
Temperaturstabilisierte Rasterkraftmikroskopie an lebenden eukaryotischen Zellen

Bachelorarbeit

zur Erlangung des Grades eines
Bachelor of Science

vorgelegt von
Carolin Rademacher

Fakultät für Physik
Fachbereich Biophysik und angewandte Nanowissenschaften

Universität Bielefeld

November 2007

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit alleine und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasst habe.

Bielefeld, den 5. November 2007

(Carolin Rademacher)

Gutachter

PD Dr. Robert Ros
Dipl. Phys. Volker Walhorn

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 7 |
| 2 | Theoretische Grundlagen | 9 |
| 2.1 | Rasterkraftmikroskopie | 9 |
| 2.1.1 | Aufbau | 9 |
| 2.1.2 | Abbildungsarten | 10 |
| 2.2 | Abbilden von lebenden Zellen | 12 |
| 2.2.1 | Immobilisierung | 13 |
| 2.2.2 | Thermische Drift des Deflectionsignals | 13 |
| 3 | Material und Methoden | 15 |
| 3.1 | Geräte | 15 |
| 3.1.1 | MFP-3D-Bio | 15 |
| 3.1.2 | Bioheater | 16 |
| 3.1.3 | Dishheater | 18 |
| 3.2 | Zellkulturmethoden | 19 |
| 3.2.1 | Passagieren einer Zellkultur | 19 |
| 3.2.2 | Fixierung der Zellen | 19 |
| 3.2.3 | Beschichten der Glasplättchen mit Gelatine | 20 |
| 3.3 | Messung der Verbiegung des Cantilevers | 20 |
| 3.4 | Methodik einer Abbildung | 21 |
| 4 | Ergebnisse und Diskussion | 23 |
| 4.1 | Vermessung der Verbiegung eines Cantilevers | 23 |
| 4.1.1 | Bioheater | 23 |
| 4.1.2 | Dishheater | 27 |
| 4.2 | Abbildungen | 32 |
| 4.2.1 | Fixierte Zellen | 32 |
| 4.2.2 | Bioheater | 33 |
| 4.2.3 | Dishheater | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 5 Zusammenfassung und Ausblick | 37 |
| Literatur | 40 |
| A Programme | 41 |
| A.1 Programmcode zum Auslesen des Deflectionsignals | 41 |
| A.2 Skript zum Auslesen jedes 150. Messwertes | 41 |
| B Rohdaten | 42 |
| B.1 Messwerte mit Bioheater | 42 |
| B.2 Messwerte mit Dishheater | 44 |
| B.2.1 Am PC aufgenommene Messwerte | 44 |
| B.2.2 Manuell aufgenommene Messwerte | 54 |
| C Berechnung des Umrechnungsfaktors g | 57 |

1 Einleitung

Die Rasterkraftmikroskopie (AFM) ist in den letzten Jahren zu einem zuverlässigen Standardverfahren geworden, um Oberflächen zu untersuchen. Die Beschränkungen auf leitende Proben, denen sein Vorgänger, das Rastertunnelmikroskop (STM) unterliegt, sind längst kein Problem mehr. So werden heute mit Rasterkraftmikroskopen viele verschiedene Materialien, wie Kristalle und Metalloberflächen bis hin zu sensiblen Biomaterialien, wie Proteine und DNA, untersucht und abgebildet. Dabei wird mit einer Spitze die Oberfläche abgerastert und die Wechselwirkungen der Spitze mit der Oberfläche über die Verbiegung eines biegsamen Hebelarms, dem Cantilever, detektiert.

Biomaterialien haben oft Strukturgrößen, die unterhalb der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie liegen. So zum Beispiel DNA, die mit einer Breite von 2nm früher nur durch Röntgenbeugungsexperimente an ihrer kristallinen, nicht nativen Form oder durch Elektronenmikroskopie untersucht werden konnte. Durch die Rasterkraftmikroskopie können solche kleine Strukturen heute ohne großen Aufwand abgebildet werden. Ebenfalls im Mittelpunkt des Interesses stehen Untersuchungen an Membranen und ganze Zellen.

Da Zellkulturen im Allgemeinen physiologische Bedingungen benötigen, ist es wünschenswert, diese Anforderungen während der Messung zu gewährleisten. Die Messungen werden zum Beispiel in Flüssigkeit, am besten in einem Nährmedium oder einer Pufferlösung durchgeführt. Würden die Zellen oder andere Biomaterialien getrocknet, hätten sie in aller Regel nicht mehr ihre native Form. Proteine werden durch den Wegfall von stabilisierenden H_2O -Molekülen denaturiert und verlieren damit ihre eigentliche Funktion. Ganze Zellen sind in diesem Fall, als System mit Stoffwechsel, noch komplizierter. Durch teilweise Denaturierung von Membranproteinen und Beeinflussung von Membranvorgängen (Osmose) kommt es außerhalb eines flüssigen Mediums dazu, dass auch die Zellen ihre native Form verlieren. Ein Beispiel sind rote Blutkörperchen, die durch zu hohen oder zu niedrigen Turgor (Zellinnen-Druck) ihre Form verlieren.

Die Messungen in flüssigen Medien bringen allerdings weitere Probleme mit sich. Das größte ist sicherlich die thermische Drift. Cantilever aus mehreren Materialien müssen unter Flüssigkeit erst das thermische Gleichgewicht mit der Umgebung erreichen, bevor eine Messung begonnen werden kann. Während sich das Gleichgewicht einstellt, verbiegen sie sich analog einem Bimetall. Diese Verbiegung kommt erst zum Stillstand, wenn das Gleichgewicht erreicht ist. Eine konstante Verbiegung ist kein Problem, da sie bei der Kalibrierung des Rasterkraftmikroskops berücksichtigt werden kann. Ändert sie sich jedoch während einer Messung kann es zu einer Zunahme des Drucks auf die Zelle kommen, wodurch die Membran zerstört werden könnte.

Da sich auch das Medium im thermischen Gleichgewicht mit der Umgebungsluft befinden muß, kann es durch Erwärmen oder Abkühlen der Flüssigkeit, auf Grund von schwankender Raumtemperatur, zu langen Equilibrierungszeiten kommen. Ein weiterer wichtiger Punkt um die Zellen in der Messung bei physiologischen Bedingungen zu halten ist die Temperatur. Der von den meisten Zellkulturen gewünschte Wert liegt bei 37°C , was im Normalfall deutlich

über der Raumtemperatur liegt.

Die Temperierung der Flüssigkeit erfordert spezielle Geräte. Mit zwei Vorrichtungen dafür wurden in dieser Arbeit Abbildungen angefertigt. Laut Hersteller sollen diese Geräte, durch stetige Temperaturkontrolle, zusätzlich die thermische Drift verlangsamen oder ganz unterdrücken. Um dies genau zu überprüfen wird die Verbiegung des Cantilevers über einen bestimmten Zeitraum anhand der Veränderung des Deflectionsignals¹ bei verschiedenen Temperaturen gemessen. Mit den, durch die Heizsysteme verbesserten, Umweltbedingungen wurden zu guter Letzt noch Abbildungen erzeugt.

¹Gibt an, wie stark der Cantilever verbogen wird.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop beruht auf dem 1982 von G.Binning und H. Rohrer erfundenem Rastertunnelmikroskop [1]. Beide Methoden gehören zu den Rastersondenmikroskopieverfahren, die alle dem selben Prinzip folgen, sich jedoch durch die Art der zu detektierenden Größen unterscheiden. Im Nahfeld ($< 50nm$) oder im direkten Kontakt zur Probe wird eine Sonde entlang eines Rasters über die Oberfläche geführt und nimmt die Wechselwirkungen zwischen der Sondenspitze und der Probenoberfläche auf.

Die Art der Wechselwirkungen charakterisieren das Mikroskopieverfahren. Beim Rastertunnelmikroskop (STM) wird der Tunnelstrom zwischen der leitenden Spitze und der ebenfalls leitenden Oberfläche detektiert [2]. Bei einem anderen Vertreter, dem optischen Nahfeldmikroskop (SNOM) [3], werden durch eine sehr kleine Apertur (einige $10nm$) spektroskopische Messungen unterhalb der Beugungsgrenze der konventionellen Lichtmikroskopie durchgeführt. Das Rasterkraftmikroskop (AFM) [4] hingegen detektiert u.a. van-der-Waals-Wechselwirkungen zwischen Probe und Spitze und ist, anders als das STM, auch für nicht leitende Materialien geeignet.

2.1.1 Aufbau

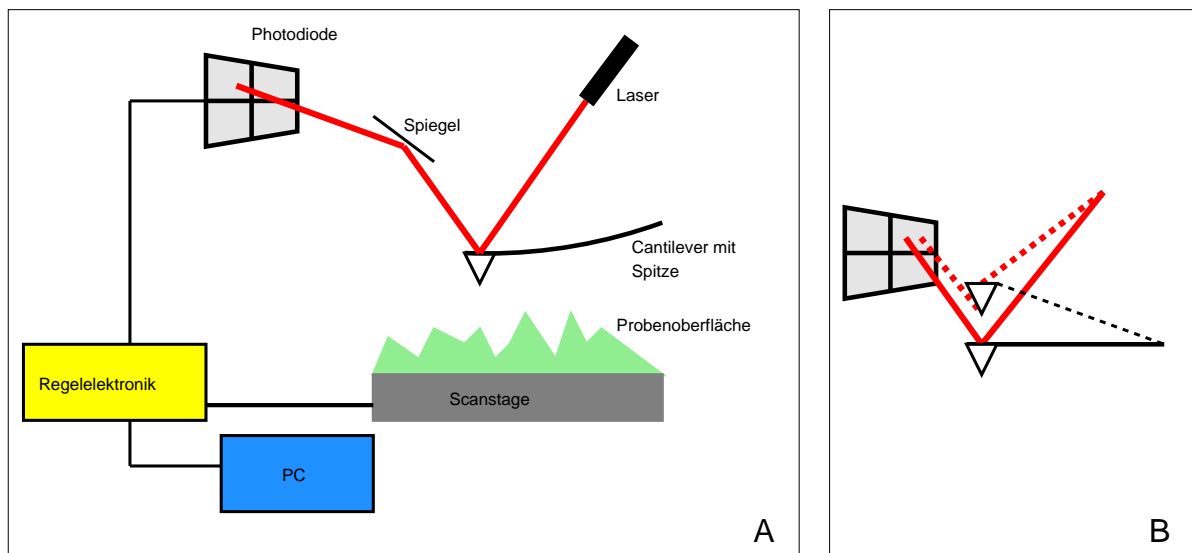


Abbildung 1: A: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. B: Schema zur Detektion der Auslenkung mittels eines Lasers

Der Sensor des Rasterkraftmikroskops ist eine Spitze, die am äußersten Ende des Cantilevers angebracht ist. Entweder wird sie über der Probe bewegt oder die Probe wird unter

einer feststehenden Spitze bewegt. Die Kräfte, die während eines Scans zwischen Probe und Spitze wirken, werden durch die Verbiegung des Cantilevers detektiert. Um diese Auslenkung genau zu bestimmen, wird ein Laserstrahl auf die Rückseite des Cantilevers projiziert, wo er reflektiert und durch einen Spiegel auf einen Detektor geleitet wird. Wird der Cantilever verbogen, so ändert die Reflexion des Lasers ihre Position auf dem Photodetektor (siehe Abbildung 1, rechts). Die so indirekt über die Verbiegung gemessenen Kräfte werden in eine Regelelektronik eingespeist, die die vertikalen Bewegungen der Spitze, je nach Messmodus, kontrolliert. Diese Methode, die Verbiegung zu detektieren, heißt „optical lever“ [5].

Die Bewegungen der Spitze, also des gesamten Cantilevers, oder der Probe werden in alle drei Raumrichtungen von Piezokeramiken übernommen. Diese sorgen für eine Nanometer genaue Positionierung von Probe und Spitze.

2.1.2 Abbildungsarten

Es wird zwischen zwei Betriebsarten unterschieden: Kontakt- und Nichtkontaktmodus [6]. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der beiden Modi. Beim Kontaktmodus (engl. „contact-mode“) sorgt die Überlappung der Orbitale der Spitzen- und der Oberflächenatome für starke, repulsive Kräfte (siehe Abbildung 3), während die Spitze in direktem Kontakt zur Oberfläche steht. Nun gibt es zwei Regelmöglichkeiten. Einerseits kann die Kraft, die auf den Cantilever wirkt, also dessen Verbiegung, konstant gehalten werden („constant-force mode“). Das bedeutet, dass der Abstand zwischen Probe und Spitze in vertikaler Richtung variiert wird und den Konturen der Oberfläche folgt. Der „constant-force mode“ stellt in diesem Fall besondere Anforderungen an die Regelelektronik. Damit die Oberfläche in guter Auflösung abgebildet wird muß die Höhe der Spitze sehr schnell (einige kHz) nachgeregelt werden.

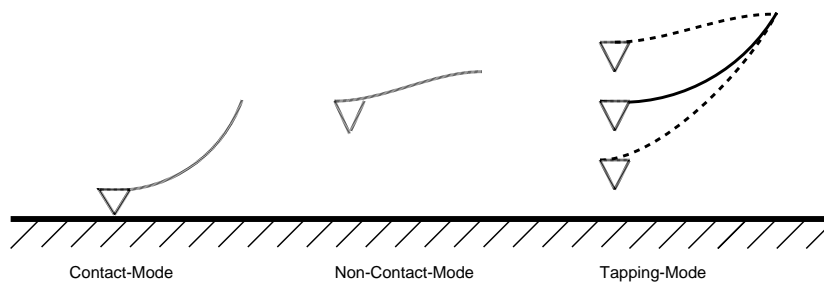


Abbildung 2: Schematischer Überblick über die Betriebsmodi des Rasterkraftmikroskops.

Die andere Möglichkeit besteht darin, den Abstand zwischen Probe und Spitze konstant zu halten („constant-height mode“). Folgt nun die Spitze der Probenoberfläche so verbiegt sich, entsprechend der wirkenden Kräfte, der Cantilever, was über die Bewegung des Laserstrahls auf der Quadranten-Photodiode detektiert wird. Diese Methode ist vor allem für relativ glatte Proben geeignet. Im „constant-height mode“ können größere Unebenheiten zu sehr starken Wechselwirkungen zwischen Spitze und Probe, also zu großen Kräften, führen. Diese verbiegen den Cantilever nicht nur stark, sondern können ihn auch beschädigen.

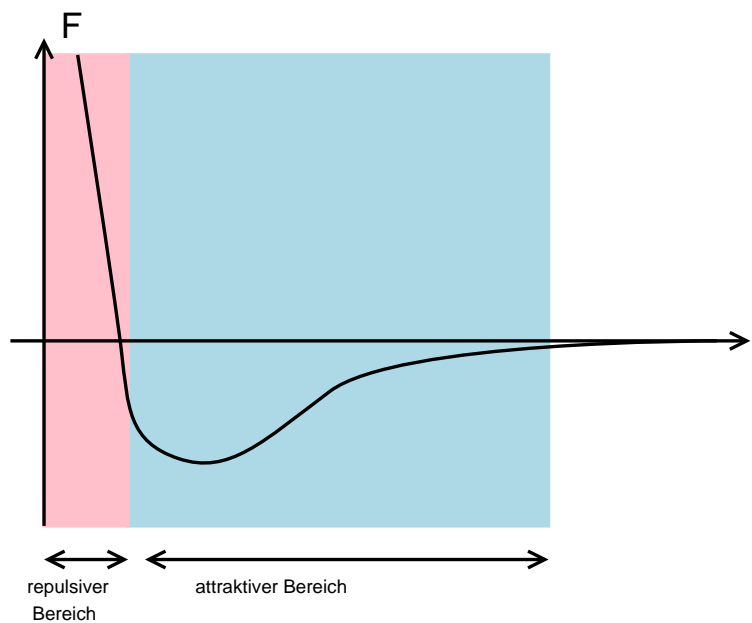


Abbildung 3: Lennard-Jones-Potential. Es macht eine Aussage über die Kraft F und deren Charakter, die die Spitze in geringem Abstand r zur Probenoberfläche erfährt. Der rosa gefärbte Bereich steht für vorwiegend repulsive und der blau gefärbte für hauptsächlich attraktive Wechselwirkungen.

Der Nichtkontaktmodus („non-contact mode“) arbeitet im attraktiven Bereich. Die attraktiven Kräfte haben zwar eine größere Reichweite als die repulsiven, sind jedoch vergleichsweise schwach. Im Großen und Ganzen gibt es zwei Varianten des „non-contact modes“: Den „tapping mode“ und den eigentlichen „non-contact-mode“.

Beim „tapping-mode“ wird die Spitze durch Piezos zum Oszillieren angeregt und hat dabei Amplituden von ungefähr 100nm [6]. Da die Spitze nur kurze Zeit (wenige μs [7], idealerweise am Scheitelpunkt der Oszillation) Kontakt zur Probe hat, wird deren Oberfläche weniger beansprucht. Darum ist diese Methode besonders für empfindliche (z.B. biologische) Proben geeignet. Der eigentliche „non-contact mode“, bei dem die Spitze die Oberfläche gar nicht berührt, wird nur bei sehr glatten Proben im Vakuum und bei sehr tiefen Temperaturen angewendet. Hierbei besteht das Problem, dass die Spitze durch Adhäsionseffekte an der Probenoberfläche eingefangen wird.

Bei allen Abbildungsmöglichkeiten gibt es Vor- und Nachteile. Der „constant-height mode“ ist nur für relativ glatte Proben geeignet. Ist die Stufe auf die zu untersuchende Probe zu hoch, dann fährt die Spitze nur gegen die Probe, beschädigt diese entweder oder wird selbst abgebrochen. Adhäsionseffekte, die die Spitze beim „tapping-mode“ ebenfalls an der Oberfläche fangen könnten werden bei Messungen in Flüssigkeit durch diese eliminiert. Durch die Oszillation des Cantilevers wird die umgebende Flüssigkeit allerdings ebenfalls in Schwingung versetzt, was zu Problemen führen kann.

In dieser Arbeit wurde der „contact-mode“ verwendet, da die Einstellung des Rasterkraftmikroskops so stark vereinfacht wurde.

Bildgebungsverfahren Um aus den vielen aufgezeichneten Signalen schließlich ein Bild zu erstellen gibt es, je nach Betriebsmodus, verschiedene Verfahren.

Das naheliegendste ist sicherlich die Topographie, das „height-image“. Ist das AFM im „contact-mode“ auf eine konstante Kraft geregelt, hebt oder senkt der z-Piezo den Cantilever, mit der daran befestigten Spitze. Die Bewegung des z-Piezoes läßt sich leicht anhand der angelegten Spannung messen. Dieses Verfahren ist auch im „non-contact-mode“ möglich. Die erhaltenen Daten werden gegen das Raster, in dem die Spitze über die Probe geführt wird, aufgetragen und ergeben so das Bild. Es ist, verglichen mit anderen Verfahren, recht kontrastarm, ermöglicht jedoch eine sehr gute dreidimensionale Darstellung der Oberflächenstrukturen. Eine weitere Möglichkeit basiert auf der Verbiegung des Cantilevers. Das „deflection-image“ wird aus den Daten über die Verbiegung des Cantilevers gewonnen. Es läßt sich ebenfalls in beiden Betriebsmodi gewinnen. Dieses Verfahren liefert sehr detaillierte und kontrastreiche Bilder, ist jedoch für 3D-Darstellungen ungeeignet.

Im „tapping-mode“ sind zwei weitere Verfahren von Bedeutung. Wie oben beschrieben, wird die Oszillation des Cantilevers gedämpft, wenn er sich der Spitze der Oberfläche nähert. Durch diese Dämpfung wird die Amplitude des oszillierenden Cantilevers verringert und seine Resonanzfrequenz verschoben. Diese Änderungen lassen sich wiederum für ein Bild nutzen. Das Aufsetzen der Spitze im „tapping-mode“ bedeutet einen Energieübertrag an die Oberfläche. Dadurch wird eine Phasenverschiebung zwischen der Schwingungsphase des Cantilevers und der Phase des antreibenden Piezos erzeugt. Diese Verschiebung wird ebenfalls zur Bildgebung genutzt. Mit beiden Verfahren können kontrastreiche Bilder erzeugt werden.

2.2 Abbilden von lebenden Zellen

Das Rasterkraftmikroskop wurde in der vorliegenden Arbeit zum Abbilden von Zellen genutzt. Die ersten biologischen Materialien wurden Ende der achtziger Jahre untersucht. Ein Großteil der Pionierarbeit in diesem Gebiet lag dabei bei G. Binnig und P. Hansma [8][9][10], die geeignete Geräte und Methoden entwickelt haben.

In dieser Arbeit wurden zwei Zelllinien verwendet: RLE und HEK-WT. Beide Kulturen wachsen adhärent und zeichnen sich auch durch ihre flachen Randbereiche aus. Dadurch werden größere Sprünge auf der Probenoberfläche innerhalb eines Scans vermieden. Der Cantilever kann also nicht durch „Rammen“ von Oberflächenstrukturen beschädigt werden, sondern sollte die Zelle hinauf gleiten.

Rasterkraftmikroskopie an Zellen kann nicht nur zur Bildgebung verwendet werden. Es werden unter anderem ebenfalls die Elastizität von Zellen und Zellmembranen ([11], [12]) und die Proteinfaltung [13] untersucht. Da das Ziel dieser Arbeit jedoch darin bestand, Geräte zur

Temperaturkontrolle zu testen und in Betrieb zunehmen, wurde sich auf die Bildgebung konzentriert.

2.2.1 Immobilisierung

Allgemein können mit einem Rasterkraftmikroskop nur Proben beobachtet werden, die fest mit einer Oberfläche verbunden sind. Darum eignen sich nur Zellen, die adhären an einer Oberfläche wachsen oder auf irgendeine Art und Weise auf dieser immobilisiert sind. Um dies zu erreichen, wurden in der Vergangenheit Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) in den Poren eines millipore-Filters gefangen und die herausschauende obere Hälfte mit dem AFM untersucht [14]. Eine andere Methode ist, die Zellen mit einer Mikropipette zu fangen [6]. Eine weitere Möglichkeit zur Immobilisierung besteht in der Beschichtung der Oberfläche, an die die Zellen adhären sollen. Dieses Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit benutzt.

Die Adhärenz der verwendeten Zelllinien zum funktionalisierten² Polyesterol der Kulturgefäße ist groß genug. Jedoch mussten Zellen für die Arbeiten mit dem Bioheater auf Glasplatten angesetzt werden. Die Adhärenz zu Glas ist ein wenig geringer [15]. Um die Zellen zu immobilisieren gibt es verschiedene Reagenzien. Ein gebräuchlicher Stoff ist Fibronectin. Er ist allerdings sehr teuer. Darum wurde als günstige Alternative dazu Gelatine gewählt, die vergleichbare Resultate liefern soll [15]. Ist es nicht von Bedeutung, ob die Zelle lebt, kann auf eine Fixierung mit Glutaraldehyd [16] zurückgegriffen werden.

Für lebende Zellen bedeutet eine Aufnahme mit einem AFM Stress. Ist der Druck des Cantilevers auf die Zelle zu groß, kann sogar die Zellmembran zerstört werden. Um solchen „Unannehmlichkeiten“ zu entkommen, beginnen die Zellen aus dem Scanbereich zu wandern. Sind die Umweltbedingungen sehr schlecht (zu kalt, zu geringes Nahrungsangebot) kugeln sich adhären Zellen zusammen und lösen sich von der Oberfläche ab. Diese Probleme lassen sich jedoch durch Kontrolle der Umweltbedingungen und der auf die Zelle ausgeübte Kraft kompensieren. Das Wandern von Zellen kann durch „Einsperren“ dieser in Gitter, oder, wie oben erwähnt, in Filter unterbunden werden.

2.2.2 Thermische Drift des Deflectionsignals

Die thermische Drift eines Cantilevers, bzw. die Drift des Deflectionsignals tritt eigentlich nur auf, wenn eine Messung in Flüssigkeit durchgeführt wird. In der Vergangenheit wurde dies aber auch schon für durch Laser erwärmte Cantilever im Vakuum [17] und für chemische Reaktionen [18] berichtet. Das Problem wurde durch Entfernen der, auf den Siliciumnitrid-Cantilever aufgedampften, Metallschichten mit Königswasser oder durch Verglühen dieser Schichten angegangen [19]. Dies führte allerdings dazu, dass der Laserstrahl vom Cantilever schlechter reflektiert wurde.

²Die Oberfläche wurde so behandelt, dass sie negativ geladen ist. An dieser Oberflächenladung sammeln sich Kationen (zB. Mg^{2+} oder Ca^{2+}) aus dem Puffer, die eine Verbindung zur Zelle herstellen.

Die verwendeten Cantilever haben, wie in Abbildung 4 dargestellt, eine von unten aufgebraute Beschichtung aus verschiedenen Metallen. Besteht nun zwischen der Flüssigkeit und dem Cantilever ein Temperaturgradient, so verbiegt sich der Cantilever kontinuierlich. Diese Verbiegung wird durch die veränderte Position des Lasers auf dem Photodetektor gemessen. Das Prinzip, nach dem sich ein Cantilever verbiegt, ist analog zu dem des Bimetalls. Zwei fest miteinander verbundene Materialien mit verschiedenen thermischen Ausdehnungskoeffizienten verbiegen sich bei einer Temperaturänderung durch den unterschiedlich großen Längenzuwachs. Der Sachverhalt wird durch die hier verwendeten Cantilever verkompliziert, da sie nicht aus zwei, sondern drei dünnen Schichten verschiedener Materialien bestehen. Die relativ einfache Modellvorstellung eines Bimetalls ist hier nicht mehr ausreichend.

Es kann bis zu mehrere Stunden dauern [19], bis sich Cantilever und Flüssigkeit im thermischen Gleichgewicht befinden. Das ist allerdings eine Zeitspanne, bei der nicht mehr sichergestellt werden kann, dass die Zellen diese auch überleben. Indem man physiologische Bedingungen für die Zellen herstellt, kann man deren Überleben während der Messung und der Equilibrierungszeit sichern. Das heißt, dass möglichst in ihrem Nährmedium gemessen wird und es auf eine konstante Temperatur, in den meisten Fällen 37°C , erwärmt wird. So ist nach der Equilibrierungsphase während der Messung, unter Voraussetzung, dass die Temperatur konstant bleibt, nicht mehr mit großer thermischen Drift zu rechnen.

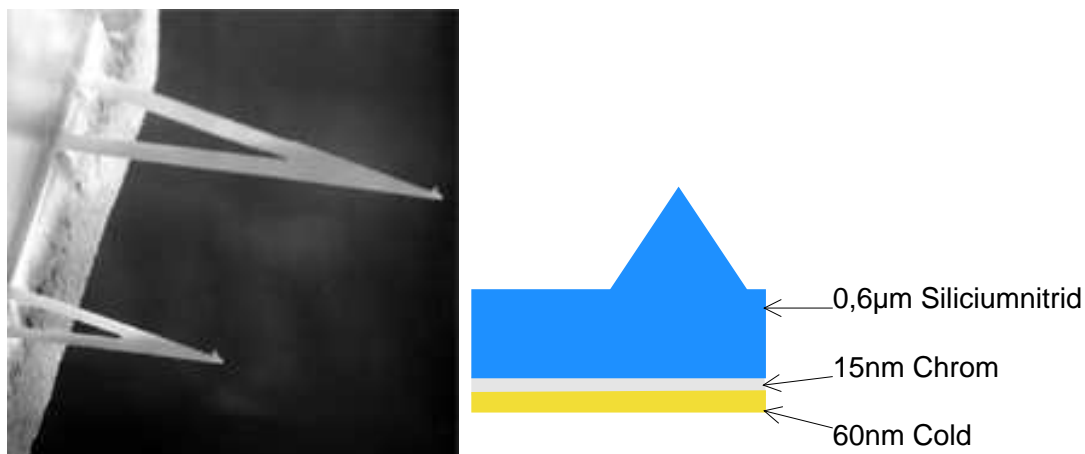


Abbildung 4: Links: Cantilever aus „NP Series“ von „Veeco“ mit nach oben deutender Spitze am Chip (Quelle: www.veecoprobes.com). Rechts: Aufbau der Metallbeschichtung an der Unterseite des Cantilevers. Die Seite, an der die Spitze angebracht ist, ist die Oberseite.

3 Material und Methoden

Rasterkraftmikroskope und Zubehörteile werden mittlerweile von verschiedenen Herstellern angeboten. Da alle Modelle typische Eigenschaften haben, werden die Besonderheiten der verwendeten Geräte im Folgenden kurz erläutert. Dabei wird auch auf die Methoden der Bildgewinnung und der Untersuchung der thermisch induzierten Verbiegung des Cantilevers eingegangen. Die Probenherstellung und -vorbereitung erforderte einige Arbeitsschritte, die ebenfalls vorgestellt werden. Darunter fallen auch die Bestandteile und Zusammensetzungen für alle verwendeten Lösungen.

3.1 Geräte

Für das MFP-3D standen zwei Geräte zur Verfügung, die eine Kontrolle der Temperatur innerhalb der Flüssigkeit ermöglichen. Der genaue Aufbau beider Systeme wird im Folgenden erläutert. Der komplette Versuchsaufbau wird über die „IGOR“ - Software kontrolliert.

3.1.1 MFP-3D-Bio

Das „MFP-3D“ von Asylum Research (Santa Barbara, Californien) ist ein kommerzielles Rasterkraftmikroskop, das auf einem umgekehrten optischen Mikroskop aufgebaut ist³. Es wurde für die Experimente mit zwei Zubehörteilen, dem Bioheater und dem Dishheater, erweitert. Einige Schritte zur Durchführung sind aber bei jedem Aufbau gleich. Diese werden in den nächsten zwei Unterpunkten behandelt.

Das „MFP-3D“ erleichtert durch das invertierte Mikroskop die Positionierung des Cantilevers über dem zu untersuchenden Bereich. Da von unten auf die Probe geblickt wird, muss diese möglichst durchsichtig sein, damit der Cantilever positioniert werden kann. Zur Positionierung des Lasers auf dem Cantilever wird die „Topview-Kamera“ benutzt. Sie wird in die selbe Halterung wie der Phasenkontrastkondensor montiert (siehe Abbildung 5).

Der Phasenkontrastkondensor macht sich die verschiedenen Brechungsindizes von Wasser (bzw. in diesem Fall Nährlösung) und den Zellen zu nutze. Licht, das durch die optisch dichteren Zellen fällt, erfährt eine Phasenverschiebung. Durch den Phasenkontrastkondensor wird das Hintergrundlicht soweit phasenverschoben, dass es mit dem Licht, welches die Zelle passiert hat, destruktiv interferiert. Dies führt dazu, dass die Zellen im Mikroskop dunkler als die Umgebung erscheinen.

Die Probe wird dabei in einer Petrischale (oder im Bioheater) unter den Messkopf gestellt und durch Magnete an der XY-Stage fixiert. Der Cantileverhalter (je nach Aufbau) wird in die Halterung auf der Unterseite des Messkopfes eingesetzt. Durch den Umlenkspiegel auf der Rückseite des Messkopfes wird die Probe beleuchtet und das Bild von der „Topview-Kamera“

³Der Zusatz „Bio“ weist auf das optische Mikroskop hin, da dieser Aufbau besonders für Biomaterialien gedacht ist

aufgenommen. Durch verschiedene Mikrostellschrauben am Versuchsaufbau werden Laser, Deflectionsignal, Kameraausschnitt, Mikroskopausschnitt (der durch eine Kamera ebenfalls in den PC übertragen wird) etc. eingestellt.

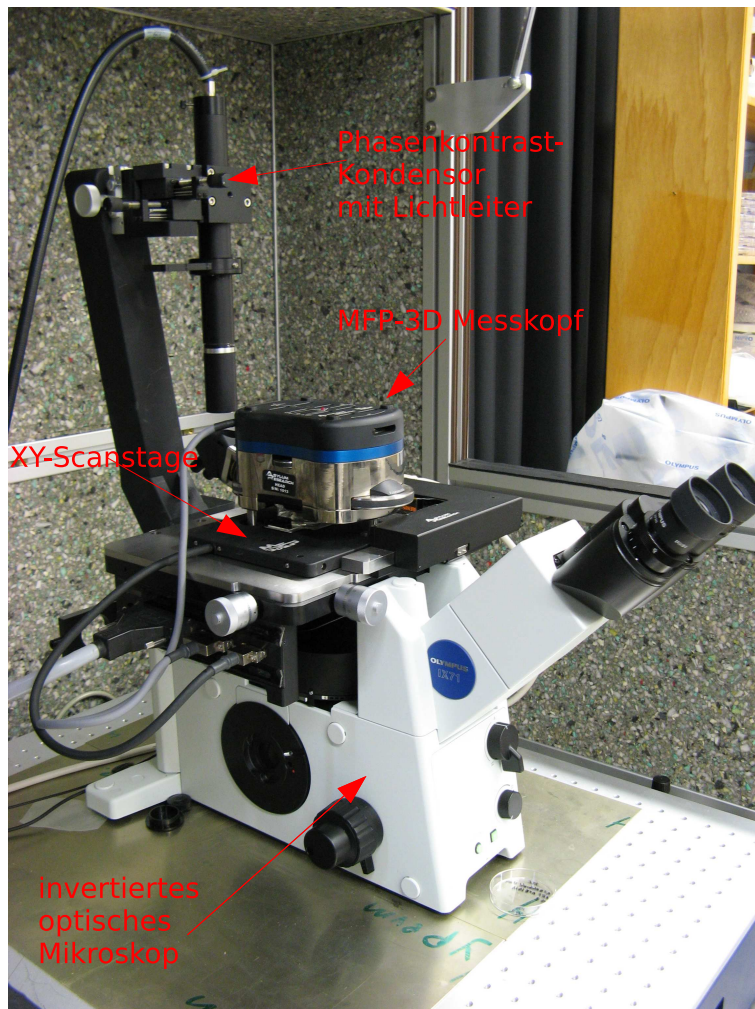


Abbildung 5: Aufbau des MFP-3D-Bio. Der gesamte Aufbau wird durch einen aktivgedämpften Tisch von den Gebäudeschwingungen usw. entkoppelt. Zusätzlich wird das Gerät im Gebrauch durch eine schallisolierte Box vor lauten Umgebungsgeräuschen geschützt.

3.1.2 Bioheater

Der Bioheater besteht aus einer geschlossenen Flüssigkeitszelle, in die ein Heizelement integriert ist. Über ein Thermoelement in der Zelle wird nah an der Probe die Temperatur der

Flüssigkeit gemessen. Die Zelle wird durch eine an den Cantileverhalter montierte Membran abgedichtet, die die empfindlichen Teile des Halters vor Feuchtigkeit schützt und das Verdunsten der Flüssigkeit verhindert. Die Membran ist durch den radialen, zieharmonikaähnlichen Aufbau dehnbar. Für den Bioheater wurde sie durch einen Metallring (siehe Abbildung 6) im Randbereich stabilisiert. Der Bioheater kann einfach in die Vertiefung in der XY-Stage eingelegt werden. Es wird mit Magneten, die auf der Unterseite des Heaters eingearbeitet sind, an der Stage fixiert.

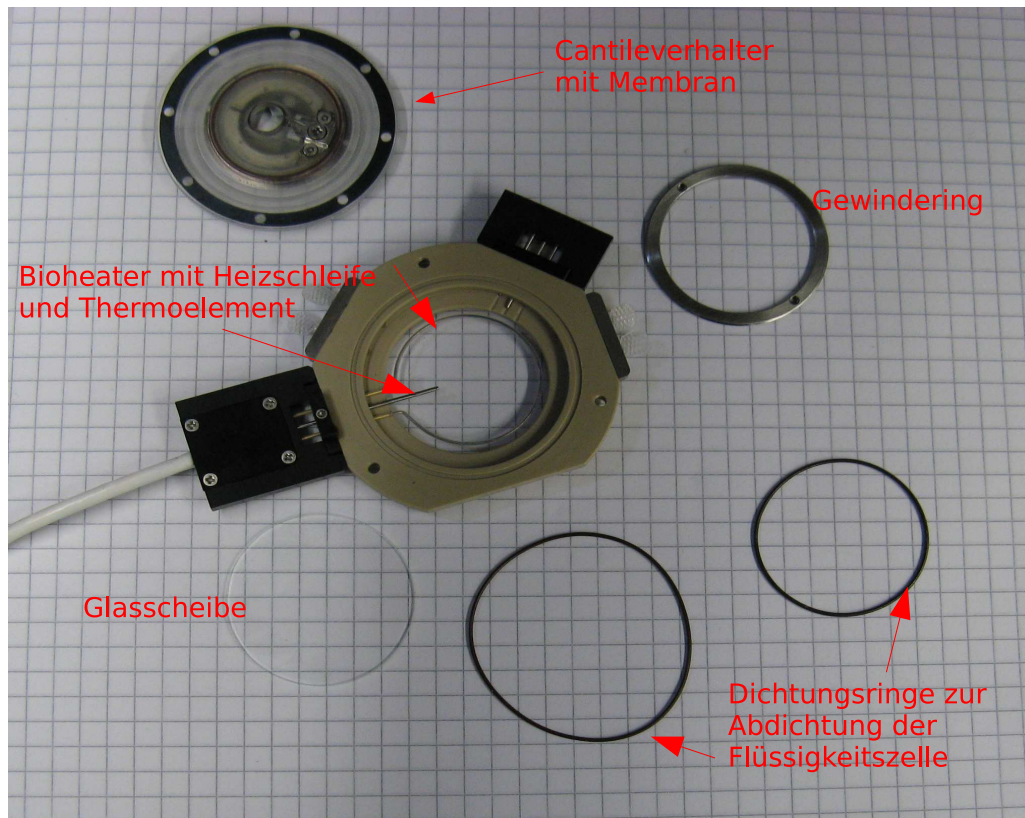


Abbildung 6: Bauteile des „Bioheaters“. Die Glasscheibe, auf welcher sich die Probe befindet, wird von unten mit dem Gewinding gegen das Heatelement geschraubt und mit dem kleineren Dichtungsring abgedichtet. Der große Dichtungsring dichtet zusammen mit der Membran den Heater gegen Verdunstung ab.

Die zu beobachtenden Proben werden auf einer Glasplatte gezüchtet bzw. dort aufgeklebt. Sie wird mit einem Gewinding von unten gegen den Bioheater geschraubt und durch einen Dichtungsring abgedichtet. Auf Anraten des Herstellers sollten alle verwendeten Dichtungsringe mit Vakuumfett eingerieben werden, um eventuelles Auslaufen zu verhindern. Ein weiterer Dichtungsring gehört in die Rille oben auf dem Bioheater. Er dichtet zusammen mit der Membran die Zelle ab.

3.1.3 Dishheater

Der Dishheater⁴ ist im Wesentlichen eine Heizplatte für Petrischalen. Er erfordert einen kleinen Umbau des MFP-3D, da die normale XY-Stage durch die Dishheaterstage ersetzt werden muss. Zwischen der Petrischale und dem Heizelement wird durch Immersol (Zeiss, Art. Nr.518F) eine Wärmebrücke geschaffen. Desweiteren ist darauf zu achten, dass die eingestellte Temperatur immer 2°C mehr, als die eigentlich geforderte beträgt.

Da konstruktionsbedingt nur der Randbereich erhitzt wird, entsteht in der Flüssigkeitszelle ein Temperaturgradient (siehe Abbildung 7), der zu Konvektionen in der Lösung führt (in der Abbildung durch die Pfeile angedeutet). Die über der Aussparung abkühlende Flüssigkeit ist ungefähr 1°C kälter als die restliche Flüssigkeit. Die Art und Weise, wie die Temperatur gemessen wird, verursacht eine weitere Temperaturdifferenz von 1°C . Durch ein Thermoelement, nahe an der Aussparung im Dishheateraufsatz, wird die Temperatur außen an der Petrischale gemessen.

Die Proben wurden für den Dishheater in den mitgelieferten Petrischalen (WillCo-dish Art. Nr.GWSt-5040) angesetzt. Sie werden mit einer Magnetklammer über dem Heizelement fixiert. Über Gewinde an der Magnetklammer kann die Höhe der Klammer an die Petrischale angepasst werden. Damit die Flüssigkeit in der Petrischale nicht verdunstet, wird, wie beim Bioheater, eine Membran an den Cantileverhalter montiert, der die Petrischale abdichtet. Dieser Membran fehlt der stabilisierende Metallring. Dafür entfällt durch eine Lippe am Rand der Membran der zusätzliche Dichtungsring. Insgesamt sollte wieder auf Vakuumpfett zurückgegriffen werden, um die Dichtheit der Flüssigkeitszelle zu gewährleisten.

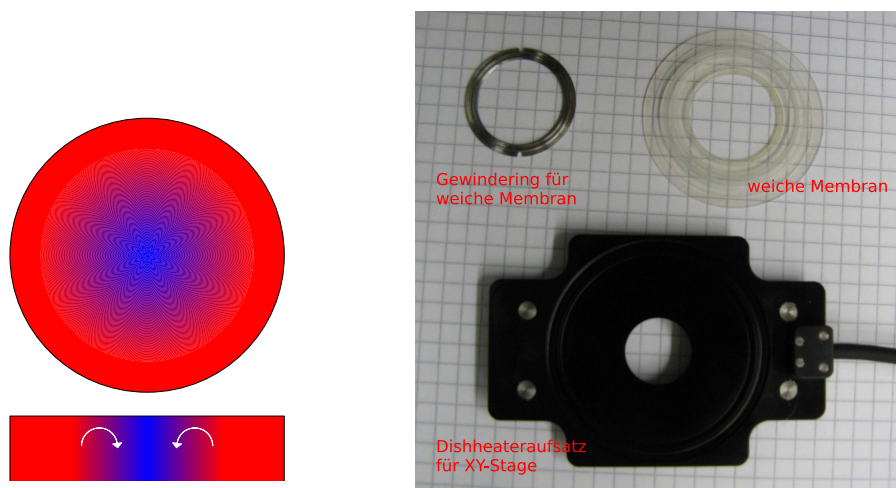


Abbildung 7: Links: Schematische Darstellung der Temperaturverteilung im Dishheater. Der Temperaturgradient von $\Delta T = 1^{\circ}\text{C}$ (von rot zu blau) in der Lösung und der Fehler durch die Temperaturmessung außerhalb der Petrischale erfordert bei erwünschten 37°C eine Einstellung auf ca. 39°C . Rechts: Bauteile des „Dishheaters“

⁴Noch nicht frei verkäuflicher Prototyp, der 2 Wochen als Leihgabe zur Verfügung stand.

3.2 Zellkulturmethoden

In diesem Abschnitt werden die Methoden diskutiert, mit denen die benutzten Zellkulturen angefertigt und auf die Untersuchung im Rasterkraftmikroskop vorbereitet wurden. Die Zellkulturen erfordern verschiedene Nährlösungen. Die RLE-6TN-Zellen⁵ werden in RPMI 1640 (Lonza Art. Nr.BE12-115F) und die HEK-WT-Zellen⁶ in DMEM (Lonza, Art. Nr.BE12-604F) mit jeweils 10% fetalem Kälberserum (PAA, Art. Nr.15-151, Lagerung der reinen Lösung bei -21°C), kurz FCS, kultiviert.

Optional wurde, vor allem im späteren Verlauf der Arbeit, noch $0,5\mu\text{L}$ einer Antibiotikastammlösung [15] zugesetzt. Sie bestand aus jeweils $5000\mu\text{g}$ Ampicillin und Streptomycin, dass in der Nährlösung eine Konzentration von jeweils $50\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$ hatte.

Alle Arbeiten wurden in steriler Umgebung (Sterilbank, Schulz Lufttechnik Art. Nr.M18) durchgeführt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Lösungen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.2.1 Passagieren einer Zellkultur

Die Zellkulturen müssen durchschnittlich alle 2-3 Tage ausgedünnt und in neuen Kulturgefäße angesiedelt werden. Dazu wird zuerst das alte Kulturmedium abpipettiert und die Kultur mit $2 - 3\text{mL}$ PBS (Fluka, Art. Nr.79382) gewaschen. Für den Puffer wurde eine Tablette in 200mL Wasser aufgelöst und anschließend eine Stunde bei 120°C und 100kPa autoklaviert.

Die adhärennten Zellen werden mit 1mL Trypsin (Lonza, Art. Nr.BE17-161E, Lagerung bei -21°C) nach 10min Einwirkzeit vom Boden des Gefäßes gelöst. Um die Zellen möglichst einzeln zu resuspendieren wird die Trypsin-Zell-Lösung mehrmals durchpipettiert. $100\mu\text{L}$ dieser Suspension werden in eine neue Zellkulturflasche (Greiner, Art. Nr.690175) oder eine Petrischale (Nunc Art. Nr.150 288) überführt und mit 5 bzw. 4mL Nährmedium aufgefüllt. Die Zellen werden bei 37°C unter 5% CO_2 -Atmosphäre 2 Tage lang im Inkubator (Revco Technologies, Art. Nr.QMI 300 SVBA) kultiviert bevor sie entweder weiter passagiert oder für eine Messung verwendet werden.

In manchen Fällen, zum Beispiel wenn die Zellen über das Wochenende kultiviert werden (3 statt 2 Tage) oder man am nächsten Abend schon eine fertige Kultur benötigt, wurde die Menge der Zellsuspension variiert.

3.2.2 Fixierung der Zellen

Die Zellen werden mit einer 1% Glutaraldehydlösung fixiert. Zuvor wird die Zellkultur mit PBS gewaschen. Das Glutaraldehyd (25%, Fluka, Art. Nr.49625) vernetzt die Aminogruppen

⁵Lungenkrebszellen der Ratte

⁶Wildtyp der HEK-293-Linie. HEK steht für „Human Embryonic Kidney“, also menschliche Nierenkrebs-Zellen. Diese werden seit Anfang der 1960er Jahre künstlich hergestellt.

der Membranproteine. Desweiteren dringt es in die Zelle ein und sorgt so dafür, dass auch das Cytoskelett versteift wird.

Es wird zur Fixierung 1mL der 1% Lösung in die Petrischale der Zellkultur gegeben und nach 1 Stunde Einwirkzeit wieder abpipettiert. Die Zellen werden danach mit PBS gewaschen und können sofort verwendet werden. Alternativ kann die Kultur auch unter Puffer, verschlossen mit Parafilm, im Kühlschrank aufbewahrt werden. Diese Methode tötet zwar die Zellen, sorgt aber für gute Adhärenz und Unabhängigkeit von physiologischen Bedingungen. Für Abbildungen von lebenden Zellen müssen andere Möglichkeiten gefunden werden ihre Haftung zu verbessern. Die in dieser Arbeit angewendete Methode wird im folgenden Kapitel erläutert.

3.2.3 Beschichten der Glasplättchen mit Gelatine

Für den Bioheater müssen die Zellen auf Glasplatten angesetzt werden. Da die Zellen auf Glas nicht so gut haften, wie auf funktionalisiertem Polyesterol, werden die Glasplatten mit Gelatine beschichtet. Da der Bioheater darauf ausgelegt ist, die Arbeit mit lebende Zellen zu erleichtern, werden keine mit Glutaraldehyd fixierten Kulturen verwendet, für die eine zusätzliche Immobilisierung mit Gelatine nicht nötig wäre.

Um Infektionen der Zellkultur zu vermeiden, müssen die Platten sauber und steril sein. Dazu werden sie zuerst im Ultraschallbad (Bandelin, Modell: Sonorex RK 510H) jeweils 2 Minuten in Aceton pA., Ethanol pA. und H_2O ⁷ gereinigt. Anschließend werden sie 60min bei 120°C und 100kPa autoklaviert.

Für die Beschichtung wird 1g Gelatine (aus Schweinehaut, Fluka, Art. Nr.48720) in 100mL H_2O gelöst [15]. Die Lösung wird 30min lang bei 120°C und 100kPa autoklaviert. Zum Beschichten wird die Glasscheibe in eine Petrischale gegeben und mit der Gelatinelösung bedeckt. Die Scheibe wird bei 37°C 30min lang inkubiert. Danach wird die Lösung wieder abpipettiert und die nun beschichtete Scheibe mit 2mL PBS gewaschen. Das beschichtete Glasplättchen muss nun sofort verwendet werden und wird für die Kultivierung in eine Petrischale gegeben.

3.3 Messung der Verbiegung des Cantilevers

Die Verbiegung des Cantilevers (engl. Deflection) wird von der IGOR-Software direkt angezeigt. Durch ein Stellrad am Messkopf des AFMs ist das Signal auf Null einstellbar. Vor der Messung wird der Versuchsaufbau normal auf eine Messung vorbereitet, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben wird.

Die verwendeten Cantilever stammen aus der „NP series“ von Veeco. Es sind vier verschiedene Cantilever mit dreieckiger Geometrie auf dem Chip. Sie unterscheiden sich in Härte und Größe. Die Cantilever sind vom Hersteller mit Buchstaben bezeichnet worden, die auch für

⁷gereinigt durch Millipore-Anlage. Nach dem Reinigen hat das Wasser einen Widerstand von $18,2\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$

diese Arbeit übernommen worden sind. In Tabelle 1 sind die Ausmaße und Federkonstante (engl. Springconstant) aufgeführt. Der ebenfalls aufgeführte Wert g ist der Umrechnungsfaktor zwischen der in Volt angegebenen Verbiegung und der Verbiegung in Nanometern. Die Bestimmung dieser Werte befindet sich im Anhang. Die Verbiegung in Nanometern ist dabei die Veränderung der Lage der Spitze verglichen mit ihrer Ruhelage.

| Bezeichnung | Länge [μm] | Breite [μm] | Springconstant [pN/nm] | g [$\frac{\text{nm}}{\text{V}}$] |
|-------------|-------------------------|--------------------------|--|--------------------------------------|
| A | 115 - 100 | 25 ± 5 | 580 | 36,766 |
| B | 196 - 180 | 41 ± 8 | 120 | 50,7 |
| C | 115 - 100 | 17 ± 4 | 320 | — |
| D | 196 - 180 | 23 ± 5 | 60 | 63,73 |

Tabelle 1: *Bezeichnungen und Größe der verwendeten Cantilever. Die Kraftkonstante gibt Auskunft über die Steifheit des Cantilevers. Je kleiner sie ist, desto weicher ist er.*

Für die Messung befindet sich die Spitze des Cantilevers so nah an der Oberfläche, dass sie ausgefahren die Oberfläche berühren würde. Sie wird während der Messung aber nicht ausgefahren. Bevor die eigentliche Messung startet, muss der Messkopf und damit der Cantilever, nach Ausrichten des Laserspots, wieder aus der Lösung entfernt werden, damit die Verbiegung komplett erfasst wird und er nicht schon vorher beginnt sich zu equilibrieren. Die Messung beginnt so nach ungefähr 10min Wartezeit direkt nach Eintauchen des Cantilevers. Das Deflectionsignal wird sofort auf 0 geregelt.

Nun wird, je nach Messung, alle 30 oder 60s das Deflectionsignal abgelesen und notiert. Die Messung dauert ca. 10min, es sei denn, die Anzeige erreicht schon vorher ihren Maximalwert. Nach Ende der Messreihe bei Raumtemperatur wird die Flüssigkeit auf die nächst höhere Temperatur erwärmt. Das Deflectionsignal wird sofort nach Erreichen der Temperatur wieder auf 0 geregelt und die Aufnahme der neuen Messdaten kann erfolgen.

Zu dieser „manuellen“ Aufnahme bietet sich noch die PC-basierte Alternative, das Signal direkt von der Software auslesen zu lassen. Das dazu geschriebene Programm liest 15mal pro Sekunde die Deflectionanzeige aus. Dies führt bei einer Messdauer von 15min zu 13500 Datensätzen. Das Programm dazu befindet sich im Anhang.

3.4 Methodik einer Abbildung

Einige Arbeitsschritte sind, auch bei Benutzung von Bio- oder Dishheater, immer identisch. Zu Beginn der Arbeit wurde hauptsächlich mit fixierten Zellen gearbeitet. Wie diese Proben zellkulturtechnisch vorbereitet wurden, ist in Abschnitt 3.2.2 beschrieben. Da diese Zellen nicht lebendig sind, bedürfen die Umweltbedingungen keiner Kontrolle.

Die Kultur wird vor der Messung noch einmal mit PBS gewaschen und das Zellkulturgefäß

mit 4mL PBS aufgefüllt. Diese Menge sorgt für einen Flüssigkeitsstand von 1-2mm im Gefäß. Der Cantileverhalter selbst ist bei einer Messung nur über den Meniskus mit der Flüssigkeit in Kontakt. Würde die Flüssigkeit höher stehen, würde sie in die unisolierten Teile des Cantileverhalters eindringen und das AFM beschädigen.

Nach Einsetzen des Cantilevers in die Flüssigkeit wird der Laser auf seine Rückseite fokussiert und das Deflectionsignal auf 0 geregelt. Danach wird die Resonanzfrequenz des Cantilevers bestimmt. Nun wird der Cantilever ausgefahren und der Messkopf abgesenkt, bis die Spitze mit der Oberfläche in Kontakt steht. Optional wird dann noch eine Kraft-Distanzkurve aufgenommen, die zur Kalibrierung dient. Nun wird eine geeignete Stelle auf der Oberfläche gewählt, ein Scanbereich eingestellt und die Messung gestartet. Wie in 2.1.2 schon erwähnt wurde als Betriebsmodus der „contact-mode“ gewählt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Vermessung der Verbiegung eines Cantilevers

In Abschnitt 3.3 wurde das Verfahren vorgestellt, mit dem die Messwerte gewonnen wurden. Die Resultate sind in den nächsten Abschnitten, getrennt nach Gerät und Aufnahmemethode, aufgelistet. Dabei entsprechen die Farben der Graphen den in nachfolgender Tabelle 2 notierten Temperaturen. Raumtemperatur bedeutet dabei und im weiteren Verlauf der Arbeit, dass keine Temperaturkontrolle stattgefunden hat.

| Farbe | Temperatur |
|---------|----------------|
| rot | Raumtemperatur |
| grün | $32^{\circ}C$ |
| blau | $37^{\circ}C$ |
| magenta | $39^{\circ}C$ |

Tabelle 2: Farblegende zur Temperatur.

Beim Bioheater betragen die Fehlerbalken, die aus Ablesefehlern resultieren, in den Diagrammen bei der Zeitmessung $\Delta t = 1s$ und beim Deflectionsignal $\Delta \text{Deflection} = 0,05V \cdot g$. Die genauen Werte für jede Messreihe sind in den Bildunterschriften genannt. Die Messwerte aus den Messungen mit dem Dishheater wurden mit dem PC aufgenommen und sind deshalb als frei von Ablesefehlern angesehen worden. Ursprünglich wurde dabei 15mal pro Sekunde das Deflectionsignal ausgelesen, was bei einer Messdauer von 15min zu ca. 13500 Datensätzen führte. Über ein Skript (s. Anhang) wurde davon jeder 150. Messwert ausgelesen und in den Diagrammen dargestellt. Das reduzierte die Daten auf 80-90 Sätze. Dadurch waren die Daten graphisch einfacher darzustellen. Um einen möglichen Einfluss der Messmethode zu bemerken, wurden beim Dishheater zusätzliche Messungen auf die „manuelle“ Art mit Stoppuhr und eigenständigem Ablesen durchgeführt.

4.1.1 Bioheater

Wie in Abbildung 8 (Cantilever A) sehr gut zu sehen ist, verbiegt sich der Cantilever in 10min um ca. $175nm$. In diesen 10min der Messung hat sich die Temperatur in der Lösung um $0,3^{\circ}C$ reduziert. Durch den Einsatz der Temperaturkontrolle konnte, sowohl bei $T = 32^{\circ}C$ als auch bei $T = 37^{\circ}C$ die Verbiegung des Cantilevers innerhalb von 10min auf ca. $25nm$ reduziert werden. Dabei ist die Änderung des Signals bereits nach 6-7 Minuten bei $T = 32^{\circ}C$ auf eine Steigerungsrate von $0,74 \frac{nm}{min}$ gesunken und bei $T = 37^{\circ}C$ ist das Signal schon bis auf Schwankungen von ca. $1,47nm$ konstant geblieben. Diese Steigerungsraten bzw. Schwankungen sind allerdings kleiner als der angenommene Ablesefehler.

Der Cantilever ist mit einer Federkonstante von $k = 580 \frac{pN}{nm}$ relativ steif und wird auf Grund seiner Geometrie in dieser Arbeit zu den „kurzen“ Cantilevern gezählt. Je steifer und kürzer ein Cantilever ist, desto unanfälliger ist er für äußere Einflüsse, wie zum Beispiel die thermisch bedingte Verbiegung, die zur Änderung des Deflectionsignals führt. Mit diesem Cantilever ist es also gelungen, die Abweichungen des Deflectionsignals innerhalb von 10min so zu stabilisieren, dass Messungen möglich sind.

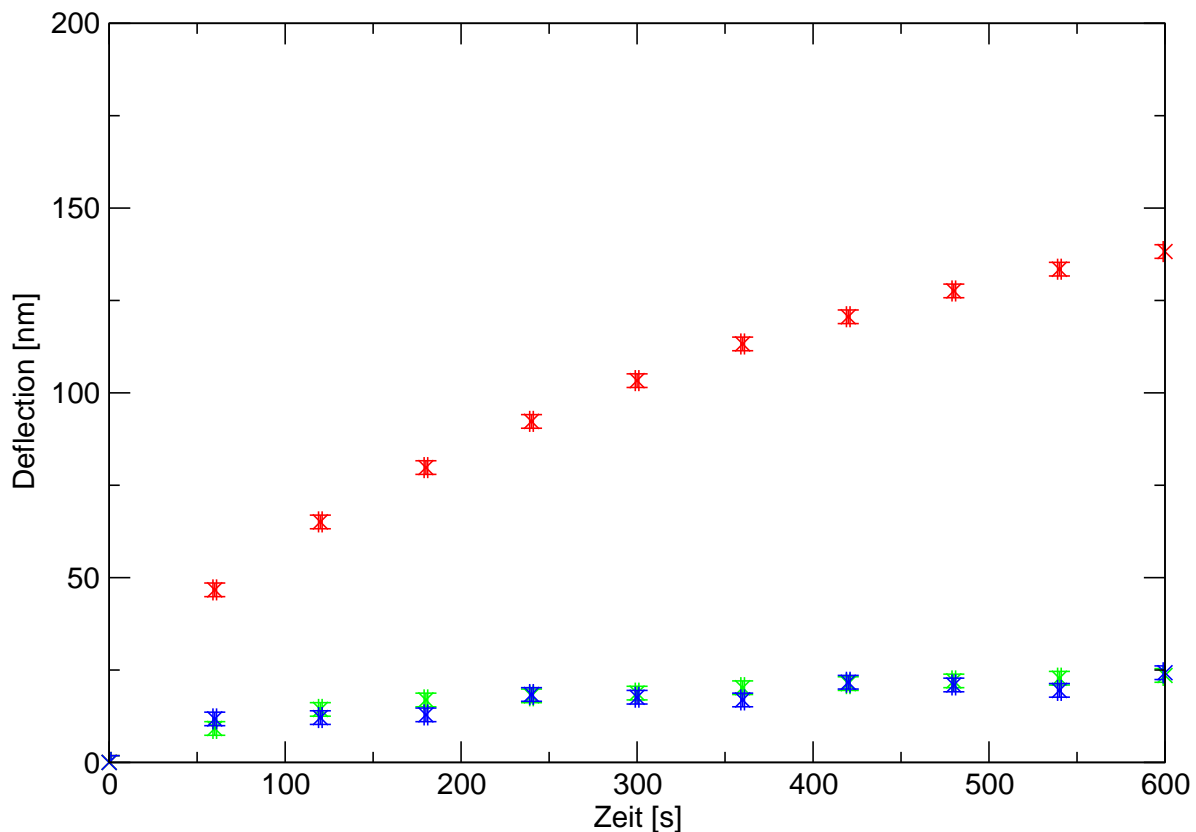


Abbildung 8: Zeitliche Entwicklung des Deflectionsignals bei verschiedenen konstanten Temperaturen am Cantilever A. Es wurde für diesen Cantilever ein Fehler von $\Delta\text{Deflection} = 1,84nm$ angenommen. Die Temperatur in der Lösung (rote Kurve) betrug zu Beginn der Messung $23,6^\circ C$ und zum Ende $23,9^\circ C$.

Cantilever B gehört zu den großen Cantilevern und ist mit einer Federkonstante von $k = 120 \frac{pN}{nm}$ fast fünfmal weicher als Cantilever A. Sowohl Federkonstante als auch Geometrie machen ihn anfälliger für die thermische Drift. Das ist auch in Abbildung 9 zusehen. Das Deflectionsignal verändert sich innerhalb der Messdauer zwar nur bis auf $200nm$, jedoch fehlt die Verlangsamung der Verbiegung am Ende der Messung. Wurde die Temperatur kontrolliert, sind bei $T = 32^\circ C$ nach 10min noch Abweichungen von ca. $125nm$ und bei $T = 37^\circ C$ von ca. $89nm$ zu messen. Die Kurvenverläufe lassen vermuten, dass die Signale frühestens nach einer halben Stunde stabil geblieben wären.

Cantilever C ist ein kleiner Cantilever mit einer Federkonstante von $k = 320 \frac{pN}{nm}$. Da für ihn

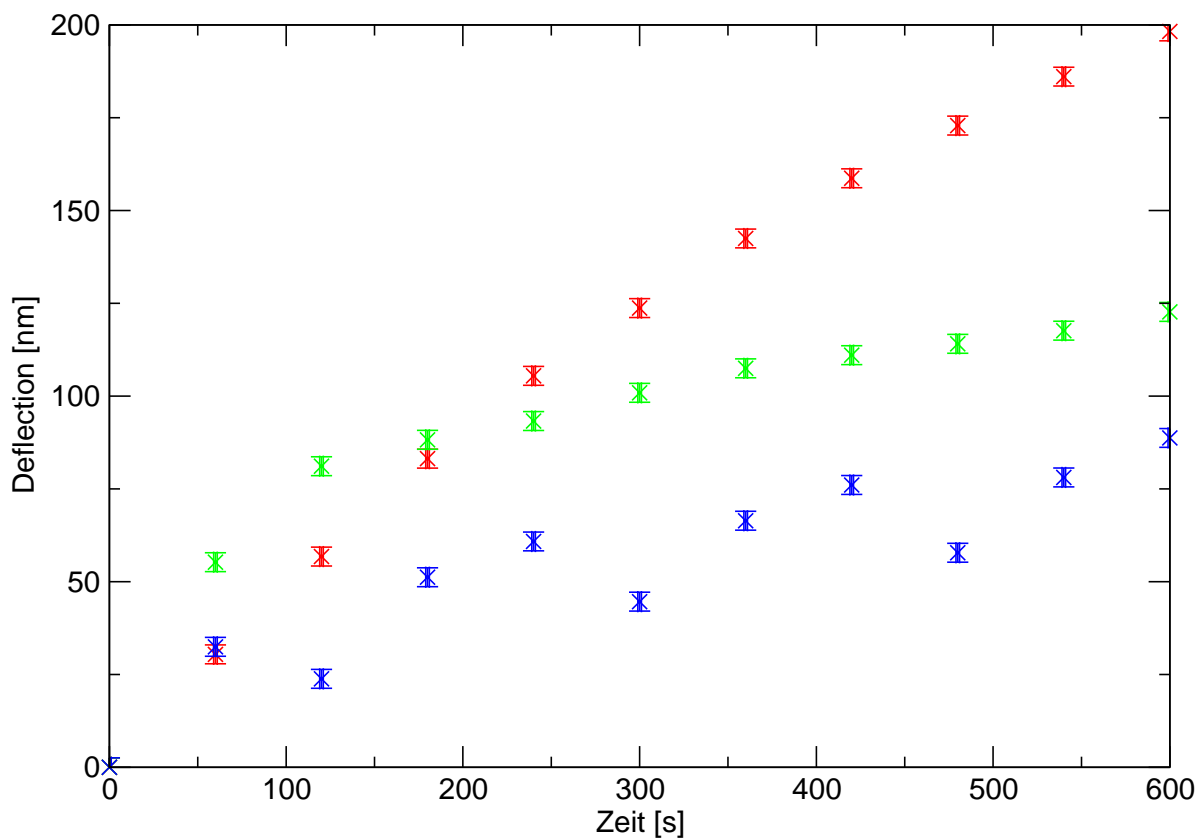


Abbildung 9: Zeitliche Entwicklung des Deflectionsignals bei verschiedenen konstanten Temperaturen am Cantilever B. Der Fehler des Deflectionwertes liegt hier bei $\Delta\text{Deflection} = 2,54\text{nm}$. Die Temperatur in der Lösung (rote Kurve) betrug zu Beginn der Messung $22,4^\circ\text{C}$ und zum Ende $23,3^\circ\text{C}$.

leider kein Umrechnungsfaktor zur Verfügung steht, wird auf die qualitative Beschreibung in Volt zurückgegriffen. Im Verlauf der Messung hat sich das Deflectionsignal auf ca. $-2,25\text{V}$ verändert. Durch Temperaturkontrolle wurde das Signal bereits nach 6min auf einen Wert von ungefähr $-0,7\text{V}$ im Fall von $T = 32^\circ\text{C}$ und auf ungefähr $-0,58\text{V}$ im Fall von $T = 32^\circ\text{C}$ stabilisiert.

Cantilever C sollte auf Grund der kleineren Federkonstante eigentlich schlechter zu stabilisieren sein, als Cantilever A. Auffällig ist ebenfalls, dass sich das Deflectionsignal des eigentlich steiferen Cantilevers in der Messung bei Raumtemperatur um einen Wert von fast 4V (175nm) verändert hat, wobei der „weichere“, also für den thermischen Drift anfälliger, nur eine Änderung um ca. 2V erfahren hat. Wurde die Temperaturkontrolle genutzt, haben sich aber beide bei ungefähr identischen Werten im Bereich zwischen $-0,5\text{V}$ und $-0,7\text{V}$ (bei Cantilever A ungefähr bei 25nm) eingependelt. Dabei ging die Equilibrierung von Cantilever C schneller als die von Cantilever A.

Bei unkontrollierten Temperaturbedingungen am Cantilever D driftete das Deflectionsignal

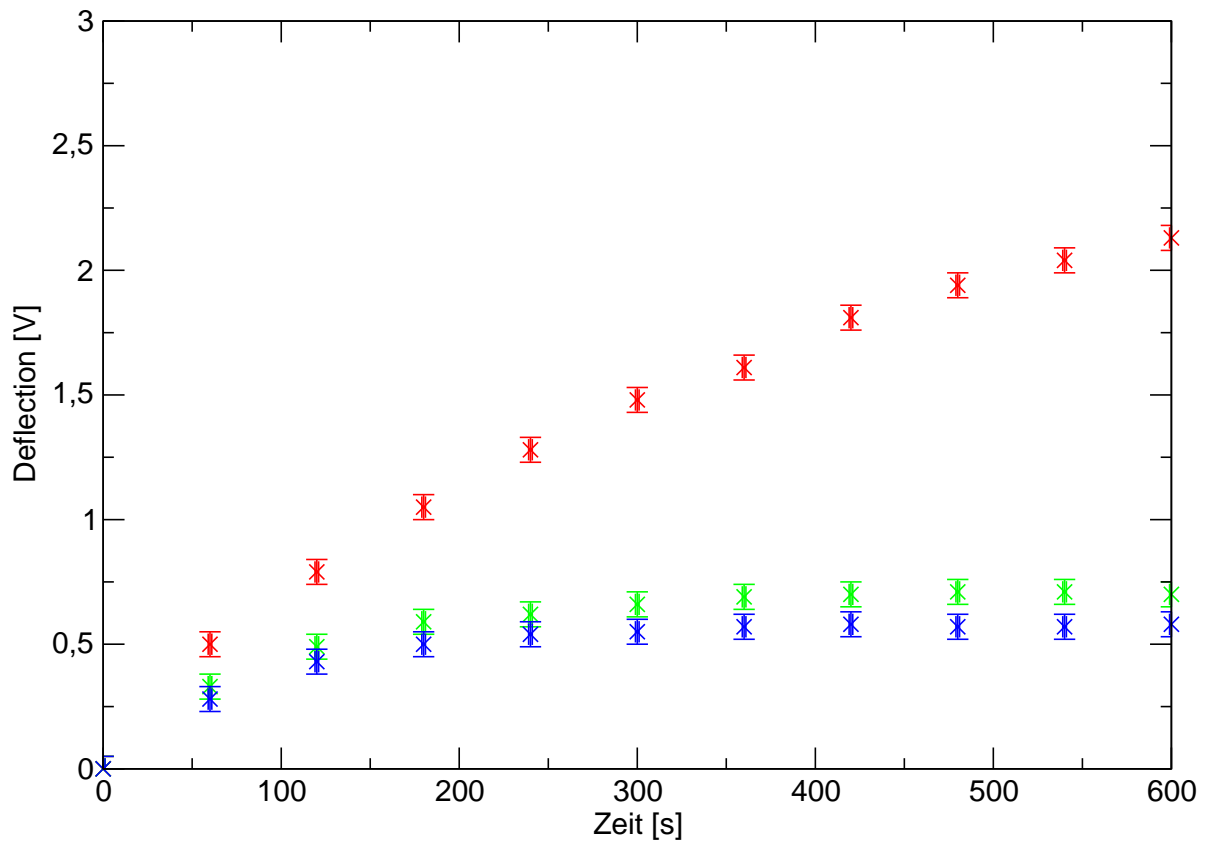


Abbildung 10: Zeitliche Entwicklung des Deflectionsignals bei verschiedenen konstanten Temperaturen am Cantilever C. Da kein Umrechnungsfaktor vorhanden ist, beträgt der Fehler $\Delta\text{Deflection} = 0,05\text{V}$. Die Temperatur der Lösung (rote Kurve) betrug zu Beginn der Messung $20,2^\circ\text{C}$ und zum Ende $20,8^\circ\text{C}$.

um ungefähr 380nm . Das ist der höchste vorkommende Wert in dieser Messreihe. Der Cantilever ist groß und weich, was zu der starken Verbiegung passt. Unter Temperaturkontrolle haben sich die Werte am Ende der Messzeit bei $T = 32^\circ\text{C}$ auf ca. 110nm und bei $T = 37^\circ\text{C}$ auf 90nm eingependelt. Da sie allerdings eine, wenn auch nur geringe, konstante Steigerungsrate besitzen, kann man noch nicht von vollständiger Equilibrierung sprechen.

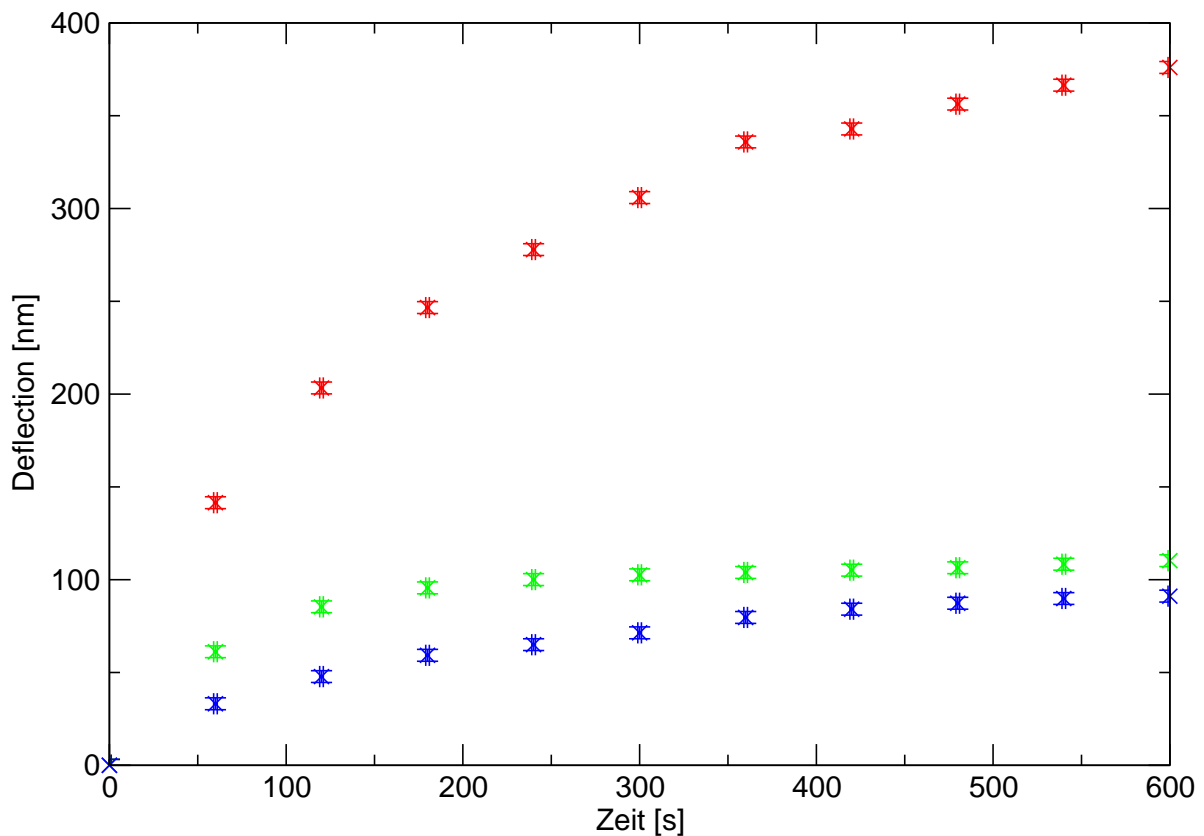


Abbildung 11: Zeitliche Entwicklung des Deflectionsignals bei verschiedenen konstanten Temperaturen am Cantilever D. Der Fehler des Deflectionwertes beträgt $\Delta\text{Deflection} = 3,19\text{nm}$. Die Temperatur der Lösung (rote Kurve) betrug zu Beginn der Messung 22°C und zum Ende $22,3^\circ\text{C}$.

4.1.2 Dishheater

Aufnahme der Messwerte durch den PC Die Messung mit dem Dishheater zeigt deutliche Unterschiede zu denen aus dem Bioheater. Auffällig ist bei allen Cantilevern, dass die Kurve für $T = 32^\circ\text{C}$ immer die größten Veränderungen erfährt. Nach den Erfahrungen mit dem Bioheater sollte das die Kurve bei Raumtemperatur sein. Die schnellste Stabilisierung bei relativ niedrigen Werten wurde bei der Messung des Deflectionsignals bei $T = 39^\circ\text{C}$ erwartet.

Bei Cantilever A und B stabilisierte sich die Kurve, die bei $T = 39^\circ\text{C}$ aufgenommen wurde, am schnellsten. Auffällig war bei beiden Cantilevern, dass die größten Abweichungen bei Messungen bei $T = 32^\circ\text{C}$ auftraten und nicht wie erwartet bei Raumtemperatur. Diese Kurve stabilisierte sich bei den zweitniedrigsten Werten.

Vom Verlauf der Kurven entspricht die Messung an Cantilever C am ehesten den Ergebnissen vom Bioheater. Die Raumtemperatur-Kurve weicht am weitesten ab. Die anderen Kurven

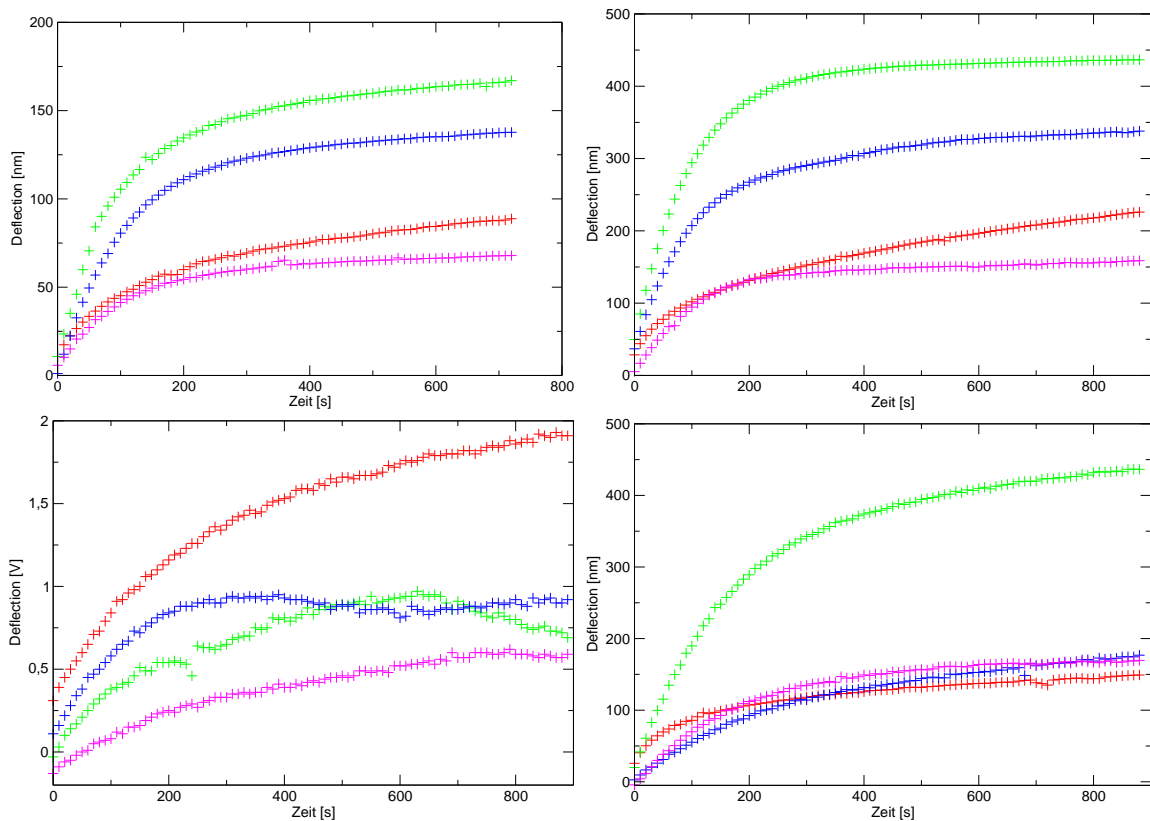


Abbildung 12: Zeitliche Entwicklung des Deflectionsignals bei verschiedenen konstanten Temperaturen. Oben links: Cantilever A, die Temperatur der Lösung (rote Kurve) betrug zu Beginn der Messung 21°C und zum Ende $21,5^{\circ}\text{C}$. Oben rechts: Cantilever B, Temperatur der Lösung zu Beginn $17,2^{\circ}\text{C}$ und zum Ende $17,9^{\circ}\text{C}$. Unten links: Cantilever C, Starttemperatur $22,8^{\circ}\text{C}$; Endtemperatur $23,6^{\circ}\text{C}$. Unten rechts: Cantilever D, Starttemperatur $20,8^{\circ}\text{C}$; Endtemperatur $21,2^{\circ}\text{C}$.

stabilisierten sich bei niedrigeren Deflectionwerten je höher die eingestellte Temperatur war. Bei Cantilever D lagen alle Kurven am Ende der Messung zwischen 150 und 200nm . Einzig die Kurve zu $T = 32^{\circ}\text{C}$ war wieder eine Ausnahme und wich weiter ab.

Eine mögliche Erklärung könnte der Temperaturgradient in der Flüssigkeit sein. Die Wertaufnahme durch den PC ist im nachhinein ebenfalls als Fehlerquelle zu sehen. Das Programm, das die Werte aufgenommen hat, hat beim Start den Heater ausgeschaltet. Dies wurde nicht immer sofort bemerkt, darum könnten die Schwankungen auch von Abkühlprozessen in der Flüssigkeit herrühren.

Aufnahme per Hand Um die Ungenauigkeiten durch die Programmfehler auszuschließen sind ausgewählte Messreihen nochmal per Hand aufgenommen worden. Dabei wurde auf die Messung mit Cantilever B und auf die Messung bei $T = 37^{\circ}\text{C}$ verzichtet.

Jedoch ist auch bei dieser „manuellen“ Aufnahme der Kurvenverlauf von den Messungen am Bioheater nicht zu reproduzieren. Auffällig ist, dass die Kurve der Messung bei $T = 39^\circ\text{C}$ (magenta) die größte Abweichung zeigt (Cantilever A: 200nm , Cantilever C $3V$, Cantilever D 390nm). Bei Cantilever C erfährt die bei Raumtemperatur aufgenommene Kurve, bei der durch die Erwärmung von $\Delta T = 0,8^\circ\text{C}$ während der Messung die größte Abweichung erwartet wurde, jedoch die kleinste (ca. $2V$). Nach der Hälfte der Messzeit verläuft die Kurve dabei parallel zur x-Achse, was auf eine Equilibrierung hindeutet. Die Kurven bei $T = 32^\circ\text{C}$ und $T = 39^\circ\text{C}$ zeigen vergleichsweise „zu“ hohe Werte an. Sie begannen in den letzten Minuten bei Werten von ca. $-3V$ sich langsam zu stabilisieren.

Diese von den Erfahrungen mit dem Bioheater nicht erwarteten Ergebnisse können, nachdem die Fehlerquelle durch das Programm ausgeschlossen wurde, von dem Temperaturgradienten herrühren. Eine andere Erklärung ist, die im Vergleich zum Bioheater schlecht isolierte Petrischale. Die aufgewärmte Lösung befindet sich beim Bioheater in einem Ring aus Polymer, der einen Durchmesser von ungefähr 5mm besitzt. Die aus dem Probengläschen bestehende Unterseite und die Membran, die die Flüssigkeitszelle abdichtet, sind zum Dishheater hin gleich bzw. ähnlich ⁸.

Da durch die beim Dishheater vergleichsweise dünnen und demnach weniger isolierten Rand der Petrischale ein größerer Wärmeverlust zu erwarten ist, als beim Bioheater, könnte sich die Temperatur in der Lösung eventuell unbemerkt geändert haben. Da die Temperatur nicht direkt in der Lösung, sondern außerhalb gemessen wurde, können Temperaturänderungen in der Flüssigkeit unbemerkt bleiben. Die Cantilever selber weisen Variationen durch interne Materialeigenschaften (z.B. Stess) zwischen einzelnen Wafern oder sogar unter den Chips auf einem Wafer auf. Dies ist ebenfalls eine Fehlerquelle, die mitunter für die verschiedenen starke thermische Drift verantwortlich sein kann.

⁸Die Isolierfähigkeit des Probengläschens wurde ähnlich gut wie die der Petrischale eingeschätzt.

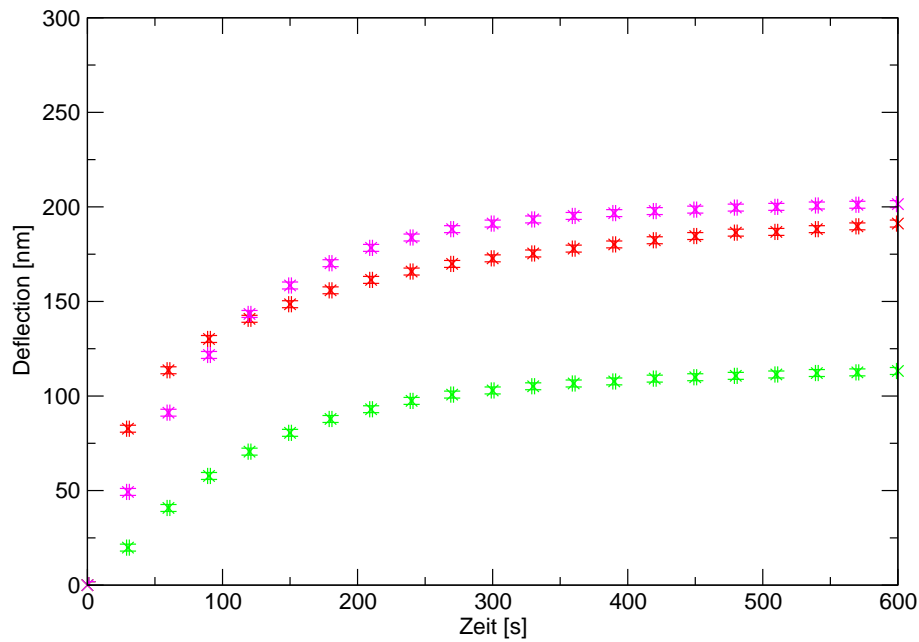


Abbildung 13: Messwerte des Deflectionssignals von Cantilever A, analog aufgenommen. Die Temperaturkontrolle wurde vom Dishheater übernommen. Bei Raumtemperatur lag die Starttemperatur bei $T = 22,7^{\circ}\text{C}$ und die Endtemperatur bei $T = 22,9^{\circ}\text{C}$

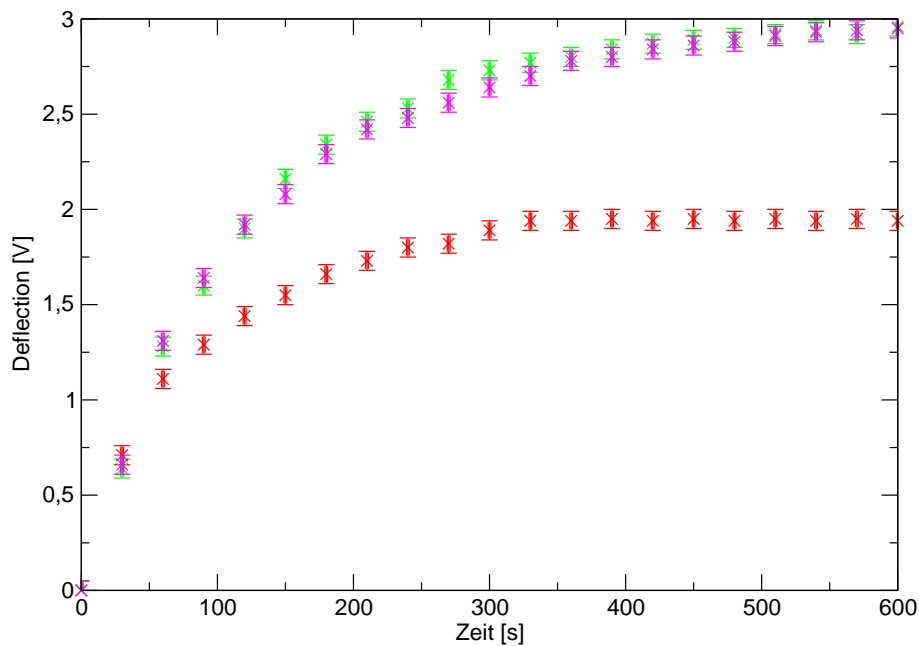


Abbildung 14: Messwerte des Deflectionssignals von Cantilever C, analog aufgenommen. Die Temperaturkontrolle wurde vom Dishheater übernommen. Bei Raumtemperatur lag die Starttemperatur bei $T = 23,2^{\circ}\text{C}$ und die Endtemperatur bei $23,5^{\circ}\text{C}$

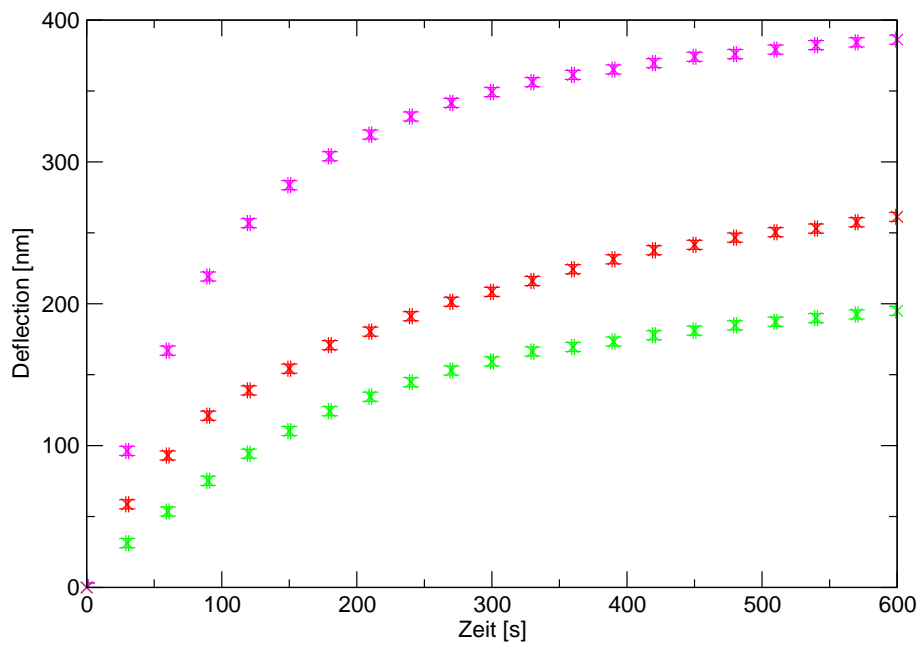


Abbildung 15: Messwerte des Deflectionsignals von Cantilever D, analog aufgenommen. Die Temperaturkontrolle wurde vom Dishheater übernommen. Bei Raumtemperatur lag die Starttemperatur bei $T = 22,7^{\circ}\text{C}$ und die Endtemperatur bei $T = 22,9^{\circ}\text{C}$

4.2 Abbildungen

Die hier gezeigten Aufnahmen stammen alle von RLE-6TN-Zellen und wurden im „contact-mode“ erstellt. Der Versuch, HEK-WT-Zellen abzubilden, scheiterte an der geringen Adhärenz der Zellen an der Kulturoberfläche. Selbst die Fixierung mit Gelatine oder das Abtöten und Fixieren mit Glutaraldehyd sorgte nicht für genügend Haftung. Meistens sind die Zellen, auch nach Behandlung mit Glutaraldehyd beim Waschen der Zellkulturen schon von der Oberfläche gespült worden. Die RLE-6TN-Linie zeigte auch ohne zusätzliche Immobilisierung durch Gelatine eine gute Haftung an der Oberfläche. Die Abbildungen der Zellen, sowohl im Bioheater, als auch im Dishheater, sind ohne die Beschichtung durch Gelatine entstanden.

4.2.1 Fixierte Zellen

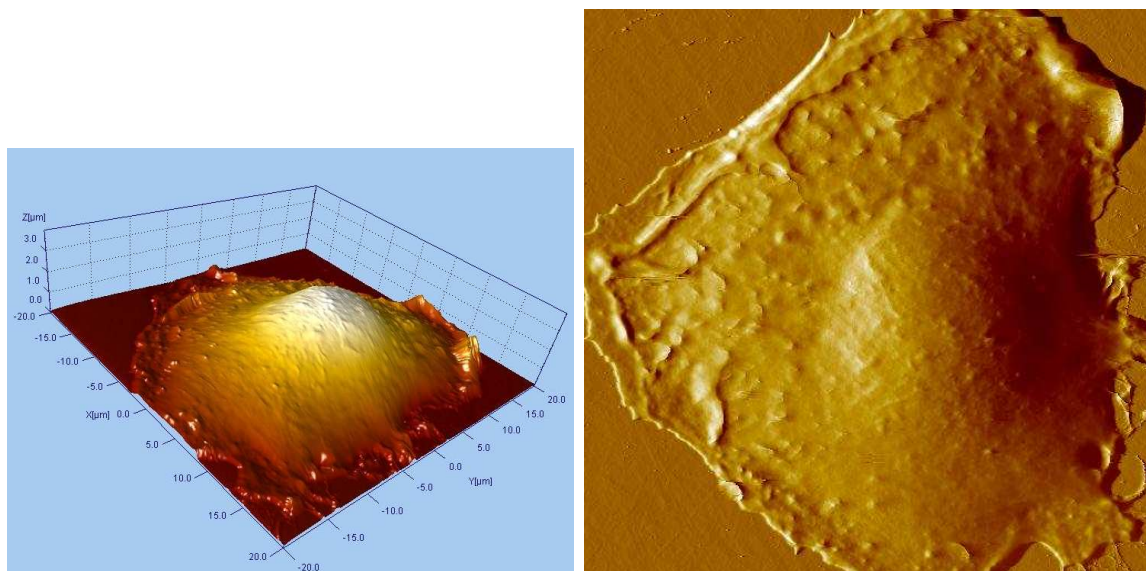


Abbildung 16: *Links: 3D-Darstellung einer fixierten RLE. Rechts: Entsprechendes Deflectionbild. Die Aufnahme wurde bei Raumtemperatur unter PBS gemacht. Die Kantenlänge des Deflectionbildes beträgt 40µm.*

Zu Beginn der Arbeiten wurde hauptsächlich mit fixierten Kulturen gearbeitet. Da diese Zellen schon abgetötet worden sind, erfordern sie weniger Aufwand während der Messung, der die Einarbeitung unnötig verkomplizieren würde. Die Petrischale wurde mit Zweikomponentenkleber (Conrad, Art. Nr.81 33 37) auf einen Objekträger geklebt. Die Petrischale wurde mit Magneten, die auf dem Objekträger auflagen, auf der XY-Stage befestigt. Der Messkopf wurde darüber gestellt und alle in Abschnitt 3.4 genannten Arbeitsschritte durchgeführt. Nach der nötigen Equilibrierung konnte die Messung beginnen. Abbildung 16 zeigt die Aufnahme einer Zelle. Abgebildet sind das Deflectionbild und das auf dem „height-image“ basierende 3D-Bild.

4.2.2 Bioheater

Um den Umgang mit dem Bioheater zu erlernen wurde der Aufbau zuerst ohne lebende Materialien betrieben. Die Annäherung der Spitze an die Oberfläche und das Abdichten der Flüssigkeitszelle war zu Beginn der Arbeiten nicht ganz unproblematisch und erforderte viel Aufmerksamkeit, so dass man sich nicht zusätzlich mit der Kontrolle der Umweltverhältnisse für die Zellen befassen konnte.

Um das Annähern der Spitze an die Glasoberfläche unter lichtmikroskopischer Kontrolle zu erleichtern, wurde auf die Glasplatte mit wasserfestem Filzstift ein Muster gemalt. Abbildung 17 zeigt die rasterkraftmikroskopische Aufnahme des Übergangsbereichs zwischen dem Glas und der aufgetragenen Filzstiftfarbe. Im 3D-Bild ist sehr gut der Höhenunterschied zwischen der Farbschicht und der sonstigen Oberfläche zu erkennen.

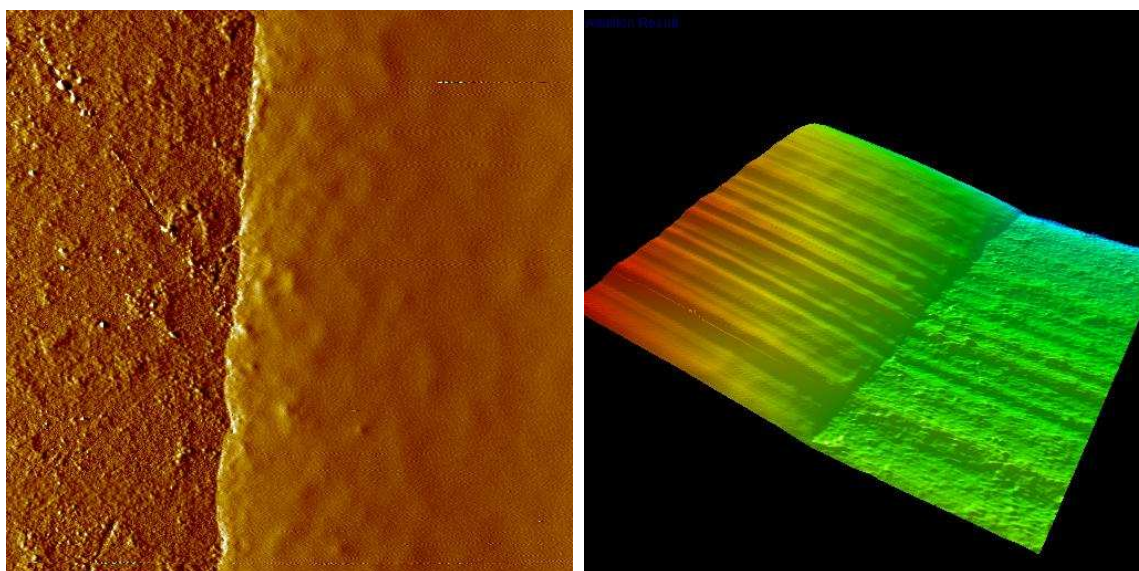


Abbildung 17: Ein Muster aus wasserfestem Filzstift auf der Glasscheibe wurde als Orientierungspunkt für die Annäherung an die Oberfläche gewählt. Die Kantenlänge des Bildausschnitts betrug dabei $40\mu\text{m}$. Die Farbschicht erreicht auf dem Bildausschnitt eine Höhe über dem Glas von 700nm .

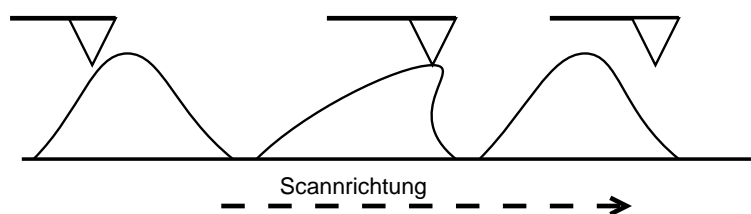


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Deformation einer Zelle durch die Spitze.

In Abbildung 19 sieht man zwei Aufnahmen derselben Zelle. Links ist das „trace“-Bild und

rechts das „retrace“⁹ Bild des Deflectionbildes zu sehen. In dieser Aufnahme erkennt man sehr gut, dass je nach Scanrichtung „hinter“ der Zelle ein dunkler Bereich liegt. Das rührt daher, dass die Zelle, als ein recht weiches Material, durch die Spitze verformt wurde und ihren Bewegungen gefolgt ist (siehe Abbildung 18).

In den Aufnahmen sind, auch nach vielen Bearbeitungsschritten, noch viele Artefakte und die Scanlinien zu sehen. Dies rührt unter anderem von der schlechten Qualität der Probe. Durch unsteriles FCS war die Zellkultur durch Bakterien befallen. Durch große Klumpen organischen Materials¹⁰, die während der Messung durch Strömungen innerhalb der Lösung durch den Scanbereich trieben, wurde die Messung dauerhaft gestört. Zeitweise setzten sie sich sogar am Cantilever ab. Eine andere Erklärung für die Artefakte ist eventuell die zu langsame Regelung des z-Piezos. Also war entweder der Setpoint oder der Gain zu niedrig eingestellt.

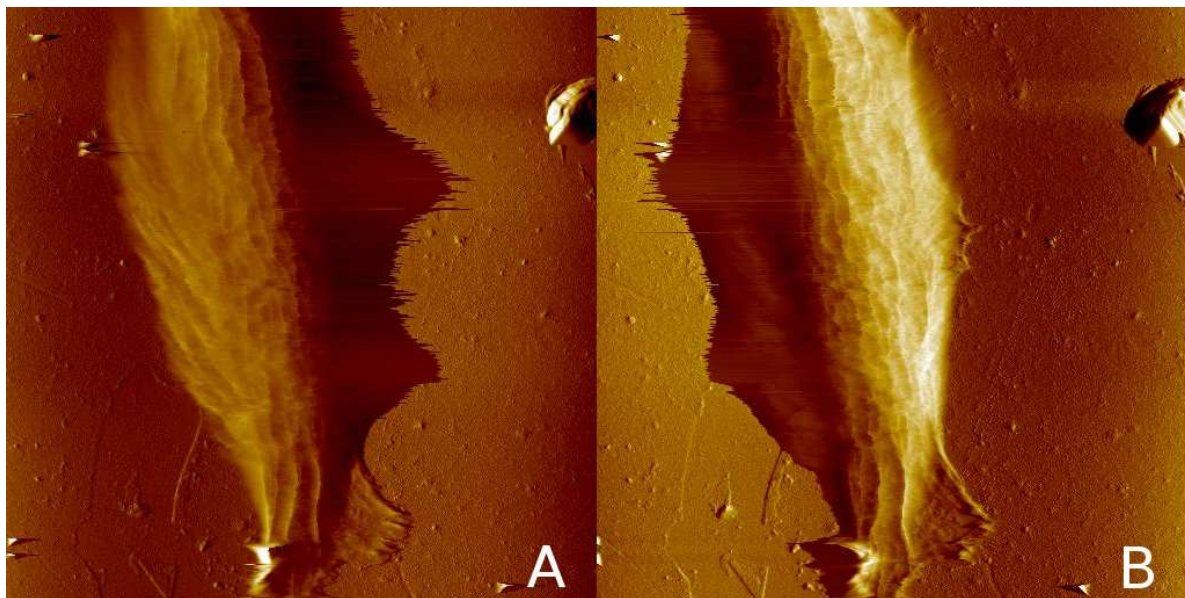


Abbildung 19: Zelle im Bioheater. Das linke Bild zeigt die „trace“ Richtung und das rechte die „retrace“ Richtung. Der Ausschnitt hat eine Kantenlänge von $60\mu\text{m}$. Die Zellkultur war mit Bakterien infiziert. Demnach trieben auch nach mehrmaligem Waschen schon viele tote Zellen und andere organische Reste in der Lösung. Diese haben die Qualität der Aufnahme negativ beeinflusst.

4.2.3 Dishheater

Die Zellen sind in den speziellen Dishheater-Petrischalen angesetzt worden. Der Versuch, die in den Standardschalen kultivierten Zellen abzubilden, wurde durch die Dichtungsmembranen

⁹Der Scanbereich wird Linienweise abgerastert, so dass die Spitze eine Linie zweimal entlangfährt. „trace“ bezeichnet dabei die Hin- und „retrace“ die Rückrichtung des Scans.

¹⁰Ihre Größe betrug ungefähr 10% der Zellgröße.

verhindert. Sie sind zu klein, um durch die ganze Höhe (15mm) der Petrischale gestreckt zu werden. Die „weiche“ Membran ohne stabilisierenden Metallring (siehe Abbildung 7) rutschte einfach durch und fiel mitsamt dem Cantileverhalter in die Petrischale. Die steifere Membran rutschte aufgrund des umlaufenden Metallrings nicht in die Probe, ließ sich jedoch nur bis auf die Mitte der Petrischale dehnen. Die „Dishheaterpetrischalen“ sind nur ca. 7mm hoch, eine Strecke auf die beide Membrane ohne Probleme gedehnt werden können.

Da die Zellkultur vor der Aufnahme nur mit Nährlösung oder Puffer gewaschen werden musste, waren die Vorbereitungen für die Zellen sehr schonend. Sie sind mit nur geringer Zeitverzögerung in den Dishheater eingebaut worden. Während dieser Zeit hat sich die Temperatur der Nährlösung nur sehr langsam verringert und entsprach demnach noch den Anforderungen der Zellkultur. Nachdem die Nährlösung, in der die Zellen lagen, langsam wieder auf 37°C ¹¹ gebracht worden war, konnte die Messung nach den üblichen Vorbereitungsschritten begonnen werden. Dabei wurde eine Bilderserie (Abbildung 20) über ca. 80min aufgenommen.

Der Bildausschnitt wurde während der Aufnahme nicht verändert. Vergleicht man die Bilder miteinander, so sieht man besonders am rechten Rand, dass die Zellen in Bewegung sind und ihre Position verändern. Die Ausläufer der Zelle werden ausgestreckt und wieder eingezogen. Bei genauerer Beobachtung kann man auch sehen, dass sich die untere der beiden Zellen im Verlauf der Messung ein wenig von ihrer Nachbarzelle absondert und sich langsam auf die untere linke Ecke zubewegt hat. Dies ist auch an der Lage der Berührungslinie zwischen den Zellen zu sehen. Auf Bild A und B verläuft sie von links unten nach rechts oben und auf Bild C und D von rechts unten nach links oben.

Insgesamt kann man daraus schließen, dass die Zellen aufgrund der Bewegung lebendig waren. Sie wurden durch die hier gewählten Bedingungen durch den Cantilever nicht beeinträchtigt. Leider sind die Zellen der Bewegung des Cantilevers etwas gefolgt, was an den „Schatten“ und den Fragmenten, die immer in Scanrichtung zeigen, zu sehen ist.

¹¹Im Prinzip wieder auf 39°C , siehe Abschnitt 3.1.3

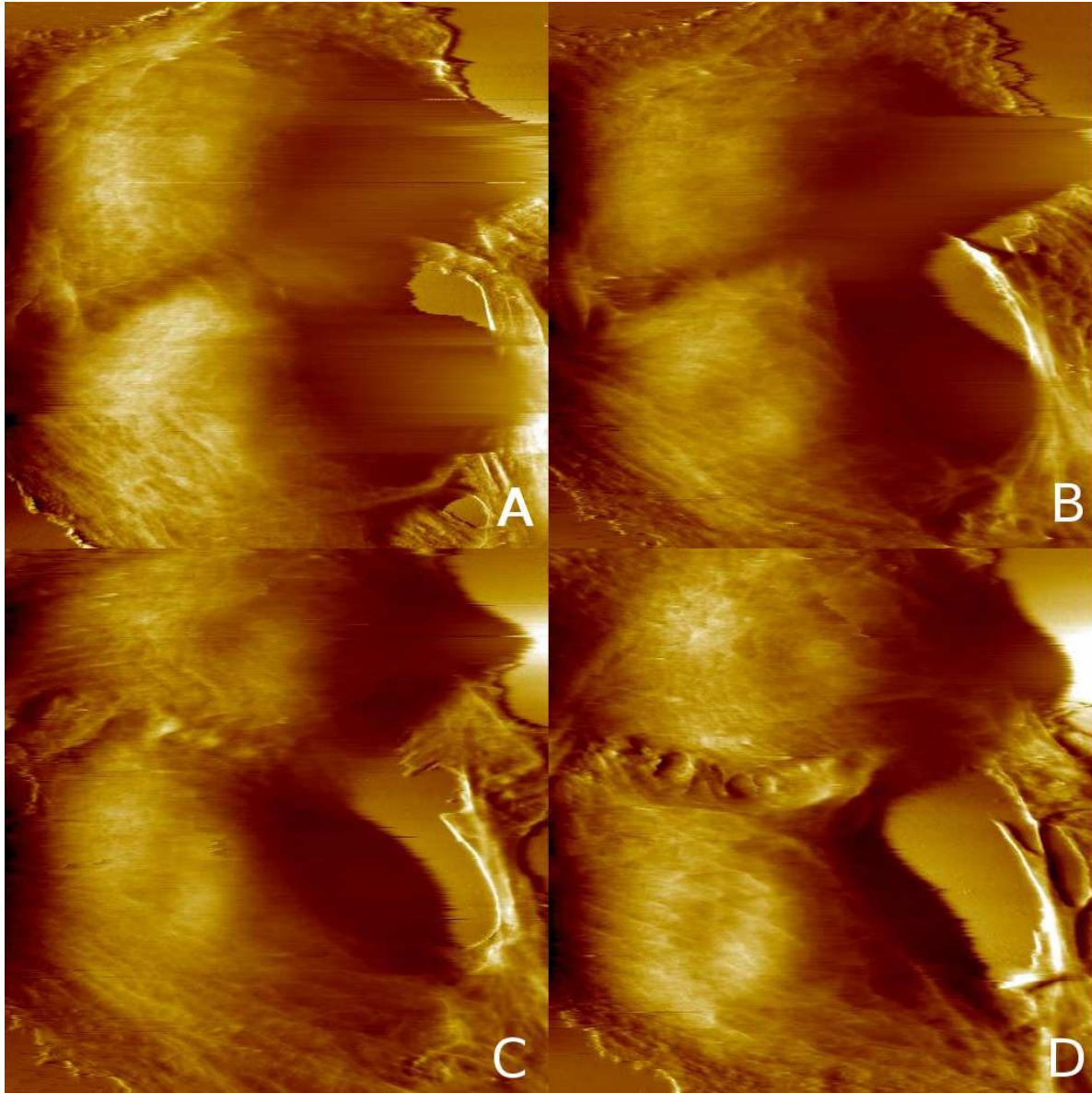


Abbildung 20: Bildserie aus Deflectionbildern zweier Zellen über 80min. Jedes Bild hat eine Kantelänge von $40\mu\text{m}$. Die Abbildungen zeigen immer die „trace“-Bilder.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Es wurden rasterkraftmikroskopische Untersuchungen in Flüssigkeit an fixierten und lebenden Zellen durchgeführt. Im Zuge dessen wurden zwei Systeme (Dishheater und Bioheater) getestet, die die Flüssigkeit während der Messung auf eine konstante Temperatur einstellen. Durch beide Systeme sollen die folgenden Probleme ausgeschaltet werden. Zum Einen die thermische Drift des Deflectionsignals, die durch die thermisch induzierte Verbiegung des Cantilevers bedingt wurde. Zum Anderen verbesserte man durch das Erwärmen der Flüssigkeit auf 37°C die Umweltbedingungen für die untersuchten Zellen.

Der Bioheater und der Dishheater sind zwei verschiedene Systeme, die Flüssigkeit während der Messung zu beheizen. In der Probenkammer des Bioheaters wird die Flüssigkeit von einem Heizring erwärmt, der von einem Regelkreis gesteuert, die gewünschte Temperatur erzeugt. Der Dishheater ist im Prinzip eine Kochplatte für Petrischalen, wobei diese in der Mitte eine Aussparung für das optische Mikroskop hat. Die Kulturschale wird über dem Heizring in Position gebracht, wobei durch Immersol eine Wärmebrücke zur Schale geschaffen wird. Die Temperatur der Lösung wird außen an der Petrischale gemessen, wodurch laut Hersteller eine Temperaturdifferenz von $\Delta T = 1^{\circ}\text{C}$ zum eingegebenen Wert herrührt.

Beide Systeme haben ihre Vor- und Nachteile. Die präzise Temperaturregelung im Bioheater spricht eindeutig für ihn. Ein großer Nachteil ist jedoch, dass er durch vom Hersteller mitgelieferte, aber unpassende Dichtungsringe nur mit sehr viel Vakuumfett wirklich abzudichten ist. Die Glasplättchen, auf denen die Kulturen angezogen werden müssen, sind ebenfalls ein Nachteil. Um ein Ablösen der Zellen zu verhindern, musste der Einbau der Glasplättchen und das Befüllen mit Medium, sowie das anschließende Erwärmen der Lösung sehr schnell geschehen.

Der Dishheater hat diese Nachteile nicht. Die Zellen bleiben während des ganzen Einbaus in ihrer Petrischale und können, wenn sie auf dem Heizelement stehen, sofort weiter beheizt werden. Die Fixierung der Petrischalen über dem Heizelement bereitet allerdings Probleme. Die Membranen, mit denen die Schalen abgedichtet wurden, lassen sich nur $6 - 7\text{mm}$ weit dehnen. Der Weg zur Oberfläche in einer normalen ca. 1cm hohen Petrischale ist zu weit für sie. Ein weiterer Nachteil des Dishheaters ist der Temperaturgradient in der Lösung, der dadurch zustande kommt, dass nur die Randbereiche der Schale geheizt werden. Die Messung der Temperatur innerhalb der Lösung ist genauer.

Die für die Aufnahmen benutzte RLE-6TN-Zelllinie eignet sich sehr gut für Untersuchungen mit dem Rasterkraftmikroskop, da sie auch ohne Immobilisierung große Adhärenz zur angebotenen Oberfläche zeigten. Das Abbilden von Zellen der HEK-WT-Linie mit dem Rasterkraftmikroskop hat sich als problematisch herausgestellt. Ihre Adhärenz ist so gering, dass sie sogar nach der Behandlung mit Glutaraldehyd noch von der Oberfläche gewaschen wurden. Sie wurde hauptsächlich auch kultiviert, weil es eine gebräuchliche und leicht zu beschaffende Zelllinie ist.

Da die Zellen keine Anzeichen von „Unwohlsein“ während einer Aufnahme zeigten, werden die geschaffenen Umweltbedingungen, sowohl im Bioheater als auch im Dishheater, als

ausreichend betrachtet. Man könnte also die Untersuchung auch auf weitere Zelllinien ausdehnen.

Der thermische Drift des Deflectionsignals konnte durch den Einsatz des Bioheaters für alle getesteten Cantilever stark verlangsamt (Cantilever B und D) oder sogar ganz gestoppt (Cantilever A und C) werden. Dabei verkürzten sich die Equilibrierungszeiten auf ca. 15min. Diese Erfolge konnten beim Dishheater leider nicht wiederholt werden. Fehlerquellen sind hierbei die ungenaue Temperaturkontrolle und der konstruktionsbedingte Temperaturgradient in der Lösung.

Die Bedingungen unter denen die Messungen mit dem Dishheater vorgenommen wurden, waren nicht konstant. Zu Beginn der Messung war das Programm, welches die Daten auslesen sollte, noch ein großer Störfaktor, der allerdings in weiteren Messungen ausgeschaltet wurde. Wie für alle Messungen war hierbei auch die Klimaanlage ein Problem. Sie wurde zwar vor der Messung abgeschaltet, jedoch erwärmte sich das Labor nur langsam wieder, was die Messung auch beeinflusst haben könnte.

Interessant könnte für weitere Untersuchungen die tatsächliche Verbiegung des Cantilevers sein. Über die Kraft-Distanz-Kurven kann mit der Steuerungssoftware ein Umrechnungsfaktor von den Volt, in denen das Deflectionsignal ausgegeben wurde, zu Nanometern bestimmt werden. Über die Gleichungen von Stoney [20] wäre es auch möglich, die theoretisch erwarteten Verbiegungen der Cantilever vorauszuberechnen, so dass ein quantitativer Vergleich möglich wäre. Natürlich läßt sich diese Messung auch auf andere Cantilever oder andere Lösungen ausdehnen.

Ein guter Ansatz wäre insgesamt die Verbindung der beiden Systeme Bioheater und Dishheater. Das Handling mit Petrischalen gestaltet sich viel einfacher und sie sind weniger leckanfällig als die Glasscheibenkonstruktion des Bioheaters. Das System des Bioheaters, mit dem innenliegenden Thermometer und der Heizschleife, hat seine Vorteile in der Genauigkeit der Temperaturkontrolle und es hat keinen messbaren Temperaturgradienten. Eine Möglichkeit wäre, die Heizschleife und das Thermoelement in den Cantileverhalter zu integrieren. So kann eine Petrischale durch eine Membran optimal gegen das Verdunsten der Lösung abgedichtet werden. Dafür müsste die Membran natürlich dehnbarer sein, als die derzeit verwendeten. Die Nachteile des Temperaturgradienten in der Flüssigkeit würden, genau wie die Leckanfälligkeit des Bioheaters, ebenfalls vermieden werden.

Literatur

- [1] Ch. Gerber E. Weibel G. Binnig, H. Rohrer. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 49(1):57–61, 1982.
- [2] Ch. Gerber E. Weibel G. Binnig, H. Rohrer. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Appl. Phys. Lett.*, 40(2):187–180, 1982.
- [3] M. Lanz D. W. Pohl, W. Denk. Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$. *J. Appl. Phys.*, 65(1):164–167, 1989.
- [4] Ch. Gerber G. Binnig, C. F. Quate. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, 56(9):930–933, 1986.
- [5] O. Marti J. Schneir V. Elings P. K. Hansma M. Longmire S. Alexander, L. Hellemans and J. Gurley. An atomic-resolution atomic-force microscope implemented using an optical lever. *J. Appl. Phys.*, 65(1):164–167, 1989.
- [6] A. P. Gunning V. J. Morris, A. R Kirby. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. Imperial College Press, 1999.
- [7] J. Tamayo and R. Garcia. Deformation, contact time, and phase contrast in tapping mode scanning force microscopy. *Langmuir*, 12:4430–4435, 1996.
- [8] W. Häberle C.-P. Czerny D. P. E. Smith F. M. Ohnesorge, J. K. H. Horber and G. Binnig. Afm review study on pox viruses and living cells. *Biophysical Journal*, 73:2183–2194, 1997.
- [9] A. L. Weisenhorn S. A. Gould T. R. Albrecht C. F. Quate D. S. Cannell H. G. Hansma P. K. Hansma B. Drake, C. B. Prater. Imaging crystals, polymers, and processes in water with the atomic force microscope. *Science*, 243:1586–1589, 1989.
- [10] J. K. Heinrich Hörber (Editors) Bhanu P. Jena. *Methods in Cell Biology - Volume 68 - Atomic Force Microscopy in Cell Biology*. Academic Press, 2002.
- [11] M. Fritz M. Radmacher and P. K. Hansma. Imaging soft samples with the atomic force microscope: Gelatin in water and propanol. *Biophysical Journal*, 69:264–270, 1995.
- [12] PG Haydon E Henderson and DS Sakaguchi. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science*, 5078:1944–1946, 1995.
- [13] S. E. Radford D. J. Brockwell, D. A. Smith. Protein folding mechanisms: new methods and emerging ideas. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 10:16–25, 2000.
- [14] S. Kasas and A. Ikai. A method for anchoring round shaped cells for atomic force microscope imaging. *Biophysical Journal*, 86:1678–1680, 1995.

- [15] Toni Lindl. *Zell- und Gewebekultur*. Spektrum - Akademischer Verlag, Heideberg Berlin, 2002.
- [16] C.-A. Schoenenberger J. H. Hoh. Surface morphology and mechanical properties of mdck monolayers by atomic force microscopy. *Journal of Cell Science*, 107:1105–1114, 1994.
- [17] M. Hipp H. Bielefeldt J. Colchero O. Marti, A. Ruf and J. Mlynek. Mechanical and thermal effects of laser irradiation on force microscope cantilevers. *Ultramicroscopy*, 42-43:345–350, 1992.
- [18] E. Meyer R.R. Schlittler J.K. Gimzewski, Ch. Gerber. Observation of a chemical reaction using a micromechanical sensor. *Chemical Physics Letters*, 217:589–594, 1994.
- [19] P.K. Hansma M. Radmacher, J. P. Cleveland. Improvement of thermally induced bending of cantilevers used for atomic force microscopy. *SCANNING*, 17:117–121, 1995.
- [20] G. Gerald Stoney. The tension of metallic films deposited by electrolysis. *Containing Papers of a mathematical and physical Character*, 82, No. 553:172–175, 1909.
- [21] F. Ohnesorge D.P.E. Smith W. Häberle, J.K.H. Hörber and G. Binnig. In situ investigations of single living cells infected by viruses. *Ultramicroscopy*, 42-44:1161–1167, 1992.

A Programme

A.1 Programmcode zum Auslesen des Deflectionsignals

Dieses Programm wurde über die Eingabe in die Steuerungsdatei *Meter.ipf* aufgerufen. Durch von „Variable go = 0“ zu „Variable go = 1“ wurde die Aufnahme der Werte gestartet.

```
#pragma rtGlobals=1 // Use modern global access method.
function plotmeter_af(Deflection,zeit)
Variable Deflection
String zeit

Wave DeflectionWave
Wave/T zeitWave

DeflectionWave[DimSize(DeflectionWave,0)-1] = Deflection
Redimension/N=(DimSize(DeflectionWave,0) + 1) DeflectionWave

zeitWave[DimSize(zeitwave,0)-1] = zeit
Redimension/N=(DimSize(zeitWave,0) + 1) zeitwave

print DimSize(DeflectionWave,0)

end

function carolin(deflection)
Variable deflection

Variable go = 0

string zeit

if (go == 1)

zeit = secs2time(DateTime,3)
plotmeter_af(deflection,zeit)
endif

//make/N=1/0 DeflectionWave
//Make/N=1/0/T zeitwave
end
```

A.2 Skript zum Auslesen jedes 150. Messwertes

Das vorliegende Skript 15.sh ist ein Shell-Skript. Mit seiner Hilfe wurde jeder 150. Wert ausgelesen.

```
#!/bin/bash
line=0
while read cline; do
```

```
(( line = line + 1 ))
if !(( line%150)); then
echo cline;
fi;
done < file
```

B Rohdaten

B.1 Messwerte mit Bioheater

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | -1,27 | -0,25 | -0,32 |
| 120 | -1,77 | -0,39 | -0,33 |
| 180 | -2,17 | -0,46 | -0,35 |
| 240 | -2,51 | -0,49 | -0,5 |
| 300 | -2,81 | -0,51 | -0,48 |
| 360 | -3,08 | -0,55 | -0,46 |
| 420 | -3,28 | -0,58 | -0,59 |
| 480 | -3,47 | -0,6 | -0,57 |
| 540 | -3,63 | -0,62 | -0,53 |
| 600 | -3,76 | -0,64 | -0,66 |

Tabelle 3: *Messwerte von Cantilever A.*

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | -0,6 | -1,09 | -0,64 |
| 120 | -1,12 | -1,6 | -0,47 |
| 180 | -1,64 | -1,74 | -1,01 |
| 240 | -2,08 | -1,84 | -1,2 |
| 300 | -2,44 | -1,99 | -0,88 |
| 360 | -2,81 | -2,12 | -1,31 |
| 420 | -3,13 | -2,19 | -1,5 |
| 480 | -3,41 | -2,25 | -1,14 |
| 540 | -3,67 | -2,32 | -1,54 |
| 600 | -3,91 | -2,42 | -1,75 |

Tabelle 4: *Messwerte von Cantilever B.*

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | -0,5 | -0,33 | -0,28 |
| 120 | -0,79 | -0,49 | -0,43 |
| 180 | -1,05 | -0,59 | -0,5 |
| 240 | -1,28 | -0,62 | -0,54 |
| 300 | -1,48 | -0,66 | -0,55 |
| 360 | -1,61 | -0,69 | -0,57 |
| 420 | -1,81 | -0,7 | -0,58 |
| 480 | -1,94 | -0,71 | -0,57 |
| 540 | -2,04 | -0,71 | -0,57 |
| 600 | -2,13 | -0,7 | -0,58 |

Tabelle 5: Messwerte von Cantilever C.

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60 | -2,22 | -0,96 | -0,52 |
| 120 | -3,19 | -1,34 | -0,75 |
| 180 | -3,87 | -1,5 | -0,93 |
| 240 | -4,36 | -1,57 | -1,02 |
| 300 | -4,8 | -1,61 | -1,12 |
| 360 | -5,27 | -1,63 | -1,25 |
| 420 | -5,38 | -1,65 | -1,32 |
| 480 | -5,59 | -1,67 | -1,37 |
| 540 | -5,75 | -1,7 | -1,41 |
| 600 | -5,9 | -1,73 | -1,43 |

Tabelle 6: Messwerte von Cantilever D.

B.2 Messwerte mit Dishheater

B.2.1 Am PC aufgenommene Messwerte

Die folgenden Messwerte sind über das Programm aus A.1 ausgelesen worden. Die ursprünglich 13500 Datensätze wurden durch das Programm aus A.2 auf ca. 80-90 Datensätze reduziert.

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | -0,29 | -0,29 | -0,03 | -0,16 |
| 10 | -0,47 | -0,64 | -0,33 | -0,28 |
| 20 | -0,61 | -0,96 | -0,61 | -0,41 |
| 30 | -0,72 | -1,25 | -0,89 | -0,56 |
| 40 | -0,82 | -1,63 | -1,13 | -0,64 |
| 50 | -0,91 | -1,92 | -1,35 | -0,74 |
| 60 | -0,99 | -2,29 | -1,55 | -0,86 |
| 70 | -1,07 | -2,45 | -1,73 | -0,91 |
| 80 | -1,13 | -2,61 | -1,88 | -0,99 |
| 90 | -1,19 | -2,75 | -2,05 | -1,06 |
| 100 | -1,23 | -2,87 | -2,19 | -1,12 |
| 110 | -1,29 | -2,97 | -2,31 | -1,17 |
| 120 | -1,33 | -3,09 | -2,43 | -1,23 |
| 130 | -1,39 | -3,17 | -2,52 | -1,27 |
| 140 | -1,44 | -3,36 | -2,63 | -1,31 |
| 150 | -1,48 | -3,33 | -2,71 | -1,35 |
| 160 | -1,53 | -3,42 | -2,78 | -1,38 |
| 170 | -1,56 | -3,5 | -2,85 | -1,42 |
| 180 | -1,55 | -3,54 | -2,91 | -1,43 |
| 190 | -1,55 | -3,61 | -2,97 | -1,46 |
| 200 | -1,63 | -3,66 | -3,02 | -1,48 |
| 210 | -1,68 | -3,71 | -3,06 | -1,51 |
| 220 | -1,72 | -3,75 | -3,1 | -1,51 |
| 230 | -1,76 | -3,78 | -3,15 | -1,54 |
| 240 | -1,77 | -3,85 | -3,17 | -1,56 |
| 250 | -1,79 | -3,87 | -3,21 | -1,58 |
| 260 | -1,81 | -3,91 | -3,24 | -1,59 |
| 270 | -1,85 | -3,95 | -3,28 | -1,6 |
| 280 | -1,84 | -3,97 | -3,3 | -1,61 |
| 290 | -1,86 | -3,99 | -3,32 | -1,62 |
| 300 | -1,89 | -4,01 | -3,35 | -1,64 |

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 310 | -1,92 | -4,03 | -3,37 | -1,64 |
| 320 | -1,94 | -4,08 | -3,38 | -1,66 |
| 330 | -1,95 | -4,09 | -3,4 | -1,67 |
| 340 | -1,96 | -4,12 | -3,42 | -1,68 |
| 350 | -1,98 | -4,14 | -3,44 | -1,76 |
| 360 | -1,99 | -4,15 | -3,45 | -1,78 |
| 370 | -2,01 | -4,17 | -3,46 | -1,7 |
| 380 | -2,02 | -4,19 | -3,48 | -1,71 |
| 390 | -2,03 | -4,21 | -3,49 | -1,72 |
| 400 | -2,05 | -4,24 | -3,51 | -1,72 |
| 410 | -2,07 | -4,24 | -3,52 | -1,73 |
| 420 | -2,09 | -4,26 | -3,53 | -1,73 |
| 430 | -2,1 | -4,27 | -3,54 | -1,74 |
| 440 | -2,11 | -4,28 | -3,55 | -1,74 |
| 450 | -2,12 | -4,29 | -3,56 | -1,75 |
| 460 | -2,12 | -4,31 | -3,58 | -1,75 |
| 470 | -2,13 | -4,32 | -3,58 | -1,76 |
| 480 | -2,15 | -4,33 | -3,59 | -1,76 |
| 490 | -2,16 | -4,34 | -3,6 | -1,76 |
| 500 | -2,18 | -4,35 | -3,61 | -1,77 |
| 510 | -2,2 | -4,36 | -3,61 | -1,78 |
| 520 | -2,21 | -4,38 | -3,62 | -1,78 |
| 530 | -2,23 | -4,38 | -3,63 | -1,78 |
| 540 | -2,24 | -4,4 | -3,64 | -1,81 |
| 550 | -2,24 | -4,4 | -3,65 | -1,79 |
| 560 | -2,25 | -4,4 | -3,65 | -1,79 |
| 570 | -2,26 | -4,42 | -3,66 | -1,79 |
| 580 | -2,28 | -4,43 | -3,67 | -1,8 |
| 590 | -2,29 | -4,44 | -3,68 | -1,8 |
| 600 | -2,3 | -4,45 | -3,68 | -1,81 |
| 610 | -2,31 | -4,46 | -3,68 | -1,81 |
| 620 | -2,32 | -4,46 | -3,68 | -1,81 |
| 630 | -2,34 | -4,47 | -3,69 | -1,81 |
| 640 | -2,34 | -4,48 | -3,7 | -1,82 |
| 650 | -2,35 | -4,48 | -3,71 | -1,83 |
| 660 | -2,36 | -4,49 | -3,72 | -1,83 |
| 670 | -2,38 | -4,5 | -3,72 | -1,83 |
| 680 | -2,38 | -4,45 | -3,73 | -1,84 |

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 690 | -2,39 | -4,51 | -3,73 | -1,84 |
| 700 | -2,38 | -4,51 | -3,74 | -1,84 |
| 710 | -2,39 | -4,52 | -3,74 | -1,85 |
| 720 | -2,41 | -4,54 | -3,75 | -1,85 |

Tabelle 7: Messwerte von Cantilever A. Sie stammen aus einer Messung mit dem Dishheater und wurden durch das Programm aufgenommen und durch ein Skript auf 80-90 Datensätze reduziert.

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | -0,56 | -0,98 | -0,73 | -0,1 |
| 10 | -0,87 | -1,68 | -1,2 | -0,33 |
| 20 | -1,08 | -2,32 | -1,66 | -0,56 |
| 30 | -1,26 | -2,91 | -2,07 | -0,76 |
| 40 | -1,42 | -3,46 | -2,44 | -0,96 |
| 50 | -1,53 | -3,95 | -2,78 | -1,15 |
| 60 | -1,65 | -4,4 | -3,1 | -1,33 |
| 70 | -1,75 | -4,81 | -3,37 | -1,36 |
| 80 | -1,84 | -5,18 | -3,65 | -1,61 |
| 90 | -1,92 | -5,51 | -3,88 | -1,74 |
| 100 | -2,01 | -5,8 | -4,09 | -1,86 |
| 110 | -2,08 | -6,05 | -4,28 | -1,97 |
| 120 | -2,14 | -6,28 | -4,44 | -2,08 |
| 130 | -2,21 | -6,5 | -4,59 | -2,19 |
| 140 | -2,27 | -6,69 | -4,71 | -2,24 |
| 150 | -2,33 | -6,86 | -4,84 | -2,34 |
| 160 | -2,39 | -7,03 | -4,93 | -2,41 |
| 170 | -2,44 | -7,16 | -5,03 | -2,46 |
| 180 | -2,5 | -7,28 | -5,12 | -2,47 |
| 190 | -2,54 | -7,4 | -5,19 | -2,54 |
| 200 | -2,59 | -7,5 | -5,27 | -2,61 |
| 210 | -2,65 | -7,59 | -5,33 | -2,64 |
| 220 | -2,68 | -7,68 | -5,39 | -2,64 |
| 230 | -2,73 | -7,76 | -5,43 | -2,66 |
| 240 | -2,78 | -7,83 | -5,48 | -2,7 |
| 250 | -2,82 | -7,89 | -5,55 | -2,73 |

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 260 | -2,86 | -7,94 | -5,59 | -2,73 |
| 270 | -2,89 | -7,99 | -5,63 | -2,74 |
| 280 | -2,93 | -8,04 | -5,66 | -2,75 |
| 290 | -2,97 | -8,08 | -5,7 | -2,78 |
| 300 | -3,01 | -8,11 | -5,73 | -2,78 |
| 310 | -3,03 | -8,15 | -5,76 | -2,8 |
| 320 | -3,08 | -8,18 | -5,79 | -2,82 |
| 330 | -3,1 | -8,21 | -5,82 | -2,81 |
| 340 | -3,13 | -8,23 | -5,84 | -2,83 |
| 350 | -3,17 | -8,26 | -5,87 | -2,85 |
| 360 | -3,25 | -8,28 | -5,91 | -2,86 |
| 370 | -3,24 | -8,3 | -5,95 | -2,88 |
| 380 | -3,27 | -8,32 | -6 | -2,87 |
| 390 | -3,3 | -8,33 | -5,99 | -2,87 |
| 400 | -3,34 | -8,35 | -6,06 | -2,89 |
| 410 | -3,36 | -8,37 | -6,08 | -2,89 |
| 420 | -3,39 | -8,39 | -6,11 | -2,89 |
| 430 | -3,43 | -8,39 | -6,16 | -2,9 |
| 440 | -3,45 | -8,41 | -6,17 | -2,93 |
| 450 | -3,49 | -8,42 | -6,2 | -2,94 |
| 460 | -3,53 | -8,43 | -6,23 | -2,94 |
| 470 | -3,55 | -8,44 | -6,24 | -2,94 |
| 480 | -3,58 | -8,45 | -6,25 | -2,93 |
| 490 | -3,61 | -8,45 | -6,27 | -2,95 |
| 500 | -3,64 | -8,47 | -6,29 | -2,96 |
| 510 | -3,66 | -8,46 | -6,32 | -2,95 |
| 520 | -3,69 | -8,47 | -6,34 | -2,96 |
| 530 | -3,71 | -8,48 | -6,36 | -2,96 |
| 540 | -3,67 | -8,48 | -6,37 | -2,97 |
| 550 | -3,77 | -8,49 | -6,39 | -2,97 |
| 560 | -3,78 | -8,49 | -6,42 | -2,98 |
| 570 | -3,81 | -8,5 | -6,44 | -2,98 |
| 580 | -3,83 | -8,5 | -6,44 | -2,98 |
| 590 | -3,85 | -8,51 | -6,44 | -2,96 |
| 600 | -3,88 | -8,51 | -6,46 | -2,96 |
| 610 | -3,9 | -8,52 | -6,47 | -2,99 |
| 620 | -3,93 | -8,52 | -6,48 | -3 |
| 630 | -3,95 | -8,52 | -6,49 | -2,99 |

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 640 | -3,97 | -8,53 | -6,49 | -3 |
| 650 | -4 | -8,53 | -6,5 | -3 |
| 660 | -4,02 | -8,54 | -6,51 | -3,01 |
| 670 | -4,05 | -8,55 | -6,52 | -3,02 |
| 680 | -4,07 | -8,55 | -6,53 | -3,04 |
| 690 | -4,09 | -8,55 | -6,51 | -3,03 |
| 700 | -4,1 | -8,56 | -6,53 | -3,01 |
| 710 | -4,13 | -8,56 | -6,54 | -3,03 |
| 720 | -4,15 | -8,56 | -6,55 | -3,05 |
| 730 | -4,16 | -8,56 | -6,56 | -3,06 |
| 740 | -4,18 | -8,56 | -6,56 | -3,05 |
| 750 | -4,21 | -8,57 | -6,57 | -3,08 |
| 760 | -4,23 | -8,58 | -6,57 | -3,08 |
| 770 | -4,26 | -8,59 | -6,58 | -3,07 |
| 780 | -4,26 | -8,58 | -6,59 | -3,07 |
| 790 | -4,28 | -8,59 | -6,6 | -3,07 |
| 800 | -4,3 | -8,59 | -6,61 | -3,07 |
| 810 | -4,31 | -8,59 | -6,61 | -3,09 |
| 820 | -4,34 | -8,59 | -6,63 | -3,09 |
| 830 | -4,36 | -8,6 | -6,64 | -3,08 |
| 840 | -4,38 | -8,59 | -6,65 | -3,11 |
| 850 | -4,41 | -8,61 | -6,63 | -3,11 |
| 860 | -4,43 | -8,61 | -6,62 | -3,12 |
| 870 | -4,45 | -8,61 | -6,65 | -3,13 |
| 880 | -4,46 | -8,61 | -6,66 | -3,13 |

Tabelle 8: Messwerte von Cantilever B. Sie stammen aus einer Messung mit dem Dishheater und wurden durch das Programm aufgenommen und durch ein Skript auf 80-90 Datensätze reduziert.

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | 0,03 | -0,11 | 0,13 | |
| 10 | -0,39 | -0,03 | -0,16 | 0,09 |
| 20 | -0,45 | -0,1 | -0,22 | 0,06 |
| 30 | -0,5 | -0,14 | -0,28 | 0,05 |
| 40 | -0,55 | -0,17 | -0,34 | 0,02 |

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 50 | -0,6 | -0,21 | -0,38 | 0 |
| 60 | -0,65 | -0,25 | -0,45 | -0,01 |
| 70 | -0,71 | -0,29 | -0,47 | -0,05 |
| 80 | -0,73 | -0,32 | -0,5 | -0,06 |
| 90 | -0,79 | -0,35 | -0,54 | -0,07 |
| 100 | -0,84 | -0,38 | -0,58 | -0,08 |
| 110 | -0,91 | -0,39 | -0,62 | -0,12 |
| 120 | -0,92 | -0,41 | -0,65 | -0,11 |
| 130 | -0,96 | -0,42 | -0,67 | -0,15 |
| 140 | -0,98 | -0,46 | -0,73 | -0,15 |
| 150 | -1 | -0,51 | -0,72 | -0,16 |
| 160 | -1,06 | -0,49 | -0,76 | -0,19 |
| 170 | -1,07 | -0,49 | -0,78 | -0,21 |
| 180 | -1,1 | -0,54 | -0,81 | -0,23 |
| 190 | -1,13 | -0,54 | -0,83 | -0,24 |
| 200 | -1,16 | -0,54 | -0,84 | -0,25 |
| 210 | -1,19 | -0,55 | -0,85 | -0,24 |
| 220 | -1,2 | -0,54 | -0,88 | -0,27 |
| 230 | -1,23 | -0,53 | -0,88 | -0,28 |
| 240 | -1,26 | -0,46 | -0,88 | -0,29 |
| 250 | -1,26 | -0,64 | -0,9 | -0,27 |
| 260 | -1,3 | -0,63 | -0,9 | -0,3 |
| 270 | -1,33 | -0,63 | -0,92 | -0,31 |
| 280 | -1,36 | -0,62 | -0,9 | -0,33 |
| 290 | -1,34 | -0,64 | -0,9 | -0,33 |
| 300 | -1,37 | -0,65 | -0,93 | -0,33 |
| 310 | -1,4 | -0,68 | -0,94 | -0,35 |
| 320 | -1,42 | -0,69 | -0,93 | -0,35 |
| 330 | -1,43 | -0,7 | -0,93 | -0,36 |
| 340 | -1,46 | -0,7 | -0,94 | -0,35 |
| 350 | -1,44 | -0,75 | -0,93 | -0,36 |
| 360 | -1,45 | -0,74 | -0,94 | -0,36 |
| 370 | -1,49 | -0,75 | -0,92 | -0,39 |
| 380 | -1,51 | -0,81 | -0,94 | -0,38 |
| 390 | -1,52 | -0,8 | -0,95 | -0,41 |
| 400 | -1,53 | -0,81 | -0,93 | -0,39 |
| 410 | -1,54 | -0,79 | -0,92 | -0,39 |
| 420 | -1,58 | -0,81 | -0,92 | -0,41 |

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 430 | -1,59 | -0,83 | -0,92 | -0,4 |
| 440 | -1,59 | -0,87 | -0,91 | -0,42 |
| 450 | -1,58 | -0,83 | -0,9 | -0,43 |
| 460 | -1,62 | -0,86 | -0,89 | -0,42 |
| 470 | -1,61 | -0,88 | -0,9 | -0,44 |
| 480 | -1,65 | -0,87 | -0,86 | -0,45 |
| 490 | -1,63 | -0,89 | -0,88 | -0,45 |
| 500 | -1,66 | -0,89 | -0,89 | -0,46 |
| 510 | -1,66 | -0,89 | -0,88 | -0,45 |
| 520 | -1,65 | -0,9 | -0,89 | -0,46 |
| 530 | -1,67 | -0,91 | -0,84 | -0,49 |
| 540 | -1,67 | -0,89 | -0,86 | -0,49 |
| 550 | -1,67 | -0,94 | -0,86 | -0,48 |
| 560 | -1,68 | -0,9 | -0,86 | -0,49 |
| 570 | -1,69 | -0,91 | -0,87 | -0,49 |
| 580 | -1,73 | -0,92 | -0,86 | -0,48 |
| 590 | -1,72 | -0,93 | -0,84 | -0,52 |
| 600 | -1,74 | -0,93 | -0,81 | -0,52 |
| 610 | -1,76 | -0,94 | -0,82 | -0,52 |
| 620 | -1,75 | -0,94 | -0,88 | -0,53 |
| 630 | -1,76 | -0,97 | -0,86 | -0,53 |
| 640 | -1,78 | -0,95 | -0,85 | -0,54 |
| 650 | -1,8 | -0,94 | -0,83 | -0,55 |
| 660 | -1,79 | -0,95 | -0,85 | -0,53 |
| 670 | -1,79 | -0,94 | -0,86 | -0,56 |
| 680 | -1,8 | -0,9 | -0,87 | -0,55 |
| 690 | -1,8 | -0,86 | -0,86 | -0,6 |
| 700 | -1,8 | -0,91 | -0,86 | -0,57 |
| 710 | -1,82 | -0,89 | -0,87 | -0,57 |
| 720 | -1,82 | -0,87 | -0,88 | -0,57 |
| 730 | -1,8 | -0,85 | -0,88 | -0,6 |
| 740 | -1,82 | -0,84 | -0,87 | -0,6 |
| 750 | -1,84 | -0,82 | -0,88 | -0,6 |
| 760 | -1,85 | -0,81 | -0,9 | -0,59 |
| 770 | -1,84 | -0,84 | -0,9 | -0,59 |
| 780 | -1,85 | -0,82 | -0,89 | -0,6 |
| 790 | -1,88 | -0,8 | -0,9 | -0,62 |
| 800 | -1,86 | -0,8 | -0,92 | -0,59 |

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 810 | -1,87 | -0,77 | -0,89 | -0,59 |
| 820 | -1,89 | -0,75 | -0,88 | -0,59 |
| 830 | -1,87 | -0,74 | -0,93 | -0,58 |
| 840 | -1,92 | -0,75 | -0,9 | -0,57 |
| 850 | -1,91 | -0,76 | -0,92 | -0,59 |
| 860 | -1,9 | -0,73 | -0,93 | -0,58 |
| 870 | -1,93 | -0,73 | -0,9 | -0,57 |
| 880 | -1,91 | -0,72 | -0,9 | -0,57 |
| 890 | -1,91 | -0,69 | -0,92 | -0,59 |

Tabelle 9: Messwerte von Cantilever C. Sie stammen aus einer Messung mit dem Dishheater und wurden durch das Programm aufgenommen und durch ein Skript auf 80-90 Datensätze reduziert.

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 0 | -0,4 | -0,31 | -0,04 | 0,07 |
| 10 | -0,64 | -0,66 | -0,15 | -0,06 |
| 20 | -0,79 | -0,95 | -0,26 | -0,18 |
| 30 | -0,91 | -1,3 | -0,32 | -0,33 |
| 40 | -1,01 | -1,56 | -0,41 | -0,47 |
| 50 | -1,09 | -1,81 | -0,49 | -0,6 |
| 60 | -1,16 | -2,12 | -0,6 | -0,68 |
| 70 | -1,23 | -2,35 | -0,65 | -0,79 |
| 80 | -1,26 | -2,56 | -0,72 | -0,91 |
| 90 | -1,32 | -2,82 | -0,8 | -1,01 |
| 100 | -1,35 | -2,98 | -0,87 | -1,1 |
| 110 | -1,42 | -3,19 | -0,95 | -1,2 |
| 120 | -1,51 | -3,42 | -1,01 | -1,25 |
| 130 | -1,49 | -3,57 | -1,06 | -1,35 |
| 140 | -1,52 | -3,82 | -1,14 | -1,38 |
| 150 | -1,55 | -3,89 | -1,17 | -1,45 |
| 160 | -1,58 | -4,04 | -1,26 | -1,56 |
| 170 | -1,6 | -4,17 | -1,31 | -1,58 |
| 180 | -1,63 | -4,31 | -1,35 | -1,63 |
| 190 | -1,66 | -4,44 | -1,38 | -1,71 |
| 200 | -1,68 | -4,54 | -1,45 | -1,76 |

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 210 | -1,7 | -4,68 | -1,49 | -1,79 |
| 220 | -1,72 | -4,75 | -1,55 | -1,84 |
| 230 | -1,73 | -4,83 | -1,58 | -1,88 |
| 240 | -1,75 | -4,95 | -1,6 | -1,89 |
| 250 | -1,77 | -5 | -1,66 | -1,95 |
| 260 | -1,79 | -5,09 | -1,68 | -1,98 |
| 270 | -1,8 | -5,19 | -1,71 | -2,04 |
| 280 | -1,83 | -5,24 | -1,77 | -2,05 |
| 290 | -1,83 | -5,32 | -1,8 | -2,1 |
| 300 | -1,85 | -5,38 | -1,79 | -2,11 |
| 310 | -1,87 | -5,42 | -1,85 | -2,15 |
| 320 | -1,89 | -5,46 | -1,86 | -2,16 |
| 330 | -1,89 | -5,54 | -1,91 | -2,17 |
| 340 | -1,91 | -5,59 | -1,91 | -2,2 |
| 350 | -1,92 | -5,68 | -1,96 | -2,18 |
| 360 | -1,94 | -5,71 | -1,98 | -2,31 |
| 370 | -1,93 | -5,73 | -2,02 | -2,27 |
| 380 | -1,96 | -5,76 | -2,01 | -2,27 |
| 390 | -1,95 | -5,83 | -2,03 | -2,3 |
| 400 | -1,97 | -5,87 | -2,07 | -2,34 |
| 410 | -2 | -5,9 | -2,06 | -2,33 |
| 420 | -2 | -5,93 | -2,12 | -2,37 |
| 430 | -2,01 | -5,95 | -2,1 | -2,36 |
| 440 | -2,01 | -5,99 | -2,13 | -2,37 |
| 450 | -2,02 | -6,03 | -2,16 | -2,42 |
| 460 | -2,04 | -6,09 | -2,16 | -2,4 |
| 470 | -2,06 | -6,08 | -2,19 | -2,43 |
| 480 | -2,07 | -6,12 | -2,21 | -2,43 |
| 490 | -2,07 | -6,13 | -2,22 | -2,45 |
| 500 | -2,07 | -6,19 | -2,26 | -2,46 |
| 510 | -2,08 | -6,21 | -2,28 | -2,45 |
| 520 | -2,09 | -6,23 | -2,29 | -2,48 |
| 530 | -2,1 | -6,26 | -2,28 | -2,52 |
| 540 | -2,11 | -6,29 | -2,28 | -2,52 |
| 550 | -2,12 | -6,3 | -2,36 | -2,53 |
| 560 | -2,12 | -6,37 | -2,35 | -2,53 |
| 570 | -2,14 | -6,34 | -2,37 | -2,52 |
| 580 | -2,14 | -6,4 | -2,38 | -2,52 |

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 37°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 590 | -2,15 | -6,38 | -2,4 | -2,55 |
| 600 | -2,15 | -6,43 | -2,4 | -2,57 |
| 610 | -2,16 | -6,45 | -2,42 | -2,57 |
| 620 | -2,16 | -6,42 | -2,41 | -2,58 |
| 630 | -2,18 | -6,48 | -2,45 | -2,58 |
| 640 | -2,18 | -6,5 | -2,45 | -2,59 |
| 650 | -2,18 | -6,52 | -2,5 | -2,59 |
| 660 | -2,19 | -6,53 | -2,47 | -2,6 |
| 670 | -2,21 | -6,58 | -2,5 | -2,59 |
| 680 | -2,22 | -6,59 | -2,33 | -2,57 |
| 690 | -2,23 | -6,58 | -2,59 | -2,6 |
| 700 | -2,17 | -6,59 | -2,54 | -2,56 |
| 710 | -2,15 | -6,63 | -2,56 | -2,58 |
| 720 | -2,12 | -6,65 | -2,57 | -2,58 |
| 730 | -2,23 | -6,64 | -2,6 | -2,61 |
| 740 | -2,24 | -6,67 | -2,6 | -2,61 |
| 750 | -2,26 | -6,66 | -2,61 | -2,63 |
| 760 | -2,26 | -6,69 | -2,61 | -2,6 |
| 770 | -2,27 | -6,69 | -2,63 | -2,63 |
| 780 | -2,27 | -6,74 | -2,67 | -2,64 |
| 790 | -2,26 | -6,72 | -2,68 | -2,63 |
| 800 | -2,26 | -6,77 | -2,65 | -2,62 |
| 810 | -2,26 | -6,8 | -2,71 | -2,61 |
| 820 | -2,3 | -6,79 | -2,69 | -2,64 |
| 830 | -2,3 | -6,8 | -2,69 | -2,65 |
| 840 | -2,31 | -6,81 | -2,71 | -2,62 |
| 850 | -2,32 | -6,8 | -2,74 | -2,62 |
| 860 | -2,33 | -6,85 | -2,74 | -2,65 |
| 870 | -2,34 | -6,85 | -2,74 | -2,65 |
| 880 | -2,34 | -6,85 | -2,77 | -2,66 |

Tabelle 10: Messwerte von Cantilever D. Sie stammen aus einer Messung mit dem Dishheater und wurden durch das Programm aufgenommen und durch ein Skript auf 80-90 Datensätze reduziert.

B.2.2 Manuell aufgenommene Messwerte

Diese Messwerte wurden mit einer Stoppuhr und durch eigenständiges Ablesen des Deflectionsignals aufgenommen.

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | -2,25 | -0,54 | -1,34 |
| 60 | -3,09 | -1,11 | -2,48 |
| 90 | -3,54 | -1,57 | -3,31 |
| 120 | -3,83 | -1,92 | -3,9 |
| 150 | -4,04 | -2,19 | -4,31 |
| 180 | -4,24 | -2,39 | -4,63 |
| 210 | -4,39 | -2,53 | -4,85 |
| 240 | -4,51 | -2,65 | -5 |
| 270 | -4,62 | -2,74 | -5,12 |
| 300 | -4,7 | -2,8 | -5,2 |
| 330 | -4,77 | -2,86 | -5,26 |
| 360 | -4,84 | -2,9 | -5,31 |
| 390 | -4,9 | -2,93 | -5,35 |
| 420 | -4,96 | -2,97 | -5,38 |
| 450 | -5,02 | -2,99 | -5,4 |
| 480 | -5,07 | -3,01 | -5,43 |
| 510 | -5,08 | -3,03 | -5,44 |
| 540 | -5,12 | -3,05 | -5,46 |
| 570 | -5,16 | -3,06 | -5,47 |
| 600 | -5,2 | -3,08 | -5,48 |

Tabelle 11: *Messwerte von Cantilever A.*

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | -0,71 | -0,64 | -0,66 |
| 60 | -1,11 | -1,28 | -1,31 |
| 90 | -1,29 | -1,6 | -1,64 |
| 120 | -1,44 | -1,9 | -1,92 |
| 150 | -1,55 | -2,16 | -2,08 |
| 180 | -1,66 | -2,34 | -2,29 |
| 210 | -1,73 | -2,46 | -2,42 |
| 240 | -1,8 | -2,53 | -2,48 |
| 270 | -1,82 | -2,68 | -2,56 |
| 300 | -1,89 | -2,73 | -2,64 |
| 330 | -1,94 | -2,77 | -2,7 |
| 360 | -1,94 | -2,8 | -2,78 |
| 390 | -1,95 | -2,84 | -2,8 |
| 420 | -1,94 | -2,87 | -2,84 |
| 450 | -1,95 | -2,89 | -2,86 |
| 480 | -1,94 | -2,9 | -2,88 |
| 510 | -1,95 | -2,92 | -2,91 |
| 540 | -1,94 | -2,94 | -2,93 |
| 570 | -1,95 | -2,92 | -2,94 |
| 600 | -1,94 | -2,96 | -2,95 |

Tabelle 12: Messwerte von Cantilever C.

| Zeit [s] | Deflection [V] bei RT | Deflection [V] bei 32°C | Deflection [V] bei 39°C |
|----------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 0 | 0 | 0 |
| 30 | -0,92 | -0,49 | -1,51 |
| 60 | -1,46 | -0,84 | -2,62 |
| 90 | -1,9 | -1,18 | -3,44 |
| 120 | -2,18 | -1,48 | -4,03 |
| 150 | -2,42 | -1,73 | -4,45 |
| 180 | -2,68 | -1,95 | -4,77 |
| 210 | -2,83 | -2,11 | -5,01 |
| 240 | -3 | -2,27 | -5,21 |
| 270 | -3,16 | -2,4 | -5,36 |
| 300 | -3,27 | -2,5 | -5,48 |
| 330 | -3,39 | -2,61 | -5,59 |
| 360 | -3,52 | -2,66 | -5,67 |
| 390 | -3,63 | -2,72 | -5,73 |
| 420 | -3,73 | -2,79 | -5,8 |
| 450 | -3,79 | -2,84 | -5,87 |
| 480 | -3,87 | -2,9 | -5,9 |
| 510 | -3,93 | -2,94 | -5,95 |
| 540 | -3,97 | -2,98 | -6 |
| 570 | -4,04 | -3,02 | -6,03 |
| 600 | 4,1 | -3,06 | -6,06 |

Tabelle 13: Messwerte von Cantilever D.

C Berechnung des Umrechnungsfaktors g

Dieser Faktor wird für die Umrechnung der Deflectionvolts-Einheit zu Nanometern benutzt. Er wird über einen Fit an eine Kraft-Distanzkurve direkt in der „IGOR-Software“ bestimmt. Die hier verwendeten Werte wurden von Daniel Wesner bestimmt. Es stehen leider nur Werte für Cantilever A, B und D zur Verfügung. Da zum Teil verschiedene Werte bestimmt wurden wird über sie gemittelt.

Cantilever A

$$g_A = \frac{1}{3} \left(34,6 \frac{nm}{V} + 30,7 \frac{nm}{V} + 45,0 \frac{nm}{V} \right) = \underline{\underline{36,766 \frac{nm}{V}}}$$

Cantilever B Hier stand nur ein Wert zur Verfügung, der direkt verwendet wurde.

$$g_B = \underline{\underline{50,7 \frac{nm}{V}}}$$

Cantilever D

$$g_D = \frac{1}{3} \left(67,0 \frac{nm}{V} + 60,8 \frac{nm}{V} + 63,4 \frac{nm}{V} \right) = \underline{\underline{63,73 \frac{nm}{V}}}$$

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich diejenigen Erwähnen, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben und entscheidend zum Gelingen beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dario Anselmetti für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe zu schreiben, bedanken.

PD Dr. Robert Ros danke ich für die Betreuung, die Ausarbeitung meines Themas und die vielen konstruktiven Diskussionen.

Herrn Dipl. Phys. Volker Walhorn danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die Erstellung meines Zweitgutachtens.

Herrn Dipl. Chem. Daniel Wesner möchte ich für die gute Betreuung am AFM und die Einführung in die Methoden der Zellkultur danken. Sein Engagement, seine vielen Anregungen und Korrekturen haben entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Für die Bereitstellung der Zellkulturen danke ich Frau Dipl. Biol. Alexandra Kroll von der „Medizinische Klinik und Poliklinik B“ der WWU Münster und Frau Eva Westendorf aus der Gruppe „Biochemie I“ der Fakultät für Chemie der Uni Bielefeld. Bei Dr. Sonja Siwiora Brenke bedanke ich mich für die Vermittlung an Eva Westendorf.

Frau Dipl. Phys. Katja Brandt, Herrn Dipl. Biotech. Dominik Greif und Herrn Dipl. Phys. Olaf Schulz möchte ich für die schöne Zeit als Bürokollegen danken. Dominik Greif möchte ich zusätzlich noch für die Hilfestellungen im Zelllabor und Olaf Schulz für das Korrekturlesen meiner Arbeit danken.

Herrn Dipl. Phys. Alexander Fuhrmann danke ich für das Programm zum Auslesen der Werte und die übrige Hilfe mit der IGOR-Software.

Für die weitere Hilfe bei Computerproblemen danke ich Herrn Dipl. Ing. Christoph Pelargus, der viel Zeit mit dem Kontrollieren und Reparieren meines Computers verbracht hat und Herrn B.Sc. Lukas Bogunovic, der mir bei Fragen zu LaTeX immer weitergeholfen hat.

Ein besonderer Dank aber gilt auch den übrigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Biophysik und angewandte Nanowissenschaften“, die mich auf vielfältige Weise unterstützt haben.

Bei meinen Freunden aus Studium und Schulzeit möchte ich mich ebenfalls bedanken.

An erster Stelle möchte ich mich bei Alexandra Schröder, Meike Oetting und Nina Könemann bedanken. Sie haben mich entscheidend bei der Literaturrecherche in Münster unterstützt und mich immer wieder aufgebaut, wenn mich missglückte Messungen im Zeitplan zurückgeworfen haben.

Den Mitglieder der Fachschaft Physik möchte ich für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren danken.

Ein besonderer Dank gilt Frau B.Sc. Martina Everwand, die mich in unserem neuen Studiengang nicht alleine gelassen hat. Vermutlich wären die vielfältigen Probleme, die wir im Laufe unserer gemeinsamen Studienzzeit aus dem Weg geräumt haben, alleine nicht so einfach zu

bewältigen gewesen. Ich hoffe, die nächsten zwei Jahre verlaufen genauso schön, wie die letzten drei.

Meinem Freund Andreas Markwirth möchte ich besonders danken. Er hat über ein halbes Jahr lang meine zum Teil sehr schlechte Laune ertragen und wegen der zum Teil sehr knappen Messzeiten mehrere Wochenenden mit mir im Labor verbracht. Ich hoffe, ich konnte ihn zumindest etwas für meine Arbeit begeistern.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern und meiner Familie danken. Sie haben mich in meiner Entscheidung Physik zu studieren stets bestätigt und mich moralisch unterstützt, wenn es mal nicht so lief. Ich denke, ich werde mit ihrer Unterstützung auch den Rest meines Studiums meistern.