

Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades
Bachelor of Science

Rasterkraftmikroskopische Elastizitätsmessungen an Zellkernen

Julius Hillebrenner
geboren in Lübeck

2016

Lehrstuhl für Experimentelle Biophysik
Fakultät Physik
Universität Bielefeld

Erstgutachter: Prof. Dr. D. Anselmetti
Zweitgutachter: Herr Dr. V. Walhorn
Abgabedatum: 23. Juni 2016

Kurzfassung

Beschreibt die Herzfrequenzvariabilität eines menschlichen Herzens die Fähigkeit des Herzmuskels sich an Belastung anzupassen, so ist der Muskel hauptverantwortlich für die Regulation des komplexen Herz-Kreislauf-Systems. Im Gegensatz zu der bewusst steuerbaren Skelettmuskulatur kommt es im Herzmuskel zu keiner natürlichen Ermüdungserscheinung. Bei der arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (*engl.*: ARVC) degeneriert der Herzmuskel gefolgt von Binde- und Fettgewebeeinlagerung, welches eine Störung der Erregungsleitung zufolge hat. Unter physiologischen Stressbedingungen, beispielsweise starker mechanischer Beanspruchung im Sport, können sich Arrhythmien abzeichnen oder es kann der plötzliche Herztod 'sudden cardiac death (SCD)' eintreten. Für die Veränderungen der Herzmuskelzellen stehen verschiedene Mutationen innerhalb der Zellkernmembran im Verdacht die Elastizität negativ zu beeinflussen. Die Untersuchung der Zelleigenschaften anhand einzelner Zellen im μm -Bereich wird mittels Rasterkraftmikroskopie durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit „Rasterkraftmikroskopische Elastizitätsmessungen an Zellkernen“ werden verschiedene Methoden für die Vermessung des Elastizitätsmoduls des Zellkerns aufgezeigt und an diversen Zelllinien angewandt. Speziell die dynamische Methode zur Bestimmung der Elastizitäten birgt noch ungeklärte Probleme. Weiterhin sollen Programmroutinen die Auswertung großer Datenmengen vereinfachen und zu einer genaueren Aussage der Zellkerneigenschaften führen.

Abstract

Regarding the human heart as one of the most relevant organs for regulating the cardiovascular system proper function is essential. Malfunction can be caused by diverse diseases with different repercussions. The Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (*short.*: ARVC) is a degenerative disease of heart muscle and genetically transmitted. This disease can cause spontaneous heart arrhythmia or sudden cardiac death - plötzlicher Herztod (SCD) in the youth when the muscle is exposed to physical stress e.g. in sports. Profound knowledge of benign cells regarding their mechanical specifications can be acquired by the use of the atomic force microscope. A small tip in size of single atoms at the end of a spring, a so called cantilever, is used to measure cell properties in magnitude of μm for research how mechanical interactions affect function of cells. After the invention in 1986 the afm gained a huge benefit for analysing single cells and multiple soft material regarding their mechanical properties. The calculation of the elastic modulus of the cell nucleus is resting on the hertzian contact mechanics of 1886.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Rasterkraftmikroskopie	3
2.1.1	Aufbau	4
2.1.2	Kalibration	7
2.2	Elastizität	9
2.3	Hertz-Modell	10
2.4	Rheologie	12
2.5	Biologische Grundlagen	13
3	Methoden	15
3.1	Rasterkraftmikroskop	15
3.2	Software	19
3.3	Messungen	19
3.3.1	Statische Messmethode	19
3.3.2	Dynamische Messmethode	21
3.4	Zellkultur	23
3.5	Probenpräparation	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Ergebnisse statische Messungen	28
4.2	Ergebnisse dynamische Messungen	33
4.4	Diskussion und Fehlerbetrachtung	42
5	Zusammenfassung	43
A	Anhang	45
A.1	Abkürzungsverzeichnis	46
A.2	Lösung der Langevin Gleichung	48
A.3	MatLab Skripte	49
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	59
	Literaturverzeichnis	61

1 Einleitung

Das etwa faustgroße menschliche Herz ist eine hocheffiziente Pumpe, die für den Transport von Sauerstoff und Stoffwechselprodukten im Blut verantwortlich ist. Es besteht aus mehreren Kammern mit einzelnen Klappen, bei dem durch jede Kontraktion des Herzmuskels ein Volumen von etwa 0.08 Liter Blut befördert wird. Der Herzmuskel kontrahiert während der gesamten Lebenszeit ca. 3 Milliarde mal und transportiert eindrucksvolle $2,46 \cdot 10^8$ L Blut durch das Adersystem des menschlichen Körpers [1]. Zwar kann der Muskel durch kontinuierliches Training um bis zu 10% vergrößert werden, jedoch kommt es unter natürlichen Voraussetzungen zu keinen Ermüdungserscheinungen wie in der Skelettmuskulatur.

Taktgebend für die Kontraktion des Herzmuskels ist ein System aus Erregungsleitungen, das unter Ruhebedingungen ca. 60 Impulse pro Minute erzeugt. Eine strukturelle Schädigungen des Muskels kann Störungen des Erregungskomplexes in Form von Arrhythmien oder den plötzlichen Herztod hervorrufen. Bei der Arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (ARVC) kommt es zu einer Degeneration einzelner Herzmuskelzellen gefolgt von der Einlagerung von Binde- und Fettgewebe. Für die ARVC auslösende Mechanismen konnten verschiedene Gen-Mutationen gefunden werden, die die Elastizität der Zellkerne negativ beeinflussen.

In dieser Arbeit werden Zellkernelastizitäten vier verschiedener Zelllinien als Blindproben am Rasterkraftmikroskop vermessen. Bei der Rasterkraftmikroskopie können Wechselwirkungskräfte mit einer feinen Spitze an einem Federbalken in Größenordnungen von Pikonewton gemessen werden[2]. Die Gen-Mutationen der Lamine, Intermediärfilamente der inneren Zellkernmembran, werden auf die Veränderung der mechanischen Eigenschaften untersucht und mit der Kontrolllinie und vorherigen Ergebnissen verglichen. Die Zellen stammen von der Arbeitsgruppe von Peter Bross der Universität Aarhus und wurden vom Herz- und Diabeteszentrum Bad Oeynhausen (HDZ NRW) kultiviert.

2 Theoretische Grundlagen

In dem folgenden Kapitel wird die allgemeine Funktionsweise der Rasterkraftmikroskopie beschrieben. Weiterhin werden die theoretischen Grundlagen der Messmethodik und der Kraft-Spektroskopie erläutert. An diversen Stellen werden englische Begriffe und Abkürzungen (vgl. Abkürzungsverzeichnis A.1) eingeführt, die sich in der Rasterkraftmikroskopie etabliert haben und gebräuchlich sind.

2.1 Rasterkraftmikroskopie

Die erstmalige Vorstellung der Rasterkraftmikroskopie geht auf das Jahr 1986 und die Entwickler G. Binnig, C.F. Quate und Ch. Gerber zurück [3]. Das Rasterkraftmikroskop (*engl.*: AFM) ist eine Weiterentwicklung des Rastertunnelmikroskops [4] und gehört zu den Rastersondenmikroskopen, bei denen mittels einer Sonde eine Probe piezogesteuert abgerastert wird. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie wird das Bild nicht mittels optischer Abbildung, sondern über die Wechselwirkungen zwischen Probe und Sonde im Kontakt oder im Nahfeld erzeugt. Ausschlaggebend für die Auswahl der Mikroskopiearten sind die zu untersuchenden Wechselwirkungen und Probeneigenschaften, die unterschiedliche Anforderungen an das Gerät stellen. Einfache Prinzipien sind die Detektion elektrischer oder magnetischer Kräfte die auf der elektrostatischen und magnetostatischen Wechselwirkung beruhen [Ch.11.2 und 12.2][5].

In der optischen Nahfeldmikroskopie (*engl.*: SNOM) können Objekte in der Größenordnung von [nm] trotz Abbe'scher Beugungsbegrenzung mittels optischer Methoden untersucht werden. Im Nahfeld wird die Probe beispielsweise durch einen Lichtwellenleiter mit einer Spitzenöffnung von $\leq 100\text{nm}$ beleuchtet und das gestreute Licht im Fernfeld analysiert [6]. Bei der Rasterionenleitfähigkeitsmikroskopie (*engl.*: SICM) wird die Ionenleitfähigkeit in einer Elektrolytlösung mit einer Kapillare als Sonde untersucht. Der abstandsabhängige Ionenstrom bei Annäherung der Sonde an eine nicht oder schlecht leitende Probe dient als Bildgebung [7]. Mit dem SICM können beispielsweise Ladungsverteilungen an (Kern- oder Polymer-)Poren

vermessen werden. Bei der Rastertunnelmikroskopie (*engl.*: STM) wird ein abstandsabhängiger Tunnelstrom in der Größenordnung von nano- bis piko-Ampere gemessen, welches eine Leitfähigkeit der Probe sowie der Spitze voraussetzt [8, Ch. 1.1-1.3]. Für eine biologische oder schlecht leitende Probe eignet sich neben dem SICM das Rasterkraftmikroskop. Der Aufbau bei dem AFM ermöglicht die Messung an Luft oder in Flüssigkeit und somit das Aufrechterhalten physiologischer Bedingungen während des gesamten Messprozesses.

2.1.1 Aufbau

Die Kraftwechselwirkung im Rasterkraftmikroskop wird durch eine sehr feine Spitze am Ende eines Federbalkens (*engl.*: cantilever) detektiert. Die Spitze besitzt ideal einen Radius von wenigen Nanometern und die molekularen Kräfte im Nahfeld führen zu einer mechanischen Auslenkung des Cantilever.

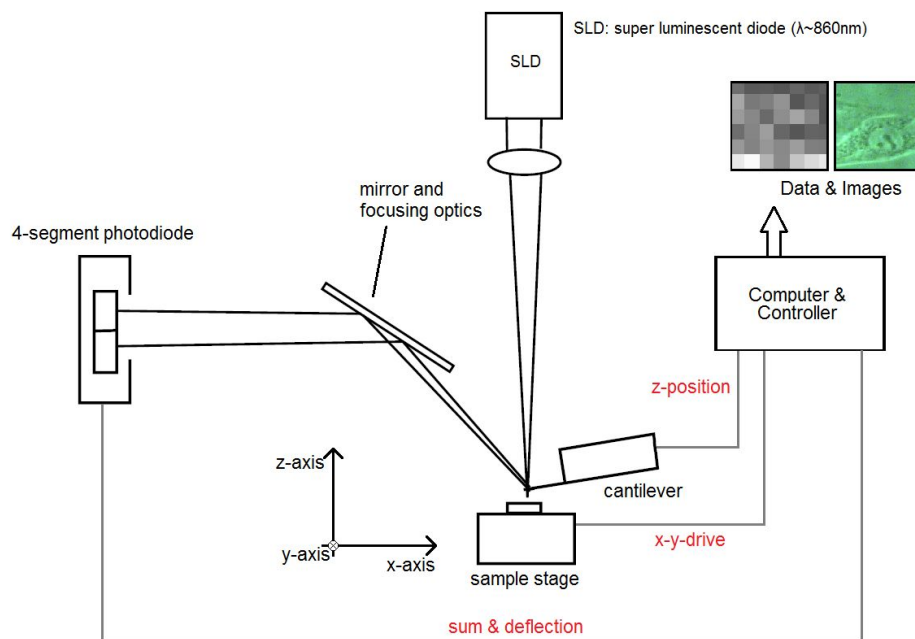


Abb. 2.1.1: Schematischer Aufbau des Rasterkraftmikroskopes (Vorlage nach [9, S.4]). Bestimmung der Auslenkung des Cantilevers mit der Lichtzeigermethode und einer Superlumineszenzdiode als Lichtquelle

Wechselwirkungskräfte Die Wechselwirkungen der Spitze des Cantilevers mit der Probenoberfläche sind von unterschiedlichen Faktoren wie der Reichweite der Kräfte, dem Abstand zwischen Sonde und Probe und den Umgebungsbedingungen abhängig. Unterschieden wird zwischen den kurz- und den langreichweitigen Kräften.

Die hier relevanten attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen [5, Ch. 13.2.] werden folgend kurz erläutert.

- attraktiv: Van-der-Waals-Kraft, Kapillarkraft, Coulombkraft
- repulsiv: Pauli-Abstoßung, Coulombkraft

Die **Van-der-Waals-Kräfte** beinhalten molekulare Wechselwirkungen, die durch permanente oder induzierte Dipole entstehen [10]. Sie gehört zu der langreichweitigen Wechselwirkung im Bereich von 100nm und für zwei makroskopische Körper ist das Van-der-Waals Potential $V_{\text{vdw}}(z) \propto r^{-6}$ [5, S.188]. Eine Besonderheit stellt die **Kapillarkraft**, die lediglich für Messungen an Luft (vgl. Abb. 2.1.3 —retrace) relevant ist. Ein dünner Film von Kondenswasser sorgt bei einem Kontakt der Sonde mit der Oberfläche für eine Wasserkapillare, die zusätzlich die Adhäsionskräfte (vgl. Abb. 2.1.3 F_{adh}) der Spitze beim Anheben verstärkt [11]. Für die Messung in Flüssigkeiten kommt dieser Effekt nicht zum Tragen.

Die Coulomb-Kraft F_C beschreibt die Wechselwirkung zwischen zwei Ladungen Q_1 und Q_2 , die je nach Vorzeichen sowohl attraktiv als auch repulsiv sein kann und gehört zu den **elektrostatischen Wechselwirkungen**. Bei diesen müssen Ladungsverteilungen im langreichweitigen Bereich mehrerer 100nm berücksichtigt werden. Für die Coulomb-Kraft gilt die Abstandsabhängigkeit $F_C \propto r^{-2}$ und zusätzlich noch $F_C \propto 1/\epsilon$, wobei ϵ die Dielektrizitätskonstante der Umgebungsbedingungen beschreibt. Als Beispiele für ϵ können hier an Luft(0°C): $\epsilon \simeq 1$ und in Wasser: $\epsilon = 81$ [12] angegeben werden. Folglich sind die Coulombkräfte in Wasser 81 mal kleiner als an Luft. Die **Pauli-Abstoßung** beschreibt quantenmechanisch die Wechselwirkung zwischen Atomen in kurzer Reichweite von unter 0.1nm^1 . Resultierend ist die repulsive Kraft aus der Überlappung der Elektronenwellenfunktionen unterschiedlicher Atome im direkten Kontakt von Spitze und Probe. Grundlegend sorgt hierbei das Aufenthaltsverbot von Elektronen mit gleichen Quantenzahlen für ein Anheben der Elektronen in höhere Energiezustände.

Das Gesamtpotential in mikroskopischer Betrachtung aus polarisierenden Wechselwirkungen und quantenmechanischen Phänomenen lässt sich durch das Lennard-Jones-Potential [5, (13.32)] beschreiben:

$$V(r) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right] \quad (2.1)$$

Hierbei werden nur die konservativen Anteile der Kraft berücksichtigt (somit nicht die Kapillarkraft) und die Konstanten sind σ , der Abstand von zwei Atomzentren, und ϵ , eine Materialkonstante. Das Minimum des Potentials ergibt sich durch $V_{\text{min}} = -\epsilon$ bei einem Abstand von $r_{\text{min}} = \sqrt[6]{2} \sigma$. Der erste Faktor $\left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12}$ ist für $r < \sigma$

¹Größe eines Atoms (Atomkern und Elektronenwolke) $\simeq 1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$

stark repulsiv aufgrund des Pauli Prinzipes. Für $r > \sigma$ ist der zweite Faktor $\left(\frac{\sigma}{r}\right)^6$ ausschlaggebend für die langreichweitige, attraktive Wechselwirkung im Lennard-Jones-Potential.

Kraftmessung Mit der Lichtzeigermethode (*engl.*: optical beam deflection) wird ein Laserspot auf die Rückseite des Federbalkens fokussiert und der Reflex über ein Spiegelsystem mittig auf einer „4-Quadranten-Photodiode“ [13] positioniert. Wird nun der Cantilever in Probennähe gebracht und ausgelenkt, so führt die Auslenkung x des Federbalkens direkt zu einer Laserverschiebung auf der Photodiode [5, Ch. 10]. Nach dem Hookeschen Gesetz gilt für die Auslenkung einer Feder

$$F = -k x \quad (2.2)$$

bei der die Kraft F proportional zur Auslenkung multipliziert mit der Federkonstante k ist. Die Auslenkung x (*engl.*: deflection) wird direkt gemessen über die Spannung $U_{\text{defl.}}$.

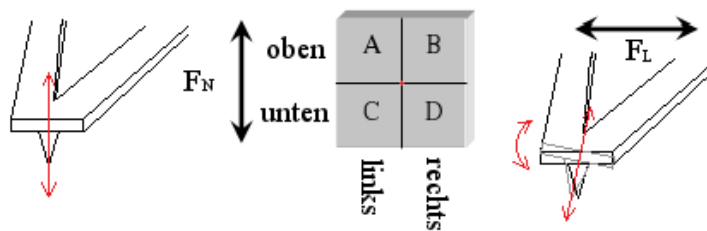


Abb. 2.1.2: Auslenkung des Cantilevers und des Lasers auf der 4-Quadranten-Photodiode bei unterschiedlicher Krafteinwirkung (Lateral-kraft für Abbildung im Kontaktmodus)

Die gemessenen Teilspannungen U_i der vier Segmente $[A, B, C, D]$ werden in der Steuersoftware verarbeitet und dienen als Regelsignal für die vertikale Position. Weiterhin kann nach vorheriger Kalibration die Auslenkung direkt als Krafrichtung und -größe ausgegeben werden. Als Grundintensität des Reflexes auf der Photodiode wird die Summe aller vier Teilspannungen der Quadranten gebildet: $U_{\text{sum}} = \sum U_i$. Für die Auslenkung in vertikaler Richtung (z-Achse) ergibt sich U_{defl} als Differenz der oberen und unteren Segmente: $U_{\text{defl}} = U_A + U_B - U_C - U_D$. Der Vollständigkeit halber gilt für das Signal bei einer Torsion des Cantilevers die Differenz der linken und rechten Segmente: $U_{\text{lat}} = U_A + U_C - U_B - U_D$.

2.1.2 Kalibration

Für die direkte Bestimmung der Kräfte nach (2.2) muss die Federkonstante k jedes Cantilevers auch aufgrund abweichender Herstellerangaben vorab kalibriert werden. Die hier verwendete Kalibrationsmethode beruht auf dem thermischen Rauschspektrum (vgl. Abb. A.0.1). Für die verallgemeinerte Beschreibung der Cantilever Bewegung mittels **Hamilton-Funktion**[14] im Phasenraum gilt:

$$\mathcal{H}(p, q) = \frac{p^2}{2m} + V(q) \quad (2.3)$$

Der erste Teil beschreibt die kinetische Energie und $V(q)$ die potentielle Energie. Nun kann der Cantilever durch einen eindimensionalen harmonischen Oszillator mit einem Freiheitsgrad in der z -Achse beschrieben werden. Für die potentielle Energie des harmonischen Oszillators gilt:

$$V(q) = \frac{1}{2} m \omega_0^2 q^2 \quad (2.4)$$

In (2.3) und (2.4) beschreiben p den Impuls, m die Masse, ω_0 die Resonanzfrequenz und q die Auslenkung des Cantilevers. Nach dem Äquipartitionstheorem gilt für die mittlere Energie pro Freiheitsgrad f

$$\langle E \rangle = \frac{f}{2} k_B T \quad (2.5)$$

mit der Boltzmann-Konstanten k_B und der Temperatur T , wobei $\langle E \rangle$ gleich der potentiellen Energie $V(q)$ entspricht. Für $f = 1$ folgt $\langle E \rangle = 1/2 k_B T$ und mit der Substitution $\omega_0^2 = \frac{k}{m}$ folgt für die Federkonstante [15]:

$$k = \frac{k_B T}{\langle q^2 \rangle} \quad (2.6)$$

Die mittlere quadratische Auslenkung $\langle q^2 \rangle$ erhält man aus der Lösung der Langevin-Gleichung für einen gedämpften harmonischen Oszillator [16]. Das Integral der Lösung im Frequenzraum entspricht hier der Fluktuation in der Spannung $\langle \delta V^2 \rangle$, die mit einem Korrekturfaktor χ^2 [17] und dem Faktor $InvOLS^2$ multipliziert werden muss (siehe A.2). Der Faktor $InvOLS$ (*engl.*: inverted optical lever sensitivity) beschreibt die Inverse der Sensitivität OLS und wird mittels einer Kraft-Distanz-Kurve auf einer harten Oberfläche (z.B. Gold oder Glas) bestimmt (vgl. Abb 2.1.3).

$$InvOLS = \frac{\Delta z [\text{nm}]}{\Delta Defl [\text{V}]} \quad (2.7)$$

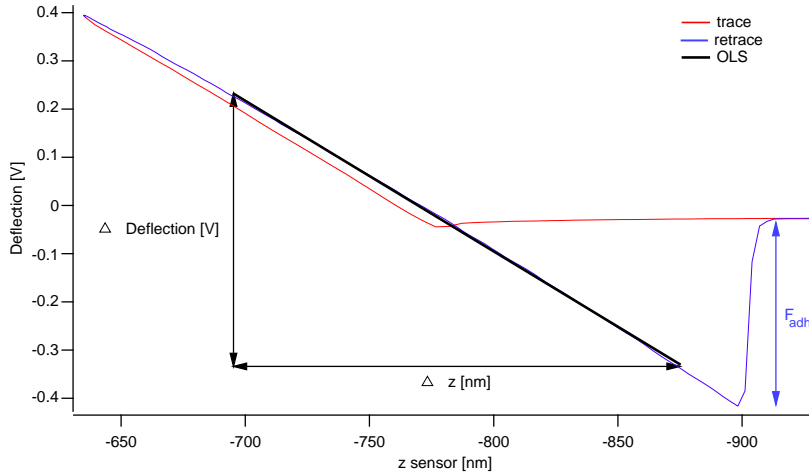


Abb. 2.1.3: Einzelkraftkurve auf Glass für die Kalibration der *OLS* (engl.: optical lever sensitivity). Triggerpunkt der Auslenkung $Defl = 0.4[V]$

Aus dem inversen der Steigung *OLS* kann zunächst die Auslenkung $Defl[nm]$ bestimmt werden über:

$$Defl[nm] = InvOLS \left[\frac{nm}{V} \right] \cdot Defl[V] \quad (2.8)$$

Anschließend kann mit der Auslenkung $Defl[nm]$ direkt die auf den Cantilever wirkende Kraft berechnet werden:

$$F [pN] = Defl[nm] \cdot k \left[\frac{pN}{nm} \right] \quad (2.9)$$

Mittels piezoelektrischer Stellelemente kann nun sowohl der Cantilever auf die Oberfläche (z -Achse) gesenkt werden und bis zu einer zuvor eingestellten Kraft den Körper eindrücken (vgl. 2.3 Hertz-Modell), als auch die Probe in der x - y -Ebene verfahren werden. Der **piezoelektrische Effekt**[8, Ch.9] beruht auf der Eigenschaft von Materialien, die durch ihre kristalline Struktur über ein ausgerichtetes elektrisches Dipolmoment verfügen. Setzt man ein piezo-sensitives Material einem elektrischen Feld aus, so führt dies zu einer proportionalen Dehnung oder Stauchung (inverser piezoelektrischer Effekt). **Einzelkraftkurven** und das Abrastern der Oberfläche ermöglichen Topographieaufnahmen, Adhäsionsbestimmungen und die Berechnungen von Probencharakteristika wie dem Elastizitätsmodul.

Abbildungsmodi

Für die Abbildung in der Rasterkraftmikroskopie stehen unterschiedliche Modi zur Verfügung. Zum einen der (statische) Kontakt-Modus (engl.: contact mode) und zum anderen die dynamischen Modi. Bei diesen oszilliert der Cantilever und schwingt nur

im Nahfeld (*engl.*: non contact mode) der Probe oder in direktem Kontakt (*engl.*: tapping mode).

stat. Bei dem **Kontaktmodus** wird die Spitze in dauerhaftem Kontakt über die Probe gefahren. Hierbei kann die Oberfläche mit konstanter Kraft (*engl.*: constant force mode) oder konstanter (z-Piezo) Höhe (*engl.*: constant height mode) vermessen werden.

dyn. Für die **dynamische Abbildung** wird der Cantilever durch eine periodische Spannungsänderung an dem z-Piezo nahe seiner Eigenfrequenz f_0 zum schwingen gebracht. Eine Phasenverschiebung $\Delta\varphi$, sowie eine Amplitudenveränderung, resultierend aus der Wechselwirkung mit der Probe, werden detektiert. Neben dem Höhenprofilbild erhält man zusätzlich das Amplituden- und Phasenbild.

2.2 Elastizität

Wird ein Körper einer Normalkraft (\vec{F}_n ist senkrecht zur Fläche A) F_n ausgesetzt, so beschreibt die (dimensionslose) Dehnung $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}$ [18, S.478] (*engl.*: strain) eine relative Längenänderung Δl zur Ausgangslänge l . Mit der auf eine Querschnittfläche A wirkenden Normalkraft wird die (Zug-) Spannung $\sigma \left[\frac{\text{N}}{\text{m}^2} \right]$ (*engl.*: stress) definiert als:

$$\sigma = \frac{F_n}{A} \quad (2.10)$$

Hierbei wird der Spezialfall einer eindimensionalen Verformung betrachtet (mehrdimensionale Beschreibungen erfordern Vektor- und Tensorschreibweise vgl. [19, Kapitel I.]), die bis zu einer Proportionalitätsgrenze [18] einen linearen, elastischen Zusammenhang beschreibt. Eine weitere Erhöhung der Kraft führt im Allgemeinen über den linearen Bereich hinaus und gehört zu der plastischen Verformung. Für den linearen Bereich ist das Verhältnis zwischen Spannung σ und Dehnung ε beschrieben durch das **Hooke'sche Gesetz** und wird durch eine materialabhängige Konstante E beschrieben:

$$E = \frac{\text{Spannung}}{\text{Dehnung}} = \frac{\sigma}{\varepsilon} \quad \left[\frac{\text{N}}{\text{m}^2} = \text{Pa} \right] \quad (2.11)$$

Diese Konstante nennt man Elastizitätsmodul (kurz: E-Modul) oder aus dem englischen „Young's modulus“ und ist für die weitere Analyse bedeutsam. Die Elastizität liegt für biologische Zellen im Bereich von 0.5 bis 100 kPa und ist von vielen Faktoren der Zellregionen und -bestandteile abhängig [20].

2.3 Hertz-Modell

Die Elastizitätsbestimmung basiert auf der Theorie von dem Kontakt zweier Körper und den daraus resultierenden Berührungsflächen von Heinrich Hertz aus dem Jahr 1881 [21]. Die Steifheit S einer Kontaktfläche A mit Radius a resultiert aus der differentiellen Veränderung der Kraft F durch die Eindringtiefe d [22]:

$$S = \frac{\partial F}{\partial d} = \kappa a E^* \quad (2.12)$$

Hierbei gibt E^* das effektive Elastizitätsmodul wieder und κ ist abhängig von der Spitzengeometrie und der Poissonzahl ν . Für verschiedene Spitzenarten liegt κ zwischen $\pi/2(1-\nu^2)$ und $2/(1-\nu^2)$ [23]. Wir verwenden hier einen Wasserbalg als Modell des Zellkerns und damit gilt $\nu_{\text{sample}} = 0,5$ für inkompressible Materialien. Die Kraft auf die Kontaktfläche resultiert aus der Spitzengeometrie (Geometriefaktor Γ), der Eindringtiefe d und ist:

$$F = \left(\frac{E^*}{1 - \nu_{\text{sample}}^2} \right) \Gamma d^2 \quad (2.13)$$

Für eine konische Spitze ist $\Gamma = \frac{2}{\pi} \tan(\alpha)$ und für eine pyramidenförmige Spitze gilt $\Gamma = \frac{1}{\sqrt{2}} \tan(\alpha)$, mit α als halbem Öffnungswinkel der Spitze [25][20]. Resultierend aus dem effektiven Elastizitätsmodul E^* folgt nun für das Elastizitätsmodul der Probe [22, S. L387]:

$$E_{\text{sample}} = (1 - \nu_{\text{sample}}^2) \cdot \left(-\frac{(1 - \nu_{\text{tip}}^2)}{E_{\text{tip}}} + \frac{1}{E^*} \right)^{-1} \quad (2.14)$$

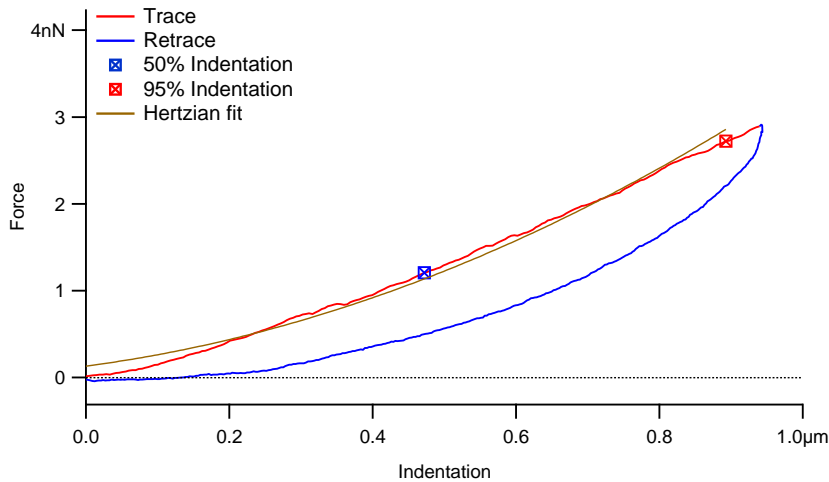
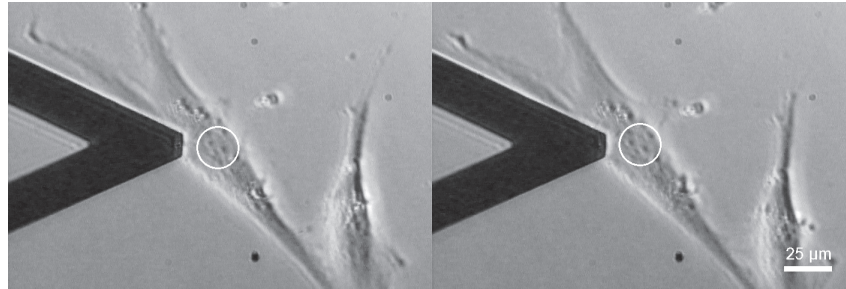
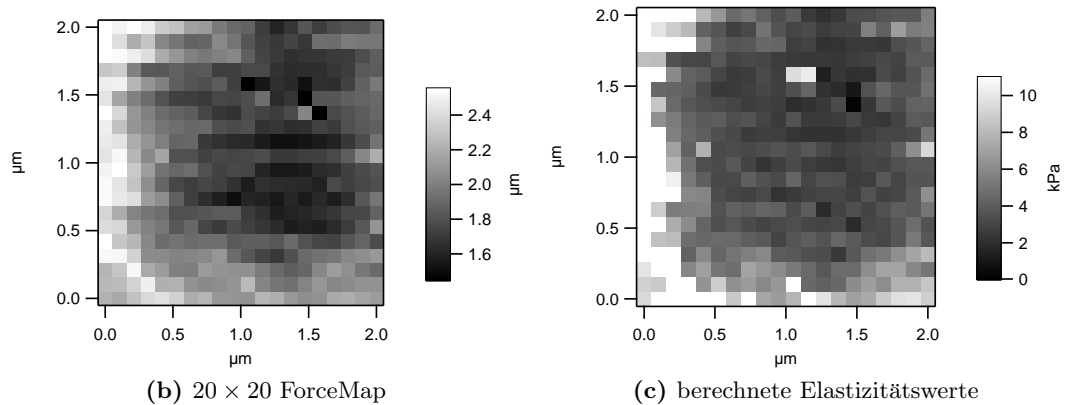


Abb. 2.3.1: Einzelne Kraft-Distanz-Kurve mit Hertz Fit über den relativen Eindrückbereich von 50-95% bei gegebener Triggerkraft von $F_{\text{trig}} = 2\text{nN}$

Für die Berechnung des Elastizitätsmoduls werden einzelne Kraft-Distanz-Kurven aufgenommen und das effektive E-Modul E^* über den Fit des Hertz-Modells in einem gewählten Intervall der Eindringtiefe (vgl. Abb. 2.3.1 —Hertzian fit) bestimmt. Anschließend kann das Elastizitätsmodul der Probe mit Gleichung (2.14) berechnet werden. Die so gewonnen Informationen werden in einer sogenannten „Force Map“ gespeichert. Hierbei entspricht eine Kraftkurve einem Pixel in der Force Map und die Größe des Scanbereiches wird vorab in der Messsoftware festgelegt.



(a) Cantilever am linken Bildrand; Zellkern eingekreist



(b) 20×20 ForceMap

(c) berechnete Elastizitätswerte

Abb. 2.3.2: (a) Phasenkontrastbild für den optischen Vergleich vor und nach der Messung (ForceMap0009, Dipper 1, 07.03.2016) mit dem gemessenen (b) Höhenprofil auf dem Zellkern und den berechneten Elastizitätswerten dargestellt als (c) Elastizitätsprofil

2.4 Rheologie

Für die vergleichenden dynamischen Messungen müssen Erweiterungen der statischen Elastizitätsmessungen gemacht werden. Es wird hierbei eng an die Messroutine von Jonathan Schröder [26] angeknüpft. Das nicht rein elastische Verhalten von Zellen, führt zu der Zuhilfenahme der zeitabhängigen Rheologie, die sich mit dem Verformungs- und Fließverhalten von viskoelastischen Materialien beschäftigt [2]. Der Zusammenhang von Elastizitätsmodul und Schermodul ist durch

$$G = \frac{E}{2(1+\nu)} \quad \text{mit} \quad G = \frac{\tau}{\gamma}$$

gegeben. Hierbei ist τ [Nm⁻²] die Scherspannung und $\gamma = \tan(\theta)$ die Scherung mit dazugehörigen Scherwinkel θ [18, S.481][19]. Die Grundlegende Methode beruht hierbei auf einer kleinen Oszillation unterschiedlicher Frequenzen (ω) bei direktem Kontakt mit dem Zellkern. Über die Betrachtung des komplexen Schermoduls $G^*(\omega)$ kann die Phasenbeziehung zwischen periodischer Anregung und Antwort des Systems analysiert werden. Die folgende Formel von Alcaraz [27] beinhaltet eine Taylor-Approximation erster Ordnung für kleine Amplitudenänderungen um d_0

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + i \cdot G''(\omega) = \frac{1-\nu}{4d_0\Gamma} \left(\frac{F(\omega)}{d(\omega)} - i\omega b(h_0) \right) \quad (2.15)$$

In Formel 2.15 beschreibt G' das Speichermodul (*engl.*: storage modulus) der elastischen Verformungsenergie, und G'' das Verlustmodul (*engl.*: loss modulus) der Dissipation in der Probe. Das Verhältnis der Kraftoszillation zu Auslenkungsoszillation beruht auf der Phasenverschiebung zwischen Amplitudenverhältnis bei der Kraftauslenkung zu Eindrücktiefe multipliziert mit dem komplexen Phasenfaktor.

$$\frac{F(\omega)}{d(\omega)} = \frac{A_F(\omega)}{A_d(\omega)} \exp(i(\varphi_{F(\omega)} - \varphi_{d(\omega)})) \quad (2.16)$$

Mit dem Quotienten $\eta = G''/G'$ wird der Verlustfaktor (*engl.*: loss tangent) beschrieben, mit dem eine Aussage über das elastische ($\eta \ll 1$) oder viskose ($\eta \gg 1$) Verhalten der Probe getroffen werden kann [27]. Im imaginären Teil beschreibt $b(h)$ einen Korrekturfaktor des hydrodynamischen Widerstands.

$$b(h) = \frac{6\pi\zeta a_{\text{eff}}^2}{h + h_{\text{eff}}} \quad (2.17)$$

Der Korrekturfaktor resultiert aus der Messung in einem viskosen Medium (Viskosität ζ), bei der die relative Phasenverschiebung φ_{lag} kleiner Oszillationen der Kraftanregung $\varphi_{F(\omega)}$ zur Auslenkungsphase $\varphi_{d(\omega)}$ korrigiert werden muss. Als Funktion abhängig von der Höhe h und zwei Fit-Parametern für die effektive Cantilevergeome-

trie a_{eff} und h_{eff} , werden für unterschiedliche Frequenzen und Abstände zur Probe jeweils die Amplituden- und Frequenzverhältnisse aufgetragen. Aus der Funktion $b(h)$ kann anschließend der Wert für den direkten Kontakt $b(h_0)$ extrapoliert werden [2, Supplementary Information].

Rheologisches Modell Für die dynamische Elastizitätsmessung und den Fit für das komplexe Schermodul $G^*(\omega)$ bedient man sich dem Modell der strukturellen Dämpfung [26][27]:

$$G^*(\omega) = \bar{G}_0 (1 + i\vartheta) \left(\frac{\omega}{\omega_0} \right)^\alpha + i\omega\mu \quad (2.18)$$

Hierbei beschreibt $\vartheta = \tan(\alpha\pi/2)$ den Koeffizienten der strukturellen Dämpfung, \bar{G}_0 einen Skalenfaktor für das Speicher- und Verlustmodul, μ ist die Viskosität der Probe und ω_0 wird zur Vereinfachung gleich 1 gesetzt.

2.5 Biologische Grundlagen

Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie Erstmalig 1978 beschrieben, handelt es sich bei der Arrhythmogenen rechtsventrikulären Kardiomyopathie (*engl. short: ARVC*) um eine degenerative Herzmuskelerkrankung am rechten Ventrikel (*med. Ventri- culus cordis dexter*). Hierbei tritt ein Verlust der Herzmuskelzellen gefolgt von der Einlagerung von Binde- und Fettgewebe auf. Die Veränderung kann Störungen der Erregungsleitung hervorrufen, die sich im Elektrokardiogramm durch die Analyse des QRS-Komplexes[28] darstellen lassen. Diese Störung kann, unter weiteren physiologischen Einflüssen wie z.B. mechanischer Beanspruchung im Sport den plötzlichen Herztod (*engl.: scd*) hervorrufen. Die ARVC wird autosomal-dominant vererbt und tritt bei Männern häufiger als bei Frauen auf. Die Krankheitshäufigkeit liegt zwischen 1:2000 bis 1:5000 [29]. Die genauere Analyse ARVC auslösender Mechanismen liefert bis heute die Erkenntnisse mehrerer Gen-Mutationen, die desmosomale Proteine kodieren. Diese sind für den Zell-Zell-Kontakt sowie die mechanische Stabilität verantwortlich.

Zellkern Zellen beschreiben „[...] die einfachste Funktionseinheit eines größeren Systems [...]“ [30, S.131] und besitzen somit je nach Funktion spezifische Eigenschaften. Der Aufbau besteht bei allen Zellen aus einer Plasmamembran, in denen die Zellorganellen und -bestandteile in der Zellflüssigkeit, dem Cytosol, eingebettet sind. Eukaryotische Zellen besitzen einen Zellkern (auch Nukleus) in dem sich die DNA befindet.

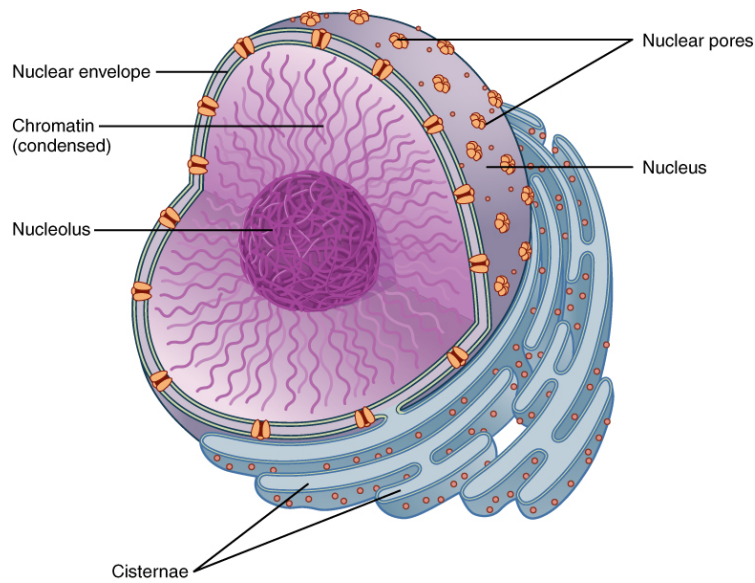


Abb. 2.5.1: Zellkern (Nucleus), Endoplasmatisches Retikulum mit Hohlräumen (Cisternae), Kernkörper (Nukleolus), Chromatinfilamente, Kernhülle (Nuclear envelope) und Kernporen (Nuclear pores) - Nucleoli und Chromatinfilamente bilden den Großteil des Karyoplasmas [31, unbearbeitet]

Die Hülle des Zellkerns besteht aus zwei Membranen (Lipiddoppelschichten), die das Karyo- oder Nukleoplasma vom Cytoplasma trennen und von etlichen Kernporen durchzogen sind. Die Kernporen sind für Regulationsmechanismen von Makromolekülen und Proteinen verantwortlich. Der Abstand der beiden Membranen liegt zwischen 20 – 40 nm. Für den Zellkern strukturgebend ist die Kernlamina, die an der Innenseite der Zellkernmembran befindlich ist und aus einem netzartigen Proteinfilament besteht [30]. Gen-Mutationen am Lamin können die mechanischen Eigenschaften des Zellkern negativ beeinflussen und werden mit der Herzmuskelerkrankung ARVC in Zusammenhang gebracht.

3 Material und Methoden

3.1 Rasterkraftmikroskop

Die Messapparatur MFP-3D-BIO™ der Firma Asylum Research (*Asylum Research, Santa Barbara, CA 93117, USA*), kombiniert ein invertierendes Lichtmikroskop, Olympus IX71 (*Olympus, Tokyo, Japan*), mit einem Rasterkraftmikroskop. Für die Elastizitätsmessung an lebenden Zellen ermöglicht die Haltevorrichtung *Bio-Heater* (*Asylum Research*) zusätzlich das Aufrechterhalten der physiologischen Bedingungen auch außerhalb des Brutschrankes. Hierfür werden die *WillCo-dish*®-Glassbodenpetrischalen auf dem *Bioheater* mit einem Magnethalter montiert. Ein dünner Film aus Immersionsöl verbessert zusätzlich die Wärmeleitung von Bioheater zur Petrischale. Die Temperaturregelung übernimmt die Erweiterung der Fa. *Asylum Research* in der Messsoftware IGOR während des gesamten Messintervalls (vgl. Abb. A.0.2). Zusätzlich befindet sich eine Gummilippe am Cantilever-Halter die sowohl die Verdunstung von Medium reduziert und gleichzeitig das *WillCo-dish* von der Messumgebung abkapselt.

Das Herzstück des Aufbaus ist der Messkopf (vgl. AFM Head Abb. 3.1.1), der neben der Optik das Piezo-Element für die Cantilever-z-Achsen Positionierung beherbergt. In x- und y-Richtung kann der Cantilever mit dem Objektstisch (*engl.: Stage*) je ca. 90µm verfahren werden und dabei Höhendifferenzen (z-Achse) von ca. 15µm vermessen [33]. Mit dem Proben-Tisch des MFP-3D-Bio kann separat der Messkopf und der *BioHeater* mit dem *WillCo* relativ zum Objektiv des Durchlichtmikroskops verschoben werden. Die Positionierung des Cantilevers im optischen Sichtfeld des Durchlichtmikroskops, sowie die Verschiebung der Probe unter dem Cantilever erlauben eine hohe Flexibilität in der Probenvermessung. Weiterhin kann über die Steuersoftware (bei vollständiger Kalibrierung der CCD-Pixelgröße) mit der Funktion region of interest (ROI) ein Bereich im Live-Bild der Kamera ausgewählt werden, der automatisch angefahren und mit der definierten Rastergröße vermessen wird.

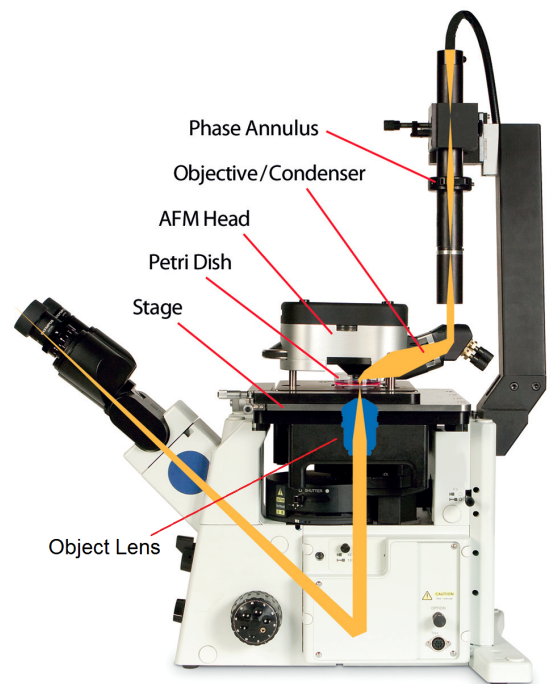


Abb. 3.1.1: Asylum MFP-3D-Bio™ mit Ringblende (*engl.: Phase Annulus*) und Objektiv (*engl.: Object Lens*) mit Phasenring [32]



Abb. 3.1.2: Messaufbau Rasterkraftmikroskop mit (1)Vibrations-Isolations-Tisch [TableStable TS-300LT] (*JRS Scientific Instruments, 8932 Mettmenstetten, Switzerland*), (2)AFM-Kopf, (3)Olympus IX71, (4)Kamera für Laserausrichtung, (5)Controller, (6)Messrechner mit IGOR und einer (S) Schallschutzbox

Die Datenaufnahme der einzelnen ForceMaps erfolgte jeweils nach optischer Kontrolle der einzelnen Zellen (in der Petrischale). Für die spätere Auswertung wurde jeweils vorher und nachher eine Aufnahme mit der Kamera gemacht und für den direkten Vergleich skaliert und zusammengefügt (vgl. Abb. 3.1.3).

Dies hatte zwei Gründe. Zum Einen wurde somit die richtige Position der Spitze des Cantilever nach jeder ForceMap auf eventuelle Verschiebungen der Probe/Zelle oder des Zellkerns an sich kontrolliert. Zum Anderen konnte die Position der Nucleoli vor und nach der Messung verglichen werden, die ein Indiz für die Lokalisierung und Bewegungen des Zellkerns darstellen. Die Qualität des Messprozesses wird damit sehr hoch gehalten und es können sowohl einzelne ForceMaps für die Berechnungen des Elastizitätsmoduls ausgeschlossen sowie die optischen Bilder mit den Topographie-Aufnahmen verglichen werden.

Im Strahlengang befindet sich ein Infrarotfilter, der das Licht der Superlumineszenzdiode (SLD) ($\lambda = 860\text{nm}$) herausfiltert und zu der grünen Ansicht der Zellen führt. Für die Abbildung bei der Durchlichtmikroskopie wird der **Phasenkontrast**¹[34] verwendet, bei dem die relativen Phasenunterschiede in Intensitätsunterschiede umgewandelt werden [35, Ch. 2 S.7]. Dies wird verwendet, da lebende Zellen (in Mono-

¹nach Frederik „Frits“ Zernike (*1888-†1966), NP 1953

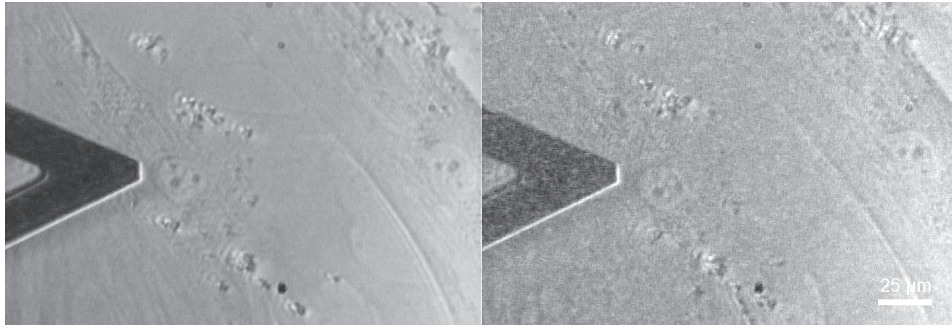


Abb. 3.1.3: Phasenkontrastbilder vor und nach der Messung (Force-Map0008, Dipper 1, 25.02.2016) für die optische Kontrolle des Zellkerns (MatLab Code Anhang **Optische Kontrolle A.3.2**)

oder Einzellage) als durchsichtige Objekte zu wenig Licht absorbieren um ein kontrastreiches Bild im Hellfeld zu erzeugen. Der Phasenkontrast wird durch eine relative Phasenverschiebung ausgelöst, die durch unterschiedliche Brechkraft (Brechzahl n) oder Dicken (d) der Zellbestandteile [36, Ch. 3.2 S.56] zustande kommen. hierfür wird im Strahlengang eine Ringblende (vgl. Abb. 3.1.1 Phase Annulus) (Ph2) mit dazugehörigem Phasenkontrastobjektiv eingebracht. Das durch die Ring- oder Phasenblende erzeugte Bild muss mittels Millimeterschrauben mit dem Phasenring im Objektiv in Deckung gebracht werden um eine möglichst kontrastreiche Bildgebung zu erzeugen [36, vgl. Bild 60, S.117].

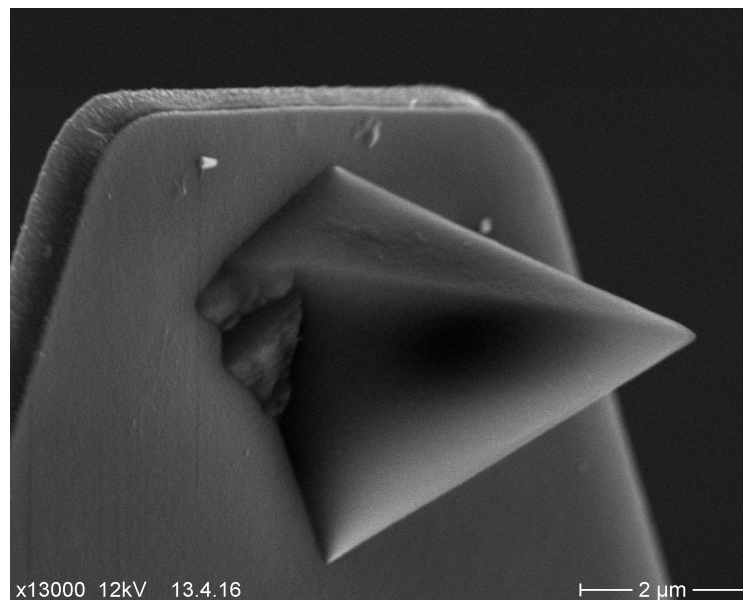
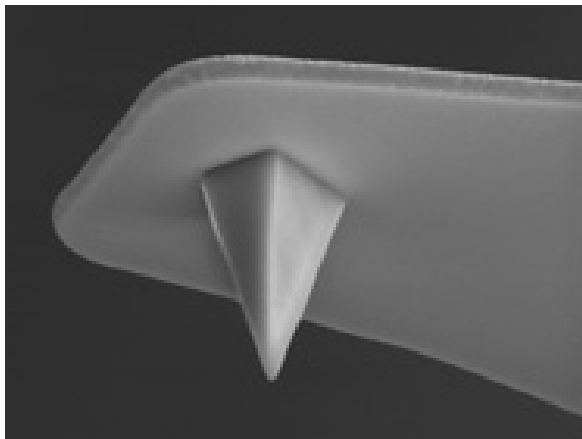


Abb. 3.1.4: Aufnahme der Spitze eines benutzten Cantilever (DNP-10 D) am Rasterelektronenmikroskop bei 13000-facher Vergrößerung [37]

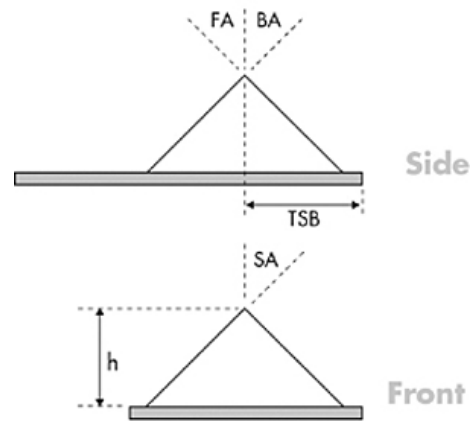
Cantilever Der benutzte Cantilever **DNP-10 Lever D** (*Bruker AFM Probes, Camarillo, CA 93012, USA*) wird sowohl für die elastischen als auch für die dynamischen Messungen verwendet. Kennzeichnend für diesen ist eine symmetrische Spitzengeometrie mit drei unterschiedlichen Winkeln (vgl. Abb. 3.1.5b), eine weiche Federkonstante und eine feine Spitze für den Kontakt mit der Probe. Je nach Messmodus wird entweder die direkte Auslenkung oder die Schwingungsamplitude gemessen. Für die verbesserte Reflexion des Laserspots bei der Lichtzeigermethode ist die Rückseite der Cantilever mit Gold beschichtet [38].

Tab. 3.1.1: Cantilever D Spezifikationen des Herstellers und Fit-Parameter

	Wert
Spitzengeometrie	symmetrische Pyramide
Frontwinkel	$\mathbf{FA} = (15,0 \pm 2,5)^\circ$
Rückseitenwinkel	$\mathbf{BA} = (25,0 \pm 2,5)^\circ$
Seitenwinkel	$\mathbf{SA} = (17,5 \pm 2,5)^\circ$
Spitzenradius (Nom)	20 nm
Material	Silicium Nitrid
Resonanzfrequenz	$f_0 \simeq 18 \text{ kHz}$ ($f_0 \in [12; 24] \text{ kHz}$)
Federkonstante	$k \simeq 0,06 \frac{\text{N}}{\text{m}}$ ($k \in [0,03; 0,12] \frac{\text{N}}{\text{m}}$)
$\frac{1}{2}$ Öffnungswinkel	19°
Poisson-Zahl	$\nu_{\text{tip}} = 0,25$
Elastizitätsmodul	$E_{\text{tip}} = 290 \text{ GPa}$



(a) Spitzenabbildung



(b) Winkel

Abb. 3.1.5: (a) Bild der Spitze und (b) geometrische Eigenschaften (vgl. Tab. 3.1.1) nach Herstellerangaben [38]

Der Fit für das Elastizitätsmodul in IGOR erlaubt die folgenden drei Spitzengeometrien: Zylinder, Kugel und Kegel. Die Einbindung der unterschiedlichen Geometriefaktoren Γ wurde hier aus zeitlichen Gründen nicht weiter verfolgt und es wurde die pyramidenförmige Tip-Geometrie mittels Kegel am besten approximiert.

3.2 Software

Die Steuerung und Regelung während des Messprozesses übernimmt IGOR Pro 6.22A (*WaveMetrics Inc., Lake Oswego, OR 97035, USA*) mit der Erweiterung der Fa. *Asylum Research* MFP3D (111111+1719).

Für die Auswertung und Verarbeitung der Daten konnte neben IGOR auch auf MatLab (Student Version) R2011a, sowie Version R2008a mit der 'curve fitting toolbox' der Firma *MathWorks* ® (*The MathWorks Inc., Natick, MA 01760, USA*) zugegriffen werden.

3.3 Messungen

3.3.1 Statische Messmethode

Die statische Messmethode beruht auf dem einfachen ForceMapping, bei dem ein vorgegebenes Raster, gegeben durch Forcelines und Forcepoints (im Folgenden kurz: $(l \cdot p)$), von Einzelkraftkurven aufgenommen wird. Die hier verwendete Größe des Scanbereiches beträgt $2 \times 2 \mu\text{m}$ und bestand aus 400 ($20 \cdot 20$) oder 600 ($24 \cdot 25$) Einzelkraftkurven. Je nach Zeitfenster pro Messung und Zellkerngröße für die gewünschte Auflösung kann dieser Wert variiert werden. Der Cantilever wird mit einer Geschwindigkeit von ca. $10 \frac{\mu\text{m}}{\text{s}}$ über der Probe verfahren und nimmt mit 0.5 Hz Einzel-Kraft-Kurven auf. Die aufgenommenen Daten ergeben ein Topographie- und eine Adhäsionsbild des Scanbereiches. Als Triggerkraft für die Eindrückung wird 2nN verwendet. Diese Kraft hat sich bei vorhergehenden Messungen als hinreichend groß erwiesen um den Zellkern nicht zu zerstören und gleichzeitig Zellbestandteile zwischen Zellkern und äußerer Zellmembran zu verdrängen.

Im 'Master Force Panel' unter 'Elastic' (IGOR) wird das Elastizitätsmodul nach Erstellung der Force Map ermittelt. Hierfür wird das Hertz-Modell im Bereich von 50 bis 95% relativer Eindrücktiefe an jede einzelne Kraftkurve angefitet. Somit können die Werte, die mit der selben Routine erfasst wurden, einfacher mit den berechneten verglichen werden. Die berechneten Elastizitätsmodule werden anschließend als Tabelle gespeichert und mithilfe von MatLab für die Auswertung anhand von Histogrammen weiterverarbeitet. Die MatLab-basierte Auswerteprozedur basiert auf vorhandenen Skripten von V. Walhorn und J.Schröder und wurde weiterentwickelt. Hierfür sind in dem Script `Messungen.m` (A.3.1) die jeweiligen Zelllinien mit zugehörigen Messtagen eingetragen.

Für die Auswertung wird die Funktion `Zelllinie.m` verwendet, die zwei Benutzereingaben erfordert.

Zunächst erfolgt die Abfrage der Zelllinie, die auf der Vereinfachung nach (Tab. 4.0.1) basiert und ausgewertet werden soll:

```
1 'Zelllinie (Dipper/Stan/Wendy/Ford):'
```

Anschließend wird die Intervallgrenze R für die Darstellung im Histogramm eingegeben.

```
1 'x-Range of Histogram x=[0,R][kPa]. Set R='
```

Hierbei kann R sowohl ein einzelner Wert, als auch ein Vektor aus mehreren Grenzen sein, die anschließend graphisch gespeichert werden. Für die Auswertung der Histogramme ist eine Routine in der Funktion eingebaut, die je nach Zelllinie einen Fit für die einzelnen Peaks benutzt und neben den Histogrammen auch die berechneten Parameter speichert. Die Ausgabe erfolgt für jedes Histogramm in eine Encapsulated Postscript-Datei `.eps` und die Messparameter werden in einer Text-Datei `.txt` gespeichert.

3.3.2 Dynamische Messmethode

Analog zu der statischen Messmethode wird der Cantilever wieder über dem Zellkern positioniert, jedoch das Raster und somit die Auflösung des Messbereichs verkleinert (ca. $10 \cdot 12$). Nach dem Anfahren und dem Erreichen der Triggerkraft verbleibt der Cantilever für eine bestimmte Zeit t_0 bei der Eindringtiefe d_0 und wird dann in Oszillation $d(\omega)$ versetzt. Hierfür wird das 'Indenter Panel' in IGOR verwendet mit dem der Cantilever durch die folgenden Frequenzen für die Zeiten t_i in Sekunden ab Erreichen der Triggerkraft von 2nN angeregt wird. Die Amplitude ist für alle Frequenzen auf 10nm festgelegt. Während der 6.5 s Messdauer geht der Kontakt zwischen Zellkern und Spitze nicht verloren und es wird die Phasenverschiebung zwischen der Anregung und Auslenkung bei unterschiedlichen Frequenzen zwischen 0 und 150 Hz detektiert. Anschließend wird der Cantilever wieder angehoben, sodass die Kraft auf 0nN zurück geht und der nächste Punkt angefahren werden kann.

Tab. 3.3.1: Indenter Funktion mit Frequenzen und Zeiten

$i =$	0	1	2	...							
Frequenz f_i [Hz]	0	10	20	30	40	50	75	100	125	150	0
Zeitdauer t_i [s]	1.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

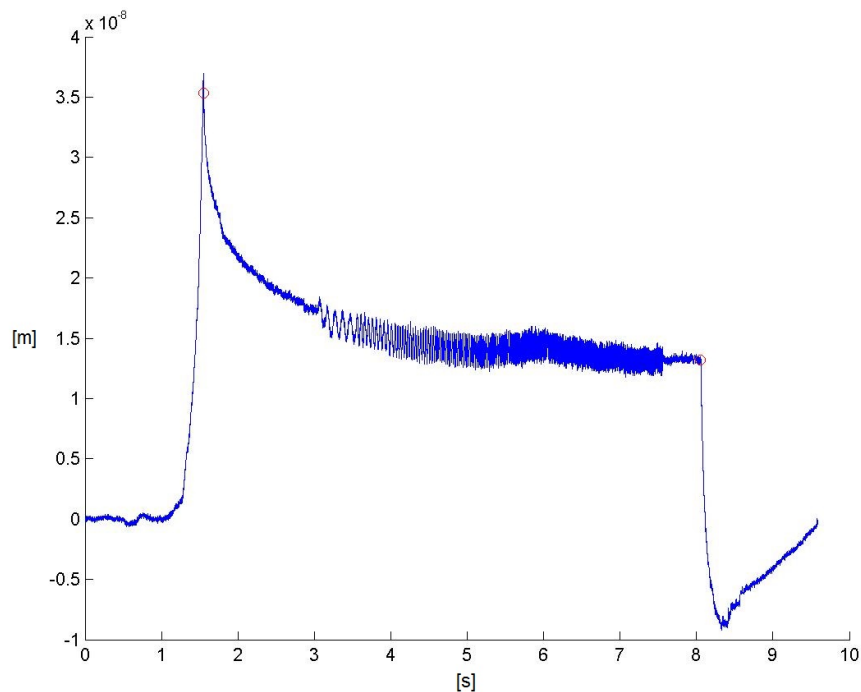


Abb. 3.3.1: Zeit-Auslenkungs-Graph der Indenterfunktion für die dynamische Messmethode eines einzelnen Messpunktes; Erreichen der 2nN Triggerkraft bei ca. 1.6s gefolgt vom Start der Indenterfunktion mit t_0

In Abbildung 3.3.1 ist ein nicht ebener Verlauf der Auslenkung nach dem Erreichen der Triggerkraft zu erkennen. Bei konstant bleibender z -Piezo Höhe erfolgt eine Art Umstrukturierung innerhalb der Zelle, bei der weitere Zellbestandteile zwischen Zellmembran und Kern verdrängt werden. Für diesen Verlauf wird die Wartezeit von 1.5s eingebaut, die das anfängliche Nachgeben berücksichtigt und eine Art Ruhelage für den Start der Oszillation sicherstellen soll. Hiermit sollen mögliche Artefaktbildungen bei der Relaxation des Systems während der dynamischen Messung vermieden werden.

Hydrodynamischer Widerstand Die Berechnungen zu dem hydrodynamischen Widerstandsfaktor sind im Quellcode bereits eingebaut und erfordern lediglich die Eingabe der Kontakthöhe sowie die Anzahl aufgenommener Korrekturkurven. Hiermit wird nach (2.17) die Phasenkorrektur im Imaginärteil des komplexen Schermoduls für verschiedene Höhen über dem Zellkern aufgenommen und anschließend der Wert für den direkten Kontakt $b(h_0)$ extrapoliert.

Datenauswertung dynamischer Messungen Die Auswertung der dynamischen Messungen erfolgt nach der Routine von J. Schröder [26] und gliedert sich mit den Programmen wie folgt:

`CalcKompMod.m` Hier erfolgt sowohl die Korrektur des hydrodynamischen Widerstandes, als auch die Berechnung des komplexen Elastizitätsmoduls. Dazu werden die Daten eines Messtages sowie alle relevanten Parameter eingelesen (vgl. A.3.4). Für die Berechnung werden jeweils die einzelnen Zeit-Auslenkungs-Graphen (vgl. Abb. 3.3.1) eingelesen, die Kontakt-/Triggerpunkte festgelegt und der Messbereich der Indenterfunktion isoliert und nach Frequenzen aufgeteilt. Gespeichert werden die Messwerte in einem Matrix-Konstrukt mit dem Namen `Gsterndaten`.

```
1 Gsterndaten (: , : , f , x)
```

Die Zugriffsvariablen sind hierbei (line number, point number, frequency, ForceMap number) und der MatLab-Operator `:` gibt alle Werte aus.

Mit `median4D.m` wird jeweils der Mittelwert über die Messwerte `Gsterndaten` aller Messungen je Frequenz ω_i ausgegeben.

Die berechneten Werte für das Elastizitätsmodul können mit `GenShearMap.m` ähnlich einer Force Map dargestellt werden. Dazu wird der Aufruf

```
1 GenShearMap ( Gsterndaten , f , x )
```

benutzt, der automatisch die ganze Force Map `x` zu der Frequenz `f` auswertet.

Strukturelle Dämpfung Für das Modell der strukturellen Dämpfung (2.18) wird zunächst eine vereinfachte logarithmische Näherung $\log(G^*)$ benutzt, um die Startwerte für den Fit mit `LogCalcStartVals.m` zu erhalten.

$$\log(G^*) = \log(G_0) \cdot \alpha \log(\omega) \quad (3.1)$$

Die Startwerte aus dem Fit (3.1) an die logarithmierten Daten werden anschließend an `LogOptimTwoPartFit.m` übergeben, mit dem der Fit des Modells der strukturellen Dämpfung an die Messwerte, berechnet durch `CalcKompMod.m`, ausgeführt wird.

3.4 Zellkultur

Für die Messungen werden verschiedene Zelllinien von Fibroblasten durch das Herz- und Diabeteszentrum NRW (HDZ NRW) in Bad Oeynhausen kultiviert.

Die Zelllinien, darunter drei Lamin-Mutationen und eine Kontroll-Linie, wurden von der Arbeitsgruppe von Peter Bross (*Aarhus University, 8200 Aarhus N, Denmark*) zur Verfügung gestellt und im Zelllabor kultiviert.

Eine (T- oder) Zellkulturflasche [40] (Cellstar©T-25) besitzt eine 25 cm² große Wachstumsfläche, auf der vorab 1 mL 0,1 %-ige Gelatinelösung eingetrocknet wurde. Für den Gasaustausch im Brutschrank (37 °C und 5 % CO₂) sind die Schraubkappen mit einem hydrophoben Filter versehen, der zum einen den erforderlichen Gasaustausch ermöglicht und sogleich eine Barriere für Keime und das Medium darstellt [39].

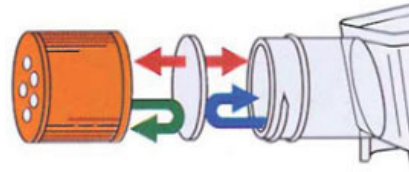


Abb. 3.4.1: Schraubkappe; rot: Gasaustausch O₂/CO₂, blau: Medium, grün: Keime [39, S.58]

Für die erforderliche Nährstoffzufuhr der Zellen in der T-Flasche wird in einem 2-3 Tage Zyklus das Medium gewechselt. Das Zellkulturmedium basiert auf 500 mL DMEM² (+L-Glutamin, +4,5 g/L Glucose) versetzt mit einem pH-Indikator Phenolrot.

Medium: 500 mL DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium), 50 mL FBS (Fetal Bovine Serum), 25 mL HEPES-Pufferlösung, 5 mL NEAA (non-essential amino acids), 5 mL Ampecilin/Streptomycin, 450 µL β-Mercaptoethanol,

3.5 Probenpräparation

Für die Messung bei physiologischen Bedingungen unter dem Asylum MFP-3D-Bio™ müssen die Zellen aus den T-Flaschen in *WillCo-dish*®-Glassbodenpetrischalen mit 50 mm Durchmesser umgesetzt werden. Nach Entfernen des Mediums wird zweifach mit 5,5 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gespült um die Zelllinie möglichst rückstandsfrei vorliegen zu haben. Für das Ablösen (*engl.*: detachment) der adhären Zellen wird mit 0,5 mL Trypsin-EDTA der Zell-Zell- sowie der Zell-Matrix-Verbund aufgelöst [39, Ch. 11.1.2]. Nach 5 min wird die Enzymaktivität durch die Zugabe von 6 mL frischem Medium gestoppt. Durch mehrfaches auf- und abpipetieren werden Zellcluster gelöst und die Zellen vereinzelt. Aus den ca. 6,5 mL können nun je nach Wachstumseigenschaften 100-180 µL zusammen mit 3 mL neuem Medium in ein *WillCo-dish*® pro Messung umgesetzt werden. In der Kulturflasche wird eine Verdünnung von 1:4 oder 1,5:3,5 (Zellsuspension zu neuem Medium) abhängig von Wachstumsrate und nächstem Passagieren belassen. Nach der Indexerhöhung der Passagenanzahl und einer Sichtkontrolle der gelösten Zellen wird die T-Flasche bis zum nächsten kultivieren inkubiert.

²Erstbeschreibung durch Dulbecco and Freeman, 1959 [39, S.81]

4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel wird auf die Messdatenaufnahme der statischen und dynamischen Messroutine, die Datenauswertung sowie die gewonnenen Messergebnisse eingegangen. Für die Bestimmung der Zellkernelastizität wurden vier verschiedene Zelllinien aus Aarhus vom Herz- und Diabeteszentrum Bad Oeynhausen (HDZ NRW) kultiviert und als Blindproben vermessen.

Tab. 4.0.1: Tabelle mit Name der Zelllinien aus dem Herz- und Diabeteszentrum Bad Oeynhausen (HDZ NRW) und den Umbenennungen für die vereinfachte Kommunikation

Datum	Name HDZ	Passagenzahl	Umbenennung
03.02.2016	hDF 8H	5	Dipper 1-2
	hDF 7G	5	Stan 1-2
	hDF E5	5	Wendy 1-2
17.03.2016	hDF 6F Arhuis	6	Ford 1
	hDF 6F Arhuis	7	Ford 2-3
03.05.2016	hDF 8H	5	Dipper 3-5
	hDF E5	5	Wendy 3-5

Für einen Messtag wird vorab eine Zelllinie in ein Glassbodenpetrischälchen umgesetzt (vgl. Kapitel 3.5). Die Konzentration für das Umsetzen variiert je Zelllinie und wird durch die ersten Umsetzungen bestimmt. Jede Probe wird nach dem Umsetzen für mindestens 24h im Brutschrank belassen bevor die Messung beginnt. Hierbei wird sichergestellt das die Zellen ausreichend fest am Boden angewachsen sind um sich während der Messung nicht zu lösen. Auch die vollständige Regeneration der Zellmembran aus dem trypsinierten Zustand der Zellen muss vor der Messung erreicht werden.

In Kapitel 4.3 wurde eine tabellarische Übersicht bisheriger Messungen in der Arbeitsgruppe dargestellt um die Größenordnung der statischen und dynamischen Messwerte neben Literaturwerten einordnen zu können.

Zunächst wurden alle vier Zelllinien mit der statischen Messmethode vermessen. An jedem Messtag konnten, auch bedingt durch die Konzentration der angewachsenen Zellen im Messbereich des Glassbodenpetrischälchen, unterschiedlich viele Force-Maps einzelner Zellen aufgenommen werden.

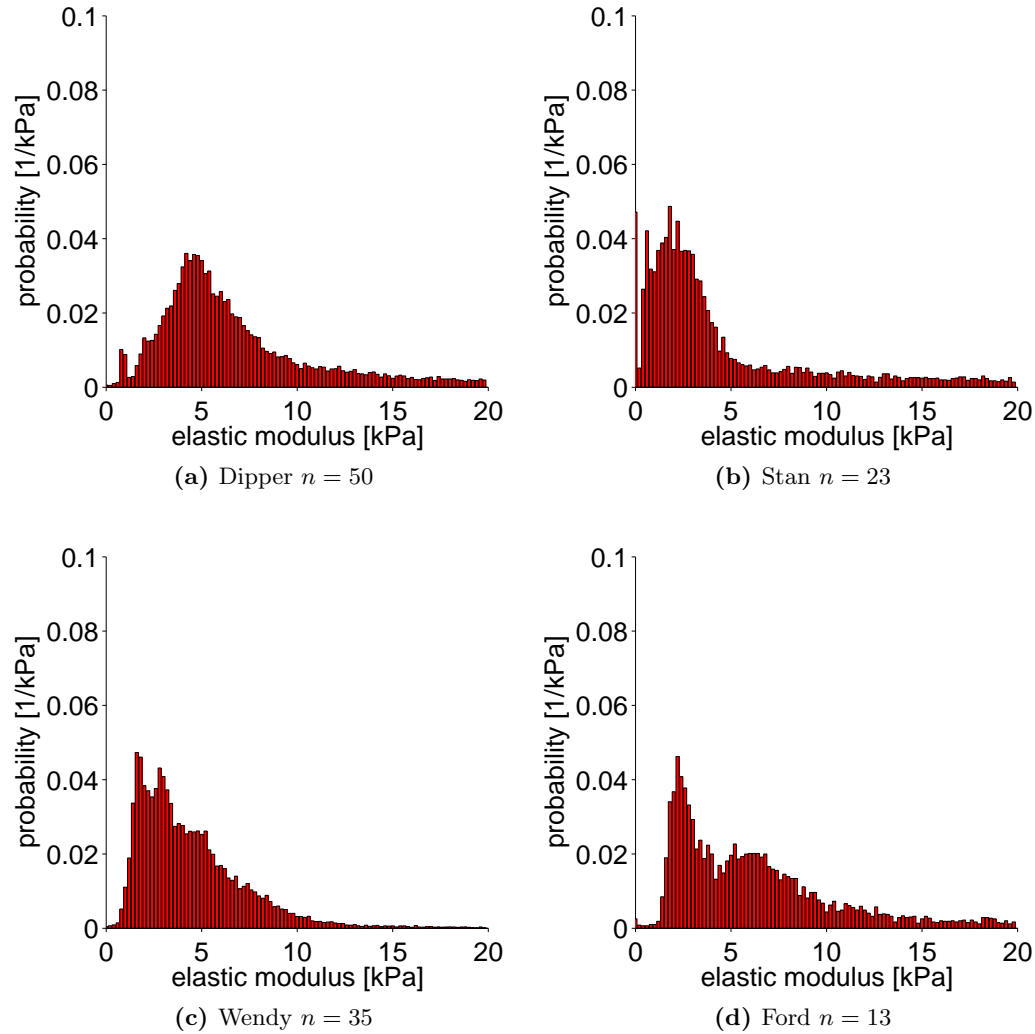


Abb. 4.0.1: Übersicht der Histogramme der Elastizitätswerte mit Anzahl n der Zellen für jede einzelne Zelllinie. Aufgetragen ist die relative Häufigkeit der jeweiligen Elastizitätswerte in [kPa].

Die Auswertung der Daten zeigt direkt Unterschiede in der Verteilung der Elastizitätswerte, die in der Übersicht (Abb. 4.0.1) ausgemacht werden können.

In jeder ForceMap werden Informationen, die aus den Kraft-Distanz-Kurven extrahiert werden pixelweise gespeichert. Standardmäßig werden die Probenhöhe und die auftretenden Adhäsionskräfte bestimmt und gespeichert. Diese werden anschließend verwendet um in IGOR gesondert die Elastizitätswerte zu berechnen¹. Dieses erfolgt vollständig für jede ForceMap nach Gleichung (2.14) mit dem Fit des Hertz-Modells im Bereich von 50-95% relativer Eindringtiefe. Die maximale Eindringtiefe ist begrenzt durch die vorgegebene Triggerkraft von $F_{trig} = 2\text{nN}$ bei der Aufnahme der einzelnen Kraft-Kurven.

Bei der Aufnahme der einzelnen ForceMaps auf jedem Zellkern wurde bei konstanter Größe von $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ die Auflösung (400 o. 600 Kraft-Kurven) nach optischer Zellkontrolle ausgewählt. Die unterschiedlichen Größen der ForceMaps werden in der Auswertung berücksichtigt und für die Erstellung der Histogramme automatisch durch die Funktion `Zelllinie.m` (A.3.3) eingelesen.

Tab. 4.0.2: Anzahl der statischen Elastizitätsmessungen je Zelllinie, Ausgabe erfolgt in Z.177 von `Zelllinie.m`

Zelllinie	Anzahl Zellen	Anzahl Einzelkraftkurven
Dipper	50	23 990
Stan	23	9808
Wendy	35	21 062
Ford	13	7200

Hierbei sind die krummen Anzahlen der Einzelkraftkurven direkt auf das Ausschließen einzelner Kraft-Distanz-Kurven sowie auf fehlerhaft berechnete Elastizitätsmodule zurückzuführen. Weiterhin werden alle berechneten Werte die außerhalb des Maximums der Histogramme von 20 [kPa] liegen bei der Erstellung der Histogramme nicht berücksichtigt. Dies geschieht in Zeile 83 von `Zelllinie.m` (A.3.3) und kann anhand von (Abb. 4.0.2) begründet werden.

¹Es empfiehlt sich hierbei die separate Berechnung des Elastizitätsmoduls, da das gleichzeitige Aufnehmen einer ForceMap und das Berechnen zu diversen Speicherfehlern innerhalb der ForceMap geführt hat.

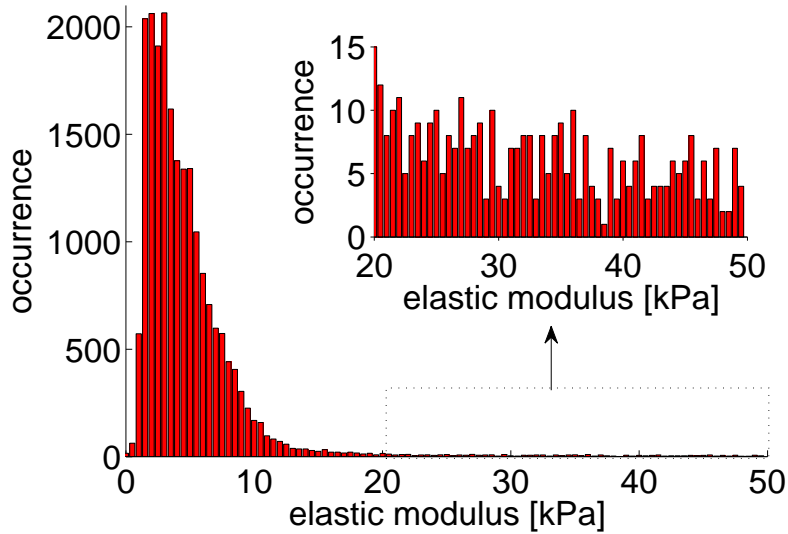


Abb. 4.0.2: Vollständiger Bereich aller aufgenommenen Messwerte der Zelllinie Wendy. Oberhalb von 20 kPa sind lediglich vereinzelte Werte zu erkennen.

Im Bereich von Werten über 20 kPa der Histogramme befinden sich lediglich einzelne Ausreißer, die in der statistischen Auswertung keine Auswirkung haben und somit in der Darstellung direkt ausgelassen werden. Als Ursachen für diese Werte können Spitzenartefakte oder Verunreinigungen im Medium erwähnt werden. Streuungen des Laserspots und eine daraus fehlerhaft bestimmte Kraft folgern einen Fehler in der mit dem Hertz-Modell bestimmten Elastizität.

Weiterhin entspricht der Bereich von 20 kPa dem Wert vorheriger Messungen, mit denen die aufgenommenen Werte somit einfacher verglichen werden können.

4.1 Ergebnisse statische Messungen

Für die Zelllinien Dipper und Stan wurden zunächst einzelne Gauss-Funktionen der Form:

$$\mathcal{F}_1(x) = a_1 \cdot \exp\left(-\left(\frac{(x - b_1)}{c_1}\right)^2\right) \quad (4.1)$$

benutzt. Für $x = b_1$, dem Zentrum des Peaks, folgt mit $\exp(0) = 1$ die Höhe des Peaks a_1 (hier rel. Einheiten). Für die Halbwertsbreite (*engl.*: FWHM) gilt $\text{FWHM} = (2\sqrt{2\log(2)} \cdot \sigma)$, wobei hier $\sigma = c_1$ gilt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 ist ein Maß der Statistik, das die Varianz der Werte vom verwendeten Modell beschreibt.

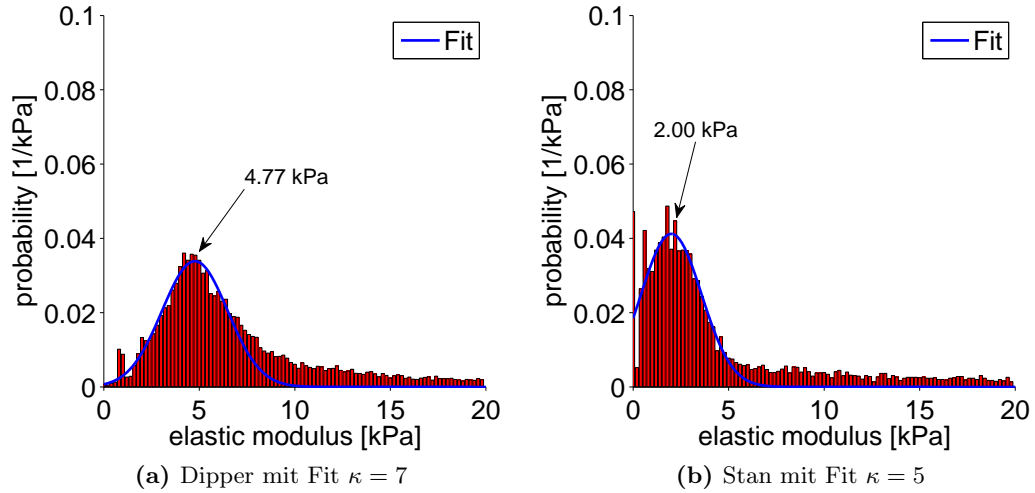


Abb. 4.1.1: Annäherung des mittleren Elastizitätswertes mit einer einzelnen Gauss-Funktion

Hierbei und im folgenden wurde der Fit angepasst an die Peaks indem Werte größer als κ [kPa] ausgeschlossen wurden um das Zentrum der Verteilung möglichst genau zu bestimmen. Auffällig ist bei Dipper ein kleiner Peak zu Beginn des dargestellten Elastizitäts-Intervalls sowie bei Stan ein hohe Anzahl an gemessenen 0-Elastizitäten.

Tab. 4.1.1: Einzelpeak Gauss-Fit an den beiden Zelllinien Dipper und Stan

Zellname	E [kPa]	FWHM [kPa]	R^2
Dipper	4,77	5,71	0,96
Stan	2,00	5,26	0,92

Werden mehrere Peaks angefitet wird (4.1) nach der Anzahl der Peaks n erweitert.

$$\mathcal{F}_n(x) = \sum_1^n a_n \cdot \exp\left(-\left(\frac{(x - b_n)}{c_n}\right)^2\right) \quad (4.2)$$

Für die Probenlinie Wendy lassen sich zwei diskrete Peaks und eine Abstufung ausmachen:

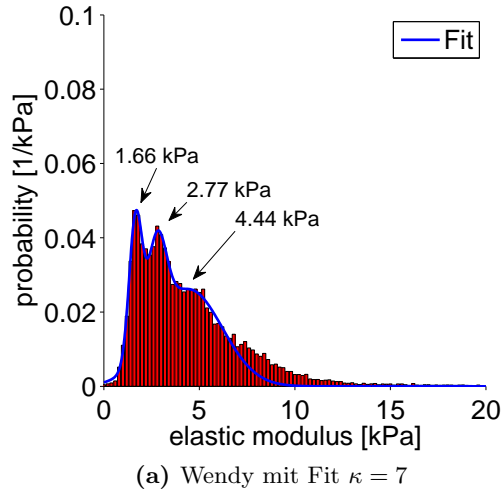
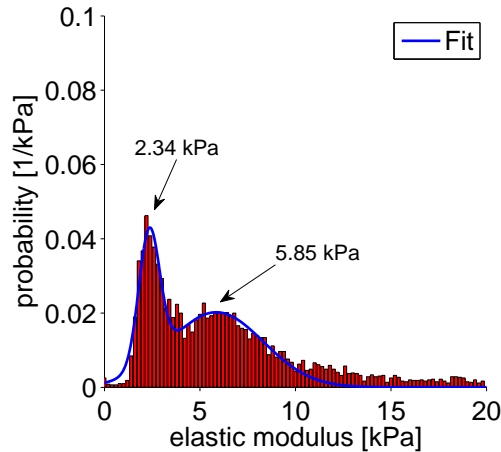


Abb. 4.1.2: Mehrfache Ausprägung einzelner Peaks und Verwendung der Gauss-Funktion mit $n = 3$.

Die Abstufungen zwischen 7 und 10 [kPa] wurden bei der Berechnung zunächst aufgrund schwacher Ausprägung ausgelassen. Für eine Berücksichtigung empfiehlt sich hierbei die Vermessung weiterer Proben, um die Abstufung stärker auszuprägen oder statistisch auszulöschen.

Tab. 4.1.2: Fit Koeffizienten der Gauss-Funktion an der Zelllinie Wendy mit $n = 3$

Zellname	E [kPa]	FWHM [kPa]	R^2
Wendy	1,66	1,12	0,99
	2,77	1,65	0,99
	4,44	5,84	0,99

(a) Ford mit Fit $\kappa = 10$ **Abb. 4.1.3:** Zweifache Ausprägung von Peaks und Verwendung der Gauss-Funktion mit $n = 2$.

Die Zelllinie Ford weist mit 13 Zellen die geringste Häufigkeit auf, jedoch lässt sich eine Verteilung der Elastizitätswerte mit zwei Gauss-Peaks gut beschreiben. Auffallend ist hierbei ein relativ ebener Verlauf bis ca. 1.5kPa.

Tab. 4.1.3: Fit Koeffizienten der Gauss-Funktion an der Zelllinie Ford mit $n = 2$

Zellname	E [kPa]	FWHM [kPa]	R^2
Ford	2,34	1,82	0,94
	5,85	8,23	0,94

Insgesamt lässt sich mit den Gauss-Funktionen eine gute Aussage über die Verteilung der mittleren Elastizitätswerte einer Zelllinie treffen. Folgend ist eine Übersicht aller statisch bestimmten Elastizitätswerte dargestellt.

Tab. 4.1.4: Übersicht der Elastizitätswerte der statisch vermessenen Zelllinien.

Zellname	E [kPa]	FWHM [kPa]	R^2
Dipper	4,77	5,71	0,96
Stan	2,00	5,26	0,92
Wendy	1,66	1,12	0,99
	2,77	1,65	0,99
	4,44	5,84	0,99
Ford	2,34	1,82	0,94
	5,85	8,23	0,94

Bis auf der zweite Peak in der Zelllinie Ford liegen alle Elastizitätsmodule unter 5kPa. Mit dem Bestimmtheitsmaß von R^2 wird die Güte der Approximation des Modells abhängig von den Daten beschrieben, wobei $R^2 = 1$ einer idealen Beschreibung entspricht. Mit den Gausskurven der Histogramme und den Bereichen des Fits werden die Verteilungen und die Peak-Zentren demnach gut beschreiben.

4.2 Ergebnisse dynamische Messungen

Sowohl der hydrodynamische Widerstand des Cantilevers als auch die Wechselwirkung mit der Zelle führen zu einer Phasenverschiebung des schwingenden Cantilevers.

Vor Beginn jeder dynamischen Messung werden für die Korrektur des hydrodynamischen Widerstandes kontaktlose Kraft-Kurven oberhalb der Probenoberfläche gefahren. Dabei wird der Cantilever in eine Oszillation mit 100Hz und 50nm Amplitude versetzt und die Phasenverschiebung in unterschiedlichen Höhen detektiert. Anschließend kann mit der Gleichung (2.17) ein Fit durch die Datenpunkte gelegt werden, mit dem der Wert für den direkten Kontakt bei h_0 extrapoliert werden kann.

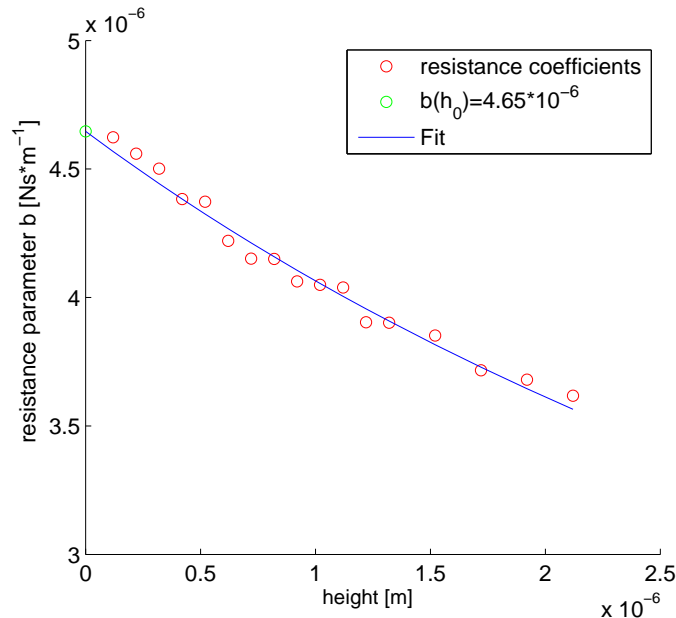


Abb. 4.2.1: Widerstandskoeffizienten mit Fit und Extrapolation von $b(h_0)$

Für den Fit wurde der bestimmte Kontaktpunkt um $0.25\mu\text{m}$ angepasst (vgl. der Kontaktkurve mit einzelnen Kraftkurven), da sonst einzelne Messpunkte im negativen Bereich liegen und die Extrapolation keinen Sinn ergäbe. Der extrapolierte Wert der korrigierten Kontakthöhe liegt bei $b(h_0) = 4.64 \frac{\mu\text{Ns}}{\text{m}}$ und somit im Bereich der Messungen von Schröder, J. [26], sowie Rother, J. [2]. Ein zweiter bestimmter Wert lag bei $b(h_0) = 4.81 \frac{\mu\text{Ns}}{\text{m}}$ (hier nicht dargestellt).

Die Datenaufnahme für die dynamische Messung beschränkt sich zunächst auf die Zelllinien Dipper und Stan, die durch eine einzelne Peak Ausprägung für den Vergleich herangezogen werden. Die dynamisch erhaltenen Elastizitätswerte werden gemittelt und mit den zuvor bestimmten elastischen Werten verglichen.

Dipper

Für die dynamische Messung an der Zelllinie Dipper wurden 16 ForceMaps mit einer Auflösung von $(13 \cdot 14)$ aufgenommen und mit `CalcKompMod.m` konnten folgende Werte ermittelt werden.

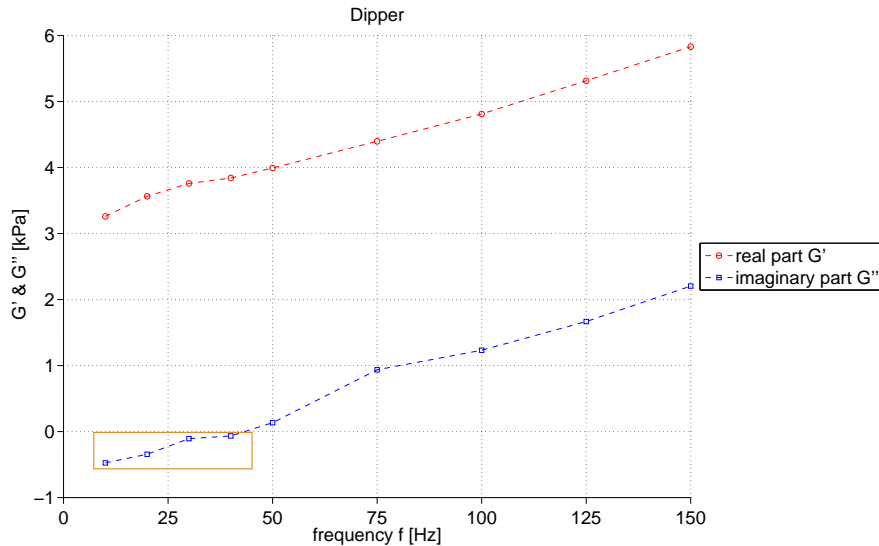


Abb. 4.2.2: Real- und Imaginärteil des komplexen Schermoduls der Zelllinie Dipper, negative Werte von G'' eingekastet

Mit $G^*(\omega) = G'(\omega) + i \cdot G''(\omega)$ wurden die Werte für das komplexe Schermodul separiert nach Real- und Imaginärteil für die einzelnen Frequenzen der Indenterfunktion (siehe Tab. 3.3.1) aufgetragen. Hierbei wurden die Mittelwerte für jede Frequenz über alle 16 ForceMaps gebildet. Auffallend ist hierbei der lineare Anstieg im Realteil, der dem Elastizitätsmodul entspricht. Wird der Mittelwert über die Frequenzen gebildet, so ergibt sich ein Wert von

$$\bar{G}^* = 3.99 \cdot 10^3 + i \cdot 1.34 \cdot 10^2 \quad (4.3)$$

Zu beachten ist hierbei der Mittelwert für die komplexen Zahlen, da diese für Frequenzen unterhalb von 50 Hz negative Werte ergeben. Für das Elastizitätsmodul ergibt sich also $\bar{G}' = 3.99$ kPa.

Aus den Werten des komplexen Schermoduls wird der Verlustfaktors η mit $\eta = G''/G'$ bestimmt. Die Werte für Frequenzen kleiner als 50 Hz sind hierbei negativ. Dieses schließt auf eine fehlerhafte Bestimmung der Phasenverschiebung, da eine negative Phase einem Vorlauf der Auswirkung vor der angewandten Kraft entspricht.

Für die Darstellung des Verlustfaktorees werden für diese Werte die positiven Zahlenwerte der Imaginärteile verwendet, da negative Verlustmodule/-faktoren hier keinen Sinn ergeben. Die invertierten Werte sind wieder eingekastet und haben keinen kausalen Zusammenhang mit dem Verlustfaktor.

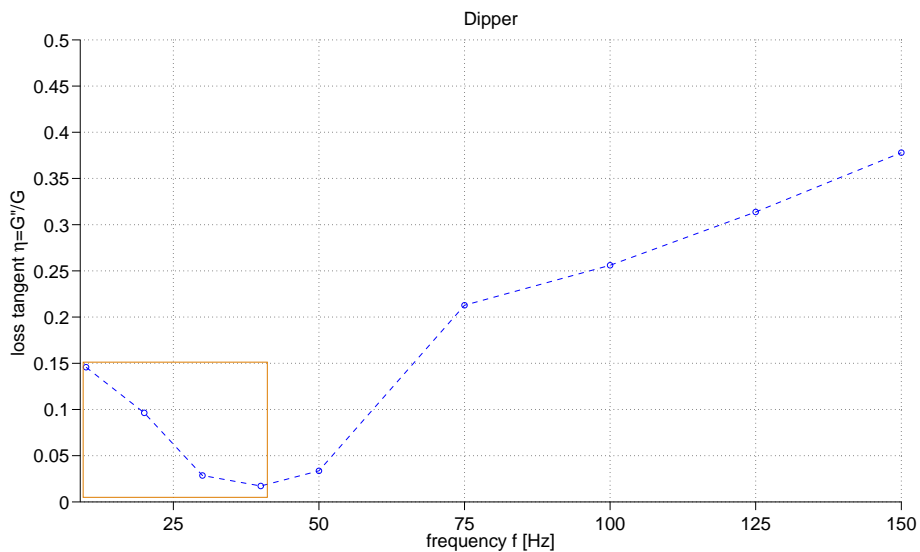


Abb. 4.2.3: Verlustfaktor bei einzelnen Frequenzen Dipper

Schließt man diese vier Werte aus, so ergibt sich für die verbleibenden Frequenzen ein Wert von $\eta \ll 1$ und daraus resultiert ein rein elastisches Verhalten der Zelllinie Dipper im Frequenzbereich von 10 – 150Hz.

Stan

Bei der Zelllinie Stan wurden 13 ForceMaps mit einer Auflösung von $(11 \cdot 12)$ aufgenommen und wieder gemittelt über alle Frequenzen der Real- und Imaginärteil dargestellt:

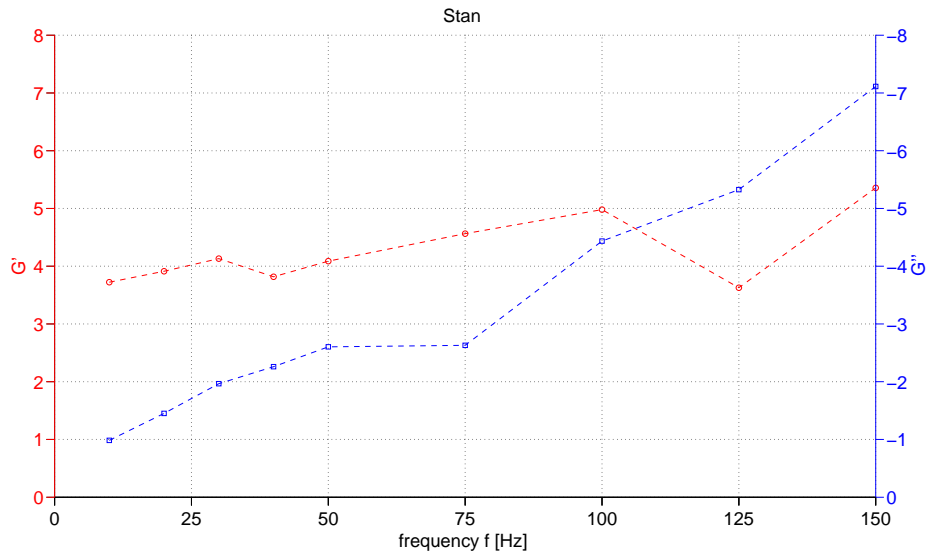


Abb. 4.2.4: Realteil G' und Imaginärteil G'' des komplexen Schermoduls der Zelllinie Stan, y-Achsen in [kPa]

Hierbei ist wieder ein annähernd linearer Verlauf des Realteils G' zu erkennen und gleichzeitig sind alle komplexen Werte des Schermoduls G'' im negativen Bereich. Es scheint bei der Berechnung im Programm oder bei der Messung ein Fehler aufgetreten zu sein. Betrachtet man den Verlauf der Werte von G'' , so lässt sich aufgrund der Größenordnung wieder eine fehlerhafte Bestimmung der Phasenverschiebung vermuten.

Wird für die Bestimmung von G' wieder G^* gemittelt, erhält man

$$\bar{G}^* = 4.09 \cdot 10^3 - i \cdot 2.60 \cdot 10^3 \quad (4.4)$$

und daraus resultiert $\bar{G}' = 4.09$ kPa für das Elastizitätsmodul der Probenlinie Stan. Mit dem berechneten komplexen Schermodul kann wieder der Verlustfaktor η dargestellt werden. Bei G'' wurden wieder die positiven Werte für die Darstellung benutzt.

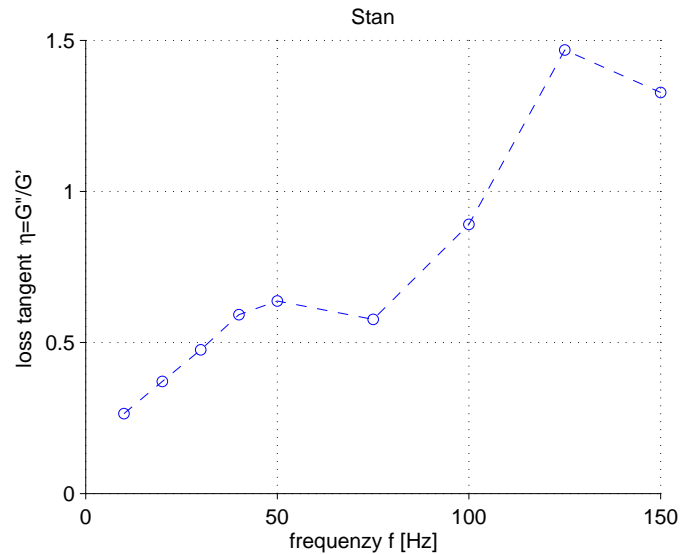


Abb. 4.2.5: Verlustfaktor bei einzelnen Frequenzen Stan, komplexer Teil der Werte wurde mit (-1) multipliziert.

Mit den invertierten komplexen Anteilen ergibt sich ein Verlustfaktor, der im Bereich größerer Frequenzen als 100 Hz größer als 1 ist und somit ein viskoseres Verhalten bei höhere Frequenzen aufweist.

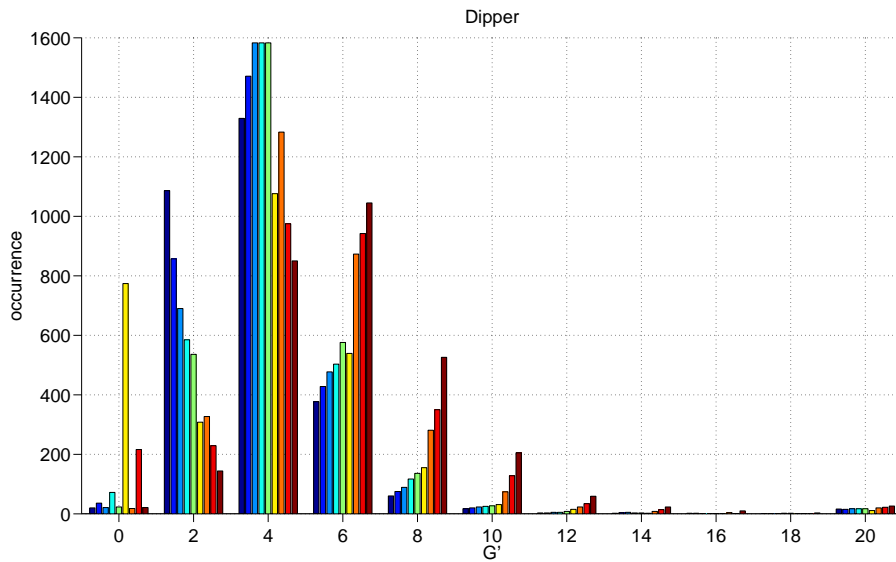
Liegen die bestimmten Werte für die Elastizitäten in der Größenordnung von 0 – 5 kPa, im Bereich plausibler Elastizitätswerte, zeigt jedoch ein direkter Vergleich (Tab. 4.2.1) unterschiedlich starke Abweichungen zwischen statischen und dynamischen Elastizitätswerten.

Tab. 4.2.1: Vergleich der statisch und dynamisch bestimmten Elastizitätsmodule der beiden Zelllinien Dipper und Stan.

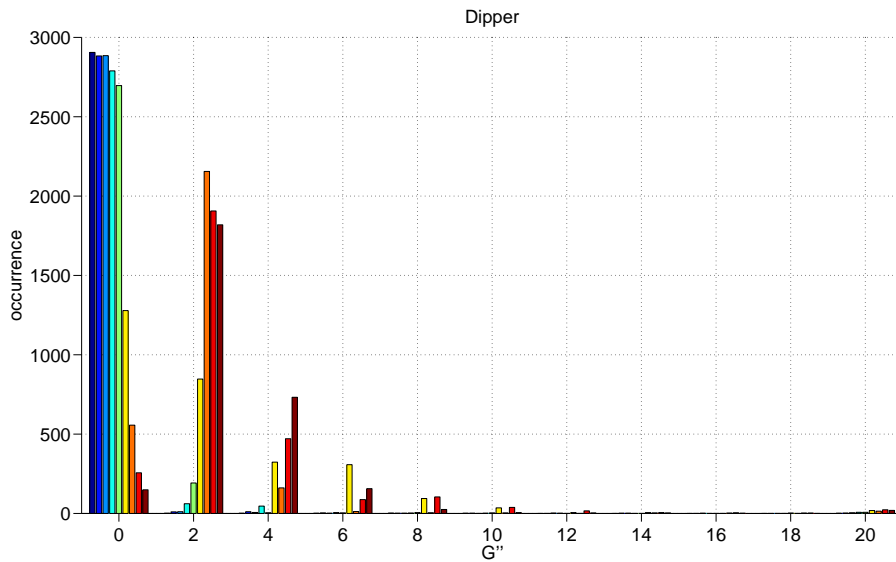
Zellname	E [kPa]	FWHM [kPa]	\bar{G}' [kPa]	Abw. zw. E& \bar{G}'
Dipper	4,77	5,71	3,99	-16%
Stan	2,00	5,26	4,09	+105%

Die starken Abweichung zwischen elastischen und dynamisch bestimmten Elastizitätswerten sowie die negativen Werte der Verlustmodule sind an dieser Stelle nicht zu erklären und bedürfen einer tieferen Analyse der Berechnung mittels CalcKompMod und weiteren Messungen an einzelnen Proben. Aufgrund der Abweichung und den Schwankungen der Messwerte wird auf den Fit des Modells der strukturellen Dämpfung hier nicht weiter eingegangen.

Vergleich realer- und imaginärer Komponente der 'Gsterndaten' Für eine genauere Analyse und eine Übersicht der berechneten Werte des komplexen Schermoduls (Gsterndaten) können Anhand der Ergebnisse der Zelllinie Dipper die Verteilungen der Real- und Imaginärteile getrennt betrachtet werden.



(a) G' in kPa, Zelllinie Dipper



(b) G'' in kPa, Zelllinie Dipper

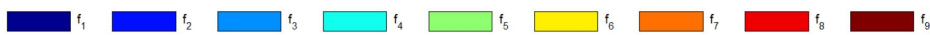


Abb. 4.2.6: Übersicht der (a) Real- und (b) Imaginärteile der Zelllinie Dipper. Aufgetragen ist die relative Häufigkeit der berechneten Werte aufgeteilt in Boxen der Breite mit 2kPa und der Farbcodierung für die einzelnen Frequenzen f_i der Indenterfunktion (s. Tab. 3.3.1).

Dies dient auch dazu um Rückschlüsse auf die Auswirkung der einzelnen Frequenzen innerhalb der Messung zu erhalten.

Die ersten und letzten Boxen enthalten weiterhin auch alle Werte die jeweils außerhalb des Intervalls von $[0; 20]$ kPa liegen, somit auch negative. Hierbei ist die hohe Anzahl der Werte für $x \leq 0$ kPa bei der Frequenz $f_6 = 75$ Hz zu erwähnen. Bei kleineren Frequenzen überwiegen niedrigere Elastizitätsmodule und für höhere Frequenzen erhält man eine Verschiebung zu größeren E-Modulen.

Die Abbildung 4.2.6 (b) zeigt den Imaginärteil des komplexen Schermoduls G'' und weist kleine Werte bei niedrigen Frequenzen auf. Lediglich für Frequenzen ab 100 Hertz ergeben sich Werte größer als 2 kPa. An dieser Stelle wird bei der Zelllinie Stan auf G' und die komplett negativen Werte G'' nicht weiter eingegangen. Für eine weitere Analyse empfehlen sich weitere Messungen einzelner ForceMaps und die dynamische Auswertung um eine genauere Aussage der Zelleigenschaften zu erhalten.

Auch eine Analyse der Phasenverschiebung die während der Messroutine automatisch erfasst wird muss eventuell noch weiter optimiert werden um eine qualitativ bessere Aussage über die imaginäre Komponente des Schermoduls treffen zu können.

4.3 Vergleichende Messwerte

Die folgenden Tabellen beinhalten Messwerte vorheriger Messungen die für den Vergleich der berechneten Werte herangezogen werden.

Tab. 4.3.1: Messwerte (Gauss-Fit der Histogramme) aufgenommen von Tamar Münnich [41]. TMEM43-Werte ausgeklammert, da die Beschreibung mittels Gauss-Fit nicht sinnvoll ist.

Mutation	Anzahl Zellen	E [kPa]	FWHM [kPa]
keine	45	3,0	4,2
keine	25	2,0	3,1
PLB	12	2,1	2,8
CGD	14	2,3	6,4
iDCM	32	5,5	7,9
OI	36	3,2	5,2
TMEM43	34	(2,5)	(22,2)
Lamin	12	2,3	3,0

Tab. 4.3.2: Messwerte (Gauss-Fit der Histogramme) aufgenommen von Ann-Christin Moritzer [42]

Mutation	Anzahl Zellen	E [kPa]	FWHM [kPa]
Kontrolle	30	2,46	1,76
Lamin (p.R471H)	45	5,52	4,30
Lamin (R321X)	40	4,55	2,83
Lamin (p.R216C)	28	2,82	2,42

Tab. 4.3.3: Messwerte (dynamische Bestimmung des Elastizitätsmoduls) aufgenommen von Jonathan Schröder [26]

Zellname	ForceMap	Mutation	\bar{E} [kPa]
Simba 2	2	Kontrolle	56,4
	3	Kontrolle	41,1
	4	Kontrolle	4,8
	5	Kontrolle	5,1
Timon	2	Kontrolle	2,2

Die zuvor aufgenommenen Werte der statischen Messungen liegen alle im Bereich von 1 bis 10 kPa und auch drei der dynamisch bestimmten Elastizitätswerte liegen in diesem, der mit Zellelastizitäten übereinstimmt (vgl. 2.2). Die vorliegenden Blindproben konnten nun graphisch mit den Werten der Lamin Mutationen von A.-Ch. Moritzer verglichen werden.

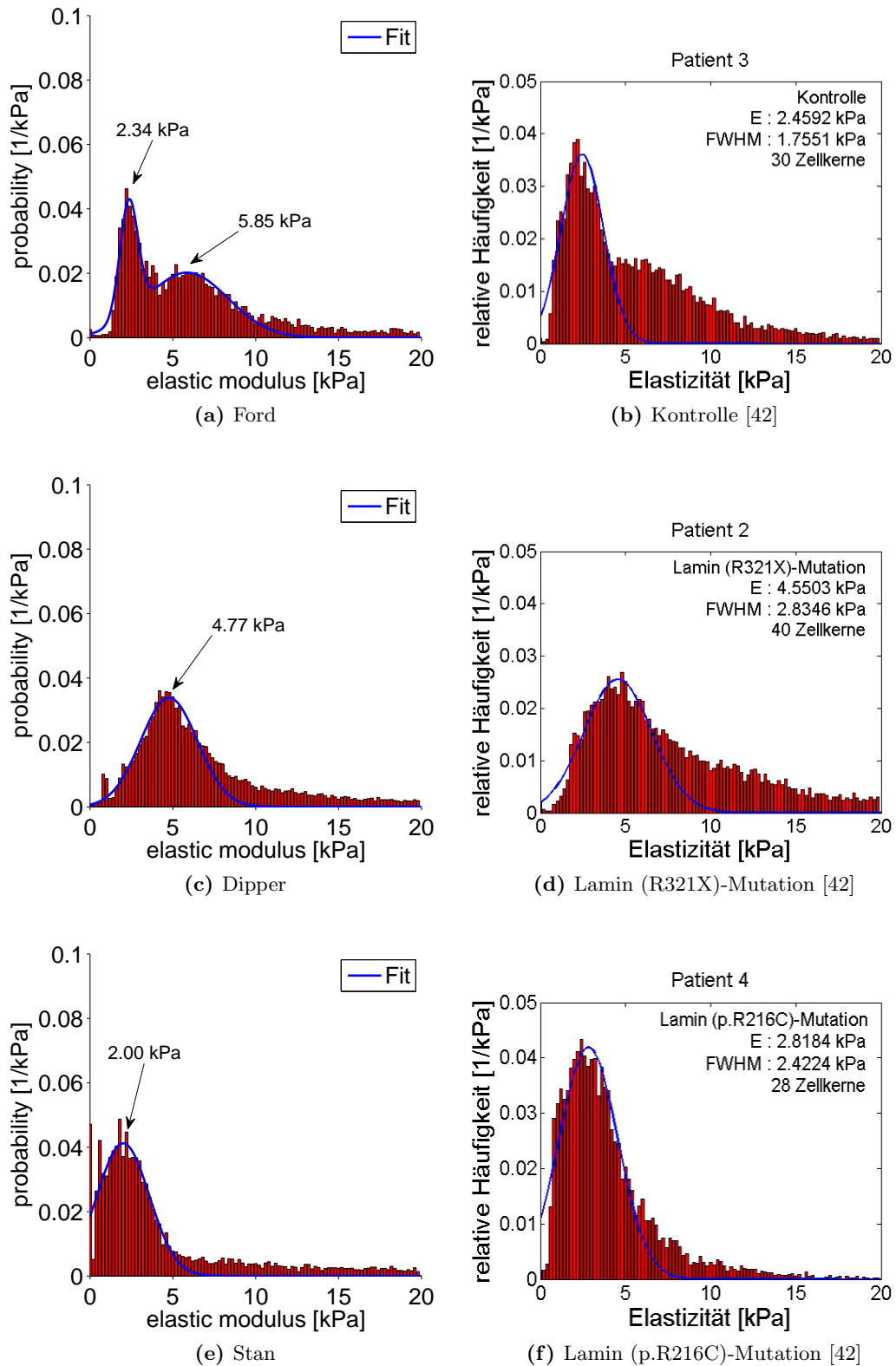


Abb. 4.3.1: Direkter Vergleich der vermessenen Blindproben mit den Mutationen vorheriger Messungen von A.-Ch. Moritzer [42].

4.4 Diskussion und Fehlerbetrachtung

Es konnten somit mit der statischen Messmethode des Elastizitätsmoduls vergleichbare Ergebnisse erzielt und den Blindproben erfolgreich eine Lamin-Mutation zugewiesen werden. Bei der dynamischen Messmethode treten noch Probleme bei der Bestimmung der Phasenverschiebung und den daraus resultierenden Werten des komplexen Schermoduls auf.

Beginnend mit der statischen Bestimmung des Elastizitätsmoduls sind zunächst verschiedene Faktoren zu berücksichtigen. Bei der Berechnung des Elastizitätsmoduls wird die benutzte pyramidenförmige Cantilever Spitze mit einem Kegel angenähert. Die Bestimmung des halben Öffnungswinkels erfolgte nach einer Konstruktion eines Spitzenmodells in einem CAD Programm. Die Einbindung für beliebige Cantilever Geometrien war an dieser Stelle in IGOR nicht möglich. Die Änderung des Wertes des Öffnungswinkels für die Elastizität geht mit $\tan(\alpha)$ ein und sollte daher noch genauer bestimmt werden.

Die Datenaufnahme der einzelnen Einzel-Kraft-Kurven weist (wie in Abb. 2.3.1 zu sehen) Abweichungen von der voreingestellten Triggerkraft von 2 nN auf, was in der automatischen Bestimmung nicht weiter kontrolliert wird. Hierfür könnte eine MatLab Routine eingebaut werden, die zunächst Auffälligkeiten im Kraftverlauf anmerkt und nach einer Benutzerkontrolle verlangt.

Die verwendeten Zelllinien weisen neben dem unterschiedlichen Wachstumsverhalten auch optische Unterschiede innerhalb der Zelllinie auf (Größe, Form vgl. Abb. A.1.1). Am auffälligsten ist ein Problem innerhalb der Zelllinie Ford (geringste Messanzahl) aufgetreten, bei dem sich einzelne Zellen nach einer, zu Test-/Kontrollzwecken gefahrenen, Einzelkraftkurve vollständig zurückgezogen haben und eine neue Zelle anvisiert werden musste. Die Passagenzahl beschränkt sich auf kleine Werte, jedoch muss an dieser Stelle die Selektion bei jedem Trypsinierungs-Vorgang erwähnt werden.

Abschließend mit der dynamischen Bestimmung der Elastizitätswerte konnten Messungen erfolgreich ausgewertet werden und die Größenordnung von den zuvor statisch bestimmten Werten eingehalten werden. Hierbei tauchen allerdings noch Fehler auf (Bsp. negative G''), deren Herkunft während der Berechnung noch nicht genauer analysiert werden konnte. Für eine genauere Auswertung sind weiterhin mehrfache Messungen erforderlich (Stichprobenzahl hier 16 und 13) um auch eventuelle Fehler einzelner Messungen aufzudecken und ausschließen zu können. Der vorhandene MatLab Code muss folglich weiterhin optimiert und an anderen Zelllinien erprobt werden, um genauere Aussagen über die mechanischen Eigenschaften von Zellen treffen zu können.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die gesammelten Daten statischer Messungen der Blindproben ergeben vergleichbare Ergebnisse, die eine direkte Zuweisung der Mutation erlauben. Für eine dynamische Messung treten noch Fehler in der Bestimmung des Elastizitätsmoduls auf, deren Herkunft während der Berechnung noch nicht weiter analysiert werden konnte. Hierfür ist eine genauere Analyse der Auswertungsroutine erforderlich, die für folgende Messungen weitere Möglichkeiten der Optimierung eröffnen.

Vergleichend mit den Werten aus Tab. 4.3.2 können drei der vier Zelllinien Mutationen zugewiesen werden. Die vermessenen Blindprobe Ford ist hierbei wahrscheinlich die Kontrolllinie, die trotz der geringen Stichprobengröße eine bimodale Verteilung wie bei den Messungen von Ann-Christin Moritzer aufweist. Der Zelllinie Dipper wird die Lamin-Mutation (R321X) und der Zelllinie Stan die Lamin-Mutation (p.R216C) zugeordnet.

Somit eignet sich das Rasterkraftmikroskop neben der Oberflächenanalyse gut für die Bestimmung von mechanischen und rheologischen Eigenschaften einzelner Zelllinien mit unterschiedlichen Mutationen. Für einzelne Krankheiten, wie zum Beispiel der hier behandelten ARVC, ausgelöst durch Gen-Mutationen können somit Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften für einzelne Mutationen nachgewiesen werden.

Ausblick Werden hier zunächst statische und dynamische Messungen separat durchgeführt ist es theoretisch auch möglich, das Hertz-Modell an den Hinweg der Zeit-Auslenkungs-Kurve (Abb. 3.3.1) bei der dynamischen Messmethode zu fitten. Hierfür müssen Programm- und Speicher-Parameter ausgewertet werden und die Messzeit beider Methoden kann erheblich verkürzt werden.

Auch eine Kontrolle der erreichten Triggerkräfte, sowie Auffälligkeiten wie Kurvenabriss oder Sprungstellen könnten in der MatLab-Routine noch eingebaut werden. Die Programmerweiterungen der Fa. Asylum Research für das MFP-3D-BIO™ in IGOR erlauben mit der Funktion region of interest eine Auswahl des Messbereichs im Live Bild der Kamera, die automatisch angefahren und vermessen wird und erleichtern das Positionieren des Zellkerns unter dem Cantilever erheblich.

Schlussendlich können noch Überlagerungen der aufgenommenen Elastizitätswerte mit den Bildern/ForceMaps durchgeführt werden um die berechneten Daten auf einzelne Bereiche rückschließen zu können.

A Anhang

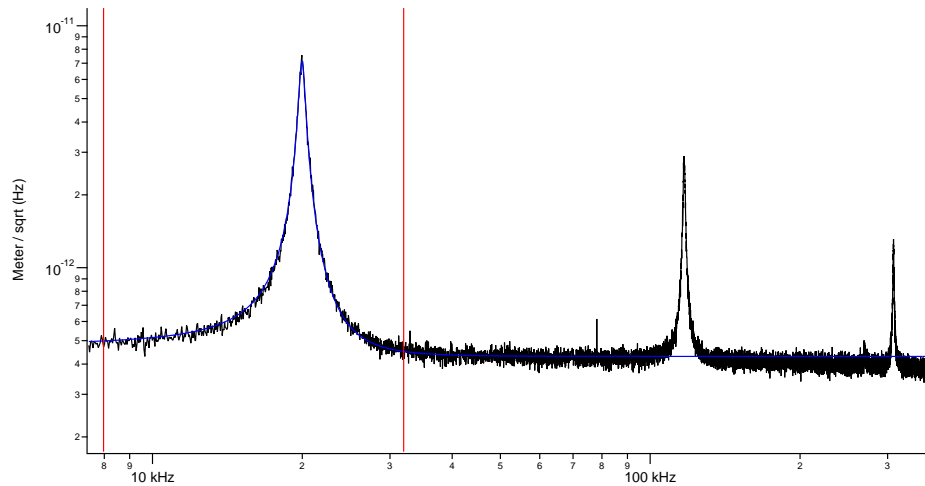


Abb. A.0.1: Doppelt logarithmisch Aufgetragen ist die Frequenz gegen die Amplitude: Thermisches Rauschspektrum Bruker DNP-10 Lever D aufgenommen in Luft. Im roten Intervall (Zoom-Center) erfolgt der Lorentz-Fit der Grundfrequenz (blaue Kurve). Zu sehen ist außerdem die 1. und 2. harmonische Anregungsfrequenz.

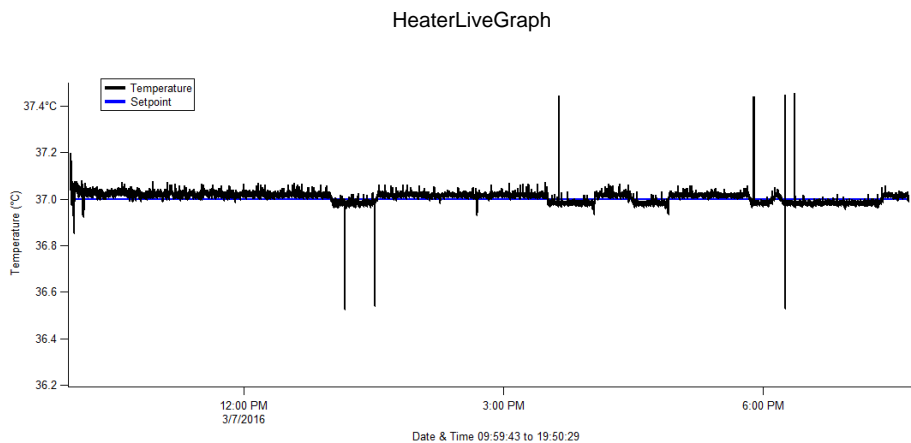


Abb. A.0.2: Aufgenommener Temperaturverlauf über den gesamten Messzeitraum einer Probe (Dipper 1, 140 μ L, 20 ForceMaps) am 07.03.2016

A.1 Abkürzungsverzeichnis

AFM atomic force microscopy - Rasterkraftmikroskop

ARVC Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie

FWHM full width at half maximum - Halbwertsbreite

ROI region of interest - Live Bereichsauswahl

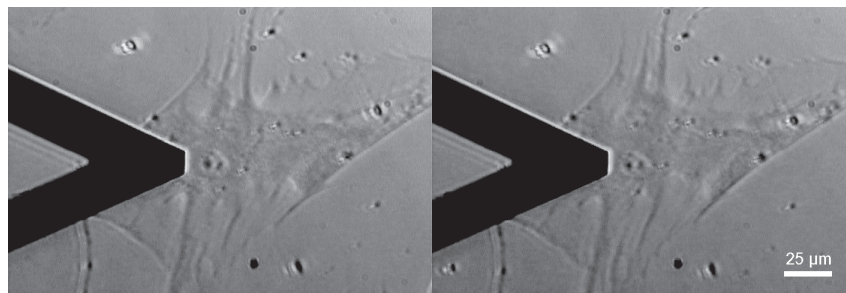
SCD sudden cardiac death - plötzlicher Herztod

SICM scanning ion conductive microscope - Rasterionenleitfähigkeitsmikroskop

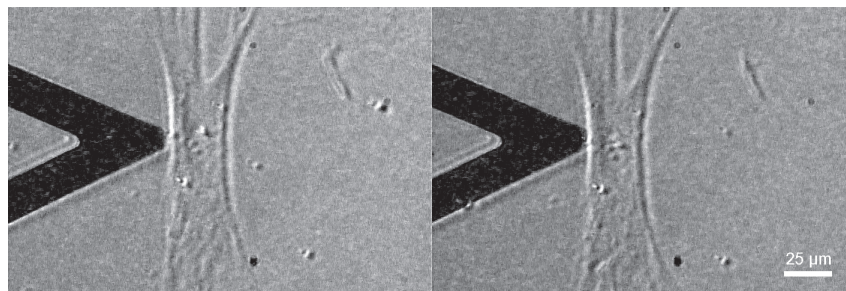
SLD superluminescent diode - Superlumineszenzdiode

SNOM scanning nearfield optical microscopy - optische Rasternahfeldmikroskop

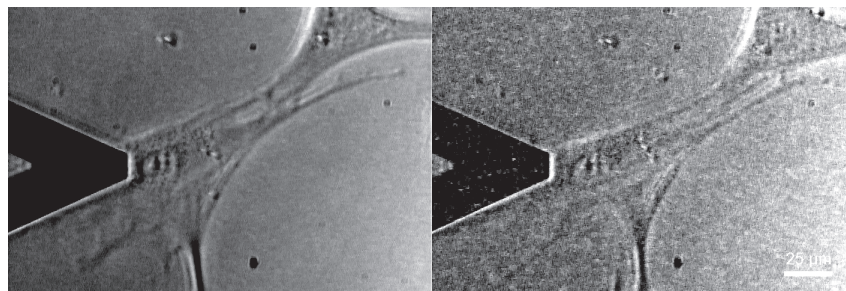
STM scanning tunneling microscopy - Rastertunnelmikroskop



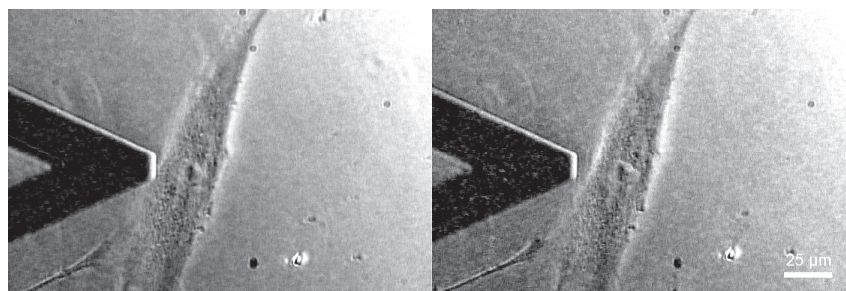
(a) Dipper



(b) Stan



(c) Wendy



(d) Ford

Abb. A.1.1: Direkter optischer Vergleich der einzelnen Zelllinien (erstellt mit Connect.m A.3.2)

A.2 Lösung der Langevin Gleichung

Die Langevin Gleichung für einen gedämpften eindimensionalen harmonischen Oszillator mit erzwungener Schwingung gilt [16]:

$$\frac{d^2}{dt^2} = 2\alpha \frac{dq}{dt} + \omega_0^2 q = \frac{F_0}{m_{\text{eff}}} e^{i\omega t} \quad (\text{A.1})$$

Hierbei beschreibt α die Dämpfungskonstante, ω die Anregungsfrequenz, ω_0 die Resonanzfrequenz und F_0 ist die externe Kraftanregung.

Für eine Dämpfung ($2\alpha \ll \omega_0$) und $\omega \approx \omega_0$ ist die Lösung stationärer Schwingungen gegeben durch ein Lorentzprofil:

$$q(t) = \frac{F_0}{2 m_{\text{eff}} \omega \sqrt{(\omega_0 - \omega)^2 + \alpha^2}} \cdot \cos(\omega t + \phi) \quad (\text{A.2})$$

und dem Phasenwinkel $\phi = \arctan\left(\frac{\alpha\omega}{\omega^2 - \omega_0^2}\right)$. Mit dem Gütefaktor $Q = \frac{\omega_0}{\alpha}$ und der Amplitude A_0 ist die Lösung nach Fourier-Transformation im Frequenzraum:

$$\tilde{q}(\omega)^2 = \frac{A_0^2 \omega_0^2}{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \left(\frac{\omega\omega_0}{Q}\right)^2} \quad (\text{A.3})$$

Die Integration der Lösung (A.3) im Frequenzraum $\left(\int_0^\infty \tilde{q}(\omega)^2 d\omega\right)$ liefert die mittlere quadratische Auslenkung $\langle q^2 \rangle$. Hierbei sind die Fitparameter an das Lorentzprofil bei der Eigenfrequenz (vgl. Abb. A.0.1): Q , ω_0 und A_0 . Die Fluktuationen ergeben sich durch die mittlere quadratische Auslenkung in Volt multipliziert mit dem Umrechnungsfaktor *InvOLS* und einem Korrekturfaktor $\chi \simeq 1$ für *InvOLS*, der das Verhältnis des Rauschens zwischen frei schwingendem Cantilever zum Cantilever im Kontakt für verschiedene Laserspot-Größen beschreibt¹ [17].

$$\langle q^2 \rangle = \langle \delta V^2 \rangle \chi^2 \text{InvOLS}^2 \quad (\text{A.4})$$

¹Darstellung verschiedener Werte für χ gegeben durch die „Equation Card“ von Asylum Research:
<https://www.asylumresearch.com/Applications/EquationCard.pdf>

A.3 MatLab Skripte

A.3.1 Messtage/Zelllinien zuweisen

Messungen.m

```
1 % Zuweisung der Messtage(statisch) zu den Zelllinien
2 % global "Zelllinie"; 2x1 Cell mit "Name" in {1,1} und
   Spaltenvektor mit
3 % Messtagen in {2,1}
4 global Dipper;
5 global Stan;
6 global Wendy;
7 global Ford;
8 Dipper1=[20160225;20160307;20160308]; %20160225 nur bis
   ForceMap 11
9 Dipper2=[];
10 Dipper3=[];
11 Dipper4=[];
12 Dipper5=[];
13 Stan1=[20160216];
14 Stan2=[20160225]; %20160225 nur ab ForceMap 12
15 Wendy1=[20160229;20160301];
16 Wendy2=[20160223];
17 Wendy3=[];
18 Wendy4=[];
19 Wendy5=[];
20 Ford1=[];
21 Ford2=[20160414];
22 Ford3=[20160404;20160405];
23 Dipper={'Dipper'; [Dipper1;Dipper2;Dipper3;Dipper4;Dipper5]};
24 Stan={'Stan'; [Stan1;Stan2]};
25 Wendy={'Wendy'; [Wendy1;Wendy2;Wendy3;Wendy4;Wendy5]};
26 Ford={'Ford'; [Ford1;Ford2;Ford3]};
```

A.3.2 Optische Kontrolle

Connect.m

```

1 clear
2 %% Text in Koordinatensystem erzeugen
3 t = text(.05,.1,'25 \mu m','FontSize',20,'FontWeight','
   normal');
4 F = getframe(gca,[21 20 77 30]); % Text speichern
5 close
6 % Ebene in RGB-Bild auswählen
7 c = rgb2ind(F.cdata,2); % und Binaerbild erzeugen
8 % Ort der schwarzen Pixel einlesen (schwarz gleich 0):
9 [i,j] = find(c == 0);
10 I=[i,j];
11
12 %% Bilder vor und nach der Messung einlesen
13 % Name Fmp{b,a}0000.png gL=#Ziffern in Dateiname
14 gL=4;
15 Max=length(dir(['Fmp' '*.png']))/2;
16 for i=0:Max
17     try
18         before=imread(['Fmpb' [repmat('0',1,gL-length(num2str(i))
19             )] num2str(i)] '.png');
19         after=imread(['Fmpa' [repmat('0',1,gL-length(num2str(i))
20             )] num2str(i)] '.png');
21         comp = [before(20:496,39:745,:),after(20:496,39:745,:)];
22         % zusammenfügen, IGOR Skala abgeschnitten
23         comp(440:448,1295:1374,:)=255; % scalebar 79px 25 \mu m
24         % Skala und Text in comp einfügen
25         for x=1:size(I,1);
26             comp(405+I(x,1),1296+I(x,2),:)=255;
27         end
28         image(comp)
29         ausgabe=['Comp' [repmat('0',1,gL-length(num2str(i))
30             )] num2str(i)] '.png']; % Speichernamen erzeugen
31         imwrite(comp,ausgabe); % Ausgabe 'Comp0000.png'
32     end
33 end

```

A.3.3 Zelllinie Auswerten

Zelllinie.m

```

1 function [Auswertung]= Zelllinie()
2 % Auswertung einer Zelllinie {Dipper,Stan,Wendy,Ford}
3 % Messtage, Zelllinie aus Messungen.m; Einlesen aller
4 % Elastizitaetswerte aus den .txt Dateien
5 clear;
6 run Messungen;
7 startFolder = cd;
8 nheaderlines = 2;
9 hold off;
10
11 %% Einlesen der Zelllinie und festlegen der x-Bereiche im
12    Histogramm
13 Name = input('Zelllinie (Dipper/Stan/Wendy/Ford): ');
14 string = [Name{1,1}]; % Zelllinie
15 nums = [Name{2,1}]; % Messtage
16
17 Range = input('x-Range of Histogram x=[0,R][kPa]. Set R=');
18
19 [lines columns]=size(Range);
20 if lines==1 && columns==1;
21     Range=[Range];
22 elseif lines>=1 && columns==1;
23     Range=sort(Range)';
24 elseif lines>=1 && columns>=1;
25     Range=sort(reshape(Range,1,lines*columns));
26 else
27     disp('bad input')
28 end
29
30 %% Histogramm aller Daten einer Zelllinie
31
32 for j=1:length(Range);
33     CountZellen=1;
34     range=Range(1,j);
35     D=[]; % Indizierung Datenvektor
36     DataPath = 'Z:\Julius\';

```

```

37     for k=1:length(Name{2,1})
38         cd ([DataPath num2str(nums(k,1))]);
39         % 'FMxyE1F.txt' mit gL=#Ziffern xy in Dateiname
40         gL=2;
41         try
42             Content=dir(['FM' '*.txt']);
43             Ende=Content(end,1).name(3:4); %letzter Wert xy
               im aktuellen Ordner
44         catch
45             error('Check files in currentfolder')
46         end
47
48         if nums(k,1)==20160225 && strcmp(string,'Dipper') %
               Wechsel der Probe innerhalb eines Messtages,
               beliebig erweiterbar
49             Min=0;
50             Max=11;
51         elseif nums(k,1)==20160225 && strcmp(string,'Stan')
52             Min=12;
53             Max=str2double(Ende);
54         else
55             Min=0;
56             Max=str2double(Ende);
57         end
58
59         for l=Min:Max
60             try
61                 file=importdata(['FM' [repmat('0',1,gL-
               length(num2str(l))) num2str(l)] 'E1F.txt'
               ],'\t', nheaderlines);
62                 % automatisch Daten einlesen
63                 [Lines Columns]=size(file.data);
64                 disc=reshape(file.data,Lines*Columns,1);
65                 % Spaltenvektor
66                 D=[D; disc]; % Alle Werte einfüegen
67                 CountZellen=CountZellen+1;
68             end
69         end
70     end
71

```

```

72
73 bin=0:range*10:range*1000;
74 abundance=hist(D, bin);
75 binkPa=0:(range/100):range;
76
77 bar(binkPa, abundance); %%Histogramm mit absoluter Haeufigkeit
78
79 all=hist(D, bin);
80 all=all(1:100);
81
82 allN=all/sum(all);
83 binkPa=0:(range/100):range-(range/100); %%Werteueberhang
84
85 %% Histogramm mit relativer Haeufigkeit
86 bar(binkPa, allN, 'r')
87
88 xlabel('elastic modulus [kPa]', 'FontSize', 20) %
      Elastizitaetsmodul
89 ylabel('probability [1/kPa]', 'FontSize', 20) %rel.
      Haeufigkeit
90 set(gca, 'FontSize', 20, 'TickDir', 'Out')
91 xmin=0; ymin=0;
92 xmax=range; ymax=0.1;
93 axis([xmin xmax ymin ymax])
94 box off
95
96 savefilename = [string '_Hist' num2str(range)];
97 savefilenamefit = [string '_Histfit' num2str(range)];
98 savepath = 'Z:\Hist\';
99 cd(savepath)
100
101 saveas(gcf, savefilename, 'eps') % Histogramm speichern
102
103 %% Definition des Fittyps und der Koeffizienten
104
105 options=fityoptions('Method', 'NonlinearLeastSquares', ...
106     'Robust', 'on', 'Algorithm', 'Trust-Region', ...
107     'MaxFunEvals', 5000);
108 options;
109

```

```
110
111
112 if strcmp(string , 'Dipper')
113     x=7; %fitrange
114     method='gauss1';
115     options.Lower=[-Inf 4 -Inf];
116     options.Upper=[Inf 7 Inf];
117 elseif strcmp(string , 'Stan')
118     x=5; %fitrange
119     method='gauss1';
120     options.Lower=[-Inf 2 -Inf];
121     options.Upper=[Inf 7 Inf];
122 elseif strcmp(string , 'Wendy')
123     x=7; %fitrange
124     method='gauss3';
125     options.Lower=[0 0 0 0 2 0 0 3.5 0];
126     options.Upper=[Inf 2 Inf Inf 3.5 Inf Inf 7 Inf];
127 elseif strcmp(string , 'Ford')
128     x=10;
129     method='gauss2';
130     options.Lower=[-Inf 0 -Inf -Inf 4.5 -Inf];
131     options.Upper=[Inf 4 Inf Inf 10 Inf];
132 end
133
134 %% Fit
135
136 [cfun , gof , output]=fit (binkPa (2:(x/0.2)) , allN (2:(x/0.2)) ,
    method , options);
137
138 hold on
139 h=plot (cfun , 'blue'); % Achsenbeschriftung ueberschrieben
140 set (h , 'LineWidth' , 2 , 'DisplayName' , 'Fit');
141 xlabel ('elastic modulus [kPa]' , 'FontSize' , 20)
142 ylabel ('probability [1/kPa]' , 'FontSize' , 20)
143 set (gca , 'FontSize' , 20 , 'TickDir' , 'Out')
144 cd (savepath)
145
146 %% Anmerkung an Fit-Peaks
147 % position=[x y width height];
148 more=get (gca , 'Position');
```



```

149 % rel. Einheiten konvertieren
150 convx=more(1,3)/range;
151 convy=more(1,4)/ymax;
152 center=[]; maxvar={}; percent=1.5; upset=1.1;
153
154 for d=1:sscanf(method, '%*5c%d')
155     cvar = ['cfun.b' int2str(d)]; % Fit-Zentrum
156     hvar = ['cfun.a' int2str(d)]; % Fit-Hoehe Max bei exp(0)
157     center(1,d)=eval(cvar); % speichern in Matrix
158     center(2,d)=eval(hvar);
159     center(3,d)=gof.rsquare;
160     maxvar{1,d}=[num2str(center(1,d), '%.2f') ' kPa']; %
161     % Konstrukt fuer 'textarrow' Anmerkung
162     maxvar{2,d}=[num2str(gof.rsquare, '%.2f')]
163
164     annotation('textarrow', ...
165         [more(1,1)+center(1,d)*convx*percent more(1,1)+
166           center(1,d)*convx], ...
167         [more(1,2)*upset+center(2,d)*convy*percent more
168           (1,2)*upset+center(2,d)*convy], ...
169         'String', maxvar{1,d}, 'TextRotation', 0, '
170         VerticalAlignment', 'bottom', 'FontSize', 16);
171
172 end
173
174 %% Grafikausgabe mit Gauss Peaks
175 saveas(gcf, savefilenamefit, 'eps')
176 end
177
178 %% Parameter speichern
179 name=[string '.txt'];
180 fid=fopen(name, 'w');
181 fprintf(fid, '%-8s % 6s, % 8s % 4.f, % 12s %6.f \r\n', 'Name =
182     ', string, '# Zellen =', CountZellen, '# Messwerte =',
183     length(D));
184 fclose(fid);
185 system('copy Dipper.txt+Stan.txt+Wendy.txt+Ford.txt all.txt')
186 cd(startFolder)

```

```
181 save('test.mat') % Arbeitsspeicher sichern  
182 clear  
183 end
```

A.3.4 Anweisung CalcKompMod von J. Schröder [26]

CalcKompMod.m

```
1 CalcKompMod(18,... %Anzahl Korrekturkurven
2     [10,20,30,40,50,75,100,125,150],... %Frequenzen
3     [0.5,0.5,0.5,0.5,0.5,0.5,0.5,0.5,0.5],... %Zeiten
4     -1.9*10^-6,... %Kontakthoehe
5     'stopLineIdx',10,'stopIdx',11,... %ForceMap Groesse
6     'startMapIdx',0,'stopMapIdx',12,... %ForceMap Anzahl
7     'nuldurfront',1.5,'b0flag',0); %Parameter, 'b0flag'
    logischer Operator fuer HDD
```

A.3.5 Analyse der Gsterndaten

GsternAnalyse.m

```

1 % RE=real(Gsterndaten(lineIdx,pointIdx,freqIdx,mapIdx))
2 % h=bar(RE*1e-3,'b') %konv. in \si{\kilo}
3 % set(h,'FaceColor','none')
4
5 ALL=[];
6 MWF=[];
7 Range=20;
8 x=0:Range*100:Range*1000;
9 xkPa=(Range/10):Range; %Aufteilung mit Breite 2 fuer
    bessere Uebersicht
10
11 for j=1:size(Gsterndaten,3) % ueber alle Frequenzen
12     RE = real(Gsterndaten(:, :, j, :));
13     [lines columns]=size(RE);
14     D = reshape(RE,lines*columns,1); % Daten der Realteile
15     MW = median(reshape(RE,lines*columns,1)*1e-3); % MW
        aller Daten
16     MWF(j,1) = MW;
17     ALL = [ALL,D];
18 end
19 MWF % Ausgabe Vektor mit Mittelwerte je Frequenz
20 % size(MWF)=size(freq)= 9 1
21
22 abundance=hist(ALL,x);
23 h=bar(xkPa,abundance);
24 % set(h,'FaceColor','none');
25 set(gca,'FontSize',12,'TickDir','Out');
26 xlabel('E [kPa]','FontSize',12);
27 ylabel('abs. Haeufigkeit','FontSize',12);
28 box off;
29 grid on;
30 axis([-1 21 0 1600])
31 % Titel:
32 % title('Dipper','FontSize',12);
33 %
34 % title('Stan','FontSize',12);

```

Abbildungsverzeichnis

2.1.1 Aufbau des Rasterkraftmikroskopes	4
2.1.2 Kraftauslenkung Cantilever	6
2.1.3 Bestimmung OLS	8
2.3.1 Hertz Fit an Kraft-Distanz-Kurve	10
2.3.2 Übersicht Datenaufnahme bei statischer Messmethode	11
2.5.1 Schematischer Aufbau Zellkern	14
3.1.1 Rasterkraftmikroskop Asylum MFP-3D-Bio™	15
3.1.2 Messaufbau Rasterkraftmikroskop	16
3.1.3 Phasenkontrastbild	17
3.1.4 REM-Bild Cantilever	17
3.1.5 Spitzengeometrie DNP-10	18
3.3.1 Dynamische Messung	21
3.4.1 Schraubkappe T-Flasche	24
4.0.1 Direkter Vergleich der vier Zelllinien	26
4.0.2 Vollständiges Histogramm im Bereich bis 50kPa	28
4.1.1 Einzelpeak Verteilungen	29
4.1.2 Drei Peaks innerhalb der Elastizitätswerte bei Wendy	30
4.1.3 Zwei Peaks innerhalb der Elastizitätswerte bei Ford	31
4.2.1 Extrapolation Widerstandsfaktor $b(h_0)$	33
4.2.2 Komplexe Schermodul Dipper	34
4.2.3 Verlustfaktor η Dipper	35
4.2.4 Komplexe Schermodul Stan	36
4.2.5 Verlustfaktor η Stan	37
4.2.6 Vergleich der absoluten Häufigkeiten von G' & G'' je Frequenz f_i Hz	38
4.3.1 Vergleich untersuchte Zelllinien mit vorherigen Messungen	41
A.0.1 Thermisches Rauschspektrum	45
A.0.2 Temperaturverlauf während der Messung	45
A.1.1 Übersicht Zelllinien	47

Tabellenverzeichnis

3.1.1 Cantilever Spezifikationen und Fit Parameter	18
3.3.1 Indenter Funktion dynamische Messung	21
4.0.1 Zelllinie Umbenennung	25
4.0.2 Anzahl der statischen Elastizitätsmessungen	27
4.1.1 Koeffizienten bei Fit Dipper und Stan	29
4.1.2 Wendy Fit Koeffizienten	30
4.1.3 Ford Fit Koeffizienten	31
4.1.4 Übersicht der Elastizitätswerte (statisch)	31
4.2.1 Vergleich statische und dynamische Ergebnisse	37
4.3.1 Messwerte (statisch) Tamara Münnich [41]	40
4.3.2 Messwerte (statisch) Ann-Christin Moritzer [42]	40
4.3.3 Messwerte (dynamisch) Jonathan Schröder [26]	40

Literaturverzeichnis

- [1] GP Dobson. *On being the right size: Heart design, mitochondrial efficiency and lifespan potential. Clinical and experimental pharmacology and physiology*, 30(8):590–597, 2003.
- [2] Jan Rother, Helen Nöding, Ingo Mey, and Andreas Janshoff. *Atomic force microscopy-based microrheology reveals significant differences in the viscoelastic response between malign and benign cell lines. Open Biology*, 4(5), 2014. **Supplementary Information.**
- [3] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber. *Atomic Force Microscope. Phys. Rev. Lett.*, 56(9):930–933, Mar. 1986.
- [4] G. Binnig and H. Rohrer. *Scanning tunneling microscopy. Surface Science*, 126(1):236 – 244, 1983.
- [5] Dror Sarid. *Scanning force microscopy*, volume 5 of *Oxford series in optical and imaging sciences*. Oxford Univ. Press, New York [u.a.], Rev. ed., 1994.
- [6] Ernst Meyer, Hans Josef Hug, and Roland Bennewitz. *Scanning probe microscopy. Advanced texts in physics*. Springer, Berlin [u.a.], 2004.
- [7] M. Pellegrino, P. Orsini, M. Pellegrini, P. Baschieri, F. Dinelli, D. Petracchi, E. Tognoni, and C. Ascoli. *Integrated SICM-AFM-optical microscope to measure forces due to hydrostatic pressure applied to a pipette. IET Micro Nano Letters*, 7(4):317–320, April 2012.
- [8] C. Julian Chen. *Introduction to scanning tunneling microscopy*, volume 64 of *Monographs on the physics and chemistry of materials*. Oxford Univ. Press, Oxford [u.a.], 2. ed., 2008.
- [9] Gerd Kaupp. *Atomic Force Microscopy, Scanning Nearfield Optical Microscopy and Nanoscratching*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2006.
- [10] J. N. Israelachvili and D. Tabor. *The Measurement of Van Der Waals Dispersion Forces in the Range 1.5 to 130 nm. Proceedings of the Royal Society of*

- London. *Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 331(1584):19–38, November 1972.
- [11] Nancy A. Burnham, Richard J. Colton, and Hubert M. Pollock. *Interpretation issues in force microscopy. Journal of Vacuum Science & Technology A*, 9(4):2548–2556, 1991.
- [12] Tilo Fischer and Hans-Jerg Dorn. *Physikalische Formeln und Daten*. Verlag Klett, 1982.
- [13] DV Kazantsev and EA Kazantzeva. *A four-segment photodiode cantilever-bending sensor for an atomic-force microscope. Instruments and experimental techniques*, 57(5):634–639, 2014.
- [14] Lev Davidovič Landau and Evgenij M. Lifšic. *Mechanik*. Lehrbuch der theoretischen Physik, Band 1. Akademie-Verlag, Berlin, 9., bearb. Aufl.1976.
- [15] Jeffrey L. Hutter and John Bechhoefer. *Calibration of atomic-force microscope tips. Review of Scientific Instruments*, 64(7):1868–1873, 1993.
- [16] Alexander Harder. *Kraftmikroskopische und kraftspektroskopische Untersuchungen an Proteoglykanen*. Diplomarbeit, Fakultät für Physik, Universität Bielefeld, Juli 2009.
- [17] R Proksch, T E Schäffer, J P Cleveland, R C Callahan, and M B Viani. *Finite optical spot size and position corrections in thermal spring constant calibration. Nanotechnology*, 15(9):1344, 2004.
- [18] Paul A. Tipler and Gene Mosca. *Physik für Wissenschaftler und Ingenieure*. Verlag Springer Spektrum, 6. Auflage, 2009.
- [19] Lev Davidovič Landau and Evgenij M. Lifšic. *Elastizitätstheorie*. Lehrbuch der theoretischen Physik, Band 7. Akademie-Verlag, Berlin, 3. Auflage, 1970.
- [20] ©2016 JPK Instruments AG. All rights reserved. *JPK Instruments - App/Tech-Notes AFM Determining the elastic modulus of biological samples using atomic force microscopy*. 13.04.2016.
- [21] H. Hertz. *Über die Berührung fester elastischer Körper. Journal für die reine und angewandte Mathematik*, 92:156–171, Jan. 1881.
- [22] S.N. Magonov, V. Elings, and M.-H. Whangbo. *Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. Surface Science Letters*, 375(2):L385–L391, 1997.

- [23] K. Kendall and D. Tabor. *An Ultrasonic Study of the Area of Contact between Stationary and Sliding Surfaces. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 323(1554):321–340, Jun. 1971.
- [24] Emilios K. Dimitriadis, Ferenc Horkay, Julia Maresca, Bechara Kachar, and Richard S. Chadwick. *Determination of Elastic Moduli of Thin Layers of Soft Material Using the Atomic Force Microscope. Biophysical Journal*, 82(5):2798–2810, May 2002.
- [25] Ian N. Sneddon. *The relation between load and penetration in the axisymmetric boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. International Journal of Engineering Science*, 3(1):47–57, 1965.
- [26] Jonathan Max Stefan Schröder. *Bestimmung der rheologischen Eigenschaften von Zellkernen mithilfe des Rasterkraftmikroskops*. Bachelorarbeit, Fakultät für Physik - Experimentelle Biophysik, Universität Bielefeld, November 2015.
- [27] Jordi Alcaraz et al. *Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy. Biophysical Journal*, 84(3):2071–2079, 2003.
- [28] ©2016 DocCheck Medical Services GmbH. *DocCheck Flexikon QRS-Komplex*. 09.03.2016.
- [29] Dr. med. Susanne Berrisch-Rahmel. *ARVC. succidia AG medicalsports network*, 01.15:14–16, 2015.
- [30] Neil A. Campbell and Jane B. Reece. *Biologie*. Pearson Studium, München [u.a.], 8. aktualisierte Auflage, 2009.
- [31] Philip Schatz. *The Nucleus* CC BY 4.0. <http://philschatz.com/anatomy-book/contents/m46073.html>, 09.02.2016.
- [32] Nicholas Geisse. *AFM and Combined Optical Techniques. APP NOTE 12*, n.A.
- [33] Inc. Oxford Instruments Asylum Research. *MFP-3D-Bio AFM Brochure. MFP-3D-Bio*, June 2015.
- [34] ©1999 Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. *Lexikon der Biologie: Phasenkontrastmikroskopie*. 10.02.2016.
- [35] Jesper Glückstad and Darwin Palima. *Generalized Phase Contrast*. Springer Series in Optical Sciences, 146. Springer Netherlands, Dordrecht, 2009.
- [36] Hermann Beyer. *Theorie und Praxis des Phasenkontrastverfahrens*. Akad. Verl.-Ges., Frankfurt a. M., 1965.

- [37] Niklas Biere, 13.04.2016. diverse Aufnahmen am Raster-Elektronen-Mikroskop.
- [38] ©2016 Bruker Nano Inc. All Rights Reserved. *Bruker AFM Probes: Cantilever Product Details DNP-10*. 13.04.2016.
- [39] Gerhard Gstraunthaler. *Zell- und Gewebekultur : Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 7. Auflage, 2013.
- [40] ©2016 Greiner Bio One International GmbH. Produktkatalog: *Ch. 1 Cell and Tissue Culture*. 10.02.2016.
- [41] Tamara Münnich. *Rasterkraftmikroskopische Elastizitätsmessungen an fibroblastischen Zellkernen zur Charakterisierung von TMEM43- und Lamin-Mutationen*. Bachelorarbeit, Fakultät für Physik - Experimentelle Biophysik, Universität Bielefeld, September 2012.
- [42] Ann-Christin Moritzer. *Rasterkraftmikroskopische Elastizitätsmessungen an fibroblastischen Zellkernen und deren Größenbestimmung zur Charakterisierung von Lamin - Mutationen*. Forschungsbericht als Teil des Masterstudiums, Fakultät für Physik - Experimentelle Biophysik, Universität Bielefeld, April 2016.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Julius Hillebrenner, versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Bachelorarbeit mit dem Titel „Rasterkraftmikroskopische Elastizitätsmessungen an Zellkernen“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erbracht habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei verschiedenen Personen für Ihre Unterstützung während des Verlaufs meiner Bachelorarbeit bedanken. Die freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Anselmetti ergab eine gute Grundlage für angenehmes Arbeiten.

Für die Einarbeitung am Asylum, viele hilfreiche Tipps, die Probenbeschaffung und die Betreuung während der gesamten Zeitspanne bedanke ich mich bei Dr. V. Walhorn.

Die vier Zelllinien wurden im Herz- und Diabeteszentrum NRW in Bad Oeynhausen kultiviert, per Fahrdienst geliefert und stammen von der Arbeitsgruppe von Peter Bross (*Aarhus University, 8200 Aarhus N, Denmark*) - Danke! - und haben die Messungen erst ermöglicht.

Während der Abwesenheit von Helene Schellenberg hat mich Niklas Biere in der Zellkultur eingearbeitet und stand mir neben Hilfestellungen bei Fragen, dem Autoklavieren und den Aufnahmen am REM zur Seite. Die Rotation mit Niklas in der zweitäglichen Zellkultur und die Proben(be-&/her-)stellung hat auch nach der Wiederkehr von Helene hervorragend funktioniert.

Den Herren vom TSV Hillentrup und Dennis möchte ich für viel Ablenkung beim Sport danken! Nicht zu vergessen ist die finanzielle und moralische Unterstützung meiner Mutter, die mir das Studium ermöglicht und stets zur Seite steht.