

ZELLDYNAMIK UND DETEKTION MAGNETISCH MARKIERTER ZELLEN

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Ingenieurwissenschaften
(Dr.-Ing.)
der Technischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von
Nils Lukat
aus Brunsbüttel

2021

1. Gutachterin Prof. Dr. Christine Selhuber-Unkel
2. Gutachter Prof. Dr. Eckhard Quandt

Datum der mündlichen Prüfung: 19.03.2021

Kurzfassung

Dreidimensionale Biomaterialien werden als Gerüstmaterialien für Zellen verwendet und ermöglichen die Proliferation und die Migration von Zellen in drei Dimensionen. Die Entwicklung dieser Materialien zielt auf die Erzeugung künstlichen Gewebes ab, welches z.B. genutzt werden kann, um erkranktes Gewebe zu ersetzen. Dabei ist es jedoch nicht selbstverständlich, dass sich Zellen über das gesamte Volumen des Gerüstmaterials verteilen und es ist davon auszugehen, dass es zu Variationen in der Zellverteilung zwischen einzelnen Proben kommen kann. Gründe dafür können ein Mangel an Nährstoffen in tieferliegenden Bereichen, räumliche Hindernisse, wie zu kleine Poren, oder ungünstige chemische oder mechanische Eigenschaften des Materials oder einer einzelnen Probe sein. Daher ist es wichtig, die Verteilung der Zellen im Volumen jeder einzelnen Probe experimentell zu bestimmen, z.B. bevor die Probe implantiert wird. Der Nachteil bisheriger Methoden zur Bestimmung der räumlichen Verteilung mithilfe eines optischen Mikroskops oder eines Rasterelektronenmikroskops ist, dass eine destruktive Probenvorbereitung benötigt wird, womit die Proben nach der Untersuchung nicht weiterverwendet werden können. Diese destruktive Probenvorbereitung hat zudem den Nachteil, dass zeitaufgelöste Messungen in einer und derselben Probe, z.B. in der Grundlagenforschung, nicht möglich sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Messverfahren zu entwickeln, das die zerstörungsfreie Detektion von Zellenverteilungen in Biomaterialien ermöglicht. Dazu werden die Zellen mit magnetischen Partikeln markiert. Anschließend soll das von diesen Partikeln ausgehende Feld mithilfe eines magnetoelektrischen Sensors detektiert werden. Die Lösung des inversen Problems liefert anschließend die Verteilung der magnetisch markierten Zellen, die dem gemessenen Feld zugrunde liegt.

Um die Zielsetzung zu erreichen, müssen mehrere Herausforderungen bewältigt werden. So erzeugt ein Ensemble magnetischer Nanopartikel erst dann ein Feld in seiner Umgebung, wenn es sich selbst in einem Magnetfeld befindet. Um ein starkes Signal von den Nanopartikeln zu erhalten, sollte dieses Magnetfeld einige Millitesla groß sein. Da Magnetfelder mit dem Abstand zur Quelle stark abnehmen, sollte der Sensor zudem möglichst dicht an der Probe platziert werden. Damit ergibt sich die Herausforderung der Messung einer kleinen Feldvariation in einem vielfach größeren Hintergrundfeld. Aus diesem Grund scheiden viele Magnetfeldsensoren aus, da sie in einem Hintergrundfeld von wenigen Millitesla bereits gesättigt sind. Des Weiteren können magnetische Hintergrundsignale, erzeugt beispielsweise durch stromführende Leitungen, die Messung überlagern und so eine Rekonstruktion der Zellverteilung unterbinden.

Um den genannten Herausforderungen zu begegnen, wird in dieser Arbeit ein ΔE -Effekt Sensor verwendet, der für den optimalen Betrieb ein definiertes Magnetfeld benötigt. Aus diesem Grund kann in diesem Aufbau die Probe sehr nah am Sensor positioniert werden, da der Sensor im Magnetfeld operieren kann. In der vorliegenden Arbeit wird dieses Magnetfeld, das zeitgleich auch die Probe magnetisiert, von einem Permanentmagneten erzeugt. Um das Signal der Probe von möglichen Hintergrundsignalen zu trennen, wird die Probe hier periodisch über den Sensor geführt, wodurch das Signal der Probe im Spektrum bei Vielfachen der Rotationsfrequenz liegt, was eine einfache Trennung der Proben- und Hintergrundsignale ermöglicht. Die Charakterisierung des Aufbaus zeigt, dass die Nachweisgrenze für eine Messung, bei welcher der Probenteller 8 mm vom Sensor entfernt ist, für eine Messzeit von 15 Sekunden bei 20 Mikrogramm liegt.

Um zu beantworten, ob der vorgeschlagene Aufbau für die Detektion von Zellverteilungen eingesetzt werden kann, wird in der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss von Partikeln auf die Zelldynamik untersucht. Es zeigt sich, dass es in Abhängigkeit vom Größenverhältnis der Poren des Gerüstmaterials und den aufgenommenen Partikeln, zu einer Beeinflussung der Zellbewegung kommen kann. Auch wird festgestellt, dass magnetische Mikropartikel zwar intrazellulär durch ein Magnetfeld verschoben werden können, die Bewegungsrichtung der Zellen davon jedoch unberührt bleibt. Dies zeigt, dass die Messung mit dem vorgeschlagenen Aufbau die Zellverteilung nicht verändert und daher die Messung von Zellverteilungen mit diesem Aufbau möglich ist.

Für die Beobachtung der Bewegung intrazellulärer Partikel wurde ein Matlab Programm entwickelt, mit dem intrazelluläre Partikel automatisiert verfolgt und ihre Trajektorien bestimmt werden können. Die so bestimmten Trajektorien einzelner, natürlich vorkommender, intrazellulärer Partikel zeigen hochinteressante superdiffusive Eigenschaften. Um die Ursachen dieser superdiffusiven Bewegung aufzudecken, werden hier mehrere Faktoren untersucht, die zu diesem Verhalten beitragen können.

Da gezeigt wurde, dass Mikrometer große Partikel die Zellbewegung in Strukturen beeinflussen, wird der Fokus bei der Bestimmung von Zellverteilungen mit dem vorgestellten Aufbau auf magnetische Nanopartikel gelegt. Um die Anzahl der nachweisbaren Zellen im Probenvolumen abzuschätzen, wird die Partikelmasse in einzelnen Zellen und ihre Abnahme mit der Zeit bestimmt. Mit Hilfe der dabei ermittelten Daten lässt sich folgern, dass bereits ein kleiner Volumenanteil an Zellen von 0,5 % im verwendeten Probenvolumen von 200 Mikrolitern ausreicht, um ein messbares Signal zu erhalten. Um auch Zellverteilungen in drei Dimensionen zerstörungsfrei auflösen zu können, wird zudem ein neuartiger Aufbau vorgeschlagen.

Abstract

Three dimensional biomaterials are used as scaffold materials for cells to enable their proliferation and migration in three dimensions. The development of these materials seeks to create artificial tissue, which can be used, for example, to replace diseased tissue *in situ*. Despite the success of these materials in enhancing cell growth in three dimensions, it is not guaranteed that the distribution of cells over the volume of these scaffold materials is uniform, leading to areas with little cell growth. These low-growth areas may arise due to a lack of nutrient penetration to deeper areas within the scaffold, small scaffold pores that prevent cells from entering the scaffold itself, or unfavorable chemical or mechanical properties of the material. As it is critical for cells to be evenly distributed throughout the biomaterial in order for it to be used as artificial tissue, it is important to experimentally determine the cell distribution within each individual sample. Previous methods for determining the spatial distribution of cells within biomaterials used optical or scanning electron microscopy techniques. These methods require that the samples be destroyed to obtain accurate cell distributions, rendering any further experiments impossible. Additionally, this destructive sample preparation has the disadvantage that time-resolved measurements are not possible.

The work presented here aims to develop a novel magnetic measurement method that enables the non-destructive and time-resolved detection of cell distributions within biomaterial scaffolds. This is accomplished by marking cells with magnetic particles, whose magnetic field can then be detected by a magnetoelectric sensor. By solving the inverse problem for the measured field, the distribution of the magnetically labelled cells within the scaffold can be determined non-destructively.

In order for this technique to make accurate, reliable measurements, several challenges must be overcome. For example, an ensemble of magnetic nanoparticles can only generate a field when they themselves are within a sufficiently strong magnetic field: to generate a measurable signal from the nanoparticles, this magnetic field should be in the range of a few millitesla. Since magnetic fields decrease strongly with increasing distance from their source, the sensor must be placed as closely as possible to the sample. Furthermore, measuring small magnetic field variations in a background field that is orders of magnitude larger renders magnetic particle measurements challenging: many magnetic field sensors are ruled out because they are saturated in a background field of a few millitesla. Additionally, magnetic background signals generated by electrical components, such as power cables, contribute their own magnetic fields to the sensor signal, further complicating these magnetic cell distribution measurements.

To address these challenges, a ΔE -effect sensor is used in this work. This sensor requires

a defined magnetic field to achieve optimal operation, which also allows the sample to be positioned very close to the sensor. The magnetic field to achieve optimal sensor operation is generated by a permanent magnet that simultaneously magnetizes the sample. In order to separate the sample signal from possible background signals, the sample is moved periodically over the sensor. This method allows the sample signal to be found within the measured spectrum at multiples of the rotation frequency, enabling a simple separation of the sample and background signals. Characterization measurements performed with this system demonstrate that the measurement's detection limit over 15 seconds is 20 micrograms, when the sample plate is 8 mm away from the sensor.

To answer whether the proposed setup can be used to detect cell distributions, this work also examines the influence of magnetic particles on cell dynamics. It turns out that depending on the size ratio of the pores of the scaffold material and the particles used for labelling, the cell movement can be influenced. Furthermore, it is shown that although the position of intracellular magnetic microparticles can be shifted by an applied magnetic field, the direction of cellular motion remains unaffected. This indicates that measurements with this setup will not artificially influence cell distribution and that it is therefore possible to determine cell distributions with the proposed setup.

To observe the movement of intracellular particles, a Matlab program was developed to automatically track intracellular particles. Single particle trajectories of naturally occurring, intracellular particles determined with this program show interesting super-diffusive properties. To discover the origin of this super-diffusive movement, several factors that may contribute to this behavior are examined here. As micrometer-sized particles influence cell movement in structured environments, the measurements of cell distributions with the proposed setup focuses on magnetic nanoparticles. To estimate the number of detectable cells in the sample volume, the particle mass in individual cells, and its decline over time, are determined. With the help of the data determined in this experiments it can be concluded that a small volume fraction of labelled cells of 0,5 % in a sample volume of 200 microliters is sufficient to obtain a measurable signal.

In order to achieve three-dimensional spatial resolution required for measurements in applied biomaterial systems, a new setup design is proposed that can resolve cell distributions in three dimensions non-destructively.

Vorwort

Im Vorwort dieser Arbeit möchte ich zunächst einen Überblick über die technischen Funktionen der PDF-Version dieser Arbeit geben, deren Vorlage die kaobook Klasse von *Frederico Marotta* ist. Anschließend wird der Rahmen beschrieben, in dem diese Arbeit entstanden ist, und an einigen anschaulichen Beispielen die Aspekte in den Fokus gerückt, die mich bei der Beschäftigung mit diesem Forschungsgebiet besonders motiviert haben.

Zunächst also ein paar einleitende Worte zu den technischen Möglichkeiten, die die PDF-Version dieser Arbeit bietet. Beim Lesen wissenschaftlicher Manuskripte störe ich mich oft an der Art, wie man mit Hilfe von Links durch die Arbeit geleitet wird. Oft verweisen verlinkte Nummern im Text auf das Literaturverzeichnis. Klickt man auf einen dieser Links, gelangt man zum Literaturverzeichnis, wo man alle wichtigen Angaben zu dem entsprechenden Zitat findet und teilweise am Titel des Manuskriptes oder am Namen des Autors erkennt, dass man diese Arbeit bereits gelesen hat. Nach dieser Erkenntnis ist es anschließend jedoch oft schwierig, aus dem Literaturverzeichnis wieder an die zuletzt gelesene Stelle im Text zu gelangen, da dies häufig mit langwierigem Scrollen verbunden ist. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit der Name des Erstautoren und der Titel der Arbeit im Seitenrand genannt, um leichter einschätzen zu können, ob man die zitierte Arbeit bereits kennt. Sollte man an weiteren Angaben zu dieser Quelle interessiert sein, führt ein Link wie gewohnt zum Literaturverzeichnis. Um aus dem Literaturverzeichnis schnell zurück zur zuletzt gelesenen Seite zu gelangen, sind auch hinter den Literaturangaben Links zu finden, die einen zu den Seiten leiten, auf denen auf diese Quelle verwiesen wird. Ebenfalls im Seitenrand befinden sich die Bildunterschriften. Insbesondere bei langen Bildunterschriften sehe ich dabei den Vorteil, dass sowohl die Bildunterschrift als auch das Bild zeitgleich sichtbar bleiben, was die Lesbarkeit der Abbildung vereinfacht. Des Weiteren werden Abkürzungen im Seitenrand eingeführt und auch häufiger wiederholt. Auch durch diese Maßnahme soll der Lesefluss vereinfacht werden. Ich hoffe Sie finden diese technischen Hilfsmittel ebenso hilfreich wie ich.

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen 2016 und 2020 im Rahmen des SFB 1261 "Magnetoelektrische Sensoren: von Kompositmaterialien zu biomagnetischer Diagnose" an der Technischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt. Kiel ist, wie kaum eine andere Stadt der Welt, mit dem Segelsport verbunden und Jahr für Jahr pilgern tausende Segelsportbegeisterte zum größten Segelevent der Welt - der *Kieler Woche*. Auch wenn es heutzutage viele navigatorische Hilfsmittel gibt, um als Segler seinen Weg zu finden, so verlassen sich doch viele immer noch auf ihren Magnetkompass, um

die Richtung des Erdmagnetfeldes zu messen und so den richtigen Kurs zu bestimmen. An dieser Stelle sei jedoch bereits darauf hingewiesen, dass die Zuverlässigkeit dieser Methode in Bereichen von neu erbauten Offshore Windparks deutlich abnehmen kann. So wird in heutigen Seekarten darauf hingewiesen, dass es z.B. im Bereich von *Baltic2*, einem Windpark nördlich von Rügen zu Missweisungen von bis zu 60° kommen kann. Dies zeigt, wie anfällig magnetische Methoden für magnetische Störfelder sind, ein Problem, dem auch ein Teil dieser Arbeit gewidmet ist. Zur Messung des Erdmagnetfeldes wurden in den letzten Jahren die traditionellen Kompassse mit Magnetnadel oft durch kleine elektrische Bauelemente ausgetauscht. Anders als der traditionelle Magnetkompass messen diese Sensoren nicht die Richtung des Feldes, sondern nur den Betrag der Feldstärke entlang einer sensitiven Achse. Dass es heute kein Problem mehr ist, mit diesen Sensoren das Magnetfeld der Erde zu bestimmen, zeigt uns ein Blick auf unser Mobiltelefon. In diesem sind drei orthogonal zueinander angeordnete Sensoren eingebaut, die die Größe des Feldes in alle Raumrichtungen messen. Aus den ermittelten Daten kann dann die Richtung zum Nordpol bestimmt werden. Aber wie so oft wollen wir besser werden - und zwar deutlich besser - So gut, dass selbst Felder im Bereich der Biomedizin, die bis zu eine Milliarde Mal kleiner sind als das Erdmagnetfeld, bestimmt werden können.

Ein Teil dieser Arbeit behandelt die Detektion von Feldern, die von magnetischen Nanopartikeln ausgehen. Magnetische Nanopartikel sind ein Hilfsmittel, welches in vielen Bereichen der Nanomedizin erforscht und in anderen bereits eingesetzt wird. Sie können zum Beispiel als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie (MRT), als bildgebendes Mittel bei der Magnetpartikelbildgebung (MPI, engl. "Magnetic Particle Imaging") oder auch als Marker dienen, um bestimmte Moleküle oder Zellen aus einer Suspension zu extrahieren. Man kann also sagen magnetische Partikel sind fast überall - es gibt sogar im Flusssediment lebende Bakterien wie z.B. *Magnetospirillum gryphiswaldense* die solche Partikel synthetisieren können, um sich im Magnetfeld der Erde zu orientieren. Dabei ist die Namensähnlichkeit zwischen *gryphiswaldense* und der deutschen Stadt Greifswald kein Zufall. Der Zusammenhang ist darauf zurückzuführen, dass diese Bakterien erstmals in einem Fluss in Greifswald, der Ryck, nachgewiesen wurden.

Ziel des Projektes, in dessen Rahmen diese Arbeit entstand, ist der Aufbau eines Messstandes zur zeitaufgelösten Messung von Verteilungen magnetisch markierter Zellen. Insbesondere wenn eine visuelle Beobachtung der Zellen nicht möglich ist, z.B. weil die Zellen sich in einem lichtundurchlässigen Substrat befinden, sind magnetische Methoden von besonderer Bedeutung.

Zur Lösung dieser Aufgabe wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Setup erdacht, aufgebaut und charakterisiert, mit dem es möglich ist, 2D (zweidimensionale) Verteilungen von kleinen Mengen magnetischer Nanopartikel zu bestimmen. Diese Messungen sollen dabei ohne magnetische Schirmung auskommen und bereits nach kurzer Messzeit ein Ergebnis liefern und das in einem um viele Größenordnungen größeren Magnetfeld, welches benötigt wird, um die magnetischen Momente der magnetischen

Nanopartikel auszurichten. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden in einem Manuskript [1] veröffentlicht. Worin aber liegen die Herausforderungen, kleine Variationen in einem verhältnismäßig starken Feld nachzuweisen? Das zu lösende Problem dabei ist, dass viele Sensoren mit ausreichend hoher Empfindlichkeit und kleinem Detektionslimit bereits in kleinen Feldern gesättigt sind, einige sogar schon im Erdmagnetfeld. Um sich dies zu veranschaulichen, denken Sie doch einmal an einen Elefanten. Dieser Elefant symbolisiert das Erdmagnetfeld bzw. ein anderes starkes Hintergrundfeld. Auf dem Rücken dieses Elefanten sitzen einige Fliegen. Mit einem entsprechenden Sensor, z.B. einer Feinwaage, kann man zwar das Gewicht der Fliegen bestimmen, aber von der Waage wird nicht viel übrig bleiben, wenn man einen Elefanten mit darauf stellt. Deshalb wird in dieser Arbeit ein ΔE -Effekt Sensor verwendet, der sich von vielen anderen Sensoren dadurch unterscheidet, dass er ein definiertes Magnetfeld von wenigen Millitesla benötigt, um seine maximale Empfindlichkeit zu erreichen. Mit dem aktuell verwendeten Setup ist es möglich, in diesem Feld von einigen Millitesla eine durch Nanopartikel verursachte Variation im Bereich von wenigen Nanotesla zu detektieren.

Mit diesem Aufbau könnten in Zukunft beispielsweise zeitaufgelöste Experimente zur Wundheilung durchgeführt werden, bei denen ein Spalt in einer Ebene mit Zellen zuwächst, die zuvor mit magnetischen Nanopartikeln markiert wurden. Natürlich sind Proben oft nicht zweidimensional, wie bei Experimenten zur Wundheilung, sondern häufig dreidimensional. Ein Beispiel hierfür sind Gerüstmaterialien, auch Scaffolds genannt, die zur dreidimensionalen Kultivierung von Zellen verwendet werden. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit auch die Grundlagen für einen Aufbau zur Bestimmung der 3D-Verteilungen von magnetisch markierten Zellen eingeführt und ein mögliches Design vorgestellt. Wozu aber werden diese Scaffolds benötigt? Ein Scaffold bezeichnet eine schwammartige Struktur aus einem Biomaterial, das z.B. mit verbundenen Kanälen durchsetzt oder aus Fasern aufgebaut ist. In den Kanälen bzw. an den Fasern können sich die Zellen in 3D ausbreiten. Der vorgeschlagene Aufbau könnte in Zukunft also dazu verwendet werden, zerstörungsfrei und zeitaufgelöst zu prüfen, ob sich Zellen tatsächlich in die Tiefe eines solchen Materials ausbreiten. Die dabei erhaltenen Informationen wären zunächst wichtig für die Grundlagenforschung und die Materialentwicklung. Ein Fortschritt in diesem Bereich wäre bahnbrechend, da er Möglichkeiten eröffnen könnte, die wie Science Fiction klingen, z.B. das Züchten künstlicher Organe. Dies ist wünschenswert, da so der bestehende Mangel an passenden Spenderorganen beseitigt wird, indem Patienteneigene Zellen im Scaffold kultiviert werden, um so ein individuell zugeschnittenes Spenderorgan zu erschaffen.

Die Bewegungsfähigkeit der Zellen in 3D Strukturen beeinflusst maßgeblich das Einwachsen von Zellen in die zuvor erwähnten Scaffolds. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die Bewegung und die intrazelluläre Bewegung von Zellen anhand des Modellorganismus *Acanthamoeba castellanii* untersucht. Diese Amöbenart findet sich im Boden und in Gewässern und kann bei Menschen insbesondere im Bereich der Augen zu Entzündungen führen. Die intrazelluläre Bewegung ist dabei insbesondere auch

für die Zellbewegung wichtig, da sie Moleküle und Vesikel transportiert, die Einfluss auf die Zellbewegung haben. Dabei gibt es mehrere Ursachen, die zur intrazellulären Bewegung führen können. Die am besten beschriebenen sind sicherlich die Diffusion, die kleine Partikel über kurze Distanzen verteilen kann, und der gerichtete Transport durch molekulare Motoren. *In vivo* überlagern sich diese Bewegungsformen und müssen voneinander getrennt werden, um sie einzeln beschreiben zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Arbeitsablauf entwickelt, der es ermöglicht, die intrazelluläre Bewegung von Vakuolen in *A. castellanii* effizient und nachvollziehbar zu bestimmen. Vakuolen sind Bestandteile der Zelle, wobei einzelne Vakuolen spezielle Aufgaben übernehmen, wie z.B. die Regulierung des osmotischen Drucks. Die erhaltenen Datensätze wurden in zwei Manuskripten [2, 3] beschrieben, wobei insbesondere die Charakterisierung der stochastischen Bewegung von Interesse ist. Dabei stellt sich heraus, dass die Bewegung von Vakuolen in *A. castellanii* superdiffusiv ist, was darauf hindeutet, dass sie durch einen oder mehrere Mechanismen angetrieben wird. In der vorliegenden Arbeit werden mehrere Mechanismen auf ihren Beitrag zum superdiffusiven Verhalten untersucht. Die dabei betrachteten Mechanismen sind die Änderung der Bewegungsrichtung der Amöbe und die Deformation der Zellmembran.

Weiterhin faszinieren Amöben aufgrund ihrer hohen und gerichteten Geschwindigkeit. So können diese Zellen, deren Länge etwa 20 µm beträgt, sich innerhalb einer Minute um mehrere Mikrometer fortbewegen. Im Rahmen dieser Arbeit soll geklärt werden, ob diese Bewegung durch magnetische Mikropartikel, die sich in einem magnetischen Feld befinden, beeinflusst wird. Diese Untersuchung ist aus zwei Gründen von Interesse. Zum einen muss der Einfluss von Mikropartikeln auf die Zellbewegung untersucht werden, um die Anwendbarkeit des Aufbaus zur Detektion magnetischer Nanopartikel zu bestimmen. Sollte dabei beobachtet werden, dass sich die Bewegung der Zellen durch magnetische Partikel beeinflussen lässt, so müssten daraus Konsequenzen für die Messung folgen. In diesem Fall müssten z.B. die Messzeit begrenzt oder die Feldgradienten reduziert werden, um so den Einfluss der Messung auf die Zellbewegung und damit das Ergebnis, die Verteilung der Zellen im Scaffold, zu minimieren. Zum anderen wäre eine Beeinflussung der Zellbewegung durch magnetische Partikel für andere Anwendungen wünschenswert. Die Zellen könnten in diesem Fall als Vorbild für Mikroroboter dienen, die sich, ferngesteuert durch weitreichende Kräfte, z.B. durch den menschlichen Körper bewegen könnten. Eine solche Fernsteuerung ist für größere Lebewesen wie Schaben bereits kommerziell erhältlich und wird von der Firma *BackyardBrains* mit dem Slogan "The world's first commercially available cyborg" vertrieben. Solche Cyborg-Insekten können, ausgestattet mit einer Kamera, beispielsweise bei der Suche nach verschütteten Personen in eingestürzten Häusern helfen. Da ferngesteuerte Amöben sich sogar im menschlichen Körper bewegen könnten, bestünde die Möglichkeit, dass sie hier ähnlich hilfreiche Aufgaben übernehmen, wie z.B. den Transport von Medikamenten.

Erklärung der Urheberschaft

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit - abgesehen von der Beratung durch die Betreuer - nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Ich versichere weiterhin, dass ich die Inanspruchnahme aller fremder Hilfen aufgeführt habe, sowie, dass ich die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Zudem ist die Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Ich erkläre außerdem, dass die Arbeit bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde und nicht als ganzes veröffentlicht worden ist bzw. zur Veröffentlichung eingereicht wurde.

Ort, Datum

Nils Lukat

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	iii
Abstract	v
Vorwort	vii
Inhaltsverzeichnis	xii
DETEKTION MAGNETISCH MARKIERTER ZELLEN	1
1 Magnetoelektrische Sensoren: Aufbau und Anwendung	7
1.1 Die piezoelektrische Schicht	9
1.2 Die magnetostriktive Schicht	10
1.3 Demodulation des Messsignals	13
1.4 Frequenzabhängigkeit des Sensors	15
2 Magnetische Nanopartikel: Anwendung und Charakterisierung	17
2.1 Magnetische Nanopartikel im Magnetfeld	19
2.2 Aufnahme magnetischer Nanopartikel durch Zellen	20
Bestimmung der Partikelmasse in einzelnen Zellen	20
Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Partikelmasse	23
3 "Magnetic Susceptibility Particle Mapping"	27
3.1 Aufbau	28
Positionieren des Sensors	29
Proben- und Hintergrundsignal	30
3.2 Eigenschaften des MSPM Setups	31
Nachweisgrenze	31
Räumliche Auflösung	33
3.3 Zellmessung	34
3.4 Rekonstruktion	34
Modellierung	35
Systemmatrix	37
Inverses Problem	38
3.5 Aufbau 3D-Setup	41
4 Fazit: DETEKTION MAGNETISCH MARKIERTER ZELLEN	45
ZELLBEWEGUNG UND IHR EINFLUSS AUF DIE INTRAZELLULÄRE DYNAMIK	51
5 Zelldynamik	57
5.1 Amöboide Zellbewegung	57
5.2 Intrazelluläre Bewegung	58
6 Detektion & Tracking von Amöben und Vakuolen	59
6.1 Setup	59

6.2	Bildverarbeitung	60
	Bildsegmentierung	61
	Koordinatentransformation	62
	Detektion von Vakuolen	63
6.3	Tracking	65
7	Untersuchung der Bewegung von Vakuolen	67
7.1	Die mittlere quadratische Verschiebung	67
7.2	Ursachen der Vakuolen-Bewegung	69
	Translation der Amöbe	69
	Rotation der Amöbe	70
	Deformation der Amöbe	75
8	Beeinflussung der Bewegung von Amöben	79
8.1	Beeinflussung durch räumliche Strukturen	79
8.2	Beeinflussung durch magnetische Partikel	81
	Intrazelluläre Position eines Partikels im Magnetfeld	83
9	Fazit: ZELLBEWEGUNG UND IHR EINFLUSS AUF DIE INTRAZELLULÄRE DYNAMIK	85
10	Zusammenfassung	91
A	Publikationen mit Eigenbeteiligung	93
B	Danksagung	95
	Literaturverzeichnis	97

Abbildungsverzeichnis

1.1	Sensor: Aufbau eines ME-Sensors	7
1.2	Sensor: Piezoelektrische Schicht	10
1.3	Sensor: Magnetostriktive Schicht und Arbeitspunkt	11
1.4	Sensor: Demodulation des gemessenen Signals	13
1.5	Sensor: Ablauf der Demodulation	14
1.6	Sensor: Einfluss des Filterverhaltens	15
2.1	Nanopartikel: Verhalten magnetischer Nanopartikel in einem Magnetfeld.	19
2.2	Magnetophorese: Aufbau zur Messung der Partikelmasse in einzelnen Zellen	21
2.3	Magnetophorese: Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Partikelmasse	24
2.4	Magnetophorese: Bestimmung der Wachstumsrate von <i>REF52-wt</i> Zellen.	25
3.1	MSPM Setup: Skizze und Bild vom "Magnetic Susceptibility Particle Mapping-Setup	28
3.2	MSPM Setup: Gemessenes Signal im Zeit und Frequenzbereich.	30
3.3	MSPM Setup: Nachweisgrenze des Setups	32
3.4	MSPM Setup: Räumliche Auflösung des Setups	33
3.5	MSPM Setup: Zellmessung	34
3.6	Rekonstruktion: Von der Messung zur Partikelverteilung mit der Systemmatrix	35
3.7	Modellierung: Berechnung des Feldes einer bekannten Partikelverteilung	36
3.8	Rekonstruktion: Aufstellen der Systemmatrix	37
3.9	Rekonstruktion: Zusammenfügen der Systemeigenschaften	39
3.10	Inverses Problem: Rekonstruktion mit und ohne Rauschen	41
3.11	MSPM 3D: MSPM Setup für 3D-Aufnahmen	42
3.12	MSPM 3D: Zusammenhang zwischen dem Rechts-Singulärvektor $V(:, i)$ und den Ebenenvektoren v_j	44
3.13	MSPM 3D: Vergleich des aktuellen und vorgeschlagenen 3D-Setup	44
5.1	Zelldynamik: Polymerisation eines Aktinfilamentes	57
6.1	Detektion: Setup für die Detektion migrierender Zellen.	60
6.2	Detektion: Bestimmen der Zellkontur	61
6.3	Detektion: Bestimmen von Kreismittelpunkten	64
6.4	Detektion: Optimieren der Kreismittelpunkte	65
6.5	Detektion: Screenshot des <i>MaMuT Viewer</i>	66
7.1	Charakterisierung: Die mittlere quadratische Verschiebung (MSD)	68
7.2	Translation: Koordinatentransformation liefert Bewegungsdaten im Zellsystem	69
7.3	Charakterisierung: MSD im Zellsystem	70
7.4	Rotation: Rotation der Amöbe kann Vakuolen-Bewegung beeinflussen	71
7.5	Rotation: Verfahren zur Detektion der Amöbenrotation aus den Bewegungsdaten einzelner Vakuolen	71
7.6	Rotation: Vergleich der Bewegungsrichtungen zeigt Zusammenhang zwischen Amöben-Daten und Vakuolenensemble	72
7.7	Rotation: Vergleich der Exponenten α	73
7.8	Deformation: Segmentierung der Zelle in dynamischen und statischen Bereich	76

7.9	Deformation: Zusammenhang zwischen Zelldeformation und intrazellulärer Dynamik	77
8.1	Manipulation: Amöbenbewegung in Strukturen	79
8.2	Manipulation: Amöbenbewegung in Kanälen	80
8.3	Manipulation: Amöbentrajektorien im Magnetfeld	81
8.4	Manipulation: Bewegungsrichtung von Amöben und intrazelluläre Position von Mikropartikeln im Magnetfeld	82
8.5	Manipulation: Abstand des Mikropartikels zum Zellmittelpunkt	83
9.1	Fazit: Fangprinzip in Kontaktlinse	88

DETEKTION MAGNETISCH MARKIERTER ZELLEN

Detektion magnetisch markierter Zellen

Die Organ- und Gewebetransplantation ist eine wichtige Therapie, um geschädigtes Gewebe oder versagende Organe zu ersetzen und so die Lebenserwartung der Patienten wiederherzustellen oder zu verbessern.^[4] Weltweit gibt es Tausende von Patienten, die auf ein passendes Spenderorgan warten. Den Angaben auf der Seite des "Organ Procurement and Transplantation Network"^[5] zufolge wird in den USA alle 9 Minuten ein Patient auf die Warteliste für eine Organspende gesetzt, was 160 Patienten am Tag entspricht. Demgegenüber stehen in den USA im Mittel jedoch nur 95 Transplantationen pro Tag. Dies zeigt die enorme Nachfrage nach Spenderorganen. Um diesen Engpass an Spenderorganen in Zukunft beseitigen zu können, wird weltweit an der Herstellung von künstlichem Gewebe gearbeitet.

Das interdisziplinäre Forschungsfeld, das sich mit der künstlichen Herstellung von dreidimensionalem Gewebe beschäftigt, wird als Tissue Engineering bezeichnet.^[6] Um dreidimensionale Gewebe herstellen zu können, müssen die Zellen in Gerüstmaterialien, sogenannten Scaffolds, kultiviert werden. In den letzten Jahren wurde dazu eine Vielzahl an Gerüstmaterialien entwickelt und erforscht, die die folgenden Funktionen und Anforderungen erfüllen müssen: (1) Unterstützung von Zell-Material-Wechselwirkungen, damit die Zellen am Material anhaften und migrieren können, (2) Transport von Gasen und Nährstoffen, um das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der Zellen im Material zu ermöglichen, (3) Biologische Abbaubarkeit des Gerüstmaterials mit einer einstellbaren Abbaurate, damit am Ende des Prozesses nur das neu gebildete Gewebe übrig bleibt, sowie (4) Geringe Toxizität, um Gewebe und Zellen nicht zu schädigen.^[7] Insbesondere die Migration von Zellen in diesen Gerüstmaterialien ist wichtig, da sie bestimmt, ob die Zellen nach der Aussaat auf dem Gerüstmaterial auch in tief liegende Ebenen des Gerüstmaterials vordringen können. Das Migrationsverhalten der Zellen wird dabei neben den Zellparametern wie der Zellsteifheit und -anhaftung auch von den mechanischen und strukturellen Eigenschaften des Gerüstmaterials beeinflusst.^[8] Es wird also deutlich, dass es viele Einflussfaktoren gibt, die das Einwachsen von Zellen in das Gerüstmaterial bestimmen, wodurch es zu Unterschieden zwischen einzelnen Proben desselben Materials kommen kann. Aus diesem Grund sind nicht destruktive Methoden notwendig, um die Zellverteilung in einzelnen Proben bestimmen zu können z.B. bevor sie implantiert werden, um so sicherzustellen, dass es keine Hohlräume gibt, die zu einem Versagen des künstlichen Gewebes führen. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit eine magnetische Messmethode erforscht, um die Verteilung von Zellen zu bestimmen.

Damit von den Zellen ein messbares, magnetisches Signal erzeugt wird, werden diese mit magnetischen Nanopartikeln markiert. Die Detektion von magnetisch markierten Zellen kann dann mit der Detektion von magnetischen Nanopartikeln gleichgesetzt werden, da es diese Nanopartikel sind, die das messbare Signal erzeugen, bzw. ihre Umgebung

[4]: Billiet u.a. (2012), »A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering«

[6]: Derakhshanfar u.a. (2018), »3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances«

[7]: Dhandayuthapani u.a. (2011), »Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review«

[8]: Gutekunst u.a. (2019), »3D Hydrogels Containing Interconnected Microchannels of Subcellular Size for Capturing Human Pathogenic Acanthamoeba Castellani«

so beeinflussen, dass sich ein Kontrast in der jeweiligen Messmethode ergibt. In der Literatur sind mehrere Methoden zu finden, mit denen es möglich ist, magnetische Nanopartikel zu detektieren. Im Folgenden soll ein Überblick über den Stand der Technik gegeben werden.

MRT: Magnetresonanztomographie

CT: Computertomografie

[10]: Yoo u. a. (2011), »Theranostic magnetic nanoparticles«

MPI: Magnetpartikelbildgebung, engl. "Magnetic Particle Imaging"

[11]: Gleich u. a. (2005), »Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles.«

SPION: Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel, engl. "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles"

Magnetische Nanopartikel können mithilfe von Geräten des klinischen Alltags wie MRTs oder CTs[9] nachgewiesen werden. Der Kontrast von magnetischen Nanopartikeln bei Messungen mit einem MRT basiert darauf, dass durch das Magnetfeld im MRT die magnetischen Momente der Nanopartikel ausgerichtet werden und so ein zusätzliches Magnetfeld im untersuchten Körper erzeugen. Dieses zusätzliche Magnetfeld führt zu einer schnelleren Relaxationszeit (T_2) des Protons im Wasser.[10]

Durch diesen Effekt kommt es zu einem hohen Kontrast zwischen normalem Gewebe und Gewebe, in dem sich magnetische Nanopartikel befinden.

Ein Verfahren, das direkt das Feld magnetischer Nanopartikel misst, ist die Magnetpartikelbildgebung (MPI),[11] bei der typischerweise ein magnetisches Wechselfeld mit einer Anregungsfrequenz von 25 kHz verwendet wird, um die Nanopartikel zu magnetisieren. Aufgrund der dynamischen, nichtlinearen Magnetisierungskurve der SPIONs werden dabei Felder mit Frequenzen bei höheren Harmonischen erzeugt. Diese höher harmonischen Komponenten ermöglichen es, das magnetische Anregungssignal vom Signal der Partikel zu trennen. Durch ein zusätzlich überlagertes Gradientenfeld lässt sich der Bereich, in dem die höher Harmonischen erzeugt werden, räumlich begrenzen. Durch eine Variation des Gradientenfeldes kann dieser Bereich im Probenvolumen verschoben werden, sodass dreidimensionale Verteilungen von SPIONs mit einer Abtastrate von einigen Hertz bestimmt werden können.

Mit MPI kann zum Beispiel in Echtzeit der Blutkreislauf im Kleintiermodell visualisiert werden, wenn SPIONs als bildgebendes Mittel in die Blutbahn injiziert werden.[12, 13] In den entstandenen Aufnahmen können lebensgefährliche Verengungen, beispielsweise in der In-Stent-Rostenose, detektiert werden. Restenose bezeichnet dabei die erneute Verengung im Bereich eines Stents, der zuvor eingesetzt wurde, um ein Gefäß zu weiten.[14] Weitere Anwendungen von MPI sind z.B. die Erkennung von Tumoren[15] oder die Verfolgung von magnetisch markierten Stammzellen[16] im Tiermodell. Vorteil dieser magnetischen Methode ist, dass ausschließlich das Signal der Magnetpartikel im Probenvolumen gemessen wird, wodurch sich bei dieser Methode ein sehr guter Kontrast ergibt. Zudem sind die zu messenden Felder mit 25 kHz und mehr hochfrequent, womit sie in Spulen ein deutliches Signal erzeugen, da die induzierte Spannung U abhängig von der zeitlichen Änderung des magnetischen Flusses ist und daher mit der Frequenz zunimmt.

Die räumliche Auflösung des MPI ist abhängig von der Stärke der magnetischen Gradienten im Probenvolumen, die zum Abtasten des Volumens zeitlich verändert werden. Damit einher gehen hohe Anforderungen an die Elektronik, die das Anregungssignal erzeugt. Dieser technische Aufwand zusammen mit der Tatsache, dass Magnetfelder mit dem Abstand zur Quelle sehr stark abnehmen, sind sicher die Hauptgründe dafür, warum diese Methode sich bisher im klinischen Alltag nicht durchsetzen konnte.

[12]: Weizenecker u. a. (2009), »Three-dimensional real-time in vivo magnetic particle imaging«

[13]: Khandhar u. a. (2017), »Evaluation of PEG-coated iron oxide nanoparticles as blood pool tracers for preclinical magnetic particle imaging«

[14]: Wegner u. a. (2020), »Magnetic Particle Imaging: Artifact-Free Metallic Stent Lumen Imaging in a Phantom Study«

Nach dem gleichen Prinzip wie beim MPI werden Magnetpartikel auch beim "Magnetic Particle Mapping" (MPM) angeregt.[17] Dies ist eine neu entwickelte Methode, die im Rahmen des SFB 1261 erforscht wird. Die Untersuchung dieses Verfahrens ist dadurch motiviert, dass der verwendete magnetoelektrische Sensor für Felder, deren Frequenz bei der Resonanzfrequenz des Sensors liegt, eine sehr hohe Empfindlichkeit aufweist. Durch die richtige Wahl der Anregungsfrequenz kann erreicht werden, dass eine Signalkomponente der Probe, die durch das nichtlineare Magnetisierungsverhalten der magnetischen Nanopartikel erzeugt wird, bei der Resonanzfrequenz des Sensors liegt. Dabei werden die Sensoreigenschaften ideal ausgenutzt, wodurch kleine Mengen an magnetischen Partikeln detektierbar sind. Im Unterschied zum MPI ist beim MPM die Anregungsfrequenz um den Faktor 10 kleiner und liegt bei etwa 2,5 kHz.[17]

Eine weitere Methode zur Bildgebung von magnetischen Nanopartikeln basiert auf dem Relaxationsverhalten magnetischer Nanopartikel. [18] Hier werden die Partikel in einem externen Feld ausgerichtet und das Abklingen des Magnetfeldes der magnetischen Nanopartikel nach Abschalten des externen Feldes gemessen. Bewegliche, ungebundene Partikel relaxieren dabei nach dem Brown-Mechanismus,[19] bei dem das gesamte Partikel rotiert. Ist das Partikel gebunden, z.B. an einer Oberfläche, so kann es nicht nach dem Brown Mechanismus relaxieren. Die Relaxation läuft in diesem Fall über den Néel-Mechanismus ab,[19] bei dem es zu einer Rotation der magnetischen Momente innerhalb des Partikels kommt. Für die betrachteten Partikel läuft dieser Néel Mechanismus deutlich langsamer ab als der Brown Mechanismus. Mithilfe der gemessenen Relaxationskurven lassen sich so Aussagen über den Bindungszustand und die Agglomeration der Partikel treffen. Durch die Verwendung mehrerer Anregungsspulen, die um die Probe verteilt sind, ist es mit dieser Methode möglich, dreidimensionale Verteilungen von Partikeln zu bestimmen.[20]

Die Motivation, sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit einem neuen Aufbau für die magnetische Detektion auseinanderzusetzen, liegt darin begründet, dass bisher vorgestellte Methoden wie MPI oder MRT eine hohe finanzielle Investition bedeuten. Daher stehen diese Geräte Arbeitsgruppen im Bereich der Biomaterialforschung kaum zur Verfügung. Aus diesem Grund wird hier ein neues Messprinzip vorgestellt, dessen Aufbau direkt aus den Anforderungen der magnetischen Nanopartikel und des Sensors abgeleitet werden können. So ist eine Herausforderung bei der Messung des Signals von magnetischen Nanopartikeln die, dass sich die Partikel in einem magnetischen Feld befinden müssen, damit sie ein messbares Feld in ihrer Umgebung erzeugen. Durch dieses Anregungsfeld ergibt sich jedoch das Problem, dass viele Magnetfeldsensoren mit hoher Empfindlichkeit in diesem Anregungsfeld bereits gesättigt sind. Das ist beim hier verwendeten magnetoelektrischen Sensor nicht der Fall – im Gegenteil – der hier verwendete Sensor, der nach dem ΔE -Effekt arbeitet, benötigt ein Feld von einigen Millitesla entlang seiner langen Achse, um seine maximale Empfindlichkeit zu erreichen.

Da der Sensor nicht dazu geeignet ist, konstante Felder zu messen, wird die Probe periodisch über den Sensor geführt, um so ein zeitlich periodisches Feld am Ort des Sensors zu erzeugen. So ergibt sich ein Setup, bei dem zum einen die Empfindlichkeit des Sensors optimal eingestellt

[17]: Friedrich u. a. (2019), »Magnetic particle mapping using magnetoelectric sensors as an imaging modality«

[18]: Ludwig u. a. (2005), »Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles in magnetically unshielded environment utilizing a differential fluxgate arrangement«

[19]: Deissler u. a. (2014), »Dependence of Brownian and Néel relaxation times on magnetic field strength«

[20]: Liebl u. a. (2014), »Quantitative imaging of magnetic nanoparticles by magnetorelaxometry with multiple excitation coils«

werden kann und in dem zum anderen die Probe ein deutliches Signal erzeugt, dessen Spektrum nahezu vollständig innerhalb der Bandbreite des Sensors liegt.

In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Komponenten des Aufbaus zur Bestimmung der Zellverteilung vorgestellt. Dazu wird zunächst die Funktionsweise des verwendeten ΔE -Effekt Sensors beschrieben und gezeigt, wie aus der Messung das Signal der Probe extrahiert werden kann. Anschließend werden die Eigenschaften von superparamagnetischen Nanopartikeln eingeführt und es wird experimentell nachgewiesen, wie groß die Masse dieser Partikel in einzelnen Zellen nach der Markierung ist. Sowohl das Kapitel 1 zum ΔE -Effekt Sensor als auch das Kapitel 2 zu den Nanopartikeln zeigen die Notwendigkeit der Anwesenheit eines Magnetfeldes am Ort des Sensors bzw. am Ort der Probe. Aus diesen Bedingungen werden anschließend in Kapitel 3 ein Aufbau abgeleitet und die Nachweisgrenze sowie die räumliche Auflösung des Verfahrens experimentell ermittelt. Es folgt eine Darstellung, wie das System mathematisch beschrieben werden kann und wie sich die Partikelverteilung rekonstruieren lässt, die dem Magnetfeld zugrunde liegt. Aus dieser Beschreibung folgen Bedingungen, die erfüllt sein müssen, um eine dreidimensionale Detektion zu ermöglichen. In Kapitel 4 werden die Ergebnisse zur Detektion magnetischer Partikel zusammengefasst, die Beurteilung der Machbarkeit von Zellmessungen diskutiert und der MSPM Aufbau in die Literatur eingeordnet.

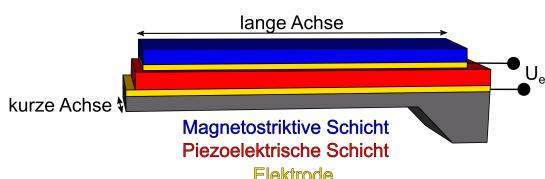
Magnetoelektrische Sensoren: Aufbau und Anwendung

1

Magnetoelektrische (ME) Sensoren zur Messung von Magnetfeldern basieren auf dem magnetoelektrischen Effekt. Dieser Effekt beschreibt das Zusammenspiel zwischen den magnetischen und elektrischen Eigenschaften eines Materials oder eines Verbundwerkstoffes. Die magnetischen und elektrischen Eigenschaften eines Materials werden durch die Orientierung und die Dynamik der magnetischen Momente bzw. durch die Dynamik und Verteilung der Ladungsträger des Materials bestimmt. Aufgrund dieser Eigenschaften können einige Materialien auf magnetische oder elektrische Felder reagieren, sie sind magnetisch bzw. elektrisch aktiv.

Bei magnetisch aktiven Materialien führt eine Umorientierung der magnetischen Momente in einem Magnetfeld zu einer Längenänderung des Materials. Diesen Effekt bezeichnet man als Magnetostriktion. Bei elektrisch aktiven Materialien hingegen führt eine elastische Verformung zu einer Verschiebung der Ladungen im Material. Diesen Effekt bezeichnet man als den direkten Piezoeffekt. Im Gegensatz dazu kommt es beim indirekten Piezoeffekt zu einer elastischen Verformung des Materials durch das Anlegen einer elektrischen Spannung.

Durch das Zusammenspiel dieser magnetischen und elektrischen Eigenschaften im Material kann es entweder zu einer elektrischen Polarisation durch ein Magnetfeld oder zu einer Umorientierung der magnetischen Momente durch ein elektrisches Feld kommen.[21] Auch wenn einige natürlich vorkommende Materialien magnetoelektrische Eigenschaften zeigen, ist die Effektgröße in diesen Materialien verhältnismäßig klein. Deshalb sind diese Materialien nicht für den Bau sensibler Sensoren geeignet. Aus diesem Grund wurden Multilagensensoren entwickelt [22, 23], in denen Schichten aus magnetisch und elektrisch aktiven Materialien mit jeweils erheblich höheren Effektgrößen mechanisch gekoppelt werden, um den magnetoelektrischen Gesamteffekt zu vergrößern.



In Abbildung 1.1 ist der schematische Aufbau eines ME Sensors skizziert, wie er im SFB1261 erforscht wird. Der Sensor besteht aus einem Biegebalken mit aufgebrachter piezoelektrischer und magnetostriktiver Schicht. Die magnetostriktive Schicht reagiert auf ein zeitlich konstantes Magnetfeld mit einer Längenänderung. Durch diese Längenänderung kommt es zu einer elastischen Verformung der piezoelektrischen Schicht und folglich zu einer messbaren Ladungsverschiebung. Betreibt man

1.1 Die piezoelektrische Schicht .	9
1.2 Die magnetostriktive Schicht	10
1.3 Demodulation des Messsignals	13
1.4 Frequenzabhängigkeit des Sensors	15

[21]: Spaldin u. a. (2005), »The Renaissance of Magnetoelectric Multiferroics«

[22]: Mori u. a. (2002), »Magnetoelectric coupling in Terfenol-D/polyvinylidenefluoride composites«

[23]: Dong u. a. (2003), »Ultrahigh magnetic field sensitivity in laminates of TERFENOL-D and $Pb(Mg_{1/3}Nb_{2/3})O_3-PbTiO_3$ crystals«

Abbildung 1.1: Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Magnetoelektrische (ME) Sensor besteht aus einem Biegebalken, auf dem eine piezoelektrische und eine magnetostriktive Schicht aufgebracht ist. Die magnetostriktive Schicht verformt sich im Magnetfeld und in der piezoelektrischen Schicht kommt es aufgrund dieser Verformung zu einer Ladungsverschiebung.

ME: magnetoelektrisch

SFB: Sonderforschungsbereich

LOD: Nachweisgrenze, engl. "limit of detection"

den Sensor auf diese Weise, um konstante Felder zu messen, stellt man fest, das nur verhältnismäßig große Felder messbar sind. Mit anderen Worten, die Nachweisgrenze, auch "limit of detection" (LOD) genannt, ist sehr groß und damit schlecht.

Um das LOD zu kleineren Feldern zu verschieben, kann ein ME Sensor auf mehrere Arten betrieben werden, die im Folgenden kurz vorgestellt werden. Bei allen Betriebsarten wird ausgenutzt, dass sich die Schichten aus aktivem Material auf einem Biegebalken befinden. Lenkt man den Biegebalken aus seiner Ruhelage aus und lässt ihn schlagartig los, so vollführt dieser eine Schwingung. Die Frequenz dieser Schwingung wird als Resonanzfrequenz f_{res} bezeichnet und kann für einen multilagigen Sensor nach folgender Gleichung berechnet werden [24, 25] :

$$f_{\text{res}} = \frac{3,51}{2\pi L^2} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N E_i I_i}{\sum_{i=1}^N m_i}} \quad (1.1)$$

Dabei ist L die Länge des Biegebalkens, N die Anzahl an Lagen auf dem Biegebalken und E_i der E-Modul, I_i das Flächenträgheitsmoment und m_i die Masse pro Einheitslänge einzelner Schichten.

Regt man eine Schwingung des Biegebalkens bei einer anderen Frequenz als der Resonanzfrequenz an, so ist die Schwingungsamplitude deutlich geringer als im resonanten Fall. Da die Schwingungsamplitude die Ursache für die elastische Verformung der piezoelektrischen Schicht ist, kommt es im einfachsten Fall bei einer kleineren Schwingungsamplitude auch zu einer kleineren Ladungsverschiebung, was zu einem kleineren messbaren Signal führt.[26] Damit liegt nahe, dass magnetische Wechselfelder, die mit der Resonanzfrequenz des Sensors schwingen, ein großes Messsignal hervorrufen. Solche magnetischen Wechselfelder werden z.B. beim "Magnetic Particle Mapping" (MPM) gemessen.[17] Viele magnetische Felder von medizinischem Interesse, wie z.B. das Herzsignal, zeigen im Spektrum wesentliche Signalanteile bei kleinen Frequenzen. Daher ist der naheliegendste Ansatz, die mechanischen Eigenschaften des Biegebalkens so zu verändern, dass die Resonanzfrequenz bei diesen kleinen Frequenzen liegt. Dabei kommt es allerdings zu dem Problem, dass diese Sensoren mit niedrigen Resonanzfrequenzen auch durch akustische Einkopplungen zum Schwingen angeregt werden, was zusammen mit dem 1/f-Rauschen zu einer deutlichen Zunahme des Rauschlevels bei niedrigen Frequenzen führt.[27] Um niederfrequente Signale messen zu können, muss daher das Messprinzip angepasst werden. Dazu wird der Sensor zu einer Schwingung bei einer seiner Resonanzfrequenzen angeregt. Die Anregung dieser externen Schwingung kann sowohl magnetisch als auch elektrisch erfolgen. [28, 29] Da das zu messende Feld den E-Modul und damit die mechanischen Eigenschaften des Sensors ändert, kommt es zu einer Modulation des messbaren Stromes.

Nach diesem Prinzip arbeitet auch der Sensor, der in dieser Arbeit verwendet wird. Durch die mechanische Kopplung der Schichten in diesem Sensor kommt es durch ein zu messendes Feld zu einer Änderung des E-Moduls E_{ms} der magnetostriktiven Schicht, was nach Gleichung 1.1 zu einer Änderung der Resonanzfrequenz führt. Der E-Modul gibt allgemein die Steigung im Spannungs-Dehnungs-Diagramm entlang

[24]: Durdaut u. a. (2017), »Modeling and Analysis of Noise Sources for Thin-Film Magnetolectric Sensors Based on the Delta-E Effect«

[25]: Thomson u. a. (1997), *Theory of Vibration with Applications*

[26]: Shi u. a. (2007), »Magnetolectric resonance behavior of simple bilayered Pb(Zr,Ti)O₃-(Tb,Dy)Fe₂/epoxy composites«

[17]: Friedrich u. a. (2019), »Magnetic particle mapping using magnetoelectric sensors as an imaging modality«

[27]: Xing u. a. (2007), »Modeling and the signal-to-noise ratio research of magnetoelectric sensors at low frequency«

[28]: Jahns u. a. (2012), »Sensitivity enhancement of magnetoelectric sensors through frequency-conversion«

[29]: Gojda u. a. (2011), »Fully integrable magnetic field sensor based on delta-E effect«

einer Achse an:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

Dabei ist $\sigma = F/A$ die mechanische Spannung. Die Spannung entspricht einer Kraft F , die auf die Fläche A normiert ist, deren Flächennormale parallel zur Kraft steht. $\epsilon = \Delta l/l_0$ stellt die Dehnung der Ausgangslänge l_0 um die Länge Δl dar. Da die Änderung des E-Moduls ΔE grundlegend für das Messprinzip ist, wird der Sensor als ΔE -Effekt Sensor bezeichnet.

Auf die Schichten dieses Sensors und ihre Aufgaben wird in den nächsten beiden Abschnitten eingegangen. Dabei wird zunächst die piezoelektrische Schicht vorgestellt, die für die Anregung und die Signalerzeugung zuständig ist. Anschließend wird auf die magnetostriktive Schicht eingegangen und gezeigt, wie ein externes Magnetfeld die Schwingung beeinflusst und die Amplitude des messbaren Wechselstromes moduliert. Abschließend wird eine mathematische Beschreibung des Signals eingeführt und gezeigt, wie durch eine Demodulation des gemessenen Signals das Signal der Probe bestimmt werden kann.

In einem zusätzlichen Abschnitt wird die Frequenzabhängigkeit des Sensors vorgestellt, die ein Tiefpassverhalten zeigt. [30] Dieses Verhalten ist bei Messungen mit dem Sensor zu berücksichtigen, da durch die frequenzabhängige Empfindlichkeit des Sensors Signale bei großen Frequenzen, im Vergleich zu Signalen bei kleinen Frequenzen, weniger starke Messsignale hervorrufen.

[30]: Reermann u. a. (2016), »Adaptive Readout Schemes for Thin-Film Magnetolectric Sensors Based on the delta-E Effect«

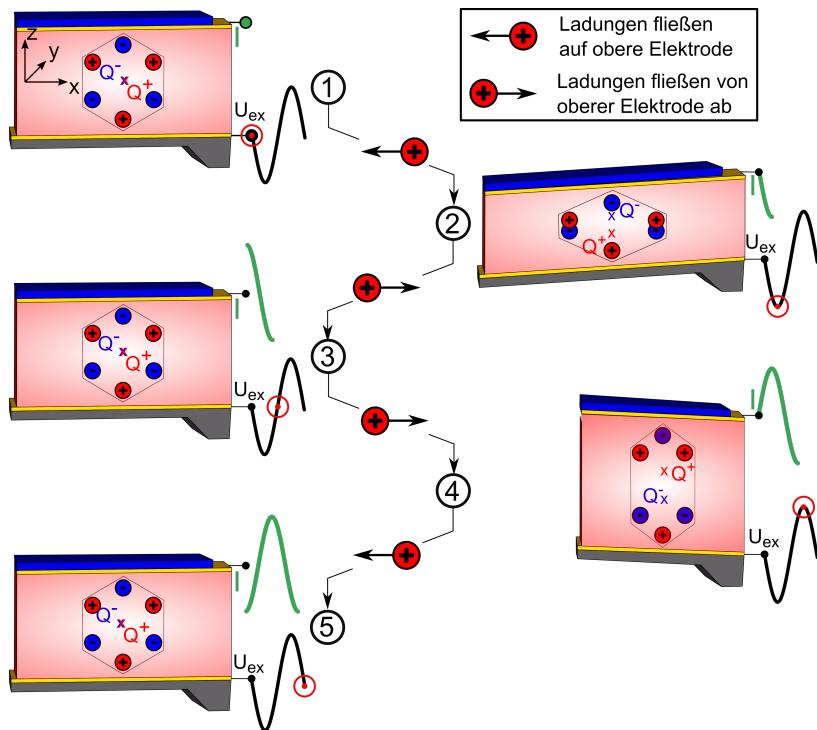
1.1 Einfluss der piezoelektrischen Schicht auf die Sensorfunktion

Bei einem ΔE -Effekt Sensor wird der Biegebalken, durch Anlegen einer elektrischen Wechselspannung an die piezoelektrische Schicht, zum Schwingen angeregt. Diese Anregung ist in Abbildung 1.2 veranschaulicht. In Punkt 1 ist der Sensor in seiner Ruhelage. Durch Anlegen einer negativen Spannung an die untere Elektrode werden die positiven Ladungen der Schicht von dieser Elektrode angezogen und es kommt zu einer Kontraktion der Schicht in z-Richtung. Diese Kontraktion in z-Richtung führt zeitgleich zu einer Längenänderung in x-Richtung, die den Sensor auslenkt. Dieser Zustand ist in Punkt 2 dargestellt. Aufgrund der Ladungsverschiebung zwischen Punkt 1 und 2 kommt es zu einem Strom positiver Ladungen auf die obere Elektrode während dieses Schrittes.

Im nächsten Schritt zwischen Punkt 2 und 3 nimmt die Spannung wieder zu, bis sie im Punkt 3 bei Null angelangt ist. In diesem Schritt fließen positive Ladungen von der oberen Elektrode ab und es kommt zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen Schichtdicke.

Zwischen Punkt 3 und 4 nimmt die Spannung an der unteren Elektrode zu, wodurch es zu einer Abstoßung positiver Ladungen in der Schicht kommt. Mit dieser Abstoßung geht eine Ausdehnung der Schicht in z-Richtung und eine Kontraktion in x-Richtung einher und positive Ladungen fließen weiterhin von der oberen Elektrode ab. Im letzten Schritt zwischen Punkt 4 und 5 stellt sich wieder der Ursprungszustand ein.

Abbildung 1.2: In der piezoelektrischen Schicht befinden sich positive (Q^+) und negative (Q^-) Ladungen. Bezogen auf eine Spiegelung an der xy-Ebene sind diese Ladungen asymmetrisch angeordnet. Ohne äußeres elektrisches Feld liegen die Schwerpunkte der positiven und negativen Ladungen an derselben Position. Oberhalb und unterhalb der piezoelektrischen Schicht befinden sich Elektroden. Durch Anlegen einer Spannung an die untere Elektrode bildet sich zwischen den Elektroden ein elektrisches Feld aus. Dieses elektrische Feld führt zu einer Ladungsverschiebung in der Schicht und damit zu einer Trennung der Ladungsschwerpunkte. Mit dieser Ladungstrennung geht eine Verformung der Schicht einher. Wird, wie in Punkt 2 gezeigt, eine negative Spannung (roter Punkt auf Spannungskurve) an die untere Elektrode angelegt, werden positive Ladungen angezogen. Um das sich ausbildende elektrische Feld auszugleichen, fließen zwischen Punkt 1 und 2 positive Ladungen auf die obere Elektrode. Diese Ladungsverschiebung ist als Strom am Anschluss der oberen Elektrode zu messen und in der Abbildung durch die Pfeile in der Mitte dargestellt. (Abbildung in Anlehnung an [31])



Aufgrund der Verschiebung der Ladungsträger kann ein Strom in der Zuleitung der Elektrode gemessen werden. Dieser wird mit einem Ladungsverstärker in eine Messspannung umgewandelt. Die Frequenz des Wechselstromes ist identisch zur Frequenz der angelegten Wechselspannung. Da sich die Schwingungsamplitude in Abhängigkeit von der Frequenz ändert und sie bei der Resonanzfrequenz am größten ist, ist hier auch die Amplitude der Ladungsträgerverschiebung und damit die Amplitude des Wechselstromes maximal.

Dieses einfache Modell zur Entstehung des Stromes auf die obere Elektrode vernachlässigt die Tatsache, dass die piezoelektrische Schicht zwischen den beiden Elektroden einen Kondensator bildet. Da ein einzelner Kondensator einen Hochpass darstellt, kommt es durch diesen zu einer Beeinflussung der Amplitude des messbaren Signals, die im nächsten Kapitel genauer beschrieben wird.

1.2 Die magnetostriktive Schicht und ihr Einfluss auf das Messignal

Dieser Abschnitt ist in zwei Punkte unterteilt. Im ersten Punkt wird dargestellt, wie sich die E-Module der tragenden Struktur und der magnetostriktiven Schicht verknüpfen lassen, um den feldabhängigen E-Modul des Sensors zu beschreiben. Dieser E-Modul des Sensors ist nach Gleichung 1.1 mit der Resonanzfrequenz des Sensors verbunden, deren Verlauf in Abbildung 1.3c dargestellt ist.

Im zweiten Punkt wird beschrieben, wie diese Änderung der Resonanzfrequenz zu einer Änderung der messbaren Stromamplitude I_0 bei der gewählten Arbeitsfrequenz f_A führt.

Arbeitsfrequenz f_A : Anregungsfrequenz, die bei der Resonanzfrequenz im magnetischen Arbeitspunkt liegt.

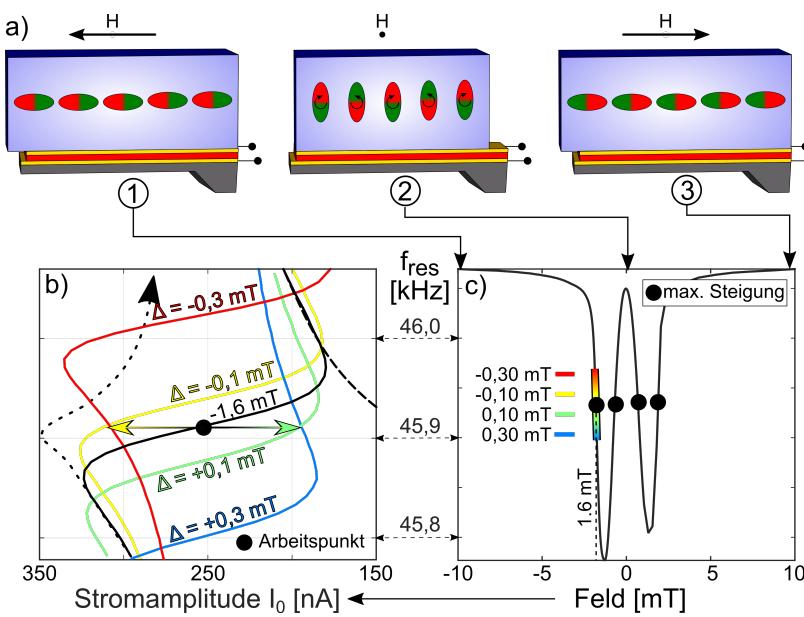


Abbildung 1.3: a) Orientierung der magnetischen Momente in der magnetostriktiven Schicht. Durch die Umorientierung im Feld kommt es zu einer Verformung der Schicht sowie einer Änderung des E-Moduls. b) Feldabhängiger Amplitudenverlauf des messbaren Wechselstromes I_0 . Eine Änderung des magnetischen Feldes führt zu einer Verschiebung des Verlaufs der frequenzabhängigen Amplitude I_0 . Die Frequenz, bei der der maximale Gradient $\partial I_0 / \partial f_{\text{res}}$ zu beobachten ist, entspricht der feldabhängigen Resonanzfrequenz f_{res} . Auf der linken Seite ist der Einfluss der mechanischen Resonanz (gepunktete Linie) und auf der rechten der Einfluss der Kapazität (gestrichelte Linie) angedeutet. c) Feldabhängige Resonanzfrequenz des Sensors. Es gibt 4 Bereiche, in denen eine kleine Änderung des magnetischen Feldes zu einer großen Änderung der Resonanzfrequenz führt. Der Sensor muss bei einem dieser Arbeitspunkte betrieben werden, um die maximale Empfindlichkeit zu erreichen. (Abbildung in Anlehnung an [32])

Eine vergrößerte Ansicht der magnetostriktiven Schicht ist schematisch in Abbildung 1.3a dargestellt. Kleine Magnete in der Schicht symbolisieren die Orientierung der magnetischen Momente. In einem magnetisierenden Magnetfeld H richten sich die magnetischen Momente entlang des externen Feldes aus. Diese Umorientierung der Momente ändert den E-Modul der magnetostriktiven Schicht E_{ms} , was aufgrund der mechanischen Kopplung mit dem Biegebalken zu einer feldabhängigen Änderung der Resonanzfrequenz des Sensors führt. Neben dem E-Modul der magnetostriktiven Schicht ist im Sensor der E-Modul der tragenden Struktur E_t , auf der die aktiven Schichten aufgebracht sind, zu berücksichtigen. Der aus diesen Anteilen zusammengesetzte E-Modul des Sensors E ergibt sich nach [33, 34] zu:

$$\frac{1}{E} = \frac{1}{E_t} + \frac{1}{E_{\text{ms}}}$$

Der Teil des E-Moduls, der die magnetostriktive Schicht beschreibt, ist dabei gegeben durch [34]

$$\frac{1}{E_{\text{ms}}} = \frac{\partial \lambda}{\partial \sigma} = \frac{\partial \lambda}{\partial H} \frac{\partial H}{\partial M} \frac{\partial M}{\partial \sigma} \quad (1.2)$$

Darin ist λ die Magnetostriktion und M die Magnetisierung der magnetostriktiven Schicht, σ die mechanische Spannung und H das magnetisierende Feld. Mit dem Zusammenhang aus [35]:

$$\frac{\partial M}{\partial \sigma} = \left(\frac{1}{\mu_0} \right) \frac{\partial \lambda}{\partial H}$$

[33]: Spetzler u. a. (2019), »Frequency Dependency of the Delta-E Effect and the Sensitivity of Delta-E Effect Magnetic Field Sensors«

[34]: Lee (1955), »Magnetostriction and magnomechanical effects«

Magnetostriktion λ : Dehnung der Ursprungslänge l um Δl

$$\lambda = \frac{\Delta l}{l}$$

Der Ausdruck 1.3 ergibt sich aus dem Ausdruck 1.2 mit:

$$\frac{\partial M}{\partial \sigma} = \left(\frac{1}{\mu_0} \right) \frac{\partial \lambda}{\partial H}$$

ergibt sich für den E-Modul in Gleichung 1.2 der Ausdruck 1.3:

$$\frac{1}{E_{ms}} = \frac{\partial \lambda}{\partial H} \frac{\partial H}{\partial M} \frac{\partial M}{\partial \sigma} \quad (1.2)$$

$$= \frac{(\partial \lambda / \partial H)^2}{\mu_0 \partial M / \partial H} \quad (1.3)$$

$$= \frac{\chi_{me}^2}{\mu_0 \chi} \quad (1.4)$$

Darin ist χ_{me} die magnetoelastische und χ die magnetische Suszeptibilität. Mit dem Zusammenhang in Gleichung 1.4 kann der Verlauf des feldabhängigen E-Moduls des Sensors aus der Magnetisierungskurve der magnetostriktiven Schicht abgeleitet werden. Dabei gilt der Zusammenhang $\lambda \propto M^2$ zwischen der Magnetostriktion λ und der Magnetisierung M . [36] Beispiele für den Verlauf der gemessenen $M(H)$, $\lambda(H)$ und $E(H)$ Kurven für amorphes FeCoSiB und die Zusammenhänge mit der magnetoelastischen und der magnetischen Suszeptibilität sind in Spetzler u.a.[33] illustriert. Aufgrund der Proportionalität in Gleichung 1.1 ähnelt der feldabhängige Verlauf des E-Moduls dem Verlauf der Resonanzfrequenz, der in Abbildung 1.3c dargestellt ist.

Im zweiten Punkt wird jetzt gezeigt, wie diese Änderung der Resonanzfrequenz durch das Feld einer Probe zu einer Modulation der Stromamplitude I_0 führt. Der Verlauf der feldabhängigen Resonanzfrequenz in Abbildung 1.3c zeigt vier Bereiche, in denen eine kleine Änderung des Magnetfeldes entlang der langen Achse des Biegebalkens zu einer großen Änderung der Resonanzfrequenz führt. Diese Punkte maximaler bzw. minimaler Steigung stellen die magnetischen Arbeitspunkte dar. Bei Messungen im Rahmen dieser Arbeit liegt die Anregungsfrequenz typischerweise im Bereich zwischen 45,885 kHz und 45,905 kHz und die Anregungsamplitude zwischen 1,3 V und 1,5 V. [1]

Um den Sensor optimal zu betreiben, hat sich bewährt, die idealen Anregungsparameter direkt vor der Messung zu bestimmen. Bei diesen idealen Anregungsparametern liegt die Nachweisgrenze des Sensors im Bereich von $448 \text{ pT/Hz}^{1/2}$. Bei der verwendeten Anregungsfrequenz wird die zweite Biegemode [37] des Sensors angeregt. Die Biegemode gibt dabei an, wo die Schwingungsknoten der Schwingung liegen. Die magnetische Feldstärke am verwendeten Arbeitspunkt liegt bei etwa $-1,6 \text{ mT}$. Das Feld, das den magnetischen Arbeitspunkt bestimmt, wird als Bias-Feld bezeichnet. Die Änderung der Resonanzfrequenz ist in der Abbildung 1.3c in einem Bereich von $\pm 0,3 \text{ mT}$ um den Arbeitspunkt farblich hervorgehoben.

Wie es durch eine Änderung der Resonanzfrequenz des Sensors zu einer Änderung der Amplitude des Wechselstromes im Arbeitspunkt kommt, ist in Abbildung 1.3b dargestellt. In der Abbildung sind die frequenzabhängigen Amplitudenverläufe für verschiedene magnetische Feldstärken um den Arbeitspunkt von $-1,6 \text{ mT}$ dargestellt. Die Farben dieser Kurven verknüpfen die Daten in Abbildung 1.3b und c miteinander. Die schwarze Kurve zeigt den frequenzabhängigen Amplitudenverlauf im magnetischen Arbeitspunkt. Der optimale elektrische Arbeitspunkt auf der schwarzen Kurve liegt an dem Punkt der größten Steigung $\partial I_0 / \partial f_{res}$. Ausgehend von diesem Arbeitspunkt nimmt die Amplitude des Stromes I_0 für eine abnehmende Anregungsfrequenz bis zu einem

[1]: Lukat u.a. (2020), »Mapping of magnetic nanoparticles and cells using thin film magnetoelectric sensors based on the delta-E effect«

[37]: Spetzler u. a. (2019), »Magnetic Sensitivity of Bending-Mode Delta-E-Effect Sensors«

Bias-Feld: Magnetfeld beim magnetischen Arbeitspunkt

lokalen Maximum zu. Dieser Abschnitt der Kurve wird wesentlich durch die mechanische Resonanz des Biegebalkens bestimmt, die durch die schwarze, gepunktete Linie angedeutet ist. Für Frequenzen größer als die Arbeitsfrequenz nimmt die Amplitude des Stromes bis zu einem lokalen Minimum ab. Dieser Teil wird maßgeblich durch die Kapazität der Schicht zwischen den Elektroden bestimmt, deren Impedanz mit der Frequenz abnimmt, wodurch der Strom steigt (gestrichelte schwarze Linie).

Der frequenzabhängige Verlauf der Amplitude I_0 ändert sich mit dem Feld am Ort des Sensors. Eine Abnahme des Feldes um 0,1 mT am Ort des Sensors führt beispielsweise zu dem in Abbildung 1.3b gelb dargestellten Amplitudenverlauf. Da der Arbeitspunkt durch die Wahl der Arbeitsfrequenz festgelegt ist, führt diese Abnahme des Feldes zu einer höheren Amplitude des Wechselstroms bei der Arbeitsfrequenz (gelber Pfeil). Entsprechend führt eine Zunahme des Feldes um 0,1 mT zur grünen Kurve, und damit zu einer Abnahme der Amplitude.

Impedanz: Wechselstromwiderstand, der das Verhältnis von elektrischer Spannung und Stromstärke angibt.

1.3 Mathematische Beschreibung und Demodulation des Messsignals

Durch die Änderung des magnetischen Feldes am Ort des Sensors kommt es zu einer Modulation der Amplitude des vom ΔE -Effekt Sensor ausgegebenen Wechselstromes. Ein Beispiel für ein gemessenes Signal ist in Abbildung 1.4a gezeigt. In diesem Signal zeigt sich deutlich das Anregungssignal (Abbildung 1.4b). Die Modulation dieses Signals zeigt sich im Verlauf der Einhüllenden (Abbildung 1.4c). Ohne zusätzliches Feld wäre die Amplitude des Signals über den gesamten Zeitbereich konstant. Diese konstante Amplitude ist in der Abbildung durch die rote Linie angedeutet. Aufgrund des zusätzlichen Feldes, das z.B. von einer Probe oder einem Hintergrundsignal ausgeht, wird die Amplitude moduliert und liegt zeitweise über bzw. unter dieser roten Linie.

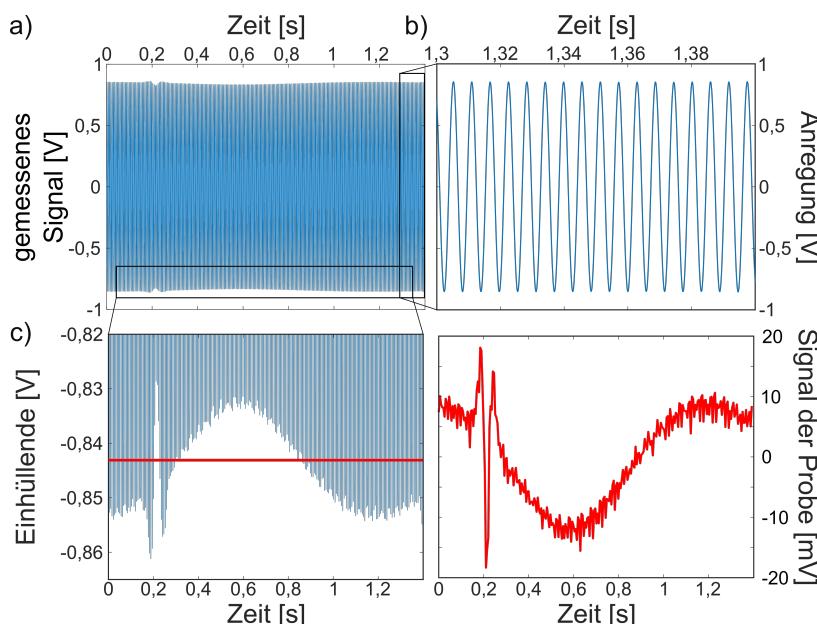


Abbildung 1.4: a) Vom ΔE -Effekt Sensor gemessenes Signal. b) Anregungssignal des ΔE -Effekt Sensors. Da der ΔE -Effekt Sensor durch Anlegen einer Wechselspannung bei der Arbeitsfrequenz zum Schwingen angeregt wird, kommt es in der piezoelektrischen Schicht zu einer periodischen Verschiebung der Ladung und folglich zu einem Wechselstrom. c) Einhüllende des gemessenen Signals. Ein magnetisches Signal ändert den E-Moduls und moduliert damit die Stromamplitude. Diese Modulation ist deutlich am Verlauf der Einhüllenden zu erkennen. d) Demoduliertes Signal. Um das Nutzsignal aus dem Messsignal zu extrahieren, wird es demoduliert.

Um das Signal der Probe aus dem gemessenen Signal zu erhalten muss es demoduliert werden. Dazu wird zunächst eine mathematische Beschreibung des Signalverlaufes eingeführt.[38] Anschließend wird das Verfahren der Demodulation vorgestellt, mit dem das Signal der Probe aus der Messung extrahiert werden kann.

Das gemessene Signal ist proportional zu einem zeitabhängigen Wechselstrom $i_m(t)$ der Frequenz $f = \omega/2\pi$, dessen Amplitude $A(t)$ von einem Magnetfeld $B(t)$ moduliert wird. Der zeitlich veränderliche Strom $i_m(t)$ kann daher durch folgenden Zusammenhang beschrieben werden

$$i_m(t) = A(t) \cos(\omega t + \phi(t)) \quad (1.5)$$

$$= A(t) \cos(\phi(t)) \cos(\omega t) - A(t) \sin(\phi(t)) \sin(\omega t) \quad (1.6)$$

$$= I(t) \cos(\omega t) - Q(t) \sin(\omega t),$$

mit der Signalzuordnung $I(t) = A(t) \cos(\phi(t))$ und $Q(t) = A(t) \sin(\phi(t))$. Die zeitlich variierende Phase $\phi(t)$ ist zu berücksichtigen, da $A(t)$ und $\cos(\omega t)$ keine feste Phasenbeziehung aufweisen müssen. $I(t)$ und $Q(t)$ können als der Real- und Imaginärteil des Signals der Probe $z(t)$ aufgefasst werden, das eine Schwingung $\cos(\omega t)$ moduliert. Die Bezeichnungen $I(t)$ und $Q(t)$ der Signale beziehen sich auf die Phasenlage mit Bezug auf das Anregungssignal. So ist das Signal $I(t)$ mit dem Anregungssignal in Phase, während $Q(t)$ eine Phasenverschiebung von 90° aufweist, was als Quadratur bezeichnet wird.

$I(t)$ und $Q(t)$ sind zunächst unbekannt, können aber durch eine Multiplikation mit $\cos(\omega t)$ bzw. $-\sin(\omega t)$ aus dem gemessenen Signal bestimmt werden. Es folgt:

$$\begin{aligned} i_m(t) \cos(\omega t) &= I(t) \cos(\omega t) \cos(\omega t) - Q(t) \sin(\omega t) \cos(\omega t) \\ &= \frac{1}{2} I(t) [1 + \cos(2\omega t)] - \frac{1}{2} Q(t) \sin(2\omega t) \\ &= \frac{1}{2} I(t) + \frac{1}{2} [I(t) \cos(2\omega t) - Q(t) \sin(2\omega t)] \end{aligned}$$

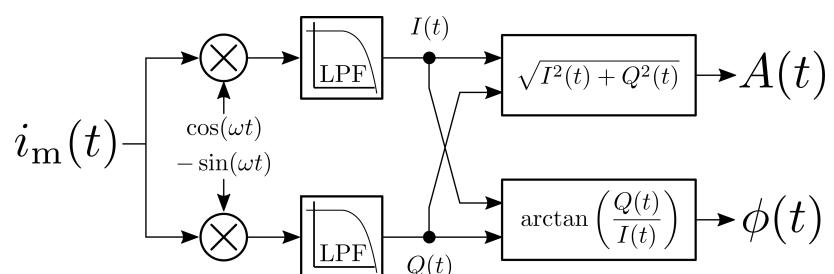
Neben dem gewünschten Basisbandsignal $I(t)$ entstehen zusätzlich die Mischprodukte $I(t) \cos(2\omega t)$ und $Q(t) \sin(2\omega t)$ mit doppelter Frequenz, die durch einen Tiefpassfilter (LPF) aus dem Signal entfernt werden können. Nach dem gleichen Schema ergibt sich:

$$\begin{aligned} i_m(t) \cdot (-\sin(\omega t)) &= -I(t) \cos(\omega t) \sin(\omega t) + Q(t) \sin(\omega t) \sin(\omega t) \\ &= -\frac{1}{2} I(t) \sin(2\omega t) + \frac{1}{2} Q(t) [1 - \cos(2\omega t)] \\ &= \frac{1}{2} Q(t) - \frac{1}{2} [I(t) \sin(2\omega t) + Q(t) \cos(2\omega t)] \end{aligned}$$

Auch hier werden die Mischprodukte mit einem Tiefpassfilter entfernt. Der konstante Faktor $\frac{1}{2}$ kann durch eine anschließende Verstärkung des Signals kompensiert werden.

LPF: Tiefpassfilter, engl "low-pass filter"

Abbildung 1.5: Durch eine Tiefpassfiltration der Produkte des gemessenen Signals mit $\cos(\omega t)$ bzw. mit $-\sin(\omega t)$ kann der Realteil $I(t)$ und der Imaginärteil $Q(t)$ des Signals der Probe bestimmt werden. Aus dem Real- und Imaginärteil des Signals der Probe lässt sich die zeitlich veränderliche Amplitude $A(t)$ und Phase $\phi(t)$ bestimmen.(In Anlehnung an [38])



Zusammenfassend ist die Bestimmung von $I(t)$ und $Q(t)$ in Abbildung 1.5 dargestellt. $I(t)$ und $Q(t)$ können durch eine Multiplikation des gemessenen Signals i_m mit $\cos(\omega t)$ bzw. $-\sin(\omega t)$ und einer anschließenden Tiefpassfilterung der Produkte bestimmt werden. Die Amplitude des Signals der Probe $z(t)$ ergibt sich dann aus dem Betrag der komplexen Zahl:

$$A(t) = |z| = \sqrt{I^2(t) + Q^2(t)} \quad (1.7)$$

1.4 Frequenzabhängigkeit der Empfindlichkeit eines ΔE -Effekt Sensors

Die Empfindlichkeit des verwendeten ΔE -Effekt Sensors ist frequenzabhängig und zeigt ein Tiefpassverhalten. Das Signal der Probe wird vom Sensor daher gefiltert ausgegeben, wobei der Einfluss höherer Frequenzen abnimmt. Der Zusammenhang zwischen dem gemessenen und dem originalen Signal kann durch eine Transferfunktion beschrieben werden.

In guter Näherung wird diese Transferfunktion durch einen Bessel-Filter 1. Ordnung beschrieben.[30] Auch experimentell kann die Transferfunktion ermittelt werden. Dazu wird am Ort des Sensors ein bekanntes Signal erzeugt, z.B. mit einer Helmholtz-Spule, und mit dem Sensor gemessen. Die Transferfunktion $H(f)$ ergibt sich aus dem Quotienten der Spektren des gemessenen $Y_m(f)$ und des vorgegebenen Signals $Y_o(f)$ [39]

$$H(f) = \frac{Y_m(f)}{Y_o(f)} \quad (1.8)$$

[30]: Reermann u. a. (2016), »Adaptive Readout Schemes for Thin-Film Magnetolectric Sensors Based on the delta-E Effect«

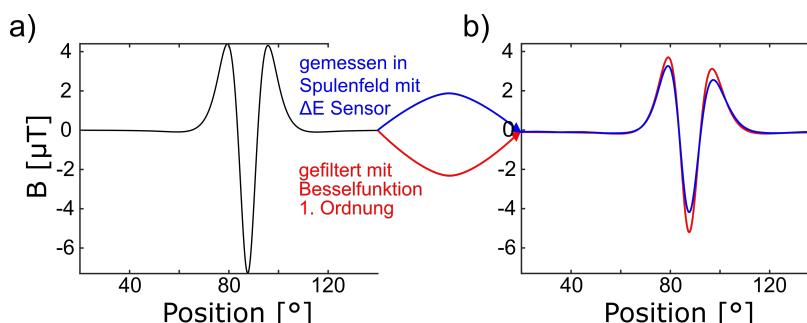


Abbildung 1.6: a) Verlauf eines vorgegebenen magnetischen Signals, das mithilfe eines Funktionsgenerators im Zentrum einer Spulenanordnung erzeugt wird.
b) Aufgrund des Filterverhaltens des Sensors weist das gemessene Feld (blau) einen leicht veränderten Verlauf auf. Dieses gemessene Signal ähnelt dem Signal, das man erhält, wenn man das Signal aus a) mit einem Bessel-Filter 1. Ordnung für eine Grenzfrequenz von 56 Hz filtert (rot).

Dieses Vorgehen ist in Abbildung 1.6 dargestellt. Abbildungsteil a) zeigt den zeitlichen Verlauf eines simulierten Signals (Abschnitt 3.4). Dieses Signal wird mithilfe eines Funktionsgenerators im Zentrum einer Spulenanordnung erzeugt. Der vom Sensor aufgenommene Feldverlauf ist in Abbildung 1.6b (blau) dargestellt. Die rote Kurve in dieser Abbildung erhält man durch die Anwendung eines Bessel-Filters 1. Ordnung mit einer Grenzfrequenz von 56 Hz. Der ähnliche Verlauf des gemessenen und simulierten Verlaufes bestätigt, dass der Sensor als Besselfilter 1. Ordnung betrachtet werden kann. Im Vergleich zum originalen Signal weisen die gefilterten Signale eine Asymmetrie bezogen auf das Minimum auf und ihre Amplituden sind etwas kleiner.

Magnetische Nanopartikel: Anwendung und Charakterisierung

2

Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel (SPIONs) können in vielen Bereichen der Medizin eingesetzt werden. Aufgrund ihrer geringen Größe von einigen Nanometern Durchmesser sind die magnetischen Momente innerhalb eines Partikels alle in dieselbe Richtung ausgerichtet. Die Magnetisierung eines einzelnen Partikels ist damit gesättigt. Durch die brownsche Molekularbewegung wird die Lage der magnetischen Partikel im Raum fortwährend verändert, wobei die magnetischen Momente innerhalb der Partikel mitrotieren. Dadurch sind die magnetischen Momente einzelner Partikel statistisch im Raum verteilt. Die von den magnetischen Momenten ausgehenden Felder heben sich daher gegenseitig auf, weswegen außerhalb des Partikelensembles kein Magnetfeld messbar ist. In einem externen Feld nimmt die Magnetisierung dieses Partikelensembles zu, da sich die magnetischen Momente entlang der Feldlinien des externen Feldes ausrichten. Eine lineare Zunahme der Magnetisierung mit dem magnetisierenden Feld ist die charakteristische Eigenschaft von paramagnetischen Stoffen. Da SPIONs einen deutlich größeren Anstieg der Magnetisierung mit dem Feld als paramagnetische Materialien aufweisen, spricht man in diesem Fall von Superparamagnetismus.

Eine Reihe von Anwendungen nutzt das Verhalten von SPIONs in magnetischen Wechselfeldern. Die dabei verwendeten Frequenzen liegen im Bereich von einigen mHz bis zu einigen hundert kHz. Werden SPIONs mit hohen Frequenzen von einigen hundert kHz angeregt, kommt es zu einer Erwärmung des umliegenden Gewebes durch die Rotation der magnetischen Momente.[40, 41] Dies wird z.B. bei der Hyperthermie zur gezielten Behandlung von Tumoren eingesetzt. Mit einer Reduktion der Anregungsfrequenz nimmt auch das Maß der Erwärmung ab. Dieser Frequenzbereich von einigen kHz wird für bildgebende Verfahren wie die Magnetpartikelpildgebung (MPI) oder das im Rahmen des SFB1261 untersuchte "Magnetic Particle Mapping" verwendet. [11, 17]

Ein weiterer Einsatzbereich von SPIONs ist die Bestimmung der Flussrichtung von Lymphe im Gewebe um einen Tumor. Die Kenntnis dieser Flussrichtung ist für Patienten mit Brustkrebs wichtig, da sie die Richtung bestimmt, in die metastasierende Tumorzellen abtransportiert werden. Bei diesem Verfahren werden um den Tumor SPIONs ins Gewebe injiziert und ihre Ansammlung in sogenannten Wächterlymphknoten bestimmt, die anschließend gezielt entfernt werden können.[42] In diesem Bereich gibt es sowohl Ansätze, die das dynamische Verhalten von SPIONs in magnetischen Wechselfeldern ausnutzen, als auch Ansätze, bei denen die Partikel im Feld eines Permanentmagneten ausgerichtet werden.[43, 44] Niedrige Frequenzen, zum Teil kleiner als 1 Hertz, werden bei der Bildgebung über die Magnetorelaxation (MRX) verwendet.[20]

2.1 Magnetische Nanopartikel im Magnetfeld	19
2.2 Aufnahme magnetischer Nanopartikel durch Zellen	20
Bestimmung der Partikelmasse in einzelnen Zellen	20
Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Partikelmasse	23

SPIONs: Superparamagnetische Eisenoxid-Nanopartikel, engl. "Superparamagnetic iron oxide nanoparticles"
MPI: Magnetpartikelpildgebung, engl. "Magnetic Particle Imaging"

[40]: Tay u. a. (2018), »Magnetic Particle Imaging-Guided Heating in Vivo Using Gradient Fields for Arbitrary Localization of Magnetic Hyperthermia Therapy«
[41]: Osaci u. a. (2020), »Influence of the magnetic nanoparticle coating on the magnetic relaxation time«

[42]: Gleich u. a. (2005), »Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles.«

[43]: Friedrich u. a. (2019), »Magnetic particle mapping using magnetoelectric sensors as an imaging modality«

[44]: Madru u. a. (2012), » ^{99m}Tc -labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles for multimodality SPECT/MRI of sentinel lymph nodes«

[45]: Cousins u. a. (2015), »Novel handheld magnetometer probe based on magnetic tunnelling junction sensors for intraoperative sentinel lymph node identification«

[46]: Sekino u. a. (2018), »Handheld magnetic probe with permanent magnet and Hall sensor for identifying sentinel lymph nodes in breast cancer patients«

AC: Wechselstrom, engl. "Alternating current"

MPS: Magnet-Partikel-Spektrometer, engl. "Magnetic particle spectrometer"

MACS: engl. "Magnetic Activated Cell Sorting"

[48]: Pamme u.a. (2006), »Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis«

[49]: Robert u.a. (2011), »Cell sorting by endocytotic capacity in a microfluidic magnetophoresis device«

[50]: Monzel u.a. (2017), »Magnetic control of cellular processes using biofunctional nanoparticles«

[51]: Hoffmann u.a. (2013), »Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles«

Mikrotubuli: Röhrenförmige Proteinkomplexe in Zellen

Das frequenzabhängige Verhalten von SPIONs über einen großen Frequenzbereich wird mit AC-Suszeptometern bestimmt. Dabei wird die frequenzabhängige komplexe Suszeptibilität der Probe ermittelt.[45] Resultate aus diesen Messungen geben Informationen über die Größe und den Bindungszustand der Partikel. Durch die Variation der Frequenz über einen großen Bereich steigen die Anforderungen an die verwendeten Verstärker. Aus diesem Grund ist mit AC-Suszeptometern nur die Erzeugung von relativ kleinen Magnetfeldern im unteren Millitesla Bereich möglich. Um das Verhalten von SPIONs in größeren Wechselfeldern dafür aber nur bei bestimmten Frequenzen zu bestimmen, kann ein Magnet-Partikel-Spektrometer (MPS) verwendet werden.[46]

Eine weitere Anwendung von SPIONs ist die magnetisch aktivierte Separation von Zellen (MACS) aus einem Gemisch verschiedener Zellsorten.[47] Dazu werden die SPIONs beschichtet, um nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an speziellen Zellen anzuhafsten. Separiert werden die magnetisch markierten Zellen anschließend, indem sie mit einem Magneten aus der Zellkultur herausgezogen werden. Um Zellen differenzierter voneinander zu trennen, kann eine Mikrofluidik verwendet werden, wie sie in der Arbeit von Pamme u.a.[48] vorgestellt wird. Dabei wird ein gebündelter Strahl von Zellen in einem laminaren Fluss durch eine Probekammer geleitet. Durch das inhomogene Feld eines Permanentmagneten werden die Zellen des Strahles, entsprechend der internalisierten Konzentration an magnetischen Nanopartikeln, unterschiedlich stark vom Permanentmagneten angezogen. Nach Durchlaufen der Probenkammer wird der laminare Fluss in mehrere Kanäle aufgespalten. Da Zellen mit hoher Konzentration im laminaren Fluss stärker abgelenkt werden, befinden sich in dem Kanal, der sich am dichtesten am Permanentmagneten befindet, die am stärksten markierten Zellen. In der Arbeit von Robert[49] wurde gezeigt, dass es mit diesem Aufbau möglich ist, Zellen mit unterschiedlicher Aufnahmekapazität voneinander zu trennen.

Ein weiteres großes Anwendungsfeld von magnetischen Nanopartikeln liegt in der Kontrolle zellulärer Prozesse.[50] So können magnetische Nanopartikel verwendet werden, um Zellen magneto-mechanisch, magnethermisch oder magneto-molekular zu stimulieren. Ein faszinierendes Beispiel für die magneto-molekulare Stimulation wird in der Arbeit von Hoffmann u.a.[51] vorgestellt. Diese Untersuchung zeigt, dass es möglich ist, die Polymerisation von Mikrotubuli durch funktionalisierte Mikropartikel gezielt zu starten. Dazu wird die Oberfläche der Nanopartikel mit einem Protein (RanGTP) funktionalisiert. Nimmt die Konzentration dieses Proteins innerhalb der Zelle über einen bestimmten Grenzwert zu, so kommt es zu einer sternförmigen Ausbildung von Mikrotubuli. In der Arbeit sind die Nanopartikel, an die das Protein gebunden ist, zunächst über die gesamte Zelle verteilt, womit die lokale Konzentration des Proteins unterhalb des Grenzwertes zur Ausbildung von Mikrotubuli liegt. Durch ein äußeres, inhomogenes Magnetfeld können die Nanopartikel dann in einem Bereich der Zelle angehäuft werden, womit die Konzentration des Proteins in diesem Bereich über den Grenzwert steigt und es zur Bildung von Mikrotubuli kommt.

Diese Übersicht der Anwendungsbereiche von magnetischen Nanopartikeln verdeutlicht eindrucksvoll, wie umfangreich ihre Anwendungen sind. In dieser Arbeit werden die magnetischen Nanopartikel verwendet, um ein Signal von Zellen zu erhalten und daraus die Zellverteilung

zu bestimmen. Daher wird im nächsten Abschnitt zunächst das Signal beschrieben, welches magnetische Partikel in einem magnetisierenden Feld erzeugen. Anschließend folgt die Bestimmung der Masse an magnetischen Nanopartikeln in einzelnen Zellen. Die Kenntnis dieser Masse und ihres zeitlichen Verlaufes ist wichtig, um bestimmen zu können, wie viele Zellen mit dem im folgenden Kapitel vorgestellten MSPM Setup detektiert werden können.

2.1 Magnetische Nanopartikel im Magnetfeld

Jedes magnetische Nanopartikel besitzt ein magnetisches Moment und ist folglich von einem magnetischen Feld umgeben. Der Feldvektor \vec{B} in einem Abstand \vec{r} von einem magnetischen Dipol \vec{m} ist durch

$$\vec{B}(\vec{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi r^2} \frac{3\vec{r}(\vec{m} \cdot \vec{r}) - \vec{m}r^2}{r^3} \quad (2.1)$$

gegeben. Darin ist μ_0 die magnetische Feldkonstante.

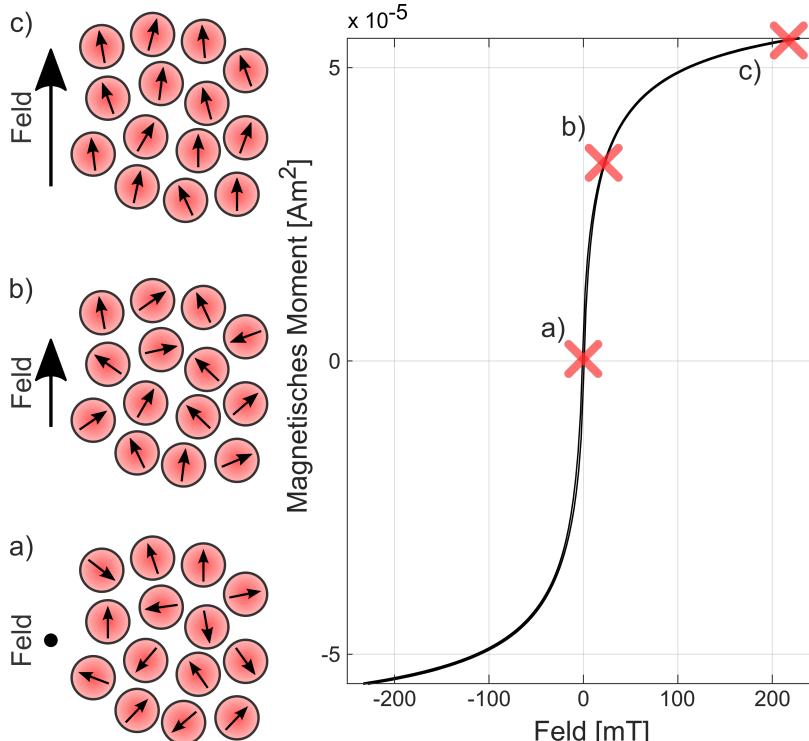


Abbildung 2.1: Magnetisierungskurve von 1,25 mg SPIONs (fluidMAG-CT). **a)** Ohne externes magnetisches Feld sind die magnetischen Momente der Nanopartikel stochastisch im Raum verteilt. Der Grund dafür ist, dass die Wechselwirkung zwischen den Partikeln so schwach ist, dass die brownsche Molekularbewegung dominiert. Das magnetische Moment des Partikelensembles mittelt sich zu Null und außerhalb des Ensembles ist kein Feld messbar, da sich die Felder einzelner Partikel destruktiv überlagern. **b)** Die magnetischen Momente der Nanopartikel richten sich bei Anwesenheit eines externen Feldes aus. **c)** Das Maß dieser Ausrichtung ist abhängig von der Stärke des äußeren Feldes. Mit kleinen Änderungen des externen Feldes nimmt das magnetische Moment des Partikelensembles zunächst schnell zu, bis es bei größeren Feldern, wenn nahezu alle magnetischen Momente ausgerichtet sind, in eine Sättigung gelangt.

Abbildung 2.1 zeigt die Magnetisierungskurve eines Ensembles magnetischer Nanopartikel, aufgenommen mithilfe eines VSM.[52] Die Magnetisierungskurve zeigt das magnetische Moment in Abhängigkeit vom angelegten externen Feld für eine Probe mit 1,25 mg SPIONs (fluidMAG-CT, Chemicell GmbH). Ohne externes Feld ist die Orientierung der magnetischen Momente stochastisch über alle Raumwinkel verteilt. Das magnetische Moment, gemittelt über ein Partikelensemble, ist also Null und es ist kein Feld vorhanden, weshalb im VSM keine Spannung in den Aufnahmespulen induziert wird. Mit einer Zunahme des externen Feldes bildet auch die Probe ein magnetisches Feld aus, da sich die magnetischen Momente des Partikelensembles entlang der

[52]: Foner (1956), »Vibrating Sample Magnetometer«

VSM: Magnetometer mit vibrierender Probe, engl. "Vibrating Sample Magnetometer"

Feldlinien des externen Feldes ausrichten. Zunächst ändert sich dabei das messbare magnetische Moment des Ensembles stark, bevor es bei größeren externen Feldern in Sättigung gelangt.

Die aufgenommene Kurve zeigt nahezu keine Hysterese, was bedeutet, dass die Auf- und Entmagnetisierung denselben Verlauf zeigen. Dieses für superparamagnetische Partikel typische Verhalten ist für viele bildgebende Verfahren entscheidend, da die Partikel instantan auf Änderungen des äußeren Feldes reagieren. Dabei gibt es jedoch eine Grenzfrequenz, oberhalb der die magnetischen Momente der Änderung nicht mehr direkt folgen können. Durch ausreichend hohe Anregungsfrequenzen können so auch bei kleineren Anregungsamplituden nichtlineare Effekte hervorgerufen werden, die Signale bei Vielfachen der Anregungsfrequenz erzeugen.

2.2 Aufnahme magnetischer Nanopartikel durch Zellen

Wichtig für ein bildgebendes Verfahren zur Visualisierung magnetisch markierter Zellen ist, dass die Zellen eine möglichst große Menge an magnetischem Material aufnehmen. Da die Konzentration (Masse pro Zelle) proportional zum erzeugten Magnetfeld ist, ermöglicht eine größere Aufnahme die Detektion einer kleineren Anzahl von Zellen. Die Menge an magnetischem Material, die von Zellen aufgenommen werden kann, ist abhängig vom Zelltyp. Insbesondere Makrophagen, die zu den Fresszellen (Phagozyten) gehören und wichtig für das Immunsystem sind, können relativ große Mengen aufnehmen. In der Literatur wird von Konzentrationen zwischen 20 pg/Zelle [49] und 50 pg/Zelle [46] berichtet. Auch die Beschichtung und die geometrische Form der Partikel [53, 54] haben einen Einfluss darauf, wie viele Partikel von Zellen aufgenommen werden. Zudem beeinflusst die Partikelbeschichtung entscheidend die physikalische Stabilität der Partikel im Zellkultur Medium. Die falsche Wahl der Beschichtung kann zu einer Agglomeration der Partikel im Medium [55] führen. Des Weiteren können sich durch die Agglomeration die magnetischen Eigenschaften ändern.[56]

[53]: Plan Sangnier u. a. (2019), »Impact of magnetic nanoparticle surface coating on their long-term intracellular biodegradation in stem cells«

[54]: Champion u. a. (2006), »Role of target geometry in phagocytosis«

[57]: Wang (2011), »Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application.«

[59]: Ahrens u. a. (2013), »Tracking immune cells *in vivo* using magnetic resonance imaging«

FDA: Behörde für Lebens- und Arzneimittel, engl. "U.S. Food and Drug Administration

Einige magnetische Partikel, wie *Resovist* und *Sinerem*[57], sind von der FDA für die Anwendung im Menschen zugelassen und es wird allgemein angenommen, dass SPIONs ungiftig [58] und biologisch abbaubar sind. Es gibt jedoch auch einige Studien, die negative Effekte von SPIONs nachweisen.[59] In dieser Arbeit werden kommerziell erhältliche SPIONs der Firma Chemicell (Chemicell GmbH, Berlin) mit der Bezeichnung fluidMAG-CT verwendet. Diese Partikel besitzen einen hydrodynamischen Durchmesser von 100 nm und sind in eine Matrix aus Citronensäure und Natrium Salz eingebettet. Partikel mit dieser Beschichtung werden in der vorliegenden Arbeit verwendet, da sie dafür bekannt sind, in großen Mengen von Zellen aufgenommen zu werden.[53]

Bestimmung der Partikelmasse in einzelnen Zellen

Die Bestimmung der aufgenommenen Masse magnetischer Nanopartikel in einer Zelle ist mit verschiedenen Methoden möglich. Die Methoden

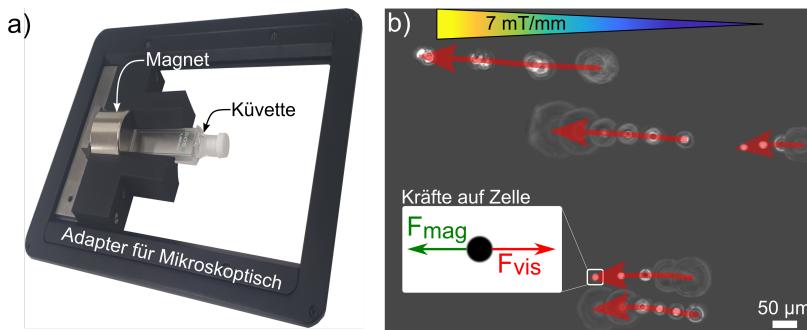
können in zwei Gruppen unterteilt werden. Methoden der ersten Gruppe bestimmen zunächst den Eisengehalt in einer Probe und teilen anschließend die ermittelte Masse durch die Anzahl der Zellen in der Probe, um so die Masse zu bestimmen, die eine einzelne Zelle der Probe im Mittel aufgenommen hat. Bei diesen Methoden wird vernachlässigt, dass Zellen in einer Probe auch unterschiedlich viele Partikel aufnehmen können. Denkbare Gründe dafür wären z.B., dass sich die Zellen während der Markierung in unterschiedlichen Stadien des Zellzyklus befanden. Zu den Methoden der ersten Gruppe gehört die Bestimmung des magnetischen Moments einer Probe mit dem VSM [60], die Berliner-Blau-Reaktion zum Nachweis von Eisen[61], die Bestimmung des Eisengehalts mittels optischer Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES) [62], wobei angeregte Atome der Probe eine für ein chemisches Element charakteristische elektromagnetische Strahlung emittieren, und die Bestimmung des Eisengehalts mit einem MRT aufgrund der Abhängigkeit zwischen dem Eisengehalt und der Relaxationsrate[10, 63].

Methoden der zweiten Gruppe bestimmen direkt den Partikelgehalt einzelner Zellen. Zu diesen Methoden gehört die "Magnetic force microscopy" (MFM) [64] und die Bestimmung mittels Magnetophorese.[65]

Da es mit den Methoden der ersten Gruppe nicht möglich ist Mengenunterschiede zwischen einzelnen Zellen der Probe zu bestimmen, wird in dieser Arbeit die Masse intrazellulärer Partikel in einzelnen Zellen mittels Magnetophorese bestimmt. Das verwendete Setup ist in Abbildung 2.2a dargestellt. Es besteht aus einer Küvette (Makro-Küvette 110-OS,

MRT: Magnetresonanztomographie

[65]: Wilhelm u. a. (2002), »Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: Kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization«



Hellma Analytics), in der sich die markierten Zellen befinden, und einem zylinderförmigen Permanentmagneten (S-24.5-20-N50, magnet-shop.de) mit einem Durchmesser von 24,5 mm, einer Höhe von 20 mm und einer Remanenz von 1,40 T bis 1,46 T. Das Setup wird auf einem Mikroskopisch montiert, um die Bewegung der Zellen im Magnetfeld zu bestimmen. Der beobachtete Bereich liegt dabei auf der Rotationsachse des zylinderförmigen Magneten. In Abbildung 2.2b sind fünf Trajektorien von Zellen im Magnetophorese-Aufbau dargestellt, die sich in verschiedenen Fokusebenen in der Küvette befinden. Um möglichst viele Zellen zu detektieren, wird der Fokuspunkt während der Aufnahme kontinuierlich variiert.

Der Radius r und die Geschwindigkeit v_c der Zelle wird aus den Aufnahmen bestimmt. Dazu werden die Zellen automatisiert vom Hintergrund

Abbildung 2.2: a) Magnetophorese-Setup zur Bestimmung der Masse aufgenommener Partikel. Die zu messenden Zellen befinden sich in einer Küvette, die auf einem Adapter für den Mikroskopisch platziert wird. b) Trajektorien von Zellen in der Küvette. Da sich nicht alle Zellen in derselben Ebene befinden, wird die Fokussierung während einer Messung kontinuierlich variiert. Während einer Messung sind die Kräfte auf die Zelle im Gleichgewicht. Die Geschwindigkeit der Zellen wird im Wesentlichen durch den magnetischen Gradienten beeinflusst, der im betrachteten Bereich etwa 7 mT/mm groß ist.

Remanenz: Feld der verbleibende Magnetisierung nach Abschalten des magnetisierenden Feldes.

segmentiert und die detektierten Objekte zu Trajektorien zusammengefasst. Die Trajektorien werden manuell kontrolliert und optimiert. Dabei werden insbesondere Bewegungsdaten von Zellclustern gelöscht, die die Messung verfälschen würden. Eine genauere Beschreibung dieses Prozesses findet sich in Kapitel 6. Die Radien der Zellen liegen bei ca. $10 \mu\text{m}$ und das Mittel der Geschwindigkeit bei etwa $100 \mu\text{m}/\text{s}$. Die Geschwindigkeit der Zellen im Bereich der Aufnahme sollte zum einen nicht zu groß sein, da das Zusammenfügen einzelner Objekte zu Trajektorien durch die größeren Schrittweiten zwischen zwei Aufnahmen deutlich erschwert wird. Zum anderen sollte die Geschwindigkeit auch nicht zu klein sein, da sonst die Ausbeute an Zellen, die während einer Aufnahme gemessen wird, sehr klein ist. Da die Geschwindigkeit vom Magnetfeld und dem Gradienten des Feldes abhängig ist, kann sie durch Variation des Abstandes zwischen der Oberfläche des Magneten und dem Aufnahmefeld eingestellt werden. Bei den vorgestellten Messungen mit SPION gelabelten Zellen beträgt der Abstand 19 mm . Das Magnetfeld in diesem Bereich liegt bei etwa $B_x = 80 \text{ mT}$ und der Gradient des Feldes ist $\partial B_x / \partial x = -7,6 \text{ mT/mm}$. Diese Werte werden mit der Python Bibliothek magpylib berechnet [66].

[66]: Ortner u. a. (2020), »Magpylib: A free Python package for magnetic field computation«

Magnetisches Moment $\vec{\mu}_c$: Ab hier bis zum Ende dieses Abschnitts wird das magnetische Moment mit $\vec{\mu}_c$ bezeichnet und nicht wie im Rest der Arbeit mit m , um es von der internalisierten Masse an SPIONs m unterscheiden zu können.

Das Feld des Magneten richtet die magnetischen Momente der SPIONs aus. Aufgrund des Gradienten des Magnetfeldes \vec{B} wirkt auf diese magnetischen Momente $\vec{\mu}_c$ eine Kraft, die sie zum Magneten hin beschleunigt. Die Kraft ergibt sich nach:

$$F_M = (\vec{\nabla} \otimes \vec{B}) \vec{\mu}_c \quad (2.2)$$

Im Bereich der Aufnahme gibt es aufgrund der Symmetrie zum Magneten nur eine Feldkomponente in B_x und die Gleichung kann zu

$$F_M = \mu_{c,x} \cdot \frac{\partial B_x}{\partial x}$$

vereinfacht werden. Bei der Bewegung der Zelle durch das Medium wirkt aufgrund der Reibung zwischen Zelle und Medium zudem eine Kraft entgegen der Bewegungsrichtung. Diese Reibungskraft ist gegeben durch

$$F_{\text{vis}} = 6\pi r \eta v_x$$

[67]: Venard u. a. (1975), *Elementary Fluid Mechanics*

wobei r der Radius einer Zelle, η die dynamische Viskosität des Mediums und v_x die beobachtbare Geschwindigkeit der Zelle zum Magneten ist. Dabei wird für η der Wert $\eta = 0,8904 \text{ mPas}$ angenommen, der dem Wert der dynamischen Viskosität von Wasser bei 25°C entspricht. [67] Setzt man diese Kräfte gleich, kann das magnetische Moment der Zelle nach

$$\vec{\mu}_c \approx \mu_{c,x} = \frac{6\pi r \eta v_x}{\frac{\partial B_x}{\partial x}} \quad (2.3)$$

berechnet werden. Mit den Angaben zum Magnetfeld und der feldabhängigen Magnetisierungskurve, die in Abbildung 2.1 gezeigt ist, kann den nach Gleichung 2.3 berechneten magnetischen Momenten eine Partikelmasse zugeordnet werden. Dazu wird das magnetische Moment μ_{VSM} aus der VSM Kurve für das gegebene Feld B_x am Ort der Aufnahme bestimmt und mit dem gemessenen magnetischen Moment einer einzelnen Zelle μ_c verglichen. Dieser Vergleich ergibt den Faktor, mit

dem die Masse m_{VSM} an SPIONs, die in der VSM Messung verwendet wurde, skaliert werden muss, um die Masse in der Zelle m_c zu erhalten. Damit ergibt sich:

$$m_c = \frac{\mu_c}{\mu_{VSM}} \cdot m_{VSM}.$$

Zur Überprüfung des Auswertungsskriptes werden Zellen mit magnetischen Polyesterolmikropartikeln (micromer-M, micromod Partikeltechnologie GmbH) gelabelt. Die Oberfläche dieser Mikropartikel ist mit PEG-COOH funktionalisiert und sie haben einen Durchmesser von 8 µm, womit sie unter dem Mikroskop gut sichtbar sind. Die Mikropartikel bestehen im Kern aus Polyesterol, der von einer Hülle umgeben ist, die magnetische Mikropartikel enthält. In dieser Hülle des Mikropartikels sind nach Herstellerangaben etwa 14 pg an SPIONs eingebettet. Die Trajektorien von Zellen, die ein einzelnes Partikel aufgenommen haben, werden bestimmt und die Masse an SPIONs in einzelnen Zellen wird aus den ermittelten Magnetophorese-Daten berechnet. Es ergibt sich eine Masse von 12,8 pg, was gut mit den Angaben des Herstellers übereinstimmt und damit das Auswertungsskript validiert.

PEG: Polyethylenglycol
COOH: Carboxygruppe

Zeitlicher Verlauf der intrazellulären Partikelmasse

Mit Blick auf die Detektion markierter Zellen in dynamischen Prozessen, wie der Bestimmung der Ausbreitung von Zellen in biomimetischen Gerüstmaterialien, ist es wichtig zu klären, wie sich die Menge an magnetischen Partikeln in einzelnen Zellen mit der Zeit verändert.

Hier wird der zeitliche Verlauf der aufgenommenen Masse in *REF52-wt* Zellen bestimmt. Für die Markierung werden die Zellen für 24 Stunden in SPION-haltigem Medium (DMEM, 10 % FBS) kultiviert, wobei die Konzentration an SPIONs im Medium 50 µg/mL beträgt. Anschließend wird das Medium entfernt und nicht aufgenommene Partikel werden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen werden mit Accutase von der Oberfläche der Kulturflasche gelöst. Der größte Teil der markierten Zellen wird in einer neuen Kulturflasche weiter kultiviert und ein kleiner Teil wird zur Bestimmung des Partikelgehalts im Magnetophorese-Setup untersucht. Die Bestimmung des Partikelgehalts erfolgt in Abständen von 24 Stunden.

REF52-wt: embryonale Fibroblasten von Ratten, engl. "rat embryonic fibroblasts"
DMEM: engl. "Dulbecco's Modified Eagle's Medium"

FBS: Fetales Kälberserum, engl. "fetal bovine serum"

PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung, engl. "phosphate-buffered saline"

Accutase: Enzymhaltige Lösung, um adhäsente Zellen vom Boden von Kulturplatten zu lösen.

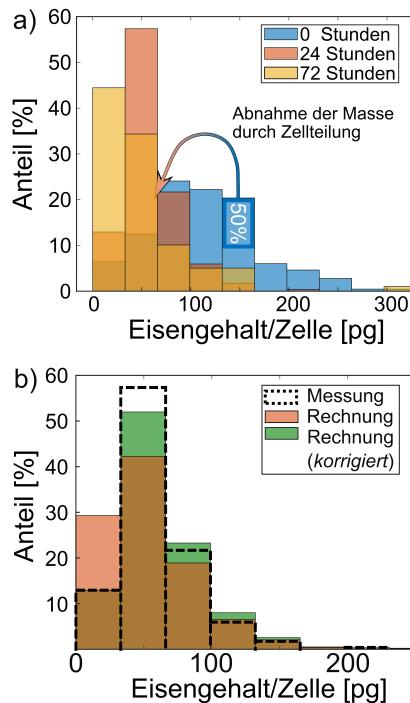
Das Ergebnis dieser Untersuchung ist den Histogrammen in Abbildung 2.3a zu entnehmen. Direkt nach dem Entfernen des partikelhaltigen Mediums zeigt sich eine breite Verteilung der Konzentration (Eisengehalt pro Zelle). Einzelne Zellen nehmen bis zu 250 pg auf und die mittlere Masse liegt bei 100 pg pro Zelle. Im Vergleich zu den zuvor genannten Quellen[46, 49], in denen die Aufnahme von Partikeln durch Makrophagen bestimmt wurde, und der Arbeit von *Plan Sangier u. a.* [53], in der hMSCs Zellen für 30 min mit ähnlichen Partikeln markiert wurden, scheint die aufgenommene Masse verhältnismäßig groß zu sein. In der Arbeit von *Plan Sangier u. a.* wird von 40 pg/Zelle berichtet, was etwa der Hälfte vom hier bestimmten Wert entspricht. Allerdings wurden die Zellen in der Arbeit von *Plan Sangier u.a.* nur für 30 min in partikelhaltigem Medium kultiviert, während in der vorliegenden Arbeit eine Zeit von 24 Stunden verwendet wurde. Das die Zeit der Markierung einen

hMSCs: menschliche mesenchymale Stammzellen, engl. "human mesenchymal stem cells"

Abbildung 2.3: a) Verteilungen zu mehreren Zeitpunkten nach dem Markieren. Es zeigt sich eine Abnahme der intrazellulären Masse an SPIONs mit der Zeit. Zur Überprüfung, ob die Abnahme auf die Zellteilung zurückzuführen ist, wird ein einfaches Modell aufgestellt, dessen Prinzip in der Abbildung dargestellt ist. Dabei wird angenommen, dass sich in 24 Stunden 50 % der Zellen teilen und dann der Säule bei der halben Masse zugeordnet werden können. **b) Vergleich von Messung und Simulation.** Die Rechnung ergibt einen zu großen Anteil bei kleineren Konzentrationen. Dies ist vermutlich auf einen systematischen Fehler des Setups zurückzuführen, der darauf basiert, dass Zellen mit weniger internalisierten Partikeln seltener gemessen werden, da sie sich langsamer bewegen. Korrigiert man dies, indem man den Anteil der Simulation bei der kleinsten Konzentration auf den gemessenen Anteil bei dieser Konzentration normiert, so zeigen die Histogramme eine gute Übereinstimmung.

[69]: Kalber u. a. (2016), »Hyperthermia treatment of tumors by mesenchymal stem cell-delivered superparamagnetic iron oxide nanoparticles«

Exocytose: Ausstoß von intrazellulärem Material, das sich in Vesikeln im Zellinneren befindet. Bei dem Prozess verschmilzt das Vesikel mit der Zellmembran



Einfluss auf die internalisierte Masse hat wird in der Arbeit von *Marcus u.a.*[68] gezeigt.

Von einer vergleichbar hohen Menge von sogar 250 pg/Zelle wird in der Arbeit von *Kalber u. a.* [69] berichtet, in der ebenfalls hMSCs mit denselben Partikeln markiert werden, wie sie in dieser Arbeit verwendet werden. Damit liegt der hier bestimmte Wert im erwarteten Bereich.

Erwartungsgemäß nimmt die Masse pro Zelle in Abbildung 2.3a mit der Zeit ab und die Verteilung wird schmäler. Gründe für die Abnahme können Zellteilung oder der Ausstoß von SPIONs aus der Zelle durch Exocytose sein. Um die Ursache der Abnahme zu bestimmen, wird ein einfaches Rechenmodell aufgestellt. Dazu wird der Anteil an Zellen bestimmt, der sich im Zeitraum zwischen zwei Messungen teilt. Dieser Anteil ist in Abbildung 2.3a für eine Säule des Histogramms dargestellt. Hier wird angenommen, dass sich in 24 Stunden 50 % der Zellen teilen. Unter der Annahme, dass sich die SPIONs gleichmäßig auf die Tochterzellen aufteilen, wird sich dieser Anteil in einer 24 Stunden später durchgeföhrten Messung bei der halben Konzentration wiederfinden. Dies ist in der Abbildung durch den Pfeil dargestellt.

Um das Rechenmodell mit der Messung vergleichen zu können, wird die Wachstumsrate der hier verwendeten *REF52-wt* Zellen bestimmt. Die dazu aufgenommenen Daten sind in Abbildung 2.4 dargestellt. Dabei wird in einem Bereich von $4,5 \text{ mm}^2$ in einem Zeitraum von 900 min alle zwei Minuten die Anzahl der Zellen bestimmt. Im betrachteten Zeitraum zeigt sich eine lineare Zunahme der Zellanzahl. Die durch lineare Regression bestimmte Steigung der Messdaten kann dann dazu genutzt werden, die Zeit zu bestimmen, in der sich die Anzahl der Zellen verdoppelt. Für die beobachteten *REF52-wt* Zellen beträgt diese Zeit 26 Stunden. Nach 24 Stunden haben sich also 93 % der Zellen geteilt und sollten daher bei der halben Konzentration wiederzufinden sein.

Mit diesen Angaben wird das Rechenmodell auf den Zeitraum zwischen 0 Stunden und 24 Stunden nach der Markierung angewandt. Das berechnete Histogramm ist in Abbildung 2.3b dargestellt (rotes Histogramm). Die gute Übereinstimmung der Messung und des Rechenmodells bestätigen die Annahme, dass sich die Nanopartikel gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilen.

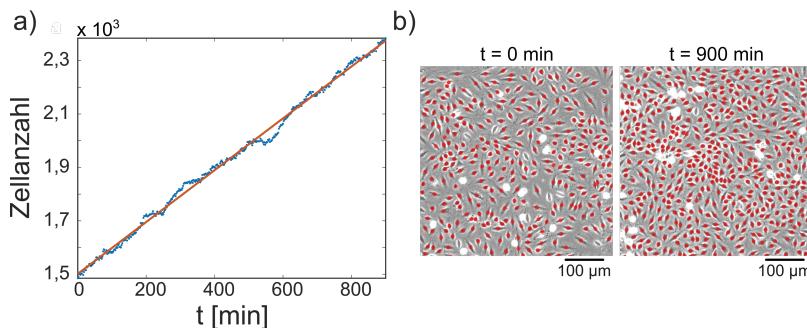


Abbildung 2.4: a) Zeitliche Zunahme an REF52-wt Zellen im beobachteten Bereich. Die Gerade zeigt eine lineare Regression der gemessenen Zellzahl. Schwankungen in der gemessenen Zellzahl sind damit zu erklären, dass die Zählung automatisiert durchgeführt wird, wodurch es zu kleinen Ungenauigkeiten kommt, die durch die lineare Regression ausgeglichen werden. b) Ausschnitte aus dem Bereich, in dem die zeitliche Zunahme der Zellen bestimmt wird, zu den Zeitpunkten $t = 0$ min und $t = 900$ min.

Verglichen mit der Messung ist der Anteil bei der geringsten Konzentration in dem roten Histogramm zu groß, während die Häufigkeiten bei größeren Konzentrationen etwas zu klein sind. Dies deutet auf einen systematischen Fehler der Messung hin, der dadurch entsteht, dass sich Zellen mit einer hohen Konzentration an SPIONs schneller bewegen als solche mit einer geringeren Konzentration. Dadurch werden Zellen mit einer hohen Konzentration häufiger gemessen. Setzt man die Häufigkeit der kleinsten berechneten Konzentration auf die gemessene Häufigkeit, so nähern sich die berechneten Werte den Messwerten an.

Es ist festzuhalten, dass die Abnahme der Masse auf die Zellteilung zurückzuführen ist und dass das System fehlerbehaftet ist, wodurch die relative Häufigkeit von Zellen mit geringer Konzentration in einer Messung zu klein bestimmt wird.

"Magnetic Susceptibility Particle Mapping"

3

Die in den letzten beiden Kapiteln vorgestellten Komponenten werden in diesem Kapitel zu einem Setup für die Detektion magnetischer Nanopartikel zusammengeführt. Die Abkürzung MSPM steht dabei für "Magnetic Susceptibility Particle Mapping" und wurde gewählt, da die magnetische Suszeptibilität $\chi(\vec{H})$, die den Zusammenhang zwischen der magnetischen Feldstärke \vec{H} und der Magnetisierung \vec{M} herstellt, für das Messprinzip grundlegend ist. Es gilt:

$$\vec{M} = \chi(\vec{H})\vec{H}.$$

Die Magnetisierung \vec{M} gibt dabei das magnetische Moment pro Volumen an, aus dem nach Gleichung 2.1 das Feld am Ort der Probe berechnet werden kann.

Der in dieser Arbeit entwickelte MSPM Aufbau und seine Eigenschaften werden im Manuscript "Mapping of magnetic nanoparticles and cells using thin film magnetoelectric sensors based on the delta-E effect" [1] detailliert beschrieben. Dieses Setup ermöglicht es, kleine Mengen von SPIONs ohne magnetische Schirmung bereits nach einer kurzen Messzeit nachzuweisen. Es wurde gezeigt, dass zweidimensionale Verteilungen von SPIONs aus einigen 10 µg bestimmt werden können und es möglich ist SPIONs zu detektieren, die zuvor von Zellen aufgenommen wurden. Auch ist der Aufbau des Setups ohne größeren finanziellen Aufwand möglich, sodass alle Voraussetzungen erfüllt sind, um dieses Tool in Zukunft Arbeitsgruppen in der Materialwissenschaft zur Verfügung stellen zu können, um z.B. die dynamische Ausbreitung von Zellen in künstlichen Biomaterialien zu untersuchen.

Bisher ist die Messungen auf die Bestimmung von zweidimensionalen Verteilungen beschränkt und die korrekte Bestimmung von dreidimensionalen Verteilungen ist nicht möglich. Daher sollen in diesem Kapitel die im Manuscript vorgestellte Arbeit erweitert und die Anforderungen an einen Aufbau definiert werden, die eine dreidimensionale Messung ermöglichen.

In diesem Kapitel wird zunächst auf den Aufbau des aktuellen Setups und das Zusammenspiel einzelner Komponenten eingegangen. Anschließend werden die Eigenschaften des Setups bestimmt und eine Messung mit Zellen vorgestellt. Es folgt eine Einführung in die Verfahren zur Rekonstruktion der Partikelverteilung aus dem gemessenen Feld. Diese theoretische Beschreibung des Systems führt zu Erkenntnissen, die es ermöglichen, ein Setup für die Detektion von dreidimensionalen Verteilungen zu entwerfen und zu beschreiben. Ein erster Entwurf eines solchen Setups wird im letzten Abschnitt dieses Kapitels vorgestellt. Aktuell mögliche Anwendungen des Setups sowie die Vor- und Nachteile des Setups mit Bezug auf ähnliche Aufbauten zur Bestimmung der Verteilung von magnetischen Nanopartikeln werden im Fazit des ersten Teils dieser Arbeit diskutiert.

3.1 Aufbau	28
Positionieren des Sensors . .	29
Proben- und Hintergrundsignal	30
3.2 Eigenschaften des MSPM Setups	31
Nachweisgrenze	31
Räumliche Auflösung	33
3.3 Zellmessung	34
3.4 Rekonstruktion	34
Modellierung	35
Systemmatrix	37
Inverses Problem	38
3.5 Aufbau 3D-Setup	41

[1]: Lukat u.a. (2020), »Mapping of magnetic nanoparticles and cells using thin film magnetoelectric sensors based on the delta-E effect«

3.1 Aufbau des MSPM Setups

Im Kapitel 1 zum ΔE -Effekt Sensor wurde gezeigt, dass der verwendete Sensor ein magnetisches Bias-Feld entlang seiner langen Achse benötigt, um optimal betrieben zu werden. Des Weiteren wurde in Kapitel 2 gezeigt, dass sich zusätzlich zu dem Sensor auch die SPIONs in einem Magnetfeld befinden müssen, damit sie ein messbares Magnetfeld in ihrer Umgebung erzeugen. Diese Anforderungen diktieren den benötigten Aufbau, der in Abbildung 3.1a skizziert ist. Um beide Anforderungen zu erfüllen, werden die Probe und der Sensor im Feld eines Permanentmagneten platziert. Positioniert man den Sensor im richtigen Abstand zum Permanentmagneten (siehe Abschnitt 3.1), so erzeugt dieser das benötigte Bias-Feld. Zudem richten sich die magnetischen Momente der SPIONs im Feld dieses Permanentmagneten aus und erzeugen ein messbares Feld am Ort des Sensors.

[70]: Zabel u. a. (2015), »Phase modulated magnetoelectric delta-E effect sensor for sub-nano tesla magnetic fields«

Im Aufbau befindet sich die Probe zwischen dem Permanentmagneten und dem Sensor. Der hier verwendete Sensor[70] besteht aus einem Biegebalken (Länge: 3 mm, Breite: 1 mm, Dicke: 0,05 mm) aus polykristallinem Silizium. An der Unterseite dieses Biegebalkens ist ein Schichtsystem angebracht, in dem sich 100 nm dicke Schichten aus FeCoSiB mit 5 nm dicken Schichten aus Chrom abwechseln. Dieses Schichtsystem ist insgesamt 2 μm dick und stellt die magnetostruktive Phase des Sensors dar. Die piezoelektrische Schicht ist auf der Oberseite des Biegebalkens angebracht und besteht aus 2 μm dickem Aluminiumnitrid (AlN).

Abbildung 3.1: a) Schematischer Aufbau des MSPM Setups. Ein Permanentmagnet magnetisiert die magnetischen Nanopartikel der Probe. Durch die Ausrichtung der magnetischen Momente der Nanopartikel kommt es zur Ausbildung eines magnetischen Feldes. Dieses Feld wird vom Sensor detektiert, der unter der Probe positioniert ist. Auch der Sensor wird von dem Permanentmagneten beeinflusst, der das Bias-Feld bereitstellt, um den Sensor optimal zu betreiben. **b) Bild des Aufbaus.** Die Probe wird auf einem Probenhalter platziert, der von einem Motor periodisch durch den Spalt zwischen Permanentmagnet und Sensor geführt wird. Die Lichtschranke dient als Trigger, um die Rotationsgeschwindigkeit zu überprüfen.

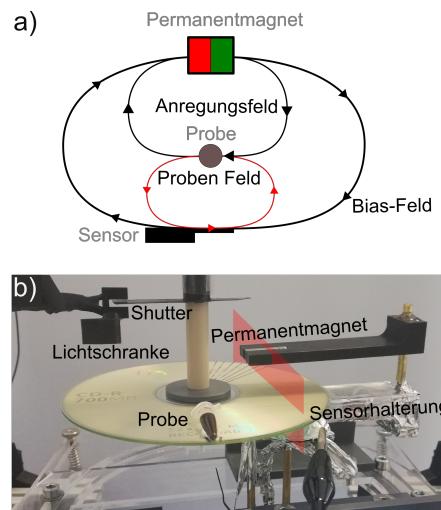


Abbildung 3.1b zeigt den verwendeten experimentellen Aufbau. Der Sensor und der Permanentmagnet sind auf einer Sensorhalterung montiert, die vertikal und radial zur rotierenden Probe verfahren werden kann, um Messungen in einer Ebene unter der Probe bei verschiedenen Abständen zu ermöglichen. Eine konstante Rotation der Probe mithilfe eines Motors ermöglicht bei Messungen mit dem Setup eine einfache Trennung von Proben- und Hintergrundsignalen (siehe Abschnitt 3.1). Um die Rotationsgeschwindigkeit zu messen, wird eine Lichtschranke verwendet, die von einem an der Motorwelle befestigten Shutter unterbrochen wird. Um den Sensor als ΔE -Effekt Sensor zu betreiben, wird er wie im Abschnitt 1.2 beschrieben angeregt. Sowohl für diese Anregung als auch für die Messung des Signals der Lichtschranke und des Sensorstromes,

den ein Ladungs-Spannungs-Wandler[24] in eine messbare Spannung umgewandelt, wird ein Audiointerface (Fireface UC, RME) verwendet. Die gesamte Steuerung des Aufbaus und die Signalaufnahme wird von einem im Rahmen dieser Arbeit erstellten MATLAB Programms mit grafischer Benutzeroberfläche kontrolliert.

[24]: Durdaut u. a. (2017), »Modeling and Analysis of Noise Sources for Thin-Film Magnetoelectric Sensors Based on the Delta-E Effect«

Positionieren des Sensors im Magnetfeld

Um den Sensor optimal betreiben zu können, muss ein definiertes Bias-Feld entlang der langen Achse des Sensors anliegen (siehe Abschnitt 1.2). Im vorgestellten Setup wird dieses Feld von einem Permanentmagneten bereitgestellt, der im richtigen Abstand zum Sensor platziert werden muss, damit er am Ort des Sensors das gewünschte Bias-Feld erzeugt. Im vorgestellten Aufbau beträgt dieser Abstand etwa 21 mm.

Bestimmt wird dieser Abstand durch die Messung mit einem Impedanzanalysator, bei der der Sensor im ersten Schritt ohne Permanentmagnet in einer Helmholtz-Spule platziert wird. Mithilfe der Helmholtz-Spule wird ein konstantes, homogenes Feld mit wählbarer Feldstärke entlang der langen Achse des Biegebalkens erzeugt. Mit dem Impedanzanalysator wird dann für verschiedene Bias-Felder der frequenzabhängige Amplitudenverlauf des Stromes aufgenommen, aus dem die Resonanzfrequenz des Sensors bestimmt werden kann (siehe Abbildung 1.3b). Bei gegebenem Magnetfeld liegt die Resonanzfrequenz des Sensors bei der Frequenz, bei der der Amplitudenverlauf den größten negativen Gradienten aufweist. Die Resonanzfrequenz definiert den elektrischen Arbeitspunkt für das anliegende Magnetfeld, da bei dieser Resonanzfrequenz die elektrische Empfindlichkeit, also die Änderung der Stromamplitude mit der Frequenz, am größten ist. Die Ursache für den Verlauf dieser Kurve wurde bereits in Abschnitt 1.2 beschrieben. Wird die Resonanzfrequenz nach diesem Verfahren für mehrere Bias-Felder bestimmt, erhält man die Kurve der feldabhängigen Resonanzfrequenz des Sensors (siehe Abbildung 1.3c). Aus dieser Kurve wird die Resonanzfrequenz des magnetischen Arbeitspunktes bestimmt. Der magnetische Arbeitspunkt liegt am Punkt der größten magnetischen Empfindlichkeit, also dem Punkt, an dem die größte Änderung der Resonanzfrequenz mit einer Änderung des Magnetfeldes einhergeht. Da im MSPM-Setup ein möglichst großes Feld im Bereich der Probe vorhanden sein soll, um ein großes Feld der SPIONs zu erhalten, wird der Sensor in dieser Arbeit beim Arbeitspunkt bei $-1,6\text{ mT}$ platziert.

Um das benötigte Feld am Ort des Sensors einzustellen, wird im zweiten Schritt der Permanentmagnet über dem Sensor platziert und der frequenzabhängige Verlauf der Stromamplitude beobachtet. Angefangen bei einem kleinen Abstand zwischen Sensor und Magneten wird der Abstand so lange vergrößert, bis der größte negative Gradient der Stromamplitude bei der zuvor bestimmten Resonanzfrequenz des magnetischen Arbeitspunktes liegt.

Zur Überprüfung der Positionierung wird erneut die Resonanzfrequenz des Sensors für verschiedene Magnetfelder in der Helmholtz-Spulen Anordnung überprüft. Die Kurve der feldabhängigen Resonanzfrequenz ist jetzt um die $1,6\text{ mT}$ nach rechts verschoben und der Arbeitspunkt liegt

bei 0 mT. Die 0 mT stehen hier nur für das Feld der Helmholtz-Spule. Die tatsächliche Feldstärke am Ort des Sensors ist weiterhin $-1,6$ mT.

Trennung von Proben- und Hintergrundsignalen

Auch ohne Probe ändert sich das vom Sensor gemessene Signal über längere Zeiträume zum Teil deutlich. Um diese Drift aus der Messung zu eliminieren, wird das Signal der Probe in diese Drift hinein kodiert. Dazu wird die Probe auf einem rotierenden Probenteller befestigt, der die Probe periodisch durch den Spalt zwischen Permanentmagnet und Sensor hindurch führt. Aufgrund dieser periodischen Rotation misst der Sensor ein periodisches Signal (Abbildung 3.2a). Dies äußert sich im Spektrum durch das Auftreten von Signalspitzen bei Vielfachen der Rotationsfrequenz, die in Abbildung 3.2b dargestellt sind. Unter Verwendung eines Kammfilters, können diese Signalspitzen bei Vielfachen der Rotationsfrequenz aus dem gemessenen Signal herausgefiltert werden. Dies ermöglicht eine einfache Trennung von Proben- und Hintergrundsignalen.

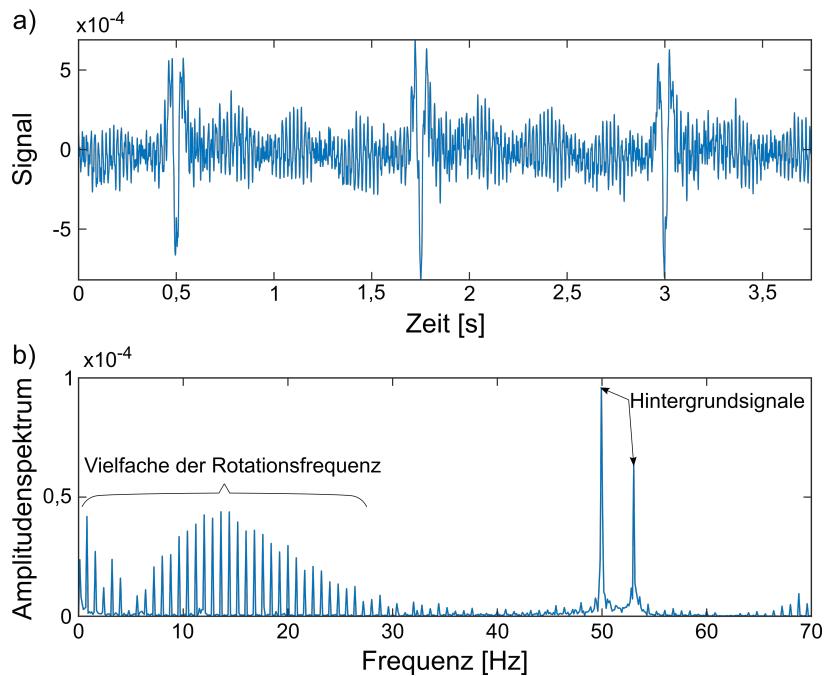


Abbildung 3.2: a) Beispiel eines vom Sensor gemessenen Signals bei einer Rotationsfrequenz des Piezomotors von 0,8 Hz. Das Signal der Probe ist von einer höherfrequenten Schwingung überlagert. b) Spektrum des Signals aus a). Signalspitzen bis 40 Hz liegen bei Vielfachen der Rotationsfrequenz. Hintergrundsignale sind bei 50 Hz und 53 Hz zu beobachten. Das 50 Hz Signal entsteht durch die Netzspannung und die Ursache für das Signal bei 53 Hz ist das Netzgerät des Verfahrtisches zur Positionierung des Sensors.

Beispiele für Hintergrundsignale sind das 50 Hz Signal der Netzspannung (siehe Abbildung 3.2b) und Vielfache davon, sowie Signale des Motors, der zur Rotation des Probentellers benötigt wird. Das Signal des Motors zeigt im Spektrum, ebenso wie das Signal der Probe, Signalspitzen beim Vielfachen der Rotationsfrequenz. Da sich die Hintergrundsignale im Spektrum nur zum Teil mit dem Signal der Probe überlagern, müssen zwei unterschiedliche Konzepte verfolgt werden, um sie zu beseitigen.

Hintergrundsignale, die nicht mit der Rotationsgeschwindigkeit des Aufbaus zusammenhängen, können durch die richtige Wahl der Rotationsfrequenz der Probe eliminiert werden. Dazu muss die Rotationsfrequenz

so gewählt werden, dass kein Vielfaches der Rotationsfrequenz auf eine Frequenz fällt, bei der das Hintergrundsignal eine Signalspitze zeigt.

Eine Möglichkeit, den Einfluss von Signalen zu eliminieren, die mit der Rotation des Probentellers zusammenhängen, ist es, diese in einer Leermessung zu bestimmen und sie nachträglich vom gemessenen Signal abzuziehen. Damit dies möglich ist, muss es einen festen Zusammenhang zwischen der azimutalen Stellung des Motors und des vom Sensor gemessenen Signals geben. Um dies zu erreichen, wurde im Rahmen der Arbeit der zunächst verwendete DC Motor durch einen Piezomotor ausgetauscht. Ein Piezomotor arbeitet rein elektrisch unter Verwendung des indirekten Piezoeffektes. Dabei liegen die elektrischen Anregungsfrequenzen zwischen 100 kHz bis 200 kHz nicht im Messbereich, weshalb sein Betrieb keine störenden magnetischen Signale erzeugt. Zur Bestimmung der azimutalen Stellung des Piezomotors ist jedoch ein Permanentmagnet auf der Motorwelle montiert, dessen Signal von einem Hallsensor für die Positionsbestimmung gemessen wird. Da die Rotation dieses Permanentmagneten am Ort des Sensors ein Feld erzeugt, das von der Stellung des Motors abhängt, lässt sich das erzeugte Signal vom gemessenen abziehen, um das Probensignal zu erhalten.

Ein weiterer Vorteil des Piezomotors ist die hohe Genauigkeit, mit der die Rotationsfrequenz eingestellt und gehalten wird. Dies ist wichtig, da die Frequenzauflösung Δf der schnellen Fourier-Transformation (FFT), die das Signal vom Zeitbereich in den Frequenzbereich überführt, von der Messzeit abhängt und für lange Messungen besser wird. Eine verbesserte Frequenzauflösung bedeutet, dass die Anzahl der Frequenzen im Spektrum, für die eine Amplitude bestimmt wird, zunimmt. Aufgrund der konstanten Rotationsgeschwindigkeit liegt die Signalleistung des Probensignals exakt bei Vielfachen der Rotationsfrequenz. Daher ist auch für lange Messzeiten und die damit verbundene gute Frequenzauflösung das Probensignal nicht über mehrere Frequenzen um die Vielfachen im Spektrum verteilt. Da die Rauschleistung pro Hertz konstant ist, sich durch die bessere Frequenzauflösung aber auf mehr Frequenzen verteilt, nimmt die Rauschleistung pro Frequenz ab, während die Leistung des Signals bei Vielfachen der Rotationsfrequenz konstant bleibt. Damit verbessert sich das Signal-Rausch-Verhältnis.

3.2 Eigenschaften des MSPM Setups

Die Eigenschaften des Setups sind durch seine Nachweigrenze und die räumliche Auflösung gegeben. Wie diese Eigenschaften bestimmt werden und welche Werte sich für sie ergeben, wird in den beiden nachfolgenden Abschnitten erläutert.

Nachweigrenze

Die Nachweigrenze gibt an, welche Masse an magnetischen Nanopartikeln in der Probe vorhanden sein muss, um am Ort des Sensors ein messbares Feld zu erzeugen. Weil das Messsignal von Rauschen überlagert ist, ändert sich die Nachweigrenze mit der Messzeit, da eine

Azimut: Winkel im Polarkoordinatensystem

Piezomotor: U-651.03 PILine Präzisionsdrehtisch, \varnothing 102 mm, 360°, 9 µrad, Physik Instrumente (PI) GmbH & Co.

Die Anregungsfrequenzen sind Angaben des Herstellers und können der Seite zu PILine Ultraschall-Piezomotoren entnommen werden. [71]

FFT: schnelle Fourier-Transformation, engl. "fast Fourier transform"

Frequenzauflösung (Δf):

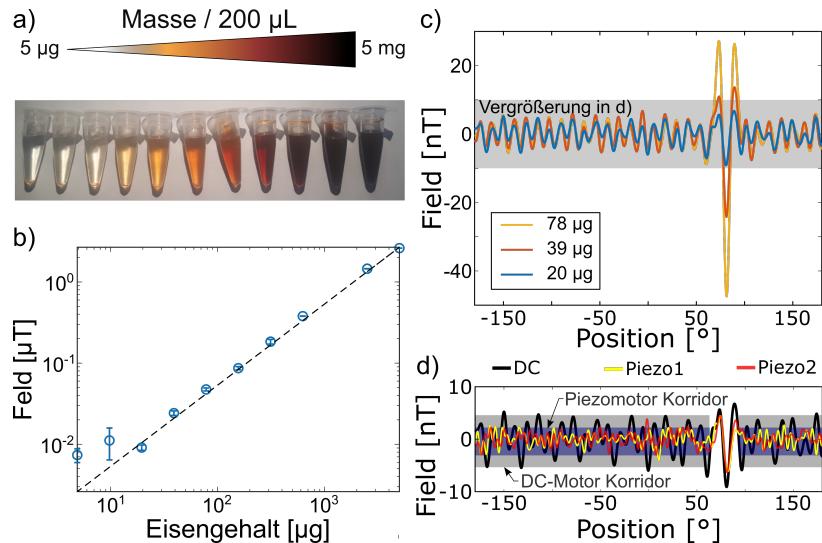
$$\Delta f = \frac{f_s}{L}$$

f_s : Aufnahmefrequenz
 L : Anzahl der Messpunkte

SNR: Signal-Rausch-Verhältnis, engl. "signal-to-noise ratio"

längere Messzeit zu einem größeren und damit besseren Signal-Rausch-Verhältnis (SNR) führt (siehe Abschnitt 3.1).

Abbildung 3.3: a) Proben zur Bestimmung der Nachweisgrenze. Die Reaktionsgefäße sind mit unterschiedlichen Massen an magnetischen Nanopartikeln gefüllt. Die Massen liegen zwischen 5 µg und 5 mg in jeweils 200 µL Wasser. Bei allen Messungen beträgt der Abstand zwischen der Probe und dem Sensor 8 mm. b) Erwartungsgemäß ist ein linearer Abfall des Messsignals mit der Masse an magnetischen Nanopartikeln zu beobachten. c) Die kleinste Masse, bei der ein Signal aus dem Hintergrundsignal hervorgeht, ist 20 µg. Dieses Hintergrundsignal wird von dem DC Motor erzeugt, der den Probenteller rotiert. d) Vergleich der Messung mit dem DC Motor mit zwei Messungen, bei denen der Probenteller von einem Piezomotor rotiert wird. Dabei ist der Korridor, in dem das Hintergrundsignal bei Messungen mit dem Piezomotor liegt, deutlich geringer.



DC: Gleichstrom, engl. "direct current"

Die Proben der Messreihe sind in Abbildung 3.3a dargestellt und beinhalten zwischen 5 mg und 5 µg SPIONs in 200 µL Wasser. Bei allen Messungen der Messreihe beträgt der Abstand zwischen der Unterkante des Probenbehälters und dem Sensor 8 mm und das Signal wird bei einer Rotationsfrequenz von 2,5 Hz für 15 s aufgenommen. Der Probenteller wird bei diesen Messungen von einem DC Motor rotiert. Gemessene Signalverläufe sind in Abbildung 3.3c dargestellt. Das Feld der Probe zeigt zwei positive Bereiche, die einen negativen Bereich flankieren. Zudem ist bei allen Messungen das Signal der Probe von einem periodischen Hintergrundsignal überlagert, das zwischen den Messungen eine starke Korrelation aufweist. Bei der Messung der 20 µg Probe kann das Signal der Probe gerade noch vom Hintergrundsignal getrennt werden. Dies zeigt sich auch in Abbildung 3.3b, in der der Betrag der negativen Signalspitze aus Abbildung 3.3c bei etwa 90° über dem Eisengehalt der Probe aufgetragen ist. Auch hier zeigt sich für Massen, die kleiner als 20 µg sind, eine Abweichung vom erwarteten, linearen Zusammenhang zwischen Masse und Messsignal aufgrund des Hintergrundsignals.

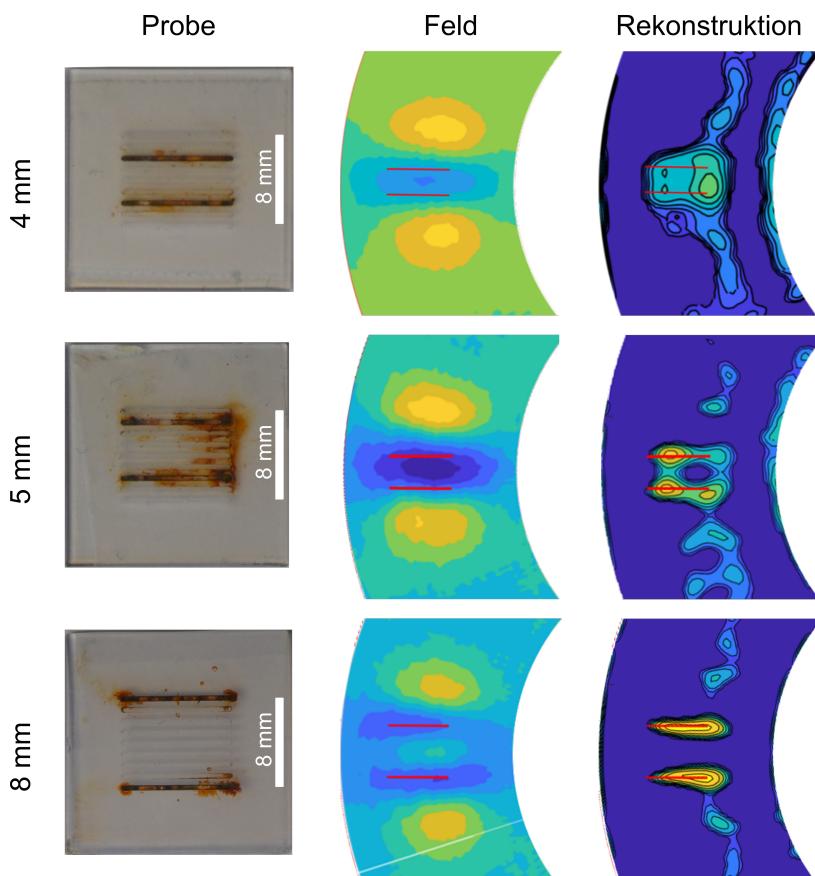
Da das Hintergrundsignal einzelner Messungen eine deutliche Abhängigkeit von der azimutalen Position der Probe aufweist, ist davon auszugehen, dass der Ursprung dieses Hintergrundsignals der DC Motor ist, der zur Rotation der Probe eingesetzt wird. Damit liegt die Nachweisgrenze des Setups mit den genannten Parametern bei 20 µg und wird durch das Signal des DC Motors begrenzt.

Diese Limitation des Aufbaus kann durch die Verwendung eines Piezomotors beseitigt werden. In Abbildung 3.3 sind zwei Messungen mit einem Piezomotor dargestellt. Diese Messungen unterscheiden sich von Messungen mit dem DC Motor in der niedrigeren Rotationsfrequenz von 0,8 Hz. Die Korridore, in denen kein Signal der Probe im Messsignal enthalten ist, sind farblich hervorgehoben. Es zeigt sich deutlich, dass das Hintergrundsignal bei Messungen mit dem Piezomotor kleiner ist.

Zudem weisen die beiden Messungen mit dem Piezomotor nach Abzug des Motorsignals keine Korrelation auf. Damit ist gezeigt, dass das SNR durch eine Verlängerung der Messzeit unter Verwendung eines Piezomotors verbessert werden kann. Zudem sollte der in Abbildung 3.3 dargestellt, lineare Zusammenhang zwischen der Masse an SPIONs in der Probe und dem Signal für gleichlange Messungen mit dem Piezomotor auch bei kleineren Massen noch den beobachteten linearen Zusammenhang zeigen.

Räumliche Auflösung

Die räumliche Auflösung des Setups gibt den Abstand zwischen zwei Objekten an, bei dem diese als voneinander getrennt wahrgenommen werden können. Aufgrund der PSF des Systems ist es, anders als z.B. bei Aufnahmen mit einem optischen Mikroskop, nicht unbedingt möglich die Partikelverteilung direkt aus dem gemessenen Feld abzuleiten. Aus diesem Grund wird hier die räumliche Auflösung aus den rekonstruierten Partikelverteilungen bestimmt.



PSF: Punktspreizfunktion, engl. "point spread function"

Abbildung 3.4: Proben, gemessenes Feld und rekonstruierte Partikelverteilung zur Bestimmung der räumlichen Auflösung. In dieser Arbeit wird die räumliche Auflösung des Setups als der Abstand definiert, bei dem die Objekte im rekonstruierten Bild trennbar sind. Bei Messungen zur Bestimmung der räumlichen Auflösung beträgt der Abstand zwischen Sensor und Probe 8 mm. Für diesen Abstand wird eine räumliche Auflösung von 5 mm bestimmt.

Abbildung 3.4 zeigt die Probe, das gemessene Feld dieser Probe und die daraus rekonstruierte Partikelverteilung. Die Probe besteht aus einem PMMA-Scheibchen mit einer Kantenlänge von 20 mm x 20 mm und einer Höhe von 1 mm. In dieses Scheibchen sind mehreren Rillen mit einer Breite und Tiefe von 0,5 mm eingraviert. Der Abstand der Mittelachsen dieser Rillen beträgt 1 mm. Zur Bestimmung der räumlichen Auflösung werden jeweils zwei Rillen einer Probe mit magnetischen Nanopartikeln

PMMA: Polymethylmethacrylat

befüllt. Die Menge an magnetischen Nanopartikeln wird mit $750 \mu\text{g}/\text{Rille}$ dabei so gewählt, dass sich ein großes SNR für kurze Messzeiten ergibt. Wie später in Abschnitt 3.4 gezeigt wird, ist dies wichtig, um eine detailgetreue Rekonstruktion zu erhalten. Bei einem Abstand von 8 mm zwischen dem Sensor und der Probe können Rillen in einem Abstand von 5 mm gerade noch auseinander gehalten werden. Die räumliche Auflösung des Setups beträgt damit 5 mm.

3.3 Zellmessung

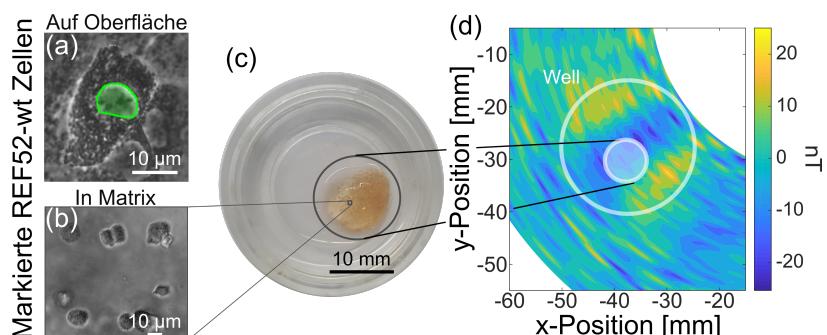
[72]: He u.a. (2016), »Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting«

Eine avisierte Anwendung des MSPM Setups ist die Detektion magnetisch markierter Zellen in einem Biomaterial. Um zu zeigen, dass dies möglich ist, wird in diesem Abschnitt eine Machbarkeitsprüfung vorgestellt, bei der markierte Zellen in einer Alginat-Gelatine-Probe nachgewiesen werden (Abbildung 3.5b). Diese Materialkombination findet z.B. als Tinte beim 3D-Druck von Biomaterialien Anwendung.[72] Der Massenanteil von Alginat aus Braunalgen (Sigma-Aldrich) in dieser Tinte beträgt 1 % und der von Gelatine (Sigma-Aldrich) 4 %. Die Alginatlösung wurde vor der Anwendung sterilfiltriert und die Gelatine-Lösung autoklaviert.

Die Zellen werden für dieses Experiment nach demselben Protokoll wie in Abschnitt 2.2 markiert. Die erhaltenen $1,4 \cdot 10^6$ Zellen werden mit 300 mL Tinte vermischt und als Tropfen in das Probengefäß gegeben. Für die Vernetzung der Probe wird eine 0,5 mol/l CaCl_2 -Lösung auf die Probe gesprührt (siehe Abbildung 3.5c).

Abbildung 3.5: Machbarkeitsprüfung einer Zellmessung mit dem MSPM Setup.
a) Nach 24 Stunden in SPION-haltigem Kulturmedium weisen Zellen magnetische Nanopartikel um ihren Zellkern, hier grün hervorgehoben, auf. Ohne Nanopartikel wäre der Bereich zwischen dem Zellkern und der Zellmembran deutlich homogener. **b)** Magnetisch markierte Zellen in einer Matrix aus Alginat und Gelatine. **c)** Probe im Probenbehälter. Die Probe enthält etwa $1,4 \cdot 10^6$ Zellen. **d)** Gemesenes Feld der Probe in einem Abstand von 8 mm.

SNR: Signal-Rausch-Verhältnis, engl. "signal-to-noise ratio"



Die Messung des Feldes der biologischen Probe liefert die Feldverteilung in Abbildung 3.5d. Auch wenn das SNR recht klein ist, kann in der Messung dennoch ein negativer Bereich erkannt werden, der von zwei positiven Bereichen flankiert wird. Damit wurde gezeigt, dass es möglich ist, magnetisch markierte Zellen mit dem vorgestellten Aufbau zu detektieren.

3.4 Rekonstruktion

Um aus dem gemessenen Feld die Partikelverteilung zu bestimmen, wird ein Modell des Setups aufgestellt. Dieses Modell beschreibt das Feld einer Quellenverteilung im Probenraum am Ort des Sensors. Zusammengefasst

wird dieses Modell in einer Systemmatrix, die eine Verknüpfung zwischen der Messung und der Partikelverteilung herstellt. Die Funktion der Systemmatrix ist in Abbildung 3.6 gezeigt.



Abbildung 3.6: Mit dem Sensor kann das Feld, das von einer Partikelverteilung ausgeht, gemessen werden. Das gemessene Feld und die Partikelverteilung sind über eine Matrix miteinander verbunden. Diese Matrix wird als Systemmatrix bezeichnet und enthält Informationen dazu, wie Partikel an einem Ort im Probenraum zum gemessenen Feld beitragen.

In den folgenden Abschnitten wird gezeigt, wie man das System modellieren und die Systemmatrix aufstellen kann. Weiterhin wird gezeigt, wie mithilfe der Systemmatrix das inverse Problem gelöst werden kann, um die zugrundeliegende Partikelverteilung zu rekonstruieren. Die dabei erhaltenen Erkenntnisse führen zu Anforderungen, die beim Aufbau eines Setups für die dreidimensionale Detektion von Nanopartikeln berücksichtigt werden müssen. Ein solches Setup wird im letzten Teil dieses Abschnitts vorgestellt und auf seine Eigenschaften untersucht.

Modellierung des MSPM Setups

Eine Modellierung des Aufbaus ermöglicht die Berechnung der Feldverteilung beliebiger Proben. Sie kann dabei helfen, den optimalen Magneten oder die optimale Anordnung von Magneten zu bestimmen, und so dazu beitragen, die Eigenschaften des Setups zu verbessern.

Aus Gleichung 2.1

$$\vec{B}(\vec{r}) = \frac{\mu_0}{4\pi r^2} \frac{3\vec{r}(\vec{m} \cdot \vec{r}) - \vec{m}r^2}{r^3} \quad (2.1)$$

, die das Feld eines Dipols beschreibt, können die Größen abgelesen werden, die die Feldstärke einer Probe an der Position des Sensors bestimmen. Die Größen, die darin durch den experimentellen Aufbau verändert werden können, sind das magnetische Moment \vec{m} und der Vektor \vec{r} , der die relative Position zwischen dem magnetischen Dipol und dem Sensor angibt. Das magnetische Moment der Probe ändert sich dabei in Abhängigkeit von Stärke und Richtung des Magnetfeldes am Ort der Probe, das durch den Permanentmagneten erzeugt wird. Verschiebt man die Probe relativ zur Position des Permanentmagneten, so ändert sich das Feld und damit ihr magnetisches Moment. Zeitgleich ändert sich durch die Verschiebung der Probe der Vektor \vec{r} zwischen dem Dipol der Probe und dem Sensor, was ebenfalls zu einer Änderung des messbaren Feldes führt. Es wird also deutlich, dass es mehrere Parameter gibt, durch die sich die Eigenschaften des Aufbaus ändern. Um in Zukunft schnell Aussagen über die Eigenschaften des Aufbaus treffen zu können, z.B. ob eine Probe mit einem Aufbau detektiert werden kann, wird im Rahmen dieser Arbeit ein Programm erstellt, das das rauschfreie Feld einer beliebigen Probe im Setup berechnen kann.

Voxel: Zusammengesetzt aus den Wörtern Volumen und Element.

Wie im Experiment wird im Modell die Probe über den Sensor rotiert und für jede Position der Probe das Feld am Ort des Sensors berechnet. Dazu wird die Probe in Volumenelemente (Voxel) zerteilt und jedem Voxel eine Masse an SPIONs zugewiesen. Mit der Feldstärke am Ort der Probe und der Magnetisierungskurve in Abschnitt 2.1 wird der Masse im Voxel ein magnetisches Moment zugeordnet. Nach Gleichung 2.1 wird dann das Feld aller Voxel am Ort des Sensors berechnet und aufsummiert.

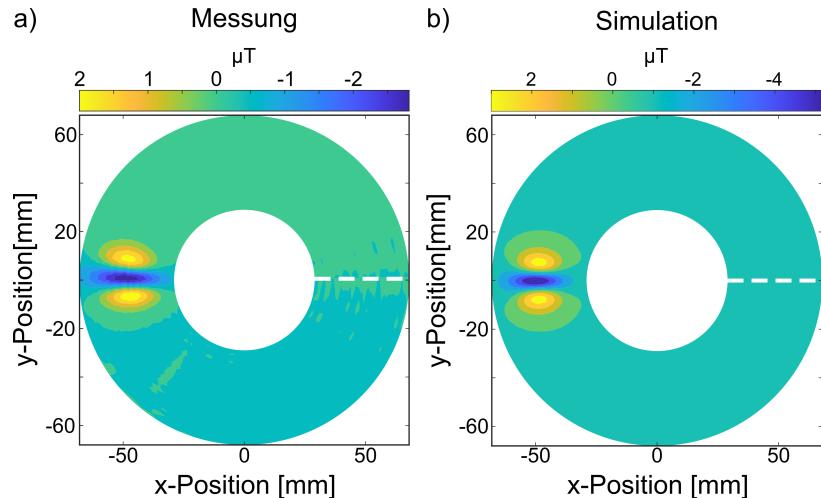


Abbildung 3.7: a) Gemessenes Feld einer Probe unter Verwendung des DC Motors. Die Probe besteht aus 200 µL Wasser mit 5 mg SPIONs.
b) Berechnetes Feld der in a) verwendeten Probe.

Zur Validierung der Resultate dieses Programms wird eine Messung durchgeführt und das Ergebnis mit den Resultaten der Simulation verglichen. Das gemessene Feld ist in Abbildung 3.7a und das berechnete Feld ist in Abbildung 3.7b dargestellt. Um die Messung und die Simulation vergleichen zu können, wird das gemessene Feld rotiert, sodass die Minima von Simulation und Rechnung übereinander liegen. Um die Ähnlichkeit der Verläufe des gemessenen und berechneten Feldes zu bestimmen, wird die Kosinus-Ähnlichkeit berechnet. Die Kosinus-Ähnlichkeit zweier Vektoren \vec{a} und \vec{b} ergibt sich nach:

$$\text{Kosinus-Ähnlichkeit} = \cos(\Theta) = \frac{\vec{a} \cdot \vec{b}}{\|\vec{a}\|_2 \|\vec{b}\|_2}$$

,wobei \vec{a} das gemessene Feld und \vec{b} das berechnete Feld ist. Im Betrachteten Fall ergibt sich eine Kosinus-Ähnlichkeit von 0,89. Da bei der Kosinus-Ähnlichkeit der Kosinus des Winkels zwischen zwei Vektoren berechnet wird, ist maximal ein Wert von 1 zu erreichen, der sich ergibt, wenn die Vektoren parallel zueinander ausgerichtet sind. Da der bestimmte Wert nahe eins ist, lässt sich schließen, dass die Form des gemessenen und berechneten Feldes gut übereinstimmt.

Dass in der Messung der obere Bereich etwas positivere Werte erreicht als der untere, liegt an dem Hintergrundsignal, das durch den DC Motor verursacht wird, der die Probe in Rotation versetzt. Die absoluten Werte der Feldstärke weichen zudem leicht voneinander ab. Der Grund hierfür ist das in Abschnitt 1.4 gezeigte, frequenzabhängige Filterverhalten des Sensors. Dieses Filterverhalten führt dazu, dass das Signal etwas kleiner und leicht verzerrt vom Sensor aufgenommen wird. Dieses Filterverhalten wird in der Simulation bisher nicht berücksichtigt. Weitere

kleine Abweichungen zwischen Simulation und Messung sind durch Ungenauigkeiten in der radialen Positionierung der Probe in der Messung zu erwarten. Die Ungenauigkeiten können hier einige Millimeter betragen. Zudem könnte die Probe bei der Messung leicht verkippt sein, sodass die Rotationsachse des Zylinders nicht exakt radial zur Rotationsachse des Probentellers ausgerichtet ist.

Systemmatrix

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, wie das Feld einer Partikelverteilung berechnet werden kann. Mit dieser Information kann jetzt die Systemmatrix aufgestellt werden, die nach Abbildung 3.6 zwischen dem Feld und der Partikelverteilung steht und benötigt wird, um das inverse Problem zu lösen. Abbildung 3.8 visualisiert das Verfahren zur Erstellung der Systemmatrix. Um die Systemmatrix aufzustellen, muss die Punktspreizfunktion (PSF) bekannt sein. Die PSF gibt den Feldverlauf einer Punktquelle im Bereich der Sensorpositionen an und kann experimentell oder mit einem Modell des Systems bestimmt werden. Im Beispiel in Abbildung 3.8a wurde eine stark vereinfachte PSF gewählt, deren Feld an fünf Sensorpositionen messbar ist.

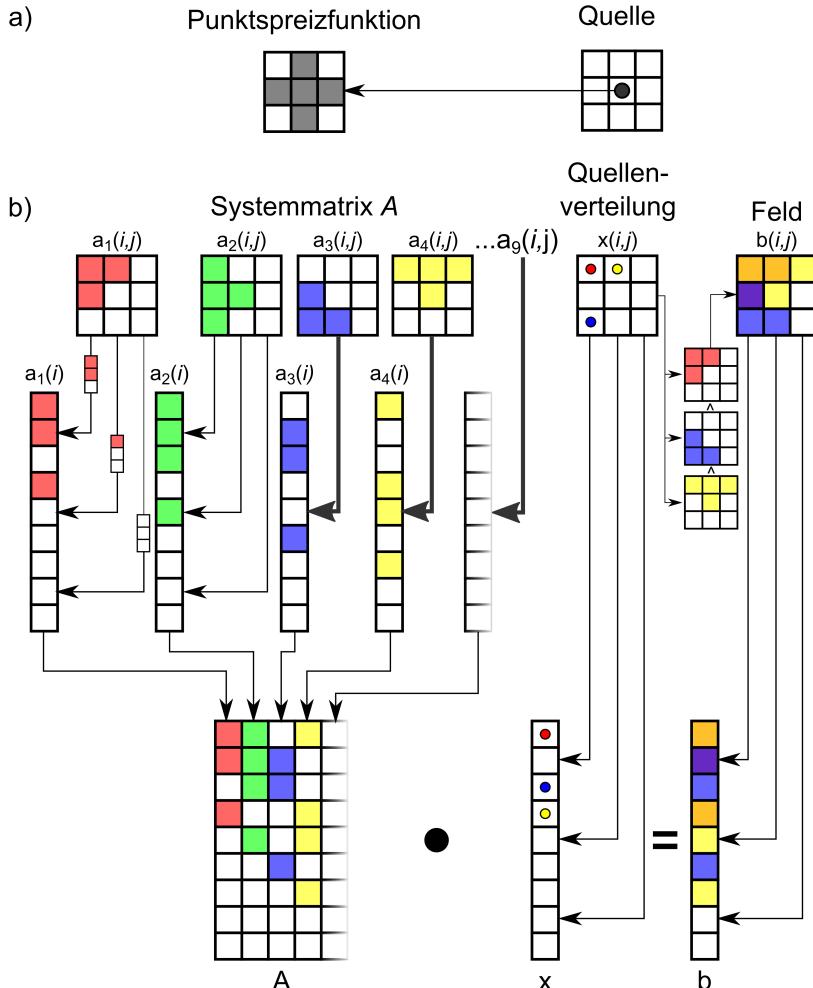


Abbildung 3.8: Um das System zu beschreiben, werden die Bereiche, in denen sich der Sensor und die Probe befinden in kleinere Bereiche unterteilt. Diese Unterbereiche sind hier als Kästchen dargestellt. **a)** Eine Punktquelle im Bereich der Probe erzeugt ein Feld im Bereich des Sensors. Die Form dieses Feldes wird als Punktspreizfunktion (engl. "point spread function", PSF) bezeichnet. Während die Punktquelle in einem Kästchen lokalisiert ist, kann das Signal dieser Quelle in mehreren Unterbereichen vom Sensor gemessen werden (graue Kästchen). **b)** Die Systemmatrix gibt das Feld im Sensorbereich für jede Probenposition an. Um mit den Daten rechnen zu können, werden die PSFs für einzelne Quellenpositionen als Vektoren geschrieben. All diese Vektoren werden zur Systemmatrix A zusammengefasst. Die dargestellte Quellenverteilung zeigt eine beliebige Anordnung von Quellen. Um das Feld dieser Verteilung zu bestimmen, müssen die Felder einzelner Quellen vereint werden. Auch die Quellverteilung und das gemessene Feld werden als Vektoren geschrieben, sodass das System durch die Gleichung $Ax = b$ beschrieben wird.

Um die Systemmatrix A zu bestimmen, werden zunächst die PSFs für alle Quellpositionen als Arrays aufgestellt. Aus Gründen der Übersicht-

PSF: Punktspreizfunktion (engl. "point spread function")

lichkeit sind im Beispiel in Abbildung 3.8b nur die Arrays $a_{1..4}(i, j)$ dargestellt. Für das Array $a_1(i, j)$ ist detailliert gezeigt, wie dieses in einen Spaltenvektor umgeformt wird, indem die Spaltenvektoren des Arrays zu einem Spaltenvektor zusammengefasst werden. Die so erstellten Vektoren stellen die Spaltenvektoren der Systemmatrix A dar.

Die Quellenverteilung $x(i, j)$ in Abbildung 3.8b zeigt eine willkürlich gewählte Verteilung von Punktquellen im Probenraum. Die Farbkodierung verknüpft diese Punktquellen mit ihrer PSF. Um das Feld dieser Quellenverteilung im Bereich des Sensors zu bestimmen, müssen die einzelnen PSFs überlagert werden. Die Farbe des resultierenden Feldes $b(i, j)$ kodiert die überlagerten PSFs einzelner Punktquellen. Wie die PSFs können auch die Quellenverteilung x und das Feld b in Vektoren umgeformt werden. So ergibt sich die Gleichung [73]

$$Ax = b$$

in der aus der Systemmatrix A und der Partikelverteilung x das Feld b berechnet wird.

Um aus einem gemessenen Feld die zugrunde liegende Partikelverteilung zu bestimmen, muss das Minimierungsproblem[73]

$$\min_x \|Ax - b\|_2^2$$

gelöst werden. Es muss also ein Vektor x für die Partikelverteilung gefunden werden, der multipliziert mit der Systemmatrix A das magnetische Feld b ergibt. Da bei der Lösung dieses Problems die Partikelverteilung aus der Feldverteilung bestimmt wird, also aus der Beobachtung die Ursache, bezeichnet man dieses Problem als ein inverses Problem.

Aufgrund von Rauschen, das die Messung überlagert, handelt es sich bei dieser Gleichung um ein schlecht konditioniertes Problem (engl. "ill-posed problem"), dessen Lösung nicht notwendigerweise der gesuchten Verteilung entspricht. Um die Lösung dieses schlecht konditionierten Problems anzunähern wird eine Regularisierungsmethode benötigt, die eine Näherung der korrekten Lösung liefert.

Inverses Problem

Um die optimale Lösung des im letzten Abschnitt vorgestellten Problems zu bestimmen, müssen die Eigenschaften des Systems aus der Systemmatrix extrahiert werden. Abbildung 3.9 soll die Systemmatrix der Anwendungsbereiche des SFB 1261 symbolisieren. Für das menschliche Auge ist es einfach, aus dieser Systemmatrix die wesentlichen Eigenschaften des Systems zu bestimmen. So geht aus der gezeigten Systemmatrix hervor, dass die Anwendungen offenbar in vier Bereiche unterteilt sind, die sich im einzelnen mit dem Gehirn, den Nerven, Zellen und dem Herzen beschäftigen. Bei genauerer Betrachtung können weitere Details erkannt werden, z.B. dass es sich bei den Nerven um Nerven des Armes handelt. Diese Charakterisierung des Systems und die Bestimmung seiner Eigenschaften ist für einen Algorithmus nur schwer durchführbar.

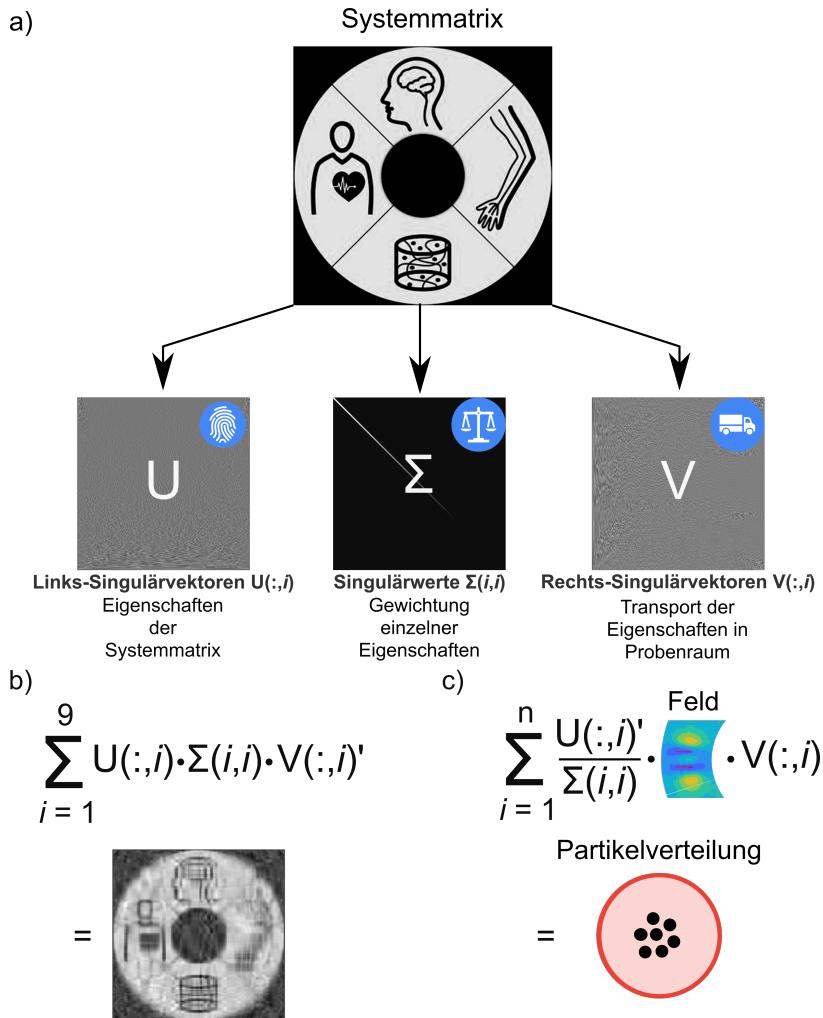


Abbildung 3.9: a) "Systemmatrix" der Anwendungsprojekte des SFB 1261. Die Systemmatrix wird mithilfe der Singulärwertzerlegung in drei spezielle Matrizen zerlegt. b) Aufsummieren der Produkte aus Singulärvektoren und Singulärwert ergibt die Systemmatrix. Dabei ist hervorzuheben, dass bereits wenige Summations schritte zu einem befriedigenden Ergebnis führen. Den Leser mag hier die scheinbar niedrige Qualität des Bildes stören. Diese liegt jedoch nicht in einer Unachtsamkeit bei der Erstellung des Bildes begründet, sondern daran, dass nur neun Eigenschaften des Systems berücksichtigt wurden. Ein besseres Bild ergibt sich, wenn mehr Eigenschaften berücksichtigt werden, also die Summe bis zu einem höheren Index n durchgeführt wird. c) Um anhand des mit MSPM gemessenen Feldes die zugrundeliegende Partikelverteilung x zu bestimmen, werden die Eigenschaften $U(:, i)'$ mit $\Sigma(i, i)$ gewichtet. Anschließend wird im gemessenen Feld nach dieser gewichteten Eigenschaft gesucht. Dazu wird das Skalarprodukt der beiden Vektoren gebildet und so ihre Ähnlichkeit bestimmt. Im abschließenden Schritt wird die Eigenschaft durch Multiplikation mit dem Rechts-Singulärvektor $V(:, i)$ zurück in den Probenraum überführt und es ergibt sich die zugrunde liegende Partikelverteilung.

Abhilfe schafft die Singulärwertzerlegung (SVD), dargestellt in Abbildung 3.9a, die die Systemmatrix in drei Matrizen aufspaltet.[73] Diese Matrizen werden üblicherweise mit U , V und Σ gekennzeichnet. Die Spaltenvektoren in U und V werden als Links- und Rechts-Singulärvektor bezeichnet und die Einträge auf der Diagonalen von Σ als Singulärwerte. Die Norm

$$\|U(:, i)\|_2 := \sqrt{(U(1, i))^2 + (U(2, i))^2 + \dots + (U(i, i))^2} = 1$$

der Links- und Rechts-Singulärvektoren ist dabei eins und Singulärwerte, die Einträge auf der Diagonalen, nehmen nach rechts unten ab. Zudem stehen die Singulärvektoren orthogonal zueinander.

Die Links-Singulärvektoren $U(:, i)$ können als die Eigenschaften der Systemmatrix betrachtet werden und die Singulärwerte $\Sigma(i, i)$ als die Gewichtung einzelner Eigenschaften.* Die Rechts-Singulärvektoren $V(:, i)$ überführen eine gewichtete Eigenschaft zurück in den Probenraum, geben also die Quellenposition einer Eigenschaft an.

In Abbildung 3.9b wird gezeigt, wie die Summe über das Produkt mehrerer gewichteter Eigenschaften mit den entsprechenden Spaltenvektoren

[73]: Hansen (2010), »3. Getting to Business: Discretizations of Linear Inverse Problems«

SVD: Singulärwertzerlegung, engl. "Singular Value Decomposition"

$U(:, i)$: Links-Singulärvektor
 $V(:, i)$: Rechts-Singulärvektor
 $\Sigma(i, i)$: Singulärwerte

* Die Inspiration den Links-Singulärvektor als Eigenschaften des Systems anzusehen stammt aus dem Vortrag "A practical guide to Singular Value Decomposition in Python" gehalten von D. Pyrathon auf der PYCON 2018 [74]

zu einer Abbildung der Systemmatrix führen. Dabei reichen bereits wenige Eigenschaften aus, um die grundlegenden Merkmale des Systems zu beschreiben.

Mit der Darstellung der Systemmatrix auf diese Weise ist einem jedoch wenig geholfen, da eine Rekonstruktion der zugrundeliegenden Partikelverteilung gesucht ist. Zur Bestimmung dieser Partikelverteilung muss ein Eigenschaften-Vektor $U(:, i)'$ mit $\Sigma(i, i)$ gewichtet werden, um den gewichteten Eigenschaften-Vektor U_{gew}

$$U_{\text{gew}} = U(:, i)' / \Sigma(i, i)$$

zu erhalten. Anschließend wird die Ähnlichkeit des gewichteten Eigenschaften-Vektors und des gemessenen Feld-Vektors b bestimmt. Dazu wird das Skalarprodukt der beiden Vektoren gebildet. Ist der Ergebniswert dieses Skalarproduktes groß, so bestimmt die Eigenschaft wesentlich das gemessene Feld. Eine Multiplikation dieses Skalars mit dem Rechts-Singulärvektor $V(:, i)$ transportiert die Eigenschaft in den Probenraum und liefert die Quellpositionen dieser Eigenschaft. Dieses Verfahren ist in Abbildung 3.9c dargestellt. Zusammenfassend ergibt dies die Gleichung[73]

$$x(n) = \sum_{i=1}^n \frac{U(:, i)' \cdot b}{\Sigma(i, i)} \cdot V(:, i)$$

für die Bestimmung der zugrundeliegenden Partikelverteilung x , die das gemessene magnetische Feld b erzeugt. Dabei gibt n die Anzahl der bei der Rekonstruktion berücksichtigten Systemeigenschaften an.

Da die Werte auf der Diagonalen von Σ mit dem Laufindex i abnehmen, werden die Werte im gewichteten Eigenschaften-Vektor U_{gew} mit i größer. Aus diesem Grund werden Eigenschaften bei höherem Laufindex stärker gewichtet als vorgesehen. Da insbesondere diese weniger deutlichen Eigenschaften durch das aufgenommene Rauschen des Signals beeinflusst werden, muss die Summe bei einem gewissen Wert von n abgebrochen werden. Diesen Abbruch der Summe bezeichnet man als Regularisierung.

Im einfachsten Fall unterbricht man die Summe durch eine visuelle Kontrolle der Ergebnisse. Ein Beispiel dafür, dass die Berücksichtigung von mehr Eigenschaften nicht immer zu einer Verbesserung der Rekonstruktion führt, ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Diese Abbildung zeigt das Ergebnis einer Rekonstruktion unter Berücksichtigung unterschiedlich vieler Eigenschaften mit und ohne Rauschen. Das Magnetfeld der Partikelverteilung wurde dazu nach den Schritten berechnet, die in Abschnitt 3.4 vorgestellt wurden. Um den Einfluss des Rauschens zu simulieren, wurde das berechnete Feld mit gaußschem Rauschen überlagert.

In diesem Beispiel zeigt sich, dass die Berücksichtigung aller Eigenschaften im Fall mit gaußschem Rauschen zu keinem sinnvollen Ergebnis führt. Daher muss die Summe nach einer bestimmten Anzahl an berücksichtigten Eigenschaften abgebrochen werden, im Beispiel etwa nach 3/4 aller verfügbaren Eigenschaften.

groß: Der Wert ist groß, wenn er ähnlich dem Produkt der Beiträge der Vektoren U_{gew} und b ist.

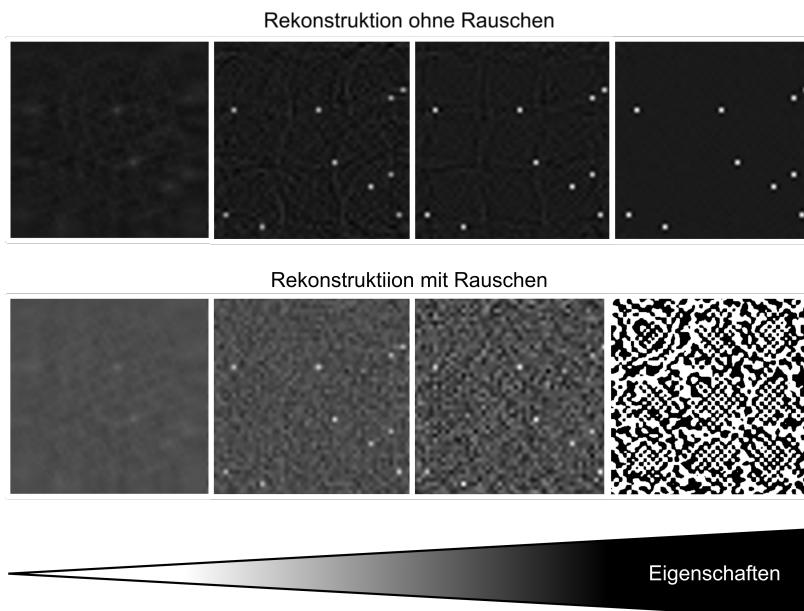


Abbildung 3.10: Vergleich der Rekonstruktion unter Berücksichtigung unterschiedlich vieler Eigenschaften. Die Anzahl der berücksichtigten Eigenschaften nimmt von links nach rechts zu. Ist die Beobachtung rauschbehaftet, so wird die Rekonstruktion mit der Anzahl der berücksichtigten Eigenschaften nicht kontinuierlich besser.

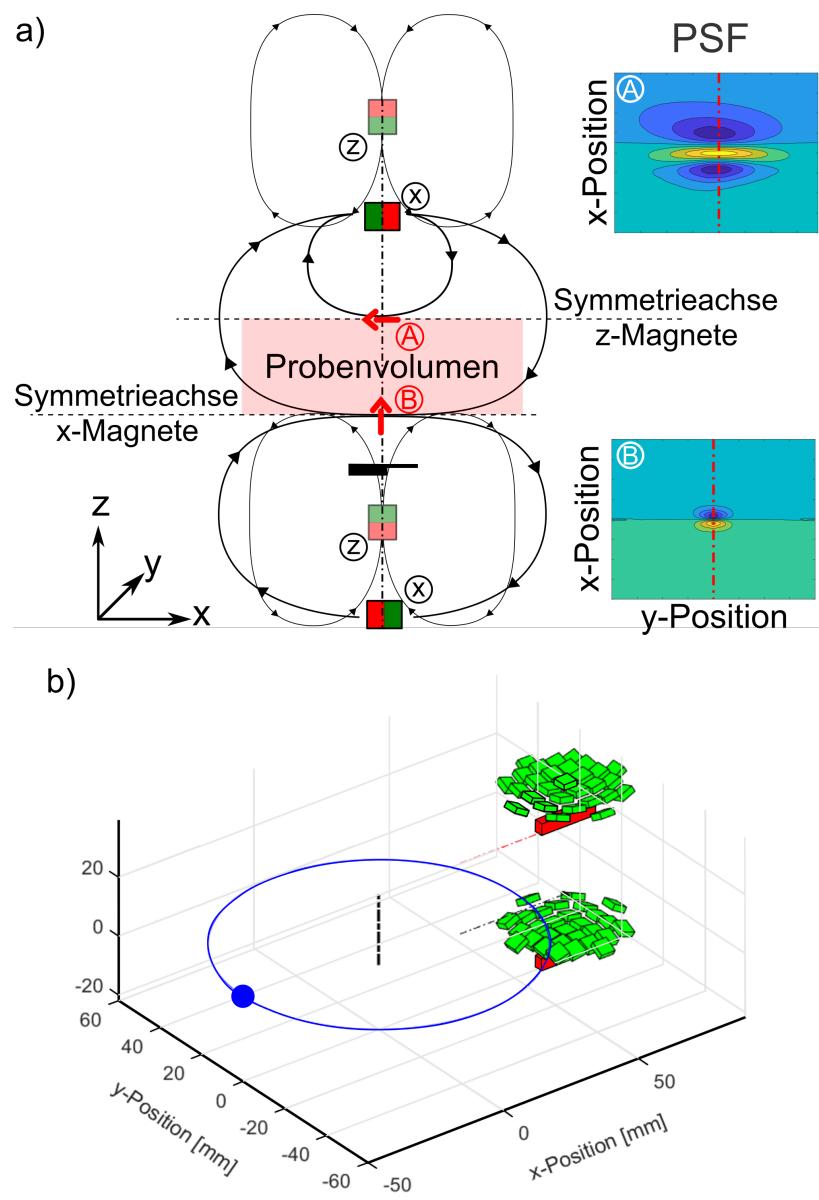
3.5 Aufbau 3D-Setup

In den letzten beiden Abschnitten wurde gezeigt, wie man von einer Punktspreizfunktion (PSF) zur Systemmatrix gelangt, die die Eigenschaften des Systems beschreibt. Dabei wurde vorgestellt, wie die Singulärvektoren und Singulärwerte mithilfe der Singulärwertzerlegung bestimmt werden können und welche Informationen in ihnen enthalten sind. Es wurde veranschaulicht, dass die Links-Singulärvektoren die Eigenschaften des Systems enthalten und die Rechts-Singulärvektoren diese Eigenschaften in den Probenraum transportieren und damit die Quellen der Eigenschaften angeben. Ein großer Schritt für das MSPM Setup wäre es, wenn nicht nur die Bestimmung von zweidimensionalen Verteilungen, wie mit dem aktuellen Setup, sondern auch die Bestimmung von dreidimensionalen Verteilungen möglich wäre. Eine Möglichkeit dies zu erreichen wäre gegeben, wenn sich die Eigenschaften der PSF in Abhängigkeit von der z-Position der Quelle ändern. Wird in einem solchen System eine Eigenschaft aus einer tieferen Schicht mit einem hohen Wert gewichtet, wird diese Gewichtung durch den Rechts-Singulärvektoren tief liegenden Quellen zugeordnet.

Wie der Feldverlauf aussehen könnte, um eine PSF zu erhalten, deren Eigenschaften sich mit der z-Position der Probe ändern, ist in Abbildung 3.11a dargestellt. Die Probe befindet sich im skizzierten Aufbau zwischen der Position A und B. Die PSFs in den Ebenen A und B lassen sich berechnen und sind in der Abbildung auf der rechten Seite dargestellt. Diese PSFs geben die Feldverteilung von Punktquellen an, wenn ihre magnetischen Momente so ausgerichtet sind, wie es die roten Pfeile in der Skizze an den Positionen A und B anzeigen. Magnetische Momente an Position A sind parallel und an Position B senkrecht zum Biegebalken des Sensors ausgerichtet. Dabei unterscheiden sich die PSFs der beiden Positionen deutlich. Während die PSF parallel ausgerichteter magnetischer Momente an Position A einen nahezu symmetrischen Verlauf entlang der x-Achse aufweist (rote Linie in PSF), zeigt die PSF von magnetischen Momenten, die senkrecht zum Sensor ausgerichtet sind, einen asymme-

PSF: Punktspreizfunktion, engl. "point spread function"

Abbildung 3.11: a) Vereinfachte Anordnung von Magneten, um eine räumliche Auflösung in drei Dimensionen zu erlangen. Um dies zu erreichen, müssen sich die PSFs mit der z-Position der Probe im Probenvolumen auf der Achse über dem Sensor ändern. Dies kann durch eine positionsabhängige Verkipfung der magnetischen Momente (rote Pfeile) erreicht werden. In der Skizze sind die magnetischen Momente an zwei Positionen (A und B) auf der Achse dargestellt. Die Positionen A und B begrenzen das Probenvolumen nach oben bzw. unten. Von Position A nach B wird das magnetische Moment von einer Ausrichtung parallel zur z-Achse in eine Ausrichtung antiparallel zur x-Achse verkippt. Die PSFs für verschiedene Höhen sind rechts von der Skizze dargestellt. Die Eigenschaften der PSFs an Position A und B unterscheiden sich deutlich. So zeigt sich an Position A eine asymmetrische und an Position B eine symmetrische PSF. Zur Erzeugung eines Feldes, das die magnetischen Momente wie zuvor beschrieben ausrichtet, werden mindestens zwei Paare von Magneten benötigt. Entsprechend der Bezeichnung der Magneten sind diese für die Ausrichtung in x- bzw. z-Richtung zuständig. Da die Magneten symmetrisch zum oberen bzw. unteren Rand des Probenvolumens angeordnet sind, heben sich die Felder eines Magnettares an der oberen bzw. unteren Kante des Probenvolumens auf. Dadurch kann erreicht werden, dass die magnetischen Momente auf der Achse entlang der roten Pfeile ausgerichtet sind. **b) Mögliche Anordnung der Magnete, die zusätzlich ein für den Sensor passendes Bias-Feld erzeugt.** Die roten Magnete erzeugen auf der Achse über dem Sensor ein Feld, das tangential zur Bewegungsrichtung der Probe zeigt - hier in y-Richtung. Die grünen Magnete erzeugen das Feld in z-Richtung. Durch die Anordnung wird ein relativ großes Volumen erzeugt, in dem die x-Komponente des Feldes klein ist. Dies ist notwendig, um den Sensor nicht zu sättigen.



trischen Verlauf entlang der x-Achse. Aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften der PSFs bei verschiedenen Abständen z sollte der visuelle Eindruck einer Messung von einfachen Verteilungen bereits Aussagen über die 3D Verteilung der SPIONs ermöglichen.

Im Folgenden wird die Strategie zum Anordnen der Magnete vorgestellt, um eine Ausrichtung der magnetischen Momente zu erreichen, wie sie in der Skizze in Abbildung 3.11a eingezeichnet ist. Dabei werden jeweils mindestens zwei Magnete verwendet, um die magnetischen Momente an Position A in x- und an Position B in z-Richtung auszurichten. Durch die Verwendung einer symmetrischen Anordnung von Magneten, ober- und unterhalb der Probe, heben sich die Felder dieser Magnete in der zwischen ihnen liegenden Symmetrieebene auf. In der Skizze sind die Magnete mit einem x markiert, die die magnetischen Momente an Position A in x-Richtung ausrichten. Entsprechend sind die Magnete mit einem z markiert, die die magnetischen Momente an Position B in

z -Richtung ausrichten. Die Magnete zur Ausrichtung der magnetischen Momente in z -Richtung sind symmetrisch zu der Ebene ausgerichtet, auf der Punkt A liegt (gestrichelte Linie). So wird eine Beeinflussung dieses Magnetpaars auf die Orientierung der magnetischen Momente an Punkt A ausgeschlossen.

Die Herausforderung bei der Anordnung der Magnete ist, dass am Ort des Sensors zusätzlich optimale Bedingungen für dessen Betrieb geschaffen werden müssen. Das bedeutet für den aktuell verwendeten Sensor ein Feld von etwa $-1,6\text{ mT}$ parallel zur langen Achse des Biegebalkens und ein möglichst kleines Feld entlang der kurzen Achse des Biegebalkens. Da senkrecht zum Sensor stehende Felder die Eigenschaften des Sensors kaum beeinflussen,[75] hat man bei der Positionierung in z -Richtung einen großen Spielraum. Dennoch sollte der Gradient des Feldes senkrecht zur Oberfläche des Biegebalkens klein sein. Das ist damit zu begründen, dass Magnetfelder frei von Quellen sind und daher durch die Oberfläche eines Volumens immer dieselbe Anzahl an Feldlinien ein- und austritt. Denkt man sich ein quaderförmiges Volumen, dass den Sensor umgibt, so wird sich der Vektor der z -Komponente der ein- und austretenden Feldlinien, bei Anwesenheit eines Gradienten in z -Richtung, unterscheiden. Da Quellenfreiheit gegeben sein muss, werden diese Feldlinien im betrachteten Bereich ihre Richtung ändern und das Volumen seitlich verlassen. Somit ist ein Gradient in z -Richtung unausweichlich mit einem Feld in x - bzw. y -Richtung verbunden.

Unter Berücksichtigung dieser Anforderungen wurde das in Abbildung 3.11b dargestellte Setup entworfen. Die grünen Magnete werden für die Ausrichtung der magnetischen Momente in z -Richtung und die roten Magnete für eine Ausrichtung parallel zum Biegebalken benötigt.

Um zu bestimmen, ob mit einem Aufbau die Detektion einer 3D-Partikelverteilung möglich ist, kann der Tiefenauflösungsplot (DRP) des Systems betrachtet werden. [76] Der DRP enthält Informationen dazu, in welche Ebene des Probenvolumens eine Eigenschaft $U(:, i)$ vom Rechts-Singulärvektor $V(:, i)$ transportiert wird, bzw. wo die Quelle dieser Eigenschaft liegt. Um den DRP bestimmen zu können, wird daher der Rechts-Singulärvektor des Setups benötigt, der mit der SVD aus der Systemmatrix abgeleitet werden kann. In Abbildung 3.8 wurde gezeigt, wie die Systemmatrix für eine zweidimensionale Detektion aufgestellt wird. Dieses Konzept kann auf drei Dimensionen erweitert werden, indem man Daten weiterer Ebenen an die Spaltenvektoren a_i , x und b anhängt. Der DRP wird aus den Rechts-Singulärvektoren $V(:, i)$ bestimmt, indem dieser in Ebenenvektoren v_j unterteilt wird. Der Zusammenhang zwischen dem Rechts-Singulärvektor $V(:, i)$ und den Ebenenvektoren v_j ist in der Abbildung 3.12 veranschaulicht. Jeder dieser Ebenenvektoren enthält Angaben zu einer Ebene des Probenvolumens. Da die Norm eines Singulärvektors eins ist, gibt die Norm einzelner Ebenenvektoren den prozentualen Anteil p_j an, mit der die Eigenschaft in einer Ebene des Probenvolumens liegt. Liegen die Eigenschaften lokalisiert in einzelnen Ebenen, so ist eine gute Tiefenauflösung zu erwarten.

Der Vergleich der DRPs des aktuellen und des vorgeschlagenen Setups ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Es lässt sich beobachten, dass die Eigenschaften des vorgeschlagenen Setups deutlich lokalisierter in einzelnen Ebenen liegen, was sich durch die hohen Werte auf der Diagonalen

[75]: Greve u. a. (2010), »Giant magneto-electric coefficients in $(\text{Fe}_{90}\text{Co}_{10})_{78}\text{Si}_{12}\text{B}_{10}$ -AlN thin film composites«

DRP: Tiefenauflösungsplot; engl. "Depth Resolution Plot"

[76]: Paoletti u. a. (2014), »A computationally efficient tool for assessing the depth resolution in large-scale potential-field inversion«

SVD: Singulärwertzerlegung, engl. "Singular Value Decomposition"

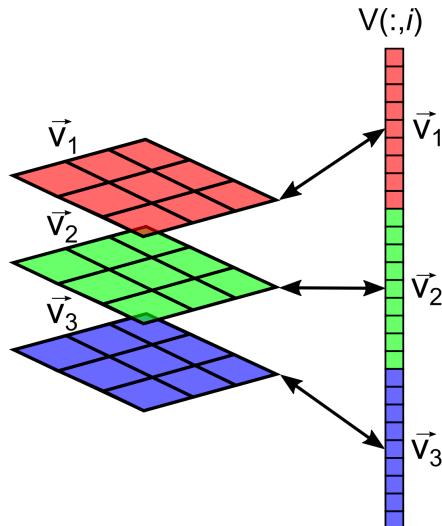
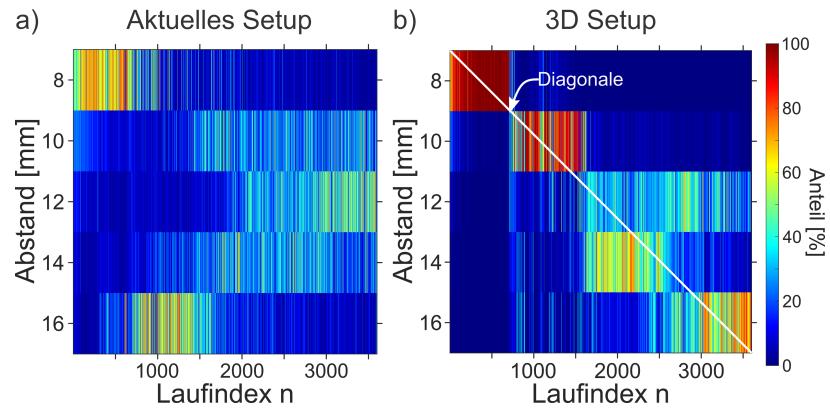


Abbildung 3.12: Zusammenhang zwischen dem Rechts-Singulärvektor $V(:,i)$ und den Ebenenvektoren v_j .

Abbildung 3.13: a) "Depth Resolution Plot" (DRP) des aktuellen Aufbaus. Auf der y-Achse des DRP ist der z-Abstand von Ebenen des Probenvolumens zum Sensor angegeben. Auf der x-Achse findet sich der Laufindex n der Eigenschaft. Der DRP gibt an, in welche Ebene des Probenvolumens eine Eigenschaft vom Rechts-Singulärvektor transportiert wird. Um eine gute Tiefenauflösung zu erhalten, müssen Eigenschaften fokussiert in einzelnen Ebenen liegen. **b) DRP des vorgeschlagenen 3D-Setups.** Der Vergleich der Plots zeigt, dass beim vorgeschlagenen Setup die Eigenschaften stärker auf einzelne Ebenen fokussiert sind. Aus diesem Grund ist eine bessere Tiefenauflösung dieses Setups zu erwarten.



ausdrückt. Im Idealfall würden die Eigenschaften zu 100 % auf der Diagonalen liegen.

Eigenschaften, die auf Ebenen mit größerem Abstand zum Sensor liegen, sind dabei bei höheren Laufindizes n zu finden. Der Grund dafür ist die Abnahme der Feldstärke mit zunehmendem Abstand zwischen Sensor und Quelle, weshalb die Eigenschaften tief liegender Ebenen schwächer aus der Systemmatrix hervorgehen. Der DRP zeigt also deutlich, dass eine Messung ein gutes SNR aufweisen muss, damit Quellen in tiefer liegenden Ebenen detektiert werden können.

SNR: Signal-Rausch-Verhältnis, engl. "signal-to-noise ratio"

Fazit: DETEKTION MAGNETISCH MARKIERTER ZELLEN

4

Mit dem im Rahmen der Arbeit aufgebauten und erforschten System ist es möglich, kleine Mengen an magnetischen Nanopartikeln in einer Probe nachzuweisen. In einer MSPM Messung von 15 Sekunden Länge ist das Signal einer Probe, deren Unterkante sich 8 mm vom Sensor entfernt befindet und 20 Mikrogramm SPIONs enthält, gerade noch vom Hintergrundsignal unterscheidbar. Durch den Austausch des DC Motors mit einem Piezomotor kann dieses Hintergrundsignal verringert werden, womit sich die Nachweisgrenze zu kleineren Massen verschiebt. Zudem wurde gezeigt, dass es möglich ist, aus dem gemessenen Feld die Position der magnetischen Nanopartikel zu bestimmen, die das Feld erzeugen. Dabei wurde gezeigt, dass bei einem Abstand von 8 mm eine räumliche Auflösung von 5 mm erreicht wird. Wichtig für die Rekonstruktion der Partikelverteilung ist dabei ein gutes SNR des gemessenen Feldes, damit viele Eigenschaften für die Rekonstruktion berücksichtigt werden können.

In einem Magnetophorese-Experiment wurde die Masse an SPIONs in einzelnen Zellen zu mehreren Zeiten nach der Markierung bestimmt. Dabei zeigte sich, dass sich direkt nach dem Markierungsprozess im Mittel etwa 100 pg SPIONs in einer Zelle befinden und diese Masse mit der Zeit aufgrund der Zellteilung abnimmt.

Mit diesen Angaben wird im Folgenden die Machbarkeit von Zellmessungen mit dem MSPM Setup beurteilt. Die Proben zur Bestimmung der Nachweisgrenze bestanden aus zylinderförmigen Proben, mit einer Höhe von 12 mm und einem Durchmesser von 5 mm. Damit ist das Probenvolumen dreidimensional, was in der Rekonstruktion, aufgrund der schlechten Tiefenauflösung dieses Aufbaus, nicht dargestellt werden kann. Im aktuellen Aufbau wird daher näherungsweise die Projektion der Partikel auf den Probenträger bestimmt. Um aus dem zylinderförmigen Probenvolumen ein messbares Signal zu erhalten, müssen im Probenvolumen mindestens 20 µg SPIONs enthalten sein. Angenommen jede Zelle enthält nach der Markierung die zuvor experimentell bestimmte Masse von 100 pg SPIONs, dann müssten in einem Volumen von 200 µL 200 k Zellen vorhanden sein, um ein messbares Signal zu erzeugen.

Ist diese Anzahl von Zellen in einem Volumen von etwa 200 µL realistisch? Im Zusammenhang mit den Magnetophorese-Experimenten wurde für den Radius einer im Medium schwimmenden Zelle ein Wert von 10 µm bestimmt. Wird davon ausgegangen, dass eine Zelle in einer dreidimensionalen Probe das Volumen einer Kugel mit einem Radius von 10 µm einnimmt, ergibt sich für 200 k Zellen ein Volumen von 0,837 mm³, was 0,42 % des Gesamtvolumentums entspricht. Ein kleiner Volumenanteil von 0,42 % an markierten Zellen in einem Probenvolumen von 200 µL reicht also aus, um ein messbares Signal zu erzeugen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass zwar ein Signal gemessen werden kann, eine Rekonstruktion der Zellverteilung aufgrund des niedrigen SNR jedoch nicht möglich ist.

Im Folgenden wird diskutiert, ob mit dem aktuellen Setup die Messung zur Wundheilung möglich ist. Bei Experimenten zur Wundheilung werden Zellen in einem Bereich einer konfluenten Zellschicht entfernt z.B. einem Streifen und anschließend beobachtet, wie dieser Spalt mit der Zeit zuwächst. Um zu beurteilen, ob eine Messung zur Wundheilung mit dem MSPM Setup realistisch ist, wird zunächst die Anzahl an Zellen pro Quadratmillimeter bestimmt. In einer nahezu konfluenten Zellschicht befinden sich etwa 530 Zellen auf einem Quadratmillimeter. Ist jede dieser Zellen mit 100 pg markiert, befinden sich auf diesem Quadratmillimeter 53 000 pg bzw. 0,053 µg SPIONs. Um auf die messbare Menge von 20 µg zu kommen, bräuchte man also eine von markierten Zellen bedeckte Fläche von etwa 380 mm². Diese Fläche ist 6,5-mal größer als die Projektion des zylinderförmigen Probenvolumens auf den Probenhalter, der eine Fläche von 60 mm² bedeckt. Damit ist es mit den aktuellen Parametern des MSPM Setups nicht möglich, ein Signal von einer einzelnen Zellschicht zu erhalten.

Um das Signal einer einzelnen Zellschicht messen zu können, müsste das von den internalisierten Partikeln ausgehende Feld 6,5-mal größer bzw. das SNR 6,5-mal besser sein. Eine Möglichkeit dies zu erreichen, wäre die Verwendung einer längeren Messzeit. Ein Fortschritt in diese Richtung wurde durch die Verwendung eines Piezomotors erzielt. Messungen mit dem Piezomotor zeigen, dass das Hintergrundsignal einzelner Rotationen nicht korreliert ist, wodurch eine Mittelung über eine längere Messzeit möglich ist. Dabei nimmt das Signal durch Aufsummieren über n Rotationen um n zu, während das stochastische Rauschen nur um den Faktor \sqrt{n} wächst. Dadurch ergibt sich durch eine n -mal längere Messzeit ein \sqrt{n} -mal besseres SNR. Man müsste also etwa 40 mal länger messen, um eine Vergrößerung des SNR um das 6,5-fache zu erreichen.

Eine weitere Möglichkeit das Signal zu verstärken ist es, den Abstand zwischen dem Sensor und der Probe zu reduzieren. Simulationen in Lukat u.a.[1] dazu zeigen, dass eine Reduktion von aktuell 8 mm auf 1 mm zu einem 5,8-fach größeren Feld führt. Mit einer Reduktion des Abstandes und einer etwas längeren Messzeit sollte also das Signal einer einzelnen konfluenten Zellebene mit einer Fläche von 60 mm² direkt nach der Markierung messbar sein. Dabei ist aber zu beachten, dass das SNR weiterhin sehr klein sein wird, womit eine Rekonstruktion nicht möglich ist, da zu wenige Eigenschaften sicher detektiert werden können. An dieser Stelle sei auf den Picard-Plot verwiesen, der eine Abschätzung ermöglicht, die angibt, wie viele Eigenschaften bei der Rekonstruktion berücksichtigt werden können.[73] Mit der Reduktion des Abstandes zwischen Probe und Sensor wird auch die Auflösung des Setups von aktuell 5 mm besser werden. Der Grund dafür ist die fokussiertere PSF bei kleineren Abständen.

Im vorgeschlagenen 3D-Setup hat man durch die Umpositionierung der Magnete die Möglichkeit, die Höhe des Probenvolumens zu verkleinern, wodurch die Auflösung in z-Richtung zunimmt, da die PSFs mit unterschiedlichen Eigenschaften (Abbildung 3.11a, rechts) näher beieinander liegen. Dies ermöglicht die räumliche Trennung von Quellen in dicht übereinander liegenden Ebenen. Diese höhere Auflösung in z-Richtung wäre insbesondere für Experimente zur Migration von Zellen in Biomaterialien interessant, bei der die Tiefe bestimmt werden soll, in die Zellen nach einer bestimmten Zeit vorgedrungen sind. Allerdings muss

[1]: Lukat u. a. (2020), »Mapping of magnetic nanoparticles and cells using thin film magnetoelectric sensors based on the delta-E effect«

[73]: Hansen (2010), »3. Getting to Business: Discretizations of Linear Inverse Problems«

Die Höhe des Probenvolumens entspricht dem Abstand zwischen Punkt A und B in Abbildung 3.11a

dabei sichergestellt werden, dass sich nur im definierten Probenvolumen magnetische Partikel befinden, da es sonst zu weiteren Feldern kommt, die eine Rekonstruktion verhindern.

Abschließend wird jetzt das MSPM Setup mit anderen in der Literatur vorgestellten Methoden zur Detektion magnetischer Nanopartikel verglichen. Dabei wird zunächst auf jene Methoden eingegangen, bei denen ebenfalls ein DC Magnetfeld verwendet wird, um die magnetischen Momente der Probe auszurichten. Anschließend werden Vor- und Nachteile der Methoden beschrieben, bei denen ein höherfrequentes Feld für die Anregung verwendet wird, wie es zum Beispiel bei der Magnetpartikelbildung (MPI) und "Magnetic Particle Mapping" (MPM) der Fall ist. Dabei wird der Fokus auf das MPM Setup[17] gelegt, da in diesem ebenfalls ein ME Sensor verwendet wird.

Das Konzept der Ausrichtung magnetischer Momente in einem homogenen Feld wurde bereits in früheren Arbeiten angewandt. So wird in der Arbeit von *Xi u.a.*[77] ein Gradiometer aus ME Sensoren verwendet, um den Eisengehalt in der Leber zu bestimmen. Dabei ist das Feld im Bereich der Probe einige 100 mT groß. Aufgrund des nichtlinearen Verlaufes der Magnetisierungskurve von SPIONs und der linearen Zunahme der Magnetisierung von Wasser, welches paramagnetisch ist, kommt es bei solch starken Feldern eher zu einer Abschirmung des Nanopartikel-Signals durch Wasser. Hier liegt ein Vorteil des MSPM Setups, bei dem das Feld am Ort der Probe etwa 6 mT groß ist, was zu einer geringeren Abschirmung durch Wasser führt.

Ein weiteres Beispiel für die Ausrichtung magnetischer Momente in einem konstanten Magnetfeld findet sich in der Arbeit von *Sekino u.a.*[44], in der die magnetischen Momente von Nanopartikeln in Wächterlymphknoten ausgerichtet werden, um ihr Feld mit einem Hall-sensor zu detektieren. Dabei muss das Feld am Ort des Sensors sehr klein sein, damit der Hall-sensor nicht gesättigt wird und er seine maximale Empfindlichkeit erreicht. Der Nachteil im Vergleich zum MSPM Setup ist, dass der Abstand zwischen Sensor und Probe daher größer gewählt oder eine kompliziertere Anordnung von Magneten verwendet werden muss, um die Bedingung eines Nullfeldes am Ort des Sensors zu erfüllen. Im MSPM Setup ist das optimale Feld am Ort des Sensors hingegen 1,6 mT groß. Dies ermöglicht es den Sensor dichter an der Probe zu platzieren was zu einem stärkeren Signal der Probe führt.

Darüber hinaus hat der in dieser Arbeit verwendete Sensor ein niedrigere Nachweigrenze von $500 \text{ pT}/\text{Hz}^{1/2}$ verglichen mit den Nachweigrenzen der zuvor genannten Arbeiten, die bei *Xi u.a.* bei $0,99 \text{ nT}/\text{Hz}^{1/2}$ und bei *Sekino u.a.* bei $1 \mu\text{T}$ liegen.

Ein weiterer Ansatz um SPIONs zu detektieren, der dem MSPM Setup ähnelt, wird in der Arbeit von *Huong Giang u.a.*[78] vorgestellt. Der in dieser Arbeit beschriebene Aufbau kann zwar ähnlich geringe Massen an SPIONs nachweisen, ist im Vergleich zum MSPM Setup jedoch etwa 4500 mal langsamer. Der Grund dafür sind die Vorteile, die sich ergeben, wenn die Probe auf einem rotierenden Probenhalter platziert wird. Dadurch wird zum einen die Aufnahmegeschwindigkeit erhöht und zum anderen wird ein periodisches Signal erzeugt, das einfach vom Hintergrundsignal getrennt werden kann.

MPM: engl. "Magnetic Particle Mapping"
ME: magnetoelektrisch

[77]: *Xi u. a.* (2016), »A Room Temperature Ultrasensitive Magnetoelectric Susceptometer for Quantitative Tissue Iron Detection«

[44]: *Sekino u. a.* (2018), »Handheld magnetic probe with permanent magnet and Hall sensor for identifying sentinel lymph nodes in breast cancer patients«

[78]: *Huong Giang u. a.* (2017), »Distance magnetic nanoparticle detection using a magnetoelectric sensor for clinical interventions«

[11]: Gleich u. a. (2005), »Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles.«

[17]: Friedrich u. a. (2019), »Magnetic particle mapping using magnetoelectric sensors as an imaging modality«

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Methoden, bei denen die magnetischen Momente im Feld eines Permanentmagneten ausgerichtet werden, folgt jetzt ein Vergleich mit Methoden, bei denen die magnetischen Momente in magnetischen Wechselfeldern ausgerichtet werden. Aufgrund von nichtlinearen, dynamischen Effekten bei der Magnetisierung von SPIONs kommt es dabei zur Erzeugung höherer Harmonischer, die vom Sensor aufgenommen werden. Dieses Prinzip wird bei der Magnetpartikelbildgebung (MPI) und dem "Magnetic Particle Mapping" (MPM) verwendet.[11, 17] Ein Vorteil dieser Methoden ist, dass das Signal nicht wie bei der Anregung im Feld eines Permanentmagneten von Signalen anderer Komponenten der Probe überlagert wird. Der Grund dafür ist, dass die Magnetisierung von anderen Komponenten der Probe wie z.B. Wasser linear mit der magnetisierenden Feldstärke ansteigt und daher keine höheren Harmonischen von diesen Komponenten erzeugt werden.

Mit der Erzeugung der Anregungssignale in diesen Methoden sind jedoch auch technische Herausforderungen verbunden. So muss das Anregungssignal konstant monofrequent sein und darf keine höheren Harmonischen aufweisen. Der Aufwand, der zur Erzeugung dieses Signals notwendig ist, ist ein Nachteil dieser Methoden, der bei Methoden mit konstantem Anregungsfeld wie z.B. MSPM wegfällt. Somit ist ein MPI zwar ein Gerät, das eine herausragende zeitliche und räumliche Auflösung ermöglicht, allerdings sind es auch sehr große und teure Geräte, die einen routinemäßigen Einsatz in vielen Laboren erschweren.

Fokussiert man den Vergleich auf MSPM und MPM, da diese ähnliche Sensoren verwenden, muss zunächst das Spektrum des zu messenden Signals betrachtet werden. Die Breite des Spektrums des Signals im MSPM Aufbau hängt im Wesentlichen von der Rotationsgeschwindigkeit des Probentellers ab und nimmt mit der Rotationsgeschwindigkeit zu. Durch die richtige Wahl der Rotationsgeschwindigkeit kann so erreicht werden, dass ein Großteil des Signals im Messbereich des Sensors liegt. Beim MPM hingegen liegen die Signale der Probe bei Vielfachen der Anregungsfrequenz. Aufgrund der begrenzten Bandbreite des Sensors um die Resonanzfrequenz kann jedoch nur eine dieser Harmonischen gemessen werden. Aus diesem Grund ist nicht von vornherein davon auszugehen, dass der vom Signal messbare Teil im MSPM Setup kleiner ist, obwohl das LOD von ΔE -Effekt Sensoren deutlich höher liegt, und damit schlechter ist, als das LOD von resonanten ME Sensoren.

In beiden Aufbauten befinden sich die Sensoren in einem Magnetfeld. Beim MSPM Setup dient dieses Feld dazu, die Partikel auszurichten und den Sensor in seinen optimalen Arbeitspunkt zu verschieben. Beim MPM Setup hingegen befindet sich der Sensor in einem Wechselmagnetfeld, dessen Frequenz bei einem Drittel der Resonanzfrequenz des Sensors liegt und nur dazu dient die Partikel anzuregen. Dabei wird davon ausgegangen, dass das LOD des Sensors davon nicht beeinflusst wird. Ob diese Annahme gerechtfertigt ist, wurde bisher nicht bewiesen, und es ist nicht bekannt, ob es Querempfindlichkeiten gibt, die die Empfindlichkeit des Sensors mit der Zeit verändern.

Aus den genannten Gründen ist bisher nicht eindeutig festzustellen, welche der beiden Methoden in Zukunft die geringere Partikelmenge nachweisen kann. Auch wenn aktuell die Nachweisgrenze von MPM

mit 300 ng etwa 65 mal besser ist als die vom MSPM Setup mit etwa 20 µg.
Bei der Betrachtung dieser Zahlen ist jedoch auch zu berücksichtigen,
dass der Abstand beim MSPM Setup mit 8 mm 4 mal größer ist als beim
MPM Setup und Magnetfelder mit dem Abstand sehr stark abnehmen.

ZELLBEWEGUNG UND IHR EINFLUSS AUF DIE INTRAZELLULÄRE DYNAMIK

Zellbewegung und ihr Einfluss auf die intrazelluläre Dynamik

Im ersten Teil der Arbeit wurde der MSPM Aufbau vorgestellt, mit dem die zweidimensionale Verteilung von Zellen bestimmt werden kann. Damit die Zellen mit diesem Aufbau in Biomaterialien detektiert werden können, müssen sie mit magnetischen Partikeln markiert werden. Mit der magnetischen Markierung und der Anwendung der Detektion von Zellen ergeben sich auch folgende Fragestellungen aus dem Bereich der Zelldynamik: Gibt es einen Einfluss der Messung auf die Zellbewegung? Wie beeinflusst die Struktur eines Biomaterials die Bewegung der Zellen? Welche Prozesse bewegen die Partikel intrazellulär? Können diese Prozesse durch magnetische Partikel beeinflusst werden?

Um diese Fragen zu beantworten, wird im Folgenden anhand des Modellorganismus *Acanthamoeba castellanii* die Bewegung von Zellen mit und ohne internalisierte Partikel auf glatten und strukturierten Oberflächen sowie die intrazelluläre Bewegung untersucht. *A. castellanii* ist eine Amöbenart, die insbesondere in Gewässern und im Boden vorkommt und schwerwiegende Entzündungen im Bereich der Augen hervorrufen kann. Dazu kommt es, wenn Amöben beispielsweise durch mangelnde Hygiene beim Wechseln von Kontaktlinsen ins Auge gelangen. Die Behandlung eines solchen Infektes ist schwierig, da die Amöben tief in die Hornhaut des Auges eindringen können und sie unter harschen Umgebungsbedingungen Zysten bilden.[79] Die Untersuchungen zur Zelldynamik werden an *A. castellanii* durchgeführt, da sie im Vergleich zu anderen Zellen, z.B. REF52-wt Zellen, die für die Messungen mit dem MSPM Setup verwendet wurden, eine deutlich größere Dynamik aufweisen und daher für Untersuchungen zur Zellbewegung besser geeignet sind.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur Zellbewegung zielen darauf ab zu bestimmen, wie die Bewegung von Zellen durch magnetische und unmagnetische Partikel beeinflusst wird. Diese Untersuchungen zur Zellbewegung sind wichtig, da die Zellbewegung entscheidend für die Ausbreitung der Zellen in einem dreidimensionalen Biomaterial ist. Zudem muss für die Anwendbarkeit einer magnetischen Messmethode sichergestellt werden, dass die Zellverteilung durch die benötigten magnetischen Partikel und Felder nicht beeinflusst wird. Zusätzlich wird untersucht, wie sich die Bewegung der Zellen durch strukturierte Oberflächen beeinflussen lässt, um Möglichkeiten zu finden, die Amöben in bestimmte Bereiche einer Probe zu dirigieren und sie in diesen festzuhalten. Fortschritte in diesem Forschungsfeld sind erstrebenswert, da sie neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnen würden, um *A. castellanii* aus einem infizierten Auge zu entfernen. Im Folgenden wird der Stand der Forschung zum Einfluss von Strukturen und magnetischen Partikeln auf die amoeboiden Zellbewegung vorgestellt. Dabei wird die Auswahl nicht auf Arbeiten mit *A. castellanii* beschränkt.

In der Arbeit von Arcizet u.a.[80] wird die Bewegung von *Dictyostelium discoideum*, einer Amöbenart die oft für Untersuchungen der Zelldynamik verwendet wird, auf strukturierten Oberflächen untersucht. Auf diesen

MSPM: engl. "Magnetic Susceptibility Particle Mapping"

[79]: Rudell u. a. (2013), »Acanthamoeba migration in an electric field«

REF52-wt: embryonale Fibroblasten von Ratten, engl. "rat embryonic fibroblasts"

[80]: Arcizet u.a. (2012), »Contact-controlled amoeboid motility induces dynamic cell trapping in 3D-microstructured surfaces«

Mikrotubuli: Filamente des Cytoskeletts

strukturierten Oberflächen befinden sich neben ebenen Bereichen auch Bereiche mit symmetrisch angeordneten Säulen. Untersuchungen auf diesen Oberflächen zeigen, dass die Zellen eine "stick-and-go" Bewegung zwischen den Säulen vollführen, wenn der Abstand zwischen den Säulen groß im Vergleich zum Zelldurchmesser ist. Stehen die Säulen hingegen näher beieinander, so zeigt sich häufig eine temporär gerichtete Bewegung entlang der Alleen, die durch die symmetrisch angeordneten Säulen vorgegeben werden. Diese temporär gerichtete Bewegung ist nicht mehr zu beobachten, wenn die Mikrotubuli der Zellen mit Benomyl depolymerisiert wurden. Daraus schließen die Autoren dieser Arbeit, dass die Mikrotubuli den Zellen ermöglichen, auf dreidimensionale Strukturen zu reagieren.

Da die amöboide Bewegung von *D. discoideum* entlang von Alleen geleitet werden kann, wäre es naheliegend, dass die Bewegung auch in Kanälen geführt werden kann. Dazu wird in der Arbeit von *Song u.a.*[81] eindrucksvoll gezeigt, wie sich die amöboide Bewegung von T-Lymphozyten auf welligen Oberflächen leiten lässt. Die Amplitude der Wellen der Oberfläche ist dabei 10 µm und die Wellenlänge liegt bei den Experimenten zwischen 20 µm und 160 µm. Wie erwartet verläuft die Bewegungsrichtung der Zellen, insbesondere bei kleinen Wellenlängen, entlang der Wellentäler und die Abweichung der Bewegungsrichtung von dieser Vorzugsrichtung nimmt mit der Wellenlänge ab.

Der Einfluss von unmagnetischen Mikropartikeln auf die Zellbewegung auf strukturierten Oberflächen wurde in der Arbeit von *Timmermann u.a.*[82] untersucht. Darin wird gezeigt, wie es zum Teil möglich ist, die Bewegung in strukturierten Oberflächen durch sterische Hinderung zu unterbinden. Dazu wurden die Amöben mit Mikropartikeln markiert, deren Durchmesser größer ist als die Durchmesser der Kanäle in der Struktur. Insbesondere diese großen Partikel können die Bewegung der Zellen beeinflussen, weshalb im ersten Teil der Arbeit der Fokus auf magnetische Nanopartikel gelegt wurde. Bei diesen Nanopartikeln ist davon auszugehen, dass sie aufgrund ihrer geringen Größe die Bewegung der Zellen nicht beeinflussen.

Das *A. castellanii* auch ohne Partikel in einer dreidimensionalen Struktur festgehalten werden können, wird in der Arbeit von *Gutekunst u.a.*[8] gezeigt. Darin wird die Bewegung von Zellen in einer von Kanälen durchzogenen Polyacrylamid-Matrix untersucht, wobei gezeigt wurde, dass sich Zellen bevorzugt an Kreuzungspunkten mehrerer Kanäle aufhalten. In der Arbeit wird daher vorgeschlagen, diese Struktur als Falle zu verwenden, in die sich Zellen hinein bewegen und festgehalten werden, um sie so aus einer Flüssigkeit zu entfernen.

Um zu prüfen, ob das Magnetfeld bei Messungen mit dem MSPM Setup einen Einfluss auf die Bewegung von markierten Zellen hat, werden in dieser Arbeit auch Trajektorien von *A. castellanii* in inhomogenen Magnetfeldern untersucht. Dazu ist bekannt, dass einige Bakterienarten in ihrem Inneren magnetische Partikel, sogenannte Magnetosome, synthetisieren können und dadurch in der Lage sind, sich im Magnetfeld der Erde zu orientieren.[83] Ob dieser Orientierungsmechanismus in Zellen auch künstlich hervorgerufen werden kann, indem die Zellen mit magnetischen Partikeln markiert werden, wurde in der Arbeit von *Wilhelm u.a.* [84] am Modellorganismus *D. discoideum* untersucht. Dabei

[81]: Song u. a. (2015), »Sinusoidal wavy surfaces for curvature-guided migration of Tlymphocytes«

T-Lymphozyten: Zellen der Immunabwehr

[82]: Timmermann u. a. (2020), »Migration of Microparticle-Containing Amoeba through Constricted Environments«

[8]: Gutekunst u. a. (2019), »3D Hydrogels Containing Interconnected Microchannels of Subcellular Size for Capturing Human Pathogenic Acanthamoeba Castellanii«

[83]: Faivre u. a. (2008), »Magnetotactic bacteria and magnetosomes«

[84]: Wilhelm u. a. (2007), »Magnetic control of Dictyostelium aggregation«

zeigt sich, dass sich die Zellbewegung von markierten Zellen in einem Magnetfeld zunächst nicht ändert. Dies wird damit erklärt, dass die Kräfte, die eine Zelle aufbringen kann, um sich ihren Weg zu bahnen, bei einigen Nanonewton liegen[85] und damit deutlich größer sind als die Kräfte, die durch die magnetischen Nanopartikel auf sie wirken und im Bereich von Pikonewton liegen. Es ist jedoch zu beobachten, dass sich diese Organismen nach mehreren Stunden im nährstoffarmen Medium zu einem Kollektiv zusammenschließen. Dieser Zusammenschluss zu einem Kollektiv ist auch für magnetisch markierte *D. discoideum* zu beobachten. Während die unmarkierten Zellen, die sich zu einem Kollektiv zusammengeschlossen haben, nicht auf ein äußeres Magnetfeld reagieren, ist ein Einfluss auf die markierten Zellen im Magnetfeld zu beobachten, da sich diese entlang der Feldlinien ausrichten.

Die Bewegung von natürlich vorkommenden, intrazellulären Partikeln, sogenannten Vakuolen, wird in einem weiteren Schritt untersucht, um die Zusammenhänge zwischen der Zellbewegung und der intrazellulären Bewegung aufzuklären. Die dabei erhaltenen Datensätze der Zelltrajektorien wurden in zwei Manuskripten [2, 3] untersucht, wobei der superdiffusive Charakter der Bewegung offengelegt wird.

Die intrazelluläre Dynamik ist wichtig, da sie grundlegend für den intrazellulären Transport von Molekülen und Organellen im Zytoskeletten ist und so die Funktion der Zelle mitbestimmt. Beispiele für die Wichtigkeit der intrazellulären Bewegung sind die Zellbewegung und die Pathogenität einiger Zellen. Der Einfluss der intrazellulären Bewegung auf die Zellbewegung basiert darauf, dass sie den intrazellulären Transport von Proteinen zum Leitsaum der Zelle ermöglicht, die hier benötigt werden, um neue Membranausstülpungen, sogenannte Pseudopodien, zu bilden und so zur gerichteten Bewegung der Zelle beitragen.[86] Ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Bewegung und der Pathogenität zeigt sich hingegen bei *Acanthamoeba culbertsoni*, einer verwandten Amöbenart. In *A. culbertsoni* werden durch den intrazellulären Transport endogene Granula bei der Adhäsion an einer Zielzelle zur Kontaktstelle transportiert, um hier Proteine freizugeben, die die Zellmembran der Zielzelle angreifen.[87, 88]

Die am besten untersuchten, intrazellulären Transportmechanismen in Zellen sind die passive Diffusion, welche die Partikel über kleine Distanzen verteilt, und der aktive Transport durch Motorproteine, die sich z.B. entlang von Mikrotubuli oder Aktinfilamenten bewegen. Diese Motorproteine können Zellkomponenten mit Geschwindigkeiten von bis zu 2 $\mu\text{m}/\text{s}$ gerichtet transportieren.[89] Besagte Motorproteine sind auch im Organismus *A. castellanii* wichtig, wie die Arbeit von Reverey u.a.[88] zeigt, in der der Einfluss des Motorproteins Myosin II, der Mikrotubuli und der Aktinfilamente auf die intrazelluläre Bewegung untersucht wurde. Die Arbeit von Heinrich u.a.[90] zeigt zudem, dass magnetische Partikel an Mikrotubuli gebunden werden können und die Bewegung eines gebundenen Partikels die lokale Bewegung eines Mikrotubuli repräsentiert. Dabei wird auch gezeigt, dass die Lage von Mikrotubuli durch eine Krafteinwirkung auf die magnetischen Partikel verändert werden kann.

Dass auch die Deformation der Zellmembran einen Einfluss auf die intrazelluläre Bewegung haben kann, wurde in der Arbeit von Koslover

[85]: Fukui u. a. (2008), »How well can an amoeba climb?«

[2]: Krapf u. a. (2019), »Spectral Content of a Single Non-Brownian Trajectory«

[3]: Thapa u. a. (2019), »Transient superdiffusion of polydisperse vacuoles in highly motile amoeboid cells«

[86]: Kaverina u. a. (2011), »Regulation of cell migration by dynamic microtubules«

Granula: kleine Partikel in biologischen Zellen.

[87]: Michalek u. a. (2013), »Structure and function of a unique pore-forming protein from a pathogenic acanthamoeba«

[88]: Reverey u. a. (2015), »Superdiffusion dominates intracellular particle motion in the supercrowded cytoplasm of pathogenic Acanthamoeba castellanii«

[89]: Reverey u. a. (2015), »Superdiffusion dominates intracellular particle motion in the supercrowded cytoplasm of pathogenic Acanthamoeba castellanii«

[90]: Heinrich u. a. (2006), »Active mechanical stabilization of the viscoplastic intracellular space of Dictyostelia cells by microtubule-actin crosstalk«

[89]: Koslover u. a. (2017), »Cytoplasmic Flow and Mixing Due to Deformation of Motile Cells«

HL 60: humane Leukämie-Zelllinie, engl. "human leukemia cell line"

u.a.[89] für HL60 Zellen gezeigt. Dabei wurde jedoch nicht der Einfluss der Änderung der Bewegungsrichtung der Zelle auf die Trajektorie intrazellulärer Partikel betrachtet. Dieser Einfluss der Änderung der Bewegungsrichtung auf die Bewegung intrazellulärer Partikel wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, um zu bestimmen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Zellbewegung und der Bewegung intrazellulärer Partikel gibt. Aus dieser Untersuchung wird ein rotationsfreies Koordinatensystem abgeleitet, in dem anschließend der Einfluss der Deformation der Zellmembran auf die intrazelluläre Bewegung von Partikeln visualisiert wird.

Zusammenfassend dienen die Untersuchungen in diesem Abschnitt im Wesentlichen dazu, den Einfluss der Messumgebung im MSPM Setup auf die Zellbewegung zu untersuchen. Dies ist wichtig zu bestimmen, da eine Änderung der Zellbewegung auch zu einer Änderung der Zellverteilung im Gerüstmaterial führen würde. In diesem Fall hätte eine Messung mit dem MSPM Setup einen Einfluss auf die Zellverteilung, was unerwünscht ist.

Zunächst wird in diesem Teil der Arbeit ein Überblick über die Grundlagen der zellulären Bewegung gegeben (Kapitel 5). Anschließend werden die Werkzeuge vorgestellt, die benötigt werden, um die Dynamik von Amöben und ihrer intrazellulären Partikel zu bestimmen (Kapitel 6). Es folgt ein Abschnitt über die Charakterisierung der Bewegung einzelner intrazellulärer Objekte, die ein stochastisches Bewegungsverhalten aufweisen (Abschnitt 7.1). Diese Charakterisierung der intrazellulären Bewegung offenbart die superdiffusive Eigenschaft dieser Bewegung, die darauf schließen lässt, dass die Bewegung aktiv getrieben wird. Um die Ursachen dieser aktiven Bewegung aufzudecken, wird die Rotation der Zelle und die Verformung der Zellmembran auf ihren Einfluss auf die intrazelluläre Bewegung untersucht. Es folgt Kapitel 8 zur Untersuchung der Bewegung von Amöben, das in zwei Teile unterteilt ist. In Abschnitt 8.1 wird der Einfluss strukturierter Oberflächen und in Abschnitt 8.2 der Einfluss von magnetischen Mikropartikeln und Feldern auf die Zellbewegung untersucht. Abschließend werden die Ergebnisse zusammengefasst und diskutiert, ob durch die Messung mit dem MSPM Setup Einflüsse auf die Zellverteilung im Gerüstmaterial zu erwarten sind. Zudem wird ein Ausblick auf mögliche, zukünftige Projekte zur aktiven Manipulation der Bewegungsrichtung gegeben.

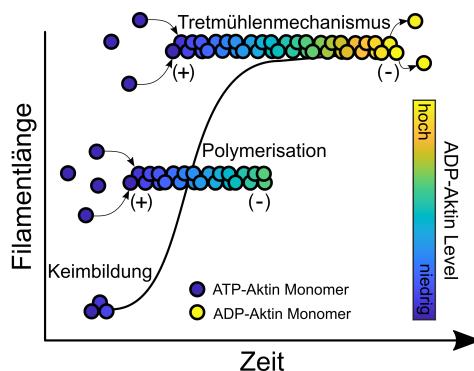
5

Zelldynamik

In den folgenden zwei Abschnitten werden die Grundlagen der Zellbewegung und der intrazellulären Bewegung eingeführt. Zellbewegung kann grundsätzlich in zwei Arten unterteilt werden, die Bewegung einer einzelnen Zelle und die kollektive Bewegung einer Zellschicht. Einzelzellbewegung, auch amöboide Bewegung genannt, ist z.B. bei der Metastasierung von Tumoren wichtig, während die kollektive Bewegung bei der Untersuchung von Wundheilungsprozessen beobachtet werden kann, bei denen ein Spalt in einer Zellschicht zuwächst.

In dieser Arbeit wird die Bewegung einzelner Amöben untersucht, weshalb im Folgenden nur die Grundlagen der amöboiden Zellbewegung und der intrazellulären Bewegung vorgestellt werden.

5.1 Amöboide Zellbewegung



5.1 Amöboide Zellbewegung . . .	57
5.2 Intrazelluläre Bewegung . . .	58

Metastasierung: Abgeleitet von Metastase, altgriechisch für "Wanderung"

Abbildung 5.1: Ablauf der Polymerisierung eines Aktinfilamentes. Keimbildung durch ATP-Aktin Monomere, schnelle Polymerisation am (+)-Ende, Hydrolyse zu ADP-Aktin und Depolymerisation am (-)-Ende. (in Anlehnung an [91], Abbildung 2)

Die amöboide Zellbewegung ist eine kriechende Bewegung, die in eine Abfolge von mehreren Schritten unterteilt werden kann. Dabei kommt es zunächst zu einer Polarisierung der Zelle durch die Polymerisierung von ATP-Aktin in Aktinfilamenten im vorderen Bereich der Zelle. Das ATP-Aktin Monomer dafür bildet sich durch die Bindung eines Aktin-Monomers (G-Aktin; globuläres Aktin) an das Nukleotid Adenosintriphosphat (ATP). Die Seite des Aktinfilaments, an der die ATP-Aktin Monomere an das Filament binden, wird als (+)-Ende bezeichnet. Am anderen Ende, dem (-)-Ende, des Aktinfilamentes verlassen ADP-Aktin Momomere das Filament,[92] da aufgrund der Hydrolyse des ATPs zu ADP die Bindungsstärke des ADP-Aktin Monomers nachlässt. Diese Schritte sind in Abbildung 5.1 veranschaulicht. Durch diesen "treadmilling"-Prozess kommt es zur Ausbildung einer Extrusion, die als Pseudopodium oder Scheinfüßchen bezeichnet wird. Damit sich diese Extrusion ausbilden kann, werden Membranvesikel in Bewegungsrichtung der Zelle in die Zellmembran eingebaut. Diese Membranvesikel

ATP: Adenosintriphosphat

[92]: Tjhung u. a. (2015), »A minimal physical model captures the shapes of crawling cells«

treadmilling, dt. Tretmühlenmechanismus

ADP: Adenosindiphosphat

[93]: Keren (2011), »Cell motility: The integrating role of the plasma membrane«

[94]: Friedl (2004), »Prespecification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration«

Mikrotubuli: Röhrenförmige Proteinkomplexe, die zusammen mit Aktin und Intermediärfilamenten das Cytoskelett eukaryotischer Zellen bilden.

ATP: Adenosintriphosphat

[95]: Vale u. a. (2000), »The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins«

[96]: Berger u. a. (2011), »Co-operative transport by molecular motors«

[93]: Keren (2011), »Cell motility: The integrating role of the plasma membrane«
[97]: Van De Meent u. a. (2010), »Measurement of cytoplasmic streaming in single plant cells by magnetic resonance velocimetry«

werden durch die intrazelluläre Dynamik in den vorderen Bereich der Zelle transportiert.[93]

An der Vorderkante der Zelle, dem Leitsaum, kommt es zu einer schwachen Anhaftung der Zelle an das Substrat. Diese schwache Anhaftung ist ein Grund für die hohe Geschwindigkeit dieser Bewegungsform.[94] Die Zellfüße ziehen die Zelle mithilfe des Motorproteins Myosin II, das die Aktinfilamente kontrahiert, nach vorne.

5.2 Intrazelluläre Bewegung

Molekulare Motoren sind Proteine wie Kinesin, Dynein oder Myosin, die Zellbestandteile wie Vesikel, Zellorganellen oder Proteine intrazellulär bewegen können. Während Kinesin und Dynein sich dazu auf Mikrotubuli bewegen, bewegen sich Myosin Proteine auf den im letzten Abschnitt eingeführten Aktinfilamenten. Aktinfilamente und Mikrotubuli befinden sich zwischen dem Zellkern und der Zellmembran und die Art des Motorproteins bestimmt, ob die Last in Richtung des Zellkerns oder der Zellmembran transportiert wird. Für die Erzeugung der Bewegung wird die chemische Energie eines ATP-Moleküls in kinetische Energie umgesetzt.[95] Um die Lasten zu transportieren, bilden sich zwischen den Motorproteinen und der Last chemische Bindungen. Untersuchungen zeigen, dass auch mehrere Motorproteine an der Bewegung einer Last beteiligt sein können.[96]

Um den Einfluss von molekularen Motoren *in vivo* nachzuweisen, müssen zunächst andere Ursachen der Bewegung abgezogen werden, welche die durch Motoren getriebene, gerichtete Bewegung überlagern. Mit durch molekulare Motoren getriebenen Bewegung ist dabei in dieser Arbeit nur die direkte Bewegung durch die Ankopplung eines Motorproteins an die Last gemeint, die sie entlang von Filamenten bewegt und nicht die indirekte Bewegung der Lasten durch Strömungstransport (Advektion) innerhalb der Zelle, deren Ursache jedoch zum Teil auch auf Motorproteine zurückzuführen ist.[93, 97] Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Bewegungsmechanismen untersucht, die die Bewegung entlang von Filamenten überlagern kann. Dabei wird davon ausgegangen, dass Ursachen dieser Bewegung die Translation der Zelle, die Änderung der Bewegungsrichtung der Zelle und die Deformation der Zellmembran sein können.

Um die Bewegung, die möglicherweise von molekularen Motoren entlang von Filamenten verursacht wird *in vivo* offenzulegen, wird hier untersucht, ob der Einfluss der überlagernden Bewegungen abgezogen werden kann.

Detektion & Tracking von Amöben und Vakuolen

6

Für die Untersuchung der Bewegung von Zellen und ihrer intrazellulären Dynamik werden Datensätze benötigt, welche die Bewegung eines Partikels beschreiben. Die Bahnen, auf denen sich diese Objekte bewegen, werden als Trajektorien bezeichnet. Um statistisch belastbare Ergebnisse zu erhalten, werden dazu möglichst lange Trajektorien benötigt. Der Grund dafür wird im Abschnitt 7.1 deutlich und hängt mit dem zur Verfügung stehenden Stichprobenumfang für unterschiedliche Zeitschritte zusammen. Der Stichprobenumfang nimmt dabei mit der Zunahme der Länge der Zeitschritte ab. Um lange Trajektorien zu erhalten, werden in dieser Arbeit daher die benötigten Daten mit einem Aufbau aufgenommen, der es ermöglicht, einer einzelnen Zelle über einen langen Zeitraum zu folgen (Abschnitt 6.1).

Für die automatisierte Detektion der betrachteten Objekte kommen anschließend verschiedene Algorithmen zum Einsatz, die in Abschnitt 6.2 eingeführt werden. Diese Algorithmen werden zu einem Programm zusammengefasst, welches die Mittelpunktkoordinaten und die Radien dieser Objekte ausgibt. Obwohl in der Literatur bereits viele Segmentierungsmethoden beschrieben wurden, ist eine präzise Segmentierung nach wie vor eine Herausforderung.[98] Dies liegt insbesondere an der Vielzahl der wählbaren Aufnahmeparameter, Versuchsumgebungen und den unterschiedlichen Aufgabenstellungen, die das Programm erfüllen soll. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein maßgeschneidertes Segmentierungsprogramm entwickelt, um diese Aufgabe bestmöglich zu erfüllen. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass Fehler bei der Detektion auftreten. Deshalb müssen die ermittelten Daten anschließend visuell kontrolliert und manuell optimiert werden. Um diese Aufgabe effizient und nachvollziehbar durchführen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Schnittstelle entwickelt, die es ermöglicht, die Resultate der Auswertung mit MaMuT,[99] einem *ImageJ* Plugin, zu kontrollieren.

6.1 Setup zum Verfolgen beweglicher Zellen

Der Aufbau für die Langzeitaufnahme von Zellen ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Die Hardware dieses Aufbaus besteht aus einem invertierten Mikroskop (IX 71, Olympus), einer Kamera (ORCA ER 2, Hamamatsu) und einem motorisierten Mikroskopisch (SCAN IM 112x74, Märzhäuser). Die Zellen, die sich für die Beobachtung in einer Petrischale ($60 \mu\text{-Dish}$, Ø 35-mm, Glasboden, Ibidi) befinden, werden auf einem Probenhalter auf dem Mikroskopisch platziert. Der Mikroskopisch ist von einer Kammer umschlossen, in der die Temperatur und der CO₂-Gehalt der Atmosphäre eingestellt werden können. Bei den Untersuchungen mit Amöben beträgt die Temperatur in der Kammer 27 °C und es wird kein CO₂ zur Umgebungsluft beigemischt.

6.1 Setup	59
6.2 Bildverarbeitung	60
Bildsegmentierung	61
Koordinatentransformation	62
Detektion von Vakuolen . .	63
6.3 Tracking	65

[98]: Chiang u. a. (2018), »Automated Bright Field Segmentation of Cells and Vacuoles Using Image Processing Technique«

[99]: Wolff u. a. (2018), »Multi-view light-sheet imaging and tracking with the MaMuT software reveals the cell lineage of a direct developing arthropod limb«

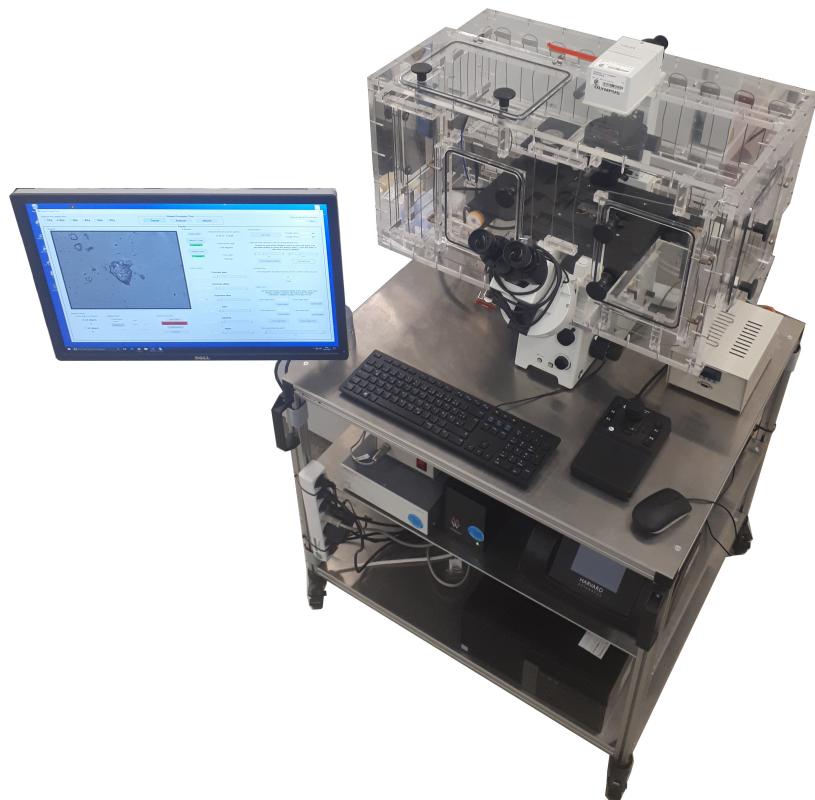


Abbildung 6.1: Setup für die Langzeitbeobachtung beweglicher Zellen. Eine Box umgibt das Mikroskop, um die Temperatur und den CO₂-Gehalt der Umgebungsluft der Probe zu regulieren. Der motorisierte Mikroskopisch ermöglicht es, das zu verfolgende Objekt in der Mitte der Aufnahme zu halten. Der Bildschirm zeigt die Benutzeroberfläche des Zellverfolgungsprogramms.

fps: Bilder pro Sekunde, engl. "frames per second"

Für die Aufnahme einzelner Zellen wird ein 60-fach Objektiv (Olympus UPLSAPO 60x/1.35NA oil-immersion) verwendet und Bilder werden mit einer Aufnahmerate von 8,95 fps aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder werden von einer Schnittstelle, die von der MATLAB Image Acquisition Toolbox bereitgestellt wird, an ein Programm zur Zellverfolgung übergeben, das im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Stellt das Programm fest, dass sich der Schwerpunkt der Zelle weiter vom Mittelpunkt der Aufnahme entfernt hat als ein voreingestellter Grenzwert, wird der Mikroskopisch verfahren, um die Zelle erneut im Bildmittelpunkt der Aufnahme zu zentrieren. Zum Abbruch der Aufnahme kommt es typischerweise, wenn die beobachtete Zelle mit einem anderen Objekt kollidiert. Aus diesem Grund wird die Zellkonzentration in der Petrischale für die Aufnahme gering gehalten.

6.2 Bildverarbeitung

Zur Bestimmung der Zellkontur und der Position von intrazellulären Partikeln werden Methoden der digitalen Bildverarbeitung angewendet. Die notwendigen Schritte zur Bestimmung der Zellkontur, aus der auch der Zellmittelpunkt bestimmt werden kann, werden im nächsten Unterabschnitt vorgestellt. Mit diesen Daten ist es möglich, den Ursprung des Koordinatensystems so zu verschieben, dass der Flächenschwerpunkt der Amöbe immer im Bildmittelpunkt liegt. Dieses Koordinatensystem wird in dieser Arbeit als das Zellsystem bezeichnet.

Zellsystem: Koordinatensystem, bei dem der Flächenschwerpunkt in der Bildmitte liegt.

Bestimmung der Zellkontur

Die Arbeitsschritte vom aufgenommenen Bild zur Kontur der Zelle sind in Abbildung 6.2 dargestellt. In der Aufnahme werden zunächst Kanten detektiert und Punkte, die auf diesen Kanten liegen, werden aufgeweitet (dilatiert). Durch Schließen verbleibender Löcher wird so eine binäre Maske erzeugt, die die Zellfläche überdeckt. Um die Umrandung dieses Bereichs dem realen Verlauf der Zellkontur anzupassen, wird der Bereich der Maske erodiert. Anschließend wird eine Umrandung um diesen Bereich gelegt, deren Verlauf in guter Näherung der Zellkontur entspricht. Die folgenden Abschnitte beschreiben die erforderlichen Schritte im Detail.

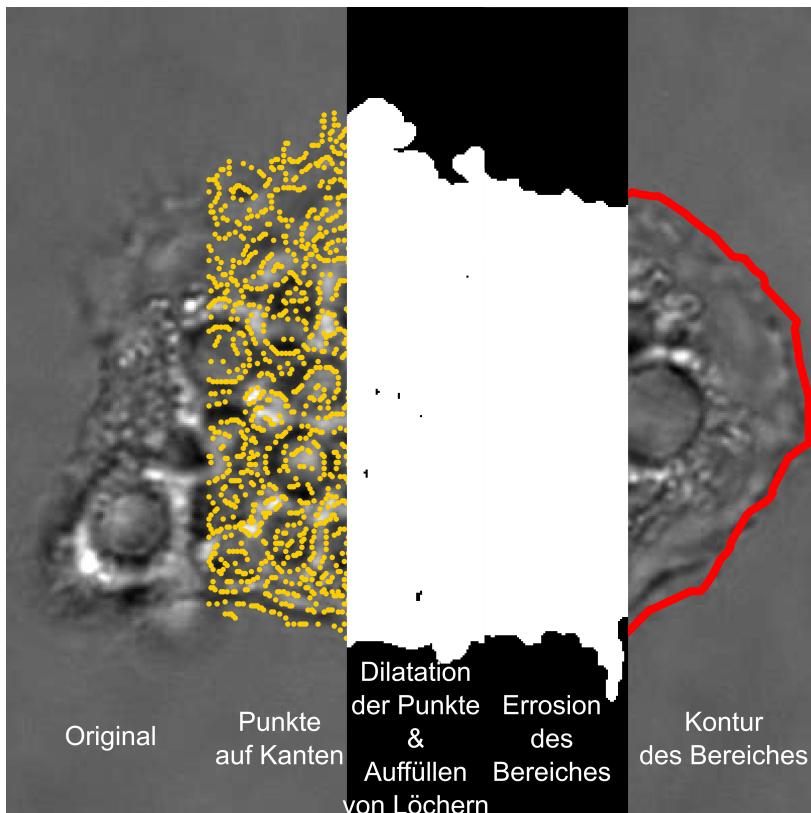


Abbildung 6.2: Von links nach rechts werden im Bild zunächst mit dem CANNY-Algorithmus Kanten erkannt. Punkte, die auf diesen Kanten liegen, werden ausgedehnt (dilatiert), wodurch nahezu die gesamte Zellfläche zu einem einzigen Bereich zusammenwächst. In diesem Gebiet werden Löcher aufgefüllt. Anschließend wird der Bereich erodiert, um die Kontur des ermittelten Bereiches, der Kontur der Zelle anzupassen. Abschließend wird die Kontur dieses Bereiches angenähert, die in guter Näherung der Zellkontur entspricht.

Kantenerkennung

Die Kantenerkennung erfolgt in dieser Arbeit über den CANNY-Algorithmus. [100] Dieser Algorithmus eignet sich besonders gut für die Detektion von Zellkonturen, da er auch schwache Kanten zuverlässig erkennt. Ob ein Punkt auf einer Kante liegt, wird durch den richtungsabhängigen Gradienten am Ort des Punktes bestimmt. Liegt der Wert dieses Gradienten über einem definierten Grenzwert, so wird angenommen, dass der Punkt auf einer Kante liegt. Nach demselben Prinzip werden schwache Kanten erkannt, wobei für diese ein kleinerer Grenzwert angegeben ist. Für schwache Kanten muss zusätzlich gelten, dass sie mit einer starken Kante verbunden sind, damit sie als Kante erkannt werden. Da im Bereich der Zellfläche deutlich stärkere Gradienten auftreten als im homogenen

[100]: Canny (1986), »A Computational Approach to Edge Detection«

Hintergrund, werden in diesem Bereich deutlich mehr Kanten als im Hintergrund detektiert.

Morphologische Operationen

Um aus den Kantenpunkten eine Maske zu erstellen, die den Bereich der Zelle markiert, müssen auf die detektierten Punkte nacheinander drei morphologische Operationen der digitalen Bildverarbeitung angewendet werden. Im ersten Schritt werden die Punkte, die auf einer Kante liegen, einer Dilatation unterzogen. Dabei werden die Punkte gespreizt, sodass die Maske anschließend nahezu den gesamten Zellbereich überdeckt. Löcher in der Maske werden durch eine zweite morphologische Operation geschlossen. Da bei der Dilatation auch Punkte auf der Zellkontur vergrößert werden, kommt es zu einer Vergrößerung der Zellfläche. Um dies zu berücksichtigen, wird bei der dritten morphologischen Operation der Bereich der Maske erodiert. Bei der Erosion werden Pixel vom Rand der Maske entfernt und so die Form der Maske an die Fläche der Zelle angepasst.

Um aus der Maske die Kontur der Zelle zu bestimmen, wird die MATLAB Funktion `boundary` verwendet. Bei dieser Funktion kann angegeben werden, wie sehr die Umrundung den konkaven Abschnitten der Zellkontur folgen soll. Dies ist sehr nützlich, da so Fehler in der Segmentierung ausgeglichen werden können. Diese Fehler treten insbesondere im vorderen Bereich der Zelle auf, in der sich die Zellfüße ausbilden. Sie treten auf, wenn der Gradient auf der Zellkontur unter den Grenzwert des CANNY-Algorithmus für starke Kanten abnimmt. Da der vordere Bereich der Zelle meistens recht homogen ist, weshalb in diesem Bereich wenig Kanten erkannt werden, können so schnell große Bereiche bei der Erstellung der Maske verloren gehen.

Durch diese Fehldetektion ist die Zellumrandung in diesen Bereichen oft stark nach innen gewölbt (konkav). Da diese konkaven Abschnitte vom `boundary`-Algorithmus ausgeglichen werden können, wird die Bestimmung der Zellkontur durch die Verwendung dieses Algorithmus robuster.

Koordinatentransformation: Verschiebung des Flächenschwerpunkts der Zelle in die Bildmitte

Im letzten Abschnitt wurde beschrieben, wie eine binäre Maske in Form der Zellfläche erstellt werden kann. Berechnet man den Schwerpunkt dieser Fläche und wählt in einer Aufnahme den Bereich, der diesen Schwerpunkt umgibt, so erhält man ein Bild, bei dem der Flächenschwerpunkt der Zelle im Zentrum liegt. Das Koordinatensystem wird dabei aus dem Laborsystem auf das Zellsystem verschoben.

Dieses Koordinatensystem eignet sich besonders gut, um die Bewegung intrazellulärer Objekte oder der Zellkontur anzugeben. Ein Beispiel für die Bewegung einer Zelle im Labor- bzw. Zellsystem ist in Abbildung 7.2 dargestellt.

Detektion von Vakuolen

Um die intrazelluläre Dynamik von Zellen zu bestimmen, müssen verfolgbare Objekte oder Strukturen im Inneren der Zelle vorhanden sein. Im Idealfall sollten diese Objekte sich deutlich vom Rest der Zelle abheben, um sie einfach detektieren zu können. Bei den hier verwendeten *Acanthamoeba castellanii* eignen sich dazu besonders gut Vakuolen. Vakuolen sind runde Organellen der Zelle, die sich durch eine recht homogene Füllung auszeichnen und von einem dunklen und/oder hellen Rand umgeben sind.

Im Folgenden wird zunächst auf die kreisförmige Hough-Transformation (CHT) eingegangen mit der in dieser Arbeit Bereiche bestimmt werden, in denen ein Kreismittelpunkt liegen könnte. Aufgrund der speziellen Eigenschaften von Vakuolen liefert die CHT nicht immer die optimale Lösung, weshalb die Ergebnisse hier mit der inversen, kreisförmigen Hough Transformation (iCHT) optimiert werden, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde. Ist eine Optimierung nicht möglich, wird der Kreis gelöscht.

Um die iCHT nicht auf den gesamten aufgenommenen Bereich anwenden zu müssen, wird nur in den Bereichen nach Mittelpunkten gesucht, in denen bereits mit der CHT ein Mittelpunkt detektiert wurde. Da hier Videos untersucht werden, kann zusätzlich ausgenutzt werden, dass Vakuolen in aufeinander folgenden Bildern an ähnlichen Positionen liegen. Aus diesem Grund wird zusätzlich in den Bereichen nach Vakuolen gesucht, in denen im vorangegangenen Bild eine Vakuole detektiert wurde. Damit ergibt sich der Vorteil, dass einmal detektierte Vakuolen in den folgenden Bildern mit hoher Wahrscheinlichkeit erneut detektiert werden.

"Circular Hough Transform"

Die CHT dient dazu, kreisförmige Objekte in einem Bild zu erkennen.[101] Dabei wird das Intervall, in dem sich die Werte für die Radien befinden dürfen, vorgegeben und dem Algorithmus als Eingangsparameter übergeben. Um Kreise mit den vorgegebenen Radien im Bild zu detektieren, werden zunächst Kanten im Eingangsbild ermittelt. Das erhaltene Kan tenbild wird mit einem binären, zweidimensionalen Filterkern gefaltet. Die Einträge dieses Filterkerns sind 1, wenn sie auf einem Kreis mit einem zuvor definierten Radius liegen, und ansonsten 0. Durch die Faltung entstehen im Ergebnisbild hohe Werte im Bereich der Mittelpunkte. Dieses Verfahren ist in Abbildung 6.3 veranschaulicht. Um Punkte, an denen eine Kante erkannt wurde, wird ein Kreis mit Radius r gezogen (rote Kreise). In der Ergebnismatrix haben Punkte, an denen sich diese Kreise schneiden, einen hohen Wert. Je höher dieser Wert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass an diesem Punkt der Mittelpunkt eines Kreises mit dem Radius r liegt. Durch Bestimmung lokaler Maxima in der Ergebnismatrix werden so Kreispunkte und Radien bestimmt.

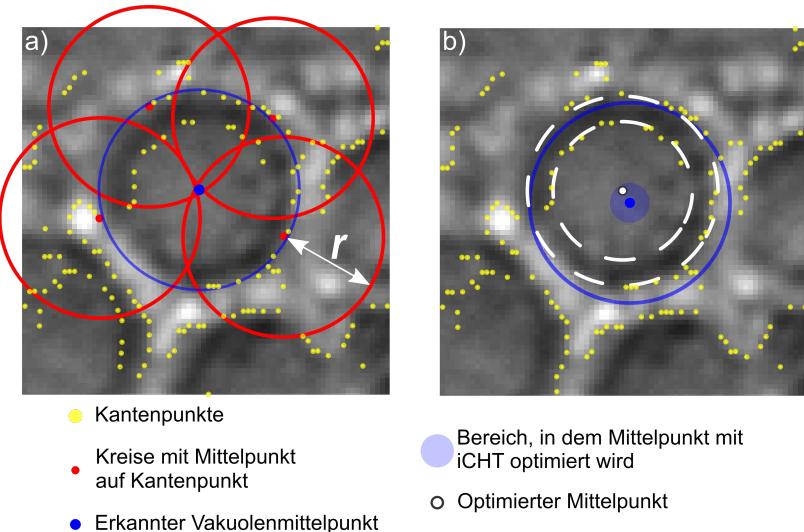
Der Nachteil der CHT ist, dass sich nur Kreise erkennen lassen, an deren Kante ein starker Gradient zu beobachten ist. Da sich Vakuolen durch einen hellen und/oder dunklen Kreis abheben, der sie umgibt, finden sich im Kan tenbild konzentrische Kreise, die das Ergebnis der CHT negativ beeinflussen. Aus diesem Grund wird die CHT hier nur dazu

CHT: Kreisförmige Hough Transformation, engl. "circular Hough Transform"

iCHT: Inverse, kreisförmige Hough Transformation, engl. "inverse circular Hough Transform"

[101]: Yuen u. a. (1990), »A Comparative Study of Hough Transform Methods for Circle Finding«

Abbildung 6.3: a) Die "circular hough transform" (CHT) kann runde Objekte in einem Bild erkennen. Dabei dienen Kantenpunkte als Ausgangspunkte für Kreise mit Radien in einem angegebenen Intervall. Positionen in der Ergebnismatrix, an denen sich diese Kreise (rot) überschneiden, stellen potentielle Kreismittelpunkte dar. Hier entspricht der blaue Kreis dem Ergebnis. b) Die Detektion von Vakuolen mit der CHT ist problematisch, da um Vakuolen im Kantenbild oft konzentrische Kreise detektiert werden, was hier durch die weißen Kreise angedeutet ist. Diese konzentrischen Kreise führen zu Fehlern in der Bestimmung der Kreismittelpunkte. Aus diesem Grund wird der mit der CHT ermittelte Punkt (blau) als Mittelpunkt eines Bereiches betrachtet, in dem der korrekte Mittelpunkt (weiß) liegt. (In Anlehnung an [102])



verwendet, Punkte auszumachen, in deren Nähe sich möglicherweise der Mittelpunkt einer Vakuole befindet. Da die Kreismittelpunkte auch etwas neben diesen Punkten liegen können, werden diese Punkte zu Bereichen aufgeweitet. In diesen Bereichen wird im nächsten Schritt versucht, die Position des Kreismittelpunktes mittels iCHT zu optimieren.

"Inverse Circular Hough Transform"

Im Abschnitt zur CHT wurde gezeigt, wie aus den Punkten, die auf der Kontur eines Kreises liegen, der Mittelpunkt dieses Kreises bestimmt werden kann. Bei der iCHT wird andersherum vorgegangen. Hier wird für jeden Punkt eines Bereiches, in dem der Mittelpunkt liegen kann, der Mittelwert über die Punkte gebildet, die im Abstand r zum betrachteten Punkt liegen. Die so bestimmten Mittelwerte werden in eine Ergebnismatrix eingetragen. Ein Beispiel einer solchen Ergebnismatrix ist in Abbildung 6.4 dargestellt. Alle Mittelwerte für einen Radius werden in einer Ebene der Ergebnismatrix eingetragen. Die Position der Ergebnismatrix, an der der minimale bzw. maximale Wert liegt, entspricht der optimierten Mittelpunktposition. Die x- und y-Position des Punktes liefern die Koordinaten des Mittelpunktes und die z-Position gibt den optimalen Radius an. Ob in der Ergebnismatrix ein Minimum bzw. Maximum liegt, hängt davon ab, ob über den dunklen oder den hellen Kreis gemittelt wird, der die Vakuole umgibt. Liegt der ermittelte Wert in der Ergebnismatrix im Bereich zwischen einem minimalen und maximalen Grenzwert, so wird angenommen, dass es sich bei der von der CHT bestimmten Struktur nicht um eine Vakuole handelt. Der Punkt wird dann von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

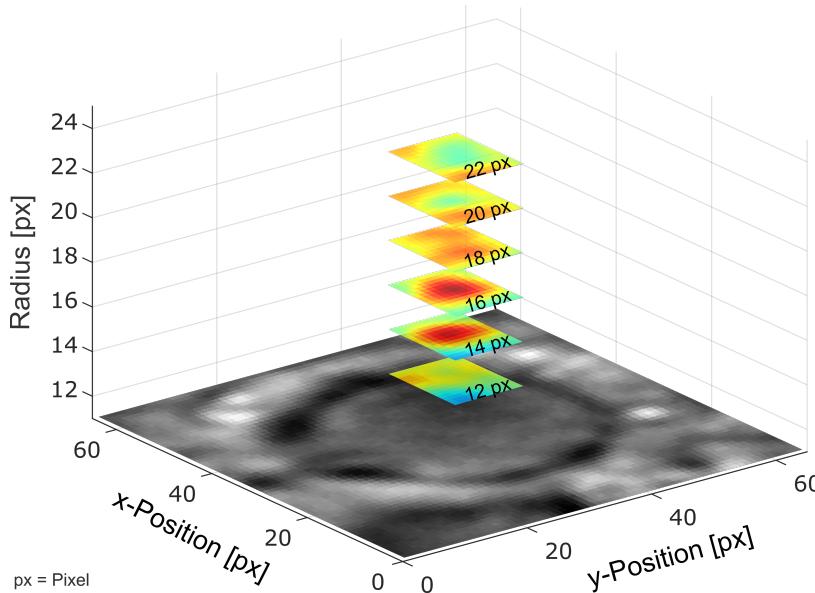


Abbildung 6.4: Um den optimalen Mittelpunkt zu bestimmen, wird eine dreidimensionale Ergebnismatrix aufgestellt. Jede z-Ebene dieser Matrix entspricht einem Radius r in Pixeln. Für jeden Punkt einer Ebene wird der Mittelwert auf dem Umfang im Abstand r bestimmt. In der Abbildung stehen rote Punkte für große Werte. Die Position des Maximums der Ergebnismatrix liefert die x- und y-Koordinate sowie den Radius des optimierten Kreises. Im Beispiel liegt der optimierte Mittelpunkt also in der Mitte der xy-Ebene bei einem Radius von 16 px.

6.3 Zusammenführen mehrerer Objekte zu einem Track

Um aus den Punkten, die in den vorherigen Abschnitten bestimmt wurden, Aussagen über die Bewegung der Objekte treffen zu können, müssen diese zu Trajektorien zusammengefasst werden. Entsprechend der Eigenschaften der Bewegung werden zwei unterschiedliche Verfahren verwendet, um die einzelnen Punkte zu Trajektorien zusammenzufassen.

Das erste Verfahren eignet sich besonders gut für ungerichtete Bewegungen, bei denen sich die Objekte in alle Richtungen mit relativ kleinen Schrittängen bewegen. Eine solche Bewegung zeigen die Vakuolen im Zellinneren einer Amöbe. Das zweite Verfahren ist hingegen besser geeignet, um Punkte zu Trajektorien zusammenzufassen, die sich im Wesentlichen in eine Richtung bewegen, dafür aber mit deutlich größeren Geschwindigkeiten. Diese Bewegung ist in Magnetophorese-Experimenten (siehe Abschnitt 2.2) zu beobachten, bei denen sich die markierten Zellen auf den Magneten zu bewegen.

Zur Anpassung dieser Verfahren an den vorliegenden Datensatz können dem Algorithmus drei Parameter übergeben werden. Diese Parameter bestimmen, wie weit sich ein Mittelpunkt zwischen zwei aufeinanderfolgenden Bildern bewegen darf, wie lange ein Mittelpunkt im Speicher bleibt, bevor der Track abgebrochen wird, und wie viele Mittelpunkte in einem Track verbunden sein müssen, damit die Daten dieser Trajektorie ausgegeben werden. Durch die richtige Wahl dieser Parameter verbessert sich die Detektion, da z.B. Fehldetections häufig nur in wenigen, aufeinander folgenden Bildern auftreten, sodass solche Trajektorien durch Angabe einer minimalen Länge von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden können.

Beide Algorithmen liefern ein Ergebnisarray, das Angaben zur Position, Zeit, dem Radius und der Track ID eines jeden Mittelpunktes enthält. Mittels einer Funktion, die im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde,

[99]: Wolff u.a. (2018), »Multi-view light-sheet imaging and tracking with the MaMuT software reveals the cell lineage of a direct developing arthropod limb«

können diese Daten in eine .xml Datei geschrieben werden, die mit dem *ImageJ* Plugin *MaMuT* (Massive Multi-view Tracker) gelesen werden kann.[99] *MaMuT* ist ein Plugin, das eine einfache manuelle Optimierung und visuelle Kontrolle der Ergebnisse ermöglicht. So können die Vakuolen und ihre Tracks über der Aufnahme eingeblendet, Tracks gelöscht oder zusammengeführt und neue Mittelpunkte manuell hinzugefügt werden. Ein Screenshot des *MaMuT Viewers* mit eingeblendeten Trajektorien ist in Abbildung 6.5 dargestellt. Dieser Schritt ist notwendig, um unvermeidlich auftretende Fehler bei der automatisierten Detektion manuell zu korrigieren und die Ergebnisse zu kontrollieren. Zudem ermöglicht diese Schnittstelle das schnelle Auffinden und Visualisieren einzelner Datenpunkte, die im Rahmen späterer Auswertungen auffallen.

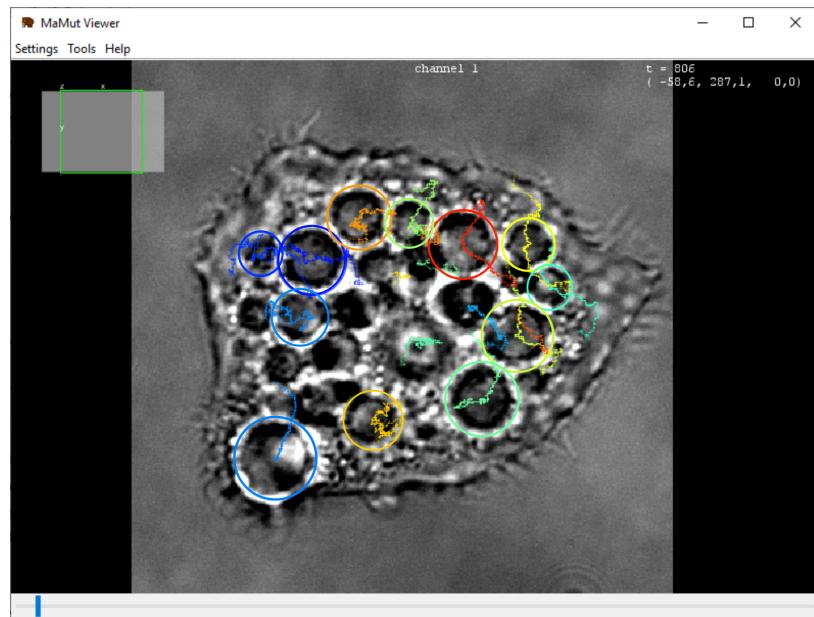


Abbildung 6.5: Screenshot des *MaMuT* Viewer, in dem die detektierten Vakuolen mit Kreisen umrandet sind. Die farblich zu den Kreisen passenden Linien stellen die Trajektorien der Vakuolen in einem Zeitintervall von 500 Bildern dar, wobei das aktuelle Bild im Mittelpunkt dieses Intervalls liegt.

Untersuchung der Bewegung von Vakuolen

7

Die intrazelluläre Bewegung von Vakuolen zeigt stochastische Eigenschaften. Aus diesem Grund sind Kenndaten, die typischerweise Bewegungen charakterisieren, wie die Bewegungsrichtung und Geschwindigkeit einzelner Partikel, wenig aussagekräftig. Um dennoch eine Beschreibung zu ermöglichen, werden in der Literatur andere Konzepte, wie das Spektrum, die Autokorrelation oder die mittlere quadratische Verschiebung der Bewegung verwendet, um die Bewegung zu charakterisieren. Es werden aber auch neue Verfahren entwickelt, um die Eigenschaften solcher Bewegungen zu bestimmen. Ein solches Verfahren wird im Manuscript von Krapf u.a. [2] vorgestellt, zu dessen Validierung die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Datensätze beitragen konnten. Eine detaillierte Beschreibung der Daten und eine Charakterisierung der Bewegung im Zellsystem, bei dem sich der Flächenschwerpunkt der Zelle in der Bildmitte befindet, findet sich im Manuscript von Thapa u.a.[3]

Im Folgenden wird beschrieben, wie die mittlere quadratische Verschiebung berechnet wird, um die vorliegenden Daten zu charakterisieren. Es zeigt sich, dass die Bewegung superdiffusiv ist, was für die Anwesenheit von Mechanismen spricht, die diese Bewegung antreiben. In der Arbeit von Referey u.a.[88] wurde der Einfluss von Aktin, Mikrotubuli und Myosin II auf die intrazelluläre Bewegung untersucht, in dem diese gezielt ausgeschaltet wurden. Um den Einfluss dieser Zellbestandteile auf die intrazelluläre Bewegung zu überprüfen, werden Trajektorien von intrazellulären Vakuolen bestimmt und analysiert. Dabei zeigt sich, dass die Bewegung aus zwei Komponenten besteht. Die erste Komponente ist eine Drift, die durch die Translation der Amöbe hervorgerufen wird, und die zweite Komponente eine superdiffusive Bewegung, die möglicherweise durch molekulare Motoren hervorgerufen wird.

Um die grundlegenden Mechanismen der superdiffusiven Bewegung aufzuklären, werden in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zur Translation der Einfluss der Rotation und der Deformation der Amöbe auf die intrazelluläre Bewegung untersucht.

7.1 Die mittlere quadratische Verschiebung

Die mittlere quadratische Verschiebung (MSD) gibt einen Wert dafür an, wie weit sich ein Partikel im Zeitintervall der Länge τ von seinem Ursprungsort entfernt.

Die Bestimmung der MSD ist schematisch in Abbildung 7.1 dargestellt. Um einen Punkt der MSD zu bestimmen, wird ausgehend von jedem Punkt der Trajektorie $[x(0), y(0)]$ die quadratische Verschiebung δ^2 zu einem späteren Punkt der Trajektorie $[x(\tau), y(\tau)]$ berechnet. Diese Verschiebungen sind ausgehend von mehreren Punkten der Trajektorie für unterschiedliche Zeiten τ in der Abbildung 7.1a dargestellt, die einen

7.1 Die mittlere quadratische Verschiebung	67
7.2 Ursachen der Vakuolen-Bewegung	69
Translation der Amöbe	69
Rotation der Amöbe	70
Deformation der Amöbe	75

[2]: Krapf u. a. (2019), »Spectral Content of a Single Non-Brownian Trajectory«

[3]: Thapa u. a. (2019), »Transient superdiffusion of polydisperse vacuoles in highly motile amoeboid cells«

[88]: Reverey u. a. (2015), »Superdiffusion dominates intracellular particle motion in the supercrowded cytoplasm of pathogenic Acanthamoeba castellanii«

MSD: mittlere quadratische Verschiebung,
engl. "mean squared displacement"

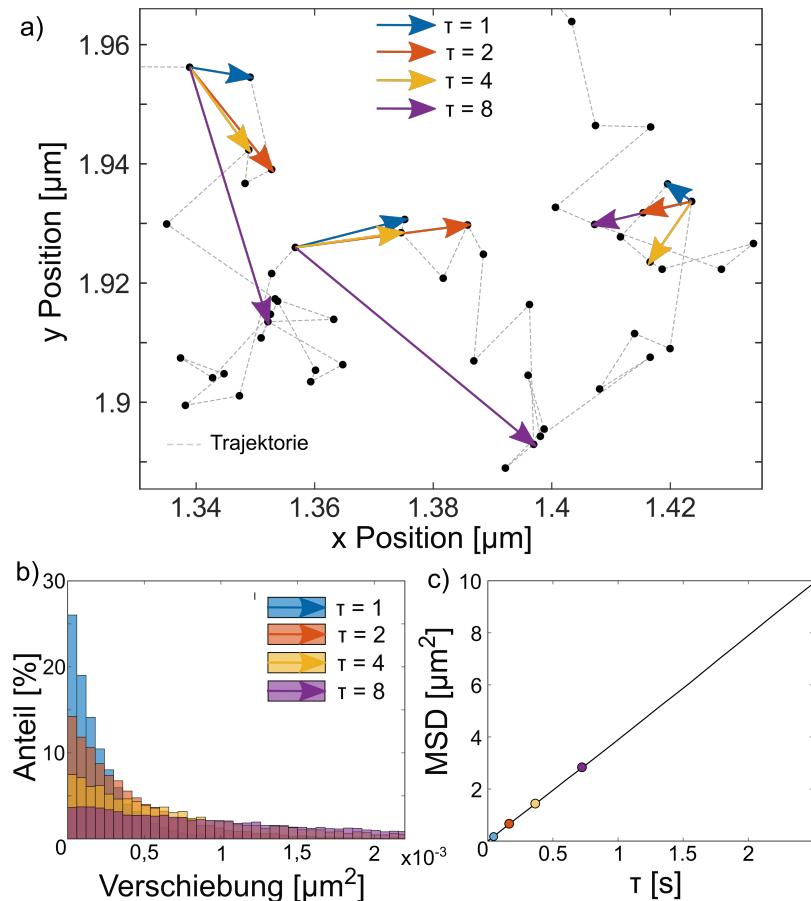


Abbildung 7.1: a) Trajektorie mit Verschiebungsvektoren für verschiedene Zeitintervalle τ . b) Histogramm der quadratischen Verschiebung für mehrere Zeitintervalle τ . c) Mittelwert der quadratischen Verschiebung für die Zeitintervalle τ . Aus der Steigung der mittleren quadratischen Verschiebung α kann die Bewegung als subdiffusiv ($\alpha < 1$), diffusiv ($\alpha \approx 1$) oder superdiffusiv ($\alpha > 1$) charakterisiert werden.

Ausschnitt der gesamten Trajektorie zeigt. Die dargestellten Datenpunkte stammen aus der Simulation einer diffusiven Bewegung. Ein Histogramm aller quadratischen Verschiebungen der Trajektorie ist in Teil b) der Abbildung gezeigt. Die Bestimmung der mittleren quadratischen Verschiebung erfolgt durch die Bestimmung des Mittelwerts der quadratischen Verschiebungen für die verschiedenen Zeitintervalle und ist in Abbildung 7.1c dargestellt.

Für diffundierende Partikel nimmt die mittlere quadratische Verschiebung $\langle \delta^2 \rangle$ linear mit der Zeit zu.[3] Es gilt:

$$\langle \delta^2(t) \rangle = \langle [x(t) - x(0)]^2 + [y(t) - y(0)]^2 \rangle = 4K_\alpha t^\alpha \propto t^\alpha \quad (7.1)$$

Dabei ist K_α der verallgemeinerte Diffusionskoeffizient und der Exponent α charakterisiert die Bewegung als:

$$\begin{aligned} \alpha < 1 : & \text{ Subdiffusive Bewegung,} \\ \alpha > 1 : & \text{ Superdiffusive Bewegung,} \end{aligned}$$

f_s : Frequenz der Datenaufnahme

Die Länge der Zeitintervalle τ kann dabei Werte zwischen $1/f_s$ und der zeitlichen Länge der Trajektorie annehmen. Weil der Stichprobenumfang der quadratischen Verschiebungen mit der Länge der Zeitintervalle τ abnimmt, können die tatsächlich beobachteten relativen Häufigkeiten stark vom theoretisch erwarteten Wert abweichen. Aus diesem Grund werden für die Bestimmung des Exponenten α nur die ersten 25 % der Datenpunkte der MSD verwendet.

7.2 Ursachen der Vakuolen-Bewegung

Intrazelluläre Bewegung kann z.B. durch molekulare Motoren, die in Abschnitt 5.2 genauer beschrieben wurden, hervorgerufen werden. Es sind aber auch andere Prozesse denkbar, die zu einer Verschiebung der Vakuolen führen. Im Manuskript [3] wurde die Vermutung aufgestellt, dass ein Teil der Bewegung der Vakuolen auf die Rotation der Amöbe um ihren Flächenschwerpunkt im Zellsystem zurückzuführen ist. Des Weiteren kann auch die Deformation der Zellmembran zu einer Bewegung intrazellulärer Partikel führen. Der Einfluss der Translation, der Rotation und der Deformation auf die intrazelluläre Dynamik wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.

[3]: Thapa u.a. (2019), »Transient superdiffusion of polydisperse vacuoles in highly motile amoeboid cells«

Zellsystem: Koordinatensystem, bei dem der Flächenschwerpunkt in der Bildmitte liegt.

a) Translation der Amöbe

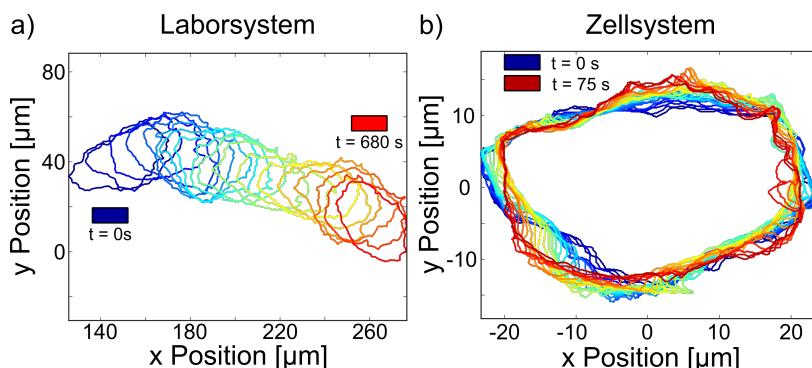


Abbildung 7.2: a) Im **Laborsystem** zeigt sich deutlich die Translation der Amöbe. Um diese Bewegung von der Vakuolen-Bewegung abzuziehen, wird der Flächenschwerpunkt der Vakuole in den Bildmittelpunkt gelegt. b) Im **Zellsystem** liegt der Flächenschwerpunkt in der Bildmitte und es zeigen sich deutliche Formänderungen in der Zellkontur.

Amöben bewegen sich im Laborsystem mit einer Geschwindigkeit von $0,1 \mu\text{m}/\text{s}$ bis $0,5 \mu\text{m}/\text{s}$ [3, 79] auf glatten Oberflächen und ihre Bewegungsrichtung ändert sich nur langsam. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigen, dass sich die Geschwindigkeiten von einzelnen Amöben dabei deutlich unterscheiden können. Die mittlere Geschwindigkeit einzelner, hier beobachteter Amöben liegt zwischen $0,22 \mu\text{m}/\text{s}$ und $0,79 \mu\text{m}/\text{s}$ und ihre Geschwindigkeit ist nahezu konstant im betrachteten Zeitintervall mit einer Länge von bis zu 54 Minuten. Diese Konstanz zeigt sich an der geringen Standardabweichung der Geschwindigkeitsverteilungen einzelner Amöben, die für alle Messungen unter $0,1 \mu\text{m}/\text{s}$ liegt. Ein Ausschnitt einer Amöbentrajektorie im Laborsystem, mit einer Länge von 680 s, ist in Abbildung 7.2a gezeigt. Im betrachteten Zeitintervall legt die Amöbe eine Distanz von $130 \mu\text{m}$ zurück. Die Abbildung zeigt eindeutig, dass die Bewegung gerichtet ist, womit sich aus der MSD für Amöben ein Exponent α mit Werten nahe 2 ergibt.

[79]: Rudell u.a. (2013), »Acanthamoeba migration in an electric field«

[3]: Thapa u.a. (2019), »Transient superdiffusion of polydisperse vacuoles in highly motile amoeboid cells«

Weil die Amöben-Bewegung gerichtet ist, würden auch Bewegungen von Vakuolen, angegeben im Laborsystem, einen gerichteten Bewegungsanteil aufweisen. Aus diesem Grund wird die Koordinatentransformation in das Zellsystem durchgeführt, bei dem sich der Schwerpunkt der Zelle im Bildmittelpunkt befindet. Die Zellkontur der Amöbe für ein Zeitintervall von 75 s im Zellsystem ist in Abbildung 7.2b dargestellt. Im Zellsystem zeigt sich deutlich die Verformung der Zellmembran, deren Einfluss auf die intrazelluläre Dynamik im Abschnitt 7.2 beschrieben wird.

MSD der Vakuolen-Bewegung

MSD: mittlere quadratische Verschiebung, engl. "mean squared displacement"

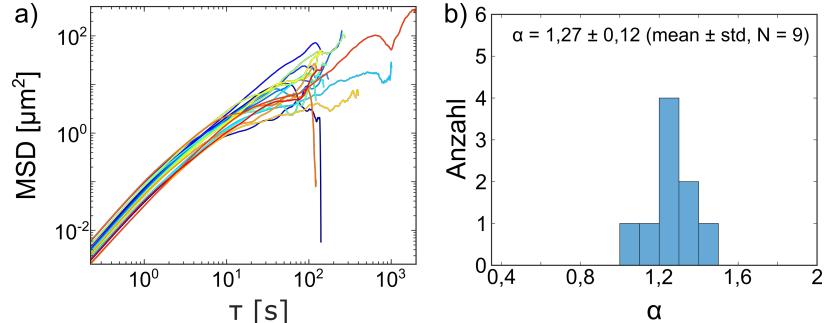


Abbildung 7.3: a) MSD Kurven einzelner Vakuolen im Zellsystem. b) Histogramm der Steigungen einzelner MSD Kurven. Die Steigung ist deutlich größer als eins und zeigt daher den superdiffusiven Charakter der Vakuolen-Bewegung.

in Abbildung 7.3a gezeigt. In dem doppelt logarithmischen Plot zeigt sich für kleine Zeitintervalle τ ein linearer Anstieg, der durch den Exponenten α beschrieben wird. Bei größeren Werten für τ zeigen die Werte deutliche Abweichungen der Werte von diesem linearen Anstieg. Der Grund dafür ist die fehlende Anzahl an Datenpunkten, für Zeitintervalle deren Länge ähnlich der Länge der Trajektorie ist, womit es bei der Mittelwertbildung der quadratischen Verschiebungen zu statistischen Ungenauigkeiten kommt. Aus diesem Grund wird die Steigung α nur aus den ersten 25 % der τ Werte der MSD Kurven bestimmt. Eine Verteilung der ermittelten Werte für den Exponenten α ist in Abbildung 7.3b dargestellt. Der Mittelwert der Steigung liegt im betrachteten Fall bei 1,27, womit die superdiffusive Eigenschaft der Vakuolen im Zellsystem gezeigt ist. Eine deutlich ausführlichere Beschreibung der Eigenschaften der Trajektorien findet sich in Quelle [3].

[3]: Thapa u.a. (2019), »Transient superdiffusion of polydisperse vacuoles in highly motile amoeboid cells«

b) Rotation der Amöbe

Ein möglicher Mechanismus, der zum beobachteten superdiffusiven Verhalten führen kann, ist eine Änderung der Bewegungsrichtung der Amöbe im Laborsystem, die in Abbildung 7.4a für einen Zeitraum von etwa 3000 Sekunden visualisiert ist. Im Beispiel zeigt der Kurs der Amöbe zunächst in Richtung 20°. Nach einer Rechtskurve bewegt sich die Amöbe auf Kurs -30° bevor sie am Ende der Beobachtung den Kurs 0° einschlägt. Diese Änderung der Bewegungsrichtung zeigt sich im Zellsystem als Rotation der Amöbe um den Bildmittelpunkt. Diese Rotation der Amöbe kann eine Vakuole um den Rotationswinkel γ um den Bildmittelpunkt bewegen und so zu einer temporär gerichteten Bewegung der Vakuole führen (Abbildung 7.4b).

Überprüft wird der Einfluss der Amöbenrotation auf die Bewegung der Vakuolen durch einen Vergleich der Bewegungsrichtung, die zum einen aus der Bewegungsrichtung der Amöbe und zum anderen aus der kumulativen Summe der Rotation des Vakuolenensembles um den Flächenschwerpunkt der Zelle bestimmt wird. Zeigen die Bewegungsrichtungen, die aus der Bewegungsrichtung der Amöbe und der Rotation der Vakuolen bestimmt wurden, denselben Trend, so ist der Einfluss der Amöbenrotation auf die Vakuolenbewegung im Zellsystem nachgewiesen.

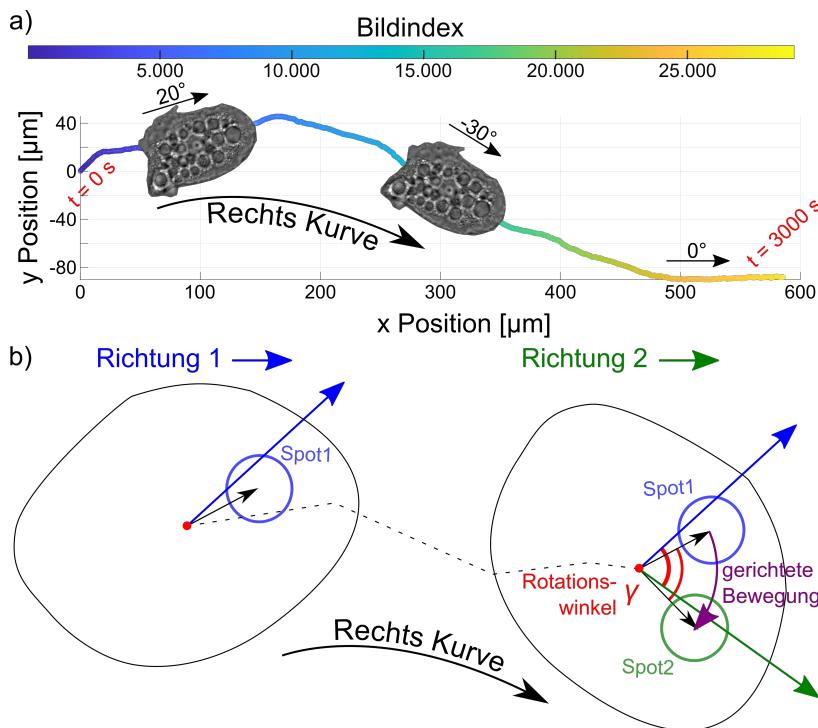


Abbildung 7.4: a) Trajektorie einer Amöbe verläuft nicht geradlinig. Im Zellsystem kommt es dadurch zu einer Rotation der Amöbe. Diese Rotation kann die Bewegung einzelner Vakuolen beeinflussen.
b) Position der Vakuole ändert sich durch die Rotation der Amöbe.

Bestimmung aus Amöbentrajektorie

Die Bewegungsrichtung von Amöben kann aus ihrer Trajektorie abgelesen werden. Die Bewegungsrichtung ergibt sich aus der Richtung des Verschiebungsvektors zwischen zwei Mittelpunktkoordinaten der Amöbe zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Kleinste Fehler bei der Bestimmung der Mittelpunktkoordinaten führen dabei zu stark verrauschten Daten für die Bewegungsrichtung. Um dieses Rauschen zu reduzieren, wird vor der Bestimmung der Bewegungsrichtung der laufende Mittelwert der Trajektorien berechnet.

Bestimmung aus Vakuolenensemble

Um die Bewegungsrichtung der Amöbe aus den Trajektorien der Vakuolen zu bestimmen, wird die Rotation der Vakuolen um den Flächenschwerpunkt der Amöbe im Zellsystem berechnet. Wie die Trajektorie der Amöbe, werden auch die Trajektorien einzelner Vakuolen geglättet, indem ein laufender Mittelwert über die Datenpunkte berechnet wird.

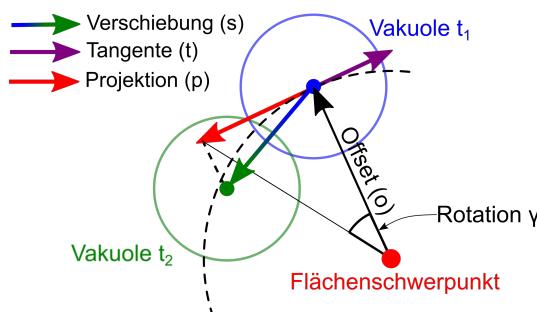


Abbildung 7.5: Skizze zur Bestimmung der Rotation einer Vakuole zwischen den Zeitpunkten t_1 und t_2 . Der Vektor der Verschiebung wird auf den Vektor Tangente projiziert, der tangential zum Vektor Offset steht. Der Winkel der Rotation γ für diese Vakuole ergibt sich aus dem Arkustangens der Beträge der Vektoren Projektion \vec{p} und Offset $\vec{\delta}$.

Zur Bestimmung der Rotation einer einzelnen Vakuole wird der Verschiebungsvektor (\vec{s}) der Vakuole zwischen zwei Aufnahmen bestimmt. Die Rotation ergibt sich aus der Projektion des Verschiebungsvektors auf die Tangente eines Kreises, dessen Mittelpunkt im Flächenschwerpunkt der Amöbe liegt. Die zugehörige Konstruktion ist in Abbildung 7.5 dargestellt. Der Winkel der Rotation γ einer Vakuole ist durch den Arkustangens ($\gamma = \arctan(\vec{p} / |\vec{o}|)$) der Vektoren Projektion und Offset gegeben. Zur Bestimmung der Rotation des Vakuolenensembles wird über die Rotation einzelner Vakuolen gemittelt. Um aus der Rotation des Vakuolenensembles die Bewegungsrichtung der Amöbe zu bestimmen, wird die kumulative Summe über die Rotation des Ensembles berechnet.

Vergleich der Bewegungsrichtungen

In den letzten zwei Abschnitten wurde gezeigt, wie die Bewegungsrichtung aus der Trajektorie der Amöben und den Trajektorien einzelner Vakuolen bestimmt werden kann. In der Abbildung 7.6a sind zwei Trajektorien derselben Vakuole dargestellt. Die Trajektorien unterscheiden sich darin, dass in einem Fall die Rotation der Amöbe abgezogen wurde. Für diese Vakuole zeigt sich besonders deutlich der Einfluss, der durch die Änderung der Bewegungsrichtung der Amöbe hervorgerufen wird. Dennoch ändern sich die MSD Kurven und ihre Steigungen unter Berücksichtigung der Rotation der Amöbe kaum. Ein Vergleich der Daten mit und ohne Abzug der Rotation findet sich in Abbildung 7.7. Sowohl im Zellsystem als auch im rotationsfreien System liegen die Werte des Exponenten α im Bereich zwischen 1,25 und 1,42.

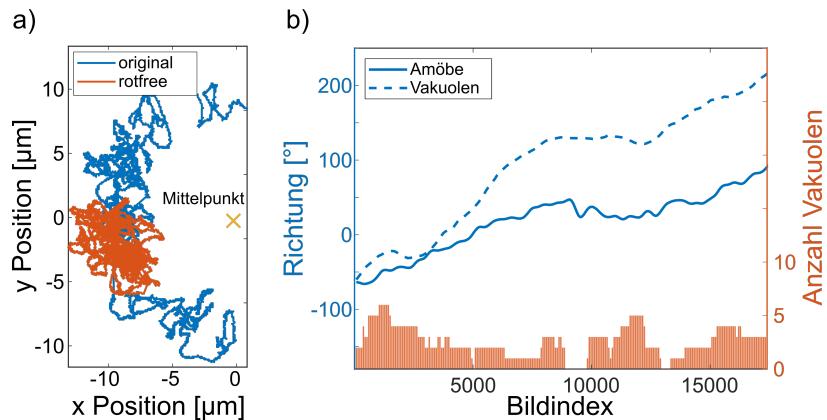


Abbildung 7.6: a) Beispiel einer Vakuolentrajektorie im Zellsystem und nach Abzug der Amöbenrotation. Die um die Rotation korrigierte Trajektorie ist deutlich lokalisierter. b) Vergleich der Bewegungsrichtung bestimmt aus der Trajektorie der Amöbe und der Rotation des Vakuolenensembles. Das Histogramm im unteren Bereich der Abbildung gibt an, wie viele Vakuolen im Ensemble enthalten sind. Die Verläufe, die nach den unterschiedlichen Bestimmungsmethoden ermittelt wurden, zeigen denselben Trend.

Der Grund für diesen geringen Unterschied ist vermutlich, dass für die Berechnung nur die ersten 25 % der möglichen Intervallzeiten τ berücksichtigt werden und die Bewegung in diesem Zeitbereich superdiffusiv bleibt, auch wenn die Rotation abgezogen wird. Wäre es möglich, längere Trajektorien zu bestimmen, so sollte sich ein Abflachen der MSD Kurve für größere τ 's zeigen. Dieses Abflachen würde dann darauf hindeuten, dass die Bewegung einzelner Vakuolen räumlich begrenzt ist.

Abbildung 7.6b zeigt den Vergleich der Bewegungsrichtung, die aus der Trajektorie der Amöbe und aus der Rotation des Vakuolenensembles ermittelt wurde. Das Histogramm im unteren Bereich der Abbildung gibt die Anzahl der Vakuolen an, die zur Bestimmung der Rotation des

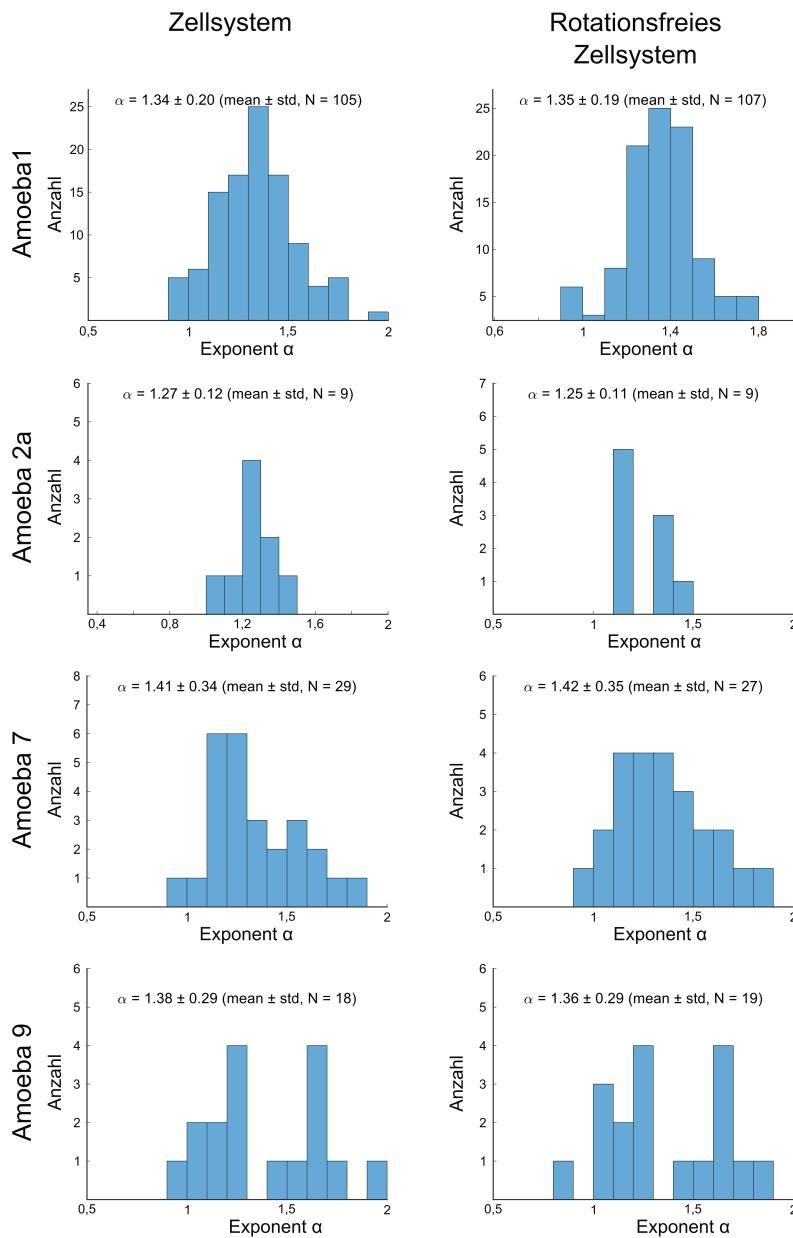


Abbildung 7.7: Vergleich der Exponenten α im Zell- und Rotationsfreien System. Der Abzug der Rotation der Amöben um ihren Schwerpunkt ändert kaum etwas am Exponenten α . Damit bleibt der superdiffusiven Charakter der Bewegung für die betrachteten Zeiten τ erhalten.

Vakuolenensembles berücksichtigt werden. Die absoluten Richtungsangaben stimmen zwar nicht überein, jedoch ist der Trend der Verläufe recht ähnlich. Der Grund dafür, dass die absoluten Werte so weit auseinander liegen, ist der Ursache geschuldet, dass die Daten aufsummiert werden müssen, um die aktuelle Bewegungsrichtung zu erhalten. Durch das Aufsummieren kleiner Fehler in der bestimmten Rotation kommt es so zu großen Abweichungen in der Bewegungsrichtung. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Trend der Bewegungsrichtung aus der Rotation des Vakuolenensembles abgeleitet werden kann.

Dies zeigt, dass die Bewegung der Vakuolen im Zellsystem von der Richtungsänderung der Bewegung der Amöbe abhängt. Betrachtet man die Vakuolen als Marker, so kann aus dieser Beobachtung geschlossen werden, dass das Zellinnere oder zumindest die Vakuolen sich bei einer Rotation der Zelle mit drehen. Diese Beobachtung ist nicht selbstverständlich, da das Zellinnere typischerweise als hochdynamisch beschrieben

[103]: Witzel u. a. (2019), »Heterogeneities Shape Passive Intracellular Transport«

[104]: Maninová u. a. (2013), »The reorientation of cell nucleus promotes the establishment of front-rear polarity in migrating fibroblasts«

MTOC: Mikrotubuli-organisierendes Zentrum, engl. "microtubule organizing center"

wird.[103] Es muss also eine Verbindung zwischen den Vakuolen und dem Ursprung der Rotation der Zelle geben.

Während diese Beobachtung für Vakuolen in der Literatur bisher nicht gefunden werden konnte, zeigt der elliptische Zellkern von Fibroblasten ein ähnliches Verhalten. Der Zellkern befindet sich bei migrerenden Zellen im hinteren Teil der Zelle und seine lange Achse ist parallel zur Bewegungsachse der Zelle ausgerichtet. Bei einer Änderung der Bewegungsrichtung der Zelle wird der Zellkern mitgedreht.[104] In den meisten polarisierten Zellen befindet sich dabei vor dem Zellkern das MTOC. Der Zellkern und das MTOC definieren das asymmetrische Profil von polarisierten Zellen, welches wichtig für die effiziente gerichtete Bewegung ist. Ausgehend vom MTOC führen sich bewegende Mikrotubuli in Richtung der Zellmembran, die wie bereits beschrieben als Schienen für molekulare Motoren dienen[103] und einen deutlichen Einfluss auf die intrazelluläre Bewegung in Amöben haben. Dies wird in der Arbeit von Reverey u.a.[88] deutlich, in der der Einfluss von Mikrotubuli, Aktin und Myosin II auf die intrazelluläre Bewegung untersucht wurde. Um den Einfluss von Mikrotubuli zu bestimmen, wird Nocodazol verwendet, ein Molekül, das dazu dient, Mikrotubuli zu depolymerisieren. Die Untersuchung der intrazellulären Bewegung von Vakuolen im Laborsystem in der Arbeit von Reverey u.a. weist auch nach der Depolymerisation weiterhin eine Bewegung auf. Die ermittelten Trajektorien zeigen, dass diese Bewegung der Vakuolen im Laborsystem nicht mehr so stark gerichtet ist, wie die Bewegung von Vakuolen in unbehandelten Zellen. Diese Reduktion wird von Reverey u.a. auf die stark reduzierte Bewegung der Zelle zurückgeführt. Gegen diese These spricht, dass einzelne Vakuolen zwar eine gerichtete Bewegung aufweisen, eine Korrelation der Bewegungsrichtung zwischen einzelnen Partikeln jedoch kaum erkennbar ist. Diese fehlende Korrelation zwischen den Partikeln passt nicht zu der Vorstellung, dass diese temporär gerichtete Vakuolenbewegung durch die verbleibende, gerichtete Zellbewegung hervorgerufen wird.

Es ist jedoch denkbar, dass in Zellen, in denen die Mikrotubuli depolymerisiert wurden, die Bewegung von Vakuolen stärker durch den intrazellulären Strömungstransport beeinflusst wird. Eine Begründung dafür wäre, eine mögliche Verknüpfung zwischen Mikrotubuli und Vakuolen, die den Strömungstransport unter Normalbedingungen unterbindet, da die Vakuolen in diesem Fall durch Mikrotubuli fixiert werden.

Auf dieser Grundlage wird hier die Hypothese aufgestellt, dass bedingt durch Mikrotubuli eine Verknüpfung zwischen den Vakuolen und der Rotation der Zelle besteht. Durch diese Verknüpfung werden bei einer Rotation der Zelle die Vakuolen durch die Mikrotubuli mitgenommen. Diese Hypothese muss in zukünftigen Experimenten überprüft werden. Eine Möglichkeit diese Hypothese zu prüfen wäre, die Amöben in gebogenen Kanälen zu führen und die Bewegung der Mikrotubuli und der Vakuolen zu verfolgen. Für so eine Untersuchung müssen die Mikrotubuli fluoreszent markiert werden. Dass Amöben in Kanälen geleitet werden können, zeigen Experimente, die im Abschnitt 8.1 vorgestellt werden. Zeigt sich in diesen Experimenten ein Zusammenhang zwischen der Bewegung der Vakuolen und der Mikrotubuli, so wäre dies ein Indiz für die Richtigkeit der aufgestellten Hypothese.

Der beobachtete Zusammenhang zwischen der Rotation der Zelle und der Vakuolen deutet auf eine zeitlich konstante Polarisation der Zelle hin, welche die Zelle eindeutig in einen Front- und Heckbereich, in Bezug auf die Bewegungsrichtung, einteilt. Aus dieser Beobachtung wird ein rotationsfreies Koordinatensystem abgeleitet. In diesem Koordinatensystem zeigen sich Deformationen der Zellmembran, deren Einfluss auf die intrazelluläre Bewegung im nächsten Abschnitt untersucht wird.

c) Deformation der Amöbe

Bereits in Abbildung 7.2 wurde gezeigt, dass sich die Kontur der Zelle mit der Zeit ändert. Um die Komponente der intrazellulären Bewegung zu beschreiben, die von dieser Deformation der Zellmembran abhängt, wird das Zellsystem in ein rotationsfreies Koordinatensystem überführt. Die Zellkontur im rotationsfreien System ist in Abbildung 7.8a dargestellt. Auch in diesem Koordinatensystem ist die Dynamik des Randbereiches klar erkennbar. Im Zeitbereich des Beispiels dehnen sich die Flanken der Zelle aus und der Abstand zwischen der Vorder- und Hinterkante nimmt ab. Um den Flächenschwerpunkt der Zelle gibt es einen Bereich, in dem nie die Zellmembran beobachtet wird. Dieser Bereich kann mit der Form einer Ellipse angenähert werden, wobei die lange Achse der Ellipse parallel zur Bewegungsrichtung ausgerichtet ist. Um die Dynamik des Randbereiches zu beschreiben, wird diese Ellipse als Referenz verwendet.

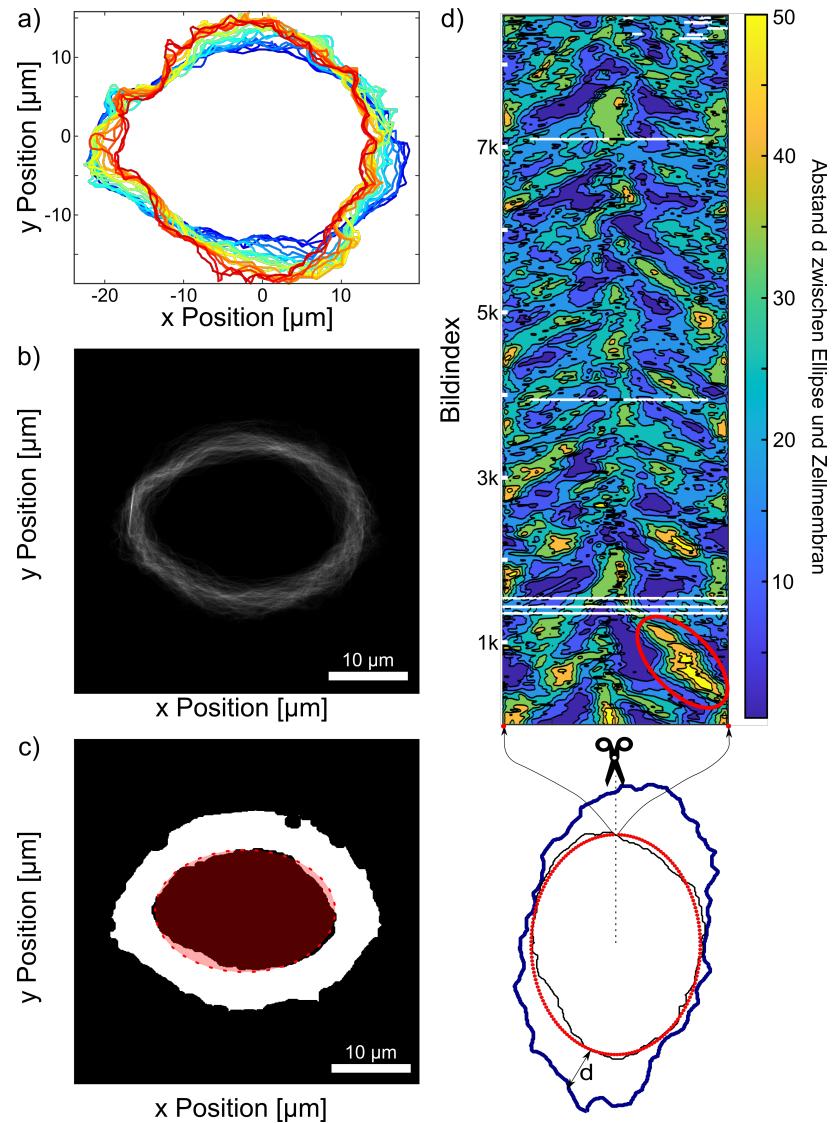
Um die optimale Form dieser Ellipse zu bestimmen, werden die Zellkonturen aller Bilder der Aufnahme übereinander gelegt. Diese Überlagerung aller Zellkonturen der Aufnahme ist in Abbildung 7.8b dargestellt. Die Helligkeit eines Punktes ist ein Maß dafür, wie häufig die Zellkontur an dieser Koordinate beobachtet wird. Abbildung 7.8c zeigt die Segmentierung des Bildes, bei dem der dynamische Randbereich vom Zellinneren durch eine Ellipse abgetrennt ist.

Die Dynamik des Randbereiches

Zur Beschreibung der Dynamik des Randbereiches wird in jedem Bild der normale Abstand d zwischen einem Punkt auf der Ellipse und der Zellmembran bestimmt (Abbildung 7.8d). Der normale Abstand wird in einem Konturdiagramm dargestellt. Dieses Konturdiagramm ist so zu lesen, dass an der linken und rechten Außenseite der vordere Bereich der Zelle liegt, und in der Mitte der hintere Bereich. Der Plot zeigt deutlich Strukturen, die vom vorderen in den hinteren Bereich der Zelle wandern. Diese Beobachtung legt nahe, dass es sich bei diesen Strukturen um Zellfüße handelt. Da es sich bei diesen Zellfüßen um Extrusionen des Zellkörpers handelt, ist davon auszugehen, dass auch diese Extrusionen die Dynamik der intrazellulären Bewegung beeinflussen.

Zusammenhang zwischen der Dynamik von Pseudopodia und Vakuolen

Um einen Zusammenhang zwischen der Verformung der Zellmembran und der intrazellulären Bewegung herzustellen, wird ein Zeitbereich der



Aufnahme ausgewählt, in dem ein Zellfuß deutlich hervortritt. Dieser Zeitbereich ist in Abbildung 7.9 dargestellt. Darin zeigt die gestrichelte, weiße Linie die Lage der Zellkontur zum Zeitpunkt $t = 0\text{ s}$ und die Aufnahme die Amöbe bei $t = 54\text{ s}$. Die farblich hervorgehobenen Bereiche visualisieren die Änderung der Zellfläche. Dabei kommt es im Bereich der roten und orangefarbenen Flächen zu einer Kontraktion und in dem wasserblauen Bereich zu einer Extrusion der Zellfläche. Die detektierten Vakuolen sind durch Kreise hervorgehoben und die Linien, die zu den Mittelpunkten der Vakuolen führen, zeigen die Bewegung der Vakuolen im Zeitraum zwischen den Aufnahmen. Die Farbe der Trajektorie gibt an, welcher Bereich der Verformung der Zellmembran die Bewegung verursacht. Vakuolen, die im vorderen Bereich der Zelle nahe dem roten Bereich liegen, bewegen sich zum Zellzentrum und folgen damit der Bewegung der Zellmembran im betrachteten Zeitintervall. Ein ähnliches Verhalten ist auf der linken Seite der Zelle (wasserblauer Bereich) und im hinteren Bereich der Zelle (orangefarbener Bereich) zu beobachten. Die Vakuole im Zentrum der Amöbe bewegt sich hingegen kaum im betrachteten Zeitintervall.

Damit zeigt sich ein deutlicher Einfluss der Deformation auf die Bewe-

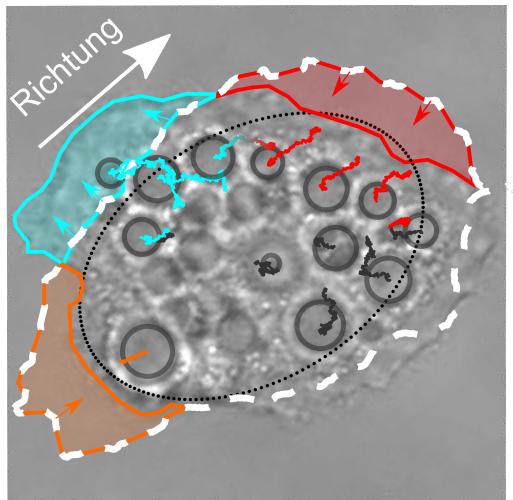


Abbildung 7.9: Die gestrichelte, weiße Linie zeigt die Zellkontur zu einem früheren Zeitpunkt. Im Zeitintervall von 54 s zwischen den Aufnahmen hat sich die Kontur der Zelle deutlich verändert. Die Linien zeigen die Trajektorien der Vakuolen, die durch Kreise hervorgehoben sind. Die Farben der Linien verknüpfen die Trajektorien mit Bereichen, die im betrachteten Zeitbereich kontrahieren bzw. expandieren und dadurch die Bewegung der Vakuolen beeinflussen. Es ist ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Deformation und der Bewegung der Vakuolen zu erkennen.

gung der intrazellulären Vakuolen. Dieser Einfluss der Deformation führt im betrachteten Zeitintervall von 54 s zu einer gerichteten Bewegung der Vakuolen und ist daher vermutlich maßgeblich für das beobachtete, superdiffusive Verhalten der Vakuolen.

Aufgrund der komplexen Dynamik der Bewegung der Zellmembran und des Einflusses dieser Bewegung auf die intrazelluläre Bewegung ist bisher keine Koordinatentransformation gefunden worden, welche die Dynamik durch die Deformation der Zellmembran beseitigt. Dies wäre nötig, um den Einfluss molekularer Motoren *in vivo* nachzuweisen, die die Vakuolen entlang von Filamenten des Cytoskeletts bewegen.

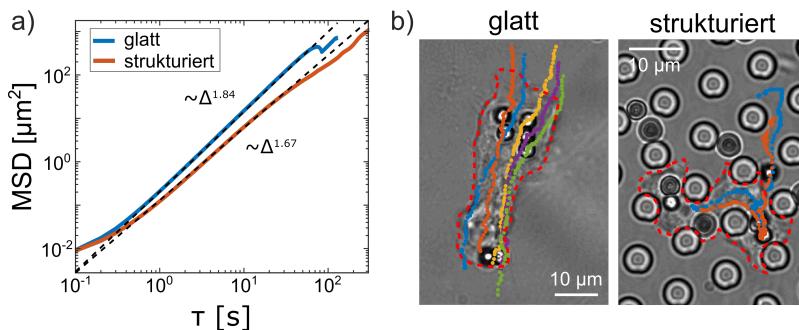
Beeinflussung der Bewegung von Amöben

8

In diesem Kapitel wird auf mehrere Möglichkeiten zur Beeinflussung der Bewegung von Amöben eingegangen. Dabei wird zunächst die Beeinflussung durch strukturierte Oberflächen auf die Bewegung von Amöben vorgestellt. Ziel dieser Untersuchungen ist es, Möglichkeiten zu finden, die Amöben gezielt in Bereiche zu dirigieren um sie in diesen festzuhalten. Damit würde sich eine Möglichkeit ergeben, diese Zellen z.B. aus einem befallenen Auge zu entfernen.

Anschließend wird geprüft, ob die Bewegungsrichtung von Zellen durch internalisierte magnetische Partikel beeinflusst wird, wenn sich die Zellen in einem magnetischen Feld befinden. Diese Untersuchung ist wichtig für die Beurteilung des Einflusses von MSPM Messungen auf die Zellbewegung, da sich auch bei diesen Messung magnetisch markierte Zellen kurzzeitig in einem magnetischen Feld befinden. Sollte sich ein Einfluss des magnetischen Feldes auf die Bewegungsrichtung der magnetisch markierten Zellen zeigen, so würde das Messergebnis durch die Messung beeinflusst werden und es müsste durch eine Änderung des Aufbaus oder eine Anpassung der Versuchsparameter darauf reagiert werden.

8.1 Beeinflussung durch räumliche Strukturen



8.1 Beeinflussung durch räumliche Strukturen	79
8.2 Beeinflussung durch magnetische Partikel	81
Intrazelluläre Position eines Partikels im Magnetfeld	83

Ziel der Arbeit "Migration of Microparticle-Containing Amoeba through Constricted Environments" [82] ist es, eine Möglichkeit zu finden, die Amöben mithilfe aufgenommener Partikel in strukturierten Umgebungen festzuhalten. Dazu wird auch die Bewegung von Amöben auf glatten Oberflächen mit der Bewegung auf strukturierten Oberflächen verglichen, um den Einfluss der strukturierten Oberfläche auf die Zellbewegung zu bestimmen. Die strukturierte Oberfläche besteht dabei aus hexagonal angeordneten Säulen aus PDMS (Sylgard 184, Dow Corning). Eine Amöbe in dieser Struktur ist in Abbildung 8.1b dargestellt. Der Spalt zwischen den Wänden zweier Säulen ist 5,5 μm breit, der Säulendurchmesser beträgt 4,5 μm und die Säulenlänge ist 10 μm .

Abbildung 8.1: a) Gemittelte MSD Kurven von internalisierten Mikropartikeln in Amöben, die sich auf glatten und strukturierten Oberflächen bewegen. b) Beispiel Trajektorien von internalisierten Mikropartikeln in Amöben, die sich auf glatten bzw. strukturierten Oberflächen bewegen. Für eine bessere Sichtbarkeit ist die Zellkontur hervorgehoben.

[82]: Timmermann u. a. (2020), »Migration of Microparticle-Containing Amoeba through Constricted Environments«

PDMS: Polydimethylsiloxan

Da die automatisierte Verfolgung von beweglichen Zellen in diesen Strukturen deutlich schwieriger ist als auf glatten Oberflächen, werden die Amöben für die Experimente mit Mikropartikeln markiert. Die internalisierten Partikel (Polysciences, Inc.) haben einen Durchmesser von $3\text{ }\mu\text{m}$ und bestehen aus Polystyrol. In Aufnahmen weisen die internalisierten Mikropartikel einen hohen Kontrast zu ihrer Umgebung auf, womit sich ihre Trajektorien einfach bestimmen lassen. Da der Partikeldurchmesser mit $3\text{ }\mu\text{m}$ deutlich kleiner als die Breite des Spaltes zwischen den Säulen ist, beeinflussen die Partikel die Bewegung der Amöbe nicht.

Aus den Trajektorien der Mikropartikel, die im wesentlichen die Bewegung der Amöbe widerspiegeln, lassen sich Informationen über die Bewegung der Amöbe ableiten. Dabei zeigt sich, dass die Bewegung der Amöbe durch die Säulen beeinflusst wird, was aus einer Abnahme der Steigung der MSD Kurven hervorgeht, die in Abbildung 8.1a dargestellt ist. Während sich für den Fall einer glatten Oberfläche ein Wert für den Exponenten α von $1,84 \pm 0,08$ ergibt, nimmt dieser Wert innerhalb der Säulenstruktur auf $1,67 \pm 0,11$ ab. Damit zeigt sich, dass die gerichtete Bewegung der Amöben durch die Säulenstruktur der Oberfläche ungerichtet wird.

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass sich die Bewegung von Amöben in Kanälen aus PDMS führen lässt. Amöben, die sich in diesen Kanälen bewegen, zeigt Abbildung 8.2. Es ist eindeutig erkennbar, dass die farblich hervorgehobenen Amöben sich entlang der Kanäle bewegen.

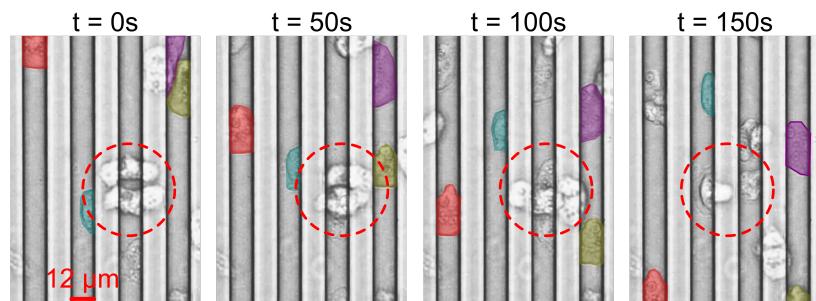


Abbildung 8.2: Aufnahmen bei mehreren aufeinanderfolgenden Zeitpunkten, die die Bewegung von Amöben entlang von Kanälen zeigen. Um die Bewegung der Amöben entlang der Kanäle hervorzuheben, sind einige Amöben farblich hervorgehoben.

Die verwendeten Kanäle sind nach oben offen, haben eine Breite von $12\text{ }\mu\text{m}$ und eine Tiefe von etwa $10\text{ }\mu\text{m}$. Meist bewegen sich die Amöben so lange geradlinig innerhalb dieser Kanäle, bis es zu einem Zusammenstoß mit einer anderen Amöbe kommt und die Amöben in benachbarte Kanäle wechseln. Der Bereich eines Zusammenstoßes ist in Abbildung 8.2 durch einen roten Kreis hervorgehoben.

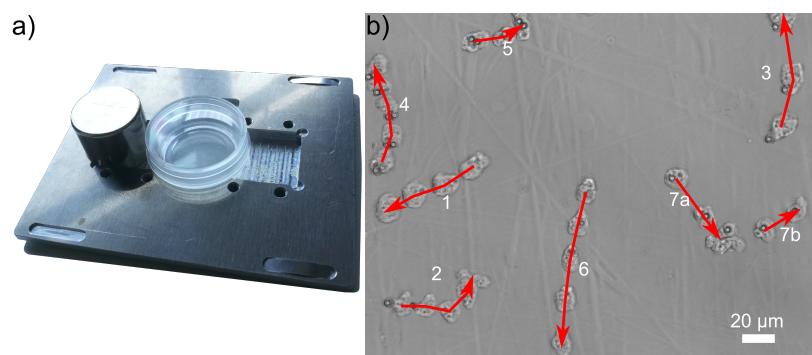
Die Geschwindigkeit der Amöben entlang der Kanäle ist mit $0,75\text{ }\mu\text{m/s} \pm 0,24\text{ }\mu\text{m/s}$ ähnlich groß wie die Geschwindigkeit auf glatten Oberflächen, wobei hier für einzelne Amöben eine Geschwindigkeit von $0,79\text{ }\mu\text{m/s}$ beobachtet werden konnte, siehe hierzu Abschnitt 7.2.

Es zeigt sich also eindeutig, dass die Bewegung der Amöben durch strukturierte Oberflächen beeinflusst werden kann. So nimmt in einer Struktur aus Säulen der Exponent α ab, was für eine weniger gerichtete Bewegung spricht. In Kanälen hingegen ist die Bewegung stärker gerichtet. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Bildung von Pseudopodien über Absätze hinweg energetisch aufwändiger ist, als wenn sie sich auf

ebenen Flächen ausbilden. Daher bewegen sich Amöben, nachdem sie sich entlang der Kanäle ausgerichtet haben, bevorzugt innerhalb der Kanäle.

8.2 Beeinflussung durch magnetische Partikel

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits gezeigt, dass magnetische Partikel dazu genutzt werden können, Zellen magnetisch zu markieren. Diese magnetische Markierung ermöglicht dann die zerstörungsfreie Detektion der Zellen auch in intransparenten Materialien. In Abschnitt 2.2 wurde die Kraft, die in einem Magnetfeld auf die markierten Zellen wirkt, dazu verwendet, um die Masse von aufgenommenem, magnetischem Material in einzelnen Zellen zu bestimmen. Daher ist die Frage naheliegend, ob man durch die Kraft, die auf die internalisierten Partikel wirkt, auch die Bewegung adhärenter Zellen beeinflussen kann.



Die Abbildung 8.3a zeigt den verwendeten Aufbau. Hier wird derselbe Magnet wie bei den Magnetophorese-Experimenten neben einer Petrischale platziert, welche die Zellen enthält. Der Abstand zwischen der Oberfläche des Magneten und dem Mittelpunkt des Bereiches, in dem die Zellen beobachtet werden, beträgt zwischen 5 mm und 15 mm. Der Aufbau wird auf einem invertierten Mikroskop platziert und die Bewegung der Zellen beobachtet.

Vor Beginn der Aufnahme werden die Amöben für 24 Stunden in PYG Medium kultiviert, das mit Mikropartikeln ($\varnothing = 8 \mu\text{m}$, Micromod Partikeltechnologie GmbH) versetzt ist. Nach 24 Stunden wird das Medium ausgewechselt, um nicht aufgenommene Partikel zu entfernen, und mit der Bildaufnahme begonnen. Abbildung 8.3b zeigt beispielhaft einige Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Bewegungsrichtung der Zellen ist durch Pfeile über den Zellen dargestellt.

Es zeigt sich, dass nicht alle Amöben Mikropartikel aufnehmen. Zudem haften bei einigen Amöben die Partikel offenbar an der Zellmembran der Amöben und lösen sich zum Teil während der Aufnahme von der Zelle ab. Auch können einige Zellen beobachtet werden, die mehr als ein Partikel aufgenommen haben.

Abbildung 8.3: a) Aufbau zur aktiven Manipulation der Bewegungsrichtung von Amöben im Magnetfeld. b) Trajektorien von Amöben im Magnetfeld. Der Magnet befindet sich auf der linken Seite der Aufnahme.

- 1 Amöbe ohne Mikropartikel (MP)
- 2 MP löst sich von Amöbe
- 3 MP haftet an Zellmembran
- 4-5 Amöbe mit zwei MP
- 6 Amöbe mit einem MP
- 7a-b Amöbe mit einem aufgenommenen Mikropartikel, deren Bewegungsrichtung sich nach der Kollision mit einer anderen Amöbe ändert.

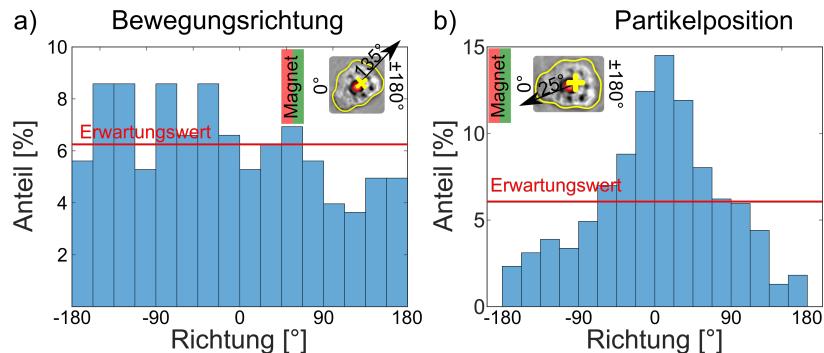
Magnet: S-24.5-20-N50, magnet-shop.de

PYG: Peptone Yeast Glucose

Für die Auswertung der Bewegungsrichtung der markierten Amöben im Magnetfeld und zur Bestimmung der Position des aufgenommenen Mikropartikels in der Zelle wird der Mittelpunkt der Zellfläche und des Mikropartikels mit *ImageJ* manuell bestimmt. Dazu wird in jedem 250. Bild einer Aufnahme die Kontur einer Zelle, die genau ein Partikel aufgenommen hat, manuell nachgezogen und der Schwerpunkt dieser Fläche bestimmt. Dabei werden nur Amöben berücksichtigt, die im betrachteten Bild nicht mit einer anderen Zelle kollidieren. Die erhaltenen Positionsdaten werden zu Trajektorien zusammengefügt, um aus diesen die Bewegungsrichtung der Amöben zu bestimmen. Da es nach einer Kollision häufig zu einer Richtungsänderung der Bewegung kommt, werden Trajektorien nach einer Kollision neu begonnen. Insgesamt werden so 508 Datensätze, bestehend aus Angaben zum Mikropartikel und zur Amöbe, ermittelt. Die Datensätze verteilen sich auf insgesamt 65 Trajektorien.

Um einzelne Trajektorien nicht zu stark zu gewichten, wurden Trajektorien mit mehr als 10 Einträgen auf die ersten 10 Einträge gekürzt. So werden 303 Bewegungsrichtungen für die Amöben bestimmt, die im Histogramm in Abbildung 8.4a dargestellt sind. Da sich die beobachteten Bewegungsrichtungen recht homogen um den Erwartungswert verteilen, gibt es keine bevorzugte Bewegungsrichtung der markierten Amöben im Magnetfeld. Die Bewegungsrichtung der Amöben wird also nicht vom Magneten beeinflusst.

Abbildung 8.4: a) Bewegungsrichtung von Amöben bezogen auf die Richtung zum Magneten. Die rote Linie zeigt den Erwartungswert. Die Schwankung der Säulenhöhe um den Erwartungswert zeigt, dass das Magnetfeld die Richtung der Amöbenbewegung nicht beeinflusst. b) Position des Mikropartikels relativ zum Zellmittelpunkt, bezogen auf die Richtung zum Magneten. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit um 0° ist deutlich erhöht. Dies verdeutlicht den Einfluss des Magnetfeldes auf die intrazelluläre Position des Partikels.



[82]: Timmermann u. a. (2020), »Migration of Microparticle-Containing Amoeba through Constricted Environments«

Kräfte auf Mikropartikel im betrachteten Bereich [$x = 5 \text{ mm}$ bis 15 mm , $y = 0 \text{ mm}$ und $z = 0 \text{ mm}$]:

$$\begin{aligned} F_x &= -16,4 \text{ pN} \dots 2,6 \text{ pN} \\ F_y &= 4,4 \text{ pN} \dots 0,5 \text{ pN} \\ F_z &= 7,6 \text{ pN} \dots 0,5 \text{ pN} \end{aligned}$$

Der Grund dafür, dass die Bewegungsrichtung der Amöben sich im Magnetfeld nicht ändert, ist, dass die Kraft auf das magnetische Partikel deutlich kleiner ist als die Kraft, die eine Amöbe aufbringen kann, um sich ihren Weg zu bahnen. Diese Kraft wurde in [82] berechnet. Hier wird gezeigt, dass eine Amöbe ein Mikropartikel zwischen zwei Säulen hindurch ziehen kann, wodurch sich die Säulen nach außen biegen. Aus der Verbiegung der Säulen kann auf eine Kraft von 100 nN geschlossen werden, die eine Amöbe dabei aufbringt.

Die Kraft auf ein magnetisches Mikropartikel im betrachteten Bereich ergibt sich nach Gleichung 2.2, wobei die Masse an SPIONs in einem Mikropartikel 14 pg beträgt. Mit dieser Masse und der Magnetisierungskurve in Abbildung 2.1 sowie dem Feld \vec{B} und dessen Gradienten im Aufnahmebereich ergeben sich im betrachteten Bereich Kräfte von einigen Pikonewton auf das Partikel und damit die Zelle.

Die Kraft auf eine markierte Zelle ist also verglichen mit der Kraft, die sie ausüben kann, etwa 10.000 mal kleiner, weshalb sich die Bewegungsrichtung der Zelle durch das Mikropartikel nicht beeinflussen lässt. Da das Feld im MSPM Setup etwa in derselben Größenordnung liegt wie bei den Migrationsexperimenten, ist davon auszugehen, dass eine MSPM Messung die Bewegung der Zelle auf direktem Weg nicht beeinflusst.

Intrazelluläre Position eines Partikels im Magnetfeld

Betrachtet man die Lage des Mikropartikels relativ zum Mittelpunkt der Amöbenfläche, so zeigt sich, dass die Partikel deutlich häufiger auf der dem Magneten zugewandten Seite liegen. Auch für diese Auswertung werden Trajektorien mit mehr als 10 Einträge auf die ersten 10 Einträge reduziert. Es bleiben 386 Positionen des Mikropartikels relativ zum Zellmittelpunkt. Die Verteilung der Winkelposition des Partikels bezogen auf den Mittelpunkt der Zelle ist in Abbildung 8.4b dargestellt. Partikel bei der Richtung 0° liegen auf der Seite, die dem Magneten zugewandt ist. Entsprechend liegen Partikel bei $\pm 180^\circ$ auf der vom Magneten abgewandten Seite.

Weiterhin zeigen die Daten, dass der Abstand der Partikel zum Flächenschwerpunkt der Zelle auf der dem Magneten zugewandten Seite größer ist als auf der dem Magneten abgewandten Seite. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 8.5 deutlich, wobei in blauen Bereichen häufiger Partikel beobachtet werden als in weißen Gebieten. Der Rote Punkt verdeutlicht die Lage des Zellmittelpunktes und der rote Kreis dient als Orientierungshilfe. Es ist eindeutig, dass sich die meisten Partikel etwa $10 \mu\text{m}$ vom Zellmittelpunkt auf der dem Magneten zugewandten Seite befinden.

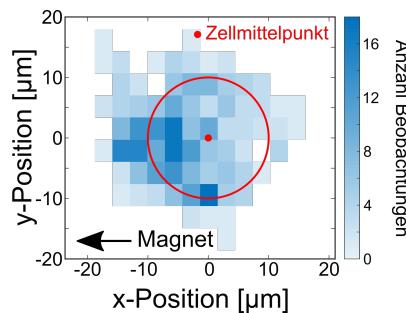


Abbildung 8.5: Abstand zwischen Mikropartikel und Zellmittelpunkt. Der Magnet ist auf der linken Seite positioniert. Die Anzahl der Beobachtungen auf der dem Magneten zugewandten Seite ist größer als auf der abgewandten Seite. Zudem liegen die Mikropartikel auf der dem Magneten zugewandten Seite weiter vom Mittelpunkt entfernt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Position des Mikropartikels in der Zelle durch magnetische Kräfte im Pikonewtonbereich beeinflusst wird und die Änderung der Position des Magneten zu einer Verschiebung des Mikropartikels innerhalb der Zelle führen sollte.

Fazit: ZELLBEWEGUNG UND IHR EINFLUSS AUF DIE INTRAZELLULÄRE DYNAMIK

9

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Bewegung von *Acanthamoeba castellanii* und deren intrazelluläre Dynamik untersucht. Eine Untersuchung dieser Bewegungen ist wichtig, da sie essentiell für die Ausbreitung von Zellen in Scaffolds sind. Um die Zellbewegung zu untersuchen, wurde ein Setup zur Verfolgung einzelner Zellen aufgebaut und ein Arbeitsprozess entwickelt, um die intrazelluläre Dynamik von Vakuolen effizient zu bestimmen. Die mit diesem Setup aufgenommenen Bilder werden in das Zellsystem, bei dem der Flächenschwerpunkt der Zelle im Zentrum des Bildes liegt, überführt. Trajektorien, die sich durch das Zusammenfassen der ermittelten Positionen in diesem Koordinatensystem ergeben, wurden in einem Manuskript [3] detailliert beschrieben und in einem weiteren [2] mit einer neuen Methode untersucht. In beiden Arbeiten wird die Bewegung der Vakuolen als superdiffusiv charakterisiert.

Zur Bestimmung der Ursachen dieser superdiffusiven Bewegung werden in der vorliegenden Arbeit die Translation der Amöbe, die Rotation im Zellsystem und die Deformation der Zellmembran auf die intrazelluläre Bewegung untersucht. Dabei wird die in [3] aufgestellte These, dass eine Änderung der Bewegungsrichtung der Amöbe eine Rotation der Vakuolen um den Zellmittelpunkt hervorruft, bestätigt. Dazu wurde nachgewiesen, dass der Trend der Bewegungsrichtung der Amöbe aus den Trajektorien der Vakuolen im Zellsystem bestimmt werden kann. Ein Hinweis auf diesen Zusammenhang zwischen der Rotation der Vakuolen und der Rotation der Zelle ist in der Literatur bisher nicht zu finden. In der Arbeit von Koslover u.a. [89] wurde zwar der Einfluss der Verformung der Zellemembran auf die intrazelluläre Bewegung untersucht, wobei die Ergebnisse eine Rotation der intrazellulären Partikel um den Zellmittelpunkt andeuten, diese Rotation wird jedoch der Deformation der Zelle zugeschrieben und nicht der Änderung der Bewegungsrichtung der Zelle. Dass die Bewegung von Zellen jedoch zu einer Umorientierung von Zellbestandteilen führen kann, zeigt beispielsweise die Lage und Orientierung des Zellkerns in migrierenden Fibroblasten. Bei Untersuchungen dazu zeigt sich, dass die lange Achse des elliptischen Zellkerns parallel zur Bewegungsrichtung ausgerichtet wird und sich bei einer Änderung der Bewegungsrichtung der Zelle mit dreht.[104] In diesen migrierenden Fibroblasten ordnen sich der Zellkern und das MTOC hintereinander an, wobei das MTOC meistens vor dem Zellkern, bezogen auf die Bewegungsrichtung, im Zentrum der Zelle liegt.

Das MTOC ist der Ausgangspunkt für Mikrotubuli, Filamente die sich zwischen MTOC und Zellmembran erstrecken. In der Arbeit von Reverey u.a. [88] wurde gezeigt, dass Mikrotubuli auch einen Einfluss auf die intrazelluläre Bewegung von *A. castellanii* haben. Dabei sind die Werte der Geschwindigkeits-Autokorrelation im Zeitbereich von zwei Sekunden in Zellen, in denen die Mikrotubuli mithilfe von Nocodazol depolymerisiert wurden, ähnlich groß wie in unbehandelten Zellen. Dies ist bemerkenswert, da dieses Verhalten in unbehandelten Zellen auf die konstante Bewegung der Amöbe im Laborsystem zurückgeführt wird,

[3]: Thapa u. a. (2019), »Transient superdiffusion of polydisperse vacuoles in highly motile amoeboid cells«

[2]: Krapf u. a. (2019), »Spectral Content of a Single Non-Brownian Trajectory«

[104]: Maninová u. a. (2013), »The reorientation of cell nucleus promotes the establishment of front-rear polarity in migrating fibroblasts«

[88]: Reverey u. a. (2015), »Superdiffusion dominates intracellular particle motion in the supercrowded cytoplasm of pathogenic *Acanthamoeba castellanii*«

MTOC: Mikrotubuli-organisierendes Zentrum, engl. "microtubule organizing center"

während zeitgleich berichtet wird, dass diese Bewegung in Amöben, die mit Nocodazol behandelt wurden, nahezu zum Erliegen kommt. Daher sollte es in Zellen, in denen die Mikrotubuli depolymerisiert wurden, eine andere Ursache für dieses Verhalten geben als die Bewegung der Zelle. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Bewegung der Vakuolen in Zellen ohne Mikrotubuli stärker durch den intrazellulären Strömungs-transport beeinflusst wird, da diese Bewegungskomponente dann nicht durch Mikrotubuli behindert wird. Aus diesem gerichteten Strömungs-transport resultieren dann die größeren Werte in der Geschwindigkeits-Autokorrelation, die im Zeitbereich von wenigen Sekunden in der Arbeit von *Reverey u.a.* beobachtet werden. Diese Beobachtung könnte also auf eine Verknüpfung zwischen Vakuolen und Mikrotubuli hindeuten. Andersherum wurde in der Arbeit von *Heinrich u.a.*[90] gezeigt, dass magnetische Kräfte auf Partikel, die an Mikrotubuli gebunden sind, zu einer Änderung der Lage der Mikrotubuli führen können.

Mit dieser Verknüpfung zwischen Vakuolen und Mikrotubuli wurde auch die in Abschnitt 7.2 vorgestellte Hypothese, dass die Mikrotubuli dafür sorgen, dass die Vakuolen bei einer Änderung der Bewegungsrichtung der Zelle mit rotieren, begründet. Um diese Hypothese *in vivo* zu überprüfen, wurde in dem Abschnitt auch ein Experiment vorgeschlagen, mit dem die Hypothese in einer zukünftigen Arbeit validiert werden kann. Bei diesem Experiment wird die Bewegung der Zelle gezielt in gebogenen Kanälen geführt und die Ausrichtung der Mikrotubuli und die Bewegung der Vakuolen beobachtet. Einen möglichen Hinweis darauf, dass eine Rotation der Mikrotubuli zu einer Rotation der Zellbestandteile führt, liefert auch das Video in der Arbeit von *Hoffmann u.a.*[51]. In dieser Arbeit befinden sich im Zentrum des sternförmigen Netzes aus Mikrotubuli magnetische Nanopartikel, an die Proteine (RanGTP) gebunden sind, die nach Erreichen einer lokalen, kritischen Konzentration die Bildung von Mikrotubuli auslösen. Das Video zeigt, wie durch die Verschiebung eines Permanentmagneten um die Zelle das Mikrotubulinnetzwerk verschoben werden kann, wobei es so aussieht, als ob dadurch auch das Innere der Zelle mitrotiert wird, was sich durch das Mitführen eines fluoreszierenden Partikels zeigt. Mit dem von *Hoffmann u.a.* durchgeführten *in vitro* Experiment könnte also auch gezielt überprüft werden, ob durch die Rotation der Mikrotubuli intrazelluläre Partikel, die im Experiment künstlich hinzugefügt wurden, mitgeführt werden können.

Der beobachtete Zusammenhang zwischen der Änderung der Bewegungsrichtung der Amöbe und der Rotation ihrer Vakuolen um den Flächenschwerpunkt deutet auf eine zeitlich konstante Polarisation der Zelle hin, welche die Amöbe mit Bezug auf die Bewegungsrichtung klar in einen vorderen und einen hinteren Bereich aufteilt. Aufgrund dieser festen Aufteilung ist es möglich, die Rotation der Amöbe aus den Trajektorien der Vakuolen zu entfernen. Dazu wird eine Koordinatentransformation eingeführt, die die Bewegungsrichtung der Amöbe im resultierenden Koordinatensystem konstant ausrichtet. Obwohl sich durch diese Transformation die Trajektorien einzelner Vakuolen zum Teil deutlich ändern, ändert sich der Exponent α zwischen Messungen im Zellsystem und Messungen im rotationsfreien System kaum. In beiden Systemen liegen die Werte für α im Bereich von 1,35 und weisen damit auf das superdiffusive Verhalten im Zeitintervall von einigen Minuten hin. Ein ganz ähnliches Verhalten findet man in der Arbeit von *Koslover*

[90]: Heinrich u. a. (2006), »Active mechanical stabilization of the viscoplastic intracellular space of Dictyostelia cells by microtubule-actin crosstalk«

[51]: Hoffmann u. a. (2013), »Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles«

u.a.[89], in der für Organellen in *HL60* Zellen ein Wert für α von 1,4 bestimmt wurde. Dabei wird in der Arbeit von *Koslover u.a.* die Interpartikel MSD berechnet, die mit der MSD im rotationsfreien Zellsystem vergleichbar ist. Die Interpartikel MSD ergibt sich nach

$$MSD(t) = \langle [d_{i,j}(t_0 + t) - d_{i,j}(t_0)]^2 \rangle_{t_0,i,j}.$$

Dabei ist $d_{i,j} = |\vec{R}_i - \vec{R}_j|$ der Abstand zwischen zwei Partikeln in der Zelle. Die Winkelklammern geben den Ensemblemittelwert über alle Startzeitpunkte t_0 und alle möglichen Partikelabstände $d_{i,j}$ an. Da für die Interpartikel MSD die Rotation der Zelle unerheblich ist, sind die bestimmten Werte für α zwischen den beiden Arbeiten von der Aussage her vergleichbar.

Um die Ursachen dieses superdiffusiven Verhaltens aufzuklären, werden die Trajektorien von Vakuolen im rotationsfreien Koordinatensystem über der Aufnahme der Amöbe eingeblendet. In diesem rotationsfreien Koordinatensystem können Extrusionen erkannt werden, die sich im vorderen Bereich der Zelle bilden und entlang der Flanken in den hinteren Bereich der Zelle wandern. Der Einfluss dieser Deformation auf die intrazelluläre Dynamik wurde visuell in Abbildung 7.9 dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Deformation der Zelle zu einer zeitlich begrenzten und gerichteten Bewegung führt, die zur Beobachtung des superdiffusiven Verhaltens im betrachteten Zeitintervall von einigen 10 Sekunden beiträgt.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die intrazelluläre Bewegung von vielen Effekten beeinflusst wird. Soll beispielsweise der Einfluss von molekularen Motoren auf die intrazelluläre Bewegung von Zellen *in vivo* untersucht werden, die die Vakuolen entlang von intrazellulären Filamenten transportieren, muss zunächst der Einfluss dieser Bewegungsmechanismen abgezogen werden, um stichhaltige Aussagen treffen zu können.

Weiterhin zeigen die Untersuchungen, dass eine Manipulation der Bewegung von *A. castellanii* auf strukturierten Oberflächen möglich ist. So ist der Exponent α der Zellbewegung in einer Säulenstruktur kleiner als der einer Bewegung auf glatten Oberflächen. Zu dem selben Ergebnis kommen auch die Autoren in der Arbeit von *Arcizet u.a.*[80], in der die Bewegung von *D. discoideum* auf glatten und strukturierten Oberflächen untersucht wurde. Die Ausbreitung von Zellen kann in strukturierten Umgebungen also reduziert werden. Ein ähnliches Verhalten wird auch in der Arbeit von *Gutekunst u.a.*[8] beobachtet, bei der die Zellbewegung von *A. castellanii* in einer dreidimensionalen Matrix aus Polyacrylamid untersucht wird, die von sich kreuzenden Kanälen durchzogen ist. Es zeigt sich, dass die Amöben über längere Zeiten in den Kreuzungspunkten der Kanäle festgehalten werden. Aus diesem Grund wird vorgeschlagen, das Material als Falle für Amöben zu verwenden, um sie beispielsweise aus einer Flüssigkeit zu entfernen.

Des Weiteren wird in der Arbeit von *Arcizet u.a.* beobachtet, dass die gerichtete Bewegung von *D. discoideum* innerhalb der periodischen Säulenstruktur im Wesentlichen entlang von Alleen verläuft. Auf dieses Verhalten lässt sich auch aus den in dieser Arbeit vorgestellten Messungen schließen, wobei eine dieser Messungen in Abbildung 8.1b exemplarisch

[89]: Koslover u. a. (2017), »Cytoplasmic Flow and Mixing Due to Deformation of Motile Cells«

MSD: mittlere quadratische Verschiebung, engl. "mean squared displacement"

[80]: Arcizet u.a. (2012), »Contact-controlled amoeboid motility induces dynamic cell trapping in 3D-microstructured surfaces«

[8]: Gutekunst u. a. (2019), »3D Hydrogels Containing Interconnected Microchannels of Subcellular Size for Capturing Human Pathogenic Acanthamoeba Castellanii«

dargestellt ist. Dieser Abbildung ist zu entnehmen, dass auch die gezeigten Mikropartikel, die die Bewegung der Amöbe repräsentieren, entlang der Allee in der periodischen Struktur transportiert werden. Verbindet man die Ränder dieser Alleen miteinander, so entstehen Kanäle und es wurde in Zusammenhang mit Abbildung 8.2 gezeigt, dass die Bewegung der Amöben in diesen Kanälen geleitet werden kann. Daraus könnte sich eine neue Behandlungsmöglichkeit ergeben, wenn ein Auge von Amöben befallen ist. So könnten zur Behandlung strukturierte Kontaktlinsen verwendet werden, die nach dem Prinzip einer Reuse funktionieren. Die Amöben können durch die Kanäle einfach in die Kontaktlinse hineinwandern. Aufgrund der inneren Struktur der Kontaktlinse ist es jedoch schwer für sie, die Struktur wieder zu verlassen. Das Beispiel einer solchen Struktur ist in Abbildung 9.1 visualisiert. Möglicherweise lässt sich

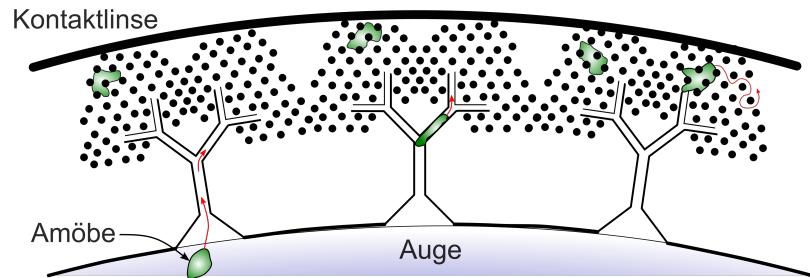


Abbildung 9.1: Funktionsprinzip einer Reuse, um Amöben aus einem infizierten Auge zu entfernen. Durch die Kanäle in der Kontaktlinse ist es für die Amöbe einfach, ins Innere der Kontaktlinse vorzudringen. Ist die Amöbe jedoch in die Säulenstruktur gelangt, so ist es schwierig für sie, die Kontaktlinse wieder zu verlassen.

[105]: Di Giacomo u. a. (2017), »Deployable micro-traps to sequester motile bacteria«

so die von Gutekunst u.a.[8] vorgestellte Fangmethode weiter verbessern, da die Oberfläche, über die die Amöben die Struktur verlassen können, reduziert wird. Ein ganz ähnliches Verfahren wurde von Di Giacomo[105] für Bakterien vorgeschlagen. Dabei werden hohle Strukturen mit etwa 100 µm Kantenlänge mithilfe eines 3D Laser-Lithografiesystems erzeugt. In der Oberfläche dieser Strukturen befinden sich trichterförmige Öffnungen, durch die die Bakterien in die Struktur hineingeleitet werden. Aufgrund der Trichterform der Öffnungen ist die Anzahl der Zellen, die durch die trichterförmige Öffnung in die Falle hineingelangen, größer als die Anzahl, die die Falle durch diese Öffnung verlassen. Dadurch nimmt die Anzahl der Bakterien in der Falle mit der Zeit zu.

Eine weitere interessante Kanalstruktur, die in diesem Zusammenhang zu nennen ist, wurde in der Arbeit von Mahmud u.a.[106] vorgestellt. Diese Kanalstruktur besteht aus sich berührenden gleichseitigen Dreiecken, deren Symmetrieachsen parallel zur Mittelachse des Kanals ausgerichtet sind. Dabei wird beobachtet, dass einzelne Zellarten eine bevorzugte Bewegungsrichtung in dieser Struktur haben, wobei unterschiedliche Zellarten nicht die gleiche Vorzugsrichtung haben müssen. Damit kann diese Struktur einerseits dazu verwendet werden, Zellen in eine Falle zu lenken und andererseits kann sie dazu verwendet werden, um bestimmte Zellarten voneinander zu trennen.

Bei Untersuchungen zur Manipulation der Bewegungsrichtung mittels magnetischer Mikropartikel wurde gezeigt, dass die Kraft auf die verwendeten Partikel im Magnetfeld zu klein ist, um eine Änderung der Bewegungsrichtung der Amöben hervorzurufen. Das gleiche Verhalten wurde auch in der Arbeit von Wilhelm u.a.[84] für *Dictyostelium discoideum* beobachtet. Daher ist davon auszugehen, dass die Verteilung der Zellen in einem Scaffold nicht durch die MSPM Messung beeinflusst wird.

Betrachtet man die intrazelluläre Position der magnetischen Mikropar-

[84]: Wilhelm u. a. (2007), »Magnetic control of Dictyostelium aggregation«

tikel in einem zeitlich konstanten, inhomogenen Magnetfeld, lässt sich feststellen, dass die Partikel bezogen auf den Flächenschwerpunkt der Zelle vermehrt auf der dem Magneten zugewandten Seite detektiert werden. Dies zeigt, dass die Mikropartikel durch ein Magnetfeld intrazellulär bewegt werden können. Dass die Position von magnetischen Partikeln innerhalb von Zellen manipuliert werden kann, wurde bereits in anderen Arbeiten gezeigt, die auf die Bestimmung der mechanischen Eigenschaften des Cytoplasmas fokussiert sind. [90, 107] Bei diesen Untersuchungen wirken für einige Sekunden Kräfte zwischen 20 pN und 700 pN auf die Zellen. Durch die Beobachtung der dadurch hervorgerufenen Bewegung der Partikel innerhalb der Zellen kann die Viskosität des Cytoplasmas bestimmt werden. Dabei werden in der Arbeit von Feneberg u.a. bei großen Kräften von 400 pN gerichtete Bewegungen der Mikropartikel parallel zur wirkenden Kraft beobachtet. Mit der Abnahme der Kraft im Kraftbereich zwischen 100 pN und 200 pN zeigt sich weiterhin diese gerichtete Bewegung, wobei diese jetzt von Phasen unterbrochen wird, in denen die Bewegungsgeschwindigkeit reduziert wird und die Bewegungsrichtung von der Richtung der wirkenden magnetischen Kraft abweicht. Aus dieser Beobachtung schließen die Autoren dieser Studie, dass die Zellen als viskoplastische Objekte betrachtet werden können. Dabei wird die Bewegung der Partikel durch Mikrotubuli und andere Komponenten des Cytoskeletts zeitweise abgebremst, bevor diese Filamente z.B. durch ihr Zerreißen den Weg für die Partikel freigeben. Wirken auf das magnetische Partikel große Kräfte im Bereich von 400 pN, so kann sich das Partikel seinen Weg direkt bahnen und es kommt zu der beobachteten, linearen Bewegung des Partikels. Im Unterschied zu jener Untersuchung zeigt sich im Rahmen dieser Arbeit, dass in *A. castellanii* auch kleine Kräfte von einigen pN, die über einen längeren Zeitraum auf die magnetischen Mikropartikel wirken, ausreichen, um sie intrazellulär zu verschieben.

Zuvor wurde in Abschnitt 7.2 die Hypothese aufgestellt, dass es aufgrund einer Verknüpfung zwischen Mikrotubuli und Vakuolen zu einer Rotation der Vakuolen um den Zellmittelpunkt kommt, wenn sich die Bewegungsrichtung der Zelle ändert. Sollte sich diese Hypothese in zukünftigen Untersuchungen bestätigen, ließe sich umgekehrt möglicherweise auch die Lage der Mikrotubuli durch magnetische Partikel verändern. Da bekannt ist, dass eine der Hauptfunktionen von Mikrotubuli die Kontrolle der Bewegung polarisierter Zellen ist,[86] ließe sich durch eine Manipulation der Lage der Mikrotubuli möglicherweise die Bewegungsrichtung einzelner Zellen beeinflussen. Dass eine Verschiebung einzelner Mikrotubuli mit magnetischen Mikropartikeln erreicht werden kann, wurde bereits in der Arbeit von Heinrich u.a. gezeigt.

Diese aktive Manipulation der Bewegungsrichtung könnte verschiedene spannende Möglichkeiten eröffnen, wie z.B. den gezielten Transport von Medikamenten im menschlichen Körper. Sollte sich zeigen, dass eine Beeinflussung der Bewegungsrichtung auf diesem Weg möglich ist, wäre eine Beeinflussung der Bewegungsrichtung im MSPM Setup dennoch unwahrscheinlich, da sich das Feld im MSPM Setup bei Rotationsfrequenzen von 0,8 Hz am Ort der Probe in einigen 100 ms ändert. Daher ist nicht davon auszugehen, dass die Partikel im viskosen Cytoplasma der Zelle ihre Position in dieser kurzen Zeit wesentlich ändern und so die Zellbewegung beeinflussen.

[107]: Feneberg u. a. (2001), »Dictyostelium cells' cytoplasm as an active viscoplastic body«

[90]: Heinrich u. a. (2006), »Active mechanical stabilization of the viscoplastic intracellular space of Dictyostelia cells by microtubule-actin crosstalk«

[86]: Kaverina u. a. (2011), »Regulation of cell migration by dynamic microtubules«

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Setup aufgebaut und erforscht, mit dem superparamagnetische Partikel nachgewiesen und ihre zweidimensionale Verteilung bestimmt werden kann. Im vorgestellten MSPM Setup werden sowohl der Sensor als auch die Probe im Feld eines Permanentmagneten platziert. Dadurch wird der Sensor unter optimalen Bedingungen betrieben und die magnetischen Momente der Probe ausgerichtet, was zu einem messbaren Signal der Probe am Ort des Sensors führt. Um das Signal der Probe von Hintergrundsignalen zu trennen, wird die Probe in Rotation versetzt, wodurch die Probe im gemessenen Spektrum Signale bei Vielfachen der Rotationsfrequenz erzeugt. Um das Rotationsverfahren gewinnbringend einzusetzen, muss die Rotationsgeschwindigkeit der Probe so konstant wie möglich sein und die Erzeugung der Rotation darf nicht von einem magnetischen Signal, das das Signal der Probe überlagert, begleitet werden. Diese Bedingungen werden durch die Verwendung eines Piezomotors erfüllt.

Weiterhin wurde gezeigt, dass Zellmessungen mit dem vorgestellten Aufbau möglich sind und dass die Zellen durch die aufgenommenen superparamagnetischen Nanopartikel nicht beeinflusst werden. Dazu wurde ein Vergleich zweier Kräfte vorgestellt. Die erste Kraft ist die, die eine Zelle aufbringen kann, um sich ihren Weg zu bahnen, und die zweite Kraft ist die, die durch die internalisierten magnetischen Partikel im Magnetfeld auf sie wirkt. Dieser Vergleich zeigt, dass die Kraft auf die magnetischen Partikel deutlich kleiner ist, womit die Bewegungsrichtung nicht beeinflusst wird.

Eine detaillierte Analyse der intrazellulären Bewegung von Vakuolen weist zudem ein hoch interessantes superdiffusives Verhalten auf. Um die Ursachen für dieses superdiffusive Verhalten aufzudecken, wurde der Einfluss der Änderung der Bewegungsrichtung der Zelle und der Deformation der Zellmembran auf die intrazelluläre Bewegung untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass die Änderung der Bewegungsrichtung keinen Einfluss auf das superdiffusive Verhalten der intrazellulären Dynamik im Zeitbereich von einigen Minuten hat. Im rotationsfreien Koordinatensystem, bei dem die Bewegungsrichtung der Zelle konstant in eine Richtung weist, zeigen sich deutliche Ausstülpungen in der Zellmembran. Es wurde beobachtet, dass diese Ausstülpungen einen deutlichen Einfluss auf die intrazelluläre Bewegung der Vakuolen haben. Durch diesen Einfluss kommt es im Zeitbereich von mehreren 10 Sekunden zu einer gerichteten Bewegung, die höchstwahrscheinlich die Ursache für die beobachtete superdiffusive Bewegung der Vakuolen in diesem Zeitbereich ist.

Um in Zukunft auch Messungen von dreidimensionalen Zellverteilungen zu ermöglichen, wurde zudem ein neues Design eines Aufbaus vorgestellt, bei dem sich die Ausrichtung der magnetischen Momente der Probe in Abhängigkeit vom Abstand zum Sensor ändert. Theoretisch wurde dieses Setup mit einem Tiefenauflösungsplot charakterisiert, der zeigt, dass dieser Aufbau eine deutlich bessere Tiefenauflösung liefert als der

bisherige. Ob dies auch experimentell erreicht werden kann, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Publikationen mit Eigenbeteiligung

A

MAPPING OF MAGNETIC NANOPARTICLES AND CELLS USING THINFILM MAGNETOELECTRIC SENSORS BASED ON THE DELTA-E EFFECT In dem Manuscript [1] wird das "Magnetic Susceptibility Particle Mapping" Setup vorgestellt. Es werden das Arbeitsprinzip für die zweidimensionale Detektion beschrieben und die optimalen Arbeitsparameter ermittelt. Zudem werden die Eigenschaften des Setups bestimmt und die Machbarkeit einer Zellmessung vorgestellt. Der Einfluss von Wasser auf das gemessene Signal wird im ergänzenden Teil des Manuskriftes betrachtet.

MAGNETIC PARTICLE MAPPING USING MAGNETOELECTRIC SENSORS AS AN IMAGING MODALITY In dem Manuscript [17] wird das "Magnetic Particle Mapping" Setup vorgestellt, mit dem die Verteilung von magnetischen Nanopartikeln bestimmt werden kann. Um die Partikel zu detektieren, werden sie in einem monofrequenten AC-Magnetfeld magnetisiert und das Signal bei der doppelten Anregungsfrequenz gemessen, das durch Nichtlinearitäten entsteht. Des Weiteren wird nachgewiesen, dass Zellmessungen mit diesem Setup möglich sind.

TRANSIENT SUPERDIFFUSION OF POLYDISPERSE VACUOLES IN HIGHLY MOTILE AMOEBOID CELLS In dem Manuscript [3] werden die Eigenschaften der Bewegung von Vakuolen im Cytoplasma von *Acanthamoeba castellanii* untersucht. Dabei werden mehrere statistische Werte im Zellsystem bestimmt, wie die zeitlich gemittelte, mittlere quadratische Verschiebung und der generalisierte Diffusionskoeffizient.

SPECTRAL CONTENT OF A SINGLE NON-BROWNIAN TRAJEKTORY In dem Manuscript [2] werden die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Daten mit Hilfe eines neuen und robusten Verfahrens charakterisiert. Dieses Verfahren eignet sich insbesondere zur Charakterisierung von experimentellen Beobachtungen, die aufgrund der experimentellen Begebenheiten nicht beliebig lang sein können.

MIGRATION OF MICROPARTICLE-CONTAINING AMOEBA THROUGH CONSTRICTED ENVIRONMENTS In dem Manuscript [82] wird die Bewegung von *Acanthamoeba castellanii* auf strukturierten Oberflächen untersucht. Die strukturierte Oberfläche besteht aus hexagonal angeordneten Säulen aus PDMS. In den Zellen befinden sich Mikropartikel und es wird untersucht, wie die Bewegung durch die Mikropartikel und durch die strukturierte Oberfläche beeinflusst wird.

B

Danksagung

Frau Prof. Dr. Christine Selhuber-Unkel danke ich herzlich für die Möglichkeit, diese Arbeit in Ihrer Gruppe als Teil des SFB1261 anfertigen zu dürfen; rückblickend insbesondere für die Möglichkeit, der freien Entfaltungsmöglichkeit, wodurch ich einige Fähigkeiten in meinen Interessensbereichen deutlich ausbauen konnte. Genauso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Eckhard Quandt für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Ich danke den Kollegen des Sonderforschungsbereichs 1261 für die interdisziplinäre Zusammenarbeit, ohne die diese Arbeit in der Form nicht möglich gewesen wäre. Dies gilt insbesondere meinem Projekt-Kollegen Ron-Marco Friedrich, mit dem ich stets aufschlussreiche Gespräche zur Rekonstruktion führen konnte. Auch möchte ich mich herzlich bei Dr. Enno Lage und Benjamin Spetzler für die anregenden Diskussionen über Magnetfeldsensoren bedanken. Für ein offenes Ohr zu Themen der Signalverarbeitung möchte ich mich herzlich bei Christin Bald, Dr. Phillip Durdaut und Eric Elzenheimer bedanken. Des Weiteren danke ich ganz herzlich den Kollegen aus der Arbeitsgruppe Biokompatible Nanomaterialien. Hier sind insbesondere Christine Arndt, Sandra Sindt, Dr. Michael Timmermann, Tobias Spratte und Dr. Shane Scott zu nennen. Bei Maria de los Angeles De la Cruz Garcia und Octavio Gonzalez Petlacalco möchte ich mich herzlich für ihre Unterstützung während ihres Praktikums im SFB1261 bedanken. Auch danke ich Manuela Lieb und Angelika Duttmann für ihre Hilfe im Labor sowie Ellen Riemer und Dr. Tina Kerby für ihre Hilfe bei organisatorischen Angelegenheiten.

Ebenso möchte ich mich bei dem Team der Werkstatt um Berndt Neumann und Matthias Burmeister für die schnelle und kompetente Umsetzung meiner experimentellen Aufbauten bedanken.

Weiterer Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung. Abschließend möchte ich mich bei meiner Frau Marie für den langjährigen, guten Zuspruch während meines Studiums und während meiner Promotion bedanken.

Literaturverzeichnis

Quellen in der Reihenfolge, in der sie in dieser Arbeit auftreten:

- [1] Nils Lukat u. a. »Mapping of magnetic nanoparticles and cells using thin film magnetoelectric sensors based on the delta-E effect«. In: *Sensors and Actuators, A: Physical* 309 (2020). doi: [10.1016/j.sna.2020.112023](https://doi.org/10.1016/j.sna.2020.112023) (siehe S. ix, 12, 27, 46, 93).
- [2] Diego Krapf u. a. »Spectral Content of a Single Non-Brownian Trajectory«. In: *Physical Review X* 9.1 (2019), S. 11019. doi: [10.1103/PhysRevX.9.011019](https://doi.org/10.1103/PhysRevX.9.011019) (siehe S. x, 55, 67, 85, 93).
- [3] Samudrajit Thapa u. a. »Transient superdiffusion of polydisperse vacuoles in highly motile amoeboid cells«. In: *Journal of Chemical Physics* 150.14 (2019), S. 22–28. doi: [10.1063/1.5086269](https://doi.org/10.1063/1.5086269) (siehe S. x, 55, 67–70, 85, 93).
- [4] Thomas Billiet u. a. »A review of trends and limitations in hydrogel-rapid prototyping for tissue engineering«. In: *Biomaterials* 33.26 (2012), S. 6020–6041. doi: [10.1016/j.biomaterials.2012.04.050](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.050) (siehe S. 3).
- [5] OPTN. *Organ Procurement and Transplantation Network*. URL: <https://optn.transplant.hrsa.gov/> (besucht am 07.09.2020) (siehe S. 3).
- [6] Soroosh Derakhshanfar u. a. »3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances«. In: *Bioactive Materials* 3.2 (2018), S. 144–156. doi: [10.1016/j.bioactmat.2017.11.008](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008) (siehe S. 3).
- [7] Brahatheeswaran Dhandayuthapani u. a. »Polymeric scaffolds in tissue engineering application: A review«. In: *International Journal of Polymer Science* 2011.ii (2011). doi: [10.1155/2011/290602](https://doi.org/10.1155/2011/290602) (siehe S. 3).
- [8] Sören B. Gutekunst u. a. »3D Hydrogels Containing Interconnected Microchannels of Subcellular Size for Capturing Human Pathogenic Acanthamoeba Castellani«. In: *ACS Biomaterials Science and Engineering* 5.4 (2019), S. 1784–1792. doi: [10.1021/acsbiomaterials.8b01009](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01009) (siehe S. 3, 54, 87, 88).
- [9] Manfred Johannsen u. a. »Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution«. In: *European Urology* 52.6 (2007), S. 1653–1662. doi: [10.1016/j.eururo.2006.11.023](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.11.023) (siehe S. 4).
- [10] Dongwon Yoo u. a. »Theranostic magnetic nanoparticles«. In: *Accounts of Chemical Research* 44.10 (2011), S. 863–874. doi: [10.1021/ar200085c](https://doi.org/10.1021/ar200085c) (siehe S. 4, 21).
- [11] Bernhard Gleich und Jürgen Weizenecker. »Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles.« In: *Nature* 435.7046 (2005), S. 1214–7. doi: [10.1038/nature03808](https://doi.org/10.1038/nature03808) (siehe S. 4, 17, 48).
- [12] J. Weizenecker u. a. »Three-dimensional real-time *in vivo* magnetic particle imaging«. In: *Physics in Medicine and Biology* 54.5 (2009), S. 1–10. doi: [10.1088/0031-9155/54/5/L01](https://doi.org/10.1088/0031-9155/54/5/L01) (siehe S. 4).
- [13] A. P. Khandhar u. a. »Evaluation of PEG-coated iron oxide nanoparticles as blood pool tracers for preclinical magnetic particle imaging«. In: *Nanoscale* 9.3 (2017), S. 1299–1306. doi: [10.1039/c6nr08468k](https://doi.org/10.1039/c6nr08468k) (siehe S. 4).
- [14] Franz Wegner u. a. »Magnetic Particle Imaging: Artifact-Free Metallic Stent Lumen Imaging in a Phantom Study«. In: *CardioVascular and Interventional Radiology* 43.2 (2020), S. 331–338. doi: [10.1007/s00270-019-02347-x](https://doi.org/10.1007/s00270-019-02347-x) (siehe S. 4).
- [15] Elaine Y. Yu u. a. »Magnetic Particle Imaging: A Novel *in vivo* Imaging Platform for Cancer Detection«. In: *Physiology & behavior* 176.3 (2019), S. 139–148. doi: [10.1016/j.physbeh.2017.03.040](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040) (siehe S. 4).

- [16] J. W. M. Bulte u. a. »Quantitative "Hot Spot" Imaging of Transplanted Stem Cells using Superparamagnetic Tracers and Magnetic Particle Imaging (MPI)«. In: *Tomography* 1.2 (2015), S. 91–97. doi: [10.18383/j.tom.2015.00172](https://doi.org/10.18383/j.tom.2015.00172) (siehe S. 4).
- [17] Ron Marco Friedrich u. a. »Magnetic particle mapping using magnetoelectric sensors as an imaging modality«. In: *Scientific Reports* 9.1 (2019), S. 1–11. doi: [10.1038/s41598-018-38451-0](https://doi.org/10.1038/s41598-018-38451-0) (siehe S. 5, 8, 17, 47, 48, 93).
- [18] F. Ludwig u. a. »Magnetorelaxometry of magnetic nanoparticles in magnetically unshielded environment utilizing a differential fluxgate arrangement«. In: *Review of Scientific Instruments* 76.10 (2005), S. 1–3. doi: [10.1063/1.2069776](https://doi.org/10.1063/1.2069776) (siehe S. 5).
- [19] Robert J. Deissler, Yong Wu und Michael A. Martens. »Dependence of Brownian and Néel relaxation times on magnetic field strength«. In: *Medical Physics* 41.1 (2014). doi: [10.1118/1.4837216](https://doi.org/10.1118/1.4837216) (siehe S. 5).
- [20] M. Liebl u. a. »Quantitative imaging of magnetic nanoparticles by magnetorelaxometry with multiple excitation coils«. In: *Physics in Medicine and Biology* 59.21 (2014), S. 6607–6620. doi: [10.1088/0031-9155/59/21/6607](https://doi.org/10.1088/0031-9155/59/21/6607) (siehe S. 5, 17).
- [21] Nicola A. Spaldin und Manfred Fiebig. »The Renaissance of Magnetoelectric Multiferroics«. In: *Science* 309.July (2005), S. 391–392. doi: [10.1126/science.1113357](https://doi.org/10.1126/science.1113357) (siehe S. 7).
- [22] Kiyotake Mori und Manfred Wuttig. »Magnetoelectric coupling in Terfenol-D/polyvinylidenedifluoride composites«. In: *Applied Physics Letters* 81.1 (2002), S. 100–101. doi: [10.1063/1.1491006](https://doi.org/10.1063/1.1491006) (siehe S. 7).
- [23] Shuxiang Dong, Jie Fang Li und D. Viehland. »Ultrahigh magnetic field sensitivity in laminates of TERFENOL-D and Pb(Mg_{1/3}Nb_{2/3})O₃-PbTiO₃ crystals«. In: *Applied Physics Letters* 83.11 (2003), S. 2265–2267. doi: [10.1063/1.1611276](https://doi.org/10.1063/1.1611276) (siehe S. 7).
- [24] Phillip Durdaut u. a. »Modeling and Analysis of Noise Sources for Thin-Film Magnetoelectric Sensors Based on the Delta-E Effect«. In: *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* 66.10 (2017), S. 2771–2779. doi: [10.1109/TIM.2017.2709478](https://doi.org/10.1109/TIM.2017.2709478) (siehe S. 8, 29).
- [25] William T. Thomson und Marie Dillon Dahleh. *Theory of Vibration with Applications*. 5th Editio. Pearson, 1997 (siehe S. 8).
- [26] Zhan Shi u. a. »Magnetoelectric resonance behavior of simple bilayered Pb(Zr,Ti)O₃-(Tb,Dy)Fe₂/epoxy composites«. In: *Journal of Applied Physics* 101.4 (2007). doi: [10.1063/1.2653524](https://doi.org/10.1063/1.2653524) (siehe S. 8).
- [27] Zengping Xing, Jiefang Li und Dwight Viehland. »Modeling and the signal-to-noise ratio research of magnetoelectric sensors at low frequency«. In: *Applied Physics Letters* 91.14 (2007), S. 1–4. doi: [10.1063/1.2794435](https://doi.org/10.1063/1.2794435) (siehe S. 8).
- [28] Robert Jahns u. a. »Sensitivity enhancement of magnetoelectric sensors through frequency-conversion«. In: *Sensors and Actuators, A: Physical* 183 (2012), S. 16–21. doi: [10.1016/j.sna.2012.05.049](https://doi.org/10.1016/j.sna.2012.05.049) (siehe S. 8).
- [29] B. Gojda u. a. »Fully integrable magnetic field sensor based on delta-E effect«. In: *Applied Physics Letters* 99.22 (2011), S. 1–4. doi: [10.1063/1.3664135](https://doi.org/10.1063/1.3664135) (siehe S. 8).
- [30] Jens Reermann u. a. »Adaptive Readout Schemes for Thin-Film Magnetoelectric Sensors Based on the delta-E Effect«. In: *IEEE Sensors Journal* 16.12 (2016), S. 4891–4900. doi: [10.1109/JSEN.2016.2553962](https://doi.org/10.1109/JSEN.2016.2553962) (siehe S. 9, 15).
- [31] Wikipedia. *Piezoelektrizität — Wikipedia, Die freie Enzyklopädie*. 2020. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Piezoelektrizit%C3%A4t&oldid=202592734> (besucht am 18.08.2020) (siehe S. 10).
- [32] Wikipedia. *Magnetostriktion — Wikipedia, Die freie Enzyklopädie*. 2019. URL: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Magnetostriktion&oldid=190799677> (besucht am 15.08.2020) (siehe S. 11).
- [33] Benjamin Spetzler u. a. »Frequency Dependency of the Delta-E Effect and the Sensitivity of Delta-E Effect Magnetic Field Sensors«. In: *Sensors* 19 (2019), S. 4769. doi: [10.3390/s19214769](https://doi.org/10.3390/s19214769) (siehe S. 11, 12).
- [34] E. W. Lee. »Magnetostriction and magnetomechanical effects«. In: *Reports on Progress in Physics* 18.1 (1955), S. 184–229. doi: [10.1088/0034-4885/18/1/305](https://doi.org/10.1088/0034-4885/18/1/305) (siehe S. 11).

- [35] R Becker und W Döring. *Ferromagnetismus*. Berlin: Julius Springer, 1939 (siehe S. 11).
- [36] A. Clark und K. Hathaway. »Physics of Giant Magnetostriction«. In: *Handbook of Giant Magnetostrictive Materials*. 1999, S. 1–125 (siehe S. 12).
- [37] Benjamin Spetzler u. a. »Magnetic Sensitivity of Bending-Mode Delta-E-Effect Sensors«. In: *Phys. Rev. Applied* 12.6 (2019), S. 064036. doi: [10.1103/PhysRevApplied.12.064036](https://doi.org/10.1103/PhysRevApplied.12.064036) (siehe S. 12).
- [38] Ralf Hoppe. *Der Quadraturmodulator*. 2015. url: <http://www.dfcgen.de/wpapers/qmod/qmodsu9.html#x37-250005.4> (besucht am 15.05.2020) (siehe S. 14).
- [39] Wikipedia. Übertragungsfunktion — Wikipedia, Die freie Enzyklopädie. 2020. url: <https://de.wikipedia.org/w/index.php?title=%C3%9Cbertragungsfunktion&oldid=196960517> (besucht am 23.08.2020) (siehe S. 15).
- [40] Zhi Wei Tay u. a. »Magnetic Particle Imaging-Guided Heating in Vivo Using Gradient Fields for Arbitrary Localization of Magnetic Hyperthermia Therapy«. In: *ACS Nano* 12.4 (2018), S. 3699–3713. doi: [10.1021/acsnano.8b00893](https://doi.org/10.1021/acsnano.8b00893) (siehe S. 17).
- [41] Mihaela Osaci und Matteo Cacciola. »Influence of the magnetic nanoparticle coating on the magnetic relaxation time«. In: *Beilstein Journal of Nanotechnology* 11 (2020), S. 1207–1216. doi: [10.3762/bjnano.11.105](https://doi.org/10.3762/bjnano.11.105) (siehe S. 17).
- [42] Renata Madru u. a. »^{99m}Tc-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles for multimodality SPECT/MRI of sentinel lymph nodes«. In: *Journal of Nuclear Medicine* 53.3 (2012), S. 459–463. doi: [10.2967/jnumed.111.092437](https://doi.org/10.2967/jnumed.111.092437) (siehe S. 17).
- [43] A. Cousins u. a. »Novel handheld magnetometer probe based on magnetic tunnelling junction sensors for intraoperative sentinel lymph node identification«. In: *Scientific Reports* 5.June (2015), S. 1–10. doi: [10.1038/srep10842](https://doi.org/10.1038/srep10842) (siehe S. 17).
- [44] Masaki Sekino u. a. »Handheld magnetic probe with permanent magnet and Hall sensor for identifying sentinel lymph nodes in breast cancer patients«. In: *Scientific Reports* 8.1 (2018), S. 1–9. doi: [10.1038/s41598-018-19480-1](https://doi.org/10.1038/s41598-018-19480-1) (siehe S. 17, 47).
- [45] K. Enpuku u. a. »Ac susceptibility measurement of magnetic markers in suspension for liquid phase immunoassay«. In: *Journal of Applied Physics* 108.3 (2010). doi: [10.1063/1.3457233](https://doi.org/10.1063/1.3457233) (siehe S. 18).
- [46] Wolfram C. Poller u. a. »Magnetic particle spectroscopy reveals dynamic changes in the magnetic behavior of very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles during cellular uptake and enables determination of cell-labeling efficacy«. In: *Journal of Biomedical Nanotechnology* 12.2 (2016), S. 337–346. doi: [10.1166/jbn.2016.2204](https://doi.org/10.1166/jbn.2016.2204) (siehe S. 18, 20, 23).
- [47] Stefan Miltenyi u. a. »High gradient magnetic cell separation with MACS«. In: *Cytometry* 11.2 (1990), S. 231–238. doi: [10.1002/cyto.990110203](https://doi.org/10.1002/cyto.990110203) (siehe S. 18).
- [48] Nicole Pamme und Claire Wilhelm. »Continuous sorting of magnetic cells via on-chip free-flow magnetophoresis«. In: *Lab on a Chip* 6.8 (2006), S. 974–980. doi: [10.1039/b604542a](https://doi.org/10.1039/b604542a) (siehe S. 18).
- [49] Damien Robert u. a. »Cell sorting by endocytotic capacity in a microfluidic magnetophoresis device«. In: *Lab on a Chip* 11.11 (2011), S. 1902–1910. doi: [10.1039/COLC00656D](https://doi.org/10.1039/COLC00656D) (siehe S. 18, 20, 23).
- [50] Cornelia Monzel u. a. »Magnetic control of cellular processes using biofunctional nanoparticles«. In: *Chemical Science* 8.11 (2017), S. 7330–7338. doi: [10.1039/C7SC01462G](https://doi.org/10.1039/C7SC01462G) (siehe S. 18).
- [51] Céline Hoffmann u. a. »Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles«. In: *Nature Nanotechnology* 8.3 (2013), S. 199–205. doi: [10.1038/nnano.2012.246](https://doi.org/10.1038/nnano.2012.246) (siehe S. 18, 86).
- [52] Simon Foner. »Vibrating Sample Magnetometer«. In: *Review of Scientific Instruments* 27.2 (1956), S. 207–208. doi: [10.1063/1.1715636](https://doi.org/10.1063/1.1715636) (siehe S. 19).
- [53] Anouchka Plan Sangnier u. a. »Impact of magnetic nanoparticle surface coating on their long-term intracellular biodegradation in stem cells«. In: *Nanoscale* 11.35 (2019), S. 16488–16498. doi: [10.1039/c9nr05624f](https://doi.org/10.1039/c9nr05624f) (siehe S. 20, 23).

- [54] Julie A. Champion und Samir Mitragotri. »Role of target geometry in phagocytosis«. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.13 (2006), S. 4930–4934. doi: [10.1073/pnas.0600997103](https://doi.org/10.1073/pnas.0600997103) (siehe S. 20).
- [55] Belén Díaz u. a. »Assessing methods for blood cell cytotoxic responses to inorganic nanoparticles and nanoparticle aggregates«. In: *Small* 4.11 (2008), S. 2025–2034. doi: [10.1002/smll.200800199](https://doi.org/10.1002/smll.200800199) (siehe S. 20).
- [56] Minghan Hu u. a. »Shaping the Assembly of Superparamagnetic Nanoparticles«. In: *ACS Nano* 13.3 (2019), S. 3015–3022. doi: [10.1021/acsnano.8b07783](https://doi.org/10.1021/acsnano.8b07783) (siehe S. 20).
- [57] Yi-Xiang J Wang. »Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application.« In: *Quantitative imaging in medicine and surgery* 1.1 (Dez. 2011), S. 35–40. doi: [10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03](https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4292.2011.08.03) (siehe S. 20).
- [58] José M. Rojas u. a. »Superparamagnetic iron oxide nanoparticle uptake alters M2 macrophage phenotype, iron metabolism, migration and invasion«. In: *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 12.4 (2016), S. 1127–1138. doi: [10.1016/j.nano.2015.11.020](https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.11.020) (siehe S. 20).
- [59] Eric T. Ahrens und Jeff W.M. Bulte. »Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging«. In: *Nature Reviews Immunology* 13.10 (2013), S. 755–763. doi: [10.1038/nri3531](https://doi.org/10.1038/nri3531) (siehe S. 20).
- [60] Alexandre Chicharo u. a. »Enhanced magnetic microcytometer with 3D flow focusing for cell enumeration«. In: *Lab on a Chip* 18.17 (2018), S. 2593–2603. doi: [10.1039/c8lc00486b](https://doi.org/10.1039/c8lc00486b) (siehe S. 21).
- [61] Stefaan J.H. Soenen und Marcel De Cuyper. »Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: An overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes«. In: *Contrast Media and Molecular Imaging* 4.5 (2009), S. 207–219. doi: [10.1002/cmmi.282](https://doi.org/10.1002/cmmi.282) (siehe S. 21).
- [62] Lars Matuszewski u. a. »Cell tagging with clinically approved iron oxides: feasibility and effect of lipofection, particle size, and surface coating on labeling efficiency.« In: *Radiology* 235.1 (2005), S. 155–161. doi: [10.1148/radiol.2351040094](https://doi.org/10.1148/radiol.2351040094) (siehe S. 21).
- [63] Greta Jarockyte u. a. »Accumulation and toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cells and experimental animals«. In: *International Journal of Molecular Sciences* 17.8 (2016). doi: [10.3390/ijms17081193](https://doi.org/10.3390/ijms17081193) (siehe S. 21).
- [64] Zhigang Wang und Alfred Cuschieri. »Tumour cell labelling by magnetic nanoparticles with determination of intracellular iron content and spatial distribution of the intracellular iron«. In: *International Journal of Molecular Sciences* 14.5 (2013), S. 9111–9125. doi: [10.3390/ijms14059111](https://doi.org/10.3390/ijms14059111) (siehe S. 21).
- [65] C. Wilhelm u. a. »Interaction of anionic superparamagnetic nanoparticles with cells: Kinetic analyses of membrane adsorption and subsequent internalization«. In: *Langmuir* 18.21 (2002), S. 8148–8155. doi: [10.1021/la0257337](https://doi.org/10.1021/la0257337) (siehe S. 21).
- [66] Michael Ortner und Lucas Gabriel Coliado Bandeira. »Magpylib: A free Python package for magnetic field computation«. In: *SoftwareX* 11 (2020), S. 100466. doi: [10.1016/j.softx.2020.100466](https://doi.org/10.1016/j.softx.2020.100466) (siehe S. 22).
- [67] J. K. Venard und R. L. Street. *Elementary Fluid Mechanics*. 5th. New York: Wiley, 1975 (siehe S. 22).
- [68] Michal Marcus u. a. »Iron oxide nanoparticles for neuronal cell applications: uptake study and magnetic manipulations«. In: *Journal of Nanobiotechnology* 14.1 (2016), S. 37. doi: [10.1186/s12951-016-0190-0](https://doi.org/10.1186/s12951-016-0190-0) (siehe S. 24).
- [69] Tammy L. Kalber u. a. »Hyperthermia treatment of tumors by mesenchymal stem cell-delivered superparamagnetic iron oxide nanoparticles«. In: *International Journal of Nanomedicine* 11 (2016), S. 1973–1983. doi: [10.2147/IJN.S94255](https://doi.org/10.2147/IJN.S94255) (siehe S. 24).
- [70] S. Zabel u. a. »Phase modulated magnetoelectric delta-E effect sensor for sub-nano tesla magnetic fields«. In: *Applied Physics Letters* 107.15 (2015). doi: [10.1063/1.4932575](https://doi.org/10.1063/1.4932575) (siehe S. 28).
- [71] PI. *PILine Ultraschall-Piezomotoren*. URL: <https://www.physikinstrumente.de/de/technologie/piezoelektrische-antriebe/piline-ultraschall-piezomotoren/> (besucht am 23.06.2020) (siehe S. 31).

- [72] Yong He u. a. »Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting«. In: *Scientific Reports* 6 (2016), S. 1–13. doi: [10.1038/srep29977](https://doi.org/10.1038/srep29977) (siehe S. 34).
- [73] Per Christian Hansen. »3. Getting to Business: Discretizations of Linear Inverse Problems«. In: *Discrete Inverse Problems*. Society for Industrial und Applied Mathematics, Jan. 2010, S. 23–51. doi: [10.1137/1.9780898718836.ch3](https://doi.org/10.1137/1.9780898718836.ch3) (siehe S. 38–40, 46).
- [74] Daniel Pyrathon. *Daniel Pyrathon - A practical guide to Singular Value Decomposition in Python*. 2018. url: https://www.youtube.com/watch?v=d7iIb_XVKZs (besucht am 19.08.2020) (siehe S. 39).
- [75] Henry Greve u. a. »Giant magnetoelectric coefficients in $(\text{Fe}_{90}\text{Co}_{10})_{78}\text{Si}_{12}\text{B}_{10}$ -AlN thin film composites«. In: *Applied Physics Letters* 96.182501 (2010). doi: [10.1063/1.3377908](https://doi.org/10.1063/1.3377908) (siehe S. 43).
- [76] Valeria Paoletti u. a. »A computationally efficient tool for assessing the depth resolution in large-scale potential-field inversion«. In: *Geophysics* 79.4 (2014), A33–A38. doi: [10.1190/GE02014-0017.1](https://doi.org/10.1190/GE02014-0017.1) (siehe S. 43).
- [77] Hao Xi u. a. »A Room Temperature Ultrasensitive Magnetoelectric Susceptometer for Quantitative Tissue Iron Detection«. In: *Scientific Reports* 6.July (2016), S. 1–7. doi: [10.1038/srep29740](https://doi.org/10.1038/srep29740) (siehe S. 47).
- [78] D. T. Huong Giang u. a. »Distance magnetic nanoparticle detection using a magnetoelectric sensor for clinical interventions«. In: *Review of Scientific Instruments* 88.1 (2017), S. 1–7. doi: [10.1063/1.4973729](https://doi.org/10.1063/1.4973729) (siehe S. 47).
- [79] Jolene Chang Rudell u. a. »Acanthamoeba migration in an electric field«. In: *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 54.6 (2013), S. 4225–4233. doi: [10.1167/iovs.13-11968](https://doi.org/10.1167/iovs.13-11968) (siehe S. 53, 69).
- [80] Delphine Arcizet u. a. »Contact-controlled amoeboid motility induces dynamic cell trapping in 3D-microstructured surfaces«. In: *Soft Matter* 8.5 (2012), S. 1473–1481. doi: [10.1039/c1sm05615h](https://doi.org/10.1039/c1sm05615h) (siehe S. 53, 87).
- [81] Kwang Hoon Song u. a. »Sinusoidal wavy surfaces for curvature-guided migration of Tlymphocytes«. In: *Biomaterials* 51 (2015), S. 151–160. doi: [10.1016/j.biomaterials.2015.01.071](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.071) (siehe S. 54).
- [82] Michael Timmermann u. a. »Migration of Microparticle-Containing Amoeba through Constricted Environments«. In: *ACS Biomaterials Science and Engineering* 6.2 (2020), S. 889–897. doi: [10.1021/acsbiomaterials.9b00496](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00496) (siehe S. 54, 79, 82, 93).
- [83] Damien Faivre und Dirk Schüler. »Magnetotactic bacteria and magnetosomes«. In: *Chemical Reviews* 108.11 (2008), S. 4875–4898. doi: [10.1021/cr078258w](https://doi.org/10.1021/cr078258w) (siehe S. 54).
- [84] C. Wilhelm, C. Rivière und N. Biais. »Magnetic control of Dictyostelium aggregation«. In: *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* 75.4 (2007), S. 1–6. doi: [10.1103/PhysRevE.75.041906](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.75.041906) (siehe S. 54, 88).
- [85] Yoshio Fukui u. a. »How well can an amoeba climb?« In: *Collected Works of Shinya Inoue: Microscopes, Living Cells, and Dynamic Molecules* (2008), S. 819–824. doi: [10.1142/9789812790866_0064](https://doi.org/10.1142/9789812790866_0064) (siehe S. 55).
- [86] Irina Kaverina und Anne Straube. »Regulation of cell migration by dynamic microtubules«. In: *Seminars in Cell and Developmental Biology* 22.9 (2011), S. 968–974. doi: [10.1016/j.semcdb.2011.09.017](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.09.017) (siehe S. 55, 89).
- [87] Matthias Michalek u. a. »Structure and function of a unique pore-forming protein from a pathogenic acanthamoeba«. In: *Nature Chemical Biology* 9.1 (2013), S. 37–42. doi: [10.1038/nchembio.1116](https://doi.org/10.1038/nchembio.1116) (siehe S. 55).
- [88] Julia F. Reverey u. a. »Superdiffusion dominates intracellular particle motion in the supercrowded cytoplasm of pathogenic Acanthamoeba castellanii«. In: *Scientific Reports* 5.February (2015), S. 1–14. doi: [10.1038/srep11690](https://doi.org/10.1038/srep11690) (siehe S. 55, 67, 74, 85).
- [89] Elena F. Koslover, Caleb K. Chan und Julie A. Theriot. »Cytoplasmic Flow and Mixing Due to Deformation of Motile Cells«. In: *Biophysical Journal* 113.9 (2017), S. 2077–2087. doi: [10.1016/j.bpj.2017.09.009](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.009) (siehe S. 55, 56, 85, 87).

- [90] Doris Heinrich und Erich Sackmann. »Active mechanical stabilization of the viscoplastic intracellular space of Dictyostelia cells by microtubule-actin crosstalk«. In: *Acta Biomaterialia* 2.6 (2006), S. 619–631. doi: [10.1016/j.actbio.2006.05.014](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2006.05.014) (siehe S. 55, 86, 89).
- [91] Edith Gouin, Matthew D. Welch und Pascale Cossart. »Actin-based motility of intracellular pathogens«. In: *Current Opinion in Microbiology* 8.1 (2005), S. 35–45. doi: [10.1016/j.mib.2004.12.013](https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.12.013) (siehe S. 57).
- [92] E. Tjhung u. a. »A minimal physical model captures the shapes of crawling cells«. In: *Nature Communications* 6 (2015), S. 1–9. doi: [10.1038/ncomms6420](https://doi.org/10.1038/ncomms6420) (siehe S. 57).
- [93] Kinneret Keren. »Cell motility: The integrating role of the plasma membrane«. In: *European Biophysics Journal* 40.9 (2011), S. 1013–1027. doi: [10.1007/s00249-011-0741-0](https://doi.org/10.1007/s00249-011-0741-0) (siehe S. 58).
- [94] Peter Friedl. »Prespecification and plasticity: Shifting mechanisms of cell migration«. In: *Current Opinion in Cell Biology* 16.1 (2004), S. 14–23. doi: [10.1016/j.ceb.2003.11.001](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.11.001) (siehe S. 58).
- [95] Ronald D. Vale und Ronald A. Milligan. »The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins«. In: *Science* 288.5463 (2000), S. 88. doi: [10.1126/science.288.5463.88](https://doi.org/10.1126/science.288.5463.88) (siehe S. 58).
- [96] Florian Berger u. a. »Co-operative transport by molecular motors«. In: *Biochemical Society Transactions* 39.5 (2011), S. 1211–1215. doi: [10.1042/BST0391211](https://doi.org/10.1042/BST0391211) (siehe S. 58).
- [97] Jan Willem Van De Meent u. a. »Measurement of cytoplasmic streaming in single plant cells by magnetic resonance velocimetry«. In: *Journal of Fluid Mechanics* 642.figure 1 (2010), S. 5–14. doi: [10.1017/S0022112009992187](https://doi.org/10.1017/S0022112009992187) (siehe S. 58).
- [98] Pei Ju Chiang u. a. »Automated Bright Field Segmentation of Cells and Vacuoles Using Image Processing Technique«. In: *Cytometry Part A* 93.10 (2018), S. 1004–1018. doi: [10.1002/cyto.a.23595](https://doi.org/10.1002/cyto.a.23595) (siehe S. 59).
- [99] Carsten Wolff u. a. »Multi-view light-sheet imaging and tracking with the MaMuT software reveals the cell lineage of a direct developing arthropod limb«. In: *eLife* 7 (2018), S. 1–31. doi: [10.7554/eLife.34410](https://doi.org/10.7554/eLife.34410) (siehe S. 59, 66).
- [100] John Canny. »A Computational Approach to Edge Detection«. In: *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence PAMI-8.6* (1986), S. 679–698. doi: [10.1109/TPAMI.1986.4767851](https://doi.org/10.1109/TPAMI.1986.4767851) (siehe S. 61).
- [101] H. K. Yuen u. a. »A Comparative Study of Hough Transform Methods for Circle Finding«. In: *Image and Vision Computing* 8.1 (1990), S. 71–77. doi: [https://doi.org/10.1016/0262-8856\(90\)90059-E](https://doi.org/10.1016/0262-8856(90)90059-E) (siehe S. 63).
- [102] MathWorks. *imfindcircles*. URL: <https://de.mathworks.com/help/images/ref/imfindcircles.html> (besucht am 24.08.2020) (siehe S. 64).
- [103] Patrick Witzel u. a. »Heterogeneities Shape Passive Intracellular Transport«. In: *Biophysical Journal* 117.2 (2019), S. 203–213. doi: [10.1016/j.bpj.2019.06.009](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.06.009) (siehe S. 74).
- [104] Miloslava Maninová u. a. »The reorientation of cell nucleus promotes the establishment of front-rear polarity in migrating fibroblasts«. In: *Journal of Molecular Biology* 425.11 (2013), S. 2039–2055. doi: [10.1016/j.jmb.2013.02.034](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.02.034) (siehe S. 74, 85).
- [105] Raffaele Di Giacomo u. a. »Deployable micro-traps to sequester motile bacteria«. In: *Scientific Reports* 7 (2017), S. 1–8. doi: [10.1038/srep45897](https://doi.org/10.1038/srep45897) (siehe S. 88).
- [106] Goher Mahmud u. a. »Directing cell motions on micropatterned ratchets«. In: *Nature Physics* 5.8 (2009), S. 606–612. doi: [10.1038/nphys1306](https://doi.org/10.1038/nphys1306) (siehe S. 88).
- [107] W. Feneberg, M. Westphal und E. Sackmann. »Dictyostelium cells' cytoplasm as an active viscoplastic body«. In: *European Biophysics Journal* 30.4 (2001), S. 284–294. doi: [10.1007/s002490100135](https://doi.org/10.1007/s002490100135) (siehe S. 89).