

Cell Monolayer Rheology – eine neue Methode zur Untersuchung von biologischen Zellsuspensionen

Lutz Heymann^a, Pablo Fernández^b, Pramod A. Pullarkat^c, Albrecht Ott^d, Nuri Aksef^a

^aUniversität Bayreuth, Lehrstuhl für Technische Mechanik und Strömungsmechanik, D-95440 Bayreuth

^bTechnische Universität München, Lehrstuhl für Zellbiophysik E27, James-Franck-Str. 1, D-85748 Garching

^cRaman Research Institute, C V Raman Avenue, Sadashivanagar, Bangalore 560080, India

^dUniversität des Saarlandes, Lehrstuhl für Biologische Experimentalphysik, D-66041 Saarbrücken

Mittels einer neu entwickelten Methode – der Cell Monolayer Rheology (CMR) Technique – wird das mechanische Verhalten von Fibroblast-Zellkollektiven und dabei speziell des Zytoskeletts untersucht. Gegenüber der Untersuchung von Einzelzellen hat die Methode den Vorteil, dass die mechanischen Eigenschaften über eine große Anzahl von Zellen (typischerweise etwa 10^6 Zellen) gemittelt werden. Dadurch wird die Reproduzierbarkeit der Messungen deutlich verbessert. Ein eigenentwickeltes Tool für kommerziell verfügbare Rotationsrheometer gestattet die Anwendbarkeit der kompletten Palette von rheologischen Scherexperimenten wie oszillatorische Scherströmungen, zyklische scherdeformationsgesteuerte Experimente, Spann- und Relaxationsversuche sowie Kriech- und Kriecherholungsversuche. Darüber hinaus ist es möglich, das Umgebungsfluid der Zellen zu modifizieren oder sogar auszutauschen, ohne das Messsystem zu öffnen, so dass die Konfiguration der Zellen nicht verändert wird. An konkreten Beispielen wird gezeigt, wie durch Zugabe von biochemisch wirksamen Substanzen das Zytoskelett modifiziert und folglich die mechanischen Eigenschaften der Zellen verändert werden.

1. Einführung

Das Zytoskelett von Zellen ist ein komplexes Netzwerk aus Proteinfilamenten, das die mechanischen Eigenschaften von Zellen bestimmt. Es besteht aus drei wesentlichen Komponenten: flexiblen Zwischenfilamenten, weniger flexiblen Actinfilamenten und steiferen Mikrotubuli. Wichtige mechanische Funktionen der Zellen wie die Formänderung, Bewegung und Teilung der Zellen werden durch das Actin-Netzwerk bestimmt. Das Actin-Netzwerk ist hoch dynamisch infolge von Polymerisations- und Depolymerisationsprozessen. Im Gegensatz zu „toten“ Polymernetzwerken ist das Actin-Netzwerk ein Netzwerk mit dynamischen Vernetzungspunkten, die sich bilden und auch wieder auflösen können. Bestimmte Motorproteine führen dazu, dass das Actin-Netzwerk aktiv Kräfte und Bewegungen generieren und aktiv auf Kräfte reagieren kann (vgl. Video unter [1]). Diese Eigenschaften sind beispielsweise bei Wundheilungsprozessen oder Krebserkrankungen von großer Bedeutung und machen das Actin-Netzwerk zu einem interessanten Studienobjekt für mechanische Untersuchungen, auch unter dem Aspekt, wie biochemisch wirksame Substanzen („drugs“) dessen mechanische Eigenschaften modifizieren.

Bisher wurden die mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts im Wesentlichen an Einzelzellen untersucht, wobei auch der Einfluss von biochemisch wirksamen Substanzen wie Glutaraldehyd auf das Actin-Netzwerk berücksichtigt wurde [2]. Eine Übersicht über moderne experimentelle Methoden wie Laser Tweezers, Atomic Force Microscope Rheology, Magnetic Bead Rheology, Optical Cell Stretchers oder Microplate Rheology wurde von Pullarkat et al. [3] gegeben. Allen Einzelzell-Experimenten ist gemeinsam, dass sie sehr aufwändig sind und an verschiedenen Zellen der gleichen Zelllinie mehrfach wiederholt werden müssen, um eine ausreichend hohe statistische Sicherheit der experimentellen Ergebnisse zu erreichen.

Methoden zur Untersuchung von Zellkollektiven sind demgegenüber bisher kaum bekannt. Eichinger et al. [4] untersuchten dicht gepackte Schichten aus Zellen mit einem Torsionspendel. Als Messsystem wurde ein in der Rheologie übliches Kegel-Platte-System eingesetzt, um eine konstante Scherrate im ganzen Messvolumen zu erreichen.

Für die Untersuchung von Monolagen biologischer Einzelzellen existiert bis dato kein geeignetes Messsystem. Ziel der Arbeiten war es, ein Messsystem für kommerzielle Rheometer zu entwickeln, mit dem bei extrem kleinen Spaltabständen verlässliche Messungen an speziell präparierten Zellkollektiven, aber auch an anderen dispersen Fluiden wie Suspensionen und Emulsionen unter mikroskopischer Beobachtung der Vorgänge im Messvolumen durchgeführt werden können. Fernández et al. [5] entwickelten ein Tool und eine Messmethode, mit der Monolagen von Zellen rheologisch charakterisiert werden können. Diese Methode und bisher erzielte ausgewählte Ergebnisse werden in dieser Arbeit präsentiert und, wo möglich, mit Ergebnissen aus Einzelzelluntersuchungen verglichen.

2. Material und Messgeräte

2.1. Zellmaterial

Als Zellmaterial wurden Swiss 3T3-Fibroblasten aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSZM Braunschweig) verwendet. Die Zelllinie 3T3 wurde in den sechziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts im Department of Pathology der New York State University School of Medicine aufgebaut. Die Zellen wurden ursprünglich aus dem Embryogewebe von Mäusen extrahiert und nach Standardprozeduren in bestimmten Nährlösungen kultiviert. Details zur Kultivierung und Aufbereitung der Zellen für die rheologischen Untersuchungen sind in [5] dargestellt. Abbildung 1

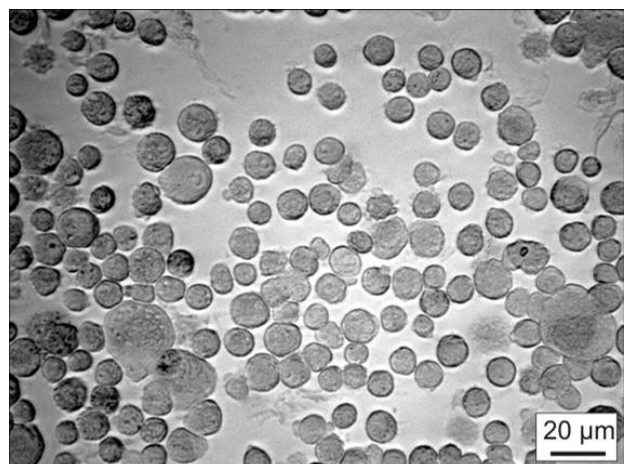


Abbildung 1: Typische Zelldichte und Zellgrößen in einer Zell-Monoschicht

zeigt die typische Zelldichte (im gesamten Messvolumen: $\approx 10^6$) einer Monolage von 3T3-Fibroblasten, wie sie in den rheologischen Messungen verwendet wurde. Der Spaltabstand des Messsystems beträgt in diesem Fall 7 μm . Die Zellen haben eine mittlere Größe von etwa 10 μm .

2.2. Messgerät und Modifikation des RheoMicroscope

Für die rheologischen Untersuchungen wurde ein modulares Kompaktrheometer MCR 500 (Anton-Paar Germany) verwendet. Da während der Messungen das Deformationsverhalten der Zellen visualisiert werden musste, wurde das ebenfalls von Anton Paar Germany für die MCR-Reihe angebotene RheoMicroscope verwendet. Als Messgeometrie wurde dabei ein koaxiales Platte-Platte-System verwendet, wobei die Platten selbst aus Glas bestanden. Es ist möglich, ein Mikroskop anzuschließen, das es gestattet, über eine CCD-Kamera Einzelbilder oder Videos der Vorgänge im Plattenspalt zu erzeugen und diese auch den rheologischen Bedingungen (beispielsweise der Fließkurve)

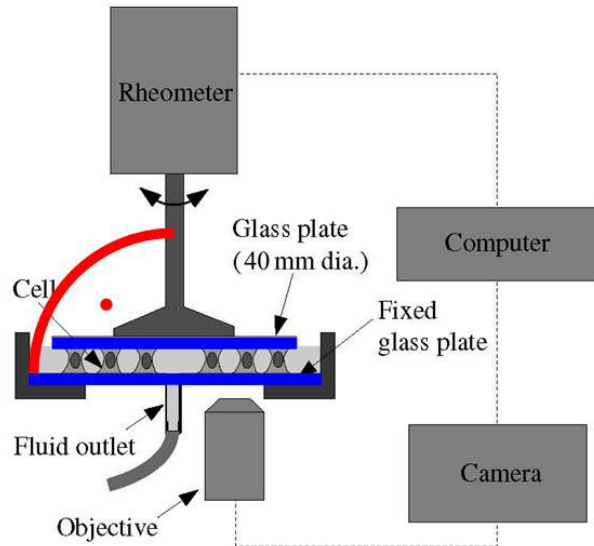


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der verwendeten Messanordnung (farbig hervorgehoben: Anforderungen an Parallelität und Orthogonalität) nach [5]

zuzuordnen. Der prinzipielle Aufbau der Messanordnung ist in Abbildung 2 dargestellt.

An die Geometrie mussten sehr hohe Anforderungen hinsichtlich der Parallelität der Glassplatten (blaue Markierung in Abbildung 2) und der Orthogonalität zwischen der oberen Glasplatte und der Rheometer-Messwelle (rot markiert) gestellt werden, um das Ziel der Messung bei Spaltabständen zwischen den Glasplatten von deutlich weniger als 10 μm zu erreichen. Aus diesem Grunde wurde die vorhandene Messeinrichtung modifiziert, um die genannten Anforderungen zu erfüllen und gleichzeitig um für die Zelluntersuchungen nützliche Optionen erweitert. Zum einen wurden die vorhandenen Glasplatten durch präzisere Glasplatten (Edmund Optics) mit einer Oberflächengüte besser als $0.25\lambda_L$ (λ_L ...Lichtwellenlänge) und einer Parallelität der beiden Flächen besser als $1'$ ersetzt.

Zum anderen wurde eine Justiereinrichtung (Abbildung 3) entwickelt, mit deren Hilfe die Orthogonalität der unteren Glasplatte ($\varnothing 50$) bezüglich der Messwelle des Rheometers mit einer Genauigkeit von 1 μm manuell mithilfe zweier Feinstellschrauben eingestellt werden kann. Anschließend wird die obere Glasplatte ($\varnothing 40$) zentrisch auf der unteren Glasplatte positioniert. Die Messwelle des Rheometers, an der eine serienmäßige Messplatte ($\varnothing 25$) befestigt ist, wird auf einem definierten Startwinkel fixiert und anschließend mit einer geringen Normalkraft auf die obere

Glasplatte abgesenkt. Durch Beleuchten mit einer Lichtquelle kann anhand der Interferenzstreifen die Parallelität beider Glasplatten überprüft werden. Jetzt wird die Messplatte mittels eines UV-härtenden Klebers mit der oberen Glasplatte verbunden. Während der Aushärtung des Klebstoffes wird laufend der Erhalt der Parallelität überprüft. Die Platten sind für die Messungen optimal konfiguriert, wenn es bei 2 µm Spaltabstand gelingt, die Messwelle ohne Kontakt zwischen den beiden Glasplatten vorsichtig um 360° zu drehen.



Abbildung 3: Modifizierte Messeinrichtung [5]

Eine weitere wichtige Modifikation war die Realisierung eines Fluid-Outlets in der Mitte der unteren Glasplatte, über den die Flüssigkeit, die sich während der Messungen zwischen den beiden Glasplatten befindet, abgesaugt bzw. gewechselt werden kann, ohne dass das Messsystem geöffnet oder der Spaltabstand verändert werden muss. Dies ist bei lebenden Zellen wichtig, da sie sich permanent in einer Nährlösung befinden müssen und während der Messung an beiden Glasoberflächen haften.

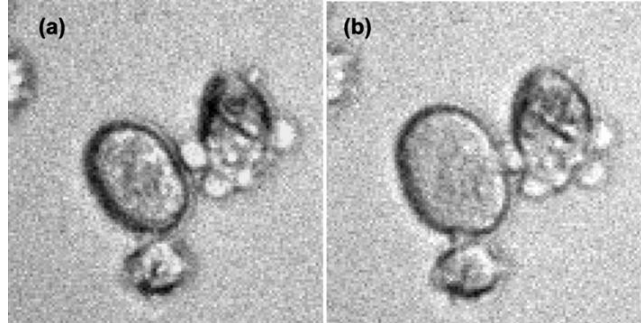
Anzumerken ist an dieser Stelle, dass das koaxiale Platte-Platte-System aus rheologischer Sicht einen wesentlichen Nachteil hat. Die Scherdeformation γ , die Scherrate $\dot{\gamma}$ und folglich auch die Scherspannung σ variieren mit der radialen Position r (vgl. [6]): $\gamma = \gamma(r), \dot{\gamma} = \dot{\gamma}(r), \sigma = \sigma(r)$. Das Scherfeld ist somit inhomogen. Im Zentrum des Messsystems sind diese Größen gleich null. Die Scherdeformation und die Scherrate variieren linear mit dem Radius und werden am äußeren Rand des Messsystems maximal. Der Scherspannungsverlauf, dessen Maximalwert ebenfalls am Rand liegt, ist hingegen vom Material selbst abhängig und muss korrigiert werden [6]. Aufgrund der Variation dieser Größen wird als Bezug immer der äußere Rand des Messsystems benutzt, das heißt, die angegebenen Größen sind die Randscherdeformation, Randscherrate bzw. Randscherspannung. Für kleine Scheramplituden stellt das inhomogene Scherfeld aber kein großes Problem dar.

2.3. Vorbereitung der Messungen

Die verwendeten Fibroblast-Zellen stellen an die biochemische Funktionalisierung der Oberflächen des Messsystems ganz spezielle Anforderungen, so dass eine spezielle Methodik zur Vorbereitung der Messungen entwickelt werden musste. Nachdem das Messsystem, wie oben beschrieben, vorbereitet und ein Spaltabstand von 100 µm eingestellt wurde, erfolgte die Oberflächenfunktionalisierung. Als Adhäsionsprotein wurde Fibronectin in einer Konzentration von 30 µg/ml in einer Phosphat-Puffer-Lösung (PBS) verwendet. Aufgrund der Kapillarität füllt das Fluid den

Messspalt aus, sobald es am Rande mit einer Pipette zugegeben wird. Die Fibronectin-Lösung verbleibt für eine Stunde im Messspalt, wird dann abgesaugt und das Messsystem mehrmals mit PBS gespült. Das Adhäsionsprotein hat nunmehr die Glasplatten biochemisch funktionalisiert.

Die Zellsuspension wird in den Messspalt eingebracht, indem diese über den äußeren Meniskus des Messsystems aufgeben und gleichzeitig die sich im Spalt befindliche Fibronectin-Lösung über das Outlet abgesaugt wird. Mikroskopisch wird die Zellanzahl dichte kontrolliert. In einer 10-minütigen Pause



sedimentieren die Zellen auf die untere Glasplatte und adhären. Nun wird der Messspalt

Abbildung 4: Zellform vor (a) und nach (b) dem Einstellen des Messspaltes auf 7 µm [5]

auf die entsprechende Größe (zum Beispiel 7 µm) verringert, damit die Zellen auch mit der oberen Platte eine Verbindung eingehen können. In Abbildung 4 sind die Zellen vor und nach dem Schließen des Messsystems dargestellt. Deutlich wird die Form- und Größenänderung der Zellen infolge Kompression, da der Spalt kleiner als die Größe der Zellen ist. Eine Wartezeit von 60 min ist ausreichend, damit die Zellen an beiden Platten vollständig haften.

3. Ergebnisse

In diesem Kapitel werden ausgewählte Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt. Da es sich bei Zellen um viskoelastische „Materialien“ handelt, die sehr sensibel auf äußere Belastungen reagieren und trotz ihrer Flexibilität nicht unbegrenzt mechanisch belastet werden können, ist es sinnvoll, experimentelle Methoden aus der Festkörperreologie anzuwenden.

3.1. Zyklische Versuche

Zyklische Versuche spielen in der Festkörperreologie eine wesentliche Rolle, gestatten Sie doch die Untersuchung von plasto-viskoelastischen Eigenschaften der Materialien. In den vorgestellten Experimenten wird alternierend ein linearer Anstieg mit anschließendem linearem Abfall der Scherdeformation $\gamma(t)$ realisiert. Mathematisch lässt sich dies mit den Beziehungen für die Aufkurve

$$\gamma(t) = \hat{\gamma} \frac{t}{t_R} \tag{1}$$

und für die Abkurve

$$\gamma(t) = \hat{\gamma} \left(1 - \frac{t}{t_R} \right) \tag{2}$$

beschreiben. Die Größen $\hat{\gamma}$ und t_R sind die Scheramplitude und die Rampenzeit, t ist die aktuelle Zeit. Aus Gln. (1) und (2) folgt sofort, dass die Scherrate $\dot{\gamma}(t) = d\gamma(t)/dt$ bei gegebener Scheramplitude und Rampenzeit eine konstante Größe ist und sich bei der Auf- bzw. Abkurve (Gl. (3) bzw. Gl. (4)) nur im Vorzeichen unterscheidet.

$$\dot{\gamma}(t) = \frac{\hat{\gamma}}{t_R} = \text{const.} \tag{3}$$

$$\dot{\gamma}(t) = -\frac{\hat{\gamma}}{t_R} = \text{const.} \tag{4}$$

Hieraus ergibt sich eine Reihe von experimentellen Möglichkeiten: (i) gleiche Scheramplituden und Scherraten, (ii) variierende Scheramplituden bei gleicher Scherrate und (iii) gleiche Scheramplituden bei variierenden Scherraten.

Im Ergebnis der Untersuchungen erhält man Kurven $\sigma(t)$ bzw. $\sigma(\gamma)$ mit σ als die Scherspannung.

3.1.1. Versuche mit konstanter Scheramplitude und konstanter Scherrate

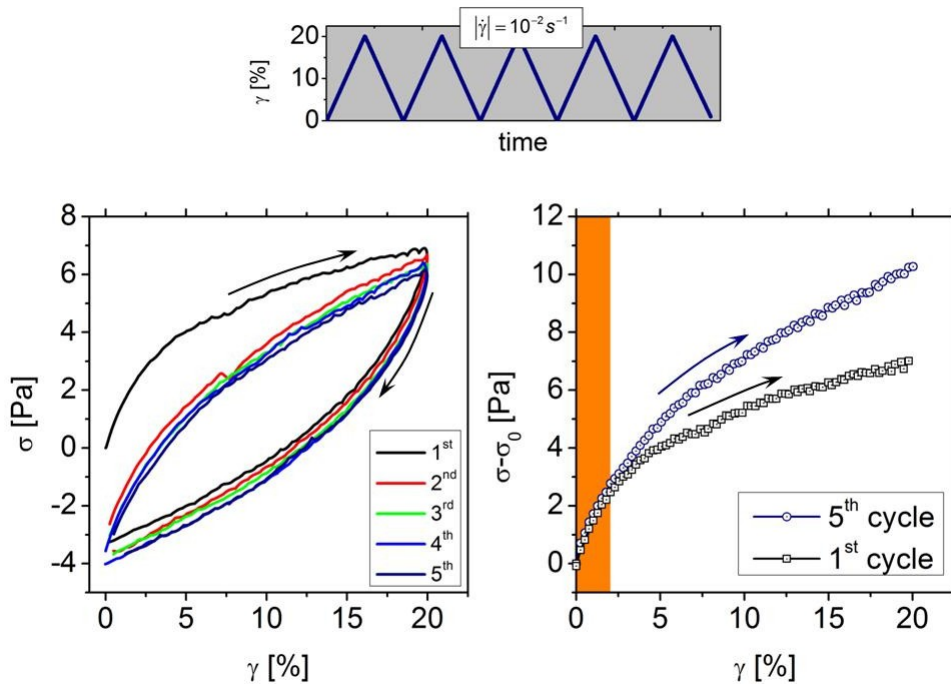


Abbildung 5: Zykliches Experiment mit konstanter Scherrate und Scheramplitude

Es wurden mehrere aufeinander folgende Zyklen mit jeweils konstanter Scherrate nach Gln. (3) und (4) realisiert. Dabei wurden im Uhrzeigersinn orientierte Hysteresis-Kurven erhalten. Die Pfeile in Abbildung 5 markieren jeweils ansteigende bzw. abfallende Scherdeformationen. Wie aus der

Grafik hervorgeht, erreichen die Zellen bereits nach dem ersten Scherzyklus ihren Grenzzyklus, der sich auch bei wiederholten Scherzyklen nicht mehr wesentlich ändert. Dies bedeutet, dass die Zellen recht schnell auf die äußere Belastung reagieren. Interessant ist auch, dass sich das Verhalten zwischen dem ersten und fünften Zyklus bei kleinen Deformationen ($\gamma < 4\%$) nicht unterscheidet. Bei größeren Deformationen ($\gamma > 5\%$) hingegen ist eine kinematische Verfestigung zu erkennen, da der Tangenten-Schermodul

$$G(\gamma) = \frac{d\sigma(\gamma)}{d\gamma} \quad (5)$$

im fünften Zyklus deutlich höhere Werte annimmt als im ersten Zyklus und in diesem Deformationsbereich von der Scherdeformation selbst abhängt.

3.1.2. Versuche mit ansteigender Scheramplitude und konstanter Scherrate

In den folgenden Versuchen wurde bei konstanter Scherrate die Scheramplitude mit dem Ziel erhöht zu untersuchen, inwieweit sich die rheologischen Eigenschaften des Zellkollektives bei höheren Belastungen ändern, die mit der gleichen Scherrate aufgebracht wurden. Nach jedem Zyklus wurde eine Ruhephase von 10 min realisiert, die der Relaxation der Scherspannungen in den Zellen diene.

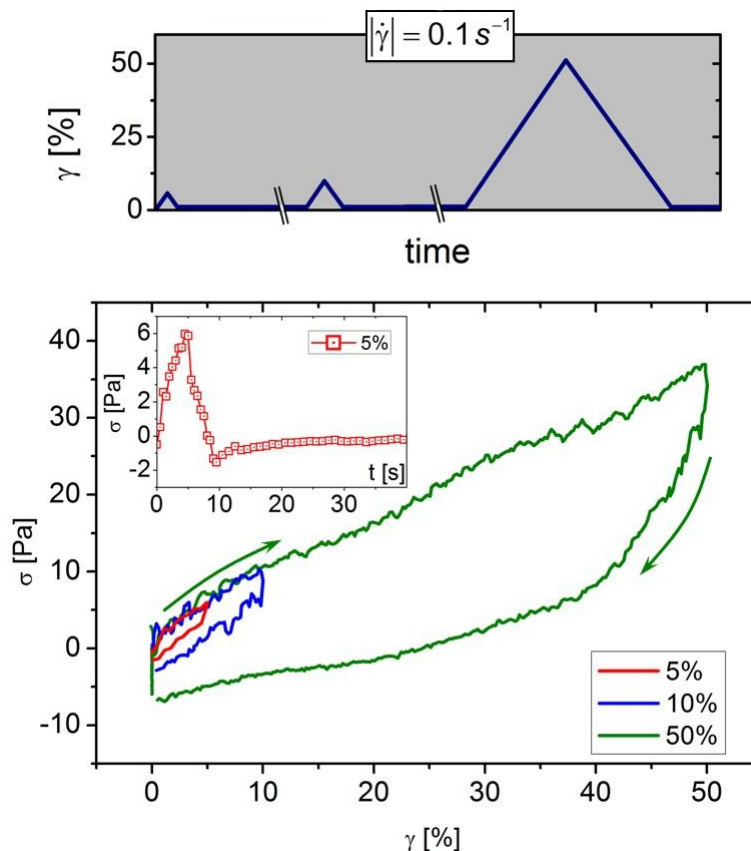


Abbildung 6: Einfluss der Scheramplitude bei konstanter Scherrate auf die rheologischen Eigenschaften der Zellen. Im Inset ist der Zeitverlauf der Scherspannung für eine Scheramplitude von 5% dargestellt.

In Abbildung 6 sind die Ergebnisse einer zyklischen Belastung mit ansteigender Scheramplitude (5%, 10% und 50%) bei einer konstanten Scherrate $|\dot{\gamma}| = 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ dargestellt. Die erhaltenen Kurven zeigen prinzipiell ein ähnliches Verhalten. In den jeweiligen Scherdeformationsbereichen der Aufkurven sind die Kurven nahezu identisch. Es zeigt sich ein klarer Übergang von einem nichtlinearen Verhalten bei sehr kleinen Scherdeformationen zu einem eher linearen Verhalten bei großen Scherdeformationen, bei denen Abhängigkeit der Scherspannung von der Scherdeformation mehr oder weniger linear ist. Die Abkurven unterscheiden sich deutlich davon. Hier ist bei großen Scherdeformationen ein nichtlineares, bei kleineren Scherdeformationen ein lineares Verhalten zu erkennen. Im Inset von Abbildung 6 ist zu erkennen, dass die Scherspannungen bei der Abkurve negative Werte annehmen und in der Ruhephase fast vollständig relaxieren, was ein Hinweis auf die zellstabilisierende Wirkung des Zytoskeletts ist.

3.1.3. Versuche mit konstanter Scheramplitude und ansteigender Scherrate

Mit diesen Versuchen wird die Frage geklärt, ob die Geschwindigkeit der mechanischen Belastung einen Einfluss auf das rheologische Verhalten des Zellkollektivs hat. Bei konstanter Scheramplitude wurde die Rampenzeit in aufeinander folgenden Zyklen verkürzt, was ansteigenden Scherraten entspricht. Zwischen den Zyklen wurde wie im vorhergehenden Experiment eine Ruhezeit von 10 min realisiert, damit die Scherspannungen in den Zellen relaxieren können.

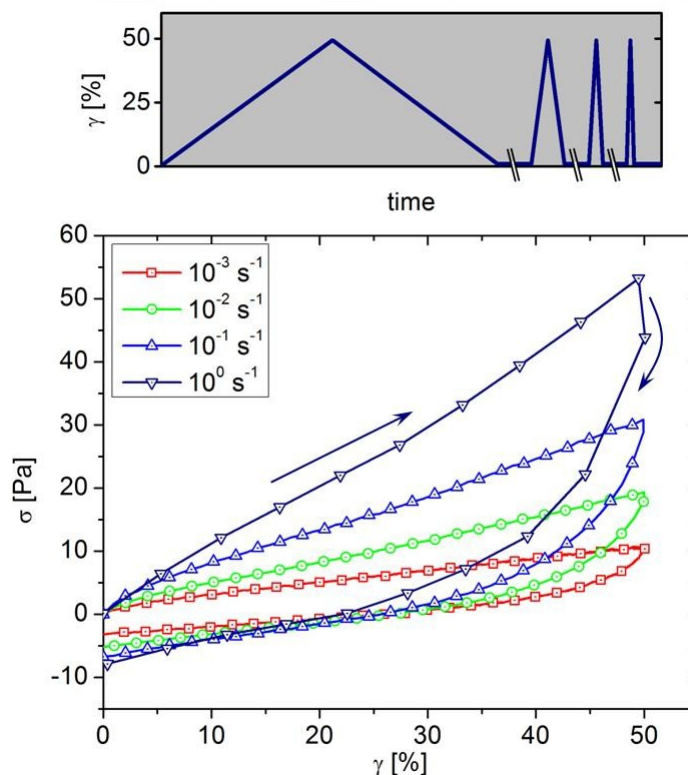


Abbildung 7: Einfluss der Scherrate auf das rheologische Verhalten des Zellkollektivs

In Abbildung 7 wird der signifikante Einfluss der Scherrate deutlich. Ohne konkrete Zahlenwerte anzugeben, ist zunächst auffällig, dass die Hysterisis-Fläche als Maß für die aufgebrauchte Deformationsarbeit

$$W_{\gamma} = W_{\gamma,auf} - W_{\gamma,ab} = \int_{\nearrow} \sigma(\gamma) d\gamma - \int_{\searrow} \sigma(\gamma) d\gamma \quad (6)$$

mit zunehmender Scherrate deutlich ansteigt. Somit ist bei der Scherung der Zellen mit höheren Scherraten mehr Energie aufzubringen, als das für kleine Scherraten der Fall ist. Die Zellen werden also, wie bereits in Abschnitt 3.1.1 festgestellt wurde, kinematisch verfestigt. Auch der Schermodul nach Gl. (5) zeigt einen deutlichen Anstieg mit zunehmender Scherrate. Die Tendenz, dass in den Aufkurven zunächst ein nichtlinearer Anfahrprozess und anschließend ein linearer Zusammenhang $\sigma(\gamma)$ auftreten, wie in Abschnitt 3.1.2 diskutiert, bestätigt sich im Wesentlichen auch für die höheren Scherraten.

3.2. Überlagerung von statischer und oszillatorischer Scherung

Oszillatorische Experimente, bei denen ein harmonisches, monofrequentes und sinusförmiges Testsignal (in unserem Falle die Scherdeformation) entsprechend der Beziehung

$$\gamma(t) = \hat{\gamma} \sin \omega t \quad (7)$$

mit der Kreisfrequenz ω und der Scheramplitude $\hat{\gamma}$ angewendet wird, sind Key-Experimente in der Rheologie, da sie mit einer Messung Aussagen sowohl zu den elastischen (gespeicherten) wie auch viskosen (dissipierten) Energieanteilen gestatten. Ohne auf Details einzugehen (diese findet man zum Beispiel in [6] oder [7]), kann aus dem um den Phasenwinkel δ verschobenen Antwortsignal (in unserem Falle der Scherspannung)

$$\sigma(t) = \hat{\sigma} \sin(\omega t + \delta) \quad (8)$$

der Betrag des komplexen Schermoduls

$$|G^*(\omega)| = \frac{\hat{\sigma}}{\hat{\gamma}} \quad (9)$$

bzw. seine Komponenten

Speichermodul	$G'(\omega) = \frac{\hat{\sigma}(\omega)}{\hat{\gamma}} \cos \delta(\omega)$	(10)
---------------	--	------

Verlustmodul	$G''(\omega) = \frac{\hat{\sigma}(\omega)}{\hat{\gamma}} \sin \delta(\omega)$	(11)
--------------	---	------

oder der Verlustfaktor

$$\tan \delta(\omega) = \frac{G''(\omega)}{G'(\omega)} \tag{12}$$

berechnet werden. Phasenwinkel kleiner als $\pi/4$ bzw. Verlustfaktoren kleiner als 1 ($G'(\omega) > G''(\omega)$) sind ein Hinweis auf ein dominierendes elastisches Verhalten, während bei Phasenwinkeln größer als $\pi/4$ bzw. Verlustfaktoren größer als 1 ($G'(\omega) < G''(\omega)$) das viskose Verhalten überwiegt.

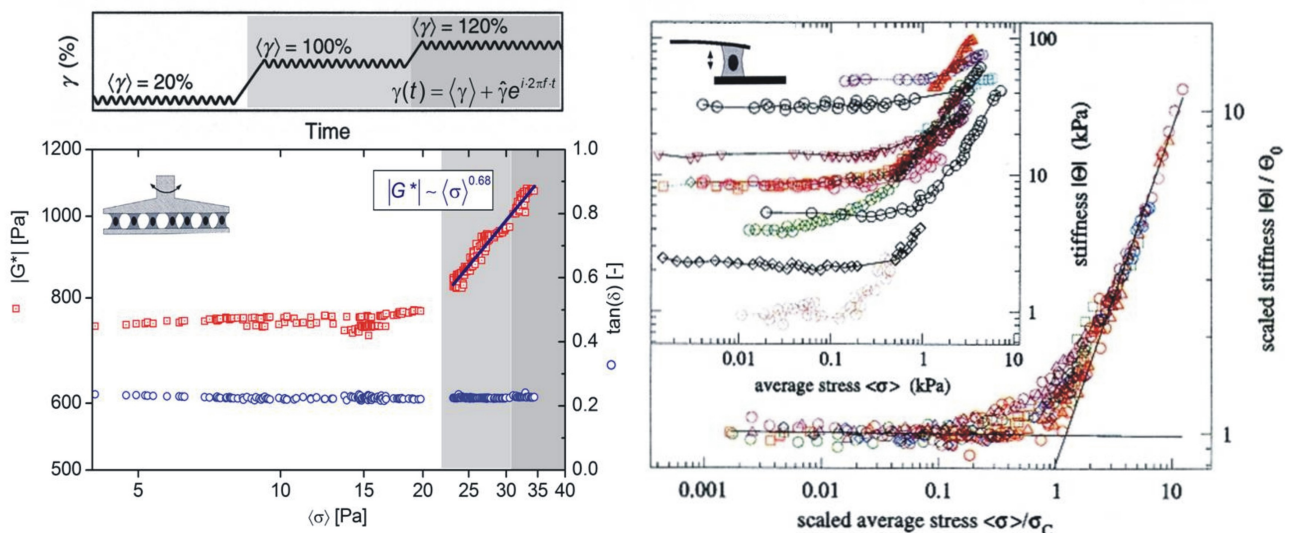
Bei der Untersuchung der Zellen war demgegenüber von Interesse, ob sich eine statische Vordeformation auf das rheologische Verhalten der Zellen auswirkt. Aus diesem Grunde wurde der harmonisch oszillierenden Scherdeformation nach Gl. (7) ein statischer Anteil $\langle \gamma \rangle$ überlagert

$$\gamma(t) = \langle \gamma \rangle + \hat{\gamma} \sin \omega t, \tag{13}$$

der sich natürlich im Scherspannungssignal als Offset widerspiegelt:

$$\sigma(t) = \langle \sigma \rangle(t) + \hat{\sigma} \sin(\omega t + \delta) \tag{14}$$

Im linken Bild von Abbildung 8 sind die Ergebnisse für eine Zell-Monolayer dargestellt, die in einem überlagerten oszillatorischen Scherexperiment erhalten wurden [5]. Die Amplitude des oszillatorischen Anteils bzw. die Kreisfrequenz sind $\hat{\gamma} = 2\%$ bzw. $\omega = 31.4 \text{ rad/s}$. Auf der Abszisse ist hier die mittlere Scherspannung aufgetragen. Es zeigt sich, dass der Betrag des komplexen Schermoduls über einen weiten Scherspannungsbereich konstant ist. Für statische Scheramplituden $\langle \gamma \rangle > 20\%$ erhält man demgegenüber eine power law-Abhängigkeit $|G^*| : \langle \sigma \rangle^{0.68}$, also ein nichtlineares Verhalten. Wie der Verlustfaktor zeigt, betrifft diese Abhängigkeit beide Modulen, da er unabhängig von der mittleren Scherspannung konstant ist und aufgrund seines Wertes $\tan \delta \approx 0.25$ eine dominierende Elastizität der Zell-Monolayer in allen Belastungsbereichen aufzeigt.



3.3. Einfluss von biochemisch aktiven Substanzen

Die Experimente an normalen, das heißt unmodifizierten Fibroblasten wurden ergänzt durch Untersuchungen zum Einfluss von biochemisch aktiven Substanzen, die in die Mechanismen des Zytoskeletts in unterschiedlicher Art und Weise eingreifen. Substanzen wie Latrunculin oder Glutaraldehyd verändern massiv die mechanischen Eigenschaften des Zytoskeletts, indem sie das Actin-Netzwerk bzw. die Vernetzungspunkte modifizieren.

3.3.1. Latrunculin als Depolymerisator

Unmodifizierte Fibroblasten wurden in einem step-strain-Experiment untersucht. Zunächst wurden die Zellen mit einer Scherdeformation von 25% deformiert. Nachdem die resultierende Scherspannung einen konstanten Gleichgewichtswert erreicht hatte, wurde die Deformation sprunghaft auf 50% erhöht und der Zeitverlauf der Scherspannung gemessen. Anschließend wurde eine Lösung von Latrunculin (LAT) in einer Konzentration von 0.2 µg/ml injiziert. LAT ist eine Substanz, die die Actin-Filamente des Zytoskeletts depolymerisiert, das heißt Vernetzungspunkte auflöst. Im Ergebnis der Behandlung mit LAT müsste das Netzwerk also deutlich an Festigkeit verlieren, die viskoelastischen Eigenschaften des Netzwerkes müssten abgebaut, zumindest aber reduziert werden. Die LAT-Lösung wurde am äußeren Rand des Messsystems zugegeben, während die Nährlösung im Zentrum über den Fluid-Outlet abgesaugt wurde.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse von Relaxationsexperimenten vor und nach der Zugabe von LAT dargestellt. Im oberen Teil befindet sich der $\gamma(t)$ -Verlauf, unten ist der Zeitverlauf der Scherspannung $\sigma(t)$ ohne und mit LAT zu sehen. Es sind deutliche Unterschiede ersichtlich.

Für den Relaxationsversuch ohne LAT ist die graphische Bestimmung der Relaxationszeit eingezeichnet. Man erkennt eine deutliche Relaxation der Scherspannung von einem Maximalwert $\sigma_0 = 2.9 \text{ Pa}$ bei $t = 0 \text{ s}$ auf einen konstanten Endwert $\sigma_\infty = 1.25 \text{ Pa}$ mit einer Relaxationszeit $\lambda \approx 6 \text{ s}$

relaxiert ist. Die Relaxationszeit entspricht der Zeit, bei der die Scherspannung $\sigma_0 - \sigma_\infty$ auf den 1/e-ten Wert abgefallen ist, wobei angenommen wurde, dass sich der Relaxationsprozess mit einem Ein-Moden-Maxwell-Modell genügend genau beschreiben lässt. Die dargestellte Relaxation zeigt ein viskoelastisches Verhalten des Actin-Netzwerkes an.

Im Gegensatz dazu brechen die Elastizität und auch die Festigkeit des Actin-Netzwerkes bei Zugabe von LAT nahezu vollständig ein. Es treten weder ein merkliches Spannungsmaximum

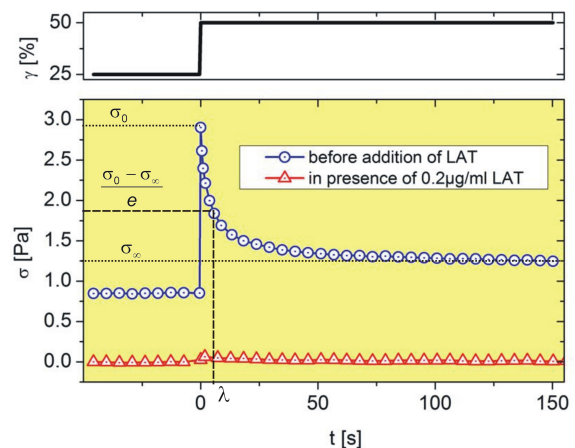


Abbildung 9: Einfluss von Latrunculin (LAT) auf das Verhalten eines Fibroblast-Kollektives im step-strain-Experiment [5]

noch eine ausgeprägte Relaxation auf. Das Actin-Netzwerk zeigt nur noch äußerst schwache viskoelastischen Eigenschaften mehr aufgrund der Depolymerisationswirkung von LAT: die vorher fixen oder auch dynamischen Vernetzungsknoten wurden fast vollständig aufgelöst.

3.3.2. Glutaraldehyd als Fixierungsmittels

Im Gegensatz zu LAT wirkt Glutaraldehyd in geringen Konzentrationen als Fixierungsmittels für die dynamischen Vernetzungspunkte und die molekularen Motoren des Actin-Netzwerkes, die der Zelle zu einer aktiven Bewegung verhelfen. Wenn Vernetzungspunkte fixiert werden, ist das Biopolymernetzwerk nicht mehr so flexibel. Seine Festigkeit muss zunehmen, das heißt die Scher- oder Elastizitätsmoduln müssen höhere Werte annehmen, als dies für unbehandelte (normale) Zellen der Fall ist. Die verbleibende Elastizität resultiert dann nur noch aus der Elastizität der einzelnen Polymerketten bzw. Polymerkettenabschnitte zwischen den fixen Vernetzungspunkten. Um dies zu untersuchen, wurde, wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben, ein zyklischer Versuch mit jeweils konstanter Scher- bzw. Dehnamplitude und konstanter Rampenzeit durchgeführt.

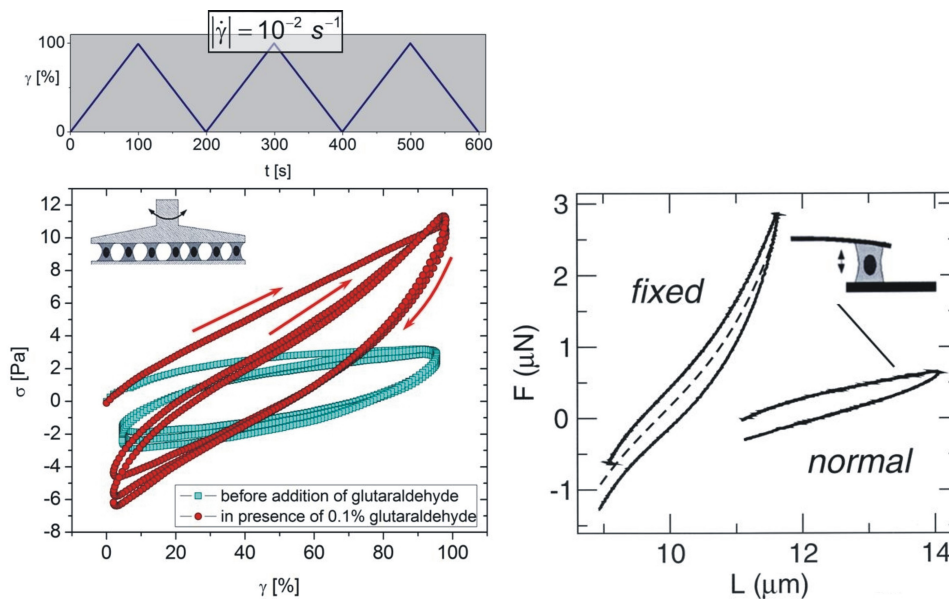


Abbildung 10: Einfluss von Glutaraldehyd auf die mechanischen Eigenschaften von Fibroblasten: (links) Cell Monolayer Rheology Technique [5], (rechts) Microplate Rheology an einer Einzelzelle [2]

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse des Scherversuches für die Monolage eines Zellkollektivs in der Form $\sigma = f(\gamma)$ (links) und für eine Einzelzelle in der Form $F = f(L)$ (rechts) dargestellt. Die blaue Kurve im linken Teil zeigt das Verhalten vor der Zugabe von Glutaraldehyd. Man erkennt einen relativ flachen Anstieg der mittleren Scherspannung, was einem kleinen Schermodul entspricht. Dies korrespondiert zu der in der rechten Abbildung mit „normal“ bezeichneten Kurve, die allerdings in einem Dehnexperiment an einer Einzelzelle ermittelt wurde. Als charakteristische mechanische Größe würde in diesem Fall der Elastizitätsmodul dienen, der einen relativ kleinen Wert annehmen würde. Allerdings ist in der rechten Teilabbildung von Abbildung 10 zu beachten,

dass die Zugkraft in Abhängigkeit von der Länge der Zelle und nicht die Zugspannung in Abhängigkeit von der Dehnung der Zelle dargestellt ist. Dennoch sind die Ergebnisse vergleichbar. Die Zugabe von Glutaraldehyd zu den Zellen ändert das mechanische Verhalten gravierend. Die rote Kurve im linken Teil von Abbildung 10 verläuft deutlich steiler, der Schermodul ist deutlich größer. Für die Einzelzelle wurde qualitativ exakt das gleiche Ergebnis erhalten. Selbst die Form der Kurven ähneln sich sehr, obwohl die Experimente unter ganz verschiedenen kinematischen Bedingungen, das heißt unter Scherung für das Zellkollektiv und unter Dehnung für die Einzelzelle, durchgeführt wurden. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass mit Glutaraldehyd tatsächlich eine Fixierung des Actin-Netzwerkes erfolgen kann.

4. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode vorgestellt, mit deren Hilfe lebende Zellen hinsichtlich ihres mechanischen Verhaltens untersucht werden können. Obwohl die Justierung und Kalibrierung des Messsystems und die Präparation der Zellen für die Messung zum Teil aufwändig ist, hat die vorgestellte Methode den großen Vorteil, dass man die über eine große Anzahl von Zellen gemittelten mechanischen Eigenschaften erhält. Es konnte gezeigt werden, dass lebende Zellen biologische Materialien sind, die auf äußere mechanische Anregungen aktiv reagieren können. Auch der Einfluss von biochemisch wirksamen Fluiden wie Latrunculin und Glutaraldehyd konnte aufgezeigt werden. Mit diesen Ergebnissen wurden Hypothesen über die Wirkmechanismen der beiden Substanzen bestätigt.

Die vorgestellte CMR-Technique ist jedoch nicht auf die Anwendung für biologische Materialien begrenzt. Mit dem vorgestellten Tool für kommerziell verfügbare Rotationsrheometer ist es möglich, sämtliche dispersen Materialien hinsichtlich ihrer rheologischen Eigenschaften zu untersuchen. Vorzugsweise wird das Tool für sehr kleine Spaltabstände des coaxialen Platte-Platte-Systems eingesetzt, weil unter diesen Bedingungen die rheologischen Eigenschaften simultan zu den Vorgängen bei der Scherung von Mono- oder Bilayern von Suspensionen oder Emulsionen mit einem Lichtmikroskop in Verbindung mit einer geeigneten Foto- oder Videotechnik untersucht werden können. Denkbar ist aber auch die Anwendung von größeren Spaltabständen. Hier wäre beispielsweise ein Konfokal-Mikroskop einsetzbar, um die Partikelbewegungen in Multilayern oder die Modifikationen von Partikel-Netzwerkstrukturen infolge Scherung zu visualisieren. Es ist angedacht, dass das Tool kommerziell von einem namhaften Rheometerhersteller vertrieben wird.

5. Literatur

- [1] <http://www.microscopyu.com/moviegallery/livecellimaging/3t3/index.html>
- [2] P Fernández, A Ott: Single Cell Mechanics: Stress Stiffening and Kinematic Hardening *Phys. Rev. Lett.* **100**, 238102 (2008)
- [3] P A Pullarkat, P Fernández, A Ott: Rheological properties of the Eukaryotic cell cytoskeleton *Phys. Rep.* **449** (2007) 29-53
- [4] L Eichinger, X B Köppel, A A Noegel, M Schleicher, M Schliwa, K Weijer, W Witke, P A Janmey: Mechanical perturbation elicits a phenotypic difference between dictostelium wild-type cells and cytoskeletal mutants *Biophys. J.* **70** (1996) 1054
- [5] P Fernández, L Heymann, A Ott, N Aksel, P A Pullarkat: Shear rheology of a cell monolayer *New J. Phys.* **9** (2007) 419 (<http://iopscience.iop.org/1367-2630/9/11/419>)
- [6] C W Macosko: Rheology – Principles, Measurement, and Applications, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1994
- [7] T Mezger: Das Rheologie-Handbuch – Für Anwender von Rotations- und Oszillationsrheometern, Vincentz-Verlag, Hannover 2000
- [8] P Fernández, P A Pullarkat, A Ott: A Master Relation Defines the Nonlinear Viscoelasticity of Single Fibroblasts *Biophys. J.* **90** (2006) 3796-3805

Dieser Vortrag wurde auf der Jahrestagung 2010 der Deutschen Rheologischen Gesellschaft und dem 17. Ostwald-Kolloquium der Deutschen Kolloidgesellschaft, 9.-12. März 2010, Karlsruhe gehalten.