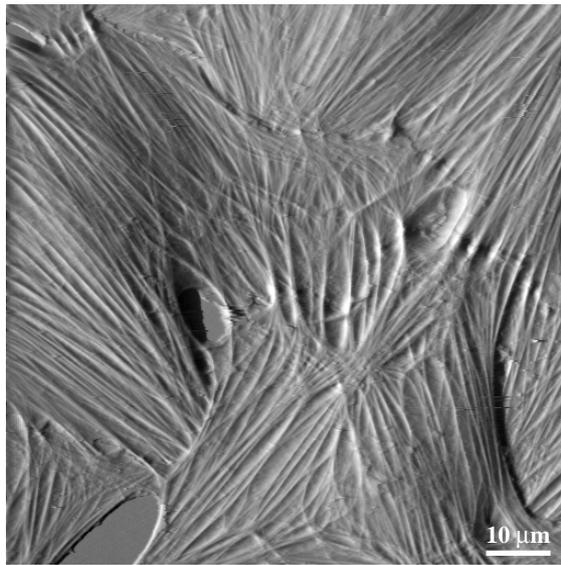


Mikromechanische Eigenschaften dünner Polymerfilme und lebender Zellen

- eine Untersuchung mittels Rasterkraftmikroskopie
und Finite-Elemente-Simulation -



AFM-Aufnahme lebender Fibroblasten

Dissertation an der Fakultät für Physik
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von

Jan Domke
aus Nürnberg

München, den 19. Dezember 2000

Erster Gutachter:
Zweiter Gutachter:
Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Hermann Gaub
Prof. Dr. Khaled Karrai
3. Mai 2001

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 EINFÜHRUNG	5
1.2 ZIEL DER ARBEIT	6
2 METHODEN	8
2.1 MATERIALTHEORIE	8
2.1.1 Hookesche Elastizitätstheorie und Hertzmodell	8
2.1.2 Mooney-Rivlin-Modell	10
2.2 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE	12
2.2.1 Aufbau und Funktionsprinzip	12
2.2.2 Verwendete Kraftmikroskope und Versuchsaufbau	13
2.2.3 Cantilever und Abtastspitze	14
2.2.4 Abbildungsverfahren	15
2.2.5 Kraft- und Elastizitätsmessungen	15
2.3 FINITE-ELEMENTE-METHODE	18
2.3.1 Einführung	18
2.3.2 Simulation von Kraft-Eindrückungskurven	20
3 ANALYSE SIMULIRTER KRAFTKURVEN MITTELS HERTZMODELL	23
3.1 EINFLUß DER MOONEY-RIVLIN-KONSTANTEN UND DES KONUSWINKELS	23
3.2 ÜBERSCHÄTZEN DES ELASTIZITÄTSMODULS IN DER AFM-ANWENDUNG	25
3.2.1 Analyse mittels Hertzmodell des Konus	25
3.2.2 Analyse mittels Hertzmodell des Paraboloids	27
3.3 DISKUSSION DER GRENZEN IN DER ANWENDUNG DES HERTZMODELLS	29
4 ENTWICKLUNG EINES PARAMETRISCHEN MODELLS ZUR BESCHREIBUNG ELASTISCHER EINDRÜCKUNGEN	31
4.1 PARAMETRISCHE ERWEITERUNGEN DES HERTZMODELLS	31
4.1.1 Eindrückung des Konus in dünne Proben	31
4.1.2 Eindrückung des Paraboloids in dünne Proben	34
4.2 VERKNÜPFUNG DER BEIDEN ERWEITERUNGEN: EINDRÜCKUNG DER AFM-SPITZE IN DÜNNE PROBEN	34
5 CHARAKTERISIERUNG DES PARAMETRISCHEN MODELLS	38
5.1 EINFLUß DES FITINTERVALLS	38
5.2 EINFLUß DES SPITZENRADIUS	40
5.3 EINFLUß VON REIBUNG	42
5.4 EINFLUß VON INHOMOGENEN PROBEN	44
5.4.1 Weiche Oberflächenschicht	44
5.4.2 Harte Oberflächenschicht	46
5.5 SCHLUßFOLGERUNGEN	48

6 EXPERIMENTELLE ANWENDUNG - HERTZMODELL UND PARAMETRISCHES MODELL IM VERGLEICH	49
6.1 GELATINEKEILE ALS MODELLSYSTEM FLACHER ZELLEN	49
6.1.1 Überschätzen des Elastizitätsmoduls im Experiment	50
6.1.2 Vergleich der berechneten Elastizitätsmoduln und Probendicken	51
6.1.3 Ist eine exakte Höhenbestimmung weicher Proben möglich?	54
6.2 UNTERSUCHUNG VON LEBENDEN ZELLEN	56
6.3 DISKUSSION	59
7 SUBSTRATABHÄNGIGKEIT DER ADHÄSION VON OSTEOLASTEN	62
7.1 CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTRATE	63
7.2 MORPHOLOGIE UND ELASTIZITÄT DER OSTEOLASTEN	65
8 UNTERSUCHUNG PULSIERENDER HERZMUSKELZELLEN	71
8.1 DYNAMIK IM ZELLRASEN	72
8.2 PULSMESSUNGEN AN EINZELZELLEN	74
8.3 WIE STARK IST EINE HERZMUSKELZELLE?	78
9 AUSBLICK	84
LITERATURVERZEICHNIS	86
ANHANG	95
A NOMENKLATUR	95
B ABKÜRZUNGEN	96
C GEWICHTUNGSFUNKTIONEN	97
D PRÄPARATION DER GELATINEPROBEN	98
E ZELLKULTUR	98
MTLn3-Zellen	98
Osteoblasten	99
Herzmuskelzellen	99
F KRAFTABSCHÄTZUNG ZUR ERZEUGUNG DES FLÜSSIGKEITSSTROMES	99
G ANKLEBEN VON GLASKUGELN AUF CANTILEVER	101
H SOLVIA PRE- UND POST-FILES	102
EIGENE PUBLIKATIONEN	124
LEBENS LAUF	125

Zusammenfassung

In der Zellbiologie leisten Elastizitätsmessungen auf der Submikrometerskala an lebenden Zellen wichtige Beiträge zur Aufklärung von Fragen der Zellmechanik. Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit die Methode der Elastizitätsmessung mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) erweitert, um quantitative Elastizitätsuntersuchungen auch an äußerst weichen dünnen Proben durchführen zu können. Die diskutierten Proben sind dabei mit einem Elastizitätsmodul von einigen Kilopascal extrem weich und haben gleichzeitig eine Dicke von lediglich einigen 100 Nanometern. Bisherige Analysemethoden der Elastizitätsmessungen basierten meist auf dem sogenannten Hertzmodell: einem theoretischen Modell, das zum einen nur die Eindrückung in äußerst dicke Proben beschreibt und zum anderen lediglich von der AFM-Spitze abweichende Stempelgeometrien beinhaltet. Mit dem Hertzmodell berechnete Elastizitätswerte mußten daher stets als Näherung verstanden werden.

Für die Analyse elastischer Eigenschaften mit dem AFM ist die genaue Kenntnis der mechanischen Wechselwirkung zwischen AFM-Spitze und Probe von zentraler Bedeutung. Diese wurde mit der Finite-Elemente-Methode (FEM) untersucht, indem die vollkommen elastische Eindrückung der AFM-Spitze in gummielastische Proben simuliert wurde. Hierbei wurde insbesondere der Einfluß der Probendicke und der Geometrie des eindrückenden Stempels auf das Kraft-Eindrückungsverhalten charakterisiert.

Mit Hilfe der FEM konnte gezeigt werden, daß im Falle dünner Proben zwei unterschiedliche Ursachen bei der Analyse der Elastizitätsmessungen durch das Hertzmodell, zu einem systematischen Überschätzen des berechneten Elastizitätsmoduls führen: Einerseits die vom Hertzmodell abweichende Geometrie der AFM-Spitze und andererseits die geringe Probendicke. Letzteres führt zur Detektion des harten Substrates im Kraft-Eindrückungsprozeß. Erst bei einer Probendicke von über 1,5 μm führt das Hertzmodell bei den untersuchten weichen Proben und Auflagekräften von unter 1 nN nur noch zu geringen Abweichungen in der Elastizitätsanalyse. Dagegen ist mit dem Hertzmodell eine exakte Bestimmung der Topographie selbst extrem weicher Proben mit geringer Dicke möglich. Dazu wird der Kontaktpunkt im Kraft-Eindrückungsprozeß mittels Hertzmodell berechnet. Die Höhe der Probe wird dabei geringfügig unterschätzt, die Abweichung bewegt sich in der Größenordnung des Radius der AFM-Spitze.

Zur Verbesserung der Elastizitätsanalyse wurde mit Hilfe simulierter Kraft-Eindrückungskurven eine parametrische Erweiterung des Hertzmodells entwickelt, welche sowohl die Geometrie der AFM-Spitze als auch die Dicke der Proben berücksichtigt. Das Parametrische Modell wurde für Probendicken unter 1 μm optimiert. Es ermöglicht nun die Bestimmung des Elastizitätsmoduls unabhängig von der Dicke der Probe, wodurch die Methode der Elastizitätsmessung mittels AFM deutlich verbessert werden konnte. Im Falle von homogenen Materialien ermöglicht das Parametrische Modell eine exakte Bestimmung der Dicke und des Elastizitätsmoduls der Probe. Außerdem sind mit Hilfe des Parametrischen Modells feinste Inhomogenitäten der Probe detektierbar. So ist es gelungen in Gelatinekeilen von lediglich einigen 100 nm Dicke noch tiefenabhängige Elastizitätsveränderungen aufzuspüren.

Die parallele Anwendung des Hertzmodells und des Parametrischen Modells erlaubt nun auch bei inhomogenen Materialien sowohl eine exakte Bestimmung von Topographie als auch der Elastizität weicher Oberflächenschichten.

Als Anwendungsbeispiel von Zellelastizitätsmessungen wurde das Adhäsionsverhalten von Osteoblasten auf verschiedenen Substratmaterialien charakterisiert. Das Adhäsionsverhalten einzelner Zellen auf den verschiedenen Substraten wurde dabei aus den resultierenden Unterschieden in Elastizität und Morphologie der Zellen beurteilt. Diese Methode ermöglicht einen neuen Zugang zur Untersuchung der Biokompatibilität der Substratmaterialien auf zellulärer Ebene *in vitro*.

An aktiven Herzmuskelzellen wurde das AFM zur Detektion der mechanischen Kontraktion der Zellen verwendet. In einem konfluenten Rasen synchronisiert pulsierender Zellen konnte die Veränderung der Pulsamplitude mit der lateralen Verschiebung von Kontraktionszentren korreliert werden. In den Kontraktionszentren erfolgt dabei ein Anheben (positive Amplitude) in den passiven Zwischenbereichen dagegen ein Absenken der Zelloberfläche (negative Amplitude). An aktiven Einzelzellen ist es erstmalig gelungen die Kontraktion als Funktion des Ortes zu messen. Als Parameter mit der geringsten Schwankung und damit möglicherweise als charakteristisch für die individuelle Zelle haben sich die Halbwertsbreite und Anstiegszeit der Pulse erwiesen. Durch Variationen der Auflagekraft konnten Einzelzellen gezielt belastet und deren Leistungsvermögen abgeschätzt werden. Die Zellen konnten dabei Kräfte bis zu 300 nN anheben und erreichten eine Mindestleistung von bis zu 0,5 pW.

1 Einleitung

1.1 Einführung

Tierzellen werden von einem Geflecht aus Proteinfilamenten, dem sogenannten Cytoskelett, durchzogen. Das Cytoskelett besteht im wesentlichen aus drei verschiedenen Proteinfamilien: den Mikrotubuli, den Intermediärfilamenten und den Actinfilamenten. Eine Hauptaufgabe dieses Proteingeflechts ist es, die Zelle mechanisch zu stützen und so deren Form zu erhalten. Trotzdem ist das Cytoskelett kein starres Gerüst, sondern eine hoch dynamische Struktur, die es der Zelle auch ermöglicht, sich zu teilen und gerichtete Kriechbewegungen oder, im Falle von Muskelzellen, Kontraktionen auszuführen. Aber auch für den Transport von Organellen innerhalb der Zelle ist das Cytoskelett mitverantwortlich. Die jeweils stattfindenden Prozesse sind auf molekularer Ebene teilweise noch völlig ungeklärt und stellen zentrale Fragen in der Zellbiologie dar [1].

Die Erforschung des Cytoskeletts erfolgte lange Zeit mit lichtmikroskopischen Methoden oder der Elektronenmikroskopie. Letzteres macht jedoch das Fixieren der Proben notwendig, was natürlich die Untersuchung dynamischer Prozesse lebender Zellen ausschließt.

Neue Einblicke in die zelluläre Biomechanik wurden mit der Entwicklung des Rasterkraftmikroskops [2] (*atomic force microscope*, AFM) möglich. Diese bildgebende Technik basiert auf einem die Probe mechanisch abtastenden Kraftsensor und gehört zur Familie der Rastersondenmikroskope [3]. Auf harten anorganischen Materialien ist das AFM in der Lage, atomare Auflösung zu erzielen [4, 5]. Im Falle extrem weicher Proben vergrößert sich die Kontaktfläche zwischen Probe und abtastender AFM-Spitze erheblich und die Auflösung kann auf über 100 nm abnehmen. Erst in kristallinen Anordnungen wie Proteinkristallen ist molekulare Strukturanalyse auch in biologischen Proben möglich [6, 7]. Im Einsatz als empfindlicher Kraftsensor können mit dem AFM Wechselwirkungskräfte auf molekularer Ebene gemessen werden, so z.B. Rezeptor-Ligand-Bindungen [8] oder die Stärke kovalenter Bindungen [9]. Ebenso kann das Dehnungsverhalten einzelner Polymere sowie die Entfaltung einzelner Proteine [10, 11] untersucht werden. Die erreichte Kraftauflösung liegt im Bereich einiger Piconewton [12]. Wird dagegen die AFM-Spitze lokal in eine Probe eingedrückt, so kann aus dem Antwortverhalten der Probe auf deren mikromechanische Volumeneigenschaften rückgeschlossen werden. Diese Art der Elastizitätsmessung wurde neben der rein bildgebenden Anwendung schon bald dazu genutzt, gezielt Materialeigenschaften auf der Nanometerskala zu analysieren [13-15].

Eine große Stärke der Kraftmikroskopie liegt darin, in Flüssigkeit arbeiten zu können. Dies ermöglicht die Anwendung des AFMs an biologischen Proben in deren physiologischer Umgebung [16, 17], was eine Grundvoraussetzung zur Untersuchung lebender Zellen darstellt [18, 19]. Gewebezellen haben häufig das natürliche Bestreben auf spezifischen Substraten zu adhären und bedürfen daher keiner künstlichen Immobilisierung. Da AFM-Messungen in Echtzeit erfolgen, ist auch die Beobachtung dynamischer Prozesse beispielsweise aktiver Proteine [20, 21] oder lebender Zellen [22] möglich.

Die Eigenschaften des AFMs bieten somit eine Vielzahl neuer Untersuchungsmöglichkeiten in der Zellbiologie. Verglichen mit dem Lichtmikroskop kann die Morphologie der Oberfläche

lebender Zellen deutlich besser aufgelöst werden; neben einer überlegenen lateralen Auflösung ist das AFM zusätzlich in der Lage, präzise Höhenmessungen auszuführen. Die ortsaufgelöste Elastizitätsmessung im Submikrometerbereich ermöglicht unmittelbare Einblicke in die mechanischen Eigenschaften der Zelle und damit in erster Linie in die Mikromechanik des Cytoskeletts. Dynamische Veränderungen des Cytoskeletts im Falle hoch komplexer Prozesse wie dem Kriechen der Zellen [23] oder der Zellteilung [24, 25] sind folglich mit dem AFM zugänglich. Aber auch für die Untersuchung der Effekte spezifisch toxischer Wirkstoffe auf Eigenschaften der Zellmechanik ist das AFM geradezu prädestiniert [26].

1.2 Ziel der Arbeit

In der Materialforschung werden die elasto-plastischen Eigenschaften einer Probe typischerweise aus deren zyklischer Be- und Entlastung ermittelt. Dazu wird ein Stempel bekannter Geometrie in die Probe gedrückt und die resultierende Eindrückung als Funktion der Auflagekraft gemessen. Um die elastischen Eigenschaften verschiedener Proben vergleichen zu können, ist es notwendig, Elastizitätsmessungen quantitativ durchzuführen. Dasselbe gilt für den Vergleich der mikromechanischen mit den makroskopischen Materialeigenschaften ein und derselben Probe. Um ein Maß für Elastizität festlegen zu können, muß aber auch der Eindrückungsvorgang theoretisch verstanden sein und durch ein entsprechendes Modell beschrieben werden.

Die meisten theoretischen Modelle basieren auf den von Hertz entwickelten Grundlagen der Kontaktmechanik [27]. Hertz konnte die elastische Verformung zweier aufeinandergedrückter homogener Kugeln analytisch beschreiben. Für die praktische Anwendung war die Erweiterung der Theorie durch Sneddon [28] äußerst bedeutsam: in seiner Arbeit wurde u.a. die Eindrückung eines steifen konusförmigen bzw. parabolischen Stempels in einen elastischen Halbraum behandelt. Sneddens Erweiterung wird allgemein als das Hertzmodell bezeichnet. Die analytische Weiterentwicklung für dünne Proben bzw. für von der Rotationssymmetrie abweichende Stempelgeometrien erscheint dagegen als nicht möglich. Ein zentrales Problem stellt hierbei der a priori unbekannte Kontaktradius zwischen Probe und Stempel dar, es handelt sich um einen sogenannten *incomplete contact*. Dies macht ein Ausweichen auf numerische Lösungen nötig [29]. Numerische Weiterentwicklungen der Theorie beinhalten z.B. verschiedene flach endende Stempelgeometrien [30] oder die Eindrückung einer Kugel in geschichtete Proben [31].

In der Elastizitätsmessung mittels AFM wird außer bei qualitativen Methoden [32] meist die von Sneddon formulierte Form des Hertzmodells verwendet, um die Elastizität quantitativ zu erfassen [14, 33]. Dies ist jedoch in vielerlei Hinsicht eine starke Vereinfachung. Werden beispielsweise dünne weiche Proben verwendet, so "fühlt" der eindrückende Stempel das harte Substrat und es entsteht ein Härteartefakt: die Probe erscheint in der Messung zu hart [34]. Des weiteren stimmt auch die Stempelgeometrie des Hertzmodells nicht mit der Geometrie der AFM-Spitze überein, die meist aus einer vierseitigen Pyramide mit kugelförmigem Apex besteht. Schließlich erweisen sich die untersuchten Proben zwar oftmals, entsprechend dem Hertzmodell, als hochgradig elastisch [35, 36], die von der Theorie geforderte Homogenität der Probe ist aber im Falle lebender Zellen sicherlich nicht gegeben. Außerdem treten bei weichen Proben relativ große Eindrückungen und entsprechend starke Materialdeformationen auf, welche in Widerspruch zu der im Hertzmodell verwendeten Materialtheorie stehen.

Die Weiterentwicklung des Hertzmodells zu einer neuen Theorie sowie deren experimentelle Überprüfung erfährt ein weiteres Problem durch die Größe der AFM-Spitze: Die Eindrücke erfolgen auf der Submikrometerskala und machen eine optische Beobachtung des Verdrängungsprozesses in der Probe unmöglich. Daher sind alternative Methoden wie z.B. die Simulation der Eindrücke erforderlich. Unter den numerischen Verfahren sind Simulationen mit der Finite-Elemente-Methode (FEM) inzwischen weit verbreitet. Beispielsweise wurden die Eindrückungsprozesse in Aluminiumschichten auf Silizium als Modellsystem für weiche Schichten auf hartem Untergrundmaterial (Al auf Si) sowie der umgekehrte Fall eines harten Films auf weichem Untergrund (Si auf Al) simuliert und im Experiment bestätigt [37, 38]. Aber auch Proben mit Elastizitätsvariationen als Funktion der Tiefe sind ebenso möglich [39] wie die Simulation einer Deformation des Stempels selbst [40]. Die Stärke der Simulation besteht in der völligen Freiheit der Wahl des virtuellen Experimentes: Stempel- und Probengeometrie, Materialbeschaffenheit, sowie die Randbedingungen des Kontaktes zwischen Probe und Stempel sind frei wählbar und somit auch gut zu kontrollieren.

Betrachtet man einen pyramidenförmigen Stempel, so zeigt er dasselbe Kraft-Eindrückungsverhalten wie ein Konus. In beiden Fällen ist die Kraft proportional zum Quadrat der Eindrücke: $F \sim \delta^2$ [41]. Da also Pyramide und Konus offenbar demselben Potenzgesetz gehorchen, sollte auch eine axialsymmetrische Näherung der AFM-Spitze möglich sein. Da außerdem in der Simulation äußerst realistische Probenmaterialien ausgewählt werden können, sollte es möglich sein, die Diskrepanz zwischen Hertzmodell und AFM-Experiment gezielt mittels FEM zu untersuchen. Vor diesem Hintergrund (viskose oder plastische Prozesse wurden dabei nicht berücksichtigt) wurde versucht, mit axialsymmetrischer FEM den Eindrückungsvorgang typischer AFM-Experimente zu simulieren und durch ein numerisches Modell zu beschreiben. Dies ist erforderlich, da das ganze Potential des AFMs in Elastizitätsmessungen nur dann genutzt werden kann, wenn es gelingt, die Fehler des Hertzmodells in der Anwendung auszuschalten. Ein verbessertes Modell zur Elastizitätsanalyse ist daher für die Klärung vieler biologischer Fragestellungen eine notwendige Voraussetzung.

Experimentell sind die diskutierten Fehler in der Anwendung des Hertzmodells bei AFM-Messungen bereits qualitativ beschrieben worden [42]. In dieser Arbeit werden für eine genauere Charakterisierung dieser Fehler zunächst simulierte Eindrückungsexperimente mit dem Hertzmodell ausgewertet. Im zentralen Teil folgt die numerische Entwicklung eines Modells zur Elastizitätsanalyse, welches auf der Simulation durch FEM basiert. Dieses parametrische Modell wird anschließend mit Hilfe weiterer Simulationen getestet und charakterisiert, bevor es schließlich zur Auswertung experimenteller Daten verwendet wird. Als Proben dienen dazu dünne Gelatinekeile als einfach zu handhabendes Modellsystem, sowie die Zellen einer metastatischen Zelllinie. Nach diesen grundlegenden Untersuchungen zu Eindrückungsexperimenten mit der AFM-Technik wird anschließend eine praktische Anwendung der Elastizitätsmessungen vorgestellt: Die Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von Knochenzellen, den sogenannten Osteoblasten, auf verschiedenen Implantatmaterialien. Schließlich wird mit den Experimenten an pulsierenden Herzmuskelzellen eine Studie vorgestellt, die als Inbegriff hoch dynamischer AFM-Anwendung nochmals die ganze Sensibilität und Sensitivität der AFM-Technik im Einsatz an lebenden Zellen veranschaulicht. Gleichzeitig präsentiert dieser letzte Abschnitt einen Übergang zur Möglichkeit, die verwendete Technik nicht nur passiv zur Beobachtung, sondern auch zur aktiven mechanischen Beeinflussung und Manipulation in der Zellbiologie zu gebrauchen.

2 Methoden

2.1 Materialtheorie

Eine Methode zur Bestimmung der elasto-plastischen Materialeigenschaften einer Probe ist die Durchführung von Eindrückungsexperimenten. Hierbei wird die Probe einem Zyklus aus Belastung und anschließender Entlastung unterzogen, wobei die Eindrückung durch einen Stempel bekannter Geometrie als Funktion der Auflagekraft gemessen wird. Die Probe kann ein isotropes homogenes Material sein oder aus mehreren verschiedenen Materialien aufgebaut sein, z.B. als Verbundwerkstoff oder als Multischichtsystem. Sollen Materialeigenschaften aus einem Experiment quantitativ bestimmt werden, muß der Eindrückungsvorgang in das Probenmaterial und dessen Verformung durch ein entsprechendes Theoriemodell beschreiben werden.

Im folgenden werden dazu zwei Modelle erläutert, welche für diese Arbeit von zentraler Bedeutung sind: (i) Das Hertzmodell, welches die lineare Hookesche Elastizitätstheorie beinhaltet, ist ein häufig verwendetes Modell, um mittels AFM durchgeführte Elastizitätsmessungen auszuwerten. (ii) Das Mooney-Rivlin-Modell ist eine nicht-lineare Theorie zur Beschreibung von inkompressiblen Materialien, welche also den Eigenschaften der Gummielastizität gehorchen. Die genaue Herleitung der jeweiligen Materialtheorie findet sich beispielsweise in einer Einführung von Ward und Hadley [43].

2.1.1 Hookesche Elastizitätstheorie und Hertzmodell

Wird auf ein isotropes Material die Spannung σ (Kraft/Fläche) ausgeübt, so erfolgt eine relative Dehnung ε (Längenänderung/Länge). In der Kontinuumsmechanik wird für isotrope Materialien im Hookeschen Gesetz der Elastizitätsmodul E (kurz: E-Modul, *Young's modulus*) als Maß der Elastizität definiert [44]:

$$\varepsilon = \frac{1}{E} \cdot \sigma \quad (1)$$

Die Elastizitätsmoduln verschiedener Materialien, welche aus dem Alltagsleben bekannt sind, erstrecken sich dabei über viele Größenordnungen. Einen Überblick dazu vermittelt Abb. 2.1.1. So besitzt Stahl einen E-Modul von etwa 200 GPa, im Gegensatz zu etwa 1 MPa im Falle eines äußerst weichen Gummis. Der sogenannte S-Layer, ein Teil einer bakteriellen Zellwand, ist wohl eines der härtesten biologischen Materialien ($E = 30$ GPa), während lebende Zellen zu den weichsten bekannten Materialien gehören.

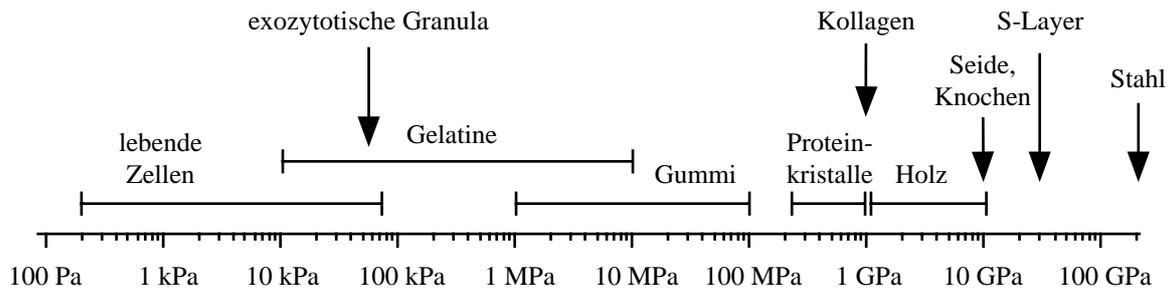


Abb. 2.1.1: Übersicht des Elastizitätsmoduls verschiedener Materialien (nach [34, 45]).

Wirkt ein allseitiger Druck auf das Material, so kann dessen relative Volumenänderung durch den sogenannten Kompressionsmodul K (*bulk modulus*) beschrieben werden. Er trägt wie E ebenfalls die Dimension Kraft durch Fläche, also Pascal [45]:

$$K = \frac{E}{3 \cdot (1 - 2\nu)} \quad (2)$$

Hierbei bezeichnet ν die Querkontraktions- oder Poissonzahl (*Poisson ratio*). Sie ist typischerweise größer als 0,2 und erreicht ihren Maximalwert 0,5 für den Fall, daß das Volumen während der Deformation erhalten bleibt, also bei inkompressiblen Materialien [44]. In der Auswertung der durchgeführten Experimente wurde stets eine Poissonzahl von $\nu = 0,5$ angenommen, d.h. sowohl Gelatineproben als auch lebende Zellen wurden als inkompressibel angenommen.

Die Voraussetzung zur Beschreibung elastischer Deformationen, und damit auch die Grundlage der meisten theoretischen Modelle zu Eindrückungsexperimenten, wurde von H. Hertz 1882 entwickelt [27, 46]. Er konnte die elastische Deformation zweier homogener Kugeln, welche gegeneinandergedrückt werden, analytisch beschreiben und leistete somit Pionierarbeit auf dem Gebiet der Kontaktmechanik. Sneddon diskutierte den Grenzfall eines elastischen homogenen Halbraumes, welcher durch einen rotationssymmetrischen Stempel eingedrückt wird [28]. Dies war eine bedeutende Weiterentwicklung der Theorie, da die Stempelgeometrie des Zylinders, des Konus (gerader Kreiskegel) bzw. des Paraboloids oder der Kugel auch in der Praxis häufig Verwendung findet. Bei der Elastizitätsuntersuchung weicher Proben mittels AFM werden zur Datenanalyse vorwiegend zwei der genannten Geometrien verwendet [14, 35, 47], die Theorie wird gemeinhin als Hertzmodell des Konus bzw. des Paraboloids bezeichnet. Dabei ist die Auflagekraft F des vollkommen harten Stempels eine Funktion der Eindrückung δ in den elastischen Halbraum [28, 48]:

$$F_{\text{Konus}} = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^2 \cdot \tan(\alpha) \quad (3)$$

$$F_{\text{Paraboloid}} = \frac{4}{3} \cdot \frac{E}{(1 - \nu^2)} \cdot \delta^{3/2} \cdot \sqrt{R} \quad (4)$$

Im Falle des Konus bezeichnet α den halben Öffnungswinkel (kurz: Konuswinkel), beim Paraboloid R den Krümmungsradius am Apex, wodurch die Geometrie des jeweiligen Stempels

beschrieben wird. Eine grundlegende Annahme beider Hertzmodelle ist eine reibungsfreie Kontaktfläche, d.h. Stempel und Probe gleiten während des Eindrückungsprozesses ohne Reibung aufeinander.

Im Falle kleiner Eindrückungen ($\delta \ll R$) und dicker Proben kann Gleichung (4) auch für kugelförmige Stempel benutzt werden [39]. Aufgrund der extremen Weichheit lebender Zellen sind die Eindrückungen der AFM-Spitze (Pyramide mit kugelförmigem Apex) bei der Elastizitätsmessung relativ groß. Da der Einfluß der genauen Apexgeometrie jedoch mit steigender Eindrückung abnimmt [49], wird in AFM-Anwendungen gewöhnlich das Hertzmodell des Konus verwendet.

Wie eingangs bereits erwähnt, ist das Hookesche Gesetz, welches dem Hertzmodell zugrunde liegt, ein lineares Materialgesetz. Es beschreibt lediglich den linearen Elastizitätsbereich eines Materials und verliert seine Gültigkeit daher bei großen Deformationen. In der Praxis beschränkt sich eine unkritische Anwendung des Hertzmodells deshalb auf kleine Eindrückungen in dicke Proben mit, im Falle von konusförmigem Stempel, einem großen stumpfen Öffnungswinkel (α nahe 90°) [48].

2.1.2 Mooney-Rivlin-Modell

In den Eindrückungsexperimenten mit dem AFM treten häufig große Materialdeformationen auf. Um diese auch theoretisch beschreiben zu können, ist eine Materialtheorie nötig, welche über das lineare Hookesche Gesetz hinausgeht. Die Modellvorstellung der im Experiment untersuchten Proben als Netzwerke mit gummielastischen Eigenschaften führt zur Verwendung einer Poissonzahl von 0,5 und zu einem theoretischen Modell, welches Gummielastizität beschreibt. Im gewählten Modell erfolgt die Beschreibung des zu verformenden Körpers über die freie Energie. Die zur Verformung geleistete Arbeit kann mit der Änderung der freien Energie (Helmholtz-Potential) gleichgesetzt werden: Im Falle von Gummi erfolgt die Deformation unter isotherm-isochoren Bedingungen. Diese Änderung der gespeicherten elastischen Energie U wird mit der Dehnungs-Energie-Funktion (*strain energy function*) beschrieben, sie definiert die aus der Dehnung resultierende gespeicherte Energie:

$$U = f(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3) \quad (5)$$

Sie ist eine Funktion der Ausdehnungsverhältnisse λ_i des Körpers in die drei Raumrichtungen, die am Beispiel eines deformierten Einheitswürfels in Abb. 2.1.2 verdeutlicht werden.

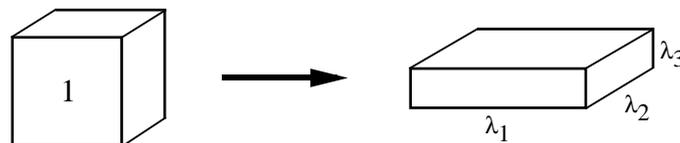


Abb. 2.1.2: Der Einheitswürfel wird deformiert, die Seiten des entstehenden Quaders haben die Länge λ_i . Im Falle eines inkompressiblen Materials bleibt das Volumen erhalten, d.h. $\lambda_1 \lambda_2 \lambda_3 = 1$.

Für kleine Dehnungen sollte Gleichung (5) in das Hookesche Gesetz überführt werden können, außerdem sollte U gleich Null sein, falls keine Dehnung erfolgt ist, d.h. $\lambda_i = 1$. Die Bedingung

für die Volumenerhaltung (Inkompressibilitätskriterium) lautet dabei $\lambda_1 \lambda_2 \lambda_3 = 1$. Bereits eine einfache Gleichung erfüllt diese beiden Bedingungen [43]:

$$U = C_1 \cdot (I_1 - 3) \quad \text{mit} \quad I_1 = \lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2 \quad (6)$$

Eine von Mooney vorgeschlagene Form ist um einen zusätzlichen Term erweitert und verbessert dadurch die Übereinstimmung mit experimentellen Messungen [50]:

$$U = C_1 \cdot (I_1 - 3) + C_2 \cdot (I_2 - 3) \quad \text{mit} \quad I_2 = \frac{1}{\lambda_1^2} + \frac{1}{\lambda_2^2} + \frac{1}{\lambda_3^2} \quad (7)$$

Die Weiterentwicklung der Energiefunktion in eine doppeltunendliche Reihe wurde von Rivlin untersucht [51]:

$$U = \sum_{i,j=0}^{\infty} C_{ij} (I_1 - 3)^i (I_2 - 3)^j \quad \text{mit} \quad C_{00} = 0 \quad (8)$$

Dabei wird die Reihenentwicklung üblicherweise zur sogenannten neo-Hookeschen Form (6) bzw. zum sogenannten Mooney-Rivlin-Modell (7) abgeschnitten.

Das in der Finite-Elemente-Simulation dieser Arbeit verwendete nicht-lineare elastische Material ist nahezu inkompressibel und wird durch ein modifiziertes Mooney-Rivlin-Modell beschrieben [52, 53]:

$${}^t_0U = C_1 \cdot ({}^t_0I_1 - 3) + C_2 \cdot ({}^t_0I_2 - 3) + \frac{K}{2} \cdot ({}^t_0J_3 - 1)^2 \quad (9)$$

Die Notation der Energiefunktion kennzeichnet deren zeitliche Entwicklung (zur Zeit t bezieht sie sich auf die Konfiguration zum Zeitpunkt 0). t_0I_1 und t_0I_2 sind die erste und zweite Invariante des Cauchy-Greenschen Deformationstensors, t_0J_3 ist die dritte Invariante des Deformationsgradiententensors und berücksichtigt die volumenabhängige Deformation des Materials mit dem Kompressionsmodul K [54]. Im Falle eines inkompressiblen Materials und kleiner Dehnungen kann der Elastizitätsmodul E durch die Mooney-Rivlin-Konstanten C_1 und C_2 beschrieben werden:

$$E = 6 \cdot (C_1 + C_2) \quad (10)$$

In einer physikalischen Interpretation der beiden Mooney-Rivlin-Konstanten wird das lineare Deformationsverhalten des Materials durch C_1 erfaßt, während das nicht-lineare Materialverhalten durch den Koeffizienten C_1/C_2 gekennzeichnet ist [55]. Auf molekularer Ebene erscheint dagegen eine Interpretation schwierig, zahlreiche Versuche dazu sind oftmals unvollständig oder auch widersprüchlich [56].

Schließlich sei noch der folgende Hinweis erlaubt, um einer Verwechslung vorzubeugen: Bei den Mooney-Rivlin-Konstanten handelt es sich nicht um die elastischen Konstanten bzw. elastischen Module der Tensorschreibweise, welche die lineare Deformation elastischer anisotroper Körper beschreiben [45]. Vielmehr beschreibt das Mooney-Rivlin-Modell ein isotropes nicht-lineares Materialverhalten.

2.2 Rasterkraftmikroskopie

2.2.1 Aufbau und Funktionsprinzip

Das Funktionsprinzip eines Rasterkraftmikroskops ist in Abb. 2.2.1 dargestellt. Die Sonde des AFMs ist eine scharfe Spitze, die sich am Ende einer empfindlichen Blattfeder, dem sogenannten Cantilever, befindet. Im einfachsten Betriebsmodus steht die Spitze in direktem Kontakt mit der Probe, welche mit einer Piezokeramik in alle drei Raumrichtungen bewegt werden kann. Durch eine laterale Rasterbewegung der Probe wird deren Oberflächentopographie von der Spitze abgetastet, wobei der Cantilever entsprechend der Oberfläche ausgelenkt wird. Die Auslenkung wird in der Regel durch einen Lichtzeiger, der auf der Rückseite des Cantilevers reflektiert wird, verstärkt und von einer segmentierten Photodiode detektiert. Die Differenz des Photostroms der verschiedenen Segmente kann nun in einem Computer in die Cantileverauslenkung und somit in die Probenhöhe zurückgerechnet werden. Korreliert mit der lateralen Position auf der Probe entsteht eine Rekonstruktion der Probestopographie.

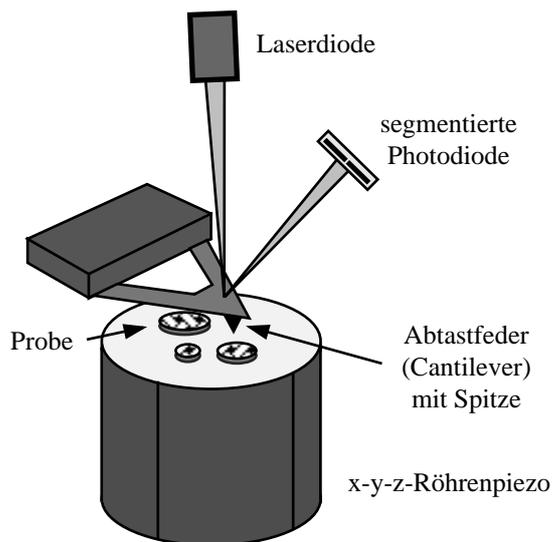


Abb. 2.2.1: Schematischer Aufbau eines Rasterkraftmikroskops. Die Probe kann mit Hilfe einer Piezokeramik unter dem Kraftsensor, dem Cantilever mit integrierter Spitze, bewegt werden. Der Cantilever wird entsprechend der Probestopographie ausgelenkt, was, durch einen Lichtzeiger verstärkt, in der positionsempfindlichen Photodiode detektiert wird.

Eine Abwandlung des konventionellen Aufbaus ist das sogenannte "stand alone AFM", welches in Abb. 2.2.2 skizziert ist. Hierbei ist der Cantilever am Röhrenpiezo befestigt und wird über die feststehende Probe bewegt, die nun in ihrer Größe prinzipiell nicht mehr eingeschränkt ist. Zusätzlich wird durch das nach unten abgeschlossene Probenvolumen die Arbeit in Flüssigkeiten stark vereinfacht. Der gesamte Aufbau kann auf einem invertierten Mikroskop plaziert werden, so daß bei transparenten Proben die Justierung und Kontrolle des Experiments deutlich erleichtert werden [57].

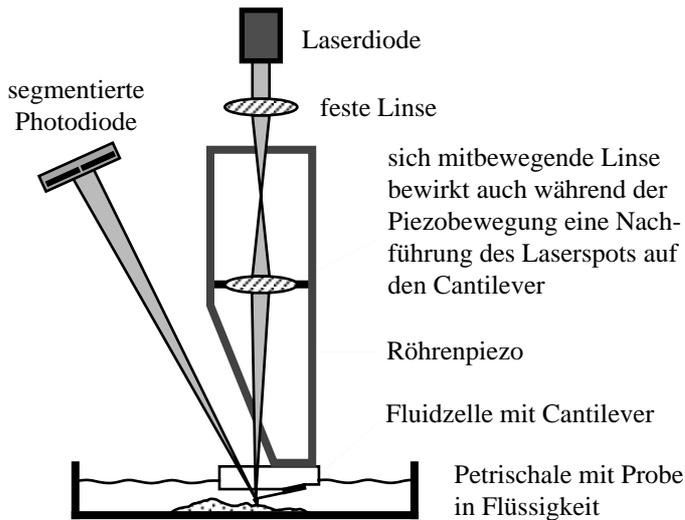


Abb. 2.2.2: Im Falle eines "stand alone AFMs" wird der Cantilever mittels Piezokeramik über die feststehende Probe bewegt. Dadurch wird sowohl die Untersuchung lateral ausgedehnter Proben als auch die Arbeit in Flüssigkeiten stark vereinfacht.

2.2.2 Verwendete Kraftmikroskope und Versuchsaufbau

Alle kraftmikroskopischen Untersuchungen wurden mit kommerziell erhältlichen AFMs durchgeführt. Zur Charakterisierung der Substratoberflächen in Kapitel 7.1 wurde ein Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) verwendet, alle anderen Messungen erfolgten mit einem Bioscope (Digital Instruments). Abbildungen im Kontaktmodus wurden mit dem Programm NIH Image SXM (*public domain* [58], National Institutes of Health, USA) bearbeitet, die Auswertung der Abbildungen und Elastizitätsdaten erfolgte mit dem Programm IGOR Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA).

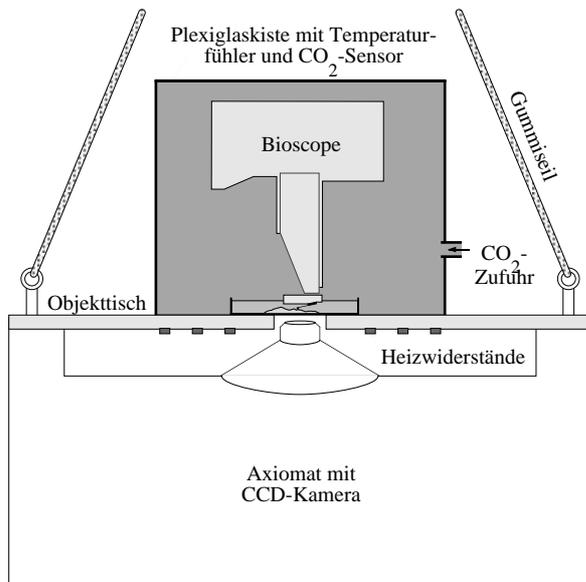


Abb. 2.2.3: Apparativer Aufbau der Zelleexperimente.

Wie in Abb. 2.2.3 skizziert, wurde das Bioscope auf ein invertiertes Mikroskop (Zeiss Axiomat, Zeiss, Oberkochen) gestellt, damit im Falle transparenter Substrate die Probenpositionierung und das eigentliche Experiment optisch kontrolliert werden konnten. Der gesamte Aufbau (Axiomat mit AFM) wurde an Gummiseilen an die Labordecke gehängt, um das AFM gegen Gebäudeschwingungen zu isolieren. Zellen wurden typischerweise direkt in kleinen Petrischalen (35 mm, Nunc, Wiesbaden-Biebrich) ausgesät, welche durch einen selbstgebauten magnetischen Halter auf dem Objektisch des Mikroskops befestigt wurden. Die Untersuchung der lebenden Zellen erfolgte direkt im Zellkulturmedium.

Das AFM befand sich in einer kleinen Plexiglaskammer, in der über einen CO_2 -Sensor die CO_2 -Zufuhr geregelt werden konnte. Die Temperatur wurde durch Heizwiderstände am

Objektstisch geregelt und mit Hilfe von Temperaturfühlern kontrolliert. Somit war es möglich die Experimente an lebenden Zellen unter Inkubatorbedingungen (37°C, 5% CO₂) durchzuführen.

2.2.3 Cantilever und Abtastspitze

Die häufig verwendeten Cantilever aus Siliziumnitrid Si₃N₄ werden mit Ätztechniken hergestellt, wie sie in der Halbleiterindustrie Anwendung finden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden stets Microlever (Coated Microlever, Park Scientific Instruments, Sunnyvale, USA) verwendet. Die Geometrie der Abtastspitze, im folgenden als AFM-Spitze bezeichnet, ist aus Abb. 2.2.4 ersichtlich, der nominelle Spitzenradius beträgt laut Herstellerangaben 50 nm. An einem rechteckigen Chip befinden sich Cantilever unterschiedlicher Geometrie und Länge, welche damit auch unterschiedliche Federkonstanten besitzen. Es wurde vorwiegend der weichste Cantilever (Typ "C") mit einer nominellen Federkonstante von 10 mN/m verwendet; die weiteren Federkonstanten der Microlever betragen 30 mN/m (Typ "D"), 100 mN/m (Typ "E") und 500 mN/m (Typ "F").

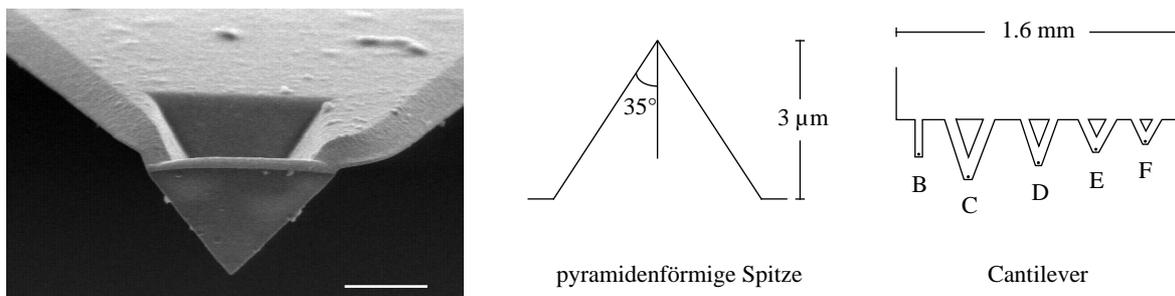


Abb. 2.2.4: Die in dieser Arbeit verwendeten Microlever. Links: REM-Aufnahme¹ des Cantileverendes mit Abtastspitze; der Skalierungsbalken hat eine Länge von 2 μm. Mitte: Geometrie der Abtastspitze, die einen nominellen Spitzenradius von 50 nm besitzt. Rechts: Schemazeichnung des Cantileverchips (rechts) gemäß [59]. Verwendet wurde vorwiegend der Cantilever "C", mit einer Länge von 320 μm und einer nominellen Federkonstante von 10 mN/m.

Die Cantilever werden in der Regel in Wafern hergestellt und vertrieben. Die Federkonstanten innerhalb eines Wafers schwanken dabei erfahrungsgemäß um weniger als 10% [60], zwischen verschiedenen Wafern dagegen um bis zu einem Faktor 2. Zur Durchführung genauer Kraftmessungen (siehe unten) ist daher zunächst eine individuelle Kalibrierung der Federkonstanten notwendig. Dazu hat sich die Methode des thermischen Rauschens bewährt [61]: nach dem Äquipartitionstheorem der statistischen Mechanik kann jedem Freiheitsgrad eines Systems im thermodynamischen Gleichgewicht die Energie von $k_B T/2$ zugeschrieben werden, so auch dem Schwingungsfreiheitsgrad des Cantilevers. Wird aus dem Rauschspektrum des frei schwingenden Cantilevers dessen mittleres Auslenkungsquadrat bestimmt, ermöglicht dies die Berechnung der Federkonstanten. Unter Berücksichtigung der Geometrie der Lichtzeigerdetektion ergibt sich für die Federkonstante k_c des Cantilevers:

¹ Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Armin Kriele (Lehrstuhl Prof. Kotthaus) angefertigt.

$$k_c = 0,8 \cdot \frac{k_B T}{\langle z^2 \rangle} \quad (11)$$

Hierbei bezeichnet k_B die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur und $\langle z^2 \rangle$ das mittlere Auslenkungsquadrat des Cantilevers. Eine ausführliche Herleitung sowie Beschreibung der experimentellen Durchführung des Verfahrens findet sich bei Thumann [62]. Da die verwendeten kommerziellen AFMs eine Anwendung dieses Eichverfahrens nicht ermöglichen, wurde die Cantileverreichung an einem Eigenbau-AFM von Dr. M. Rief [63] durchgeführt. Zur Berechnung der Auflagekraft des verwendeten Cantilevers wurde jeweils der Mittelwert der Federkonstanten einiger Cantilever ein und desselben Wafers zugrunde gelegt.

2.2.4 Abbildungsverfahren

Aus der Vielzahl der inzwischen entwickelten Abbildungsverfahren sollen hier lediglich die in dieser Arbeit verwendeten kurz erklärt werden.

Im Modus konstanter Höhe (*constant height mode*) wird die z -Ausdehnung des Piezos nicht verändert. Während die Probe lateral abgerastert wird, ergibt sich die Höheninformation somit aus der Auslenkung des Cantilevers. Im Falle kristalliner Strukturen, wie z.B. Glimmer, kann dadurch sogar atomare Auflösung erreicht werden [5]. Da mit der Höhe von Probenstrukturen auch die Auflagekraft des ausgelenkten Cantilevers zunimmt, ist dieser Modus lediglich dazu geeignet, sehr flache und relativ harte Proben abzubilden. Im Modus konstanter Auslenkung (*constant deflection mode*) wird der Abstand zur Probe durch den Piezo korrigiert, um durch Höhenänderungen der Probe bedingte Kraftfluktuationen auszugleichen. Ein elektronischer Nachregelmechanismus hält die Cantileverauslenkung und somit auch die Auflagekraft konstant. Dadurch wird auch die Untersuchung relativ hoher und weicher Proben, z.B. lebender Zellen, ermöglicht [64, 65]. Die Höheninformation erhält man aus der erforderlichen Korrekturspannung des Piezos. Aufgrund der limitierten Nachregelgeschwindigkeit ist in diesem Modus nur ein relativ langsames Abrastern der Probe möglich. In der Praxis wird daher meist ein kombinierter Auslenkungs- und Nachregelmodus (*error signal mode*) verwendet. Durch eine einstellbare Zeitkonstante wird hierbei die Geschwindigkeit der Nachregelung festgelegt. Somit wird das Probenrelief im wesentlichen vom Piezo nachgefahren, feine Strukturen werden jedoch nicht korrigiert, sondern als Cantileverauslenkung (*error signal*) detektiert. Dieser Modus vereint die Vorteile der erstgenannten Betriebsmodi und ermöglicht somit ein relativ schnelles Abrastern von weichen Proben mit großen Höhenunterschieden [66, 67].

Da die AFM-Spitze stets in direktem Probenkontakt steht, werden die beschriebenen Abbildungsverfahren oft unter dem Begriff Kontaktmodus zusammengefaßt. Andere Verfahren, wie z.B. der Tapping-Modus [68-71], spielten in dieser Arbeit keine Rolle.

2.2.5 Kraft- und Elastizitätsmessungen

Neben der Abbildung der Topographie einer Probe ermöglicht das AFM als äußerst empfindlicher Kraftsensor, Kräfte im Bereich einiger Pikonewton auszuüben und zu

detektieren. Die im AFM gemessene Cantileverauslenkung d kann mit Hilfe des Hookeschen Federgesetzes direkt in die jeweils anliegende Kraft F umgerechnet werden:

$$F = k_c \cdot d \quad (12)$$

Im Experiment werden zur Kraft- bzw. Elastizitätsmessung sogenannte Kraftkurven aufgenommen. Dazu wird der Cantilever an die Probe angenähert, nach erfolgtem Kontakt weiter auf die Probe gedrückt und wieder weggezogen. Die jeweilige Cantileverauslenkung bzw. die anliegende Kraft wird gegen die momentane z -Position des Piezos aufgetragen, wie aus Abb. 2.2.5 ersichtlich. Die Form der Kraftkurve ergibt sich aus den am Cantilever anliegenden Kräften; so wird sich stets ein Gleichgewicht zwischen der Federkraft und den attraktiven und repulsiven Kräften zwischen Probe und Spitze einstellen. Die größten Beiträge liefern hierbei Pauli-Abstoßung, van der Waals-Kräfte und elektrostatische Kräfte, an Luft können außerdem Kapillarkräfte auftreten [72-77]. Der Verlauf einer Kraftkurve im Kontaktbereich läßt dabei Rückschlüsse auf die mechanischen Eigenschaften der Probe zu. So können Annäherungs- und Wegfahrkurve auch unterschiedliche Formen haben, wenn beispielsweise die Eindrückung in ein viskoses Material erfolgt. Müssen beim Wegfahren Adhäsionskräfte überwunden werden, so bleibt der Cantilever über den Kontaktpunkt hinaus an der Probe, bis die anwachsende Federkraft schließlich größer als die Adhäsionskräfte ist und der Cantilever von der Probe wegschnappen kann.

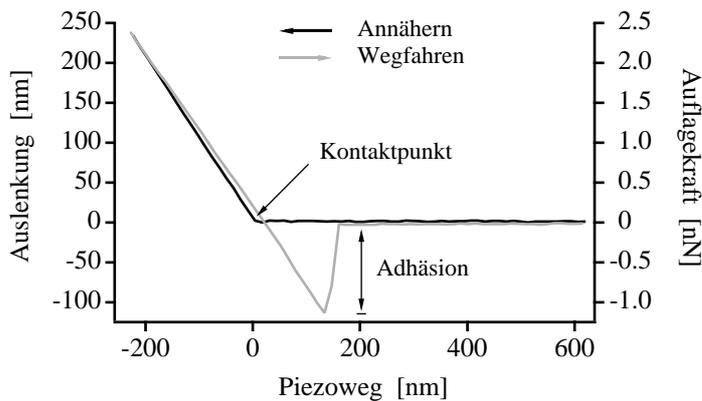


Abb. 2.2.5: Typischer Verlauf einer Kraftkurve, aufgenommen auf einer Si-Oberfläche in de-ionisiertem Wasser.

Eine qualitative Information über die Weichheit der Probe gibt bereits die Steigung der Kraftkurve: je weicher die Probe, desto flacher die Kraftkurve. In eine im Vergleich zur Federkonstanten des Cantilevers harte Probe kann die AFM-Spitze nicht eindringen; somit entspricht die Cantileverauslenkung d dem Piezoweg z ($d = z$). Ist die Probe dagegen weich, so erfolgt eine Eindrückung δ und die Auslenkung wird entsprechend kleiner:

$$d = z - \delta \quad (13)$$

Um die Eindrückung bei einer bestimmten Auflagekraft aus einer Kraftkurve ablesen zu können, muß die Differenz zu einer Eichkraftkurve, welche auf hartem Substrat aufgenommen wurde, gebildet werden, wie in Abb. 2.2.6 angedeutet. Die quantitative Auswertung von Kraftkurven erfordert somit stets eine Kalibrierung der Steigung, d.h. die Aufnahme von Referenzkraftkurven auf hartem Substrat.

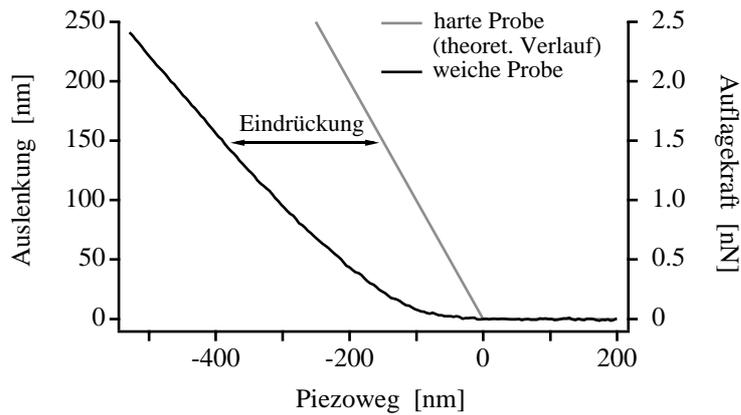


Abb. 2.2.6: Kraftkurven auf unterschiedlich harten Proben. Die AFM-Spitze kann in die harte Probe nicht eindringen, die Cantileverauslenkung entspricht daher dem Piezoweg. Bei der Eindrückung in ein weiches Material ist der Verlauf der Kraftkurve entsprechend flacher. Die Eindrückung ergibt sich dabei aus der Differenz zu einer Kraftkurve auf hartem Substrat mit der Steigung eins.

Durch die Analyse der Kraftkurven kann nun der Elastizitätsmodul einer Probe berechnet werden. Im Falle weicher Proben geschah dies bisher durch die Anwendung des Hertzmodells des Konus [15]: mit den Gleichungen (12) und (13) kann die Eindrückung δ in (3) eliminiert werden [42]:

$$z = d + \sqrt{\frac{k_C \cdot d \cdot \pi \cdot (1 - \nu^2)}{2 \cdot E \cdot \tan(\alpha)}} \quad (14)$$

Alle nun vorhandenen Größen sind bekannt und der Elastizitätsmodul E kann somit berechnet werden. Da die Werte für z und d die jeweilige Differenz zum Kontaktpunkt (z_0, d_0) als Startpunkt des Eindrückungsvorganges darstellen, wird Gleichung (14) für die Auswertung der AFM-Meßwerte zu folgender Form erweitert:

$$z - z_0 = d - d_0 + \sqrt{\frac{k_C \cdot (d - d_0) \cdot \pi \cdot (1 - \nu^2)}{2 \cdot E \cdot \tan(\alpha)}} \quad (15)$$

Der eigentliche Auswertungsvorgang einer Kraftkurve läuft nun wie folgt ab: die Analyse der Elastizitätseigenschaften weicher Proben mit dem Hertzmodell erfolgt an Kraftkurven, welche als Mittelwert aus Annäherungs- und Wegfahrkurve berechnet wurden. Hierdurch können die in Flüssigkeiten auftretenden hydrodynamischen Effekte auf die Cantileverauslenkung beim Durchfahren der Kraftkurve in erster Ordnung ausgeschaltet werden. Die weitere Berechnung erfolgt nun meistens nicht über den gesamten Kontaktbereich der Kraftkurve, sondern lediglich innerhalb eines ausgewählten Fitbereichs, wie in Abb. 2.2.7 skizziert. Dies ermöglicht eine gezielte Auswertung der Kraftkurven in verschiedenen Bereichen der Auflagekraft und somit auch in Bereichen unterschiedlicher Eindrückung in die Probe. In einem ersten Schritt wird ein Näherungswert für den Kontaktpunkt berechnet. Diesen erhält man aus der Nullage der Cantileverauslenkung d_0 im Teil der Kraftkurve ohne Probenkontakt und den Auslenkungen zweier Datenpunkte (z_1, d_1) und (z_2, d_2) , welche den Fitbereich begrenzen. Der genäherte Kontaktpunkt legt nun die Nullage der Cantileverauslenkung fest. Mit diesem Wert und den Grenzpunkten des Fitbereichs wird in einem zweiten Schritt der endgültige Kontaktpunkt z_0 berechnet. Ein Fit (Methode der kleinsten Quadrate [78]) des Hertzmodells über den Kontaktpunkt und alle Datenpunkte innerhalb des Fitbereichs führt schließlich zur Berechnung

des Elastizitätsmoduls. Somit können also aus jeder Kraftkurve die beiden Parameter Elastizitätsmodul E und Kontaktpunkt z_0 gewonnen werden.

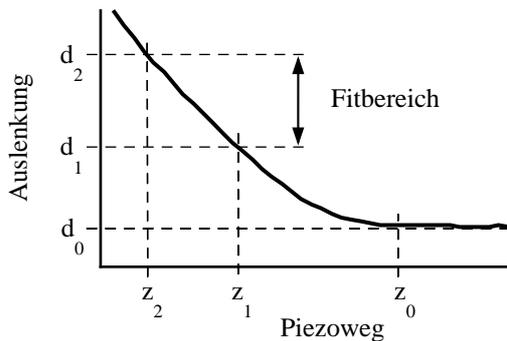


Abb. 2.2.7: Mittel aus Annäherungs- und Wegfahrkurve einer Kraftkurve auf einer weichen Gelatineprobe. In der Auswertung erfolgt der Fit des Hertzmodells nicht über den gesamten Kontaktbereich der Kraftkurve, sondern lediglich im sogenannten Fitbereich, welcher durch die Datenpunkte (z_1, d_1) und (z_2, d_2) begrenzt wird. Der Wert d_0 bezeichnet die Nulllage der Cantileverauslenkung. Unabhängig voneinander können die beiden Parameter Elastizitätsmodul E und Kontaktpunkt z_0 berechnet werden.

Im sogenannten *Force-Mapping-Modus* [79] können Kraftkurven aufgenommen werden, während die Probe lateral abgerastert wird. Somit entsteht ein zweidimensionales Feld von Kraftkurven, die sogenannte Force-Map. Durch eine entsprechende Auswertung können die untersuchten Proben beispielsweise in Hinblick auf ihre Adhäsionseigenschaften [80, 81], Elektrostatik [82] oder Elastizität [33] flächendeckend charakterisiert werden. Da aus den z -Positionen der Kontaktpunkte von Kraftkurven auch die Höhenunterschiede auf der Probe berechnet werden können, ermöglicht der Force-Mapping-Modus die Rekonstruktion der Topographie einer unbelasteten Probe. Die laterale Auflösung im Force-Mapping-Modus liegt bei harten Proben im Bereich einiger Nanometer [82]. Da die laterale Auflösung jedoch im wesentlichen mit dem Kontaktradius (Abb. 2.2.8) der AFM-Spitze skaliert, reduziert sie sich im Falle lebender Zellen drastisch. Aufgrund der vergleichsweise tiefen Eindrückung in die extrem weichen Proben ist auch der resultierende Kontaktradius entsprechend groß und die Auflösungsgrenze steigt auf über 100 nm an.

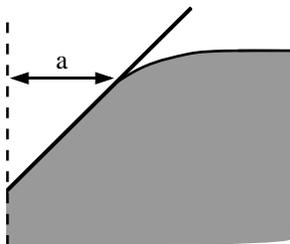


Abb. 2.2.8: Eindrückung eines konusförmigen Stempels in eine Probe. Das Ende des Kontaktbereiches zwischen Stempel und Probe kennzeichnet die Lage des Kontaktradius a .

2.3 Finite-Elemente-Methode

2.3.1 Einführung

Bereits Archimedes hat die schwierige Berechnung des Kreisumfangs auf ein einfacheres Problem zurückgeführt, indem er Stützpunkte auf dem Kreisumfang einführte und diese durch gerade Sehnen miteinander verbunden hat. Die Summe der Sehnen ist nun eine Näherung des Kreisumfangs. Die Idee, die dieser Berechnung zugrunde liegt, wird in der Methode der finiten Elemente (*finite element method*, FEM), welche in den fünfziger Jahren entwickelt wurde, wieder aufgegriffen: ersetze krumme Linien durch Geraden, denn diese sind leichter zu

berechnen! Der Ersatz von krummen Flächen kann durch Dreiecke oder Vierecke erfolgen, im dreidimensionalen wäre eine entsprechende Unterteilung beispielsweise in Tetraeder oder Hexaeder denkbar [83].

In einer der ersten Anwendungen standen die Ingenieure des Flugzeugherstellers Boeing in Seattle vor dem Problem, die statische Berechnung von gepfeilten Tragflächen durchzuführen [84]. Der feste Körper als Kontinuum wurde in endlich viele Elemente unterteilt, deren Eckpunkte, auch Stützpunkte oder Knoten genannt, sich entsprechend der Belastung des Gesamtkörpers verschieben. Diese Verschiebung der Knoten, welche das System vollständig beschreiben, kann nun in endlich vielen Gleichungen erfaßt werden. Somit wurde durch eine Diskretisierung eine näherungsweise Lösung des Problems ermöglicht, zu dessen Berechnung nur noch die Lösung eines Gleichungssystems nötig ist. Diese Gleichungssysteme sind mit bekannten Matrizenmethoden mit Hilfe eines Computers lösbar. Der entstehende Diskretisierungsfehler kann durch eine höhere Knotendichte reduziert werden, was jedoch gleichzeitig einen höheren Rechenaufwand verursacht. Zur Berechnung der jeweiligen Gleichgewichtslage des Systems werden beispielsweise im Bereich der Festkörpermechanik Variationsprinzipien wie das Prinzip der virtuellen Arbeit oder der Energieminimierung eingesetzt [83].

Hinter dem Grundgedanken der FEM, ein Kontinuum durch ein diskretes Ersatzsystem zu ersetzen, entstand in den letzten Jahrzehnten ein schlagkräftiges Werkzeug, welches in weiten Bereichen der Technik und Naturwissenschaften Anwendung findet. Stets handelt es sich dabei um Probleme, welche durch partielle Differentialgleichungen beschrieben werden, die zwar nicht analytisch, wohl aber numerisch lösbar sind. Mathematische Modelle, die auf partiellen Differentialgleichungen basieren, finden sich beispielsweise in der Meteorologie (Eulergleichungen), der Astrophysik (Strahlungstransportgleichung), im Flugzeugbau (Navier-Stokes-Gleichung), im Hoch- und Tiefbau oder dem Design von Fahrzeugen (Elastizitätsgleichung); in der Geologie können Strömungsprozesse, Plattentektonik oder magnetische Felder simuliert werden. Die breite Anwendung der FEM, beispielsweise in der Automobilindustrie als Ergänzung zum praktischen Experiment, reicht dabei vom ersten Entwurf, der Entwicklung und Konstruktion, bis zur Optimierung des Endproduktes, aber auch zur Schadensanalyse zu Gutachterzwecken. Die Einsatzgebiete liegen in Schwingungs- und Akustikanalysen, der Aerodynamik, Statik, Crash-Test-Simulation, Lacktrocknung, Spritzgußsimulation und vielem mehr. Durch die geplante unmittelbare Verknüpfung von Konstruktion mittels CAD (*computer-aided design*) und Simulation mittels FEM wird die computergestützte Entwicklungsarbeit hier sicherlich noch effizienter werden [85].

Der Fortschritt in der Leistungsfähigkeit von Simulationstechniken in der jüngeren Vergangenheit wird am Beispiel von Wetterberechnungen deutlich: obwohl die Eulergleichungen als entsprechendes mathematisches Modell bereits seit über hundert Jahren bekannt waren, ist es den Meteorologen erst seit knapp 20 Jahren möglich, eine computergestützte Wetterprognose zu entwickeln. Erst seit damals sind die Computer so leistungsfähig, daß die Simulation bei einer sinnvollen Dichte der Knoten weniger Zeit beansprucht als die Wetterentwicklung selbst. Der Fortschritt ist dabei einer Kombination von erworbenen Verbesserungen zu verdanken: die gesteigerte Rechnerleistung wurde nicht nur durch leistungsfähigere, schnellere Prozessoren erreicht, sondern auch durch deren effiziente Parallelisierung. Aber auch die Entwicklung neuer numerischer Methoden, wie z.B. die adaptive Gitterverfeinerung, leistete einen wichtigen Beitrag zur Steigerung der Effizienz [85, 86].

Für die Einführung in die Theorie der FEM sei auf weiterführende Literatur [54, 87] verwiesen.

2.3.2 Simulation von Kraft-Eindrückungskurven

In dieser Arbeit wurde die FEM dazu genutzt, die Eindrückung eines harten Stempels in eine weiche elastische Probe zu simulieren. Es wurde das kommerzielle Softwarepaket SOLVIA (Version 95.0, SOLVIA Engineering AB, Västerås, Schweden) verwendet, welches auf einem Großrechner (IBM SP2/77 workstation) am Leibniz Rechenzentrum in München betrieben wurde. Dabei wurde die Eindrücktiefe δ als Funktion der Auflagekraft F auf den Stempel berechnet, wodurch Kraft-Eindrückungskurven (in der Folge ebenfalls einfach Kraftkurven genannt) entstanden, wie sie experimentell auch mittels AFM gewonnen werden können. Die Simulation erfolgte in Axialsymmetrie, also zweidimensional. Wenn nicht anders beschrieben, so wurde als Stempel ein Konus (gerader Kreiskegel) mit einem halben Öffnungswinkel (Konuswinkel) von $\alpha = 38,31^\circ$ verwendet. Im Falle der simulierten AFM-Spitze wurde die Konusspitze (Apex) durch eine Kugel mit 50 nm Radius ersetzt. Da die AFM-Spitzen die Form einer vierseitigen Pyramide mit Seitenwinkel 35° besitzen, mußte der Öffnungswinkel in der zweidimensionalen Simulation angepaßt werden: eine einfache Rechnung zeigt, daß bei gleicher Eindrückung δ ein Konus mit einem Halbwinkel α von $38,31^\circ$ dasselbe Volumen verdrängt wie eine Pyramide obiger Geometrie. Der reale Öffnungswinkel der Pyramidenseiten wurde also sozusagen durch einen effektiven Konuswinkel ($\alpha = 38,31^\circ$) ersetzt.

Die Knoten an der Bodenfläche der Probe waren fixiert und simulierten damit perfekte Adhäsion mit dem Substrat, die Knoten an der äußeren Randfläche der Probe waren frei. Die einzige benötigte Kontaktfläche, nämlich zwischen Stempel und Probe, wurde als reibungsfrei angenommen. Die gewählten Randbedingungen sind in Abb. 2.3.1 schematisch dargestellt. Die axialsymmetrischen 4-Knoten-Elemente (*plane elements*) waren im Kontaktbereich mit dem Stempel am kleinsten, da hier die größte Verformung und daher auch die größten Spannungen in der Probe auftraten, und wurden sukzessive nach außen bzw. unten vergrößert. Die Umgebung des Kontaktbereiches für die Konus- bzw. AFM-Spitzengeometrie des Stempels ist in Abb. 2.3.2 dargestellt.

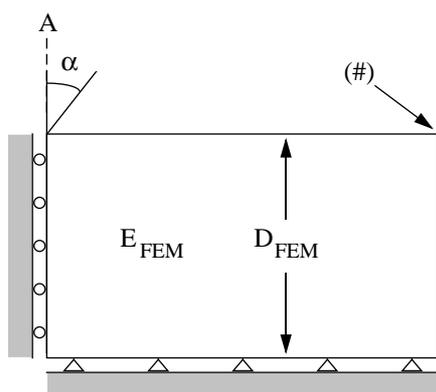


Abb. 2.3.1: Schemazeichnung der Randbedingungen der Simulation mittels FEM. Entlang der Symmetrieachse A sind die Knoten lediglich in z-Richtung frei beweglich, zwischen Substrat und Probe sind die Knoten fixiert, was perfekter Adhäsion entspricht. Am äußeren Rand sind sie frei beweglich. Während die laterale Ausdehnung, das Netzwerk des Kontaktbereiches zum Stempel sowie der Elastizitätsmodul E_{FEM} unverändert blieben, wurde die Dicke D_{FEM} in den verschiedenen Proben variiert. Der Kontakt zwischen dem harten Stempel und der weichen Probe wurde als reibungsfrei angenommen. Die Verschiebung des Knoten (#) diente als Kriterium für die Dimensionierung der simulierten Probe.

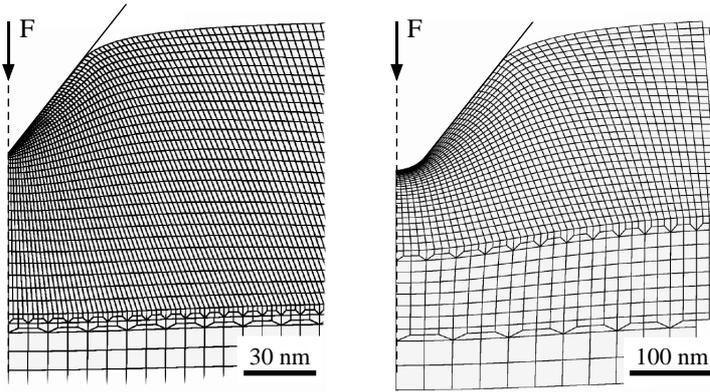


Abb. 2.3.2: Kontaktbereich zwischen Stempel und Probe. Aufgrund der hier auftretenden größten Verformungen im Netzwerk erfordert dieser Bereich die größte Simulationsgenauigkeit. Deshalb wurde in diesem Bereich ein dichteres Netzwerk gewählt. Als Reaktion auf eine Auflagekraft F zeigt der Konus (links) eine Eindrückung von 60 nm, die AFM-Spitze ist hier 200 nm in die Probe eingedrungen.

Zunächst wurde das Netzwerk einer dicken Probe konstruiert, welches die Eigenschaften eines elastischen Halbraumes besitzen sollte. Dazu wurde sowohl die laterale Ausdehnung als auch die Dicke der Probe stetig erweitert, bis schließlich das folgende Kriterium erfüllt war: der Knoten (#) der äußeren oberen Ecke der Probe (siehe Abb. 2.3.1) bewegte sich bei einer maximalen Eindrückung von 300 nm nur noch marginal, d.h. weniger als 1 nm in z -Richtung und weniger als 0,1 nm radial. Im Falle des konusförmigen Stempels sollte außerdem die simulierte Kraftkurve über den gesamten Eindrückungsbereich dem Kraftgesetz des Hertzmodells entsprechen. Wie in Abb. 2.3.3 zu sehen ist, besitzt in doppeltlogarithmischer Darstellung die Kraftkurve einer dicken Probe dieselbe konstante Steigung, wie sie durch das Hertzmodell des Konus beschrieben wird, während die Steigung der Kraftkurve einer dünnen Probe mit zunehmender Eindrückung anwächst. Die eben beschriebenen Kriterien wurden für den Konus als Stempel mit einer Probendicke von 50 μm und einem Probenradius von knapp 25 μm erreicht, die Probe bestand dabei aus 5690 Elementen. Für den Stempel mit AFM-Spitzenform wurde die Probendicke auf 100 μm erhöht. Gleichzeitig reduzierte sich die Zahl der Elemente auf unter 4000, da nun die Singularität der Konusspitze durch den kugelförmigen Apex ersetzt wurde. Von nun an blieb sowohl die Vernetzung des Kontaktbereichs als auch die laterale Ausdehnung der Probe unverändert. Variiert wurde nun lediglich die Probendicke, wobei neben der dicken Probe, also dem Modell des elastischen Halbraumes, überwiegend dünne Proben mit einer Dicke von weniger als 1 μm modelliert wurden. Dieser Dickenbereich ist im Falle von AFM-Experimenten an lebenden Zellen von besonderem Interesse.

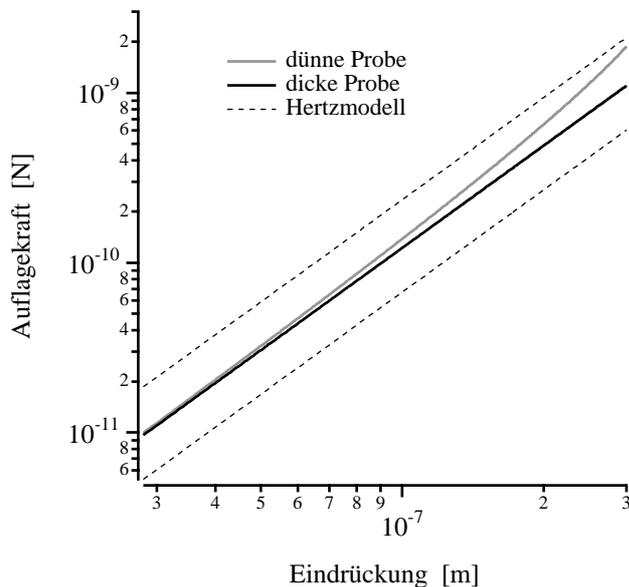


Abb. 2.3.3: Die doppeltlogarithmische Darstellung zweier Kraftkurven, welche mit konusförmigem Stempel simuliert wurden, verdeutlicht den Einfluß der Probendicke. Im Falle der dünnen Probe ($D = 324 \text{ nm}$) nimmt die Steigung der Kraftkurve mit wachsender Eindrückung stetig zu. Die dicke Probe ($D = 50 \mu\text{m}$) hingegen genügt den Anforderungen als Modell für den elastischen Halbraum: die Steigung der Kraftkurve ist über den gesamten Eindrückungsbereich konstant und entspricht dem angedeuteten Potenzgesetz des Hertzmodells für den Konus.

Falls nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Simulationen mit einem Elastizitätsmodul von $E_{\text{FEM}} = 20 \text{ kPa}$ sowie mit $C_1 = 3,32 \text{ kPa}$, $C_2 = 0,01 \text{ kPa}$ und einem Kompressionsmodul von $K = 200 \text{ Mpa}$ durchgeführt. Die Poissonzahl betrug bei kleinen Dehnungen folglich 0,500, d.h. die Verformung der Probe erfolgte faktisch unter konstantem Volumen. Eine Charakterisierung und Diskussion der beiden ausgewählten Mooney-Rivlin-Konstanten bzw. deren Einfluß auf die Simulation wird im folgenden Kapitel diskutiert.

Die Wahl des Elastizitätsmodul ergab sich aus den Experimenten mit Gelatine und lebenden Zellen, ein E-Modul von $E = 20 \text{ kPa}$ liegt gerade im Schnittbereich der E-Moduln dieser Proben (vgl. Abb. 2.1.1). Um sicherzugehen, daß auch in den simulierten Kraftkurven der AFM-Spitzen Auflagekraft und Eindrückung, wie bei rotationssymmetrischen Stempeln üblich, linear mit dem Elastizitätsmodul skalieren [88] (vgl. auch Gleichung (3) und (4)), wurden Sätze von Kraftkurven mit unterschiedlichem E-Modul simuliert. Zu verschiedenen Probendicken wurde in der Simulation der E-Modul von 20 kPa auf Werte von 1 kPa bzw. 100 kPa verändert. Dabei haben die resultierenden Kraftkurven mit einer Maximalabweichung von lediglich $5 \cdot 10^{-3}\%$ mit dem E-Modul skaliert.

3 Analyse simulierter Kraftkurven mittels Hertzmodell

Die Anwendung des Hertzmodells zur Analyse von Elastizitätsmessungen dünner weicher Proben mittels AFM wirft Probleme in dreierlei Hinsicht auf: (i) Vergleichsweise scharfe AFM-Spitzen und große Eindrückungen führen zu großen Deformationen. Das dadurch möglicherweise erzwungene nicht-lineare Materialverhalten wird im Hertzmodell nicht beschrieben. (ii) Die analytische Herleitung des Modells ist nur für eine unendlich ausgedehnte Probe exakt, nicht jedoch für dünne Filme. (iii) Die verwendeten AFM-Spitzen besitzen nicht die vom Modell erfaßten Stempelgeometrien. Die Verwendung des Hertzmodells kann also selbst bei homogenen Proben nur eine Näherung darstellen, entsprechend treten im Falle inhomogener Materialien, wie z.B. Verbundwerkstoffen oder auch lebender Zellen, weitere Konflikte auf. Experimentell wurde das Hertzmodell bereits in einem früheren Projekt eingehend auf seine Verwendbarkeit hin getestet [36, 42]. Dabei konnte mit Hilfe weicher Keile aus Gelatine der Einfluß des harten Substrats auf die gemessene Elastizität dünner Proben charakterisiert werden. Die Simulation von Kraftkurven mittels FEM ermöglicht nun einen Zugang, bei dem verschiedenste Einflüsse gezielt als Randbedingungen der Simulation variiert und somit auch kontrolliert werden können. Die Charakterisierung der Einflüsse von endlicher Probendicke und Spitzengeometrie auf eine Auswertung mittels Hertzmodell kann daher im Falle der Simulation deutlich detaillierter erfolgen.

3.1 Einfluß der Mooney-Rivlin-Konstanten und des Konuswinkels

Die Simulation erlaubt den Einsatz verschiedener theoretischer Modelle zur Beschreibung der elastischen Materialeigenschaften. Ausgewählt wurde ein erweitertes Mooney-Rivlin-Modell, welches auch die Simulation großer Dehnungen bei einem inkompressiblen Material ermöglicht. Die Entwicklung eines neuen Kraft-Eindrückungsgesetzes, das auf der Simulation dieses Materials basiert und somit auch nicht-lineares Materialverhalten berücksichtigt, ist somit in der Lage, das oben unter (i) genannte Problem zu lösen.

Die für die Simulationen ausgewählten Werte der Mooney-Rivlin-Konstanten ($C_1 = 3,32$ kPa und $C_2 = 10$ Pa) sollten keinem bestimmten Material entsprechen, sondern allgemein den folgenden Eigenschaften genügen [56]: (i) Bei den meisten Gummis ist C_1 größer als C_2 . (ii) Für gequollene Polymernetzwerke nimmt zusammen mit dem Volumenanteil des Polymers auch C_2 ab. (iii) Im Gegensatz zur Dehnung wächst beim Komprimieren von Gummi das Verhältnis C_1/C_2 um etwa eine Größenordnung an. Speziell die beiden letzten Punkte sind dabei für die später diskutierten AFM-Experimente von Bedeutung.

Um den Einfluß der beiden Konstanten auf die simulierten Daten abschätzen zu können, wurde die Eindrückung in die den Halbraum repräsentierende Probe simuliert, wobei das Verhältnis C_1/C_2 variiert wurde. Die verwendete Geometrie des Stempels war ein Konus mit einem Konuswinkel von 35° bzw. 80° , welcher 300 nm bzw. 37 nm tief, d.h. bis zu einem ungefähr gleichen Kontaktradius, in die Probe gedrückt wurde. Die erhaltenen Kraftkurven wurden mit dem Hertzmodell gefittet und somit der Elastizitätsmodul E_{fit} berechnet. In Abb. 3.1.1 ist E_{fit} gegen das Verhältnis C_1/C_2 aufgetragen. Im Falle des stumpfen Konus ($\alpha = 80^\circ$) ist die

Abweichung von E_{fit} gegenüber dem nominellen E-Modul $E_{\text{FEM}} = 20 \text{ kPa}$ relativ klein, beim spitzen Konus ($\alpha = 35^\circ$) hingegen ist die Abweichung deutlich ausgeprägter. Der prinzipielle Kurvenverlauf ist jedoch in beiden Fällen gleich: mit der Abnahme von C_2 wird auch der gefittete E-Modul kleiner. Gleichzeitig nimmt jedoch auch der Einfluß von kleinem C_2 auf E_{fit} deutlich ab, d.h. die Veränderungen in E_{fit} sind für $C_1/C_2 > 9$ deutlich kleiner als für $C_1/C_2 < 9$. Dies wiederum macht deutlich, daß nicht so sehr die exakten Werte bei der Wahl der beiden Mooney-Rivlin-Konstanten wichtig waren, sondern lediglich die Entscheidung, daß C_1 im Vergleich zu C_2 groß sein sollte.

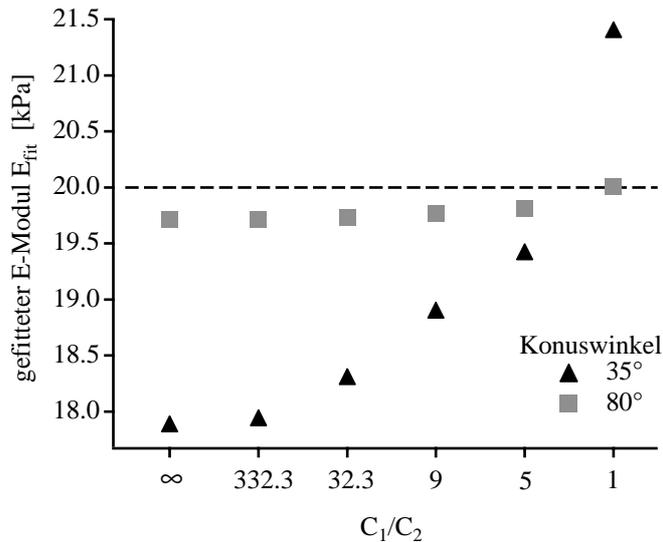


Abb. 3.1.1: Für zwei verschiedene Konusgeometrien des Stempels wurde das Verhältnis von C_1/C_2 der Probe variiert. Der mittels Hertzmodell gefittete E-Modul weicht beim stumpfen Konus ($\alpha = 80^\circ$) nur bis zu 1,4% vom nominellen Wert $E_{\text{FEM}} = 20 \text{ kPa}$ ab. Bei einem Konuswinkel von 35° wächst die Abweichung bis nahezu 11% an. Die maximale Abweichung tritt in beiden Fällen bei $C_2 = 0$ auf.

Zusätzlich wird ein weiterer Effekt sichtbar: mit abnehmendem Konuswinkel wird die Abweichung von E_{fit} zu E_{FEM} immer größer. Sie ist in beiden Fällen für $C_2 = 0$ maximal, im Falle des stumpfen Konus beträgt sie lediglich 1,4%. Für den spitzen Konus dagegen ist die maximale Abweichung auf 10,5% angewachsen. Offensichtlich sind hier die Voraussetzungen für die Verwendung des Hertzmodells sowie von Gleichung (10), nämlich lediglich kleine Dehnungen im Material, nicht mehr gegeben. Diese Situation ändert sich für Konuswinkel nahe 90° , die damit verbundene Gültigkeit des Hertzmodells wird in Abb. 3.1.2 deutlich: für wachsenden Konuswinkel konvergiert der gefittete E-Modul gegen den nominellen Wert von 20 kPa. Bei einem Konuswinkel von 89° beträgt die Abweichung nur noch 0,14%. Auf der anderen Seite ist die Übereinstimmung natürlich eine notwendige Bestätigung einer möglichst realistischen Simulation.

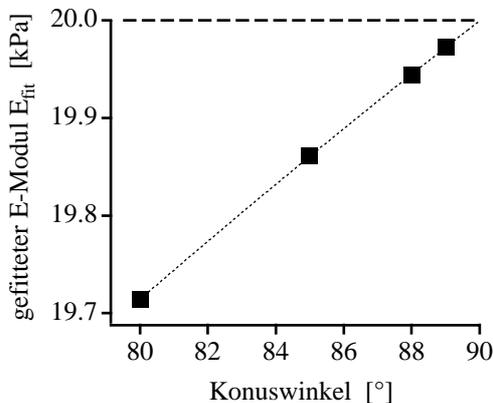


Abb. 3.1.2: Werte des gefitteten E-Modul für stumpfe Konusgeometrien. Ein einfacher Parabelfit (gepunktete Linie) durch die Datenpunkte, der auf einen Konuswinkel von 90° extrapoliert wurde, zeigt die Übereinstimmung mit dem nominellen Wert $E_{\text{FEM}} = 20 \text{ kPa}$ (gestrichelte Linie) und bestätigt so die Gültigkeit des Hertzmodells. Die Abweichung für einen Konuswinkel von 89° beträgt lediglich 0,14%.

3.2 Überschätzen des Elastizitätsmoduls in der AFM-Anwendung

Über Eindrückungsexperimente mit konus- oder pyramidenförmigen Stempeln mit stumpfem Apex, also abgerundeter Spitze, wurde berichtet, daß die mittels Hertzmodell des Konus berechneten Werte des Elastizitätsmoduls E_{fit} im Vergleich zum nominellen Elastizitätsmodul der Probe stets zu hoch waren [49, 89, 90]. Um sowohl diese Beobachtungen als auch den Einfluß der Filmdicke auf die Auswertung zu überprüfen, wurden simulierte Kraftkurven, mit der AFM-Spitze als Stempel, mit dem Hertzmodell ausgewertet. Dies erfolgte in derselben Weise, in welcher auch experimentelle Daten analysiert werden: alle Kraftkurven werden in demselben Intervall der Auflagekraft, dem sogenannten Fitbereich, ausgewertet (siehe auch Abschnitt 2.2.4). Der für die folgende Diskussion verwendete Satz an Kraftkurven wurde auf Probendicken zwischen 190 nm und 1 μm simuliert. Einen Teil dieser Kraftkurven zeigt Abb. 3.2.1, zum Vergleich ist zusätzlich die den elastischen Halbraum repräsentierende Kraftkurve (100 μm -Probe) dargestellt. Deutlich ist der Einfluß der Probendicke auf den Verlauf der Kraftkurve zu sehen.

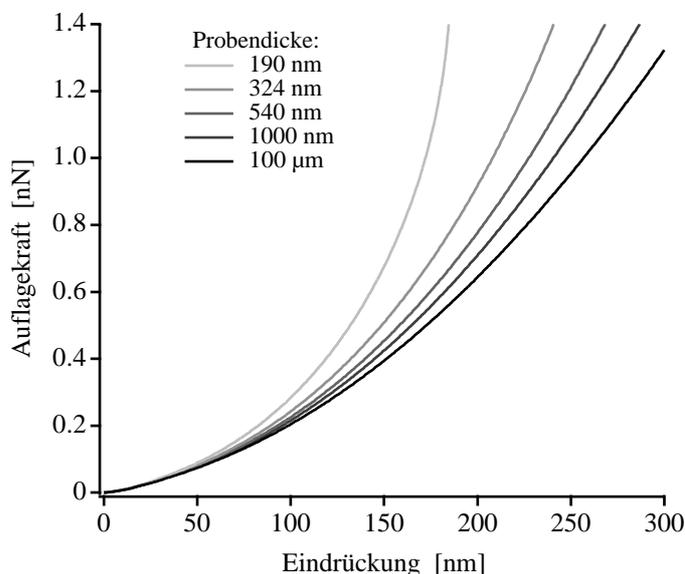


Abb. 3.2.1: Simulierte Kraftkurven bei unterschiedlicher Probendicke. Die AFM-Spitze wurde dazu in eine Standardprobe (Materialkonstanten: $E = 20 \text{ kPa}$, $C_2 = 10 \text{ Pa}$, $K = 200 \text{ MPa}$) eingedrückt. Variiert wurde lediglich die Dicke der Probe.

3.2.1 Analyse mittels Hertzmodell des Konus

Der angesprochene Effekt eines Überschätzens des berechneten Elastizitätsmoduls ist prinzipiell auch für AFM-Messungen zu erwarten, wie die folgende Überlegung zeigt: man betrachte einen Konus und eine AFM-Spitze mit gleichem Öffnungswinkel, wie in Abb. 3.2.2 skizziert. Werden beide Stempel gleich tief eingedrückt, so ist der Kontaktradius des Konus a_{Konus} kleiner als jener der AFM-Spitze a_{AFM} , entsprechend kleiner ist auch das vom Konus verdrängte Volumen der Probe. Die benötigte Auflagekraft wird folglich im Falle des Konus kleiner sein als die Auflagekraft der AFM-Spitze: $F_{\text{Konus}} < F_{\text{AFM}}$. Bei Verwendung von Gleichung (3) ist daher der berechnete Elastizitätsmodul im Falle der AFM-Spitze größer, die Probe also scheinbar härter: der Elastizitätsmodul wird hier überschätzt. Gleichzeitig ist jedoch zu erwarten, daß der Einfluß des runden Apex mit zunehmender Eindrückung an Einfluß verliert und deshalb die Eigenschaften der Konusgeometrie zunehmend dominieren [49].

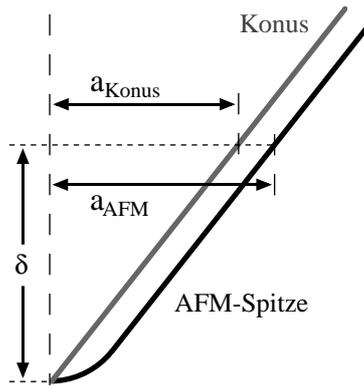


Abb. 3.2.2: Skizze eines Konus und einer AFM-Spitze mit gleichem Öffnungswinkel. Bei gleicher Eindringung δ ist der Kontaktradius a des Konus kleiner als jener der AFM-Spitze. Entsprechend ist auch die Auflagekraft des Konus kleiner: $F_{\text{Konus}} < F_{\text{AFM}}$. Die Folge ist ein Überschätzen des Elastizitätsmoduls im Falle der AFM-Spitze.

Die Kraftkurven aus Abb. 3.2.1 wurden mit dem Hertzmodell des Konus ausgewertet und der gefittete Elastizitätsmodul E_{fit} in Abb. 3.2.3a gegen die jeweilige Probendicke D_{FEM} aufgetragen. Der nominelle E-Modul der Probe $E_{\text{FEM}} = 20 \text{ kPa}$ ist zusätzlich als gestrichelte Linie eingezeichnet. Die Eindringung der AFM-Spitze für die Fitbereiche wurde lediglich für die 1000 nm dicke Probe angegeben, da die Eindringung natürlich von der jeweiligen Probendicke abhängt. Die Auflagekräfte über 100 pN stellen typische Fitbereiche zur Auswertung experimenteller AFM-Daten dar (1, s, n). Betrachtet man beispielsweise den Fitbereich von 200 - 500 pN (s), so liegt bei einer Probendicke von $1 \mu\text{m}$ der berechnete Elastizitätsmodul bei $E_{\text{fit}} = 21,1 \text{ kPa}$, d.h. die Auswertung liefert hier einen relativ guten Wert, der sich bei zunehmender Probendicke weiter dem nominellen Wert E_{FEM} annähert. Für dünnere Proben wird E_{fit} stetig größer, da der Einfluß des harten Substrats anwächst: bei gleicher Auflagekraft wird die erfolgte Eindringung immer kleiner. Die AFM-Spitze beginnt sozusagen das harte Substrat zu spüren, der gefittete Elastizitätsmodul wird immer größer, d.h. die Probe erscheint mit abnehmender Dicke immer härter. Dieser Effekt wächst bei höherer Auflagekraft weiter an (n), da dann auch die Eindringungen entsprechend größer werden. Entsprechend weniger ausgeprägt ist der Effekt bei niedrigeren Kräften (1). Die naheliegende Vermutung wäre nun, zur Verbesserung den Fitbereich entsprechend anzupassen, d.h. die Auflagekräfte weiter zu reduzieren. Beim Übergang des Fitbereichs auf Kräfte unter 100 pN (von 1 nach m) tritt jedoch plötzlich eine Umkehrung des Trends zu immer kleineren Werten des gefitteten Elastizitätsmoduls auf: wird der Fitbereich zu kleineren Kräften verschoben, so werden die berechneten Werte für E_{fit} wieder größer und wachsen stark an. Hier kommt nun der Effekt der runden Apexgeometrie immer stärker zum Tragen. Die abgerundete AFM-Spitze unterscheidet sich hier deutlich von der konischen Geometrie, welche dem Hertzmodell zugrunde liegt. Auch ein Fit der Kraftkurve wird daher entsprechend schlecht sein und die berechneten Werte des Elastizitätsmoduls werden deutlich vom nominellen Wert abweichen. Der beschriebene Umkehreffekt ist in Abb. 3.2.3b für eine beliebige Probendicke nochmals schematisch dargestellt. Für hohe Auflagekräfte bzw. Eindringungen (rechts vom Minimum des E-Moduls) führt v.a. der Einfluß des harten Substrates zu einem Härteartefakt, bei kleinen Auflagekräften bzw. Eindringungen (links vom Minimum des E-Moduls) ist die Ursache für das Überschätzen des E-Moduls hauptsächlich in der abgerundeten Apexgeometrie der AFM-Spitze zu suchen.

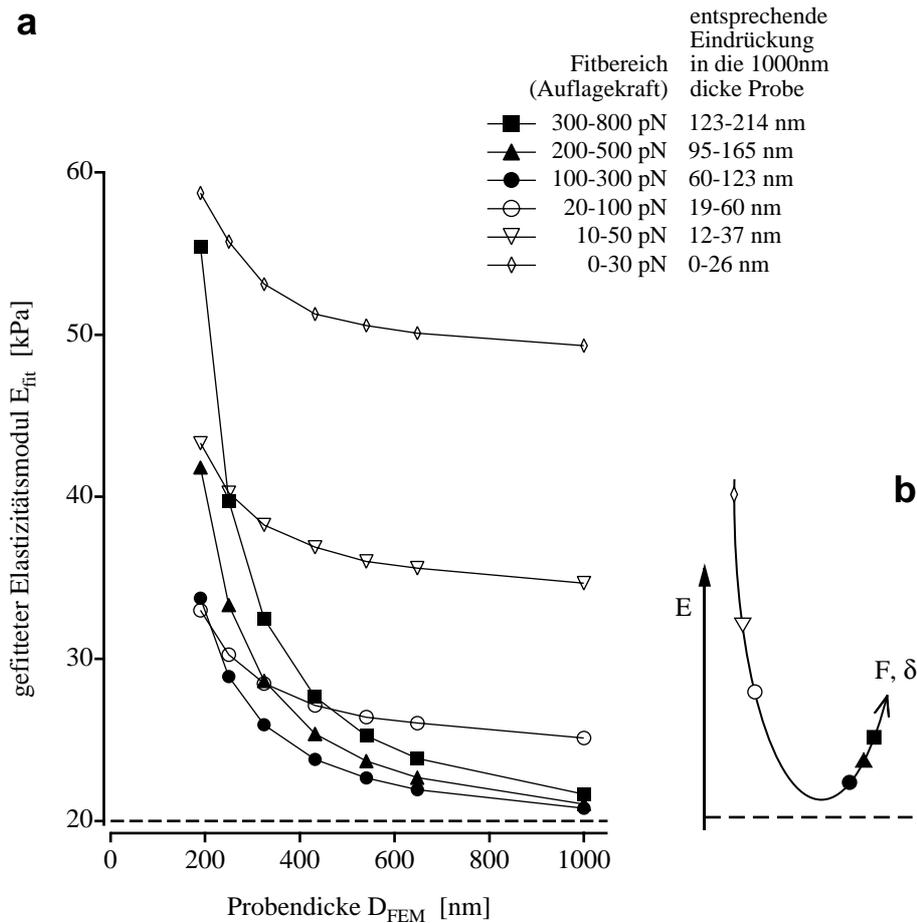


Abb. 3.2.3: Die simulierten Kraftkurven aus Abb. 3.2.1 wurden in verschiedenen Fitbereichen mit dem Hertzmodell des Konus ausgewertet und gegen die Probendicke aufgetragen (a). Schemazeichnung des Umkehrreffektes des berechneten E-Moduls in Abhängigkeit von Auflagekraft bzw. Eindrückung (b). Das systematische Überschätzen des gefitzten E-Moduls hat zwei Gründe: (i) Bei hohen Auflagekräften, also großen Eindrückungen, hat in Abhängigkeit von der Probendicke das harte Substrat Einfluß auf die Auswertung. (ii) Die runde Apexgeometrie der AFM-Spitze wirkt sich besonders bei niedrigen Auflagekräften aus. Der nominelle Wert des E-Moduls ist durch die gestrichelte Linie angedeutet (a und b).

3.2.2 Analyse mittels Hertzmodell des Paraboloids

Im folgenden werden eine AFM-Spitze (Spitzenradius $R = 50 \text{ nm}$, Konuswinkel $\alpha = 38,31^\circ$) und ein Paraboloid mit gleichem Krümmungsradius verglichen, beide sind in Abb. 3.2.4 skizziert. Durch den Schnittpunkt der Profile beider Stempel bei einer Eindrückung $\delta^* = 88,3 \text{ nm}$ und dem Kontaktradius $a^* = 93,9 \text{ nm}$ werden zwei Eindrückungsbereiche voneinander getrennt: für kleinere Eindrückungen ($\delta < \delta^*$) ist auch der Kontaktradius für die AFM-Spitze stets kleiner als der Kontaktradius des Paraboloids ($a_{\text{AFM}} < a_{\text{Paraboloid}}$), entsprechend wird das verdrängte Volumen im Falle der AFM-Spitze kleiner sein. Dies bedeutet, daß die benötigte Auflagekraft der AFM-Spitze kleiner ist als jene des Paraboloids ($F_{\text{AFM}} < F_{\text{Paraboloid}}$). Wird der Elastizitätsmodul mit dem Hertzmodell des Paraboloids (4) berechnet, wird er somit zu klein ausfallen. Für eine bestimmte Eindrückung, die etwas größer

ist als δ^* , werden jedoch beide Stempel dasselbe Volumen verdrängen. Dies ist bei einer Eindrückung von $\delta^\# = 139,6 \text{ nm}$ der Fall; hier beginnt die Umkehrung des Effekts. Wird die Eindrückung nun weiter vergrößert ($\delta > \delta^\#$), ist das von der AFM-Spitze verdrängte Volumen größer als jenes des Paraboloids. Entsprechend wird dann der aus einer AFM-Messung resultierende Elastizitätsmodul zu groß ausfallen.

Für kleine Eindrückungen ($\delta < \delta^\#$) muß somit ein Unterschätzen, für Eindrückungen die größer sind als $\delta^\#$ muß hingegen erneut ein Überschätzen des Elastizitätsmoduls erwartet werden.

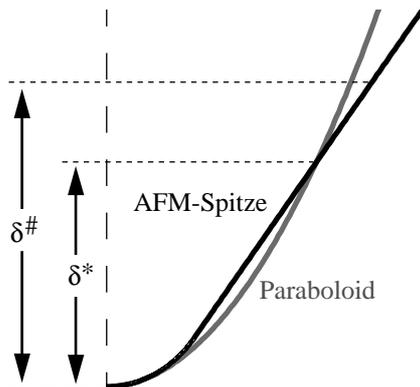


Abb. 3.2.4: Skizze einer AFM-Spitze und eines Paraboloids mit gleichem Krümmungsradius. Bei einer Eindrückung $\delta < \delta^*$ ist der Kontaktradius der AFM-Spitze kleiner als jener des Paraboloids. Entsprechend ist auch die Auflagekraft der AFM-Spitze kleiner: $F_{\text{AFM}} < F_{\text{Paraboloid}}$. Die Folge ist ein Unterschätzen des mit dem Hertzmodell des Paraboloids berechneten Elastizitätsmoduls bei AFM-Messungen. Für Eindrückungen, die größer sind als $\delta^\#$, tritt der umgekehrte Effekt ein.

Die Bestätigung lieferte ein erneutes Auswerten der Kraftkurven aus Abb. 3.2.1, welches nun aber mit dem Hertzmodell des Paraboloids erfolgte und in Abb. 3.2.5 dargestellt ist. Durch die Auswertung in einem Fitbereich äußerst niedriger Auflagekraft (\square) wird hier ein gutes Ergebnis für den berechneten Elastizitätsmodul erzielt. Die maximale Eindrückung der AFM-Spitze beträgt hier im Falle der $1 \mu\text{m}$ dicken Probe lediglich $7,4 \text{ nm}$. In diesem Bereich stimmt die

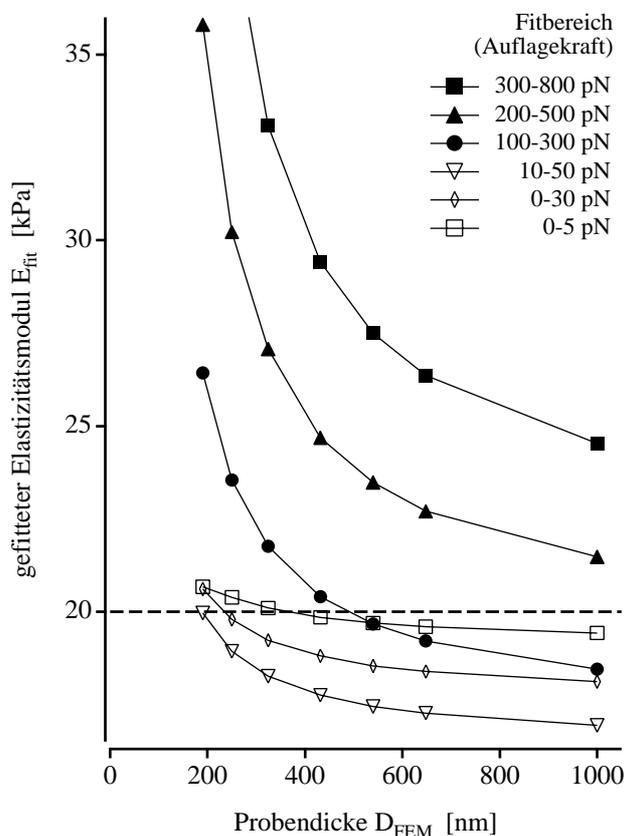


Abb. 3.2.5: Die simulierten Kraftkurven aus Abb. 3.2.1 wurden in verschiedenen Fitbereichen mit dem Hertzmodell des Paraboloids ausgewertet. Der nominelle Wert des E-Moduls ist durch die gestrichelte Linie angedeutet. Eine Auswertung bei extrem niedrigen Auflagekräften (\square) ermöglicht die relativ genaue Berechnung des E-Moduls. Bei niedrigen Auflagekräften (unter 100 pN) erfolgt vorwiegend ein Unterschätzen des E-Moduls, bei hohen Auflagekräften wächst der Einfluß des harten Substrates und der Konusform der Spitze. Beides äußert sich in einem zu großen berechneten E-Modul.

Stempelgeometrie im Hertzmodell weitgehend mit der Geometrie der AFM-Spitze überein, entsprechend beträgt hier die maximale Abweichung des gefitteten vom nominellen E-Modul lediglich 2,8%. Die ebenfalls auftretenden Abweichungen, welche bei dünner Probe durch das harte Substrat hervorgerufen werden, sind hier nur gering ausgeprägt, da die Eindrückungen im Vergleich zu den diskutierten Dicken der Probe relativ klein sind. Für große Auflagekräfte und die damit verbundenen großen Eindrückungen werden die Abweichungen des berechneten Elastizitätsmoduls wie erwartet deutlich größer: im Widerspruch zum angewandten Fitmodell dominiert hier wieder der Einfluß der Konusgeometrie der AFM-Spitze. Zusätzlich macht sich, in Abhängigkeit von der Probendicke, der Einfluß des harten Substrates bemerkbar.

Die im AFM-Experiment normalerweise verwendeten Fitbereiche liegen bei Auflagekräften oberhalb von 100 pN. Dies hat zur Folge, daß auch bei der Anwendung des Hertzmodells des Paraboloids im wesentlichen ein Überschätzen des E-Moduls erfolgen wird.

3.3 Diskussion der Grenzen in der Anwendung des Hertzmodells

Mit Hilfe der Simulation durch die FEM konnten zum Teil auch im Experiment beobachtete Effekte bestätigt und näher charakterisiert werden. Im Einzelnen waren dies:

- (1) Das Hertzmodell ist lediglich für kleine Dehnungen im Probenmaterial gültig. Obwohl die verwendeten AFM-Spitzen die stumpfsten erhältlichen sind, haben sie einen Seitenwinkel von 35° , sind also relativ spitz. Die im Eindrückungsexperiment auftretenden Verformungen sind daher vergleichsweise groß und führen somit zu einer Abweichung des mit dem Hertzmodell berechneten Elastizitätsmoduls vom nominellen Wert. Während bei stumpfen konusförmigen Stempeln ($\alpha > 85^\circ$) kaum Fehler auftraten, sind diese bei einem spitzen Konus mit einem Konuswinkel von 35° auf über 10% angewachsen.
- (2) Bei abnehmender Probendicke wird der mittels Hertzmodell berechnete Elastizitätsmodul größer, die Probe also scheinbar härter. Dieser Effekt wächst mit steigender Auflagekraft und der resultierenden größeren Eindrückung an.
- (3) Die AFM-Spitze kann durch einen Konus mit kugelförmigem Apex dargestellt werden. Im Falle dicker Proben können für kleine Eindrückungen (< 10 nm) Daten mit dem Hertzmodell des Paraboloids ausgewertet werden, für große Eindrückungen (> 100 nm) verliert der Einfluß des runden Apex an Bedeutung, so daß mit dem Hertzmodell des Konus eine relativ genaue Datenanalyse erfolgen kann. Der Zwischenbereich wird hingegen durch keines der beiden Modelle zufriedenstellend beschrieben, stellt jedoch einen für das AFM bedeutenden Kraftbereich dar. Hier tritt als Folge der nicht mit dem Hertzmodell konformen Spitzengeometrie ein systematisches Überschätzen des Elastizitätsmoduls auf.

Die Darstellung der Abbildungen 3.2.3 und 3.2.5 wurde, so wie es bisher auch in der Auswertung der Experimente üblich war, als Funktion des Fitbereichs, also der gewählten Auflagekraft, präsentiert. Das Überschätzen des Elastizitätsmoduls ist jedoch ein Effekt, der durch das Zusammenwirken von Spitzengeometrie und Probendicke entsteht. So tritt der Wechsel vom Unterschätzen zum Überschätzen des E-Moduls in Abb. 3.2.5 bei einer bestimmten Eindrückung auf und nicht in Abhängigkeit einer bestimmten Auflagekraft. Das bedeutet, der Wechsel ist dann unabhängig von der Härte des Materials. Würden die beiden

Abbildungen als Funktion der Eindrückung dargestellt, würden sie sich qualitativ nicht ändern. Möglicherweise würde jedoch die Entwicklung eines, zum im folgenden Kapitel entwickelten Konzept, alternativen Korrekturmechanismus in der Auswertung unterstützt. Denkbar wäre dann weiterhin die vergleichsweise einfache Auswertung mittels Hertzmodell, die in einem zweiten Schritt in Abhängigkeit von Eindrückung und Probendicke korrigiert würde.

Eindrucksvoll wird in Abb. 3.2.5 aber auch deutlich, daß mit einer Datenanalyse bei äußerst kleinen Eindrückungen alle drei genannten Effekte nahezu ausgeschaltet werden könnten. Die Auswertung von AFM-Daten in diesem Fitbereich mit dem Hertzmodell des Paraboloids würde ein zufriedenstellendes Ergebnis liefern. Bei einem Elastizitätsmodul der simulierten Probe von 20 kPa bedeutet dies jedoch ein exaktes Arbeiten in einem Kraftbereich von unter 5 pN, was momentan mit dem AFM noch nicht realisierbar erscheint.

Somit machen die in diesem Kapitel diskutierten Probleme deutlich, daß ein verbessertes Modell zur Auswertung der experimentellen Daten notwendig ist. Dessen Entwicklung soll im folgenden Kapitel beschrieben werden.

4 Entwicklung eines Parametrischen Modells zur Beschreibung elastischer Eindrückungen

In diesem Kapitel wird die Entwicklung eines Kraft-Eindrückungs-Modells für die Geometrie der in Zellexperimenten gebräuchlichen AFM-Spitzen vom Typ Microlever vorgestellt. Das Ziel des neuen numerisch entwickelten Modells war es, durch die Berücksichtigung der im vorigen Kapitel diskutierten Probleme, sowohl der Geometrie der AFM-Spitze, als auch einer möglichen geringen Probendicke, die Auswertung experimenteller Kraftkurven zu verbessern. Die Vorgehensweise bestand dabei aus mehreren Schritten: Zunächst wurden beide Hertzmodelle auf die Anwendung bei endlicher Probendicke erweitert und anschließend mathematisch aneinandergesetzt, um auf diese Weise das neue Modell an die Spitzengeometrie anzupassen. Die Erweiterung des Hertzmodells erfolgte durch das Anfügen von Korrekturtermen, deren einzelne Parameter derart optimiert wurden, daß mit dem neuen Modell ein Satz von simulierten Kraftkurven bestmöglich beschrieben werden konnte.

4.1 Parametrische Erweiterungen des Hertzmodells

4.1.1 Eindrückung des Konus in dünne Proben

Um die Eindrückung eines Konus in eine Probe endlicher Dicke zu beschreiben, wurde das Hertzmodell (3) mit einem Korrekturterm $f(\delta/D)$ ergänzt. Dieser ist eine Funktion der normalisierten Eindrückung, also des Verhältnisses aus Eindrückung δ und Probendicke D :

$$F_{\text{FitKonus}} = A \cdot E_{\text{fit}} \cdot \delta^2 \cdot f\left(\frac{\delta}{D}\right) \quad (16)$$

$$\text{mit} \quad A = \frac{2}{\pi} \cdot \frac{\tan(\alpha)}{1 - \nu^2} \quad \text{und} \quad 0 \leq \frac{\delta}{D} \leq 1.$$

Sinnvollerweise muß $f(\delta/D)$ für sehr kleine Eindrückungen bzw. große Probendicken den Wert 1 annehmen, damit Gleichung (16) wieder in die ursprüngliche Form des Hertzmodells (3) übergeht. Erreicht die Eindrückung die Größe der Probendicke, d.h. $\delta/D = 1$, so muß $f(\delta/D)$ divergieren, da in diesem Falle auch die Auflagekraft gegen unendlich anwächst. Für den Korrekturterm gilt somit:

$$1 \leq f\left(\frac{\delta}{D}\right) < \infty \quad (17)$$

Der Korrekturterm wurde als eine Potenzreihe angesetzt, mit der mathematischen Motivation, daß jede Funktion durch eine Potenzreihe, die sogenannte Taylorsche Reihe, angenähert werden kann [91]. Als Exponenten wurden nicht nur ganze, sondern reale Zahlen zugelassen, da sich

hierdurch die Zahl der erforderlichen Terme erheblich reduzierte, so daß die Reihe bereits mit zwei Entwicklungstermen eine ausreichende Genauigkeit aufweisen und danach abgebrochen werden konnte:

$$f\left(\frac{\delta}{D}\right) = \left(1 + c_1 \cdot \left(\frac{\delta}{D}\right)^{c_2} + c_3 \cdot \left(\frac{\delta}{D}\right)^{c_4}\right) \quad (18)$$

Um die Koeffizienten c_1 bis c_4 zu bestimmen, wurden zunächst mit Hilfe der FEM verschiedene Kraftkurven simuliert, bei denen ein Konus in Proben mit einer Dicke von 216 nm, 324 nm, 432 nm, 540 nm, 648 nm und 1 μm gedrückt wurde. Die parametrische Erweiterung sollte speziell für diesen Dickenbereich optimiert werden, da einerseits für die Untersuchungen an lebenden Zellen gerade deren Randbereich mit einigen hundert Nanometern Dicke äußerst interessant ist und andererseits bereits bei einer Probendicke von 1 μm der Einfluß des harten Substrates bei den im AFM-Experiment üblichen Eindrückungen nur noch schwach ausgeprägt ist (vgl. Kapitel 3.2).

Die vier unbekanntenen Koeffizienten c_1 bis c_4 wurden mit Hilfe eines Monte-Carlo-Fits so berechnet, daß die simulierten Kraftkurven durch das erweiterte Hertzmodell (16) bestmöglich beschrieben wurden. Der Fit wurde an den simulierten Kraftkurven bis zu einer Eindrückung von 300 nm oder aber maximal bis zur halben Probendicke durchgeführt, da im AFM-Experiment meistens das Ziel verfolgt wird, lebende Zellen möglichst wenig zu beeinflussen. Das bedeutet jedoch ein Ausüben von lediglich niedrigen Auflagekräften, um somit große Eindrückungen zu vermeiden. Zusätzlich wird bei großen Eindrückungen wiederum der Einfluß der in der FEM gewählten Materialtheorie auf die Simulation bedeutsam [90].

Nach der Ausführung des Monte-Carlo-Fits ergab sich mit den Koeffizienten c_1 bis c_4 die folgende Form der Erweiterung für das Hertzmodell des Konus:

$$F_{\text{FitKonus}} = A \cdot E_{\text{fit}} \cdot \delta^2 \cdot f\left(\frac{\delta}{D}\right) \quad (19)$$

$$\text{mit} \quad f\left(\frac{\delta}{D}\right) = \left(1 + 0.4831 \cdot \left(\frac{\delta}{D}\right)^{1.128} + 0.3839 \cdot \left(\frac{\delta}{D}\right)^{3.929}\right).$$

Dabei wurde der Wert des Elastizitätsmoduls E_{fit} auf 18238 Pa festgelegt. Dieser Elastizitätsmodul ergab sich zuvor aus einem Fit an der Kraftkurve, welche auf der den elastischen Halbraum repräsentierenden Probe simuliert wurde. Auf ihn sind somit, als Referenzwert des E-Moduls des elastischen Halbraumes, die Koeffizienten kalibriert. Ersichtlich ist nun auch das Verhalten der Funktion $f(\delta/D)$ für eine im Vergleich zur Eindrückung große Probendicke: $f(\delta/D)$ erreicht dann den Wert 1 und Gleichung (19) konvergiert gegen die ursprüngliche Form des Hertzmodells (3).

Die Verbesserung des erweiterten theoretischen Modells gegenüber dem klassischen Hertzmodell veranschaulicht Abb. 4.1.1. Gezeigt sind vier simulierte Kraftkurven eines Konus auf dünnen Proben (Abb. 4.1.1c), welche sowohl mit dem Hertzmodell (3), als auch mit dessen parametrischer Erweiterung (19) gefittet wurden. Die Differenz zwischen den Kraftkurven und dem jeweiligen Fit, ist über den Kraftkurven für die beiden Modelle

dargestellt. Während die maximale Abweichung im Falle des Hertzmodells 19,4 pN beträgt (Abb. 4.1.1a), reduziert sie sich bei Anwendung der parametrischen Erweiterung auf lediglich 0,37 pN (Abb. 4.1.1b). Dies bedeutet eine Verbesserung der Fitgenauigkeit um mehr als das 50-fache! Betrachtet man den aus den Fits berechneten Elastizitätsmodul, so liegt er beim Hertzmodell bis zu 35% über dem E-Modul des simulierten Halbraumes, im Falle der Erweiterung nur noch maximal 0,32%. Die Verbesserung durch die parametrische Erweiterung wird besonders bei der Berechnung der Probendicke aus der Kraftkurve deutlich: hier liegt der Fehler bei maximal 0,93%, während das Hertzmodell eine direkte Berechnung dieses Parameters überhaupt nicht ermöglicht hatte.

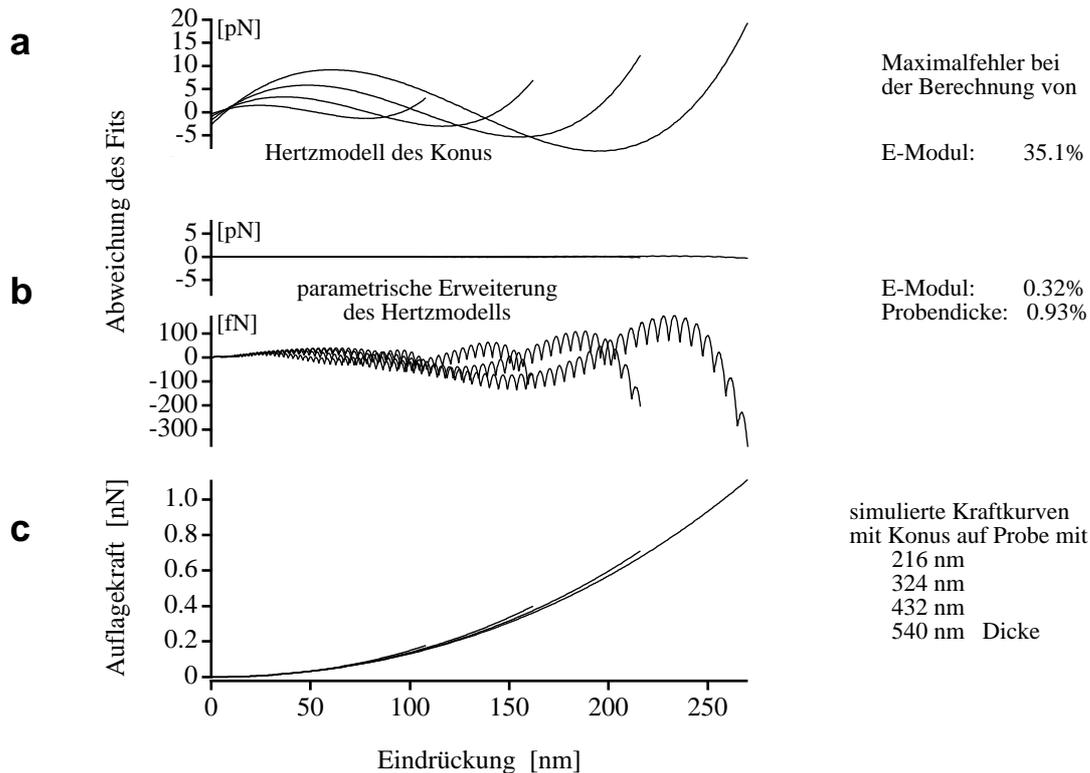


Abb. 4.1.1: Die unten dargestellten simulierten Kraftkurven eines Konus auf dünnen Proben (c) wurden mit dem Hertzmodell des Konus (3) und dessen parametrischer Erweiterung (19) gefittet. Die jeweilige Abweichung des Fits zur Kraftkurve ist darüber aufgetragen, jene der parametrischen Erweiterung zum besseren Vergleich zweimal (b): zunächst mit derselben Skalierung wie die Abweichung beim Hertzmodell (a), dann vergrößert, um die Güte des Fits zu verdeutlichen. Die jeweiligen Maximalfehler der berechneten Parameter E-Modul und Probendicke sind auf der rechten Seite angegeben.

Auffallend sind in Abb. 4.1.1b die Schwingungen des vergrößerten Graphen zur Abweichung der parametrischen Erweiterung. Sie sind eine direkte Folge der Diskretisierung in der FEM. Indirekt sind sie jedoch ein weiteres Maß für die Güte des erweiterten Modells, dessen Abweichungen offensichtlich nur geringfügig über der Größenordnung des Diskretisierungsfehlers liegen.

4.1.2 Eindrückung des Paraboloids in dünne Proben

Um das Hertzmodell an den runden Apex der AFM-Spitze anzupassen, wurde in einem zweiten Schritt das Hertzmodell des Paraboloids (4) für die Eindrückung in dünne Proben erweitert. Die Vorgehensweise war dabei dieselbe wie die im Falle des Konus diskutierte. Als Grundlage wurden nun Kraftkurven bei Probendicken von 190 nm, 250 nm, 324 nm, 432 nm, 540 nm, 648 nm und 1000 nm mit der AFM-Spitze als Stempel simuliert. Der Übergang vom kugel- zum konusförmigen Teil der AFM-Spitze erfolgt bei der gewählten Geometrie (Spitzenradius $R = 50$ nm, Öffnungswinkel $\alpha = 38,31^\circ$) bei einer Eindrückung von 19 nm. Bei der Durchführung des Monte-Carlo-Fits wurden deshalb die Kraftkurven bis zu dieser Eindrückung mit dem folgenden erweiterten Hertzmodell des Paraboloids gefittet:

$$F_{\text{FitParab}} = B \cdot E_{\text{fit}} \cdot \delta^{3/2} \cdot g\left(\frac{\delta}{D}\right) \quad (20)$$

$$\text{mit} \quad B = \frac{4}{3} \cdot \frac{\sqrt{R}}{1 - \nu^2} \quad \text{und} \quad g\left(\frac{\delta}{D}\right) = \left(1 + k_1 \cdot \left(\frac{\delta}{D}\right)^{k_2}\right).$$

Der Ansatz der Erweiterung $g(\delta/D)$ hatte zunächst dieselbe Form wie in Gleichung (18). Während der Bestimmung der Koeffizienten durch den Monte-Carlo-Fit wurde jedoch deutlich, daß eine Erweiterung über den ersten Term der Potenzreihe hinaus keine spürbare Verbesserung in der Fitgenauigkeit mit sich bringt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß eine Eindrückung von maximal 19 nm im Vergleich zu den gewählten Probendicken relativ klein ist. Daher kann die Abweichung vom ursprünglichen Potenzgesetz des Hertzmodells noch mit der kürzeren Erweiterung hinreichend gut korrigiert werden. Die Berechnung der Koeffizienten k_1 und k_2 ergab die folgende Form des erweiterten Hertzmodells des Paraboloids:

$$F_{\text{FitParab}} = B \cdot E_{\text{fit}} \cdot \delta^{3/2} \cdot \left(1 + 1.692 \cdot \left(\frac{\delta}{D}\right)^{1.224}\right) \quad (21)$$

Hierbei war der im Fit optimierte Wert für $E_{\text{fit}} = 19010$ Pa. Für eine im Vergleich zur Eindrückung große Probendicke erreicht die Funktion $g(\delta/D)$ wiederum den Wert 1 und Gleichung (21) geht in die ursprüngliche Form des Hertzmodells (4) über.

4.2 Verknüpfung der beiden Erweiterungen: Eindrückung der AFM-Spitze in dünne Proben

Um ein parametrisches Modell zu entwickeln, welches die Auflagekraft einer AFM-Spitze in eine dünne Probe als Funktion der Eindrückung beschreibt, wurden im nächsten Schritt die beiden Erweiterungen des Hertzmodells miteinander verknüpft. Dazu war es erforderlich, zwei Gewichtungsfunktionen (W_i) zu finden, welche die beiden Erweiterungen des Hertzmodells mathematisch verbinden und dabei die Überlagerung der Gleichungen (19) und (21) in gewünschter Weise steuern konnten:

$$F_{AFM}^* = F_{FitParab} \cdot W_{Parab} + W_{Konus} \cdot F_{FitKonus} \quad (22)$$

Wie in Abb. 4.2.1 skizziert, kontrollieren die Funktionen W_i den Übergang der Spitzengeometrie von dem Bereich des Paraboloids zum Konus durch ein eindrückungsabhängiges Gewichten der beiden erweiterten Hertzmodelle $F_{FitParab}$ und $F_{FitKonus}$: für kleine Eindrückungen sollte der Einfluß des dem Paraboloid zugehörigen Terms dominieren, für große Eindrückungen jedoch abklingen. Hier wiederum sollte der Term des Konus hervortreten, d.h. die beiden Funktionen sollten ein entgegengesetzt zu- bzw. abnehmendes Gewichtungsverhalten zeigen, um sozusagen zwischen den beiden Bereichen überblenden zu können. Die genaue Form der Gewichtungsfunktionen wurde wieder durch einen Monte-Carlo-Fit an simulierten Kraftkurven bestimmt.

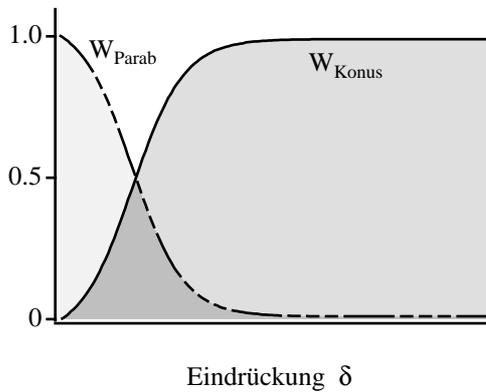


Abb. 4.2.1: Schematischer Verlauf der beiden Gewichtungsfunktionen W_{Parab} und W_{Konus} . Die Idee war, Funktionen der Eindrückung δ mit entgegengesetzt zu- und abnehmendem Gewichtungsverhalten zu finden, um so die beiden Erweiterungen des Hertzmodells miteinander verknüpfen zu können.

Wie bei der Erweiterung des Paraboloids wurden dazu sieben Kraftkurven auf Probendicken zwischen 190 nm und 1 μ m mit der AFM-Spitze als Stempel simuliert. Der Fit wurde wiederum bis zu einer Eindrückung von 300 nm bzw. bis zur halben Probendicke durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Ansätze von Gewichtungsfunktionen, welche die erwünschten Eigenschaften erfüllen konnten, konstruiert und anschließend getestet. Die besten Ergebnisse wurden mit einem Ansatz erzielt, der zwei entgegengesetzten Fermi-Dirac-Verteilungen entspricht:

$$W_i = \left(b_{i1} + \frac{b_{i2}}{e^{(\delta-b_{i3})/b_{i4}} + b_{i5}} \right) \quad (23)$$

Bei diesem Fermi-Dirac-Ansatz waren der Maximalfehler und auch die durchschnittliche Abweichung des Fits am kleinsten. Besonders im problematischen Übergangsbereich der Spitzengeometrie von der Kugel zum Konus, also bei einer Eindrückung von 19 nm, war der Fermi-Dirac-Ansatz den anderen Ansätzen deutlich überlegen. Ein Vergleich mit zwei alternativen Ansätzen findet sich in Anhang C.

Wird in Gleichung (22) der Elastizitätsmodul E ausgeklammert, so kann im Monte-Carlo-Fit zur Bestimmung der Koeffizienten der Gewichtungsfunktionen b_{ij} der nominelle E -Modul von 20 kPa eingesetzt werden. Die Koeffizienten b_{ij} enthalten dadurch einen Vorfaktor, welcher die

durch den kleinen Konuswinkel entstandene Abweichung im gefitteten E-Modul korrigiert². Mit anderen Worten: die Koeffizienten werden bezüglich des nominellen E-Moduls kalibriert. Die endgültige Form des Parametrischen Modells beschreibt nun die Auflagekraft der AFM-Spitze als Funktion der Eindrückung δ , der Probendicke D und des Elastizitätsmoduls E :

$$F_{AFM} = E \cdot \left[B \cdot \delta^{3/2} \cdot g\left(\frac{\delta}{D}\right) \cdot W_{Parab} + W_{Konus} \cdot A \cdot \delta^2 \cdot f\left(\frac{\delta}{D}\right) \right] \quad (24)$$

$$\text{mit} \quad W_{Parab} = \left(0.09276 + \frac{0.3642}{e^{(\delta-20\text{nm})/53\text{nm}} - 0.3299} \right)$$

$$\text{und} \quad W_{Konus} = \left(0.9272 + \frac{0.2966}{e^{(\delta-100\text{nm})/143\text{nm}} + 0.1469} \right).$$

Die beiden Gewichtungsfunktionen sind in Abb. 4.2.2 dargestellt.

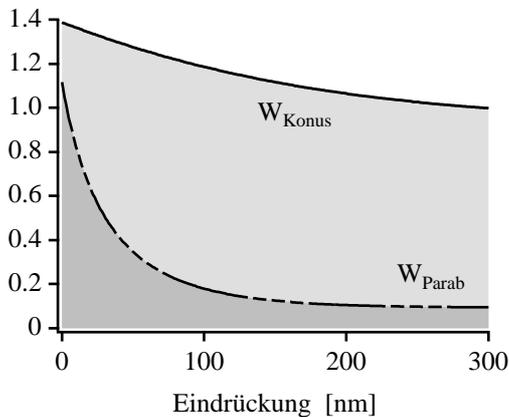


Abb. 4.2.2: Die beiden Gewichtungsfunktionen W_{Parab} und W_{Konus} , die sich aus einem Monte-Carlo-Fit an simulierten Kraftkurven ergaben.

Da bei experimentellen Kraftkurven auf weichen Proben im Gegensatz zur Nullage der Cantileverauslenkung (bzw. der Auflagekraft) der Kontaktpunkt, und damit die Nullage der Eindrückung, oftmals nicht gut erkennbar ist, muß diese ebenfalls gefittet werden (vgl. Kapitel 2.2.5). Deshalb wird im Parametrischen Modell (24) die Eindrückung δ durch die allgemeinere Form $\delta - \delta_0$ ersetzt, wobei nun δ_0 ein weiterer Fitparameter ist. Dies ist auch die Form des Parametrischen Modells, mit der anschließend experimentelle Kraftkurven gefittet werden, um den Elastizitätsmodul und die Dicke der Probe zu bestimmen.

Um die höhere Genauigkeit des Parametrischen Modells gegenüber dem Hertzmodell zu veranschaulichen, wurden erneut simulierte Kraftkurven mit diesen beiden Modellen ausgewertet. Die Kraftkurven und die Abweichung des jeweiligen Fits sind in Abb. 4.2.3 dargestellt, wobei hier auch der Fit des Hertzmodells über den gesamten Kraftkurvenbereich erfolgte. Die maximale Abweichung für das Hertzmodell beträgt 27,2 pN, für das Parametrische Modell lediglich 2,4 pN. Da neben der endlichen Probendicke auch die Stempelgeometrie von der Vorgabe im Hertzmodell abweicht, ist der Fehler des berechneten

² Gemäß Kapitel 3.1 war im Falle des elastischen Halbraums bei einem Fit mittels Hertzmodell der kleine Konuswinkel ($\alpha = 38.31^\circ$) die Hauptursache für die Abweichung des gefitteten E-Moduls (18238 Pa) vom nominellen Wert (20000 Pa).

Elastizitätsmoduls mit bis zu 63,7% gewaltig. Für das Parametrische Modell beläuft sich der maximale Fehler für den E-Modul auf 2,1%, im Falle der nun berechenbaren Probendicke auf 6,5%.

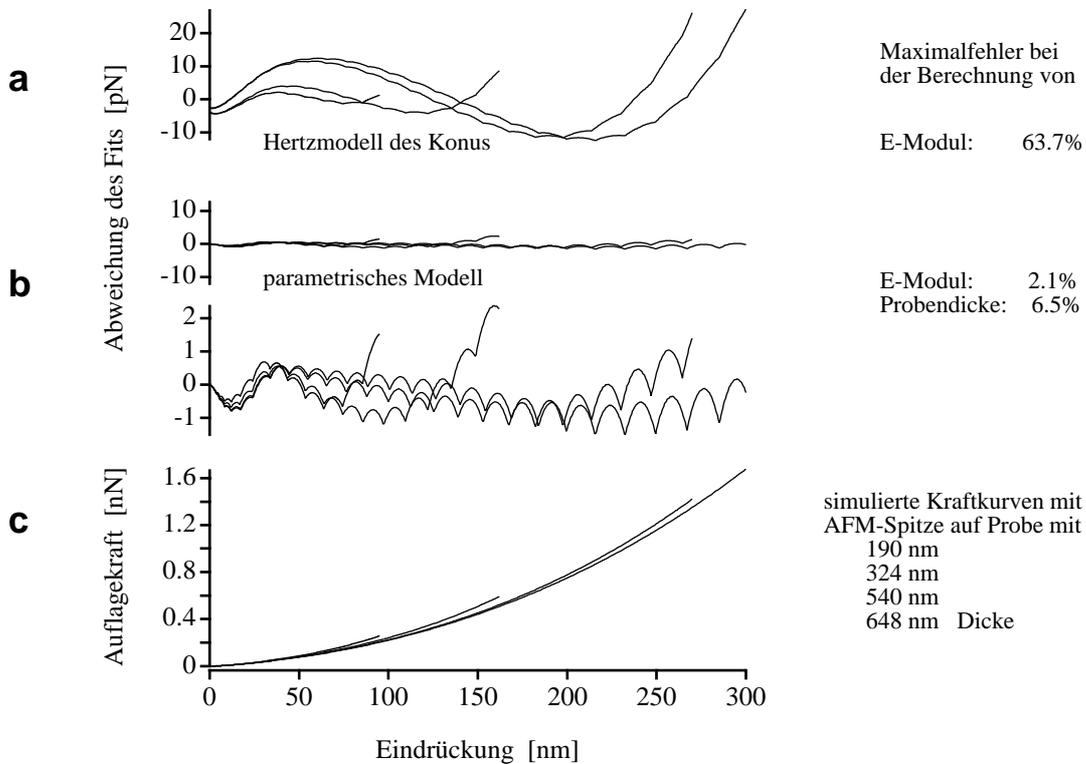


Abb. 4.2.3: Die unten dargestellten simulierten Kraftkurven einer AFM-Spitze auf dünnen Proben (c) wurden mit dem Hertzmodell des Konus (3) und dem neu entwickelten Parametrischen Modell (24) gefittet. Die jeweilige Abweichung des Fits zur Kraftkurve ist darüber zu sehen. Um die Güte des Fits zu verdeutlichen, ist die Abweichung des Parametrischen Modells zweimal gezeigt (b): zunächst vergrößert, sowie mit derselben Skalierung wie beim Hertzmodell (a). Die jeweiligen Maximalfehler des berechneten E-Moduls bzw. der Probendicke sind auf der rechten Seite angegeben.

5 Charakterisierung des Parametrischen Modells

Bevor das neu entwickelte Parametrische Modell zur Auswertung experimenteller Daten verwendet wird, erfolgt in diesem Kapitel eine Charakterisierung des Modells, um die Auswirkungen von Variationen verschiedener Randbedingungen abschätzen zu können. Da das Modell aus der Anwendung eines Monte-Carlo-Fits an wenigen simulierten Kraftkurven entstanden ist, sind folglich sämtliche Koeffizienten auf die dabei gewählten Randbedingungen optimiert. Werden die Randbedingungen im Experiment verändert, so können Auswertungsfehler auftreten, die in diesem Kapitel näher untersucht werden. Dazu wurden Kraftkurven mit gezielt veränderten Randbedingungen simuliert und die Auswirkungen auf die Qualität der anschließend durchgeführten Fits untersucht.

5.1 Einfluß des Fitintervalls

Bei der im vorigen Kapitel beschriebenen Entwicklung des Parametrischen Modells wurde der Monte-Carlo-Fit an den simulierten Kraftkurven stets vom Kontaktpunkt bis zu einer Eindrückung von halber Probendicke bzw. maximal 300 nm durchgeführt. Bei der Auswertung von Kraftkurven mit dem Parametrischen Modell ist das beste Ergebnis natürlich bei einem Fit unter eben diesen Bedingungen zu erwarten. Nun ist aber im Experiment die Probendicke nicht im voraus bekannt, sondern ein zu bestimmender Parameter, weshalb eine entsprechende Optimierung des Fitbereichs a priori nicht praktikierbar ist.

Um die Qualität des Fits unter praxisnahen Bedingungen zu testen, wurden simulierte AFM-Kraftkurven daher in verschiedenen Fitbereichen ausgewertet. Wie in Abb. 5.1.1 skizziert, wurde dazu der Startpunkt des Fitbereichs konstant gehalten, während der flexible Endpunkt des Fitbereichs kontinuierlich zu immer größeren Eindrückungen verschoben wurde³.

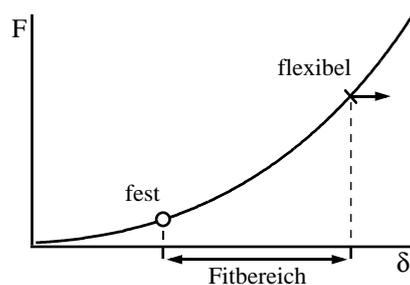


Abb. 5.1.1: Schemazeichnung einer Kraftkurve mit flexiblem Fitbereich. Um die Auswirkung unterschiedlicher Fitbereiche auf die Auswertung zu untersuchen, wurde das Ende des Fitbereichs zu immer größeren Eindrückungen verschoben, während der Startpunkt beibehalten wurde.

Die mit dem Parametrischen Modell in verschiedenen Fitbereichen ermittelten Probendicken und Elastizitätsmoduln sind in Abb. 5.1.2 für vier simulierte Kraftkurven dargestellt. Um die Qualität des Fits einschätzen zu können, sind die nominellen Werte der Probendicke ($D_{\text{FEM}} = 190 \text{ nm}$, 324 nm , 540 nm und $1 \mu\text{m}$) und des Elastizitätsmoduls ($E_{\text{FEM}} = 20 \text{ kPa}$) als gestrichelte Linien eingezeichnet. Damit die gefitteten Parameter Probendicke D_{fit} und E-Modul E_{fit} aller vier Kraftkurven übersichtlich gegen die Endposition des Fitbereichs aufgetragen werden konnten, wurde die Endposition des Fitbereichs normalisiert, d.h. durch die nominelle Probendicke D_{FEM} dividiert. Dargestellt sind die Ergebnisse drei verschiedener Startpunkte des

³ In der späteren Analyse experimenteller Daten erfolgt die Auswertung ebenfalls in flexiblen Fitbereichen.

Fitbereichs, nämlich für eine Eindrückung von $\delta = -5$ nm, $\delta = 0$ nm, also den Kontaktpunkt, und $\delta = 50$ nm. Wie erwartet wurde das beste Resultat für den Fitbereich erzielt, der direkt am Kontaktpunkt beginnt (Abb. 5.1.2b, e). Der gefittete E-Modul liegt dann über sehr große Bereiche der Eindrückung innerhalb des eingetragenen 5%-Fehlerintervalls. Selbst im Fall der Kraftkurve der dünnsten Probe, welche die größten Abweichungen zeigt, ist dies ein Bereich von etwa 0,2 bis 0,8 der normalisierten Eindrückung, bei den anderen Kraftkurven ist dieser Bereich sogar noch größer. Wird der Startpunkt des Fits zu größeren Eindrückungen verschoben (hier: $\delta = 50$ nm), so wird der Fehler des Fits allmählich größer (Abb. 5.1.2c, f). Das erzielte Ergebnis ist aber immer noch deutlich besser als bei einem Startpunkt, der nur geringfügig im Bereich negativer Eindrückungen liegt, im dargestellten Fall 5 nm vor dem eigentlichen Kontaktpunkt (Abb. 5.1.2a, d). Hier verschlechtert sich der Fit dramatisch und der Fehler wird inakzeptabel groß.

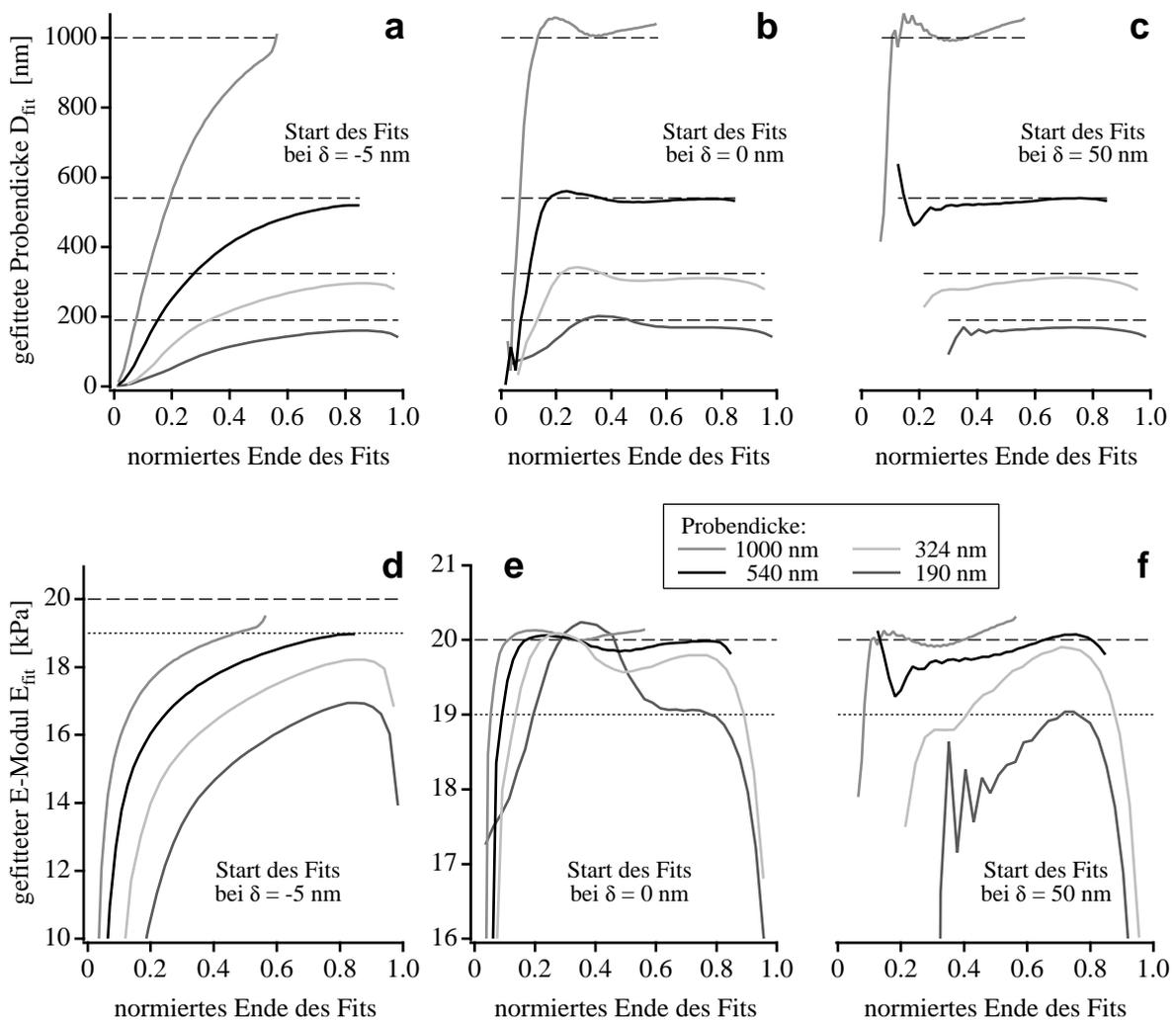


Abb. 5.1.2: Vier simulierte AFM-Kraftkurven wurden in verschiedenen Fitbereichen mit festem Start- und flexiblem Endpunkt mit dem Parametrischen Modell (24) gefittet. Die daraus berechneten Probendicken D_{fit} und Elastizitätsmoduln E_{fit} sind gegen das normalisierte Ende des Fitbereichs aufgetragen. Sobald Teile des Fitbereichs außerhalb des Kontaktbereichs der Kraftkurve liegen (a, d), ist der Fehler gewaltig. Er reduziert sich jedoch drastisch, wenn als Startpunkt der Kontaktpunkt gewählt wird (b, e), selbst bei einem Fitbereich oberhalb von 50 nm Eindrückung (c, f) ist der Fehler vergleichsweise klein. Die nominellen Probendicken bzw. der nominelle E-Modul sind als gestrichelte Linie eingezeichnet, eine Abweichung des E-Moduls von 5% als gepunktete Linie.

Für spätere Anwendungen läßt sich also zusammenfassend feststellen, daß wie erwartet die Qualität des Fits um so besser ist, je näher der Startpunkt des Fitbereichs an den Kontaktpunkt heranrückt. Andererseits muß jedoch auf jeden Fall gewährleistet sein, daß der Fitbereich vollständig im Kontaktbereich der Kraftkurve liegt.

5.2 Einfluß des Spitzenradius

Ein weiterer kritischer Punkt in der Entwicklung des Parametrischen Modells ist die Geometrie des eindrückenden Stempels, da insbesondere der Kugelradius am Apex der AFM-Spitze bei der Herstellung Schwankungen unterworfen ist. Deshalb muß davon ausgegangen werden, daß im AFM-Experiment der Spitzenradius vom nominellen Wert ($R = 50 \text{ nm}$) abweichen kann. Um die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Auswertung mit dem Parametrischem Modell zu untersuchen, wurden zum Vergleich Kraftkurven mit abweichender Stempelgeometrie simuliert. Der Öffnungswinkel wurde konstant gehalten, während der Kugelradius der AFM-Spitze variiert wurde: neben dem nominellen Radius von 50 nm betrug die Werte 40 nm bzw. 60 nm , wobei die AFM-Spitze in eine 540 nm dicke Probe eingedrückt wurde. Die Auswertung der Kraftkurven erfolgte wieder in flexiblen Fitbereichen. Wie in Abb. 5.2.1 skizziert, wurde diesmal jedoch der Startpunkt sukzessive zu größeren Eindrückungen verschoben, während der Endpunkt des Fitbereichs fixiert war.

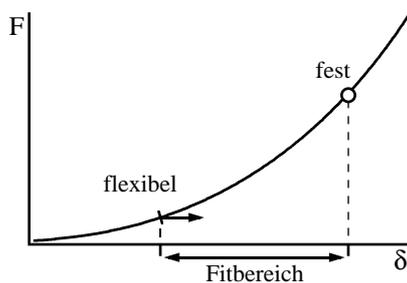


Abb. 5.2.1: Schemazeichnung einer Kraftkurve mit flexiblem Fitbereich zur Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Stempelgeometrien. Das Ende des Fitbereichs wurde fixiert, während der Startpunkt zu immer größeren Eindrückungen verschoben wurde.

Die mit drei verschiedenen Stempelgeometrien simulierten Kraftkurven wurden mit dem Parametrischen Modell gefittet und die berechneten Parameter Probendicke D_{fit} und Elastizitätsmodul E_{fit} in Abb. 5.2.2 gegen den Startpunkt des Fitbereichs aufgetragen. Als Folge des vergrößerten bzw. verkleinerten Kugelradius ist ein deutliches Über- bzw. Unterschätzen von nomineller Probendicke und E-Modul zu beobachten. In der Abbildung sind die Ergebnisse für drei verschiedene Endpositionen des Fitbereichs, die bei einer Eindrückung von 200 nm , 270 nm , also der halben Probendicke, bzw. 340 nm liegen, dargestellt, die nominellen Werte von $D_{\text{FEM}} = 540 \text{ nm}$ bzw. $E_{\text{FEM}} = 20 \text{ kPa}$ sind als gestrichelte Linien eingezeichnet. Prinzipiell kann im Fall eines im Vergleich zum nominellen Wert zu großen Spitzenradius ($R > 50 \text{ nm}$) ein systematisches Überschätzen der berechneten Werte der Probendicke und des E-Moduls beobachtet werden. Ist der Kugelradius dagegen vergleichsweise zu klein ($R < 50 \text{ nm}$), so sind auch die beiden berechneten Parameter D_{fit} und E_{fit} systematisch zu klein. In allen Fällen ist außerdem zu erkennen, daß der Einfluß des Spitzenradius mit zunehmender Eindrückung, also ansteigenden Werten für den Startpunkt des Fits, abnimmt und sich daher die drei Graphen einander annähern. Diese Beobachtung wurde in

Kapitel 3 bereits in Zusammenhang mit dem Hertzmodell beschrieben und konnte daher auch hier erwartet werden. Wird der Endpunkt des Fitbereichs zu größeren Eindrückungen verschoben, so erhöht sich die Genauigkeit des Fits ebenfalls erheblich. Im Fall eines Startpunktes des Fits oberhalb von 10 nm Eindrückung und eines Fitendes bei 340 nm (Abb. 5.2.2c, f) liegt die maximale Abweichung für alle drei Stempelgeometrien größtenteils sogar unter 3%.

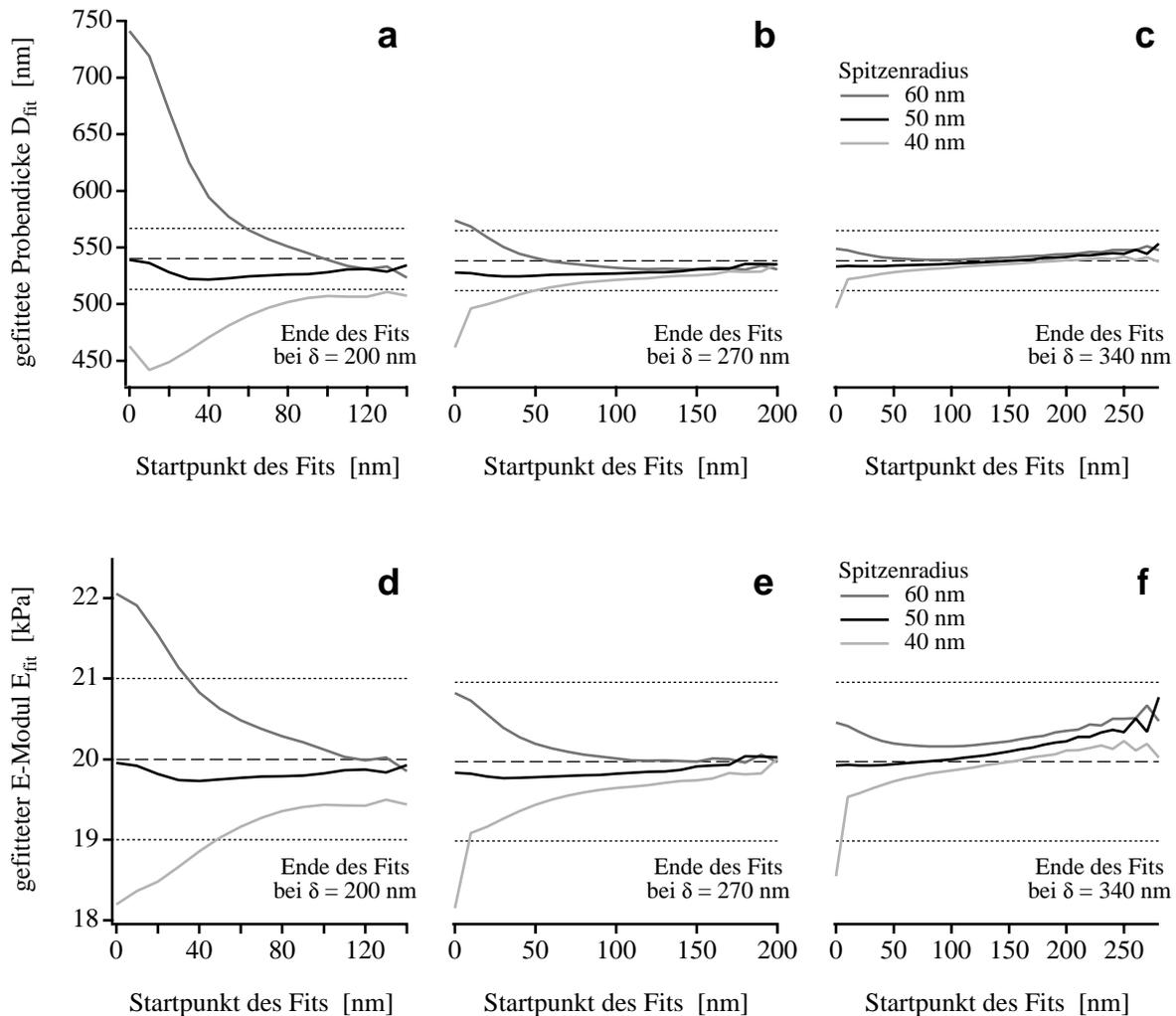


Abb. 5.2.2: Drei Kraftkurven wurden mit AFM-Spitzen mit unterschiedlichem Spitzenradius ($R = 40$ nm, 50 nm bzw. 60 nm) auf einer 540 nm dicken Probe simuliert und mit dem Parametrischen Modell gefittet. Aus den verschiedenen Fitbereichen mit flexiblem Start- und festem Endpunkt wurden die Probendicke D_{fit} und der Elastizitätsmodul E_{fit} berechnet und gegen den Startpunkt des Fitbereichs aufgetragen. Die nominelle Probendicke und der nominelle E-Modul sind als gestrichelte Linie eingezeichnet, eine Abweichung von 5% zusätzlich als gepunktete Linie. Ein Fit im Bereich kleiner Eindrückungen reagiert am empfindlichsten auf die veränderten Spitzenradien; hier sind im Fall der 40 nm- bzw. 60 nm-Spitze die größten Abweichungen zu sehen. Wird der Fitbereich vergrößert, d.h. das Ende des Fitbereichs zu größeren Eindrückungen verschoben, so nimmt der Einfluß des Spitzenradius deutlich ab.

In der praktischen Anwendung hat folglich die genaue Kenntnis der Spitzengeometrie eine zentrale Bedeutung. Ist der Spitzenradius bekanntermaßen 50 nm, so ergibt in der Datenauswertung ein Fitbereich, der in der Nähe des Kontaktpunktes, d.h. bei einer Eindrückung von

beispielsweise 5 nm, beginnt, gemäß Kapitel 5.1 die besten Resultate. Ist der Spitzenradius dagegen nicht exakt bestimmt, so empfiehlt sich eine Auswertung mit einem Startpunkt des Fitbereichs bei etwa 20 bis 50 nm, wobei der Fit mindestens bis zu einer Eindrückung von halber Probendicke ausgedehnt werden sollte. Letzteres steht möglicherweise in Widerspruch zur oftmals erwünschten störungsfreien Untersuchung, beispielsweise von lebenden Zellen, die nur bei kleinen Eindrückungen, also niedrigen Auflagekräften erreicht werden kann.

5.3 Einfluß von Reibung

Berühren sich zwei Körper, die sich relativ zueinander bewegen, so treten Reibungskräfte auf. Gleiten die Oberflächen der beteiligten Körper aufeinander, so ist die charakteristische Größe, welche die Gleitreibungskraft F_G mit der Normalkraft F_N des gleitenden Körpers verknüpft, der Gleitreibungskoeffizient μ_G [92]:

$$F_G = \mu_G \cdot F_N \quad \text{mit} \quad \mu_G \geq 0 \quad (25)$$

μ_G ist eine materialabhängige Größe und müßte, um in der Simulation berücksichtigt zu werden, zunächst im AFM-Experiment für jede Probe neu bestimmt werden. Da das AFM auch in der Lage ist, die Torsion des Cantilevers zu messen, ist auch eine Messung der Lateralkraft F_L möglich. Mit der Auflagekraft F , als wirkende Normalkraft, ist somit auch die Bestimmung eines lokalen Reibungskoeffizienten möglich [93]. Im Fall harter Materialien, die während des Ab tastens mittels AFM-Spitze keinerlei Verformung erfahren, ist dies im Prinzip realisierbar. Bei weichen Proben treten jedoch elastische oder plastische Verformungen auf, die bei der Messung der Lateralkraft ebenfalls einen Beitrag leisten werden. Zusätzlich hat z.B. bei Polymergelen das Lösungsmittel und damit die chemische Umgebung großen Einfluß auf die Wechselwirkung zwischen den Oberflächen der Probe und der AFM-Spitze. Betrachtet man die Oberfläche lebender Zellen, so tritt ein weiteres Problem in Erscheinung: die Zellmembran selbst ist durchsetzt von zahlreichen Membranproteinen bzw. bedeckt von Proteinen der extrazellulären Matrix, deren Zusammensetzung aber beispielsweise von Umweltfaktoren oder der Phase im Zellzyklus abhängen, aber auch je nach Zelltyp variieren kann [1, 94]. Die unspezifische Adhäsion der Proteine an der AFM-Spitze ist somit ein weiterer lokaler Beitrag zur Reibungskraft und eine verlässliche Bestimmung von μ_G deshalb undenkbar.

In der Simulation mittels FEM wurde daher der einfache Grenzfall $\mu_G = 0$ verwendet und somit bei der Wahl der Randbedingungen zwischen Stempel und Probe stets ein reibungsfreies Gleiten angesetzt. Da diese Konvention jedoch nicht im realen Experiment erwartet werden kann, wurde die Auswirkung des Reibungskoeffizienten auf die Auswertung mittels Simulation untersucht. Dazu wurde die Eindrückung in eine 540 nm dicke Probe simuliert, wobei der Reibungskoeffizient zwischen AFM-Spitze und Probe im Bereich von 0 bis 1 variiert wurde. An den resultierenden Kraftkurven (Abb. 5.3.1) ist der Einfluß des Reibungskoeffizienten deutlich zu sehen, am stärksten im Bereich von 0 bis 0,25. Für größere Werte verändert sich der Verlauf nur noch gering.

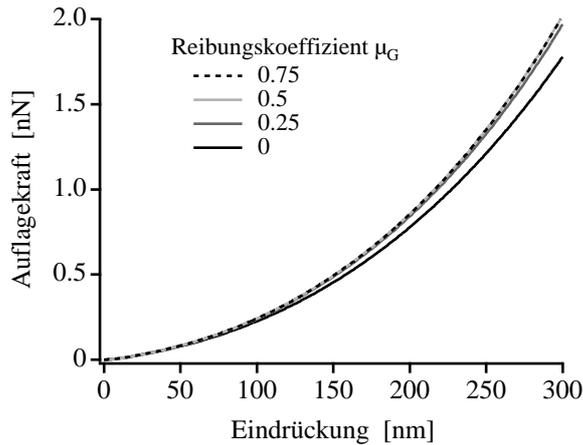


Abb. 5.3.1: Simulierte Kraftkurven mit unterschiedlichem Reibungskoeffizient μ_G zwischen 540 nm dicker Probe und AFM-Spitze. Der Einfluß auf die Kraftkurven wird besonders im Bereich $\mu_G < 0,25$ deutlich.

Die Kraftkurven wurden anschließend in einem Fitbereich mit flexiblem Start- und festem Endpunkt ausgewertet. Die berechneten Probendicken D_{fit} und Elastizitätsmoduln E_{fit} wurden in Abb. 5.3.2 gegen den Startpunkt des Fitbereichs aufgetragen und die nominellen Werte $D_{\text{FEM}} = 540$ nm und $E_{\text{FEM}} = 20$ kPa als gestrichelte Linien eingezeichnet. Da für große Werte von μ_G keine Veränderungen mehr sichtbar waren, wurde lediglich die Auswertung bis $\mu_G = 0,75$ dargestellt. Die auftretenden Schwankungen in Abhängigkeit vom Startpunkt des Fits sind für reibungsfreies Gleiten ($\mu_G = 0$) gering ausgeprägt, in den anderen Fällen ($\mu_G > 0$) sind die berechneten Werte für Probendicke bzw. E-Modul nahezu konstant, also unabhängig vom Fitbereich. Bei wachsender Reibung nimmt die berechnete Probendicke stetig ab, für $\mu_G = 0,25$ beträgt sie etwa 88%, für $\mu_G \geq 0,5$ etwa 84% der nominellen Dicke. Wie aus dem Verlauf der Kraftkurven bereits zu erwarten war, ist die größte Veränderung also bereits im Bereich geringer Reibung ($\mu_G < 0,25$) zu beobachten. Beim Elastizitätsmodul liegen die berechneten Werte bis zu 6% über dem nominellen Wert, der gesamte Anstieg erfolgt dabei im Bereich $\mu_G < 0,25$.

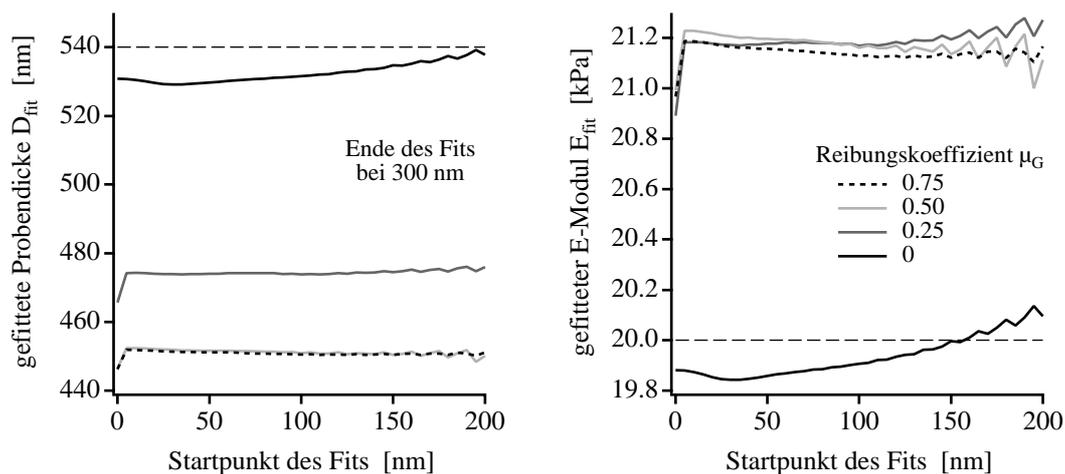


Abb. 5.3.2: Zwischen AFM-Spitze und Probe wurde der Reibungskoeffizient μ_G variiert und die simulierten Kraftkurven mit dem Parametrischen Modell gefittet. In Fitbereichen mit flexiblem Start- und festem Endpunkt wurden Probendicke D_{fit} und E-Modul E_{fit} berechnet. Als Folge der zunehmenden Reibung ergibt sich ein systematisches Unterschätzen der ermittelten Probendicke von bis zu 16%. Im Gegensatz dazu wird der berechnete E-Modul bis zu 6% überschätzt. Die nominellen Werte der Probendicke bzw. des E-Moduls sind als gestrichelte Linien eingezeichnet.

Zusammenfassend kann der Einfluß der Reibung auf Auswertungsfehler durch das Parametrische Modell bezüglich des Elastizitätsmoduls als vergleichsweise gering eingestuft werden. Da die maximale Abweichung bereits bei geringer Reibung eintritt, liegt hier ein eher systematisches Überschätzen vor. Der prozentuale Fehler und damit der Einfluß auf die Auswertung ist im Fall der berechneten Probendicke deutlich stärker. Daher ist die Möglichkeit einer alternativen Dickenbestimmung der Probe über die klassische Auswertung der Kraftkurven mittels Hertzmodell von großer Bedeutung und wird in Kapitel 6 eingehend diskutiert.

5.4 Einfluß von inhomogenen Proben

In allen bisherigen Simulationen wurde stets eine homogene Probe postuliert, was in der praktischen Anwendung jedoch nur selten auftreten wird. So sind z.B. lebende Zellen äußerst komplex organisierte Ansammlungen von Organellen und daher höchst inhomogene Proben. Speziell das Cytoskelett, welches die Zelle als dreidimensionales Netzwerk durchzieht und im wesentlichen für deren mechanische Eigenschaften verantwortlich ist, ist auf der für AFM-Messungen empfindlichen Größenskala hierarchisch aufgebaut und ungleichmäßig über das Zellvolumen verteilt. Deshalb ist es wichtig den Einfluß von Inhomogenitäten in der Probe auf eine Auswertung mit dem Parametrischen Modell zu untersuchen. Im einfachsten Ansatz, der mit einer axialsymmetrischen Simulation verfolgt werden kann, wurden daher Proben mit Schichten unterschiedlicher Elastizität modelliert. Der Schwerpunkt lag dabei auf Proben, welche mit zunehmender Tiefe immer härter wurden; zum Vergleich wurde jedoch auch der Fall einer harten Oberflächenschicht simuliert.

5.4.1 Weiche Oberflächenschicht

Eine mit zunehmender Tiefe härter werdende Probe wurde durch die folgende Simulation mit der AFM-Spitze als Stempel realisiert: die Probe mit einer Dicke von 810 nm wurde in zwei bzw. drei gleich dicke Schichten von jeweils 405 nm bzw. 270 nm unterteilt, wie in Abb. 5.4.1 skizziert. Im Material der Oberflächenschicht wurden wieder die Standardeigenschaften ($E_{\text{FEM}} = 20 \text{ kPa}$ mit $C_1 = 3,32 \text{ kPa}$, $C_2 = 10 \text{ Pa}$, $K = 200 \text{ MPa}$) gewählt, während in den darunterliegenden Schichten der Elastizitätsmodul erhöht wurde. Hierbei wurde jedoch sowohl das Verhältnis C_1/C_2 als auch $(C_1+C_2)/K$, d.h. nach (2) und (10) die Poissonzahl von $\nu = 0,5$, beibehalten. Die nun diskutierten Kraftkurven wurden an Proben mit den folgenden Elastizitätsmoduln simuliert: zunächst wurde eine Doppelschicht mit jeweils 20 kPa simuliert; sie stellt also als vergleichende Kontrollsimulation eine homogene Probe dar (kurz bezeichnet als 1:1⁴). Eine weitere Doppelschicht wurde mit $E = 40 \text{ kPa}$ in der Bodenschicht simuliert (1:2). Die beiden Dreifachschichten hatten schließlich zusätzliche Schichten mit einem E-Modul von 40 kPa und 80 kPa (1:2:4) bzw. 80 kPa und 200 kPa (1:4:10).

⁴ Zur Identifikation werden die Kraftkurven im folgenden mit dem Verhältnis der Elastizitätsmoduln der verschiedenen Schichten bezeichnet, in diesem Fall also 1:1.

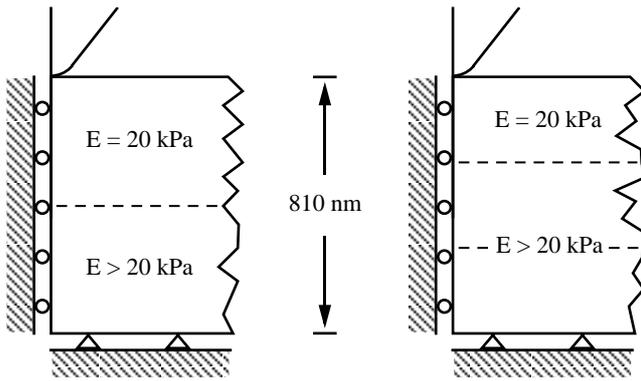


Abb. 5.4.1: Schemazeichnung der simulierten Proben, die in zwei bzw. drei gleich dicke Schichten unterteilt wurden. Während die Eigenschaften der Oberflächenschicht mit $E = 20 \text{ kPa}$ stets der Standardprobe entsprachen, wurden die Schichten nach unten immer härter.

Mit diesen Vorgaben wurden nun Kraftkurven simuliert, die anschließend mit dem Parametrischen Modell ausgewertet wurden. Wie in Kapitel 5.1 wurde das Ende des Fitbereichs variiert, während der Startpunkt konstant bei einer Eindrückung $\delta = 0 \text{ nm}$, also dem Kontaktpunkt, festgehalten wurde. Die beiden gefitteten Parameter Probendicke D_{fit} und Elastizitätsmodul E_{fit} sind in Abb. 5.4.2 gegen das Ende des Fitbereichs aufgetragen. Das zum Vergleich aufgetragene Ergebnis der homogenen Probe (1:1) zeigt lediglich kleine Schwankungen um die nominellen Werte, wie es entsprechend Kapitel 5.1 zu erwarten war.

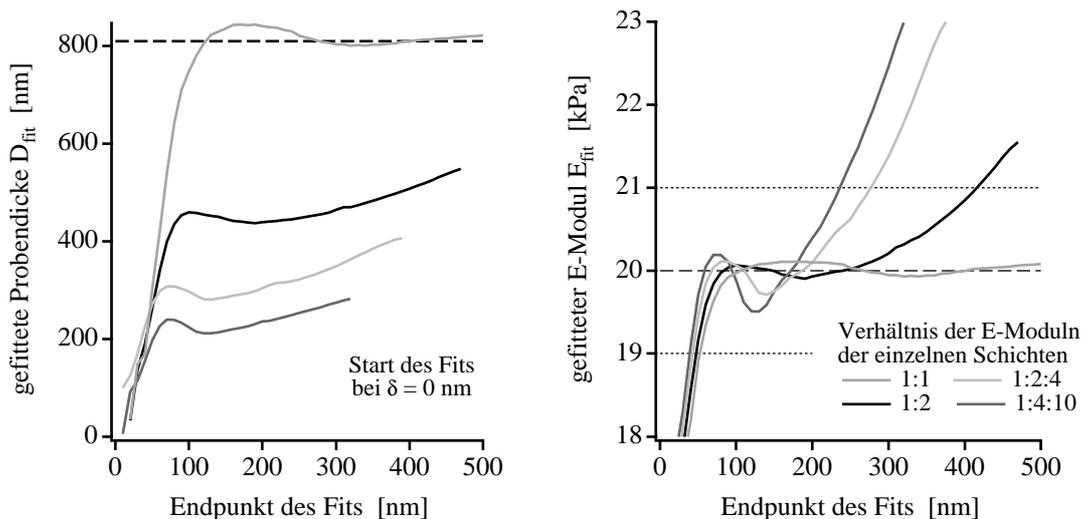


Abb. 5.4.2: Vier Kraftkurven, die auf Proben simuliert wurden, welche aus zwei bzw. drei nach unten härter werdenden Schichten bestanden, wurden mit dem Parametrischen Modell gefittet. Aus den verschiedenen Fitbereichen mit festem Start- und flexiblem Endpunkt wurden die Probendicke D_{fit} und der Elastizitätsmodul E_{fit} berechnet und gegen den Endpunkt des Fitbereichs aufgetragen. Die nominellen Werte der Gesamtdicke der Probe und des E-Moduls der Oberflächenschicht sind als gestrichelte Linie eingezeichnet, eine Abweichung des E-Moduls von 5% zusätzlich als gepunktete Linie. Während im Fall der homogenen Probe (1:1) nur geringe Abweichungen auftreten, nimmt die berechnete Probendicke bei den geschichteten Proben drastisch ab. Der berechnete E-Modul fluktuiert für Fitbereiche kleiner Eindrückungen um seinen nominellen Wert, bevor er anschließend deutlich ansteigt.

Die Auswertung der inhomogenen Proben zeigt dagegen ein unterschiedliches Verhalten in den berechneten Probendicken und Elastizitätsmoduln. Hier führen die härteren Schichten zu einer drastischen Reduktion der berechneten Probendicke D_{fit} . Eine entsprechende Reduktion von D_{fit} ist zu erwarten, wenn in einem Grenzübergang eine Zwischenschicht unendlich hart, also

effektiv zu einem neuen Substrat, wird. Überraschend ist aber, daß sich bereits im Fall der Doppelschicht mit 40 kPa (1:2) die gefittete Probendicke auf etwa 60% reduziert. Auch im Fall der Dreifachschichten zeigt die Auswertung der Probendicke, daß das Parametrische Modell relativ gut die Dicke der homogenen Oberflächenschicht berechnet, nicht jedoch die Gesamtdicke der Probe. Dies ist selbst dann der Fall, wenn sich die Elastizitätsmoduln der verschiedenen Schichten in der gleichen Größenordnung bewegen (1:2:4) und sich damit in der Weichheit deutlichst vom darunterliegenden harten Substrat unterscheiden. Während die berechneten Probendicken bei einem Fit im Bereich größerer Eindrückungen nur geringfügig anwachsen, zeigen die berechneten Elastizitätsmoduln ein deutlich anderes Verhalten. Bereits ab einer Eindrückung von etwa 50 nm (dies entspräche einer normierten Eindrückung von 0,06) liegen alle Graphen innerhalb des 5%-Fehlerintervalls und fluktuieren zunächst um den nominellen Wert der Oberflächenschicht von $E_{FEM} = 20 \text{ kPa}$. Erst wenn als Ende des Fitbereichs größere Eindrückungen verwendet werden, nimmt die Steigung der Graphen deutlich zu, falls die Dicke der Oberflächenschicht kleiner oder der E-Modul der unteren Schicht größer wird.

5.4.2 Harte Oberflächenschicht

Der umgekehrte Fall, nämlich eine geschichtete Probe mit harter Oberflächenschicht, wurde mit denselben Vorgaben für die Materialkonstanten wie im vorigen Abschnitt simuliert. Wie in Abb. 5.4.3 skizziert, betrug die Gesamtdicke der Probe wieder 810 nm, die Dicke der harten Oberflächenschicht 270 nm. Der Oberflächenschicht wurde ein Elastizitätsmodul von $E_{FEM} = 80 \text{ kPa}$ zugewiesen, der unteren Lage der E-Modul und die Eigenschaften der Standardprobe mit $E_{FEM} = 20 \text{ kPa}$.

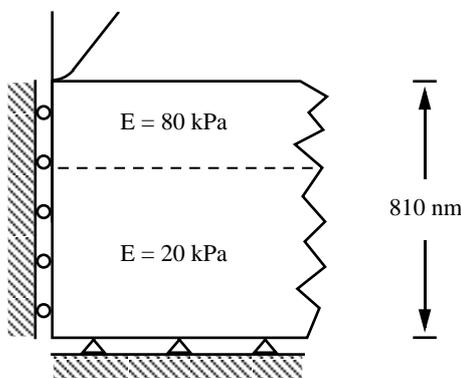


Abb. 5.4.3: Schemazeichnung der simulierten Proben mit harter Oberflächenschicht. Die Eigenschaften der unteren Schicht entsprach mit $E = 20 \text{ kPa}$ der Standardprobe.

Die an dieser Probe simulierte Kraftkurve wurde wieder in einem flexiblen Fitbereich ausgewertet. Neben flexiblem Start- bei festem Endpunkt wurde diesmal auch mit einem Fitbereich konstanter Länge, in diesem Fall 100 nm, ausgewertet; hier wurde der gesamte Fitbereich sukzessive zu größeren Eindrückungen verschoben. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abb. 5.4.4 zu sehen. Im Fall des 100 nm-Fitbereichs (Abb. 5.4.4a, b) lassen sich deutlich zwei Bereiche unterscheiden, in denen die beiden Schichten zum Ausdruck kommen. Die gefittete Filmdicke entspricht bei großen Eindrückungen sehr gut dem nominellen Wert der Gesamtdicke der Probe, während bei kleinen Eindrückungen die Probe viel zu dick erscheint. Der gefittete Elastizitätsmodul bewegt sich je nach Eindrückung zwischen den nominellen Werten der beiden Schichten. Bemerkenswert ist hierbei der Höcker im Graphen (Mitte des

Fitbereichs bei einer Eindrückung von $\delta = 255$ nm). Er deutet den Übergang von der harten Oberflächenschicht zum weichen Untergrund an, der bei einer Tiefe von 270 nm erfolgt. Wird in der Auswertung das Ende des Fits fixiert (Abb. 5.4.4c, d), in diesem Fall bei einer relativ großen Eindrückung von 615 nm, so wird die Probendicke ebenfalls geringfügig überschätzt, solange kleine Eindrückungen in den Fit mit einbezogen werden. Ein entsprechendes Verhalten zeigt der gefittete Elastizitätsmodul; auch hier äußert sich der Einfluß der Oberflächenschicht, wenn kleine Eindrückungen in den Fit eingeschlossen werden. Je weiter sich aber der Startpunkt des Fitbereichs zu großen Eindrückungen verschiebt, desto mehr dominieren die elastischen Eigenschaften der tiefen Schicht.

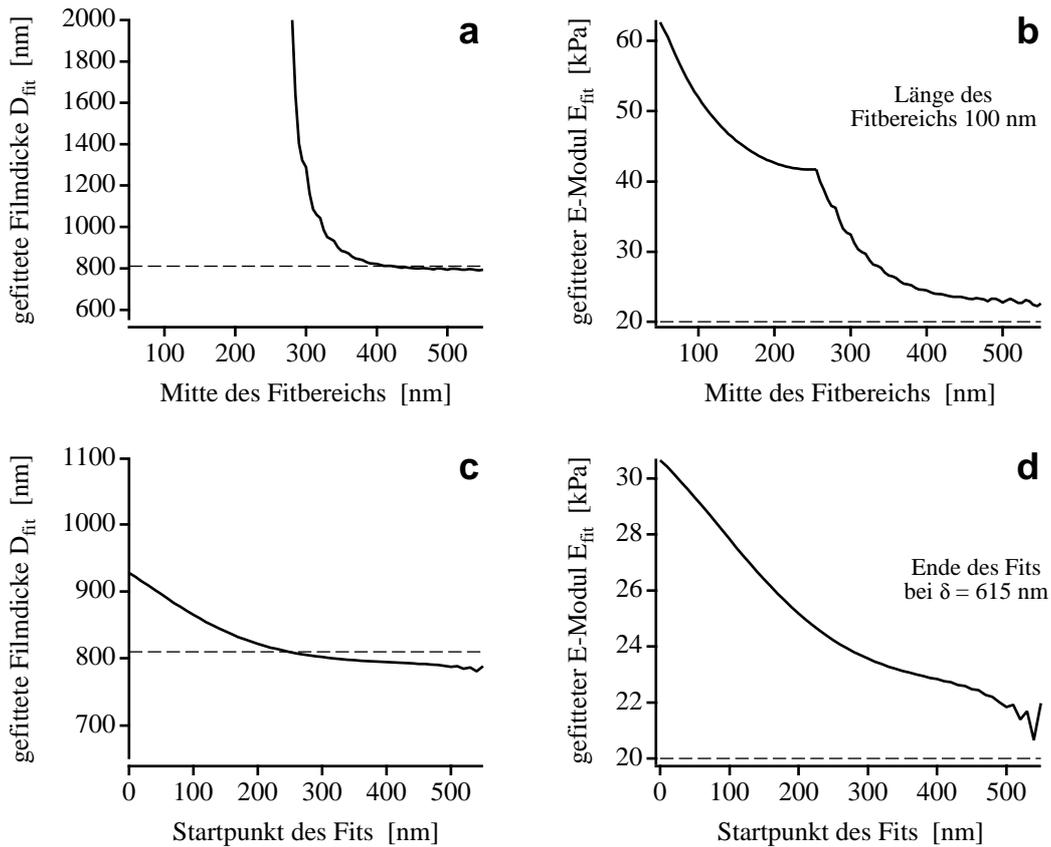


Abb. 5.4.4: Eine Kraftkurve, simuliert auf einer Probe mit harter Oberflächenschicht, wurde mit dem Parametrischen Modell gefittet. Zur Berechnung der Probendicke D_{fit} und des Elastizitätsmoduls E_{fit} wurden Fitbereiche mit einer konstanten Länge von 100 nm (a, b) bzw. mit festem Start- und flexiblem Endpunkt (c, d) verwendet. Die nominellen Werte der Gesamtdicke der Probe und des E-Moduls der Tiefenschicht sind als gestrichelte Linie eingezeichnet. Die harte Oberflächenschicht führt bei der Berechnung der Probendicke zu einem Überschätzen von D_{fit} , im Fall des E-Moduls nähert sich E_{fit} bei einem Fit im Bereich zunehmender Eindrückung dem Wert der weichen Tiefenschicht an.

5.5 Schlußfolgerungen

In der Analyse der simulierten Kraftkurven wurde deutlich, daß die Variationen der Randbedingungen eine Vielzahl von Mustern in den Ergebnissen hervorrufen, welche aufgrund der verwendeten idealisierten Proben noch entsprechend einfach zu interpretieren waren. Im Experiment ist jedoch eine komplexere Probenzusammensetzung und somit eine Überlagerung der diskutierten Muster zu erwarten. Die richtige Interpretation wird dadurch deutlich erschwert werden.

Anhand der ausgewerteten Kraftkurven in den Abbildungen 5.4.2 und 5.4.4 ergaben sich charakteristische Hinweise, die beispielsweise eine inhomogene Probe deutlich von homogenen Proben (Abb. 5.1.2) unterscheiden. Eine Variation des Fitbereichs über große Eindrückungsbereiche läßt am berechneten Elastizitätsmodul erkennen, ob dieser wie im Fall einer homogenen Probe nur kleinen Schwankungen unterliegt, oder aber wie im Fall der geschichteten Proben mit zunehmender Eindrückung ansteigt (weich auf hart) bzw. abfällt (hart auf weich). Entsprechend läßt auch die berechnete Probendicke erkennen, ob es sich um ein kleines Pendeln um einen Mittelwert oder aber um deutlich eindrückungsabhängige Ergebnisse im Fall inhomogener Proben handelt. Bietet sich bei einer AFM-Messung zudem die Möglichkeit, als Bezugshöhe das Substrat selbst in die Messung einzuschließen, so kann zusätzlich durch die Messung von Höhendifferenzen in der klassischen Auswertung mittels Hertzmodell die Probendicke unabhängig bestimmt werden. Ein Vergleich dieser beiden Methoden wird in Kapitel 6.1 aufgegriffen und diskutiert.

Die Wahl einiger in der Simulation verwendeter Randbedingungen, wie z.B. der vernachlässigten Reibung oder auch der perfekten Adhäsion der Probe an das Substrat, kann sicherlich kontrovers diskutiert werden. Während eine quantitative Messung des Reibungskoeffizienten momentan nicht möglich erscheint und deshalb der einfache reibungsfreie Grenzfall gewählt wurde, ist die Simulation der an das Substrat gebundenen Probe zumindest für den Fall eines Polymergels plausibel: z.B. ist es möglich, Gelproben mittels AFM im Kontaktmodus abzubilden. Aufgrund der hierbei auftretenden vergleichsweise großen Lateralkräfte [95, 96], sind dazu zweifelsohne gut adhärierte Proben nötig. Außerdem wird beispielsweise in der Kraftspektroskopie unspezifische Adhäsion gezielt dafür ausgenutzt, um einzelne Polymerstränge an das Substrat zu binden [10].

Im Fall lebender Zellen ist die Situation etwas anders. Diese sind normalerweise nicht über die gesamte Unterseite in direktem Kontakt mit dem Substrat, sondern lediglich an einzelnen sogenannten Fokalkontakten (*focal adhesions*) oder Adhäsions-Plaques [1, 97]. Da der Bruchteil dieser Kontaktfläche jedoch zwischen verschiedenen Zelltypen deutlich variieren kann [98], würde selbst die Simulation einer nur teilweise substratgebundenen Probe, im Versuch eine lebende Zelle zu modellieren, lediglich einen Kompromiß darstellen.

Auch wenn in diesem Kapitel nur einige Aspekte der experimentellen Situationen mittels Simulation erfaßt werden konnten, war dies für die folgende Datenanalyse eine dringend notwendige Charakterisierung des Parametrischen Modells, um dessen Auswertungsverhalten kennenzulernen und etwaige auftretende Fehler abschätzen zu können.

6 Experimentelle Anwendung - Hertzmodell und Parametrisches Modell im Vergleich

Nach der Charakterisierung an simulierten Kraftkurven soll das Parametrische Modell nun an experimentellen Daten angewendet werden. Dies geschieht anhand zweier verschiedener Proben: Zunächst wird die Untersuchung dünner Keile aus Gelatine diskutiert, die sich als Modellsystem für dünne weiche Proben bereits bewährt haben [34, 36, 42]. Derartige Gelatinekeile besitzen Elastizitätsmoduln und Dicken, wie sie auch in den Randbereichen lebender Zellen zu finden sind. Zur Anwendung des Parametrischen Modells an lebenden Zellen wurden MTLn3-Zellen ausgewählt, da diese besonders ausgedehnte flache Randbereiche, sogenannte Lamellipodien besitzen. Die erzielten Ergebnisse des Parametrischen Modells werden jeweils mit der Auswertung des Hertzmodells verglichen⁵.

6.1 Gelatinekeile als Modellsystem flacher Zellen

Gelatinekeile können als äußerst weiche und dünne Proben präpariert werden und dienen somit als Modellsysteme für die flachen Randbereiche von Zellen. Dicke und E-Modul von dehydrierten Gelatinekeilen können durch die schrittweise Zugabe von Wasser eingestellt werden. Die Zunahme des Volumens beim Aufquellen des Gels geht dabei mit einem Weicherwerden der Probe einher. Ein Beispiel eines eingetrockneten Gelatinekeils zeigt Abb. 6.1.1. Deutlich sind die gleichmäßig ansteigende Probe und die ebene Fläche des Substrates zu erkennen.

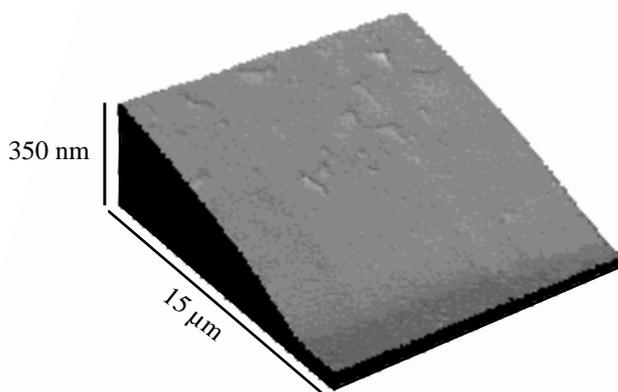


Abb. 6.1.1: AFM-Aufnahme eines dehydrierten Gelatinekeils im Kontaktmodus. Vorne rechts befindet sich das flache Substrat. Durch die 3D-Rekonstruktion ist zu sehen, daß der keilförmige Anstieg gleichmäßig über große Bereiche der Probe verläuft.

Der Quellprozeß der Gelatineprobe wurde mit zwei Methoden beobachtet: Zum einen durch die Aufnahme von Force-Maps, also einem Feld von Kraftkurven, das die Berechnung der Probenhöhe und des E-Moduls im Rahmen des jeweiligen Modells ermöglicht⁶. Zum anderen

⁵ Die Probenpräparation bzw. Zellkultur ist in Anhang D bzw. E beschrieben. Alle AFM-Experimente wurden mit einem Bioscope (Digital Instruments) durchgeführt.

⁶ Die Federkonstante des Cantilevers betrug 11 mN/m. Es wurden 32 Kraftkurven pro Zeile mit einer Länge von 1,1 µm und einer Scanrate von 4,9 Hz aufgenommen. Die Maximalauslenkung des Cantilevers beim Durchfahren der Kraftkurven wurde auf 2,6 nN eingestellt.

wurde zwischen den Force-Maps jeweils eine Kontrollmessung im Kontaktmodus durchgeführt, wodurch man Höhenprofile bei einer konstanten Auflagekraft erhält⁷.

6.1.1 Überschätzen des Elastizitätsmoduls im Experiment

Bei einer Auswertung der Force-Maps mit dem Hertzmodell ist der berechnete Elastizitätsmodul stark von dem gewählten Fitbereich abhängig, in dem die Kraftkurven ausgewertet wurden. Bei großer Auflagekraft und Eindrückung wird auch der Einfluß des harten Substrates größer. Dieses Verhalten, das in Kapitel 3.2.1 anhand simulierter Kraftkurven diskutiert wurde, ist in Abb. 6.1.2 dargestellt. Bei gleicher Probendicke entsteht bei zunehmender Auflagekraft eine größere Eindrückung und somit ein wachsender Einfluß des harten Substrats, der berechnete E-Modul wird größer und die Probe erscheint härter. Bleibt die Auflagekraft konstant, so führt eine abnehmende Probendicke ebenfalls zu einer scheinbar härter werdenden Probe, also zu einem Überschätzen des E-Moduls. Die Berechnung von Probenhöhe und E-Modul wurde in drei typischen Fitbereichen durchgeführt: bei Auflagekräften von 0,22 bis 0,55 nN, 0,33 bis 0,88 nN und 0,55 bis 1,32 nN⁸. Um den groben Verlauf der Meßpunkte zu verdeutlichen, wurden diese zusätzlich stark geglättet und als durchgezogene Linie eingezeichnet, wodurch der in Kapitel 3.2.1 diskutierte Effekt sichtbar wird.

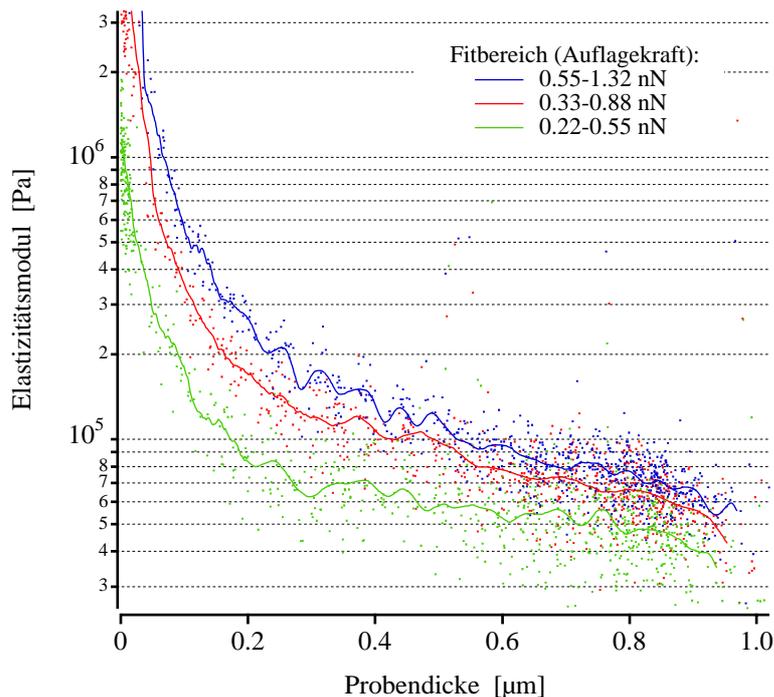


Abb. 6.1.2: Die Force-Map einer weichen Gelatineprobe wurde mit dem Hertzmodell ausgewertet. Um den Verlauf der Daten zu veranschaulichen, sind diese nochmals stark geglättet als durchgezogene Linie eingezeichnet. Der berechnete E-Modul zeigt eine deutliche Abhängigkeit von Fitbereich und Probendicke: bei abnehmender Probendicke bzw. zunehmender Auflagekraft nimmt der Einfluß des harten Substrates zu und die Probe wird scheinbar härter.

Somit zeigen die drei Graphen in Abhängigkeit von dem gewählten Fitbereich - wie erwartet - gegeneinander die diskutierte Verschiebung. Im Gegensatz zur theoretischen Vorhersage konvergieren jedoch die drei Graphen nicht für große Probendicken, sondern unterscheiden sich

⁷ Bei maximaler Nachregelgeschwindigkeit betrug die Scanrate 1 Hz. Die minimierte Auflagekraft, welche nach jeder Abbildung durch die Aufnahme von Kraftkurven ermittelt wurde, war meist kleiner als 1 nN.

⁸ Die Fitbereiche wurden gewöhnlich bei einer Cantileverauslenkung von 20-50 nm, 30-80 nm und 50-120 nm gewählt. Zur besseren Übersicht werden jedoch die Fitbereiche lediglich als Kraftintervalle angegeben.

auch hier noch deutlich in Abhängigkeit von der gewählten Auflagekraft (und damit Eindrückung). Dieser Effekt wird später noch diskutiert.

6.1.2 Vergleich der berechneten Elastizitätsmoduln und Probendicken

Zur Gegenüberstellung beider Modelle wird nun eine einzelne typische Zeile der selben Force-Map betrachtet, ausgewertet ist sie in Abb. 6.1.3 dargestellt. Der Elastizitätsmodul wurde sowohl mit dem Hertzmodell als auch mit dem Parametrischen Modell berechnet und ist gegen die laterale Position auf der Probe aufgetragen. Der Verlauf der Probenhöhe ist durch das Höhenprofil, welches im Kontaktmodus an der selben Stelle der Probe aufgenommen wurde, zu sehen. Die Auswertung mittels Hertzmodell zeigt die bereits diskutierte Aufspaltung der Graphen in Abhängigkeit vom gewählten Fitbereich. Beim Parametrischen Modell fällt, wie

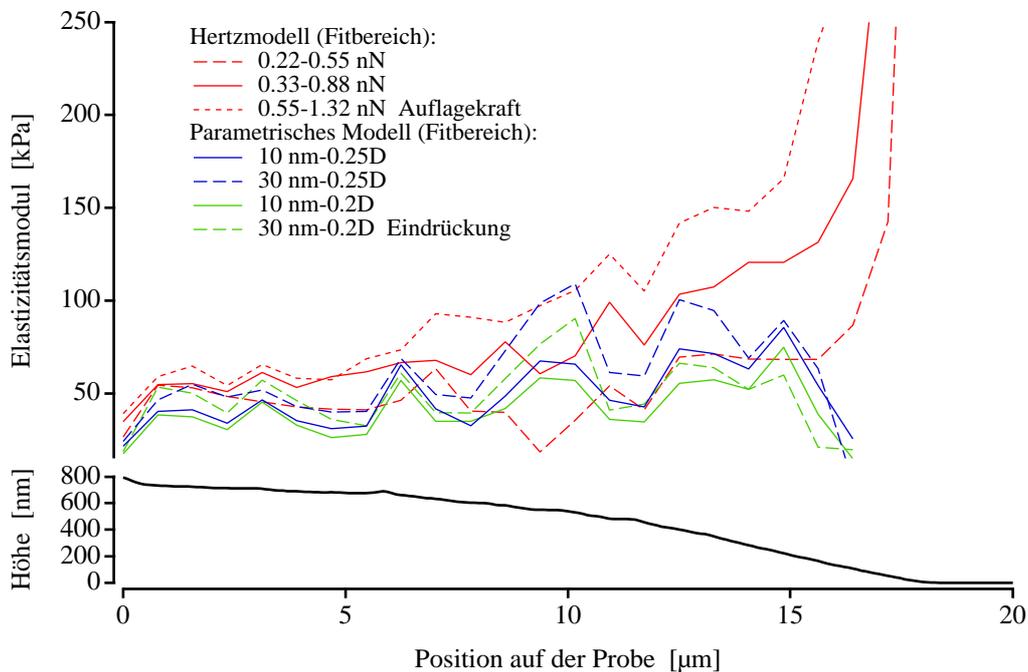


Abb. 6.1.3: Mittels Hertzmodell und Parametrischem Modell ausgewerteter E-Modul einer typischen Force-Map-Zeile als Funktion der lateralen Position auf der Probe. Das im Kontaktmodus aufgenommene Höhenprofil gibt die Form des Gelatinekeils wieder. Die Abhängigkeit des berechneten E-Moduls von der Probendicke ist im Falle des Parametrischen Modells deutlich geringer ausgeprägt als beim Hertzmodell. Unabhängig vom verwendeten Modell steigt der berechnete E-Modul jedoch an, wenn der Fitbereich zu größeren Eindrückungen (d.h. Auflagekraft im Fall des Hertzmodells) verschoben wird.

erwartet, der berechnete E-Modul überwiegend kleiner aus. Aufgrund der hier berücksichtigten Probendicke und Spitzengeometrie unterbleibt ein Überschätzen des E-Moduls. Eine leichte Zunahme des E-Moduls mit abnehmender Probendicke sowie eine geringe Abhängigkeit vom Fitbereich, und zwar eine Zunahme des E-Moduls mit wachsender Eindrückung, ist aber auch weiterhin zu erkennen. Der Fitbereich im Parametrischen Modell wurde zum einen variiert um mögliche Abweichungen des Spitzenradius vom nominellen Wert zu berücksichtigen (Start des

Fits bei 10 bzw. 30 nm), zum anderen wurde das Fitende variiert, es wurde auf eine Eindrückung von 20% bzw. 25% der mittels Hertzmodell bestimmten Probendicke gelegt⁹. Die Dicke der Probe, also deren Höhenprofil, wurde mittels Force-Mapping und anschließender Auswertung durch das Hertzmodell bzw. das Parametrische Modell bestimmt, zusätzlich aber auch im Kontaktmodus. Im Falle des Hertzmodells ist die berechnete Probendicke nahezu unabhängig vom gewählten Fitbereich. Wie in Abb. 6.1.4 dargestellt unterscheiden sich die drei Profile des Hertzmodells nur geringfügig bei einer Probenposition von etwa 10 μm . Da das Höhenprofil aus den berechneten Kontaktpunkten der Kraftkurven konstruiert wurde, sollte es identisch zur Oberfläche der unbelasteten Probe sein. Die Kontaktmodusaufnahme wurde bei einer Auflagekraft von etwa 0,93 nN aufgenommen, wodurch die weiche Probe beim Abrastern durch die AFM-Spitze zusammengepreßt wurde. Folglich ist die gemessene Probendicke etwas niedriger, als in der Auswertung durch das Hertzmodell. Das dargestellte Höhenprofil ist aus acht benachbarten Zeilen gemittelt, die auf der Position der Force-Map-Zeile aufgenommen wurden. Wird die Analyse der Kraftkurven mit dem Parametrischen Modell durchgeführt, so ist die Keilform der Probe immer noch erkennbar, die berechnete Probendicke ist jedoch im Vergleich zu den beiden anderen Methoden nur noch knapp halb so dick, wird also drastisch unterschätzt. Wird der Startpunkt des Fitbereichs variiert, so treten bei etwa 30% der Kraftkurven starke Schwankungen in der berechneten Probendicke auf.

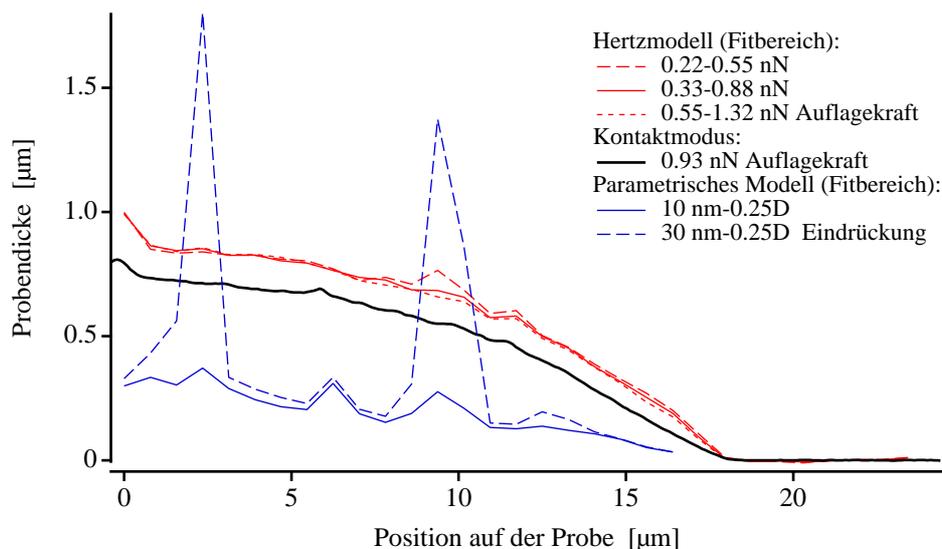


Abb. 6.1.4: Höhenprofile des Gelatinekeils, die durch drei verschiedene Methoden ermittelt wurden: Auswertung von Kraftkurven in verschiedenen Fitbereichen mittels Hertzmodell (rot) bzw. Parametrischem Modell (blau). Nach der Abbildung der Probe im Kontaktmodus (schwarz) wurde die Auflagekraft durch die Aufnahme von Kraftkurven bestimmt.

Die Auswertung der Kraftkurven mit dem Parametrischen Modell hat eine massiv unterschätzte Probendicke sowie einen bei ansteigender Eindrückung zunehmenden Elastizitätsmodul ergeben. Der Gelatinekeil erscheint somit nicht als die erwartete homogene Probe, vielmehr zeigt v.a. die berechnete Probendicke große Ähnlichkeit mit der Auswertung einer geschichteten, mit der Tiefe härter werdenden Probe (vgl. Kapitel 5.4.1). Die Ergebnisse bedürfen daher weiterer Diskussion.

⁹ Die Rechtfertigung für das Verwenden der mittels Hertzmodell berechneten Probendicke erfolgt später.

Eine mögliche Erklärung liegt in der molekularen Struktur der Gelatine. Diese kommt in der Untersuchung mit dem AFM zum Tragen und könnte die Beobachtungen in der Auswertung erklären. Gelatine ist denaturiertes Kollagen, das Basisprotein im Stütz- und Bindegewebe von Säugetieren. Als Polypeptidkette bildet eine einzelne Kollagenfaser eine linkshändige α -Helix, jeweils drei Fasern lagern sich zu einem rechtshändigen Superhelixstrang zusammen [99]. Im Bestreben denaturierter Kollagenstränge, lokal neue Doppel- und Dreifachhelizes auszubilden, entstehen Bindungsstellen und damit ein dreidimensionales Netzwerk, welches physikalisch in diesen sogenannten Knotenpunkten (*cross-links*) verbunden ist. Eine typische Eigenschaft dieses allgemein als Gel bezeichneten Polymernetzwerks ist das Aufquellen in Lösungsmitteln [100-102]. Bei der Präparation der Gelatineprobe wurde keine gesättigte Lösung verwendet, sondern lediglich die minimal zur Bildung eines Gels nötige Konzentration [103]. Eine mögliche Folge während des Trockenprozesses wäre, daß sich Polymere ablagern können und so die Konzentration der Polymere nach unten anwächst. Aufgrund der unspezifischen Bindung der Polymere in den Knotenpunkten hätte dies eine erhöhte Dichte möglicher Bindungen in der Tiefe zur Folge. Da jedoch die Elastizität primär durch die Dichte der Knotenpunkte bestimmt ist [104], würde sich auch der Elastizitätsmodul mit zunehmender Tiefe erhöhen. Einerseits konnte dieser Elastizitätsgradient bereits nach der Auswertung mittels Hertzmodell in Abb. 6.1.2 vermutet werden, da die Graphen der verschiedenen Fitbereiche auch bei großen Probendicken noch nicht konvergieren. Andererseits war eine Bestätigung erst durch das Parametrische Modell möglich, da hier das im Hertzmodell auftretende dickenbedingte Härteartefakt keinen Einfluß mehr auf die Auswertung hat.

Aber auch beim Parametrischen Modell bleibt ein leichter Anstieg des Elastizitätsmoduls bei gleichzeitiger Dickenabnahme bestehen. Eine mögliche Erklärung dieses Effekts findet sich in der entropischen Natur der Gummielastizität. Im einfachsten Fall kann ein Polymer als Kette aus steifen, gleich langen und wechselwirkungsfreien Segmenten, als sogenannte Gaußsche Kette betrachtet werden. Statistische Überlegungen zeigen, daß das Dehnungsverhalten dieser Kette, also deren elastische Eigenschaften ausschließlich durch die Zahl der möglichen Zustände, die das Polymer einnehmen kann, bestimmt ist. Wird z.B. durch das Strecken des Polymers dessen Konformationsraum und damit die Zahl der möglichen Zustände eingeschränkt, so reduziert sich gleichzeitig die Entropie des Systems. Die daraus resultierende Rückstellkraft des Polymers, eine rein entropische Kraft, versucht das Polymer in einen entropisch günstigeren Zustand zu überführen. Deshalb wird die Gaußsche Kette auch als entropische Feder bezeichnet [43, 105, 106]. Im Fall des Gelatinekeils wird der Konformationsraum der Polymere durch zwei Flächen eingeschränkt: die Grenzfläche zum Lösungsmittel und die Oberfläche des Substrats. Die Kettenlänge der verwendeten Polymere beträgt mehrere hundert Nanometer [42] und liegt somit in der Größenordnung der Probendicke. Die Grenzflächen haben daher erheblichen Einfluß auf die Konformation der eingeschlossenen Polymere und führen zu einem steigenden E-Modul aufgrund der mit abnehmender Probendicke sinkenden Entropie. Die Begrenzung des Volumens führt außerdem erneut zu einer höheren Zahl möglicher Knotenpunkte zwischen den einzelnen Polymeren [107, 108]. Mit der Dichte der Knotenpunkte im Gel steigt aber wiederum auch dessen Elastizitätsmodul an [104].

6.1.3 Ist eine exakte Höhenbestimmung weicher Proben möglich?

Im letzten Kapitel ist deutlich geworden, daß die Bestimmung der Topographie einer weichen Probe im unbelasteten Zustand weiterhin problematisch erscheint. Die aus dem Kontaktmodus resultierenden Höhenprofile geben lediglich eine Mindesthöhe an, da die Probe in Abhängigkeit von E-Modul und Auflagekraft beim Abbilden eingedrückt wird. Die wahre Höhe der Probe wird somit im Bereich der mittels Hertzmodell berechneten Profile liegen. Die Qualität dieser Höhenmessung durch Force-Mapping und anschließender Auswertung mittels Hertzmodell soll nun abgeschätzt werden. Dazu wurde aus dem Höhenprofil des Kontaktmodus und der Berechnung der dabei erfolgten Eindrückung die Topographie der unbelasteten Probe rekonstruiert.

Die Auflagekraft bei der Messung der Probenhöhe im Kontaktmodus betrug etwa 0,93 nN. Damit konnte mit dem Parametrischen Modell berechnet werden, wie tief die AFM-Spitze während des Abrasterns im Kontaktmodus in die Probe eingedrungen ist. Als Funktion der Probendicke und des lokal gemessenen Elastizitätsmoduls ist dies überall dort möglich, wo beim Force-Mapping eine Kraftkurve aufgenommen wurde. Als jeweiliger E-Modul wurde der Mittelwert verwendet, welcher aus zwei Fitbereichen entstand, nämlich ab einer Eindrückung von 10 nm bzw. 30 nm bis zu einer Auflagekraft von 0,93 nN, entsprechend der Auflagekraft unter welcher die Probe abgebildet wurde. Da die tatsächliche Dicke noch nicht bestimmt ist, wurden als jeweilige Probendicke die durch das Hertzmodell ermittelten Werte eingesetzt. Dies ist zwar zu diesem Zeitpunkt nur eine Näherung, aber der verursachte Fehler durch eine falsch angesetzte Probendicke ist äußerst gering wie folgendes Beispiel zeigt:

Wird die Dicke von 800 nm auf 1 μm erhöht, so ändert sich bei einer Probe von 40 kPa die Eindrückung um lediglich 2 nm oder 1,3%, nämlich von 156 nm auf 158 nm. Im Gegensatz dazu erhöht sich bei einer Reduktion im E-Modul auf 30 kPa und einer Dicke von 800 nm die Eindrückung um 29 nm oder 18,6% auf 185 nm! Für die Berechnung der Eindrückung ist somit der Einfluß des E-Moduls im Gegensatz zur Dicke weitaus größer und dessen exakte Berechnung daher von größter Bedeutung.

In Abb. 6.1.5 wurde die berechnete Eindrückung der AFM-Spitze (Graph a) auf die im Kontaktmodus gemessene Höhe (b) addiert. Das daraus resultierende Profil (c) ist noch geringfügig höher, als das mit dem Hertzmodell berechnete Profil (d). Die Differenz der beiden Graphen (c-d) ist im unteren Teil der Abbildung separat dargestellt, ihr Durchschnittswert beträgt 48 nm.

Eine Erklärungsmöglichkeit der entstandenen Höhendifferenz liegt in den in Kapitel 5.3 beschriebenen Reibungseffekten. Die im Parametrischen Modell nicht berücksichtigte Reibung zwischen Probe und AFM-Spitze führt bei gleicher Auflagekraft zu einer geringeren Eindrückung. Graph (c) in Abb. 6.1.5 sollte dementsprechend niedriger verlaufen und die Differenz der Graphen (c-d) geringer ausfallen.

Eine weitere Ursache könnte im folgenden Sachverhalt liegen: Bei der Berechnung der Probendicke durch das Hertzmodell wird zunächst durch einen Fit der Kraftkurve der Kontaktpunkt bestimmt, welcher der Höhe der unbelasteten Probenoberfläche entspricht. Die Geometrie der AFM-Spitze entspricht aber nicht der des Stempels im verwendeten Hertzmodell, der Kontaktpunkt wird im Hertzmodell berechnet, als würde ein Konus in die Probe eindringen. Folglich wird in der ermittelten Probenhöhe aufgrund der stumpfen Form der AFM-Spitze der in Abb. 6.1.6 skizzierte Unterschied Δz als systematischer Fehler eingerechnet. Um diesen

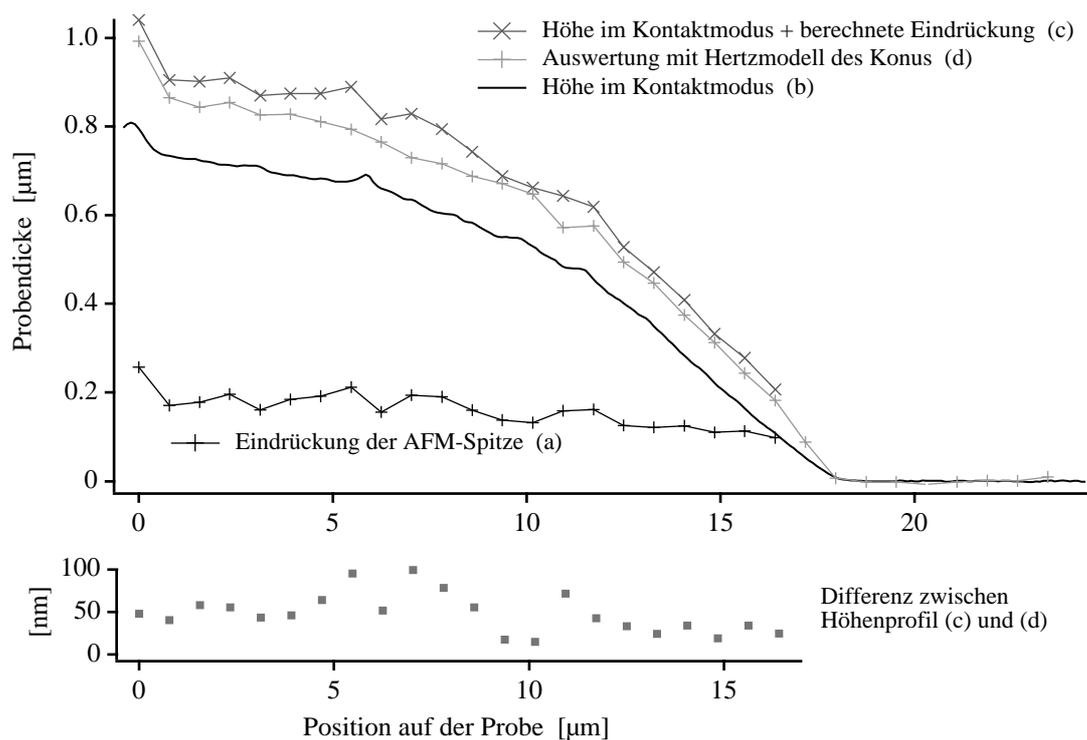


Abb. 6.1.5: Die Eindrückung der AFM-Spitze in die Gelatineprobe während der Abbildung im Kontaktmodus wurde mit dem Parametrischen Modell berechnet (a). Diese Eindrückung wurde auf die im Kontaktmodus ermittelte Höhe (b) addiert, um somit ein korrigiertes Probenprofil zu erhalten (c). Die Auswertung mittels Hertzmodell ergibt eine etwas geringere Höhe (d). Der Durchschnittswert der Differenz beider Profile (c-d) beträgt 48 nm.

Fehler für das diskutierte Experiment genauer zu erfassen, wurde die verwendete AFM-Spitze mit einem Rasterelektronenmikroskop abgebildet¹⁰ und der Spitzenradius zu 62 ± 3 nm bestimmt. Wird diese AFM-Spitze mit einem Konus mit gleichem Öffnungswinkel verglichen, so führt dies zu einem Unterschied von $\Delta z = 46$ nm. Die durchschnittliche Abweichung der Höhenprofile (c) und (d) aus Abb. 6.1.5 ist damit genauso groß, wie der durch die Spitzengeometrie in der Auswertung mit dem Hertzmodell bedingte systematische Fehler.

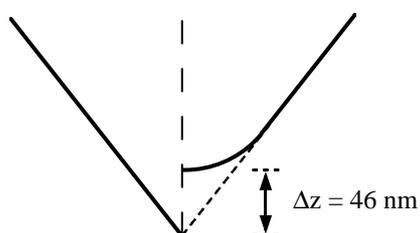


Abb. 6.1.6: Der vertikale Unterschied Δz zwischen einer abgerundeten AFM-Spitze mit Spitzenradius $R = 62$ nm und einem Konus beträgt 46 nm.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß die Auswertung der Kraftkurven mit dem Hertzmodell eine präzise Rekonstruktion der wahren Höhe der unbelasteten Probe ermöglicht. Die wahre Höhe wird dabei geringfügig unterschätzt, der systematische Fehler bewegt sich aber

¹⁰ In Zusammenarbeit mit Armin Kriele (Lehrstuhl Prof. Kotthaus).

lediglich in der Größenordnung des Spitzenradius. Dies rechtfertigt nun auch die Verwendung der durch das Hertzmodell ermittelten Probenhöhe in Abb. 6.1.2. Der Elastizitätsmodul wird deutlich besser mit dem Parametrischen Modell erfaßt, da hier im Gegensatz zum Hertzmodell kein Überschätzen des E-Moduls erfolgt.

6.2 Untersuchung von lebenden Zellen¹¹

Nach den an Gelatine erlangten Erfahrungen wurde für die Anwendung des Parametrischen Modells an lebenden Zellen gezielt eine Zelllinie gesucht, welche die folgenden beiden Eigenschaften aufweist: (i) Die Zellen sollten ausgeprägte flache Bereiche besitzen, mit einer Dicke möglichst niedriger als 1 μm . (ii) Das Cytoskelett in diesen Bereiche sollte schwach ausgeprägt sein, um hier möglichst homogene Materialeigenschaften vorzufinden. Die Wahl fiel schließlich auf eine metastatische Zelllinie, sogenannte MTLn3-Zellen [110]. Diese Zellen reagieren auf die chemische Stimulation durch den Lockstoff EGF (*epidermal growth factor*) innerhalb weniger Minuten mit einer gerichteten Bewegungsreaktion, der sogenannten Chemotaxis. Die Fähigkeit zu wandern ist für Krebszellen von zentraler Bedeutung, erst dadurch werden sie in die Lage der Metastasenbildung versetzt, d.h. sie können sich von ihrem Ursprungsplatz zu anderen Körperstellen ausbreiten [1]. Im Falle der MTLn3-Zellen erfolgt nach der Zugabe von EGF eine Reaktion, die durch das Ausstrecken großflächiger dünner Randbereiche, sogenannter Lamellipodien sichtbar wird [111]. Da diese frisch gebildeten Lamellipodien beim Abbilden mit dem AFM eine vergleichsweise strukturlose Oberfläche zeigten und außerdem eine Dicke von wenigen hundert Nanometern aufweisen, erschienen MTLn3-Zellen als Testsystem für eine Anwendung des Parametrischen Modells gut geeignet.

Eine quer zum Zellrand verlaufende ausgewertete Force-Map-Zeile einer zunächst unbehandelten Zelle zeigt Abb. 6.2.1. Die mit dem Hertzmodell berechnete Höhe der Zelle war nahezu unabhängig vom Fitbereich, das gezeigte Höhenprofil ist daher der Mittelwert der angegebenen drei Fitbereiche. Die Zelle steigt gleichmäßig vom Rand in Richtung Zellkern an. Der entsprechend berechnete Elastizitätsmodul zeigt das bekannte dickeabhängige Verhalten: je höher die Auflagekräfte des angewandten Fitbereichs, um so stärker wird der E-Modul überschätzt, wobei der Abstand der berechneten Werte für die dünner werdende Probe am Zellrand deutlich anwächst. Die Auswertung mittels Parametrischem Modell liefert Fluktuationen im ermittelten Höhenprofil; übersteigt die Dicke der Zelle 1 μm (Probenposition $> 16 \mu\text{m}$), so erzeugt der Fit in etwa 50% der Kraftkurven divergierende Probendicken. Der berechnete Elastizitätsmodul bleibt meistens unter 10 kPa, lediglich bei einer Probenposition um 15 μm steigt der E-Modul auf über 20 kPa an und ist deutlich höher als in der Umgebung. Dieser lokale Anstieg des E-Moduls ist sowohl beim Hertzmodell als auch beim Parametrischen Modell zu beobachten und geht einher mit dem Überschätzen der Probenhöhe durch das Parametrische Modell. Dies deutet gemäß Kapitel 5.4.2 auf eine harte Oberflächenstruktur auf weicher Probe hin. Möglicherweise handelt es sich dabei um sogenannte Streßfasern. Diese wichtigen Bestandteile des Cytoskeletts sind kabelartige, kontraktile Bündel aus Actinfilamenten, die in der Zelle z.B. die Weiterleitung

¹¹ Die AFM-Messungen des beschriebenen Experiments wurden von Dr. C. Rotsch in Zusammenarbeit mit Prof. K. Jacobson durchgeführt [vgl. 67, 109]. Während des Experiments wurden die Zellen stets unter Zellinkubatorbedingungen (37°C, 5% CO₂) gehalten. Die in der Auswertung verwendete Federkonstante des Cantilevers beträgt 10 mN/m.

von Zugkräften ermöglichen [1]. Sie verlaufen teilweise direkt unter der Zellmembran und haben zentrale Bedeutung für die gemessenen mechanischen Eigenschaften einer Zelle [47, 112]. Streßfasern, die am Rand der Zelle zum Großteil parallel zu deren Kante verlaufen (vgl. auch Abb. 7.2.1) [23, 47, 67, 98, 113, 114], sind vermutlich auch hier die Ursache für die härtere Struktur. In den dickeren Teilen der Zelle in Abb. 6.2.1 sollte ein ausgeprägtes Cytoskelett vorliegen, welches u.a. aus einem steifen Polymernetzwerk aus Actinfilamenten besteht. Die inhomogene innere Struktur könnte somit für das Unterschätzen der Probendicke durch das Parametrische Modell verantwortlich sein.

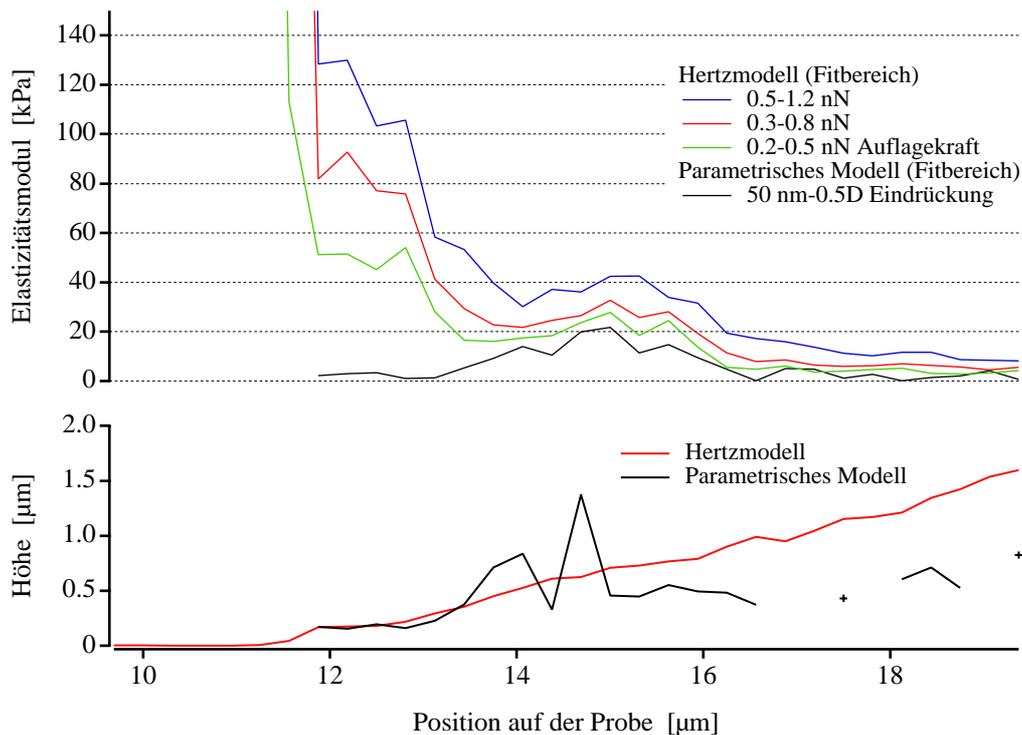


Abb. 6.2.1: Ausgewertete Zeile einer Force-Map, die quer zum Rand einer MTLn3-Zelle aufgenommen wurde. Die Graphen zeigen Elastizitätsmodul und Topographie, wobei die mit dem Hertzmodell berechnete Höhe das Profil und die Lage der Zelle auf dem Substrat veranschaulicht.

Nach dem Einsetzen der durch EGF hervorgerufenen chemotaktischen Reaktion begann sich das Lamellipodium der Zelle großflächig auszudehnen. Während dieses Prozesses wurde die Datenzeile aufgenommen, die ausgewertet in Abb. 6.2.2 dargestellt ist. Sie wurde am selben Ort der Zelle aus Abb. 6.2.1 aufgenommen, wobei im Höhenprofil deutlich das neu gebildete nach links ausgestreckte Lamellipodium sichtbar ist. Die Auswertung durch das Hertzmodell ergibt für diesen Bereich eine Höhe zwischen 200 und 300 nm, der berechnete Elastizitätsmodul zeigt die bekannte fitbereichsabhängige Aufspaltung der Graphen. Die Anwendung des Parametrischen Modells ergibt einen Elastizitätsmodul, der vorwiegend kleiner als 20 kPa ist, die berechneten Probendicken sind meistens einige zehn Nanometer kleiner als bei der Auswertung mit dem Hertzmodell. Bemerkenswert ist dabei das Muster bei einer Probenposition von etwa 14 μm , das schon vorhin beschrieben wurde: an einer relativ harten Stelle erscheint die Zelle im Parametrischen Modell übermäßig dick. Die These, daß es sich hierbei um eine Streßfaser handelt, wird nun auch dadurch unterstützt, daß es sich trotz der hohen Aktivität der Zelle offensichtlich um eine relativ langlebige Struktur in der Zelle handelt.

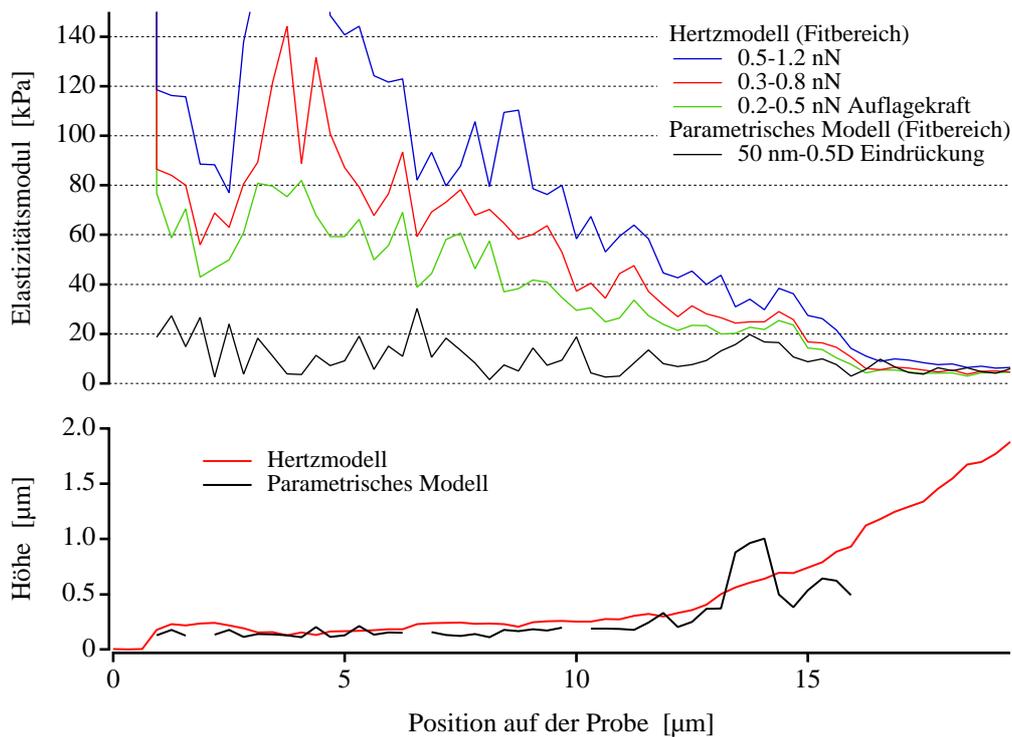


Abb. 6.2.2: Höhenprofile und E-Modul am selben Ort der Zelle aus Abb. 6.2.1, etwa 10 Minuten nach der Zugabe von EGF. Im Höhenprofil ist deutlich das neu gebildete ausgestreckte Lamellipodium zu erkennen, das eine Dicke von etwa 200-300 nm aufweist.

Betrachtet man den berechneten Elastizitätsmodul, so fällt auf, daß alle Graphen des Hertzmodells untereinander, aber auch mit dem Graph des Parametrischen Modells im Bereich des zentralen Zellkörpers konvergieren. Bei einer Dicke der Zelle von über 1,5 μm stimmen die berechneten Werte gut überein. Auch die mit beiden Modellen ermittelten Dicken des ausgestreckten Lamellipodiums unterscheiden sich nur gering. Dies weist darauf hin, daß die schnell gewachsenen Bereiche der Zelle äußerst homogene Materialeigenschaften aufweisen. Da im Lamellipodium das Actinnetzwerk erst neu gebildet werden mußte, konnten offensichtlich noch keine komplizierteren Strukturen wie z.B. Streßfasern aufgebaut werden. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Kontaktbilder, die in der Phase der Lamellipodiumausbreitung aufgenommen wurden [vgl. 67]: diese zeigen ein ausgeprägtes aber gleichzeitig außergewöhnlich unstrukturiertes Lamellipodium; ganz im Gegensatz zu anderen Zelllinien, in denen auch die Randbereiche vom Cytoskelett durchzogen sind.

Geht man davon aus, daß es sich hier beim Lamellipodium um eine Probe mit homogenen Materialeigenschaften handelt, so bedarf die zwischen den beiden Auswertungen entstandene Höhendifferenz weiterer Diskussion. Eine Erklärung wären wiederum Reibungseffekte zwischen Probe und AFM-Spitze. Diese würden dazu führen, daß die berechnete Dicke der Probe zu klein ausfällt. Da Reibung im Parametrischen Modell unberücksichtigt geblieben ist, wäre dies eine mögliche Erklärung für die entstandenen Höhendifferenz. Eine weitere Hypothese, für eine dünne harte Schicht im unteren Bereich der Zelle, die bei der Auswertung mit dem Parametrischen Modell zu einer kleineren Probendicke führen könnte, wäre die folgende: Die Fokalkontakte, an denen Zellen über die extrazelluläre Matrix mit dem Substrat

verbunden sind, nehmen nur einen kleinen Teil der Fläche auf der Zellunterseite ein, der weit unter 20% liegen kann [97, 98]. Die anderen Bereiche besitzen einen deutlich größeren Abstand zum Substrat, der über 50 nm betragen kann und mit Zellmedium gefüllt ist [1]. Da diese Flüssigkeitsschicht von Zellmembran und Substrat nahezu eingeschlossen ist, kann das Medium seitlich vermutlich nur schwer ausströmen, während die Zelle bei der Aufnahme einer Kraftkurve komprimiert wird. Eine einfache Abschätzung (vgl. Anhang F) zeigt, daß die zur Erzeugung des Flüssigkeitsstromes notwendige zusätzliche Kraft in der Messung einen nicht zu vernachlässigenden Beitrag leistet. Somit wäre es möglich, daß das Medium die selben Auswirkungen auf die Datenanalyse besitzt wie eine harte Schicht, was sich ebenfalls in den beiden unterschiedlichen Ergebnissen der berechneten Höhen äußert.

Dies führt zu dem zentralen Ergebnis, daß die beiden Modelle zwei unterschiedliche Größen berechnen: das Hertzmodell berechnet die wahre Höhe der Zelle, also deren Oberfläche im unbelasteten Zustand, das Parametrische Modell hingegen berechnet die Dicke des Lamellipodiums. Übereinstimmende Werte von Höhe und Dicke im vorderen Bereich des Lamellipodiums (Probenposition $\approx 4 \mu\text{m}$) stellen somit einen Hinweis auf einen Fokalkontakt dar. Der Abstand zwischen Zelle und Substrat ist dabei am besten für Gewebekultur-Fibroblasten charakterisiert und beträgt etwa 10-15 nm [1, 115].

Die zweite Hypothese muß sicherlich noch in weiteren Studien näher untersucht werden. Eine mögliche Methode stellt beispielsweise die Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RICM) dar. Hierbei kann der Abstand zwischen einem transparenten Substrat und der Zelle interferometrisch bestimmt werden [116-118]. Da diese wie auch alternative optische Methoden wie z.B. TIRFM¹² die Probe von der Unterseite untersuchen, besteht die Möglichkeit, die optischen Messungen gleichzeitig mit den AFM-Experimenten durchzuführen [122].

6.3 Diskussion

Die wichtigsten Eigenschaften von Hertzmodell und Parametrischem Modell in der Auswertung von Kraftkurven sind komprimiert in Tabelle 6.3.1 zusammengefaßt. Vergleicht man die beiden Methoden zur Auswertung der Kraftkurven, so ist im Fall des berechneten Elastizitätsmoduls eine Verbesserung durch das in dieser Arbeit entwickelte Parametrische Modell erreicht worden. Jetzt ist es möglich, auch von dünnen Proben unverfälschte Elastizitäten zu ermitteln, da das durch hartes Substrat und die Geometrie der AFM-Spitze im Hertzmodell verursachte Härteartefakt beseitigt werden konnte. Anhand der untersuchten MTLn3-Zellen, als äußerst weiche Probe, konnte außerdem gezeigt werden, daß bei Probendicken über $1,5 \mu\text{m}$ und den im AFM üblichen Eindrückungen die ausgewerteten E-Moduln beider Methoden konvergieren. Bei diesen vergleichsweise dicken Proben ist also die Datenanalyse durch das Hertzmodell ohne Qualitätsverlust möglich. Im Fall der berechneten Probendicke ist die Situation anders. Zur Berechnung der Topographie der unbelasteten Probe zeigte sich das Hertzmodell deutlich überlegen. Hier erfolgte ein geringes systematisches Unterschätzen, welches bei den verwendeten AFM-Spitzen etwa in der Größenordnung des Spitzenradius lag. Da die durch das Parametrische Modell berechnete Probendicke äußerst empfindlich inhomogene Materialeigenschaften anzeigt, kann sich, wie im Fall der Zellen gezeigt, aufgrund einer harten Untergrundschicht in der Probe deren eigentliche Dicke von der

¹² TIRFM (*total internal reflection fluorescence microscopy*) [119-121].

wahren Höhe der Probe unterscheiden. Berechnet werden also zwei unterschiedliche Parameter. Bei der Kraftkurvenauswertung durch das Parametrische Modell hat sich der E-Modul im Vergleich zur Probendicke als der deutlich stabilere und unempfindlichere Fitparameter erwiesen. Speziell bei Probendicken von mehr als 1 μm wurde oft ein Divergieren der berechneten Dicken beobachtet. Dieses Verhalten hatte sich bereits in Kapitel 5 im Rahmen der Simulationen angedeutet: bei der Fehlercharakterisierung traten beim E-Modul im Vergleich zur Probendicke meist deutlich kleinere Abweichungen auf.

	Hertzmodell	Parametrisches Modell
Topographie	Bestimmung der Topographie der unbelasteten Probe (Fehler der Höhenbestimmung in der Größenordnung des Spitzenradius).	Dickenbestimmung der <u>homogenen</u> Probe. Abweichung von Topographie dient als Hinweis auf <u>inhomogene</u> Probe. Vorzeichen der Abweichung läßt evtl. Rückschluß auf Art der Inhomogenität zu.
Elastizität	Härteartefakt wegen Geometrie der AFM-Spitze bei kleinen Eindrückungen und Substrateinfluß bei dünnen Proben.	Von Probendicke unabhängiger E-Modul. Bestimmung des Elastizitätsmoduls von weichen Oberflächenschichten.

Tabelle 6.3.1: Gegenüberstellung der wichtigsten Eigenschaften und Möglichkeiten, welche die beiden Modelle zur Auswertung von Kraftkurven zur Verfügung stellen.

Da einerseits durch das Hertzmodell exakte Höhen bestimmt werden, die als Kontrollmessung dienen können, liegt andererseits gerade in der Empfindlichkeit der berechneten Probendicke des Parametrischen Modells dessen Stärke. Das große Potential des Parametrischen Modells besteht deshalb gerade auch im Aufspüren kleinster Inhomogenitäten der Materialeigenschaften. So konnte gezeigt werden, daß die Detektion eines Elastizitätsgradienten selbst bei dünnen Schichten von lediglich wenigen hundert Nanometern Dicke möglich ist. Auf dieser Größenskala wären alternative Untersuchungsmöglichkeiten lediglich durch optische Methoden denkbar.

Im Vergleich mit Gelatinekeilen haben sich die MTLn3-Zellen mit frisch gebildetem Lamellipodium überraschend als das bessere (weil homogenere) Modellsystem erwiesen. Da es sich bei diesen Zellen jedoch um Proben handelt, die sich mitten in einem dynamischen Prozeß befinden, ist die Weiterentwicklung experimenteller Modellsysteme unumgänglich. Nur dann ist es möglich die Grenzen des in dieser Arbeit entwickelten Parametrischen Modells genauer abschätzen zu können. Hier kann beispielsweise bei der Präparation von Gelkeilen die Verwendung chemisch verbundener Polymere von Vorteil sein. Durch die dann chemisch definierten Bindungsstellen können homogenere Proben hergestellt werden. Die Konzentration der Knotenpunkte im Netzwerk und damit auch die Elastizität der Gele kann dann direkt durch die Konzentration der Polymere eingestellt werden.

Im Fall der FEM wurden durch die Ausführung effizienter axialsymmetrischer Simulationen dreidimensionale Aspekte ausgeschlossen. Auch wenn das Kraft-Eindrückungsgesetz theoretisch durch ein zweidimensionales Modell angenähert werden kann (vgl. Kapitel 1.2) bleiben zwei Aspekte unberücksichtigt: zum einen wird sich die Spannungsverteilung im Material, speziell an den Kanten (als Singularitäten) des pyramidenförmigen Stempels von der des Konus unterscheiden. Dieser Einfluß sollte jedoch relativ klein sein; so wurde lediglich über Abweichungen im Bereich weniger Prozent berichtet [40, 90]. Zum anderen ist im AFM der

Cantilever mit einem Neigungswinkel von 12° eingebaut. Dieser wird beim Durchfahren der Kraftkurven nicht kompensiert, das Eindringen der AFM-Spitze erfolgt nicht parallel zu ihrer Symmetrieachse [123]. Erst durch eine dreidimensionale Simulation kann der Einfluß auf die gemessenen Kraftkurven mittels FEM erfaßt werden. In der Praxis sind dazu aber auch Eindrückungsexperimente an geneigten Proben denkbar.

Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Projektion von einem makroskopisch definierten Maß, wie dem Elastizitätsmodul, auf die molekulare Größenskala. Der E-Modul stammt aus der Kontinuumsmechanik und beschreibt per Definition Volumeneigenschaften eines Materials. Bei Elastizitätsmessungen mit dem AFM erfolgt also die Anwendung der Hookeschen Elastizitätstheorie auf einer Skala, in der die Wechselwirkungen zwischen AFM-Spitze und Probe nicht nur durch deren mechano-elastischen Materialeigenschaften bestimmt werden, sondern der Einfluß von Elektrostatik, van der Waals-Kräften und Oberflächeneffekten wie Kapillarkräften und Oberflächenspannung bedeutend wird. Speziell im Falle kleiner Auflagekräfte ist aber die Eindrückung und damit das an der Wechselwirkung beteiligte Volumen im Vergleich zur Kontaktfläche sehr klein. Zusätzlich können neben den genannten Wechselwirkungen auf der molekularen Skala auch entropische Effekte, wie im Fall der Gelatinekeile diskutiert, in Erscheinung treten. Hier wird im Gegensatz zum Kontinuum im Großen der diskrete molekulare Charakter der Proben deutlich. Deshalb unterliegt auch der als Elastizitätsmodul ermittelte Wert dem Einfluß der anderen Wechselwirkungen. Aus diesen Aspekten ergibt sich letztlich ein Skalierungsproblem und es stellt sich die Frage, ob die makroskopische Größe Elastizitätsmodul sinnvoll auf die molekulare Welt übertragbar ist.

Neben der parallelen Untersuchung identischer Proben mit alternativen Methoden der Mikrorheologie [124-126] wäre daher eine makroskopische Untersuchung des Parametrischen Modells äußerst hilfreich, um zunächst an wohl definierten und kontrollierbaren Systemen die Übereinstimmung mit der Simulation zu testen. Der interessante Teil in der Anwendung mit dem AFM, also im Nanokosmos, läge dann gerade in den Abweichungen zur makroskopischen Welt, da hierin all die genannten Wechselwirkungen sichtbar werden würden.

7 Substratabhängigkeit der Adhäsion von Osteoblasten¹³

In der orthopädischen Forschung sind die beiden Hauptziele zur Entwicklung synthetischer Implantate, einerseits die mechanische Funktionalität des Originals zu erhalten und andererseits die biologische Verträglichkeit des Materials mit dem Organismus zu gewährleisten. Das Implantat soll biokompatibel sein. An Knochenimplantate, erwähnt seien beispielsweise künstliche Gelenke, werden enorme biomechanische Anforderungen gestellt. Um diese zu erfüllen, müssen die makroskopischen mechanischen Ansprüche optimal mit den mikroskopischen zellulären Anforderungen an die Grenzfläche zwischen Implantat und umgebendem Gewebe abgestimmt sein. Nur dann kann ein dauerhaftes Einwachsen in den Knochen, die sogenannte Osseointegration, erfolgen [128]. Bis zur Osseointegration laufen äußerst komplexe Kaskaden von intra- wie extrazellulären Prozessen ab, die zum Großteil noch unverstanden sind und kontrovers diskutiert werden [129-131]. Bei Zellen, die in direktem Kontakt mit dem Implantat stehen, muß in jedem Fall ein gutes Anheften an die Oberfläche, Vermehrung sowie das Ausscheiden von Knochenmatrix erfolgen, damit eine anschließende Verkalkung des Kontaktgewebes ermöglicht wird¹⁴ [130]. Alle diese Aspekte hängen nicht nur von der Chemie des Implantats sondern v.a. von dessen Oberflächeneigenschaften wie Topographie, Rauigkeit und Proteinadsorption ab, aber auch z.B. von den chemischen Verfahren der Beschichtung und Sterilisation [133-137].

Für die langfristige Akzeptanz im Organismus ist natürlich der innige Kontakt zwischen Implantat und knochenbildenden Zellen, den sogenannten Osteoblasten, eine Grundvoraussetzung, weshalb die Untersuchung der Implantatoberflächen von zentraler Bedeutung in der Implantatforschung ist. Da die Ergebnisse von Tierversuchen neben ethischen Bedenken nicht ohne weiteres auf den menschlichen Organismus übertragbar sind, wird zunehmend versucht, zentrale Aspekte wie Zellwachstum, Vermehrung und Produktion der Knochenmatrix durch Experimente in Zellkulturen humaner Zelllinien zu untersuchen [129, 131, 138, 139]. Dabei stehen neben mechanischen Experimenten zur Messung der Adhäsionskräfte [140, 141] v.a. bildgebende Methoden zur Untersuchung der Zellmorphologie im Vordergrund [129, 138, 139].

Im folgenden Projekt wurde die Morphologie und Elastizität von Osteoblasten auf verschiedenen Substraten mit dem AFM charakterisiert und zur Beurteilung der Zelladhäsion verwendet. Dazu wurden Zellen, die auf metallischen Substraten (CoCr, Ti und TiV) kultiviert wurden, mit Zellen auf Deckgläsern (Glas) bzw. in Standard-Zellkulturpetrischalen aus Polystyren (PS) verglichen¹⁵. Ziel war es, mit dem AFM eine Methode zu etablieren, mit der das Adhäsionsverhalten auf zellulärer Ebene untersucht werden kann. Durch die Verwendung von Substratmaterialien, die in der Orthopädie als Werkstoffe interessant sind, kann diese Methode neue Einsichten in die Biokompatibilität von Implantatmaterialien gewähren.

¹³ Die Experimente in diesem Kapitel sind in Zusammenarbeit mit S. Dannöhl durchgeführt worden. Das Projekt wurde in Kooperation mit Dr. W. Aicher und Dr. O. Müller von der Orthopädischen Klinik in Tübingen durchgeführt [vgl. 114, 127].

¹⁴ Die frisch exprimierte Knochenmatrix wird als Osteoid bezeichnet und besteht hauptsächlich aus Typ-I-Kollagen. Die Umwandlung in harte Knochenmatrix erfolgt durch das Einlagern kleiner kristalliner Plättchen aus Calciumphosphat, die eine Größe von einigen zehn Nanometern haben [1, 132].

¹⁵ Die Zellkultur der Osteoblasten, sowie die Präparation der Substrate ist im Anhang E beschrieben.

7.1 Charakterisierung der Substrate

Charakteristische AFM-Bilder der verwendeten Substrate sind in Abb. 7.1.1 zu sehen¹⁶. Während die metallbedampften Oberflächen und die Deckgläser eine typische Körnung aufweisen, ist im Fall der Petrischale eine faserartige Oberflächenstruktur sichtbar.

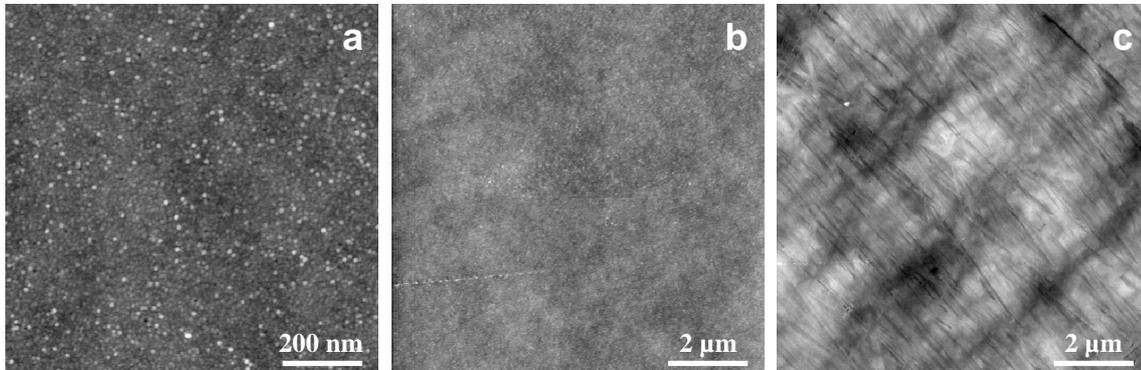


Abb. 7.1.1: Charakteristische Höhenbilder der verwendeten Substrate: metallbedampfte Oberfläche, hier TiV (a, z-Skala: 7 nm), Glasplättchen (b, z-Skala: 5 nm) und Petrischale (c, z-Skala: 40 nm).

Als Maß für die Rauigkeit wurden die Höhenabweichungen von der Hauptebene der Oberfläche $\Delta H(x,y)$ verwendet. Die Rauigkeit $\langle H \rangle$ ist dann gemäß [142] wie folgt definiert:

$$\langle H \rangle = \frac{1}{\Delta x \Delta y} \cdot \int_{y=0}^{\Delta y} \int_{x=0}^{\Delta x} |\Delta H(x,y)| dx dy \quad (26)$$

Die durchschnittlichen Rauigkeiten der verschiedenen Substrate, die sich bei einer Bildgröße von $\Delta x = \Delta y = 10 \mu\text{m}$ ergaben, sind in Abb. 7.1.2 dargestellt. Die Rauigkeit der Petrischalen (PS) war am größten, die der Glasplättchen am kleinsten, die Werte der metallbedampften Oberflächen lagen dazwischen. Bei einer Bewertung der Auswirkungen ist zu beachten, daß die Rauigkeit nach obiger Definition eine Funktion der Bildgröße ist. So hat sich

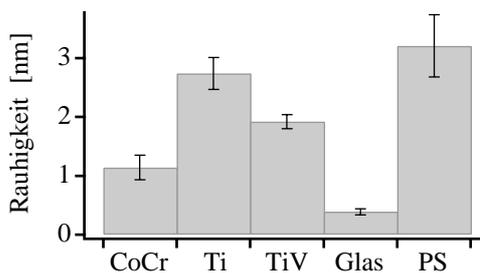


Abb. 7.1.2: Durchschnittliche Rauigkeiten der verschiedenen Substrate bei einer Bildgröße von $10 \mu\text{m}$. Die Rauigkeit wurde aus der Abweichung der Höhe von der Hauptebene der Oberfläche berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen den verschiedenen Proben (6-11 Stück) des jeweiligen Substrates.

die Rauigkeit der Petrischale bei einer Bildgröße von $1 \mu\text{m}$ um 60% verringert, die Rauigkeit der anderen Substrate dagegen um höchstens 20% [vgl. 127]. Für eine quantitative Analyse ist es daher nötig, die Rauigkeiten auf allen Größenskalen zu untersuchen, die für die Zelladhäsion von Bedeutung sind. Die angewandte Methode, Oberflächen metallisch zu bedampfen, hat zu vergleichsweise glatten Oberflächen geführt. So berichten beispielsweise

¹⁶ Alle Substrate wurden an einem Nanoscope IIIa (Digital Instruments) bei gleicher Nachregelgeschwindigkeit mit scharfen Microlevern (Park Scientific, $k_c = 0,1 \text{ N/m}$) an Luft abgebildet.

Larsson et al. [135] bei gleicher Charakterisierung durch das AFM über z.T. bis zu einer Größenordnung größere Rauigkeiten ihrer Implantatmaterialien.

Nach dem Aussäen und Absetzen der Zellen besteht zwischen Zellen und Substrat nicht unbedingt direkter Kontakt, wie folgendes Experiment qualitativ zeigt: das Zellmedium ist eine Lösung verschiedenster Salze, Proteine und Nährstoffe, die teilweise auf der Substratoberfläche adsorbieren. Um dies sichtbar zu machen, wurden die sauberen Substrate nach dem Einbau in das AFM für vier Stunden in Zellmedium inkubiert. Anschließend wurde ein Quadrat mit $2\ \mu\text{m}$ Seitenlänge bei relativ hoher Auflagekraft ($F > 6\ \text{nN}$) und hoher Scanrate mehrmals abgerastert. Wurde der Bildausschnitt nun auf $5\ \mu\text{m}$ vergrößert und extrem vorsichtig abgerastert (Auflagekraft $F < 1\ \text{nN}$, langsame Scanrate), so wurden kleine Wälle sichtbar (Abb. 7.1.3)¹⁷. Diese bestehen aus adsorbierten Bestandteilen des Zellmediums, die durch die AFM-Spitze beim Abrastern des $2\ \mu\text{m}$ -Quadrats auf die Seite geschoben wurden. Solche Wälle waren bei allen Substraten sichtbar und hatten je nach Dicke der adsorbierten Schicht durchschnittliche Höhen von bis zu $80\ \text{nm}$. Eine genauere Analyse des Adsorptionsprozesses erscheint prinzipiell möglich, indem das Volumen der aufgeschobenen Wälle ermittelt wird.

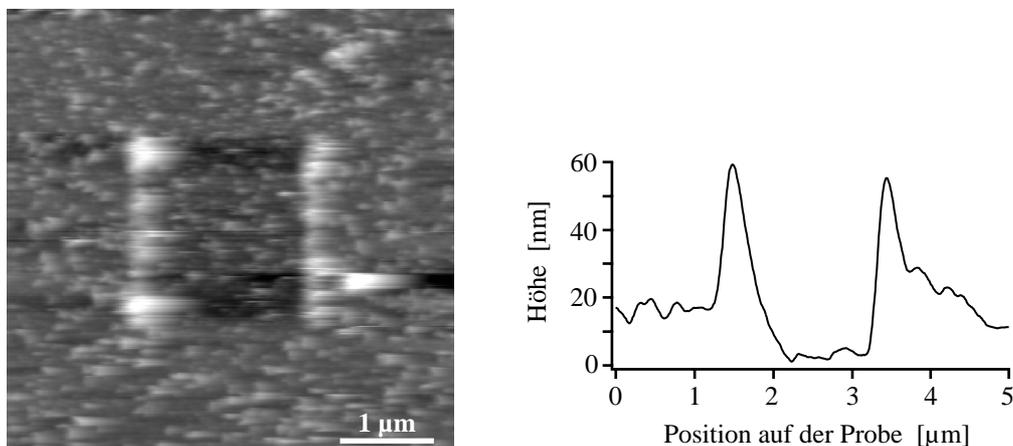


Abb. 7.1.3: Komponenten des Zellmediums sind auf einer CoCr-Oberfläche adsorbiert. Nach mehrmaligem Abrastern eines $2\ \mu\text{m}$ großen Quadrates mit hoher Auflagekraft, werden an dessen Rand kleine Wälle aufgeschoben. Diese werden sichtbar, wenn ein größerer Bildausschnitt vorsichtig abgerastert wird (z-Skala Höhenbild: $130\ \text{nm}$). Das durchschnittliche Höhenprofil (Mittelung aller Zeilen des zentralen Quadrates) zeigt eine maximale Höhendifferenz von über $50\ \text{nm}$.

Der *in vitro* beobachtete Adsorptionsprozess, der grundsätzlich auch *in vivo* auftritt, hängt in großem Maße von den Oberflächeneigenschaften des Substrates ab. Diese bestimmen die Wahrscheinlichkeit eines Proteins auf der Oberfläche zu adsorbieren [130]. Die entstehende Schicht kann Eigenschaften der Substrate abschirmen und somit auch verändern. Das Adhäsionsverhalten von Zellen kann dadurch beeinflusst werden, wenn diese lediglich mit der adsorbierten Schicht wechselwirken. Treten also Unterschiede im Adhäsionsverhalten auf, ist es schwierig zu trennen, ob diese auf unterschiedlichen Substrateigenschaften oder den dadurch hervorgerufenen Veränderungen der adsorbierten Proteinschicht beruhen.

¹⁷ Die Experimente wurden an einem Nanoscope IIIa mit normalen Microlevern ($k_c = 8\ \text{mN/m}$) durchgeführt.

7.2 Morphologie und Elastizität der Osteoblasten

Zur systematischen Untersuchung der Zellmorphologie der Osteoblasten wurden alle Zellen sowohl im Kontaktmodus (bei einer minimierten Auflagekraft von $F < 1 \text{ nN}$) als auch im Force-Mapping-Modus abgebildet¹⁸. Ein typisches Höhenbild eines Osteoblasten ist in Abb. 7.2.1 dargestellt. Deutlich zu sehen ist die lineare Struktur des Cytoskeletts (in diesem Fall die bereits in Kapitel 6.2 beschriebenen Streißfasern), das sich über die gesamte Zelle erstreckt. Verkleinert man den Bildausschnitt, so werden feinere Strukturen auf der Zelloberfläche sichtbar. Ein Auslenkungsbild einer solchen Oberfläche zeigt Abb. 7.2.2. Neben dickeren Bündeln sind auch äußerst feine Filamente zu sehen, welche die Zelloberfläche als feinmaschiges Netzwerk erscheinen lassen. Trotz der extremen Weichheit der Osteoblasten war es noch möglich, Strukturen mit lediglich 50 nm Durchmesser aufzulösen.

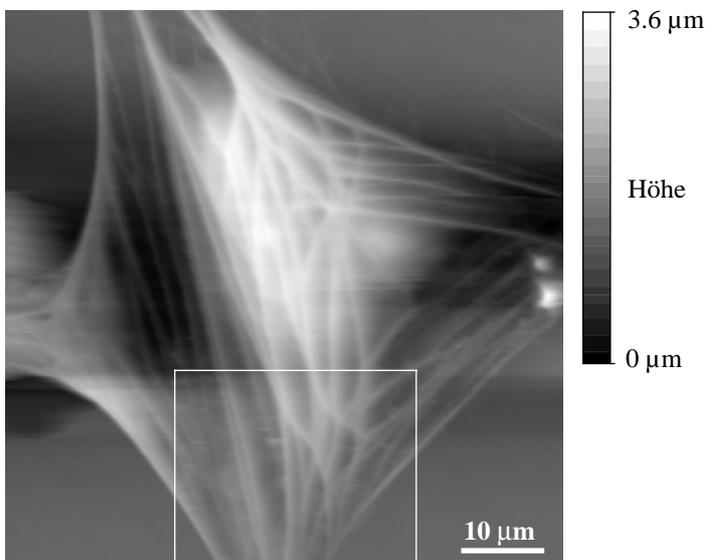


Abb. 7.2.1: Höhenbild eines lebenden Osteoblasten. Deutlich ist die lineare Struktur des steifen Cytoskeletts zu sehen. Am linken Bildrand besteht direkter Kontakt zu einer benachbarten Zelle. Der weiße Kasten umrahmt die Fläche der Force-Map aus Abb. 7.2.3.

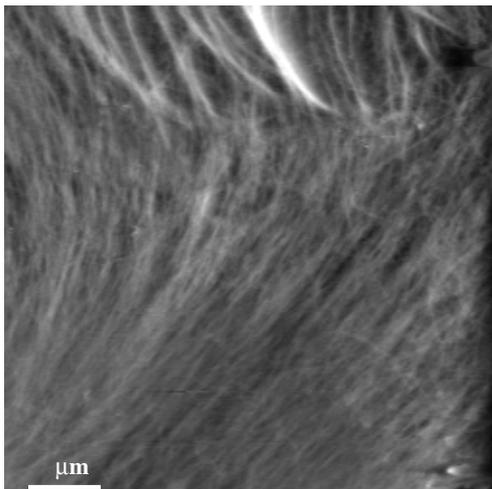


Abb. 7.2.2: Auslenkungsbild der Zelloberfläche eines Osteoblasten (z-Skala: 130 nm). Auf dieser Größenskala erscheint das Cytoskelett als feine netzartige Struktur. Die dünnsten noch erkennbaren Filamente haben einen Durchmesser von etwa 50 nm.

¹⁸ Die Experimente wurden an einem Bioscope mit normalen Microlevern ($k_c = 8 \text{ mN/m}$) unter Zellinkubatorbedingungen (37°C , $5\% \text{ CO}_2$) durchgeführt. Die Scanrate betrug im Force-Mapping-Modus 7,1 Hz bei 32 Kraftkurven pro Zeile bzw. 12 Hz bei 64 Kraftkurven pro Zeile und einer Kraftkurvenlänge von 1-1,6 µm. Die Maximalauslenkung des Cantilevers wurde auf 0,9 nN eingestellt, die Auswertung der Kraftkurven erfolgte mit dem Hertzmodell in einem Fitbereich von 0,24-0,64 nN.

Eine Force-Map, welche auf der Zelle aus Abb. 7.2.1 aufgenommen und mit dem Hertzmodell hinsichtlich Elastizitätsmodul ausgewertet wurde, ist in Abb. 7.2.3 dargestellt. Die im Kontaktmodus abgebildeten Streßfasern erscheinen hier als harte Strukturen, die einen größeren E-Modul aufweisen als die weichen Bereiche dazwischen.

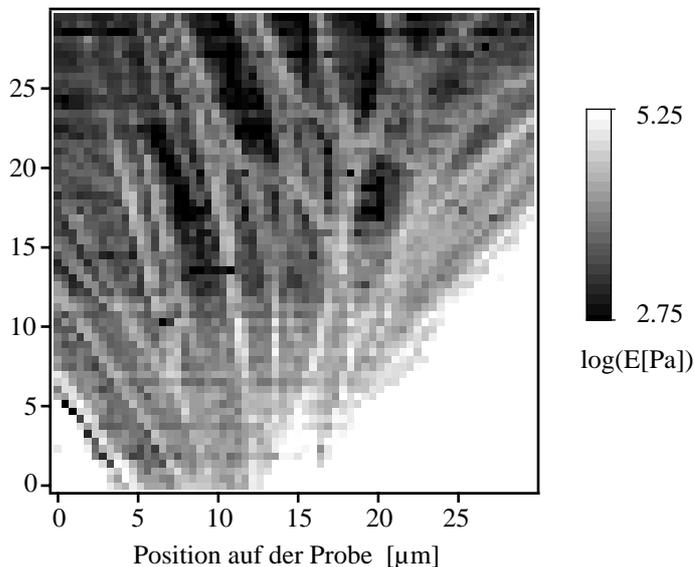


Abb. 7.2.3: Elastizitätsbild der in Abb. 7.2.1 gekennzeichneten Region des Osteoblasten. Der E-Modul wurde mit dem Hertzmodell aus einer Force-Map berechnet. Harte Strukturen erscheinen weiß, weiche Bereiche der Zelle sind schwarz. Deutlich sind als hellere lineare Strukturen die vergleichsweise harten Streßfasern zu sehen.

Vergleicht man die im Kontaktmodus gemessenen Höhen einer Zelle mit den durch Force-Mapping ermittelten Höhen, so zeigen sich deutliche Unterschiede. Trotz einer für den Kontaktmodus vergleichsweise niedrigen Auflagekraft von unter 1 nN werden die extrem weichen Zellen beim Abrastern zusammengepreßt¹⁹. Typischerweise werden die Zellen auf 65-85%, manchmal sogar bis auf die Hälfte ihrer wahren Höhe komprimiert. Dies erklärt auch das prägnante Erscheinungsbild des Cytoskeletts in Abb. 7.2.1: die weichen Regionen der Zelle werden deutlich stärker eingedrückt als die vergleichsweise harten Streßfasern, die somit als höhere Strukturen erscheinen. Gleichzeitig wird klar, daß zur exakten Höhenbestimmung von adhärennten Zellen der Kontaktmodus trotz niedrigster Auflagekräfte keine zuverlässige Alternative zur Berechnung der Höhe aus Force-Maps darstellt.

Als Meßgrößen zur Charakterisierung der Zellmorphologie wurden die von der Zelle auf dem Substrat bedeckte Fläche A , die Länge der Zelle l und die Breite der Zelle b direkt aus den Kontaktmodusaufnahmen ermittelt. Beispiele solcher AFM-Aufnahmen sind in Abb. 7.2.4 zu sehen. Die Höhe der Zelle h wurde aus Force-Maps mit Hilfe des Hertzmodells berechnet.

¹⁹ Die Auflagekraft wird in der Regel vor jeder Abbildung minimiert, um ein möglichst schonendes Abrastern zu ermöglichen. Die minimale Auflagekraft, die dabei zu ausreichender Interaktion zwischen AFM-Spitze und Zelle führt und somit einen befriedigenden Bildkontrast hervorruft, liegt gewöhnlich bei etwa 0,9 nN. Die selbst bei dieser Kraft entstehenden großen Eindrückungen werden z.B. in Abb. 3.2.1 nochmals deutlich.

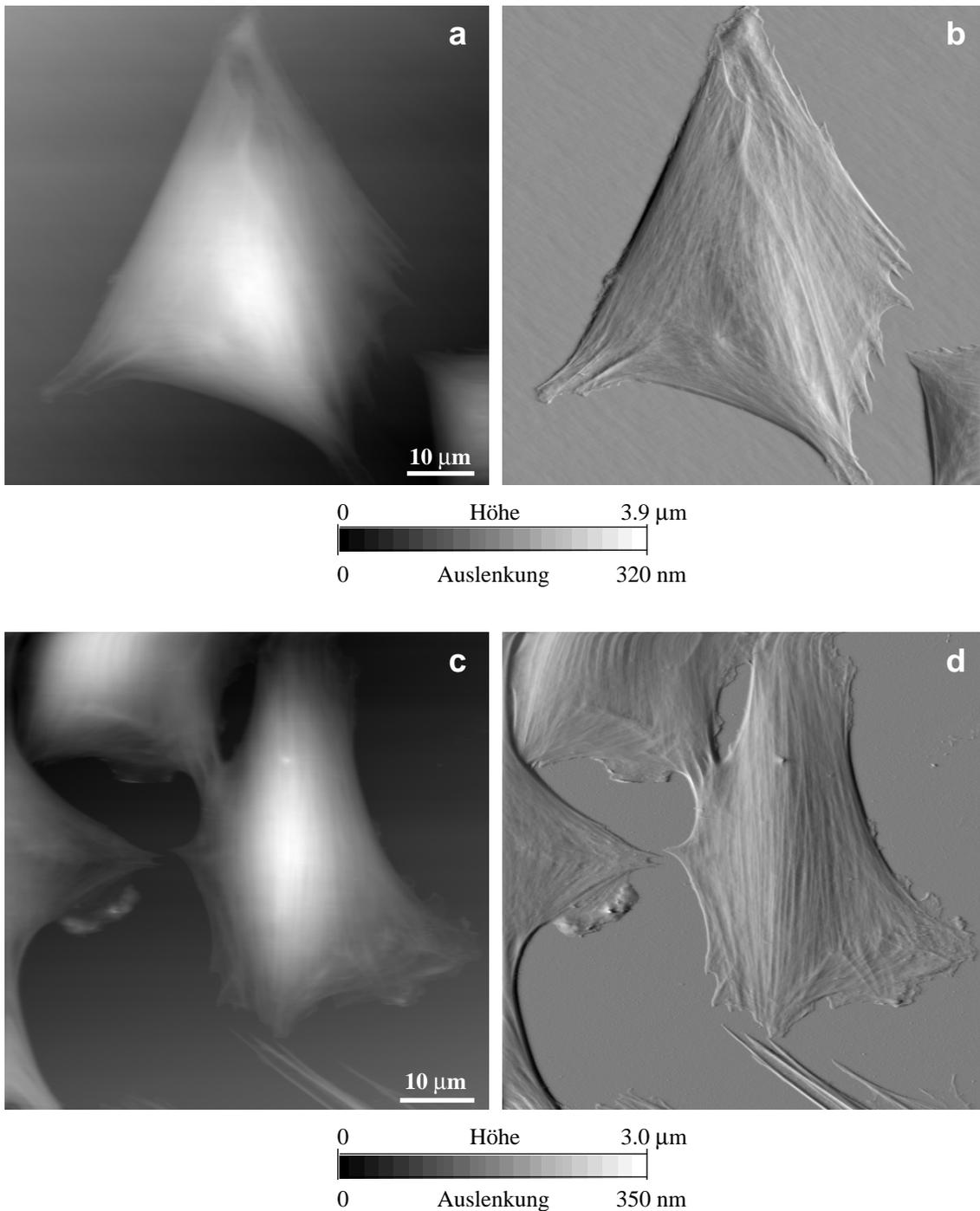


Abb. 7.2.4: Typische AFM-Aufnahmen lebender Osteoblasten auf Petrischale (a, b) bzw. CoCr-Substrat (c, d). Während die Höhenbilder (a, c) die Topographie der Zellen wiedergeben, ist in den Auslenkungsbildern (b, d) deutlich das Cytoskelett zu sehen.

Die gemessenen Flächen und Höhen der Zellen sind in Abb. 7.2.5 aufgeführt. Die Zellen auf den metallischen Substraten sind im Mittel deutlich größer als jene auf Petrischalen oder Glasplättchen. Die Höhe der Osteoblasten ist dagegen auf den Glasplättchen am größten und auf Petrischalen am niedrigsten, die Werte der metallischen Substrate liegen dazwischen.

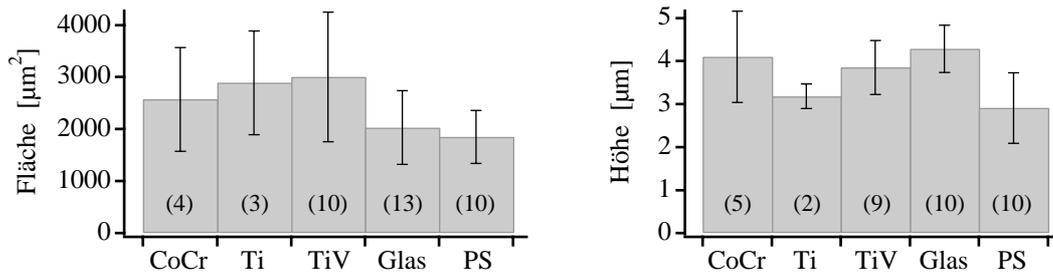


Abb. 7.2.5: Einfluß der Substrate auf die absolute Größe der Osteoblasten. Die von den Zellen bedeckte Fläche wurde aus Kontaktmodusaufnahmen bestimmt, die Höhe der Zellen aus Force-Maps mit dem Hertzmodell berechnet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb der Proben der einzelnen Substrate, die Zahl in Klammern ist die Anzahl der Proben.

Neben den absoluten Größen der Zellen ist v.a. deren Form interessant, um Rückschlüsse auf das Adhäsionsverhalten ziehen zu können. Dazu wurden, in Anlehnung an ein früheres Projekt [98], die beiden folgenden Formfaktoren definiert: das Verhältnis $s_1 = l/b$ beschreibt die Form der Zelle als Ellipsoid²⁰. Das Verhältnis $s_2 = (\pi/4)^{1/2} \cdot h/A^{1/2}$ beinhaltet die Höhe der Zelle und ist damit ein dreidimensionales Maß, welches die Flachheit der Zellen beschreibt²¹. Die Resultate beider Formfaktoren sind in Abb. 7.2.6 dargestellt. Die Elliptizität der Zellen s_1 zeigt sehr große Fluktuationen. Die Schwankungen innerhalb der Substrate sind größer als die Unterschiede zwischen den verschiedenen Substraten. Im Gegensatz dazu zeigt die Flachheit der Zellen s_2 deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Substraten. Auf Glas sind die Zellen am stärksten aufgerundet, auf Petrischalen und Ti-Substraten sind sie dagegen am flachsten.

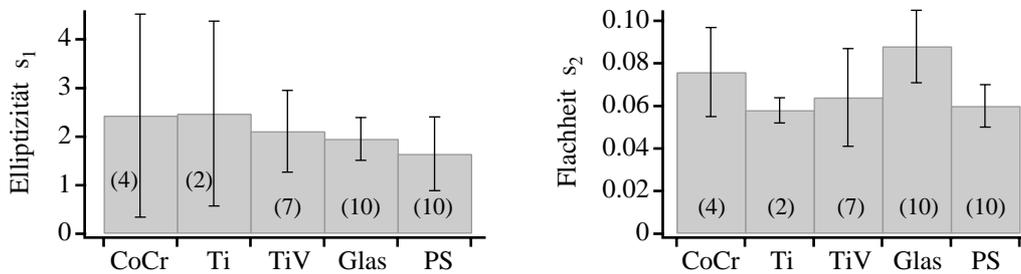


Abb. 7.2.6: Einfluß der Substrate auf die Form der Osteoblasten. Die Elliptizität der Zellen $s_1 = l/b$ schwankt innerhalb der Substrate deutlich stärker als zwischen den Substraten. Die Flachheit der Zellen $s_2 = (\pi/4)^{1/2} \cdot h/A^{1/2}$ ermittelt auf Glas die aufgerundetsten Zellen, auf Petrischalen erscheinen die Zellen am flachsten. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb der Proben der einzelnen Substrate, die Zahl in Klammern ist die Anzahl der Proben.

Aus den aufgenommenen Force-Maps wurde als weiterer Parameter der Elastizitätsmodul berechnet. Als Kenngröße zur Beschreibung der Osteoblasten wurde der durchschnittliche E-Modul im Kernbereich der Zelle gebildet, wobei nur Werte des E-Modul einbezogen wurden, die aus Bereichen der Zelle stammten, die höher als $2 \mu\text{m}$ waren. Da somit der Einfluß des harten Substrates auf die berechneten Werte ausgeschlossen war, konnte der E-Modul ebenfalls mit dem Hertzmodell ausgewertet werden. Der Durchschnittswert wurde aus 30 bis 100 Kraftkurven pro Zelle berechnet, die Ergebnisse sind in Abb. 7.2.7 gezeigt. Zwischen den

²⁰ Die beiden Grenzfälle sind ein kreisrunder Körper mit $s_1 = 1$, bzw. die Form eines Stabes mit $s_1 \rightarrow \infty$.

²¹ Für den Fall einer Kugel ist $s_2 = 1$, im Falle einer flachen Scheibe ist $s_2 = 0$.

verschiedenen Substraten schwankt der E-Modul dabei bemerkenswert stark, er unterscheidet sich zwischen 8,8 kPa auf Ti und 2,1 kPa auf TiV um mehr als das 4-fache. Die Elastizitäten der Zellen auf Glas bzw. Petrischale bewegen sich dazwischen.

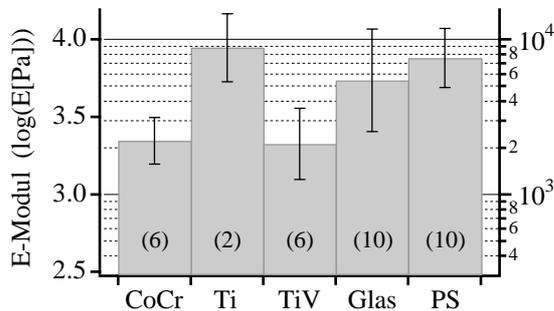


Abb. 7.2.7: Einfluß der Substrate auf die Elastizität der Osteoblasten. Der durchschnittliche E-Modul wurde ausschließlich im Kernbereich berechnet, die Zellen waren hier höher als 2 μm . Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung innerhalb der Proben der einzelnen Substrate, die Zahl in Klammern ist die Anzahl der Proben.

Betrachtet man die Charakterisierung der Zellmorphologie, so fällt auf, daß absolute Werte wie Fläche oder Höhe der Zellen keine eindeutigen Tendenzen erkennen lassen. Während die Flächen auf Glas und Petrischalen deutlich kleiner waren als auf den metallischen Substraten, wurden auf Glas die höchsten und auf Petrischale die niedrigsten Zellen gefunden. Dieses Beispiel verdeutlicht die Notwendigkeit, einen Parameter einzuführen, der beide Größen miteinander verknüpft: die Flachheit der Zellen. Erst jetzt ist es möglich, die Gestalt verschiedener Zellen mit einem dreidimensionalen Maß quantitativ zu erfassen und damit zu vergleichen. Bereits in optischen Untersuchungen wurde die Elliptizität mit der Adhäsion der Zellen in Beziehung gesetzt [129]. Ebenso ist es plausibel, eine flachere Gestalt der Zellen mit größerer Adhäsion zu korrelieren, da eine gute Haftung der Zelle zum Substrat nötig ist, um das natürliche Bestreben der Zelle, sich aufzurunden, zu überwinden. Damit ist gleichzeitig ein Maß gefunden, welches auf die Qualität der Adhäsion der Zelle auf dem Substrat rückschließen läßt. Werden schließlich die Ergebnisse der Rauigkeit der Substrate mit der Flachheit der Zellen verglichen, so läßt sich eine enge Korrelation feststellen: je größer die Rauigkeit des Substrates desto flacher die Zellen und desto größer die Adhäsion der Zellen auf dem Substrat. Wenn man nun eine hohe Rate der Knochenbildung als Konsequenz einer guten Substrathaftung der Zelle auffaßt, stimmt obige Korrelation mit der Beobachtung von Larsson et al. [135] überein. Da jedoch in der Literatur der Einfluß der Rauigkeit auf die Adhäsion kontrovers diskutiert wird [131], darf das in dieser Studie gewonnene Ergebnis nicht verallgemeinert werden. Von zentraler Bedeutung ist hier vermutlich die Größenskala in der sich die Rauigkeit bewegt. Für die Elastizität der Zelle, wie sie mit dem AFM gemessen wird, ist v.a. der aus dem Actinnetzwerk bestehende Teil des Cytoskeletts verantwortlich [47]. Daher sollte der durchschnittliche E-Modul über dem Kernbereich einer Zelle ein Maß dafür sein, wie stark deren Cytoskelett ausgebildet ist. Da außerdem das Cytoskelett für die dauerhafte Adhäsion einer Zelle auf dem Substrat verantwortlich ist [97], sollte auch der E-Modul mit der Flachheit der Zellen korrelieren. Für die Petrischalen und die Ti-Substrate ist dies offensichtlich auch der Fall; hier wurden sowohl die flachsten, als auch die härtesten Zellen beobachtet. Auch die beobachtete Abnahme des E-Moduls auf CoCr-Substraten steht in Einklang mit der berichteten schwächeren Ausbildung des Actinnetzwerks auf diesem Substrat [129].

Aufgrund der im Versuchsaufbau festgelegten optischen Beobachtung von der Unterseite der Probe (vgl. Kapitel 2.2.2) war im Fall der undurchsichtigen metallisch bedampften Substrate eine Positionierung der Zellen unter dem AFM nicht möglich. Die Zellen mußten sozusagen blind angesteuert werden, was mit einem hohen Zeitaufwand verbunden war und die z.T.

geringe Probenzahl zur Folge hatte. Auch wenn aus diesem Grund die Ergebnisse sicherlich mit Vorsicht zu genießen sind, so sind trotzdem in den Fällen besserer Statistik (PS, Glas, TiV) deutliche Tendenzen sichtbar. Da inzwischen auch das Problem der optischen Positionierung durch Ergänzungen im Versuchsaufbau gelöst werden konnte, steht das Potential der Methode, mittels AFM die substratabhängige Morphologie und Cytomechanik einzelner Zellen zu charakterisieren, außer Frage.

Im Vergleich mit anderen Methoden der Implantatforschung ist ein großer Vorteil, daß mit dem AFM lebende Zellen untersucht werden können. Bei größerer lateraler Auflösung als bei der Lichtmikroskopie, ist das AFM zusätzlich ein einzigartiges Werkzeug zur exakten Höhenbestimmung lebender Zellen. Auch die Untersuchung der Cytomechanik ist mit einer besseren Auflösung möglich als bei alternativen Methoden, wie beim sogenannten *Cell Poking* [143] oder dem SAM (*scanning acoustic microscope*) [144].

Ein äußerst intuitiver Zugang, wie er am Lehrstuhl Gaub von M. Benoit verfolgt wird, ist die direkte Messung der Adhäsionskräfte durch das AFM. Osteoblasten werden dazu auf dem Cantilever kultiviert und im Experiment in direkten Kontakt mit dem Substrat gebracht. Durch Variation der Kontaktzeit kann neben der Stärke der Haftung auch deren Kinetik untersucht werden. Die Kontaktzeiten im Bereich von wenigen Sekunden bis etwa einer Stunde liegen hierbei auf einer deutlich kürzeren Zeitskala. Beispiele für diese Methode der Adhäsionsmessung finden sich in [145, 146].

8 Untersuchung pulsierender Herzmuskelzellen

In Wirbeltieren gibt es drei verschiedene Muskeltypen: den Herzmuskel, Skelettmuskeln und glatte Muskeln. Letztere finden sich v.a. im Wandgewebe von Hohlorganen, wie Blutgefäßen oder dem Verdauungstrakt. Der zugrunde liegende molekulare Kontraktionsmechanismus ist in allen drei Fällen ein Vorbeigleiten von aneinandergelagerten Actin- und Myosinfilamenten. Herzmuskelzellen besitzen im Gegensatz zu den anderen Muskelzellen eine sehr viel größere Zahl von Mitochondrien, die für die stetige Bereitstellung der zur Kontraktion benötigten Energie sorgen [132]. Ein weiterer Unterschied zwischen den Muskeltypen liegt in den Membran- und den elektrischen Eigenschaften. Während eine Skelettmuskelzelle als Antwort auf ein Aktionspotential eines Motoneurons kontrahiert, sind Herzmuskelzellen dazu in der Lage, selbst Aktionspotentiale zu generieren. Die Membran hat sogenannte Schrittmachereigenschaften, die zu einer rhythmischen Depolarisation der Zellmembran und damit zur Ausbildung eines Aktionspotentials führen. Diese Funktion bleibt selbst nach der Isolation der Zellen erhalten, so daß Herzmuskelzellen auch in Zellkultur pulsieren. Benachbarte Zellen sind über Kontaktzonen, sogenannte *Gap Junctions*, miteinander elektrisch gekoppelt. Bei genügender Zelldichte können sich somit auch in Zellkultur die Aktionspotentiale über alle Zellen ausbreiten, was schließlich zu einer synchronisierten Kontraktion des Zellverbandes führt [1, 94, 147].

Die Untersuchung von Herzmuskelzellen ist in zweierlei Hinsicht von großem Interesse: zum einen stellt dieser Zelltyp ein ideales Modellsystem zur Muskelkontraktion dar, da aufgrund spontaner selbständiger Ausbildung des Aktionspotentials auch in Zellkultur die Kontraktion ohne Ankopplung an Nervenfasern erfolgt. Zum anderen ist es das Ziel, Herzkrankheiten bereits auf zellulärer Ebene erforschen und verstehen zu können.

Die Messung von Aktionspotentialen erfolgt typischerweise mit Mikroelektroden bzw. der *Patch-Clamp*-Technik [148]. Die mechanische Kontraktion wurde v.a. durch Mikropipetten kombiniert mit Mikromanipulatoren untersucht [149, 150]. Für diese Anwendung ist jedoch durch das AFM mittlerweile ein Instrument verfügbar, welches zur Untersuchung der Zellmechanik hinsichtlich Kraftempfindlichkeit, lateraler Auflösung und Positionierbarkeit deutlich überlegen ist [22, 151]. Diese Eigenschaften konnten in der folgenden Studie zu einer präzisen Charakterisierung der mechanischen Kontraktion von Herzmuskelzellen genutzt werden. Bei aktiven adhärenierten Einzelzellen ist es gelungen die Kontraktionen ortsaufgelöst zu charakterisieren bzw. die von den Zellen generierte Leistung zu messen²².

²² Die Experimente wurden an einem Bioscope mit normalen Microlevern (Kap. 8.1 und 8.2: $k_c = 8 \text{ mN/m}$) unter Zellinkubatorbedingungen (37°C , $5\% \text{ CO}_2$) durchgeführt. Um Zeitserien der mechanischen Pulse an fester Position aufzunehmen, wurde die Bildgröße auf 0 nm eingestellt und so die lokalen Höhenänderungen als Funktion der Zeit gemessen. Die Nachregelgeschwindigkeit wurde stets maximiert, so daß die Cantileverauslenkung höchstens 5% (meistens weniger als 2%) des Höhensignals betragen hat. Die Messung konnte also effektiv bei konstanter Auflagekraft, d.h. isotonischen Bedingungen durchgeführt werden. Die Isolation der Herzmuskelzellen ist im Anhang E beschrieben.

8.1 Dynamik im Zellrasen

Herzmuskelzellen, die sich zu einem dichten (konfluenten) Rasen verbunden hatten, haben in der Zellkultur nach etwa einem Tag von selbst zu pulsen²³ begonnen. Bereiche gleichzeitiger Kontraktion sind dabei stetig angewachsen, so daß nach zwei bis drei Tagen oftmals der gesamte Zellrasen einer Petrischale ein synchrones Pulsieren vollzogen hat. Die mit dem AFM gemessenen Pulse waren dann äußerst regelmäßig und gleichförmig. So wurden z.B. Proben beobachtet, deren Frequenz sich über eine halbe Stunde lediglich um etwa 8% veränderte. Typische Pulsformen sind in Abb. 8.1.1 dargestellt. Es treten positive wie auch negative Amplituden, z.T. mit Mehrfachspitzen, auf. Die Pulse können dabei mono-, bi- aber auch triphasisch verlaufen [vgl. 152].

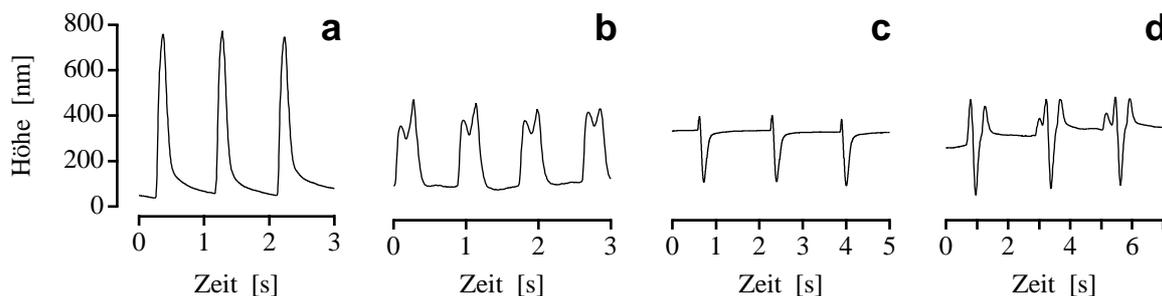


Abb. 8.1.1: Mit dem AFM gemessene Pulsformen in einem dichten Rasen von Herzmuskelzellen. Neben den typischen monophasischen Pulsen (a), treten auch Doppelspitzen (b) oder bi- und triphasische Pulse (c, d) auf. Sowohl positive als auch negative Amplituden können beobachtet werden.

Zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs monophasischer Pulse wurden die folgenden Parameter eingeführt: Der Höhenverlauf $H(t)$ der aktiven Zelle während eines Pulses wurde ausgewertet auf Pulsamplitude ΔH , Halbwertsbreite t_{fwhm} (Breite der Pulse auf Höhe der halben Amplitude) und Pulsperiode t_p (Zeit zwischen zwei benachbarten Pulsen). Zur Beschreibung der Pulsform wurde die maximale Steigung während des An- bzw. Abstiegs dH_{An}/dt bzw. dH_{Ab}/dt , also die Geschwindigkeit der Höhenänderung, ermittelt. Da diese Absolutwerte z.T. sehr stark schwankten, wurden die Steigungen auf die Amplitude des Pulses normiert. Als Maß für die Dauer des An- bzw. Abstiegs ergaben sich somit die Werte $t_{\text{An}} = [(dH_{\text{An}}/dt)/\Delta H]^{-1}$ bzw. $t_{\text{Ab}} = [(dH_{\text{Ab}}/dt)/\Delta H]^{-1}$. Die Werte sind stets als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Wie auch im Verlauf dieses Kapitels noch deutlich werden wird, ist das Pulsverhalten im Zellrasen deutlich stabiler als im Falle einzelner Zellen [153]. Trotzdem konnten gelegentlich auch im Zellrasen drastische Veränderungen in der Pulscharakteristik beobachtet werden: Abb. 8.1.2 zeigt einen Ausschnitt einer 12-minütigen Zeitserie, die auf einem pulsierenden Zellrasen aufgenommen wurde. Während in der Anfangsphase gleichförmige Pulse negativer Amplitude detektiert wurden, setzt plötzlich ein Wechsel zu anderen Pulsformen ein. Nach einer Übergangsphase von knapp zwei Minuten, in der biphasische Pulse auftraten, lagen in der Endphase durchweg positive Amplituden vor. Sowohl in der Anfangs- wie auch in der Endphase der Messung waren die Pulsformen über vergleichsweise lange Zeit stabil. Dies geht

²³ Im folgenden ist mit "pulsen" stets die optisch sichtbare bzw. mit dem AFM detektierte Kontraktion gemeint, also die mechanische und nicht die elektrische Aktivität der Zellen.

auch aus der Auswertung der charakteristischen Parameter hervor, die in Tabelle 8.1.1 zusammengestellt sind.

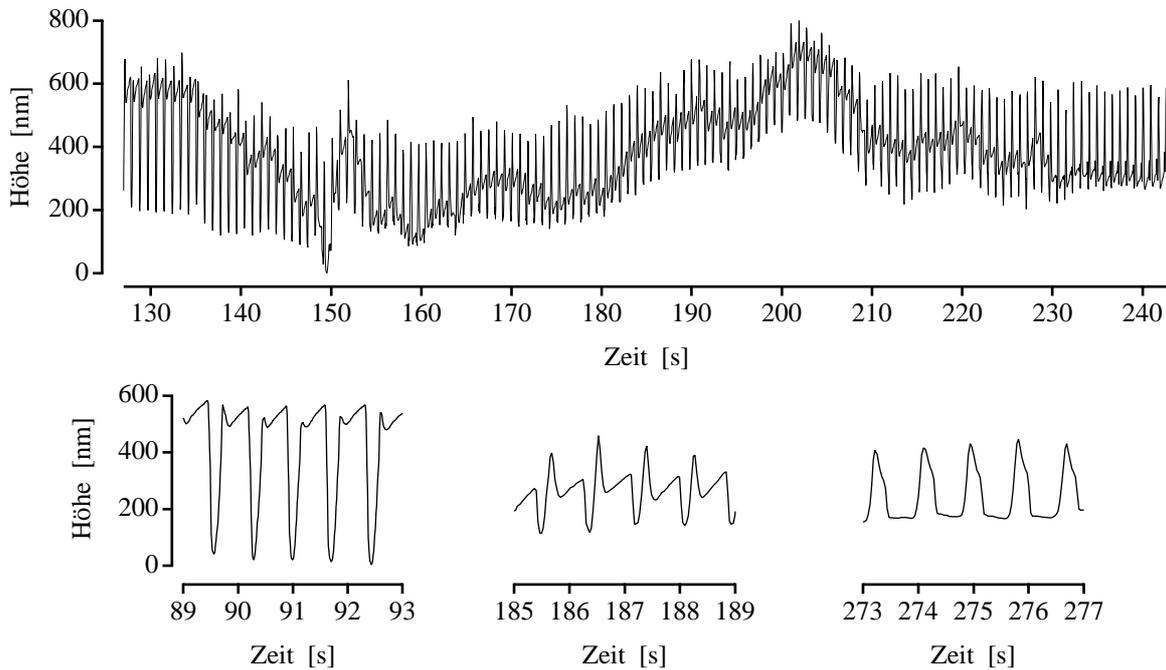


Abb. 8.1.2: Der Ausschnitt einer Zeitserie, die auf einem Rasen konfluenter Zellen aufgenommen wurde, zeigt einen zweifachen Wechsel von negativen zu positiven Amplituden (oben). Die drei vergrößerten Intervalle (unten) zeigen typische Pulsformen vor, während und nach dem Wechsel. Trotz der drastischen Veränderung der Pulsform ist die Pulsperiode nahezu konstant geblieben.

	Anfang der Messung (negative Amplitude)	Vorzeichenwechsel der Amplitude	Ende der Messung (positive Amplitude)
ΔH	625 ± 70 nm		290 ± 65 nm
t_p	$0,81 \pm 0,15$ s	$0,87 \pm 0,02$ s	$0,85 \pm 0,03$ s
t_{fwhm}	$0,19 \pm 0,01$ s		$0,24 \pm 0,03$ s
dH_{An}/dt	$11,0 \pm 0,8$ $\mu\text{m/s}$		$4,1 \pm 1,2$ $\mu\text{m/s}$
dH_{Ab}/dt	$6,6 \pm 1,2$ $\mu\text{m/s}$		$3,2 \pm 0,6$ $\mu\text{m/s}$
t_{An}	57 ± 6 ms		75 ± 16 ms
t_{Ab}	98 ± 16 ms		90 ± 13 ms

Tabelle 8.1.1: Charakteristische Parameter, welche die Form der Pulse des Zellrasens der Messung aus Abb. 8.1.2 beschreiben. Zur Berechnung der Parameter vor und nach dem Vorzeichenwechsel der Amplitude wurde ein Intervall von jeweils 90 s verwendet, das außerhalb der Wechselferode lag. Hier erfolgte das Pulsieren der Zellen äußerst gleichförmig.

Im Falle pulsierender Zellrasen fielen bei der Betrachtung durch das optische Mikroskop makroskopische (auf der Millimeterskala) Kontraktionsmuster auf. Neben aktiven Bereichen, die sich zu Kontraktionszentren ausbildeten, entstanden eher passive Gebiete, in denen die Zellen bei jedem Puls lateral in Richtung der aktiven Zentren gezogen wurden. Die Kontraktionszentren konnten dabei als Orte positiver Pulsamplituden identifiziert werden, negative Amplituden wurden dagegen lediglich in den passiven Bereichen gefunden. Obwohl die Pulsperiode der in Abb. 8.1.2 dargestellten Zeitserie äußerst stabil war, hat sich die Form

der Pulse plötzlich verändert. Aufgrund der parallelen Beobachtung im optischen Mikroskop konnte dies mit einer Verschiebung eines Kontraktionszentrums in die Nähe der AFM-Spitze korreliert werden

Die optisch erkennbare laterale Bewegung des Zellrasens führte auch zu der folgenden Hypothese, welche die auftretenden bi- und triphasischen Pulsformen erklären könnte: Durch die laterale Bewegung werden auch harte oberflächennahe Strukturen des Cytoskeletts, unter der AFM-Spitze hindurchgezogen. Auf den verschiedenen harten Positionen der Zelle ergeben sich daraus unterschiedliche Eindrücke, die sich mit der eigentlichen Auslenkung der Zelloberfläche überlagern. Ist dies der Fall, dann würden bi- und triphasischen Pulsformen als Folge der veränderten Morphologie am Ort der AFM-Messung auftreten.

Einerseits konnte am Zellrasen beobachtet werden, daß die ausgebildete Pulsfrequenz sehr stabil über lange Zeiten aufrechterhalten bleibt. Dies scheint eine direkte Folge der Synchronisation der aneinandergestellten Herzmuskelzellen zu sein. Andererseits existiert eine makroskopische Verschiebung der Kontraktionszentren, die dann auch auf der Minutenskala lokal zu einer drastischen Veränderung der Pulsformen führen kann.

Messungen des Aktionspotentials wurden von Dr. W. Parak mittels Patch-Clamp-Technik an Herzmuskelzellen durchgeführt, die nach demselben Protokoll isoliert wurden [vgl. 98, 118]. Bei Raumtemperatur betrug dabei die Dauer des Anstiegs $t_{An} = 42 \pm 19$ ms, bei einer Amplitude von $\Delta V = 67 \pm 9$ mV. In der Literatur wurde hingegen von Anstiegen berichtet, deren Steigung bis zu einer Größenordnung steiler waren [153, 154]. Diese deutlich schnelleren Anstiegszeiten wurden jedoch unter physiologischen Bedingungen gemessen, die Patch-Clamp-Messungen bei Raumtemperatur dürften daher eine obere Grenze der elektrisch ermittelten Anstiegszeit darstellen. Ein weiterer Grund für die großen Unterschiede in den Anstiegszeiten der Pulse besteht darin, daß die Aktionspotentiale stark von der Art des Gewebes, d.h. vom Ort der Zellentnahme abhängen, da die Zellen der verschiedenen Herzregionen ganz unterschiedliche Funktionen erfüllen müssen [118, 147]. Bei Vergleichen muß somit auch zwischen den unterschiedlichen Präparationen der Herzmuskelzellen unterschieden werden.

8.2 Pulsmessungen an Einzelzellen

Da die Entstehung der am Zellrasen beobachteten Vielzahl von Pulsformen nicht sicher geklärt werden konnte, stellte sich die Frage, ob verschiedene Pulsformen auch an einzelnen Zellen gesehen werden können, oder ob sie charakteristisch für den Zellverband sind. Aufeinanderfolgende Pulse einer Einzelzelle waren meistens viel unregelmäßiger, als dies im Zellrasen beobachtet werden konnte. Die in Abb. 8.2.1 dargestellte Zeitsequenz läßt zwar eine regelmäßige Pulsperiode vermuten, im Vergleich zu den Messungen am Zellrasen, variiert die Form der Pulse jedoch deutlich.

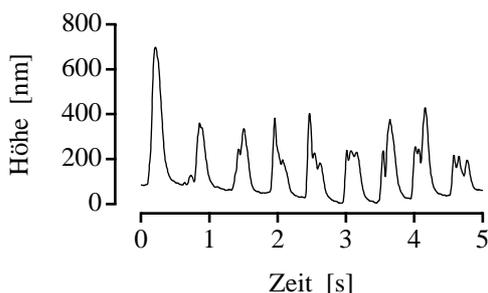


Abb. 8.2.1: Zeitserie einer pulsenden Einzelzelle. Während die Pulsperiode relativ stabil ist, ändern sich Amplitude und Form der Pulse von einer Kontraktion zur nächsten äußerst stark.

Wurden Einzelzellen über einen längeren Zeitraum beobachtet, so zeigte sich ein weiterer Unterschied zum Zellrasen: Zeiten hoher Pulsaktivität wechselten ab mit Ruhezeiten, in denen keine oder nur einzelne mechanische Pulse zu erkennen waren. Beide Verhaltensmuster konnten über mehrere Minuten anhalten. Abb. 8.2.2 zeigt einen typischen Ausschnitt einer 30-minütigen Messung an einer einzelnen Zelle. Man kann hier auch erkennen, daß die Pulsperiode innerhalb der aktiven Perioden relativ gleichmäßig verläuft, aber von einem Abschnitt zum nächsten bis um das 2-fache variieren kann. Die Amplituden aufeinanderfolgender Pulse konnten sich um ein Vielfaches unterscheiden, dagegen veränderte sich die Form der Pulse erstaunlich wenig. Deutlich wird dies durch die charakteristischen Parameter der einzelnen markierten Abschnitte, die in Tabelle 8.2.1 zusammengestellt sind.

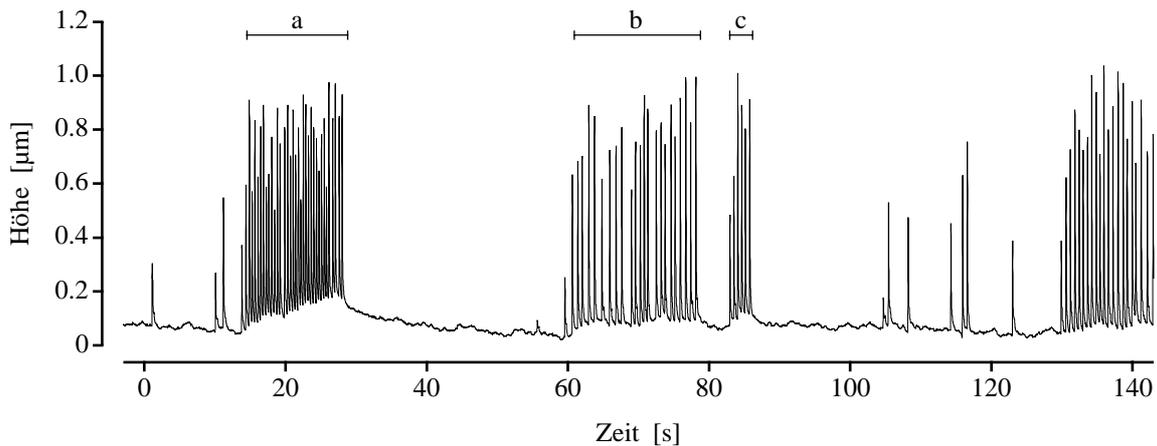


Abb. 8.2.2: Ausschnitt einer Zeitserie, die auf einer pulsierenden Einzelzelle aufgenommen wurde. Zeiten mit hoher mechanischer Aktivität wechseln sich mit Ruheperioden ab, die manchmal von einzelnen Pulsen unterbrochen werden. Während die Pulsperiode innerhalb aktiver Phasen nur geringe Schwankungen zeigt, kann sie von einer Phase zur nächsten um das bis zu 2-fache variieren.

Zeitabschnitt	a (14-28 s)	b (60-78 s)	c (83-86 s)
ΔH	654 ± 124 nm	714 ± 107 nm	687 ± 184 nm
t_p	$0,41 \pm 0,06$ s	$0,80 \pm 0,23$ s	$0,55 \pm 0,03$ s
t_{fwhm}	75 ± 3 ms	77 ± 4 ms	78 ± 2 ms
dH_{An}/dt	$20,0 \pm 3,7$ $\mu\text{m/s}$	$20,7 \pm 3,1$ $\mu\text{m/s}$	$20,3 \pm 5,2$ $\mu\text{m/s}$
dH_{Ab}/dt	$10,9 \pm 1,5$ $\mu\text{m/s}$	$10,7 \pm 1,5$ $\mu\text{m/s}$	$10,1 \pm 2,8$ $\mu\text{m/s}$
t_{An}	34 ± 2 ms	34 ± 2 ms	34 ± 1 ms
t_{Ab}	66 ± 4 ms	67 ± 3 ms	68 ± 4 ms

Tabelle 8.2.1: Statistik der markierten Abschnitte der Zeitserie aus Abb. 8.2.2, aufgenommen auf einer einzelnen Zelle. Während die Amplitude ΔH und die Pulsperiode t_p starke Schwankungen aufwiesen, blieben die anderen Parameter, welche die Form der Pulse beschreiben, äußerst stabil. Dabei waren v.a. die Fluktuationen der Anstiegs- bzw. Abstiegszeit t_{An} bzw. t_{Ab} als normierte Größen vergleichsweise klein.

Bei den bisherigen Messungen an einzelnen Herzzellen wurde die AFM-Spitze auf das Zentrum der schlagenden Zelle positioniert und das Pulsen in Zeitserien aufgezeichnet. Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zelle gut oder schlecht auf dem Substrat adhärirt war. Setzt man voraus, daß eine Zelle während der Kontraktion ihr Volumen beibehält, so sollten auch auf Einzelzellen positive wie auch negative Amplituden beobachtet werden können. Um die Pulse einzelner

Zellen ortsaufgelöst kartieren zu können, war es das Ziel, die betreffende Herzzelle mit dem AFM sowohl abzubilden, als auch die hohe laterale Positioniergenauigkeit des AFMs auszunützen und Zeitserien der Pulse an verschiedenen Orten auf der Zelle aufzunehmen. Hierbei war das Hauptproblem, einzelne Zellen zu finden, die einerseits pulsen und andererseits gut genug adhärirt sind, um abgebildet zu werden. Dies ist in der Regel ein Widerspruch, da der überwiegende Anteil pulsender Einzelzellen nur lose mit dem Substrat verbunden ist und dabei eher die Gestalt einer Kugel annimmt.

Eine kleine Gruppe aus vier pulsenden Herzzellen, die mit dem AFM abgebildet werden konnten, zeigt Abb. 8.2.3; das Bild wurde aus zwei einzelnen Abbildungen zusammengesetzt.

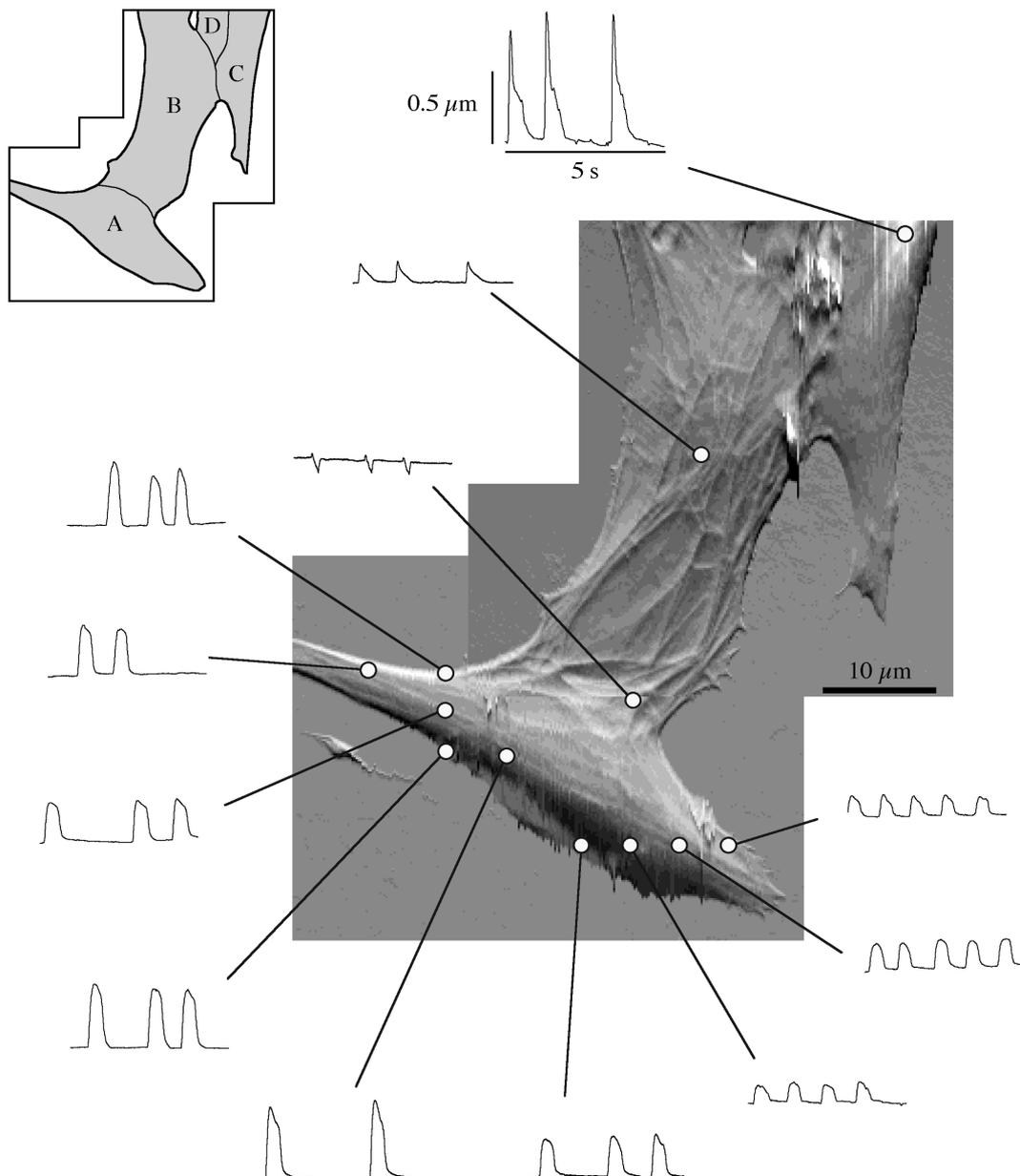


Abb. 8.2.3: Kartiertes Pulsen einer Gruppe von Herzzellen. Das AFM-Bild der Zellen ist aus zwei einzelnen Auslenkungsbildern zusammengesetzt, das Schema links oben zeigt die Begrenzung und die Benennung der einzelnen Zellen. Die Ausschnitte der an den kreisförmig markierten Orten aufgenommenen Zeitserien sind alle identisch skaliert. Lediglich zwischen den Zellen (A) und (B) konnten biphasische Pulse aufgezeichnet werden, an allen anderen Orten waren die Pulse positiv.

Aufgrund der Kontraktion der Zellen während des Abrasterns und der resultierenden Cantileverauslenkung sind v.a. auf den Zellen (A), (C) und (D) deutliche Streifen in Scanrichtung (senkrecht) zu erkennen. Die Zellen (A) und (B) waren gut adhärirt und konnten daher abgebildet werden. Die beiden anderen Zellen hatten eine langgezogene spindelförmige Gestalt und waren für den limitierten Arbeitsbereich des Piezos in z-Richtung zu hoch, um abgebildet zu werden. Durch das optische Mikroskop wurde ihre Länge auf etwa 200 μm geschätzt. Optisch konnte man außerdem erkennen, daß sich die vier Zellen synchronisiert hatten, d.h. die Kontraktion jeweils gleichzeitig erfolgte. Speziell von Zelle (A) wurden mit der AFM-Spitze an verschiedenen Orten Zeitserien des mechanischen Pulsens aufgenommen. Die Auflagekraft wurde mittels Kraftkurven vor jeder Zeitserie auf 0,8 nN eingestellt.

Bei dieser Probe, wie auch bei anderen Messungen, konnten lediglich positive Pulse gemessen werden. Die biphasischen Pulse zwischen den Zellen (A) und (B) traten an einem Ort mit ausgeprägtem Cytoskelett auf, das hier durch seine laterale Bewegung diese Pulsform verursacht haben könnte. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß am äußersten Rand der Zelle ein Absenken der Oberfläche, also negatives Pulsen stattgefunden hat. Da aktive Zellen trotz Substrathftung seitlich eine relativ steile Flanke besitzen, besteht hier die Gefahr eines Abrutschens der AFM-Spitze, was eine genaue Detektion der Pulse verhindert.

Die statistische Auswertung der Pulse der vier Zellen ist in Tabelle 8.2.2 aufgelistet.

	Zelle A	Zelle B	Zelle C	Zelle D
n	11	1	4	1
ΔH	290 \pm 134 nm	134 \pm 36 nm	683 \pm 337 nm	408 \pm 45 nm
t_{rwhm}	406 \pm 24 ms	338 \pm 61 ms	191 \pm 55 ms	303 \pm 40 ms
t_{An}	75 \pm 12 ms	49 \pm 4 ms	37 \pm 4 ms	74 \pm 16 ms
t_{Ab}	120 \pm 13 ms	206 \pm 45 ms	126 \pm 49 ms	161 \pm 37 ms

Tabelle 8.2.2: Statistik der Zeitserien der in Abb. 8.2.3 kartierten Zellen. Dabei ist n die Zahl der auf der Zelle aufgenommenen Zeitserien. Die angegebenen Fluktuationen sind bei den Zellen (A) und (C) die Standardabweichungen zwischen den Zeitserien, bei den Zellen (B) und (D) die Standardabweichungen innerhalb der Zeitserien. Die Parameter t_{rwhm} und t_{An} scheinen mit vergleichsweise niedrigen Fluktuationen erneut charakteristische Parameter für die jeweiligen Zellen zu sein.

In zweierlei Hinsicht hat sich Zelle (B) von den anderen drei Zellen unterschieden: Zum einen kann man im AFM-Bild erkennen, daß die Zelle gut adhärirt war; trotz der großen Fläche war sie in dieser Gruppe die flachste Zelle. Das ausgeprägte Cytoskelett läßt eine netzartige und nicht die bei Muskelzellen typische lineare Struktur²⁴ erkennen. Zum anderen weicht bei dieser Zelle die beobachtete Pulsform von allen anderen Formen ab, die Pulse haben mit einem äußerst flachen Abfall die längsten in dieser Studie beobachteten Abstiegszeiten und auch im Zentrum der Zelle eine relativ kleine Amplitude. Eine Erklärung dieses Erscheinungsbildes könnte in der Präparationsmethode der Zellen liegen: Die erwünschten Herzmuskelzellen präsentieren nur einen Anteil von bis zu 80% der Zellen, d.h. es befinden sich auch andere Zelltypen wie z.B. Fibroblasten des Herzgewebes in der Probe [155]. Zelle (B) war möglicherweise entweder eine inaktive Muskelzelle oder aber ein anderer Zelltyp und hat als eine Art Transmitter für die Synchronisation der Zelle (A) mit (C) und (D) gesorgt. Die abweichende Pulsform der Zelle (B) könnte dann durch ein passives Pulsverhalten erklärt werden, welches eher durch die mechanische Kopplung an die Nachbarzellen hervorgerufen wurde, als durch eigene Aktivität.

²⁴ Im Falle der Muskelzellen ist die lineare Struktur möglicherweise durch die ausgerichteten Myofibrillen und weniger durch das Cytoskelett verursacht. Eine genaue Aussage dazu erfordert weitere Untersuchungen.

Vergleicht man abschließend das Pulsverhalten einzelner Zellen mit dem konfluenter Zellen, so konnten deutliche Unterschiede in der Stabilität der Pulsperiode erkannt werden. Die Pulsform änderte sich stark zwischen einzelnen Zellen, typische Halbwertsbreiten der Pulse lagen bei $t_{\text{fwhm}} = 60\text{-}410$ ms und typische Anstiegszeiten bei $t_{\text{An}} = 25\text{-}80$ ms. Da für die jeweiligen Einzelzellen die Schwankungen dieser beiden Parameter jedoch sehr klein waren, scheinen sie charakteristische Größen für die individuelle Zelle darzustellen.

Bei bestimmten Krankheitsbildern in der Kardiologie ist die Detektion der lateralen Fortpflanzung der elektrischen Anregung über das Herzgewebe, des sogenannten Myokards, von großem Interesse. Hier ist es z.B. für die Art der Reizleitung zwischen den einzelnen Zellen charakteristisch, ob sich das Aktionspotential parallel oder quer zu den Muskelzellen ausbreitet; des weiteren sind aber auch altersbedingte Unterschiede in der Kopplung der Zellen bekannt [156].

In dieser Arbeit ist es gelungen, das mechanische Pulsieren einzelner Zellen orts aufgelöst zu detektieren. Dies kann als erster Schritt gesehen werden, auch die Ausbreitung der mechanischen Pulse über das Herzmuskelgewebe zu vermessen.

8.3 Wie stark ist eine Herzmuskelzelle?

Durch die Anwendung des AFMs als Kraftsensor konnten schließlich auch die von einzelnen Zellen generierten Kräfte gemessen werden. Wegen der Geometrie des AFM-Aufbaus wurden stets Kräfte in z-Richtung und damit senkrecht zur Ausrichtung der kontrahierenden Myofibrillen gemessen. In der Literatur diskutierte Kraftmessungen erfolgen üblicherweise in Kontraktionsrichtung: einzelne Zellen oder die Myofibrillen gehäuteter Zellen²⁵ werden dazu durch Mikropipetten festgehalten [150, 157]. Der Vorteil gehäuteter Zellen besteht neben einer direkten Kontrollmöglichkeit der Ca^{2+} -Konzentration der Umgebung in der Vermeidung sowohl extra- als auch innerzellulärer viskoelastischer Elemente. Letztere beeinflussen bei intakten Zellen v.a. die Messungen frequenzabhängiger Größen wie z.B. die Kontraktionsgeschwindigkeit in nicht-linearer Weise. Trotzdem wurde auch in dieser Studie Wert auf unbehandelte Zellen mit intakter Membran gelegt, um so die selbständige Kontraktion der Zellen beobachten zu können. Ziel war es, Veränderungen des Pulsverhaltens unter einer externen Last zu untersuchen. Um diese durch die AFM-Spitze vermittelte Auflagekraft möglichst gleichmäßig auf die Zelle zu verteilen, wurden Glaskugeln mit einem Durchmesser von ungefähr 40 μm auf die Enden der Cantilever geklebt²⁶. Die ausgewählten Kugeln waren somit ungefähr gleich groß wie die untersuchten Zellen. Dadurch konnte bei großer Kontaktfläche trotzdem noch eine ausreichend genaue Positionierung durch das optische Mikroskop durchgeführt werden. Ein mit Kugeln modifizierter Cantileverchip ist in Abb. 8.3.1 abgebildet.

²⁵ In der Herzmuskelzelle wird die Kontraktion durch die Ausschüttung von Ca^{2+} -Ionen hervorgerufen. Im Experiment mit Myofibrillen werden die chemisch oder mechanisch gehäuteten Zellen durch Einstellung der Ca^{2+} -Konzentration in der Lösung zur Kontraktion oder Entspannung angeregt.

²⁶ Das Protokoll zum Ankleben der Glaskugeln an Cantilever ist in Anhang G beschrieben.

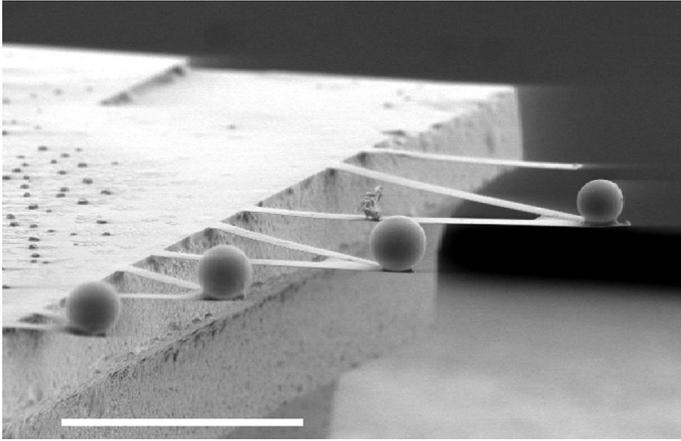


Abb. 8.3.1: REM-Aufnahme²⁷ eines Chips, bei dem alle Cantilever zur Vergrößerung der Kontaktfläche mit Glaskugeln beklebt wurden. Der Skalierungsbalken hat eine Länge von 200 μm .

Im Experiment wurden die Kugeln über aktiven Einzelzellen positioniert und Zeitserien der mechanischen Pulse von jeweils 10 s aufgezeichnet. Im Verlauf einer Zeitserie wurde die Auflagekraft stets konstant gehalten, d.h. die Messungen erfolgten unter isotonischen Bedingungen. Zwischen den Zeitserien wurde mehrmals zwischen der mit dem jeweiligen Cantilever erreichbaren maximalen Auflagekraft bzw. der von der Zelle ertragenen Maximalkraft und völliger Entlastung variiert. Während die beiden weichsten Cantilever (Typ "C" und "D") zu weich waren, konnten mit den härteren Cantilevern (Typ "E" und "F") genügend große Kräfte auf die Zellen ausgeübt werden, um die Pulsamplitude deutlich zu beeinflussen. Ein Beispiel solcher Zeitserien mit unterschiedlicher Last zeigt Abb. 8.3.2. Die Auflagekraft wurde ausschließlich zwischen den Zeitserien schrittweise reduziert. Deutlich ist bei abnehmender

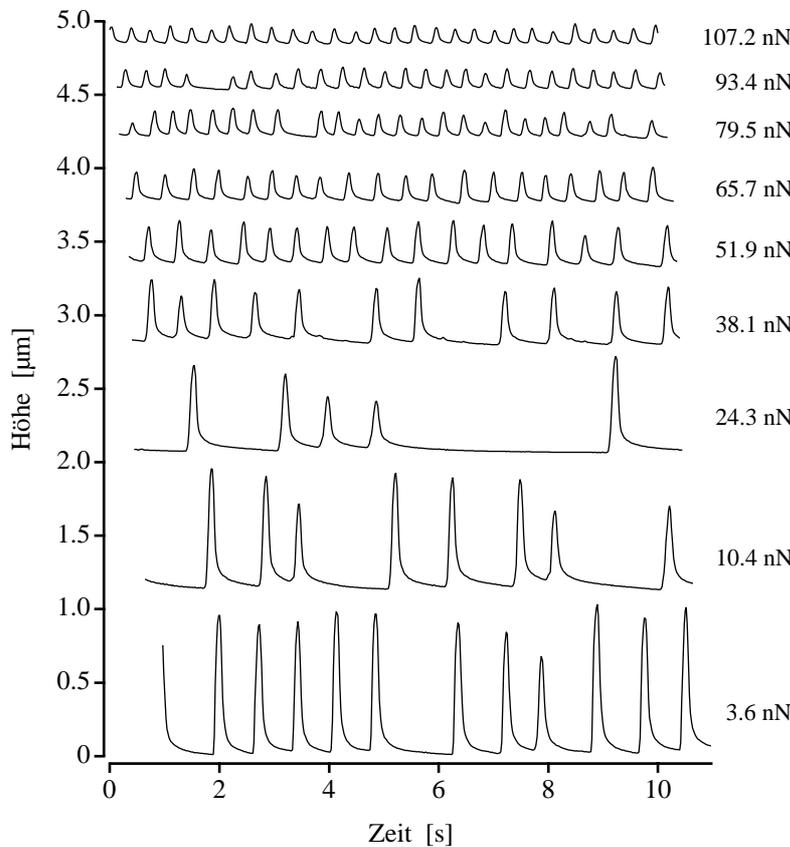


Abb. 8.3.2: Zeitserien einer zunehmend entlasteten Einzelzelle. Die Zelle wurde jeweils 10 s mit konstanter Kraft belastet, bevor die Auflagekraft weiter reduziert wurde. Während die Zelle bei einer anfänglichen Last von 107 nN im Mittel eine Pulsamplitude von lediglich 110 nm erreicht, steigt die Amplitude bei nahezu vollständiger Entlastung bis auf 920 nm an. Deutlich ist in einigen Zeitserien die unregelmäßige Pulsperiode zu sehen. Zeitweise ist die Zelle über mehrere Sekunden mechanisch inaktiv.

²⁷ Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Armin Kriele (LS Prof. Kotthaus) angefertigt.

Auflagekraft neben der zunehmenden Pulsamplitude auch eine veränderte Pulsperiode zu erkennen. Aufgrund der Rezeption mechanischer Reize durch Zellen, ist die Beeinflussung der Pulsperiode durch externe Last durchaus plausibel. Es konnte jedoch keine systematische Abhängigkeit zwischen Pulsperiode und Auflagekraft festgestellt werden: Vielfach konnte bei zunehmender Auflagekraft eine abnehmende Pulsperiode beobachtet werden, gelegentlich traten jedoch auch Zellen mit umgekehrtem Verhalten auf.

Eine Meßreihe aus mehreren Be- und Entlastungszyklen an ein und der selben Zelle zeigt Abb. 8.3.3. Jeder Datenpunkt stellt hier die durchschnittliche Pulsamplitude der isotonischen Kontraktionen während einer Zeitserie dar. Entsprechend dem Ablauf der Meßreihe wurden die Pulsamplituden mit der jeweiligen Auflagekraft in chronologischer Folge aufgetragen (Abb. 8.3.3a). In diesem Beispiel ist zunächst mit andauernder Messung ein deutlicher Rückgang der Maximalamplitude, d.h. der Amplitude bei unbelasteter Zelle zu erkennen. Zu Beginn der Messung betrug die Maximalamplitude gut $1,2 \mu\text{m}$ (Zeitserie 2), in der Hälfte der Meßreihe noch etwa 400 nm (Zeitserie 57), dies entspricht einer Abnahme auf etwa 30% der Ausgangshöhe. Da aktive Einzelzellen gewöhnlich nur schwach am Substrat adhärirt waren, erscheint als Ursache eine laterale Verschiebung der Positionen von Kugel und Zelle zueinander als plausibel; die Zelle könnte sich unter der Kugel herausbewegt haben. Da die Kugeln optisch einen Großteil der Zelle bedeckt haben, konnten kleine Änderungen der Position im optischen Mikroskop nicht erkannt werden. Nach dem Wechsel von Cantilever "E" auf "F" schwankte die Amplitude bei völlig entlasteter Zelle nur noch geringfügig um Werte von 400 nm . Durch die Berechnung der maximalen Steigung der Höhenänderung der Pulse dH_{An}/dt wurde eine charakteristische Geschwindigkeit der Zellkontraktion ermittelt. So konnte neben dem Abfall der Amplitude bei zunehmender Last stets eine deutliche Abnahme der Kontraktionsgeschwindigkeit beobachtet werden. Der hyperbolische Zusammenhang zwischen zu hebender Last F und der Geschwindigkeit v der Muskelkontraktion wird durch die Hill-Gleichung beschrieben [158]:

$$(F + a) \cdot (v + b) = (F_0 + a) \cdot b = \text{const} \quad (27)$$

Dabei ist F_0 die Maximalkraft bei isometrischer Kontraktion²⁸, a und b sind Konstanten und abhängig von vielerlei Parametern wie der Länge des entspannten Muskels, der Temperatur, der Ca^{2+} -Konzentration, etc. Die Meßdaten der Kontraktionsgeschwindigkeit dH_{An}/dt wurden in Abb. 8.3.3b gegen die jeweilige Auflagekraft aufgetragen, der hyperbolische Fit entsprechend der Hill-Gleichung ist als durchgehende Kurve eingezeichnet.

Die Hill-Gleichung, als bekannteste Gleichung in der Biomechanik des Muskels, wurde empirisch entwickelt und beschreibt ursprünglich die Kontraktionseigenschaften des Skelettmuskels in tetanischen Krämpfen. Die Gleichung wurde inzwischen vielseitigst erweitert, durch das Hinzufügen verschiedener Elemente wurde dabei versucht, sowohl den Herzmuskel als auch andere Kontraktionssituationen zu beschreiben [132]. Da diese jedoch nicht den hier durchgeführten Messungen senkrecht zur Kontraktionsrichtung entsprechen, soll der qualitative hyperbolische Fit nicht näher diskutiert werden.

²⁸ Hierbei wird der Muskel während der Spannungsentwicklung auf konstanter Länge gehalten.

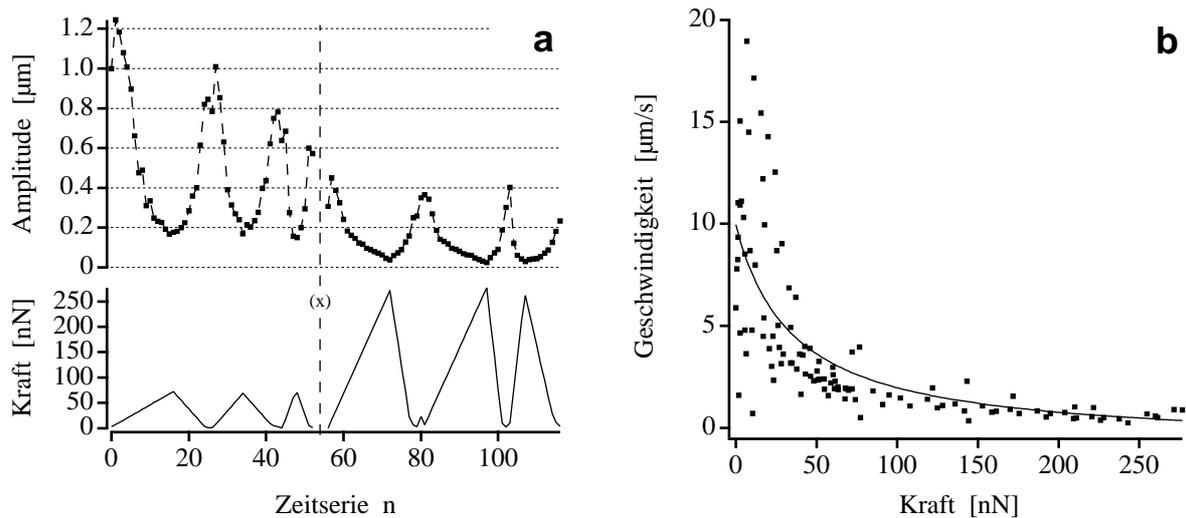


Abb. 8.3.3: Meßreihe einer pulsierenden Einzelzelle unter externer Last. Die gemittelten Pulsamplituden der 10 s-Zeitserien sind zusammen mit der jeweiligen Auflagekraft chronologisch aufgetragen (a). Nach dem Wechsel zum härteren Cantilever (x) ist der Amplitudenverlauf der Zelle reversibel, die Amplitude erreicht dann nach völliger Entlastung wieder ihren ursprünglichen Wert von etwa 400 nm. Die Aufnahme der gesamten Meßreihe dauerte etwa eine Stunde²⁹. Neben der Amplitude zeigt auch die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit eine deutliche Abhängigkeit von der aufliegenden Kraft (b). Ein hyperbolischer Fit an die Meßdaten entsprechend der Hill-Gleichung ist als durchgehende Linie eingezeichnet.

Für das Leistungsvermögen von Herzmuskeln im Organismus stellt die Geschwindigkeit der Muskelkontraktion einen entscheidenden Faktor dar [159]. Um die Leistung einzelner Herzmuskelzellen abschätzen zu können, wurde das Produkt aus aufliegender Kraft und maximaler Kontraktionsgeschwindigkeit berechnet:

$$P_{\max} = F \cdot dH_{\text{An}}/dt \quad (28)$$

Ein Datensatz dazu ist in Abb. 8.3.4 dargestellt. Neben der Auflagekraft und der aus jeder Zeitserie gemittelten Amplitude wurde die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit sowie die Leistung der Zelle P_{\max} chronologisch aufgetragen. Dabei wird sichtbar, daß Amplitude und Geschwindigkeit qualitativ denselben Verlauf aufweisen. Die aufgetragene Leistung zeigt ein auffälliges zum Kraftverlauf unsymmetrisches, aber reversibles Muster, welches mehrmals auch bei anderen Proben beobachtet wurde. Das Leistungsmaximum wird dabei deutlich vor der Maximalkraft erlangt und bei der schrittweisen Entlastung der Zelle nicht wieder erreicht. Erst nach einigen Minuten und einer völligen Entlastung konnte die Zelle die ursprüngliche Maximalleistung wieder erbringen. In der Detektion des mechanischen Pulses bleibt der dissipative Anteil der Kontraktionsenergie unberücksichtigt, die berechnete Leistung stellt somit lediglich eine Abschätzung der Mindestleistung der kontrahierenden Zelle dar. Im Falle der gemittelten Pulsperiode wurde die Länge von Pausen nicht eingerechnet³⁰. Trotzdem ist die Abweichung innerhalb der Zeitserien vergleichsweise hoch, da wie bereits diskutiert, Einzelzellen weitaus unregelmäßiger pulsen als synchronisierte Zellen eines Zellrasens.

²⁹ Da der zeitliche Abstand zwischen den Zeitserien nicht konstant war, konnte die Abszisse nicht direkt in eine Zeitachse umskaliert werden.

³⁰ Pulsabstände, die mehr als das 1,5-fache des vorangegangenen Abstands betragen, wurden als Pausen gewertet.

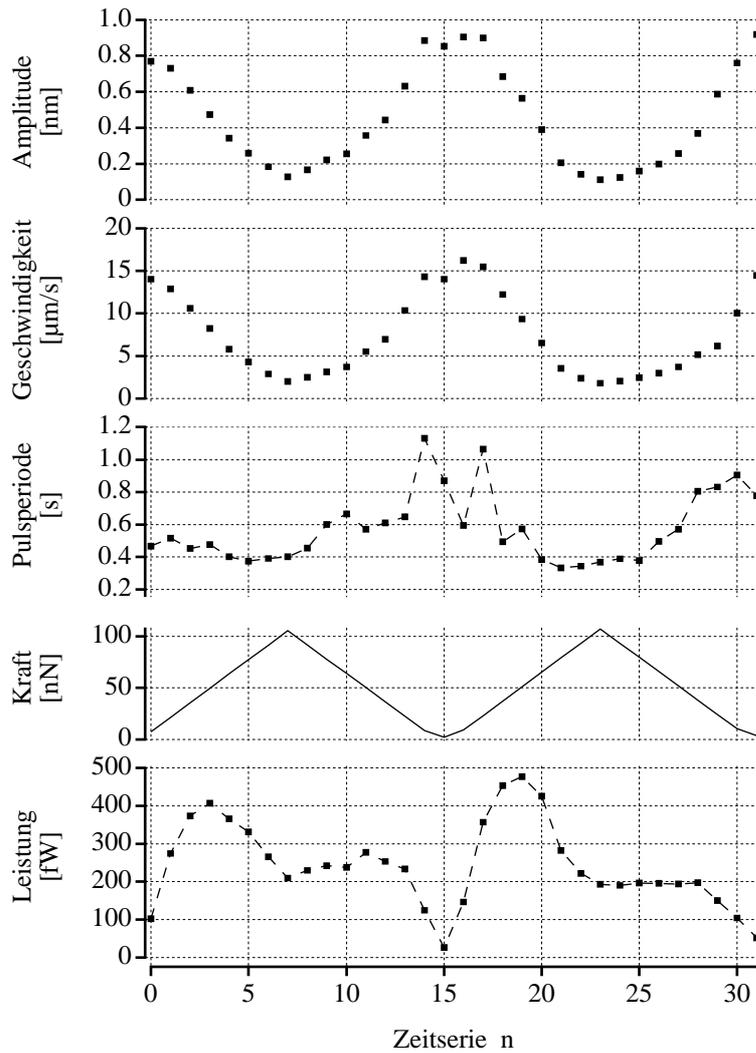


Abb. 8.3.4: Meßreihe einer pulsierenden Einzelzelle unter externer Last. Die Mittelwerte der Pulsamplitude, Maximalgeschwindigkeit, Pulsperiode und Leistung jeder 10 s-Zeitreihe sind zusammen mit der Auflagekraft chronologisch aufgetragen. Außer der Pulsperiode erreichen die Meßwerte nach völliger Entlastung auch im zweiten Belastungszyklus wieder ihren ursprünglichen Wert, die Zelle ist reversibel belastbar. Die Aufnahme dieser Meßreihe dauerte etwa 15 Minuten.

Die für maximale Leistung optimale Kraft einer Zelle lag meist im Bereich von 25-60 nN. Dies wird gut sichtbar, wenn Leistung und Kraft wie in Abb. 8.3.5 gegeneinander aufgetragen werden. Der Graph beschreibt dann eine Hystereseschleife, die von der Zelle während eines Zyklus aus Be- und Entlastung durchlaufen wird.

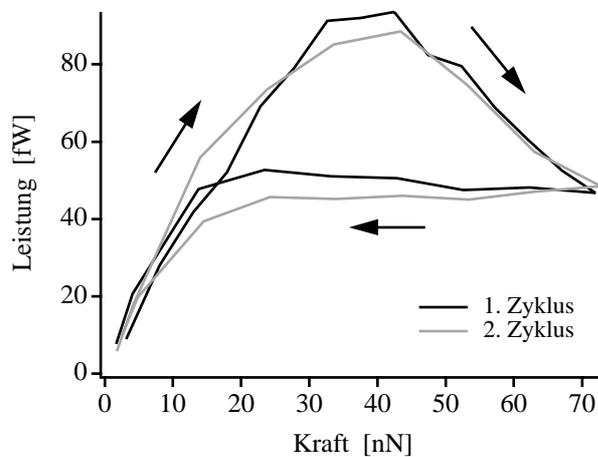


Abb. 8.3.5: Last-Leistungsabhängigkeit einer pulsierenden Einzelzelle. Während des Belastungszyklus wurde das Leistungsmaximum der Zelle immer vor und niemals nach dem Durchlaufen der Maximalkraft erreicht.

Für den deutlichen Leistungsverlust der Zellen nach maximaler Belastung gibt es zwei Erklärungsansätze:

Zum einen könnten die in der Muskelzelle parallel gebündelten Myofibrillen bei zu hoher Auflagekraft der Kugel nach beiden Seiten weggedrückt werden. Dies müßte eine reduzierte Kontraktionsgeschwindigkeit bewirken, um eine geringere Leistung im Laufe zunehmender Entlastung erklären zu können. Da bei Messungen an intakten Zellen zweifelsohne viskoelastische Effekte eine bedeutende Rolle spielen, könnten erzwungene Veränderungen in der Zellmorphologie auch Einfluß auf die viskoelastischen Eigenschaften und damit auch auf die gemessene Geschwindigkeit haben. Erst die völlige Entlastung der Zelle ermöglicht es den Myofibrillen, ihre ursprüngliche Ausrichtung in der Zelle wieder einzunehmen. Die Ursache für den Leistungsverlust während des Belastungszyklus läge in diesem mechanischen Erklärungsmodell somit in den wechselnden Randbedingungen des Kraftübertrags, also in der apparativen Seite der Detektion.

Zum anderen könnte aber auch ein tatsächlicher Leistungsverlust vorliegen, der durch einen Mangel an ATP (Adenosintriphosphat)³¹ in der Muskelzelle hervorgerufen wird. Das in einer Muskelzelle frei verfügbare ATP reicht nur für wenige Kontraktionen aus und muß daher ständig neu erzeugt werden [94]. Im Herzmuskel erfolgt dies vorwiegend durch die oxidative Phosphorylierung von Fettsäuren [160]. Nach maximaler Leistung könnte somit in der Zelle ein Mangel an ATP herrschen, so daß erst nach mehreren Minuten unter geringer Last die Energiereserven wieder aufgefüllt werden können und erneut maximale Leistung von der Zelle erbracht werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der geschilderte Effekt nicht mehr näher untersucht werden. Durch gezielte Variationen in der Dauer der Belastungs- bzw. der Erholungsphase während eines Zyklus könnten jedoch die beiden Hypothesen getestet werden. Während das mechanische Erklärungsmodell einen nicht beeinflussten Leistungsverlauf erwarten ließe, wäre beim zweiten Ansatz eine deutliche Abhängigkeit von der Dauer der Entlastungsphase zu erwarten.

Die in den Experimenten gemessenen Leistungen und Kräfte einzelner Zellen variierten deutlich zwischen den Proben und erreichten bis zu 0,5 pW bzw. 300 nN. Ein direkter Vergleich mit in der Literatur beschriebenen Werten für Herzmuskelzellen ist aus mehreren Gründen schwierig. Zum einen unterscheiden sich neben den verwendeten Spezies auch die ausgeführten Präparationsprotokolle voneinander. So werden z.T. ganz bestimmte funktionelle Bereiche des Herzens zur Isolierung von Muskelzellen ausgewählt, die Durchführung der Experimente schließlich findet unter den unterschiedlichsten physiologischen Voraussetzungen statt. Ein paar Studien, deren Kraftmessungen allerdings stets in Kontraktionsrichtung erfolgten, seien hier jedoch genannt: An intakten Herzmuskelzellen des Frosches wurden bis zu 250 nN [150], bei Meerschweinchen bis zu 2,6 µN [149] gemessen. Im Falle gehäuteter Zellen von Ratten lagen die Kräfte zwischen 4 µN [150] und 12 µN [157]. Im Vergleich dazu liegen die Kräfte von Skelettmuskelzellen beispielsweise der Ratte mit 0,5 mN [161] deutlich höher.

³¹ ATP, der wesentliche Träger chemischer Energie in Zellen, besteht aus Adenin, Ribose und drei Phosphatgruppen. Durch die Hydrolyse von ATP wird die für zahlreiche zelluläre Reaktionen nötige Energie frei.

9 Ausblick

Das in dieser Arbeit entwickelte Parametrische Modell schafft die Voraussetzung für eine deutlich verbesserte, von der Probendicke unabhängige Elastizitätsanalyse äußerst weicher und dünner Proben mittels AFM. Das bisher in der Analyse mit dem Hertzmodell auftretende Härteartefakt tritt beim Parametrischen Modell nicht mehr in Erscheinung.

Zur weiteren Charakterisierung seiner Qualitäten sollte das Parametrische Modell an alternativen Modellsystemen getestet werden. Makroskopische Modelle haben dabei den Vorteil, daß Experiment und Vorhersage des Parametrischen Modells leichter miteinander verglichen werden können. Für die AFM-Anwendung sollten chemisch vernetzende Polymere die Herstellung homogener Proben ermöglichen. Die elastischen Eigenschaften könnten dann über die Konzentration der Polymere eingestellt werden.

In der Zellbiologie ermöglicht das Parametrische Modell zahlreiche Anwendungen im Zusammenhang zellmechanischer Fragestellungen:

Für die Fortbewegungsmechanismen wandernder Zellen werden derzeit unterschiedliche Erklärungsmodelle diskutiert. AFM-Messungen am Leitsaum des aktiven Lamellipodiums geben hier Einsichten in das dynamische Verhalten des Cytoskeletts. Aufgrund der äußerst geringen Dicke dieser Strukturen haben bei den bisherigen Analysemethoden allerdings auch die auftretenden Höhenfluktuationen zu artifiziellen Veränderungen im Elastizitätsmodul geführt. Mit dem Parametrischen Modell ist es nun möglich, E-Modul und Höhe voneinander zu entkoppeln und somit den Wandel elastischer Eigenschaften mit der tatsächlichen dynamischen Veränderung des Cytoskeletts zu korrelieren.

Das Einlagern kristalliner Plättchen aus Calciumphosphat in die neugebildete Knochenmatrix durch Osteoblasten ist ein Prozeß, der auch *in vitro* stattfindet. Aufgrund der Plättchengröße von einigen 10 Nanometern wäre die Beobachtung dieses Vorgangs sicherlich ein Vorstoß in den Grenzbereich der ortsaufgelösten Elastizitätsmessung. Die Unterscheidung dieser Plättchen vom Hintergrundrauschen der Messung erscheint erst mit der verbesserten Analysemethode erfolgversprechend.

Die bemerkenswerte Eigenschaft des Knochens, mechanische Belastungen im Organismus durch einen adaptiven Aus- und Umbau der statischen Eigenschaften zu optimieren [1, 132], beinhaltet viele ungeklärte Fragen. Vermutlich basiert die Fähigkeit der funktionellen Anpassung des Knochens³² unter anderem auf verschiedenen Detektionsmechanismen der mechanischen Belastung in den knochenbildenden Osteoblasten [163]. Auf die mechanische Stimulation reagieren die Osteoblasten einerseits intrazellulär durch einen gerichteten Umbau des Cytoskeletts und andererseits extrazellulär durch den gezielten Aufbau von Knochenmatrix. Die Untersuchung dieses Antwortverhaltens der Zellen stellt durch die mögliche Kombination mit kürzlich vorgestellten Methoden mechanischer Zellbelastung³³ ein ideales Einsatzgebiet für die Elastizitätsmessung mittels AFM dar.

Erste Vorversuche haben gezeigt, daß eine parallele Untersuchung elektrophysiologischer und zellmechanischer Aspekte durch die Kombination von Patch-Clamp-Technik und AFM bereits

³² Dieses sogenannte Prinzip der funktionellen Anpassung wurde 1895 von Roux formuliert [162]. Es beschreibt die Anpassung und Optimierung eines Organs an seine Funktion durch die Ausübung gerade dieser Funktion.

³³ Durch kontrolliertes anisotropes Dehnen des elastischen Substrates wird Zug auf die Zellen ausgeübt [164].

mit geringem apparativem Aufwand realisierbar ist. Damit ist die Detektion mechano-elektrischer Signalübertragung zugänglich, was ein großes Feld neuartiger Untersuchungen zulässt. Hierin wäre das AFM nicht nur zur Messung, sondern auch zur kontrollierten Ausübung von Kräften und damit zur Stimulation zellulärer Prozesse nötig.

Ein Beispiel für mechano-elektrische Signalerzeugung ist die Umwandlung elastischer Deformation in ein neuronales Signal durch die sogenannten Haarzellen des inneren Ohres. Die Stereocilien der Haarzellen dienen als empfindliche Sensoren, die eine erfolgte mechanische Stimulation detektieren und die Umwandlung in ein elektrisches Signal ermöglichen.

Des Weiteren reagieren auch dehnungsaktivierte Ionenkanäle der Zellmembran mit einer elektrischen Antwort auf die mechanische Stimulation der Zelle. Dabei ist eine gezielte Anregung der Ionenkanäle durch das AFM vorstellbar. Vielversprechende Zellen wären hier wiederum die mechano-sensitiven Osteoblasten.

Die Möglichkeit einer elektrischen Stimulation verbunden mit der Detektion der mechanischen Antwort der Zelle führt direkt in die Physiologie der (Herz-) Muskelkontraktion. Durch die gleichzeitige Messung elektrischer und mechanischer Aktivität wäre die Untersuchung der Kopplung beider Signalformen im Falle der Herzmuskelzellen möglich. Im Gegenzug kann natürlich auch die Entkopplung beider Signale überhaupt nur mit einem kombinierten Meßaufbau verfolgt werden. Die Unterdrückung der elektro-mechanischen Kopplung im Muskel kann beispielsweise durch das Muskelrelaxans Dantrolen erfolgen [165]. In Vorversuchen, in welchen lediglich die mechanischen Pulse detektiert wurde [vgl. 166], ist es bereits gelungen, bei Herzmuskelzellen diese mechanische Aktivität reversibel zu blockieren.

Im letzten Kapitel dieser Arbeit wurde das AFM nicht mehr nur als reines Meßinstrument verwendet, sondern auch zur gezielten Beeinflussung und Manipulation des Verhaltens einzelner Zellen genutzt. Eine konsequente Fortführung dieses methodischen Ansatzes wäre beispielsweise die Frage, ob sich mit gezielter mechanischer Stimulation durch rhythmische Belastung einzelne Herzzellen in ihrem Pulsverhalten beeinflussen lassen - mit anderen Worten: Ist eine Herzmuskelmassage auf zellulärer Ebene möglich?

Literaturverzeichnis

- [1] Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. 1997. *Molekularbiologie der Zelle*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- [2] Binnig, G., C.F. Quate, and C. Gerber. 1986. *Atomic force microscope*. Phys. Rev. Lett. 56:930-933.
- [3] Wickramasinghe, H.K. 1990. *Scanning probe microscopy. Current status and future trends*. J. Vac. Sci. Technol. A. 8:363-369.
- [4] Tillmann, R.W., M. Radmacher, and H.E. Gaub. 1992. *Surface structure of hydrated amorphous silicon oxide at 3 Å resolution by scanning force microscopy*. Appl. Phys. Lett. 60:3111-3113.
- [5] Ohnesorge, F., and G. Binnig. 1993. *True Atomic Resolution by Atomic Force Microscopy via Repulsive and Attractive Forces*. Science. 260:1451-1456.
- [6] Müller, D.J., F.A. Schabert, G. Büldt, and A. Engel. 1995. *Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy*. Biophys. J. 68:1681-1686.
- [7] Müller, D.J., D. Fotiadis, S. Scheuring, S.A. Müller, and A. Engel. 1999. *Electrostatically balanced subnanometer imaging of biological specimens by atomic force microscope*. Biophys. J. 76:1101-1111.
- [8] Florin, E.-L., V.T. Moy, and H.E. Gaub. 1994. *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*. Science. 264:415-417.
- [9] Grandbois, M., M. Beyer, M. Rief, H. Clausen-Schaumann, and H.E. Gaub. 1999. *How Strong Is a Covalent Bond?* Science. 283:1727-1730.
- [10] Rief, M., F. Oesterheld, M. Berthold, and H.E. Gaub. 1997. *Single molecule force spectroscopy on polysaccharides by atomic force microscopy*. Science. 275:1295-1297.
- [11] Rief, M., M. Gautel, J. Fernandez, and H.E. Gaub. 1997. *Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM*. Science. 276:1109-1112.
- [12] Rief, M., H. Clausen-Schaumann, and H.E. Gaub. 1999. *Sequence-dependent mechanics of single DNA molecules*. Nat. Struct. Biol. 6:1-4.
- [13] Burnham, N.A., and R.J. Colton. 1989. *Measuring the nanomechanical properties and surface forces of materials using an atomic force microscope*. J. Vac. Sci. Technol. A7(4):2906-2913.
- [14] Tao, N.J., N.M. Lindsay, and S. Lees. 1992. *Measuring the microelastic properties of biological material*. Biophys. J. 63:1165-1169.
- [15] Radmacher, M. 1997. *Measuring the elastic properties of biological samples with the atomic force microscopy*. IEEE Eng. in Med. and Biol. 16:47-57.
- [16] Drake, B., C.B. Prater, A.L. Weisenhorn, S.A.C. Gould, T.R. Albrecht, C.F. Quate, D.S. Cannell, H.G. Hansma, and P.K. Hansma. 1989. *Imaging crystals, polymers and biological processes in water with AFM*. Science. 243:1586-1589.
- [17] Hansma, H.G., and J.H. Hoh. 1994. *Biomolecular imaging with the atomic force microscope*. Annu. Rev. Biophys. Chem. 23:115-139.
- [18] Henderson, E. 1994. *Imaging of living cells by atomic force microscopy*. Prog. Surf. Sci. 46:39-60.

- [19] Radmacher, M., R.W. Tillmann, M. Fritz, and H.E. Gaub. 1992. *From molecules to cells - imaging soft samples with the AFM*. Science. 257:1900-1905.
- [20] Radmacher, M., M. Fritz, H.G. Hansma, and P.K. Hansma. 1994. *Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope*. Science. 265:1577-1579.
- [21] Kasas, S., N.H. Thomson, B.L. Smith, H.G. Hansma, X. Zhu, M. Guthold, C. Bustamante, E.T. Kool, M. Kashlev, and P.K. Hansma. 1997. *Eschericia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy*. Biochem. 36:461-468.
- [22] Shroff, S.G., D.S. Saner, and R. Lal. 1995. *Dynamic micromechanical properties of cultured rat atrial myocytes measured by atomic force microscopy*. Am. J. Physiol. 269:C286-C292.
- [23] Rotsch, C., K. Jacobson, and M. Radmacher. 1999. *The dynamics of active and stable edges in motile fibroblasts investigated by atomic force microscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. 96:921-926.
- [24] Dvorak, J.A., and E. Nagao. 1998. *Kinetic analysis of the mitotic cycle of living vertebrate cells by atomic force microscopy*. Exp. Cell Res. 242:69-74.
- [25] Matzke, R., K. Jacobson, and R. Radmacher. 2000. *Direct high resolution measurement of furrow stiffening during the division of adherent cells*. Nat. Cell Biol. submitted.
- [26] Rotsch, C., and M. Radmacher. 2000. *Drug induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study*. Biophys. J. 78:520-535.
- [27] Hertz, H. 1882. *Über die Berührung fester elastischer Körper*. J. Reine Angew. Mathematik. 92:156-171.
- [28] Sneddon, I.N. 1965. *The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile*. Int. J. Eng. Sci. 3:47-57.
- [29] Jaffar, M.J. 1988. *A numerical solution for axisymmetric contact problems involving rigid indenters on elastic layers*. J. Mech. Phys. Solids. 36:401-416.
- [30] King, R.B. 1987. *Elastic analysis of some punch problems for a layered medium*. Int. J. Solids Structures. 23:1657-1664.
- [31] Ogilvy, J.A. 1993. *A parametric elastic model for indentation testing of thin films*. J. Phys. D: Appl. Phys. 26:2123-2131.
- [32] A-Hassan, E., W.F. Heinz, M.D. Antonik, N.P. D'Costa, S. Nagaswaran, C.-A. Schoenenberger, and J.H. Hoh. 1998. *Relative micro-elastic mapping of living cells by atomic force microscopy*. Biophys. J. 74:1564-1578.
- [33] Radmacher, M., M. Fritz, C.M. Kacher, J.P. Cleveland, and P.K. Hansma. 1996. *Measuring the elastic properties of human platelets with the atomic force microscope*. Biophys. J. 70:556-567.
- [34] Domke, J., C. Rotsch, P.K. Hansma, K. Jacobson, and M. Radmacher. 1998. *Atomic Force Microscopy of Soft Samples: Gelatin and Living Cells*. In: ACS Symposium Series - Scanning Probe Microscopy of Polymers. American Chemical Society, Washington, DC. 178-193.
- [35] Weisenhorn, A.L., M. Khorsandi, S. Kasas, V. Gotozos, M.R. Celio, and H.J. Butt. 1993. *Deformation and height anomaly of soft surfaces studied with the AFM*. Nanotechnology. 4:106-113.
- [36] Domke, J., and M. Radmacher. 1998. *Measuring the elastic properties of thin polymer films with the atomic force microscope*. Langmuir. 14:3320-3325.

- [37] Bhattacharya, A.K., and W.D. Nix. 1988. *Analysis of elastic and plastic deformation associated with indentation testing of thin films on substrates*. Int. J. Solids Structures. 24:1287-1298.
- [38] Laursen, T.A., and J.C. Simo. 1992. *A study of the mechanics of microindentation using finite elements*. J. Mater. Res. 7:618-626.
- [39] Suresh, S., A.E. Giannakopoulos, and J. Alcalá. 1997. *Spherical indentation of compositionally graded materials: theory and experiments*. Acta mater. 45:1307-1321.
- [40] Knapp, J.A., D.M. Follstaedt, S.M. Myers, J.C. Barbour, and T.A. Friedmann. 1999. *Finite-element modeling of nanoindentation*. J. Appl. Phys. 85:1460-1474.
- [41] Bilodeau, G.G. 1992. *Regular pyramid punch problems*. Trans. ASME J. Appl. Mech. 59:519-523.
- [42] Domke, J. 1997. *Untersuchung dünner Polymerfilme mittels Rasterkraftmikroskopie*. Diplomarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [43] Ward, I.M., and D.W. Hadley. 1993. *An introduction to the mechanical properties of solid polymers*. John Wiley & Sons, Chichester.
- [44] Vogel, H. 1995. *Gerthsen Physik*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- [45] Dorfmueller, T., W.T. Hering, and K. Stierstadt. 1998. *Bergmann/Schaefer - Lehrbuch der Experimentalphysik, Bd.1: Mechanik, Relativität, Wärme*. Walter de Gruyter, Berlin, New York.
- [46] Timoshenko, S., and J.N. Goodier. 1951. *Theory of elasticity*. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.
- [47] Hofmann, U.G., C. Rotsch, W.J. Parak, and M. Radmacher. 1997. *Investigating the cytoskeleton of chicken cardiocytes with the atomic force microscope*. J. Struct. Biol. 119:84-91.
- [48] Johnson, K.L. 1994. *Contact Mechanics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- [49] Briscoe, B.J., K.S. Sebastian, and M.J. Adams. 1994. *The effect of indenter geometry on the elastic response to indentation*. J. Phys. D: Appl. Phys. 27:1156-1162.
- [50] Mooney, M. 1940. *A theory of large elastic deformation*. J. Appl. Physics. 11:582-592.
- [51] Rivlin, R.S., and D.W. Saunders. 1951. *Large elastic deformations of isotropic materials, VII. Experiments on the deformation of rubber*. Phil. Trans. Roy. Soc. A243:251-288.
- [52] Chen, J.S., and C. Pan. 1996. *A pressure projection method for nearly incompressible rubber hyperelasticity, Part I: Theory*. J. Appl. Mech. 63:862-868.
- [53] SOLVIA Engineering AB. 1996. *SOLVIA-PRE 95.0 Users Manual, Stress Analysis*, Västerås, Schweden.
- [54] Bathe, K.J. 1990. *Finite-Elemente-Methoden*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [55] Müller, I., and P. Strehlow. 1999. *Physik von Luftballons*. Physikalische Blätter. 55:37-41.
- [56] Mark, J.E. 1975. *The constants $2C_1$ and $2C_2$ in phenomenological elasticity theory and their dependence on experimental variables*. Rubber Chem. Technol. 48:495-512.
- [57] Hansma, P.K., B. Drake, D. Grigg, C.B. Prater, F. Yashar, G. Gurley, V. Elings, S. Feinstein, and R. Lal. 1994. *A new, optical lever based atomic force microscope*. J. Appl. Phys. 76:796-799.
- [58] <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>.
- [59] <http://spmprobes.com/>.
- [60] Kudera, M. 2000. *persönliche Mitteilung*.

- [61] Butt, H.-J., and M. Jaschke. 1995. *Thermal Noise in Atomic Force Microscopy*. Nanotechnology. 6:1-7.
- [62] Thumann, A. 2000. *Kraftmessung an einzelnen Molekülen*. Zulassungsarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [63] Rief, M. 1995. *Kräfte in der molekularen Erkennung - eine Untersuchung mit dem Kraftmikroskop*. Diplomarbeit, Physik-Department, TU München.
- [64] Fritz, M., M. Radmacher, and H.E. Gaub. 1993. *In vitro activation of human platelets triggered and probed by SFM*. Exp. Cell Res. 205:187-190.
- [65] Radmacher, M. 1993. *Kraftmikroskopie an weichen Proben*. Doktorarbeit, Physik-Department, TU München.
- [66] Putman, C.A.J., K.O. van der Werf, B.G. de Grooth, N.F. van Hulst, J. Greve, and P.K. Hansma. 1992. *A new imaging mode in Atomic Force Microscopy based on the error signal*. In: Proc. SPIE. 198-204.
- [67] Rotsch, C. 1999. *Elastizitätsmessungen an lebenden Zellen mit dem Rasterkraftmikroskop*. Doktorarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [68] Hansma, P.K., J.P. Cleveland, M. Radmacher, D.A. Walters, P.E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H.G. Hansma, C.B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, and V. Elings. 1994. *Tapping mode Atomic Force Microscopy in liquids*. Appl. Phys. Lett. 64:1738-1740.
- [69] Putman, C.A.J., K.O. van der Werf, B.G. De Grooth, N.F. Van Hulst, and J. Greve. 1994. *Tapping mode atomic force microscopy in liquid*. Appl. Phys. Lett. 64:2454-2456.
- [70] Magonov, S., V. Elings, and M.-H. Whangbo. 1997. *Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy*. Surf. Sci. 375:L385-L391.
- [71] Clausen-Schaumann, H. 2000. *Adressierung und Strukturierung von Biomolekülen auf der Nanometer-Skala*. Doktorarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [72] Pethica, J.B., and W.C. Oliver. 1987. *Tip surface interactions in STM and AFM*. Phys. Scr. T19. 61:61-66.
- [73] Weisenhorn, A.L., P.K. Hansma, T.R. Albrecht, and C.F. Quate. 1989. *Forces in atomic force microscopy in air and water*. Appl. Phys. Lett. 54:2651-2653.
- [74] Butt, H.-J. 1991. *Measuring electrostatic, van der Waals, and hydration forces in electrolyte solutions with an atomic force microscope*. Biophys. J. 60:1438 - 1444.
- [75] Hartmann, N. 1991. *Van der Waals interaction between sharp probe and flat samples*. Phys. Rev. B. 43:2404-2407.
- [76] Israelachvili, J.N. 1992. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, New York.
- [77] Weisenhorn, A.L., P. Maivald, H.-J. Butt, and P.K. Hansma. 1992. *Measuring adhesion, attraction, and repulsion between surfaces in liquids with an atomic force microscope*. Phys. Rev. B (Condensed Matter). 45:11226-11232.
- [78] Hämmerlin, G., and K.-H. Hoffmann. 1989. *Numerische Mathematik*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [79] Cleveland, J.P., M. Radmacher, and P.K. Hansma. 1994. *Atomic scale force mapping with the atomic force microscope*. In: NATO Advanced Research Workshop. AIP, Schluchsee, Germany. 543-549.
- [80] Ludwig, M. 1997. *Entwicklung neuer rasterkraftmikroskopischer Betriebsmodi zur Strukturierung von Oberflächen und zur Identifizierung von einzelnen biologischen*

- Molekülen anhand ihrer Topographie, Länge, Elastizität und Funktionalität.* Doktorarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [81] Grandbois, M., W. Dettmann, M. Benoit, and H.E. Gaub. 2000. *Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope.* Journal of Hystochemistry and Cytochemistry. 48:719-724.
- [82] Rotsch, C., and M. Radmacher. 1997. *Measuring electrostatic interactions with the atomic force microscope.* Langmuir. 13:2825-2832.
- [83] Rannacher, R., and E. Stein. 1999. *Finite Elemente.* Spektrum der Wissenschaft: Dossier Software:10-17.
- [84] Turner, M.J., R.W. Clough, H.C. Martin, and L.J. Topp. 1956. *Stiffness and deflection analysis of complex structures.* J. Aeronaut. Sci. 23:805-824.
- [85] Spektrum der Wissenschaft. 1999. *Dossier: Software.* Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.
- [86] Trottenberg, U. 1999. *Quantensprünge in der numerischen Simulation.* Spektrum der Wissenschaft: Dossier Software:6-9.
- [87] Zienkiewicz, O.C. 1984. *Methode der finiten Elemente.* Carl Hanser Verlag, München.
- [88] Oliver, W.C., and G.M. Pharr. 1992. *An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments.* J. Mater. Res. 7:1564-1583.
- [89] Doerner, M.F., and W.D. Nix. 1986. *A method for interpreting the data from depth-sensing indentation instruments.* J. Mater. Res. 1:601-609.
- [90] Costa, K.D., and F.C.P. Yin. 1999. *Analysis of indentation: implications for measuring mechanical properties with atomic force microscopy.* ASME Journal of Biomechanical Engineering. 121:462-471.
- [91] Bronstein, I.N., and K.A. Semendjajew. 1985. *Taschenbuch der Mathematik.* Verlag Harri Deutsch, Thun, Frankfurt/Main.
- [92] Demtröder, W. 1998. *Experimentalphysik I, Mechanik und Wärme.* Springer, Berlin, Heidelberg.
- [93] Colton, R.J., A. Engel, J.E. Frommer, H.E. Gaub, A.A. Gewirth, R. Guckenberger, J. Rabe, W.M. Heckl, and B. Parkinson. 1998. *Procedures in Scanning Probe Microscopy.* John Wiley & Sons, Chichester.
- [94] Campbell, N.A. 1997. *Biologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [95] Benoit, M. 1994. *Die Supramolekulare Struktur von Nematocysten.* Diplomarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [96] Benoit, M., T. Holstein, and H.E. Gaub. 1997. *Lateral forces in AFM imaging and immobilisation of cells and organelles.* Eur. Biophys. J. 26:283-290.
- [97] Burridge, K., K. Fath, T. Kelly, G. Nuckolls, and C. Turner. 1988. *Focal Adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton.* Ann. Rev. Cell Biol. 4:487-525.
- [98] Parak, W.J., J. Domke, M. George, A. Kardinal, M. Radmacher, H.E. Gaub, A.D.G. deRoos, A.P.R. Theuvenet, G. Wiegand, E. Sackmann, and J.C. Behrends. 1999. *Electrically Excitable NRK Fibroblasts - A New Model System For Cell-Semiconductor Hybrids.* Biophys. J. 76:1659-1667.
- [99] Stryer, L. 1995. *Biochemistry.* W.H. Freeman and Company, New York.
- [100] Treloar, L.R.G. 1970. *Introduction to polymer science.* Wykeham Publications, London.

- [101] Clark, A.H., and S.B. Ross-Murphy. 1987. *Structural and mechanical properties of biopolymer gels*. Adv. Polymer Sci. 83:57-192.
- [102] Djabourov, M., J.-P. Lechaire, and F. Gaill. 1993. *Structure and rheology of gelatin and collagen gels*. Biorheology. 30:191-205.
- [103] Djabourov, M. 1988. *Architecture of gelatin gels*. Contemp. Phys. 29:273-297.
- [104] Treloar, L.R.G. 1958. *The physics of rubber elasticity*. Clarendon Press, Oxford.
- [105] Rief, M. 1997. *Kraftspektroskopie an einzelnen Molekülen*. Doktorarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [106] Krautbauer, R. 1999. *DNS als organisches Templat zur Ausbildung metallischer Nanodrähte*. Diplomarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [107] Despotopoulou, M.M., R.D. Miller, J.F. Rabolt, and C.W. Frank. 1996. *Polymer chain organization and orientation in ultrathin films: a spectroscopic investigation*. J. Polym. Sci., Part B (Polym. Phys.). 34:2335-2349.
- [108] Arteca, G.A. 1997. *Molecular shape changes in compressed polymer mushrooms with variable excluded volume*. Anal. Quim. 93:237-245.
- [109] Rotsch, C., K. Jacobson, J. Condeelis, and M. Radmacher. 2000. *EGF-stimulated lamellipod extension in adenocarcinoma cells*. Ultramicroscopy. in press.
- [110] Neri, A., D. Welch, D. Kawaguchi, and G.L. Nicholson. 1982. *Development and biological properties of malignant cell sublines and clones of a spontaneously metastasizing rat mammary adenocarcinoma*. J. Nat. Cancer Inst. 68:507-517.
- [111] Segall, J., S. Tyerech, L. Boselli, S. Masseling, J. Helft, A.Y. Chan, J. Jones, and J.S. Condeelis. 1996. *EGF stimulates lamellipod extension in metastatic mammary adenocarcinoma cells by an actin-dependent mechanism*. Clin. Exp. Metastasis. 14:61-72.
- [112] Haga, H., S. Sasaki, K. Kawabata, E. Ito, T. Ushiki, and T. Sambongi. 2000. *Elasticity mapping of living fibroblasts by AFM and immunofluorescence observation of the cytoskeleton*. Ultramicroscopy. 82:253-258.
- [113] Domke, J., W.J. Parak, M. George, H.E. Gaub, and M. Radmacher. 1999. *Mapping the Mechanical Pulse of Single Cardiomyocytes with the Atomic Force Microscope*. Eur. Biophys. J. 28:179-186.
- [114] Domke, J., S. Dannöhl, W.J. Parak, O. Müller, W.K. Aicher, and M. Radmacher. 2000. *Substrate dependent differences in morphology and elasticity of living osteoblasts investigated by atomic force microscopy*. Colloids Surf. B Biointerfaces. 19:367-379.
- [115] Izzard, C.S., and L.R. Lochner. 1976. *Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique*. J. Cell. Sci. 21:727-748.
- [116] Bereiter-Hahn, J., C.H. Fox, and B. Thoreli. 1979. *Quantitative reflection contrast microscopy of living cells*. J. Cell. Biol. 82:767-779.
- [117] Gingell, D., and I. Todd. 1979. *Interference reflection microscopy - a quantitative theory for image interpretation and its application to cell-substratum separation measurement*. Biophys. J. 26:507-526.
- [118] Parak, W.J. 1999. *Zell-Halbleiter-Hybride*. Doktorarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [119] Axelrod, D., T.P. Burghardt, and N.L. Thompson. 1984. *Total internal reflection fluorescence*. Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 13:247-268.

- [120] Gingell, D., I. Todd, and B. J. 1985. *Topography of cell-glass apposition revealed by total internal reflection fluorescence of volume markers*. J. Cell Biol. 100:1334-1338.
- [121] Reichert, W.M., and G.A. Truskey. 1990. *Total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy. I. Modelling of cell contact region fluorescence*. J. Cell Sci. 96:219-230.
- [122] Mathur, A.B., G.A. Truskey, and W.M. Reichert. 2000. *Atomic force and total internal reflection fluorescence microscopy for the study of force transmission in endothelial cells*. Biophys. J. 78:1725-1735.
- [123] Cleveland, J. 2000. *persönliche Mitteilung*.
- [124] Bausch, A.R., F. Ziemann, A.A. Boulbitch, K. Jacobson, and E. Sackmann. 1998. *Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry*. Biophys. J. 75:2038-2049.
- [125] Wagner, O., J. Zinke, P. Dancker, W. Grill, and J. Bereiter-Hahn. 1999. *Viscoelastic properties of f-actin, microtubules, f-actin/ α -actinin, and f-actin/hexokinase determined in microliter volumes with a novel nondestructive method*. Biophys. J. 76:2784-2796.
- [126] Mahaffy, R.E., C.K. Shih, F.C. MacKintosh, and J. Käs. 2000. *Scanning probe-based frequency-dependent microrheology of polymer gels and biological cells*. Phys. Rev. Lett. 85:880-883.
- [127] Dannöhl, S. 1998. *Biophysikalische Untersuchungen auf zellulärer Ebene für die Orthopädie*. Zulassungsarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [128] Branemark, P.I., B.O. Hansson, R. Adell, U. Breine, J. Lindstrom, O. Hallen, and A. Ohman. 1977. *Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw*. Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Suppl. 16.1 1977. 16:7-132.
- [129] Sinha, R.K., F. Morris, S.A. Shah, and R.S. Tuan. 1994. *Surface Composition of Orthopaedic Implant Metals Regulates Cell Attachment, Spreading, and Cytoskeletal Organization of Primary Human Osteoblasts in Vitro*. Clin. Orthop. Related Res. 305:258-272.
- [130] Kieswetter, H., Z. Schwartz, D.D. Dean, and B.D. Boyan. 1996. *The Role of Implant Surface Characteristics in the Healing of Bone*. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 7:329-345.
- [131] Cooper, L.F., T. Masuda, P.K. Yliheikkilä, and D.A. Felto. 1998. *Generalizations Regarding the Process and Phenomenon of Osseointegration. Part II. In Vitro Studies*. J. Oral Maxillofac. Implants. 13:163-174.
- [132] Fung, Y.C. 1993. *Biomechanics - mechanical properties of living tissues*. Springer, New York.
- [133] Hartmann, L.C., M.A. Meenaghan, N.G. Schaaf, and P.B. Hawker. 1989. *Effects of pretreatment sterilization and cleaning methods on materials properties and osseointegration of a threaded implant*. J. Oral Maxillofac. Implants. 4:11-18.
- [134] Groessner-Schreiber, B., and R.S. Tuan. 1992. *Enhanced extracellular matrix production and mineralization by osteoblasts cultured on titanium surfaces in vitro*. J. Cell Sci. 101:209-217.
- [135] Larsson, C., P. Thomsen, B.O. Aronsson, M. Rodahl, J. Lausmaa, B. Kasemo, and L.E. Ericson. 1996. *Bone response to surface-modified titanium implants: studies on the early tissue response to machined and electropolished implants with different oxide thicknesses*. Biomaterials. 17:605-616.
- [136] Urban, R.M., J.J. Jacobs, D.R. Sumner, C.L. Peters, F.R. Voss, and J.O. Galante. 1996. *The Bone-Implant Interface of Femoral Stems with Non-Circumferential Porous Coating*. J. Bone Joint Surg. 78A:1068-1081.

- [137] Hanawa, T., Y. Kamiura, S. Yamamoto, T. Kohgo, A. Amemiya, H. Ukai, K. Murakami, and K. Asaoka. 1997. *Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia*. J. Biomed. Mater. Res. 36:131-136.
- [138] Gronowicz, G., and M.B. McCarthy. 1996. *Response of Human Osteoblasts to Implant Materials: Integrin-Mediated Adhesion*. J. Orthop. Res. 14:878-887.
- [139] Okamoto, K., T. Matsuura, R. Hosokawa, and Y. Akagawa. 1997. *RGD Peptides Regulate the Specific Adhesion Scheme of Osteoblasts to Hydroxyapatite but not to Titanium*. J. Dent. Res. 77:481-487.
- [140] McClay, D.R., M. Wessel, and R.B. Marchase. 1981. *Intercellular recognition: quantitation of initial binding events*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:4975-4979.
- [141] Piper, J.W., R.A. Swerlick, and C. Zhu. 1998. *Determining Force Dependence of Two-Dimensional Receptor-Ligand Binding Affinity by Centrifugation*. Biophys. J. 74:492-513.
- [142] Digital Instruments. 1993. *NanoScope III Control System User's Manual*. v3.0. 12.60-12.69.
- [143] Petersen, N.O., W.B. McConnaughey, and E.L. Elson. 1982. *Dependence of locally measured cellular deformability on position on the cell, temperature and cytochalasin B*. Proc. Natl. Acad. Sci. 79:5327-5331.
- [144] Bereiter-Hahn, J. 1995. *Probing biological cells and tissues with acoustic microscopy*. Advances in Acoustic Microscopy. 1:79-115.
- [145] Thie, M., R. Röspe, W. Dettmann, M. Benoit, M. Ludwig, H.E. Gaub, and H.-W. Denker. 1998. *Interactions between trophoblast and uterine epithelium: monitoring of adhesive forces*. Hum. Reprod. 13:3211-3219.
- [146] Benoit, M., D. Gabriel, G. Gerisch, and H.E. Gaub. 2000. *Discrete interactions in cell adhesion measured by force spectroscopy*. Nat. Cell Biol. 2:313-317.
- [147] Antoni, H. 1997. *Erregungsphysiologie des Herzens*. In: Physiologie des Menschen. Springer, Berlin Heidelberg New York. 472-497.
- [148] Noble, D. 1984. *The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology*. J. Physiol. (Lond.). 353:1-50.
- [149] Shepherd, N., M. Vornanen, and G. Isenberg. 1990. *Force measurements from voltage-clamped guinea pig ventricular myocytes*. Am. J. Physiol. 258:H452-H459.
- [150] Brady, A.J. 1991. *Mechanical properties of isolated cardiac myocytes*. Physiol. Rev. 71:413-428.
- [151] Arnsdorf, M.F., and X. Shaohua. 1996. *Atomic (scanning) force microscopy in cardiovascular research*. J. Cardiovasc. Electrophys. 7:639-652.
- [152] Parak, W.J., M. George, J. Domke, M. Radmacher, J.C. Behrends, M.C. Denyer, and H.E. Gaub. 2000. *Can the light-addressable potentiometric sensor (LAPS) detect extracellular potentials of cardiac myocytes?* IEEE Trans. Biomed. Eng. 47:1106-1113.
- [153] Clay, J.R., and R.L. DeHaan. 1979. *Fluctuations in interbeat interval in rhythmic heart-cell clusters*. Biophys. J. 28:377-389.
- [154] Clay, J.R., R.M. Brochu, and A. Shrier. 1990. *Phase resetting of embryonic chick atrial heart cell aggregates*. Biophys. J. 58:609-621.
- [155] Blondel, B., I. Roijen, and J.P. Cheneval. 1971. *Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts*. Experientia. 27.

- [156] Spach, M.S., and P.C. Dolber. 1986. *Relating extracellular potentials and their derivatives to anisotropic propagation at a microscopic level in human cardiac muscle*. Circ. Res. 58:356-371.
- [157] Palmer, R.E., A.J. Brady, and K.P. Roos. 1996. *Mechanical measurements from isolated cardiac myocytes using a pipette system*. Am. J. Physiol. 270:C697-C704.
- [158] Hill, A.V. 1938. *The heat of shortening and the dynamic constants of muscle*. Proc. Roy. Soc. B. 126:136-195.
- [159] McDonald, K.S., M.R. Wolff, and R.L. Moss. 1998. *Force-velocity and power-load curves in rat skinned cardiac myocytes*. J. Physiol. 511:519-531.
- [160] Guyton, A.C., and J.E. Hall. 1996. *Textbook of Medical Physiology*. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- [161] McDonald, K.S. 2000. *Ca²⁺ dependence of loaded shortening in rat skinned cardiac myocytes and skeletal muscle fibres*. J. Physiol. 525:169-181.
- [162] Roux, W. 1895. *Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen, Teil I und II*. Engelmann, Leipzig.
- [163] Jones, D., G. Leivseth, and G. Tenbosch. 1995. *Mechano-reception in osteoblast-like cells*. Biochem. Cell Biol. 73:525-534.
- [164] Grabner, B., F. Varga, N. Fratzl-Zelman, E. Luegmayer, H. Glantschnig, M. Rumpler, A. Tatschl, P. Fratzl, and K. Klaushofer. 2000. *A new stretching apparatus for applying anisotropic mechanical strain to bone cell in-vitro*. Rev. Sci. Instrum. 71:3522-3529.
- [165] Forth, W., D. Henschler, W. Rummel, and K. Starke. 1996. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie, sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker*, Heidelberg Berlin Oxford.
- [166] George, M. 1997. *Untersuchungen zur Noninvasiven Membranpotentialmessung mit einem Lichtadressierbaren Potentiometrischen Sensor*. Diplomarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [167] Löbbcke, C. 1997. *Herstellung flacher Goldschichten als Substrate für biophysikalische Untersuchungen*. Diplomarbeit, Sektion Physik, LMU München.
- [168] Barth, F., P. Mühlbauer, F. Nikol, and K. Wörle. 1985. *Mathematische Formeln und Definitionen*. Bayerischer Schulbuchverlag und J. Lindauer Verlag, München.
- [169] Radmacher, M. 1990. *Spontane Bildung von planaren Bilayern auf Festkörperoberflächen aus der Vesikelphase*. Diplomarbeit, Physik-Department, TU München.
- [170] Benoit, M. 2000. *Kraftspektroskopie an lebenden Zellen*. Doktorarbeit, Sektion Physik, LMU München.

Anhang

A Nomenklatur

C_1, C_2	Mooney-Rivlin-Konstanten
D	Probendicke
D_{FEM}	in der Simulation eingesetzte, nominelle Probendicke
D_{fit}	durch einen Fit ermittelte Probendicke (berechnete Probendicke)
E	Elastizitätsmodul, <i>Young's modulus</i>
E_{FEM}	in der Simulation eingesetzter, nomineller E-Modul
E_{fit}	durch einen Fit ermittelter E-Modul (berechneter E-Modul)
F	Auflagekraft
F_{AFM}	Auflagekraft der AFM-Spitze im Parametrischen Modell
$F_{\text{FitParab}}, F_{\text{FitKonus}}$	Auflagekraft des parabolischen und des konusförmigen Stempels in der parametrischen Erweiterung für dünne Proben
F_{G}	Gleitreibungskraft
F_{N}	Normalkraft
$F_{\text{Paraboloid}}, F_{\text{Konus}}$	Auflagekraft des parabolischen bzw. konusförmigen Stempels im Hertzmodell
$\langle H \rangle$	Rauhigkeit
ΔH	Amplitude des Pulses einer Herzmuskelzelle
I_1, I_2	erste und zweite Invariante des Cauchy-Greenschen Deformationstensors
J_3	dritte Invariante des Deformationsgradienttensors
K	Kompressionsmodul, <i>bulk modulus</i>
P_{max}	Leistung einer Herzmuskelzelle bei maximaler Kontraktionsgeschwindigkeit
R	Kugelradius bzw. Krümmungsradius am Apex des Paraboloiden
T	absolute Temperatur
U	Dehnungs-Energie-Funktion, <i>strain energy function</i>
$V_{\text{AFM}}, V_{\text{Kon}}, V_{\text{Seg}}$	Volumen von AFM-Spitze, Konus und Kugelsegment
$W_{\text{Konus}}, W_{\text{Parab}}$	Gewichtungsfunktionen im Parametrischen Modell
a	Kontaktradius
$a_{\text{AFM}}, a_{\text{Konus}}, a_{\text{Paraboloid}}$	Kontaktradius des jeweiligen Stempels
d	Cantileverauslenkung
dH_{Ab}/dt	maximale Geschwindigkeit der Höhenänderung während des Pulsabfalls
dH_{An}/dt	maximale Geschwindigkeit der Höhenänderung während des Pulsanstiegs bzw. charakteristische Kontraktionsgeschwindigkeit
h	Höhe des Konus bzw. Kugelsegments
k_{B}	Boltzmannkonstante
k_{C}	Federkonstante des Cantilevers
Δp	Druckdifferenz

r	Radius der Basisfläche des Konus
s_1	Elliptizität der Zelle
s_2	Flachheit der Zelle
t_{An}, t_{Ab}	An- bzw. Abstiegszeit des Pulses einer Herzmuskelzelle
t_{fwhm}	Halbwertsbreite des Pulses einer Herzmuskelzelle
t_p	Pulsperiode
z	Piezoweg
α	Konuswinkel (halber Öffnungswinkel des Konus)
δ	Eindrückung
ε	(relative) Dehnung
η	dynamische Viskosität
λ	(Längen-) Ausdehnungsverhältnis
μ_G	Gleitreibungskoeffizient
ν	Querkontraktions- oder Poissonzahl, <i>Poisson ratio</i>
σ	Spannung

B Abkürzungen

AFM	<i>atomic force microscope</i>
ATP	Adenosintriphosphat
CAD	<i>computer-aided design</i>
CoCr	Kobaltchrom
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FEM	Finite-Elemente-Methode
MEM	<i>minimum essential medium</i>
PS	Polystyren
REM	Rasterelektronenmikroskop (<i>scanning electron microscope</i>)
RICM	<i>reflection interference contrast microscopy</i>
SAM	<i>scanning acoustic microscope</i>
Ti	Titan
TiV	Titanvanadium
TIRFM	<i>total internal reflection fluorescence microscopy</i>

C Gewichtungsfunktionen

Bei der in Kapitel 4.2 beschriebenen Suche nach geeigneten Gewichtungsfunktionen W_i wurden verschiedene Ansätze getestet. Ein naheliegender und einfacher Ansatz war dabei der einer Exponentialfunktion:

$$W_i = b_{i1} + b_{i2} \cdot \left(\frac{R}{\delta}\right)^{b_{i3}} \quad (C1)$$

Als charakteristische Größe dieses Exponentialansatzes tritt der Kugelradius R der AFM-Spitze auf. Da durch den Kugelradius auch der Übergang vom kugelförmigen Apex in den Konus der AFM-Spitze festgelegt ist, sollte er auch in der Gewichtungsfunktion Einfluß haben. Der durchgeführte Fit wies nach der Optimierung der Koeffizienten eine erstaunliche Genauigkeit auf, die maximale Abweichung auf die Kraftkurven betrug 4,4 pN.

Dies wurde mit komplizierteren Ansätzen verglichen, die beispielsweise den hyperbolischen Tangens beinhalteten:

$$W_i = b_{i1} \cdot \left(b_{i2} + \tanh\left(\frac{\delta}{b_{i3}} - b_{i4}\right) \right) \quad (C2)$$

Hier ergab sich ein Maximalfehler von 39,2 pN, also eine nahezu 9-mal größere Maximalabweichung als bei Ansatz (C1).

Der Maximalfehler im Falle des Fermi-Dirac-Ansatzes (23) sank bis auf 2,4 pN ab, war also nochmals deutlich kleiner als die 4,4 pN im Falle des Exponentialansatzes. Die Abweichungen der Kraftkurvenfits für diese beiden Ansätze sind in Abb. C.1 dargestellt.

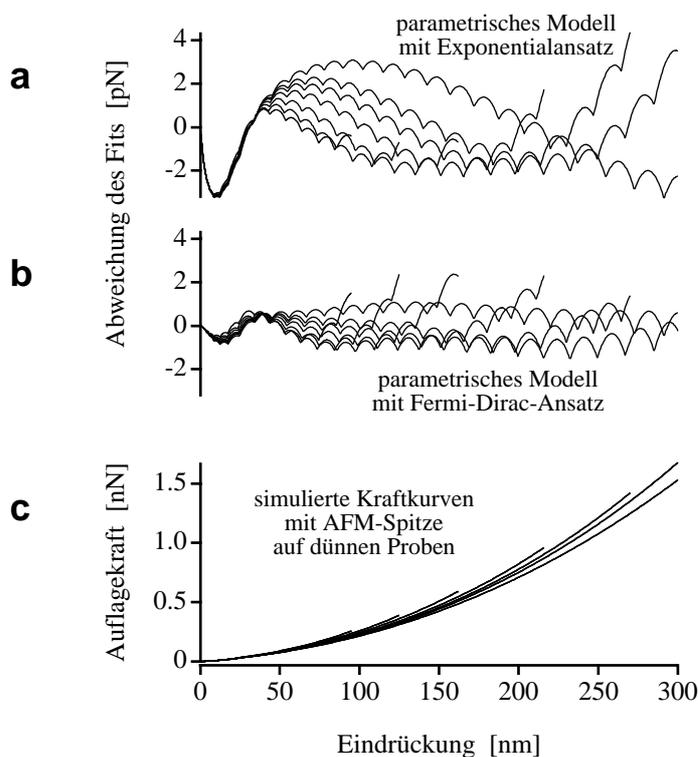


Abb. C.1: Die unten dargestellten simulierten Kraftkurven einer AFM-Spitze auf dünnen Proben (c) wurden mit zwei verschiedenen Ansätzen für die Gewichtungsfunktionen gefittet. Die Abweichungen des optimierten Fits zur Kraftkurve für den Fall eines Exponentialansatzes (a) bzw. eines Fermi-Dirac-Ansatzes (b) sind darüber zu sehen. Die Überlegenheit des Fermi-Dirac-Ansatzes wird besonders für kleine Eindrückungen ($\delta < 50$ nm) deutlich.

Einerseits ist hier deutlich zu sehen, daß auch die durchschnittliche Abweichung für den Fermi-Dirac-Ansatz merklich niedriger ausfällt als beim Exponentialansatz (C1). Andererseits kann man erkennen, daß besonders der Übergangsbereich in der Spitzegeometrie von der Kugel zum Konus, welcher bei einer Eindrückung von 19 nm erfolgt, problematisch ist. Beide Ansätze zeigen in diesem Bereich systematische Abweichungen, wobei der Fit des Fermi-Dirac-Ansatzes auch hier deutlich besser ausfällt: Im Intervall bis 50 nm Eindrückung beträgt die Abweichung bis zu 0,86 pN, für den Exponentialansatz hingegen 3,23 pN.

D Präparation der Gelatineproben

Gelatine (Fluka, Deisenhofen) aus Schweinehaut mit einer Gelstärke von 250 Bloom wurde in 20 ml Millipore-Wasser (Milli-Q plus 185, MilliPore, Eschborn) bei einer Temperatur von 50°C und einer Konzentration von 5 mg/ml unter ständigem Rühren gelöst. Nach 10 Minuten erfolgte die Zugabe von 10 Tropfen einer 2 mg/ml Coomasie-Blau-Lösung (Sigma, Brilliant Blue R, Deisenhofen). Nach weiteren 5 Minuten wurden mit Pasteurpipetten einzelne Tropfen der Lösung als Probe auf unbehandelte Objektträger (Sigma, Precleaned Microscope Slides) getropft. Die Proben wurden anschließend über Nacht getrocknet und am nächsten Tag untersucht. Das Trocknen wie auch die Experimente erfolgten stets bei Zimmertemperatur, also bei etwa 20°C. Im Experiment wurden die Proben zunächst in einer Petrischale in 100% 2-Propanol (Sigma, HPLC Qualität) dehydriert. Das Quellen der Probe erfolgte anschließend durch die schrittweise Zugabe von Millipore-Wasser in kleinen Mengen.

Bei der Positionierung der Probe unter dem AFM ist es wichtig die Kante der Probe und damit auch Teile des Substrats in den abzubildenden Bereich mit einzubeziehen. Zum einen bildet das Substrat bei Höhenmessungen die Bezugshöhe, zum anderen muß beim Force-Mapping die Steigung der Kraftkurven kalibriert werden, was durch die Aufnahme von Referenzkraftkurven auf hartem Material erfolgt (vgl. Kapitel 2.2.5).

E Zellkultur

MTLn3-Zellen

Die Beschreibung der Zellkultur ist ausführlich in [67] beschrieben. Die Zellen wurden bei pH 7,4 in α -MEM mit 5% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden für die Experimente in unbehandelte Petrischalen gesät und vor dem EGF-Experiment in α -MEM, das 35% FBS und 12 mM HEPES-Puffer enthält, ausgehungert. EGF (*epidermal growth factor*) wurde als einzelner Tropfen aus einer konzentrierten Stammlösung der Petrischale zugegeben. Ungefähr fünf Minuten später, setzte die chemotaktische Reaktion der Zelle ein und das Lamellipodium begann sich mit einer Geschwindigkeit von etwa 1,7 $\mu\text{m}/\text{min}$ auszudehnen. Da die Zugabe von EGF wegen des AFM-Aufbaus nicht in unmittelbarer Nähe der Zelle erfolgen konnte, wurde die Reaktion der Zelle verzögert. Der Lockstoff mußte erst durch Diffusion und Konvektion durch das Zellmedium zur Zelle gelangen, die eigentliche

Reaktionszeit der Zelle auf EGF ist daher schneller als die beobachteten fünf Minuten und beträgt etwa ein bis drei Minuten [111].

Osteoblasten

Die Beschreibung der Zellkultur ist ausführlich in [127] beschrieben. Die Zelllinie SaOS2 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) wurde in DMEM/F12 Medium (Gibco) mit 3080 mg/l Hepes (Aldrich, Steinheim), 1200 mg/l NaHCO₃, 100 ml/l FCS, 20 ml/l Penicilin-Streptomycin, 20 ml/l MEM-Vitamine und 12 ml Amphotericin-B (alle: Gibco) kultiviert. Das Medium wurde sterilgefiltert und auf pH 7,4 eingestellt. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von etwa $3 \cdot 10^4$ Zellen/ml 2-3 mm hoch in 35 mm-Petrischalen (Nunc, Wiesbaden) auf die folgenden **Substrate** ausgesät: unbehandelte Petrischalen (Nunc), unbehandelte Deckgläser (Assistent, München) bzw. metallbedampfte Deckgläser. Mit einer von Dipl.-Phys. C. Löbbcke aufgebauten Eigenbau-Aufdampfanlage [167] wurden Titan (Ti), Kobaltchrom (CoCr) und Titanvanadium (TiV) (alle: Goodfellow, Nauheim) thermisch bis zu einer maximalen Schichtdicke von 50 nm auf die Deckgläser aufgedampft. Während des Aufdampfens blieben die Deckgläser auf Zimmertemperatur. Die Untersuchung der Zellen wurde nach zwei Tagen in vitro durchgeführt.

Herzmuskelzellen

Das Präparationsprotokoll und die Kultivierung der Zellen ist ausführlich in [118] beschrieben. Die Herzen wurden 7 Tage alten Hühnerembryos entnommen und enzymatisch dissoziiert. Die Zellsuspension wurde anschließend für eine Stunde in einem Gewebekulturfläschchen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank aufbewahrt. In dieser Zeit lagert sich ein großer Teil der Bindegewebszellen am Boden an, während die Muskelzellen länger in der Zellsuspension verbleiben. Durch diese selektive Adhäsion kann der Anteil der Muskelzellen in der Suspension auf etwa 80% erhöht werden [155].

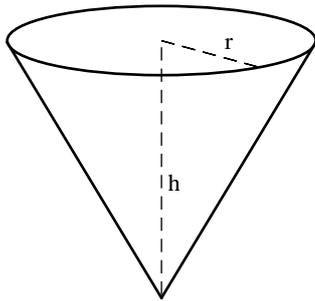
Die Herzmuskelzellen wurden in 35 mm-Petrischalen (Nunc) mit Konzentrationen von etwa $5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ausgesät (zur Untersuchung von einzelnen Zellen). Höhere Konzentrationen ergaben einen zusammenhängenden Zellrasen. Nach 1-2 Tagen in vitro begann ein Großteil der Herzmuskelzellen zu pulsieren.

F Kraftabschätzung zur Erzeugung des Flüssigkeitsstromes

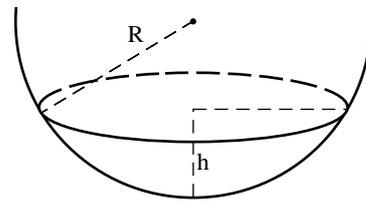
Der Abstand zwischen einer adhärenierten Zelle und dem Substrat beträgt 50 nm und mehr, lediglich an den Orten der Fokalkontakte ist dieser Abstand deutlich kleiner. Werden Kraftkurven auf einer Zelle aufgenommen, so wird die Zelle an dieser Stelle komprimiert und gegen das Substrat bewegt. Dabei wird das im Zwischenraum eingeschlossene Flüssigkeitsvolumen teilweise verdrängt werden und seitlich abfließen. Um die Kraft beurteilen zu können, die zur Erzeugung dieses Flüssigkeitsstromes benötigt wird, soll hier eine einfache Abschätzung vorgenommen werden.

Zur Berechnung des von der AFM-Spitze verdrängten Flüssigkeitsvolumens, wird diese wieder als Konus (Konuswinkel $\alpha = 38,31^\circ$) mit kugelförmigem Apex (Kugelradius $R = 50$ nm)

betrachtet. Das Volumen der AFM-Spitze berechnet sich dann mit Hilfe der Einzelvolumen von Konus und Kugelsegment [168]:

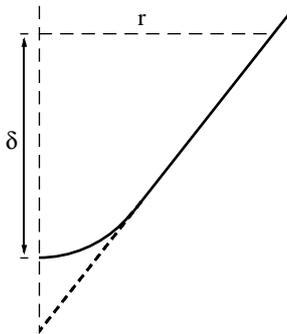


$$V_{\text{Kon}} = \frac{1}{3} \cdot r^2 \cdot \pi \cdot h$$



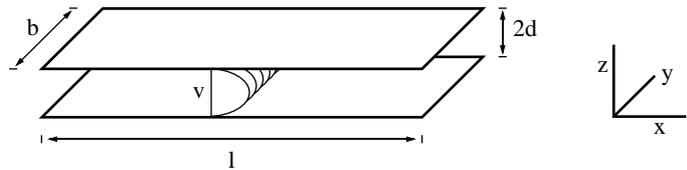
$$V_{\text{Seg}} = \frac{h^2 \cdot \pi}{3} \cdot (3R - h)$$

mit $h = 19 \text{ nm}$, $R = 50 \text{ nm}$



Bei einer Eindrückung $\delta = 100 \text{ nm}$ ergibt sich $r = 103,2 \text{ nm}$; das dabei durch die AFM-Spitze verdrängte Volumen beträgt $V_{\text{AFM}} = 1,4 \cdot 10^{-21} \text{ m}^3$.

Zur Abschätzung des Flüssigkeitsstromes wird die nebenstehende Geometrie zweier paralleler Platten mit dem Abstand $2d$ betrachtet. Die zwischen den Platten in x -Richtung laminar strömende Flüssigkeit bildet dabei ein parabelförmiges Geschwindigkeitsprofil aus. Mit der zwischen den Plattenenden vorliegenden Druckdifferenz Δp und der dynamischen Viskosität η der Flüssigkeit resultiert für die Geschwindigkeit der Flüssigkeit v der folgende Zusammenhang [92, 169]:



$$v = \frac{\Delta p}{2 \cdot \eta \cdot l} \cdot (z^2 - d^2) \quad (\text{F1})$$

Als Volumen V , welches in der Zeit t zwischen den Platten durchströmt, ergibt sich

$$\frac{V}{t} = \int_0^{2d} \int_0^b v \cdot dy \cdot dz = \frac{\Delta p}{3 \cdot \eta \cdot l} \cdot b \cdot d^3 \quad (\text{F2})$$

Als Druckdifferenz dient nun die durch die AFM-Spitze aufgewendete Kraft F , die sich auf der projizierten Kontaktfläche verteilt: $\Delta p = F/r^2 \pi$. Als charakteristische Breite der Platten b wird der Umfang der AFM-Spitze am Ort des Radius r gewählt: $b = 2 \cdot r \cdot \pi$.

Für die Erzeugung des Flüssigkeitsstromes wird somit die folgende Kraft benötigt:

$$F = \frac{3}{2} \cdot \frac{V \cdot r \cdot \eta \cdot l}{t \cdot d^3} \quad (\text{F3})$$

Der dominierende Parameter ist hierbei der Plattenabstand: d geht in der dritten Potenz in die Auflagekraft ein. Die anderen Parameter leisten lediglich lineare Beiträge. Werden die folgenden, für das AFM-Experiment charakteristischen Werte eingesetzt,

$$\begin{aligned} V_{\text{AFM}} &= 1,4 \cdot 10^{-21} \text{ m}^3 & r &= 103 \text{ nm} \\ \eta &= 1 \text{ mPa} \cdot \text{s} & l &= 10 \text{ } \mu\text{m} \\ t &= 0,05 \text{ s} & d &= 25 \text{ nm} \end{aligned}$$

so ergibt sich eine Kraft von $F = 2,8 \text{ pN}$.

Im Gegensatz zur durchgeführten Abschätzung erfolgt im Experiment das Abströmen der Flüssigkeit radial vom Ort der Kraftkurve nach außen. Der Druck wird somit nicht mehr linear, sondern stärker abfallen. Aufgrund der Volumenerhaltung der abströmenden Flüssigkeit wird die Geschwindigkeit nach außen hin abnehmen. Bei gleichbleibender Plattenlänge l (als Größenordnung des halben Lamellipodiumdurchmessers) wird daher ein radial abströmendes Flüssigkeitsvolumen weniger Widerstand erfahren, als in der Abschätzung. Die benötigte Kraft würde daher unter den berechneten $2,8 \text{ pN}$ liegen, die somit eine Obergrenze darstellen sollten. Wie bereits diskutiert beträgt jedoch der Zell-Substrat-Abstand an den Fokalkontakten der Zelle, die eine bedeutende Fläche der Zellunterseite ausmachen können, deutlich weniger als 50 nm . Hier würde folglich das Abfließen des Mediums erschwert. Desweiteren wurde beobachtet, daß Fokalkontakte nahezu ringförmig am Rand der Zelle angeordnet sein können [122]. Dies hätte einen weiteren Anstieg der zur Verdrängung erforderlichen Kraft zur Folge, die somit über der Kraft einer idealisierten Abschätzung liegen würde. Der berechnete Wert von $2,8 \text{ pN}$ kann somit nur einen groben Hinweis auf die Größenordnung der Kraft geben.

Im Falle eines Elastizitätsmodul von 5 kPa , wie er in den diskutierten Experimenten an lebenden Zellen oftmals gemessen wurde, und einer Probendicke von 250 nm , wird eine Eindrückung von 100 nm bereits mit einer Auflagekraft von 65 pN erreicht. Nach der erfolgten Abschätzung ist möglicherweise die dabei zusätzlich aufzuwendende Kraft ein durchaus bedeutender Beitrag und sollte daher in die Diskussion einbezogen werden.

G Ankleben von Glaskugeln auf Cantilever

Die in Kapitel 8.3 verwendeten modifizierten Cantilever wurden nach folgendem Protokoll hergestellt: Zum Ankleben von Glaskugeln mit einem Durchmesser von etwa $40 \text{ } \mu\text{m}$ (Sigma) wird langsam aushärtender Zweikomponentenkleber (Bindulin, Fürth) verwendet. Zunächst wird ein Tropfen der in Alkohol emulgierten Kugeln auf einem Glasobjektträger verteilt und eingetrocknet. Dann wird eine möglichst fein ausgezogene Glaspipette leicht über den frisch vermischten Kleber gezogen und vorsichtig am Objektträger abgestreift (Achtung: Pipette bricht leicht ab!), bis sich nur noch winzige lediglich unter dem Mikroskop erkennbare Klebstofftropfen (sollten deutlich kleiner als die Glaskugeln sein!) an der Pipette befinden. Jeweils ein Klebstofftropfen wird auf das vordere Ende der Cantilever übertragen. Mit einer möglichst dünnen Kanüle wird nun versucht mittels Adhäsion einzelne Glaskugeln aufzugreifen und auf dem Klebstofftropfen auf dem Cantilever zu plazieren. Die Oberflächenspannung des

Tropfens zieht die Kugel dabei in seine Mitte. Die gesamte Arbeit erfolgt unter einem Stereoskop, die Kugeln sind am besten auf schwarzem Untergrund zu sehen. Durch entsprechendes Stapeln der Objektträger als Arbeitsfläche sollten Glaskugeln und Cantilever in der selben Fokusebene liegen. Diese von M. Benoit perfektionierte Methode des Kugelklebens ist ausführlich in [170] beschrieben.

H SOLVIA Pre- und Post-Files

Im folgenden werden die Files der in dieser Arbeit verwendeten Simulationen aufgeführt. Diese wurden möglichst kurz gehalten, indem Überschneidungen mit den vorangestellten Basisfiles herausgekürzt wurden. Dies ist jeweils durch "..." gekennzeichnet.

Variierte Probendicke bei konusförmigem Stempel

PRE-files:

```
* PRE-file von HALBRAUM GEGEN 38.31grad KONUS
*
SET MODE=BATCH
*
DISKFILE SOLVIA10.DAT '/ptmp/uh3i103/SOLVIA10.DAT'
DISKFILE SOLVIA60.DAT '/ptmp/uh3i103/SOLVIA60.DAT'
LIST DISKFILENAMES
*
HEADING 'HALBRAUM GEGEN 38.31grad KONUS ; E=20kPa C2=10Pa'
*
DATABASE CREATE
*
MASTER IDOF=100111 NSTEP=200 DT=1
KINEMATICS DISPLACEMENTS=LARGE STRAINS=LARGE
ITERATION METHOD=FULL-NEWTON LINE-SEARCH=YES
TOLERANCES ETOL=0.0001
*
TIMEFUNCTION 1 / 0. 0. / 4000 1000
*
*
*Knotenkoordinaten:
*
SYSTEM 1
COORDINATES SYSTEM=1
ENTRIES NODE Y Z
*
*Stempelkoordinaten:
*
      1  0      0
      2 237.03  300
*
*
*Koordinaten vom Probennetzwerk:
*
      5  0      0
      6  0     -126
      7 204    -126
      8 204     0
      9  0    -135
     10 204   -135
     11  0   -198
     12 204   -198
     13 238   -198
```

14	238	-135
15	238	-126
16	238	0
19	255	-198
20	255	-126
21	255	0
22	0	-288
23	255	-288
24	340	-288
25	340	-198
26	340	0
27	0	-324
28	357	-324
29	357	-288
30	357	0
31	459	-324
32	459	0
33	0	-540
34	612	-540
35	612	-324
36	612	0
37	0	-1620
38	612	-1620
39	1632	-1620
40	1632	0
41	0	-1728
42	1632	-1728
43	1836	-1728
44	1836	0
45	0	-10000
46	10200	-10000
47	10200	-1728
48	10200	0
49	0	-30000
50	13056	-30000
51	13056	-10000
52	13056	-1728
53	13056	0
54	0	-50000 to
62	13056	-50000
63	24480	-50000
64	24480	-30000
65	24480	-10000
66	24480	-1728
67	24480	0

*

*

*Vernetzungsvorschriften:

*

```

EGROUP 1 PLANE AXISYMMETRIC M=1
LINE STRAIGHT 5 6 RATIO=3 EL=28
LINE STRAIGHT 8 5 RATIO=0.00011 EL=96
LINE STRAIGHT 6 7 EL=96
LINE STRAIGHT 7 8 EL=14
LINE STRAIGHT 7 10 EL=2
LINE STRAIGHT 6 9 EL=2
LINE STRAIGHT 9 10 EL=24
LINE STRAIGHT 9 11 EL=7
LINE STRAIGHT 11 12 EL=12
LINE STRAIGHT 12 13 EL=2
LINE STRAIGHT 10 14 EL=4
LINE STRAIGHT 7 15 EL=4
LINE STRAIGHT 13 14 EL=7
LINE STRAIGHT 10 12 EL=7
LINE STRAIGHT 14 15 EL=1
LINE STRAIGHT 15 16 EL=14
LINE STRAIGHT 8 16 EL=4
LINE STRAIGHT 13 19 EL=1
LINE STRAIGHT 19 20 EL=4
LINE STRAIGHT 20 21 EL=7

```

LINE STRAIGHT 13 15 EL=8
 LINE STRAIGHT 16 21 EL=1
 LINE STRAIGHT 11 22 EL=5
 LINE STRAIGHT 22 23 EL=15
 LINE STRAIGHT 23 24 EL=5
 LINE STRAIGHT 24 25 EL=5
 LINE STRAIGHT 25 26 EL=11
 LINE STRAIGHT 21 26 EL=5
 LINE STRAIGHT 22 27 EL=1
 LINE STRAIGHT 22 29 EL=21
 LINE STRAIGHT 27 28 EL=7
 LINE STRAIGHT 24 26 EL=16
 LINE STRAIGHT 29 30 EL=8
 LINE STRAIGHT 28 30 EL=9
 LINE STRAIGHT 28 31 EL=2
 LINE STRAIGHT 31 32 EL=3
 LINE STRAIGHT 32 36 EL=3
 LINE STRAIGHT 27 33 EL=2
 LINE STRAIGHT 33 34 EL=6
 LINE STRAIGHT 34 35 EL=2
 LINE STRAIGHT 27 35 EL=12
 LINE STRAIGHT 31 35 EL=3
 LINE STRAIGHT 33 37 EL=10
 LINE STRAIGHT 36 38 EL=15
 LINE STRAIGHT 37 38 EL=6
 LINE STRAIGHT 38 39 EL=10
 LINE STRAIGHT 37 41 EL=1
 LINE STRAIGHT 37 39 EL=16
 LINE STRAIGHT 41 42 EL=8
 LINE STRAIGHT 42 43 EL=1
 LINE STRAIGHT 40 42 EL=16
 LINE STRAIGHT 43 44 EL=8
 LINE STRAIGHT 41 45 ratio=2 EL=13
 LINE STRAIGHT 43 44 EL=8
 LINE STRAIGHT 44 48 EL=41
 LINE STRAIGHT 41 47 EL=50
 LINE STRAIGHT 45 46 EL=25
 LINE STRAIGHT 45 51 EL=32
 LINE STRAIGHT 45 49 ratio=3 EL=10
 LINE STRAIGHT 49 50 EL=16
 LINE STRAIGHT 46 51 EL=7
 LINE STRAIGHT 51 52 ratio=0.5 EL=13
 LINE STRAIGHT 52 53 EL=8
 LINE STRAIGHT 48 53 EL=7
 LINE STRAIGHT 49 54 ratio=2 EL=5
 LINE STRAIGHT 54 62 EL=8
 LINE STRAIGHT 52 66 ratio=2 EL=10
 LINE STRAIGHT 50 64 ratio=2 EL=10
 LINE STRAIGHT 62 63 ratio=2 EL=5

*

GSURFACE 5 6 7 8 NODES=4 ADDZONE=C-REGION
 GSURFACE 6 9 10 7 NODES=4
 GSURFACE 9 11 12 10 NODES=4
 GSURFACE 14 10 12 13 NODES=4
 GSURFACE 7 10 14 15 NODES=4
 GSURFACE 16 8 7 15 NODES=4
 GSURFACE 20 15 13 19 NODES=4
 GSURFACE 20 21 16 15 NODES=4
 GSURFACE 22 23 19 11 NODES=4
 GSURFACE 26 21 19 25 NODES=4
 GSURFACE 19 23 24 25 NODES=4
 GSURFACE 27 28 29 22 NODES=4
 GSURFACE 24 29 30 26 NODES=4
 GSURFACE 28 31 32 30 NODES=4
 GSURFACE 27 33 34 35 NODES=4
 GSURFACE 31 35 36 32 NODES=4
 GSURFACE 33 37 38 34 NODES=4
 GSURFACE 38 39 40 36 NODES=4
 GSURFACE 37 41 42 39 NODES=4
 GSURFACE 42 43 44 40 NODES=4

```

GSURFACE 41 45 46 47 NODES=4
GSURFACE 43 47 48 44 NODES=4
GSURFACE 51 45 49 50 NODES=4
GSURFACE 46 51 52 47 NODES=4
GSURFACE 47 52 53 48 NODES=4
GSURFACE 49 54 62 50 NODES=4
GSURFACE 62 63 64 50 NODES=4
GSURFACE 51 50 64 65 NODES=4
GSURFACE 51 65 66 52 NODES=4
GSURFACE 52 66 67 53 NODES=4
*
LINE STRAIGHT N1=1 N2=2 EL=300 RATIO=3
*
*
*Materialeigenschaften:
*
MATERIAL 1 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
*
*
*Randbedingungen,(teils)fixierte Knoten:
*
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22 / 22 27 / 27 33 / 33 37 / 37 41 / 41 45 / 45 49 / 49
54
FIXBOUNDARIES INPUT=LINES / 1 2
*
*
*Definition der beiden Kontaktflächen:
*
CGROUP 1 CONTACT2
CONTACTSURFACE 1 INPUT=LINE / 8 5
CONTACTSURFACE 2 INPUT=LINE ADDZONE=C-REGION / 1 2
CONTACTPAIR 1 TARGET=2 CONTACTOR=1
*
*
*Vorgabe der Eindrückung:sschritte:
*
LOADS DISPLACEMENT / 54 3 1 TO 62 3 1 / 63 3 1 / 739 3 1 TO 742 3 1
*
*
*Definition einiger Beispielzonen (zur graphischen Ausgabe):
*
Zone A GL ymin=0 ymax=400 zmin=-200 zmax=1
Zone B GL ymin=0 ymax=100 zmin=-50 zmax=1
Zone C GL ymin=0 ymax=1500 zmin=-850 zmax=1
Zone D GL ymin=0 ymax=4000 zmin=-2500 zmax=1
Zone E GL ymin=0 ymax=8000 zmin=-5000 zmax=1
*
*
*graphischen Ausgabe:
*
SET PLOTORIENTATION=PORTRAIT
MESH
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH NSYMBOL=MYNODES NNUMBERS=MYNODES
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
SET PLOTORIENTATION=LANDSCAPE
MESH ZONENAME=A
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=B
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=C
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=D
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=E
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
SET PLOTORIENTATION=PORTRAIT
MESH ZONENAME=C-REGION
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=CONTACTS NNUMBERS=NO NSYMBOLS=YES

```

```

PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
*
*
SOLVIA
END
*

```

PRE-file für weitere Eindrückung:

```

*
SET MODE=BATCH
*
*2nd run
*
DISKFILE SOLVIA10.DAT '/ptmp/uh3i103/SOLVIA10.DAT'
DISKFILE SOLVIA60.DAT '/ptmp/uh3i103/SOLVIA60.DAT'
*
HEADING 'HALBRAUM GEGEN 38.31grad KONUS ; E=20kPa C2=10Pa'
*
DATABASE OPEN
*
MASTER MODEX=RESTART NSTEP=200 TSTART=200 DT=1
*
SOLVIA
END
*

```

```

*
...
HEADING '1000er FILM GEGEN 38.31grad KONUS ; E=20kPa C2=10Pa'
...

```

```

36 612 0
37 0 -864
38 612 -864
39 1632 -864
40 1632 0
41 1836 -864
42 1836 0
43 0 -1000
44 1632 -1000
45 1836 -1000
46 6000 -1000
47 6000 -864
48 6000 0
49 24480 -1000
50 24480 -864
51 24480 0

```

```

....
LINE STRAIGHT 33 37 EL=3
LINE STRAIGHT 36 38 EL=8
LINE STRAIGHT 37 38 EL=6
LINE STRAIGHT 38 39 EL=10
LINE STRAIGHT 37 43 EL=1
LINE STRAIGHT 37 39 EL=16
LINE STRAIGHT 39 41 EL=1
LINE STRAIGHT 41 45 EL=1
LINE STRAIGHT 39 40 EL=8
LINE STRAIGHT 41 42 EL=4
LINE STRAIGHT 43 44 EL=8
LINE STRAIGHT 41 47 EL=20
LINE STRAIGHT 45 46 EL=20
LINE STRAIGHT 47 48 EL=4
LINE STRAIGHT 46 47 EL=1
LINE STRAIGHT 46 49 ratio=3 EL=20

```

```

LINE STRAIGHT 47 50    ratio=3  EL=20
...
GSURFACE 37 43 44 39  NODES=4
GSURFACE 44 45 41 39  NODES=4
GSURFACE 39 41 42 40  NODES=4
GSURFACE 41 45 46 47  NODES=4
GSURFACE 42 41 47 48  NODES=4
GSURFACE 47 46 49 50  NODES=4
GSURFACE 48 47 50 51  NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22 / 22 27 / 27 33 / 33 37 / 37 43
...
LOADS DISPLACEMENT / 43 3 1 / 44 3 1 / 45 3 1 / 46 3 1 / 49 3 1 / 514 3 1 TO 520 3 1 / 540 3 1 TO 558 3 1 / 562 3 1
TO 580 3 1
...
*

*

...
HEADING '648er FILM GEGEN 38.31grad KONUS ; C2=10 E=20kPa'
...
    37  0    -648
    38 612   -648
    39 1632  -648
    40 1632    0
    41 1836  -648
    42 1836    0
    43 6000  -648
    44 6000    0
    45 24480 -648
    46 24480  0
...
LINE STRAIGHT 33 37    EL=1
LINE STRAIGHT 36 38    EL=6
LINE STRAIGHT 37 38    EL=6
LINE STRAIGHT 38 39    EL=10
LINE STRAIGHT 37 39    EL=16
LINE STRAIGHT 39 41    EL=2
LINE STRAIGHT 39 40    EL=6
LINE STRAIGHT 41 42    EL=3
LINE STRAIGHT 41 43    EL=20
LINE STRAIGHT 43 45    ratio=3  EL=20
LINE STRAIGHT 43 44    EL=3
...
GSURFACE 40 39 41 42  NODES=4
GSURFACE 41 43 44 42  NODES=4
GSURFACE 44 43 45 46  NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22 / 22 27 / 27 33 / 33 37
...
LOADS DISPLACEMENT / 37 3 1 TO 39 3 1 / 41 3 1 / 43 3 1 / 45 3 1 / 486 3 1 TO 500 3 1 / 508 3 1 TO 545 3 1
...
*

*

...
HEADING '540er FILM GEGEN 38.31grad KONUS ; C2=10 E=20kPa'
...
    37  3600  -540
    38  3600    0
    39 24480  -540
    40 24480    0
...
LINE STRAIGHT 27 33    EL=2
LINE STRAIGHT 34 35    EL=2
LINE STRAIGHT 27 35    EL=12
LINE STRAIGHT 31 35    EL=3
LINE STRAIGHT 33 34    EL=6

```

```

LINE STRAIGHT 34 37 ratio=3 EL=12
LINE STRAIGHT 37 39 ratio=4 EL=25
LINE STRAIGHT 34 36 EL=5
LINE STRAIGHT 39 40 EL=5
...
GSURFACE 31 35 36 32 NODES=4
GSURFACE 34 37 38 36 NODES=4
GSURFACE 37 39 40 38 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22 / 22 27 / 27 33
...
LOADS DISPLACEMENT / 479 3 1 TO 518 3 1 / 33 3 1 / 34 3 1 / 37 3 1 / 39 3 1
...
*

*

...
HEADING '432er FILM GEGEN 38.31grad KONUS ; C2=10 E=20kPa'
...
33 0 -432
34 612 -432
35 612 -324
36 612 0
37 1836 -432
38 1836 0
39 6000 -432
40 6000 0
41 24480 -432
42 24480 0
...
LINE STRAIGHT 32 36 EL=3
LINE STRAIGHT 27 33 EL=1
LINE STRAIGHT 34 35 EL=1
LINE STRAIGHT 27 35 EL=12
LINE STRAIGHT 31 35 EL=3
LINE STRAIGHT 34 36 EL=4
LINE STRAIGHT 33 34 EL=12
LINE STRAIGHT 34 37 ratio=2 EL=10
LINE STRAIGHT 37 39 ratio=2 EL=16
LINE STRAIGHT 39 41 ratio=3 EL=20
LINE STRAIGHT 37 38 EL=2
LINE STRAIGHT 41 42 EL=2
...
GSURFACE 31 35 36 32 NODES=4
GSURFACE 34 37 38 36 NODES=4
GSURFACE 37 39 40 38 NODES=4
GSURFACE 39 41 42 40 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22 / 22 27 / 27 33
...
LOADS DISPLACEMENT / 33 3 1 / 34 3 1 / 37 3 1 / 39 3 1 / 41 3 1 / 479 3 1 TO 532 3 1
...
*

*

...
HEADING '324er FILM GEGEN 38.31grad KONUS ; C2=10 E=20kPa'
...
30 357 0
31 500 -324
32 500 0
33 1836 -324
34 1836 0
35 6000 -324
36 6000 0
37 24480 -324
38 24480 0
...

```

```

LINE STRAIGHT 22 27 EL=1
LINE STRAIGHT 22 29 EL=21
LINE STRAIGHT 24 26 EL=16
LINE STRAIGHT 29 30 EL=8
LINE STRAIGHT 28 30 EL=9
LINE STRAIGHT 27 28 EL=7
LINE STRAIGHT 28 31 ratio=2 EL=2
LINE STRAIGHT 31 33 ratio=2 EL=8
LINE STRAIGHT 33 35 ratio=2 EL=12
LINE STRAIGHT 35 37 ratio=3 EL=18
LINE STRAIGHT 31 32 EL=3
LINE STRAIGHT 35 36 EL=3
...
GSURFACE 28 31 32 30 NODES=4
GSURFACE 31 33 34 32 NODES=4
GSURFACE 33 35 36 34 NODES=4
GSURFACE 35 37 38 36 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22 / 22 27
...
LOADS DISPLACEMENT / 27 3 1 / 28 3 1 / 31 3 1 / 33 3 1 / 35 3 1 / 37 3 1 / 464 3 1 TO 505 3 1
...
*

*

...
HEADING '216er FILM GEGEN 38.31grad KONUS ; C2=10 E=20kPa'
...
TIMEFUNCTION 1 / 0. 0. / 5000 1000
...
22 0 -216
23 255 -216
24 340 -216
25 340 -198
26 340 0
27 370 -216
28 370 0
29 500 -216
30 500 0
31 1836 -216
32 1836 0
33 6000 -216
34 6000 0
35 24480 -216
36 24480 0
...
LINE STRAIGHT 16 21 EL=1
LINE STRAIGHT 11 22 EL=1
LINE STRAIGHT 24 25 EL=1
LINE STRAIGHT 25 26 EL=11
LINE STRAIGHT 21 26 EL=5
LINE STRAIGHT 24 26 EL=12
LINE STRAIGHT 22 23 EL=15
LINE STRAIGHT 23 24 EL=5
LINE STRAIGHT 24 27 EL=1
LINE STRAIGHT 27 29 ratio=2 EL=2
LINE STRAIGHT 29 31 ratio=2 EL=8
LINE STRAIGHT 31 33 ratio=2 EL=12
LINE STRAIGHT 33 35 ratio=3 EL=18
LINE STRAIGHT 27 28 EL=6
LINE STRAIGHT 29 30 EL=2
LINE STRAIGHT 35 36 EL=2
...
GSURFACE 19 23 24 25 NODES=4
GSURFACE 27 28 26 24 NODES=4
GSURFACE 27 29 30 28 NODES=4
GSURFACE 29 31 32 30 NODES=4
GSURFACE 31 33 34 32 NODES=4
GSURFACE 33 35 36 34 NODES=4

```

```

...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22
...
LOADS DISPLACEMENT / 22 3 1 TO 24 3 1 / 27 3 1 / 29 3 1 / 31 3 1 / 33 3 1 / 35 3 1 / 431 3 1 TO 484 3 1
...
*

```

POST-files:

```

*POST-file von HALBRAUM GEGEN 38.31grad KONUS
*
SET MODE=BATCH
*
DISKFILE POST01.DBS '/ptmp/uh3i103/POST01.DBS'
DISKFILE SOLVIA10.DAT '/ptmp/uh3i103/SOLVIA10.DAT'
DISKFILE SOLVIA60.DAT '/ptmp/uh3i103/SOLVIA60.DAT'
*
DATABASE CREATE
*
*
*Datei zur Datenausgabe der Kräfte und Verschiebungen der nachfolgenden Knoten:
*
WRITE FILENAME='kon50k.lis'
*
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 5 45 49 54 63 67 48 40
*
*Definition von Zonen zur graphischen Ausgabe,
die nicht aus PRE-file übernommen werden:
*
ZONE C GL ymin=0 ymax=100 zmin=-100 zmax=0
ZONE B GL ymin=0 ymax=400 zmin=-500 zmax=0
*
SET PLOTORIENTATION=portrait
MESH
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH OUTLINE=YES CONTOUR=MISES VECTOR=REACTION
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH OUTLINE=YES CONTOUR=MISES VECTOR=DISPLACEMENT
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH OUTLINE=YES CONTOUR=SYZ
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH OUTLINE=YES CONTOUR=SPMIN
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
SET PLOTORIENTATION=PORTRAIT
MESH ZONENAME=C-REGION OUTLINE=YES CONTOUR=MISES
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=CONTACTS OUTLINE=YES CONTOUR=SYZ
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=B TIME=50
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=B TIME=100
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=B
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
SET PLOTORIENTATION=landscape
MESH ZONENAME=C TIME=50
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=C TIME=100
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
MESH ZONENAME=C
PLOT GRAPHICS=POSTSCRIPT
*
NLIST ZONENAME=DATENPUNKTE R=T TST=0 TE=2000
SUMMATION ZONENAME=C1 KIND=CONTACTS TST=0 TE=2000
*
END

```

```

*
*
*1000er FILM GEGEN 38.31grad KONUS
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1  2  5  45  49  52  54  48  40  630  680
...
*
*
*648er FILM GEGEN 38.31grad KONUS
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1  2  5  22  37  45  46  40  490  520
...
*
*
*540er FILM GEGEN 38.31grad KONUS
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1  2  5  22  33  37  39  40  36  8  500
...
*
*
*432er FILM GEGEN 38.31grad KONUS
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1  2  5  22  33  37  41  42  38  510
...
*
*
*324er FILM GEGEN 38.31grad KONUS
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1  2  5  11  27  37  38  30  470  500
...
*
*
*216er FILM GEGEN 38.31grad KONUS
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1  2  5  6  22  31  35  36  30  440  480
...
*

```

Variierte Probendicke mit AFM-Spitze als Stempel

```

*
...
HEADING 'HALBRAUM GEGEN AFM-SPITZE E=20kPa C2=10'
...
TIMEFUNCTION 1 / 0. 0. / 4000 2000
*
*
*Knotenkoordinaten kugelförmiger Apex des Stempels:
*
SYSTEM 1 CYLINDRIC Z=50
COORDINATES SYSTEM=1
ENTRIES NODE R THETA
      1  50 -90

```

2 50 -38.31
LINE INTERPOLATED N1=1 N2=2 EL=400 SYSTEM=1

*
*

**Koordinaten des konusförmigen Stempelteils:*

*

SYSTEM 2

COORDINATES SYSTEM=2

ENTRIES NODE Y Z

* 60 39.232 19.003 das ist auch punkt 2
61 355.3 419

*
*

**Koordinaten vom Probennetzwerk:*

*

5	0	0
6	0	-252
7	408	-252
8	408	0
9	0	-270
10	408	-270
11	0	-396
12	408	-396
13	476	-396
14	476	-270
15	476	-252
16	476	0
19	510	-396
20	510	-252
21	510	0
22	0	-576
23	510	-576
24	680	-576
25	680	-396
26	680	0
27	0	-648
28	714	-648
29	714	-576
30	714	0
31	918	-648
32	918	0
33	0	-1080
34	1224	-1080
35	1224	-648
36	1224	0
37	0	-3240
38	1224	-3240
39	3264	-3240
40	3264	0
41	0	-3456
42	3264	-3456
43	3672	-3456
44	3672	0
45	0	-15000
46	24480	-15000
47	24480	-3456
48	24480	0
49	0	-100000
50	24480	-100000

*

EGROUP 1 PLANE AXISYMMETRIC M=1

LINE STRAIGHT 5 6 RATIO=3 EL=28

LINE STRAIGHT 8 5 RATIO=0.0015 EL=48

LINE STRAIGHT 6 7 EL=48

LINE STRAIGHT 7 8 EL=14

LINE STRAIGHT 6 9 EL=1

LINE STRAIGHT 9 10 EL=24

LINE STRAIGHT 9 11 EL=7

LINE STRAIGHT 11 12 EL=12

LINE STRAIGHT 12 13 EL=2

LINE STRAIGHT	10	14	EL=4	
LINE STRAIGHT	7	15	EL=4	
LINE STRAIGHT	13	14	EL=7	
LINE STRAIGHT	10	12	EL=7	
LINE STRAIGHT	14	15	EL=1	
LINE STRAIGHT	15	16	EL=14	
LINE STRAIGHT	8	16	EL=4	
LINE STRAIGHT	13	19	EL=1	
LINE STRAIGHT	19	20	EL=4	
LINE STRAIGHT	20	21	EL=7	
LINE STRAIGHT	13	15	EL=8	
LINE STRAIGHT	16	21	EL=1	
LINE STRAIGHT	11	22	EL=5	
LINE STRAIGHT	22	23	EL=15	
LINE STRAIGHT	23	24	EL=5	
LINE STRAIGHT	24	25	EL=5	
LINE STRAIGHT	25	26	EL=11	
LINE STRAIGHT	21	26	EL=5	
LINE STRAIGHT	22	27	EL=1	
LINE STRAIGHT	22	29	EL=21	
LINE STRAIGHT	27	28	EL=7	
LINE STRAIGHT	24	26	EL=16	
LINE STRAIGHT	29	30	EL=8	
LINE STRAIGHT	28	30	EL=9	
LINE STRAIGHT	28	31	EL=2	
LINE STRAIGHT	31	32	EL=3	
LINE STRAIGHT	32	36	EL=3	
LINE STRAIGHT	27	33	EL=2	
LINE STRAIGHT	33	34	EL=6	
LINE STRAIGHT	34	35	EL=2	
LINE STRAIGHT	27	35	EL=12	
LINE STRAIGHT	31	35	EL=3	
LINE STRAIGHT	33	37	EL=10	
LINE STRAIGHT	36	38	EL=15	
LINE STRAIGHT	37	38	EL=6	
LINE STRAIGHT	38	39	EL=10	
LINE STRAIGHT	37	41	EL=1	
LINE STRAIGHT	37	39	EL=16	
LINE STRAIGHT	41	42	EL=8	
LINE STRAIGHT	42	43	EL=1	
LINE STRAIGHT	40	42	EL=16	
LINE STRAIGHT	43	44	EL=8	
LINE STRAIGHT	41	45	ratio=3	EL=10
LINE STRAIGHT	43	44	EL=8	
LINE STRAIGHT	44	48	EL=51	
LINE STRAIGHT	41	47	EL=60	
LINE STRAIGHT	45	46	EL=30	
LINE STRAIGHT	45	49	ratio=3	EL=20
LINE STRAIGHT	49	50	EL=15	

*

GSURFACE	5	6	7	8	NODES=4	ADDZONE=C-REGION
GSURFACE	6	9	10	7	NODES=4	
GSURFACE	9	11	12	10	NODES=4	
GSURFACE	14	10	12	13	NODES=4	
GSURFACE	7	10	14	15	NODES=4	
GSURFACE	16	8	7	15	NODES=4	
GSURFACE	20	15	13	19	NODES=4	
GSURFACE	20	21	16	15	NODES=4	
GSURFACE	22	23	19	11	NODES=4	
GSURFACE	26	21	19	25	NODES=4	
GSURFACE	19	23	24	25	NODES=4	
GSURFACE	27	28	29	22	NODES=4	
GSURFACE	24	29	30	26	NODES=4	
GSURFACE	28	31	32	30	NODES=4	
GSURFACE	27	33	34	35	NODES=4	
GSURFACE	31	35	36	32	NODES=4	
GSURFACE	33	37	38	34	NODES=4	
GSURFACE	38	39	40	36	NODES=4	
GSURFACE	37	41	42	39	NODES=4	
GSURFACE	42	43	44	40	NODES=4	

```

GSURFACE 41 45 46 47  NODES=4
GSURFACE 43 47 48 44  NODES=4
GSURFACE 45 49 50 46  NODES=4
*
LINE STRAIGHT N1=2 N2=61 EL=200
LINE COMBINED N1=1 N2=61 I1=2
*
...
*
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22 / 22 27 / 27 33 / 33 37 / 37 41 /
41 45 / 45 49
FIXBOUNDARIES INPUT=LINES / 1 61
*
CGROUP 1 CONTACT2
CONTACTSURFACE 1 INPUT=LINE / 8 5
CONTACTSURFACE 2 INPUT=LINE ADDZONE=C-REGION / 1 61
CONTACTPAIR 1 TARGET=2 CONTACTOR=1
*
LOADS DISPLACEMENT / 49 3 1 / 50 3 1 / 1004 3 1 to 1017 3 1
*
...
*
...
HEADING '1000er FILM GEGEN AFM-SPITZE E=20kPa C2=10'
...
32 918 0
33 1224 -648
34 1224 0
35 0 -1000 to
41 1224 -1000
42 24480 -1000
43 24480 -648
44 24480 0
...
LINE STRAIGHT 31 32 EL=3
LINE STRAIGHT 32 34 EL=3
LINE STRAIGHT 27 35 EL=2
LINE STRAIGHT 35 41 EL=6
LINE STRAIGHT 27 33 EL=12
LINE STRAIGHT 31 33 EL=3
LINE STRAIGHT 33 34 EL=3
LINE STRAIGHT 33 41 EL=2
LINE STRAIGHT 41 42 ratio=4 EL=50
...
GSURFACE 28 31 32 30 NODES=4
GSURFACE 27 35 41 33 NODES=4
GSURFACE 31 33 34 32 NODES=4
GSURFACE 33 41 42 43 NODES=4
GSURFACE 33 43 44 34 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22 / 22 27 / 27 35
...
LOADS DISPLACEMENT / 35 3 1 TO 41 3 1 / 42 3 1 / 782 3 1 to 830 3 1
...
*
*
...
HEADING '648er FILM GEGEN AFM-SPITZE E=20kPa C2=10'
...
26 680 0
27 0 -648 to
34 714 -648
35 714 -576
36 714 0
37 1000 -648
38 1000 0

```

```

39 24480 -648
40 24480 0
...
LINE STRAIGHT 22 27 EL=1
LINE STRAIGHT 22 35 EL=21
LINE STRAIGHT 27 34 EL=7
LINE STRAIGHT 24 26 EL=16
LINE STRAIGHT 35 36 EL=8
LINE STRAIGHT 34 36 EL=9
LINE STRAIGHT 34 37 ratio=2 EL=2
LINE STRAIGHT 37 38 EL=3
LINE STRAIGHT 37 39 ratio=4 EL=50
...
GSURFACE 19 23 24 25 NODES=4
GSURFACE 27 34 35 22 NODES=4
GSURFACE 24 35 36 26 NODES=4
GSURFACE 34 37 38 36 NODES=4
GSURFACE 37 39 40 38 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22 / 22 27
...
LOADS DISPLACEMENT
27 3 1 TO 34 3 1 / 765 3 1 / 37 3 1 / 768 3 1 to 816 3 1 / 39 3 1
...
*

*

...
HEADING '540er FILM GEGEN AFM-SPITZE E=20kPa C2=10'
...
22 0 -540
23 680 -540
24 680 -396
25 680 0
26 770 -540
27 770 0
28 24480 -540
29 24480 0
...
LINE STRAIGHT 16 21 EL=1
LINE STRAIGHT 11 22 EL=4
LINE STRAIGHT 22 23 EL=20
LINE STRAIGHT 19 21 EL=11
LINE STRAIGHT 23 25 EL=15
LINE STRAIGHT 21 25 EL=5
LINE STRAIGHT 26 27 EL=5
LINE STRAIGHT 26 28 ratio=5 EL=50
...
GSURFACE 20 21 16 15 NODES=4
GSURFACE 22 23 24 11 NODES=4
GSURFACE 25 21 19 24 NODES=4
GSURFACE 23 26 27 25 NODES=4
GSURFACE 26 28 29 27 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22
...
LOADS DISPLACEMENT
22 3 1 / 721 3 1 TO 739 3 1 / 23 3 1 / 26 3 1 / 761 3 1 to 809 3 1 / 28 3 1
...
*

*

...
HEADING '432er FILM GEGEN AFM-SPITZE E=20kPa C2=10'
...
22 0 -432
23 680 -432
24 680 -396

```

```

25 680 0
26 770 -432
27 770 0
28 24480 -432
29 24480 0
...
LINE STRAIGHT 16 21 EL=1
LINE STRAIGHT 11 22 EL=1
LINE STRAIGHT 22 23 EL=20
LINE STRAIGHT 19 21 EL=11
LINE STRAIGHT 23 25 EL=12
LINE STRAIGHT 21 25 EL=5
LINE STRAIGHT 26 27 EL=4
LINE STRAIGHT 26 28 ratio=5 EL=50
...
GSURFACE 20 21 16 15 NODES=4
GSURFACE 22 23 24 11 NODES=4
GSURFACE 25 21 19 24 NODES=4
GSURFACE 23 26 27 25 NODES=4
GSURFACE 26 28 29 27 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11 / 11 22
...
LOADS DISPLACEMENT
22 3 1 / 718 3 1 TO 736 3 1 / 23 3 1 / 26 3 1 / 754 3 1 to 802 3 1 / 28 3 1
...
*

*

...
HEADING '324er FILM GEGEN AFM-SPITZE E=20kPa C2=10'
...
10 408 -270
11 0 -324
12 408 -324
13 476 -324
14 476 -270
15 476 -252
16 476 0
19 510 -324
20 510 -252
21 510 0
22 680 -324
23 680 0
24 770 -324
25 770 0
26 24480 -324
27 24480 0
...
LINE STRAIGHT 6 9 EL=1
LINE STRAIGHT 9 10 EL=24
LINE STRAIGHT 9 11 EL=3
LINE STRAIGHT 11 12 EL=12
LINE STRAIGHT 12 13 EL=2
LINE STRAIGHT 10 14 EL=4
LINE STRAIGHT 7 15 EL=4
LINE STRAIGHT 10 12 EL=3
LINE STRAIGHT 14 15 EL=1
LINE STRAIGHT 15 16 EL=14
LINE STRAIGHT 8 16 EL=4
LINE STRAIGHT 13 19 EL=1
LINE STRAIGHT 19 20 EL=2
LINE STRAIGHT 20 21 EL=7
LINE STRAIGHT 13 15 EL=4
LINE STRAIGHT 13 16 EL=18
LINE STRAIGHT 16 21 EL=1
LINE STRAIGHT 19 21 EL=9
LINE STRAIGHT 19 22 EL=5
LINE STRAIGHT 23 25 EL=1

```

```

LINE STRAIGHT 24 25 EL=3
LINE STRAIGHT 24 26 ratio=5 EL=50
...
GSURFACE 16 8 7 15 NODES=4
GSURFACE 21 16 13 19 NODES=4
GSURFACE 23 21 19 22 NODES=4
GSURFACE 22 24 25 23 NODES=4
GSURFACE 24 26 27 25 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 11
...
LOADS DISPLACEMENT
11 3 1 / 659 3 1 TO 669 3 1 / 12 3 1 / 670 3 1 / 13 3 1 / 19 3 1 /
704 3 1 to 707 3 1 / 22 3 1 / 24 3 1 / 710 3 1 TO 758 3 1 / 26 3 1
...
*

*

...
HEADING '250er FILM GEGEN AFM-SPITZE E=20kPa C2=10'
...
TIMEFUNCTION 1 / 0. 0. / 4000 1000
...
5 0 0
6 0 -250
7 408 -250
8 408 0
9 550 -250
10 550 0
11 1000 -250
12 1000 0
13 24480 -250
14 24480 0
...
EGROUP 1 PLANE AXISYMMETRIC M=1
LINE STRAIGHT 5 6 RATIO=3 EL=32
LINE STRAIGHT 8 5 RATIO=0.0015 EL=48
LINE STRAIGHT 6 7 EL=48
LINE STRAIGHT 7 8 EL=16
LINE STRAIGHT 7 9 RATIO=3 EL=5
LINE STRAIGHT 9 10 EL=8
LINE STRAIGHT 9 11 RATIO=3 EL=5
LINE STRAIGHT 11 12 EL=4
LINE STRAIGHT 11 13 ratio=5 EL=50
...
GSURFACE 5 6 7 8 NODES=4 ADDZONE=C-REGION
GSURFACE 7 9 10 8 NODES=4
GSURFACE 9 11 12 10 NODES=4
GSURFACE 14 12 11 13 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6
...
LOADS DISPLACEMENT
6 3 1 / 578 3 1 TO 624 3 1 / 7 3 1 / 640 3 1 to 643 3 1 / 9 3 1 /
651 3 1 to 654 3 1 / 11 3 1 / 658 3 1 TO 706 3 1 / 13 3 1
...
*

*

...
HEADING '190er FILM GEGEN AFM-SPITZE E=20kPa C2=10'
...
TIMEFUNCTION 1 / 0. 0. / 16000 2000
...
5 0 0
6 0 -190
7 320 -190
8 320 0

```

```

    9   540  -190
   10   540   0
   11  1000 -190
   12  1000   0
   13 24480 -190
   14 24480   0
...
EGROUP 1 PLANE AXISYMMETRIC M=1
LINE STRAIGHT 5 6 RATIO=3 EL=32
LINE STRAIGHT 8 5 RATIO=0.0015 EL=42
LINE STRAIGHT 7 8 EL=16
LINE STRAIGHT 6 7 RATIO=1.2 EL=42
LINE STRAIGHT 7 9 RATIO=3 EL=7
LINE STRAIGHT 9 11 RATIO=3 EL=5
LINE STRAIGHT 11 13 ratio=5 EL=40
LINE STRAIGHT 9 10 EL=8
LINE STRAIGHT 11 12 EL=4
...
GSURFACE 5 6 7 8 NODES=4 ADDZONE=C-REGION
GSURFACE 7 9 10 8 NODES=4
GSURFACE 9 11 12 10 NODES=4
GSURFACE 14 12 11 13 NODES=4
...
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6
...
LOADS DISPLACEMENT
6 3 1 / 7 3 1 / 9 3 1 / 11 3 1 / 13 3 1 / 587 3 1 TO 676 3 1
...
*
*
*
* POST-file von HALBRAUM GEGEN AFM-SPITZE
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 92 5 41 45 49 50 48 44
...
*
*
* 1000er FILM GEGEN AFM-SPITZE
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 62 5 22 35 42 43 44 34
...
*
*
* 648er FILM GEGEN AFM-SPITZE
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 62 5 11 27 39 40 38
...
*
*
* 540er FILM GEGEN AFM-SPITZE
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 62 5 9 22 28 29 27
...
*
*
* 432er FILM GEGEN AFM-SPITZE
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 62 5 9 22 28 29 27
...
*

```

```

*
*324er FILM GEGEN AFM-SPITZE
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 62 5 6 11 26 27 25
...
*

```

```

*
*250er FILM GEGEN AFM-SPITZE
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 62 5 6 13 14 12
...
*

```

```

*
*190er FILM GEGEN AFM-SPITZE
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 62 5 6 9 13 14 12 600 650
...
*

```

Variation des Kugelradius

```

*
...
HEADING '540er FILM GEGEN AFM-SPITZE 40nm Radius'
...
SYSTEM 1 CYLINDRIC Z=40
COORDINATES SYSTEM=1
ENTRIES NODE R THETA
          1 40 -90
          2 40 -38.31
LINE INTERPOLATED N1=1 N2=2 EL=400 SYSTEM=1
*
SYSTEM 2
COORDINATES SYSTEM=2
ENTRIES NODE Y Z
          61 347.43 415.2
...
*

```

```

*
...
HEADING '540er FILM GEGEN AFM-SPITZE 60nm Radius'
...
SYSTEM 1 CYLINDRIC Z=60
COORDINATES SYSTEM=1
ENTRIES NODE R THETA
          1 60 -90
          2 60 -38.31
LINE INTERPOLATED N1=1 N2=2 EL=400 SYSTEM=1
*
SYSTEM 2
COORDINATES SYSTEM=2
ENTRIES NODE Y Z
          61 363.12 422.8
...
*

```

Variation der Reibung

Zur Charakterisierung von Reibungseinflüssen zwischen AFM-Spitze und Probe, wurden die SOLVIA-files des 540nm dicken Films verwendet. Variiert wurde dazu lediglich der Reibungskoeffizient im vollgenden Abschnitt:

```
...
CGROUP 1 CONTACT2
CONTACTSURFACE 1 INPUT=LINE / 8 5
CONTACTSURFACE 2 INPUT=LINE ADDZONE=C-REGION / 1 61
CONTACTPAIR 1 TARGET=2 CONTACTOR=1 FRICTIONKOEFF=0.75
...
```

Variation der Mooney-Rivlin-Konstanten

Die Variation von C_1 und C_2 wurde für zwei Stempelgeometrien durchgeführt: für Konuswinkel von 35° bzw. 80° .

```
*
HEADING 'HALBRAUM GEGEN 35grad KONUS'
...
SYSTEM 1
COORDINATES SYSTEM=1
ENTRIES NODE Y Z
      1 0 0
      2 210.063 300
...
*
```

```
*
HEADING 'HALBRAUM GEGEN 80grad KONUS'
...
SYSTEM 1
COORDINATES SYSTEM=1
ENTRIES NODE Y Z
      1 0 0
      2 567.13 100
...
*
```

Materialvariationen:

```
*
MATERIAL 1 RUBBER C1=1666.67 C2=1666.67 KAPPA=200000000
*
MATERIAL 1 RUBBER C1=2777.78 C2=555.56 KAPPA=200000000
*
MATERIAL 1 RUBBER C1=3000 C2=333.33 KAPPA=200000000
*
MATERIAL 1 RUBBER C1=3233.33 C2=100 KAPPA=200000000
*
MATERIAL 1 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
*
MATERIAL 1 RUBBER C1=3333.33 C2=0 KAPPA=200000000
*
```

Inhomogene (geschichtete) Proben

Als Basisnetz für die Simulation geschichteter Proben wurde das folgende PRE-file verwendet. Anschließend wurden lediglich die Materialparameter der Schichten variiert.

```
*
...
HEADING '810er HOMOGENE PROBE GEGEN AFM-SPITZE E=1:1'
...
TIMEFUNCTION 1 / 0. 0. / 4000 2000
...
    5  0    0
    6  0   -252
    7 408  -252
    8 408   0
    9  0   -270
   10 408  -270
   11  800 -270
   12 800   0
   13 24480 -270
   14 24480   0
   15  0  -405
   16 408  -405
   17  800 -405
   18 24480 -405
   19  0  -540
   20 408  -540
   21  800 -540
   22 24480 -540
   23  0  -810
   24 408  -810
   25  800 -810
   26 24480 -810
*
LINE STRAIGHT N1=2 N2=61 EL=200
LINE COMBINED N1=1 N2=61 I1=2
*
MATERIAL 1 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
MATERIAL 2 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
MATERIAL 3 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
MATERIAL 4 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
*
EGROUP 1 PLANE AXISYMMETRIC M=1
LINE STRAIGHT 5 6 RATIO=3 EL=28
LINE STRAIGHT 8 5 RATIO=0.0015 EL=48
LINE STRAIGHT 6 7 EL=48
LINE STRAIGHT 7 8 EL=14
LINE STRAIGHT 6 9 EL=1
LINE STRAIGHT 9 10 EL=24
LINE STRAIGHT 8 10 EL=15
LINE STRAIGHT 10 11 RATIO=2 EL=4
LINE STRAIGHT 11 12 EL=5
LINE STRAIGHT 11 13 RATIO=15 EL=20
*
GSURFACE 5 6 7 8 NODES=4 ADDZONE=C-REGION
GSURFACE 6 9 10 7 NODES=4
GSURFACE 10 11 12 8 NODES=4
GSURFACE 14 12 11 13 NODES=4
*
EGROUP 2 PLANE AXISYMMETRIC M=2
LINE STRAIGHT 9 15 EL=4
LINE STRAIGHT 15 16 EL=12
LINE STRAIGHT 10 16 EL=4
LINE STRAIGHT 16 17 RATIO=2 EL=4
LINE STRAIGHT 11 17 EL=2
LINE STRAIGHT 17 18 RATIO=15 EL=20
```

```

LINE STRAIGHT 13 18 EL=2
*
GSURFACE 9 15 16 10 NODES=4
GSURFACE 10 16 17 11 NODES=4
GSURFACE 11 17 18 13 NODES=4
*
EGROUP 3 PLANE AXISYMMETRIC M=3
LINE STRAIGHT 15 19 EL=4
LINE STRAIGHT 19 20 EL=6
LINE STRAIGHT 20 16 EL=4
LINE STRAIGHT 20 21 RATIO=2 EL=4
LINE STRAIGHT 21 17 EL=2
LINE STRAIGHT 21 22 RATIO=15 EL=20
LINE STRAIGHT 22 18 EL=2

GSURFACE 15 19 20 16 NODES=4
GSURFACE 16 20 21 17 NODES=4
GSURFACE 18 17 21 22 NODES=4
*
EGROUP 4 PLANE AXISYMMETRIC M=4
LINE STRAIGHT 19 23 EL=4
LINE STRAIGHT 20 24 EL=4
LINE STRAIGHT 21 25 EL=2
LINE STRAIGHT 22 26 EL=2
LINE STRAIGHT 23 24 EL=3
LINE STRAIGHT 24 25 RATIO=2 EL=4
LINE STRAIGHT 25 26 RATIO=15 EL=20
*
GSURFACE 19 23 24 20 NODES=4
GSURFACE 20 24 25 21 NODES=4
GSURFACE 21 25 26 22 NODES=4
*
FIXBOUNDARIES 2 INPUT=LINES / 5 6 / 6 9 / 9 15 / 15 19 / 19 23
FIXBOUNDARIES INPUT=LINES / 1 61
*
CGROUP 1 CONTACT2
CONTACTSURFACE 1 INPUT=LINE / 8 5
CONTACTSURFACE 2 INPUT=LINE ADDZONE=C-REGION / 1 61
CONTACTPAIR 1 TARGET=2 CONTACTOR=1
*
LOADS DISPLACEMENT
23 3 1 / 24 3 1 / 25 3 1 / 26 3 1 / 2637 3 1 to 2660 3 1
...
*

*
...
HEADING '810er MULTILAYER GEGEN AFM-SPITZE E=1:2'
...
MATERIAL 1 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
MATERIAL 2 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
MATERIAL 3 RUBBER C1=6646.67 C2=20 KAPPA=400000000
MATERIAL 4 RUBBER C1=6646.67 C2=20 KAPPA=400000000
...
*

*
...
HEADING '810er MULTILAYER GEGEN AFM-SPITZE E=1:2:4'
...
MATERIAL 1 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
MATERIAL 2 RUBBER C1=6646.67 C2=20 KAPPA=400000000
MATERIAL 3 RUBBER C1=6646.67 C2=20 KAPPA=400000000
MATERIAL 4 RUBBER C1=13293.32 C2=40 KAPPA=800000000
...
*

```

```

*
...
HEADING '810er MULTILAYER GEGEN AFM-SPITZE    E=1:4:10 '
...
MATERIAL 1 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
MATERIAL 2 RUBBER C1=13293.32 C2=40 KAPPA=800000000
MATERIAL 3 RUBBER C1=13293.32 C2=40 KAPPA=800000000
MATERIAL 4 RUBBER C1=33233.3 C2=100 KAPPA=2000000000
...
*

```

```

*
...
HEADING '810er MULTILAYER GEGEN AFM-SPITZE    E=4:1:1 '
...
MATERIAL 1 RUBBER C1=13293.32 C2=40 KAPPA=800000000
MATERIAL 2 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
MATERIAL 3 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
MATERIAL 4 RUBBER C1=3323.33 C2=10 KAPPA=200000000
...
*

```

die auszulesenden Punkte im POST-file waren die folgenden

```

*HEADING '810er MULTILAYER GEGEN AFM-SPITZE '
...
ZONE DATENPUNKTE I=N
  1 2 5 9 15 19 23 25 26
...
*

```

Eigene Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Domke, J., and M. Radmacher. 1998. *Measuring the Elastic Properties of Thin Polymer Films with the Atomic Force Microscope*. Langmuir. 14:3320-3325.

Domke, J., C. Rotsch, P.K. Hansma, K. Jacobson, and M. Radmacher. 1998. *Atomic Force Microscopy of Soft Samples: Gelatin and Living Cells*. In: ACS Symposium Series - Scanning Probe Microscopy of Polymers. American Chemical Society, Washington, DC. 178-193.

Domke, J., W.J. Parak, M. George, H.E. Gaub, and M. Radmacher. 1999. *Mapping the Mechanical Pulse of Single Cardiomyocytes with the Atomic Force Microscope*. Eur. Biophys. J. 28:179-186.

Parak, W.J., J. Domke, M. George, A. Kardinal, M. Radmacher, H.E. Gaub, A.D.G. deRoos, A.P.R. Theuvenet, G. Wiegand, E. Sackmann, and J.C. Behrends. 1999. *Electrically Excitable NRK Fibroblasts - A New Model System for Cell-Semiconductor Hybrids*. Biophys. J. 76:1659-1667.

Rauscher, M., R. Paniago, H. Metzger, Z. Kovats, J. Domke, J. Peisl, H.-D. Pfannes, J. Schulze, and I. Eisele. 1999. *Grazing Incidence Small Angle X-Ray Scattering from Free-Standing Nanostructures*. J. Appl. Phys. 86:6763-6769.

Parak, W.J., M. George, J. Domke, M. Radmacher, J.C. Behrends, M.C. Denyer, and H.E. Gaub. 2000. *Can the Light-Addressable Potentiometric Sensor (LAPS) Detect Extracellular Potentials of Cardiac Myocytes?* IEEE Trans. Biomed. Eng. 47:1106-1113.

Domke, J., S. Dannöhl, W.J. Parak, O. Müller, W.K. Aicher, and M. Radmacher. 2000. *Substrate Dependent Differences in Morphology and Elasticity of Living Osteoblasts Investigated by Atomic Force Microscopy*. Colloids Surf. B Biointerfaces. 19:367-379.

Domke, J., and M. Radmacher. *The Elastic Indentation of thin Films - a Parametric Model for Application in Atomic Force Microscopy, Part I: Theory*. J. Appl. Phys. eingereicht.

Domke, J., and M. Radmacher. *The Elastic Indentation of thin Films - a Parametric Model for Application in Atomic Force Microscopy, Part II: Experiments*. J. Appl. Phys. eingereicht.

Domke, J., and M. Radmacher. *Measuring the Mechanical Transfer Function of Soft Materials with the Atomic Force Microscope*. in Vorbereitung.

Kacher, C., J. Domke, R. Matzke, C. Rotsch, K. Lenzian, M. Radmacher, and M. Fritz. *Elasticity Measurements on Isolated Plant Cuticles in Air and in Water Done with the Atomic Force Microscope*. in Vorbereitung.

Lebenslauf

Jan Domke,
geboren am 5. Mai 1971 in Nürnberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Eltern: Edda und Dr. Horst Domke

- 1977-1981 Besuch der Grundschule Untermeitingen
- 1981-1990 Besuch des Gymnasiums der Leonhard-Wagner-Schule in Schwabmünchen
- 1990/1991 Zivildienst in der Jugendherberge Oberammergau und in der Sozialstation
Untermeitingen am Pfarramt St. Stephan
- 1991-1997 Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Angewandte Physik:
"Untersuchung dünner Polymerfilme mittels Rasterkraftmikroskopie"
- seit 1997 Promotion am Lehrstuhl für Angewandte Physik

Vielen Dank ...

...an alle Mitarbeiter des Lehrstuhls für Angewandte Physik die in den vergangenen Jahren mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

- Prof. Manfred Radmacher für die optimale Betreuung meiner Arbeit, am Ende auch über die Distanz Göttingen-München hinweg, sowie die nötigen Freiräume, Projekte auch nach eigenem Willen gestalten zu dürfen.
- Prof. Hermann Gaub, der meine Projekte stets mit Interesse verfolgt hat und mit so mancher unkonventionellen Idee garniert hat. Ganz nebenbei trägt er auch die Hauptverantwortung für das angenehme Arbeitsklima am Lehrstuhl.
- Rainer *Igor* Matzke, dem Partner der Arbeitsgruppe Zelldrücken, für die zahlreichen nanoelastischen Diskussionen und Erste-Hilfe-Macros.
- Angelika, als Zellkulturweltmeisterin ist es ihr sogar gelungen einzelne pulsierende Herzzellen wunderschön in zentraler Petrischalenlage zu positionieren.
- Wolfgang und Schorschi von der LAPS-Universität für die fruchtbaren Kooperationen.
- Otto Müller und Wilhelm Aicher für die produktive Zusammenarbeit in den Knochenprojekten, von denen leider vieles als Idee unaufgeräumt blieb...
- Armin Kriele für die REM-Aufnahmen.
- Zoltan Kovacs für den Einblick in die wunderschöne Welt der Nanopyramiden.
- Beno für seine stete Hilfsbereitschaft in den alltäglichen Problemen am Lehrstuhl und latürrnisch für die unvergessenen Jam-Sessions... "*Mensch Beno!*"
- Matthias, den man (zumindest in seiner Münchner Zeit) stets nicht nur um biophysikalischen Rat fragen konnte, sondern der meist auch tatsächlich guten Rat wußte.
- Ken "*sounds good*" Jacobson als großer Motivator ("*we need your simulation...*").
- den Fußballexperten (Christoph, Kokuse, Rupert - heute schon geschweinebaucht? - und Thorsten) des Lehrstuhls, durch die Diskussionsforen gänzlich unphysikalischer Natur ermöglicht wurden.
- Wolferl, Brigge, Rainer, Anki und Michel Grandbois in Berg und Court.
- nochmals der gesamten Gambicrew für die gute Stimmung im Laden...
- Rainer, Max *Bösel*, Beno, Edda und Horst für das Korrekturlesen der Arbeit.
- Silke für unser gemeinsames Projekt und die Welt außerhalb des Sommerfeldkellers...

Nicht zu vergessen die ausgesprochen produktive Stimmung, die maßgeblich durch die zahlreichen sozialen Events unserer Gruppe begründet wurde. Die unzähligen Diskussionen bei Kaffee und Kuchen, Dachterassenfeiern, Muschelnessen, Sänften- und Schlittenbasteln, Skifahren, gemeinsame Tagungs- und Biergartenbesuche oder Institutsseminare in Torbole und Venedig, sorgen dafür, daß man nicht als Einzelkämpfer überleben muß...

