

Physik-Department
der Technischen Universität München
Lehrstuhl für Biophysik E22 – Univ.-Prof. Dr. E. Sackmann

**Entwicklung einer schnellen digitalen Bildverarbeitungstechnik und
einer interferometrischen 2λ – Mikroskopietechnik:
Anwendung in der Zell-Biophysik**

Jörg Schilling

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Harald Friedrich

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Erich Sackmann
2. Univ.-Prof. Dr. Joachim O. Rädler,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 11.09.03 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 10.10.03 angenommen.

für meine Mutter

*** 18.11.1945**

† 25.12.2001

und

meinen Großvater

*** 15.01.1912**

† 05.08.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	5
2.1	Ziele	5
2.2	Gliederung	6
3	„Open Box“-Eine neue Echtzeit-Bildverarbeitung.....	7
3.1	Digitale und analoge Aufzeichnungstechnik	7
3.2	Die Wahl der Waffen	8
3.2.1	Das Betriebssystem.....	8
3.2.2	Die Entwicklungsumgebung VC++.....	8
3.2.3	Das objektorientierte Paradigma.....	9
3.3	Die Programmkonzeption.....	11
3.3.1	Objektorientiertes Design	11
3.3.2	Einbettung in das Document-View-Konzept der MFC	13
3.3.3	Erweiterung des Klassendiagramms.....	14
3.4	Parallelisierung	15
3.5	Demonstration der Erweiterbarkeit.....	19
3.6	Datenspeicherung und Kompression	23
3.6.1	Technische Voraussetzungen.....	23
3.6.2	DCT- und Wavelet-Kompression.....	24
3.6.3	Einzelbild oder Bild-zu-Bild-Komprimierung.....	25
3.6.4	Effekt der Komprimierung auf die Datenauswertung.....	27
3.7	Die Verbindung zwischen Kamera und Computer	29
3.8	Interline-Transfer-Technologie.....	30
4	Zwei Wellenlängen Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie	31
4.1	Reflex Interferenz Kontrast Mikroskopie (RIKM).....	31
4.1.1	Versuchsaufbau.....	31
4.1.2	Theorie der Bildentstehung.....	32
4.2	Zielsetzung der Weiterentwicklung.....	34
4.2.1	Vesikel	34
4.2.2	Kugeln.....	36
4.3	Aufbau der Zwei-Wellenlängen-Technik	38
4.4	Auswertung von Kugelfluktuationen.....	40
4.4.1	Berechnung der Kugelhöhen	40
4.4.2	Abstand der Extrema	42

4.4.3	Genauigkeit der RIKM bei der Berechnung der Kugelhöhe.....	44
4.4.4	Kugel Tracking.....	44
4.4.5	Höhenbestimmung	50
4.4.6	Drei-Wellenlängen-Technik.....	52
5	Experimente am Reflexions Interferenz Kontrast Mikroskop	55
5.1.1	Polystyrolkugeln über Glas	55
5.1.1.1	Theoretische Grundlagen	55
5.1.1.2	Fallende Kugeln	60
5.1.1.3	Kugelfluktuationen.....	62
5.1.1.4	Zusammenfassung.....	65
5.1.2	Messungen an Hyaluronsäure	67
5.1.2.1	Einführung.....	67
5.1.2.2	Material und Methoden	69
5.1.2.3	Messergebnisse.....	70
5.1.2.4	Analyse der viskoelastischen Parameter	72
5.1.2.5	Diskussion	75
5.1.3	Vergleich Kugel über Hyaluronsäure und Kugel über Glas	76
5.2	Vesikel.....	79
5.2.1	Einführung.....	79
5.2.2	Material und Methoden	80
5.2.3	Messergebnisse.....	82
5.2.4	Diskussion	87
6	Rheologische Untersuchungen an Aktinnetzwerken.....	89
7	Ausblick	113
	Abkürzungen	115
	Symbole.....	117
	Herzlichen Dank.....	119
	Bibliographie.....	121
	Eigene Veröffentlichungen	127

1 Zusammenfassung

Mikrooptische Methoden in Kombination mit dynamischer schneller Bildverarbeitung werden in der biophysikalischen Forschung immer wichtiger. Bei der Untersuchung physikalischer Eigenschaften von weicher Materie, beispielsweise mit Hilfe von kolloidalen Sonden, ist der Einsatz solcher Methoden unentbehrlich geworden.

In den letzten Jahren hat die rasante Entwicklung in der Chiptechnologie zu einer wesentlichen Verbesserung der CCD-Kameras geführt. Dabei wurde sowohl die Quanteneffektivität bei der Umwandlung der Photonen in Ladung gesteigert, als auch das Ausleserauschen minimiert. Es gab aber bisher keine Software, mit der sich dynamische Vorgänge mit diesen neuen Kameras mit digitalen Interface aufzeichnen ließen. Die erhältlichen Programme unterstützen nur Einzelaufnahmen sowie die Abspeicherung kurzer Sequenzen. Daher war ein Anliegen dieser Arbeit, diese Technik für eine Vielzahl von biophysikalischen Experimenten zugänglich zu machen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher das neue Bildverarbeitungsprogramm „Open Biophysics Optical eXplorer“ (Open Box), entwickelt, das die digitale Bildaufnahme ermöglicht. Mit dem neuen Programm werden Lösungen zur Bewältigung großer Datenmengen angeboten, die bei der digitalen Bildaufnahme entstehen. Hierzu gehören die Wavelet-basierte Datenkompression, die Echtzeit-Bearbeitung des Videobildes sowie die Möglichkeit, Dateien nahezu beliebiger Größe bearbeiten zu können. Ein Verfahren wurde entwickelt, das die gleichzeitige Bildaufnahme, Bildbearbeitung und Bildanzeige erlaubt, wobei durch parallelisierte Programmführung eine optimale Ausnutzung der Rechenzeit gewährleistet ist. Heute ist Open Box zu einer Standardanwendung am Lehrstuhl E22 geworden und hat den Einsatz von Videorekordern komplett verdrängt. Mit Hilfe des digitalen Aufnahmeverfahrens konnten weitere Techniken entscheidend verbessert werden.

Im zweiten Teil wurde die Methode eingesetzt, um zum einen die Beeinflussung von Undulationskräften auf die Adhäsion weicher Schalen (Vesikel) auf Festkörpern zu analysieren. Dies konnte mit wesentlich besserer Zeitauflösung als in früheren Experimenten erfolgen. Zum anderen wurde die Wechselwirkung von kolloidalen Sonden mit Grenzflächen als Funktion des absoluten Abstandes analysiert. In beiden Fällen wurde die Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM) eingesetzt. Dies ist eine interferometrische Methode um Abstände im μm -Bereich von einem Substrat in

Genauigkeit von wenigen Nanometern zu bestimmen. Bisher konnte mit dieser Methode aufgrund der interferometrisch Technik nur relative Höhen bestimmt werden. Mit der Realisierung eines neuartigen Mikroskopaufbaus (Zwei-Wellenlängen-RIKM), der das gleichzeitige Betrachten des Interferenzmusters von zwei statt nur einer Wellenlänge ermöglicht, ist es nun möglich, absolute Abstände zu bestimmen.

Die Verlässlichkeit dieser Technik wurde anhand von fallenden kolloidalen Sonden über einen Substrat bestätigt. Dabei wurde nachgewiesen, dass sich die Bahn der Sonden nach der Gleichung von Brenner (Brenner 1961) verhält, die die Reibungskraft auf Kugeln im flüssigen Medium in der Nähe von Oberflächen beschreibt. Zur Durchführung dieses Experiments wurde ein neuartiger Kugelverfolgungsalgorithmus entwickelt, der speziell auf die radialsymmetrische Abbildung von Kugeln mit RIKM abgestimmt ist.

Diese Technik kann nun zur Untersuchung von Materialeigenschaften dünner Filme verwendet werden. Hierzu wurde eine Reihe von Versuchen über vernetzten und unvernetzten Hyaluronsäurefilmen durchgeführt. Eine ähnliche Technik wurde schon früher am Lehrstuhl angewendet, aufgrund der analogen Aufzeichnungstechnik und begrenzter Rechenkapazität konnte jedoch das Verhalten von nur wenigen Sonden ausgewertet werden. Nun sind Experimente mit umfangreicher Statistik möglich. In diesem Zusammenhang wurden Experimente durchgeführt, in denen das Verhalten von Kugeln über reinem Glassubstrat und über weichen Polymerfilmen quantitativ verglichen werden konnten. Es wurde gezeigt, dass die bisher angewendete Theorie zur Auswertung dieser Versuche nicht ausreichend ist.

Zwei-Wellenlängen-RIKM wurde angewendet, um die Fluktuationen an der Unterseite von entspannten Riesenvesikeln aus Lipid-Cholesterol-Mischungen mit Beimengungen von Lipopolymeren zu untersuchen. Hierbei wurden erstmals gezeigt, dass transiente Phasenseparationen während der Zusammenstöße der Membran mit dem Substrat (aufgrund der Undulationen) stattfinden.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde ein Versuchsaufbau nach der Magnetic-Tweezers-Methode durch Hinzunahme der neuen Bildverarbeitungstechnik entscheidend verbessert und automatisiert. Bei der Magnetic-Tweezers-Methode wird eine zeitlich veränderbare Kraft auf ein in ein Probenmaterial eingebettetes paramagnetisches Sondenpartikel ausgeübt. Die erzeugte Deformation des Probenmaterials, die durch die Auslenkung der Sondenpartikel sichtbar wird, kann mit

Hilfe von Videomikroskopie aufgezeichnet und in einem zweiten Schritt mit einem Bildverarbeitungsprogramm ausgewertet werden. Mit dem neuen Aufbau konnten die frequenzabhängigen viskoelastischen Moduln von verschlachten Aktinlösungen in Frequenzbereichen von 0.5 bis 40 Hz gemessen und damit der dynamische Bereich der bisherigen Methode um fast eine Größenordnung erweitert werden. Die Frequenzabhängigkeit des Speicher- und des Verlustmoduls ist $G'(f) \propto G''(f) \propto f^\alpha$; wobei $\alpha = 0.83 \pm 0.08$ ist. Dies weicht nur geringfügig von dem theoretischen Wert 0.75 ab. Durch die Automatisierung der frequenzabhängigen Messung kann die Magnetic-Tweezers-Methode nun auch für sich zeitlich verändernde Systeme verwendet werden.

In dieser Arbeit wurden somit drei verschiedene Zellmodelle untersucht. Aktinnetzwerke als Modell für das Zytoskelett, die Membran von Vesikeln als Modell für die Zellwand und Hyaluronsäure als Modell für die extrazelluläre Matrix. Die Herstellung von sowie die Messungen an diesen sehr unterschiedlichen Systemen wurden ermöglicht durch die Zusammenarbeit mit Manfred Keller, Stefanie Gönnenwein und Kheya Sengupta.

2 Einleitung

2.1 Ziele

In der Biophysik ist die Videomikroskopie eine sehr wichtige Untersuchungsmethode, die es erlaubt, physikalische Eigenschaften von weicher Materie zu bestimmen (Häckl 1997; Simson 1998). Die Technik der kolloidalen Sonden beispielsweise hat in den letzten Jahren wesentliche Beiträge für das Verständnis von Polymernetzwerken geliefert (Dichtl 1997; Bausch 1998; Gisler 1998; Gisler 1999). Mit der Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (RIKM) können auftretende Kräfte während der spezifischen und unspezifischen Zelladhäsion bestimmt werden (Gönnenwein 2003; Lorz 2003).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die bereits am Lehrstuhl vorhandene Technik der Videomikroskopie zu modernisieren. Insbesondere sollte die analoge durch die digitale Videoaufzeichnung ersetzt werden. Bei der analogen Aufzeichnungstechnik erfolgt die Speicherung des aufgenommenen Experimentes auf ein S-VHS-Videoband. Die Auswertung wird an digitalisierten Ausschnitten durchgeführt. Bei der digitalen Aufzeichnung erfolgt keine qualitätsmindernde analoge Zwischenspeicherung, das Signal von der CCD-Kamera wird während der Aufnahme digitalisiert und digital gespeichert oder in Echtzeit ausgewertet. Die wesentlichen Vorteile der digitalen gegenüber der bisher verwendeten analogen Technik liegen in der flexiblen Aufnahmefrequenz und der besseren Bildqualität. Moderne CCD-Kameras werden in der Regel nur noch mit digitalem Interface hergestellt, so dass der Einsatz der analogen Technik mit diesen Kameras nicht mehr möglich ist. Da die Industrie bis heute keine vollständige Lösung zur Verfügung gestellt hat, die digitalen CCD-Kameras zur Aufnahme dynamischen Verhaltens nutzbar zu machen, wurde zu diesem Zweck in dieser Arbeit das Echtzeit-Bildverarbeitungsprogramm „Open Biophysics Optical eXporer“ (Open Box) entwickelt.

Die Untersuchung physikalischer Eigenschaften von Zellen ist ein Hauptanliegen der Biophysik. Dabei sind z.B. Teilaspekte wie die Zellbewegung, die spezifische und unspezifische Adhäsion von Interesse. Die Komplexität realer Zellen, die sich aus dem Zusammenwirken eigenständiger Zellkompartimenten ergibt, erschwert jedoch die Untersuchung von Einzelaspekten. Mit der Konstruktion von Modellen einzelner Zellbestandteile können diese gezielt erforscht werden. In dieser Arbeit wurden

Experimente an unterschiedlichen Modellen durchgeführt. Die Zellhülle wurde durch eine geschlossene Lipidmembran simuliert. An Beifügungen von Zusatzkomponenten wurde die Änderung der Dynamik untersucht. In der extrazellulären Matrix, also in der „Außenhaut der Zelle“ übernimmt die Hyaluronsäure unterschiedliche Aufgaben. Ihr Verhalten wurde an einem membrangestützten Hyaluronsäurefilm studiert. Die Stabilität einer Zelle ist durch ihr Zytoskelett gewährleistet. Dieses wurde vereinfacht mit einem reinen Aktinnetzwerk dargestellt. Hier wurden die frequenzabhängige viskoelastischen Moduln bestimmt.

Für die Experimente an Vesikeln und an Hyaluronsäurefilmen wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zwei-Wellenlängen-RIKM-Technik entwickelt. RIKM gibt das Höhenprofil eines Objektes in der Nähe eines Substrates als Interferenzmuster wieder. Die Beleuchtung erfolgt dabei mit einer Linie des Linienspektrums einer Quecksilberdampfampe. Interferenzmuster enthalten jedoch nur relative, aber nicht absolute Höheninformationen. Aus Interferenzmustern mehrerer verschiedener Linien von dem gleichen Objekt können jedoch absolute Höhen errechnet werden. Dieses Verfahren nutzt die Zwei-Wellenlängen-RIKM-Technik.

2.2 Gliederung

Im Kapitel 3 wird die Konzeption von „Open Box“ vorgestellt. Dabei wird der objektorientierte Programmentwurf dargestellt, die Schritte zur Parallelisierung werden erklärt sowie die Notwendigkeit der Wavelet-basierten Kompression erörtert.

Kapitel 4 führt in die Technik Zwei-Wellenlängen-RIKM-Technik ein. Dabei werden neu entwickelte Algorithmen vorgestellt, die zur Auswertung von Kugelfluktuationen notwendig sind.

Im Kapitel 5 werden Ergebnisse von Experimenten an Hyaluronsäurefilmen und Vesikel vorgestellt, die mit Hilfe der Zwei-Wellenlängen-RIKM-Technik durchgeführt werden konnten.

Kapitel 6 enthält einen Abdruck einer im Rahmen der Doktorarbeit abgefassten Veröffentlichung über rheologische Untersuchungen an Aktinnetzwerken. Mit Hilfe des entwickelten Bildverarbeitungsprogramm wurde ein automatisierter Magnetic-Tweezers-Aufbau entwickelt, mit dem die dargestellten Experimente durchgeführt werden konnten.

3 „Open Box“ - Eine neue Echtzeit-Bildverarbeitung

3.1 Digitale und analoge Aufzeichnungstechnik

CCD-Kameras, die für die Videomikroskopie verwendet werden, lassen sich in Abhängigkeit ihrer Datenschnittstelle in analoge und digitale Kameras aufteilen. Grundsätzlich nimmt jede CCD-Kamera für jeden Pixel einen analogen Wert auf. Dies ist eine bestimmte Menge an Ladung, die proportional zu der Photonenmenge ist, die auf diesem Pixel während der Belichtungszeit einfällt. Eine analoge Kamera gibt diesen Wert als Spannung weiter, während eine digitale Kamera diesen Wert digitalisiert als Binärwert übergibt. Eine digitale Kamera verfügt also im Gegensatz zu einer analogen Kamera über eine Digitalisierungseinheit. Für analoge Kameras stehen zur Datenübergabe die europäische PAL- und die amerikanische NTSC-Norm zur Verfügung, die auf feste Bildraten von 25 bzw. 33 Hz¹ und feste Pixelformate festgelegt sind. Sollen Bilder mit einer größeren Pixelanzahl oder mit höherer Bildrate übertragen werden, so ist dies nur über eine digitale Schnittstelle möglich.

Da qualitativ hochwertige Kameras in der Regel mit einer digitalen Schnittstelle ausgeliefert werden, stellte sich die Frage, ob diese für biophysikalische Experimente, bei denen Bildfolgen über mehrere Minuten lückenlos aufgenommen werden müssen, verwendet werden können. Die wichtigen zu erfüllenden Forderungen bestehen darin, dass es möglich sein muss, größere Ausschnitte aus dem Kamerabild für längere Zeiträume aufnehmen und archivieren zu können. Bei der bisherigen analogen Videomikroskopie, die bisher an unseren Lehrstuhl Anwendung fand, wurde für die Aufnahme sowie für die Archivierung S-VHS-Videobänder verwendet. Die Aufnahme auf Videobändern verringert jedoch die Qualität der Bilder. Bei der digitalen Bildverarbeitung erfolgt die Aufnahme auf Festplatten und die Archivierung auf CD-R's bzw. beschreibbaren DVD's. Zur sinnvollen Archivierung muss eine Datenreduktion mittels Bildkompression erfolgen.

Das größte Hindernis zur Anwendung der digitalen Kameras war, dass es bis heute keine Bildverarbeitungssoftware gibt, die der Forderung nach direkter Aufnahme auf die Festplatte und ein Konzept zur Datenkompression nachkommt.

¹ Hier wurde die Frequenz bezogen auf Vollbilder angegeben. Tatsächlich werden mit der doppelten Frequenz Halbbilder übertragen.

So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Bildverarbeitungsprogramm verwirklicht, dass die Nutzung von digitalen Kameras für die Videomikroskopie in der Biophysik ermöglicht. Es wurde **Open Biophysics Optical eXplorer**, abgekürzt Open Box genannt.

3.2 Die Wahl der Waffen

Open Box wurde anfangs mit Visual C++ 5.0, später mit Visual C++ 6.0 (Microsoft Corp., Unterschleißheim, Deutschland) unter Windows NT 4.0 (siehe VC++) verwirklicht. Die Anwendung wurde nach den Regeln des objektorientierten Paradigmas (siehe Abschnitt 3.2.3) erstellt. Im folgenden werden die Gründe für diese Auswahl dargestellt.

3.2.1 Das Betriebssystem

Windows NT 4.0 wurde als zugrundeliegendes Betriebssystem gewählt, da zum einen die Verfügbarkeit von Treibern für die verwendete Hardware (Video-Grabber, A/D-Wandler) außerordentlich gut ist, und zum anderen Windows NT 4.0 preemptives² Multitasking und Multithreading beherrscht. Die letzte Eigenschaft ist insbesondere für die Echtzeitfähigkeit von Open Box unerlässlich (siehe Abschnitt 3.4). Open Box kann auch mit den Nachfolgebetriebssystemen Windows 2000 und Windows XP betrieben werden, die ebenfalls diese Eigenschaften aufweisen.

3.2.2 Die Entwicklungsumgebung VC++

Dahl und Nygaard entwickelten bereits in den sechziger Jahren die Idee der objektorientierten Programmierung, die sich wesentlich von den zu dieser Zeit gängigen prozeduralen Sprachen (Fortran, C, Pascal u.a.) unterschied. Die entstandene Programmiersprache Simula 67 (Dahl 1970) ist der Urahn der heutigen objektorientierten Entwicklungsumgebungen (Delphi, VC++, Smalltalk u.a.). Die geringe Leistungsfähigkeit der frühen objektorientierten Sprachen verzögerte jedoch deren Verbreitung. Bjarne Stroustrup, ein Mitarbeiter der Computing Science Research Center der Bell Labs (Murray Hill, New Jersey, USA), erweiterte 1979 die Sprache C um objektorientierte Elemente (Stroustrup 1992a; Stroustrup 1992b). Die Zielsetzung war hierbei, keine Kompromisse bei der Leistungsfähigkeit und Flexibilität der Sprache einzugehen. 1985 wurde die erste Version des erweiterten C, das nun C++ genannt wurde, kommerziell vertrieben. C++ ist, nach der Aussage von Stroustrup, keine

² Preemptives Multitasking ist im Gegensatz zu kooperativen Multitasking nicht darauf angewiesen, dass die einzelnen Prozesse kooperieren, das heißt diese müssen nicht selbständig ihre Rechenzeit abgeben. Diese Eigenschaft ist für die Stabilität und Ansprechbarkeit einer rechenintensiven Anwendung entscheidend.

objektorientierte Programmiersprache, sondern eine „Multi-Paradigmen-Sprache“, die objektorientierte Programmierung unterstützt. Heute gibt es für jedes namhafte Betriebssystem C++ - Compiler sowie Entwicklungsumgebungen. Das von Microsoft Corp. entwickelte Visual C++ (VC++) gehört zu den wichtigsten Entwicklungsumgebungen zum Erstellen von Win32 Applikationen³.

VC++ als Entwicklungsumgebung wurde aus folgenden Gründen gewählt:

- VC++ verfügt über die Leistungsfähigkeit und Flexibilität von C++.
- VC++ bietet viele Möglichkeiten einer modernen Entwicklungsumgebung (Debugger, visueller Ressourceneditor, ...).
- Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hardware bietet Unterstützung für VC++.
- Die Verfügbarkeit von Programmbibliotheken, wie zum Beispiel der Kompressionsbibliothek von MEVIS (siehe Abschnitt 3.6), ist für VC++ besser als für andere Entwicklungssysteme.

3.2.3 Das objektorientierte Paradigma

Im folgenden werden die Vorteile des objektorientierten Paradigmas dargestellt und die zum Verständnis notwendigen Begriffe der objektorientierten Programmierung erläutert.

„Statt eines bitfressenden Prozessors, der Datenstrukturen hin- und herschaufelt, haben wir nun ein Universum von wohlgezogenen Objekten, die sich höflich gegenseitig bitten, zur Erfüllung ihrer jeweiligen Anliegen beizutragen.“

Mit diesen Satz kommentiert Dan Ingalls⁴ die Grundidee der objektorientierten Sprache, dessen wesentliche Konzepte Datenkapselung, Vererbung und Polymorphismus⁵ sind. Diese Begriffe werden im folgenden erläutert.

In prozeduralen Sprachen findet man eine Trennung zwischen Daten und Funktionen. In objektorientierten Sprachen definiert man Strukturen, die Daten und Funktionen vereinen. Im objektorientierten Vokabular werden diese Strukturen **Objekte** genannt,

³ Win32 Applikationen sind Anwendungen die für 32-Bit-Windowsbetriebssysteme geschrieben wurden. Diese Betriebssysteme sind Windows NT, 9x.,Me, 2000 und XP.

⁴ Dan Ingalls verwirklichte die erste Implementierung des objektorientierten Entwicklungssystem Smalltalk-72.

⁵ polymorph (gr.) = verschiedenartig

deren Daten heißen **Eigenschaften**⁶ und deren Funktionen nennt man **Methoden**. Die im Quellcode beschriebene Definition eines Objekts heißt **Klasse**. Sie ist also die Abstraktion des Objekts. Sie beschreibt sein Verhalten, also die Möglichkeiten, die es durch die Methoden erhält, sowie den Zustand, der durch die Eigenschaften festgelegt ist. Wenn die Klasse als Form betrachtet wird, so ist das Objekt die Figur, die mit dieser Form hergestellt werden kann. Diesen Vorgang der Erstellung eines Objekts nennt man **Instanziierung**.

Datenkapselung bedeutet, dass die Eigenschaften eines Objekts nicht direkt zugänglich sind, sondern nur mit Hilfe von Methoden gesetzt werden können. Dabei sind die Methoden dafür verantwortlich, dass sich ein Objekt stets in einem wohl definierten Zustand befindet. Als Resultat der konsequenten objektorientierten Programmierung kann sich, anders als im klassisch prozeduralen Fall, der Programmierer auf die Konsistenz zusammenhängender Daten verlassen.

Die Vererbung ermöglicht die Erweiterung einer Klasse. Eine Kindklasse wird von einer Elternklasse abgeleitet und erbt dabei deren Funktionalität. Die Elternklasse stellt somit die Verallgemeinerung einer Kindklasse dar. Im Abschnitt 3.3.3 wird dies anhand eines konkreten Beispiels dargestellt.

Der Polymorphismus ist als Konsequenz der Vererbung eines der wichtigsten Konzepte der objektorientierten Programmierung. Dieser Mechanismus ermöglicht, dass Objekte von verschiedenen Kindklassen, die über einen gemeinsame Ahnenklasse verfügen, auf gleiche Methodenaufrufe unterschiedlich in der Implementation, aber gleich im Sinn reagieren. Dies soll anhand eines Beispiels erläutert werden. In Open Box ist eine Klasse CBildquelle definiert. Von dieser Klasse sind unter anderen die Klassen CBildquelleAVI und CBildquelleSGI abgeleitet. Diese Klassen sollen den Zugriff auf die Bilddaten einer AVI- bzw. eine SGI-Datei ermöglichen. Objekte dieser speziellen Klassen können mit den allgemeinen Methoden der Ahnenklasse (z.B. LadeBild(Bildnummer)) angesprochen werden. In Tab. 3.1 ist der Unterschied zum Funktionsaufruf des klassisch prozeduralen Paradigmas dargestellt. Man sieht, dass der Aufruf nach dem objektorientierten Paradigma wesentlich übersichtlicher ist. Wird das Programm um eine Bildquelle erweitert(z.B. der Zugriff auf ein Quicktime-Movie), so

⁶ Die Entwickler von VC++ benutzen den Begriff „Member-Funktion“ statt des allgemein verwendeten Begriffs „Eigenschaft“.

muss diese Stelle des klassisch prozeduralen Programms erweitert werden, die des objektorientierten Programms nicht.

Objektorientierter Methodenaufruf	Klassisch prozeduraler Funktionsaufruf
Bildquelle-> LadeBild(Bildnummer)	if (Bildquelle == TIFF-Datei) LadeBildVonTIFFDatei(Bildquelle, Bildnummer); else if (Bildquelle == AVI-Datei) LadeBildVonAVIDatei(Bildquelle Bildnummer); else if

Tab. 3.1: Vergleich des objektorientierten Methodenaufruf mit dem klassisch prozeduralen Funktionsaufruf

Objektorientierte Programme lassen sich auf Grund der beschriebenen Konzepte wesentlich besser warten und erweitern als Programme die auf prozedurale Quelltexte beruhen. Die Verwendung einer objektorientierten Sprache reicht allerdings noch nicht aus, um dieses hohe Maß an Übersichtlichkeit zu erzeugen. Die Analyse der Problemstellung und das Design des Programms müssen konsequent nach objektorientierten Gesichtspunkten durchgeführt werden. Dies wird im Abschnitt 3.3 dargestellt.

3.3 Die Programmkonzeption

3.3.1 Objektorientiertes Design

Am Anfang eines objektorientierten Entwurfs steht die Abstraktion des in die Programmiersprache abzubildenden Vorganges, und die daraus resultierende Definition der Klassen, die zur Abbildung dieses Vorgangs benötigt werden (Booch 1994). Der Vorgang der Bildverarbeitung lässt sich in 3 unabhängige Schritte einteilen:

1. Das Einlesen des Bildes aus einer Kamera oder aus einer Datei
2. Die Bearbeitung des Bildes
3. Die Anzeige des Bildes

Für die Umsetzung in ein objektorientiertes Design, müssen für diese einzelnen Schritte Klassen gefunden werden, die diese entsprechenden Aufgaben durchführen. Dabei sind die Klassen so zu wählen, dass sie sich in Ihrer Aufgabenstellung möglichst eindeutig von anderen Klassen abgrenzen lassen. Die auf diese Weise definierten Klassen sind in

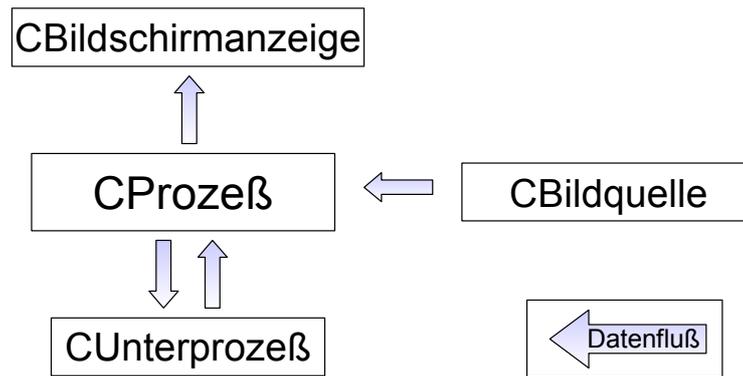


Abb. 3.1: Der Basisentwurf des Klassendiagramms von Open Box.

Abb. 3.1 dargestellt. Im Folgenden werden deren Aufgaben und Anforderungen beschrieben.

CBildquelle

Die Bildquelle kann z.B. eine CCD-Kamera, ein Videorekorder oder eine Datei sein. Das Objekt besitzt Methoden, die Informationen über die Bildfolge liefern, sowie den Zugriff auf einzelne Bilder ermöglichen. Die Bildquelle stellt Steuerelemente zur Verfügung, die zum Beispiel im Fall der Kamera, die Steuerung derselben übernehmen.

CUnterprozess

Der Unterprozess ist für die Bearbeitung der Bilder zuständig. Er kann z.B. ein Kugelverfolgungsalgorithmus anwenden oder die Speicherung von Bildfolgen auf die Festplatte durchführen. Ein Unterprozess kann Kontroll- und Anzeigefenster erzeugen lassen.

CBildschirmanzeige

Die Bildschirmanzeige kann Bildfolgen, Helligkeitsprofile oder Helligkeitsverteilungen anzeigen. Sie kann Steuerleisten aufnehmen und über Kontextmenüs Benutzereingaben entgegennehmen.

CProzess

Das Objekt der Klasse CProzess soll die Aufgabe haben, die anderen Objekte zu steuern.

3.3.2 Einbettung in das Document-View-Konzept der MFC

Im Folgenden wird die Aufgabe der „Microsoft Foundation Classes“ (MFC) in VC++ beschrieben und die notwendige Erweiterung des Basis-Klassenkonzepts vorgestellt, die Voraussetzung ist, um die Vorteile der MFC bei der Anwendungssteuerung nutzen zu können.

Ein Windows-Programm kommuniziert mit dem Betriebssystem über das „Win32 Application Programming Interface“ (Win32 API)⁷. Da diese Schnittstelle aber nicht objektorientiert gestaltet ist, ist es vorteilhaft, diese zur Verwendung in einem objektorientierten Programm zu kapseln. In VC++ übernimmt diese Aufgabe die MFC (Kruglinsky 1992). Windows stellt verschiedene Programmierschnittstellen zur Verfügung, um Anwendungen zu erzeugen und zu verwalten. Das Multi Document Interface (MDI) bietet eine Schnittstelle für dokumentenbasierte Anwendungen, die das gleichzeitige Bearbeiten von mehreren Dokumenten ermöglicht. Ein Dokument ist in diesem Sinne eine Struktur, die Daten beinhaltet, dies kann z.B. eine Folge von aufgenommen Bildern sein. Das MDI wird in Open Box über die MFC benutzt.

Das MDI-Konzept sieht vor, dass am Anfang jeden Vorganges, das Öffnen oder Erstellen eines Dokumentes steht. Zu jedem geöffneten bzw. erzeugten Dokument muss je ein von den MFC-Klassen CDocument und CView abgeleitetes Objekt erzeugt werden. Die Klasse CView ist zuständig für die Bildschirmansicht, die Klasse CDocument organisiert die Datenhaltung. Wenn nun über die MFC das MDI benutzt wird, ist es notwendig, diese beiden Klassen in das Klassenkonzept der Anwendung einzubinden. Die Einbindung dieser beiden Klassen in das Basis-Klassendiagramm von Open Box wird nun im Folgenden diskutiert.

Für die Klasse CView ist dies sehr einfach. Die zur Bildschirmanzeige benötigten Klassen, können direkt von CView abgeleitet werden. Sie erhalten hierdurch eine umfangreiche ererbte Unterstützung zur Darstellung des Fensters und zur Kontrolle von Steuerelementen.

⁷ Das Win 32 API ist eine Programmierschnittstelle zum Betriebssystem für Win32-Applikationen.

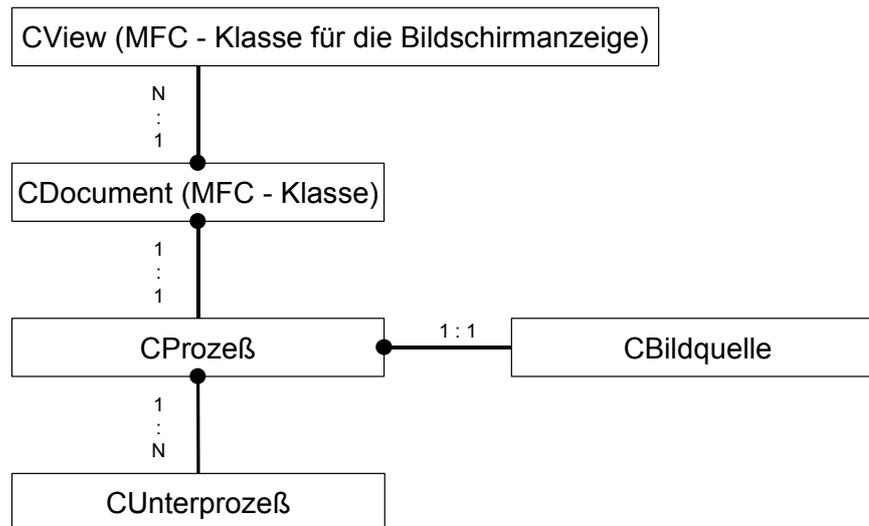


Abb. 3.2: Einbettung des Basis-Klassenkonzept in die MFC. Die Verbindungen stellen die Besitzverhältnisse dar, wobei die Linien mit einem ausgefüllten Kreis beim Besitzer enden.

Um die Klasse CDocument in das Klassenkonzept zu berücksichtigen, gibt es generell zwei Möglichkeiten. Eine Klasse, die im Konzept enthalten ist, kann von CDocument abgeleitet werden, oder CDocument wird als zusätzliche Klasse dem Konzept hinzugefügt. Für den ersten Fall könnten als geeignete Klassen die Bildquelle und der Prozess in Betracht gezogen werden. Um diese Klassen jedoch nicht mit Methoden zu belasten, die keinen direkt einsehbaren Bezug zu diesen haben, wurde die zweite Möglichkeit gewählt. Ein Ableiten der Klasse CProzess von der Klasse CDocument wäre jedoch ebenfalls sinnvoll gewesen. Dem Basis-Klassendiagramm von Abb. 3.1 wird nun die Klasse CBildDokument hinzugefügt, die von der MFC-Klasse CDocument abgeleitet wird. Für jede zu bearbeitende Bildfolge wird ein Objekt der Klasse CBildDokument erzeugt, das genau über ein Objekt der Klasse CProzess verfügt, das wiederum ein Objekt der Klasse Bildquelle besitzt. Ein Objekt CProzess kann mehrere Objekte CUnterprozess besitzen, die für die Bearbeitung der Bilder zuständig sind. Das vervollständigte Basis-Klassendiagramm ist in Abb. 3.2 dargestellt. Die Linien verdeutlichen die Besitzverhältnisse, wobei die ausgefüllten Kreise an den Enden der Linien zum jeweiligen Besitzer zeigen.

3.3.3 Erweiterung des Klassendiagramms

CBildquelle, CUnterprozess und CView sind abstrakte Klassen. Das bedeutet, dass von ihnen keine konkreten Objekte instantiiert werden können. Sie dienen zur Definition einer allgemeinen Schnittstelle, die den Zugriff auf die abgeleiteten speziellen Klassen vereinheitlichen. Von diesen abstrakten allgemeinen Klassen werden also spezielle

konkrete Klassen abgeleitet. So werden z.B. von der abstrakten Klasse CBildquelle die konkreten Klassen CBildQuelleAVI und CBildQuelleBitmap abgeleitet (vgl. Abschnitt 3.2.3), die einen Zugriff auf Bilder einer AVI- bzw. einer Bitmap-Datei ermöglichen. In Abb. 3.3 ist die Vererbungshierarchie der Klasse CBildquelle dargestellt.

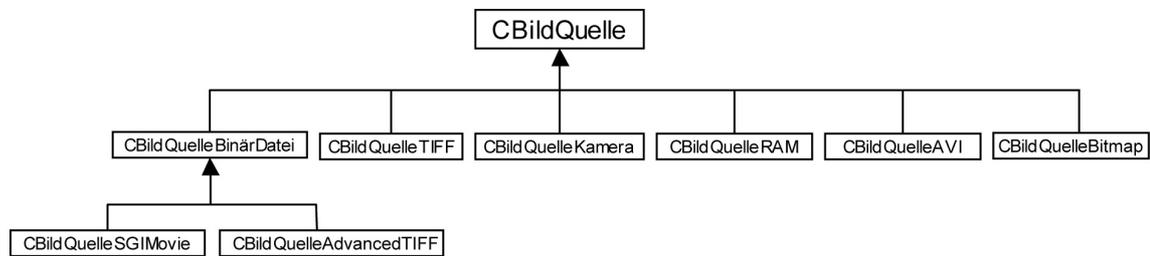


Abb. 3.3: Vererbungshierarchie der Klasse CBildquelle

In Abb. 3.4 ist das Klassendiagramm in ausführlicher Form dargestellt. Es zeigt zusätzlich die Vererbungshierarchien der Klassen CUnterprozess und CView, sowie die Beziehung zu den wichtigsten Hilfsklassen. Diese dienen der Benutzerkommunikation, der Steuerung der zusätzlichen Hardware (Kamera-Controller, Frame-Grabber-Karte, A/D-Wandler) und der Datenverwaltung. Zusätzlich verfügt OpenBOX über 38 Dialogklassen, die zur Einstellung von Programmparametern verwendet werden. Zur Wahrung der Übersicht sind diese im Klassendiagramm nicht dargestellt.

3.4 Parallelisierung

Die im Abschnitt 3.3 dargestellten Klassendiagramme geben Auskunft über die Besitzverhältnisse und Vererbungshierarchien, jedoch nicht über den chronologischen Ablauf des Programms. Im einfachsten Fall kann eine Win32-Anwendung nur einen Ausführungspfad besitzen, der Basis-Thread genannt wird. Ein parallelisiertes Programm kann neben diesen Basis-Thread, weitere

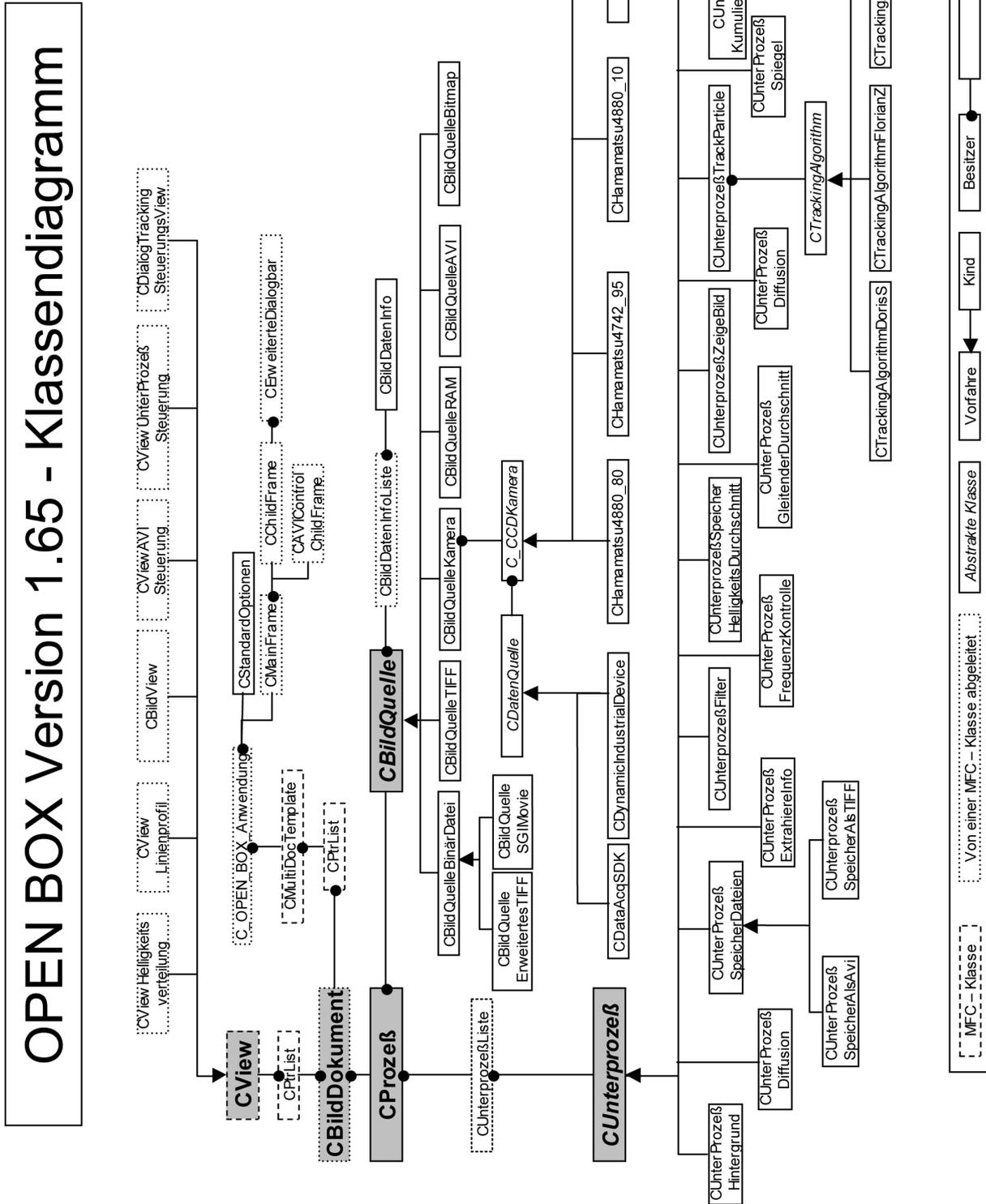


Abb. 3.4: Das Klassendiagramm der abgeleiteten Klassen von Open Box. Die Klassen des Basiskonzept sind grau unterlegt. Abstrakte Klasse sind kursiv dargestellt.

Ausführungspfade besitzen (Rößmann 1997). Auf den ersten Blick stellt sich die Parallelisierung eines Programms als eine Zunahme seiner Komplexität dar. Doch im Folgenden soll gezeigt werden, dass sich die Komplexität der Echtzeit-Bildverarbeitung durch die Parallelisierung verringert werden kann.

Es wird der Fall betrachtet, bei dem Bilder von einer CCD-Kamera eingelesen und anschließend bearbeitet werden. Hierbei existieren zeitliche Beschränkungen. Die Frame-Grabber-Karte, die als Schnittstelle zwischen Computer und CCD-Kamera dient, erhält kontinuierlich Bilddaten von der Kamera. Wenn ein Bild vollständig in dem Speicher der Frame-Grabber-Karte eingelesen ist, sendet diese ein Signal an das Programm, dass ein Bild zur Abholung bereit liegt. Das Bildverarbeitungsprogramm muss nun unmittelbar reagieren und das Bild in den Hauptspeicher des Computers kopieren, bevor es von dem nächsten Bild der Kamera überschrieben wird. Genau hier liegt das Problem. Das Programm ist damit beschäftigt die vorhergehenden Bilder zu bearbeiten, anzuzeigen und Eingaben vom Benutzer entgegenzunehmen. Es muss vermieden werden, dass während der Ausführung von Programmteilen, die sich nicht mit dem Einlesen der Bilder in den Hauptspeicher beschäftigen, Bilder verloren gehen. Eine Möglichkeit wäre den gesamten Programmcode der während der Echtzeit-Bildverarbeitung verwendet wird so zu programmieren, dass z.B. nach jeder Millisekunde nachfragt wird, ob ein Bild vorhanden ist, das abgeholt werden muss. Die Schwierigkeit liegt dabei nicht zu oft und nicht zu selten nachzufragen. Fragt das Programm zu oft nach, so wird es durch diesen Vorgang verlangsamt, fragt es zu selten nach, können Bilder verloren gehen. Der Zeitbedarf des Programms hängt nicht zuletzt von der individuellen Rechner-Performance ab, von der jedoch der Programmcode nicht abhängig sein sollte. Als Konsequenz dieses Verfahrens, würde das Programm mit organisatorischen Quellcode aufgebläht und dadurch sehr unübersichtlich werden.

Eine Zielsetzung der objektorientierten Programmierung ist jedoch, Probleme getrennt zu lösen und verschiedene Aufgaben nicht wie im dargestellten Fall miteinander zu vermischen. Eine Lösung, die dieser Zielsetzung entspricht, bietet das Betriebssystem an. Im Abschnitt 3.2.1 wurde als einer der Gründe der Wahl von Windows NT 4.0 die Fähigkeit zum preemptiven Multitasking und Multithreading genannt. Dieses erlaubt nicht nur, dass Programme gleichzeitig nebeneinander ablaufen können, sondern den

parallelen⁸ Ablauf einzelner Programmpfade (Threads). Die Zeiteinteilung, die durch das Betriebssystem vorgenommen wird, kann manipuliert werden, indem den einzelnen Programmpfaden unterschiedliche Prioritäten zugeordnet werden.

Nun können die Aufgaben des Bildverarbeitungsprogramm (Bild einlesen, Bild bearbeiten und Bild anzeigen) nach Ihrer Priorität sortiert werden. Der Thread, der die Bilder von der Frame-Grabber-Karte einliest, hat eine höhere Priorität, als der Thread der die Bilder bearbeitet. Dieser steht über den Thread, der die Bilder am Bildschirm anzeigt. Das Abholen der Bilder von der Grabberkarte ist zeitkritisch. Dies muss unmittelbar nach der Aufforderung der Frame-Grabber-Karte geschehen. Das Bearbeiten der Bilder ist wichtig, aber nicht zeitkritisch, da durch die Einführung eines Zwischenspeichers die Bilder nicht unmittelbar nach dem Einlesen behandelt werden müssen. Die Anzeige der Bilder kann sogar teilweise entfallen, da z.B. bei einer Bildfrequenz von 100 Hz nicht mehr erkennbar ist, ob jedes oder nur jedes zweite Bild angezeigt wird.

Aus den unterschiedlichen Prioritäten ergibt sich folgende Konsequenz. Der Thread, der die Bilder von der Frame-Grabber-Karte einliest, bildet für den zeitlichen Ablauf des Programms ein starres Gerüst. Der Thread der für die Bildbearbeitung zuständig ist, fügt sich diesem Zeitgerüst. Der Thread der die Bildschirmanzeige erzeugt, füllt die verbleibenden Lücken aus. Abb. 3.5 stellt das Verhalten der drei beschriebenen Threads bei einer quasiparallelen Ausführung in einem Zeitdiagramm dar. Die nach unten zeigenden Pfeile stellen die verwendete Rechenzeit des jeweiligen Threads dar. Die Beschriftung der Pfeile bezieht sich auf die Nummer des zu bearbeitenden Bildes. Es ist ein Vorgang dargestellt, bei dem der Zeitbedarf des bildbearbeitenden Threads für verschiedene Bilder unterschiedlich ist. Für Bild 2 verwendet dieser Thread mehr Zeit, als es das von den bildereinlesenden Thread vorgegebene Zeitgerüst zulässt. Diese Differenz kann zum einen, durch das Auslassen von Bildern bei der Anzeige, und zum anderen durch den unterschiedlichen Zeitbedarf für verschieden Bilder ausgeglichen werden. Rechts in der Abbildung wird der Bildpuffer dargestellt, in dem eingelesene Bilder bis zu ihrer Verarbeitung zwischengespeichert werden. Dabei werden die Bilder mit ihrer jeweiligen Nummer dargestellt. Wenn für jedes Bild bei der Bearbeitung die

⁸ Wenn ein Programm, das diese Fähigkeiten nutzt, auf einem System mit nur einem Prozessor gestartet wird, handelt es sich hierbei um einen „quasiparallelen“ Programmablauf.

zur Verfügung stehende Zeit überschritten wird, muss der Prozess abgebrochen werden, sobald der Zwischenspeicher gefüllt ist.

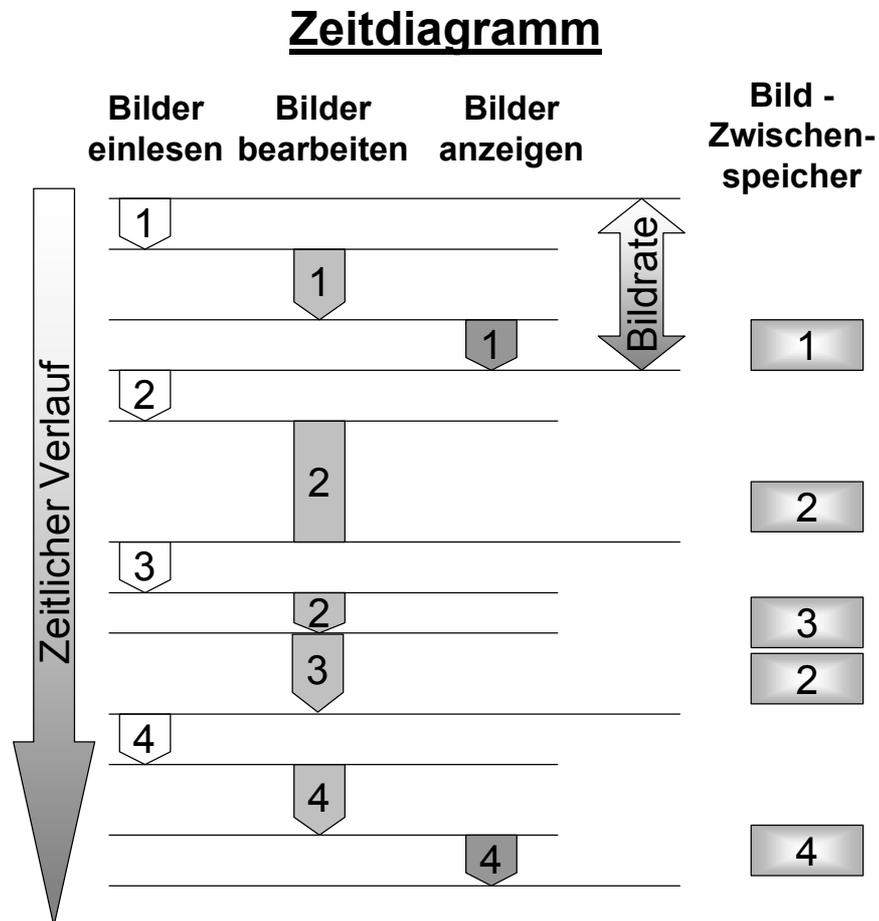


Abb. 3.5: Zeitablauf im Programm bei der quasiparallelen Ausführung (siehe Text).

3.5 Demonstration der Erweiterbarkeit

Open Box ist nicht nur für die speziellen Versuche konzipiert, die in den nachfolgenden Kapiteln dargestellt werden, sondern es soll eine vollständige Alternative zur analogen Bildverarbeitung sein. Eine Grundvoraussetzung hierfür ist die einfache Erweiterung des bestehenden bildbearbeitenden Moduls.

Eine dementsprechende Erweiterung wird erreicht durch das Ableiten einer neuen Klasse von der Klasse CUnterprozess (siehe Abschnitt 3.3.1). Um diesen Vorgang möglichst einfach zu halten soll für die Erstellung des Programmcode folgendes gelten:

- Die Programmierung des Unterprozess vollzieht sich ausschließlich innerhalb der Klasse. Außerhalb der Klasse sind nur wenig standardisierte Änderungen notwendig, die keine Konzeptionsarbeit erfordern. Eine detaillierte Kenntnis der

Programmstruktur, bzw. des Klassen-Konzepts ist nicht notwendig. Es sollte lediglich das Basis-Klassenkonzept verstanden sein.

- Open Box ist ein parallelisiertes Programm. Die Klasse CUnterprozess ist bereits von der Konzeption thread-sicher gestaltet. Bei der Programmierung eines Unterprozesses muss das parallele Konzept nicht berücksichtigt werden.
- Ein Unterprozess muss lediglich das Format der Bilder berücksichtigen. Eine Unterscheidung nach Bildquellen ist nicht erforderlich.

Das Ergebnis dieser Forderungen soll anhand eines Fallbeispiels demonstriert werden. Folgende Aufgabe ist gestellt:

Der Einfluss des Hintergrundes einer Bildfolge soll reduziert werden. Hierzu kann der Benutzer eine Bitmap-Datei angeben, die von den aktuellen Bildern subtrahiert werden soll. Dieser Vorgang soll in der Prozessliste von Open Box erscheinen und von dem Prozessmanager gesteuert werden können.

Hierzu wird eine neue Klasse CUnterprozessHintergrund von der Klasse CUnterprozess abgeleitet werden. In Tab. 3.2 ist die Klassendeklaration dargestellt.

In der Zeile 1 wird die Klassendeklaration mit dem C++ -Schlüsselwort „class“ eingeleitet. Es wird der Name der neuen Klasse, sowie der Elternklasse genannt. Zeile 4 und 6 enthalten den Konstruktor bzw. Destruktor. Dies sind Standardmethoden, über die jede Klasse verfügt. Der Konstruktor wird automatisch aufgerufen, wenn ein konkretes Objekt erzeugt (instantiiert) wird, der Destruktor wird automatisch aufgerufen wenn das Objekt gelöscht wird. In den Zeilen 9 bis 14 sind Methoden definiert und implementiert, die zur Verwaltung des Unterprozess in der Anwendung dienen. In den Zeilen 17 bis 20 sind die wichtigen Methoden definiert, die als einzelne Phasen des Unterprozesses interpretiert werden können. Mit diesen Methoden sowie den Konstruktor und den Destruktor wird die Funktionalität des Unterprozesses implementiert. Ab Zeile 20 sind die Eigenschaften definiert, die den Zustand des Objektes beschreiben. Das Schlüsselwort „private“ (Zeile 22) schützt sie vor einen Zugriff von außen (siehe Datenkapselung Abschn. 3.2.3).

1	class CUnterprozessHintergrund: public CUnterprozess	Klassenname
2	{	
3	public:	
4		
5	CUnterProzessHintergrund (CProzess* pProzess);	Konstruktor
6	virtual ~ CUnterProzessHintergrund ();	Destruktor
7		
8		
9	static CString GetNameOfObject()	Methoden, die zur automatischen Einbindung in das Programm benötigt werden.
10	{return "Subtrahiere Hintergrund";};	
11	static BOOL IsExclusive()	
12	{return FALSE;};	
13	DWORD GetID(void)	Ererbte Methoden der Elternklasse, die überschrieben werden müssen.
14	{return SPI_SubProcessHintergrund;};	
15		
16		
17	BOOL Init (void);	Eigenschaft
18	BOOL GetOptionsFromUser (void);	
19	BOOL DoProcess (CBildDatenInfo* pBildDatenInfo);	
20	void Deinit (void);	
21		
22	private:	
23	CString m_strFileName	
24	void* m_pBackground	
25	};	

Tab. 3.2: Klassendeklaration der neuen Klasse CUnterprozessHintergrund

Die Dynamik des Unterprozess besteht aus 6 Phasen. Diese werden im folgenden beschrieben.

Phase 1: Konstruktor

Der Konstruktoraufruf erfolgt nur einmal, wenn das Objekt erzeugt wird. Hier werden den Eigenschaften sinnvolle Werte zugewiesen, damit sich das Objekt in einem definierten Zustand befindet.

```

CUnterProzessHintergrund::CUnterProzessHintergrund
(CProcess* pProcess):CSubProzess(pProcess)
{
    Objekt in einen definierten Zustand setzen.
}

```

Phase 2: Initialisierung

Bei der Initialisierung können Informationen abgefragt werden, die über die zu bearbeitenden Bilder benötigt werden (z.B. Breite, Höhe). Wenn die einstellbaren Optionen noch nicht von dem Benutzers abgefragt wurden, muss dieses nun geschehen.

Dies erfolgt über den Aufruf der Methode `GetOptionsFromUser`. Im Fall der Klasse `CUnterprozessBackground` ermöglicht sie dem Benutzer die Auswahl der Bitmap-Datei, die das zu verwendende Hintergrundbild beinhaltet. Wenn alle notwendigen Informationen zusammengetragen sind, kann die Initialisierung des Unterprozesses stattfinden. Hier werden nun alle Aufgaben durchgeführt, die nur einmal am Anfang einer Bildfolge notwendig sind.

```
BOOL CUnterProzessHintergrund::Init(void)
{
    Bei der ersten Initialisierung wird die Methode GetOptionsFromUser
    aufrufen.

    Das Hintergrundbild wird geladen.

    Wenn alles o.k. ist, liefert die Methode „TRUE“ zurück
}
```

Phase 3: Eingabe der Optionen durch den Benutzer

Diese Phase wird automatisch von der Initialisierungsphase oder manuell von dem Benutzer aufgerufen.

```
BOOL CUnterProzessHintergrund::GetOptionsFromUser(void)
{
    Namen der Datei wird per Dialog vom Benutzer erfragt

    Wenn alles o.k. ist, liefert die Methode „TRUE“ zurück
}
```

Phase 4: Ausführung

Diese Phase wird aufgerufen wenn ein neues Bild geladen wurde. In den Parametern des Aufrufs wird die Speicheradresse des Bild übergeben. Dem UnterProzess ist es gleichermaßen möglich, aus dem Bild zu lesen, sowie Werte des Bildes zu ändern.

```
BOOL CUnterProzessHintergrund::DoProcess(CBildDatenInfo* pBildDatenInfo)
{
    Hintergrundbild vom aktuellen Bild abziehen. Der Zugriff auf das aktuelle Bild
    erfolgt mit dem Übergabeparameter „pBildDatenInfo“.

    Wenn alles o.k. ist liefert die Methode „TRUE“ zurück
}
```

Phase 5: Deinitialisierung

Diese Phase wird aufgerufen, wenn der Unterprozess gestoppt wurde. Die Eigenschaften des Unterprozesses werden in den Grundzustand gesetzt. Die Optionen, die der Benutzer eingegeben hat, bleiben erhalten und werden bei der nächsten Initialisierung wieder berücksichtigt. Speicher, der in der Initialisierungsphase reserviert wurde, wird freigegeben. Der Unterprozess wird gestoppt, wenn das Bearbeiten einer Bildfolge beendet wurde, oder der Benutzer diesen Unterprozess in dem Prozessmanager der Anwendung deaktiviert.

```
void CUnterProzessHintergrund::Deinit (CBildDatenInfo* pBildDatenInfo)
{
    Hintergrundbild löschen
}
```

Phase 6: Destruktor

Diese Phase wird aufgerufen, bevor das Objekt vernichtet wird. Hier finden die letzten Aufräumarbeiten statt. Der Unterprozess wird auf Anforderung des Benutzers gelöscht.

```
CUnterProzessHintergrund::~~UnterProzessHintergrund()
{
    Eigenschaften deinitialisieren.
}
```

Die Arbeit, ein Unterprozess zu implementieren besteht somit darin, den Quellcode für diese 6 Phasen zu schreiben. Ein Eingriff in die Dynamik des Programmes, die dessen genaue Kenntnis voraussetzt, ist also nicht notwendig.

3.6 Datenspeicherung und Kompression

3.6.1 Technische Voraussetzungen

Aufgrund von Einschränkungen in der Festplattenkapazität und Geschwindigkeit konnte Open Box anfangs nur zur Aufnahme von kleinen Bildausschnitten für kurze Zeiten verwendet werden. Da sich schnell zeigte, dass mit neuen digitalen Kameras Bilder mit wesentlich besserer Qualität erzeugen ließen, entstand der Bedarf, diese Kameras auch für Experimente zu verwenden, bei denen größere Bildausschnitte über längere Zeiten aufgenommen werden müssen. Die Frage, ob die digitale die analoge Bildverarbeitung ersetzen könnte, hing somit an der Limitierung der Aufnahmezeiten und den Möglichkeiten der Datenarchivierung.

Bei der analogen Videomikroskopie war die Aufnahmezeit durch die Verwendung von Videobändern zur Aufzeichnung praktisch nicht begrenzt, die Möglichkeit der Digitalisierung war jedoch stark eingeschränkt möglich. Die maximale Größe der digitalisierten Bildfolgen war abhängig von der Größe des Hauptspeichers, da die Daten nicht direkt auf die Festplatte geschrieben werden konnten. Das Videoband wurde zur Archivierung benutzt. Durch Steigerung der Festplattengeschwindigkeit und der Erhöhung der Festplattenkapazität aufgrund der technischen Entwicklung und die Verwendung von RAID-Controllern gibt es nun auch für die direkte digitale Aufnahme kaum zeitliche Einschränkungen. Das größere Problem tritt jedoch bei der Archivierung von Bildfolgen auf, die aus Datenströmen von bis zu 1.5 GB/Min bestehen können. Um diese Daten sinnvoll zu archivieren, ist eine Datenkompression unentbehrlich.

3.6.2 DCT- und Wavelet-Kompression

Ein Bild kann als eine zweidimensionale Matrix betrachtet werden. Der erste Schritt zur Kompression von Bilddaten ist die Transformation dieser Matrix zu einer Basis, in der diese Daten einfacher dargestellt werden können. Komprimiert wird das transformierte Bild, indem die Koeffizienten der neuen Basis gerundet bzw. zu Null gesetzt werden. Anschließend werden die verbleibenden Koeffizienten mit Entropie-Encodern wie der Huffman oder Runlength-Codierung weiter komprimiert. Für das bekannte jpeg-Format wird die diskrete Kosinustransformation (DCT) verwendet. Würde man jedoch versuchen, mit diesen Verfahren ein Bild als Gesamtes zu transformieren, so ergeben sich zwei Probleme. Zum einen steigt die Rechenzeit mit der Größe des Bildes überproportional stark an und zum anderen sind die trigonometrischen unendlich ausgedehnten Funktionen nicht geeignet, Bilder zu beschreiben, die nicht aus regelmäßigen Mustern bestehen, sondern örtlich begrenzte Details enthalten. Bemerkbar macht sich der Effekt indem die Koeffizienten nicht komprimiert werden können, ohne dass das dekomprimierte Bild stark von dem Originalbild abweicht. Um mit der DCT zu komprimierbaren Koeffizienten zu gelangen, wird bei der jpeg-Kompression das Bild in 8*8 Pixel große Blöcke zerlegt. Diese Blöcke werden einzeln transformiert. Der Nachteil dieses Verfahrens wird bei hohen Kompressionsraten sichtbar. Nach der Dekompression passen die einzelnen Blöcke nicht mehr zusammen und es treten die für das jpeg Verfahren typische Blockartefakte auf (siehe Abb. 3.6).

Es wäre also wünschenswert, das Bild auf eine geeignetere Basis abzubilden, die eine Transformation des gesamten Bildes erlaubt. Eine Funktionsbasis, die diese Bedingung

erfüllt sollte auf der einen Seite berücksichtigen, dass im Bild dargestellte Objekte örtlich begrenzt sind (Lokalität), sowie das Objekte unterschiedlicher Größe beschrieben werden müssen (Skalenverhalten). Diese Eigenschaften bieten Basen aus Wavelet-Funktionen. Haar fand bereits 1910 die nach ihm benannte Funktion, die diese Eigenschaften aufweist. Dennoch wurde 1991 von der Joint Photographic Experts Group das jpeg-Format, das die DCT verwendet, als Standardkompressionsformat eingeführt (Wallace 1991). Eine Wavelet-basierte Kompression hätte die Rechenleistung der damaligen Computersysteme überfordert. Nachdem heute die Rechenleistung der aktuellen Systeme ausreichend ist, wurde nun von der Joint Photographic Experts Group das jpeg2000-Format definiert, das die Wavelet-Transformation verwendet (Taubman 2001). Dieses Format soll nun das jpeg-Format ablösen. Abb. 3.6 zeigt ein Beispiel für die Leistungsfähigkeit von Wavelet-basierten Kompressionen gegenüber DCT-basierten Kompressionen.

Bei der Implementierung der Datenkompression in Open Box im Jahr 2000 stellte sich das Problem, dass der jpeg2000-Standard noch nicht verabschiedet war und somit auch noch keine standard-konformen Programmbibliotheken erhältlich waren. Somit wurde die Entscheidung getroffen eine Programmbibliothek der Firma Mevis (Bremen) zu implementieren, die eine wavelet basierte Kompression für Grauwertebilder mit Farbtiefen bis zu 16 Bit unterstützt.

3.6.3 Einzelbild oder Bild-zu-Bild-Komprimierung

Innerhalb eines Filmes ändert sich von Bild zu Bild oft nur ein kleiner Teil, während die größte Fläche des Bildes annähernd konstant bleibt. Wenn die Information der Änderung zwischen den Einzelbildern, anstatt der Information von jedem einzelnen Bild komprimiert wird, führt dies zu wesentlich höheren Kompressionsraten. Dieses Verfahren wird bei den meisten Videokompressionsalgorithmen angewendet. Die gängigen Videokompressionsalgorithmen sind jedoch dafür ausgelegt, dass beim dekomprimierten Bild lediglich die ablaufende Bildfolge vom menschlichen Auge als scharf empfunden wird. Betrachtet man die dekomprimierten Bilder einzeln, so sieht man, dass durch die Kompression bewegte Objekte verschmiert dargestellt werden. Da aber insbesondere zumeist die bewegten Objekte Gegenstand des Interesses sind, sind diese Verfahren für die Videomikroskopie ungeeignet. Daher werden in Open Box, in

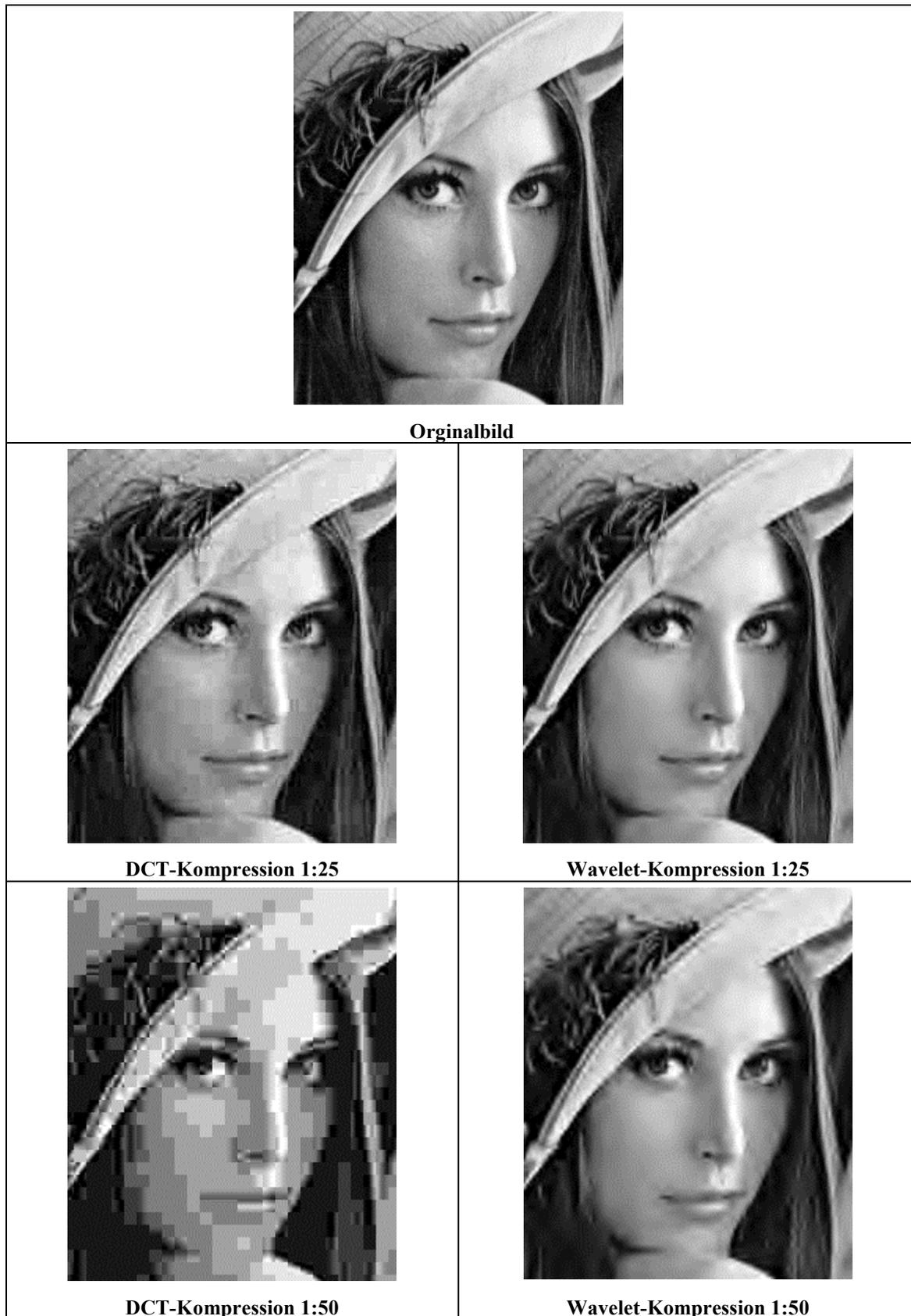


Abb. 3.6: Darstellung unterschiedlicher Kompressionsstufen mit einer DCT- (jpeg) und einer Wavelet-basierten Kompression an einem Bild mit 209*252 Pixel. Man sieht, dass bei der DCT-basierten Kompression bereits bei mittleren Kompressionsraten von 1:25 Blockartefakte auftauchen. Die Bilder wurden absichtlich so weit vergrößert, so dass zum besseren Vergleich die Pixelrasterung erkennbar ist.

Ermangelung einer geeigneten Bibliothek zur Filmkompression, die Bilder eines Filmes einzeln komprimiert.

3.6.4 Effekt der Komprimierung auf die Datenauswertung

Es ist mit der verwendeten Programmbibliothek auch möglich eine verlustlose Datenkompression anzuwenden, man kann hierbei jedoch kaum größere Kompressionsraten als 1:2 erwarten. Da dies für die Datenarchivierung noch nicht ausreichend ist, muss also ein Unterschied zwischen dem Original und dekomprimierten Bild hingenommen werden. Hierbei wirkt die Datenkompression wie ein Tiefpassfilter, der bei niedrigen Kompressionsraten die hohen Frequenzen, also das Rauschen, aus dem Bild entfernt. Bei sehr hohen Kompressionsraten verschwimmen jedoch Kanten und Ecken. Für die biophysikalischen Anwendungsbereiche von Open Box ist in erster Linie sicherzustellen, dass die aus dem Bildern gewonnenen quantitativen Aussagen nicht durch die Kompression verändert werden. Eine allgemeine Angabe über die möglich Höhe der Kompressionsrate für jegliche Berechnungen lässt sich nicht machen. Exemplarisch wurde die Auswirkung der Kompression auf zwei unterschiedliche Experimente untersucht.

Magnetische Kugeln im Phasenkontrast

Im ersten Experiment wurde die Auswirkung auf eine angeregte Kugeloszillation berechnet, die bei mikrorheologischen Experimenten zur Berechnung der viskoelastischen Moduln untersucht wird. Die 4.5 μm großen Kugeln wurde im Phasenkontrast mit einer Pixelauflösung von 123 nm pro Pixel aufgenommen. Die sinusförmige Oszillation wurde durch ein externes magnetisches Feld angeregt. Betrachtet wurde die durchschnittliche Abweichung zwischen den Kugelpositionen die von dem originalen und dekomprimierten Bildern errechnet wurden, sowie die Abweichung in der Amplitude und der Phase der Oszillation, die aus den Bildfolgen ermittelt wurden. Der Film hatte 1238 Bildern mit einer Größe von 164 * 123 Pixel. Die Zeitauflösung der Aufnahme betrug 100 Hz, die Oszillation wurde mit einer Sinusschwingung von 4 Hz angeregt. Die Abweichungen wurden für unterschiedliche Kompressionsraten von 1:5 bis 1:200 bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.7 dargestellt. Bei einer Kompressionsrate von 1:10 liegt die mittlere Differenz der Einzelpositionsbestimmungen bei 2 nm und somit noch unterhalb der Auflösungsgrenze für die laterale Positionsbestimmung des Experimentes. Für Abweichung der Phase und

Amplitude ergab sich ein relativer Fehler von unter 0.02 % für die Kompressionsrate von 1:10.

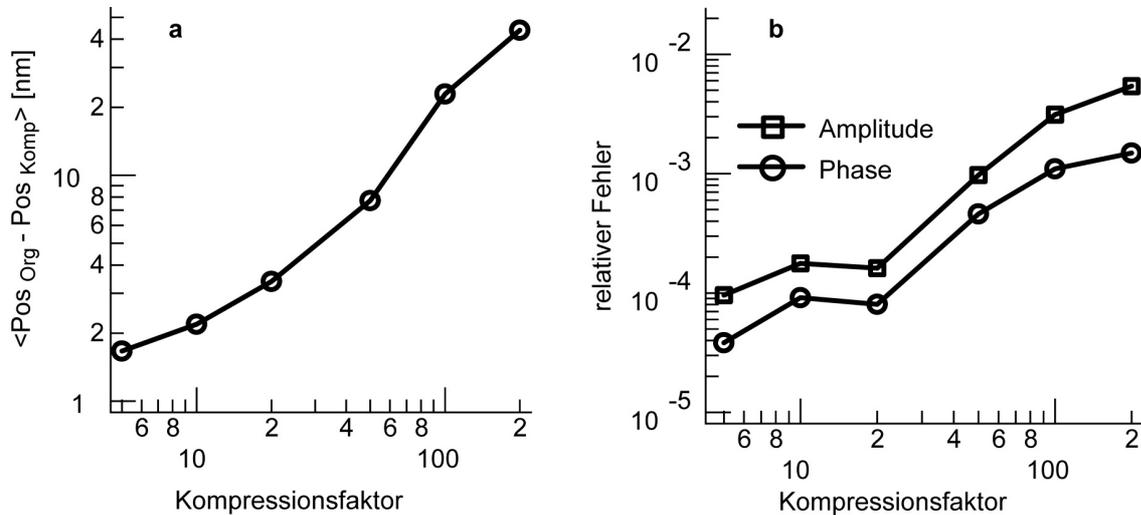


Abb. 3.7: Auswirkung der Kompression auf die Berechnung einer Kugeloszillation. Graph (a) zeigt die durchschnittliche Abweichung in der Positionsberechnung zwischen Originalbild und dekomprimierten Bild. Im Graph (b) ist der relative Fehler dargestellt, der sich für die berechnete Amplitude und Phase der Oszillation ergibt.

Vesikel aufgenommen mit RIKM

Des Weiteren wurde in Anlehnung an die Versuche des Abschnittes 5.2 die Unterseite eines fluktuierenden Vesikels mit RIKM betrachtet. Aus der Helligkeit des mit RIKM beobachteten Interferogramms kann die Höhe der Membran über dem Substrat berechnet werden. Die laterale Auflösung betrug dabei 166.2 nm pro Pixel. Um den Einfluss der Kompression auf die berechneten Höhen zu untersuchen, wurde ein Film mit 2000 Bildern mit unterschiedlichen Kompressionsraten von 1:5 bis 1:200 komprimiert. Anschließend wurden die Höhen für einen bestimmten Pixel aus allen Filmen bestimmt und verglichen. Abb. 3.8 zeigt die dekomprimierten Bilder. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.9 dargestellt. Bei einer Kompressionsrate von 1:10 beträgt der relative Fehler bei der Berechnung der Höhe bis zu 1 %. Auch dies liegt unterhalb der Auflösungsgrenze des Experimentes.

10 Prozent Regel

Es konnte gezeigt werden, dass bei den zwei vorgestellten Experimenten eine Kompressionsrate von 1:10 nur zu einem Fehler im Ergebnis unterhalb der Auflösungsgrenze des jeweiligen Experimentes führt. Diese Aussage kann natürlich nicht auf andere Experimente verallgemeinert werden, aber dennoch zeigen diese

Experimente, dass eine Datenreduktion auf 10% nur minimale Auswirkungen auf Ergebnisse hat, die aus Bildern bzw. Filmen berechnet werden.

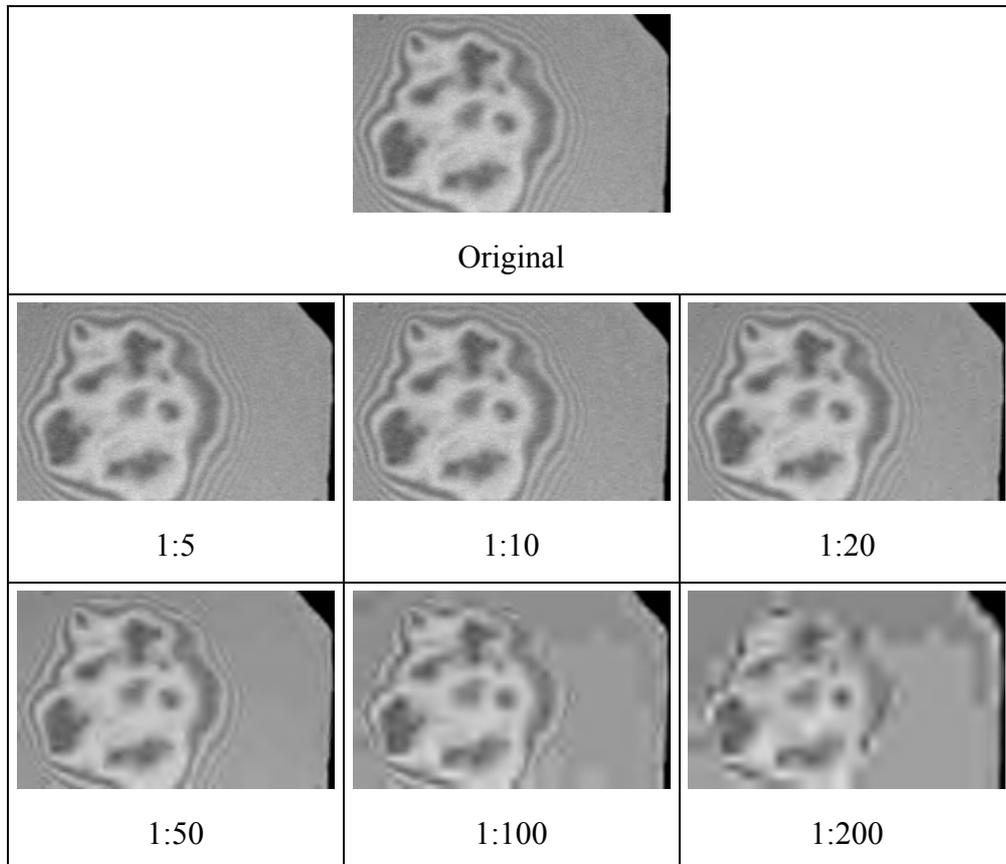


Abb. 3.8: Auswirkung der Kompressionsrate auf ein $164 * 103$ Pixel großes Bild eines Vesikels aufgenommen mit RIKM (siehe Abschnitt 5.2).

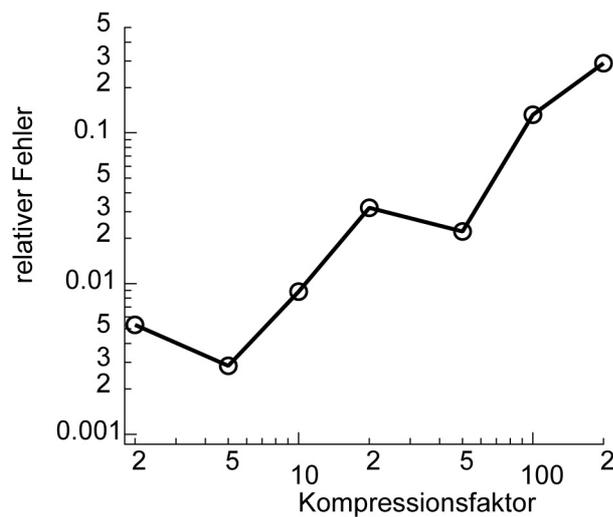


Abb. 3.9: Relativer durchschnittlicher Fehler in der Höhenberechnung von der Helligkeit eines Pixels von Abb. 3.8 in Abhängigkeit der Kompressionsrate.

3.7 Die Verbindung zwischen Kamera und Computer

Die von der Kamera aufgenommenen Bilder müssen zum Hauptspeicher des Computers übertragen werden. Bei der Verwendung der Kamera Hamamatsu ORCA-ER treten z.B.

Datenraten von bis zu 24 MB/s auf. Die zur Datenübertragung traditionell verwendete RS 232-Schnittstelle (serielle Schnittstelle), über die jeder PC verfügt, ist diesen Datenstrom nicht gewachsen. Auch die neuere Standardschnittstelle USB 1.1 (Universal Serial Bus) verfügt mit einer maximalen Datenrate von 1,5 MB/s bei weitem nicht über die notwendige Kapazität. Erst die neusten Entwicklungen IEEE1394 (Firewire) und USB 2.0 würden ein direktes Einlesen des Datenstroms mit 50 MB/s bzw. 60 MB/s von der Kamera zum Hauptspeicher des Computers ohne zusätzliche Schnittstellenkarte ermöglichen. Auf die Verwendung dieser beiden neuen Standardschnittstellen stellen sich die Kamerahersteller jedoch nur langsam ein. So wird für das Einlesen der Daten eine sogenannte Frame-Grabber-Karte benötigt. Diese verfügen über Schnittstellenstandards wie RS 422, RS 644 (LVDS) oder den neueren CamLink-Standard. Diese Schnittstellen, die als PCI-Karten im Computer eingesetzt werden, verfügen über Datenraten von 120 MB/s. Dies entspricht der maximalen Datenrate, die bei Verwendung des PCI-Busses für den Datentransport zum Hauptspeicher möglich ist.

3.8 Interline-Transfer-Technologie

Für die durchgeführten Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Kameras mit einem Interline Transfer-Chip zur Bildaufnahme verwendet. Für Bildfolgen, die mit einer Kamera mit diesem Chiptyp aufgenommen wurden, existieren keine Totzeiten zwischen den einzelnen Bildern. Im Nachfolgenden soll die Technik erklärt werden, die dies ermöglicht. Der Interline Transfer-Chip besteht aus einem lichtsensitiven und einem lichtunempfindlichen Bereich für jeden Pixel. Zuerst werden aufgrund der Einwirkung der Photonen in den lichtsensitiven Bereichen Ladungen erzeugt. Am Ende der Belichtungsdauer wird die Ladung in die lichtunempfindlichen Bereiche in einem Schritt verschoben. Aus diesen Bereichen wird die Ladung nun sequentiell ausgelesen, digitalisiert und zum Computer übertragen. Die maximale Bildrate ist durch diesen Auslesevorgang begrenzt. Um beim Interline Transfer-Chip für eine bessere Quantenausbeute zu sorgen, bedient man sich der „Lens-on-chip“-Technik. Wie der Name schon sagt sorgen auf dem Chip aufgebrachte Linsen (eigentlich nur winzige Tropfen eines lichtleitenden Materials) dafür, dass viele der Lichtstrahlen, die normalerweise auf die lichtunempfindlichen Bereiche fallen würden nun so abgelenkt werden, dass sie ebenfalls auf die lichtsensitiven Bereiche auftreffen. Die Folge dieser Technik ist eine Steigerung der Lichtausbeute um ca. den Faktor 2.

4 Zwei Wellenlängen Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie

4.1 Reflex Interferenz Kontrast Mikroskopie (RIKM)

Mit RIKM können Abstände von Objekten mit nm-Auflösung in der Nähe von Substratoberflächen gemessen werden. Es eignet sich sowohl für Phospholipidmembranen, die nur eine geringe Reflektivität aufweisen, sowie auch für kolloidale Sonden. Diese Technik wurde das erste Mal von Abercrombie (Abercrombie 1958) und Curtis (Curtis 1964) in der Zellbiologie angewendet und später mit der von Ploem (Ploem 1975) entwickelten Antiflextechnik grundlegend verbessert. Durch die Fortschritte in der computergestützten Bildverarbeitung ergeben sich ständig erweiternde Anwendungsmöglichkeiten. Insbesondere mit der in dieser Arbeit verfügbar gemachten digitalen Aufnahmetechnik können viele bisherige zeitliche und qualitative Limitierungen überwunden werden. Anwendung findet RIKM zum Beispiel in der Untersuchung von Zell- und Vesikeladhäsion (Albersdörfer 1999a; Guttenberg 2001), sowie von Benetzungseigenschaften von Oberflächen (Wiegand 1997).

In dieser Arbeit wurden mit der neuen Technik die Fluktuationen von Multikomponentenmembranen über passivierten Glasoberflächen sowie der Einfluss von Vernetzern auf membrangestützte Hyaluronsäurefilme untersucht. Hierzu war es notwendig die Zwei-Wellenlängen RIKM-Technik zu entwickeln.

4.1.1 Versuchsaufbau

Abb. 4.1(a) zeigt den schematischen Aufbau eines Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskopes. Von dem Linienspektrum einer Quecksilberdampfampe wird eine Wellenlänge mittels eines Interferenzfilters ausgewählt. Bei der Auswahl der Linie muss beachtet werden:

- Die Linie muss genügend Intensität bieten.
- Die Energie der Photonen sollte das Experiment möglichst gering beeinflussen.
- Die verwendete CCD-Kamera muss sensitiv im Bereich dieser Linie sein.

Alle Kriterien werden am besten von der 546 nm-Linie erfüllt. Das Licht wird an der Glas-Wasser-Grenzfläche der Substratoberfläche und an der Wasser-Objekt-Oberfläche reflektiert. Die beiden Strahlen interferieren und erzeugen ein Interferogramm. Abb. 4.1 (b) zeigt ein Beispiel für eine Durchlichtaufnahme und eine RIKM-Abbildung eines

Vesikels. Der mit einer Zuckerlösung gefüllte Vesikel ist aufgrund des osmotischen Drucks entspannt, und liegt somit mit der Unterseite flach auf dem Substrat. Während in der Durchlichtaufnahme nur die Umrisse des Vesikels zu erkennen sind, gibt die RIKM-Abbildung die Topologie der aufliegenden Fläche wieder. Da die Reflektivität von Phosphorlipidmembranen sehr gering ist, ist es notwendig auftretendes Streulicht zu reduzieren. Dies geschieht mit der Antiflextechnik mit Hilfe von Polarisatoren. Eine Beschreibung dieser Technik findet sich bei Wiegand (Wiegand 1998). Als Mikroskop wird ein Axiomat (Zeiss, Oberkochen) verwendet, das mit einem 63-fach Öl-Immersionsobjektiv (antiflex, NA = 1.3) und einer Quecksilberdampfampe HBO 103W/2 (Zeiss, Oberkochen) ausgestattet ist. Aufgenommen werden die Bilder mit einer digitalen peltiergekühlten 10-Bit-Kamera C4880-85 (Hamamatsu, Herrsching). Die Echtzeitbildverarbeitung erfolgt am PC mit Open Box (siehe Kapitel 3).

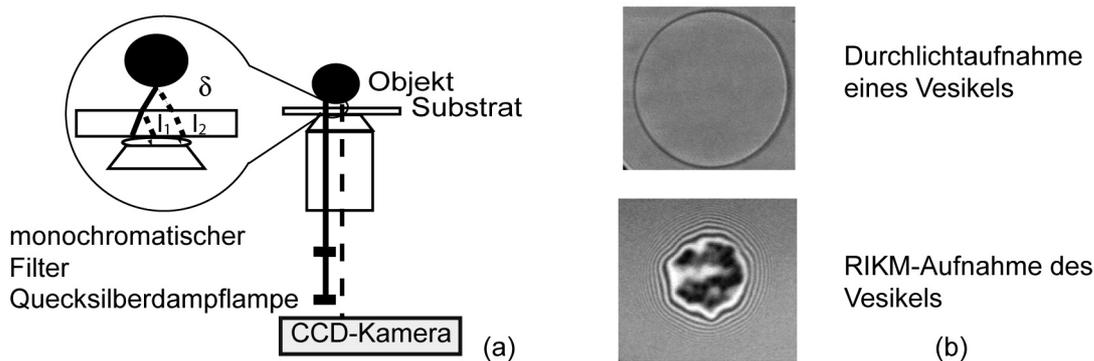


Abb. 4.1: Systematischer Aufbau des Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskops und Beispiel eines Interferogramms eines Vesikels

4.1.2 Theorie der Bildentstehung

Das RIKM-Interferogramm entsteht aus der Interferenz der reflektierten Strahlen der Substrat-Wasser- und der Wasser-Objekt-Grenzfläche. Im einfachsten Modell können die Intensitätswerte des Interferogramms in Abhängigkeit von dem Substrat-Objekt-Abstand $h(x)$ mit Gl. (4.1) beschrieben werden.

$$I(h(x)) = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos \frac{4\pi n}{\lambda} h(x) \quad (4.1)$$

Dabei ist λ die Wellenlänge des einfallenden Lichtes, n ist der Brechungsindex des umgebenden Mediums und I_1 und I_2 sind die reflektierten Intensitäten (siehe Abb. 4.1). Daraus ergibt sich eine einfache Gleichung zur Umrechnung der Intensitäten in Höhen:

$$h(x) = \frac{\lambda}{4\pi n} \arccos\left(\frac{2I(x) - (I_{\max} + I_{\min})}{I_{\max} - I_{\min}}\right) \quad (4.2)$$

Hierbei ist $I(x)$ die aufgenommene Intensität, I_{\max} die maximale Intensität und I_{\min} die minimale Intensität des Interferenzmusters in dem entsprechenden Bereich. Bei diesem Modell werden folgende Effekte vernachlässigt:

- a) Das Licht entstammt nicht einer Punktlichtquelle sondern, einer Lichtquelle mit endlicher Apertur.
- b) Die Gl. (4.1) gilt nur für die Reflexion an parallelen Oberflächen. Mit zunehmender Steigung ergeben sich geringere Intensitäten.
- c) Die verwendete Auflösung pro Pixel liegt mit 83.1 nm unterhalb der optischen Auflösung von $\lambda/2n = 204$ nm. Daher wird ein Punkt vom Objekt auf mehrere Punkte des CCD-Chips abgebildet. Dies führt zu einem von der Form des Objektes abhängigen Fehler.

Punkt a) wird in der „finite-aperture-theory“ berücksichtigt (Rädler 1993). Hierbei wird über die Winkel des einfallenden Lichtes integriert. Als Ergebnis ergibt sich anstatt Gl.(4.1) folgende Gleichung:

$$I(h(x)) = 4\pi \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right) * \left(I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \frac{\sin(y)}{y} \cos\left(\frac{4\pi n h(x)}{\lambda} \cos^2\left(\frac{\alpha}{2}\right) + \delta\right) \right), \quad (4.3)$$

$$y = \frac{4\pi n h(x)}{\lambda} \sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)$$

Hierbei ist $\alpha = \arcsin(\text{INA}/n)$, wobei INA die numerische Beleuchtungsapertur und n der Brechungsindex des umgebenden Mediums ist. Die INA ist für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente 0.48. Aus Gl. (4.3) ergeben sich folgende Konsequenzen. Die Höhe in Abhängigkeit der Intensität lässt sich mit dieser Gleichung nicht mehr analytisch darstellen. Die Phase wird um den Faktor $\cos^2(\alpha/2)$ gestreckt und die Amplitude wird um den Faktor $y/\sin(y)$ gedämpft. Dies bedeutet z.B., dass das erste Intensitätsmaxima nicht bei $\lambda/4n$, sondern in Abhängigkeit der INA bei $\lambda/(4n \cos^2(\alpha/2))$ auftritt. Im Weiteren wird in diesem Kapitel zum leichteren Verständnis bei der Angabe absoluter Werte für $\alpha = 0$ verwendet.

In der „non-local-theory“ (Kühner 1996) ist zusätzlich Punkt b) berücksichtigt. Jedoch muss für deren Anwendung die Objektgeometrie des zu beobachteten Objekt bekannt sein.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Berechnungen wurde die einfache Theorie verwendet. Bei der Untersuchung von Vesikeln ist die Form nicht bekannt, daher kann die „non-local-theory“ nicht angewendet werden. Bei der Höhenberechnung von koloidalen Sonden wurde mit Hilfe der einfachen Theorie eine empirische Funktion gefunden, die alle erwähnten Korrekturen berücksichtigt.

4.2 Zielsetzung der Weiterentwicklung

Abbildungen aus interferometrischen Techniken wie RIKM, beinhalten nur relative, aber keine absoluten Informationen. Aus Gl. (4.2) folgt:

$$I\left(\frac{\lambda i}{4n} - \Delta h\right) = I\left(\frac{\lambda j}{4n} + \Delta h\right) \text{ für } i, j \in \mathbb{N} \quad (4.4)$$

$$I\left(\frac{\lambda i}{2n}\right) = I\left(\frac{\lambda j}{2n}\right) \text{ für } i, j \in \mathbb{N} \quad (4.5)$$

Soll eine Höhe direkt aus einen Intensitätswert aus dem RIKM-Interferogramm berechnet werden, so kann man z.B. bei Verwendung der 546 nm–Linie zur Beleuchtung aus Gleichung (4.2) bei bekannten I_{\max} und I_{\min} für den selben Intensitätswert Höhen von 90, 114, 294 und 318 nm erhalten, da aufgrund der Periodizität des Interferenzmusters keine eindeutige Höhenzuordnung möglich ist.

4.2.1 Vesikel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Membranfluktuation an entspannten Vesikeln über passivierte Glasoberflächen analysiert (siehe Abschnitt 5.2). An diesen System kann eine Phasenseparationen aufgrund der Wechselwirkung zwischen Membran und Substrat beobachtet werden. Es wurden Abstände zwischen Membran und Substrat von bis zu 120 nm gemessen. Die Messungen konnten mit der konventionellen RIKM-Technik durchgeführt werden, wobei die Zwei-Wellenlängen-Technik verwendet wurde, um die Ergebnisse zu bestätigen. Nach diesen erfolgreichen Experimenten sind nun bioanalogere Systeme von Interesse, bei denen die Wechselwirkung zwischen festkörpergestützten Membran und der aufliegenden Vesikelmembran untersucht wird. Bei diesen Experimenten treten aufgrund der weichen Oberfläche der festkörpergestützten Membran Abstände auf, die größer als $\lambda/4n$ sind und sich somit

nicht mehr mit der konventionellen RIKM-Technik analysieren lassen. Diese Experimente waren die Hauptmotivation für die Entwicklung der Zwei-Wellenlängen-Technik. Abb. 4.2 verdeutlicht das Problem bei der Rekonstruktion eines Höhenprofils eines fluktuierenden Vesikels und stellt die Lösung des Problems mit der Zwei-Wellenlängen-Technik vor. In Abb. 4.2 (c) ist ein mit „grün“ bezeichnetes Helligkeitsprofil dargestellt, das der eingezeichneten Linie in Bild (a) entspricht. Das Bild (a) wurde mit der bisher verwendeten grünen Linie (546 nm) der Quecksilberdampfampe aufgenommen. Mit Hilfe von Gl. (4.2) kann das Helligkeitsprofil in ein Höhenprofil umgerechnet werden. Durch die Uneindeutigkeit der Rekonstruktion ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, von denen zwei mögliche Höhenprofile im Abb. (d) dargestellt sind. Dabei wurde vorausgesetzt, dass der Vesikel sich an den Rändern des Intensitätsprofils nahe dem Substrat befindet. Unklar ist jedoch, ob sich der Vesikel in der Mitte des Profils dem Substrat nähert (gestrichelte Linie), oder ob sich von diesem entfernt (durchgezogene Linie). Die Uneindeutigkeit entsteht in der Höhe von 101.9 nm, da hier das Maximum der Intensität der grünen Linie erreicht wird.

Nun soll gezeigt werden wie mit Hilfe einer zweiten Linie, also einer zweiten Phaseninformation, das Profil eindeutig rekonstruiert werden kann. Hierzu wurde der Vesikel gleichzeitig mit der blauen Linie (436 nm) aufgenommen (Bild (b)). Das entsprechende Helligkeitsprofil aus dieser Aufnahme ist in Abb. (c) mit „blau“ bezeichnet. Im Bild e wurden für die jeweiligen rekonstruierten Höhenprofile aus Abb. (d) Helligkeitsprofile berechnet, die bei der Aufnahme mit der blauen Linie zu erwarten wären. Ein Vergleich mit der tatsächlich aufgenommenen Intensität der blauen Linie in Bild c zeigt, dass die durchgezogene Linie dem tatsächlich aufgenommenen Intensitätsprofil entspricht. Somit kann die durchgezogene Linie im Bild d als richtige Rekonstruktion identifiziert werden. In der gleichen Weise können auch die verbleibenden möglichen Rekonstruktionen der Höhenwerte ausgeschlossen werden, bei denen nicht vorausgesetzt wird, dass sich der Vesikel an den Rändern des Profils am Substrat befindet.

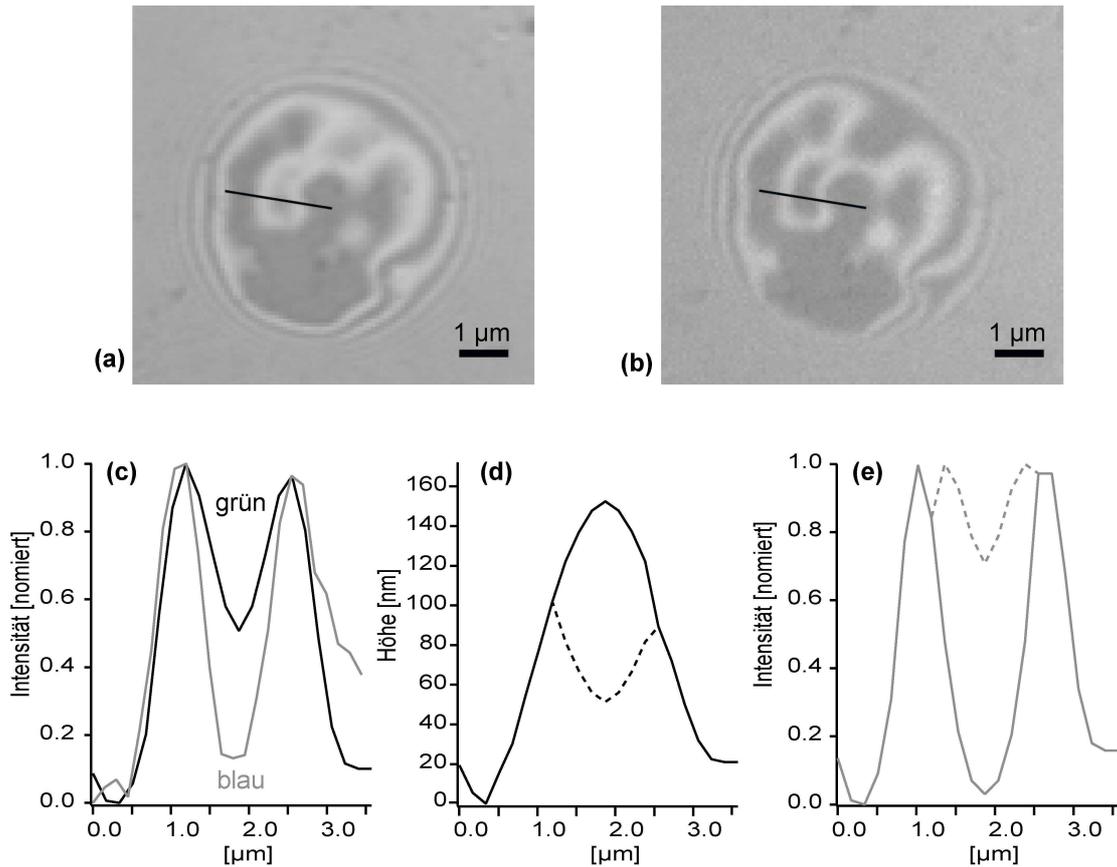


Abb. 4.2: Ausschnitt aus der RIKM-Aufnahme eines fluktuierenden Vesikels, aufgenommen mit der grünen 546 nm Linie (Bild a) und mit der blauen 436 nm Linie (Bild b). Abb. c zeigt die in Bild (a) bzw. (b) eingezeichneten Intensitätsprofile. Bei der Rekonstruktion des Höhenprofils aus der grünen Linie (Abb. (d)) ergeben sich 2 physikalisch sinnvolle Möglichkeiten. Bild (e) zeigt für diese Möglichkeiten die zu erwartenden Intensitätsprofile für die blaue Linie. Ein Vergleich mit dem Intensitätsprofil der blauen Linie in Abb. (c) zeigt, dass das durchgezogene Profil in der Abb. (d) der richtigen Lösung entspricht.

4.2.2 Kugeln

Polystyrolkugeln von der Größe einiger Mikrometer, können als Sonden benutzt werden um physikalische Eigenschaften wie Dicke, Oberflächenelastizität und Viskosität von substratgestützten weichen Filmen im wässrigen Medium zu untersuchen. RIKM eignet sich hervorragend um die Höhenfluktuation zu beobachten. Dabei können die Sonden, je nach Kugelgröße und Material, bis zu einer Höhe von einigen Mikrometern beobachtet werden. Die theoretisch maximale Höhe ist durch Gl. (4.3) bestimmt und für die verwendete numerische Apertur von 0.48 auf 7 μm begrenzt. In den Experimenten mit 10 μm großen Polystyrolkugeln, konnte die Höhe während des Falls dieser Kugeln auf die Substratfläche ab genau dieser Höhe bestimmt werden.

Da die Form der Kugel bekannt ist, reduziert sich die Uneindeutigkeit bei der Höhenbestimmung auf Gl. (4.5), da das RIKM-Muster der Kugeln unter den Bedingungen von Gl. (4.4) unterschiedlich ist. Die Berechnung der Kugelhöhe aus dem

Interferogramm ergibt unabhängig von der dabei verwendeten Methode eine Höhe von

$h_1 + \frac{\lambda_1 i}{2n}$ wobei i unbekannt ist.

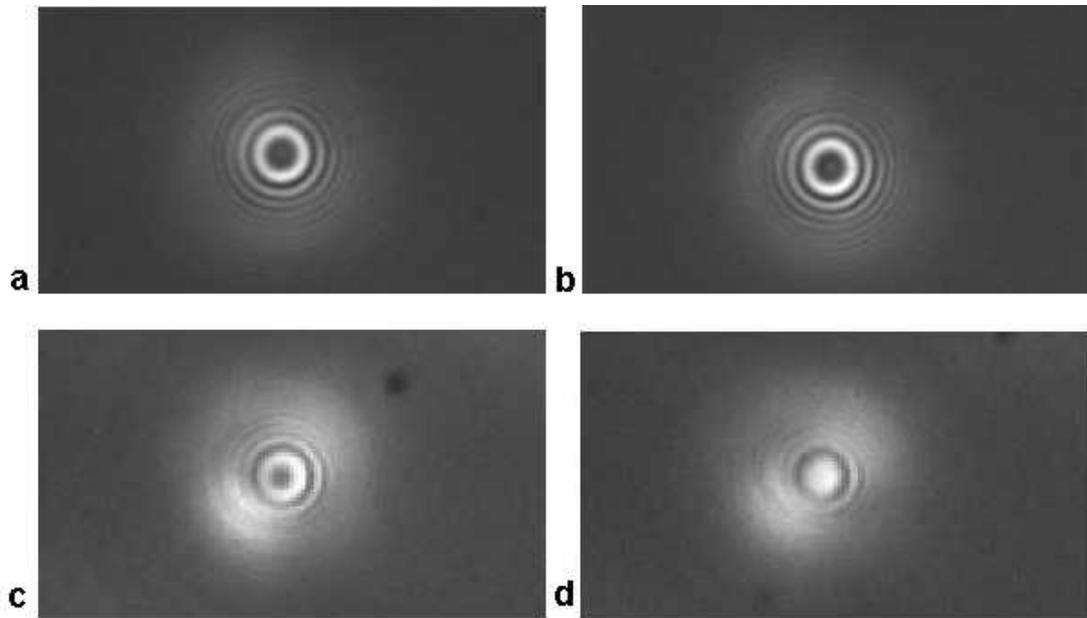


Abb. 4.3: Bild (a) und (b) zeigen die RIKM-Abbildung einer 11 μm großen Kugel über einem Film aus Hyaluronsäure in 185 bzw. 389 nm Höhe, aufgenommen mit Licht der 546 nm Linie. Da die Höhendifferenz $\lambda/2n$ beträgt, ergeben sich gleiche Interferenzmuster. Bild (c) und (d) wurden zur gleichen Zeit wie Bild (a) bzw. (b) aufgenommen, jedoch mit Licht der 436 nm Linie. Da die Höhendifferenz für diese Wellenlänge einer anderen Phasendifferenz entspricht ($1.25 \cdot \lambda/2n$) ergeben sich unterschiedliche Interferenzmuster. Durch Vergleich der Interferenzmuster aus der grünen und blauen Linie kann bei bekannten Brechungsindex n die absolute Höhe der Kugeln bestimmt werden.

Wird eine Kugel mit RIKM mit Licht der grünen Linie beobachtet, so führen nach Gleichung (4.5) Höhen von 185 und 389 nm zu fast identischen Interferogrammen, wie in Abb. 4.3 a und b dargestellt. Wenn nun die Phaseninformationen einer zweiten Linie

hinzugenommen wird, ergibt sich eine zweite Höheninformation $h_2 + \frac{\lambda_2 j}{2n}$, wobei j

unbekannt ist. In Abb. 4.3 c und d sind die genau gleichzeitigen Aufnahmen der Kugeln von Bild (a) und (b) mit der blauen Linie gezeigt. Man sieht, dass mit Hilfe der Bilder (c) und (d) die Höhen der Kugeln in Bild (a) und (b) unterscheidbar sind. Die Gl. (4.6), in der i und j unbekannte ganze Zahlen sind, kann gelöst und damit eine absolute Höhe bestimmt werden.

$$h_1 + \frac{\lambda_1 i}{2n} = h_2 + \frac{\lambda_2 j}{2n} \quad (4.6)$$

4.3 Aufbau der Zwei-Wellenlängen-Technik

Abb. 4.4 zeigt schematisch den erweiterten RIKM-Aufbau. Realisiert wurde dieser mit einem 436/546 nm Dualbandfilter (Spezialanfertigung der AHF-AG, Tübingen, Abb. 4.5) nach der Quecksilberdampflampe, der nun zwei statt einer Linie, wie bei der konventionellen RIKM, passieren lässt. Die Abbildung des Objektes besteht nun aus der Überlagerung von zwei Interferogrammen, die mit Hilfe eines dichroitischen Spiegels getrennt und auf zwei Kameras abgebildet werden. Der dichroitische Spiegel (AHF-AG, Tübingen) hat den 50%-Punkt bei 455 nm, eine Reflexion von größer als 95 % bei 436 nm und eine Transmission von größer als 90% bei 546 nm. Der 436 nm Filter hinter dem Spiegel ist notwendig, da das Bild der schwächeren blauen Linie von dem Restlicht der grünen Linie überlagert würde. Alternativ wäre es auch möglich, die beiden Muster nach der Trennung durch den dichroitischen Spiegel versetzt auf eine Kamera abzubilden. Da die Linien der Quecksilberdampflampe jedoch sehr unterschiedliche Intensitäten besitzen, ist es schwierig, beide Bilder gleichzeitig kontrastreich mit einer Kamera aufzunehmen.

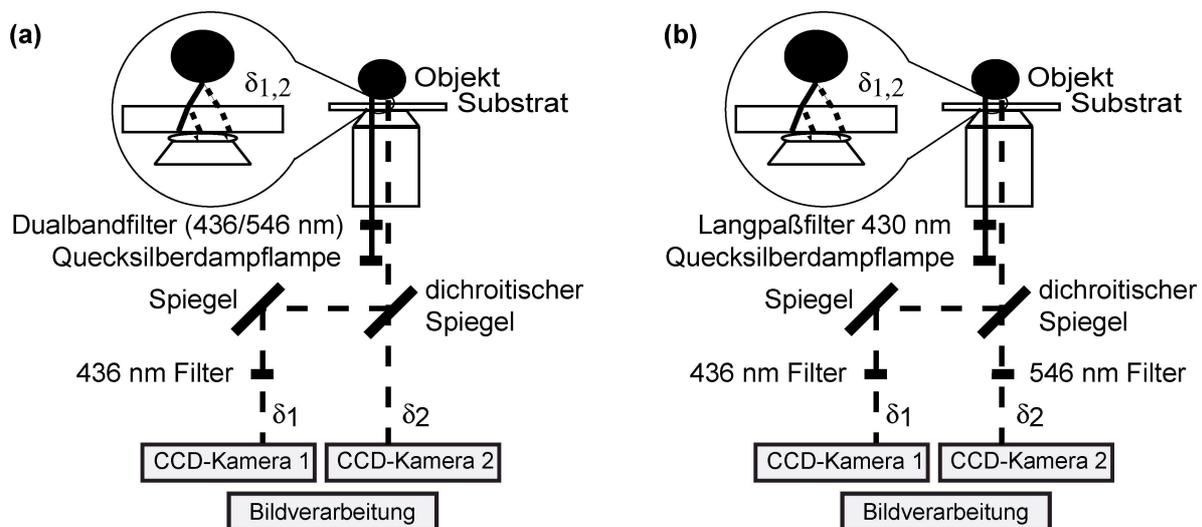


Abb. 4.4: Abb. (a) zeigt den schematischen Aufbau der realisierten Zwei-Wellenlängen-RIKM-Technik. Die beiden Strahlengänge der unterschiedlichen Wellenlängen sind mit $\delta_{1,2}$ bezeichnet. Graph (b) zeigt den Vorschlag für ein flexibleres Konzept, bei der die Intensität der blauen Linie weniger abgeschwächt wird.

Es hat sich als Nachteil dieses Aufbaus erwiesen, dass die Intensität der blauen Linie durch das Durchlaufen der Filtersysteme stark abgeschwächt wird. Mit Abb. 4.4 b wird eine Variation des Aufbaus vorgestellt, die die Intensität der Abbildung der blauen Linie erhöht und das Konzept flexibler macht für die Hinzunahme weiterer Linien (siehe Abschnitt 4.4.6).

Abb. 4.5 zeigt schematisch die zur Verfügung stehenden Linien im Spektrum der Quecksilberdampfampe. Im Prinzip können für die Zwei-Wellenlängen-Technik alle Linien miteinander kombiniert werden. Die Linien im Violetten und Ultravioletten (nicht dargestellt) Bereich werden jedoch von Filtern stärker absorbiert als langwelligere Linien und können zu unerwünschten Aktivierungen chemischer Prozesse bei der Beobachtung von Zellen führen. Es hat sich gezeigt, dass die blaue 546.1 nm-Linie den besten Kontrast erzielt. Bisher wurden die Linien mit der Wellenlänge 435.8, 546.1 und 677 nm verwendet.

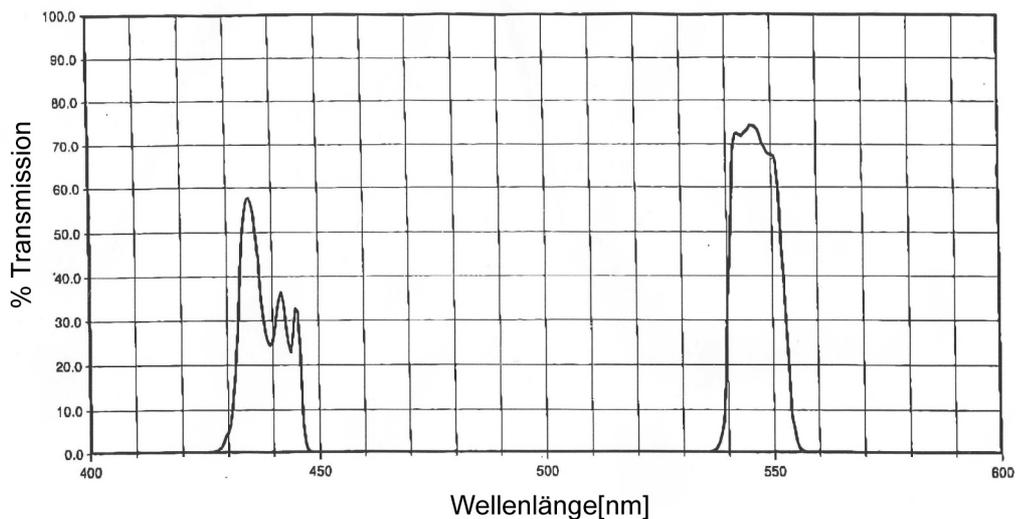


Abb. 4.5: Transmission des Dualbandfilters. Für die 436 nm-Linie zeigt der Filter eine Transmission von 58 %, für die 546 nm-Linie 74 %.

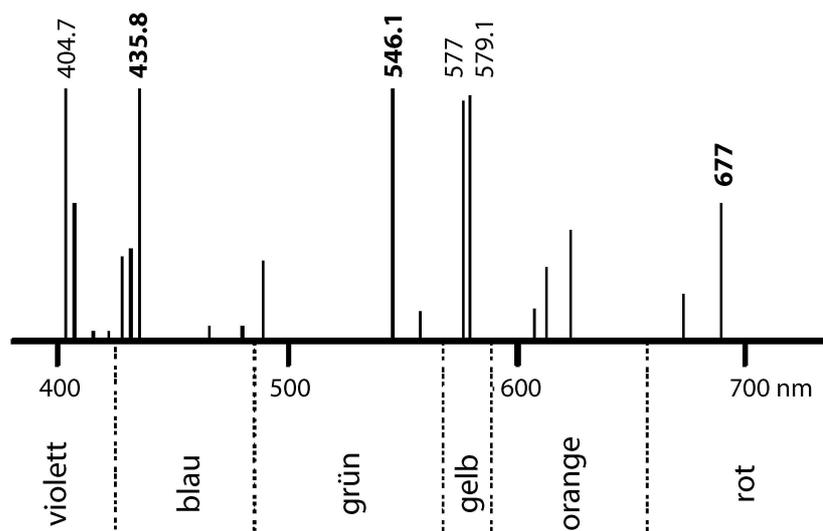


Abb. 4.6: Spektrum der Quecksilberdampfampe im sichtbaren Bereich. Bisher wurden die 435.8, 546.1 und die 677 nm-Linie verwendet.

4.4 Auswertung von Kugelfluktuationen

4.4.1 Berechnung der Kugelhöhen

Aus einem Interferenzmuster kann eine Höheninformation mit unterschiedlichen Verfahren ermittelt werden. So ist es möglich die Höhe einer Kugel, wie bei unbekanntem Strukturen von der Helligkeit eines Punktes, in diesem Fall von der Kugelmittle, nach Gl. (4.2) zu bestimmen.

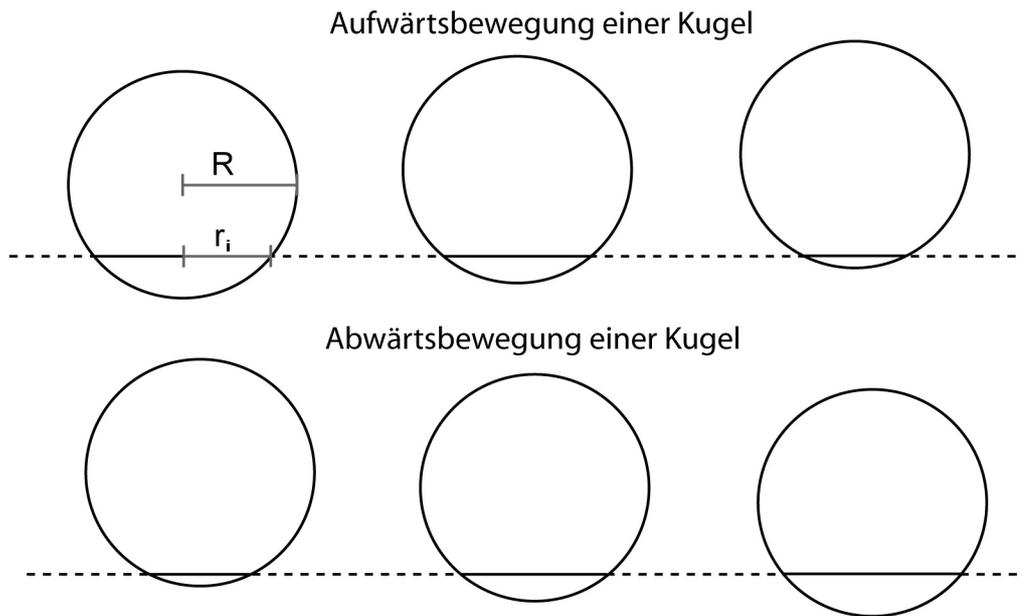


Abb. 4.7: Die Abbildung der Interferenzextrema auf der Kugel sind Ringe, deren Radien Auskunft über die Höhe und der Bewegungsrichtung geben. Hier sind die Ringe und die Kugeln in der Seitenansicht gezeigt. Bei einer Abwärtsbewegung wird der Radius der Ringe größer, bei der Aufwärtsbewegung kleiner.

Der Nachteil dieser Methode ist, dass I_{\max} und I_{\min} bekannt sein müssen. Diese Parameter variieren jedoch mit der Ausleuchtung und den Mikroskopeinstellungen. Zusätzlich beinhaltet die Höhenbestimmung mit dieser Methode einen unnötig hohen Fehler, da nur wenig von der vorhandenen Bildinformation zur Höhenbestimmung benutzt wird. Rädler et al. (Rädler 1992) benutzten ein einfaches Verfahren, bei dem die Intensität an einem festen Abstand vom Kugelmittelpunkt aufgenommen wurde. Hierbei wurde dann für die Höhenberechnung eine Helligkeitsinformation verwendet, die über eine Anzahl von $2\pi i$ Bildpixel gemittelt wurde, wobei i der gewählte Abstand in Pixel ist. I_{\max} und I_{\min} musste jedoch mit Hilfe von Gl. (4.3) abgeschätzt werden. Kühner et al. (Kühner und Sackmann 1996) benutzten ein Verfahren, in dem sie eine Fitfunktion dem gesamten Interferenzmuster der Kugel anpassten. Diese Funktion wurde aus der „finite-aperture-theory“ gewonnen. Das Ergebnis wurde mit Hilfe der „non-local-theory“

korrigiert. Dieses zweistufige Verfahren war notwendig, da die „non-local-theory“ nicht direkt als Fitfunktion anwendbar ist. Dieses Verfahren machte die Messungen sehr aufwendig, so dass die Anzahl der möglichen Messungen durch den Zeitaufwand bei der Auswertung limitiert war.

Im folgenden wird ein Verfahren vorgestellt, das in seiner Komplexität zwischen diesen beiden Verfahren liegt und eine relative Höhenauflösung von 0.3 nm erreicht. In Abb. 4.3 sieht man, dass das Interferenzmuster von Kugeln aus Ringen destruktiver und konstruktiver Interferenz besteht, die als Höhenlinien aufgefasst werden können. Abb. 4.7 zeigt wie sich diese Abbildungen der Interferenzextrema auf der Kugeloberfläche bei der Bewegung verhält. Sinkt die Kugel werden die Ringe größer, steigt die Kugel werden die Ringe kleiner. Der Radius eines Ringes kann also direkt benutzt werden, um die Höhe und Bewegungsrichtung einer Kugel zu berechnen. Hierfür ist es sinnvoll den Radius des ersten über die Messdauer nicht verschwindenden Interferenzringes zu nehmen. Somit wird jedoch eine Funktion benötigt, die für den Radius eines Ringes die Höheninformation angibt. Nach der einfachen Theorie würde man Gl. (4.7) für die Interferenzminima erhalten.

$$h(r_i) = \frac{\lambda i}{2n} - \left(\sqrt{R^2 - r_i^2} - R \right) \quad (4.7)$$

Dabei ist r_i der Radius des i -ten Interferenzringes bei der Höhe h der Kugelunterseite und R der Kugelradius (siehe Abb. 4.7). Der erste Term beschreibt den Weg vom Substrat zum i -ten Interferenzminima und der zweite Term die Distanz zwischen Interferenzminima und Kugelunterseite. In Abb. 4.8: Tatsächlicher und theoretischer Radius des zweiten Interferenzringes als Funktion der Höhe einer 10 μm Kugel. Während man im Vergleich zur einfachen Theorie bei großen Radien eine erwartete Abweichung zu größeren Höhen erhält, tritt bei kleineren Radien ein kleinerer aber genau gegenteiliger Effekt auf.

ist der aus dieser Gleichung gewonnene Radius des zweiten Interferenzringes als gestrichelte Linie dargestellt. Die experimentellen Daten sind zum Vergleich als Kreuze dargestellt. Diese wurden von Kugeln errechnet, die über einen größeren Bereich als eine Periode fluktuierten. Somit waren I_{\min} und I_{\max} bekannt und die Höhe konnte unter Vernachlässigung der Kugelneigung berechnet werden. Der Bereich Kugelunterseite von dem die Intensität aufgenommen wurde, weist bei einer Auflösung von 85.1 nm/Pixel nur eine geringe maximale Steigung von 0.004 auf. Somit kann dieser Bereich

näherungsweise als eine ebene Fläche betrachtet werden, so dass eine Korrektur nach der „non-local-theory“ nicht notwendig ist. Vergleicht man nun den beobachteten Radius eines Interferenzringes mit den nach Gl. (4.2) berechneten Werten zeigt sich erwartungsgemäß, dass bei größeren Radien in den Daten eine Abweichung zu größeren Kugelhöhen auftritt. Dies bedeutet, dass die Ringe aufgrund der Reflektion an den schrägen Kugelwänden aufgespreizt werden. Würde anstelle Gl. (4.2) diese Funktion mit Hilfe der „non-local-theory“ berechnet werden, was jedoch zu keiner analytischen Lösung führen würde, so würde diese Abweichung verschwinden. Mit dieser Theorie kann jedoch nicht erklärt werden, warum für kleine Radien ein kleinerer aber genau gegenteiliger Effekt eintritt. Dieser Effekt wurde auch durch weitere Experimente bestätigt. So tritt er ebenfalls auf, wenn rekonstruierte radial gemittelte Höhenprofile (Abb. 4.9) mit der Theorie verglichen werden. Man kann zeigen, dass eine Pixelauflösung unterhalb der optischen Auflösung genau zu diesen Effekt führt. Diese Abweichungen sind jedoch klein und erzeugen eine Abweichung von unter 10 nm. Die Ergebnisse wurden hier dargestellt, um zu zeigen, dass die an den experimentellen Daten angepasste Fitfunktion eine genaue Methode zur Höhenrekonstruktion ist, da hierbei auf sehr einfacher Weise alle bekannten und unbekanntes Korrekturen berücksichtigt werden. Diese ist in Abb. 4.8 als durchgezogene Linie dargestellt. Hierzu wurde ein Polynom 2. Grades verwendet (4.8). Diese gilt für Kugeln mit 9.6 µm Durchmesser.

$$f(r) = 408.7 \text{ nm} - 0.02704 * r - 0.0000786 \text{ nm}^{-1} * r^2 \quad (4.8)$$

4.4.2 Abstand der Extrema

Mit Hilfe des Interferenzmusters von Kugeln wird deren optische Höhen gemessen. Um eine korrekte Höhe zu erhalten, muss also der Brechungsindex der Schicht zwischen Kugel und Substrat bekannt sein. Wenn die Größe der beobachteten Kugel, z.B. aus einer Durchlichtaufnahme, bekannt ist, kann mit Hilfe von Gl. (4.9) der tatsächliche Brechungsindex berechnet werden.

$$A(r) = \sqrt{r^2 + \frac{\lambda}{n} \sqrt{R^2 - r^2} - \frac{\lambda}{2n}} - r \quad (4.9)$$

Diese Gleichung beschreibt den horizontalen Abstand zwischen zwei Minima bzw. Maxima in der RIKM-Abbildung. A ist der Abstand der Extrema, r der Abstand des inneren Extremum zur Kugelmitte und $\lambda/(2*n)$ der vertikale Abstand zwischen zwei

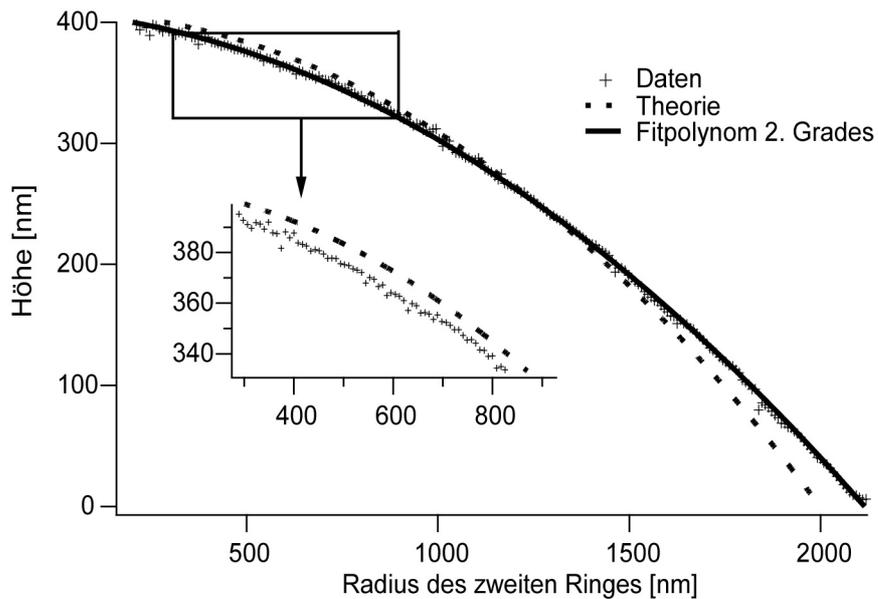


Abb. 4.8: Tatsächlicher und theoretischer Radius des zweiten Interferenzringes als Funktion der Höhe einer $10\ \mu\text{m}$ Kugel. Während man im Vergleich zur einfachen Theorie bei großen Radien eine erwartete Abweichung zu größeren Höhen erhält, tritt bei kleineren Radien ein kleinerer aber genau gegenteiliger Effekt auf.

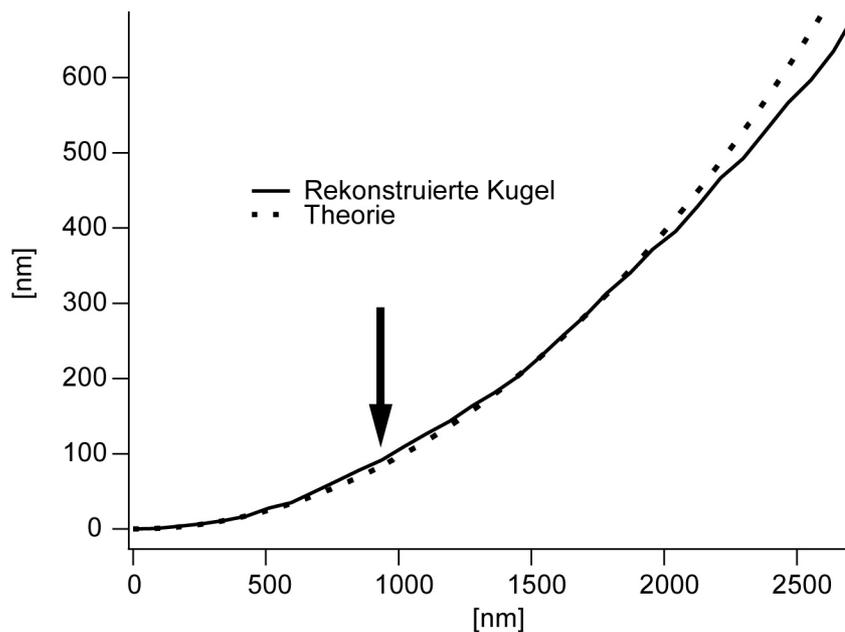


Abb. 4.9: Gemitteltes rekonstruiertes Profil von 4 Polystyrolkugeln aus RIKM-Bildern. Auch hier lässt sich deutlich der Effekt erkennen, dass das Profil für kleine Radien steiler erscheint (siehe Pfeil), als dies von der einfachen Theorie zu erwarten wäre.

Minima bzw. Maxima. Da die Gleichung mit der einfachen Theorie hergeleitet worden ist, gilt sie nur für Ringe nahe dem Kugelmittelpunkt. Für $10\ \mu\text{m}$ Kugeln kann die Gleichung bis zu einem Radius von $600\ \text{nm}$ angewendet werden.

Ist der Brechungsindex bekannt, kann wie in Abb. 4.10 gezeigt, mit Hilfe von Gl. (4.9) der Radius der Kugeln berechnet werden.

4.4.3 Genauigkeit der RIKM bei der Berechnung der Kugelhöhe

Um die Genauigkeit der RIKM bei der Abbildung von Polystyrolkugeln zu demonstrieren, wurden von zwei in unterschiedlichen Höhen (4 und 29 nm) liegenden Kugeln Höhenprofile aus radial gemittelten Intensitätsprofilen erstellt. Dabei wurde Gl. (4.2) verwendet. Es wurden die Intensitätsprofile schrittweise von Extremum zu Extremum transformiert, wobei das jeweilige Extremum als I_{\max} und I_{\min} eingesetzt wurde. Subtrahiert man die beiden Profile, erhält man als Abstand der beiden Kugeln 25(6) nm. Der Fehler, der aus einer Höhenberechnung, die nur einen radial gemittelten Punkt im Intensitätsprofil verwendet, beträgt also weniger als 6 nm.

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verfahren, werden mehrere radial gemittelte Punkte zur Ermittlung der Höhe verwendet. Für eine ruhenden Kugel über einer attraktiven silanisierten Glasoberfläche (siehe 0) konnte bei einer Kugelhöhe von 4 nm eine Standardabweichung der vertikalen Kugelfluktuations von 0.3 nm gemessen werden. Damit ergibt sich, dass der Fehler für die Bestimmung der relativen Höhe, kleiner als ein Nanometer ist. Aus Gl. (4.7) kann ein Fehler für die absolute Höhe einer Einzelmessung abgeschätzt werden (Gl. (4.10)). Für die Unsicherheit in der Bestimmung des Radius der Kugel $\Delta R = 100$ nm und den Radius der Ringe $\Delta r = 10$ nm ergibt sich für eine 10 μm große Kugel bei einer Höhe von 100 nm ein Fehler von 6 nm.

$$\Delta h(r_i) = \sqrt{\left(\left(\frac{R}{\sqrt{R^2 - r_i^2}} - 1 \right) * \Delta R \right)^2 + \left(\frac{r_i}{\sqrt{R^2 - r_i^2}} \Delta r_i \right)^2} \quad (4.10)$$

4.4.4 Kugel Tracking

Da die beobachteten Kugeln nicht nur senkrecht zur Oberfläche, sondern auch in der lateralen Richtung fluktuieren bzw. diffundieren können, muss für jedes Bild die Position der Kugel mit Hilfe eines Kugelverfolgungsalgorithmus ermittelt werden. Die gängigen Verfahren sind hierzu die Berechnung des Masseschwerpunktes, das Anfitten eines Gaußprofils und die Korrelation (Cheezum 2001). Die Abbildung einer Kugel mit RIKM besteht jedoch aus einem Interferenzmuster, das sich mit der Höhe ändert. Deswegen ist die Korrelation nicht verwendbar, da sie von Bild zu Bild ein konstantes Muster benötigt. Die Anfitten eines Gaußprofils ist ebenfalls nicht möglich, da der Mittelpunkt, der mit der Gaußkurve angefitet werden müsste, beliebig klein werden und verschwinden kann. Das Verfahren des Masseschwerpunktes erreicht für das zwischen hell und dunkel wechselnde Muster keine hinreichende Genauigkeit.

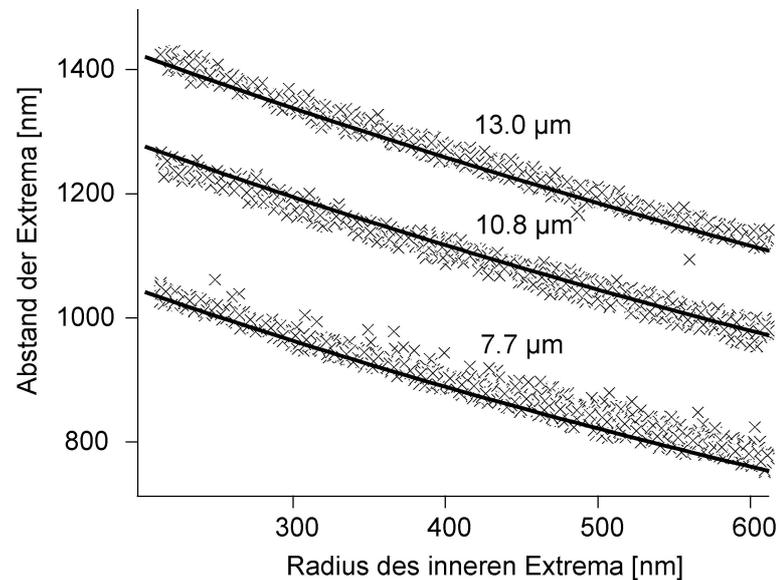


Abb. 4.10: Abstand von zwei Extrema in der RIKM-Abbildung in Abhängigkeit von den Radius des kleineren Extrema. Die Datenpunkte wurde von drei unterschiedlich großen fluktuierenden Kugeln berechnet. Der theoretische Abstand ist nach Gl. (4.9) berechnet. Die Radien wurden einer Durchlichtaufnahme entnommen.

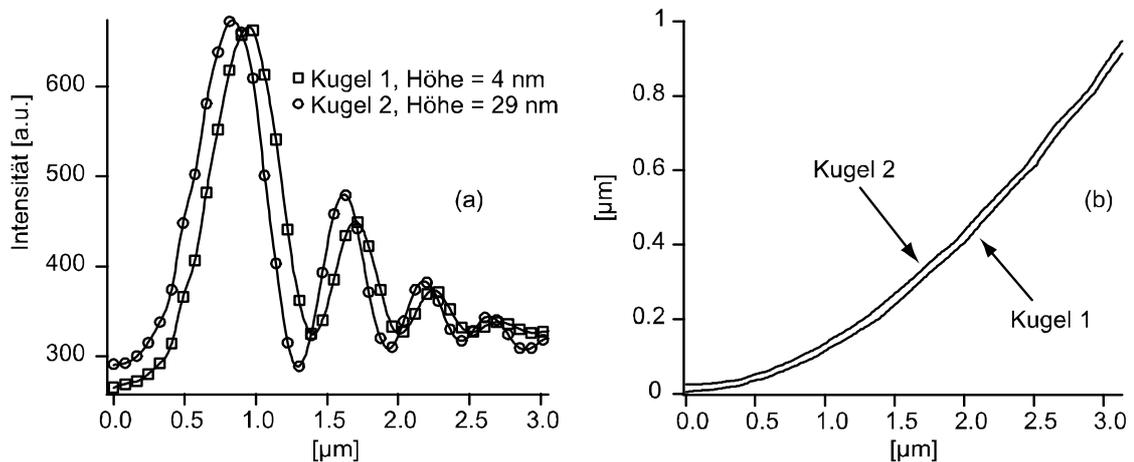


Abb. 4.11: Radial gemittelte Intensitätsprofile von zwei Kugeln die in unterschiedlicher Höhe über der Substratfläche liegen (a) und Rekonstruktion der Höhenprofile (b). Die durchgezogene Linie, die zur Transformation verwendet wurde, wurde zwischen den Datenpunkten (O, □) interpoliert.

Somit war es notwendig, einen speziell für das RIKM-Muster einer Kugel abgestimmten Algorithmus zu entwickeln, der die charakteristischen Eigenschaften des Musters detektiert.

- 1) Das Muster ist radialsymmetrisch

$$I(\vec{x}_0 + \vec{x}_1) \approx I(\vec{x}_0 + \vec{x}_2) \text{ für } |\vec{x}_1 - \vec{x}_0| \approx |\vec{x}_2 - \vec{x}_0| \quad (4.11)$$

- 2) Das Muster variiert senkrecht zu den Radiallinien

$$I(\vec{x}_0 + \vec{x}_1) \neq I(\vec{x}_0 + \vec{x}_2) \text{ für } |\vec{x}_1 - \vec{x}_0| \neq |\vec{x}_2 - \vec{x}_0| \quad (4.12)$$

Hierbei ist $I(\vec{x}_i)$ die Intensität am Ort \vec{x}_i und \vec{x}_0 der Mittelpunkt der Kugel.

Der entwickelte Algorithmus quantifiziert diese beiden Eigenschaften für Bildpixel in der Umgebung eines vermuteten Mittelpunktes und gibt für den tatsächlichen Mittelpunkt ein Maximum an. Er besteht aus zwei unabhängigen Teilen. Im folgenden wird die Vorgehensweise dargestellt:

Wenn man auf einen Kreis um ein Zentrum eines radialsymmetrischen Muster wandert, so begegnet man dort nur Punkte gleicher Intensität (Gl. (4.11)). Wandert man um einen Punkt, der nicht im Zentrum liegt, so kann man unterschiedlichen Intensitäten begegnen. Mathematisch lässt sich dieser Unterschied durch die Standardabweichung der Punkte die auf diesen Kreis liegen ausdrücken. In Abb. 4.12 b wurde diese Standardabweichung für 3 unterschiedliche in Bild (a) eingezeichnete Punkte in Abhängigkeit vom Radius berechnet. Man sieht, dass die Werte für Punkt 1 (Mittelpunkt) wesentlich kleiner sind als für Punkt 2. Für Punkte außerhalb der Struktur (Punkt 3) erhält man jedoch noch geringe Werte. Der Funktionswert des ersten Teiles des Algorithmus ist die Aufsummation dieser Standardabweichungen je Punkt. Die mit „ f_1 “ bezeichnete Kurve in der Abb. 4.12 d zeigt diese berechneten Funktionswerte entlang der in Bild (a) eingezeichneten Linie. Man sieht, dass man für den Mittelpunkt der Kugel ein lokales Minimum erhält. Wenn die Line jedoch in den unstrukturierten Bereich läuft, erhält man Funktionswerte unterhalb diesem Minimum. Um als Ergebnis ein globales Minimum für den Kugelmittelpunkt zu erhalten muss also zusätzlich unterschieden werden, ob das vermeintliche Zentrum radialer Symmetrie auch ein Zentrum einer Struktur ist und nicht das Zentrum eines unstrukturierten Bereiches. Dies wird im zweiten Teil des Algorithmus überprüft.

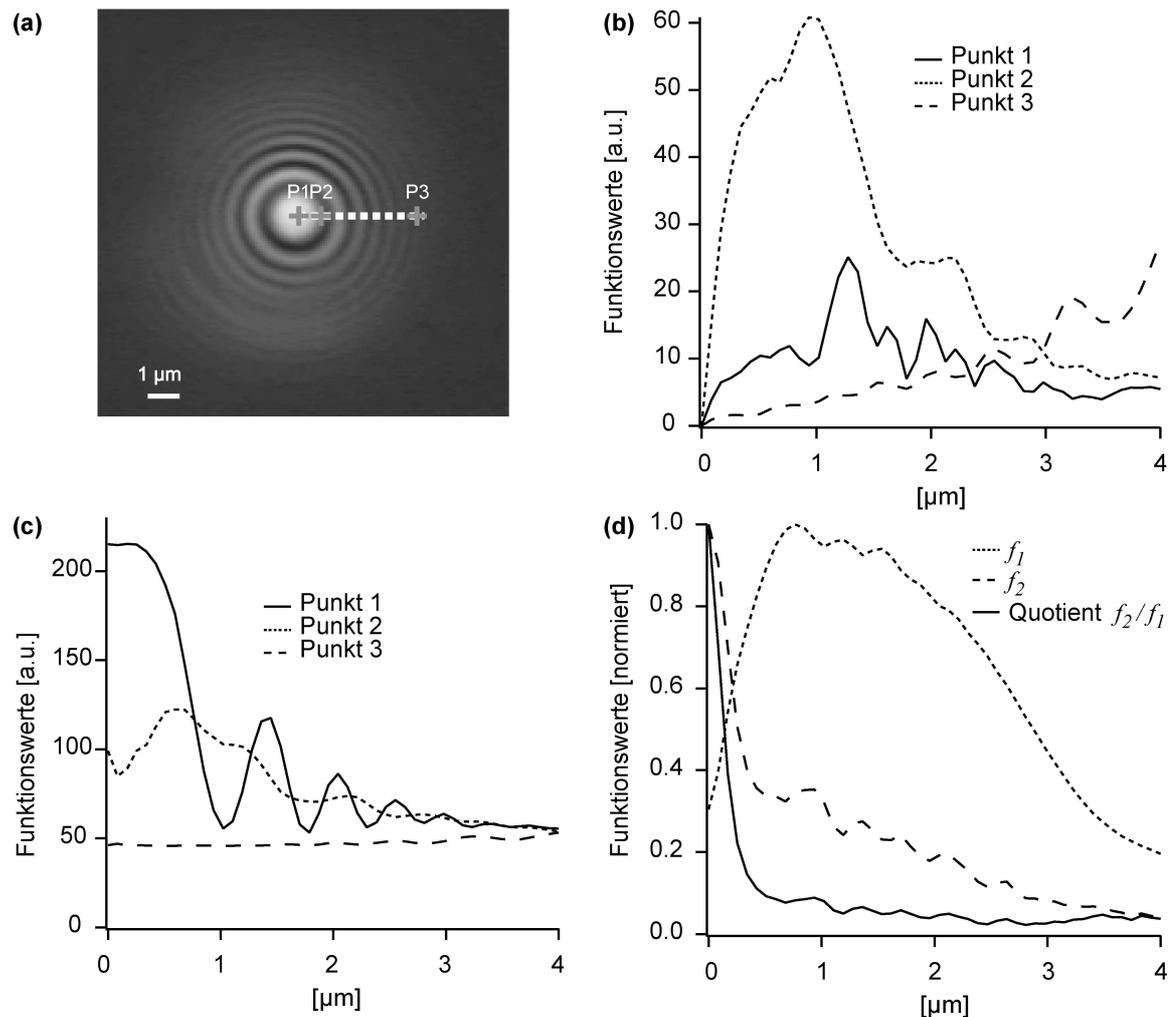


Abb. 4.12: Veranschaulichung des Kugelverfolgungsalgorithmus (siehe Text).

Hierzu kann man sich senkrecht zu Kreislinien bewegen und dabei überprüfen, ob die Werte rasch aufeinanderfolgend schwanken, wie dies für das RIKM-Muster von Kugeln der Fall ist. Effektiver wird dieser Vorgang, wenn diese Veränderung an radial gemittelten Profilen überprüft wird, da sich die Schwankungen des Intensitätsmusters für die Profile rausmitteln, die sich außerhalb des Mittelpunktes befinden. Graph (c) zeigt ein Beispiel von radial gemittelten Profilen für die drei verschiedenen Punkte. Die Schwankung der Intensität ist am größten für das Profil des Mittelpunktes. Um wieder zu einem Wert zu gelangen, der ein Maß für die Radialsymmetrie liefert, muss also überprüft werden wie stark die Änderung des radial gemittelten Profils variiert. Hierzu kann die Standardabweichung der Ableitung dieser Profile benutzt werden. In der Abb. 4.12 d ist auch dieser zweite Teil des Algorithmus „ f_2 “ für die in Bild a eingezeichnete Linie dargestellt. Hier wird deutlich, dass man für den Mittelpunkt der radialsymmetrischen Struktur ein globales Maximum erhält. Der Quotient aus beiden beschriebenen Teilen des Algorithmus liefert nun ein zweidimensionales Feld von

Werten, dessen scharfes globales Extremum auf den Mittelpunkt der gesuchten Struktur in Pixelauflösung verweist. In Graph (d) ist der Quotient ebenfalls für die in Bild (a) eingezeichnete Linie dargestellt. Mittels Taylorentwicklung (siehe unten) oder genauer mit Anpassung einer Fitfunktion an das Wertefeld kann eine Subpixelauflösung erreicht werden.

Im Nachfolgenden ist der Algorithmus als Funktion $F(x)$ dargestellt:

$$\langle I_i(\vec{x}) \rangle = \frac{1}{2\pi i} \sum_{\varphi} I \left(\vec{x} + \begin{pmatrix} i^* \cos(\varphi) \\ i^* \sin(\varphi) \end{pmatrix} \right), \varphi = \left\{ \frac{1}{i}, \frac{2}{i}, \dots, \frac{2\pi i}{i} \right\}$$

$$\sigma(I_i(\vec{x})) = \sqrt{\frac{1}{2\pi i - 1} \sum_{\varphi} \left(I \left(\vec{x} + \begin{pmatrix} i^* \cos(\varphi) \\ i^* \sin(\varphi) \end{pmatrix} \right) - \langle I_i(\vec{x}) \rangle \right)^2}, \varphi = \left\{ \frac{1}{i}, \frac{2}{i}, \dots, \frac{2\pi i}{i} \right\}$$

$$f_1 = \sum_{i=1}^n \sigma(I_i(\vec{x}))$$

$$D_i(\vec{x}) = \langle I_{i+1}(\vec{x}) \rangle - \langle I_i(\vec{x}) \rangle$$

$$\langle D(\vec{x}) \rangle = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n D_j(\vec{x})$$

$$f_2(\vec{x}) = \sigma(D(\vec{x})) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (D_j(\vec{x}) - \langle D(\vec{x}) \rangle)^2}$$

$$F(\vec{x}) = \frac{f_2(\vec{x})}{f_1(\vec{x})}$$

$I(\vec{x})$ = Intensität am Bildpunkt \vec{x} , n = Radius der gesuchten Struktur

In Abb. 4.13 ist die Anwendung des Algorithmus auf 4.5 μm große Dynabeads (Dynal, Hamburg) gezeigt. Bild (a) zeigt die RIKM-Bilder der Kugel, wobei jede Kugel auf Grund der unterschiedlichen Höhe ein unterschiedliche Helligkeit im Kugelmittelpunkt aufweist. Bild (b) zeigt das Ergebnis des Algorithmus codiert als Helligkeitswerte. Die maximalen Funktionswerte sind schwarz. Man erkennt, dass unabhängig von der Helligkeit des Mittelpunktes des Realbildes die Kugelpositionen durch die Extrema in Bild (b) beschrieben werden. Im Bild (c) wird die gefundene Position im Realbild verdeutlicht.

Abb. 4.14 demonstriert, dass der Algorithmus nicht nur zur Kugelverfolgung verwendet werden kann, wobei die ungefähre Position aus den vorangegangenen Bild bekannt ist, sondern auch zum automatischen Auffinden von Kugeln. In der Abb. 4.14 wird eine

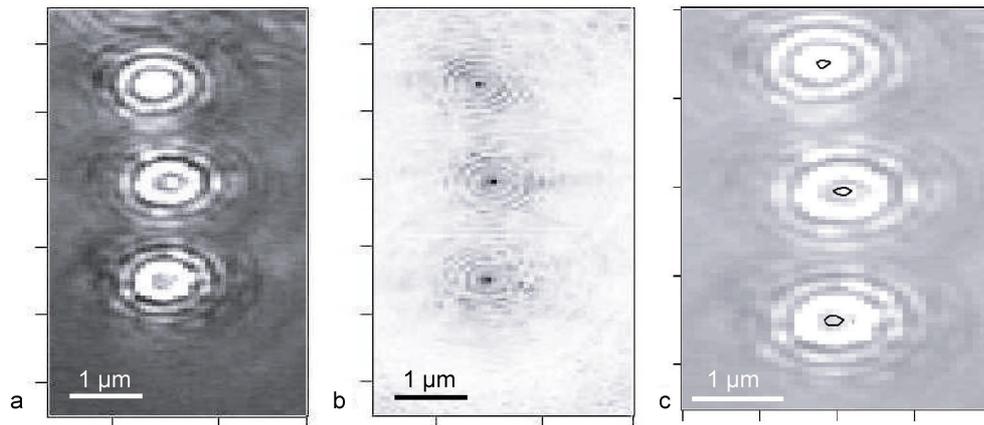


Abb. 4.13: Graphische Darstellung des Ergebnisses des Kugelverfolgungsalgorithmus (b) angewendet auf das Bild (a). Gezeigt sind drei $4.5\ \mu\text{m}$ große Latexkugeln auf einer 3T3-Zelle. Man erkennt deutlich im Bild (b), dass der Algorithmus unabhängig von der Helligkeit des Mittelpunktes des Interferenzmusters für jede Kugel einen eindeutigen Mittelpunkt als Maximum (schwarz) der Funktion angibt. In Bild (c) ist ein Konturplot der Funktionswerte dem realen Bild überlagert, um die Position des gefundenen Mittelpunktes zu verdeutlichen.

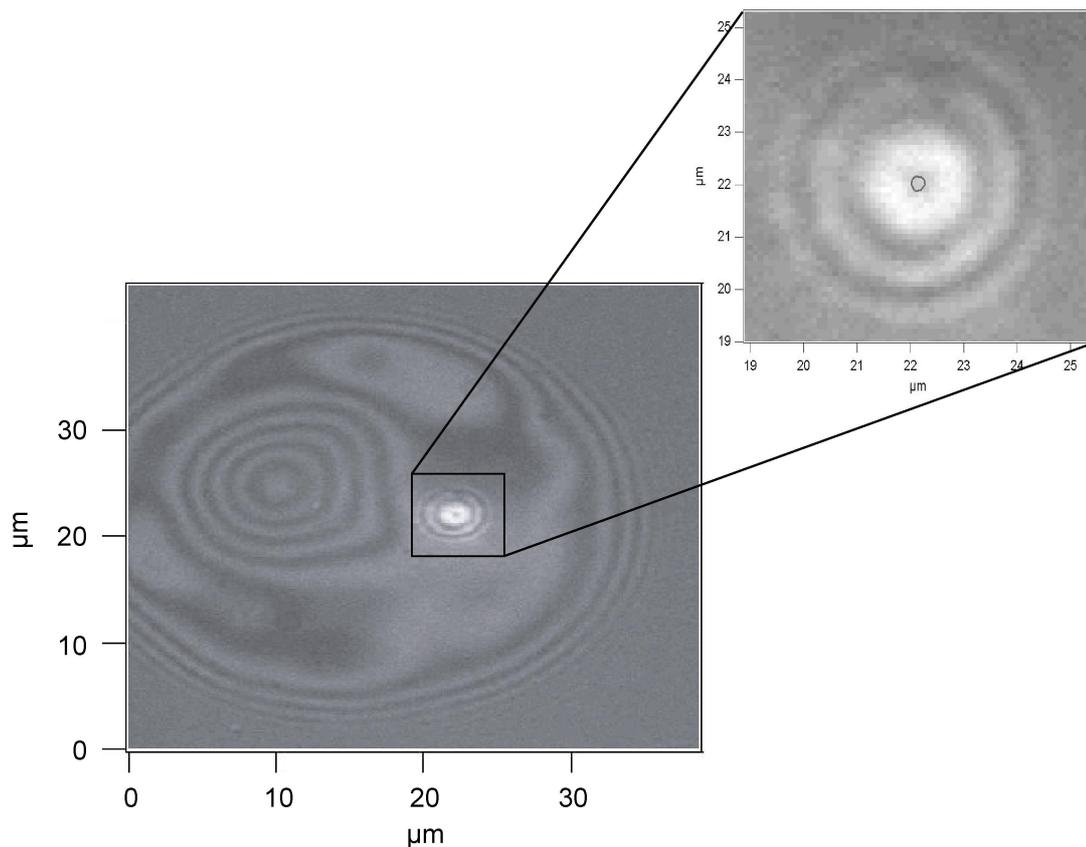


Abb. 4.14: Verwendung des Algorithmus zur Auffindung der Kugel. Der Kreis im Ausschnitt zeigt das gefundene globale Maximum bei der Anwendung des Algorithmus auf das gesamte Bild.

Kugel gezeigt die sich innerhalb eines Vesikels befindet. Der Kreis im Ausschnitt markiert das globale Maximum, dass bei der Anwendung des Algorithmus auf das

gesamte Bild, gefunden wurde. Die Einstülpung des Vesikels links im Bild wird nicht als globales Maximum abgebildet, da die Parameter des Algorithmus die gesuchte Strukturgröße vorgeben, die in diesem Fall auf die zu suchende Kugel abgestimmt waren.

4.4.5 Höhenbestimmung

Ist der Mittelpunkt einer Kugel bestimmt, so wird ein radial gemittelttes Profil erstellt. Hieraus können die Radien der Interferenzringe als Extrema identifiziert werden, aus denen die Kugelhöhe berechnet werden kann. Eine pixelgenaue Bestimmung der Extrema würde laut Gl. (4.10) eine Genauigkeit von 10 bis 30 nm zwischen 0 und 400 nm Höhe erreichen. Für ein genaueres Ergebnis müssen die Extrema des Profils in einer Subpixelaufösung berechnet werden.

Hierzu wird folgendes Verfahren angewendet:

Eine beliebige Funktion kann mit einer Taylorentwicklung approximiert werden.

$$f(x) = f(a) + (x-a)f'(a) + \frac{(x-a)^2}{2!} f''(a) + o(x^3)$$

Dabei gilt für eine diskrete Funktionen:

$$f'(a) = \frac{f(a+1) - f(a-1)}{2}, f'' = f(a+1) - 2f(a) + f(a-1)$$

Das Extrema wird gefunden, in dem die erste Ableitung gleich Null gesetzt wird.

$$f'(x) = f'(a) + (x-a)f''(a) + o(x^2) = 0$$

Somit gilt für das Extremum einer diskreten Funktion:

$$x \approx a - \frac{f'(a)}{f''(a)} = a - \frac{1}{2} \frac{f(a+1) - f(a-1)}{f(a+1) - 2f(a) + f(a-1)}$$

Diese Näherung gibt nur ein sinnvolles Ergebnis, wenn sich genau ein Extremum zwischen $f(a-1)$ und $f(a+1)$ befindet.

Mit der Kenntnis der Position des Extremums kann nun aus dem Interferenzmuster einer Wellenlänge die Höhe der Kugel bis auf einen unbestimmten Summanden von $\frac{\lambda_1 i}{2n}$ berechnet werden, wobei i unbekannt ist. Mit Hilfe des Interferenzmusters der zweiten Wellenlänge kann i ermittelt werden. In Abb. 4.15 ist dies verdeutlicht. Hier

sind die Intensitätswerte der Mitte einer fluktuierenden Kugel der blauen Wellenlänge gegen die Werte der grünen Wellenlänge aufgetragen (Kreuze). Die durchgezogene Linie stellt den theoretischen Verlauf nach Gl. (4.13) dar.

$$I_2(I_1) = c_2 - A_2 \cos\left(\frac{\lambda_1}{\lambda_2} \arccos\left(\frac{c_1 - I_1}{A_1}\right)\right) \quad (4.13)$$

I_1 bzw. I_2 ist die Intensität des grünen bzw. blauen Lichtes, $A_{1,2}$ die Intensitätsamplituden und $c_{1,2}$ die Offsets $(I_{i,\max} + I_{i,\min})/2$ der Intensitäten.

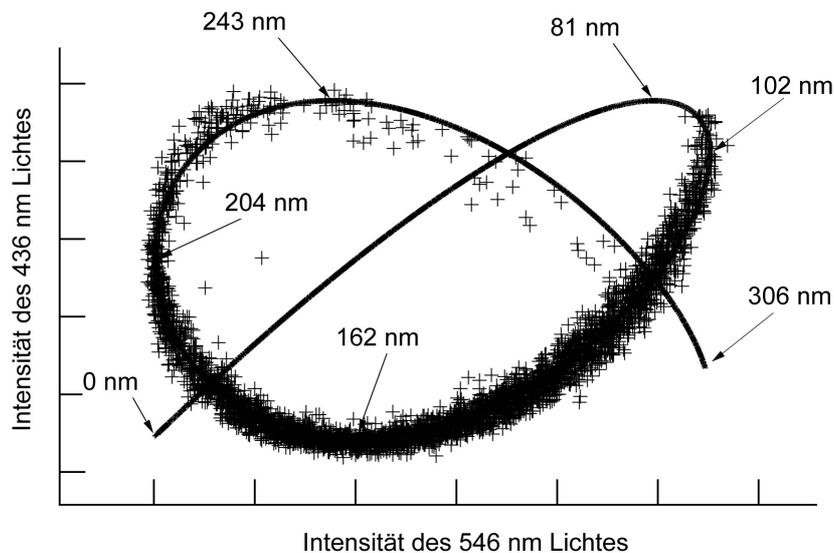


Abb. 4.15: Hier sind die gleichzeitig gemessenen Intensitäten des Mittelpunktes einer fluktuierenden Kugel gegeneinander aufgetragen. Jeder Messpunkt stellt die Position der Kugel zu einer Zeit t dar. Während die Intensitätswerte nicht eindeutig transformierbar sind, gibt die Phasenlage Auskunft über die absolute Höhe. Der nach Gl. (4.13) erwartete theoretische Verlauf ist bis 300 nm dargestellt.

Aus der Lage der Datenpunkte $(I_2(t), I_1(t))$ auf der theoretischen Kurve $I_2(I_1)$ im Graph der Abb. 4.15 lässt sich die Höhe der Kugel bestimmen. In Abb. 4.16 sind die Intensitätswerte der Kugelmittelpunkte gegen die aus den Radien der Interferenzringe berechneten Höhen aufgetragen. Es sind Kugeln in drei verschiedenen Höhen gezeigt. Die Höhen können im gezeigten Bereich durch die Phasenrelation der Intensitäten eindeutig zugeordnet werden. In Abb. 4.16 erkennt man, dass die Phasenlage der beiden Wellenlängen zur Höhe von 408 nm symmetrisch sind. Die Höhe von 306 nm besitzt also die gleiche Phasenbeziehung wie 510 nm. Dennoch sind fluktuierende Kugeln in diesen Höhen unterscheidbar, da die Änderung der Phasenlage und die Änderung der Höhe in diesen beiden Punkten sich genau gegenläufig verhalten, wobei die Änderung der Höhe aus der Änderung der Breite der Interferenzringe berechnet werden kann.

4.4.6 Drei-Wellenlängen-Technik

Eine Mehrdeutigkeit entsteht, wenn sich die Intensitätsminima der beiden Wellenlängen in der gleichen Höhe annähernd treffen und sich somit die Phasenrelation wiederholt. Dies tritt bei den gewählten Wellenlängen, wie in Abb. 4.16 erkennbar ist, bei 816 nm ein. Somit wäre nicht zu unterscheiden, ob die in Abb. 4.15 gezeigte Kugelfluktuationshöhe um eine Höhe von 160 nm oder von 976 nm stattfindet. Wenn sich für die durchgeführte Messung auch für beide oder noch größere Höhen ein physikalisch sinnvolles Ergebnis ergibt, muss für dieses Experiment eine weitere Wellenlänge gewählt werden, die eine Eindeutigkeit in einen genügend großen Bereich gewährleistet. Abb. 4.17 verdeutlicht den Einsatz einer gelben Linie (577 nm) als dritte Wellenlänge. Während durch Ausnutzung der grünen und blauen Linie nicht allein entschieden werden könnte, ob die gezeigte Kugelfluktuationshöhe um eine mittlere Höhe von 120 nm oder 936 nm stattfindet, würde hier die gelbe Linie (577 nm) durch eine unterschiedliche Phasenlage eine klare Entscheidung ermöglichen. Abb. 4.18 zeigt das Ergebnis einer Messung, die zuerst mit der grünen und blauen Linie und anschließend alleine mit der roten Linie (677 nm) durchgeführt wurde. Die relative Phasenlage der Intensitäten der drei Wellenlängen lässt die Kugelposition eindeutig im zugänglichen Bereich von 0 bis 7 μm zuordnen.

Bei der Messung mit drei Wellenlängen gibt es zwei mögliche Vorgehensweisen. In beiden Fällen wird zuerst die Messung wie beschrieben, mit zwei Wellenlängen durchgeführt. Anschliessend kann entweder die dritte Wellenlänge einzeln (Vorgehensweise I) oder in Kombination mit einer der ersten beiden Wellenlängen (Vorgehensweise II) gemessen werden. Bei der ersten Methode muss jedoch sicher gestellt werden, dass die mittlere Höhe der Kugel zwischen den beiden Messungen um weniger als 23 nm (bei der Kombination 436/546/577 nm) variiert. Bei der zweiten Methode wird lediglich eine mittlere Genauigkeit der Höhenmessung von 23 nm innerhalb einer Messung benötigt (bei der angegebenen Wellenlängenkombination).

Das Problem der Uneindeutigkeit kann bei der Verwendung einer Quecksilberdampfampe als Beleuchtungsquelle nicht unter Verwendung von anderen Wellenlängenkombinationen umgangen werden. Die Wellenlängenkombination grün/gelb (546/577 nm) würde zwar mit der Beziehung $\lambda_{\text{gelb}} \approx 1.057 \lambda_{\text{grün}}$ eine zweideutige Phasenbeziehungen erst nach 3.7 μm erzeugen, um zwei nebeneinanderliegende Perioden, also z.B. Höhen von 90 und 294 nm, zu unterscheiden, bräuchte man jedoch eine Genauigkeit in der absoluten

Höhenbestimmung für beide Wellenlängen von unter 5 nm. Die grün/rote (546/677 nm) Kombination ergibt mit $\lambda_{\text{rot}} \approx 1.25 \lambda_{\text{grün}}$ eine Wiederholung der Phasenbeziehung nach 1020 nm.

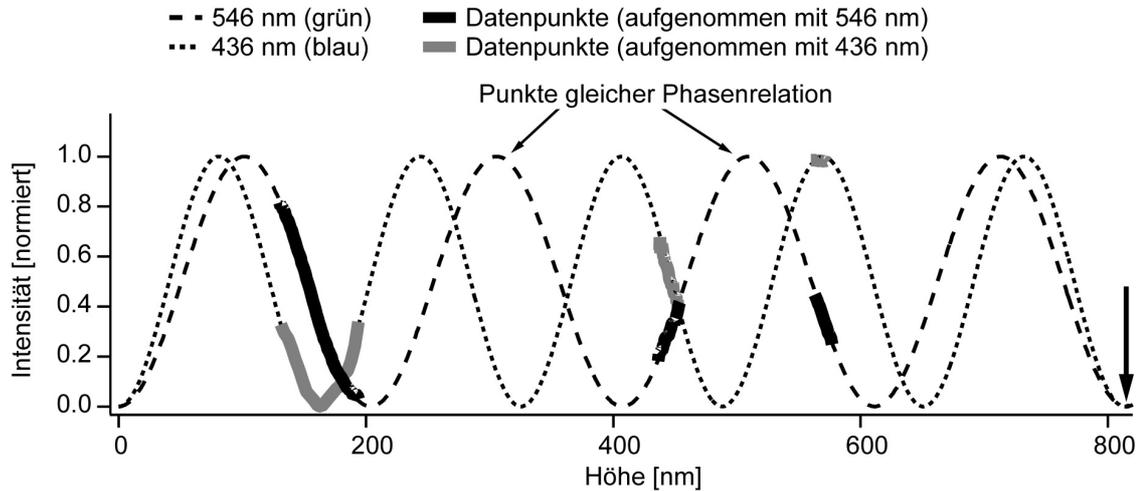


Abb. 4.16: Auftragung der Intensitäten zweier Wellenlängen (546 und 436 nm) über der Höhe. Die Intensitätswerte der grünen und blauen Linie sind für drei in unterschiedlicher Höhe fluktuierenden Kugeln aufgetragen. Hierbei wurden die Intensitätswerte in Abhängigkeit der Höhe gemittelt. Aufgrund der Phasenbeziehung der beiden Wellenlängen kann die Höhe bis 816 nm eindeutig zugeordnet werden. Ab 816 nm (siehe Pfeil) wiederholt sich die Phasenbeziehung.

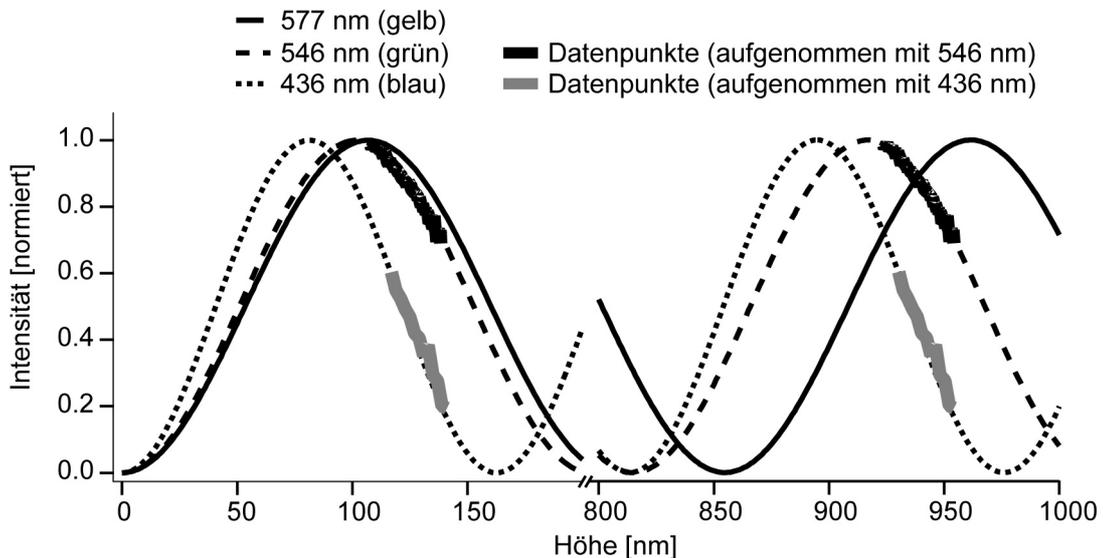


Abb. 4.17: Aufgrund der Relation $\lambda_{\text{grün}} \approx 1.25 \lambda_{\text{blau}}$ wiederholt sich die Phasenbeziehung zwischen diesen beiden Linien in 816 nm Höhe. Die Phasenbeziehung der Intensitäten für eine fluktuierende Kugel kann somit z.B. an Höhen von 120 oder 936 nm angepasst werden. Wird die Phasenbeziehung zu einer dritten Linie, wie z.B. der gelben Linie gemessen, so kann die Höhe wieder eindeutig bestimmt werden.

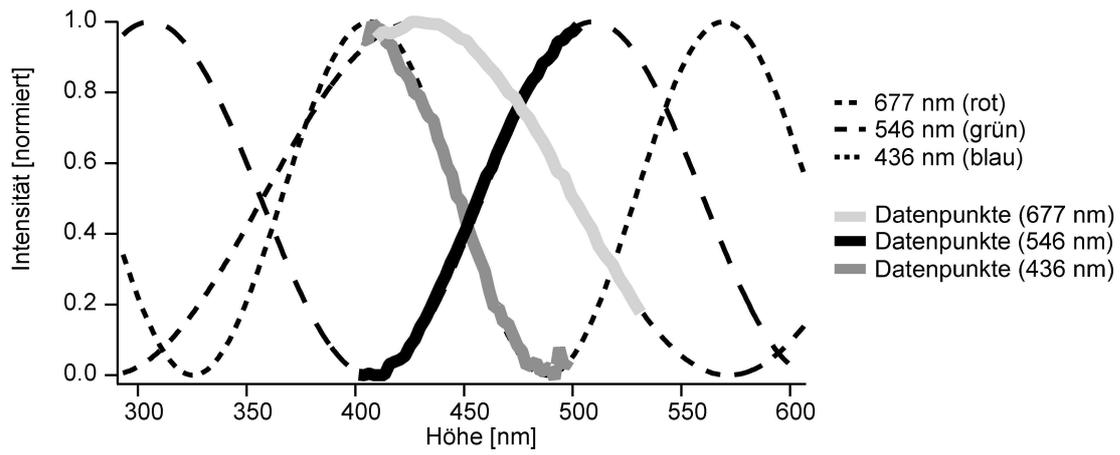


Abb. 4.18: Unter Ausnutzung der roten Linie (677 nm) als dritte Linie, wurde hier die absolute Höhe bestimmt.

5 Experimente am Reflexions-Interferenz-Kontrast-Mikroskop

5.1.1 Polystyrolkugeln über Glas

Im folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen der Wechselwirkung von Polystyrolkugeln im wässrigen Medium mit Glasoberflächen dargestellt und diskutiert. Durch die Beobachtung von fallenden Kugeln konnte die durch Gl.(4.3) bestimmte maximale Höhe gemessen werden, unter der diese Kugeln im RICM beobachtet werden können. Es konnte gezeigt werden, dass die Fallgeschwindigkeit der Kugel durch die modifizierte Stocksche Gleichung der hydrodynamischen Reibung einer Kugel in der Nähe fester Oberflächen bestimmt ist und mit einer Theorie von Brenner qualitativ gedeutet werden kann (Brenner 1961; Happel 1991). Die verwendeten Kugeln schweben über Glasoberflächen und führen Brownsche Molekularbewegung parallel und senkrecht zur Oberfläche aus. Diese Fluktuation wurde charakterisiert, um den Unterschied im Verhalten der Kugeln gegenüber dem Verhalten über Polymerfilmen zu erkennen.

5.1.1.1 Theoretische Grundlagen

Im folgenden werden die Wechselwirkungen zwischen Glasoberfläche und Polystyrolkugeln besprochen.

Gravitation

Die Gravitationskraft, die auf die Kugeln im wässrigen Medium wirkt, kann mit (5.14) beschrieben werden:

$$V_{Grav} = \frac{4}{3} \pi R^3 \Delta \rho g h \quad (5.14)$$

Hierbei ist $\Delta \rho$ der Dichteunterschied zwischen Medium und Kugel und g die Fallbeschleunigung. Polystyrol hat eine Dichte von 1.005 g/m^3 , Das verwendete Salz KCl hat ein molekulares Gewicht von 75.5 g/mol und der verwendete Puffer Hepes 238 g/mol .

Elektrostatik

Oberfläche von Festkörpern besitzen in der Regel feste Ladungsträger oder dissoziierbare geladene Gruppen, die im wässrigen Medium zu einer pH-abhängigen

Oberflächenladungsdichte führen. Die geladenen Kugeln im Medium sind von Wolken frei beweglicher Gegenionen umgeben, die die elektrostatische Wechselwirkung abschirmen. Die elektrostatische Potential pro Einheitsfläche zwischen zwei ebenen Flächen kann näherungsweise mit folgender Gleichung (Gregory 1975) angegeben werden:

$$E_{el}(h) = \frac{64n_l K_B T}{\kappa} \tanh \frac{e\Psi_1}{4k_B T} \tanh \frac{e\Psi_2}{4k_B T} e^{-\kappa h} \quad (5.15)$$

Hierbei ist n_l die Ionendichte pro Einheitsvolumen, e die Elementarladung, Ψ das Oberflächenpotential und κ^{-1} die Abschirmlänge. Die Gleichung gilt für $\kappa h \gg 1$.

Nach (Israelachvili 1991) kann die reziproke Abschirmlänge κ mit Gl. (5.16) berechnet werden.

$$\kappa = \left(\sum_i \frac{n_{l_i} e^2 z_i^2}{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T} \right) \quad (5.16)$$

Dabei wird über unterschiedliche Ionen i aufsummiert. n_l ist die Dichte der jeweiligen Ionen, e die Elementarladung, z die Ladungszahl, ϵ_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums und ϵ_r die relative Dielektrizitätskonstante der Lösung. Somit ergibt sich für die Abschirmung eines 1:1 Elektrolyts wie z.B. das im Rahmen dieser Arbeit verwendete KCl:

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{0.304}{\sqrt{[KCl]}} \text{ nm} \quad (5.17)$$

Hierbei ist $[KCl]$ die Konzentration in Mol/m^3 . Für eine Lösung ohne KCl jedoch mit 5 mM Hepes-Lösung ergibt sich eine Abschirmlänge von 4.3 nm, für eine Lösung mit zusätzlich 200 mM KCl 0.67 nm. Beim verwendeten pH-Wert kann das Oberflächenpotential für Glas ψ_{Glas} mit 70 mV und das Oberflächenpotential für Polystyrol ψ_{PS} mit 50 mV angenommen werden.

Um das elektrostatische Wechselwirkungspotential zwischen Kugel und Substrat zu bestimmen, muss das Potential zwischen jedem Element der Kugeloberfläche und jedem Element der Substratoberfläche aufsummiert werden. Eine Näherung für diese Integration gibt die Derjaguin-Näherung an:

$$U(h) = f \int_D^{\infty} E(h) dh \quad (5.18)$$

Hierbei ist f ein geometrischer Faktor, der für eine Wechselwirkung zwischen einer ebenen Oberfläche und einer Kugeloberfläche mit $f = 2\pi R$ angegeben werden kann, wobei R der Kugelradius ist. $E(h)$ ist das Wechselwirkungspotential pro Einheitsfläche, das aus Gl. (5.15) entnommen werden kann. Unter Verwendung von Gl.(5.16) erhält man für das elektrostatische Wechselwirkungspotential zwischen Kugel und Substrat:

$$U(h) = 64\pi R \varepsilon_0 \varepsilon_r \tanh \frac{e\Psi_1}{4k_B T} \tanh \frac{e\Psi_2}{4k_B T} \left(\frac{k_B T}{e} \right)^2 e^{-\kappa h} \quad (5.19)$$

Van der Waals-Potential

Die Van-der-Waals-Wechselwirkung zwischen Kugeln und einer Oberfläche kann nach Israelachvili (Israelachvili 1991) berechnet werden:

$$V_{vdw} = -\frac{A_H R}{6h} \quad (5.20)$$

Dies ist ebenfalls ein Ergebnis der Derjaguin-Näherung. Hierbei ist A_H die Hamakerkonstante. In dieser Gleichung wird jedoch weder die Retardation noch die Abschirmung der Van-der-Waals-Kraft berücksichtigt. Die Van-der-Waals-Konstante kann in einen statischen Anteil $A_{v=0}$ und einen dynamischen Anteil $A_{v>0}$ aufgeteilt werden. Für die Wechselwirkung zwischen Polystyrol und Glas im wässrigen Medium sind beide Anteile in etwa gleich groß und in der Größenordnung von $k_B T$. Der Anteil $A_{v=0}$ unterliegt der Abschirmung mit $e^{-\kappa h}$. Der Anteil $A_{v>0}$ wird bei großen Abstand durch die elektrodynamische Retardation bestimmt.

Bevan et al. (Bevan 1999) haben bei der TIRM-Experimenten (Total internal reflection microscopy) mit Polystyrolkugeln mit einem Radius von $6 \mu\text{m}$ über Glas ein empirisches Gesetz (5.21) gefunden, dass die Höhenabhängigkeit der Van-der-Waals-Wechselwirkung wiedergibt.

$$V_{vdw}(h) = -3k_B T e^{-\frac{h}{40nm}} \quad (5.21)$$

Hydrodynamik

Auf eine Kugel, die sich in einer Flüssigkeit bewegt wirkt eine Reibungskraft entgegen der Bewegungsrichtung der Kugel. Unter der Voraussetzung einer laminaren Strömung kann diese mit dem Stokesschen Gesetz beschrieben werden:

$$F_R = \gamma v, \quad \gamma = 6\pi R \eta \quad (5.22)$$

Dabei ist F_R die Reibungskraft, die in Abhängigkeit der Geschwindigkeit v auf die Kugel wirkt, η ist die dynamische Viskosität des umgebenen Medium und R der Kugelradius. In der Nähe einer Wand entsteht eine zusätzliche Reibungskraft, da das Strömungsprofil um die Kugel durch diese Wand gestört wird (siehe Abb. 5.19).

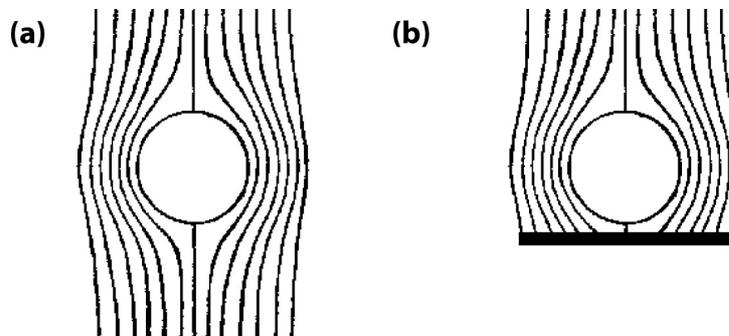


Abb. 5.19: (a) Das ideale Strömungsprofil um eine fallende Kugel besteht im Fall einer laminaren Umströmung aus wohldefinierten Strömungsfäden. (b) Wird dies Profil durch eine Wand gestört, entsteht eine zusätzliche Reibungskraft.

Diese kann durch einen zusätzlichen Geometriefaktor berücksichtigt werden, indem man die Stokessche Gleichung erweitert:

$$\gamma = -6\pi R \eta \lambda \quad (5.23)$$

Für eine Bewegung senkrecht zur Wand wurde bereits von Reynolds mit $\lambda = R/h$ eine Näherung angegeben (Reynolds 1886), die für $h \ll R$ angewendet werden kann. Dabei ist h der Abstand von der Kugeloberfläche zur Wand. Exakt wurde dieser Faktor von Brenner (Happel und Brenner 1991) bestimmt :

$$\lambda = \frac{4}{3} \sinh(\alpha) * \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+1)}{(2n-1)(2n+3)} \left[\frac{2 \sinh(2n+1)\alpha + (2n+1)\sinh 2\alpha}{4 \sinh^2\left(2n + \frac{1}{2}\right)\alpha - (2n+1)^2 \sinh^2 \alpha} - 1 \right] \quad (5.24)$$

$$\alpha = \cosh^{-1}\left(\frac{h+r}{r}\right)$$

Für eine Bewegung parallel zur Wand tritt ebenfalls eine zusätzliche Reibungskraft auf. Faxen (Faxen 1923; Happel und Brenner 1991) hat in seiner Dissertation für diesen Fall die folgende Gleichung abgeleitet:

$$\lambda = \frac{R}{1 - (9/16)(R/h) + (1/8)(R/h)^3 - (45/256)(R/h)^4 - (1/16)(R/h)^5} \quad (5.25)$$

Brownsche Bewegung

Die Fluktuation einer kolloidalen Sonde aufgrund der Brownsche Bewegung in einem Potential $V(h)$ kann durch die Langevin Gleichung beschrieben werden:

$$m \frac{\partial^2 h}{\partial t^2} + \gamma \frac{\partial h}{\partial t} + \frac{\partial V}{\partial h} = f_{stoch} \quad (5.26)$$

Dabei ist h der Abstand von der Kugeloberfläche zum Substrat, m die Masse der Kugel, t die Zeitvariable und f_{stoch} ist die stochastisch fluktuierende Kraft des thermischen Rauschens. Im Falle eines kolloidalen Partikels kann der Trägheitsterm (erster Term) vernachlässigt werden. Der zweite Term beschreibt die dissipative Reibungskraft, wobei γ der effektiver Reibungskoeffizient ist. Dieser ist über Gl. (5.23) mit der Viskosität η verknüpft. Der dritte Term beschreibt das Potential zwischen Kugel und Polymerfilm. $V(h)$ ist bestimmt durch die Elastizität des Polymerfilms und kann für kleine Deformationen als harmonisches Potential angenähert werden. Somit gilt $V(h) = V'' \cdot (h - \langle h \rangle)^2$, wobei V'' die zweite Ableitung des Potentials nach dem Ort ist und somit einer Federkonstante entspricht.

Die viskoelastischen Parameter V'' und γ können aus der Höhenfluktuation des kolloidalen Partikel über die Korrelationsfunktion berechnet werden:

$$\langle \Delta h(t) \Delta h(t + \tau) \rangle = \frac{k_B T}{V''} e^{-\frac{V''}{\gamma} \tau} \quad (5.27)$$

Aus Gl. (5.27) folgt:

$$\langle \Delta h(t) \Delta h(t + 0) \rangle = \langle \Delta h^2 \rangle = \frac{k_B T}{V''} \quad (5.28)$$

Die Bestimmung von V'' und γ kann somit wie folgt durchgeführt werden. Erst wird V'' aus $\langle \Delta h^2 \rangle$ berechnet und anschließend kann γ durch Anpassung der rechten Seite von Gl(5.27) an die Autokorrelation aus der Höhenfluktuation bestimmt werden.

5.1.1.2 Fallende Kugeln

Untersuchungen an fallenden Kugeln in der Nähe von Oberflächen wurden bisher nur an makroskopischen Kugeln durchgeführt (MacKay 1962) Mit RIKM konnte nun erstmals der Fall von 10 μm großen Kugeln ab einer Höhe von 7 μm beobachtet werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 5.20 dargestellt. Die theoretische Bahn $h(t)$, die in den Graphen als gestrichelte Linie dargestellt ist, wurde aus dem Gleichsetzen der Reibungskraft nach Brenner (5.24) und der Schwerkraft gewonnen:

$$\int_{h'=h_0}^h \lambda(h', r) dh' = -\frac{2}{9} \frac{\Delta\rho r^2 g}{\eta} (t - t_0) \quad (5.29)$$

g ist die Fallgeschwindigkeit und h_0 die Höhe zum Zeitpunkt t_0 . Die Massenträgheit wurde hierbei vernachlässigt und die Integration numerisch gelöst. Die theoretische Bahn wurde an die experimentelle Kurve unter Variation der Dichtendifferenz angeglichen. Die Radien der Kugeln wurden einer Durchlichtmikroskopie gemessen. Hieraus ergab sich eine Dichte für die Polystyrolkugel $\rho = 1.05 \text{ g/cm}^3$, die mit Literaturwerten übereinstimmt (Weast 1971). Der ermittelte Dichteunterschied von $\Delta\rho = 0.14 \text{ g/cm}^3$ zwischen der Lösung mit und ohne 200 mMol KCl, stimmt gut mit den theoretischen Wert von 0.151 g/cm^3 überein. Bilder (a) und (b) zeigen den Fall in einer Lösung mit bzw. ohne 200 mMol KCl. Die Kugeln folgen sehr exakt den theoretisch berechneten Bahnen. Im Bild c ist der Fall von zwei unterschiedlich großen Kugeln dargestellt. Da die Masse der Kugel und somit die Schwerkraft mit der 3. Potenz des Radius zunimmt, die Reibung aber in der entsprechenden Höhe näherungsweise mit der 2. Potenz, ist die größere Kugel schneller. Man erkennt in den Bildern (a) und (b), dass die Kugeln nicht bis zu dem Substrat fallen, sondern über diesem schweben. Dabei sinken die Kugeln nicht unterhalb von 40 nm, obwohl die elektrostatische Abschirmlänge weniger als einen Nanometer beträgt. Dieser Effekt wird weiter unten ausführlich diskutiert. Um sicher zu stellen, dass dies kein systematischer Messfehler in der Höhenmessung ist, da man aufgrund der elektrostatischen Abstoßung (5.19) eine geringere Höhe erwarten würde, wurden diese Experimente über einer für die Kugeln

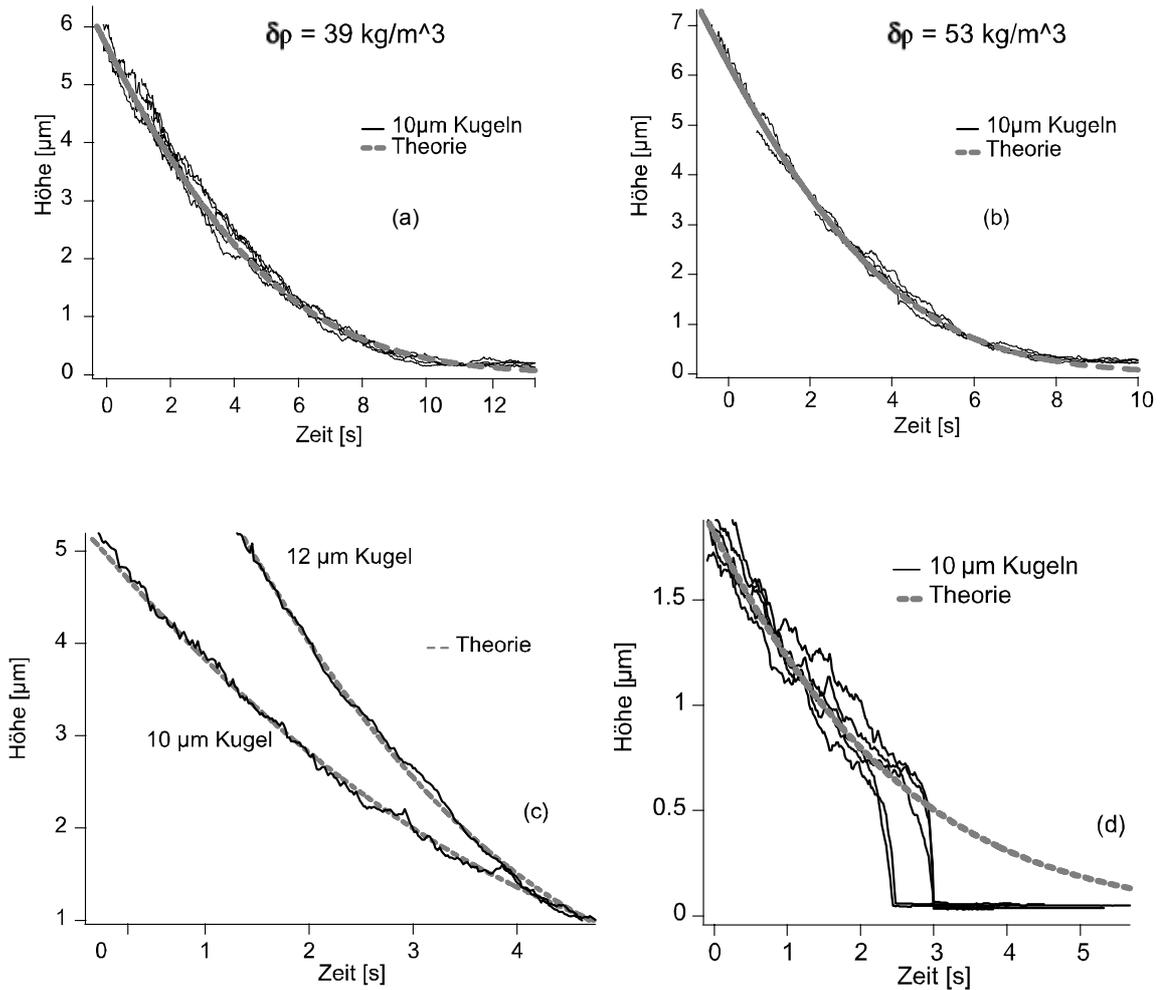


Abb. 5.20: Fall von 10µm Polystyrolkugeln über reinen und silanisierten Glasoberflächen im wässrigen Medium. Die durchgezogenen Linien sind Einzelmessungen, die gestrichelten Linien zeigen die aus Gl. (5.29) erhaltenen Höhenbahnen. Bild (a) zeigt den Fall in einer 200 mM KCL/5mM Hepes - Lösung und Bild b wurde in einer 5mM Hepeslösung aufgenommen. Bild c zeigt das unterschiedliche Verhalten von zwei unterschiedlich großen Kugeln.

attraktive Oberfläche durchgeführt. Hierfür wurde auf Glas 3-Triethoxysilylpropylamine durch Physisorption aufgetragen. Dabei wurde eine von Siqueira Petri beschriebenes Verfahren (Siqueira Petri 1999) angewendet. Hierdurch wird die silanierte Oberfläche des Glases elektrostatisch positiv. Da die Kugeln im wässrigen Medium beim verwendeten pH-Wert eine negativ geladene Oberflächenladung haben, wirkt zwischen Kugel und silanierter Glasoberfläche eine attraktive elektrostatische Wechselwirkung. Tatsächlich wurden bei 10 untersuchten Kugeln eine durchschnittliche Höhen von 13 nm mit einer Standardabweichung von 6 nm gemessen. Die niedrigste Kugel lag auf 4 nm. In Bild d kann man einen überraschenden Effekt beobachten. Die attraktive Wechselwirkung zwischen Kugel und silaniserten Substrat führt zu einem „Sturzflug“ der Kugeln ab 600nm. Dabei

beschleunigen die Kugeln ihren Fall, bis sie kurz vor dem Substrat in einer Höhe von 200 nm Geschwindigkeiten von bis zu 4 $\mu\text{m/s}$ erreichen. Wenn man die Reibung nach Gl. (5.24) berücksichtigt, muss eine attraktive Kraft von 10 pN zu dieser Geschwindigkeit führen. Die Gravitationskraft die auf die Kugel wirkt, ist um den Faktor 50 geringer. Dieser Effekt wurde bei einer Abschirmlänge von 0.67 nm (5 mM Hepes) und 4.3 nm (200 mM KCl + 5 mM Hepes) gemessen. Die Schwelle, ab der dieser Effekt einsetzte war mit 600 nm unabhängig von der Abschirmlänge.

5.1.3 Kugelfluktuationen

Die Kugeln sinken nicht bis zur Oberflächen sondern fluktuieren je nach Ionenkonzentration der Lösung in einer Höhe von 40 bis 200 nm. Dabei befinden sie sich in vertikaler als auch in horizontaler Richtung in einem linsenförmigen Potential, wobei die Breite des Potentials in lateraler Richtung größer ist als in vertikaler Richtung. Überraschend ist erstens, dass in horizontaler Richtung überhaupt ein Potential besteht. Man würde insbesondere für eine schwebende Kugel eine freie Diffusion erwarten. Zweitens ist die Höhe der unteren Begrenzung des Potentials nicht vereinbar mit dem Bild einer glatten Kugel über einer Glasoberfläche, da die elektrostatische Abstoßung die als repulsives Potential nach Gl.(5.19) die Kugel tragen sollte gleichgesetzt mit der Gravitation wesentlich geringere Gleichgewichtshöhen (50 nm) geben sollte. Das Van-der-Waals-Potential Gl. (5.20) modifiziert das Potential berechnet Elektrostatik und Gravitation nur geringen.

Bewegungen von Polystyrolkugeln in der verwendeten Größe in der Nähe von Oberflächen wurden für die vertikale Richtung bereits in TIRM-Experimenten (Bevan 2000) untersucht. Dabei wurden die Kugeln jedoch mit Hilfe eines Lasers in einem bestimmten Abstand zur Oberfläche gehalten. Bewegungen in lateraler Richtung wurden mit Hilfe einer Laserfalle von Pralle et al. (Pralle 1998) untersucht. Aus den Fluktuationen in vertikaler und horizontaler Richtung wurden Diffusionskonstanten bestimmt und mit den nach Brenner bzw. Faxen erwarteten Werten verglichen. Die Gültigkeit dieser Gleichungen konnte eindrucksvoll bestätigt werden.

Bei den in Abb. 5.21 und Abb. 5.22 gezeigten Untersuchungen werden die Kugeln jedoch nicht von dem Feld eines Lasers auf eine bestimmten Höhe gehalten, sondern sie suchen sich selber ihre Gleichgewichtshöhe. Die effektive Viskosität wurde über die Autokorrelation bestimmt. Die Potentialkrümmung wurde mit der Boltzmannverteilung (5.30) berechnet.

$$V(h) = -k_B T \ln(P(h)) + C \quad (5.30)$$

Hierbei ist $V(h)$ das Potential einer Häufigkeitsverteilung $P(h)$. Graph (a) und (b) zeigen die Krümmung V'' im Potentialminimum, die der Kraftkonstante des Potentials entspricht. Für die Breite σ des harmonisch um den Fluktuationsmittelpunkt genäherten Potentials gilt Gl. (5.31).

$$\sigma^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=0}^N (x_i - \bar{x})^2 = \frac{k_B T}{V''} \quad (5.31)$$

Hierbei sind $x_0 \dots x_N$ die aufgenommenen Höhen. Abb. 5.21a zeigt, dass zwar die mittlere Höhe $\langle h \rangle$ gemittelt über mehrere Kugeln von der Ionenkonzentration abhängt, die Krümmung des Potentials $V''/k_B T$ variiert jedoch im wesentlichen mit der mittleren Höhe h jeder einzelnen Kugel. Kugeln die sich auf der gleichen Höhe befinden, jedoch mit einer unterschiedlichen Ionenkonzentration umgeben sind, haben einen annähernd gleichen Wert von V'' . Eine Anpassung einer linearen Funktion an die logarithmierten

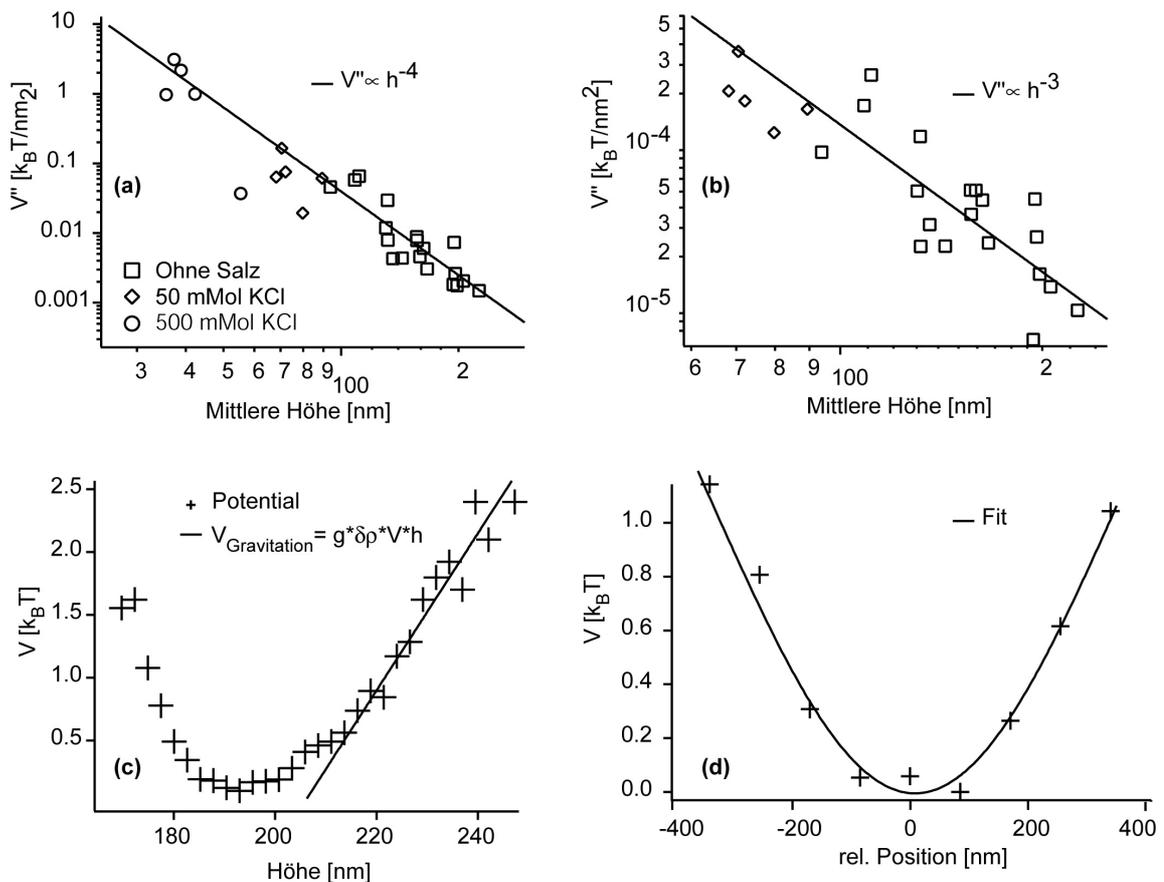


Abb. 5.21: Fluktuierende Kugeln über einer Glasoberfläche. Graph (a) und (b) zeigen die Potentialkrümmung V'' des vertikalen (a) und horizontalen (b) Potentials in dem sich die Kugeln über der Glasoberfläche befinden. Graph c und d zeigen den Potentialverlauf einer Kugel für die vertikale (c) und horizontale (d) Richtung.

Daten ergibt für diese Kugeln ein empirisches Gesetz: $V'' \propto \sigma^{-2} \propto h^{-4}$. Das gleiche Verhalten gilt für das Potential in paralleler Richtung zur Oberfläche (Graph b). Hier lässt ein empirisches Gesetz $V'' \propto \sigma^{-2} \propto h^{-3}$ bestimmen. Im Graph c ist das aus der Boltzmannverteilung (5.30) berechnete Potential für eine 200 nm hohe Kugel für die vertikale Richtung dargestellt. Es ist asymmetrisch und die obere Grenze entspricht exakt dem Gravitationspotential. Das entsprechende Potential in lateraler Richtung (Graph d) ist symmetrisch. Abb. 5.22 zeigt die effektiven Viskositäten, verglichen mit den theoretisch zu erwartenden Verlauf. Für die vertikale Bewegung (Graph (a)) von Kugeln die in Höhen größer als 150 nm fluktuieren, passen die Absolutwerte sehr gut zur Theorie. Für die Bewegung in horizontaler Richtung (Graph (b)) passen die Absolutwerte ebenfalls gut zur Theorie, der Anstieg der Viskosität mit der Abnahme der Höhe ist jedoch etwas steiler.

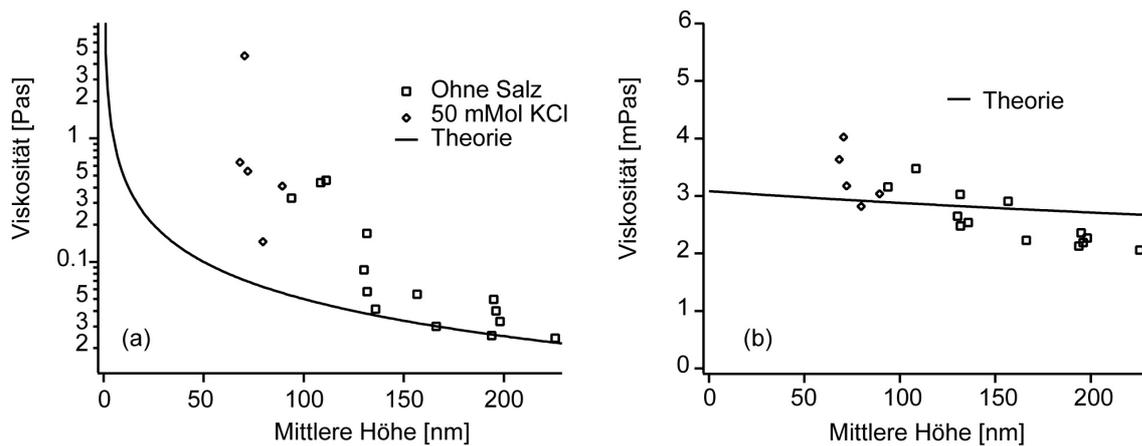


Abb. 5.22: Scheinbare Viskosität verglichen mit der Theorie. Graph (a) zeigt die Auswertung für die vertikale und Graph (b) für die horizontale Kugelbewegung.

In Abb. 5.23 wurden die aus der vertikalen Fluktuation berechneten Diffusionskonstanten in Höhen (hydrodynamische Höhe h_{hyd}) nach Gl. (5.23) und (5.24) umgerechnet und über die aus der optischen RIKM-Messung gewonnen Höhen (optische Höhe h_{opt}) aufgetragen. Man kann erkennen, dass für die Kugeln unterhalb von 100 nm ein Beziehung gilt $h_{\text{opt}} = h_{\text{hyd}} + 60$ nm, während sich die Höhen für oberhalb von 100 nm langsam an die erwarteten Werte annähern.

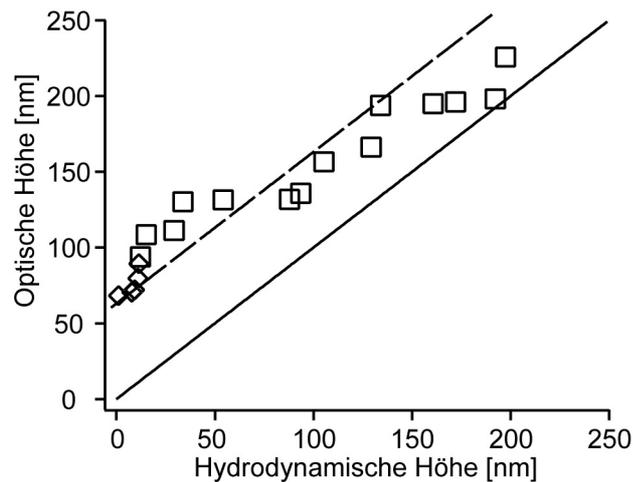


Abb. 5.23: Vergleich der hydrodynamisch aus der effektiven Viskosität nach Brenner und der optisch aus den RICM-Daten erhaltenen Höhen. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf $h_{\text{opt}} = h_{\text{hyd}} + 60 \text{ nm}$.

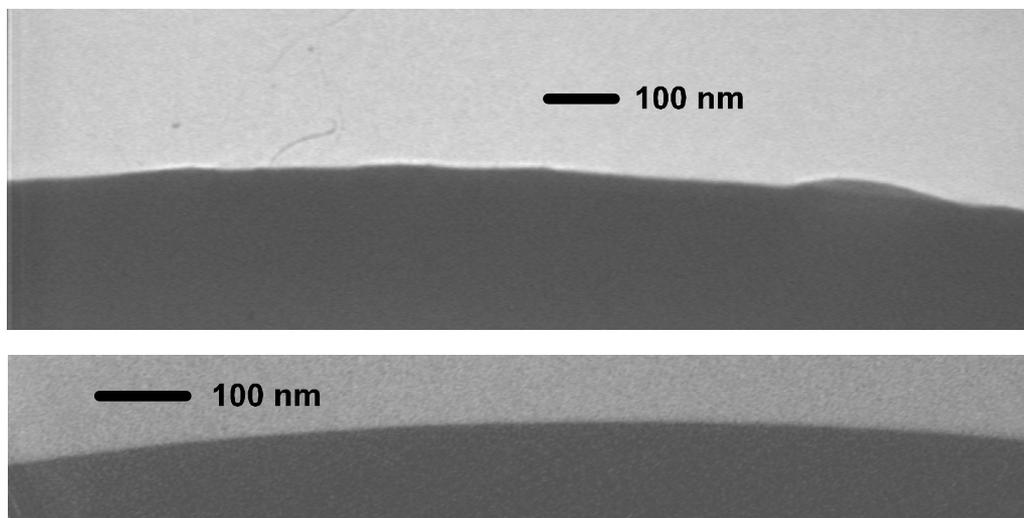


Abb. 5.24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberflächen von zwei Polystyrolkugeln in Luft. Die Auflösung beträgt 2 nm / Pixel. Die Oberflächen sind sehr glatt und weisen teilweise nur geringe Abweichungen auf.

5.1.1.4 Zusammenfassung

Es konnte anhand von fallenden Polystyrolkugeln die modifizierte Stockessche Gleichung nach Brenner bestätigt werden, die die Kraft auf eine Kugel in der Nähe einer Oberfläche beschreibt. Dabei wurden die Auftriebskraft der Lösung sowie die Größen der Kugeln variiert. Versuche dieser Art wurden bisher nur für mikroskopische Kugeln bis Höhen von einem Mikrometer in Diffusions- nicht aber in Fallexperimenten durchgeführt. Obwohl die Debye-Abschirmlänge unter einen Nanometer betrug, konnte oberhalb einer positiv geladenen Oberfläche eine Beschleunigung von negativ geladenen Kugeln ab einer Höhe von 600 nm beobachtet werden. Dieser Effekt könnte an einer Reorganisation der Verteilung der Gegenionen durch den hydrodynamischen

Fluss liegen oder auf das Auftreten von unbekanntem hydrodynamischen Kräften zurückzuführen sein.

Oberhalb eines reinen Glassubstrates fluktuieren die verwendeten Polystyrolkugeln in einer Höhe zwischen 40 und 200 nm, abhängig von der Ionenkonzentration der umgebenden Lösung. Dabei ist die Fluktuationsamplitude der Kugeln nicht von der Ionenkonzentration, sondern von der Höhe der Kugel über dem Substrat abhängig. Für eine Gleichgewichtshöhe zwischen elektrostatischer Abstoßung und Gravitation würde man bei Lösungen mit 5mM Hepes-Puffer Höhen bis 55 nm erwarten. Da die Kraft bei steigender Oberflächenladung asymptotisch verläuft, spielt die Variation der Ladung nur eine geringe Rolle. Polystyrolkugeln bestehen aus einem Knäuel von Polymerfäden. Im trockenen Zustand haben sie eine sehr glatte Oberfläche (Abb. 5.24), die nur sehr kleine Abweichungen aufweisen. Man kann jedoch nicht ausschließen, dass äußeren Polymerfäden einen weichen, jedoch optisch nicht sichtbaren Polymerfilm bilden, der die Kugel auf Distanz hält. Mit diesem Bild würde sich die Differenz zwischen optischer und hydrodynamischer Höhe erklären lassen. Auch die Tatsache, dass in paralleler Richtung zur Oberfläche keine Diffusion stattfindet, die man für schwebende Kugel erwarten würde, sondern die Kugeln sich in einem höhenabhängigen Potential befinden, spricht für einen Kontakt mit der Oberfläche. Bei steigender Ionenkonzentration des umgebenden Medium sinkt die Kugel. Dies spricht für ein Zusammenziehen dieses Polymerfilms. Die Idee von herausragenden Polymerfäden wurde bereits bei Rädler et al. (Rädler und Sackmann 1992) aufgebracht. Hier wurden ebenfalls Kugelfluktuationen mit RIKM, jedoch mit wesentlich größeren Polystyrolkugeln ($R > 11 \mu\text{m}$) gemessen. Um auszuschließen, dass bei der Höhenberechnung kein systematischer Fehler vorliegt, wurden Kugeln über eine attraktive Oberfläche gemessen. Hier ergaben die Berechnungen Höhen bis unter 5 nm. Ähnliche Höhen konnten auch mit mechanischen Druck mittels eines Glasplättchen auf die Kugeln erzeugt werden.

5.1.2 Messungen an Hyaluronsäure

5.1.2.1 Einführung

Die in den vorherigen Abschnitten eingeführte Technik zur Bestimmung der absoluten Höhe und Fluktuation von koloidalen Sonden eignet sich hervorragend um die physikalischen Eigenschaften dünner festkörpergestützten Polymerfilme zu untersuchen. Im folgenden werden die Ergebnisse von Untersuchungen an Hyaluronsäurefilmen vorgestellt.

Disaccharideinheiten besteht, denen je eine Carboxylgruppe angelagert ist.

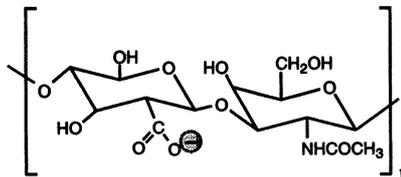


Abb. 5.25: Struktur der Hyaluronsäure

Die Abspaltung der Carboxylgruppen bei neutralen pH-Wert, trägt zu einer hohen Löslichkeit des Polymers in Wasser bei. Aufgrund der sterischen und elektrostatischen Wechselwirkung quillt das Polymer in Wasser stark auf (bis zu 0.1 Vol% Hyaluronsäure pro Einheit Wasser (Hascall)). Hyaluronsäure ist ein multifunktionales Molekül dem eine wichtige Rolle als Baustein von natürlichen Gewebe zukommt. Es ist durch Zellrezeptoren an der Zellmigration beteiligt. (Zimmermann 2002). In neueren Untersuchungen wurde gefunden, dass Segmente der Hyaluronsäure eine wichtige Rolle in der Signalübertragung spielen (Lee 2000). Die Rolle von Hyaluronsäure als häufiges Strukturelement, so z.B. im Glaskörper des Auges oder als „Schmiermittel“ an Verbindungsstellen der Knochen, ist in dem starken Schwellverhalten des Polyelektrolyt und der geringen viskoelastischen Impedanz des Polymers in Lösung begründet. In Abhängigkeit der Anwesenheit von Rezeptoren (z.B. CD44) kann Hyaluronsäure als attraktiver oder repulsiver Abstandshalter auf Zelloberflächen zwischen Zellen wirken. Hyaluronsäure kann Zellen im Bindegewebe auf einen Abstand von einigen hundert Nanometern halten, somit eine Bewegung zwischen den Zellen zulassen und eine rezeptor-gesteuerte Zellanhäufung verhindern. Diese Eigenschaft von Hyaluronsäure ist z.B. wichtig während Stadien der

Embryonenentwicklung, wie der Ausbildung der Skelettmuskulatur und den neuronalen Netzen.

Die folgende Untersuchung gehört zu einer Reihe von in unseren Labor durchgeführten Versuchen, deren Zielsetzung in der Schaffung von Modellsystemen von Zell- und Gewebeoberflächen liegt. In früheren Arbeiten wurden Hyaluronfilme kovalent an Aminogruppen gebunden, die durch Aminosilanisierung auf die Substratoberfläche aufgebracht wurden. Der Nachteil dieses Verfahren ist, dass hierbei die Dichte und Mobilität der Bindungsstellen nicht kontrollierbar ist und die durchschnittliche Filmhöhe bei physiologischen Ionenkonzentrationen (~ 150 mM) sehr klein ($\cong 60$ nm) war ((Albersdörfer 1999b)).

In dieser Arbeit wurde ein System untersucht, dass näher an der biologischen Realität liegt. Es wurde die Hyaluronsäure auf eine festkörpergestützte Membran mittels eines gentechnisch rekombinierten Hyaluronsäure-Bindungsprotein p32 gebunden. Das Protein verfügt über einen Histidin-Schwanz und kann somit spezifisch an Chelatorlipide gekoppelt werden, die in Lipiddoppelschichten eingebunden werden können.

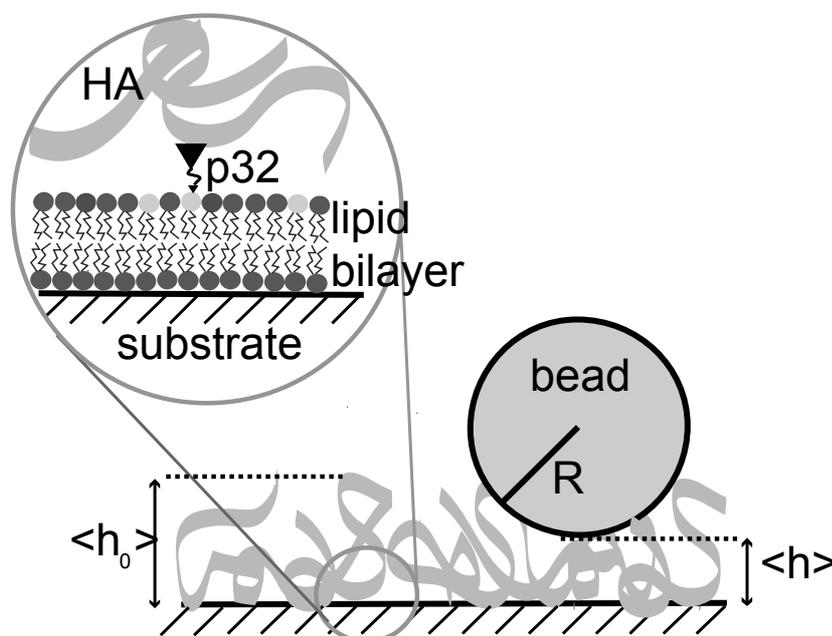


Abb. 5.26: Schematischer Aufbau des Hyaluronsäurefilms. Das Hyaluronsäure-Bindungsprotein p32 wird an Chelatorlipide, die in einer substratgestützten Membran gelöst sind, gebunden. Die Hyaluronsäuremoleküle binden spezifisch an dieses Protein.

Die lokale Filmdicke und die viskoelastischen Moduln an der Oberfläche wurden mit einer bereits früher entwickelten koloidalen Sondentechnik gemessen, die auf der

Analyse der Brownschen Bewegung von auf der Filmoberfläche liegenden koloidalen Sonden basiert. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Zwei-Wellenlängen-RIKM-Technik konnte genutzt werden, um die bei der Messung an diesen Modellsystem auftretenden Kugelhöhen eindeutig zu bestimmen.

5.1.2.2 Material und Methoden

Hyaluronsäure

Natriumsalz der Hyaluronsäure wurde von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet. Das Molekulargewicht des benutzten Polymer ist 1.24 MDa und es besteht aus 3100 Disaccharideinheiten mit einer aufeinanderfolgenden Länge von ungefähr 3 μm . Mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Hyaluronsäure konnte gezeigt werden, dass diese nicht unspezifisch sondern nur mit Hilfe des Hyaluronsäure-bindenden Protein p32 an Lipidmonoschichten binden kann.

Präparation des Hyaluronsäure-bindenden Proteins p32

Das Hyaluronsäure-bindende Protein p32 wurde mit Hilfe von Gentechnik synthetisiert und kann dadurch mit einem Histidinschwanz versehen werden über den das Makromolekül an Chelatorlipide binden kann. p32 ist ein Trimer und hat drei Hyaluronsäure-Bindungsstellen. Daher konnte p32 sowohl als Vernetzer, als auch als Anker zur Andockung an das Substrat verwendet werden. Eine ausführliche Beschreibung des Präparationsverfahren von p32 ist im Anhang von (Sengupta 2002) angegeben. Um sicherzustellen das p32 spezifisch an den Chelatorlipiden und an der Hyaluronsäure bindet wurden von Dr. Khuya Sengupta umfangreiche Funktionstest vorgenommen. Die positiven Ergebnisse sind bei Sengupta (s.o.) dargestellt.

Präparation

Auf einen sorgfältig gereinigten Glasobjektträger wurde mit Langmuir-Schäfer-Technik eine Lipiddoppelschicht aufgetragen. Die erste (untere) Monoschicht besteht aus reinem DMPC (Dimyristoleoyl-Phosphatidylcholin). Alle Lipide wurden von Avanti Polar Lipids Inc., AL. bezogen. Die zweite Monoschicht besteht aus einer Mischung aus DMPC und Lipiden mit einer Nickel-Chelatorlipid-Hauptgruppe: Ni-NTA-DOGS (Nitriloacetic acid Dioleoyl-sn-Glycero-3- [N-(5-Amino-1-Carboxypentyl) Iminodiacetic Acid)Succinyl]). Beide Monoschichten wurden bei einem Oberflächendruck von 25 bis 30 mN/m und einer Temperatur von 25 °C auf die Oberfläche transferiert.

Der mit der Lipiddoppelschicht beschichtete Objektträger wurde in eine Pufferlösung (HEPES bei pH=7.2) eingetaucht und als Boden einer 1 ml Kammer eingesetzt. 10 μg des Rezeptorproteins p32 wurden hinzugefügt. Nach ungefähr dreißig Minuten wurde der Puffer ausgetauscht, um ungebundene p32 zu entfernen. Anschließend wurden 10 μl einer 0.1 mg/ml Lösung der Hyaluronsäure hinzugefügt. Nach 30 Minuten, wurde der Puffer ausgetauscht, um überschüssige Hyaluronsäure zu entfernen.

Der Effekt von überschüssigen Salz (KCl) oder Vernetzern auf den wurde gemessen, indem zuerst die Ausgangshöhen der Filme bestimmt wurden, bevor Salz oder Vernetzer hinzugefügt wurden. Somit wurde für jede Probe die Höhe und die viskoelastischen Eigenschaften vor und nach dem Hinzufügen des Salzes oder der Vernetzer gemessen.

Präparation der Kugeln

Für die Experimente wurden Polystyrolkugeln von Polysciences, Inc. (Warrington, USA) mit einem Durchmessers von 10 μm verwendet. Vor dem Experiment wurden die Kugeln bei Raumtemperatur für ungefähr 20 Minuten in einer Lösung mit 3 Gewichtsprozent Tierserumalbumins (BSA, Sigma) inkubiert. Anschließend wurden sie gewaschen, um das nicht adsorbierte BSA zu entfernen. Die Kugeln sind somit mit einem stark absorbierten Film von BSA bedeckt. Dieser Schritt ist notwendig, da sie sonst, wie in Kontrollexperimenten beobachtet wurde, unspezifisch an der Hyaluronsäure wegen der hydrophoben Anziehung haften.

5.1.2.3 Messergebnisse

System	1 % NTA			20 % NTA		
	$\langle h \rangle$	σ	$\langle \Delta h \rangle$	$\langle h \rangle$	σ	$\langle \Delta h \rangle$
kein Salz, kein p32	231	40	24	225	45	30
200mM KCl, kein p32	97	15	5	142	32	20
kein Salz, 10 $\mu\text{l/ml}$ p32	274	40	32	229	62	30

Tab. 5.1: Ergebnisse der Höhenmessung. Alle Werte sind in nm angegeben

Es wurde die Dicke des Hyaluronsäure-Films bei unterschiedlicher Ionenkonzentration des Puffers und als Funktion der Anzahl der Chelatorlipide gemessen. Dabei wurden in der oberen Lipidschicht 1 bzw. 20 % Chelatorlipide mit DMPC gemischt. Die Daten sind in Tab. 5.1 zusammengefasst. Angegeben ist $\langle h \rangle$ die durchschnittliche Filmhöhe, σ die Standardabweichung der Höhe h an unterschiedlichen Orten und $\langle \Delta h \rangle$ der Durchschnitt der Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung der Kugelfluktuationen gemittelt über unterschiedliche Orte. Die Daten in der ersten Zeile wurden an frisch präparierten Filmen aufgenommen. Dabei wurde über 2 Filme und jeweils 10 Kugeln gemittelt. Der Puffer der mit „kein Salz“ bezeichnet wird, enthält eine 5mM HEPES Lösung (pH = 7.2). Im Falle der Konzentration von 20% der Chelatorlipide konnte an über 15 Proben gezeigt, dass diese Ergebnisse reproduzierbar sind. Zeile 2 zeigt die Veränderung bei einer Zugabe von 200 mM KCl. Bei den in Zeile 3 gezeigten Daten wurden Vernetzer hinzugefügt. Für die Ergebnisse wurden Kugelfluktuationen an 16 unterschiedlichen Positionen ermittelt. Die Reproduzierbarkeit der Daten wurde an 5 unterschiedlichen Proben gezeigt.

Die gemessene Dicke eines Hyaluronsäurefilms beträgt 225 nm. Die Dicke variiert in einer Probe um 25%. Die durchschnittliche Höhe variiert von Probe zu Probe um 15%. In Übereinstimmung mit früheren Studien mit kovalent gebundenen Hyaluronsäure-Filmen (Albersdörfer und Sackmann 1999b) sinkt die Dicke des Films bei der Erhöhung der Ionenkonzentration um einen Faktor zwei. Die ioneninduzierte Kondensation des Netzwerkes ist verbunden mit einem Abfall der Fluktuationsamplitude.

Tab. 5.1 zeigt, dass die Dicke nicht signifikant von der Dichte der Chelatorlipide abhängt. Dies kann dadurch erklärt werden, dass der Floryradius der verwendeten Hyaluronsäure-Moleküle ($R_F \approx 120$ nm) größer ist als der Abstand der Chelatorlipide, der bei einer Konzentration von 1% 6nm beträgt. Die durchschnittliche Filmdicke stimmt mit dem zweifachen Floryradius der Hyaluronsäure in Lösung überein: $R_F \approx aN^{3/5}$, wobei a die Länge und N die Anzahl der Disachharide ist. Für $a \approx 1$ nm und $N=3000$ ergibt sich für $R_F \approx 120$ nm. Dies lässt darauf schließen, dass die Dicke des auf der Oberfläche aufgetragenen Filmes konsistent ist mit einer Monoschicht von aufgequollenen Hyaluronsäure-Polymeren, welche spezifisch an der Oberfläche gekoppelt sind.

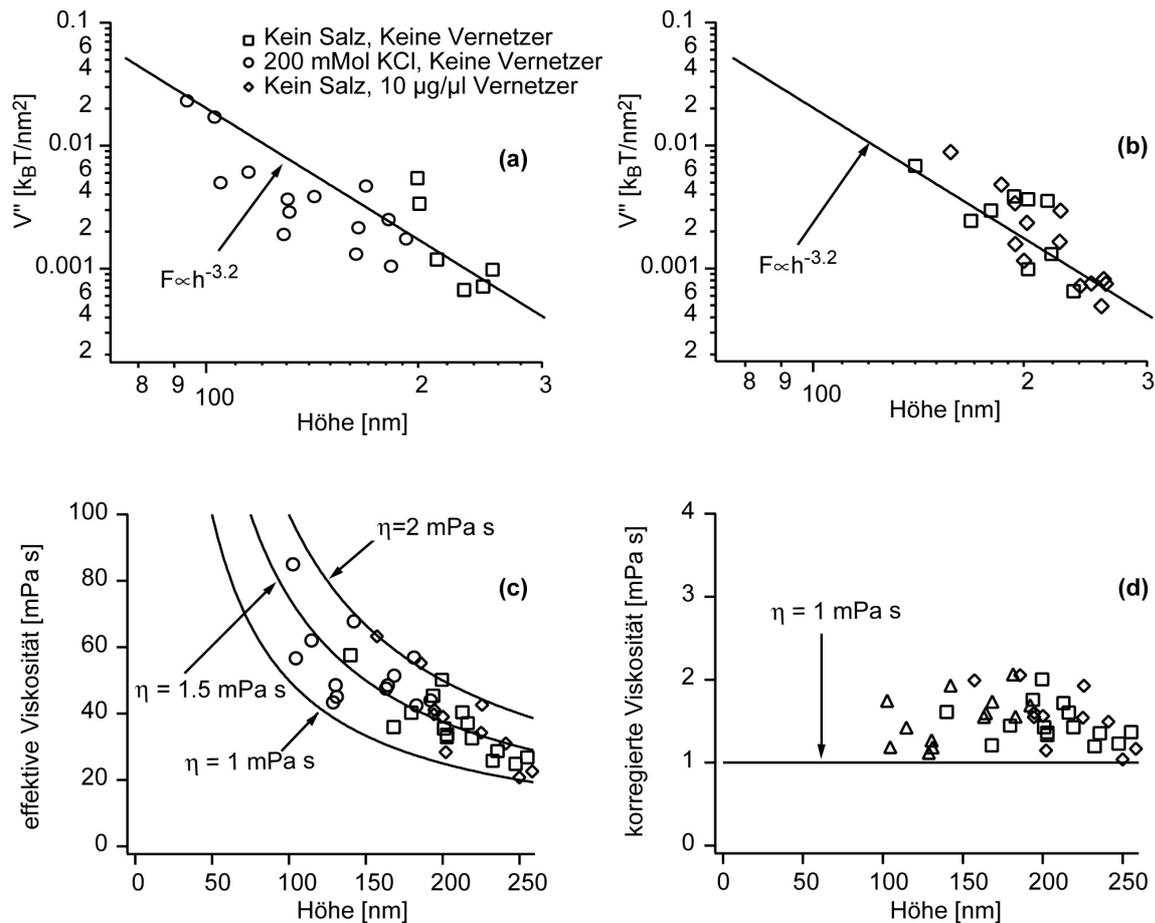


Abb. 5.27: Graph (a) und (b) zeigen die zweite Ableitung des Wechselwirkungspotentials V'' der Kugel mit der Oberfläche. Jeder Datenpunkt stellt eine gemessene Kugel dar. Graph a zeigt den Zustand des Hyaluronsäurefilms vor (\square) und nach (\circ) dem Hinzufügen von 200 mM KCl. Graph b zeigt den Hyaluronsäurefilm vor (\square) und nach (\diamond) dem Hinzufügen von p32 als Vernetzer. In Graph (c) sind die aus der Autokorrelationsfunktion gewonnenen Viskositäten dargestellt. Die durchgezogenen Linien zeigen den Anstieg der scheinbaren Viskosität, die durch die Nähe der Wand verursacht wird. Bei gleichbleibender Viskosität verhalten sich die scheinbaren Viskositäten den Linien entsprechend. Graph (d) zeigt die nach Brenner korrigierten Viskositäten.

Um zu testen ob p32 auch als Vernetzer verwendet werden kann, wurde der Effekt von p32 gemessen, das nach dem Binden der Hyaluronsäure hinzugefügt wurde. Aus Zeile 3 der Tab. 5.1 folgt ein kleine, jedoch reproduzierbare Erhöhung des Films. Intuitiv würde man eine Erniedrigung erwarten, wenn das Protein als Vernetzer den Film zusammenzieht. Der Effekt kann aber erklärt werden, wenn man annimmt, dass der Film durch das Protein aufgequollen wird, da das Protein eine höhere Löslichkeit im Polymerlayer als im Wasser hat.

5.1.2.4 Analyse der viskoelastischen Parameter

Abb. 5.27 zeigt die zweite Ableitung V'' des Potentials im Minimum in Abhängigkeit der mittleren Kugelhöhe $\langle h \rangle$ über der Substratoberfläche. Dabei sind Daten aus den beschriebenen Experimenten unter verschiedenen Ionenkonzentration, mit und ohne

Vernetzer aufgetragen. Die Daten zeigen bei steigender Höhe einen monotonen Abfall von V'' , das mit den elastischen Eigenschaften des Polymerfilm verbunden ist. Das Verhalten kann durch ein empirisches Gesetz $V'' = d^{\alpha \pm \delta\alpha}$ mit $\alpha = -3.2$ und $\delta\alpha = 0.3$ beschrieben werden. Der effektive Reibungskoeffizient und somit die effektive Viskosität an der Oberfläche kann aus der Korrelationsfunktion Gl. (5.27) bestimmt werden. Die Werte sind ebenfalls in Abb. 5.27 dargestellt. Unabhängig von der Zugabe von KCl und p32 als Crosslinker, jedoch auch unabhängig von der Höhe wurde eine nach Brenner korrigierte Viskosität η von 1.5(2) mPas gefunden.

5.1.2.4.1 Hertzmodell

Aus den elastischen Eigenschaften der Oberfläche lässt sich der Young Modulus E des Films berechnen. Im folgenden wird hierzu das Hertzmodell vorgestellt. Aufgrund der Schwerkraft sinkt die Kugel im Hyaluronsäure-Film ein. Die gemessene Filmhöhe ist somit kleiner als die tatsächliche Höhe des unverzerrten Filmes. Da die Dichtendifferenz zwischen Kugel und Wasser gering ist, wird gegenüber der Filmdicke nur ein kleines Einsinken erwartet. Dies ist eine Voraussetzung, um das Hertzmodell anzuwenden. Mit diesem ist es möglich, in erster Näherung, den Young-Modulus mit aus der Kraftkonstante V'' zu bestimmen.

Unter der Annahme der Inkompressibilität des Hyaluronsäure-Films (Poisson Verhältnis = 1/2) kann die Deformationsenergie mit Hilfe des Hertzmodell angegeben werden (Landau 1986):

$$U_{ela}^{Hertz} = \frac{32}{45} \frac{E}{R^{1/2}} (\delta h)^{5/2} \quad (5.32)$$

Hierbei ist E der Young-Modulus. Im Langevin-Model wird das Poteintial harmonisch genähert:

$$U_{ela}^{Langevin} = \frac{1}{2} V'' (\delta h)^2 \quad (5.33)$$

Nach dem Gleichsetzen der beiden Energien erhält man:

$$E = \frac{45}{64} \frac{V''}{R^{1/2}} (\delta h)^{-1/2} \quad (5.34)$$

δh erhält man von Gl. 9.14 aus (Landau und Lifschitz 1986):

$$\delta h = \left(\frac{9}{16} \right)^{2/3} E^{-2/3} R^{-1/3} F_g^{2/3} \quad (5.35)$$

wobei F_g die Gravitationskraft ist. Somit ergibt sich für den Young Modulus:

$$E \approx 0.79 R^{-1/2} F_g^{-1/2} (V'')^{3/2} \quad (5.36)$$

Aus Gl. (5.36) und Gl. (5.35) können nun bei bekannten V'' E bzw. δh berechnet werden.

Der Dichteunterschied zwischen der Lösung und der Polystyrolkugel beträgt $\delta\rho \approx 0.05 \text{ kg/m}^3$ und damit ist $F_g = 0.4 \text{ pN}$. Für den Fall $h_0 = 250 \text{ nm}$ ist $V'' = 10^{-3} \text{ k}_B\text{T/nm}^2$ erhält man $E = 4 \pm 1 \text{ Pa}$ und $\delta h = 100 \text{ nm}$. Für den Fall $h_0 = 100 \text{ nm}$ bei 200 mM KCl erhält man für $E = 100\text{-}300 \text{ Pa}$ und $\delta h = 5 - 10 \text{ nm}$. Der experimentell ermittelte Wert von $E = 200 \text{ Pa}$ stimmt gut überein mit Messungen des Youngmodulus von dicken leicht vernetzten Hyaluronsäure-Layern von $E = 3 - 300 \text{ Pa}$ in Abhängigkeit des Grades der Vernetzung.

5.1.2.4.2 HJKR-Modell

Das Hertzmodell vernachlässigt die spezifischen Kräfte zwischen Kugel und Substrat. Diese werden im HJKR-Modell (Johnson 1971) berücksichtigt. Hier erhält man für das totale Wechselwirkungspotential:

$$V(h) = \frac{32}{45} ER^3 \left(\frac{\delta h}{R} \right)^{5/2} - \pi W_{Ad} R(\delta h) + \frac{4\pi}{3} (\delta\rho) g R^3 \langle h \rangle + C \quad (5.37)$$

Der zweite Term beschreibt die Adhäsionsenergie und der dritte Term die Schwerkraft, wobei $\Delta\rho$ die Dichtedifferenz zwischen Kugel und Oberfläche ist. Wie in Abb. 5.28 gezeigt, kann Gl.(5.37) nun durch Anpassung der Parameter E und W_{Ad} an die experimentellen Daten unter Verwendung der Boltzmannverteilung angepasst werden. Für den Fall für $\langle h \rangle = 250 \text{ nm}$ findet man $E \approx 10 \text{ Pa}$, $\delta h \approx 50 \text{ nm}$, und $W_{Ad} \approx 10^{-8} \text{ J/m}^2$.

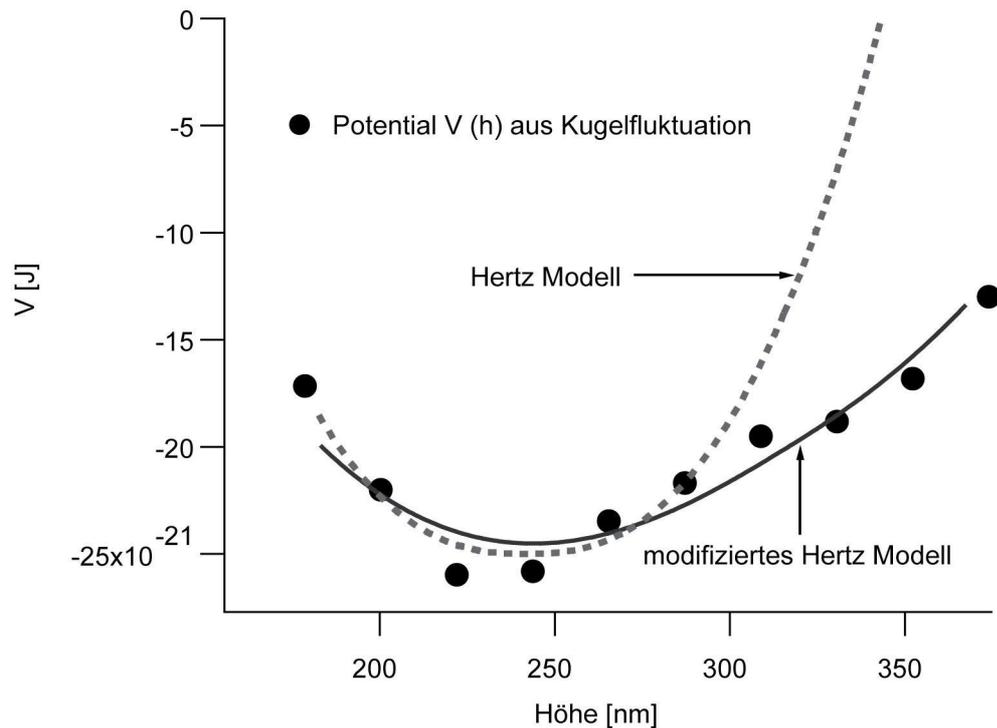


Abb. 5.28: Anpassung des gemessenen Potentials an das HJKR-Modell

5.1.2.5 Diskussion

Es wurde eine Methode entwickelt, um biokompatible weiche Polymerkissen in einer Dicke um 100 nm auf Festkörpern zu erzeugen. Die Verbindungsstellen können mobil gemacht werden, indem sie an Membranen gekoppelt werden. Daher kann das entwickelte System als Modellsystem für Zelloberflächen betrachtet werden. Eine Hauptmotivation dieser Untersuchung war es, eine biokompatible Oberfläche für die störungsfreie Immobilisierung von Zellen zu schaffen, um die physikalischen Grundlagen der Zelladhäsion zu untersuchen.

Durch die Kombination von Zwei-Wellenlängen-RIKM und koloidaler Partikel Bewegungsanalyse, ist es möglich, die viskoelastischen Eigenschaften von Polymerfilmen in Abhängigkeit der Filmdicke zu bestimmen.

Diese Messungen sind essentiell für die zukünftige Messungen an gestützten Hyaluronsäure-Filmen für quantitative Studien für Zellbewegung und Zelladhäsion, da beide Prozesse stark von der Elastizität des Substrates abhängen. Die Korrelation zwischen Zellbewegung und Elastizität des Substrates wurde in unterschiedlichen Studien bewiesen (Balaban 2001; Munerar 2001; Zimmermann, Geiger und Addadi 2002). In diesen Fällen bestanden die Substrate aus Filmen von einigen 100 Mikrometern Dicke, die eine Elastizität von einigen 100 Pascals aufwiesen. Mit

Hyaluronsäure wäre es möglich, die Messungen auf wesentlich weicheren und dünneren Substraten durchzuführen, mit der Situationen z.B. während der Embryoentwicklung simuliert werden können.

Die Mikrointerferometrische Technik die hier benutzt wurde, ist limitiert auf weiche Filme, da die räumliche Auflösung der relativen Höhenmessung ungefähr 1 nm beträgt. Höhere Auflösungen können mit der Raster-Kraft-Mikroskopie (AFM) erreicht werden, wobei die AFM-Spitze mit einem koloidalen Partikel verbunden wird. Diese Methode ist jedoch auf die Messung von Federkonstanten limitiert, die in der Ordnung von einigen Newton pro Meter sind. Die beiden Methoden ergänzen sich somit.

Unsere Anstrengungen die Elastizität des Hyaluronsäure-Layers durch die Vernetzerkonzentration zu steuern waren bisher nicht erfolgreich, was damit zusammenhängen kann, dass p32 nur an die Kettenenden der Hyaluronsäure-Moleküle binden kann.

5.1.3 Vergleich Kugel über Hyaluronsäure und Kugel über Glas

Bei der Berechnung des Youngmodulus im vorherigen Abschnitt wird davon ausgegangen, dass die Kugel, die auf der Hyaluronsäureschicht aufliegt, sich in einem Potential befindet, dass von der Elastizität dieser Schicht und der Wechselwirkung zwischen Kugel und Schicht abhängt. Die Wechselwirkung der Kugel mit der unter der Schicht liegenden Substratoberfläche wird vernachlässigt. Hierzu wurden folgende Annahmen gemacht.

- a) Die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Substrat und Kugel ist durch die Ionenstärke des Mediums und der Hyaluronsäureschicht abgeschirmt.
- b) Die Van-der-Waals-Kraft ist in der auftretenden Höhen zu vernachlässigen.
- c) Die hydrodynamische Kopplung mit der Wand ändert die scheinbare Viskosität, jedoch nicht die Häufigkeitsverteilung $P(h)$ und somit die Potentialstärke V'' . Dies wird nach dem Fluktuations-Dissipationstheorem erwartet. Man kann direkt aus Gl. (5.27) ersehen, dass die mittlere quadratische Auslenkung $\langle \Delta h^2 \rangle$ und somit V'' unabhängig von dem Reibungskoeffizienten γ ist.

In Abschnitt 5.1.1.3 und 5.1.2.3 wurden jedoch Ergebnisse vorgestellt, bei denen ein Skalenverhalten von V'' mit der Höhe erkennbar ist. In Abb. 5.29 sind Werte von V''

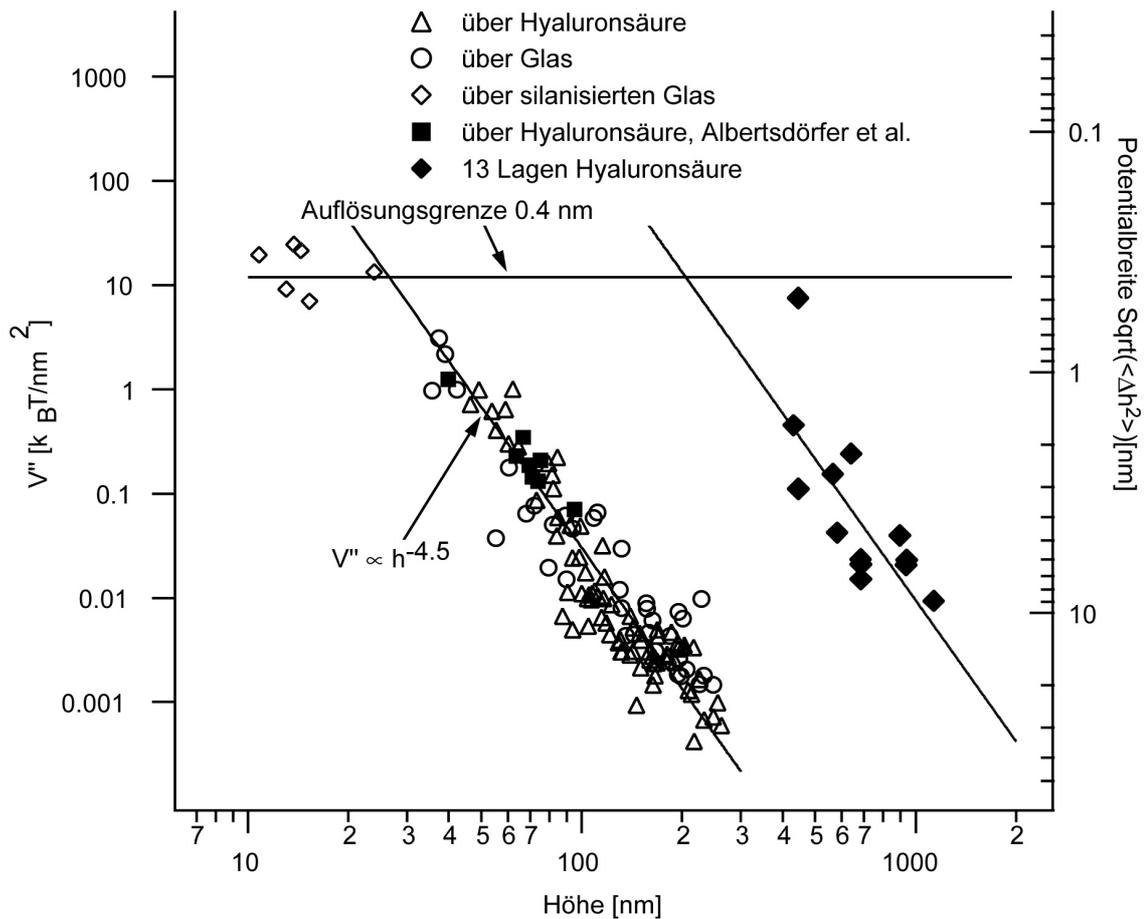


Abb. 5.29: V'' in Abhängigkeit der Höhe über Glas und über Hyaluronsäure

aus unterschiedlichen Messungen gegen die Höhe aufgetragen. Hierbei wurden auch Messungen aus früheren Arbeiten berücksichtigt (Albersdörfer 1999a). Hier kann die Kraftkonstante V'' und somit die Fluktuationsamplituden von Kugeln die über Glas bzw. über Hyaluronsäure auf der gleichen Höhe fluktuieren direkt miteinander verglichen werden. Die gleichen Höhen kommen zustande, wenn man Kugeln über Glas bei geringer Ionenkonzentration mit Kugeln über einer Hyaluronsäure-Schicht bei hoher Ionenkonzentration vergleicht. Vergleicht man die Kugelhöhen bei gleich hohen Ionenkonzentrationen, so findet man insbesondere bei hohen Ionenkonzentrationen sehr unterschiedliche Höhen. Kugeln über Glas sinken z.B. bei 200 mM KCl auf 50 nm ab, während Kugeln über Hyaluronsäure eine Höhe von ca. 100 nm behalten. Dies zeigt das die Kugeln tatsächlich wie angenommen auf der Hyaluronsäure-Schicht aufliegen. Dennoch findet man gleiche Fluktuationsamplituden bei gleichen Höhen. In den vorgestellten Einzelmessungen wurde ein empirisches Gesetz $V'' = d^{\alpha \pm \delta \alpha}$ gefunden mit $\alpha = -3.2$ bei Hyaluronsäure und $\alpha = -4$ über Glas. Bei der Zusammenfassung umfangreicher unterschiedlicher Messungen wurde $\alpha = h^{-4.5}$ gefunden. Für Messungen an einer wesentlich dickeren 13-lagigen Hyaluronsäureschicht, deren Dicke in der

Größenordnung zwischen 500 und 1000 nm erwartet wird, konnte ebenfalls $\alpha = h^{-4.5}$ bestätigt werden. Der Verlauf des Graphen ist in der Höhe verschoben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Berechnung des Youngmodulus aus V'' bzw. $P(h)$ auf jeden Fall den Abstand zur Wand mit berücksichtigen muss. Dies ist ein Ergebnis, dass von den bisher angewendeten Theorien nicht erwartet wird.

5.2 Vesikel

5.2.1 Einführung

Lipidmembranen, im folgenden Membranen genannt, spielen als Modellsystem zur Untersuchung der statistischen Mechanik von wechselwirkenden Oberflächen in der weichen Festkörperphysik eine bedeutende Rolle. Die komplexe Wechselwirkung zwischen Enthalpie und Entropie, das heißt zwischen Form und Fluktuation, die die Wechselwirkung zwischen Membranen in wässriger Lösung bestimmt, wurde in den Achtzigern erfolgreich aufgeklärt (Komura 2000). Interesse an biologischen Materialien, wie der lipidreichen Zelloberfläche, ist eine wichtige Motivation für das Studium an Lipidschichten als Modellsystem der Zelloberflächen.

Die reine Wechselwirkungsenergie zwischen zwei Lipiddoppelschichten (Membranen) pro Einheitsfläche, bezeichnet als $V(h)$ ist aufgrund der Hydrationskraft zwischen den polaren (bzw. geladenen) Kopfgruppen der Oberflächenmolekülen für Entfernungen in nm-Bereich repulsiv, während bei größeren Entfernungen die Van-der-Waals-Kraft mit der elektrostatischen Abstoßung konkurriert. In den biologisch relevanten Bereich der Salzkonzentration, hat das Potential $V(h)$ ein einzelnes Van-der-Waals-Minimum mit einer Tiefe $W = 10^{-4}$ bis 10^{-5} J/m² bei einem Gleichgewichtsabstand von $\langle h \rangle = 2-3$ nm.

Thermische Fluktuationen von Doppelschichten, als Undulationen bekannt, renormalisieren $V(h)$ wenn W reduziert wird. Die klassische Theorie von Lipowsky und Leibler (Lipowsky 1986) sagt einen kontinuierlichen Entbindungsübergang am kritischen Punkt W_c (10^{-5} - 10^{-6} J/m² für Lipiddoppelschichten) voraus. Dieser ist charakterisiert durch den Anstieg des mittleren Abstandes $\langle h \rangle$. Wenn zwei Doppelschichten, die sich in der ungebundenen Phase ($W < W_c$) befinden, mit einer äußeren Kraft auf einen festen Abstand $\langle h \rangle$ gehalten werden, finden Kollisionen zwischen den Membranen mit einem typischen lateralen Abstand von der Größe $\xi_{\parallel} \approx \sqrt{\kappa / k_B T} \langle h \rangle$ statt. Hierbei ist κ die „Helfrich bending energy“, die ein Maß für die Biegesteifigkeit von Doppelschichten ist. Mit dem Helfrichpotential $V_{HE}(\langle h \rangle) \propto \frac{\Delta E_c}{\xi_{\parallel}^2}$ kann die vollständige freie Energie pro Einheitsfläche abgeschätzt werden, die durch die Begrenzung auferlegt wird (Helfrich 1978). Hierbei ist ΔE_c die freie Energie pro Kollision. Berechnungen mit der Renormalisierungs-Gruppen-Theorie (David 1990) und Monte Carlo Simulationen (Gompper 1989; Janke 1989; Netz 1995a) ergeben für die Helfrich-Abstoßung:

$$V_{HE} = c_{fl} \frac{(k_B T)^2}{\kappa \langle h \rangle^2} \quad (5.38)$$

Hierbei ist $c_{fl}(W) \equiv \frac{\Delta E_c(W)}{k_B T}$ die dimensionslose Kollisionsenergie. Für $W > W_c$ ist c_{fl} eine universelle Konstante ($c_{fl} \approx 0.116$), unabhängig von der inneren Struktur der Membran und Details des Wandpotentials. Studien mit Kleinwinkelröntgenbeugung (SAXS) (Safinya 1986) mit geschichteten Lipiddoppelschichten haben, jedoch mit einer Diskrepanz im Wert c_{fl} , die Gültigkeit von Gl. (5.38) bestätigt. Die Helfrich Abstoßung ist zu einem zentralen Konzept geworden, um das Phasenverhalten von Membranen zu analysieren.

In neueren Untersuchungen hat sich das Interesse auf geschlossene Lipidmembranen fokussiert, die als Vesikel oder Liposome bekannt sind. Die Vesikel können zusätzliche Komponenten in geringer molarer Konzentration aufnehmen, wie z.B. PEG-Lipide. Dies sind Lipopolymere, die durch sterische Abstoßung, die von der Van-der-Waals-Kraft getriebene Aggregation von Membranen verhindern können. Eine zweite wichtige Zusatzkomponente ist Cholesterol, welches die Stabilität erhöht und als Antieisfriermittel wirkt (Nielsen 2000). Das Lipopolymer und Cholesterol sind hoch löslich in der Lipidmembran. Da die Kollisionsenergie eine universelle Konstante ist und nicht mit Details der Membranzusammensetzung variiert, sollte Gl. (5.38) für Multi-Membran-Systeme ihre Gültigkeit behalten. In einer früheren SAXS-Studie (Castro-Roman 1999) mit gestapelten Lipidmembranen, die PEG-Lipide enthielten wurde eine unerwartete singuläre Abhängigkeit der Helfrich-Abstoßung von der Oberflächenkonzentration von Cholesterol gefunden.

5.2.2 Material und Methoden

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von RIKM die Gültigkeit von Gl. (5.38) für Membranen überprüft, die PEG-Lipide und Cholesterol enthalten. Die neuentwickelte digitale Bildverarbeitung machte diese Experimente möglich, da nun die verwendete digitale Kamera rauschärmer und schneller ist, als die bisher bei früheren Experimenten in unserem Labor verwendeten analogen Kameras. Die Membranfluktuationen konnten nun über wesentlich längere Zeiträume beobachtet werden, da die maximale Aufnahmezeit für diese Experimente praktisch nicht mehr limitiert ist.

Es wurden einschalige Riesenvesikel aus 1,2-Dielaidoyl-sn-Glycerol-3-Phosphocholine (DEPC)⁹ untersucht, die unterschiedliche Mengen an PEG-Lipiden und Cholesterol enthielten. Der Floryradius R_g von PEG Lipiden ist mit 3.2 nm ungefähr vergleichbar mit der Position des Van-der-Waals-Minima von $V(h)$.

Die Vesikel wurden zuerst in einer 170 mM Zuckerlösung in Anwesenheit eines elektrischen Feldes geschwollen. Um die thermische Undulationen der Membran durch den osmotischen Druck eines gespannten Vesikels nicht zu unterdrücken, wurden die Vesikel in eine Lösung mit 100 mM NaCl und 10 mM Hepes mit einem pH von 7.2 und 265 mOsm gebracht, wobei der osmotische Druckunterschied ausreicht, um die Vesikel zu entspannen. Die Vesikel sinken auf Grund der Schwerkraft auf den Boden der Messkammer, wo sich das Substrat befindet. Die Van-der-Waals-Kraft wurde mit einem dünnen nicht adhäsiven Film (Blotting Grade Non-Fat Dry Milk, BioRad, CA) kontrolliert, der zuvor auf dem Substrat aufgetragen wurde. Die Dicke des Filmes wurde so weit variiert, dass sich die Vesikel nicht mehr in der gebundenen Phase befanden. Dies entspricht einem Wert für W von $1.3 \cdot 10^{-6} \text{ J/m}^2$.

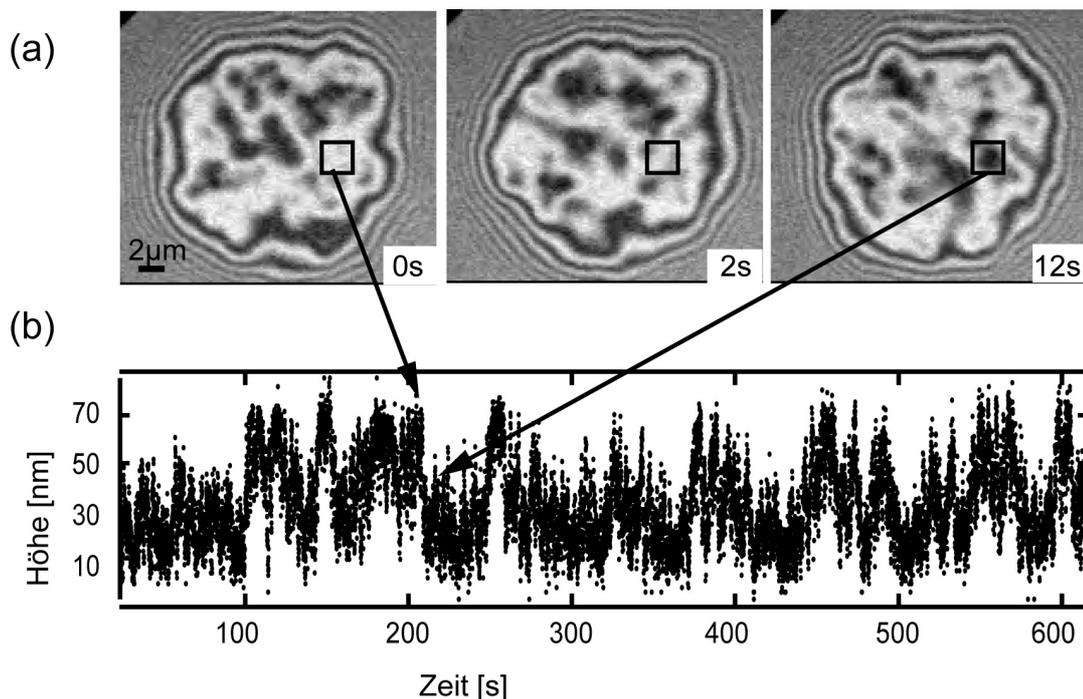


Abb. 5.30: (a) RIKM-Interferogramme eines Riesens DEPC-Vesikels (50mol% DEPC, 50 mol % Cholesterol) zu drei unterschiedlichen Zeiten. Das Muster aus Grauwerten ändert sich mit der Zeit aufgrund der Vesikelfluktuationen über den Substrat (siehe eingerahmte Fläche). (b) Die Höhenfluktuation des Vesikels aufgetragen über die Zeit. Sie wird aus der inversen Kosinustransformation der Grauwerte von den Interferogramm gewonnen. Dabei wird über eine Fläche von $0.008 \mu\text{m}^2$ gemittelt.

⁹ DEPC ist ein Phospholipid mit Ketten aus 18 C-Atomen und einer Doppelbindung in trans-Konfiguration.

Um die Kollisionen zwischen der Membran und dem Substrat zu beobachten, wurde die Höhe der Membran $h(r,t)$ als Funktion der Zeit und des Ortes mit RIKM bestimmt.

5.2.3 Messergebnisse

Abb. 5.30a zeigt 3 RIKM-Bilder eines Riesenvesikels zu unterschiedlichen Zeiten. Die charakteristische Länge des sich ergebenden „Leopardenmusters“ liegt in der Größenordnung von einigen Mikrometern. Die Kästchen verdeutlichen die zeitliche Änderung des Musters. Abb. 5.30b zeigt die zeitliche Änderung der Membranhöhen $h(r,t)$, gemittelt über eine Fläche von $0.12 \mu\text{m}^2$ mit einer Zeitauflösung von 10 ms. In der Membranfluktuation $h(r,t)$ ist erkennbar, dass die Membran zwischen einem niedrigeren und einem hohen Zustand in einer Zeit von einigen Sekunden wechselt. Innerhalb dieser Zustände finden schnellere Fluktuationen statt. Beide Zustände liegen oberhalb von 10 nm und sind somit höher als der gebundene Zustand, der bei 2-3 nm zu erwarten ist. Ein Vergleich der Wahrscheinlichkeitsverteilungen $P(h)$ der gemessenen Höhenfluktuationen an verschiedenen Orten des Vesikels zeigt, dass die Höhenfluktuationen unabhängig vom Ort sind, solange sie genügend weit vom Vesikelrand entfernt gemessen werden, so dass dessen Einfluss unberücksichtigt bleiben kann.

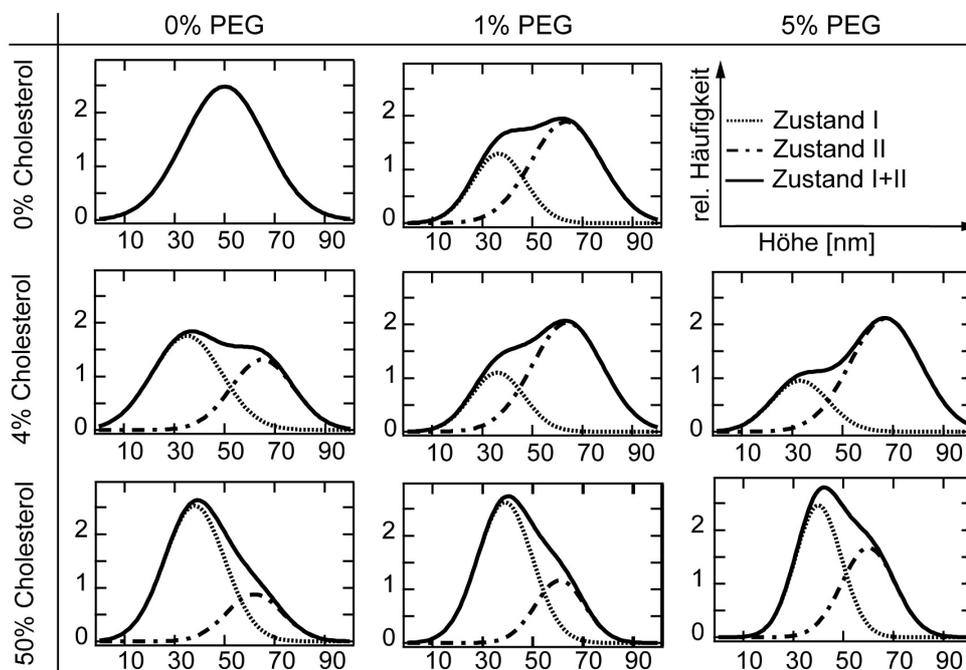


Abb. 5.31: Gefittete Häufigkeitsverteilung $P(h)$ des Membran-Substrat-Abstandes für unterschiedliche Werte von PEG-Lipidkonzentrationen (0 mol %, 1 mol % und 5 mol % PEG) und Cholesterolkonzentrationen (0 mol %, 4 mol % und 50 mol %) für einen Riesenvesikel aus DEPC.

Um die Höhenfluktuationen zu analysieren wurden Vesikel unterschiedlicher Zusammensetzung jeweils 10 Minuten lang mit einer Bildrate von 100 Hz aufgenommen. Hieraus ergeben sich 60.000 Datenpunkte je Ort und Aufnahme. Abb. 5.31 zeigt die resultierenden Häufigkeitsverteilungen $P(h)$ der gemessenen Höhen als Funktion des PEG und Cholesterolgehaltes.

Leibler und Lipowsky (Leibler 1987) fanden bei der theoretischen Analyse von Membranfluktuationen in der ungebundenen Phase um eine gegebene mittlere Höhe (erzeugt durch ein linear einschließendes Potential), dass die Fluktuation $\Phi(r,t) = H(r,t) - \langle h \rangle$ um den mittleren Abstand von einer Gausschen Hamiltonfunktion (5.39) bestimmt ist.

$$H([\phi]) = \frac{1}{2} \kappa \int d^2r \left[(\nabla^2 \Phi)^2 + 4\xi_{\parallel}^{-4} \Phi^2 \right], \quad \xi_{\parallel} = \frac{8}{C_{\parallel}} \sqrt{\frac{2\kappa}{k_B T}} \langle h \rangle \quad (5.39)$$

Hierbei entspricht ξ_{\parallel} einer Korrelationslänge in der Ebene mit $C_{\parallel} \approx 5.83$ als universelle Konstante (Netz 1995a). Die Häufigkeitsverteilung $P(h)$ die aus Gl. (5.39) resultiert, ist eine Gaußkurve, die eine RMS-Breite (Wurzel aus dem quadratischen Mittel) von $w = \langle \Phi^2 \rangle^{1/2}$ hat, die proportional zum mittleren Abstand $\langle h \rangle$ ist, mit C_{\perp} als weitere universelle Konstante:

$$\langle w \rangle = \frac{\langle h \rangle}{C_{\perp}}, \quad C_{\perp} = \sqrt{5} \quad (5.40)$$

Abb. 5.31 (1.Spalte, 1.Reihe) zeigt eine Häufigkeitssverteilung der Höhenfluktuation für eine reine DEPC-Membran, wobei $P(h)$ tatsächlich mit einer Gaußkurve mit einer RMS-Breite von 25(6) nm und mit einem mittleren Abstand von 50(15) nm angepasst werden kann. Nach Gl. (5.39) beträgt die Korrelationslänge in der Ebene für DEPC 540(50) nm für $\kappa = 25 k_B T$. Der theoretische mittlere Abstand kann aus dem Gleichsetzen der Gravitationskraft, die auf das Vesikel wirkt mit der Kraft aus dem Helfrichpotential (5.38) errechnet werden:

$$g\Delta\rho V_V = -A_C \left[\frac{dV_{HE}(h)}{dh} \right]_{h=\langle h \rangle} \quad (5.41)$$

Hierbei ist g die Gravitationskraft, $\Delta\rho$ der Dichteunterschied zwischen Vesikelinneren und umgebenen Medium, V_V das Vesikelvolumen sowie A_C ist die Kontaktfläche des Vesikels mit dem Substrat. Hieraus erhält man für $\langle h \rangle = 65(5)$ nm. Dies ist konsistent

mit den gemessenen Werten $\langle h \rangle = 50(15)\text{nm}$ und Gl. (5.40). Das gemessene Fluktuationenspektrum für eine Einkomponentenmembran passt somit gut zu den theoretischen Vorhersagen.

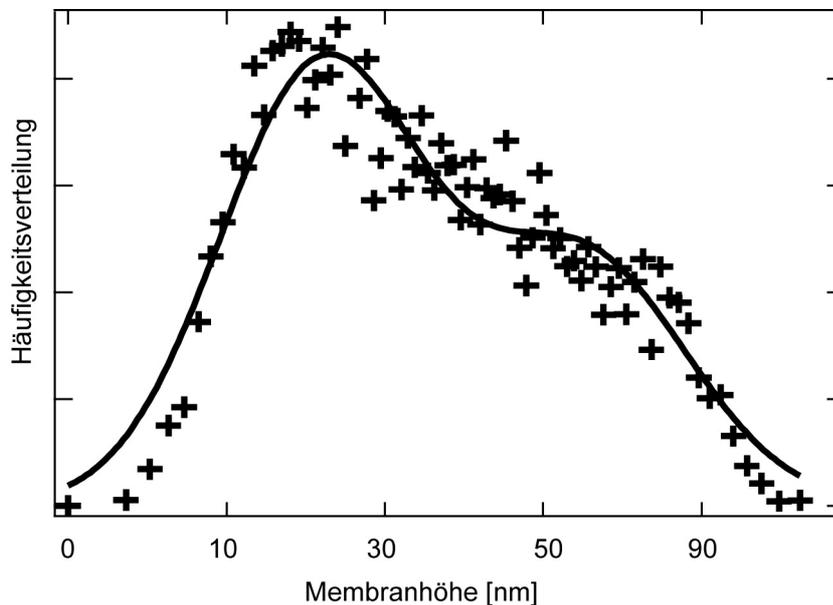


Abb. 5.32: Eine typische Häufigkeitsverteilung $P(h)$ des Substrat-Membranabstandes einer DEPC- Membran mit 50 mol % Cholesterol und 0 mol % PEG. Die Kreuze sind die Datenpunkte und die durchgezogene Linie wurde durch Anpassung der Gl.(5.42) gewonnen.

Abb. 5.32 zeigt $P(h)$ für eine Membran die 50 % Cholesterol enthält. Es ist klar erkennbar, dass die Verteilung nicht mit einer einzelnen Gaußkurve angefitet werden kann. Ebenfalls kann an die Verteilungen der anderen Multikomponentmembranen keine Gaußkurve angepaßt werden.

Die gemessene Verteilung lässt sich jedoch an die Summe zweier Gaußfunktionen anpassen:

$$P(h) = \frac{W_I}{w_I} e^{-\frac{(h-h_I)^2}{2w_I^2}} + \frac{W_{II}}{w_{II}} e^{-\frac{(h-h_{II})^2}{2w_{II}^2}} \quad (5.42)$$

Wobei die Parameter $h_{I,II}$ und $w_{I,II}$ die Höhe bzw. die Breite und W_I und W_{II} das statistische Gewicht von zwei Zuständen beschreiben. Die zwei mit I und II bezeichneten Zustände können mit den schwarzen und weißen Bereichen in Abb. 5.30 identifiziert werden.

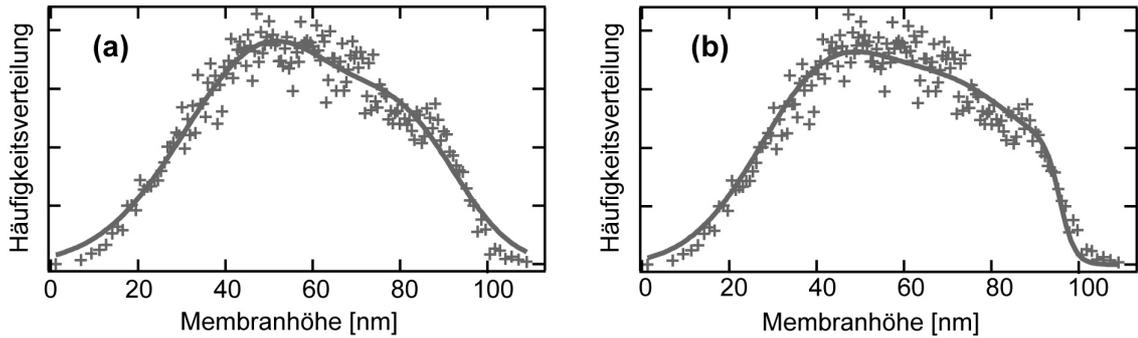


Abb. 5.33: (a) Anpassung der Doppelgaussfunktion aus Gl. (5.42) an die Häufigkeitsverteilung der Höhenfluktuation einer DEPC-Membran. (b) Anpassung an die modifizierte Doppelgaussfunktion aus Gl. (5.43) an die gleiche Häufigkeitsverteilung.

Messungen an Vesikeln, die höher als das Interferenzmaximum der grünen Linie (102 nm) fluktuieren, können im Prinzip nur analysiert werden, wenn sie mit der Zwei-Wellenlängen-Technik durchgeführt wurden. Da das Interferenzmuster der Membran z.B. für Höhen von 94 und 110 nm die gleiche Helligkeit annimmt, sind die Höhen nicht mehr eindeutig rekonstruierbar. Im Histogramm macht sich der Effekt der Fluktuation über 102 nm in einem steilen Abfall am oberen Ende des Histogramms bemerkbar (Abb. 5.33). Wenn nur eine geringe Anzahl an Datenpunkten über diese Grenze liegen, so kann die Häufigkeitsverteilung an eine modifizierte Fitfunktion Gl. (5.43) angepaßt werden.

$$P(h) = \frac{1}{1 + e^{\frac{h-h'}{b}}} \left(\frac{W_I}{w_I} e^{\left(-\frac{(h-h_I)^2}{2w_I^2}\right)} + \frac{W_I}{w_I} e^{\left(-\frac{(2h'-h-h_I)^2}{2w_I^2}\right)} + \frac{W_{II}}{w_{II}} e^{\left(-\frac{(h-h_{II})^2}{2w_{II}^2}\right)} + \frac{W_{II}}{w_{II}} e^{\left(-\frac{(2h'-h-h_{II})^2}{2w_{II}^2}\right)} \right) \quad (5.43)$$

Hierbei wird berücksichtigt, dass aus Gl. (4.2) berechnete Höhen einer Membran $h(r,t)$, die höher als das Interferenzmaximum $h' = \lambda/2n$ liegen, nach Gl. (4.4) als eine Höhe von $2h'-h(r,t)$ abgebildet werden. Dies entspricht einer Spiegelung an der Höhe h' . Der erste und der dritte Summand berücksichtigt die Höhen zwischen 0 und h' , während der zweite und der vierte Summand die zurückgespiegelten Werte von den Höhen zwischen h' und $2h'$ berücksichtigen. Der Vorfaktor entspricht einer Heavysidefunktion, die berücksichtigt, dass alle Werte auf Höhen zwischen 0 und h' abgebildet werden. Dieser fällt jedoch nicht sprunghaft, sondern gedämpft ab, wie dies für den oberen Rand des Histogramms aus Höhenwerten aus RIKM-Messungen, die um h' fluktuieren der Fall ist. b wirkt als eine Abklinglänge, die für die durchgeführten Experimenten zu 1.5 nm

bestimmt wurde. Sie ist abhängig von der durchschnittlichen Membrangeschwindigkeit und statistischen Fehlern wie dem Kamerarauschen.

Obwohl diese Messung in diesem Fall noch mit der Ein-Wellenlängen-RIKM-Technik durchgeführt werden kann, muss auf jeden Fall mit der Zwei-Wellenlängen-Technik überprüft werden, welcher Anteil der Datenpunkte oberhalb von h' liegen. Abb. 5.34 zeigt wie die Phasenbeziehung zwischen den beiden Wellenlängen dazu verwendet wird, um die Höhe der Fluktuation zu bestimmen (siehe auch Abschnitt 4.2.1).

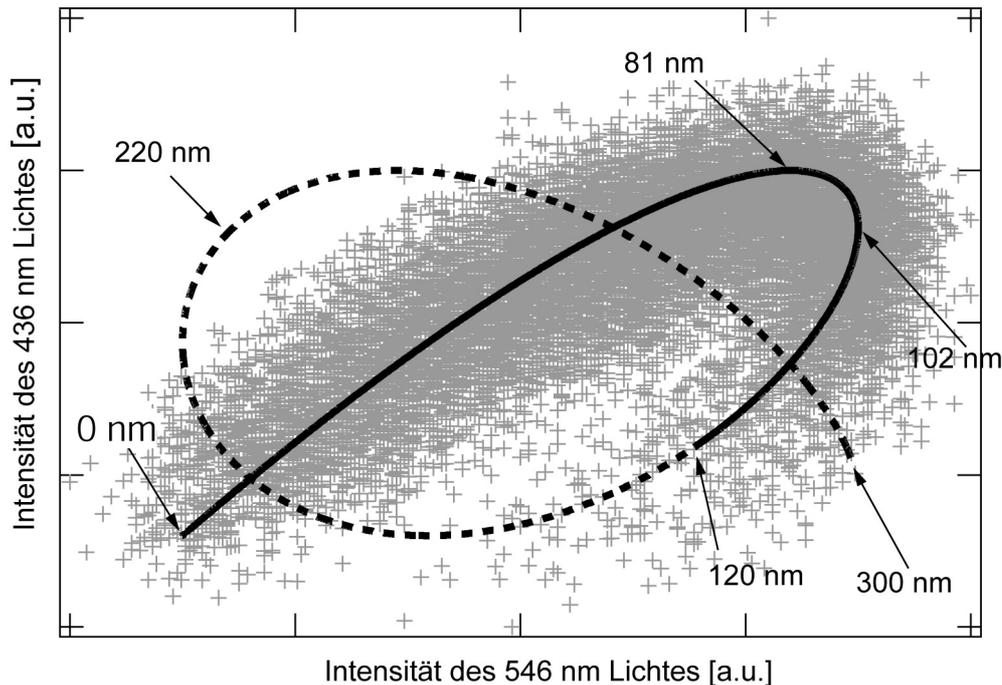


Abb. 5.34: Intensität des blauen Lichtes aufgetragen gegen die Intensität des grünen Lichtes für eine $0.12 \mu\text{m}^2$ große Fläche einer fluktuierende Membran die sich zwischen 0 und 120 nm befindet. Mit Hilfe der Phasenbeziehung zwischen den beiden Wellenlängen ist klar erkennbar, dass sich ein Anteil der Datenpunkte oberhalb vom Interferenzmaximum von 102 nm befindet.

Wie in Abb. 5.31 gezeigt, spreizen die beiden Peakpositionen I und II die mittlere Höhe der einfachen Membran. Während die Höhen und Breiten der Zustände nicht signifikant variieren und vergleichbar bleiben mit der Breite der Einkomponentenmembran variiert jedoch die relative Wichtung W_I, W_{II} der Zustände I und II stark mit der Komposition.

Betrachtet man den Fall für eine konstante Cholesterolkonzentration von 4 mol% (zweite Reihe) und eine Variation des Lipopolymers, so sieht man, dass die relative Wichtung W_I/W_{II} des ersten Peaks auf 0.24 des Anfangswertes reduziert wird bei einer Anreicherung um 5 mol% des Lipopolymers. Dies lässt vermuten, dass es ausgeprägte lipopolymerarme (I) und lipopolymerreiche (II) Zustände gibt, so dass die Erhöhung des Lipopolymeranteils die Wichtung zwischen Zustand I und II nach Zustand II verschiebt.

Für eine feste PEG-Lipidkonzentration und variierten Cholesterolkonzentration (Spalten in Abb. 5.31), lässt sich ein ähnliches Szenario beobachten, hier jedoch reduziert sich der Quotient W_I/W_{II} mit ansteigendem Cholesterolgehalt, so dass hier der Zustand I mit Cholesterol angereichert ist.

Der unterschiedliche Effekt der zwei Additive ist erklärbar, da das Lipopolymer als „Repeller“ wirkt, das einen Zustand mit größerem Abstand bevorzugt, während Cholesterol die Steifigkeit erhöht. Da der cholesterolangereicherte, also steifere Bereich für die thermischen Fluktuationen eine erhöhte Energie benötigt, wird der untere Zustand I bei der mit Cholesterol angereicherten Membran attraktiver.

5.2.4 Diskussion

Diese Beobachtungen werfen zwei Vermutungen auf. Die Helfrich-Abstoßung könnte zum einen dazu führen, dass eine Phasenseparation auch für hoch lösliche Additive induziert wird (Bruinsma 2001)¹⁰. Eine theoretische Studie über die Helfrich-Abstoßung von Netz und Pincus (Netz 1995b) sagt tatsächlich voraus, dass die Kopplung zwischen Membrankrümmung und Konzentration eines Additivs eine Phasenseparation auch bei extrem kleinen Konzentrationen führt. Die beobachtete Phasenseparation ist hier dynamischer Natur.

Die zweite schwieriger zu verstehende Tatsache ist die Existenz einer Doppelbande in der Verteilung $P(h)$. Aufgrund der universellen Kollisionsenergie sollte die universelle Einzelpeakstruktur von Leibler und Lipowsky auch für Multikomponentmembranen gültig sein. Die Doppelpeakstruktur kann nicht mit bekannten Theorien erklärt werden, auch nicht in der Anwesenheit einer lateralen Phasenseparation.

Der mittlere Abstand der Membranfluktuation für einen Zustand geht in Gl. (5.38) nur durch eine effektive renormalisierte Krümmungsenergie $\kappa(\sigma)$ ein, wobei σ die Oberflächenkonzentration des Additivs ist. Für ein symmetrisches Lipopolymer mit dem Gyrationradius R_g ist vorhergesagt (Hiergeist 1996):

$$\kappa(\sigma) \cong \kappa + k_B T \sigma R_g^2 \quad (\text{für } \sigma R^2 < 1) \quad (5.44)$$

¹⁰ Geringe Konzentrationen von Adhäsionsmolekülen können aufgrund von weitreichender Wechselwirkung die über Membran übertragen werden, zu einer Phasenseparation führen. Weder PEG noch Cholesterol fallen jedoch in diese Kategorie.

Wenn man eine laterale Phasenseparation von σ annimmt, erhält man für $\kappa = 25 k_B T$, dass der Unterschied in den Peakpositionen mit 1 nm zu klein ist, um die beobachtete Aufspaltung des Einzelpeaks in zwei Peaks zu erklären.

6 Rheologische Untersuchungen an Aktinnetzwerken

Bereits in meiner Diplomarbeit wurden die frequenzabhängigen viskoelastischen Moduln von verschlauften F-Aktinlösungen mit Hilfe von Magnetic Tweezers untersucht. Mit dem Einsatz der digitalen Bildverarbeitungstechnik konnten diese Moduln in einem Bereich von 7 bis 40 Hertz gemessen werden, der bislang mit dieser Methode nicht zugänglich war. Ein Ziel war die Bestimmung des Skalenverhalten der viskoelastischen Moduln in diesem Bereich. Es wurde jedoch festgestellt, dass apparative Mängel im Aufbau, das Ergebnis stark verfälschten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Mängel wesentlich verringert, sowie der Magnetic-Tweezers-Aufbau erweitert. Somit konnten neue Messungen erfolgreich durchgeführt und veröffentlicht werden. Diese Veröffentlichung ist im Folgenden abgedruckt.

Der Artikel erschien im Journal Review of Scientific Instruments (72(9):3626-3634) und kann unter der Adresse „<http://link.aip.org/link/?rsi/72/3626>“ gefunden werden.

Copyright (2001) American Institute of Physics. Dieser Artikel darf mit dieser Arbeit nur zur persönlichen Benutzung aus dem Netz geladen werden. Jede andere Benutzung benötigt die Erlaubnis des Autors oder des American Institute of Physics.

The following article appeared in Review of Scientific Instruments and may be found at <http://link.aip.org/link/?rsi/72/3626>.

Copyright (2001) American Institute of Physics. This article may be downloaded for personal use only. Any other use requires prior permission of the author and the American Institute of Physics.

Oscillatory magnetic bead rheometer for complex fluid microrheometry

M. Keller, J. Schilling, and E. Sackmann

Technische Universität München
Fakultät für Physik, Lehrstuhl für Biophysik E22
James-Franck-Str., 85748 Garching, Germany

The dynamic range of the microrheometry based on the analysis of the enforced motion of colloidal force probes by video microscopy has been extended to 40 Hz. For that purpose a novel rapid image processing system has been developed enabling the real-time data acquisition and analysis thus improving the time resolution of particle tracking to 6 ms. A second advancement consists in the development of a correction procedure accounting for two effects: Firstly, for the smearing out of the diffraction image of the beads due to the finite data acquisition time and, secondly, for systematic phase shifts of magnetic bead deflection with respect to the force due to the finite response time of the superparamagnetic beads in the direction of the gradient of the magnetic field. The new method has been applied to re-study the dynamic scaling law of the frequency dependence of the viscoelastic impedance of entangled actin solutions in the frequency regime determined by the conformational dynamics and entropic tension of single filaments. The frequency dependence of the storage and loss modulus obeys the scaling laws $G'(\omega) \propto G''(\omega) \propto \omega^\alpha$ with $\alpha = 0.83(8)$ which is only slightly higher than the theoretical prediction ($\alpha = 0.75$).

1 INTRODUCTION

Viscoelasticity is a basic physical property of biomaterials which plays an essential role for the biological function of cells and tissue (including bones, connective tissue and synovial fluids). It affects the dynamics of cellular shape changes during locomotion[1, 2] and the intracellular transport of vesicles or phagosomes by molecular motors.[3, 4, 5] Thus, changes of the viscoelastic moduli of the actin based cytoskeleton by mutations (such as the knock out of gelating factors) can drastically impair the locomotion of cells as demonstrated for the amoeba *Dictyostelium discoideum*. [2]

Rheological studies of bio-materials are thus of both practical and scientific interest. Practical aspects include the measurement of subtle changes of the viscoelastic

properties of the composite cell plasma membrane or the cytoplasm by biochemical signaling[6, 7] and mutations[2, 8, 9]. Scientific applications include studies of the correlation between macroscopic rheological properties of actin gels and the molecular dynamics of single molecules (such as actin filaments).[10, 11]

Rheological studies of biomacromolecular networks are, however, hampered by the highly heterogeneous architecture of these materials (such as the cytoplasm or the connective tissue). On the other hand, most of the polymer filaments forming intracellular scaffolds (F-actin and intermediate filaments) or extracellular matrices (hyaluronic acid, proteoglycan, keratin) are semiflexible and exhibit lengths of the order of micrometers. Thus networks formed by these materials exhibit mesh sizes of the order of a few micrometers and are in general soft exhibiting viscoelastic moduli of the order of a few hundred pascals. This opens new possibilities to study simultaneously rheological properties and molecular motions by microoptical techniques.

The microscopic viscoelastic properties of soft heterogeneous biomimetic networks may be studied by two complementary microrheological techniques: (1) measurements of viscoelastic responses evoked by applications of oscillatory mechanical forces or of force pulses on embedded colloidal beads[6, 12, 13] and (2) the analysis of the Brownian motion of colloidal probes[14, 15]. By combining microrheometry with microfluorescence[16] or colloidal probe spectroscopy[10, 17] it is possible to gain insight into the relationships between viscoelastic properties of actin networks and local motions of single filaments. These measurements of the filament self diffusion through analysis of the motion of attached colloidal gold beads showed that the reptation time of single filaments agree well with the terminal relaxation time[10].

The force free microrheometry is based on the analysis of Brownian motion by laser tracking techniques and by using quadrant diodes for the detection of the bead deflection[14, 15, 18]. Impedance spectra can be measured up to 10^3 Hz. It has been applied to measure complex viscoelastic impedance spectra in kidney epithelial cells by analyzing the motion of perinuclear granules with sub-nanometer lateral resolution[15] and the values of viscoelastic moduli measured are well consistent with values measured by magnetic tweezers[6]. An advantage of both microrheometry techniques is that the microheterogeneity of complex viscoelastic bodies such as cross-linked actin gels or cell cytoplasm can be studied by measuring distributions of viscoelastic moduli.

An important question is whether viscoelastic impedance spectra measured by microscopic and macroscopic rheometry agree. Measurements with both the micromechanical and the force free technique showed systematic differences. Compar-

ative studies of entangled solutions of actin and filamentous viruses[19] by magnetic tweezers and torsional rheometry showed that the shape of the impedance spectra between 10^{-3} and 5 Hz are similar (exhibiting a terminal regime, a plateau and an ascending high frequency branch) while the absolute values obtained by microrheometry are systematically lower. The discrepancy decreases with increasing ratio of the bead diameter to the mesh size as also predicted theoretically.[20] Similar discrepancies have recently been found by Crocker *et al.*[14] measuring impedance spectra of entangled actin solutions through analysis of single particle motions and the cross-correlation of the motion of particles, respectively. The former technique yields the local viscoelasticity impedance while the latter yields insight into the macroscopic viscoelastic impedance. The most remarkable result is that the high frequency branch of the storage modulus $G'(\omega)$ appears to exhibit different scaling laws when measured with the single particle ($G'(\omega) \propto \omega^{0.75}$) and the particle correlation technique ($G'(\omega) \propto \omega^{0.5}$), respectively. The latter power law agrees well with that measured by the torsional macrorheometry.[15, 21, 22, 23]

The magnetic tweezers techniques enables measurements of local impedance spectra $G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$ by application of oscillatory forces or of the relaxation modulus $G(t)$ (related to G^* by the fourier transform $G^*(\omega) = i\omega \int_0^\infty G(t)e^{i\omega t} dt$) by subsequent application of force pulses.[24, 25, 26] Forces in the pN to nN range may be applied to explore the transition between the linear and non-linear regime of viscoelasticity and to measure the yield stress of biomacromolecular networks or cell cytoplasms. Such measurements provided strong evidence that cells (such as *Dicystostelium discoideum*) exhibit typical features of viscoplastic bodies[3] enabling the active transport of cells through networks by active forces smaller than the average yield stress of the cytoplasm.

A drawback of the previous technique based on the evaluation of the viscoelastic response curves by analysis of the stored video images was that it yields only reliable values of the viscoelastic impedance up to about 5 Hz.[12] We therefore present an improved version of the oscillatory microrheometer enabling reliable measurements of the viscoelastic spectra of semidilute F-actin solutions up to at least 40 Hz. This progress is achieved by two improvements. Firstly, a real-time image processing system has been developed which allows to control a digital CCD-camera. Thus it is possible to determine the particle deflection with a variable time resolution of down to 6 ms. Secondly, an improved method for the determination of the phase shift of the bead deflection with respect to the oscillatory force has been developed.

A thorough examination of the performance of the microrheometer based on comparative measurements of the impedance spectra of fluids and entangled actin

solutions showed in addition that there is a systematic time shift between the magnetic field and the magnetic force onto the colloidal probes. Its value is independent on the frequency but depends on the amplitude of the magnetic field. By comparing the frequency dependencies of the viscous response of simple fluids (e. g. water-glycerol-mixtures) with calculated response curves, a correction factor for the newly designed instrument was determined enabling absolute measurements of $G^*(\omega)$ with high precision (uncertainty 10 %) up to 40 Hz.

2 THE METHOD

2.1 The magnetic bead microrheometer

For a schematic view of the technical components, see Fig. 1. Magnetic beads are embedded into the actin network contained in the measuring chamber (cf. below) which is placed between two electromagnetic coils with soft iron cores. The average distance between the beads is typically 100 μm . The inhomogeneous magnetic field produced by the coils applies a force to the beads that is proportional to the coil current. The oscillatory motion of a bead induced by the magnetic force is observed through an inverted phase contrast microscope. The image is focussed on a Peltier cooled digital CCD-camera. In order to determine the viscoelastic parameters of the network it is necessary to determine both the amplitude and the phase shift between excitation and response with high precision. In order to measure a frequency spectrum of the viscoelastic modulus $G^*(\omega)$ a series of sinusoidally oscillating forces is applied while the frequency is varied from high to low values of ω . For this purpose, an online image processing software has been developed which controls the coil current and allows to record and analyze the time dependence of the bead motion with a time resolution of down to 6 ms.[27]

2.1.1 Colloidal probes

As magnetic beads we used Dynabeads M-450 (Dyna, Hamburg, Germany), shown in Fig. 2. These highly monodisperse latex beads of radius $r = 2.25(5) \mu\text{m}$ contain 0.19(2) g/g interspersed particles of Fe_2O_3 that are smaller than Weiss domains. Therefore, the beads do not exhibit ferromagnetic behavior such as coercitive forces or hysteresis. For every type of magnetic bead used, we performed a separate force calibration. For this purpose, a force-current-relation is established by analyzing the oscillating motion of the beads in a simple fluid (like a glycerol-water-mixture) of known viscosity η induced by the oscillating current in the solenoid. The force is

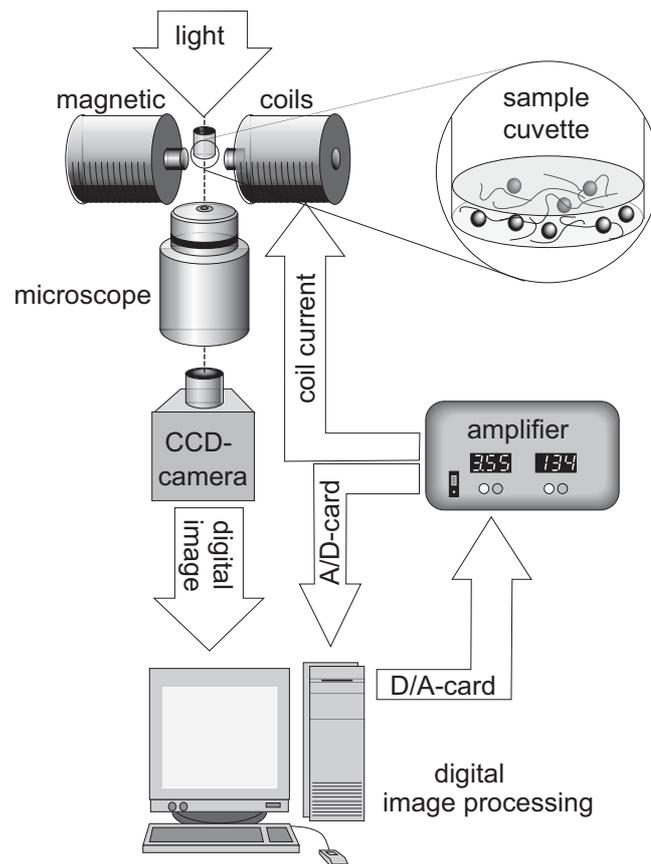


Figure 1: Schematic view of the micro-rheometer. The sample is contained in a circular cuvette (cf. Fig. 4) and is placed together with the magnet on the stage of a Zeiss Axiovert microscope. The magnet consists of two magnetic coils with cylindrical soft iron cores. The amplifier driving the power supply of the magnets feeds also a signal to the analog-digital-card for the measurement of the phase. The images are taken with a cooled CCD camera and are directly stored on the hard disc of the computer.

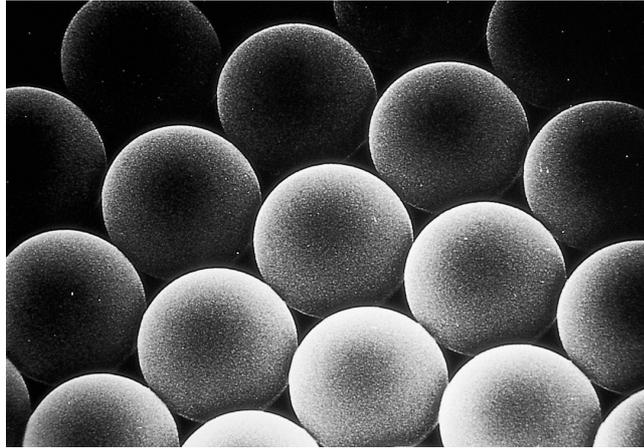


Figure 2: Electron micrograph of the M-450 Dynabeads. The radius of a bead is $2.25 \mu\text{m}$. Courtesy of Dynal Biotech ASA.

obtained from Stokes' law $F = 6\pi r\eta\dot{x}$, where \dot{x} denotes the speed of the particle. The result of the calibration for the beads used is shown in Fig. 3. The maximal force that can be exerted by the present setup is 3 pN. According to Fig. 3, the force-current-relation is approximately linear, therefore a sinusoidally oscillating current through the coils generates an approximately sinusoidally oscillating force onto the beads.

2.1.2 Sample cuvette

In order to enable measurements with small quantities of bio-material, the sample cuvette for the specimen (see Fig. 4) contains a volume of only $15 \mu\text{L}$. It is made up of two cover-glasses separated by a teflon spacer of $400 \mu\text{m}$ thickness and vacuum grease, thus preventing the drying-out of the specimen. The chamber is fasted to a hollow rotating socket of 1 cm height as shown in Fig. 5.

2.1.3 Microscope

The magnetic beads are observed by phase-contrast microscopy using an inverted Axiovert 10 microscope equipped with a 32-fold Achroplan long distance objective and a further 2.5-fold magnification (all Zeiss, Oberkochen, Germany). The microscope is mounted on a vibration damped table (Technical Manufacturing Corporation, Peabody, MA, USA).

2.1.4 Magnetic solenoid and amplifier

The magnetic field is produced by a pair of coils (42 mm length, 30 mm diameter) made of copper wire (0.63 mm diameter, 1100 turns) into which cylindrical soft

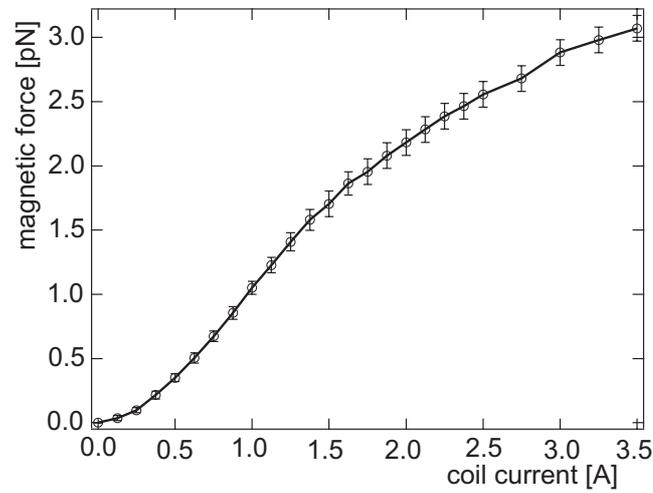


Figure 3: Plot of magnetic force as function of the current in the solenoid. The force calibration was performed by analyzing the oscillatory bead motion in a purely viscous medium: a glycerol-water-salt mixture of known viscosity.

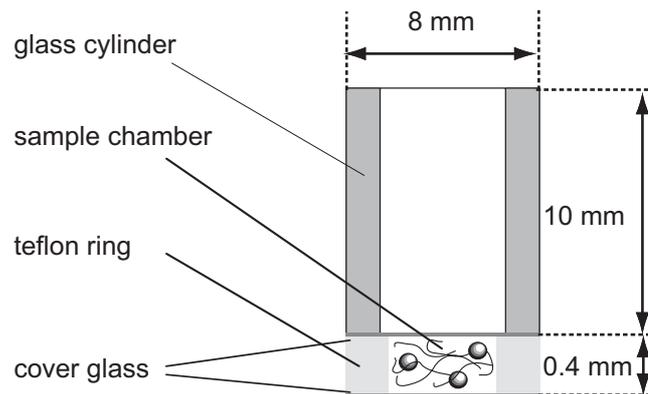


Figure 4: Schematic view of the cylindrical sample chamber mounted on a glass cylinder. It has a diameter of 5.5 mm and contains a volume of 15 μL .

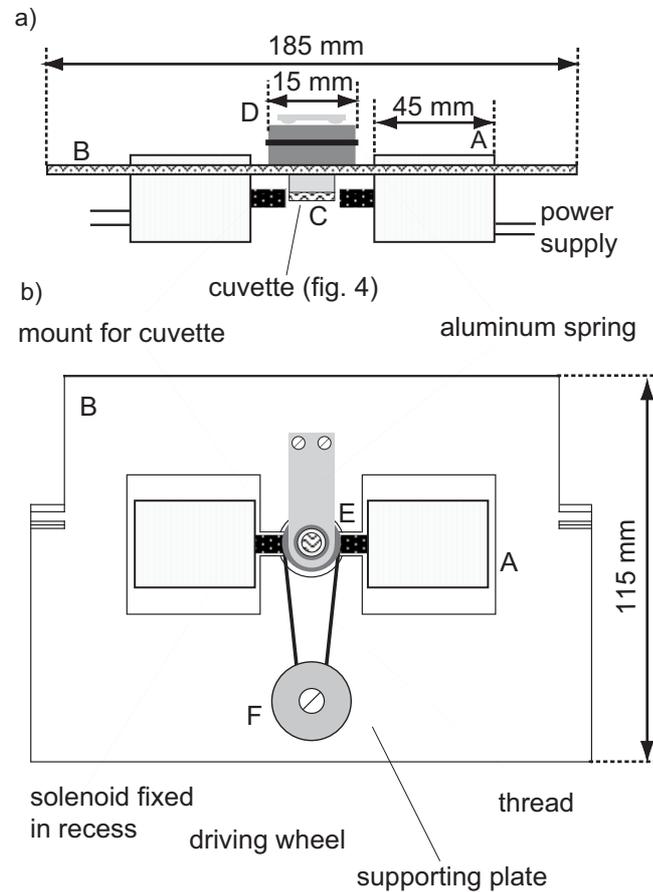


Figure 5: Schematic view of total set-up (measuring chamber and solenoid) fixed on the microscope stage. In the center of the chamber the forces are equal in both directions. Rotation of the sample causes motion of the particles along concentric circles. By observing the sample during rotation one can localize the central point of these circles, i.e. the center of the chamber. Measurements were performed only in this area. a) Front view and b) top view showing solenoid (A) with cylindrical iron core fixed to the supporting plate (B) and measuring chamber fixed to the cylindrical socket (C). The top part (D) consists of a wheel (E) which is connected to a second driving wheel (F) by an elastic and to the supporting plate by a cylindrical bearing. The wheel (E) serves to rotate the sample chamber in order to locate its center.

iron cores of 6 mm diameter with flat ends are inserted. The distance between the surfaces of the iron cores is 15 mm.

To generate the coil current, the computer produces a control signal which is fed to a home-made amplifier which produces an output current proportional to the input voltage signal. It exhibits a maximum output current of 4.5 ampères and a maximum output voltage of 60 volts. In order to exert an oscillating force to the magnetic beads, two magnetic fields exhibiting opposite field gradients are generated alternately in the two opposing coils. Therefore, the two coils are alternately supplied with sinusoidal half waves. The amplifier produces these two output current signals. The output signal fed to one coil is proportional to the positive control signal while the signal fed to the second coil is proportional to the absolute value of the negative control signal. This simple method allows to control both coil currents with one single input signal. To generate a sinusoidal current in the coils, the output current signal of the amplifier has to overcome the induction of the coils. Because of the discontinuous self induction at the beginning and end of a sinusoidal half wave a high standard is required for this amplifier. Otherwise the output current signal will be distorted and shifted in time.

2.1.5 CCD-camera

A peltier cooled CCD-camera C 4880-80 (Hamamatsu, Herrsching, Germany) is connected to the microscope. Due to the progressive scan interline technique, the 10-bit images are captured without any dead-time of the camera. By reading out only an suitable part of the CCD-chip, making use of 2- or 4-binning[28] and accumulation[29] of pictures, it is possible to vary the camera frequency F_{Cam} between less than 1 Hz and 170 Hz. However, a consequence of the binning procedure is a loss in spatial resolution. On the other hand, as will be shown in section 2.5, it may be very useful to gain a lower value of the ratio f/F_{Cam} . For very small bead oscillations (≈ 10 nm), it is necessary to keep the correction factor for the apparent amplitude x_0^{app} as close as possible to the value one in order to enable the reliable calculation of the amplitude and the phase of the oscillation.

2.2 PC and image processing software

The PC has been configured for the special requirements of real-time image processing. The stability of the frame grabber card used, namely an IC-PCI with an AM-DIG-2M-module (Imaging Technologies Incorporated, Bedford, MA, USA), is very sensitive to the type of CPU and main-board chip set used. Thus we chose

iron cores of 6 mm diameter with flat ends are inserted. The distance between the surfaces of the iron cores is 15 mm.

To generate the coil current, the computer produces a control signal which is fed to a home-made amplifier which produces an output current proportional to the input voltage signal. It exhibits a maximum output current of 4.5 ampères and a maximum output voltage of 60 volts. In order to exert an oscillating force to the magnetic beads, two magnetic fields exhibiting opposite field gradients are generated alternately in the two opposing coils. Therefore, the two coils are alternately supplied with sinusoidal half waves. The amplifier produces these two output current signals. The output signal fed to one coil is proportional to the positive control signal while the signal fed to the second coil is proportional to the absolute value of the negative control signal. This simple method allows to control both coil currents with one single input signal. To generate a sinusoidal current in the coils, the output current signal of the amplifier has to overcome the induction of the coils. Because of the discontinuous self induction at the beginning and end of a sinusoidal half wave a high standard is required for this amplifier. Otherwise the output current signal will be distorted and shifted in time.

2.1.5 CCD-camera

A peltier cooled CCD-camera C 4880-80 (Hamamatsu, Herrsching, Germany) is connected to the microscope. Due to the progressive scan interline technique, the 10-bit images are captured without any dead-time of the camera. By reading out only a suitable part of the CCD-chip, making use of 2- or 4-binning[28] and accumulation[29] of pictures, it is possible to vary the camera frequency F_{Cam} between less than 1 Hz and 170 Hz. However, a consequence of the binning procedure is a loss in spatial resolution. On the other hand, as will be shown in section 2.5, it may be very useful to gain a lower value of the ratio f/F_{Cam} . For very small bead oscillations (≈ 10 nm), it is necessary to keep the correction factor for the apparent amplitude x_0^{app} as close as possible to the value one in order to enable the reliable calculation of the amplitude and the phase of the oscillation.

2.2 PC and image processing software

The PC has been configured for the special requirements of real-time image processing. The stability of the frame grabber card used, namely an IC-PCI with an AM-DIG-2M-module (Imaging Technologies Incorporated, Bedford, MA, USA), is very sensitive to the type of CPU and main-board chip set used. Thus we chose

the main board P3B-F (Asus, Newark, CA, USA) with a 700 MHz Intel Pentium III CPU. In addition, the main board is equipped with a 512 MB random access memory (RAM), a Rage Fury Pro graphics adapter (Ati Technologies, Thornhill, ON, Canada), a DT3010/32 AD/DA-card (Data Translation, Marlboro, MA, USA) and a Fast Trak 66 raid-controller (Promise Technology, San Jose, CA, USA). The image data streams are stored onto two hard discs (39 GB, 7200 rpm, 54098U8 of Maxtor, Milpitas, CA, USA) which are connected to the raid-controller. Due to this strategy, the two hard disks appear in the system as one disc exhibiting double size and double writing speed. This is necessary in order to store the huge data streams from the CCD-camera for extended periods of time. Note that the C 4880-80 produces a data stream of up to 16 MB/s. A single fast hard disc can continually store data streams of up to 10 MB/s. For the operating system Windows NT 4.0 and the software a separate hard disc (20.5 GB, 7200 rpm, DPTA-372050 of IBM, Armonk, NY, USA) is used.

In order to control the described magnetic tweezers setup an image processing software exhibiting the following features is necessary: It has to support the CCD-camera C 4880-80 and provide possibilities to control hardware such as an AD/DA-card. It should enable to process the special 10 bit or at least the more general 16 bit gray-scale images and it has to be able to store huge image data streams for extended periods of time. Because there is apparently neither a software nor an image processing development tool commercially available that meets our requirements, we have developed a real-time image processing software by use of VC++ 5.0 under Windows NT 4.0 SP3 (both Microsoft Corp., Unterschleißheim, Germany). This software called "Open Box" has further been developed into a standard tool for video microscopy at our laboratory E22. It is available on request.

With the image processing software "Open Box", it is possible to measure viscoelastic impedance spectra automatically. In addition, we have implemented a commercially available compression algorithm (MT-WICE library, MeVis Technology, Bremen, Germany) based on a wavelet transformation for images. This enables the reduction of the size of the images by 90 % without an appreciable difference between the compressed and uncompressed images. By condensing the accumulated huge amount of image data to manageable sizes, it is possible to archive them with an acceptable effort. The compressed files are stored on CD-R's.

2.3 The original magnetic bead microrheometer

In the original magnetic bead microrheometer developed previously[12, 24] the control signal for the amplifier was generated by a frequency generator. The images from an analogue CCD-camera were recorded by a Panasonic AG-7350 S-VHS video cassette recorder. The image of a LED diode controlled simultaneously by the coil current was recorded by an second CCD-camera. Thus the information on the phase of the coil current was also stored. The images of both cameras were synchronized and mixed by a video mixing desk and stored on video tape. As a result of the fixed video frequency of 25 Hz, this technique limits the time resolution. In addition, due to the poor quality of the images taken by a normal CCD-camera and stored by a VCR, the spatial resolution of the deflection is much smaller than the one achieved with a cooled CCD-camera where the images are stored directly digitally. Therefore, impedance spectra could only be measured up to a frequency of 5 Hz. Another disadvantage of the original system is, that it needs more time to measure an impedance spectrum. Therefore, variations in biological systems changing in the course of time can be observed with an improved time-resolution.

2.4 Particle tracking

The position of a bead is obtained from the images by application of a procedure developed in our laboratory. In brief, a two dimensional Gaussian is fitted to the intensity distribution of each image. From the time dependence of the position of the bead we obtain the phase and the amplitude of the oscillation by a discrete Fourier transformation. To correct for effects of finite acquisition time we use a Hann Window[30]. In order to calculate the phase shift between excitation and deflection, the same procedure was applied to the data from the A/D - card which contains the force applied on the beads for every image taken. For immobilized beads F. Ziemann has shown[24] that the detection of a position with a precision of 1 nm and better is possible by the Gaussian fitting procedure mentioned above. In our high frequency experiments the beads cover a distance of up to 10 nm during one exposure period. This precision is just sufficient to determine the "center of mass" of the bead position. In order to obtain the real amplitude and phase the data were corrected as shown in the next section.

2.5 Corrections

Special care has to be taken whenever a moving object is observed with a camera recording images with a frequency F_{Cam} . Every recorded image of the bead is



Figure 6: Illustration of the picture of a bead recorded by a CCD-camera: a) In the case of a resting particle results a point-symmetric distribution of brightness. b) In the case of a vertically oscillating particle, the distribution of brightness is smeared out in this direction.

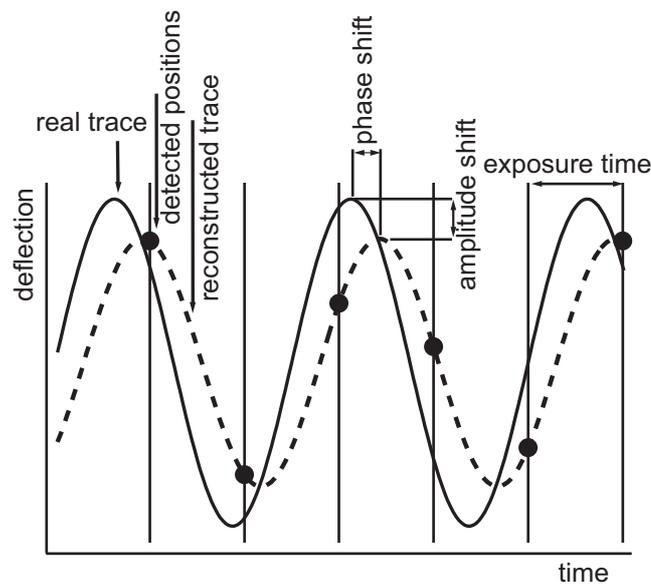


Figure 7: Illustration of the origin of the reduced amplitude and the phase shift due to a finite exposure time. Within the exposure time a part of the trace (between pairs of vertical lines) and not a single position is recorded. For that reason the "center of mass" of the blurred shape of the beads does not reach the true maximum value of the amplitude of the bead deflection. Moreover, the measured phase lags behind the true phase.

determined by the integration of the trajectory of the object during the period $T_{\text{Cam}} = 1/F_{\text{Cam}}$. For that reason, snapshots of beads oscillating with frequency f do not exhibit circular symmetry but the intensity distribution is elongated in the direction of its motion. The ellipticity of the smeared-out intensity distribution depends on the ratio f/F_{Cam} , as shown in Fig. 6. The particle-tracking algorithm determines the position of the "center of mass" of the distribution of brightness. The position of the bead at time t has to be calculated from this value as follows: If the camera records the picture of a bead that is oscillating with the amplitude x_0 during the period $(t - T_{\text{Cam}}) \dots t$, the object moves from the position $x_0 \sin(\omega(t - T_{\text{Cam}}) + \varphi)$ to $x_0 \sin(\omega t + \varphi)$ (see Fig. 7). The position of the "center of mass" $x^{\text{app}}(t)$ of the image of the bead can be calculated as

$$x^{\text{app}}(t) = \frac{1}{T_{\text{Cam}}} \int_{t-T_{\text{Cam}}}^t x_0 \sin(\omega t' + \varphi) dt' = x_0^{\text{app}} \sin(\omega t + \varphi + \varphi^{\text{shift}}), \quad (1)$$

with the apparent amplitude x_0^{app}

$$x_0^{\text{app}} = x_0 \frac{2}{\omega T_{\text{Cam}}} \left| \sin \frac{\omega T_{\text{Cam}}}{2} \right| \quad (2)$$

and the apparent phase

$$\varphi^{\text{app}} = \varphi + \varphi^{\text{shift}} = \varphi + \frac{\omega T_{\text{Cam}}}{2} \bmod \pi. \quad (3)$$

The calculated shift of the amplitude and of the phase as well as an experimental verification is shown in Fig. 8. The real amplitude x_0 and the real phase φ have to be calculated from the apparent amplitude x_0^{app} and the apparent phase φ^{app} that are determined by the particle tracking algorithm according to

$$x_0 = x_0^{\text{app}} \frac{\omega T_{\text{Cam}}}{\sqrt{2(1 - \cos \omega T_{\text{Cam}})}} \quad (4)$$

and

$$\varphi = \varphi^{\text{app}} - \frac{\omega T_{\text{Cam}}}{2} \bmod \pi. \quad (5)$$

This result is valid only for non-interlaced images. Note that in the case of the standard analogue video technique the recorded images are interlaced. This leads to an even larger correction factor for the amplitude than that calculated above.

2.6 Verification of the method

In order to test the validity of the above method of analysis for the high frequency regime above 5 Hz, we evaluated the viscoelastic properties of a glycerol-water-salt-mixture (0.4 g/g water, 0.1 g/g glycerol, 0.5 g/g CsCl₂). The salt was added in

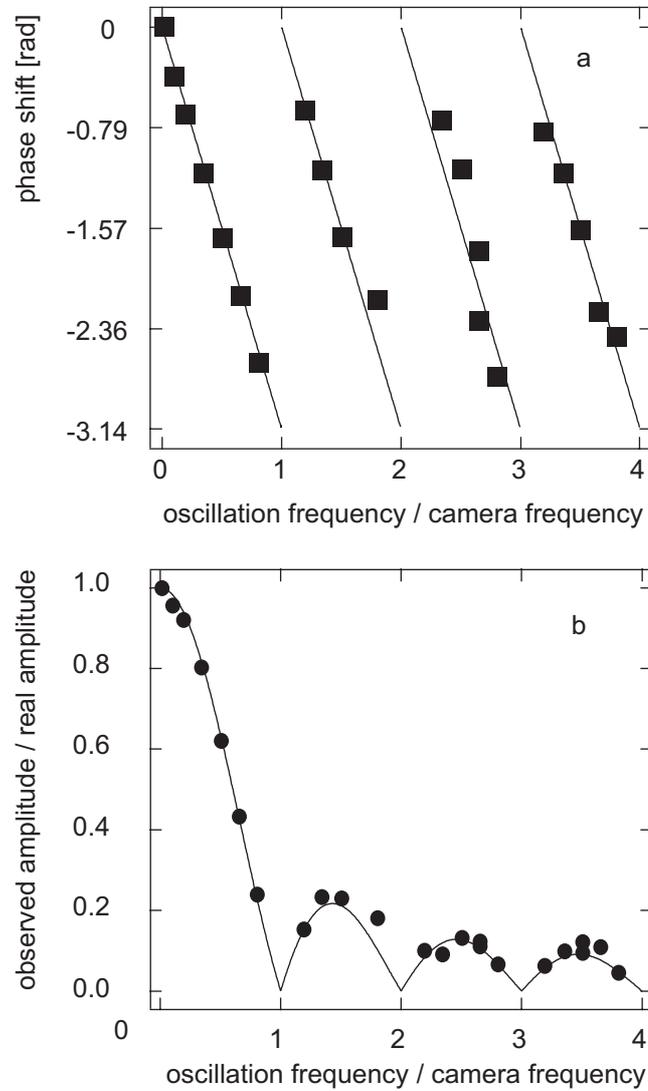


Figure 8: Comparison of the calculated (drawn line) and the measured (dots) correction functions for a) the phase and b) the amplitude. Correction are required due to the finite exposure time of the CCD-camera. In the experiment, a bead oscillating with a frequency of 1 Hz in a F-Actin solution was recorded with camera frequencies between 0.26 Hz and 27 Hz. Note that in each measurement, the real amplitude and the phase shift δ between force and bead oscillation is always the same.

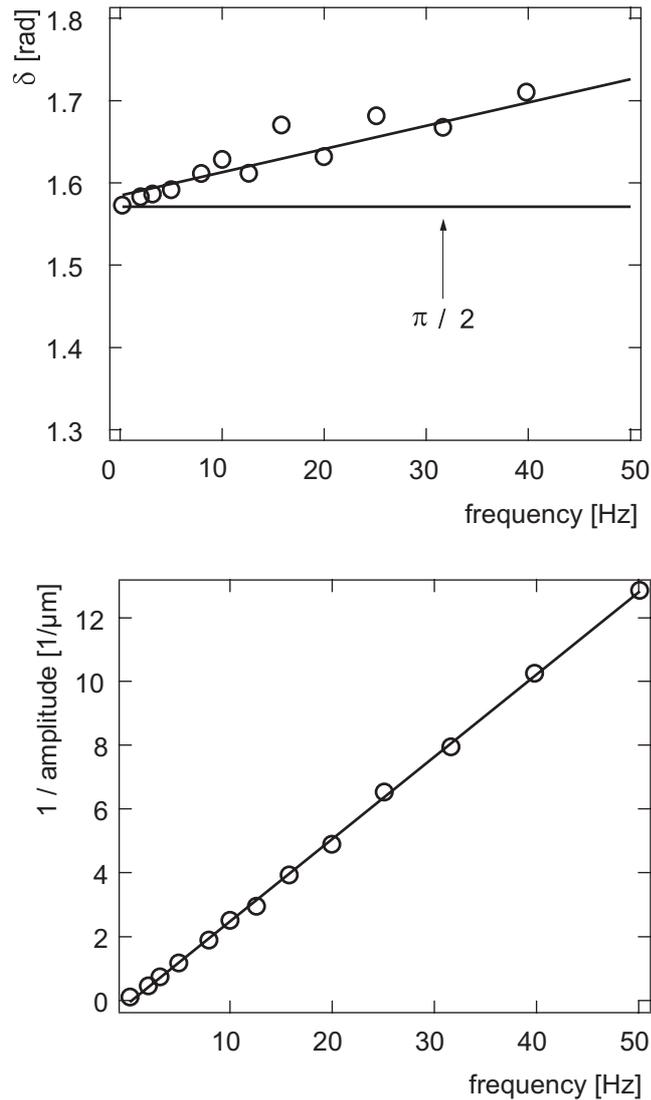


Figure 9: Plot of a typical frequency dependence of phase and amplitude of a glycerol-water-salt-mixture.

order to avoid sedimentation of the beads during the measurement. Due to the fact that a simple solution has no elasticity in the frequency regime of interest, a bead oscillating in the sample has a phase shift between the applied force and the deflection of $\delta = \pi/2$ as follows from Stokes' theory of the motion of a bead in a viscous fluid[31]. Furthermore, the theory predicts that (i) the amplitude of the oscillation decreases as $x_0 \propto \omega^{-1}$, (ii) the shear modulus is zero, $G' = 0$, and (iii) the loss modulus is $G'' \propto \omega$. The result of a typical measurement is shown in Fig. 9.

Detailed measurements of the phase shift showed that in contrast to the expected constant phase difference of $\delta = \pi/2$, δ increases linearly as $\delta = \pi/2 + 2\pi\tau_1 f$. For each colloidal probe used and for every exerted force F_0 the proportionality factor

τ_1 corresponds to a delay-time τ_1 . This is a measure for the systematic time delay between the magnetic field and the force applied to the Dynabeads. Note that there is no phase difference between the coil current and the magnetic field (gradient) as was directly measured by a hall-probe. τ is typically in the range of 1 to 5 ms for forces between 2.2 and 2.9 pN. For a given force amplitude F_0 measurements of the delay-time τ did not vary much. For a force of 2.9 pN, τ was for instance $\tau = 1.5(3)$ ms. The delay decreased considerably with increasing force amplitude. Therefore, for every sample a mean value of the delay τ was calculated for each applied force.

A systematic phase shift between the applied force and the deflection of the bead was also observed for the F-actin solutions (see Chapter 3) in the frequency regime between 15 and 40 Hz where δ is expected to be constant. We observed again a linear increase of the phase difference: $\delta = \delta_0 + 2\pi\tau_1 f$, and the value τ_1 was about equal to that of the simple glycerol solution. The good agreement between the apparent phase shift ($2\pi\tau_1 f$) obtained for glycerol and F-actin strongly suggests that it is a consequence of the delayed response of the iron particles in the magnetic beads. The origin of this effect is not clear. For this reason we think it is justified to subtract this linear increase of phase from the measured values of δ in order to correct for the systematic phase shift. At least for frequencies below 1 Hz, the error of the phase difference is negligible.

In the experiments on glycerol solutions described above, the power law $x_0(\omega) \propto \omega^\alpha$ was tested. We found the exponent $\alpha = 1.05(5)$ which is 5% higher than the expected value $\alpha = 1.0$. [31] The reason for this small systematic deviation is not yet known. However, the finding shows that the measured amplitudes exhibit a systematic uncertainty of up to 5%.

3 RESULTS

The main motivation for the development of the present high frequency magnetic bead microrheometer was to extend the local measurements of the viscoelastic moduli of actin networks to higher frequencies in order to re-evaluate the power laws $G'(\omega) \propto G''(\omega) \propto \omega^\alpha$ in the frequency regime determined by the internal chain conformation dynamics. In the previous microrheometry measurements [12] the exponent varied between 0.5 and 0.7 and was systematically smaller than that predicted by theoretical models [32, 33] ($\alpha = 0.75$).

The present experiments were performed with actin prepared according to procedures used previously. Actin was extracted from rabbit muscle following the prepa-

ration procedure by Spudich *et al.*[34, 35]. However, an additional purification step proposed by MacLean-Fletcher[36] was applied to remove traces of cross-linkers. The functionality was tested by falling ball viscosimetry. G-actin was polymerized in a polymerizing buffer (2 mmol/L Tris, 2 mmol/L MgCl₂, 100 mmol/L KCl, 0.2 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L CaCl₂, 0.5 mmol/L ATP, pH=7.5) for 10 h at 4 °C. The final actin concentration was 0.4 mg/mL, corresponding to a mesh size of $\xi \sim 0.5 \mu\text{m}$.

In oscillatory rheometry the viscoelastic moduli $G'(\omega)$ and $G''(\omega)$ are obtained from the measurement of the amplitude of deflection $x_0(\omega)$ and the phase shift δ according to:[12]

$$G'(\omega) = \frac{F_0}{6\pi R x_0(\omega)} \cos \delta(\omega) \quad (6)$$

and

$$G''(\omega) = \frac{F_0}{6\pi R x_0(\omega)} \sin \delta(\omega), \quad (7)$$

where $\tan \delta = G''/G'$ is the loss-tangent and R is the bead radius.

In order to achieve good statistics, 32 frequency spectra were measured at 17 different frequencies between 0.5 and 42 Hz with a camera working at a frequency of 118.9 Hz. Three different F-actin samples were studied. In each case two to three beads were analyzed. For each of these colloidal probes, the spectra were measured four times by varying the force in the sequence 2.2 pN, 2.9 pN, 2.9 pN, 2.2 pN. The observed bead amplitude x_0^{app} varied between 13 nm at 42 Hz and 365 nm at 0.5 Hz thus the real amplitude x_0 varied between 16 and 365 nm (cf. eq. 4). To establish one graph for the mean values of G' and G'' , the raw data have been processed in the following way. After taking into account the corrections established in equations 4 and 5, for every sample and each applied force F_0 (2.2 pN and 2.9 pN) a mean phase shift $\vartheta_i = 2\pi\tau_i f$ (see section 2.6) was calculated. This value ϑ_i was then subtracted from the respective value of the phase shift δ_i . These results and the values of the amplitudes $x_{0,i}$ of the bead deflection were averaged for each frequency and each force considered. In this way we obtained two $G'(\omega)$ - and two $G''(\omega)$ -spectra, one for 2.2 pN and one for 2.9 pN. The spectra for the two forces agree completely over the whole frequency range demonstrating that the experiments are performed in the linear viscoelastic regime. The linearity of the viscoelastic response obtained with the present technique has also been demonstrated in separate experiments for forces between 3 and 7 pN.[37] For that reason the two spectra obtained for the two forces were averaged. The result is shown in Fig. 10: The slope of $G'(\omega)$ and $G''(\omega)$ in the high-frequency-regime is 0.83(8).

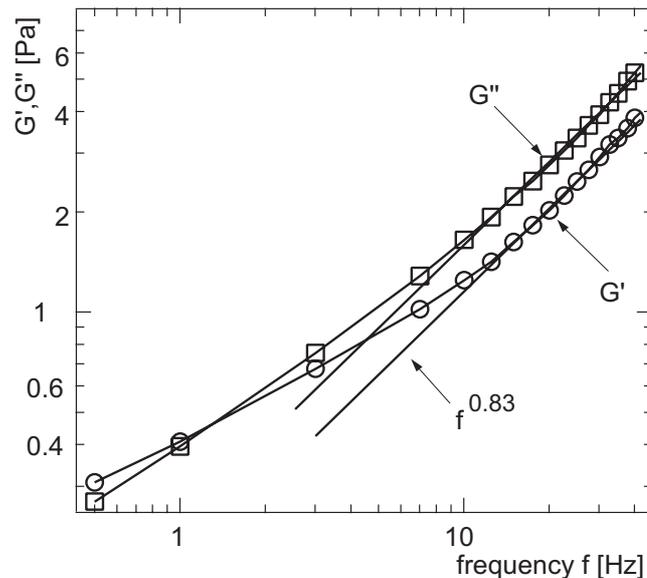


Figure 10: The viscoelastic moduli $G'(\omega)$ and $G''(\omega)$ of an entangled F-actin solution of actin concentration $c_A = 0.4$ mg/mL. Each data point was obtained by averaging over 32 measurements as described in the text.

4 DISCUSSION

An improved magnetic bead microrheometer has been developed enabling reliable micromechanical measurements of the frequency dependent viscoelastic moduli of soft biogels up to frequencies of 40 Hz. The upper frequency limit is determined by the fact that the deflections of the beads are too small to be analyzed in a reliable way. For softer viscoelastic bodies reliable measurements of up to 100 Hz are possible. One major instrumental improvement consists in the development of a fast real-time image processing system enabling the direct storage and processing of the images in the computer thus improving the time resolution of data acquisition to less than 10 ms. A second improvement consisted in the development of correction procedures which allowed to account for two effects. Firstly, it is now possible to correct for the smearing-out of the diffraction spots of the images of the beads caused by the finite image acquisition time. Secondly, the new set-up allows to account for the systematic phase shifts caused by the finite response time of the magnetic Dynabeads to changes in the direction of the gradient of the magnetic field. The reliability of the technique was tested by evaluating the viscous response of a glycerol solution.

The new technique was applied to measure the frequency dependence of the viscoelastic impedance of an entangled actin network between 0.5 and 40 Hz. The most pertinent result of the present study is the demonstration that the high frequency

branches of the viscoelastic moduli measured by micromechanical technique obey scaling laws $G'(\omega) \propto G''(\omega) \propto \omega^\alpha$ with an exponent $\alpha = 0.8$ which agrees well with the theoretical prediction for the tension dominated regime of the microscopic[17, 32] and macroscopic[33] viscoelastic response. On the other side, previous macrorheological measurements yielded a power law $G'(\omega) \propto G''(\omega) \propto \omega^{0.5}$ between 0.1 and 10 Hz.[21] Crocker *et al.*[14] found however, that the frequency dependence of $G^*(\omega)$ measured by single particle tracking varies as $\omega^{0.75}$ (in agreement with the present result) while that obtained by two particle correlation analysis varies as $\omega^{0.5}$. The $\omega^{0.75}$ dependence of the microscopic viscoelastic impedance is also consistent with measurements of the time dependent root mean square displacement $\sqrt{(\Delta u)^2}$ of single actin filaments in entangled solutions which was determined by Brownian motion analysis of colloidal beads attached to the test filaments[10]. Power laws $\sqrt{(\Delta u)^2} \propto t^{-0.75}$ were found for the short time motion in the direction parallel and perpendicular to the filament axis.[10] It should also be noted that in the present micromechanical study the deflection amplitudes were of the order of 10 nm (at frequencies above 10 Hz) and were thus similar to those applied in the laser particle tracking experiments[14] and in the previous macrorheological measurements.[21] Taken together, these results strongly suggest that the microscopic and macroscopic viscoelasticity impedance obeys different high frequency power laws. Nevertheless, more systematic measurements of the variation of the viscoelastic impedance spectra with the deflection amplitude are required. Moreover, new theoretical approaches concerning the variation of viscoelastic properties of macromolecular networks with the scale of the deformation are required to come to a final conclusion.

Acknowledgments

We are grateful to D. Simson, F. Ziemann and M. Dichtl for providing the particle tracking algorithm. Helpful discussions with E. Frey are gratefully acknowledged.

The work was financially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 413) and the Fonds der Chemischen Industrie.

References

- [1] T. P. Stossel, *Sci. Am.* **271**, 54 (1994).
- [2] M. Schindl, E. Wallraff, B. Deubzer, W. Witke, G. Gerisch, and E. Sackmann, *Biophys. J.* **68**, 1177 (1995).
- [3] W. Feneberg, M. Westphal, and E. Sackmann, *Eur. Biophys. J.* **30**, 284 (2001).

- [4] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson, *Molecular Biology of the Cell* (Garland, New York, NY, 1994).
- [5] R. Simson, E. Wallraff, J. Faix, J. Niewohner, G. Gerisch, and E. Sackmann, *Biophys. J.* **74**, 514 (1998).
- [6] A. R. Bausch, W. Möller, and E. Sackmann, *Biophys. J.* **76**, 573 (1999).
- [7] A. R. Bausch, U. Hellerer, M. Essler, M. Aepfelbacher, and E. Sackmann, *Biophys. J.* **80**, 2649 (2001).
- [8] C. Pasternak, J. A. Spudich, and E. L. Elson, *Nature* **341**, 549 (1989).
- [9] R. Neujahr, C. Heizer, R. Albrecht, M. Ecke, J. M. Schwartz, I. Weber, and G. Gerisch, *J. Cell Biol.* **139**, 1793 (1997).
- [10] M. A. Dichtl and E. Sackmann, *New J. Phys.* **1**, 18.1 (1999).
- [11] B. Hinner, M. Tempel, E. Sackmann, K. Kroy, and E. Frey, *Phys. Rev. Lett.* **81**, 2614 (1998).
- [12] F. Ziemann, J. Rädler, and E. Sackmann, *Biophys. J.* **66**, 2210 (1994).
- [13] R. E. Mahaffy, C. K. Shih, F. C. MacKintosh, and J. Käs, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 880 (2000).
- [14] J. C. Crocker, M. T. Valentine, E. R. Weeks, T. Gisler, P. D. Kaplan, A. G. Yodh, and D. A. Weitz, *Phys. Rev. Lett.* **85**, 888 (2000); A. J. Levine and T. C. Lubensky *et al.*, *Phys. Rev. E* **63**, 041510 (2001).
- [15] S. Yamada, D. Wirtz, and S. C. Kuo, *Biophys. J.* **78**, 1736 (2000).
- [16] J. Käs, H. Strey, J. X. Tang, D. Finger, R. Ezzell, E. Sackmann, and P. A. Janmey, *Biophys. J.* **70**, 609 (1996).
- [17] F. Gittes, B. Schnurr, P. D. Olmsted, F. C. MacKintosh, and C. F. Schmidt, *Phys. Rev. Lett.* **79**, 3286 (1997).
- [18] J. Apgar, Y. Tseng, E. Fedorov, M. B. Herwig, S. C. Almo, and D. Wirtz, *Biophys. J.* **79**, 1095 (2000).
- [19] F. G. Schmidt, B. Hinner, E. Sackmann, and J. X. Tang, *Phys. Rev. E* **62**, 5509 (2000); F. G. Schmidt, B. Hinner, and E. Sackmann, *Phys. Rev. E* **61**, 5646 (2000).

- [20] A. C. Maggs, Phys. Rev. E **57**, 2091 (1998).
- [21] O. Müller, H. E. Gaub, M. Bärmann, and E. Sackmann, Macromolecules **24**, 3111 (1991).
- [22] J. Xu, W. H. Schwarz, J. A. Käs, T. P. Stossel, P. A. Janmey, and T. D. Pollard, Biophys. J. **74**, 2731 (1998).
- [23] A. Palmer, T. G. Mason, J. Xu, S. C. Kuo, and D. Wirtz, Biophys. J. **76**, 1063 (1999).
- [24] F. Ziemann, PhD thesis, Technische Universität München (1997).
- [25] F. Amblard, B. Yurke, A. Pargellis, and S. Leibler, Rev. Sci. Instrum. **67**, 818 (1996).
- [26] F. Amblard, A. C. Maggs, B. Yurke, A. Pargellis, and S. Leibler, Phys. Rev. Lett. **77**, 4470 (1996).
- [27] J. Schilling, Diploma thesis, Technische Universität München (1999).
- [28] Note that in the case of 2- (or 4-) binning, 4 (or 16) pixels are coupled together into one pixel. This procedure reduces the read-out-time of the CCD-chip, but decreases also the spatial resolution by a factor of 2 (or 4, respectively). The image of a moving object becomes sharper. Under certain conditions, this leads to a more precise detection of the bead position.
- [29] Accumulation means that the exposure time of an image is a multiple of the read-out-time of the CCD-chip.
- [30] W. H. Press, S. A. Teukolsky, W. T. Vetterling, and B. P. Flannery, *Numerical Recipes in C*, 2nd edition (Cambridge University Press, 1992), Chap. 13.
- [31] L. D. Landau and E. M. Lifschitz, *Fluid Mechanics*, 2nd edition (Butterworth-Heinemann 1995), Chap. 2.
- [32] F. Gittes and F. C. MacKintosh, Phys. Rev. E **58**, R1241 (1998).
- [33] D. C. Morse, Phys. Rev. E **58**, R1237 (1998).
- [34] J. A. Spudich and S. Watt, J. Biol. Chem. **246**, 4866 (1971).
- [35] J. D. Pardee and J. A. Spudich, Meth. Enzymol. **85**, 165 (1982).

- [36] S. MacLean-Fletcher and T. D. Pollard, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **96**, 18 (1980).
- [37] F. G. Schmidt, PhD thesis, Technische Universität München (2000).

7 Ausblick

Das Echtzeitbildverarbeitungssystem Open Box hat im Laufe dieser Arbeit die analoge Bildverarbeitung am Lehrstuhl E22 vollständig verdrängt. Inzwischen konnten Experimente in vielen Bereichen der Biophysik mit Hilfe von Open Box unabhängig von dieser Arbeit durchgeführt werden:

- Einzelfilamentdynamik in Aktinnetzwerken (Dichtl 2001)
- Aktive und passive Aktin-Myosin-Netwerke (Keller 2003)
- Aktinnetzwerke in Vesikeln (Limozin 2002)
- Viskoelastische Moduln von Zellen (Vonna 2002; Fenneberg 2003)
- Verwenden von Quanten Dots zur Erhöhung der optischen Auflösung (Bausch 2002)
- Thermodynamische Charakterisierung schwacher Adhäsionssysteme (Lorz 2003)
- Generische und spezifische Zelladhäsion (Gönnenwein 2003)

Da bis heute noch kein mit Open Box vergleichbares Produkt auf dem Markt gekommen ist, das Konzepte zur Online-Speicherung auf die Festplatte, sowie zur Datenkompression liefert, wird Open Box noch einige Jahre seinen Stellenwert behalten.

Eine mögliche Weiterentwicklung wäre die Implementation einer geeigneten Kompressionslibrary, die eine Bild-zu-Bild-Komprimierung unterstützt (siehe Abschnitt 3.6.3), um bei gleicher Qualität der entpackten Filme einerseits Kompressionsraten unter 10 % zu erhalten und um andererseits eine schnellere Dekompression zu ermöglichen. Nach der Verabschiedung des Motion JPEG 2000-Standards im März 2001 sollte so eine geeignete Library bald verfügbar sein.

Die Zwei-Wellenlängen-RIKM-Technik mit koloidalen Sonden wurde in einer neuen Arbeit von K. Sengupta und C. Picart an mehrlagigen Polyallylaminhydrochlorid/Polystyrolsulfonat-Systeme (PAH/PSS) angewendet. Mit diesem System können Polymerfilme unterschiedlicher Höhe durch die Variationen der Lagenanzahl hergestellt werden. Durch Vergleich mit bereits durchgeführten Messungen der Höhe mit Optical Waveguide light spectroscopy (OWLS) (Picart 2001), erhoffen wir uns Aufklärung über

die widersprüchlichen Ergebnissen aus den Vergleichen von Sonden über Glas und Sonden über dünnen Filmen (Abschnitt 5.1.3).

Abkürzungen

API	Application Programming Interface, Programmierschnittstelle zwischen Betriebssystem und Anwendung
AFM	Atomic Force Microscopy, Raster Kraft Mikroskopie
CCD	Charge Coupled Device
CD / CD-R	Compact Disc / Compact Disc Recordable
DCT	Discret Cosinus Transformation
GB	Gigabyte, je nach Kontext 10^9 oder 2^{30} (1.073.741.824) Byte
Hz	Hertz
Jpeg	DCT-basiertes Kompressionsformat für Bilddaten, benannt nach der Joint Photographic Experts Group
Jpeg2000	Neues Wavelet-basiertes Kompressionsformat für Bilddaten, benannt nach der Joint Photographic Experts Group
KCl	Kaliumchlorid
MB	Megabyte, je nach Kontext 10^6 oder 2^{20} (1.048.576) Byte
MFC	Microsoft Foundation Classes, Klassenbibliothek zur Kapselung der Win32-API
Min	Minuten
mM	Millimolar
μm	Mikrometer
NTSC	analoge Übertragungsnorm für Bild- und Tonsignale benannt nach dem National Television Standards Committee
NA	numerische Apertur
nm	Nanometer
PAL	phase alternating line = die Phase wechselnde Zeileanaloge, Übertragungsnorm für Bild- und Tonsignale
PCI	Peripheral Component Interconnect, Standardschnittstelle für Erweiterungskarten im PC
pN	Pikonewton

RAID	"Redundant Array of Independent Disks“, ein RAID-System ist in der Lage, Daten gleichzeitig auf mehrere Festplatten entweder redundant oder aufgeteilt zu speichern. Im ersten Fall wird eine Erhöhung der Sicherheit, im zweiten Fall eine Erhöhung der Schreibgeschwindigkeit bewirkt.
RIKM	Reflexions Interferenz Kontrast Mikroskopie, im Sprachgebrauch auch als Reflexions Interferenz Kontrast Mikroskop verwendet
RS-232	serieller Schnittstellenstandard mit 25- oder 9-poliger Verbindung für die serielle Übertragung von Computer-Daten - auch V.24 genannt
TIF/TIFF	Tagged Image File Format,
USB	Universal Serial Bus, aktueller serieller Schnittstellenstandard
Win32	Allgemeine Benennung der 32 Bit Windows-Betriebssysteme

Symbole

λ	Wellenlänge des Lichtes
π	Kreiszahl
σ	Standardabweichung
h	Höhe
I	Intensität
i, j	Indizes
k_B	Boltzmannkonstante
n	Brechungsindex
P	Häufigkeitsverteilung
R	Kugelradius
r	Ringradius
V''	Die zweite Ableitung eines Potentials nach dem Ort

Herzlichen Dank

Als erstes will ich mich bei meinem Doktorvater **Prof. Erich Sackmann** bedanken, an dessen Lehrstuhl ich mich die letzten 5 Jahre sehr wohl gefüllt habe. Seine Gabe Menschen für die Physik zu begeistern, ist etwas ganz besonderes.

Ein besonders großer Dank geht an meine engsten Kollegen, Freunde und Tourenpartner **Manfred Keller**, **Stefanie Gönnerwein** und **Kheya Sengupta**, mit den ich interessante und lustige Stunden sowohl bei Experimenten und Auswertungen, als auch in den Felswänden Deutschlands, Österreichs und der Schweiz verbracht habe.

Bedanken möchte ich bei ganz **E22**, wo jeder auf seine Art zu einer einmaligen Atmosphäre beiträgt:

Prof. Andreas Bausch, für den Glauben an und die Unterstützung für Open Box sowie die vielen interessanten Diskussionen. **Laurent Vonna**, für die vielen kulinarischen Partys. **Alexander Roth**, **Laurent Limozin**, **Jörg Uhde**, **Nikita Ter-Oganessian** und **Christian Daniel** als wertvolle diskussionsfreudige und bergtaugliche Arbeitskollegen. **Katrin Prechtel**, für die immer gute Laune. **Felix Linke** und **Rainer Tharmann**, die mich mit viel Motivation als Netzwerkadministrator abgelöst haben. **Felix**, natürlich auch für die Komplizenschaft an der einsamen C++-Front. **Gerald Wiegand**, **Heiko Hillebrand** und **Olliver Purrucker**, die immer für eine lustige Büroatmosphäre sorgten, insbesondere schätze ich **Ollis** Kompetenz in MB-Fragen. **Barbara Lorz**, für die Unterstützung beim RIKM. **Monika Rusp**, für die Aufnahmen am Elektronenmikroskop. **Claudine Voelker** und **Sonja Kraus**, für die Unterstützung an der Administrationsfront. **Michael Nikolaides**, **Murat Tutus** und **Florian Rehfeld**, für ihren persönlichen Einsatz, E22 lebendig zu halten. **Prof. Rudolf Merkel**, für die vielen hilfreichen Diskussionen.

Catherine Picart (Polymères et Matériaux de Strasbourg), für die interessante und aufschlussreiche Zusammenarbeit.

Stephan Pettinger, für den unermüdlichen Einsatz, E22 mit erstklassiger Hardware zu versorgen. Der **Firma Mevis**, für die kostenfreie Überlassung der MT-Wice-Library.

Auch ein großes **Danke Schön** geht **an alle bisher nicht erwähnten Kletterer**, die am Abend und am Wochenende für die notwendigen Ausgleich sorgten:

Berenike Maier und **Sebastian Gönnerwein**, die mich zusammen mit **Steffi** zum Wiedereinstieg ins Klettern motivierten. **Uta Müller**, für die besonders vielen und schönen gemeinsamen Klettertouren. **Katharina Kästner** und **Steffen Quade**, für das gemeinsame Klettern, sowie für das kulinarische Verwöhnen. **Michael Reiner**, für die spannenden allmontaglichen Wochenendgeschichten. Und an alle nicht erwähnten **ehemaligen und aktuellen Kletterpartner**.

Den **Korrekturlesern**, insbesondere **Steffi**, die ich hierfür am meisten in Anspruch genommen habe.

Dem **Kleeblatt**, für die Treue.

Meinen **Eltern** und **Großeltern**, für die Unterstützung.

Bibliographie

- Abercombie A. W. und E. J. Ambrose (1958). "Interference reflection microscopy studies of cell contacts in tissue culture". *Exp.Cell Res* **15**: 332-345.
- Albersdörfer A. (1999a). Dissertation, "Über das Quellverhalten und die viskoelastischen Eigenschaften ultradünner, festkörpergestützter Polyelektrolytfilme". Fakultät für Physik, Technische Universität München
- Albersdörfer A. und E. Sackmann (1999b). "Swelling Behaviour an Viscoelasticity of Ultrathin Grafted Hyaluronic acid films". *Eur.Phys.J.* **B10**: 663-672.
- Balaban N. Q., U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabany, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addali und B. Geiger (2001). "Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates". *Nat.Cell.Biol.* **3**: 466-472.
- Bausch A. R. und D. A. Weitz (2002). "Tracking the dynamics of single quantum dots: Beating the optical twice". *J. of Nanoparticle Research* **4**: 477-481.
- Bausch A. R., F. Ziemann, A. A. Boulbitch, K. Jacobson und E. Sackmann (1998). "Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry.". *Biophysical Journal* **75**: 2038-2049.
- Bevan M. A. und D. C. Prieve (1999). "Direct Measurement of Retarded van der Waals Attraction". *Langmuir* **15**: 7925-7936.
- Bevan M. A. und D. C. Prieve (2000). "Hindered diffusion of colloidal particles very near a wall". *J. Cem. Phys.* **113**: 1228.
- Booch G. (1994). "Objektorientierte Analyse und Design" Addison-Wesley
- Brenner H. (1961). "The slow motion of a sphere through a viscous fluid towards a plane surface". *Chem.Eng.Sci.* **16**: 242-251.
- Bruinsma R. und E. Sackmann (2001). "Bioadhesion and the dewetting transition". *C.R.Acad.Sci.IV-Phys.* **2**: 803.
- Castro-Roman F., G. Porte und C. Ligoure (1999). "Renormalization of Helfrich's Interactions between Fluid Membranes in a Lyotropic Lamellar Phase by Addition of Amphiphilic Copolymers". *Phys. Rev. Lett.* **82**: 109.

- Cheezum M. K., W. F. Walker und W. H. Guilford (2001). "Quantitative Comparison of Algorithmus for Tracking Single Fluorescent Particles". *Biophysical Journal* **81**: 2378-2388.
- Curtis A. S. G. (1964). "The mechanism of adhesion of cells to glass. A study by interference reflection microscopy.". *J.Cell.Biol.* **20**: 199-215.
- Dahl O.-J., B. Myhrhaug und K. Nygaard (1970). "Simula 67 - Common Base Language". *Technical Report Nr. 22, Norwegian Computer Centre, Oslo, Norwegen.*
- David F. (1990). "Proceedings of the 1989 Symposium on Lattice FieldTheorie, Capri Italy". Amsterdam
- Dichtl M. (1997). Diplomarbeit, "Anwendung von kolloidalen Sonden zur Untersuchung der Reptation von Aktinfilamenten"., Technische Universität München
- Dichtl M. (2001). Dissertation, "Moleküldynamik und Mikrorheologie von Biopolymernetzwerken: Eine Untersuchung mit kolloidalen Sonden". Fakultät für Physik, Technische Universität München
- Faxen H. (1923). "Die Bewegung einer starren Kugel längs der Achse eines mit zäher Flüssigkeit gefüllten Rohres". *Arkiv.Mat.Astron.Fys.* **17**(No.27).
- Fenneberg W. (2003). Dissertation, "Viskoelastische Mikroskopie der Zellhülle von humanen Endothelzellen". Fakultät für Physik, Technische Universität München
- Gisler T. und D. A. Weitz (1998). "Tracer microrheology in complex fluids". *Current opinion in colloid and interface science* **3**(6): 586-592.
- Gisler T. und D. A. Weitz (1999). "Scaling of the microrheology of semidilute F-actin solutions". *Phys. Rev. Lett.* **82**(7): 1606-1609.
- Gompper G. und D. M. Kroll (1989). "Steric interactions in a multimembrane system: a monte carlo study". *Europhys.Lett.* **9**: 59.
- Gönnenwein S. (2003). Dissertation, "Generic and Specific Cell Adhesion: Investigations of a Model System by Micro-Interferometry". Fakultät für Physik, Technische Universität München
- Gregory J. (1975). "Interaction of unequal double layers at constant charge". *J.Colloid.Interface Sci.* **51**: 44.

- Guttenberg Z., B. Lorz, E. Sackmann und A. Boulbitch (2001). "First-order transition between adhesion states in a system mimicking cell-tissue interaction". *Europhys. Lett.* **54**(6): 826–832.
- Häckl W. (1997). Dissertation, "Rekonstitution von Aktinnetzwerken in Vesikel". Fakultät für Physik, Technische Universität München
- Happel J. und H. Brenner (1991). "Low Reynolds number hydrodynamics" Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands
- Hascall V. C. und T. C. Laurent (1997). "Review article in: www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html".
- Helfrich W. (1978). "Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments.". *Z.Naturforsch.A*(33): 305.
- Hiergeist G. und R. Lipowsky (1996). "Elastic Properties of Polymer-Decorated Membranes". *J. Phys. II (France)* **6**: 1465.
- Israelachvili J. (1991). "Intermolecular & Surface Forces" 2 edn. Academic Press. London
- Janke W., H. Kleinert und M. Meinhart (1989). "Monte Carlo Study of Stack of Self-Avoiding Surfaces with Extrinsic Curvature Stiffness". *Phys.Lett.B* **217**: 525.
- Johnson K. L., K. Kendall und A. D. Roberts (1971). *Proc.R.Soc.London* **324**: 301-313.
- Keller (2003). Dissertation, "Aktive und passive Aktin-Myosin-Netzwerke". Fakultät für Physik, Technische Universität München
- Komura S. und D. Andelmann (2000). "Adhesion-induced lateral phase separation in membranes". *Eur.Phys.J. E*(3): 259-271.
- Kruglinsky D. (1992). "Inside Visual C++" Microsoft Press. Redmond, Washington
- Kühner M. und E. Sackmann (1996). "Ultrathin hydrated dextran films grafted on glass: preparation and characterization of structural, viscous and elastic properties by quantitative microinterferometry.". *Langmuir* **12**: 4866-4876.
- Landau L. und E. M. Lifschitz (1986). "Theorie of elasticity, 3rd ed." Pergamon Press Inc. New York
- Leibler S. und R. Lipowsky (1987). "Complete unbinding and quasi-long-range order in lamellar phases". *Phys. Rev. B* **35**: 7004.

- Limozin L. und E. Sackmann (2002). "Polymorphism of Cross-Linked Actin Networks in Giant Vesicles". *Phys. Rev. Lett.* **89**(16): 168103.
- Lipowsky R. und S. Leibler (1986). "Unbinding Transitions of Interacting Membranes". *Phys.Rev.Lett.*(56): 2541.
- Lorz B. (2003). Dissertation, "Etablierung eines Modellsystems der Zelladhäsion über spezifische Bindungen geringer Affinität – eine mikrointerferometrische Studie". Fakultät für Physik, Technische Universität München
- MacKay G. D. M., M. Suzuki und S. G. Mason (1962). "Approach of solid sphere to a rigid plane interface. part 2". *J. Coll. Sci.* **18**: 103-104.
- Munerar S., Y. Wang und M. Dembo (2001). "Traction Force Microscopy of Migrating Normal and H-ras Transformed 3T3 Fibroblasts". *Biophysics J.* **80**: 1744-1757.
- Netz R. R. (1995a). "Complete unbinding of fluid membranes in the presence of short-ranged forces". *Phys. Rev. E* **51**: 2286.
- Netz R. R. und P. Pincus (1995b). "Inhomogeneous fluid membranes: Segregation, ordering, and effective rigidity". *Phys. Rev. E* **52**: 4114.
- Nielsen M., J. Thewalt, L. Miao, J. H. Ipsen, M. Bloom, M. J. Zuckermann und O. G. Mouritsen (2000). "Sterol evolution and the physics of membranes". *Europhys. Lett.* **52**: 368.
- Picart C., G. Ladam, B. Senger, J.-C. Voegel, P. Schaaf, F. J. G. Cuisinier und C. Gergely (2001). "Determination of structural parameters characterizing thin films by optical methods: A comparison between scanning angle reflectometry and optical waveguide lightmode spectroscopy". *J. Chem. Phys.* **115**(2): 1086-1094.
- Ploem J. S. (1975). "Reflection contrast microscopy as a tool for forces between surfaces bearing grafted polymers applied to data on absorbed block copolymers.". *Black Scientific Publications, Oxford.*
- Pralle A., E.-L. Florin, E. H. K. Stelzer und J. K. H. Hörber (1998). "Localviscosity probed by photonic force microscopy". *App.Phys.A* **66**: S71-S73.
- Rädler J. und E. Sackmann (1992). "On the Measurement of Weak Repulsive and Frictional Colloidal Forces by Reflection Interference Contrast Microscopy". *Langmuir* **8**: 848-853.

- Rädler J. und E. Sackmann (1993). "Imaging optical thicknesses and separation distances of phospholipid vesicles at solid surfaces". *J. Phys. II France* **3**: 727-748.
- Reynolds O. (1886). *Trans.R.Soc.London.* **177**: 157.
- Rößmann M. (1997). "Applikationen entwickeln unter Windows NT 4.0" Addison-Wesley
- Safinya C. R., D. Roux, G. S. Smith, S. K. Sinha, P. Dimon, N. A. Clark und A. M. Bellocq (1986). "Steric Interactions in a Model Multimembrane System: A Synchrotron X-Ray Study". *Phys. Rev. Lett.* **57**: 2718.
- Sengupta K., J. Schilling, S. Marx, M. Fischer, A. Bacher und E. Sackmann (2002). "Mimicking Tissue Surfaces by Supported Membrane Coupled Ultrathin Layer of Hyaluronic Acid". *Langmuir* **19**(5): 1775-1781.
- Simson R. (1998). Dissertation, "Untersuchung der elastischen und plastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mittels mikro-optischer und mikromechanischer Methoden". Fakultät für Physik, Technische Universität München
- Siqueira Petri D. F., G. Wenz, P. Schunk und T. Schimmel (1999). "An Improved Method for the Assembly of Amino-Terminated Monolayers on SiO₂ and the Vapor". *Langmuir* **15**(13): 4520-4523.
- Stroustrup B. (1992a). "Die C++ Programmiersprache, 2., überarb. Aufl." Addison-Wesley. Bonn [u.a.]
- Stroustrup B. (1992b). "Entwurf und Entwicklung von C++" Addison-Wesley. Bonn [u.a.]
- Taubman D. S. und M. W. Marcellin (2001). "Jpeg2000: Image Compression Fundamentals, Standards, and Practice" Kluwer International Series in Engineering and Computer Science
- Vonna L., A. Wiedemann, M. Aepfelbacher und E. Sackmann (2002). "Local force induced conical protrusions of phagocytic cells". *J. of Cell Science* **116**: 785-790.
- Wallace G. K. (1991). "The JPEG Still Picture Compression Standard,". *Communications of the ACM* **14**(4): 31-44.

- Weast R. C. (1971). "Handbook of chemistry and physics" 51. The Chemical Rubber Co (CRC). Ohio
- Wiegand G., T. Jaworek, G. Wegner und E. Sackmann (1997). "Studies of Structure and Local Wetting Properties on Heterogeneous Micropatterned Solid Surfaces by Microinterferometry". *J. Colloid Interface Sci.* **196**: 299-312.
- Wiegand G., R. K. Neumaier und E. Sackmann (1998). "Microinterferometry: three-dimensional reconstruction of surface microtopography for thin-film and wetting studies by reflection interference contrast microscopy (RICM)". *Applied Optics* **37**(29): 6892-6905.
- Zimmermann E., B. Geiger und L. Addadi (2002). "Modeling of the Pore Domain of the GLUR1 Channel: Homology with K⁺ Channel and Binding of Channel Blockers". *Biophys. J.* **82**: 1848-1847.

Eigene Veröffentlichungen

Keller M., J. Schilling und E. Sackmann (2001). „Oscillatory magnetic bead rheometer for complex fluid microrheometry”. *Rev. Sci. Instr.*, 72(9):3626-3634

Marx S., J. Schilling, E. Sackmann und R. Bruinsma (2002). „Helfrich Repulsion and Dynamical Phase-Separation of Multi-Component Surfactant Bilayers”. *Phys. Rev. Lett.* 88(13): 1380102

Sengupta K., J. Schilling, S. Marx, M. Fischer, A. Bacher und E. Sackmann (2003). „Mimicking tissue surfaces by supported membrane coupled ultrathin layer of hyaloronic acid”, *Langmuir* 19(5):1775-1781

Schilling J., K. Sengupta, S. Gönnenwein, A. Bausch und E. Sackmann (2003). „Absolute Interfacial Distance Measurements by Dual Wavelength Reflection Interference Contrast Microscopy”. (*Phys. Rev. E, accepted*)