen mit Vernetzerproteinen an allen Kanten der kubischen Netzwerkzellen. Dies ergibt eine Anzahl von Vernetzern  $N \approx \frac{V_{Fibroblast}}{V_{kubischeZelle}} = \frac{\frac{4}{3}\pi(12\mu m)^3}{(100nm)^3} \approx 7 \cdot 10^6$  in guter Übereinstimmung mit Abschätzungen in [57]. Zu beachten ist, dass die angenommene Aktintopologie nur im Bereich der Zellmembran als kortikales Zytoskelett vorkommt [39]. Innerhalb der Zelle finden sich längere Filamente und Stressfasern. Letztere enthalten ebenfalls viele Vernetzerproteine, wie z.B.  $\alpha$ -Aktinin und Myosin, die periodisch konzentriert vorkommen [44]. Darüber hinaus gibt es auch Vernetzerproteine zwischen verschiedenen Zytoskelettstrukturen, die in der Abschätzung nicht vorkommen. Somit kann die vereinfachende Annahme eines einfach kubischen Aktinskeletts gerechtfertigt werden. Unter der Annahme dass das Ablösen von Vernetzungsproteinen die gesamte Dissipation bedingt, kann die Anzahl der beteiligten Proteine abgeschätzt werden. Vernetzer haben Bindungsstärken von  $\approx 10k_B T$ , was einer Energie von  $4 \cdot 10^{-20}$  Joule entspricht. Es wurde gezeigt, dass die Dissipation in vernetzten Gelen um einen Faktor 100 größer ist, als die Bindungsenergie der Vernetzer, da beim Verlust eines Vernetzers zusätzlich Energie verloren geht, die in elastischer Verformung gespeichert war [57, 208]. Somit müssten sich pro Zellstreckung (halbe Oszillationsperiode) maximal  $0,5 \cdot \frac{10^{-12} J}{100 \cdot 4 \cdot 10^{-20} J} \approx 10^5$  Vernetzer ablösen. Dies bedeutet, dass sich für die maximal beobachtete Dissipation ständig etwa 1-2% der in der Zelle vorhandenen Vernetzer lösen und wieder binden müssen.

Neben dem Ablösen von Vernetzern existieren noch weitere Dissipationsmechanismen, wie z.B. das Konzept der versteckten Länge (*hidden length*) [209]. Die Grundidee ist, dass Teile des Netzwerks in einer verknäuelten Konformation mittels Vernetzern fixiert sind. Wird das Netzwerk deformiert, so trägt nur ein Teil der wirklichen Länge zur entropischen und enthalpischen Elastizität bei, was zu einer steifen Netzwerkreaktion führt. Oberhalb einer kritischen Kraft lösen sich Vernetzer und geben somit die versteckte Länge frei [210], was zu einer Kraftrelaxation und der Dissipation der Energie, die in der Reduktion entropischer Freiheitsgrade oder enthalpischer Streckung gespeichert war. Mikrotubuli und Aktinfilamente nehmen innerhalb der Zelle aufgrund der großen Persistenzlänge im Vergleich zur Konturlänge gerade Konformationen ein, die den Mechanismus der versteckten Länge unwahrscheinlich machen. Intermediärfilamente mit ihrer geringen Persistenzlänge wären mögliche Kandidaten. Dies würde auch erklären, dass Intermediärfilamente für die Zellstabilität unter großen Stimuli verantwortlich gemacht werden. Die versteckte Länge könnte es einer Zelle ermöglichen ihre Ruhelänge auf sehr kurzen Zeitskalen anzupassen und mechanische Energie zu dissipieren, die von außen zugeführt wird. Bisher wurde die versteckte Länge für Zellen und

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

---

Biopolymergele meist nur auf der Basis der Entfaltung von Vernetzerproteinen beschrieben, deren Rolle noch diskutiert wird [211, 212]. Einige Arbeiten zeigen einen vernachlässigbaren Beitrag zur Gelrheologie [206]. Andere Arbeiten weisen jedoch auf einen Beitrag der Domänenentfaltung in der Mechanotransduktion und in der *power law*-Rheologie hin [211, 212, 213]. Darüber hinaus kann die Domänenentfaltung auch zu einer abnehmenden Steifigkeit eines Gels beitragen [212]. Die in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse unterstützen die in vorherigen Abschnitten formulierte Vermutung, dass die nichtlineare Zellmechanik durch Filament- und Vernetzerdynamiken bestimmt wird. Die Dissipation wird nicht primär durch eine einfache Newton'sche Viskosität des Zytosols bedingt. Es existiert eine Kopplung zwischen der Zellelastizität und der Dissipation, wie sie auch schon in [142] postuliert wurde. Das Lösen von Vernetzern und die damit verbundene Abnahme der Zellelastizität bietet der Zelle die Möglichkeit mechanische Energie gezielt zu dissipieren ohne eine Zerstörung der Netzwerkstruktur in Kauf zu nehmen. Durch die Reversibilität der Bindung kann nach Beendigung des Stimulus eine Wiederherstellung der rigiden Netzwerkstruktur erfolgen. Im Falle eines oszillatorischen Stimulus kommt es wahrscheinlich zu einem stetigen Binden und Ablösen von Vernetzern, die zu einem Aufbau und einer Zerstörung metastabiler Substrukturen des Zytoskeletts führen. Somit kann die Zelle, abhängig von der Rate des Stimulus, auch auf sehr geringen Zeitskalen adaptiv auf Stimuli reagieren. Krishnan et al. haben die Fluidisierung der Zelle als protektiven Mechanismus beschrieben, der Zellen unter physiologischen Bedingungen und physiologischen mechanischen Stimuli eine mechanische Integrität garantiert [112]. Des Weiteren wird in [112] die These aufgestellt, dass die Verstärkung zytoskelettärer Strukturen nur unter bestimmten Stimuli (lokalen und inhomogenen) erfolgt und somit eher einen *Spezialfall* darstellt.

#### 4.4.9. Einzelzellscherung im Mikroplattenrheometer

Mit Hilfe eines Mikroplattenrheometers (Abschnitt 3.2.1.2) können einzelne Zellen gestreckt oder geschert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluß von Scherungen auf die Geometrie des Aktinzytoskeletts in 3T3 Zellen und der Einfluß von Vimentin auf RPE-1 Zellen (Siehe Anhang A.3.3) untersucht.

Die mechanische Charakterisierung der Nichtlinearitäten von Fibroblasten zeigt eine Symmetriebrechung der Zellen trotz harmonischer, symmetrischer Anregung (Abschnitt 4.4.5). Die Asymmetrie sollte sich auch auf Zytoskelettebene wiederfinden. Daher wurden Scherversuche an einzelnen Zellen mittels eines Mikroplattenrheometers (Siehe Abschnitt 3.2.1) durchgeführt. Um das Zytoskelett sichtbar zu machen wurden mit *lifeact*-transfizierte Zellen verwendet. Abbildung 4.72 zeigt das durch *lifeact* gefärbte Aktinzytoskelett einer adhären 3T3-Zelle. Ziel der Experimente

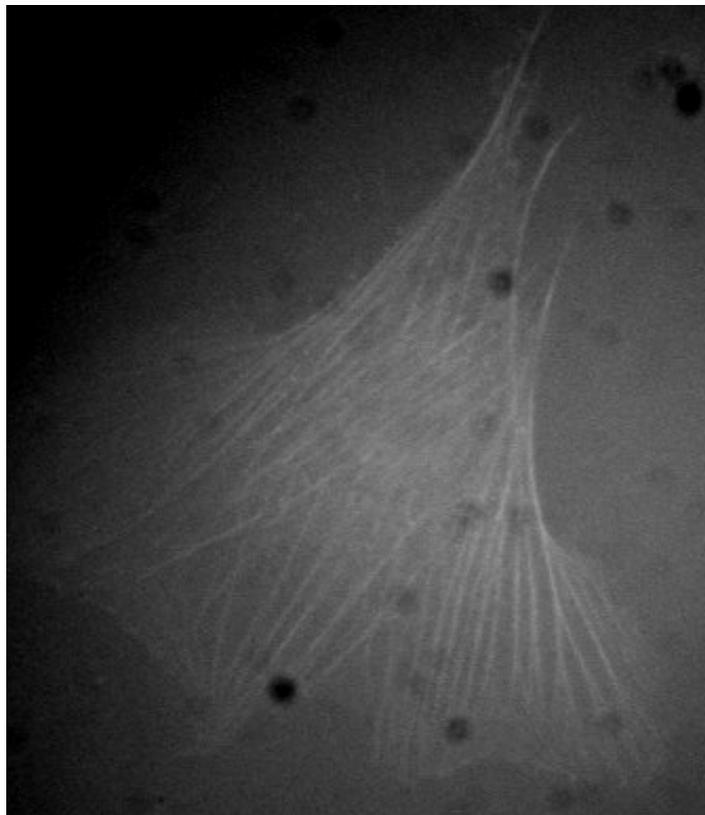


Abbildung 4.72.: Aktinzytoskelett einer 3T3-Zelle. Die Färbung wurde mittels einer stabilen Transfektion mit dem *lifeact* Vektor erreicht. Die Stressfasern, die einen wesentlich größeren Durchmesser als Aktinfilamente aufweisen, sind deutlich zu erkennen.

war es herauszufinden, ob die Symmetriebrechung während einer harmonischen Scherung auf Zytoskelettebene in Form von asymmetrischer Verteilung des Aktins sichtbar gemacht werden kann. Um sicherzustellen, dass die Zellen zwischen den hergestellten Mikroplatten adhären, wurden diese zunächst für eine Stunde bei konstantem Plattenabstand gehalten. Es zeigt sich, wie auch

#### 4.4 Nichtlineare Mechanik von 3T3 Fibroblasten

---

in früheren Arbeiten gezeigt [108], dass eine Zelle nach einiger Zeit beginnt auf die Platten zu reagieren. Sie nimmt eine konvexe Form an (Siehe Abbildung 4.73).

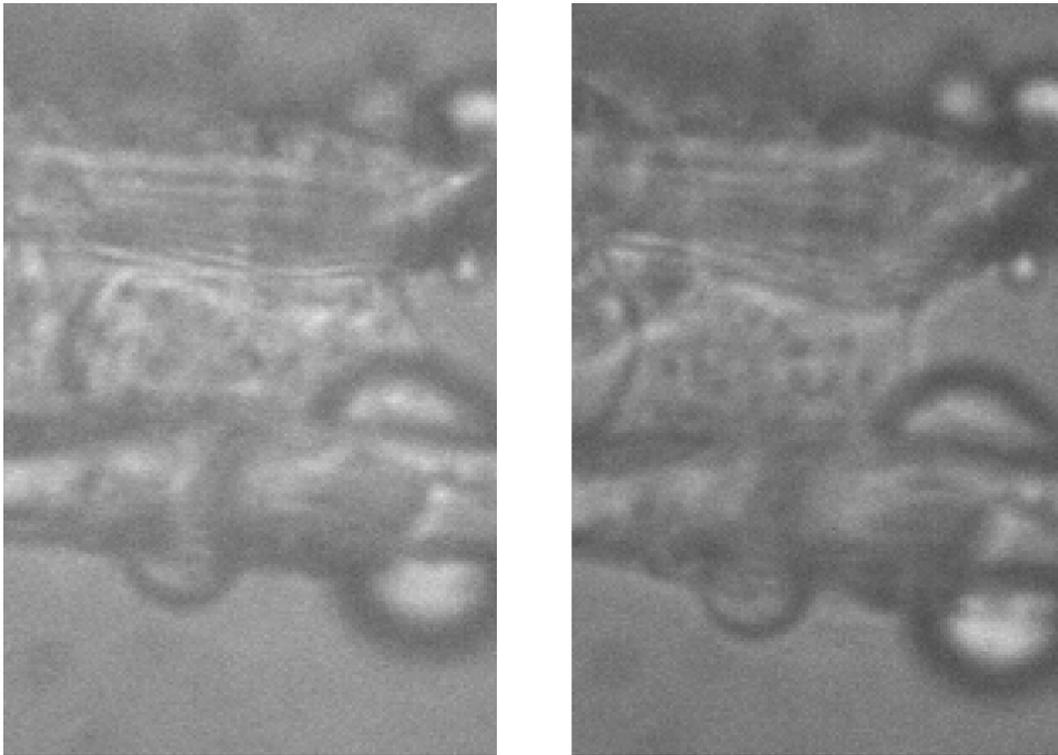


Abbildung 4.73.: Links: 3T3 Zelle direkt nach der Kontaktierung mit den Mikroplatten. Die Zelle hat eine konkave Form. Rechts: Zelle nach 1,5 Stunden Adhäsionszeit. Die Zelle hat ihre Form verändert und ist jetzt konvex geformt, was ein Ausdruck der Kontraktilität ist [57]. Es sind zusätzliche Zellen zu sehen, die sich unterhalb der Mikroplatten außerhalb des Fokus des Objektivs befinden.

Die mikroskopischen Aufnahmen der adhärenen Zellen können verwendet werden, um die Annahmen der Adhäsionsfläche für 3T3 Zellen bei der Umrechnung von Monoschichteigenschaften auf Einzelzeleigenschaften (Abschnitt 4.1.7) zu überprüfen. Der Durchmesser der Adhäsionsfläche  $d$  kann mit Hilfe von ImageJ bestimmt werden. Die Adhäsionsfläche berechnet sich dann zu:

$$A = \pi \left(\frac{d}{2}\right)^2 \quad (4.33)$$

Auch hier ergeben sich Werte um  $d=20-25 \mu\text{m}$  bzw.  $A=300-600 \mu\text{m}^2$  in guter Übereinstimmung mit den für das Rheometer abgeschätzten Werten.

Nach der Adhäsionszeit werden Zellen mit steigender Amplitude geschert in Analogie zu den Rheometerexperimenten. Für jede Scheramplitude wird eine Oszillation von zwei Minuten ausgeführt. Die Scherung erfolgt deformationsgesteuert über den *closed loop* Modus des piezoelektrischen Aktuators. Abbildung 4.74 zeigt eine Zelle vor der Scherung, während und nach der Scherung mit einer Deformationsamplitude von  $\gamma=1$ . Vor und nach den Scherungen werden Fluoreszenzaufnah-

men der Zellen gemacht, um das Aktinzytoskelett zu visualisieren (Siehe Abbildung 4.75).

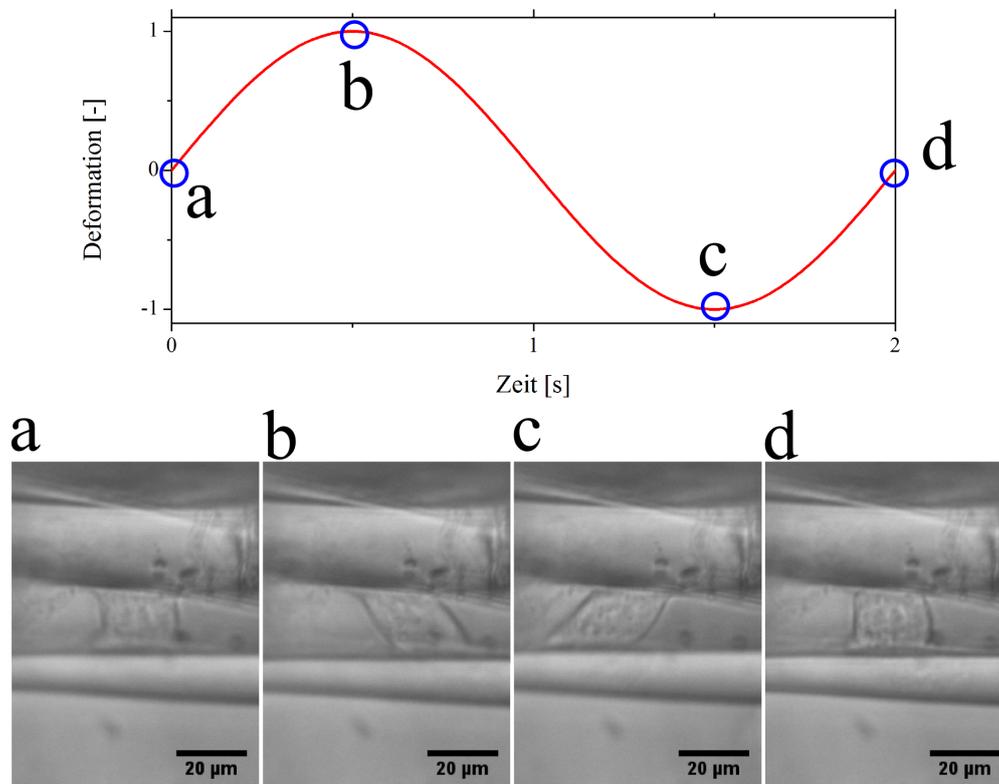


Abbildung 4.74.: Schermessung an einer 3T3 Zelle. Es wurden Oszillationen mit steigender Amplitude durchgeführt. Oben: Deformation als Funktion der Zeit für eine Oszillation mit einer Amplitude von  $\gamma=1$ . Unten: Zelle nach der Adhäsionszeit (a), bei maximaler Scherung in positiver Richtung (b), bei maximaler Scherung in negativer Richtung (c) und am Ende der Oszillationsmessungen (d). Nach der Aufnahme von Bild a) wurde die Zelle zunächst mit kleineren Deformationsamplituden geschert. Diese Bilder sind hier nicht gezeigt. Die Form der Zelle zu Beginn und am Ende der Oszillationsmessungen unterscheiden sich deutlich. Dies weist auf Änderungen des Zytoskeletts, ausgelöst durch die mechanische Belastung hin.

Es sind keine einzelnen Stressfasern sichtbar. Es lässt sich jedoch eine Änderung der Fluoreszenzverteilung innerhalb der Zelle vor und nach der Scherung beobachten. Dies deutet auf eine Änderung der Zytoskelettstruktur hin. Die Änderungen der Fluoreszenzverteilung zeigten jedoch keine Systematik, so dass keine weitere Analyse erfolgte. Des Weiteren zeigt sich eine Abnahme der gesamten Fluoreszenzintensität mit steigender Anregungsamplitude, die sich in einem reduzierten Signal zu Rausch Verhältnis zeigt. Die genaue Beobachtung von einzelnen Stressfasern und deren Dynamik ist mit der hier gewählten Methode nicht möglich.

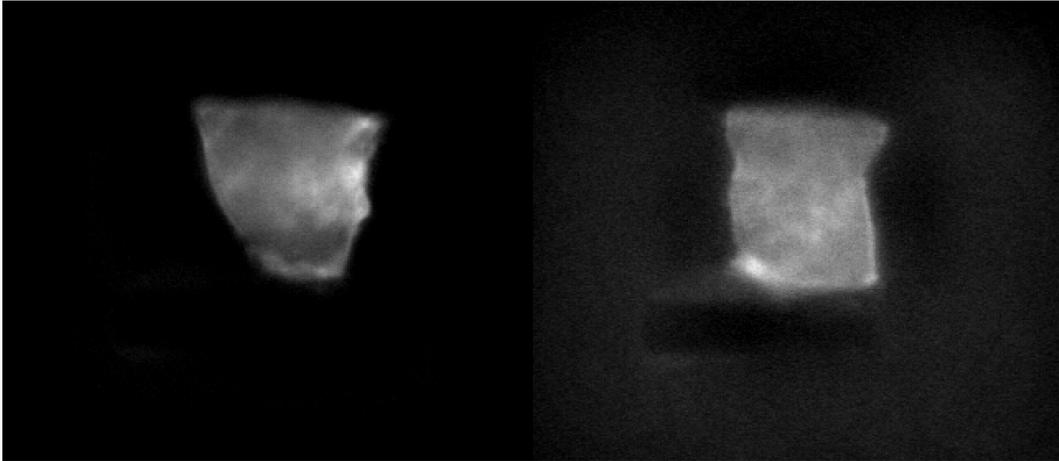


Abbildung 4.75.: Fluoreszenzaufnahmen der Zelle vor einer Oszillation mit Amplitude  $\gamma=1$  (links) und danach (rechts). Es sind keine Stressfasern zu erkennen. Es zeigt sich allerdings ein Unterschied in der Fluoreszenz vor und nach der mechanischen Belastung, was auf eine Änderung in der Zytoskelettstruktur hindeutet. Ein weiterer Hinweis ist, dass die Intensität der Fluoreszenz nach der Oszillation geringer ist, was sich im reduzierten Signal zu Rausch Verhältnis widerspiegelt. Dies könnte durch die Zerstörung von Aktinfilamenten aufgrund der großen Deformation hervorgerufen werden, die auch bei Streckmessungen beobachtet wurde [148].

##### 4.4.9.1. Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mikroplattenrheometer nach dem Vorbild von [57] aufgebaut. Es wurde dahingehend modifiziert, dass eine Scherung der Zellen möglich war, um die mechanische Belastung der Zellen im Rheometer auf Einzelzellebene zu untersuchen.

Das Aktinzytoskelett der 3T3-Zellen wurde mit *lifeact* GFP (grün fluoreszierendes Protein) angefärbt, um Änderungen in der Aktin-Zytoskelettstruktur aufgrund von mechanischer Scherung zu untersuchen, die für die in Abschnitt 4.4 untersuchten Nichtlinearitäten und insbesondere die Symmetriebrechung verantwortlich sein können.

Die Zytoskelettgeometrie konnte mit diesem Aufbau nicht sichtbar gemacht werden. Stressfasern sind in Zellen, die in Kulturschalen oder auf Objektträgern kultiviert werden, deutlich sichtbar. Zwischen den Mikroplatten kann keine Feinstruktur des Aktins aufgelöst werden. Dies stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeiten überein [110, 146]. Auch die Nutzung eines Konfokalmikroskops bringt keine Verbesserung [146].

Zellen konnten zwischen den Mikroplatten geschert werden. Dabei zeigen sich Änderungen der Zellform, die durch die mechanische Belastung hervorgerufen werden. Die Fluoreszenzverteilung ändert sich ebenfalls durch die angelegte Scherung, außerdem nimmt bei großen Stimuli die Fluoreszenzintensität im gesamten ab. Diese Ergebnisse deuten auf eine Änderung der Zytoskelettstruktur hin, insbesondere auf eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts bei großen Scherungen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine Veränderung des Zytoskeletts, hervorgerufen

durch eine Scherbelastung, Auslöser für das nichtlineare Verhalten von Fibroblasten unter Oszillationen mit großen Amplituden sein kann. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur. In [166] wird gezeigt, dass Aktin sich als Antwort auf mechanische Stimuli reorganisieren kann. In [148] wurde gezeigt, dass die Fluoreszenzintensität des Aktinzytoskeletts stark abnimmt, wenn eine Zelle gestreckt wird. Dies wurde mit der Zerstörung einzelner Filamente erklärt [112, 214]. Dieser Mechanismus kann auch die hier beobachtete Abnahme der Fluoreszenzintensität mit steigender Anregungsamplitude erklären.

Die Verwendung von flexiblen Polymergelsubstraten auf denen Fibroblasten kultiviert werden bietet eine Möglichkeit die Hypothese, dass sich das Zytoskelett durch die Scherung verändert, zu bestätigen. Die Zellen würden dabei über mindestens 24 Stunden kultiviert und nachfolgend durch eine Scherung des gesamten Gels verformt. In dieser Konformation kann das Aktinzytoskelett visualisiert werden. Es handelte sich zwar nicht um die gleiche Geometrie, wie sie im Rheometerexperiment vorherrscht, trotzdem lieferte dieses Experiment interessante Einblicke in die Zytoskelettdynamik unter Scherungen mit großer Amplitude. Daher ist dieses Experiment ein guter Ansatzpunkt für zukünftige Arbeiten.

### 4.5. Modellierung der nichtlinearen Mechanik von Fibroblasten

Es existieren vielfältige theoretische Modelle, die verschiedene Aspekte der Zellmechanik beschreiben [120]. Die experimentellen Ergebnisse weisen auf eine wichtige Rolle inelastischer Veränderungen des Zytoskeletts als Reaktion auf mechanische Stimuli hin. Ziel dieses Abschnitts ist es zu überprüfen, ob die vorgeschlagenen mikroskopischen Grundlagen der nichtlinearen Zellmechanik die Basis eines Modells bilden können, das die experimentellen Ergebnisse reproduzieren kann. Es sollen daher zum einen ein phänomenologisches, elastoplastisches Kontinuumsmodell, welches von Fernandez et al. [57] eingeführt wurde und zum anderen ein Modell, welches auf der internen Struktur der Zelle in Form von Filamenten und deren Ausrichtung und Dynamik basiert, untersucht werden [166].

#### 4.5.1. Plastizität und kinematisches Härten - Zelle als Kontinuum

In [57] wurde ein phänomenologisches Modell für die passive Zellmechanik in uniaxialer Dehnung vorgestellt. Die Grundprinzipien des Modells werden hier übernommen, allerdings erfolgt eine Anpassung an eine Zellscherung. Das Modell basiert auf der Grundidee, dass die Zelle für kleine Stimuli elastisch und oberhalb einer gewissen Schwelle plastisch verformt wird. Es ist somit eine Weiterentwicklung der üblichen viskoelastischen Beschreibung der Zelle und nimmt an, dass die Zelle ihre Ruhelänge (*zero force length*) aufgrund äußerer mechanischer Stimuli verändern kann [57]. Diese Längenänderung kann durch verschiedene Mechanismen, wie das Wachstum von Aktinfilamenten und Stressfasern, aber auch durch Reorientierung von Filamenten und deren transienten Fixierung durch dynamische Vernetzungsproteine erklärt werden, wobei die genauen Mechanismen bisher unbekannt sind.

Die Zelldeformation wird in einen elastischen und einen plastischen Anteil aufgeteilt, die sich additiv zur Gesamtdeformation zusammensetzen:

$$\gamma = \gamma_{el} + \gamma_{inel} \quad (4.34)$$

In Anlehnung an Experimente mit Geweben [215] wurde eine exponentielle Kraft-Längen-Beziehung angenommen [57]. Ein entscheidender Punkt ist, dass die plastische Verformung Einfluss auf die elastische Kraft-Längen-Beziehung nimmt. Dies wird durch die Einführung einer *elastic stretch ratio* [57] bewerkstelligt. Analog dazu wird für eine Scherung die elastische Scherratio  $\lambda$  verwendet

$$\lambda = \frac{\gamma_{el}}{1 + |\gamma_{inel}|} \quad (4.35)$$

Die Schubspannung kann durch die Nutzung der Invarianten für eine Scheranregung statt, wie in [57], der Invarianten für eine Dehnung geschrieben werden als [216]

$$\tau = C_1 \cdot \lambda \cdot e^{\delta \cdot \lambda^2} \quad (4.36)$$

Die Dynamik der plastischen Deformation wird durch eine phänomenologische Ratengleichung beschrieben [57]

$$\dot{\gamma}_{inel} = C_2 \cdot \text{sign}(\tau - \tau_{back}) \cdot \left(\frac{\tau - \tau_{back}}{D}\right)^\beta \cdot e^{\frac{\tau - \tau_{back}}{D}} \quad (4.37)$$

$\tau_{back}$  ist eine Schubspannung, die der plastischen Deformation entgegenwirkt. Das zugrunde liegende Phänomen wird als kinematisches Härten bezeichnet. Die zeitliche Änderung der Schubspannung  $\tau_{back}$  wird als direkt proportional zur zeitlichen Änderung der plastischen Deformation angenommen (lineares kinematisches Härten) [57]

$$\dot{\tau}_{back} = C_3 \cdot \dot{\gamma}_{inel} \quad (4.38)$$

Die Größe  $D$  legt die Schubspannung fest, bei der der Übergang von elastischer zu plastischer Verformung erfolgt. In [57] wurde angenommen, dass sie sich wie ein differentielles Modul verhält. Für eine Scherung ergibt sich damit

$$D = C_4 \cdot \frac{\partial \tau}{\partial \lambda} \quad (4.39)$$

Es ergeben sich somit sechs Parameter  $C_1 - C_4$ ,  $\delta$  und  $\beta$ .

---

### Numerische Lösung des Gleichungssystems

Das obige Gleichungssystem kann mit Hilfe der finiten Differenzen gelöst werden. Zunächst wird angenommen, dass sich die Zelle in einem relaxierten Zustand bei  $\gamma=0$  und  $\tau=0$  Pa befindet. Eine Vorspannung wird hier nicht betrachtet. Die Zelle wird entweder deformations- ( $\gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t + \delta)$ ) oder schubspannungsgesteuert ( $\tau(t) = \tau_0 \sin(\omega t + \delta)$ ) angeregt. Für jeden Zeitpunkt  $t_i$  werden Gleichungen 4.35-4.39 ausgewertet. Für die Lösung der Differentialgleichungen  $\dot{C} = f$  sind die Werte zum Zeitpunkt  $t_i$  abhängig von den Werten zum Zeitpunkt  $t_{i-1}$ :

$$C(t_i) = C(t_{i-1}) + f(t_{i-1}) \cdot dt \quad (4.40)$$

wobei  $dt = t_i - t_{i-1}$ . Jede Anregungsamplitude wird für eine Zeit  $t=120$  simuliert. Nach dieser Zeit wird die Anregungsamplitude vergrößert, in Analogie zur Vorgehensweise während der Experimente. Wird die Anregungsamplitude vergrößert, so werden die aktuellen Werte der Größen (Gleichungen 4.35 bis 4.39) übergeben, so dass eine Oszillationsserie durch vorhergehende Serien beeinflusst wird, wie dies auch im Experiment der Fall sein kann.

Bei den Gleichungen des obigen Modells handelt es sich um nichtlineare Gleichungen. Um numerische Stabilität zu gewährleisten ist es wichtig die Schrittweite  $dt$  möglichst klein zu wählen. Allerdings nimmt die Rechenzeit mit kleiner werdender Schrittweite stark zu. Eine feste Schritt-

## 4.5 Modellierung der nichtlinearen Mechanik von Fibroblasten

---

weite hat sich als problematisch herausgestellt. Für kleine Anregungsamplituden kann mit einer Schrittweite von  $dt=0,01$  oder  $dt=0,001$  simuliert werden. Dies führt, je nach Parameterwahl jedoch zu numerischen Instabilitäten. Um dies zu verhindern wurde ein modifiziertes Eulerschema (*modified Euler scheme*) nach [217, 218] verwendet. Bei diesem wird die Schrittweite dynamisch an die Nichtlinearität des Gleichungssystems angepasst. Dazu werden die Gleichungen für zwei aufeinanderfolgende Zeitpunkte  $t+dt$  und  $t+2dt$  gelöst. Wenn der Unterschied zwischen den Werten unterhalb einer frei wählbaren Toleranz liegt, wird der Mittelwert der beiden erhaltenen Werte genutzt. Ist der Unterschied zu groß, wird die Schrittweite verringert, bis der Unterschied unterhalb der Toleranz liegt. Die genaue Implementierung in Matlab findet sich in Anhang A.4.1.

Die Parameter des Modells wurden manuell angepasst, so dass sich eine bestmögliche Übereinstimmung mit den experimentellen Daten ergibt. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die Parameter keine physikalisch sinnlosen Werte annehmen. So wäre ein Parameter  $C_3 = 10^{17} Pa$  für Zellen wenig sinnvoll. Der Parameter  $C_1$  nimmt eine Sonderstellung ein. Dieser kann als Schubmodul für sehr kleine Anregungen, bei denen noch keine plastische Deformation stattfindet interpretiert werden. Somit ist dieser näherungsweise durch  $C_1 = G(\gamma_0 \rightarrow 0)$  (Vergleiche Abschnitt 4.4.2.1) und damit den linearen Schubmodul für verschwindende Anregung gegeben.  $C_1$  ist ein Maß für die elastische Schubspannung, die in der Zelle durch eine Deformation aufgebaut wird. Analog gibt  $C_3$  die Stärke des *back stress* an, der dieser Schubspannung entgegenwirkt. Es kann angenommen werden, dass die Stärke des *back stress* geringer als die der elastischen Schubspannung ist, womit  $C_1 > C_3$  angenommen werden kann. Die restlichen Parameter wurden an diese Vorgaben angepasst.

---

Im Folgenden werden die Ergebnisse der numerischen Berechnungen vorgestellt. Diese werden nach Anregungen aufgeteilt.

- Cosinusförmige Schubspannungsanregung

Das Modell wurde schubspannungsgesteuert gelöst. Eine direkte Anregung mittels Cosinus führte zu numerischen Instabilitäten. Daher wurden statt einer instantanen Erhöhung der Schubspannung auf den Maximalwert unterschiedliche Schubspannungsraten verwendet. Es zeigte sich jedoch kein Einfluss der initialen Rate auf den Gleichgewichtszustand des Modells. Daher wurde eine sinusförmige Schubspannung

$$\tau(t) = \tau_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (4.41)$$

vorgegeben.

- Langsame Deformationsanregung (DL)

In Abschnitt 4.1.3 wurde erläutert, dass das Rheometer im deformationsgesteuerten Modus keine sinusförmige Deformation einstellt. Die Schubspannung bleibt sinusförmig, es wird nur die gewünschte Deformationsamplitude eingeregelt. Aus diesem Grund wurde zur Anpas-

sung des Modells an die Messdaten bei langsamer Deformationsanregung eine sinusförmige Schubspannung mit den, aus dem Experiment erhaltenen, Amplituden vorgegeben. Dies ist gerechtfertigt, da Experimente mit langsamer Deformation (DL) und sinusförmiger Schubspannung (SS) analoge Ergebnisse liefern.

- Schnelle Deformationsanregung (DS)

Für die numerische Lösung des Modells wurde zunächst ebenfalls eine sinusförmige Schubspannung vorgegeben. Auf diesem Weg konnten die experimentellen Ergebnisse weder quantitativ noch qualitativ reproduziert werden. Daher wurde eine Deformationsanregung

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin(\omega t) \quad (4.42)$$

verwendet, die die experimentellen Ergebnisse besser reproduzierte.

In Abbildung 4.76 sind die Lissajous Graphen für eine Oszillationsmessung bei cosinusförmiger Schubspannungssteuerung und die numerische Lösung des Modells gezeigt. Die Anpassungsparameter sind in Tabelle 4.1 gezeigt.

$C_1$	$C_2$	$C_3$	$C_4$	$\delta$	$\beta$
1900Pa	$3\frac{1}{s}$	600Pa	90Pa	3.5	4

Tabelle 4.1.: Modellparameter zur Anpassung des Modells an Experimente mit cosinusförmiger Schubspannungsanregung

Für kleine Schubspannungsamplituden stimmen Experiment und Modell sehr gut überein. Für größere Amplituden nimmt die Abweichung immer mehr zu. Das Modell ergibt zu kleine Deformationen als Antwort auf die vorgegebene Schubspannung. Dies zeigt sich ebenfalls, wenn man die dynamischen Schubmodule als Funktion der Schubspannungsamplitude aufträgt (Siehe Abbildung 4.77). Im Modell müsste der Beitrag der plastischen Deformation für große Anregungen größer ausfallen. Dies kann durch den Übergang zu nichtlinearem kinematischem Härten realisiert werden. Nichtlineares kinematisches Härten nach Fredericks-Armstrong [98, 219] folgt den Gleichungen

$$\tau_{back} = C_3 \cdot A \quad (4.43)$$

$$\dot{A} = \dot{\gamma}_{inel} - q \cdot A \cdot |\dot{\gamma}_{inel}| \quad (4.44)$$

wobei ein neuer Parameter A eingeführt wurde, der die Entwicklung des *back stress* beschreibt. Des Weiteren kommt ein neuer Anpassungsparameter q hinzu.

Abbildung 4.78 zeigt eine Gegenüberstellung der experimentellen Lissajous Graphen mit den Ergebnissen der numerischen Berechnung des obigen Modells für drei Anregungsamplituden. Die Anpassungsparameter sind in Tabelle 4.2 gezeigt. Für cosinusförmige Schubspannungsanregung ergibt sich eine sehr gute quantitative Übereinstimmung (4.78, rechts). Für langsame Deformationsanregung ist die Übereinstimmung immer noch gut (4.78, links). Das Modell sagt eine zyklisch

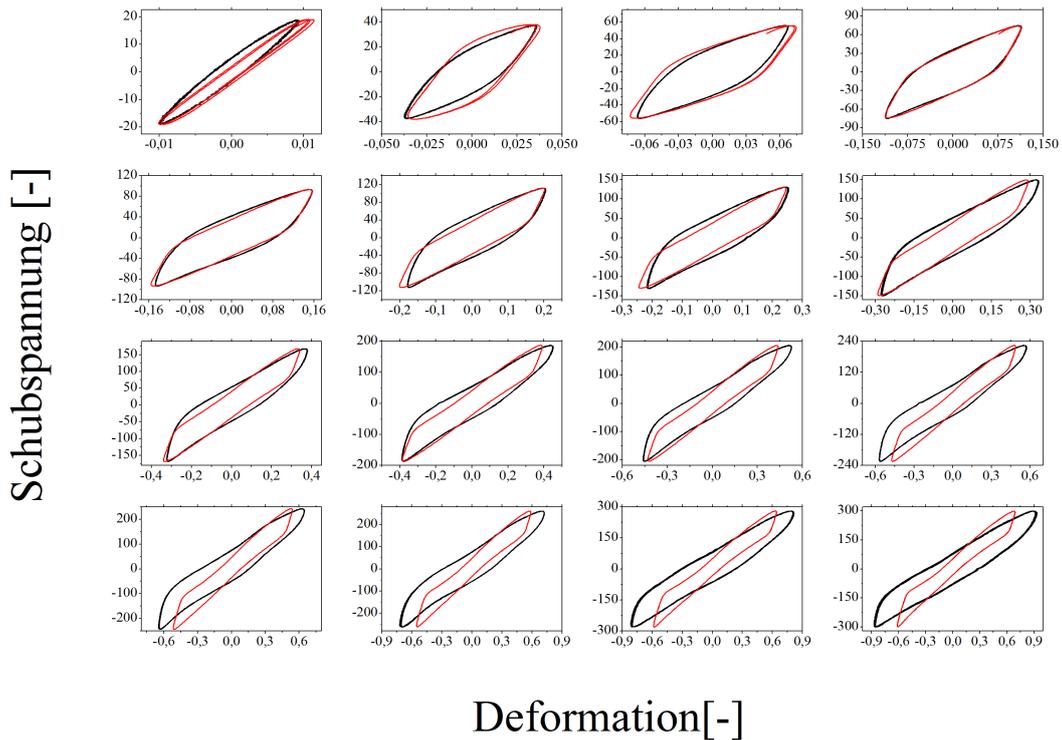


Abbildung 4.76.: Lissajous Graphen für ein Oszillationsexperiment mit sinusförmiger Schubspannungsanregung (schwarz) und die numerische Lösung des Kontinuumsmodells mit den Parametern aus Tabelle 4.1. Für kleine Schubspannungsamplituden  $\tau_0 < 100 Pa$  ergibt sich eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Experiment. Für größere Amplituden nehmen die Abweichung mehr und mehr zu.

abnehmende Steifigkeit voraus, die auch im Experiment beobachtet wird. Für schnelle Deformationsanregung erhält man ausschließlich qualitative Übereinstimmung (4.78, Mitte, hier ist die normierte Schubspannung aufgetragen). Sinusförmige Schubspannung wurde nicht mit Hilfe des Modells angepasst, da die Ergebnisse analog zur langsamen Deformation sind. Die vollständigen Daten, inklusive der Anpassungsparameter, sind in Anhang A.4.2 gezeigt. Abbildung 4.79 vergleicht Schubmodule aus Experiment und Modell. Für sinusförmige Schubspannungs- und langsame Deformationsanregung reproduziert das Modell die experimentellen Daten sehr gut. Im Falle der schnellen Deformationsanregung sagt das Modell eine Versteifung voraus, obwohl das Experiment eine abnehmende Steifigkeit zeigt. Das Kontinuumsmodell gibt nicht die gleichzeitige interzyklisch abnehmende und intrazyklisch zunehmende Steifigkeit wieder.

### 4.5.1.1. Diskussion

Das hier verwendete elastoplastische Kontinuumsmodell mit nichtlinearem kinematischen Härten kann die experimentellen Ergebnisse von kleinen (langsame Deformation und sinusförmige Schubspannung) und großen maximalen Scherraten (cosinusförmige Schubspannung) sehr gut

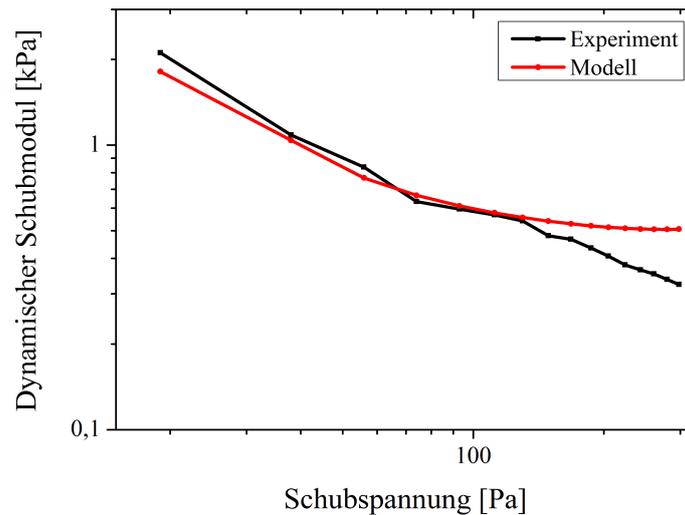


Abbildung 4.77.: Oszillationserie in cosinusförmiger Schubspannungssteuerung. Aufgetragen ist der dynamische Schubmodul als Funktion der Schubspannungsamplitude (Schwarz: Experiment, rot: Modell). Für Schubspannungsamplituden kleiner als  $\tau_0 < 100 Pa$  ergibt sich eine gute Übereinstimmung. Für größere Amplituden nimmt die Abweichung zu.

Parameter	DS	DF	SC
$C_1$	1100 Pa	1400 Pa	1900 Pa
$C_2$	1.85 1/s	4.5 1/s	4 1/s
$C_3$	650 Pa	20 Pa	500 Pa
$C_4$	120	420	90
$\delta$	3.5	5.2	5.5
$\beta$	3.5	5.3	5
$q$	0.3	-0.1	1.5

Tabelle 4.2.: Parameter die zur Lösung des erweiterten Kontinuumsmodells verwendet wurden.

quantitativ reproduzieren. Für mittlere maximale Raten in schneller Deformationsanregung, reproduziert das Modell die Ergebnisse nur qualitativ, es sagt jedoch eine interzyklische Versteifung statt der experimentell beobachteten abnehmenden Steifigkeit voraus.

Die Tatsache, dass das Modell die Ergebnisse der cosinusförmigen Schubspannung gut reproduziert ist nicht überraschend. Die Ergebnisse weisen den typischen Verlauf für plastische Materialien mit kinematischem Härten auf. Ein solches Regime wurde auch von Wolff et al. vorhergesagt [114].

Es ist jedoch interessant zu sehen, dass die Übereinstimmung des Modells mit dem Experiment für langsame Deformation abnimmt und für schnelle Deformation nicht mehr gegeben ist. Des Weiteren gibt das Modell die Abhängigkeit der mechanischen Antwort von der Anregungshistorie nicht wieder. Zur Reproduktion der Ergebnisse der unterschiedlichen Anregungen müssen unterschiedliche Parametersets verwendet werden.

Eine Möglichkeit ist, dass das Kontinuumsmodell nicht adäquat ist, da die Netzwerkstruktur und

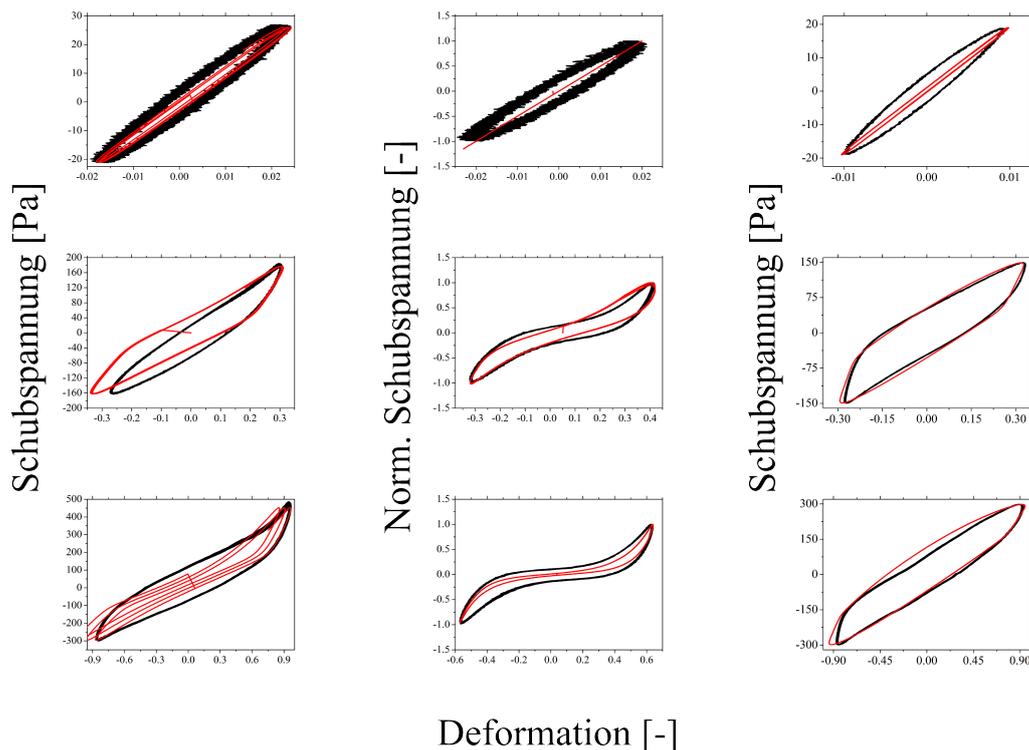


Abbildung 4.78.: Vergleich zwischen Experiment (schwarz) und Modell (rot) für drei Anregungsarten (von links nach rechts). Aufgetragen sind die Schubspannung (links und rechts) bzw. die normierte Schubspannung (Mitte) als Funktion der Deformation für drei Anregungsamplituden (von oben nach unten). Für cosinusförmige Schubspannungsanregung und langsame Deformationsanregung stimmen Experiment und Modell gut überein. Im Falle der schnellen Deformation (Mitte) ergibt sich nur bei Normierung der Schubspannung eine Übereinstimmung. Für kleine Anregungen (oben) ist die Dissipation (die Breite der Ellipsen) für alle Anregungsarten zu gering.

deren Dynamik entscheidend für die mechanische Zellantwort ist. Dies stimmte gut mit den vorgeschlagenen mikroskopischen Ursachen für die intrazyklische Zunahme der Steifigkeit und deren Abhängigkeit vom Stimulus überein (Abschnitte 4.4.2.3 und 4.4.3.1). Missel et al. heben hervor, dass die mechanische Antwort von Biopolymergelen stark von der relativen Orientierung des Stimulus in Bezug auf eine anisotrope Filamentstruktur abhängt. Darüber hinaus sagen Missel et al. vorher, dass eine Kontinuumsbeschreibung für anisotrope, nichtaffine Netzwerkstrukturen nicht sinnvoll bzw. nicht möglich ist. [198] Daher wird im Folgenden untersucht, ob ein einfaches Netzwerkmodell, das auf Filamentstruktur und Vernetzern beruht, die experimentellen Befunde besser reproduzieren kann.

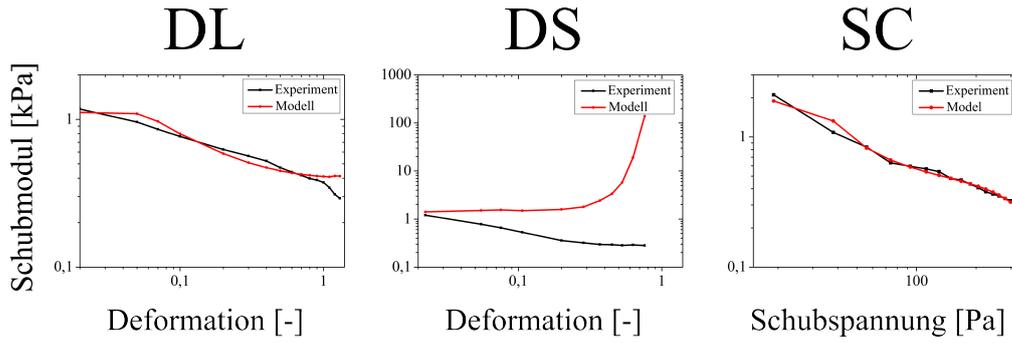


Abbildung 4.79.: Vergleich zwischen Experiment (schwarz) und Modell (rot) für drei Anregungsarten (von links nach rechts). Aufgetragen sind die Schubmodule als Funktion der Deformation. Für cosinusförmige Schubspannungsanregung und langsame Deformationsanregung stimmen Experiment und Modell sehr gut überein. Im Falle der schnellen Deformation (Mitte) ergibt das Modell eine Versteifung, während im Experiment eine abnehmende Steifigkeit beobachtet wird.

#### 4.5.2. Filamentnetzwerk - Geometrie der Nichtlinearität

Es kann spekuliert werden, dass die nichtlineare, adaptive Zellmechanik u.a. durch das dynamische Aktinzytoskelett bestimmt wird. Stressfasern ermöglichen der Zelle kontraktile Kräfte auf die Umgebung auszuüben. Darüber hinaus erhalten sie die mechanische Stabilität der Zelle und reagieren auf mechanische Stimuli durch dynamische Umordnungen [59]. Dies wird gestützt durch die Parallelen, die die in dieser Arbeit vorgestellten intrazyklischen Versteifungen mit denen von vernetzten Aktinringen aufweisen (Siehe Abschnitt 4.4.3.1).

Im Folgenden wird ein einfaches Modell präsentiert, welches die Zelle als Ansammlung von Stressfasern und Aktinfilamenten ansieht. Das Modell basiert auf Arbeiten von Head et al. [220, 221], Missel et al. [198] und MacKintosh et al. [103], stellt jedoch eine Vereinfachung dar. Die Zelle wird als  $15 \times 15 \mu\text{m}$  große Box dargestellt, in welche Filamente eingefügt werden. Durch die globale Scherung wird, unter der Annahme affiner Deformation, jedes Filament gestreckt. Das Scherfeld führt zu einer Translation des Anfangs- und Endpunkts eines jeden Filaments, die abhängig von der Lage der Punkte ist (Siehe Abbildung 4.80). Wird eine Scherung  $\gamma$  ausgeführt, so wird ein Punkt  $(x, y)$  innerhalb der gewählten Box in einen neuen Punkt überführt. Dieser lässt sich mit Hilfe der Transformationsmatrix für einfache affine Scherung (*simple shear*) berechnen:

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & \gamma \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} \quad (4.45)$$

Die Dehnung  $\epsilon$  eines Filaments ergibt sich somit zu

$$\epsilon = \frac{\Delta L}{L(\gamma = 0)} = \frac{L(\gamma) - L(\gamma = 0)}{L(\gamma = 0)} = \frac{\sqrt{(x'_E - x'_A)^2 + (y'_E - y'_A)^2} - \sqrt{(x_E - x_A)^2 + (y_E - y_A)^2}}{\sqrt{(x_E - x_A)^2 + (y_E - y_A)^2}} \quad (4.46)$$

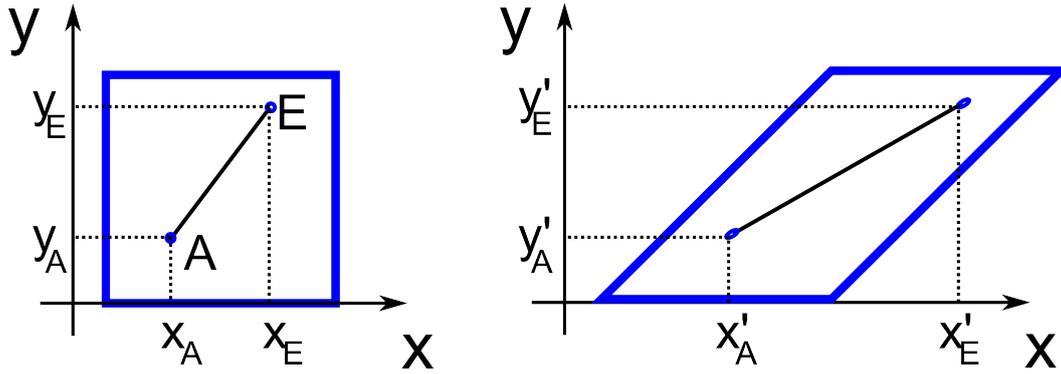


Abbildung 4.80.: Links:  $15 \times 15 \mu\text{m}$  große Box, in die beispielhaft ein Filament platziert wurde. Die Anfangs- und Endkoordinaten  $(x_A, y_A)$  und  $(x_E, y_E)$  sind eingezeichnet. Rechts: Eine Scherung der Simulationsbox führt zu einer Translation der Anfangs- und Endpunkte des Filaments, was zu einer Streckung führt. Die Translationen und damit die Streckung sind abhängig von der Lage der Punkte in der Box (Siehe Gleichung 4.45).

wobei die Indizes  $A$  und  $E$  den Anfangs- und Endpunkt eines Filaments bezeichnen (Siehe Abbildung 4.80). Durch Einsetzen der Transformationsgleichungen erhält man schließlich:

$$\epsilon = \frac{\sqrt{(x_E + \gamma \cdot y_E - x_A + \gamma \cdot y_A)^2 + (y_E - y_A)^2} - \sqrt{(x_E - x_A)^2 + (y_E - y_A)^2}}{\sqrt{(x_E - x_A)^2 + (y_E - y_A)^2}} \quad (4.47)$$

Die Streckung des Filaments führt zu einer Kraft  $F$ , die in dessen Richtung wirkt. Diese Kraft lässt sich in eine Normalkraft  $F_N$  und eine Scherkraft  $F_S$  aufteilen. Das Rheometer misst nur die Scherkraft. Um diese Komponente zu berechnen benötigt man den Winkel  $\theta$  zwischen Filamentrichtung und der  $y$ -Richtung des Koordinatensystems. Man erhält die Scherkraft eines einzelnen Filaments mit

$$F_S = F \cdot \cos(\theta) = F \cdot \frac{x_E - x_A}{\sqrt{(x_E - x_A)^2 + (y_E - y_A)^2}} \quad (4.48)$$

Die Gesamtkraft ergibt sich dann aus der Summe über alle Filamente  $N$ :

$$F_{ges} = \sum_{i=1}^N F_{S,i} = \sum_{i=1}^N F_i(\epsilon_i) \cdot \cos(\theta_i) = \sum_{i=1}^N F_i(\epsilon_i) \cdot \frac{x_{E,i} - x_{A,i}}{\sqrt{(x_{E,i} - x_{A,i})^2 + (y_{E,i} - y_{A,i})^2}} \quad (4.49)$$

#### 4.5.2.1. Zwei-Filament-Modell - Die Ausrichtung der Filamente bestimmt die Form der nichtlinearen Antwort

Um einen ersten Eindruck vom Verhalten des Filamentmodells zu bekommen, werden zunächst zwei Filamente betrachtet, die die gesamte Zelle durchdringen. Diese werden unter verschiedenen Winkeln, symmetrisch zur  $y$ -Achse verteilt  $[\alpha_1 = \alpha, \alpha_2 = 180^\circ - \alpha]$ , um den Einfluss der Ausrichtung zu studieren. Abbildung 4.81 zeigt die Dehnung eines Filaments als Funktion der anliegenden Scherung und als Funktion des Winkels  $\alpha$ . Die Dehnung ist aufgrund der Geometrie nicht im-

mer monoton. Je nach Ausrichtung kann es zu einer Dehnung, aber auch einer Kompression der Filamente kommen.

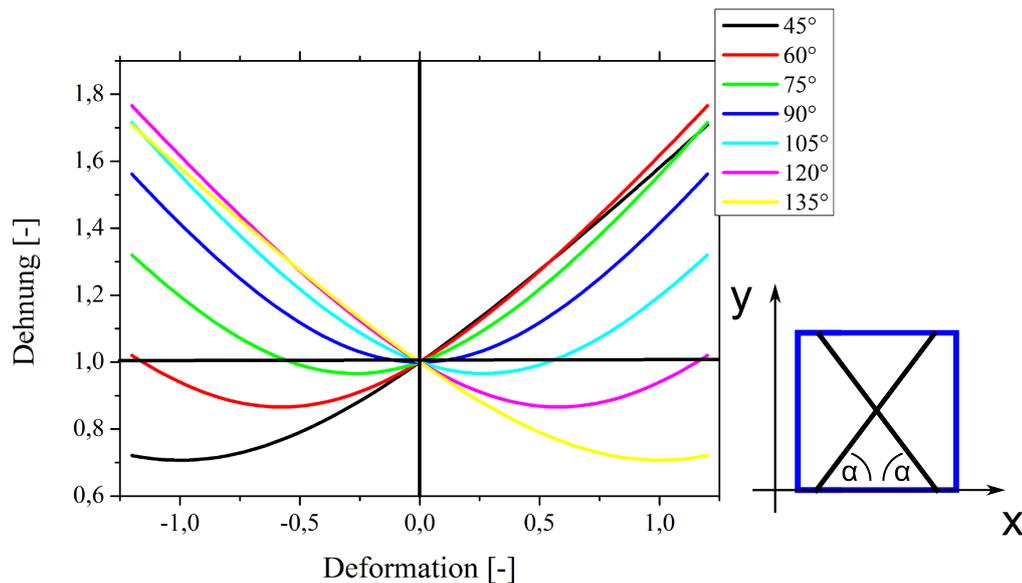


Abbildung 4.81.: Dehnung eines Filaments, das unter dem Winkel  $\alpha$  (Legende) zur x-Achse orientiert ist als Funktion der anliegenden Deformation. Je nach Winkel kann es zu einer Dehnung oder einer Kompression kommen. Inset: Symmetrische Ausrichtung der Filamente unter den Winkeln  $\alpha_1 = \alpha$  und  $\alpha_2 = 180^\circ - \alpha$ .

Kumar et al. haben die Viskoelastizität von Stressfasern innerhalb einer Zelle charakterisiert [58]. Daher wird im Folgenden jedes Filament zunächst als linear viskoelastisch modelliert:

$$F = a\epsilon + b\dot{\epsilon} \quad (4.50)$$

wobei o.B.d.A.  $a=1000$  N und  $b=200$  N/s angenommen wird.  $a$  und  $b$  werden hier beliebig gewählt. Entscheidend ist nur das Verhältnis  $\frac{b}{a}$ , da dies angibt, ob das Filament elastisch oder viskos dominiert ist (vgl. die Bedeutung des Phasenwinkels  $\delta$  bei oszillatorischer Beanspruchung). Abbildung 4.82 zeigt den dynamischen Schubmodul als Funktion der Deformation für verschiedene Filamentausrichtungen. Für kleine Deformationen ist der Schubmodul umso größer, je kleiner der Winkel wird. Dies bedeutet, dass für kleine Deformationen Filamente mit einem Winkel zwischen  $45^\circ - 60^\circ$  die Zellantwort dominieren. Filamente, die senkrecht zur Scherung orientiert sind, spielen kaum eine Rolle. Wird die Deformation größer, so nimmt der Beitrag der senkrechten Filamente zu, während der Beitrag der  $45^\circ$ -Filamente abnimmt. Die Orientierung der Filamente innerhalb der Zelle kann somit eine wichtige Rolle für die mechanische Antwort spielen. Dies wird noch deutlicher anhand der Lissajous-Figuren in Abbildung 4.83. Die nichtlineare Antwort hängt sehr stark von der Ausrichtung der Filamente ab. Filamente mit einer Ausrichtung von  $65^\circ$  reproduzieren die experimentelle Ergebnisse für eine langsame Deformationsanregung (DL),

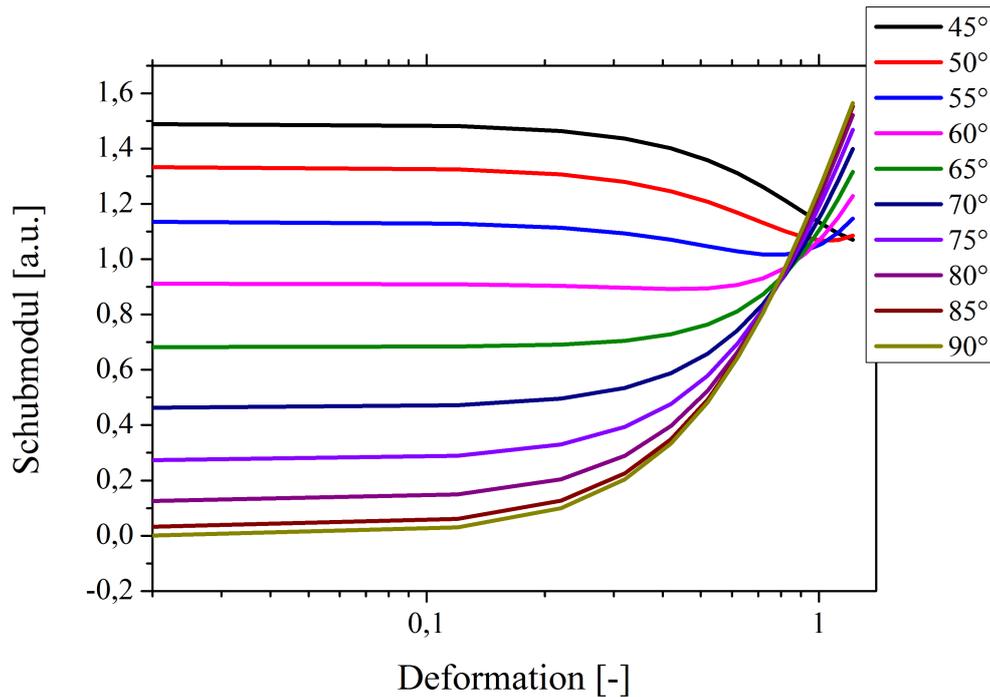


Abbildung 4.82.: Ergebnisse der Berechnung des Zwei-Filament-Modells für oszillatorische Anregung mit steigender Deformationsamplitude. Der dynamische Schubmodul  $|G^*|$  ist als Funktion der Deformation für verschiedene Faserwinkel (Legende) aufgetragen. Für kleine Deformationen  $\gamma < 0,2$  ist  $|G^*|$  für alle Winkel konstant, wobei  $|G^*|$  kleiner wird, je größer der Winkel wird. Für  $\alpha = 90^\circ$  geht  $G$  gegen null für sehr kleine Deformationen. Für Winkel  $\alpha < 60^\circ$  nimmt der Schubmodul zunächst ab, um für sehr große Deformationen wieder zuzunehmen. Die Abnahme des Schubmoduls verschwindet für  $\alpha > 60^\circ$ . In diesen Fällen nimmt  $|G^*|$  für größer werdende Deformationen zu.

also für kleine maximale Scherraten sehr gut. Filamente mit einer Ausrichtung von  $75 - 90^\circ$  reproduzieren die experimentelle Ergebnisse für eine schnelle Deformationsanregung (DS), also für mittlere maximale Scherraten sehr gut. Die Ergebnisse für cosinusförmige Anregungen können in diesem einfachen Modell nicht reproduziert werden. Hierzu wäre eine Zunahme des viskosen Anteils, der durch das Verhältnis  $\frac{b}{a}$  definiert ist nötig. Dies ist nicht Teil des Modells, da  $a$  und  $b$  als konstant angenommen werden.

#### Mehr-Filament-Modell - Anisotropie der Filamentverteilung führt zu Asymmetrie der mechanischen Antwort

In einer Zelle sind Filamente mit beliebiger Ausrichtung vorhanden. Daher soll an dieser Stelle ein Modell mit mehreren Filamenten ( $n=8$ ) betrachtet werden. Die nichtlineare Zellantwort ändert sich nicht wesentlich im Vergleich zum Zwei-Filament-Modell. Hier soll insbesondere das

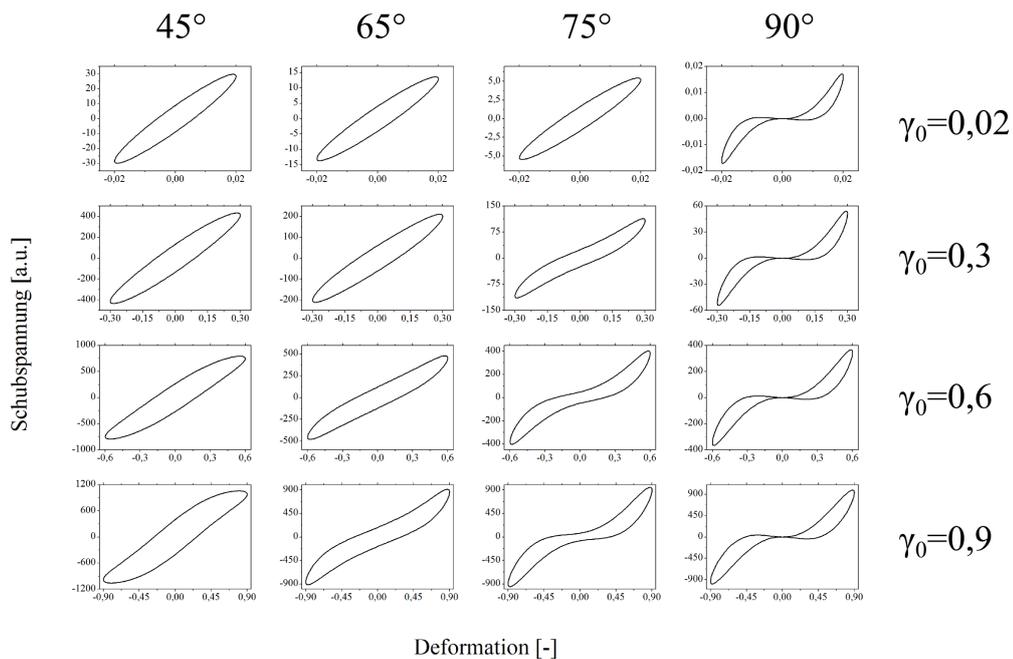


Abbildung 4.83.: Ergebnisse des Zwei-Filament-Modells für oszillatorische Anregung mit steigender Deformationsamplitude bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Die Schubspannung ist als Funktion der Deformation für verschiedene Deformationsamplituden (oben nach unten) und Filamentwinkel (links nach rechts) aufgetragen. Die nichtlineare Antwort hängt von der Ausrichtung der Filamente ab. Filamente mit Winkeln  $< 60^\circ$  zeigen eine abnehmende intrazyklische Steifigkeit, Fasern mit  $> 60^\circ$  eine zunehmende Steifigkeit innerhalb der hier betrachteten Deformationsintervalle. Filamente mit einer Ausrichtung um  $65^\circ$  führen zu Lissajous Graphen, die den nichtlinear viskoelastischen Ergebnissen für kleine Scherraten ähneln (langsamer Deformationsanregung). Filamente mit einer Ausrichtung um  $80^\circ$  führen zu Lissajous Graphen, die den Ergebnissen für mittlere Scherraten ähneln (schnelle Deformationsanregung).

Verhalten bei asymmetrischer Verteilung der Filamente untersucht werden. Dies kann auf zwei Arten geschehen. Entweder werden die Filamente asymmetrisch verteilt, oder es wird eine mittlere Deformation vorgegeben, so dass  $\gamma(t) = \langle \gamma \rangle + \gamma_0 \sin(\omega t)$ . In beiden Fällen zeigt sich eine asymmetrische Antwort. Eine asymmetrische Filamentverteilung liefert Lissajous Kurven, die qualitativ sehr gut mit den experimentellen Daten übereinstimmen (Siehe Abbildung 4.84).

#### 4.5.2.2. Diskussion

Die obigen Filamentmodelle, basierend auf viskoelastischen, statischen Filamenten, sind nicht in der Lage die experimentellen Ergebnisse quantitativ zu reproduzieren, vor allem in Bezug auf die abnehmenden Schubmodule. Sie geben allerdings Hinweise auf die zugrundeliegende Dynamik. So zeigt sich, dass sowohl die auftretenden Nichtlinearitäten, als auch die Asymmetrien durch eine

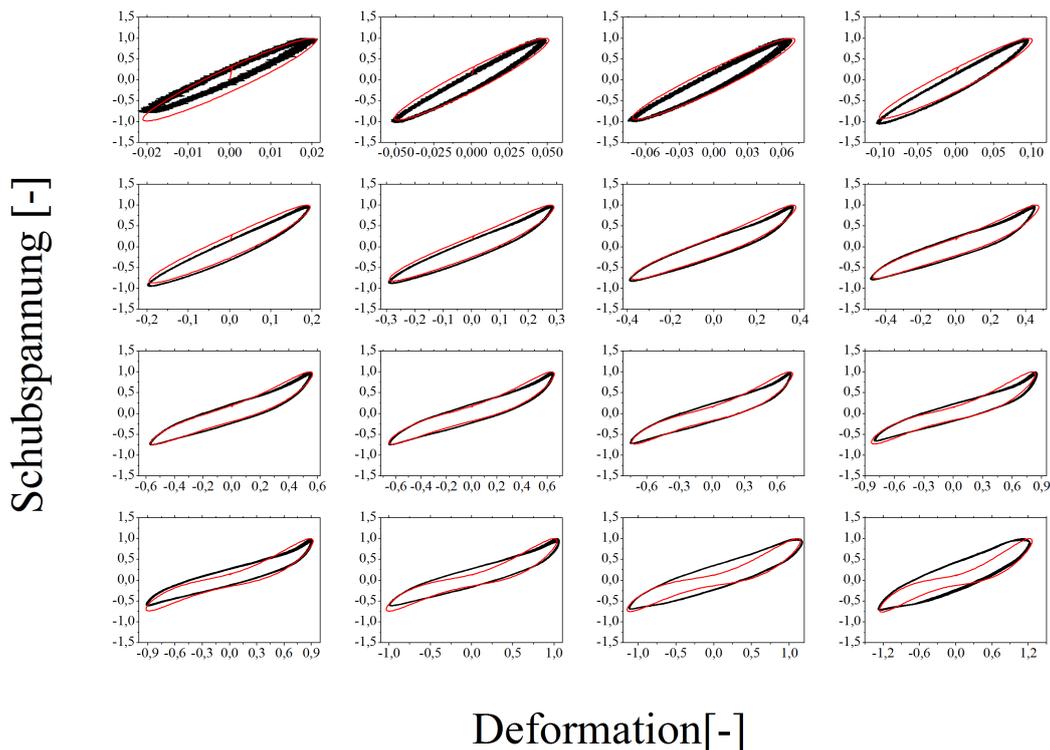


Abbildung 4.84.: Vergleich zwischen der Zellantwort, wie sie experimentell mit langsamer Deformationsanregung bestimmt wurde (schwarz) und dem Mehr-Filament-Modell (rot). Die normierten Schubspannungen sind als Funktion der Deformation aufgetragen. Die Filamente sind asymmetrisch verteilt (Winkel  $\alpha = [45 \ 50 \ 80 \ 80 \ 80 \ 100 \ 105 \ 135]^\circ$ ). Durch die Asymmetrie der Filamentverteilung kann die experimentell beobachtete Asymmetrie für kleine und mittlere Deformationen sehr gut reproduziert werden. Für große Deformationen spiegelt das Modell die experimentellen Daten nicht wieder, da es hier in der lebenden Zelle wahrscheinlich zur Zerstörung und Umordnung von Filamenten kommt, was im Modell nicht implementiert ist.

dynamische Entwicklung der Filamente und ihrer Orientierung erklärt werden können. Dalhaimer et al. haben auf Grundlage der Theorie der Flüssigkristalle gezeigt, dass zum einen die Vernetzung und zum anderen die Orientierung und Orientierbarkeit der Zytoskelettkomponenten eine entscheidende Rolle bei der mechanischen Antwort einer Zelle spielen können [193]. Im Folgenden wird ein einfaches Filamentmodell vorgestellt, in dem die Filamente auf einen mechanischen Stimulus reagieren können.

### 4.5.2.3. Dynamisches Filamentmodell - Reorientierung, Zerstörung von Filamenten und Dissipation von Vernetzungsproteinen

Im Folgenden werden die bisher vorgestellten Filamentmodelle erweitert. Es werden  $N=1000$  Filamente betrachtet, die in der Simulationsbox platziert werden. Jedes Filament folgt in Anlehnung

an mechanische Charakterisierungen von Stressfasern [222] einer nichtlinearen Kraft-Dehnungs-Beziehung, die zusätzlich noch vom Vernetzungsgrad abhängt:

$$F = \frac{N}{N_0} \cdot (a \cdot \epsilon^3 + b \cdot \epsilon + c \cdot \dot{\epsilon}) \quad (4.51)$$

$N$  ist die Anzahl der Vernetzungsproteine, die einer *slip bond* Kinetik [223] folgen

$$\dot{N} = -N e^{\frac{F_{ges}}{N}} + \delta(N_0 - N) \quad (4.52)$$

$N_0$  ist die initiale Anzahl der Vernetzer,  $\delta$  die Rate für eine erneute Bindung der Vernetzer, die hier vereinfachend als konstant angenommen wird. Darüber hinaus wird angenommen, dass alle Vernetzer eines Filaments die gleiche Kraft  $\frac{F_{ges}}{N}$  erfahren. Unter mechanischer Beanspruchung kommt es zur Zerstörung, Neubildung und auch einer Umordnung von Stressfasern und Aktinstrukturen [166, 224]. Kaunas et al. modellieren diese Prozesse durch einen dehnungsabhängigen Abbau und eine instantane Neubildung von Fasern [166]. Der Abbau wird durch eine stochastische Ratengleichung beschrieben. Die Neubildung erfolgt durch die zufällige Platzierung eines neuen Filaments. Diese Dynamik wird hier übernommen. Die Wahrscheinlichkeit für die Zerstörung eines Filaments ergibt sich zu

$$P = (k_1 + k_2 \epsilon^2) \Delta t \quad (4.53)$$

$k_1$  beschreibt dabei die zufällige, dehnungsunabhängige Zerstörung von Filamenten,  $k_2$  die dehnungsabhängige Zerstörung.

Die Netzwerke werden wie folgt generiert. 700 Filamente durchziehen die gesamte Zelle. Dazu werden Anfangs- und Endpunkte der Filamente auf der oberen und unteren Kante der Simulationsbox fixiert ( $y=0$  und  $y=15$ ). Dies soll eine polarisierte Zelle mit zelldurchdringenden Aktinstrukturen modellieren. Die restlichen 300 Filamente werden zufällig platziert. Jedes Filament enthält 20 Vernetzer pro Mikrometer Filament. Die Größe der Vernetzerdichte und auch die Filamentanzahl kann in gewissen Grenzen (Vernetzeranzahl  $\approx > 1000$  und Filamentzahl  $\approx > 100$ ) beliebig gewählt werden. Es ändern sich dann nur die Absolutwerte der mechanischen Eigenschaft, nicht jedoch die grundlegende Dynamik.

Die Netzwerke werden mit sinusförmiger Deformation  $\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \sin(\omega t)$  mit steigender Amplitude  $\gamma_0$  angeregt, wobei für jede Amplitude für eine Dauer von  $t=120$  angeregt wird. Es zeigt sich, dass auch für dieses Modell verschiedene Parametersets verwendet werden müssen, um die Ergebnisse der verschiedenen Anregungen reproduzieren zu können. Der Matlab-Programmcode zur numerischen Berechnung des Modells findet sich in Anhang A.4.3.

Abbildung 4.85 zeigt den Vergleich zwischen Experiment und Modell für die Parameter aus Tabelle 4.3. Das Modell reproduziert die Ergebnisse für langsame Deformation (DL, Abbildung 4.85, links) und cosinusförmige Schubspannung (SC, Abbildung 4.85, rechts) sehr gut. Die Schubspannungswerte für kleine Stimuli unter cosinusförmiger Schubspannungsanregung sind zu gering (Abbildung 4.85, rechts unten), ansonsten ergibt sich eine gute quantitative Übereinstimmung. Für den Fall der schnellen Deformation ergibt sich eine bessere quantitative Übereinstimmung im

#### 4.5 Modellierung der nichtlinearen Mechanik von Fibroblasten

---

Parameter	DL	DS	SC
a	33 N	33 N	24 N
b	8.4 N	8.4 N	6.1 N
c	0.88 N/s	0.88 N/S	0.96 N/s
$k_1$	0.0003 1/s	0.0003 1/s	0.0003 1/s
$k_2$	0.1 1/s	0.55 1/s	0.5 1/s
$\delta$	5.7	4.5	10

Tabelle 4.3.: Parameterset zur Lösung des Filamentmodells für die Anregungen langsame Deformation (DL), schnelle Deformation (DS) und cosinusförmige Schubspannung (SC). Die Parameter a,b und c wurden so gewählt, dass die berechneten Schubmodule eine quantitative Übereinstimmung mit den Experimenten zeigen.  $k_1$  wurde aus [166] übernommen.  $k_2$  und  $\delta$  wurden so angepasst, dass die experimentelle Dynamik bestmöglich reproduziert wird.

Vergleich zu dem Kontinuumsmodell (Abbildung 4.78). Es zeigt sich jedoch, dass die dem Modell zugrundeliegende Dynamik die Zellenantwort im Fall der schnellen Deformation nicht vollständig reproduziert. In Abschnitt 4.5.2.1 wurde gezeigt, dass Filamente, die um einen Winkel von  $\approx 80^\circ$  gruppiert sind, die Lissajousplots für den DS Modus am besten reproduzieren. Daher soll die Filamentdynamik dergestalt modifiziert werden, dass sich eine Umordnung der Filamente in Richtung von  $\approx 80^\circ$  ergibt. Die Neubildung der Filamente erfolgt im Folgenden nicht mehr zufällig. Neue Filamente werden als zellübergreifende Filamente initialisiert. Dies wird dadurch erreicht, dass Anfangs- und Endpunkte der Filamente auf den oberen und unteren Rand der Simulationsbox fixiert werden. Abbildung 4.86 zeigt die Ergebnisse des modifizierten Modells für die schnelle Deformationsanregung (DF). Durch die Änderung der Reorientierung ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Experiment.

Abbildung 4.87 zeigt die Dynamik der Filamentausrichtungen während der oszillatorischen Anregung. Aufgrund der Generierung der Netzwerke ergibt sich zu Beginn eine Vorzugsorientierung um einen Winkel von  $90^\circ$ . Diese Vorzugsorientierung geht mit steigender Anregungsamplitude zugunsten einer zufälligen Orientierung verloren (Abbildung 4.87 DL,SC, DS). Im Falle der geänderten Dynamik für die schnelle Deformationsanregung nimmt die Breite der ursprünglichen Verteilung ab, die Vorzugsorientierung um  $90^\circ$  wird verstärkt (Abbildung 4.87 DS  $90^\circ$ ). Die geänderte Filamentdynamik hat auch einen Einfluss auf die mittlere Filamentlänge. Diese nimmt mit steigender Anregungsamplitude oberhalb einer kritischen Deformationsamplitude ab (Abbildung 4.88 DL, DS, SC). Für die geänderte Filamentumordnung ergibt sich eine Zunahme der mittleren Filamentlänge (Abbildung 4.88, links DS  $90^\circ$ ). Abbildung 4.88 (rechts) zeigt die mittlere Anzahl der Vernetzer als Funktion der Deformationsamplitude. Diese nimmt für alle betrachteten Fälle mit steigender Amplitude monoton ab. Es ergeben sich nur geringfügige Unterschiede. Die Vernetzeranzahl oszilliert um ihren amplitudenabhängigen Mittelwert (Abbildung 4.88, rechts, Inset). Die Amplitude dieser Oszillationen ist jedoch so gering, dass sie vernachlässigbar sind. Die Dissipation wird in diesem einfachen Modell daher beinahe ausschließlich von der viskosen Natur der

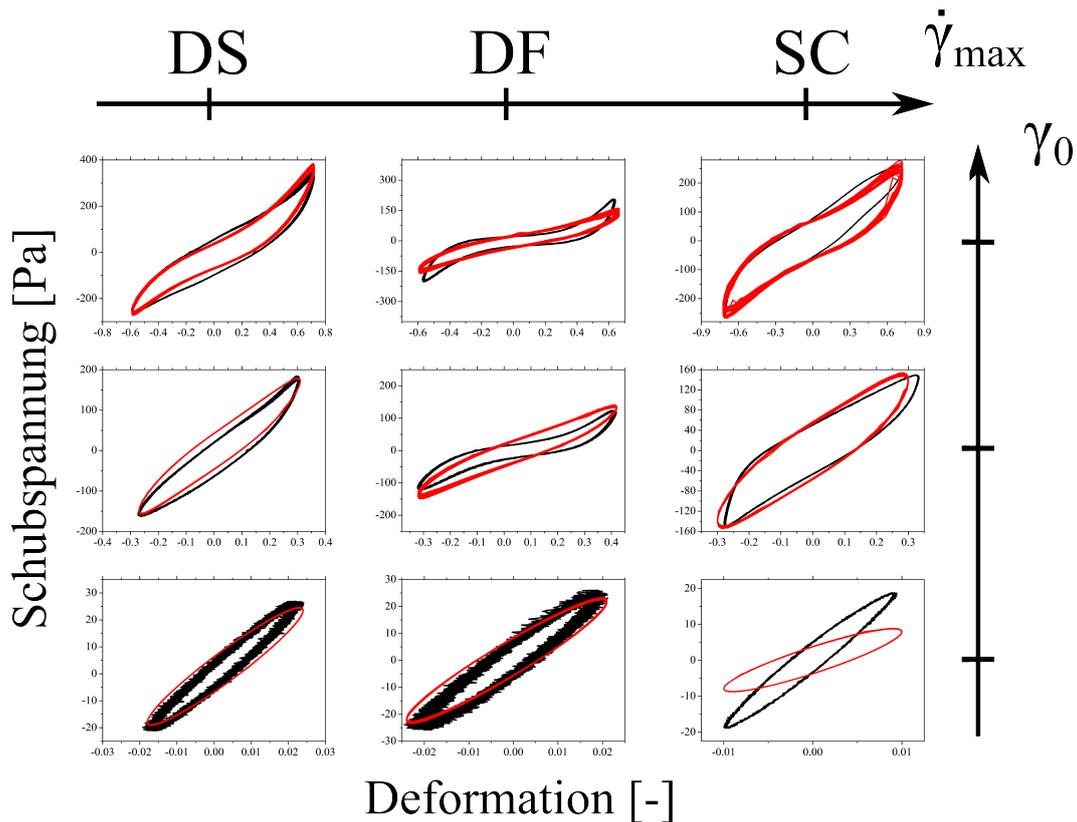


Abbildung 4.85.: Vergleich der experimentellen (schwarz) Lissajousplots mit den Ergebnissen des Filamentmodells (rot) für langsame Deformation (DL, links), schnelle Deformation (DS, Mitte) und cosinusförmige Schubspannung (SC, rechts) für drei Deformationsamplituden (von unten nach oben) bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Das Modell kann die Ergebnisse quantitativ für langsame Deformation und cosinusförmige Schubspannung gut reproduzieren. Für kleine Stimuli im Falle der cosinusförmigen Schubspannung liefert das Modell zu kleine Schubspannungswerte (unten rechts). Für schnelle Deformation ergibt sich eine wesentlich bessere quantitative Übereinstimmung als im Falle des Kontinuumsmodells (Abbildung 4.78).

Filamente und damit durch den Parameter  $c$  (Siehe Gleichung 4.51) bestimmt.

#### 4.5.2.4. Diskussion

Im vorangegangenen Abschnitt wurde die Zelle als eine Ansammlung von  $N=1000$  Filamenten, deren nichtlineare Kraft-Längen-Beziehung [222] durch assoziierte Vernetzer, die einer *slip bond* Kinetik [223] folgen, mit bestimmt wird. Filamente können mit einer von der Dehnung abhängigen Wahrscheinlichkeit zerstört werden, was zu einer instantanen Neubildung von Filamenten führt [59, 166]. Der Ausgangszustand der Simulation wird durch Platzierung von 700 zelldurchspannenden Filamenten und 300 zufällig platzierten Filamenten bestimmt. Dies soll eine durch die

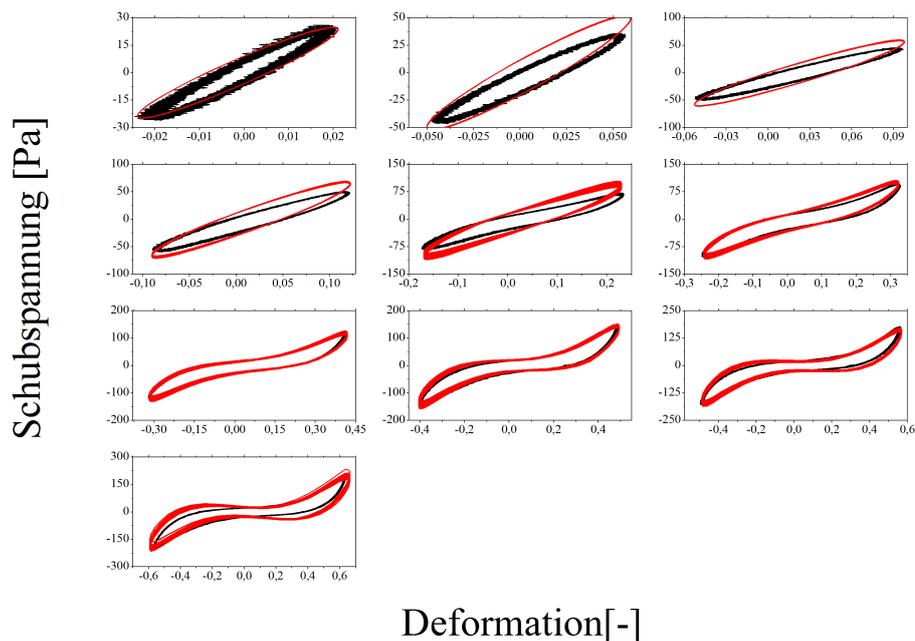


Abbildung 4.86.: Vergleich der experimentellen (schwarz) Lissajousplots mit den Ergebnissen des modifizierten Filamentmodells (rot) für schnelle Deformation (DS) für größer werdende Deformationsamplituden. Modell und Experiment stimmen sehr gut überein, wenn Filamente sich in Richtung eines Winkels von  $90^\circ$  reorientieren (Abbildung 4.87).

Adhäsionsflächen polarisierte Zelle mit einem engmaschigen Grundskelett simulieren. Es erfolgt eine sinusförmige Deformationsanregung.

Analog zum Kontinuumsmodell kann das dynamische Filamentmodell die Abhängigkeit der Zellantwort von der genauen Anregung nicht reproduzieren. Es müssen für jede Präkonditionierung verschiedene Parametersätze verwendet werden. Dies ist darin begründet, dass sowohl die Vernetzerdynamik, als auch die Filamentdynamik im stationären Zustand in diesem Modell nur von der finalen Amplitude bestimmt wird und keine ausreichende Abhängigkeit von den initialen Anregungszyklen aufweist. Dies zeigt sich u.a. daran, dass ausschließlich die mittlere Vernetzeranzahl ausschlaggebend ist, die als Gleichgewichtswert der zugrundeliegenden Differentialgleichung gegeben ist. Um eine sensiblere Abhängigkeit von der Deformationshistorie zu erhalten wäre eine komplexere Dynamik notwendig, die auch eine Vernetzung mehrerer Filamente untereinander und damit eine Bildung von größeren transienten Substrukturen erlaubte.

Die Kombination aus Vernetzerdynamik und Filamentumordnung reproduziert die experimentellen Ergebnisse wesentlich besser als das Filamentmodell. Das amplitudenabhängige Ablösen von Vernetzern ist für alle Präkonditionierungen sehr ähnlich. Die Filamentreorientierung variiert jedoch. Zu Beginn sind die Filamente hauptsächlich um  $90^\circ$  orientiert. Für langsame Deformationsanregung und cosinusförmige Schubspannungsanregung orientieren sich die Filamente bevorzugt um

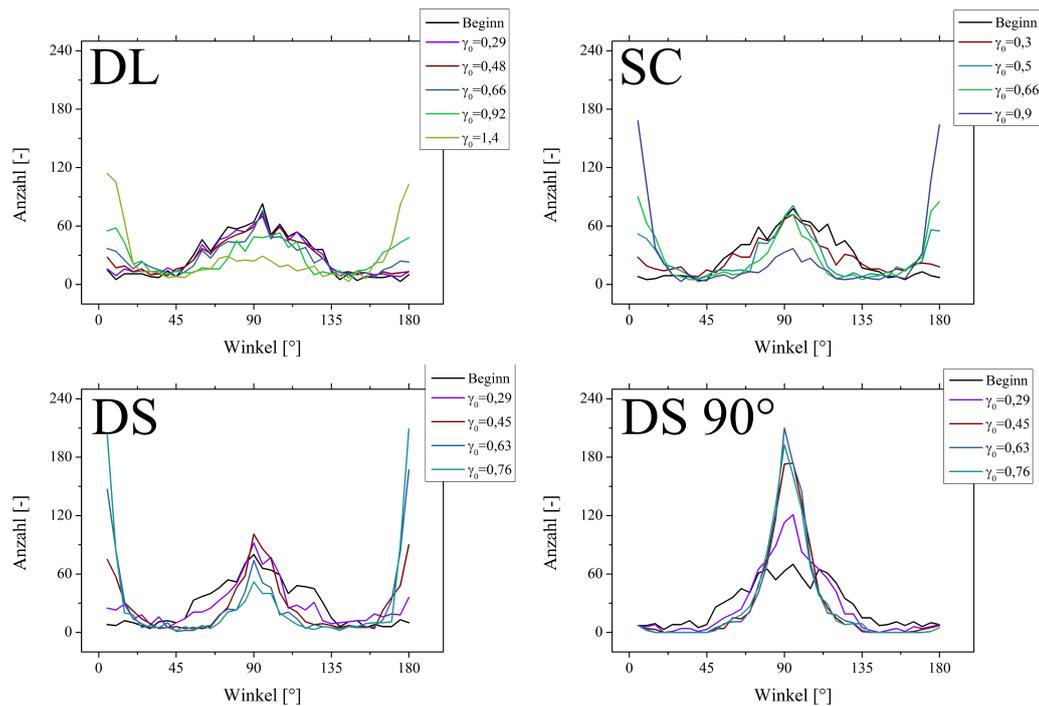


Abbildung 4.87.: Ausrichtung der Filamente in Bezug auf die Scherrichtung als Funktion der Deformationsamplitude (Legenden). Aufgetragen ist die Anzahl der Filamente als Funktion des Winkels zur  $x$ -Achse der Simulationsbox (Siehe Abbildung 4.80). Die Winkelkoordinate wurde in  $5^\circ$ -Intervalle unterteilt und die Anzahl der jeweiligen Filamente mit der entsprechenden Orientierung gezählt. Zu Beginn sind die Filamente vorzugsweise um  $90^\circ$  orientiert, was der Initialisierung der Netzwerke geschuldet ist. Oben links: Anpassung an langsame Deformationsanregung (DL). Die Filamentorientierung bleibt zunächst bestehen. Erst für sehr große Deformationsamplituden ( $\gamma_0 > 0,9$ ) kommt es zur Umorientierung der Filamente in Richtung der Scherung ( $0^\circ$  bzw.  $180^\circ$ ). Oben rechts: Anpassung an cosinusförmige Schubspannungsanregung (SC). Die Reorientierung in Richtung der Scherung ( $0^\circ$  bzw.  $180^\circ$ ) beginnt schon für kleine Deformationsamplituden  $\gamma_0 > 0,3$ . Unten links: Anpassung an schnelle Deformationsanregung (DS). Es kommt zu einer Reorientierung ab Deformationsamplituden von  $\gamma_0 > 0,3$  in Richtung der Scherung ( $0^\circ$  bzw.  $180^\circ$ ). Unten rechts: Anpassung an schnelle Deformationsanregung mit modifizierter Reorientierungsdynamik (DS  $90^\circ$ ). Die Reorientierung in Richtung  $90^\circ$  ist sehr stark ausgeprägt.

$0^\circ$  bzw.  $180^\circ$  und  $90^\circ$ , da hier die Dehnung bei gegebener Scherung minimal wird. Dies führt zu einem abnehmenden Schubmodul und einer weniger ausgeprägten intrazyklischen Versteifung. Letzteres liegt an der gleichzeitig abnehmenden mittleren Filamentlänge. Kürzere Filamente werden bei gegebener Scherung weniger gestreckt. Dies bedeutet, dass weniger Filamente in den nichtlinearen Bereich der Kraft-Längen Kurve getrieben werden. Dies führt zum Verschwinden der intrazyklischen Versteifung bei cosinusförmiger Schubspannungsanregung, da hier Reorientierung und Längenabnahme stark ausgeprägt sind. Um die schnelle Deformationsanregung besser

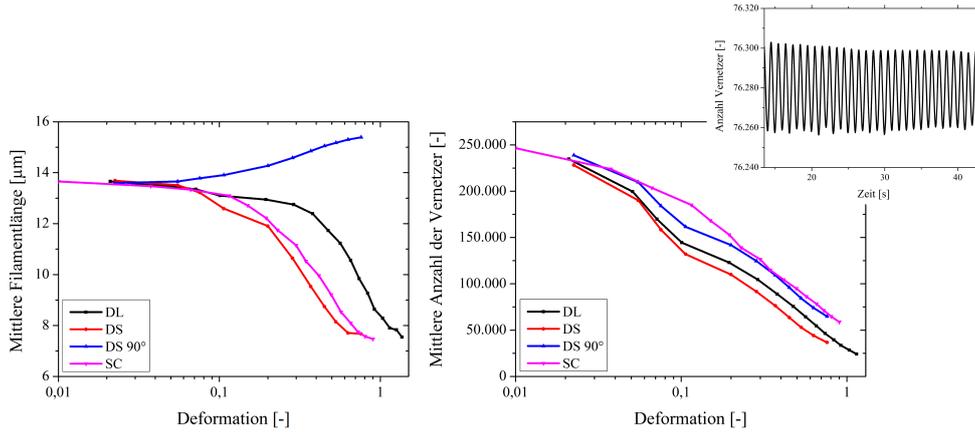


Abbildung 4.88.: Filamentdynamik und Vernetzerdynamik im Filamentmodell für langsame Deformation (DL), schnelle Deformation (DS), schnelle Deformation mit modifizierter Dynamik (DS 90°) und cosinusförmige Schubspannungsanregung (SC). Links: Mittlere Filamentlänge als Funktion der Deformationsamplitude. Die initiale mittlere Filamentlänge beträgt etwa  $13,6 \mu\text{m}$ . Für kleine Amplituden ist die mittlere Länge nahezu konstant. Sie nimmt oberhalb einer Deformationsamplitude von  $\gamma_0=0,08$  (DS),  $\gamma_0=0,1$  (SC) und  $\gamma_0=0,3$  (DL) ab. Für die modifizierte Dynamik ergibt sich eine Zunahme der mittleren Länge. Rechts: Mittlere Vernetzerzahl als Funktion der Deformationsamplitude. Die mittlere Vernetzerzahl nimmt mit steigender Deformationsamplitude monoton ab, wobei der funktionale Zusammenhang für alle Anregungen ähnlich ist. Durch die oszillatorische Anregung und die Möglichkeit des *rebindings* oszilliert die Vernetzerzahl um den aufgetragenen Mittelwert. Inset: Beispiel für die Oszillationen der Vernetzeranzahl um den Mittelwert. Die Amplitude der Oszillationen ist sehr gering (hier:  $A=25$ ), so dass diese im Prinzip vernachlässigbar sind.

reproduzieren zu können wird die Umordnung modifiziert. Neue Filamente bilden sich bevorzugt in 90° Richtung als zelldurchziehende Filamente. Die initiale Filamentverteilung um 90° wird somit mit steigender Anregungsamplitude schmaler. Darüber hinaus steigt die mittlere Filamentlänge mit steigender Anregung an. Diese Umverteilung führt, in Kombination mit abnehmender Vernetzerzahl, zu einem mit der Anregungsamplitude abnehmenden Schubmodul. Gleichzeitig kommt es zu einer stark ausgeprägten intrazyklischen Versteifung, die durch die 90°-Filamente hervorgerufen wird (Vergleiche Abschnitt 4.5.2.1, Abbildung 4.84). Für sehr große Deformationen orientieren sich die Filamente in allen Fällen bevorzugt um 0° und 90°, da hier die Dehnung bei gegebener Scherung minimal wird. Die Filamente minimieren somit ihre mechanische Belastung, was mit den Arbeiten von Kaunas et al. übereinstimmt [59, 166]. Für sehr große Deformationsamplituden  $\gamma_0 > 1$  kann das Modell die Ergebnisse nicht mehr gut reproduzieren (Siehe Anhang A.4.4). Hier kommt es möglicherweise zu einer Änderung der Dynamik. Die Ursache dafür soll hier nicht betrachtet werden, sondern ist Gegenstand zukünftiger Arbeiten.

Die Präkonditionierung schlägt sich in diesem Modell durch die Variation in der Filamentdynamik wieder. Die Dynamik der Vernetzer ist jedoch unabhängig von der Präkonditionierung. Dies passt

gut zur experimentellen Beobachtung, dass die wahrscheinlich vernetzerdominierte Dissipation unabhängig von der Präkonditionierung ist und ausschließlich von der Deformationsamplitude abhängt (Siehe Abschnitt 4.4.8).

Die interne Struktur des Zytoskeletts und speziell die Orientierbarkeit der Filamente spielen eine wichtige Rolle in der nichtlinearen Zellantwort. Arbeiten von Dalhaimer et al. zeigen auf Basis der Theorie der Flüssigkristalle ebenfalls eine starke Abhängigkeit der Zellantwort von der Orientierung der Filamente voraus [193]. Missel et al. haben theoretisch gezeigt, dass für anisotrope Biopolymergele die mechanische Antwort von der relativen Orientierung der Netzwerkstruktur und der mechanischen Scherung abhängt. Insbesondere wird vorhergesagt, dass für anisotrope und nichtaffine Gele eine Kontinuumsmodellierung nicht mehr möglich ist, da eine Filamentstruktur und mögliche Umordnungen mit berücksichtigt werden müssen [198]. Dies passt sehr gut zu den vorliegenden Ergebnissen. Die Regime, bei denen das Filamentmodell eine Abnahme der mittleren Filamentlänge und damit einen Verlust einer zelldurchziehenden Struktur vorhersagt, können auch sehr gut durch ein elastoplastisches Filamentmodell reproduziert werden. Das Regime, bei dem eine Verstärkung der Polarisierung stattfindet, kann ausschließlich durch das Filamentmodell, welches die Anisotropie berücksichtigt, quantitativ reproduziert werden.

In Zukunft sind noch einige Verbesserungen des Modells möglich. In der derzeitigen Implementierung existieren keine Vernetzungen zwischen mehreren Filamenten. Somit kann die Ausbildung von Stresspfaden oder *supportive frameworks* [199], also zelldurchziehende vernetzte Strukturen, nur über sehr lange zelldurchziehende Filamente erreicht werden. Die Einführung von Interfilamentvernetzern würde eine vielfältigere Dynamik erlauben, die eine Modifikation für die schnelle Deformation wahrscheinlich unnötig macht, da die Zunahme der mittleren Filamentlänge durch vernetzen verschiedener Substrukturen erreicht werden könnte. Darüber hinaus könnte das erneute Binden von Vernetzern ebenfalls kraftabhängig realisiert werden [150]. Es wäre interessant zu prüfen, ob diese Modifikationen ausreichen, um die Abhängigkeit von der Deformationshistorie zu reproduzieren, ohne verschiedene Parametersets zu verwenden.

Das Modell liefert schon in seiner jetzigen Form interessante Einsichten und unterstützt das mikroskopische Bild, das durch die experimentellen Ergebnisse nahegelegt wird.

Es stellt sich die Frage nach der biologischen Realisierung der Umordnung innerhalb einer lebenden Zelle. Eine Reorientierung, insbesondere von Stressfasern, findet auf einer Zeitskala von 10-30 Minuten statt [188]. Diese kann somit nicht als instantane Reaktion auf eine initiale Anregung von 10-60 Sekunden erfolgen. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich um einen kumulativen Effekt handelt: Die Reorientierung würde schon durch die Präkonditionierungszyklen der ersten Oszillationsserien initiiert und schreitet mit der Zeit immer weiter voran. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich nicht um eine Reorientierung langer Filamente handelt. Es könnte sich um die Ausbildung von Perkulationspfaden bzw. Stresspfaden [199], die die Zelle durchziehen, handeln. Diese Ausbildung kann durch kurzfristige Vernetzer- und Filamentdynamik gesteuert werden und könnte somit auch von Präkonditionierungen auf der Zeitskala von einigen Sekunden beeinflusst werden. Dabei spielen Stressrelaxationen eine wichtige Rolle [104]. Diese dissipieren mechanische Energie und erlauben eine *passive* Umordnung des Zytoskeletts durch Gleiten von Filamenten. Die

#### 4.5 Modellierung der nichtlinearen Mechanik von Fibroblasten

---

neuen Topologien werden durch ein erneutes Binden von Vernetzern transient stabilisiert, so dass metastabile Zwischenstrukturen entstehen. Die Entwicklung und Konsolidierung dieser Strukturen im Laufe der Präkonditionierung definiert die nichtlineare Zellantwort im Gleichgewicht.

Wolff et al. haben das Modell der inelastischen glassartigen wurmartigen Kette (iGWLC) vorgestellt [150]. Dieses basiert auf einer glassartigen Filamentdynamik und einer kraftabhängigen Vernetzerdynamik. Die glassartige Dynamik erlaubt es, dass metastabile Strukturen entstehen, die den oben diskutierten Zwischenstrukturen entsprechen könnten. Das Modell sagt die drei nichtlinearen Regime voraus, die hier experimentell bestätigt wurden [114]. Das nichtlineare Regime wird im Modell jedoch durch die Amplitude und die Frequenz der Oszillation im Gleichgewicht bestimmt. Im Anhang zu [114] zeigen Wolff et al. jedoch, dass ein transienter Anregungspuls zu einer Änderung der Dynamik des Modells führen kann. Die hier vorgestellten Präkonditionierungszyklen könnten somit die Rolle des transienten Anregungspulses spielen. Die Dynamik des vernetzten Filaments wird verändert und die nichtlineare Antwort ändert sich trotz gleicher Gleichgewichtsanregung, abhängig von der Ausprägung des Pulses. Es wäre daher in Zukunft von großem Interesse die Antwort der iGWLC auf die hier angewandten Anregungen zu untersuchen.

## 4.6. Zusammenfassung und Diskussion

Unter physiologischen Bedingungen sind lebende Zellen mechanischen Stimuli unterschiedlicher Größe und auf unterschiedlichen Zeitskalen ausgesetzt. Dabei zeigen Zellen eine komplexe, nichtlineare mechanische Antwort. Abhängig von der Beschaffenheit des mechanischen Stimulus, umfasst diese sowohl zunehmende [57, 108, 109] als auch abnehmende [87, 108, 113] Steifigkeit und eine adaptive Anpassung des Zytoskeletts [59, 166, 188]. Die auftretenden Nichtlinearitäten in der mechanischen Zellantwort und im besonderen ihre Abhängigkeit von Stimulus und Messmethode sind noch nicht verstanden.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der nichtlinearen Mechanik lebender 3T3 Fibroblasten unter Nutzung der Zellmonoschichtreologie (nach [87]). Die Zellen wurden mit verschiedenen oszillatorischen Stimuli bei einer Frequenz von 0,5 Hz (Abschnitt 4.4) mit sukzessive ansteigenden Amplituden angeregt. Die oszillatorischen Stimuli unterschieden sich in den initialen, transienten Zyklen, die vor dem Erreichen der gewünschten stationären Oszillationen (mit den voreingestellten Amplituden) durchlaufen wurden (Abbildung 4.34). Um eine bessere Vergleichbarkeit mit anderen Arbeiten zu gewährleisten, wurde eine Berechnung der mittleren mechanischen Eigenschaften der einzelnen Zelle etabliert (Abschnitt 4.1.7) [127]. Die nichtlineare mechanische Antwort der Zellen wurde mit Hilfe verschiedener Methoden, wie den Schubmodulen, verallgemeinerten Modulen, differentiellen Modulen und der Fouriertransformationsreologie charakterisiert. Von besonderem Interesse war der Übergang von linearem zu nichtlinearem Zellverhalten und die Abhängigkeit der Nichtlinearität von der Anregungsamplitude.

Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse der Experimente und der Modelle kurz rekapituliert. Für eine detaillierte Diskussion wird auf die Diskussion am Ende der jeweiligen Teilabschnitte der Ergebnisse verwiesen. Es folgt eine Diskussion der Ergebnisse mit Fokus auf den Aspekten, die zur Hauptaussage dieser Arbeit in Bezug auf die nichtlineare Zellmechanik führen und diese untermauern. Eine Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Literatur und ein Ausblick beenden das Kapitel.

Für Deformationsamplituden  $\gamma_0 < 0,01$  ist die Schubspannungsamplitude  $\tau_0 \propto \gamma_0$  im stationären Zustand (nach den initialen Zyklen) direkt proportional zur Deformationsamplitude  $\gamma_0$ . Somit ergibt sich ein konstanter dynamischer Schubmodul  $G_0 \neq G(\gamma_0)$  unabhängig von der Anregungsamplitude. Für Anregungsamplituden  $\gamma_0 < 0,01$ , was einer Scherung von 150 Nanometern entspricht, ist die mechanische Zellantwort somit linear (Abschnitt 4.4.2). Dieser Wert stimmt gut mit anderen in der Literatur beschriebenen Werten für lebende Zellen [57, 142] und Biopolymergele [178] überein.

Wird die Anregungsamplitude größer als  $\gamma_0 = 0,01$ , so wird die Zellantwort nichtlinear. Der dynamische Schubmodul im stationären Zustand nimmt mit weiter ansteigender Oszillationsamplitude ab. Die Zellen zeigen somit eine **interzyklisch** abnehmende Steifigkeit auf einer Zeitskala von Minuten (Abschnitt 4.4.2). Darüber hinaus kommt es innerhalb einer Oszillationsperiode zu einer *instantanen* Versteifung der Zellen oberhalb einer kritischen Deformation  $\gamma_c$  (Zeitskala  $< 0,5$  Se-

## 4.6 Zusammenfassung und Diskussion

---

kunden), was als **intrazyklische** Versteifung bezeichnet wird. Die kritische Deformation nimmt mit steigender Oszillationsamplitude zu (Abschnitt 4.4.3). Somit koexistieren eine abnehmende Steifigkeit und eine Versteifung auf unterschiedlichen Zeitskalen. Ein analoges Verhalten wurde für Kollagengele beschrieben [179]. Die Abnahme des Schubmoduls und die Zunahme der kritischen Deformation  $\gamma_c$  sind teilweise reversibel (Abschnitt 4.4.4).

Die Ausprägung der Nichtlinearitäten ist abhängig vom Zustand der Zellen zu Beginn der Messung. Die Abnahme des Schubmoduls  $\Delta G$  mit steigender Anregungsamplitude wird mit steigender initialer Steifigkeit im linearen Regime  $G_0$  ausgeprägter ( $G_0 \nearrow \Rightarrow \Delta G \nearrow$ ). Je steifer die Zelle zu Beginn ist, umso mehr verliert sie an Steifigkeit durch mechanische Belastung (Abschnitt 4.4.2.1). Dies ist in guter Übereinstimmung mit anderen experimentellen Arbeiten [113].

Das zentrale Ergebnis dieser Arbeit ist, dass die Ausprägungen der Nichtlinearitäten von der Deformationshistorie und im Speziellen von den initialen Oszillationszyklen, in denen die stationären Amplituden und Scherraten noch nicht erreicht sind abhängt. Besonders die maximale Deformationsrate  $\dot{\gamma}_{max}$  in den initialen Zyklen bestimmt die Zellantwort. Mit steigender maximaler Rate  $\dot{\gamma}_{max}$  wird die Abnahme des Schubmoduls ausgeprägter ( $\dot{\gamma}_{max} \nearrow \Rightarrow \Delta G \nearrow$ ) (Abschnitt 4.4.2.1), während die intrazyklische Versteifung weniger ausgeprägt wird und bei sehr großen Raten sogar vollständig verschwindet (Abschnitt 4.4.3).

Die mechanischen Eigenschaften von Fibroblasten weisen darüber hinaus eine dynamische Asymmetrie auf. Dies bedeutet, dass die mechanische Antwort von der Scherrichtung abhängt. Die Asymmetrie nimmt in Abhängigkeit von der Anregungsamplitude zwei Maxima an, eines für kleine ( $\gamma_0 \approx 0,2$ ) und ein weiteres für große ( $\gamma_0 \approx 0,8$ ) Deformationsamplituden (Abschnitt 4.4.5). Die Energiedissipation  $D$  von Fibroblasten wird ausschließlich durch die Deformationsamplitude definiert ( $D \propto \gamma_0^{1,78}$ ) und ist unabhängig von der Deformationshistorie. Die dissipierte Energie in den hier vorgestellten Experiment steigt von etwa 1 Femtojoule bis zu 1 Picojoule an. Es zeigt sich eine monotone Zunahme der Dissipation mit steigender Frequenz der Oszillationen (Abschnitt 4.4.8).

Eine Fixierung des Zytoskeletts mit Glutaraldehyd (1%-ige Lösung) führt zu einer ausgeprägten Versteifung der Zellen um einen Faktor 10. Mit steigender Anregungsamplitude nimmt der Schubmodul zunächst analog zu unbehandelten Zellen ab. Oberhalb einer Deformationsamplitude von  $\gamma_0 = 0,4$  kommt es jedoch zu einer wesentlich stärkeren Abnahme des Schubmoduls im Vergleich zu unbehandelten Zellen oder sogar zu einem Abreißen der Zellen von den Platten. Behandlung der Zellen mit dem Rho Kinase Inhibitor Y27632 ändert nicht die Größe des Schubmoduls der Zellen. Allerdings versagt die Zelladhäsion bei geringen Deformationsamplituden von etwa  $\gamma_0 = 0,2$ . Die Rho Kinase scheint somit für die Aufrechterhaltung einer starken Adhäsion wichtig zu sein (Abschnitt 4.4.6).

Fernandez et al. haben ein phänomenologisches Kontinuumsmodell vorgeschlagen, das große Teile der passiven Zellmechanik unter uniaxialer Streckung reproduziert [57]. Das elastoplastische Kontinuumsmodell, basierend auf exponentieller Elastizität und kinematischen Härten wurde für die in dieser Arbeit verwendete Scheranregung modifiziert (nach [57]). Das Modell kann die experimentellen Ergebnisse für langsame Deformations- und cosinusförmige Schubspannungsanregung

reproduzieren. Die ausgeprägte interzyklische Abnahme des Schubmoduls in Kombination mit der intrazyklischen Versteifung, wie sie in Experimenten mit schneller Deformation auftreten, kann das Modell nicht quantitativ modellieren (Siehe Abschnitt 4.5.1). Eine mögliche Erklärung ist, dass die zugrundeliegende Netzwerkstruktur des Zytoskeletts sich ändert und sich Filamente als Antwort auf die mechanische Antwort umorientieren, wie dies mehrfach experimentell beobachtet wurde [59]. Eine solche Änderung der zugrundeliegenden Struktur, und speziell ein Übergang zu anisotroper Filamentausrichtung, kann nicht adäquat durch ein Kontinuumsmodell beschrieben werden [198].

Ein Filamentmodell, welches die Zelle als Ansammlung von 1000 Filamenten mit assoziierten Vernetzerproteinen ansieht und die Dynamik der Filamentorientierung und Vernetzer berücksichtigt, reproduziert die Ergebnisse hingegen sehr gut (Abschnitt 4.5.2.3). Das Filamentmodell weist darauf hin, dass die Abnahme der Vernetzerkonzentration für die abnehmende Zellsteifigkeit verantwortlich ist, während die Orientierung der Filamente die Form der Lissajouskurven und damit der intrazyklischen Versteifung dominiert. Entscheidend ist, dass sich die Filamente durch eine streckungsabhängige Zerstörung und Neubildung derart ausrichten, dass sie die mechanische Streckung minimieren und ein anisotropes Zytoskelett bilden (Abschnitt 4.5.2.4). Beide Modelle zeigen jedoch nicht die ausgeprägte Abhängigkeit der Antwort von der Deformationshistorie und speziell den initialen Anregungszyklen. Es müssen unterschiedliche Parameter zur Lösung der Modelle verwendet werden, um die unterschiedlichen experimentellen Anregungen zu reproduzieren. Dies deutet auf unterschiedliche zugrundeliegende Dynamiken und Netzwerkstrukturen des Zytoskeletts, hervorgerufen durch die unterschiedlichen Präkonditionierungszyklen, hin. Die einfachen Modelle können diese komplexe Dynamik, welche auf dem Zusammenspiel von Filamenten und Vernetzern beruht nicht reproduzieren (Abschnitte 4.5.1.1 und 4.5.2.4).

Unter Berücksichtigung aller experimentellen und modellbezogenen Ergebnisse lässt sich folgende begründete Hypothese formulieren:

Die Abnahme des Schubmoduls erfolgt zum einen durch das Ablösen von Vernetzungsproteinen [102, 104] von Zytoskelettfilamenten und zum anderen durch eine Zerstörung und Umorientierung von einzelnen Filamenten [59, 166] oder einer dynamischen Orientierung systemdurchziehender vernetzter Strukturen, sogenannter mechanischer Hauptstresspfade (*stress path, supportive framework*) [185, 198, 199]. Die Ausbildung von Stresspfaden ist abhängig von der Filamentausrichtung und deren Vernetzung und somit auch von der mechanischen Deformation. Die intrazyklische Versteifung wird durch entropische und/oder enthalpische Streckung von Filamenten und Stresspfaden hervorgerufen, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind [190, 191, 192]. Jung et al. zeigen auf Basis von theoretischen Modellen, dass die Nichtlinearitäten innerhalb eines Zyklus von der ratenabhängigen Vernetzerdynamik und der Zerstörung von Filamenten abhängen können [185]. Dies kann die Sensitivität der intrazyklischen Versteifung in Bezug auf die maximale Scherrate erklären. Die partielle Reversibilität der Abnahme des Schubmoduls und der Zunahme der kritischen Deformation passen zu einer Vernetzerdynamik, die neben dem Ablösen auch ein erneutes Binden der Vernetzer und damit eine Erholung des Schubmoduls und eine Abnahme der kritischen Deformation erlaubt. Die ausschließliche Abhän-

## 4.6 Zusammenfassung und Diskussion

---

gigkeit der Dissipation von der Deformationsamplitude legt nahe, dass pro Oszillationsperiode im stationären Zustand eine feste Anzahl von Vernetzern abgelöst werden und wieder binden, unabhängig von der Deformationshistorie und trotz unterschiedlicher nichtlinearer Antworten. Die Stressrelaxation durch das Lösen von Vernetzern ist wichtig für die Aufrechterhaltung einer intakten Zytoskelettstruktur unter großen mechanischen Stimuli. Große mechanische Deformationen führen somit nicht zu einer Zerstörung von Strukturen, sondern zu einem, durch das Lösen von Vernetzern ermöglichten, Gleiten von Filamenten und Substrukturen, die sich durch ein erneutes Binden von Vernetzern in kurzer Zeit wieder in neuer Konfiguration zusammenlagern können. Eine Fixierung des Zytoskeletts unterdrückt die Stressrelaxation, was zu einer größeren Steifigkeit, aber einer ebenfalls größeren Fragilität des Zytoskeletts aufgrund der Zerstörung großer Zytoskelettteile, deren Reparatur längere Zeit in Anspruch nimmt, führt. Die Asymmetrie der Zellantwort, also die Abhängigkeit der mechanischen Antwort von der Scherrichtung, kann durch eine asymmetrische Umordnung des Zytoskeletts und eine plastische Deformation der Zellen entstehen. Die asymmetrische Umordnung könnte durch eine mechanisch induzierte Verstärkung geringfügig asymmetrischer Filamentverteilungen entstehen. Die asymmetrische Verteilung kann von einer initial asymmetrischen Verteilung oder der initialen Scherrichtung herrühren. Die plastische Deformation kann durch Filamentpolymerisation oder die Fixierung einer vergrößerten Zelllänge durch Vernetzer kommen. Diese plastische Deformation äußert sich in einer Verschiebung des Oszillationsnullpunkt und in einer asymmetrischen mechanischen Antwort. Jung et al. zeigen, dass das Brechen von Filamentstrukturen ebenfalls für eine asymmetrische mechanische Antwort verantwortlich sein kann [185].

Das mikroskopische Bild passt sehr gut zu Arbeiten von Wolff et al., die das Modell der glasartigen, wurmartigen Kette (iGWLC) vorgestellt haben [114, 150]. Das Modell basiert auf einem Filament, das durch glasartige Dynamik in langlebige, metastabile Zustände getrieben werden kann und dessen Dynamik zusätzlich durch dynamische Vernetzer mit kraftabhängigen Bindungsraten bestimmt wird. Wolff et al. sagen auf Basis von Lissajousfiguren drei nichtlineare Regime für lebende Zellen voraus, die mit den in dieser Arbeit gezeigten Regimen übereinstimmen. Bei Wolff et al. wird die Antwort jedoch durch die Amplitude und die Frequenz des Stimulus definiert. Hier ergeben sich die unterschiedlichen Antworten für analoge stationäre Anregungen, abhängig von den initialen Zyklen und damit der ratenabhängigen Deformationshistorie. Wolff et al. zeigen jedoch, dass ein transienter mechanischer Anregungspuls die Antwort der iGWLC beeinflussen kann. Somit könnten die initialen Anregungszyklen als transiente Pulse, die das Zytoskelett reorganisieren bzw. präkonditionieren, verstanden werden. Präkonditionierungszyklen sind aus der experimentellen Gewebemechanik bekannt. Hier werden solche Zyklen gezielt eingesetzt, um einen vergleichbaren *Referenzzustand* des untersuchten Gewebes herbeizuführen. Matthews et al. haben erstmals eine Präkonditionierung auch für einzelne Zellen vorgeschlagen [60].

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die nichtlineare Mechanik lebender Fibroblasten von der Deformationshistorie bzw. dem exakten Deformationspfad abhängt. Die initialen Oszillationszyklen induzieren Änderungen der Netzwerkstruktur des Zytoskeletts, was eine veränderte mechanische Antwort auf die stationären Oszillationsanregungen bedingt. Die in-

italen Zyklen wirken als mechanische Prädiktionierung, analog zu Mechanismen in Geweben [194, 195]. Die Dynamik der Vernetzer und Filamente führt zu einer inelastischen Zellantwort mit ausgeprägter mechanischer Pfadabhängigkeit und einem mechanischen *Gedächtnis*. Das mechanische Gedächtnis äußert sich darin, dass die Zelle nach Erreichen der stationären Oszillationen noch eine mechanische „Erinnerung“ an die Prädiktionierungszyklen hat und eine mechanische Antwort zeigt, die von diesen initialen Zyklen mit definiert wird. Es existieren sehr viele Arbeiten, die eine mechanische Adaption oder Prädiktionierung auf der Zeitskala von einigen Stunden [59, 166, 188] oder sogar Wochen [225] beschreiben. Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen eine Prädiktionierung auf einer Zeitskala von wenigen Minuten oder sogar wenigen Sekunden. Eine analoge Möglichkeit der mechanischen Prädiktionierung wurde von Matthews et al. vorgeschlagen [60], aber nicht weiter verfolgt. Die vorliegende Arbeit hebt die Bedeutung einer mechanischen Prädiktionierung auf Grundlage der Abhängigkeit der Zellmechanik von der Verformungsgeschichte, auch auf kurzen Zeitskalen hervor. Das mechanische Gedächtnis lebender Zellen kann die Grundlage für die Komplexität der mechanischen Antwort sein, obwohl die Zellmechanik auf simplen Prinzipien der inelastischen Mechanik vernetzter Biopolymere beruht [57, 114].

Der ausgeprägte Einfluss der Deformationshistorie und der (resultierenden) Zytoskelettstruktur auf die nichtlineare Zellmechanik ist eine mögliche Erklärung für das divergierende Bild in der Literatur [114]. Verschiedene Messtechniken untersuchen die Zellmechanik auf unterschiedlichen Zeit- und Längenskalen und mit unterschiedlichen Messprotokollen. Somit werden unterschiedliche Netzwerkstrukturen (Stressfasern, kortikales Zytoskelett, Zytoplasmaskellett) [144] mit unterschiedlichen Dynamiken vermessen. Darüber hinaus kann es, je nach Zelltyp, unterschiedliche Strukturen des Zytoskeletts, vor allem in Bezug auf den Anteil an Stressfasern, geben. Muskelzellen weisen wesentlich ausgeprägtere Stressfaserstrukturen auf als z.B. Endothelzellen oder Fibroblasten. Die Ausprägung des Stressfaserkeletts kann auch aufgrund unterschiedlicher Kulturprotokolle variieren. Für viele Messungen werden Zellen auf Glasoberflächen mit großer Festigkeit kultiviert, für manche Techniken werden Zellen auf weicheren Geloberflächen ausgesät [112, 113]. In [147] wurde gezeigt, dass die nematische Ausrichtung des Aktin- und Stressfaserzytoskeletts abhängig von der Steifigkeit des Substrats ist. Somit kann auch das Substrat über die Definition der Netzwerkstruktur des Zytoskeletts die nichtlineare Zellmechanik beeinflussen. Des Weiteren kann die Wahl der Analysemethoden einen Einfluss auf die Ergebnisse haben, was in dieser Arbeit gezeigt wurde. Die verallgemeinerten Module zeigten eine intrazyklische Versteifung für alle Anregungsarten. Die differentiellen Module ergeben jedoch keine Versteifung für cosinusförmige Schubspannungssteuerung. Bei der Beschreibung der nichtlinearen Zellmechanik muss somit sehr genau abgewägt werden, welche Messmethode und welches Messprotokoll zum Einsatz kommt, welche Zeitskala untersucht wird, welche Auswertemethoden zum Einsatz kommen und auch, welcher Zelltyp vermessen wird. Dies stellt sehr hohe Anforderungen an Studien, die zellmechanische Messungen vergleichen wollen. Die diskutierten Punkte könnten die Unterschiede in den beobachteten nichtlinearen Antworten erklären. Sie könnten auch, zumindest teilweise, die großen Unterschiede in den Absolutwerten der Zellsteifigkeiten und -module bei Verwendung unterschiedlicher Messmethoden

[120] erklären.

Im folgenden Abschnitt sollen Möglichkeiten für weiterführende Arbeiten aufgezeigt werden. Eine detailliertere Charakterisierung der nichtlinearen Zellmechanik könnte durch den Einbau eines Piezomotors, der eine exakte Deformationsanregung erlaubt, erfolgen. Ein wesentlicher Vorteil wäre, neben der exakt sinusförmigen Deformationsanregung, die Möglichkeit wohldefinierte Präkonditionierungszyklen zu etablieren. Dies würde die präzise Untersuchung der Amplituden- und Ratenabhängigkeit der Präkonditionierung ermöglichen. Darüber hinaus könnten die Unterschiede zwischen Deformations- und Schubspannungsanregung präzise untersucht werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob bzw. inwieweit die Präkonditionierung reversibel ist. Eine Untersuchung des Einflusses der Frequenz und der Rate des mechanischen Stimulus sind von großer Wichtigkeit. Die Abnahme der Schubmodule hin zu einem *universellen*, für alle Zellen unabhängig vom Ausgangszustand gleichen Wert für große Anregungsamplituden, sollte weiter charakterisiert werden. Hierzu bietet sich vor allem an den Einfluss der Intermediärfilamente zu betrachten. Diese wurden für die mechanische Stabilität von Zellen bei großen Stimuli verantwortlich gemacht [189]. Es kann daher spekuliert werden, dass der asymptotische Schubmodul durch das Intermediärfilamentnetzwerk bestimmt wird, nachdem große polarisierte Aktin- und Mikrotubulistrukturen zerstört wurden [100]. Dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Im Rahmen dieser und anderer Arbeiten [175] wurde der Einfluss der Dynamik von Zytoskelett- und Vernetzungsproteinen auf die viskose, dissipative Antwort der Zelle gezeigt. Es ist zu erwarten, dass Änderungen der Dynamik auch Auswirkungen auf die Art der Nichtlinearität haben. Somit könnte der Einfluss der Überexpression des TES-Proteins auf die nichtlineare Zellantwort interessant sein. Ehrlicher et al. haben gezeigt, dass  $\alpha$ -Aktinin Einfluss auf die Zellmechanik nimmt [175]. Der Einfluss von  $\alpha$ -Aktinin auf die nichtlineare Mechanik wäre ebenfalls interessant. Zuletzt steht noch eine fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der Zytoskelettdynamik während der Präkonditionierung aus. Das Zytoskelett konnte in dieser und auch in anderen Arbeiten in einem Mikroplattenrheometer [146] nicht visualisiert werden. Daher bietet es sich an Zellen auf flexiblen Gelen zu kultivieren und die mechanische Anregung durch eine Scherung des Gels zu bewerkstelligen. Die Struktur des Zytoskeletts wäre in diesem System zwar leicht anders, trotzdem sollte diese experimentelle Realisierung wesentlich detailliertere Einsichten in die Dynamik des Zytoskeletts unter Scherung erlauben. Eine weitere Möglichkeit wäre die Nutzung hochauflösender Mikroskopiemethoden (*super-resolution microscopy*), die Aufnahmen subzellulärer Strukturen, wie z.B. des Zytoskeletts ermöglichen [226].

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zu einem besseren Verständnis der Grundlagen der nichtlinearen, adaptiven Antwort lebender Zellen auf mechanische Stimuli bei. Es zeigt sich, dass das Paradigma der viskoelastischen Zelle nur sehr eingeschränkte Gültigkeit besitzt (sehr kleine Stimuli, kurze Messzeiten, unstrukturiertes Zytoskelett). Die mechanische Antwort lebender Zellen ist stark inelastisch und kann nur in diesem Rahmen verstanden werden. Versteifung und abnehmende Steifigkeit treten nicht nur in unterschiedlichen Experimenten auf, sondern koexistieren. Die Abhängigkeit von der exakten Deformationshistorie stellt eine Herausforderung

für zukünftige experimentelle und theoretische Arbeiten auf dem Gebiet der Zellmechanik dar. Die Ergebnisse lassen sich auch im Hinblick auf die Rolle von Zellen im Gewebe und im Organismus diskutieren. Die Fähigkeit lebender Zellen, differenziert auf mechanische Stimuli zu reagieren, ist wichtig für die mechanische Homöostase in Geweben und während der Entwicklung von Organismen. Unter physiologischen Bedingungen sind Zellen ständig mechanischen Reizen auf unterschiedlichen Zeitskalen ausgesetzt und müssen darauf reagieren, ohne die Funktionsfähigkeit des Gewebes zu gefährden. Zellen haben dabei die Möglichkeit mechanischen Widerstand zu leisten (*brace for the storm* [112]) oder den Einfluss des mechanischen Stimulus zu minimieren (*go with the flow* [112]). Welche Antwort erfolgt hängt unter anderem von der Rate und Amplitude des Stimulus, aber auch seiner Dauer ab. Die Umordnungen des Zytoskeletts spielen dabei eine wichtige Rolle. Besonders die Bildung polarisierter Zytoskelettstrukturen, wie z.B. Stressfasern [227] oder suprazellulärer Aktinstrukturen [228], sind in der Entwicklung von Organismen entscheidend. Die Rolle mechanischer Stimuli in der Polarisierung von einzelnen Zellen und der synchronisierten Polarisierung von Geweben wird zur Zeit vermehrt untersucht. Die vorliegende Arbeit betont die Rolle, welche unterschiedliche mechanische Stimuli für die mechanische Antwort lebender Zellen und die Zytoskelettstruktur spielen können. Ähnliche Abhängigkeiten der mechanischen Antwort vom Messprotokoll und damit von der Form des mechanischen Stimulus wurden für Aktin- [101], Kollagen- und Fibringele [182] beschrieben. Somit könnte die Fähigkeit auf mechanische Stimuli adaptiv und sensibel zu reagieren eine inhärente Eigenschaft aktiver, biologischer Polymerstrukturen sein. Diese Fähigkeit kann die Grundlage für die stimulusabhängige Bildung angepasster, übergeordneter Strukturen sein. Die Bildung übergeordneter, polarisierter Strukturen ist eine Voraussetzung für die zellübergreifende mechanische Kommunikation in Zellaggregaten und Geweben, die von entscheidender physiologischer Bedeutung ist [227].

## 5. Teil II: Mechanik der Atherosklerose

Krankhafte Veränderungen des Herzens und der Blutgefäße gehören zu den häufigsten Todesursachen in westlichen Ländern [20, 229]. Sie sind häufig eine Folgeerscheinung von Atherosklerose, einer fortschreitenden krankhaften Veränderung der Aorta und anderer Arterien [20]. Atherosklerose entsteht durch eine Fehlregulation des Lipidmetabolismus, die zu einer Immunreaktion führt, in deren Verlauf sich sogenannte Lesionen in der Wand eines Blutgefäßes bilden. Die entstehenden Lesionen bestehen zunächst nur aus weichen Schwammzellen, die das subendotheliale Gewebe nicht mehr verlassen können. In fortschreitenden Lesionen kommt es zu einer Remodellierung des umliegenden Gewebes mit einer Rekrutierung von Muskelzellen, einer verstärkten Bildung von Kollagen, und der Kalzifizierung der Aorta. Folgen sind ein erhöhter Blutdruck und schließlich häufig Herzinfarkte oder Schlaganfälle [20, 66, 67].

Viele Arbeiten zeigen, dass die mechanischen Eigenschaften der Aorta eine wichtige Rolle im Herz-Kreislauf-System spielen [21, 230]. Änderungen der mechanischen Eigenschaften korrelieren mit erhöhtem mechanischen und biochemischen Stress, Bluthochdruck, und Entzündungsreaktionen. Des Weiteren hängen Änderungen der Mechanik mit einer gestörten biochemischen und mechanischen Homöostase zusammen, die wiederum eine Remodellierung des Aortagewebes und eine daraus resultierende Dysfunktion des Gefäßes hervorrufen können [231]. Es hat sich gezeigt, dass die Aortamechanik auch in der Atherosklerose eine Rolle spielt. Die genauen Ursache-Wirkungs-Mechanismen sind trotz vielfältiger Forschungsarbeit noch nicht vollständig verstanden.

Ivabradin ist ein Medikament, das die Herzfrequenz reduziert, ohne Einfluss auf den Blutdruck oder die Kontraktilität des Herzens zu nehmen [131]. Es wurde gezeigt, dass Ivabradin das Fortschreiten von Atherosklerose verhindert [131] und die Größe von atherosklerotischen Lesionen reduzieren kann [130].

Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, welchen Einfluss atherosklerotische Lesionen und das Medikament Ivabradin auf die mechanischen Eigenschaften der Aorta von Mäusen hat. Dazu werden Gewebestücke der Aorta von Wildtypmäusen, atherosklerotischen und ivabradinbehandelten Mäusen (Abschnitt 3.3.1) mittels exzentrischer Scherrheometrie und Zugversuchen (Abschnitt 3.3.2 und Abschnitt 3.3.3) charakterisiert und verglichen.

In Abschnitt 5.1 werden zunächst die Schermessungen vorgestellt. Abschnitt 5.2 beinhaltet die Zugmessungen. In Abschnitt 5.3 werden die Ergebnisse diskutiert und in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet.

## 5.1. Exzentrisches Rheometer

Zunächst wurden Messungen mit Hilfe der Technik des exzentrischen Rheometers (Abschnitt 3.3.2) an Aortagewebe vorgenommen. Die Präparation der Gewebeprobe erfolgte wie in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Es wurden *Amplitudensweeps* (Siehe Abschnitt 2.2.2.3) im Deformationsintervall von  $\gamma_0 = 0,001-0,2$  bei einer Frequenz von 0,5 Hz durchgeführt. Abbildung 5.1 zeigt Ergebnisse für Messungen an Wildtyp-Mäusen. Der elastische Modul nimmt im untersuchten In-

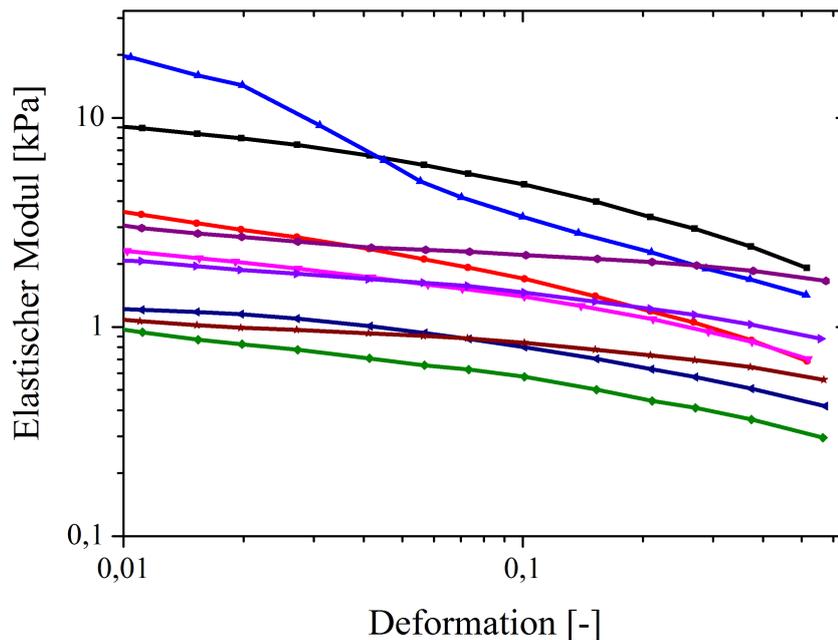


Abbildung 5.1.: Ergebnisse der Amplitudensweepmessungen an Aortenstücken von Wildtyp-Mäusen bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Der elastische Modul  $G'$  ist als Funktion der Deformationsamplitude aufgetragen.  $G'$  nimmt mit steigender Amplitude ab, die Aorta wird also weicher. Es zeigt sich eine große Streuung der Messwerte.

tervall mit steigender Deformationsamplitude ab, die Aorta wird weicher. Es zeigt sich eine große Streuung der Messwerte. Abbildung 5.2 zeigt die statistische Auswertung der Amplitudenmessungen für eine Deformationsamplitude von  $\gamma_0 = 0,1$  für Wildtyp-,  $APOE^{-/-}$ - und Ivabradin-Mäuse. Der Mittelwert der Elastizität weist keine signifikante Änderung, weder durch atherosklerotische Lesionen, noch durch die Ivabradin-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Streuung der Messwerte ist sehr ausgeprägt, vor allem für Ivabradin-Mäuse. Es zeigen sich zwei Gruppen von Messwerten, der erste um den Mittelwert  $G' = 1$  kPa, der zweite um etwa  $G' = 3,5$  kPa gruppiert. Die Ergebnisse der Wildtypmäuse zeigen zwei Ausreißer.

## 5.2 Zugmessung an Aortastücken

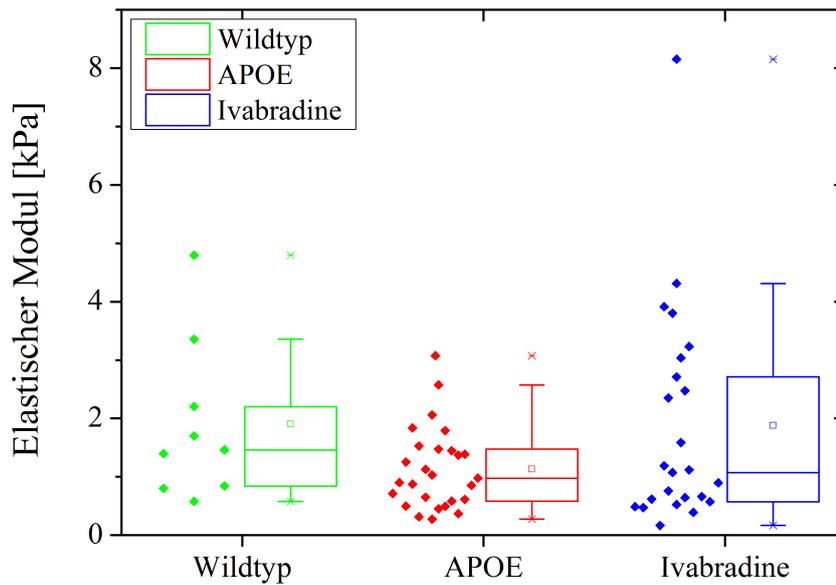


Abbildung 5.2.: Statistische Auswertung der Amplitudensweepmessungen an Aortenstücken von Wildtyp- (grün), APOE<sup>-/-</sup> (rot) und Ivabradin (blau) -mäusen bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Boxen zeigen Median, erstes und drittes Quartil. Whisker geben die Ausreißer (Faktor von 1,5) an, Quadrate den Mittelwert der links neben den Boxen gezeigten Messdaten. Horizontale Linien geben Maximum und Minimum, Kreuze die 99%- und 1%-Marke an. Der Mittelwert des elastischen Moduls  $G'$ , hier bei einer Deformation von 0,1 ändert sich nicht signifikant, weder durch die Fettfutterbehandlung der APOE<sup>-/-</sup>-Mäuse, noch durch die Gabe von Ivabradin im Vergleich zum Wildtyp.

## 5.2. Zugmessung an Aortastücken

Um auszuschließen, dass das negative Ergebnis auf die Messmethode zurückzuführen ist, wurden am gleichen Mausmodell Zugmessungen vorgenommen (Siehe Abschnitt 3.3.3). Die Aortaringe wurden mit konstanter Rate gestreckt und die entstehende Kraft gemessen.

Abbildung 5.3 zeigt eine typische Kraft-Dehnungskurve für eine Aortenstück aus einer Wildtypmaus. Die Kraft-Längen Beziehung weist einen, für Gewebe typischen, exponentiellen Verlauf auf [215]. Die zylinderförmigen Aortenstücke haben präparationsbedingt unterschiedliche Längen. Daher muss die Kraft pro Länge  $f = \frac{F}{L}$  betrachtet werden, um Aussagen über die größenunabhängige Elastizität treffen zu können. Um ein Maß für die Elastizität zu finden wurden die f-s Kurven exponentiell angepasst. Durch Berechnung der Ableitung bei einer Dehnung von  $s=1$  mm

$$E = \frac{\partial f}{\partial s} \quad (5.1)$$

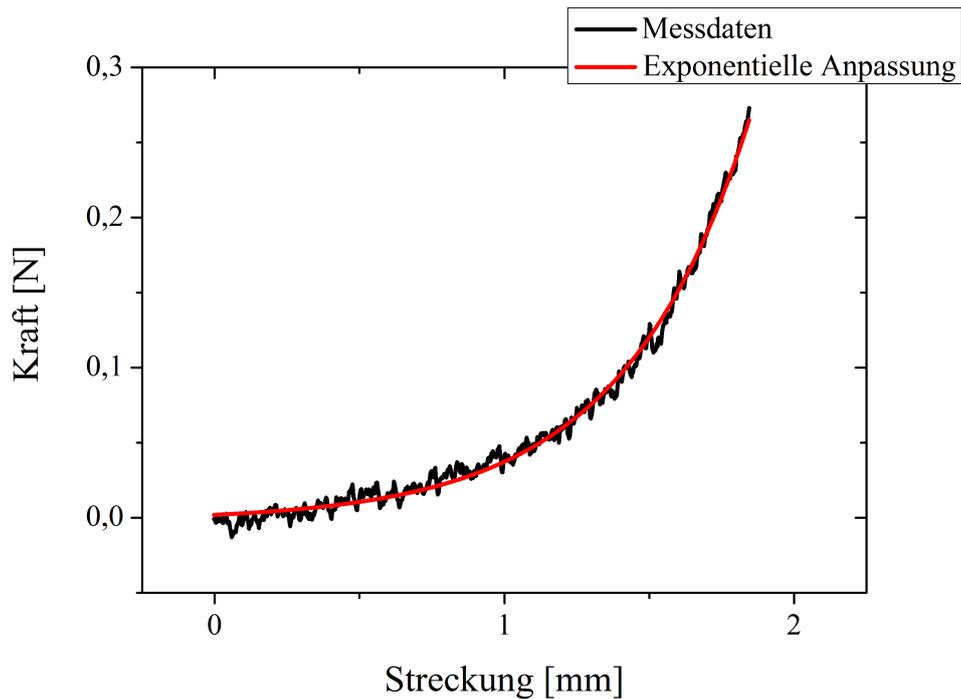


Abbildung 5.3.: Beispielhaftes Ergebnis einer Streckmessung an einem Aortenstück einer Wildtypmaus. Aufgetragen ist die Kraft als Funktion der der Streckung  $s$ . Die F-s-Kurve kann exponentiell angepasst werden. Für alle Messungen ergibt sich eine Anpassung mit  $R^2 > 0.9$ .

erhält man die Elastizität  $E$  als Maß für die Steifigkeit des Aortenstücks. Die Steifigkeit der Aorta wird mit steigender Streckung größer, die Aorta verfestigt sich unter Zugbelastung, im Gegensatz zur Scherung (Abbildung 5.1). Abbildung 5.4 zeigt die statistische Auswertung der Streckexperimente ( $n=15$  für alle Typen). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten von Wildtyp und  $\text{APOE}^{-/-}$ -Mäusen. Die Mittelwerte von Wildtyp- und Ivabradin-Mäusen unterscheiden sich jedoch statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), die von  $\text{APOE}^{-/-}$  und Ivabradin-Mäusen marginal signifikant ( $p < 0,1$ ). Die Probengröße ist mit  $n=15$  jedoch relativ gering. In Abschnitt 3.3.1 wurde erläutert, dass die Aorta in drei Stücke aufgeteilt wurde, um positionsabhängige Effekte zu untersuchen. In Abbildung 5.5 ist die Elastizität  $E$  nach der Position des Aortastücks getrennt aufgetragen. Die Elastizität nimmt für Wildtyp-Mäuse mit wachsendem Abstand von Herzen ab. Dieser Trend geht für  $\text{APOE}^{-/-}$ -Mäuse verloren. Hier zeigt sich kein eindeutiger Trend mehr. Die Behandlung mit Ivabradin stellt den Trend der monotonen Abnahme bei Wildtyp-Mäuse wieder her. Dies kann bedeuten, dass der globale, positionsunabhängige Mittelwert kein guter Indikator für die Änderung der Aortenmechanik von  $\text{APOE}^{-/-}$ -Mäusen ist. Erst die positionsabhängige Auftragung der Elastizitäten zeigt eine deutliche Änderung gegenüber Wildtyp- und Ivabradin-Mäusen.

## 5.2 Zugmessung an Aortastücken

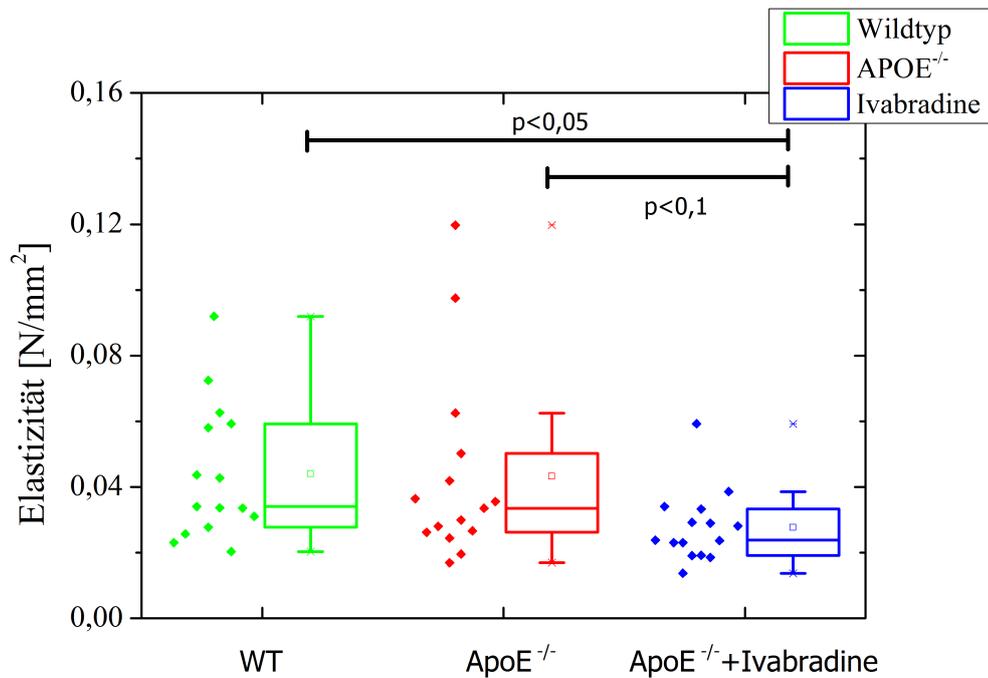


Abbildung 5.4.: Statistische Auswertung der Dehnungsmessungen an Aortenstücken von Wildtyp- (grün), APOE (rot) und Ivabradin (blau) -mäusen (jeweils  $n=15$ ). Boxen zeigen Median, erstes und drittes Quantil. *Whisker* geben die Ausreißer (1,5 mal Boxgröße) an, Quadrate den Mittelwert der links neben den Boxen gezeigten Messdaten. Horizontale Linien geben Maximum und Minimum, Kreuze die 99%- und 1%-Marke an. Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und Ivabradin ( $p<0,05$ ), und ein marginal signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp und APOE<sup>-/-</sup>. Zu Beachten ist jedoch, dass die Probenzahl mit  $n=15$  relativ gering ist.

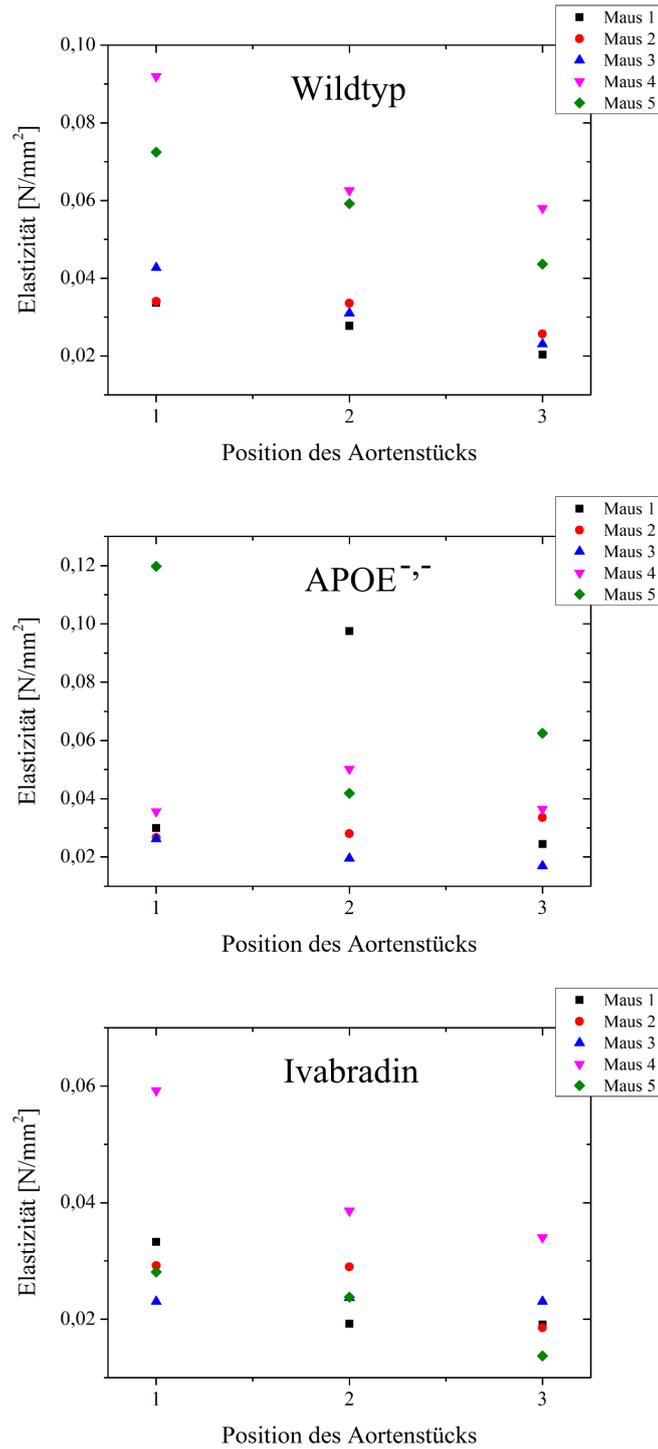


Abbildung 5.5.: Elastizität der Aortastücke als Funktion der Position (1-3) für Wildtyp- (oben), APOE<sup>-/-</sup> (Mitte) und Ivabradin-Mäuse (unten). Für Wildtyp- und Ivabradin-Mäuse zeigt sich eine abnehmende Elastizität. Für APOE<sup>-/-</sup> bricht dieser Trend jedoch zusammen, die Elastizitätswerte sind zufällig verteilt, wahrscheinlich durch lokale Änderungen der Aortasteifigkeit, die nur eines der drei Stücke betrifft.

### 5.3. Zusammenfassung und Diskussion

Atherosklerose kann zu Veränderungen der mechanischen Eigenschaften von Aortagewebe führen [232]. Im Rahmen dieses Projekts sollte untersucht werden, ob dies für das gewählte Mausmodell der Fall ist, und ob das Medikament Ivabradin Einfluss auf die Aortamechanik nimmt. Dazu wurden Scher- und Zugmessungen an Aortastücken durchgeführt.

Schermessungen zeigen abnehmende Schubmodule der Aorten mit steigender Oszillationsamplitude bei einer Frequenz von 0,5 Hz. Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Maustypen. Der elastische Modul variiert sehr stark zwischen verschiedenen Proben.

Zugmessungen zeigen eine Verfestigung der Aorten mit zunehmender Streckung. Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen und APOE<sup>-/-</sup>-Mäusen in Bezug auf den Mittelwert der Aortasteifigkeit. Die Positionsabhängigkeit der Elastizität ändert sich jedoch. Wildtypmäuse zeigen eine abnehmende Steifigkeit mit wachsendem Abstand vom Herzen. Dieser Trend verschwindet bei APOE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass nur an einigen Stellen der Aorta Lesionen entstehen, die groß genug sind um die Aortasteifigkeit zu beeinflussen. Durch diese Lesionen ergäbe sich eine lokale Versteifung der Aorta, die nur Auswirkungen auf eine Position innerhalb der Aorta hat. Die Behandlung mit Ivabradin stellt den Trend der Wildtypmäuse wieder her. Die Gabe von Ivabradin führt des Weiteren zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Abnahme des Mittelwerts der Aortasteifigkeit verglichen mit Wildtyp- und eine marginal signifikante ( $p < 0,1$ ) Abnahme der mittleren Steifigkeit im Bezug auf APOE<sup>-/-</sup>-Mäuse.

Die präsentierten Messdaten zeigen, dass die Zugmessungen besser interpretierbare Ergebnisse liefern, als Schermessungen mittels exzentrischer Rheometrie. Dies ist wahrscheinlich in der besseren Reproduzierbarkeit der Anfangsbedingungen begründet. Im Falle der exzentrischen Rheometrie wird beim Einbringen der Probe in das Rheometer eine nicht genau reproduzierbare Normalkraft aufgebracht (Siehe Abschnitt 3.3.2). Eine genaue Einstellung der Normalkraft war nicht möglich und es konnte keine Möglichkeit zur Kompensation gefunden werden. Das Aufbringen der Normalkraft wirkt wie eine Präkonditionierung der Probe, die nachweislich das mechanische Verhalten von Gewebe beeinflussen kann [194]. Darüber hinaus ist eine mechanische Anisotropie der Aorta eine mögliche Erklärung. Die Steifigkeit in axialer Richtung ist geringer als in umlaufender Richtung, hervorgerufen durch die nematische Ordnung der Bestandteile der extrazellulären Matrix, wie Collagen und Elastin [233, 234, 235]. Beim Einbringen der aufgetrennten Aortastücke wurde nicht auf die Scherrichtung geachtet, so dass es dadurch zu Streuungen der Ergebnisse kommen konnte. Das Einbringen der Probe bei Zugmessungen erfordert keine mechanische Präkonditionierung durch Aufbringen einer Kraft. Darüber hinaus spielt die Anisotropie des Gewebes keine Rolle, da die Zugrichtung für alle Proben gleich ist.

Für Zugmessung ergeben sich Unterschiede zwischen den Mausmodellen. Eine signifikante Zunahme des Mittelwerts der Steifigkeit bei APOE<sup>-/-</sup>-Mäusen findet sich jedoch nicht. Der Grund hierfür kann das gewählte Mausmodell sein. APOE-Mäuse werden für sechs Wochen mit fett- und cholesterinhaltigem Futter versorgt. Dies führt nachweislich zu der Bildung von atheroskle-

rotischen Läsionen. Diese bestehen aber hauptsächlich aus Schwammzellen, eine Kalzifizierung findet in dieser (etwa 20 Wochen) kurzen Zeit kaum statt [130, 236]. Cecelja et al. konnten zeigen, dass nur kalzifizierte atherosklerotische Läsionen einen Einfluss auf die Steifigkeit der Aorta im Menschen haben [236]. Die nichtkalzifizierten Vorstufen der Läsionen haben hingegen keinen Einfluss [236]. Dies könnte erklären, warum sich bei den hier dargestellten Messungen im Mittel kein Unterschied zwischen Wildtyp- und APOE<sup>-/-</sup>-Mäusen findet. Lokal zeigt sich jedoch wahrscheinlich eine Versteifung, die sich im Zusammenbruch der monotonen Abnahme der Elastizität mit wachsendem Abstand vom Herzen widerspiegelt.

Die Behandlung mit Ivabradin stellt die Abnahme der Elastizität mit steigendem Abstand der Gewebeprobe vom Herzen wieder her. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass die Versteifung einzelner Abschnitte der Aorta durch atherosklerotische Läsionen rückgängig gemacht wird. Des Weiteren führt Ivabradin zu einer verringerten mittleren Steifigkeit der Aorta im Vergleich zum Wildtyp und zu APOE<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Langzeitbehandlung mit Ivabradin beim Menschen führt ebenfalls zu einer Abnahme des Steifigkeitsindex der Aorta [237].

Zusammenfassend kann folgende begründete Hypothese formuliert werden: atherosklerotische Läsionen, die aufgrund des Fehlens des Apolipoprotein E und des besonderen Futters entstehen, führen zu einer lokalen Versteifung der Aorta. Das Medikament Ivabradin kann diese lokale Versteifung rückgängig machen. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Custodis et al., die gezeigt haben, dass die Größe vorhandener Läsionen durch die Behandlung mit Ivabradin abnimmt [130]. Die Wirkung von Ivabradin ist jedoch nicht auf Aortaabschnitte mit Läsionen beschränkt. Es kommt zu einer globalen Abnahme der Steifigkeit der ganzen Aorta.

Zukünftige Arbeiten könnten die Positionsabhängigkeit der Elastizität und der atheroskleroseinduzierten Versteifungen genauer untersuchen. Hierzu könnten lokale Steifigkeitsmessungen mit Hilfe von Mikropipetten oder Indentern durchgeführt werden. Des Weiteren könnte die Rolle von nicht-kalzifizierten und kalzifizierten Läsionen auf die Änderungen der Steifigkeit weiter untersucht werden. Dazu könnten die Mäuse über einen längeren Zeitraum mit Fettfutter behandelt werden oder es müsste ein anderes Mausmodell gewählt werden.

Ein definiertes Präkonditionierungsprotokoll könnte bessere Ergebnisse der Schermessungen ermöglichen. Somit hätte man die Möglichkeit zwei unterschiedliche Messungen mit einem Messgerät durchzuführen und zu vergleichen. Insbesondere die Tatsache, dass Schermessungen einen abnehmenden Schubmodul, Zugmessungen aber eine zunehmende Steifigkeit mit wachsender Verformung zeigen könnte von großem Interesse sein.

## 6. Teil III: Mechanobiologie der Hydraregeneration

Ein Meilenstein der Evolution war der Übergang von einzelligen zu multizellulären Lebewesen, die eine oder mehrere Körperachsen aufweisen. Die Grundlagen der *de novo* Achsenbildung, die ausgehend von einem symmetrischen Zellaggregat erfolgt, sind noch nicht vollständig verstanden. *Hydra* ist ein Modellorganismus für Embryonalentwicklung und Achsenbildung [71]. Es handelt sich um einen Süßwasserpolyphen, aus der Klasse der *Hydrozoa* und dem Stamm der *Cnidaria*, der aus einem zylindrischen Körper mit einem Fuß und einer einzigen Körperöffnung mit umliegenden Tentakeln besteht. Der Körper ist aus einer Zelldoppelschicht, die durch eine extrazelluläre Matrix getrennt ist, aufgebaut. Kleine Gewebestücke und sogar Aggregate aus Einzelzellen können sich zu einer vollständigen *Hydra* regenerieren. Sie formen zunächst eine Hohlkugel, die osmotisch getriebene, isotrope Oszillationen ausführt [72, 76]. Die Hohlkugel bricht ihre Symmetrie und die Oszillationen erfolgen in der Folge in ellipsoider Form bis die *Hydra* vollständig regeneriert ist [73, 75]. Das Vorhandensein der Oszillationen führte zu der Idee, dass diese als mechanischer Stimulus fungieren und somit einen Beitrag zur Symmetriebrechung leisten. Ein theoretisches Modell, basierend auf einem mechanisch stimulierten Turing-Mechanismus, kann die Symmetriebrechung sehr gut erklären [75]. Bisher konnten die Aktivator und Inhibitorsubstanzen, die Grundlage des Turing-Modells, nicht identifiziert werden. Die skalenfreien Fluktuationen der mRNA des Gens *ks1*, welches als Marker für Kopfbildungspotential angesehen wird [80, 81], führten zu der Idee, dass sich die *Hydra* während der Regeneration inhärent getrieben auf einen kritischen Punkt zubewegt [73, 82]. Charakteristisch für einen kritischen Punkt wären, dass kleinste äußere Stimuli ausreichen, um eine Achse zu definieren. Dies konnte mit Hilfe eines Temperaturgradienten, in dem sich die Körperachse der *Hydras* ausrichtet, nachgewiesen werden [73]. Ein theoretisches Modell, basierend auf der intrazellulären Produktion und der interzellulären Weitergabe eines Faktors X und der daraus entstehenden selbstorganisierten Kritikalität, kann die Ergebnisse sehr gut reproduzieren [82]. Es beantwortet jedoch nicht die Frage nach der Grundlage der Fluktuationen und der Natur des Faktors X und damit der Informationsweitergabe.

In dieser Arbeit sollen zwei Teilaspekte der Symmetriebrechung in *Hydra* untersucht werden. Zunächst wurde die Dynamik des *ks1* Proteins mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, um zu überprüfen, ob sich Fluktuationen auch auf Proteinebene wiederfinden. Dies ist in Abschnitt 6.1 beschrieben. Des Weiteren wurde der Einfluss zellübergreifender Aktinstrukturen (Myoneme) auf die Symmetriebrechung untersucht. Die Ergebnisse sind in Kapitel 6.2 dargestellt. In Kapitel 6.3

werden die Ergebnisse diskutiert und eingeordnet.

## 6.1. Dynamik der ks1 Expression

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass während der Regeneration skalenfreie Fluktuationen der ks1-mRNS stattfinden [73, 82], die ab einer Regenerationszeit von etwa 20 Stunden von einer stabilen sigmoidal anwachsenden ks1 Transkription abgelöst werden [73]. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das ks1 Protein ebenfalls Fluktuationen oder gegebenenfalls eine abweichende Dynamik aufweist.

Zur Untersuchung der ks1 Proteindynamik wurde hier die Regeneration von *Hydrakugeln* (*Hydra magnipapillata* mit GFP-ks1, Siehe Abschnitt 3.4) mittels Fluoreszenzmikroskopie mikroskopisch aufgenommen. Alle 2 Minuten wurden Bilder aufgenommen. Die Belichtung im blauen Wellenlängenbereich wurde nur für etwa 2 Sekunden angeschaltet, um eine Reaktion der *Hydra* auf das Anregungslicht zu vermeiden. Zur Auswertung wurden die mittleren Grauwerte der aufgenommenen Bildern mit Hilfe von IMAGEJ bestimmt. Diese verändern sich, sobald das ks1 Protein vermehrt vorhanden ist. Die aufgenommenen Bilder wurden auf die maximal vorkommende Intensität normiert. Sobald die ks1-Expression einsetzt werden die ks1-Spots wesentlich intensiver als der Hintergrund. Somit fällt der mittlere Grauwert mit steigender ks1-Expression ab (Siehe Abbildung 6.1).

Das Einsetzen des Grauwertabfalls wird als Zeitpunkt der beginnenden stabilen ks1-Protein-Expression gewertet. Es zeigt sich, dass für unterschiedliche Regenerationen die ks1 Expression zu unterschiedlichen Zeitpunkten  $T=5-22$  h beginnt (Siehe Abbildung 6.1). Einige Regenerationen weisen eine sehr frühe stabile ks1 Expression  $t \approx 5-10$  h auf. Zur Kontrolle wurde der Kopf eines *Hydrapolyps* abgetrennt und die ks1-Expression untersucht. In diesem Fall muss keine neue Achse gebildet werden. Es erfolgt ausschließlich die Bildung eines neuen Kopfes. Die ks1-Expression setzt hier nach etwa 6 Stunden ein. Dies kann bedeuten, dass in einigen *Hydrakugeln* keine *de novo* Achsenbildung, sondern nur eine Neubildung des Kopfes und Fußes bei vordefinierter Achse erfolgte.

Abbildung 6.2 zeigt die *Hydrakugel* zu verschiedenen Zeiten im Regenerationsprozess, vor und nach dem Symmetriebruch. Es sind scheinbar keine Fluktuationen der Fluoreszenz vorhanden. Es erfolgt ein zeitlich stabiler Anstieg der ks1-Expression, der einem sigmoidalen Verlauf folgt, analog zur mRNA Expression nach der Symmetriebruchung [73]. Völlig ausschließen lassen sich ks1 Proteinfluktuationen nicht, da nur Aufnahmen in einer Fokusebene gemacht wurden. Aussagen über die gesamte Kugel können somit nicht getroffen werden. Es ist allerdings wenig wahrscheinlich, dass in acht Experimenten keinerlei Fluktuationen zu sehen sind, nur aufgrund der Beschränkung auf eine Fokusebene.

## 6.1 Dynamik der ks1 Expression

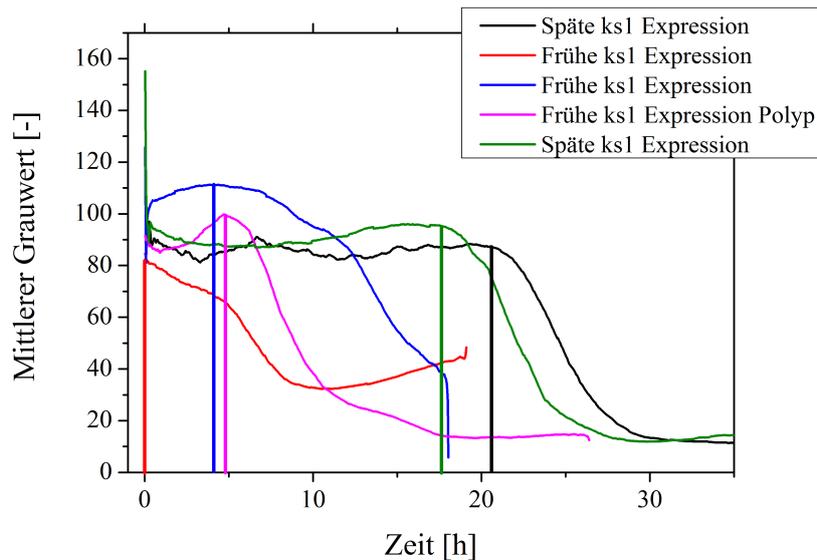


Abbildung 6.1.: Zeitlicher Verlauf des mittleren Grauwerts von Fluoreszenzaufnahmen, die während der Regeneration von *Hydra magnapapillata* (GFP-ks1) gewonnen wurden. Der Grauwert ist für eine gewissen Zeit ungefähr konstant. Beim Einsetzen der stabilen ks1-Protein-Expression nimmt der Grauwert ab. Die Dynamik folgt einem sigmoidalen Verlauf, analog zur mRNA [73]. Der zeitliche Beginn der Expression variiert von etwa 5-22 Stunden. *Polyp* beschreibt die Ergebnisse für ein Experiment, bei dem nur der Kopf einer Hydra abgetrennt und im folgenden die ks1 Expression untersucht wurde. Dieses Experiment wurde durchgeführt, um die früh einsetzende ks1 Expression in einigen Experimenten zu überprüfen. Diese könnte daher kommen, dass keine *de novo* Achsenbildung erfolgte, sondern nur eine Regeneration der noch vorhandenen Achse.

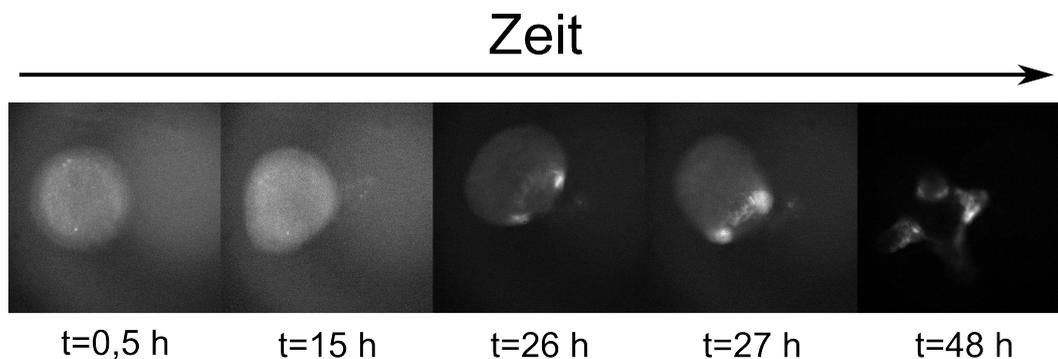


Abbildung 6.2.: Zeitaufgelöste Regeneration einer *Hydra*. Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Eine deutliche ks1 Expression ist erst nach etwa 26 Stunden an der Basis der entstehenden Tentakel erkennbar. Vorher ist keine lokale ks1 Expression auszumachen. Auf Proteinebene scheint es keine Fluktuationen im Vorfeld der Achsenbildung zu geben. Völlig ausgeschlossen werden können die Fluktuationen nicht, da nur Aufnahmen in einer Fokusebene gemacht wurden.

## 6.2. Einfluss des Aktinzytoskeletts auf die Symmetriebrechung

In vielen entwicklungsbiologischen Prozessen spielen Aktin und im speziellen der kontraktile Aktomyosinapparat einzelner Zellen eine wichtige Rolle [15, 238]. *Hydrapolypen* weisen ein zellübergreifendes Aktinskelett, sogenannte Myoneme, auf. Die Myoneme ergeben eine Asymmetrie bzw. eine Polarisation auf Ebene des Zytoskeletts. Was geschieht mit diesen Strukturen nach dem Schneiden und in der sich regenerierenden *Hydrakugel*? Wenn eine *de novo* Achsenbildung stattfindet, so müsste zunächst die Asymmetrie auf Zytoskelettebene verschwinden. Der Wiederaufbau dieser Asymmetrie könnte möglicherweise für die Achsenbildung verantwortlich sein.

Um diese Hypothese zu untersuchen wurden *Hydrakugeln* zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb des Regenerationsprozesses fixiert und das Aktinzytoskelett mittels Rhodamin-Phalloidin gefärbt (Siehe Abschnitt 3.4.4). Die Hydrapräparation wurde in Zusammenarbeit mit Heike Dobicki, Aravind Pasula und Julia Flesch durchgeführt.

Abbildung 6.3 zeigt Fluoreszenzaufnahmen des Aktinzytoskeletts zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Regeneration. Es zeigt sich, dass direkt nach dem Schneiden noch übergeordnete Aktinstrukturen vorhanden sind. Diese verschwinden nach 1-2 Stunden ( $n=5$ ), so dass die Asymmetrie des Aktins aufgelöst wird. Die ersten Aktinstrukturen, die zu erkennen sind entstanden hier nach frühestens 18 Stunden ( $n=7$ ). In einem Experiment entstanden diese sogar erst nach 30 Stunden. Dies legt nahe, dass das zellübergreifende Aktinskelett keine aktive Rolle bei der Symmetriebrechung spielt. Das kortikale Aktin ist jedoch stets vorhanden. Dieses könnte ebenfalls eine Rolle spielen, die hier jedoch nicht untersucht wird.

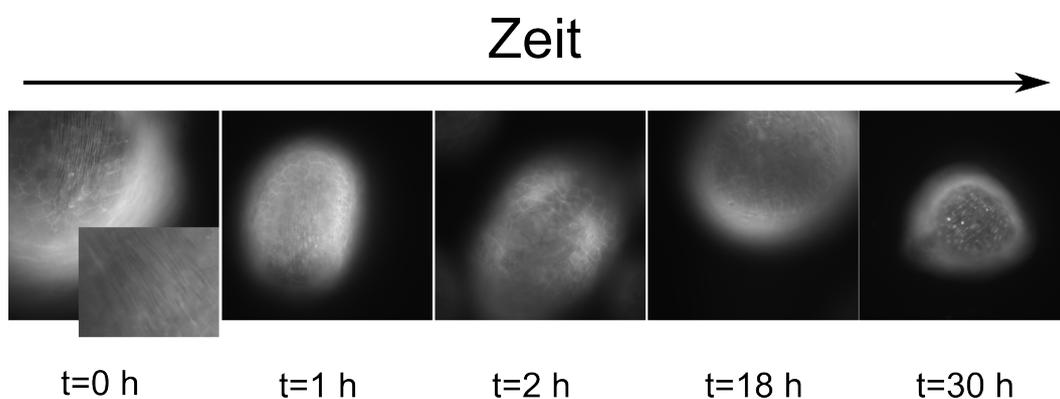


Abbildung 6.3.: Gefärbtes Aktinzytoskelett von *Hydrakugeln* zu verschiedenen Zeitpunkte während der Regeneration. Direkt nach dem Schneiden ( $t=0$  h,  $n=2$ ) sind noch deutliche zellübergreifende Aktinstrukturen erkennbar, die aber nach und nach mit der Zeit verschwinden ( $t=1-2$  h,  $n=5$ ). Das Aktinskelett wird erst zu einem späten Zeitpunkt während der Regeneration sichtbar (18-30 h,  $n=7$ ). Dies legt nahe, dass das zellübergreifende Aktinskelett keine Rolle bei der Symmetriebrechung spielt. Der Aufbau erfolgt erst nach der Symmetriebrechung entlang der vorgegebenen Achse.

### 6.3. Zusammenfassung und Diskussion

Im vorangegangenen Abschnitt wurden zwei Teilaspekte der *Hydraregeneration* betrachtet. Zum Einen wurde die Dynamik der Expression des ks1 Proteins und zum Anderen das Verhalten des polarisierten Aktinzytoskeletts (Myoneme) während der Regeneration untersucht.

Die Dynamik des ks1-Proteins während der Regeneration wurde mittels zeitaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie charakterisiert. Die Fluoreszenzintensität zeigt einen sigmoidalen Verlauf, wobei der Anstieg der ks1 Expression an der Basis der Tentakel beginnt und somit nach der Symmetriebrechung beginnt. Die Dynamik stimmt sehr gut mit den Ergebnissen von Soriano et al. überein [73]. Es zeigen sich keine Fluktuationen des Proteins während der Regeneration und vor der Symmetriebrechung. Dies deutet darauf hin, dass die Fluktuationen nur auf Ebene der mRNS erfolgen. Dies wurde schon von Gamba et al. auf Basis eines selbstkritischen Modells der mRNS-Fluktuation von ks1 vorgeschlagen. Die Ergebnisse der Modellierung zeigen, dass die Fluktuationen auf einer Skala von einer Minute stattfinden [82]. Die Zeitskala, auf der Proteine produziert werden ist jedoch wesentlich größer ( $>\approx 10$  Minuten) [239, 240], so dass es unwahrscheinlich wäre, dass die Fluktuationen auf Proteinebene zu finden sind. Somit unterstützen die hier präsentierten experimentellen Ergebnisse die Implikationen des Modells von Gamba et al. [82].

Das ks1-Protein wird somit scheinbar erst synthetisiert nachdem die Achse schon festgelegt ist. Es ist bekannt, dass das ks1 Gen von sehr vielen regulatorischen Abschnitten umgeben ist [80, 81]. Somit könnten die Ergebnisse, neben der Regulation auf Transkriptionsebene, auch auf eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene hindeuten. Die genetische Sequenz des ks1 Proteins und im speziellen die Anzahl der ks1 Sequenzen im *Hydragenom* unterscheiden sich sehr stark zwischen verschiedenen Unerarten von Hydra [241]. Soriano et al. verwendeten *Hydra vulgaris* [73], während für diese Arbeit *Hydra magnipapillata* verwendet wurde. Dies könnte ebenfalls ein Grund für das Fehlen der Fluktuationen des ks1 Proteins sein. Auffallend ist, dass der Zeitpunkt, an dem der Anstieg der ks1 Expression beginnt stark variiert. Soriano et al. beschreiben einen Anstieg bei etwa 18 Stunden nach Beginn der Regeneration. Hier ergeben sich Anstiege der Proteinexpression bei Zeiten von 0 Stunden bis 21 Stunden. Eine mögliche Erklärung ist, ebenfalls der unterschiedliche verwendete *Hydraart*. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass für die sehr kurzen Zeiten kein Verlust der initialen Symmetrie stattgefunden hat. Um dies zweifelsfrei zu entscheiden müssten die Regenerationen genauer untersucht werden [242], was jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit ist. Es stellt sich die Frage nach der Aufgabe der ks1-Fluktuationen auf Ebene der mRNS. Allerdings ist selbst die Rolle des ks1-Proteins im Hydraorganismus immer noch weitgehend unbekannt [80, 81]. Wären die unterschiedlichen *Hydraarten* tatsächlich der Grund für das Fehlen der Fluktuationen, so wäre die Rolle der ks1-Fluktuationen möglicherweise auf eine *Hydraart* beschränkt. Dies wäre insbesondere interessant im Bezug auf die einheitlichen Prozesse in der Entwicklung von Organismen. Viele der Signalkaskaden in der Entwicklung sind hochgradig konserviert. Strainspezifische Fluktuationen wären somit von großem Interesse.

Es existieren viele Hinweise auf die Beteiligung von Aktin und Myosin an diversen entwicklungsbio-

logischen Prozessen [15, 16, 238, 243]. In *Hydra* findet sich, neben dem kortikalen Aktinzytoskelett, ein Netz von zellübergreifenden Aktinfasern, sogenannte Myoneme, die eine stark polarisierte Struktur innerhalb des Organismus bilden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Strukturen in einem frühen Stadium des Regenerationsprozesses abgebaut werden und erst nach der Symmetriebrechung wieder entstehen. Es wurde spekuliert, dass eine *de novo* Achsenbildung nur für ausreichend kleine Gewebestücke stattfindet. Es zeigt sich, dass die Myoneme für große Gewebestücke nicht abgebaut werden [242]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass zu Beginn der Regeneration in *Hydra* zunächst die vorhandene Polarisation des Zytoskeletts zerstört werden muss, um einen isotropen Ausgangszustand zu erreichen. Das übergeordnete Aktinzytoskelett scheint bei der Symmetriebrechung selbst keine Rolle zu spielen. Myoneme sind somit wahrscheinlich auch nicht an den Oszillationen der *Hydrakugel* vor der Symmetriebrechung [72] beteiligt. Auch in anderen Organismen zeigt sich die Bedeutung unterschiedlicher Aktinstrukturen während der Entwicklung. So teilt sich der sogenannte Dorsalschluss in *Drosophila melanogaster* in zwei Phasen. Die erste Phase umfasst Oszillationen der Zellfläche und des gesamten Gewebes, die durch Aktomyosinkontraktilität der einzelnen Zellen hervorgerufen werden. Die zweite Phase ist charakterisiert durch eine Verkürzung des Gewebes, an dem suprazelluläre Aktinstrukturen beteiligt sind [16, 228, 244]. Eine ähnliche Zweiteilung könnte sich auch in der *Hydregeneration* zeigen. Für die Symmetriebrechung sind die mechanischen Eigenschaften auf Einzelzellebene entscheidend. Erst wenn die globale Symmetrie gebrochen ist, entstehen neue suprazelluläre Strukturen, die die Symmetrie stabilisieren [242].

Um die Rolle des Zytoskeletts in der Symmetriebrechung zu charakterisieren sind weitere Experimente notwendig. Der Einsatz von pharmakologischen Wirkstoffen in Kombination mit fluoreszenzmikroskopischer Aufnahme des Zytoskeletts können weiteren Aufschluss über den Einfluss der Zellmechanik geben. Des Weiteren könnten zeitaufgelöste Messungen der mechanischen Eigenschaften der *Hydrakugel* mittels Gewebetensiometrie [245] Einsicht in die Änderungen der mechanischen Eigenschaften des Gewebes und deren Korrelation mit der Symmetriebrechung geben.

## 7. Fazit

Die vorliegende Arbeit zeigt die Relevanz der Mechanik biologischer Materialien auf der Ebene der einzelnen Zelle, des Gewebes und des sich regenerierenden Organismus. Die grundlegenden Elemente der Biomechanik sind die Biopolymere und die assoziierten, vernetzenden Proteine, sowohl des Zytoskeletts, als auch der extrazellulären Matrix. Vor allem die Polarisation (nematische Ausrichtung) von Biopolymernetzwerken und die dynamische Reaktion auf mechanische Stimuli (inelastische Mechanik) spielen eine wichtige Rolle in der Mechanobiologie. Einzelne Zellen können ihr Zytoskelett als Reaktion auf mechanische Stimuli ausrichten, was zu anisotropen mechanischen Eigenschaften führt [59, 188]. In Blutgefäßen führen Veränderungen im Blutfluss zu einer Remodellierung biopolymerer Strukturen, wie Kollagen und Elastin, was zu verminderter Leistungsfähigkeit der Gefäße führt [231, 234, 235]. Die gegenseitige Beeinflussung von Zellen und extrazellulärer Matrix ist die Grundlage der Entwicklung von Organismen und der Gewebemöbiostase [246]. Sie erlaubt ein positionsabhängiges Verhalten, wie z.B. Differenzierung, von Zellen [247] und die Entstehung polarisierter Strukturen [59, 147]. Letztere sind entscheidend für die langreichweitige Übertragungen von Informationen durch mechanische Stimuli [141, 248]. In der Entwicklung und Regeneration von Organismen spielt diese langreichweitige Kommunikation über ein ganzes Gewebe hinweg eine wichtige Rolle [73, 228].

Zusammenfassend ist die Eigenschaft von Biopolymernetzwerken, auf mechanische Stimuli adaptiv und selektiv zu reagieren und polarisierte und übergeordnete Strukturen zu bilden, eine Voraussetzung für die Entstehung komplexer Organismen. Für Experimentatoren und Theoretiker stellen diese Systeme eine große Herausforderung dar, da es sich um komplexe Systeme außerhalb des thermodynamischen Gleichgewichts handelt, die auf kleinste Stimuli adaptiv reagieren können und ein Gedächtnis aufweisen. Trotz vieler Forschungsarbeit ist ein grundlegendes Verständnis noch nicht in Reichweite, was die Mechanobiologie zu einem spannenden und aktuellen Forschungsfeld macht.



# A. Anhang

## A.1. Material und Methoden

### A.1.1. Medien

- 2x HBS (1 Liter)
  - 10 g HEPES
  - 16 g NaCl
  - 2 g Dextrose
  - 7,4 g KCl
  - 0,4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(7H<sub>2</sub>O)

Stoffe werden in Milliporewasser gelöst. Der pH-Wert wird auf 7,1 eingestellt. Die fertige Lösung wird durch einen Sterilfilter mit Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$  filtriert. Aliquots (500  $\mu\text{l}$ ) werden eingefroren.

### A.1.2. Herstellung der Mikroplatten

Die Mikroplatten wurden mit dem Programm aus Tabelle A.1 im *pipette puller* (Sutter Instruments) hergestellt. In den meisten Fällen trennen sich die zwei Hälften der Mikroplatte durch den

Schritt	<i>heat</i>	<i>pull</i>	<i>velocity</i>	<i>time</i>
1	465	1	25	150
2	465	0	25	150
3	465	0	25	150
4	465	25	25	150
5	465	0	0	150
6	435	0	0	150

Tabelle A.1.: Programm zur Herstellung der Mikroplatten für Einzelzellexperimente

Zug in Schritt 4. In seltenen Fällen funktionierte dies nicht, weshalb noch zwei weitere Aufheischritte hinzugefügt wurden.

### A.1.3. Präparation der Zellmonoschichtreologie

1. Waschen der Glasplatten mit Wasser
2. Reinigung der Glasplatten in 4%-iger Deconex-Lösung im Ultraschallbad (15 Minuten bei 40°)
3. Waschen der Glasplatten mit 70%-igem Ethanol
4. Abspülen mit reinem Ethanol unter Sterilbank
5. Trocknen lassen
6. Aufkleben der Metallhalterung auf den Ring mit UV-Kleber
7. Trocknung des Klebers unter UV-Lampe
8. Abspülen des Rings mit reinem Ethanol unter Sterilbank
9. Kontaktieren der Platten
10. Überprüfung der Newton'schen Interferenzstreifen zur Prüfung der Parallelität (maximal 5-6, ansonsten erneute Reinigung)
11. Aufbringen der Fibronektinlösung
12. einstündige Inkubation bei Raumtemperatur unter der Sterilbank
13. Starten des Rheometers und der Software
14. Präparation der Zellen
15. Abspülen der unteren Platte mit PBS
16. Fixierung der Platte mit Reservoir im Rheometer
17. Benetzung mit HBSS
18. Aufbringen der Zell-Bead-Suspension (Auf-und-ab pipettieren, um die Bildung von Zellclustern zu vermeiden)
19. Abspülen des Rings mit PBS
20. Anschrauben des Drehsensors (Schrauben nicht fixieren) so dass sich der Ring ausrichten kann
21. Einbringen der Geometrie ins Rheometer
22. Manuelles Feststellen der Geometrie in der Rheometersoftware (CR=0)
23. Einstellen von CS=0, so dass sich Geometrie in eine kräftefreie Position bringt

## A.1 Material und Methoden

---

24. Verringern der Lifthöhe per Hand am Rheometer bis der Ring in Kontakt mit Flüssigkeit kommt
25. Langsames Verringern der Lifthöhe, bis nur noch ein geringer Spalt verbleibt (es dürfen sich keine Luftblasen bilden)
26. Verringern der Lifthöhe per Terminal-Software mit einer Geschwindigkeit von etwa 1-5 Mikrometern pro Sekunde (Terminal Befehl: T DS 0.0025)
27. sobald die Normalkraft ansteigt muss die Geschwindigkeit verringert werden (Terminal Befehl: T DS 0.0001)
28. Lift stoppen sobald eine Normalkraft von 2 Newton erreicht ist (Terminal Befehl: I LH)
29. Foto der Monoschicht im gequetschten Zustand
30. 45 Minuten Wartezeit
31. Fixieren der Ausrichtung des Rings mit UV-Kleber
32. Trocknen des UV-Klebers mit UV-Lampe für etwa 15 Minuten
33. Wartezeit, so dass eine Adhäsionszeit von insgesamt 1,5 Stunden erreicht wird
34. Einstellen von  $CR=0$ , damit sich der Ring beim Anheben des Lifts nicht dreht
35. an dieser Stelle kann das Medium gegen Medium mit pharmakologischen Wirkstoffen ausgetauscht werden. Dieses wird während des Anhebens des Lift zwischen die Platten gesaugt und kann im Folgenden auf die Zellen wirken.
36. Vergrößern der Lifthöhe mit Terminal Software (Terminal Befehl: T DS -0.0001) bis keine Normalkraft auf die Zellen wirkt
37. Einstellen des Plattenabstands in der Rheometersoftware per Terminal Software (Terminal Befehl: T GO X). X ist dabei die Strecke in Metern, die zur aktuell angezeigten Spalthöhe addiert werden muss, um den gewünschten Spalt einzustellen (z.B. T GO 0.002345).
38. Einstellen auf  $CS=0$ . Dadurch relaxieren die Zellen und stehen nicht unter einer Vorspannung bei Beginn der Messung.
39. 5-10 minütige Wartezeit zur Relaxation der Zellen (eventuell zusätzliche Wartezeit zum Wirken von pharmakologischen Wirkstoffen)
40. Speichern der Präparationsdatei
41. Foto der Monoschicht vor der Messung (somit kann sichergestellt werden, dass die Zellen gequetscht wurden)
42. Öffnen der Labviewsoftware
43. Starten der gewünschten Messung

Es ist sehr wichtig, dass zwischen Einbringen der Zellen ins Rheometer und der Kontaktierung mit beiden Platten (Schritt 18-28) nicht mehr als 5-10 Minuten vergehen. Ansonsten findet keine starke Adhäsion an beiden Platten statt und die Zellen lösen sich schon für kleine Stimuli.

## A.2. Datenanalyse

In diesem Abschnitt soll der Programmcode, der zur Berechnung der mechanischen Eigenschaften von Einzelzellen, zur Modellierung, und zur Bildaufnahme erstellt wurden zusammengefasst werden.

### A.2.1. Berechnung mechanischer Größen aus den elektrischen Rohdaten des Rheometers

```
clear
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
                                %Data acquisition%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
str='Doktorarbeit\Fourier\2010-19-05\'; % Datenordner
datname='oszisall.txt'; % Dateiname
data = load([str datname]);
start =1;
stop=length(data);
M0=92; % Drehmomentwert bei einer Deformation von 0,02 und einer Frequenz
von 0,5 Hz zur Berechnung der Zellzahl
sinus=data(start:stop,2); % Rohdaten Rotationsencoder sinus
cosinus=data(start:stop,3); %Rohdaten Rotationsencoder cosinus
drehmoment=data(start:stop,4); % Rohdaten Drehmoment
vorzeichen=data(start:stop,5); % Vorzeichen Drehmoment
for i=1:length(sinus)
zeit(i)=0.01*i;% Zeitvektor
end;
s0=sinus(1:100);% Startpositionsbestimmung sinus
c0=cosinus(1:100);%Startpositionsbestimmung cosinus
offsin=mean(s0);%
offcos=mean(c0);%

L=length(sinus);
fsample=100; % Datenaufnahmerate
```

## A.2 Datenanalyse

---

```
Tsample=1/fsample; % zeitlicher Abstand der Samples
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
                    %Calculation of torque and deformation
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

signalA=(sinus-2.5)/4; % Umrechnung der sinus und cosinus signale
signalB=(cosinus-2.5)/4; % in 1V peak to peak signale symmetrisch um 0

signalA0=(mean(s0)-2.5)/4;% Startpunkt
signalB0=(mean(c0)-2.5)/4;% Startpunkt

% Quadratursignale
for i=1:length(sinus)
    if signalA(i)<0
        rechteckA(i)=0;
    else rechteckA(i)=1;
    end;
    if signalB(i)<0
        rechteckB(i)=0;
    else rechteckB(i)=1;
    end;
end;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
% Änderungen im Quadratursignal, zur Bestimmung der Drehrichtung
deltaA(1)=0;
deltaB(1)=0;
for i=2:length(sinus)
    deltaA(i)=rechteckA(i)-rechteckA(i-1);
    deltaB(i)=rechteckB(i)-rechteckB(i-1);
end;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

c0=signalA0./signalB0;
c=signalA./signalB;
% Berechnung des Drehwinkels
count(1)=0;
for i=2:length(c)
    if deltaB(i)==1
        if abs(atan(c(i)))>0.1
```

---

```
    if rechteckA(i)==0
        count(i)=count(i-1)+1;
    end;
    if rechteckA(i)==1
        count(i)=count(i-1)-1;
    end;
else count(i)=count(i-1);
end;
end;
if deltaB(i)==-1
    if abs(atan(c(i)))>0.1
        if rechteckA(i)==0
            count(i)=count(i-1)-1;
        end;
        if rechteckA(i)==1
            count(i)=count(i-1)+1;
        end;
    else count(i)=count(i-1);
end;
end;

if deltaA(i)==1
    if abs(atan(c(i)))>0.5
        if rechteckB(i)==0
            count(i)=count(i-1);%-1;%
        end;
        if rechteckB(i)==1
            count(i)=count(i-1)+1;
        end;
    else count(i)=count(i-1);
end;
end;
if deltaA(i)==-1
    if abs(atan(c(i)))>0.5
        if rechteckB(i)==0
            count(i)=count(i-1);%-1;%
        end;
        if rechteckB(i)==1
```

## A.2 Datenanalyse

---

```
        count(i)=count(i-1)+1;
    end;

    else count(i)=count(i-1);
    end;
end;

if deltaA(i)==0 && deltaB(i)==0
    count(i)=count(i-1);
end;

end;
alpha0=atan(mean(c0));
alpha=atan(c)+transpose(count).*pi;
gamma=-(alpha-alpha0).*0.02/((5000*15*10^(-6))); % Deformation
mgamma=mean(gamma); % Mittelwert der Deformation
%Berechnung des Drehmoments aus Rohdaten (Drehmoment und Vorzeichen) unter
Verwendung der experimentell bestimmten Eichkurve
if vorzeichen(1)<1

    torque(1)=-((0.023+37848.55589*(abs(drehmoment(i)+0.00070726))^(2.04291)));

else

    torque(1)=(0.023+37848.55589*(abs(drehmoment(i)+0.00070726))^(2.04291));

end;

for i=2:length(sinus)
    if vorzeichen(i)<2.5 %&& abs(vorzeichen(i)-vorzeichen(i-1))<.1

        torque(i)=-((0.023+37848.55589*(abs(drehmoment(i)+0.00070726))^(2.04291)));

    else

        torque(i)=(0.023+37848.55589*(abs(drehmoment(i)+0.00070726))^(2.04291));
    end;
end;
to=transpose(torque);
```

```

N=4051.1*M0; Bestimmung der Zellzahl für Fibroblasten
%N=956.46*M0; % Bestimmung der Zellzahl für HELA-Zellen

Azelle=pi*(12)^2; %mittlere Zellfläche%
F=torque*1000/(0.2*N); % Kraft auf die einzelne Zelle
tau=(torque*10^(6)./0.02)/(N*Azelle); % Schubspannung

dat=[transpose(zeit),gamma, transpose(tau),,];% J]; % speichern der Daten
ausgabe='matlabdata.txt';
save([str ausgabe], 'dat', '-ascii')

```

### A.2.2. Berechnung Schubmodule Einzelzellen

```

clear;
rng(sum(100*clock), 'twister'); % Initialisierung Zufallsgenerator
% D=0.25*randn(300000,1)+6.17;
% C=exp(D);
% C=C(C>314);
M=[]; % Drehmomentamplituden aus Experiment
gamma=[]; % Deformationsamplituden aus Experiment
d=0.005; % Breite Ring
D=24*10^(-6); % mittlerer Durchmesser Zellen
R=0.02; % Radius Ring
X=(n)*D; % Einstellen der gewünschten Zellzahl durch den Abstand zwischen
zwei Zellen über Parameter n
nmax=d/(X); % maximale Anzahl Zellen in radialer Richtung
nmaxg=floor(nmax); % nmax aus N
r=0:1:nmaxg; % Unterteilung der radialen Richtung
ri=-(2*r+1)*X/2+R; % radiale Positionen der Zellen
U=2*pi*ri*1000000; % Umfang bei Radius ri
mmm=floor(max(U)/(30)); % maximale Anzahl Zellen im Umfang
V=zeros(nmaxg,mmm);
ARE=0;
for i=1:nmaxg+1
    Dx=0.26*randn(30000,1)+6.17; % logarithmische Normalverteilung der
    Zellfläche
    C=exp(Dx); % Umrechnung n Fläche
    C=C(C>314); % nur Zellen berücksichtigen, die beide Platten berühren
    c=1;

```

## A.2 Datenanalyse

---

```
while sum(2*sqrt(C(1:c)/pi))<U(i)
    c=c+1;
end;
V(i,1:c)=C(1:c);
ARE=ARE+ri(i)*sum(V(i,1:c))*10^(-12); % tau konstant
end;
B1=0;
B12=0;
B13=0;
B14=0;
for i=1:length(V(:,1))
    for j=1:length(V(1,:))
        if V(i,j)~=0
            B1=B1+(pi/2*(10^(-6)*sqrt(V(i,j)/pi))^4)+(ri(i))^2*pi*
            (10^(-6)*sqrt(V(i,j)/pi))^2;
            % vollständig
            B12=B12+(pi/2*(10^(-6)*sqrt(V(i,j)/pi))^4)+(R)^2*pi*(10^(-6)
            *sqrt(V(i,j)/pi))^2;
            % Zellen alle im Abstand R
            B13=B13+(pi/2*(10^(-6)*sqrt(478/pi))^4)+(ri(i))^2*pi*(10^(-6)
            *sqrt(478/pi))^2;
            % Zellen alle A=478mum^2
            B14=B14+(pi/2*(10^(-6)*sqrt(478/pi))^4)+(R)^2*pi*(10^(-6)
            *sqrt(478/pi))^2;
            % Zellen alle im Abstand R und mit A=478mum^2
        end;
    end;
end;
% Berechnung der Schubmodule
GL=M*10^(-6)./(gamma*B1/R);
GR=M*10^(-6)./(gamma*B12/R);
GA=M*10^(-6)./(gamma*B13/R);
GAR=M*10^(-6)./(gamma*B14/R);
G=M*10^(-6)./(gamma)/(ARE);
ARE2=R*478*10^(-12)*length(find(V~=0)); % Zellen alle im Abstand R
und mit A=478mum^2 und ri^4 vernachlässigen
G2=M*10^(-6)./(gamma*ARE2);
Rel=GL./G;
numcells=length(find(V~=0));
Gges=[GL GR GA GAR G G2];
```

## A.3. Ergebnisse

### A.3.1. Messprotokolle

Zeit	Anregung
120 s	$\gamma_0=0,02$
120 s	$\tau =0$ Pa
120 s	$\gamma_0=0,05$
120 s	$\tau =0$ Pa
120 s	$\gamma_0=0,07$
120 s	$\tau =0$ Pa
120 s	$\gamma_0=0,1$
120 s	$\tau =0$ Pa
120 s	$\gamma_0=0,2$
120 s	$\tau =0$ Pa
120 s	$\gamma_0=0,3$
120 s	$\tau =0$ Pa
120 s	$\gamma_0=0,4$
120 s	$\tau =0$ Pa
120 s	$\gamma_0=0,5$
120 s	$\tau =0$ Pa
120 s	$\gamma_0=0,6$
120 s	$\tau =0$ Pa
.	.
.	.
.	.

Tabelle A.2.: Messprotokoll für eine Messung im langsamen Deformationsmodus (DL)

A.3.2. Verallgemeinerte Module

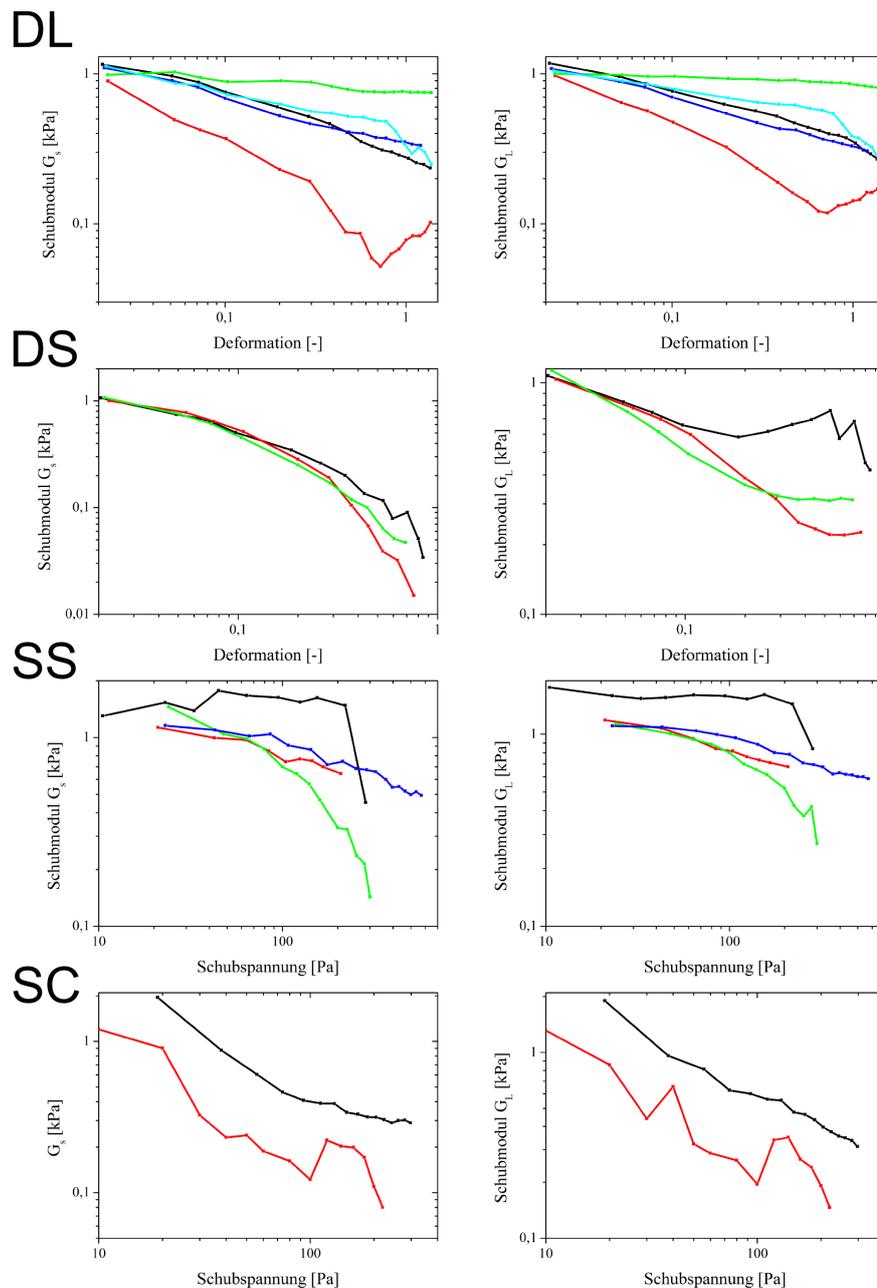


Abbildung A.1.: Verallgemeinerte Module  $G_s$  (links) und  $G_L$  (rechts) für die vier Messmodi. Erste Zeile: Langsame Deformation DL, zweite Zeile: Schnelle Deformation DS, dritte Zeile: Schubspannung sinus SS, vierte Zeile: Schubspannung cosinus. Für alle Messmodi zeigt sich ein Abfall der Module für steigende Anregungsamplitude, äquivalent zu den linearen Modulen. Die Abnahme von  $G_s$  und  $G_L$  erfolgt jedoch nicht gleichförmig. Dies kann durch den Nichtlinearitätsindex quantifiziert werden (Siehe Abbildung 4.48).

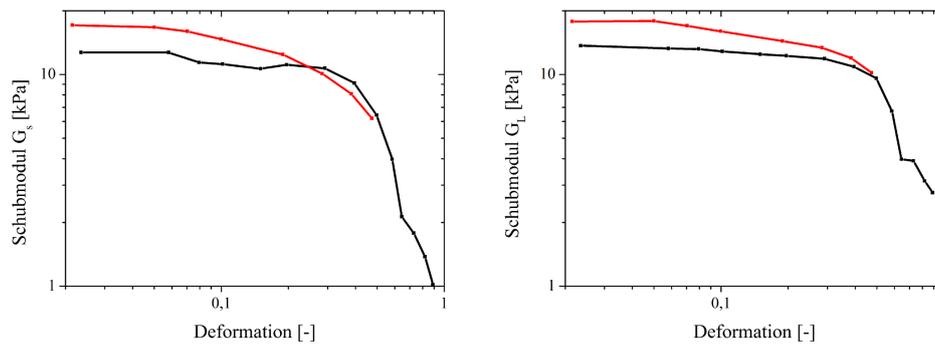


Abbildung A.2.: Verallgemeinerte Module für Messungen im langsamen Deformationsmodus mit Glutaraldehyd behandelten Zellen. Links:  $G_s$  als Funktion der Deformationsamplitude.  $G_s$  nimmt mit steigender Deformation ab. Rechts:  $G_L$  nimmt ebenfalls als Funktion der Deformation ab. Für Deformationen kleiner als  $\gamma_0=0,1-0,2$  nehmen die Schubmodule nur in geringem Maße ab. Für größere Deformation erfolgt eine rasche Abnahme.

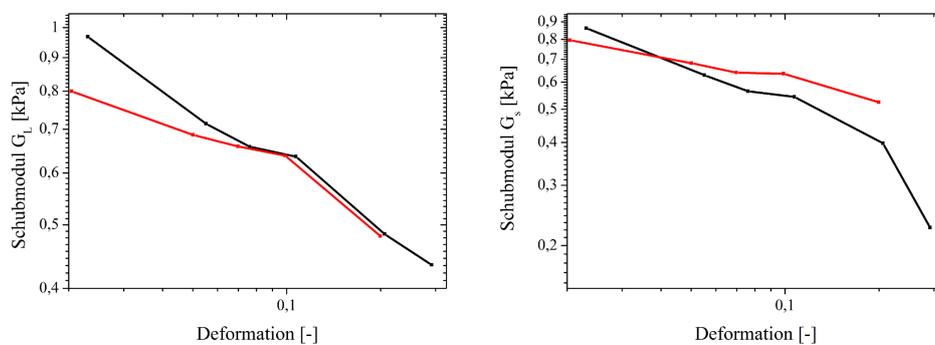


Abbildung A.3.: Verallgemeinerte Module für Messungen im langsamen Deformationsmodus mit Y27632 behandelten Zellen. Links:  $G_s$  als Funktion der Deformationsamplitude.  $G_s$  nimmt mit steigender Deformation ab. Rechts:  $G_L$  nimmt ebenfalls als Funktion der Deformation ab. Für Deformationen kleiner als  $\gamma_0=0,1-0,2$  nehmen die Schubmodule nur in geringem Maße ab. Für größere Deformation erfolgt eine rasche Abnahme.

### A.3.3. Einzelzellmessungen an RPE-1 Zellen

Die Experimente mit RPE-1 Zellen stellen die ersten Versuche zur Charakterisierung von Vimentin und dessen Rolle in der Definition der Zellmechanik unter Verwendung des im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Mikroplattenrheometers dar. Dazu wurden Wildtypzellen und Zellen, bei denen die Vimentinexpression mittels RNA Interferenz verringert wurde zwischen die Mikroplatten gebracht. Nach einer Adhäsionszeit von 30 Minuten wurden die Platten auseinandergedehnt, um die Zelle zu strecken. Dabei zeigte sich, dass die Wildtypzelle bis zu einem Faktor von 3-4 gedehnt werden kann, bevor die Adhäsion vollständig versagt (Abbildung A.4, oben). Die *knock down* Zellen hingegen zeigen keine nennenswerte Adhäsion, eine Streckung ist nicht möglich (Abbildung A.4, unten) ( $n=5$ ).

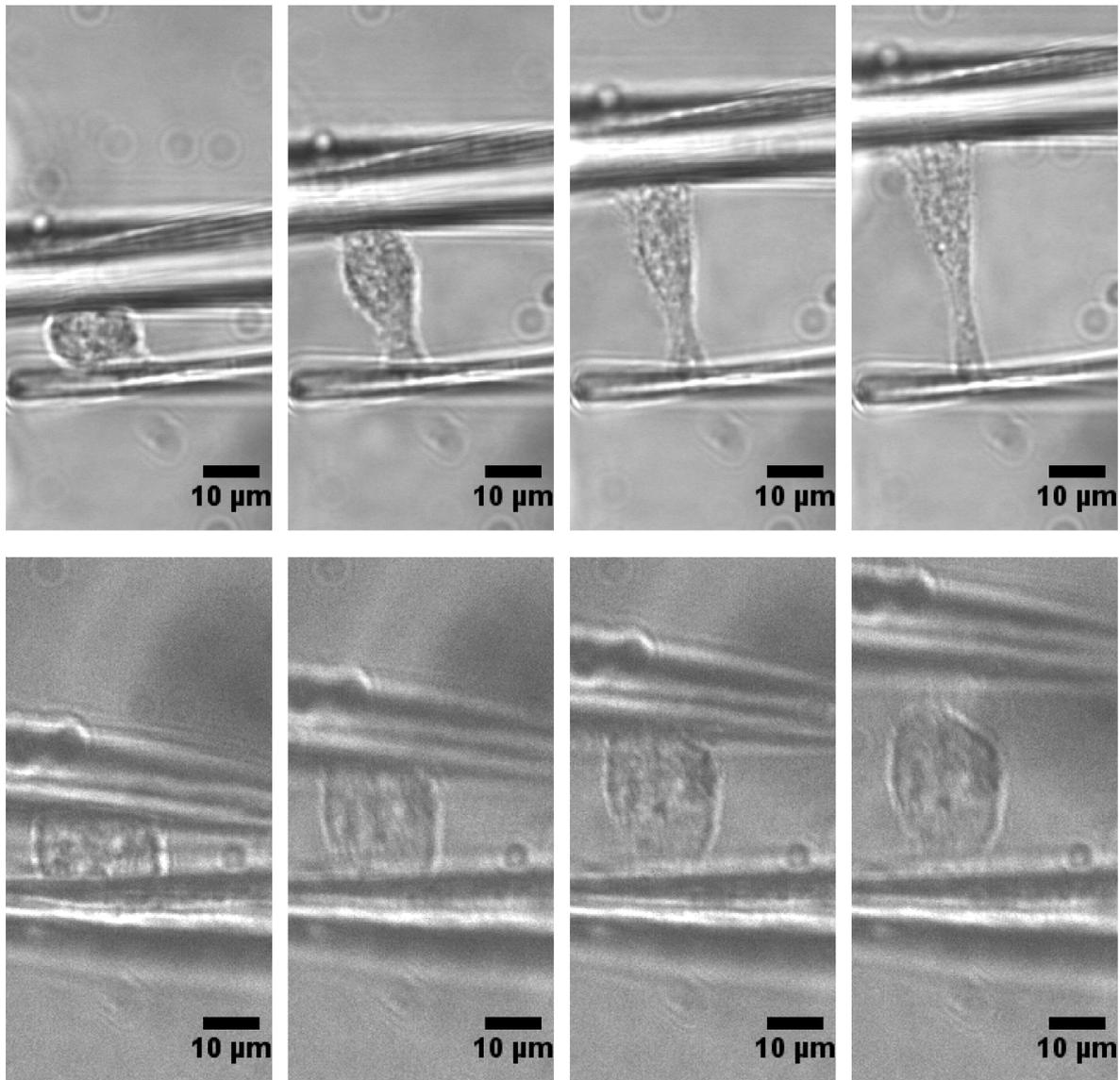


Abbildung A.4.: Oben: Streckung einer nativen RPE-1 Zelle von der anfänglichen Länge  $l = 10\mu m$  (links) auf  $l = 40\mu m$  (rechts). Die Zelle wird sehr stark gestreckt und in ihrer Mitte eingeschnürt. Der Zellkern bewegt sich an die obere Kante der Zelle. Unten: Vimentin *knock down* Zelle. Die Platten werden auseinandergefahren. Es findet jedoch keine nennenswerte Zellstreckung statt. Die Zelladhäsion versagt vorher.

## A.4. Modelle

### A.4.1. Modifiziertes Eulerverfahren mit variabler Schrittweite zur Lösung des Kontinuumsmodells

```

nmin=0.01;
nmax=10;
Tol=0.04;

for m=1:Ltau0
    i=2;
    if m==1
        tauback(1,m)=0;
        gammainel(1,m)=0;
        D0(1,m)=Dexp;
    else

        tauback(1,m)=tauback(Lt,m-1);
        gammainel(1,m)=gammainel(Lt,m-1);
        gamma(1,m)=gamma(Lt,m-1);
        A(1,m)=A(Lt,m-1);%gammainel(Lt,m-1);

        D0(1,m)=Dexp;%D0(Lt,m-1);

    end;

while T < tges
    g1=gammax(m)+gamma0(m)*sin(pi*(T));

    t1=(C1)*((g1-gammainel(i-1,m))/(1+abs(gammainel(i-1,m))))
    *exp(C4*(((g1-gammainel(i-1,m))/(1+abs(gammainel(i-1,m))))^2));
    ginell=gammainel(i-1,m)+C3*sign(t1-tauback(i-1,m))*
    (((abs(t1-tauback(i-1,m))/D0(i-1,m)))^(beta))*
    exp(((abs(t1-tauback(i-1,m))/D0(i-1,m))))*tstep;
    A1=(ginell-gammainel(i-1,m))+A(i-1,m)-(q*A(i-1,m)*
    abs(ginell-gammainel(i-1,m)));
    Tb1= C2*A1;

```

## A.4 Modelle

---

```
gel1=g1-ginel1;
D1=Dexp*(exp(C4*((gel1/(1+abs(ginel1)))^2))*
(1+2*C4*((gel1/(1+abs(ginel1)))^2)));
S1=[t1
    ginel1
    A1
    Tb1
    D1];
g2=gammax(m)+gamma0(m)*sin(pi*(T+tstep));
t2=(C1)*((g2-ginel1)/(1+abs(ginel1)))*
exp(C4*((g1-ginel1)/(1+abs(ginel1)))^2));
ginel2=ginel1+C3*sign(t2-Tb1)*(((abs(t2-Tb1)/D1))^(beta))*
exp(((abs(t2-Tb1)/D1)))*tstep;
A2=(ginel2-ginel1)+A1-(q*A1*abs(ginel2-ginel1));
Tb2= C2*A2;
gel2=g2-ginel2;
D2=Dexp*(exp(C4*((gel2/(1+abs(ginel2)))^2))*
(1+2*C4*((gel2/(1+abs(ginel2)))^2)));
S2=[t2
    ginel2
    A2
    Tb2
    D2];
S0=[tau(i-1,m)
    gammainel(i-1,m)
    A(i-1,m)
    tauback(i-1,m)
    D0(i-1,m)];
S3=0.5*(S1+S2);
err=norm(S2-S1)/norm(S2);
n=0.9*sqrt(Tol/err);
if isnan(err)==1
break
end;
if err<Tol
    T=T+tstep;
    gamma(i,m)=gammax(m)+gamma0(m)*sin(pi*T);
    tau(i,m)=S3(1);
    gammainel(i,m)=S3(2);
    A(i,m)=S3(3);
```

---

```
tauback(i,m)=S3(4);
D0(i,m)=S3(5);
tvec(i)=T;
i=i+1;
if n>nmax
n=nmax;
end;
n(isinf(n))=nmax;
else
  if n<nmin
    n=nmin;
  end;
n(isnan(n))=nmin;
tstep=n*tstep;
if tstep>tges-T
  tstep=tges-T;
end;
end;
end;
```

A.4.2. Ergebnisse des Kontinuumsmodells

In Abschnitt 4.5.1 wurden die experimentellen Lissajousplots für drei Deformationsamplituden mit den Vorhersagen des Kontinuumsmodells verglichen (Abbildung 4.78). Im Folgenden werden die vollständigen Daten gegenübergestellt.

- langsame Deformationsanregung (DL)

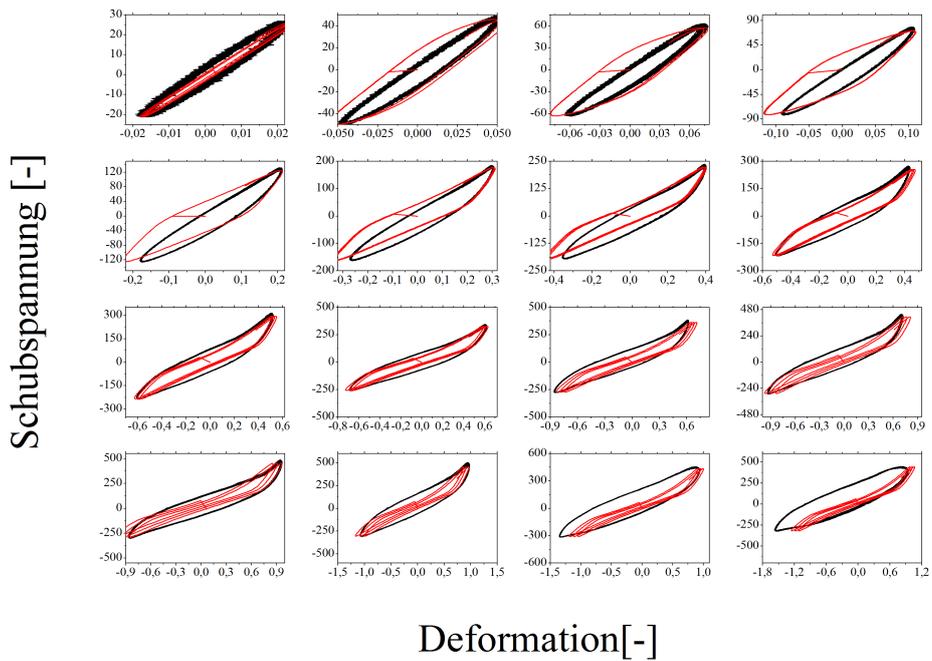


Abbildung A.5.: Lissajous Graphen für ein Oszillationsexperiment mit langsamer Deformationsanregung (schwarz) und die numerische Lösung des Kontinuumsmodells mit den Parametern aus Tabelle 4.2 (links). Aufgetragen ist die Schubspannung als Funktion der Deformation. Für Deformationsamplituden kleiner als  $\gamma_0 = 0,8$  reproduziert das Modell die experimentellen Ergebnisse gut, wobei für kleine Amplituden die Breite der Kurven zu ausgeprägt ist.

- schnelle Deformationsanregung (DS)

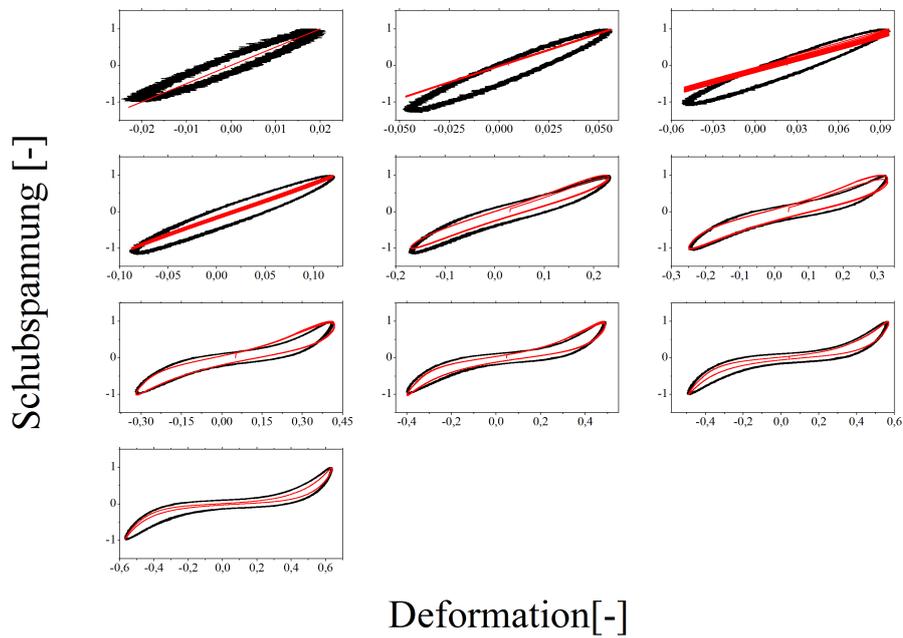


Abbildung A.6.: Lissajous Graphen für ein Oszillationsexperiment mit schneller Deformationsanregung (schwarz) und die numerische Lösung des Kontinuumsmodells mit den Parametern aus Tabelle 4.2 (Mitte). Aufgetragen ist die normierte Schubspannung als Funktion der Deformation. Das Modell reproduziert die experimentellen Ergebnisse qualitativ sehr gut.

- cosinusförmige Schubspannungsanregung (SC)

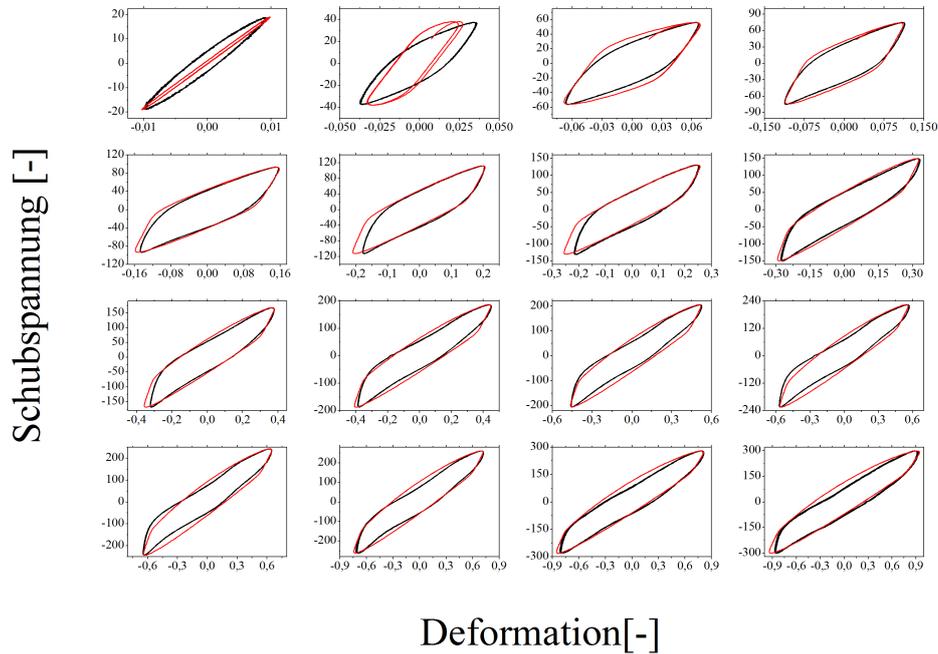


Abbildung A.7.: Lissajous Graphen für ein Oszillationsexperiment mit cosinusförmige Schubspannungsanregung (schwarz) und die numerische Lösung des Kontinuumsmodells mit den Parametern aus Tabelle 4.2 (rechts). Aufgetragen ist die normierte Schubspannung als Funktion der Deformation. Das Modell reproduziert die experimentellen Ergebnisse sehr gut.

### A.4.3. Numerische Lösung des Filamentmodells

Im Folgenden wird der Matlab-Programmcode zur Lösung des Filamentmodells dargestellt.

- Hauptprogramm

```
clear;
global x;
global N;
global Nsf;
global Nxc;
N=1000;
Nsf=700;
x=15;
global dt;
```

---

```

global Mt;
dt=0.05;
t=0:dt:100.50;
gamma0=[];
meangamma=[];
str='';
datname='';
experimentaldata = load([str datname]);
Nc=10000;
f0=0.5;
k=30*ones(1,N);%40.7
k1=7.6*ones(1,N);
k2=1.2*ones(1,N);
g0=0;
Stress=zeros(length(gamma0),length(t)-1);
Numcross=zeros(length(gamma0),length(t)-1);
Angle=zeros(length(gamma0)+1,N);
GL=zeros(length(gamma0),1);
Lenn=zeros(length(gamma0)+1,1);
Nsfturn=zeros(length(gamma0)+1,1);
Nsfturn(1)=0;
Ncl=zeros(length(gamma0)+1,1);
Ncl(1)=10000;
gamma=transpose(sin(2*pi*f0*t))*transpose(gamma0);
Fibrenetwork=x*rand(4,N);
    Fibrenetwork(2,1:700)=15;
    Fibrenetwork(4,1:700)=0;
F=zeros(4,N);
for i=1:N
    if Fibrenetwork(2,i)>Fibrenetwork(4,i)
        Fi(:,i)=Fibrenetwork(:,i);
    else Fi(:,i)=[Fibrenetwork(3:4,i); Fibrenetwork(1:2,i)];
    end;
end;
Lsheared=sqrt((Fi(1,:)-Fi(3,:)).^2+(Fi(2,:)-Fi(4,:)).^2);
angle=180/pi*acos((((Fi(1,:)-Fi(3,:)))/Lsheared));
Lenn(1)=mean(Lsheared);
Angle(1,:)=angle;
Nmn0=20*Lsheared;
Nxc=Nmn0;

```

---

```
sdist=5:5:180;
Dist=zeros(length(gamma0)+1,36);
for j=1:36
Dist(1,j)=length(angle(angle>=(j-1)*5 & angle<j*5));
end;
for i=1:length(gamma0)
[Stress(i,:) Angle(i+1,:) Fa Lenn(i+1) Nsfturn(i+1) Nmn0 Numcross(i,:)]=
Fibrestress3(Fi,transpose(gamma(:,i)),k, k1, k2, Nmn0);
GL(i)=max(Stress(i,2/dt:end))/gamma0(i);
Fi=Fa;
for j=1:36
    Dist(i+1,j)=length(Angle(i,(Angle(i,:)>=(j-1)*5 & Angle(i,:)<j*5)));
end;
end;
data=zeros(length(t),length(gamma0));
for i=1:length(gamma0)
    data(1:length(t)-1,(2*i-1):(2*i))=
    [gamma(2:end,i)+meangamma(i),transpose(Stress(i,:))];
end;
```

-----

Graphische Darstellung der Daten

-----

```
subplot(2,2,1)
figure(1)
plot(gamma0,GL)
subplot(2,2,2)
plot(t(1:end-1),Stress)
subplot(2,2,3)
plot(gamma(end-200:end,:),transpose(Stress(:,end-200:end)))
subplot(2,2,4)
hold;
for i=1:length(gamma0)
    plot(sdist,Dist(i,:))
end;
figure(3)
for d=1:length(gamma0)
    subplot(4,4,d)
    hold;
```

```

    plot(gamma(end-200:end,d),Stress(d,end-200:end),'r','LineWidth',2);
    plot(experimentaldata(:,(2*d-1)),experimentaldata(:,(2*d)));
end;

```

- Funktion *Fibrestress*: Scherung und Kraftberechnung

```

function [Stress Angle F Len N Nc Numcross] =
Fibrestress( Fibrenetwork, gamma, k, k1, k2, Nc );
global dt;
global x;
global N;
global Nsf;
global Mt;
global Nxc;
Mt=0;
Numsf=0;
g=10;
gammastep=gamma(2:end)-gamma(1:end-1);
Stress=zeros(1,length(gammastep));
Numcross=zeros(1,length(gammastep));
F=zeros(1,length(gammastep));
A=zeros(1,N);
alpha=zeros(1,length(Fibrenetwork));
dL=zeros(1,length(Fibrenetwork));
Fshearfibre=zeros(1,N);
Fibrenetworksheared=Fibrenetwork;
Lnet=sqrt((Fibrenetworksheared(1,:)-Fibrenetworksheared(3,:)).^2+
(Fibrenetworksheared(2,:)-Fibrenetworksheared(4,:)).^2);
Nxc2=Nc;
ang=((Fibrenetworksheared(1,:)-Fibrenetworksheared(3,:))./Lnet);
for i=1:length(gammastep)
if i>1
    [Arg Lsheared Lnet k k1 k2 Numsf]=
    Turnover(Fibrenetworksheared,Lsheared,Lnet,epsilon,
    sum(gammastep(1:i-1)),k,k1,k2, Numsf);
    Fibrenetworksheared=Arg;
end;
Fibrenetworksheared=[Fibrenetworksheared(1,:)+Fibrenetworksheared(2,:)
*gammastep(i) ; Fibrenetworksheared(2,:); Fibrenetworksheared(3,:)+

```

```
Fibrenetworksheared(4,:)*gammastep(i); Fibrenetworksheared(4,:)]];
Lsheared=sqrt((Fibrenetworksheared(1,:)-Fibrenetworksheared(3,:)).^2+
(Fibrenetworksheared(2,:)-Fibrenetworksheared(4,:)).^2);
deltaL=Lsheared-(dL+Lnet);
dL=Lsheared-Lnet;
epsilon=dL./Lnet;
angle=((Fibrenetworksheared(1,:)-Fibrenetworksheared(3,:))./Lsheared);
Fshearfibre=.8*(Nc./Nxc).*(k.*epsilon.^3+k1.*epsilon+k2.*(deltaL)./Lnet./dt);
F(i)=sum(Fshearfibre.*angle);
Nc=Nc+(-Nc.*exp(abs(Fshearfibre)./Nc)+
g*exp(-abs(Fshearfibre)./Nc).*(Nxc2-Nc))*dt;
Numcross(i)=sum(Nc);
A=180/pi*acos(angle);
ang=angle;
end;

Stress=F;
Angle=A;
F=Fibrenetworksheared;
Len=mean(Lsheared);
N=Numsf;
Nc=(Nc);
```

- Funktion *Turnover*: Filamentzerstörung und Neubildung

```
function [Fibrenetwork ,Lsheared, Lnetneu ,k ,k1,k2, Numsf] =
Turnover(Fsheared, Lsheared, Lnet, epsilon, ga, k,k1, k2, Numsf)
global Mt;
global dt;
global x;
global N;
global kact;
global kact2;
Mt=Numsf;
zufall=rand(1,length(epsilon));
P=(0.0003+.500000*epsilon.^2)*dt;

Fibrenew=zeros(4,1);
z=zeros(2,1);
```

---

```
for i=1:length(zufall)
    if zufall(i)<=P(i)
        z=x*rand(2,1);
        Fibrenew(2)=max(z);
        Fibrenew(1)=(x)*rand+ga*Fibrenew(2);
        Fibrenew(4)=min(z);
        Fibrenew(3)=(x)*rand+ga*Fibrenew(4);
%         Fibrenew(2)=15;
%         Fibrenew(1)=(x)*rand;
%         Fibrenew(4)=0;
%         Fibrenew(3)=(x)*rand;

        Fsheared(:,i)=[Fibrenew(1); Fibrenew(2) ;Fibrenew(3); Fibrenew(4)];
Lnet(i)=sqrt((Fsheared(1,i)-Fsheared(3,i)).^2+
(Fsheared(2,i)-Fsheared(4,i)).^2);
Lsheared(i)=Lnet(i);
Mt=Mt+1;

end;
Fibrenew=Fsheared;
Lnetneu=Lnet;
Numsf=Mt;
k=k;
k1=k1;
k2=k2;
```

A.4.4. Ergebnisse des Filamentmodells

In Abschnitt 4.5.2.3 wurden die experimentellen Lissajousplots für drei Deformationsamplituden mit den Vorhersagen des Filamentmodells verglichen (Abbildung 4.85). Im folgenden werden die vollständigen Daten gegenübergestellt.

- langsame Deformationsanregung (DL)

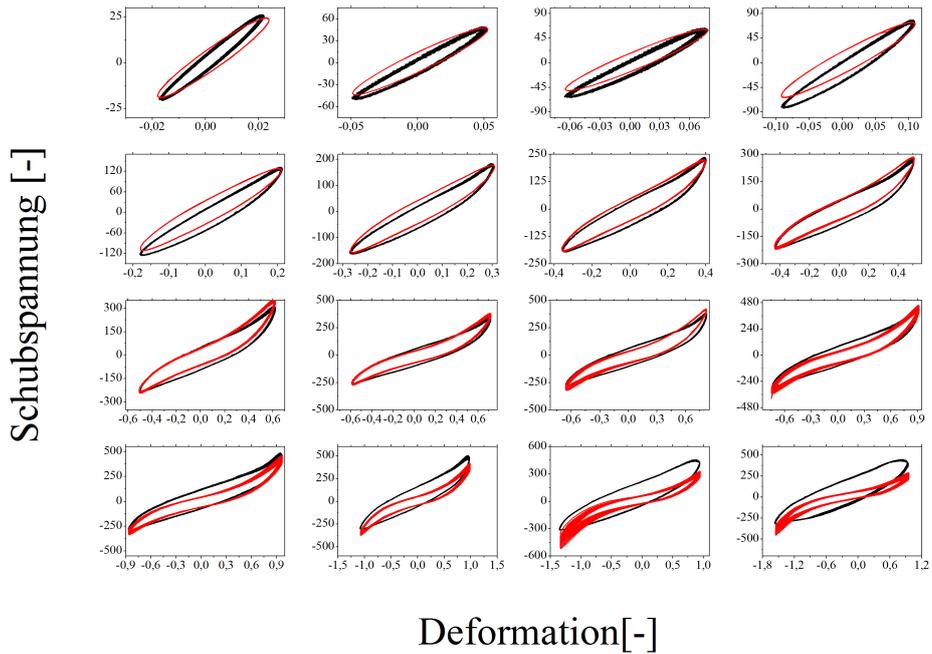


Abbildung A.8.: Lissajous Graphen für ein Oszillationsexperiment mit langsamer Deformationsanregung (schwarz) und die numerische Lösung des Filamentmodells mit den Parametern aus Tabelle 4.2 (rechts). Aufgetragen ist die Schubspannung als Funktion der Deformation. Für Deformationsamplituden kleiner als  $\gamma_0 = 1$  reproduziert das Modell die experimentellen Ergebnisse gut. Für größere Amplituden weichen Experiment und Modell ab.

- schnelle Deformationsanregung (DS)

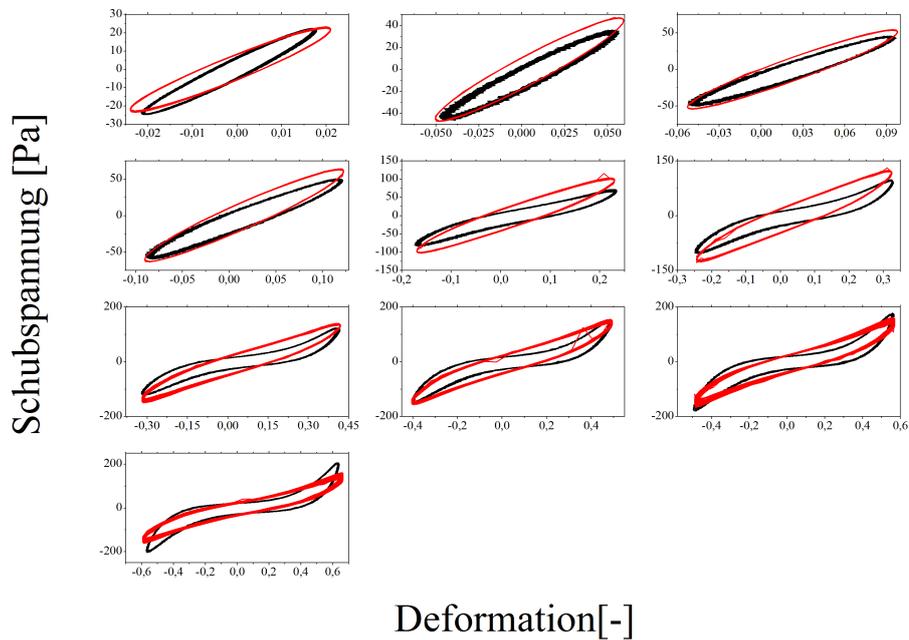


Abbildung A.9.: Lissajous Graphen für ein Oszillationsexperiment mit schneller Deformationsanregung (schwarz) und die numerische Lösung des Filamentmodells mit den Parametern aus Tabelle 4.2 (Mitte). Aufgetragen ist die Schubspannung als Funktion der Deformation. Das Filamentmodell reproduziert die experimentellen Ergebnisse auch quantitativ gut. Die intrazyklische Versteifung fällt jedoch etwas zu gering aus.

- cosinusförmige Schubspannungsanregung (SC)

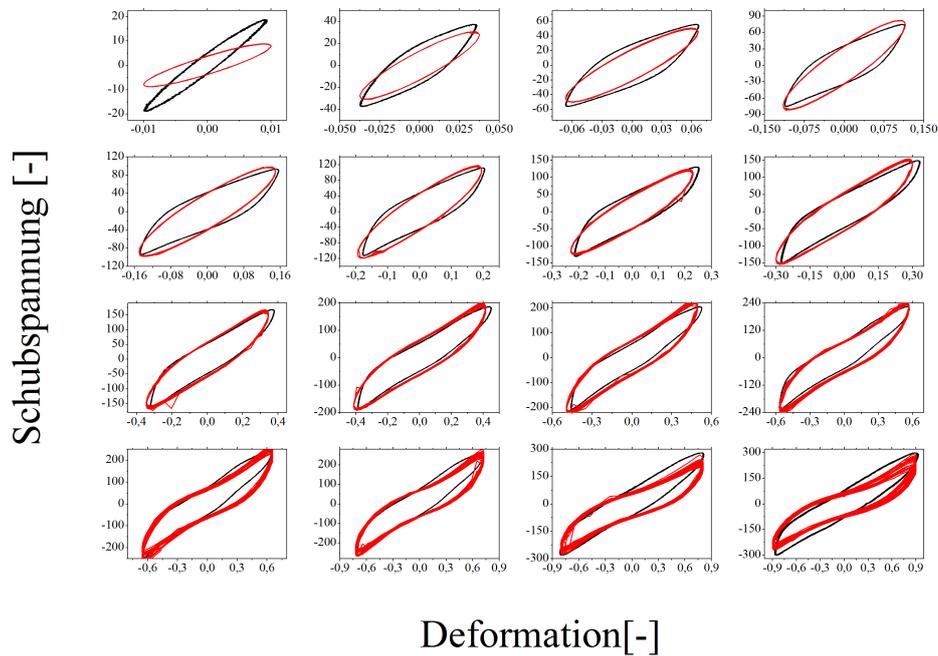


Abbildung A.10.: Lissajous Graphen für ein Oszillationsexperiment mit cosinusförmige Schubspannungsanregung (schwarz) und die numerische Lösung des Filamentmodells mit den Parametern aus Tabelle 4.2 (rechts). Aufgetragen ist die normierte Schubspannung als Funktion der Deformation. Für Deformationsamplituden kleiner als  $\gamma_0 = 0,7$  reproduziert das Modell die experimentellen Ergebnisse gut. Für größere Amplituden weichen Experiment und Modell ab.



# Abbildungsverzeichnis

2.1. Schematische Darstellung von Stressfasern . . . . .	7
2.2. Schematische Darstellung der Entstehung fokaler Adhäsionen . . . . .	9
2.3. Schematische Darstellung eines Rotationsrheometers . . . . .	18
2.4. Schematische Darstellung einer Platte-Platte-Geometrie . . . . .	19
2.5. Spektrale Zusammensetzung symmetrischer und asymmetrischer oszillatorischer Signale . . . . .	23
2.6. Definition der verallgemeinerten Module . . . . .	24
3.1. Schematische Darstellung des Mikroplattenrheometers . . . . .	36
3.2. Schematische Darstellung der Zellmonoschichtreologie . . . . .	38
3.3. Platte-Ring Messgeometrie . . . . .	39
3.4. Messgeometrie im Rheometer . . . . .	40
3.5. Microbead Methode zur parallelen Einstellung der Messgeometrie . . . . .	41
3.6. Schematische Darstellung der Messmethoden zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften von Aortastücken . . . . .	43
4.1. Leermessung an Zellmedium in Platte-Ring Messgeometrie . . . . .	51
4.2. Ergebnisse Drehmomentsensor im Rheometer . . . . .	52
4.3. Beispiel langsame Deformationsanregung . . . . .	53
4.4. Beispiel schnelle Deformationsanregung . . . . .	54
4.5. Spektrale Zusammensetzung des Deformationssignales im nichtlinearen Regime . . . . .	55
4.6. Ergebnisse von Fouriertransformationsrheologiemessung an Polyethylenoxid Gel . . . . .	56
4.7. Beispiel cosinusförmige Schubspannungsanregung . . . . .	57
4.8. Beispiel sinusförmige Schubspannungsanregung . . . . .	58
4.9. Anregung und Antwort einer Messung im schnellen Deformationsmodus . . . . .	60
4.10. Erholung der Zellen am Ende einer Oszillationsserie . . . . .	61
4.11. Nullpunktverschiebung durch Regelung des Rheometers . . . . .	61
4.12. Amplitudensweep an 13 Monoschichten von 3T3 Fibroblasten . . . . .	62
4.13. Histogramm der Zellfläche von 3T3 Zellen im Rheometer . . . . .	65
4.14. Anpassungskurve zur Bestimmung der Zellzahl für 3T3 Zellen aus der Drehmomentamplitude . . . . .	66
4.15. Einfluss von vereinfachenden Annahmen bei der Berechnung des mittleren Schubmoduls einer Einzelzelle . . . . .	68

---

4.16. Exponentiell-lineare Anpassung des Schubmoduls als Funktion der Deformation . . . . .	69
4.17. Fehler bei der Drehmomentberechnung durch die Annahme eines konstanten Schubmoduls . . . . .	70
4.18. Amplitudensweep 3T3 Einzelzelle aus dreizehn Monoschichten . . . . .	71
4.19. Mittelwert und Standardabweichung des Schubmoduls einer einzelnen 3T3 Zelle . . . . .	72
4.20. Bestimmung von Adhäsionsstärken mittels Zellmonoschichtreologie . . . . .	73
4.21. Anpassungskurve zur Bestimmung der Zellzahl für MCF7 Zellen aus der Drehmomentamplitude . . . . .	77
4.22. Amplitudensweepmessung an MCF7 Zellen . . . . .	77
4.23. Speicher-, Verlustmodul und Phasenwinkel als Funktion der Anregungsamplitude für MCF7 Zellen . . . . .	78
4.24. Frequenzsweepmessung an MCF7 Zellen . . . . .	79
4.25. Speicher-, Verlustmodul und Phasenwinkel als Funktion der Anregungsfrequenz für MCF7 Zellen . . . . .	79
4.26. Kriechmessung an MCF7 Zellen . . . . .	80
4.27. Kriechexponenten von MCF7 Zellen als Funktion der mechanischen Spannung . . . . .	81
4.28. Schubspannungsrampen an MCF7 Zellen . . . . .	82
4.29. Anpassungskurve zur Bestimmung der Zellzahl für HELA Zellen aus der Drehmomentamplitude . . . . .	85
4.30. Amplitudensweepmessung an Wildtyp und TES-transfizierten HELA Zellen . . . . .	86
4.31. Frequenzsweepmessung an Wildtyp und TES-transfizierten HELA Zellen . . . . .	87
4.32. Phasenwinkel als Funktion der Frequenz für Wildtyp und TES-transfizierte HELA Zellen . . . . .	88
4.33. Kriechmessungen an Wildtyp und TES-transfizierten HELA Zellen . . . . .	89
4.34. Schemadarstellung der Oszillationsmessungen und der Anregungen zur Charakterisierung der nichtlinearen Mechanik von 3T3 Fibroblasten . . . . .	92
4.35. Amplitudensweepmessungen an 3T3 Fibroblasten im langsamen Deformationsmodus . . . . .	93
4.36. Lissajouskurven von 3T3 Zellen variieren trotz gleicher Anregung . . . . .	94
4.37. Schubspannungsamplitude als Funktion der Deformationsamplitude für Messungen in allen Anregungsmodi . . . . .	97
4.38. Schubspannungsamplitude als Funktion der Deformationsamplitude getrennt nach den vier Messmodi. . . . .	98
4.39. Zyklische Abnahme des Schubmoduls mit der Zeit . . . . .	99
4.40. Detaildarstellung der zyklischen Abnahme des Schubmoduls für 3T3 Zellen . . . . .	100
4.41. Schubmodul als Funktion der Deformationsamplitude und der Schubspannungsamplitude für 3T3 Zellen . . . . .	101
4.42. Lissajousplots zeigen drei nichtlineare Regime, abhängig von der Art der Anregung . . . . .	102
4.43. Abnahme der Schubmoduls ist abhängig von der Art der Anregung . . . . .	104
4.44. Abnahme des Schubmoduls ist abhängig vom linearen Modul zu Beginn der Messung . . . . .	105
4.45. Nullpunktverschiebung für fünf Messungen im langsamen Deformationsmodus . . . . .	105

4.46. Einfluss der Nullpunktverschiebung auf den Schubmodul . . . . .	106
4.47. Einfluss der Nullpunktverschiebung auf den Schubmodul bei konstanter Anregungsamplitude . . . . .	107
4.48. Nichtlinearitätsindex L als Funktion der Anregungsamplitude . . . . .	112
4.49. Unterschiede der verallgemeinerten Module für langsamen und schnellen Deformationsmodus . . . . .	113
4.50. Differentielle Module für langsame und schnelle Deformationsanregung . . . . .	114
4.51. Differentielle Module für sinusförmige und cosinusförmige Schubspannungsanregung	115
4.52. Kritische Deformation steigt mit steigender Anregungsamplitude . . . . .	116
4.53. Reversibilität der Abnahme des Schubmoduls 1 . . . . .	121
4.54. Reversibilität der Abnahme des Schubmoduls 2 . . . . .	122
4.55. Reversibilität der Zunahme der kritischen Deformation . . . . .	123
4.56. Beispiel für Fouriertransformationsrheologiemessung an 3T3 Zellen . . . . .	125
4.57. Beispiel für normierte Intensität der Obertöne . . . . .	126
4.58. Erster Oberton als Funktion der Anregungsamplitude für alle Anregungsarten . .	128
4.59. Zweiter Oberton als Funktion der Anregungsamplitude für alle Anregungsarten .	130
4.60. Zweites Maximum des ersten Obertons wird durch die Nullpunktverschiebung bestimmt . . . . .	132
4.61. Einfluss von Glutaraldehyd und Y27632 auf die Abnahme des Schubmoduls mit steigender Anregungsamplitude . . . . .	135
4.62. Einfluss von Glutaraldehyd auf die Obertöne der nichtlinearen Zellantwort . . . .	136
4.63. Einfluss von Glutaraldehyd auf den Nichtlinearitätsindex von 3T3 Fibroblasten . .	137
4.64. Einfluss von Y27632 auf die Obertöne der nichtlinearen Zellantwort . . . . .	137
4.65. Einfluss von Y27632 auf den Nichtlinearitätsindex von 3T3 Fibroblasten . . . . .	138
4.66. Einfluss der Oszillationszeit auf den dynamischen Schubmodul . . . . .	140
4.67. Einfluss der Oszillationszeit auf die Nichtlinearität . . . . .	141
4.68. Einfluss der Oszillationszeit auf die Normalkraft und die mittlere Deformation . .	142
4.69. Einfluss der Nullpunktverschiebung auf die Normalkraft . . . . .	143
4.70. Energiedissipation als Funktion der Deformationsamplitude . . . . .	146
4.71. Energiedissipation als Funktion der Anregungsfrequenz . . . . .	147
4.72. Aktinzytoskelett einer mit lifeact transfizierten 3T3 Zelle . . . . .	150
4.73. 3T3 Zelle im Mikroplattenrheometer . . . . .	151
4.74. Änderungen der Form einer Zelle durch Scherung im Mikroplattenrheometer . . .	152
4.75. Änderungen der Fluoreszenzverteilung des Aktinzytoskeletts durch Scherung einer 3T3 Zelle im Mikroplattenrheometer . . . . .	153
4.76. Vergleich der Vorhersagen eines elastoplastischen Kontinuumsmodell mit linearem kinematischem Härten mit experimentellen Lissajouskurven von 3T3 Zellen . . .	159
4.77. Vergleich der Vorhersagen eines elastoplastischen Kontinuumsmodell mit linearem kinematischem Härten mit experimentellen Schubmodulen von 3T3 Zellen . . . .	160

---

4.78. Vergleich zwischen Experiment und erweitertem Kontinuumsmodell für drei Anregungsarten . . . . .	161
4.79. Vergleich der Schubmodule aus dem erweiterten Kontinuumsmodell mit experimentellen Ergebnissen . . . . .	162
4.80. Schematische Darstellung des Filamentmodells . . . . .	163
4.81. Dehnung eines Filaments als Funktion der Filamentausrichtung . . . . .	164
4.82. Ergebnisse des Zwei-Filament-Modells für oszillatorische Anregung mit steigender Deformationsamplitude . . . . .	165
4.83. Lissajouskurven aus dem Zwei-Filament-Modell für oszillatorische Anregung mit steigender Deformationsamplitude . . . . .	166
4.84. Lissajouskurven bei asymmetrischer Filamentverteilung . . . . .	167
4.85. Ergebnisse des Filamentmodells . . . . .	170
4.86. Ergebnisse des Filamentmodells mit modifizierter Umordnungsdynamik . . . . .	171
4.87. Winkelverteilung der Filamente im Filamentmodell unter Scherung . . . . .	172
4.88. Abhängigkeit der mittleren Filamentlänge und der mittleren Vernetzerzahl von der Deformationsamplitude . . . . .	173
5.1. Ergebnisse der Amplitudensweepmessungen an Aortenstücken von Wildtyp-Mäusen	184
5.2. Statistische Auswertung der Amplitudensweepmessungen an Aortenstücken von Wildtyp-, APOE <sup>-/-</sup> und Ivabradinmäusen . . . . .	185
5.3. Kraft-Dehnungskurve eines Aortenstücks einer Wildtypmaus . . . . .	186
5.4. Statistische Auswertung der Dehnungsmessungen an Aortenstücken von Wildtyp-, APOE <sup>-/-</sup> und Ivabradinmäusen . . . . .	187
5.5. Positionsabhängigkeit der Elastizität der Aortenstücke von Wildtyp-, APOE <sup>-/-</sup> und Ivabradinmäusen . . . . .	188
6.1. Zeitlicher Verlauf der ks1 Expression . . . . .	193
6.2. Fluoreszenzaufnahmen der Regeneration einer ks1 <i>Hydra</i> . . . . .	193
6.3. Aktinzytoskelett von <i>Hydrakugeln</i> zu verschiedenen Zeitpunkte während der Regeneration . . . . .	194
A.1. Verallgemeinerte Module für alle Messmodi . . . . .	209
A.2. Verallgemeinerte Module für mit Glutaraldehyd behandelte Zellen . . . . .	210
A.3. Verallgemeinerte Module für mit Y27632 behandelte Zellen . . . . .	210
A.4. RPE-1 Zelle im Mikroplattenrheometer . . . . .	211
A.5. Vergleich experimenteller Lissajousplots mit Vorhersagen des Kontinuumsmodells für langsame Deformation . . . . .	215
A.6. Vergleich experimenteller Lissajousplots mit Vorhersagen des Kontinuumsmodells für schnelle Deformation . . . . .	216
A.7. Vergleich experimenteller Lissajousplots mit Vorhersagen des Kontinuumsmodells für cosinusförmige Schubspannungsanregung . . . . .	217

---

A.8. Vergleich experimenteller Lissajousplots mit Vorhersagen des Filamentmodells für langsame Deformation . . . . .	223
A.9. Vergleich experimenteller Lissajousplots mit Vorhersagen des Filamentmodells für schnelle Deformation . . . . .	224
A.10. Vergleich experimenteller Lissajousplots mit Vorhersagen des Filamentmodells für cosinusförmige Schubspannungsanregung . . . . .	225



# Tabellenverzeichnis

3.1. Verwendete Zelltypen . . . . .	29
4.1. Modellparameter einfaches Kontinuumsmodell für cosinusförmige Schubspannungsanregung . . . . .	158
4.2. Parameter für die Lösung des erweiterten Kontinuumsmodells . . . . .	160
4.3. Parameter zur Lösung des Filamentmodells . . . . .	169
A.1. Programm zur Herstellung der Mikroplatten für Einzelzelleexperimente . . . . .	199
A.2. Messprotokoll für deformationsgesteuerte Messungen . . . . .	208



# Literaturverzeichnis

- [1] H. Niederbragt. Hierarchical Organization of Biological Systems and the Structure of Adaptation in Evolution and Tumorigenesis. *Journal of Theoretical Biology*, 184(2):149–156, January 1997.
- [2] Dirk M Lorenz, Alice Jeng, and Michael W Deem. The emergence of modularity in biological systems. *Physics of life reviews*, 8(2):129–60, June 2011.
- [3] John M Tarbell, Zhong-Dong Shi, Jessilyn Dunn, and Hanjoong Jo. Fluid Mechanics, Arterial Disease, and Gene Expression. *Annual review of fluid mechanics*, 46:591–614, January 2014.
- [4] Douglas Hanahan and Robert A Weinberg. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100:57–70, 2000.
- [5] John S Bertram. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21:167–223, 2001.
- [6] Alan E. Guttmacher and Francis S. Collins. Genomic medicine - A primer. *The New England Journal of Medicine*, 347(19), 2002.
- [7] Donald Ingber. Mechanobiology and diseases of mechanotransduction. *Annals of Medicine*, 35(8):564–577, January 2003.
- [8] Tracy Tucker, Marco Marra, and Jan M Friedman. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *American journal of human genetics*, 85(2):142–54, August 2009.
- [9] Albert-László Barabási, Natali Gulbahce, and Joseph Loscalzo. Network medicine: a network-based approach to human disease. *Nature reviews. Genetics*, 12(1):56–68, January 2011.
- [10] Chin-Lin Guo, Nolan C Harris, Sithara S Wijeratne, Eric W Frey, and Ching-Hwa Kiang. Multiscale mechanobiology: mechanics at the molecular, cellular, and tissue levels. *Cell & bioscience*, 3(1):25, January 2013.
- [11] Thomas Iskratsch, Haguy Wolfenson, and Michael P. Sheetz. Appreciating force and shape the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12):825–833, October 2014.

- [12] Robyn H Pritchard, Yan Yan Shery Huang, and Eugene M Terentjev. Mechanics of biological networks: from the cell cytoskeleton to connective tissue. *Soft matter*, 10(12):1864–84, March 2014.
- [13] Tadanori Mammoto, Akiko Mammoto, and Donald E Ingber. Mechanobiology and developmental control. *Annual review of cell and developmental biology*, 29:27–61, January 2013.
- [14] Marjolein C.H. Van der Meulen and Patrick J. Prendergast. Mechanics in skeletal development , adaptation and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 358(1638):565–578, 2000.
- [15] April Dinwiddie, Ryan Null, Maria Pizzano, Lisa Chuong, Alexis Leigh Krup, Hwei Ee Tan, and Nipam H Patel. Dynamics of F-actin prefigure the structure of butterfly wing scales. *Developmental biology*, 392(2):404–18, August 2014.
- [16] Guy B Blanchard, Sughashini Murugesu, Richard J Adams, Alfonso Martinez-Arias, and Nicole Gorfinkiel. Cytoskeletal dynamics and supracellular organisation of cell shape fluctuations during dorsal closure. *Development (Cambridge, England)*, 137(16):2743–52, August 2010.
- [17] E. Heller and E. Fuchs. Tissue patterning and cellular mechanics. *The Journal of Cell Biology*, 211(2):219–231, October 2015.
- [18] S Suresh, J Spatz, J P Mills, a Micoulet, M Dao, C T Lim, M Beil, and T Seufferlein. Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria. *Acta biomaterialia*, 1(1):15–30, January 2005.
- [19] Subra Suresh. Biomechanics and biophysics of cancer cells. *Acta biomaterialia*, 3(4):413–38, July 2007.
- [20] A. Lusis. Atherosclerosis. *Nature*, 407(6801):233–241, 2010.
- [21] M. Cecelja and P. Chowienczyk. Role of arterial stiffness in cardiovascular disease. *JRSM Cardiovascular Disease*, 1(4):11–11, July 2012.
- [22] Daniel A Fletcher and R. Dyche Mullins. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280):485–492, January 2010.
- [23] Alberts. *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Wiley VCH, 2005.
- [24] Karp. *Molekulare Zellbiologie*. Springer, 2005.
- [25] Jonathon Howard. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Palgrave Macmillan, 2005.
- [26] Eckhard Mandelkow and Eva-Maria Mandelkow. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(1):72–81, January 1995.

- [27] O Valiron, N Caudron, and D Job. Microtubule dynamics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58:2069–2084, 2001.
- [28] Hélène de Forges, Anaïs Bouissou, and Franck Perez. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(2):266–74, February 2012.
- [29] Fumio Motegi, Seth Zonies, Yingsong Hao, Adrian a Cuenca, Erik Griffin, and Geraldine Seydoux. Microtubules induce self-organization of polarized PAR domains in *Caenorhabditis elegans* zygotes. *Nature cell biology*, 13(11):1361–7, November 2011.
- [30] Lee a Ligon and Erika L F Holzbaur. Microtubules tethered at epithelial cell junctions by dynein facilitate efficient junction assembly. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 8(7):808–19, July 2007.
- [31] Elaine Fuchs and Klaus Weber. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annual review of biochemistry*, 63:345–382, 1994.
- [32] Harald Herrmann, Harald Bär, Laurent Kreplak, Sergei V Strelkov, and Ueli Aebi. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(7):562–73, July 2007.
- [33] M.G. Mendez, D. Restle, and P.a. Janmey. Vimentin Enhances Cell Elastic Behavior and Protects against Compressive Stress. *Biophysical Journal*, 107(2):314–323, July 2014.
- [34] Jui M. Dave and Kayla J. Bayless. Vimentin as an Integral Regulator of Cell Adhesion and Endothelial Sprouting. *Microcirculation*, 21(4):333–344, May 2014.
- [35] Claire L Hyder, Kati Kempainen, Kimmo O Isoniemi, Susumu Y Imanishi, Hidemasa Goto, Masaki Inagaki, Elnaz Fazeli, John E Eriksson, and Kid Törnquist. Sphingolipids inhibit vimentin-dependent cell migration. *Journal of cell science*, pages 2057–2069, April 2015.
- [36] Roberto Dominguez and Kenneth C Holmes. Actin structure and function. *Annual review of biophysics*, 40:169–86, January 2011.
- [37] TD Pollard and JA Cooper. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326:1208–1212, 2009.
- [38] Jonathon Howard. *Cell mechanics and the cytoskeleton*. Macmillan Education, first edition, 2005.
- [39] Guillaume Salbreux, Guillaume Charras, and Ewa Paluch. Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis. *Trends in cell biology*, 22(10):536–45, October 2012.
- [40] Steven J Winder and Kathryn R Ayscough. Actin-binding proteins. *Journal of cell science*, 118(Pt 4):651–4, February 2005.

- [41] Céline Revenu, Rafika Athman, Sylvie Robine, and Daniel Louvard. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 5(8):635–46, August 2004.
- [42] Benoit Ladoux and Alice Nicolas. Physically based principles of cell adhesion mechanosensitivity in tissues. *Reports on progress in physics. Physical Society (Great Britain)*, 75(11):116601, November 2012.
- [43] Michael Murrell, Patrick W Oakes, Martin Lenz, and Margaret L Gardel. Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 16(8):486–498, July 2015.
- [44] Stéphanie Pellegrin and Harry Mellor. Actin stress fibres. *Journal of cell science*, 120(Pt 20):3491–9, October 2007.
- [45] Sari Tojkander, Gergana Gateva, and Pekka Lappalainen. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *Journal of cell science*, 125(Pt 8):1855–64, April 2012.
- [46] Kazuo Katoh, Yumiko Kano, and Yasuko Noda. Rho-associated kinase-dependent contraction of stress fibres and the organization of focal adhesions. *Journal of The Royal Society Interface*, 8:305–311, 2011.
- [47] Corina Ciobanasu, Bruno Faivre, and Christophe Le Clainche. Actin dynamics associated with focal adhesions. *International journal of cell biology*, 2012:941292, January 2012.
- [48] AL Berrier and KM Yamada. Cell matrix adhesion. *Journal of cellular physiology*, 213:565–573, 2007.
- [49] J Thomas Parsons, Alan Rick Horwitz, and Martin a Schwartz. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(9):633–43, September 2010.
- [50] D. Riveline, E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and a. D. Bershadsky. Focal Contacts as Mechanosensors: Externally Applied Local Mechanical Force Induces Growth of Focal Contacts by an Mdia1-Dependent and Rock-Independent Mechanism. *The Journal of Cell Biology*, 153(6):1175–1186, June 2001.
- [51] TP Lele, J Pendse, and Sanjay Kumar. Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. *Journal of cellular physiology*, 207:187–194, 2006.
- [52] F Boccafoschi, M Bosetti, P M Sandra, M Leigheb, and M Cannas. Effects of mechanical stress on cell adhesion A possible mechanism for morphological changes. *Cell Adhesion and Migration*, 4(1):19–25, 2009.
- [53] Mark a Smith, Elizabeth Blankman, Margaret L Gardel, Laura Luettjohann, Clare M Waterman, and Mary C Beckerle. A zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair. *Developmental cell*, 19(3):365–76, September 2010.

- [54] Tae Kyung Kim and James H Eberwine. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397(8):3173–8, August 2010.
- [55] Ross C Wilson and Jennifer a Doudna. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annual review of biophysics*, 42:217–39, January 2013.
- [56] Marta Targosz-Korecka, Grzegorz Daniel Brzezinka, Joanna Danilkiewicz, Zenon Rajfur, and Marek Szymonski. Glutaraldehyde fixation preserves the trend of elasticity alterations for endothelial cells exposed to TNF- $\alpha$ . *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 72(3):124–30, March 2015.
- [57] Pablo Fernández and Albrecht Ott. Single cell mechanics: Stress stiffening and kinematic hardening. *Physical Review Letters*, 100(23):1–4 (238102), June 2008.
- [58] Sanjay Kumar, Iva Z Maxwell, Alexander Heisterkamp, Thomas R Polte, Tanmay P Lele, Matthew Salanga, Eric Mazur, and Donald E Ingber. Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophysical journal*, 90(10):3762–73, May 2006.
- [59] Roland Kaunas, Phu Nguyen, Shunichi Usami, and Shu Chien. Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44):15895–900, November 2005.
- [60] Benjamin D Matthews, Darryl R Overby, Robert Mannix, and Donald E Ingber. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechano-sensitive ion channels. *Journal of cell science*, 119(Pt 3):508–18, February 2006.
- [61] Joseph Sambrook and David W. Russell. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, third edit edition, 2001.
- [62] Gerhard Aumüller, Gabriela Aust, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Giovanni Maio, Artur Mayerhofer, Siegfried Mense, and Dieter Reiß ig. *Anatomie*. Thieme, 3. edition, 2014.
- [63] Ghassan S Kassab. Biomechanics of the cardiovascular system: the aorta as an illustratory example. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 3(11):719–40, December 2006.
- [64] Magnus Bäck, T Christian Gasser, Jean-Baptiste Michel, and Giuseppina Caligiuri. Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases. *Cardiovascular research*, 99(2):232–41, July 2013.
- [65] Andreas Harloff, Andrea Nussbaumer, Simon Bauer, Aurélien F Stalder, Alex Frydrychowicz, Cornelius Weiller, Jürgen Hennig, and Michael Markl. In vivo assessment of wall shear stress in the atherosclerotic aorta using flow-sensitive 4D MRI. *Magnetic resonance in medicine*, 63(6):1529–36, June 2010.

- [66] Christian Weber and Heidi Noels. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine*, 17(11):1410–22, January 2011.
- [67] Paul N Hopkins. Molecular biology of atherosclerosis. *Physiological reviews*, 93(3):1317–542, July 2013.
- [68] Kathryn J Moore, Frederick J Sheedy, and Edward a Fisher. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature reviews. Immunology*, 13(10):709–21, October 2013.
- [69] Howard M. et al Lenhoff. *Hydra research methods*. Plenum Press, 1983.
- [70] T W Holstein, E Hobmayer, and U Technau. Cnidarians: an evolutionarily conserved model system for regeneration? *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 226(2):257–67, February 2003.
- [71] Brigitte Galliot. Hydra, a fruitful model system for 270 years. *The International journal of developmental biology*, 56(6-8):411–23, January 2012.
- [72] C Fütterer and C Colombo. Morphogenetic oscillations during symmetry breaking of regenerating *Hydra vulgaris* cells. *EPL (Europhysics Letters . . . )*, 64(1), 2003.
- [73] Jordi Soriano, Cyril Colombo, and Albrecht Ott. Hydra molecular network reaches criticality at the symmetry-breaking axis-defining moment. *Physical review letters*, 258102(December):1–4, 2006.
- [74] Thomas C G Bosch. Why polyps regenerate and we don't: towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Developmental biology*, 303(2):421–33, March 2007.
- [75] Jordi Soriano, Sten Rüdiger, Pramod Pullarkat, and Albrecht Ott. Mechanogenetic coupling of Hydra symmetry breaking and driven Turing instability model. *Biophysical journal*, 96(4):1649–60, March 2009.
- [76] Michael Kücken, Jordi Soriano, Pramod a Pullarkat, Albrecht Ott, and Ernesto M Nicola. An osmoregulatory basis for shape oscillations in regenerating hydra. *Biophysical journal*, 95(2):978–85, July 2008.
- [77] Shigeru Kondo and Takashi Miura. Reaction-Diffusion Model as a Framework for Understanding Biological Pattern Formation. *Science*, 329(September):1616–1620, 2010.
- [78] Alan M. Turing. The Chemical Basis of Morphogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 237(641):37–72, 1952.
- [79] JM Carlson and GH Swindle. Self-organized criticality: sandpiles, singularities, and scaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(July):6712–6719, 1995.
- [80] Ruth Weinziger, LM Salgado, CN David, and TC Bosch. Ks1, an epithelial cell-specific gene, responds to early signals of head formation in Hydra. *Development*, 2517:2511–2517, 1994.

- [81] I Endl, JU Lohmann, and TCG Bosch. Head-specific gene expression in Hydra: Complexity of DNA-protein interactions at the promoter of *ks1* is inversely correlated to the head activation potential. *Proceedings of the . . .*, 96(February):1445–1450, 1999.
- [82] Andrea Gamba, Mario Nicodemi, Jordi Soriano, and Albrecht Ott. Critical behavior and axis defining symmetry breaking in Hydra embryonic development. *Physical review letters*, 108(April):1–5, 2012.
- [83] Gerhard Schramm. *A practical approach to rheology and rheometry*. Thermo Haake, 2000.
- [84] Jacob Lubliner. *Plasticity Theory*. Dover books on engineering, 2nd edition, 2006.
- [85] J. Chakrabarty. *Theory of Plasticity*. Butterworth-Heinemann, 3rd edition, 2006.
- [86] Howard A Barnes and Derek Bell. Controlled-stress rotational rheometry : An historical review. *Korea-Australia Rheology Journal*, 15(4):187–196, 2003.
- [87] Pablo Fernández, Lutz Heymann, Albrecht Ott, Nuri Aksel, and Pramod A Pullarkat. Shear rheology of a cell monolayer. *New Journal of Physics*, 419(11):1–28, November 2007.
- [88] Jörg Läger, Klaus Wollny, and Siegfried Huck. Direct Strain Oscillation: a new oscillatory method enabling measurements at very small shear stresses and strains. *Rheologica Acta*, 41(4):356–361, April 2002.
- [89] Jörg Läger and Heiko Stettin. Differences between stress and strain control in the non-linear behavior of complex fluids. *Rheologica Acta*, 49(9):909–930, April 2010.
- [90] Hans M. Wyss, Kunimasa Miyazaki, Johan Mattsson, Zhibing Hu, David R. Reichman, and David a. Weitz. Strain-Rate Frequency Superposition: A Rheological Probe of Structural Relaxation in Soft Materials. *Physical Review Letters*, 98(23):238303, June 2007.
- [91] Hans-Wolfgang Spiess Manfred Wilhelm Daniel Maring. Fourier-transform rheology. *Rheological Acta*, 37:399–405, 1998.
- [92] Kyu Hyun, Manfred Wilhelm, Christopher O. Klein, Kwang Soo Cho, Jung Gun Nam, Kyung Hyun Ahn, Seung Jong Lee, Randy H. Ewoldt, and Gareth H. McKinley. A review of nonlinear oscillatory shear tests: Analysis and application of large amplitude oscillatory shear (LAOS). *Progress in Polymer Science*, 36(12):1697–1753, December 2011.
- [93] Manfred Wilhelm, Pierre Reinheimer, and Martin Ortseifer. High sensitivity Fourier-transform rheology. *Rheologica Acta*, 38(4):349–356, October 1999.
- [94] Claudia Carotenuto, Massimiliano Grosso, and PL Maffettone. Fourier transform rheology of dilute immiscible polymer blends: a novel procedure to probe blend morphology. *Macromolecules*, pages 4492–4500, 2008.
- [95] Leonard M. C. Sagis, Mariëlle Ramaekers, and Erik van der Linden. Constitutive equations

- for an elastic material with anisotropic rigid particles. *Physical Review E*, 63(5):051504, April 2001.
- [96] RH Ewoldt, AE Hosoi, and GH McKinley. New measures for characterizing nonlinear viscoelasticity in large amplitude oscillatory shear. *Journal of Rheology*, 52(6), 2008.
- [97] Randy H. Ewoldt. Defining nonlinear rheological material functions for oscillatory shear. *Journal of Rheology*, 57(1):177, 2013.
- [98] Christopher J. Dimitriou, Randy H. Ewoldt, and Gareth H. McKinley. Describing and prescribing the constitutive response of yield stress fluids using large amplitude oscillatory shear stress (LAOStress). *Journal of Rheology*, 57(1):27, 2013.
- [99] A. R. Bausch and K. Kroy. A bottom-up approach to cell mechanics. *Nature Physics*, 2:231–238, 2006.
- [100] C Storm, JJ Pastore, and FC MacKintosh. Nonlinear elasticity in biological gels. *Nature*, 435(May):0–3, 2005.
- [101] Christine Semmrich, Ryan J. Larsen, and Andreas R. Bausch. Nonlinear mechanics of entangled F-actin solutions. *Soft Matter*, 4(8):1675, 2008.
- [102] O. Lieleg, M. M. a. E. Claessens, C. Heussinger, E. Frey, and a. R. Bausch. Mechanics of Bundled Semiflexible Polymer Networks. *Physical Review Letters*, 99(8):088102, August 2007.
- [103] C. P. Broedersz and F. C. MacKintosh. Modeling semiflexible polymer networks. *Reviews of Modern Physics*, 86(3):995–1036, July 2014.
- [104] C Heussinger. Stress relaxation through crosslink unbinding in cytoskeletal networks. *New Journal of Physics*, 14(9):095029, September 2012.
- [105] Oliver Lieleg, Mireille M. a. E. Claessens, and Andreas R. Bausch. Structure and dynamics of cross-linked actin networks. *Soft Matter*, 6(2):218–225, 2010.
- [106] Jianxin Chen, Ning Wang, I V A Marija Tolic, Srbojub M Mijailovich, James P Butler, Jeffrey J Fredberg, Iva Marija Tolic, J Fredberg, and Dimitrije Stamenovic. Cell prestress . I . Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells. 02115:606–616, 2002.
- [107] Dimitrije Stamenović. Effects of cytoskeletal prestress on cell rheological behavior. *Acta biomaterialia*, 1(3):255–62, May 2005.
- [108] Pablo Fernández, Pramod A Pullarkat, and Albrecht Ott. A master relation defines the nonlinear viscoelasticity of single fibroblasts. *Biophysical journal*, 90(10):3796–805, May 2006.

- [109] Philip Kollmannsberger, Claudia Tanja Mierke, and Ben Fabry. Nonlinear viscoelasticity of adherent cells is controlled by cytoskeletal tension. *Soft Matter*, 7(7):3127–3132, 2011.
- [110] Pablo A Fernandez. *Mechanics of living cells: nonlinear viscoelasticity of single fibroblasts and shape instabilities in axons*. PhD thesis, Universität Bayreuth, 2006.
- [111] Xavier Trepats, Linhong Deng, Steven S An, Daniel Navajas, J Daniel, William T Gerthoffer, James P Butler, and Jeffrey J Fredberg. Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature*, 447(7144):592–595, 2007.
- [112] Ramaswamy Krishnan, Chan Young Park, Yu-Chun Lin, Jere Mead, Richard T Jaspers, Xavier Trepats, Guillaume Lenormand, Dhananjay Tambe, Alexander V Smolensky, Andrew H Knoll, James P Butler, and Jeffrey J Fredberg. Reinforcement versus fluidization in cytoskeletal mechanoresponsiveness. *PloS one*, 4(5):e5486, January 2009.
- [113] Núria Gavara, Pere Roca-Cusachs, Raimon Sunyer, Ramon Farré, and Daniel Navajas. Mapping Cell-Matrix Stresses during Stretch Reveals Inelastic Reorganization of the Cytoskeleton. *Biophysical Journal*, 95(1):464–471, July 2008.
- [114] Lars Wolff, P Fernández, and Klaus Kroy. Resolving the stiffening-softening paradox in cell mechanics. *PloS one*, 7(7), 2012.
- [115] Lars Wolff, Pablo Fernandez, and Klaus Kroy. Inelastic mechanics of sticky biopolymer networks. *New Journal of Physics*, 12(5):053024, May 2010.
- [116] Sabine Schmitz. *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
- [117] Olivier Thoumine, Albrecht Ott, Olivier Cardoso, and Jean-Jacques Meister. Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 39(1-2):47–62, February 1999.
- [118] N. Desprat, A. Guiroy, and A. Asnacios. Microplates-based rheometer for a single living cell. *Review of Scientific Instruments*, 77(5):055111, 2006.
- [119] P. A Pullarkat, P.A. Fernandez, and A. Ott. Rheological properties of the eukaryotic cell cytoskeleton. *Physics Reports*, 449:29–53, 2007.
- [120] Marita L. Rodriguez, Patrick J. McGarry, and Nathan J. Sniadecki. Review on Cell Mechanics: Experimental and Modeling Approaches. *Applied Mechanics Reviews*, 65(6):060801, October 2013.
- [121] Jochen Guck, Revathi Ananthakrishnan, and Hamid Mahmood. The optical stretcher: a novel laser tool to micromanipulate cells. *Biophysical journal*, 81(August):767–784, 2001.
- [122] M Puig-De-Morales. Measurement of cell microrheology by magnetic twisting cytometry with frequency domain demodulation. *Journal of Applied Physiology*, 91:1152–1159, 2001.

- [123] Yiider Tseng, TP Kole, and Denis Wirtz. Micromechanical mapping of live cells by multiple-particle-tracking microrheology. *Biophysical journal*, 83(6):3162–3176, 2002.
- [124] Philip Kollmannsberger and Ben Fabry. High-force magnetic tweezers with force feedback for biological applications. *The Review of scientific instruments*, 78(11):114301, November 2007.
- [125] Kristina Haase and AE Pelling. Investigating cell mechanics with atomic force microscopy. *Journal of The Royal Society Interface*, 12, 2015.
- [126] Oliver Otto, Philipp Rosendahl, Alexander Mietke, Stefan Golfier, Christoph Herold, Daniel Klaue, Salvatore Girardo, Stefano Pagliara, Andrew Ekpenyong, Angela Jacobi, Manja Wobus, Nicole Töpfner, Ulrich F Keyser, Jörg Mansfeld, Elisabeth Fischer-Friedrich, and Jochen Guck. Real-time deformability cytometry: on-the-fly cell mechanical phenotyping. *Nature methods*, (July 2014), February 2015.
- [127] Mathias Sander, Julia Flesch, and Albrecht Ott. Using cell monolayer rheology to probe average single cell mechanical properties. *Biorheology*, 52:269–278, November 2015.
- [128] Mathias Sander. *Rheologische Messungen an lebenden Zellen*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes, 2009.
- [129] O.C. Aktas, M. Sander, M.M. Miró, J. Lee, C.K. Akkan, H. Smail, A. Ott, and M. Veith. Enhanced fibroblast cell adhesion on Al/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanowires. *Applied Surface Science*, 257(8):3489–3494, February 2011.
- [130] Florian Custodis, Magnus Baumhäkel, Nils Schlimmer, Franka List, Christoph Gensch, Michael Böhm, and Ulrich Laufs. Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 117(18):2377–87, May 2008.
- [131] JC Tardif and J Gregoire. Chronic heart rate reduction with ivabradine and prevention of atherosclerosis progression assessed using intravascular ultrasound. *European Heart Journal Supplements*, 5:G46–G51, 2003.
- [132] H.A. Cirka, S.A. Koehler, W. W. Farr, and K.L. Billiar. Eccentric rheometry for viscoelastic characterization of small, soft, anisotropic, and irregularly shaped biopolymer gels and tissue biopsies. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 40(8):1654–1665, 2013.
- [133] Michael D Abramoff, Paulo J Magalhães, and Sunanda J. Ram. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, July, 2004.
- [134] Caroline A Schneider, Wayne S Rasband, and Kevin W Eliceiri. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7):671–675, June 2012.
- [135] Isabelle Philipp, Roland Aufschnaiter, Suat Ozbek, Stefanie Pontasch, Marcell Jenewein, Hiroshi Watanabe, Fabian Rentzsch, Thomas W Holstein, and Bert Hobmayer. Wnt/beta-

- Catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan Hydra. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(11):4290–4295, 2009.
- [136] Dagmar van Dusschoten and Manfred Wilhelm. Increased torque transducer sensitivity via oversampling. *Rheologica Acta*, 40(4):395–399, July 2001.
- [137] JW Cooley and JW Tukey. An algorithm for the machine calculation of complex Fourier series. *Mathematics of computation*, 19(90):297–301, 1965.
- [138] Gabriel Fenteany, Paul a Janmey, and Thomas P Stossel. Signaling pathways and cell mechanics involved in wound closure by epithelial cell sheets. *Current Biology*, 10(14):831–838, July 2000.
- [139] Nicholas D. Evans, Richard O.C. Oreffo, Eugene Healy, Philipp J. Thurner, and Yu Hin Man. Epithelial mechanobiology, skin wound healing, and the stem cell niche. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 28:397–409, December 2013.
- [140] Wolfgang H Goldmann, Vera Auernheimer, Ingo Thievessen, and Ben Fabry. Vinculin, cell mechanics and tumour cell invasion. *Cell biology international*, 37(5):397–405, May 2013.
- [141] Sungsoo Na, Olivier Collin, Farhan Chowdhury, Bernard Tay, Mingxing Ouyang, Yingxiao Wang, and Ning Wang. Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18):6626–31, May 2008.
- [142] Ben Fabry, Geoffrey N Maksym, James P Butler, Michael Glogauer, Daniel Navajas, Nathan A Taback, Emil J Millet, and Jeffrey J Fredberg. Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells. *Physical Review E*, 68, 2003.
- [143] B. D. Hoffman, G. Massiera, K. M. Van Citters, John C. Crocker, Kathleen M Wan Citters Brenton D. Hoffman Gladys Massiera, and John C. Crocker. The consensus mechanics of cultured mammalian cells:. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(27):10259–10264, June 2006.
- [144] Brenton D Hoffman and John C Crocker. Cell mechanics: dissecting the physical responses of cells to force. *Annual review of biomedical engineering*, 11:259–88, January 2009.
- [145] S Na, A Trache, J Trzeciakowski, Z Sun, G A Meininger, and J D Humphrey. Time-dependent Changes in Smooth Muscle Cell Stiffness and Focal Adhesion Area in Response to Cyclic Equibiaxial Stretch. *Annals of biomedical engineering*, 36(3):369–380, 2008.
- [146] Kevin D Webster, Win Pin Ng, and Daniel A Fletcher. Tensional homeostasis in single fibroblasts. *Biophysical journal*, 107(1):146–55, July 2014.
- [147] Mukund Gupta, Bibhu Ranjan Sarangi, Joran Deschamps, Yasaman Nematbakhsh, Andrew Callan-Jones, Felix Margadant, René-Marc Mège, Chwee Teck Lim, Raphaël Voituriez, and

- Benoît Ladoux. Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nature communications*, 6(JUNE):7525, January 2015.
- [148] Neil Pender and Christopher A G Mcculloch. Quantitation of actin polymerization in two human fibroblast sub-types responding to mechanical stretching. *Journal of Cell Science*, 100:187–194, 1991.
- [149] Philip Kollmannsberger and Ben Fabry. Linear and Nonlinear Rheology of Living Cells. *Annual Review of Materials Research*, 41(1):75–97, August 2011.
- [150] Lars Wolff and Klaus Kroy. Minimal model for the inelastic mechanics of biopolymer networks and cells. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 86(4 Pt 1):040901, October 2012.
- [151] Benjamin Tränkle. *Rheologie an Monoschichten von lebenden Zellen*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes.
- [152] Martin Ortseifer Thorsten Neidhüz ½fer Hans-Wolfgang Spiess Manfred Wilhelm Pierre Reinheimer. The crossover between linear and non-linear mechanical behaviour in polymer solutions as detected by Fourier-transform rheology. *Rheological Acta*, 39:241–246, 2000.
- [153] Christophe Baravian, Ghania Benbelkacem, and François Caton. Unsteady rheometry: can we characterize weak gels with a controlled stress rheometer? *Rheologica Acta*, 46(5):577–581, November 2006.
- [154] Sanjay Kumar and Valerie M Weaver. Mechanics, malignancy, and metastasis: the force journey of a tumor cell. *Cancer metastasis reviews*, 28(1-2):113–27, June 2009.
- [155] CC Lee, CC Wu, and FC Su. The technique for measurement of cell adhesion force. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 24(1):51–56, 2004.
- [156] C Selhuber-Unkel, T Erdmann, M López-García, H Kessler, U S Schwarz, and J P Spatz. Cell adhesion strength is controlled by intermolecular spacing of adhesion receptors. *Biophysical journal*, 98(4):543–51, February 2010.
- [157] Jung-Eun Bae, Mirin Lee, Kwang Soo Cho, Kwan Ho Seo, and Dong-Gug Kang. Comparison of stress-controlled and strain-controlled rheometers for large amplitude oscillatory shear. *Rheologica Acta*, 52(10-12):841–857, July 2013.
- [158] B Codan, V Martinelli, L Mestroni, and O Sbaizero. Atomic force microscopy of 3T3 and SW-13 cell lines: an investigation of cell elasticity changes due to fixation. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 33(6):3303–8, August 2013.
- [159] Albrecht Ott Pablo A. Fernandez. Single cell mechanics: Stress stiffening and kinematic hardening. *Physical Review Letters*, 100:1–4 (238102), 2008.

- [160] Nicolas Desprat, Alain Richert, Jacqueline Simeon, and Atef Asnacios. Creep function of a single living cell. *Biophysical journal*, 88(3):2224–2233, March 2005.
- [161] Hsi-Hui Lin, Hsiu-Kuan Lin, I-Hsuan Lin, Yu-Wei Chiou, Horn-Wei Chen, Ching-Yi Liu, Hans I-Chen Harn, Wen-Tai Chiu, Yang-Kao Wang, Meng-Ru Shen, and Ming-Jer Tang. Mechanical phenotype of cancer cells: cell softening and loss of stiffness sensing. *Oncotarget*, 6(25):20946–20958, August 2015.
- [162] O. Thoumine and A. Ott. Comparison of the mechanical properties of normal and transformed fibroblasts. *Biorheology*, 34:309–26, 1997.
- [163] Wenwei Xu, Roman Mezencev, Byungkyu Kim, Lijuan Wang, John McDonald, and Todd Sulchek. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PLoS one*, 7(10):e46609, January 2012.
- [164] Joseph Fenner, Amanda C Stacer, Frank Winterroth, Timothy D Johnson, Kathryn E Luker, and Gary D Luker. Macroscopic stiffness of breast tumors predicts metastasis. *Scientific reports*, 4:5512, January 2014.
- [165] Priyanka Pravincumar, Dan L Bader, and Martin M Knight. Viscoelastic cell mechanics and actin remodelling are dependent on the rate of applied pressure. *PLoS one*, 7(9):e43938, January 2012.
- [166] Hui-Ju Hsu, Chin-Fu Lee, Andrea Locke, Susan Q Vanderzyl, and Roland Kaunas. Stretch-induced stress fiber remodeling and the activations of JNK and ERK depend on mechanical strain rate, but not FAK. *PLoS one*, 5(8):e12470, January 2010.
- [167] A. S. Coutts. TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *Journal of Cell Science*, 116(5):897–906, March 2003.
- [168] Boyan K Garvalov, Theresa E Higgins, James D Sutherland, Markus Zettl, Niki Scaplehorn, Thomas Köcher, Eugenia Piddini, Gareth Griffiths, and Michael Way. The conformational state of Tes regulates its zyxin-dependent recruitment to focal adhesions. *The Journal of cell biology*, 161(1):33–9, April 2003.
- [169] Elen Griffith, Amanda S Coutts, and Donald M Black. RNAi knockdown of the focal adhesion protein TES reveals its role in actin stress fibre organisation. *Cell motility and the cytoskeleton*, 60(3):140–52, March 2005.
- [170] Rachel E Laudadio, Emil J Millet, Ben Fabry, Steven S An, James P Butler, and Jeffrey J Fredberg. Rat airway smooth muscle cell during actin modulation: rheology and glassy dynamics. *American journal of physiology. Cell physiology*, 289(6):C1388–95, December 2005.
- [171] Emad Moeendarbary and Andrew R. Harris. Cell mechanics: principles, practices, and

- prospects. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 6(5):371–388, September 2014.
- [172] Yuxia Luan, Oliver Lieleg, Bernd Wagner, and Andreas R Bausch. Micro- and macrorheological properties of isotropically cross-linked actin networks. *Biophysical journal*, 94(2):688–93, January 2008.
- [173] O. Lieleg, M. M. a. E. Claessens, Y. Luan, and a. R. Bausch. Transient Binding and Dissipation in Cross-Linked Actin Networks. *Physical Review Letters*, 101(10):108101, September 2008.
- [174] Kranthi Kumar Elineni and Nathan D Gallant. Regulation of cell adhesion strength by peripheral focal adhesion distribution. *Biophysical journal*, 101(12):2903–11, December 2011.
- [175] Allen J Ehrlicher, Ramaswamy Krishnan, Ming Guo, Cécile M Bidan, David A Weitz, and Martin R Pollak. Alpha-actinin binding kinetics modulate cellular dynamics and force generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(21):6619–6624, 2015.
- [176] Anne S G van Oosten, Mahsa Vahabi, Albert J Licup, Abhinav Sharma, Peter a Galie, Fred C MacKintosh, and Paul a Janmey. Uncoupling shear and uniaxial elastic moduli of semiflexible biopolymer networks: compression-softening and stretch-stiffening. *Scientific reports*, 6(January):19270, January 2016.
- [177] M. M. a. E. Claessens, R. Tharmann, K. Kroy, and a. R. Bausch. Microstructure and viscoelasticity of confined semiflexible polymer networks. *Nature Physics*, 2(3):186–189, February 2006.
- [178] J Xu, Y Tseng, and D Wirtz. Strain hardening of actin filament networks. Regulation by the dynamic cross-linking protein alpha-actinin. *The Journal of biological chemistry*, 275(46):35886–92, November 2000.
- [179] Nicholas a Kurniawan, Long Hui Wong, and Raj Rajagopalan. Early stiffening and softening of collagen: interplay of deformation mechanisms in biopolymer networks. *Biomacromolecules*, 13(3):691–8, March 2012.
- [180] Christopher J Dimitriou. *The rheological complexity of waxy crude oils : Yielding , thixotropy and shear heterogeneities*. PhD thesis, 2013.
- [181] O Lieleg, J Kayser, G Brambilla, L Cipelletti, and A R Bausch. Slow dynamics and internal stress relaxation in bundled cytoskeletal networks. *Nature materials*, 10(3):236–42, March 2011.
- [182] Stefan Münster, Louise M Jawerth, Beverly a Leslie, Jeffrey I Weitz, Ben Fabry, and David a Weitz. Strain history dependence of the nonlinear stress response of fibrin and collagen

- networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30):12197–202, July 2013.
- [183] C. Bustamante, J. F. Marko, and E.D. Siggia. Entropic Elasticity of Lambda-Phage DNA. *Science*, 265:1599–1600, 1994.
- [184] Tiina Lehto, Marta Miaczynska, Marino Zerial, Daniel J. Müller, and Fedor Severin. Observing the growth of individual actin filaments in cell extracts by time-lapse atomic force microscopy. *FEBS Letters*, 551(1-3):25–28, September 2003.
- [185] Wonyeong Jung, Michael P Murrell, and Taeyoon Kim. F-Actin Fragmentation Induces Distinct Mechanisms of Stress Relaxation in the Actin Cytoskeleton. *ACS Macro Letters*, 5:641–645, 2016.
- [186] Hyungsuk Lee, Jorge M. Ferrer, Matthew J. Lang, and Roger D. Kamm. Molecular origin of strain softening in cross-linked F-actin networks. *Physical Review E*, 82(1):011919, July 2010.
- [187] Sapun H Parekh Ovijit Chaudhuri and Daniel A Fletcher. Reversible stress softening of actin networks. *Nature*, 445:295–298, 2007.
- [188] Simon Jungbauer, Huajian Gao, Joachim P Spatz, and Ralf Kemkemer. Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates. *Biophysical journal*, 95(7):3470–8, October 2008.
- [189] Paul A Janmey, Ursula Euteneuer, Peter Traub, and Manfred Schliwa. Viscoelastic Properties of Vimentin Compared with Other Filamentous Biopolymer Networks. *Journal of Cell Biology*, 113(1):155–160, 1991.
- [190] P. R. Onck, T. Koeman, T. van Dillen, and E. van der Giessen. Alternative Explanation of Stiffening in Cross-Linked Semiflexible Networks. *Physical Review Letters*, 95(17):178102, October 2005.
- [191] T. Van Dillen, P. R. Onck, and E. Van der Giessen. Stiffening of semiflexible biopolymers and cross-linked networks. *arXiv*, pages 1–17, November 2006.
- [192] Goran Žagar, Patrick R Onck, and Erik van der Giessen. Two Fundamental Mechanisms Govern the Stiffening of Cross-linked Networks. *Biophysical journal*, 108(6):1470–9, March 2015.
- [193] Paul Dalhaimer, Dennis E. Discher, and Tom C. Lubensky. Crosslinked actin networks show liquid crystal elastomer behaviour, including soft-mode elasticity. *Nature Physics*, 3(5):354–360, March 2007.
- [194] Shaokoon Cheng, Elizabeth C Clarke, and Lynne E Bilston. The effects of preconditioning strain on measured tissue properties. *Journal of biomechanics*, 42(9):1360–2, June 2009.

- [195] Julie M Giles, Amanda E Black, and Jeffrey E Bischoff. Anomalous rate dependence of the preconditioned response of soft tissue during load controlled deformation. *Journal of biomechanics*, 40(4):777–85, January 2007.
- [196] Aisling Ní Annaidh, Karine Bruyère, Michel Destrade, Michael D Gilchrist, and Mélanie Otténio. Characterization of the anisotropic mechanical properties of excised human skin. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 5(1):139–48, January 2012.
- [197] Mark F Coughlin and Jeffrey J Fredberg. Changes in cytoskeletal dynamics and nonlinear rheology with metastatic ability in cancer cell lines. *Physical biology*, 10(6):065001, December 2013.
- [198] Andrew R Missel, Mo Bai, William S Klug, and Alex J Levine. Affine-nonaffine transition in networks of nematically ordered semiflexible polymers. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 82(4 Pt 1):041907, October 2010.
- [199] Taeyoon Kim, Margaret L Gardel, and Ed Munro. Determinants of fluidlike behavior and effective viscosity in cross-linked actin networks. *Biophysical journal*, 106(3):526–34, February 2014.
- [200] Ning Wang, Jessica D Tytell, and Donald E Ingber. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(January):75–82, 2009.
- [201] Louise Guolla, Martin Bertrand, Kristina Haase, and Andrew E Pelling. Force transduction and strain dynamics in actin stress fibres in response to nanonewton forces. *Journal of Cell Science*, 125(3):603–613, 2012.
- [202] Paul a. Janmey, Margaret E. McCormick, Sebastian Rammensee, Jennifer L. Leight, Penelope C. Georges, and Fred C. MacKintosh. Negative normal stress in semiflexible biopolymer gels. *Nature Materials*, 6(1):48–51, December 2006.
- [203] Julia Flesch. *Untersuchung verschiedener Aspekte mechanischer und genetischer Regulationsmechanismen biologischer Systeme*. Masterarbeit, Universität des Saarlandes, 2015.
- [204] Hermann Schillers, Mike Wälte, Katarina Urbanova, and Hans Oberleithner. Real-time monitoring of cell elasticity reveals oscillating myosin activity. *Biophysical journal*, 99(11):3639–46, December 2010.
- [205] Emad Moeendarbary, Léo Valon, Marco Fritzsche, Andrew R Harris, Dale A Moulding, Adrian J Thrasher, Eleanor Stride, L Mahadevan, and Guillaume T Charras. The cytoplasm of living cells behaves as a poroelastic material. *Nature Materials*, 12(3):253–261, 2013.
- [206] Taeyoon Kim, Wonmuk Hwang, and Roger D. Kamm. Dynamic Role of Cross-Linking Proteins in Actin Rheology. *Biophysical Journal*, 101(7):1597–1603, October 2011.

- [207] Alexandre Micoulet, Joachim P Spatz, and Albrecht Ott. Mechanical response analysis and power generation by single-cell stretching. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*, 6(4):663–70, April 2005.
- [208] Emmanuel Décavé, Daniel Garrivier, Yves Bréchet, Franz Bruckert, and Bertrand Fourcade. Peeling process in living cell movement under shear flow. *Physical review letters*, 89(10):108101, September 2002.
- [209] Georg E Fantner, Tue Hassenkam, Johannes H Kindt, James C Weaver, Henrik Birkedal, Leonid Pechenik, Jacqueline a Cutroni, Geraldo a G Cidade, Galen D Stucky, Daniel E Morse, and Paul K Hansma. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nature materials*, 4(8):612–6, August 2005.
- [210] Charles K C Lieou, Ahmed E Elbanna, and Jean M Carlson. Sacrificial bonds and hidden length in biomaterials : A kinetic constitutive description of strength and toughness in bone. *Physical Review E*, 012703:1–10, 2013.
- [211] Brenton D Hoffman, Gladys Massiera, and John C Crocker. Fragility and mechanosensing in a thermalized cytoskeleton model with forced protein unfolding. *Physical Review E*, 76(June), 2007.
- [212] B. A. DiDonna and Alex J Levine. Unfolding cross-linkers as rheology regulators in F-actin networks. *Physical Review E*, 75, 2007.
- [213] Brenton D. Hoffman Gladys Massiera and John C Crocker. Power-law rheology and mechano-sensing in a cytoskeleton model with forced protein unfolding. *arXiv*, 2006.
- [214] Guillaume Lenormand Xavier Trepast and Jeffrey J Fredberg. Universality in cell mechanics. *Soft Matter*, 4:1750–1759, 2008.
- [215] Y. C. Fung. *Biomechanics: Mechanical properties of living tissues*. 1993.
- [216] Stephen C Cowin and Stephen B. Doty. *Tissue Mechanics*. Springer, 2006.
- [217] Scott W. Sloan, Andrew J. Abbo, and Daichao Sheng. Refined explicit integration of elastoplastic models with automatic error control. *Engineering Computations*, 18(1/2):121–194, February 2001.
- [218] D M Pedroso and M M Farias. Implicit and Explicit Numerical Integration Schemes Applied to Elastoplastic Constitutive Laws for Soils. *Researchgate*, 2005.
- [219] Fabio De Angelis. A Comparative Analysis of Linear and Nonlinear Kinematic Hardening Rules in Computational Elastoplasticity. *Technische Mechanik*, 32:164–173, 2012.
- [220] D a Head, a J Levine, and F C MacKintosh. Distinct regimes of elastic response and deformation modes of cross-linked cytoskeletal and semiflexible polymer networks. *Physical*

- review. *E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 68(6 Pt 1):061907, December 2003.
- [221] David a Head, Alex J Levine, and F C MacKintosh. Deformation of cross-linked semiflexible polymer networks. *Physical review letters*, 91(10):108102, September 2003.
- [222] Shinji Deguchi, Toshiro Ohashi, and Masaaki Sato. Tensile properties of single stress fibers isolated from cultured vascular smooth muscle cells. *Journal of biomechanics*, 39(14):2603–10, January 2006.
- [223] Ulrich S Schwarz. Catch me because you can: a mathematical model for mechanosensing. *Biophysical journal*, 105(6):1289–91, September 2013.
- [224] E. Elson and G. Genin. Rhe role of mechanics in actin stress fibre kinetics. *Experimental Cell Research*, 319(16):2490–2500, 2013.
- [225] Jenna L Balestrini, Sidharth Chaudhry, Vincent Sarrazy, Anne Koehler, and Boris Hinz. The mechanical memory of lung myofibroblasts. *Integrative Biology*, 4:410–421, 2012.
- [226] Eva Wegel, Antonia Göhler, B Christoffer Lagerholm, Alan Wainman, Stephan Uphoff, Rainer Kaufmann, and Ian M Dobbie. Imaging cellular structures in super-resolution with SIM, STED and Localisation Microscopy: A practical comparison. *Scientific reports*, 6(November 2015):27290, June 2016.
- [227] Hailong Wang, a S Abhilash, Christopher S Chen, Rebecca G Wells, and Vivek B Shenoy. Long-range force transmission in fibrous matrices enabled by tension-driven alignment of fibers. *Biophysical journal*, 107(11):2592–603, December 2014.
- [228] Jerome Solon, Aynur Kaya-Çopur, Julien Colombelli, and Damian Brunner. Pulsed Forces Timed by a Ratchet-like Mechanism Drive Directed Tissue Movement during Dorsal Closure. *Cell*, 137(7):1331–1342, June 2009.
- [229] National Center For Health. Health, United States, 2015: With Special Feature on Racial and Ethnic Health Disparities. Technical report, 2015.
- [230] João L Cavalcante, João a C Lima, Alban Redheuil, and Mouaz H Al-Mallah. Aortic stiffness: current understanding and future directions. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(14):1511–22, April 2011.
- [231] Deshun Lu and Ghassan S Kassab. Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology. *Journal of The Royal Society Interface*, 8:1379–1385, 2011.
- [232] M T Walsh, E M Cunnane, J J Mulvihill, a C Akyildiz, F J H Gijssen, and G a Holzapfel. Uniaxial tensile testing approaches for characterisation of atherosclerotic plaques. *Journal of biomechanics*, 47(4):793–804, March 2014.
- [233] Darren Haskett, Gregory Johnson, Aifang Zhou, Urs Utzinger, and Jonathan Vande Geest.

- Microstructural and biomechanical alterations of the human aorta as a function of age and location. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*, 9(6):725–36, December 2010.
- [234] Yu Zou and Yanhang Zhang. An experimental and theoretical study on the anisotropy of elastin network. *Annals of biomedical engineering*, 37(8):1572–83, August 2009.
- [235] Mary K O’Connell, Sushila Murthy, Samson Phan, Chengpei Xu, Joann Buchanan, Ryan Spilker, Ronald L Dalman, Christopher K Zarins, Winfried Denk, and Charles a Taylor. The three-dimensional micro- and nanostructure of the aortic medial lamellar unit measured using 3D confocal and electron microscopy imaging. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 27(3):171–81, April 2008.
- [236] Marina Cecelja, Benyu Jiang, Lisa Bevan, Michelle L. Frost, Tim D. Spector, and Phil J. Chowienczyk. Arterial stiffening relates to arterial calcification but not to noncalcified atheroma in women: A twin study. *Journal of the American College of Cardiology*, 57(13):1480–1486, 2011.
- [237] Gokay Nar, Sinan Inci, Gokhan Aksan, Selami Demirelli, Korhan Soylu, Serkan Yuksel, Okan Gulel, and Atilla Icli. Ivabradine on Aortic Stiffness in Patients With Heart Failure. *Journal of Investigative Medicine*, 63(4):620–625, 2015.
- [238] Antonio Jacinto and Buzz Baum. Actin in development. *Mechanisms of Development*, 120(11):1337–1349, November 2003.
- [239] Uri Moran, Rob Phillips, and Ron Milo. SnapShot: key numbers in biology. *Cell*, 141(7):1262–1262.e1, June 2010.
- [240] Delphine Aymoz, Victoria Wosika, Eric Durandau, and Serge Pelet. Real-time quantification of protein expression at the single-cell level via dynamic protein synthesis translocation reporters. *Nature communications*, 7:11304, April 2016.
- [241] Georg Hemmrich. *Comparative genomics and computational biology in the basal metazoan Hydra*. PhD thesis, 2007.
- [242] Heike Dobicki. *Symmetry breaking in regenerating hydra: The role of fluctuations and cell mechanics*. PhD thesis, 2016.
- [243] Michael Krahe, Iris Wenzel, Kao-Nung Lin, Julia Fischer, Joseph Goldmann, Markus Kästner, and Claus Fütterer. Fluctuations and differential contraction during regeneration of *Hydra vulgaris* tissue toroids. *New Journal of Physics*, 15(3):035004, March 2013.
- [244] Qiming Wang, James J Feng, and Len M Pismen. A Cell-Level Biomechanical Model of *Drosophila* Dorsal Closure. *Biophysical journal*, 103(11):2265–2274, 2012.
- [245] Christine M Butler and Ramsey A Foty. Measurement of Aggregate Cohesion by Tissue Surface Tensiometry. *Journal of Visualized Experiments*, 50, 2011.

- [246] Pengfei Lu, Ken Takai, Valerie M Weaver, and Zena Werb. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3:1–24, 2011.
- [247] Amnon Buxboim, Irena L Ivanovska, and Dennis E Discher. Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells 'feel' outside and in? *Journal of cell science*, 123(Pt 3):297–308, February 2010.
- [248] Yongyun Hwang and Abdul I Barakat. Dynamics of mechanical signal transmission through prestressed stress fibers. *PloS one*, 7(4):e35343, January 2012.

## Publikationen

- Bereits publiziert
  - 1.) O.C. Aktas, M. Sander, M.M. Miro, J. Lee, C.K. Akkan, H. Smail, A. Ott, and M. Veith. Enhanced fibroblast cell adhesion on Al/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanowires. *Applied Surface Science*, **257**(8):3489-3494, February 2011.
  - 2.) Mathias Sander, Julia Flesch, and Albrecht Ott. Using cell monolayer rheology to probe average single cell mechanical properties. *Biorheology*, **52**:269-278, November 2015.
- Im Review-Prozess
  - 1.) Mathias Sander, Heike Dobicki und Albrecht Ott. The mechanics of fibroblasts subjected to large amplitude oscillatory shear. *Biophysical Journal*
  - 2.) Dikla Raz-Ben Aroush, Atef Asnacios, Wei-Chiang Chen, Maxim E. Dokukin, Bryant L. Doss, Pauline Durand, Andrew Ekpenyong, Jochen Guck, Nataliia V. Guz, Paul A. Janmey, Nicole M. Moore, Albrecht Ott, Yeh-Chuin Poh, Robert Ros, Mathias Sander, Igor Sokolov, Jack R. Stuanton, Ning Wang, Denis Wirtz, Pei-Hsun Wu. Comparative study of cell mechanics methods. *Nature Methods*