

**Dehnungsinduzierte Mechanosensitivität in  
Abhängigkeit der RhoA-induzierten  
Zellkontraktilität und BAG3-vermittelter Autophagie**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Lukas Lövenich**

aus Bergheim

Bonn

Mai 2022



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: PD Dr. Bernd Hoffmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höfeld

Tag der Promotion: 04.10.2022

Erscheinungsjahr: 2022



*Für meine Eltern*

*ohne die dieser Weg  
niemals möglich gewesen wäre.*



## Zusammenfassung

Die Zellen und Gewebe unseres Körpers sind ständig einer Vielzahl umweltbedingter mechanischer Reize ausgesetzt, an die sie sich anpassen müssen. Die zelluläre Wahrnehmung des mechanischen Reizes beruht auf mechanosensitiven Proteinen, welche mechanische Signale zumeist über Konformationsänderungen in eine chemische Signalkaskade überführen.

Das Schicksal der mechanosensitiven Proteine nach Krafteinwirkung ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Durch mechanische Beanspruchungen können Proteine irreversibel beschädigt werden und ihre Funktion verlieren. Diese Proteine müssen von der Zelle erkannt und entweder zurückgefaltet oder abgebaut werden, da eine Akkumulation nicht-funktionaler Proteine zur Funktionsstörung der Zelle führt. Ob auch der Abbau mechanosensitiver Proteine, ausgelöst durch mechanische Reize, in der Zellhomöostase eine Rolle spielt, ist bisher nur unvollständig untersucht.

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang von Mechanosensitivität und Autophagie-vermitteltem Abbau mechanosensitiver Proteine analysiert. Dazu wurde der physiologische, mechanische Reiz der zyklischen Dehnung auf adhärente Zellen angewandt und die Adaptation der Zellen untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass eine uniaxiale, zyklische Dehnung die Formation von Autophagosomen in verschiedenen Zelltypen in einem zeitlichen Verlauf induziert. Die Autophagie korreliert mit der Aktin Reorientierung entgegen der Dehnungsrichtung und sinkt nach vollendeter Adaptation auf den mechanischen Reiz wieder ab.

Die Aktin Reorientierung wird durch die Blockierung des Abbaus der Autophagosomen verzögert. Sowohl die Induktion der Autophagie als auch die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts hängen zudem von der RhoA-induzierten Zellkontraktilität ab. Zusätzlich wird die Aktin Reorientierung durch das Co-Chaperon BAG3 vermittelt und legt eine Beteiligung der Chaperon-assistierten, selektiven Autophagie in der mechanosensitiven Adaptation der Zellen nahe.

Die Quantifizierung mechanosensitiver Proteine in Fokaladhäsionen und Adhärenzverbindungen konnte nach kurzer Dehnungsdauer die Fähigkeit der Proteine zur Adaptation auf den mechanischen Reiz ohne eine irreversible Beschädigung der funktionalen Struktur bestätigen.

Nach längerer Dehnung konnte jedoch ein Abbau der Proteine  $\alpha$ -Catenin,  $\alpha$ -Tubulin, Paxillin, LC3B-I und -II und HSC70 aufgezeigt werden. Der Abbau war durch die Blockierung des lysosomalen Abbauwegs der Autophagosomen für  $\alpha$ -Tubulin, Paxillin, LC3B-II und HSC70 nicht oder nur geringer nachweisbar.

Folglich wurde ein mechanisch induzierter Abbau des FA-Proteins Paxillin über die Autophagie nachgewiesen. Damit könnte der Mechanismus des Autophagie-vermittelten Abbaus von Paxillin, der bisher nur in Tumorzellen untersucht wurde, auf gesunde Zellen übertragen werden. Zusätzlich konnte der Abbau der Proteine bei einer kürzeren biaxialen, zyklischen Dehnung bestätigt und um die Proteine Filamin A und Vinculin ergänzt werden.

# Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG.....	VII
INHALTSVERZEICHNIS.....	IX
ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	XII
TABELLENVERZEICHNIS .....	XV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	XVI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1    Mechanosensitive Wahrnehmung von Zellen.....	1
1.2    Die Kontraktilität der Zelle .....	4
1.2.1    Die extrazelluläre Matrix (EZM).....	4
1.2.2    Das Aktin-Zytoskelett .....	5
1.2.3    Fokaladhäsionen (FAs).....	13
1.2.4    Adhärenzverbindungen (AJs).....	19
1.3    Proteinhomöostase (Proteostase) .....	21
1.3.1    Das Molekulare Chaperon-System .....	22
1.3.2    Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) .....	23
1.3.3    Autophagie .....	23
1.4    Ziel der Arbeit.....	29
2 MATERIAL UND METHODEN .....	33
2.1    Geräte.....	33
2.2    Verbrauchsmaterialien .....	34
2.3    Chemikalien und Reagenzien .....	36
2.4    Puffer und Lösungen.....	38
2.5    Verwendete Zelllinien.....	39
2.6    Antikörper und fluoreszierende Farbstoffe .....	41
2.7    Plasmide.....	42
2.8    Programme.....	42
2.9    Herstellung von Zellkultursubstraten.....	43
2.9.1    Herstellung von elastischem Polydimethylsiloxan (PDMS).....	43
2.9.2    Herstellung von elastischen Silikonkammern für Dehnungsexperimente .....	44
2.9.3    Herstellung von Glassubstraten .....	45
2.10    Zellkultur .....	46
2.10.1    Routinezellkultur .....	46
2.10.2    Kryokonservierung der Zellen.....	47
2.10.3    Aussähen von Zellen auf elastischen Silikonkammern .....	47
2.11    Verwendung von Medikamenten.....	48
2.11.1    Inhibition des Abbaus durch das Lysosom und das Proteasom .....	48

2.11.2	Aktivierung der RhoA- und Inhibition der ROCK-Signalkaskade.....	49
2.11.3	Inhibition der Proteinbiosynthese und des Transkriptionsfaktors YAP .....	49
2.12	Durchführung von uniaxialen Dehnungsexperimenten mit elastischen Substraten .....	50
2.13	Durchführung von biaxialen Dehnungsexperimenten mit elastischen Silikonkammern .....	52
2.14	Immunzytochemische Färbungen (IFs) zellulärer Proteine .....	53
2.15	Transfektion mit Lipofectamine 3000.....	55
2.16	Mikroskopie .....	55
2.16.1	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM 880) .....	55
2.16.2	Weitfeldfluoreszenzmikroskopie (Cell Observer).....	56
2.17	Proteinquantifizierungen mittels Western Blot Analyse .....	57
2.17.1	Proteinisolation und Denaturierung der Proteine .....	57
2.17.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
2.17.3	Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran .....	59
2.17.4	Enzymimmunologische Färbung der Proteine .....	60
2.18	Auswertungen .....	61
2.18.1	Analyse der Aktin Orientierung .....	61
2.18.2	Quantifizierung der LC3B-positiven APs .....	62
2.18.3	Quantifizierung der Western Blot Banden .....	62
2.18.4	Statistische Analysen .....	63
3	ERGEBNISSE .....	65
3.1	Die Aktin Reorientierung nach uniaxialer, zyklischer Dehnung ist abhängig vom lysosomalen Abbau der Autophagosomen.....	65
3.1.1	Autophagosomen sind hoch dynamisch und durch uniaxiale, zyklische Dehnung mechanisch induzierbar .....	65
3.1.2	Das Aktin-Zytoskelett und der Zellkörper zeigen einen Zelltyp-spezifischen, zeitlichen Verlauf in der Reorientierung nach uniaxialer, zyklischer Dehnung .....	71
3.1.3	Die Reorientierung des Zellkörpers und des Zytoskeletts ist abhängig vom lysosomalen Abbau der Autophagosomen.....	75
3.2	RhoA und ROCK induzieren die Zellkontraktilität und damit die dehnungsinduzierte Autophagie .....	84
3.2.1	RhoA Induktion in Fibroblasten verstärkt die Aktin Reorientierung und die dehnungsinduzierte Autophagie .....	84
3.2.2	ROCK Inhibition verhindert die Zellkörper Reorientierung und die dehnungsinduzierte Autophagie in glatten Muskelzellen .....	90
3.3	Die Proteinbiosynthese durch den Transkriptionsfaktor YAP verstärkt die Aktin Reorientierung in glatten Muskelzellen .....	95
3.3.1	Blockierte Proteinbiosynthese verzögert die Aktin Reorientierung .....	95
3.3.2	YAP Inhibition verlangsamt die Aktin Reorientierung .....	97
3.4	BAG3 vermittelt die Aktin Reorientierung.....	99
3.4.1	Nicht funktionales BAG3 verlangsamt die Aktin Reorientierung in glatten Muskelzellen .....	99

3.4.2	Verlangsamte Aktin Reorientierung in BAG3-KO Podozyten.....	101
3.5	Monozellschichten verhalten sich vergleichbar wie Einzelzellen .....	106
3.5.1	Dehnungsinduzierte Aktin Reorientierung und Autophagie sind übertragbar auf Monozellschichten .....	106
3.5.2	Die Aktin Reorientierung und Induktion von APs sind übertragbar auf Keratinozyten Monozellschichten .....	114
3.6	Abbau von mechanosensitiven Proteinen durch uniaxiale Dehnung bei aktiver Autophagie	118
3.6.1	Kein Abbau von mechanosensitiven Proteinen nach kurzer Dehnungsdauer.....	118
3.6.2	Abbau von mechanosensitiven Proteinen nach längerer Dehnung .....	120
3.7	Stabile mechanische Belastung durch biaxiale Dehnung bewirkt den Abbau mechanosensitiver Proteine .....	122
3.7.1	Keine Aktin Reorientierung nach biaxialer, zyklischer Dehnung .....	122
3.7.2	Induktion von APs durch biaxiale Dehnung.....	124
3.7.3	Abbau von mechanosensitiven Proteinen durch biaxiale Dehnung.....	125
4	DISKUSSION .....	129
4.1	Dehnungsinduzierte Autophagie und Aktin Reorientierung.....	129
4.2	Zellkontraktilität in dehnungsinduzierte Autophagie und Aktin Reorientierung.....	135
4.3	BAG3 in der mechanosensitiven Aktin Reorientierung.....	138
4.4	Dehnungsinduzierte Abbau von mechanosensitiven Proteinen in Fokaladhäsionen durch Autophagie.....	141
5	AUSBLICK .....	147
	LITERATURVERZEICHNIS .....	151
	PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE .....	163
	DANKSAGUNG.....	165

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Blutgefäßes.....	2
Abbildung 1.2: Mechanismen von mechanosensitiven Proteinen. ....	3
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der (De-) Polymerisation und Verzweigung des Aktin-Zytoskeletts.....	7
Abbildung 1.4: Die Kontraktion des Aktomyosins.....	8
Abbildung 1.5: Aktin-Stressfasern in Abhängigkeit der Substratelastizität und zyklischer Dehnung.....	10
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Fokaladhäsion (FA). ....	16
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung einer Adhärenzverbindung (AJ). ....	20
Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Rückfaltung und des Abbaus von fehlgefalteten Proteinen.....	21
Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Hauptautophagieformen. ....	24
Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Chaperon-assistierten, selektiven Autophagie (CASA).....	26
Abbildung 1.11: BAG3 vermittelte Transkription und Translation von Filamin.....	28
Abbildung 2.1: Aufbau der Gussformen zur Herstellung von elastischen Silikonkammern. ....	45
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Kammerhalterungen und der Dehnungsapparatur für uniaxiale Dehnung. ....	51
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Kammerhalterungen und der Dehnungsapparatur für biaxiale Dehnung. ....	52
Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau eines Western Blots. ....	59
Abbildung 3.1: Autophagosomen in verschiedenen Säugetierzellen.....	66
Abbildung 3.2: Überexpression von mCHERRY-eGFP-LC3B durch transiente und stabile Transfektion in A7r5 Zellen.....	68
Abbildung 3.3: Mechanische Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 und MEF Einzelzellen. ....	70
Abbildung 3.4: Aktin und Zellkörper Reorientierung orthogonal zur Dehnungsrichtung als mechanosensitive Antwort auf uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 und MEF Einzelzellen.....	72
Abbildung 3.5: Aktin Reorientierung bei zweifacher, uniaxialer, zyklischer Dehnung mit Änderung der Dehnungsrichtung um 90° in A7r5 Einzelzellen. ....	74
Abbildung 3.6: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen und des Proteasoms in A7r5 Einzelzellen.....	76
Abbildung 3.7: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen und des Proteasoms in MEF Einzelzellen.....	77
Abbildung 3.8: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung in MEF WT und ATG5-KO Einzelzellen. ....	79
Abbildung 3.9: Zellkörper Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen und des Proteasoms in A7r5 Einzelzellen.....	81
Abbildung 3.10: Vimentin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen in A7r5 Einzelzellen. ....	82
Abbildung 3.11: Vergleich der Aktin, Vimentin und Zellkörper Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen in A7r5 Einzelzellen.....	83

---

Abbildung 3.12: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei verstärkter RhoA Induktion in MEF Einzelzellen.....	85
Abbildung 3.13: Aktin Reorientierung und Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei RhoA Induktion in MEF Einzelzellen.....	87
Abbildung 3.14: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei verstärkter RhoA Induktion in A7r5 Einzelzellen.....	89
Abbildung 3.15: Aktin Reorientierung und Induktion von LC3B-positiven APs auf 5 kPa Elastomersubstraten durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 Einzelzellen. ....	90
Abbildung 3.16: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei ROCK Inhibition in A7r5 Einzelzellen. ....	92
Abbildung 3.17: Mechanische Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung nach ROCK Inhibition in A7r5 Einzelzellen. ....	93
Abbildung 3.18: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei blockierter Proteinbiosynthese. ....	96
Abbildung 3.19: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des Transkriptionsfaktors YAP . ....	98
Abbildung 3.20: Einfluss von BAG3 in der Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 Einzelzellen.....	100
Abbildung 3.21: Einfluss von BAG3 in der Aktin Reorientierung in undifferenzierten, humanen Podozyten. ....	102
Abbildung 3.22: Differenzierung von humanen Podozyten durch einen Temperaturwechsel von 32 °C auf 37 °C. ....	103
Abbildung 3.23: Einfluss von BAG3 in der Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung in differenzierten, humanen Podozyten.....	104
Abbildung 3.24: Vergleich der Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung von undifferenzierten und differenzierten, humanen WT Podozyten.....	105
Abbildung 3.25: Vergleich von A7r5 Einzelzellen und Monozellschichten. ....	107
Abbildung 3.26: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 Monozellschichten. ....	108
Abbildung 3.27: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von APs in A7r5 Monozellschichten. ....	109
Abbildung 3.28: Mechanische Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 Monozellschichten. ....	111
Abbildung 3.29: Einfluss der Blockierung der V-ATPase auf die Aktin Reorientierung und die Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung. ....	113
Abbildung 3.30: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von APs in Keratinozyten Monozellschichten. ....	115
Abbildung 3.31: Mechanische Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung in Keratinozyten Monozellschichten.....	117
Abbildung 3.32: Protein Quantifizierungen mittels Western Blot Analysen nach 1 h uniaxialer, zyklischer Dehnung von A7r5 Monozellschichten. ....	119
Abbildung 3.33: Protein Quantifizierungen mittels Western Blot Analysen nach 4 h uniaxialer, zyklischer Dehnung von A7r5 Monozellschichten. ....	121
Abbildung 3.34: Orientierung des Aktin-Zytoskeletts nach biaxialer, zyklischer Dehnung in A7r5 Einzelzellen. ...	123

Abbildung 3.35: Mechanische Induktion von LC3B-positive APs nach biaxialer, zyklischer Dehnung in A7r5 Monozellschichten.....	124
Abbildung 3.36: FAs und AJs nach biaxialer, zyklischer Dehnung in A7r5 Monozellschichten.....	125
Abbildung 3.37: Protein Quantifizierung mittels Western Blot Analysen nach 1 h biaxialer, zyklischer Dehnung von A7r5 Monozellschichten.....	127

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	33
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	34
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	36
Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.....	38
Tabelle 5: Verwendete Zelllinien .....	39
Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper .....	41
Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen.....	41
Tabelle 8: Verwendete Plasmide.....	42
Tabelle 9: Verwendete Programme.....	42

## Abkürzungsverzeichnis

A7r5	glatte Muskelzellen aus der Ratte (Zelllinie)
ABP	Aktin-bindende Proteine
ADF	Aktin-Depolymerisierungs-Faktoren
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
AJ(s)	Adhärenzverbindung(en)
AK	Antikörper
AL(s)	Autolysosom(en)
AMOTL1/2	Angiomotin-ähnliches Protein 1 und 2
AP(s)	Autophagosom(en)
Arp2/3	Aktin-ähnliches Protein 2 und 3
AT	Adenin-Tymin-Basenpaar
ATP	Adenosintriphosphat
BAG3	<i>B-cell lymphoma 2 associated anthanogen 3</i> (molekularer Chaperonregulator 3)
BAG3-WAWA	BAG3 Mutation mit Tryptophan-Alanin-Substitution an den Positionen 26 und 49
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
c-Cbl	<i>Casitas B-lineage</i> Lymphom Protein
CASA	Chaperon-assistierte, selektive Autophagie
CB	Zytoskelettpuffer
CHX	Cycloheximid
CI95	95 % Konfidenzintervall
CQ	Chloroquin-diphosphat
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	verstärkt grün fluoreszierendes Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FA(s)	Fokaladhäsion(en)
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FBS/FCS	Fötale Kälberserum
FN	Fibronektin
FZJ	Forschungszentrum Jülich GmbH
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HSC	Hitzeschock verwandte Proteine
HSP(s)	Hitzeschockprotein(e)
IBI	Institut für biologische Informationsverarbeitung
IF(s)	Immunfluoreszenzfärbung(en)
Ig	Immunglobulin
JDP(s)	J-Domänenprotein(e)
kDa	Kilodalton
LAMP-2A	lysosomal assoziiertes Membranprotein 2A

LATS1/2	<i>large tumor suppressor</i> Kinasen 1 und 2
LC3B	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1A/1B leichte Kette 3B
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LPA	Lysophosphatidsäure
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
mA	Milliampere
MEF	murine, embryonale Fibroblasten (Zelllinie)
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MP	Milchpulver
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
NBR1	Nachbar des BRCA1-Gen-1-Proteins
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ns	nicht signifikant
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFA	Paraformaldehyd
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
Rap1	Ras-ähnliches Protein 1
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RhoA	Ras homologe GTPase A
ROCK	Rho-assoziierte Protein Kinase
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SF(s)	Stressfaser(n)
sHSP(s)	kleine Hitzeschockproteine
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment</i> Rezeptor
TAZ	Transkriptionaler Co-Aktivator mit PDZ-Bindedomäne
TEAD	TEA-Domänen Transkriptionsfaktor
TSC	Tuberöser Sklerosekomplex
ü.N.	über Nacht
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
V	Volt
VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>
WT	Wildtyp
YAP	Yes-assoziiertes Protein
*	signifikant $p < 0.05$
**	hoch signifikant $p \leq 0.01$
***	höchst signifikant $p \leq 0.001$



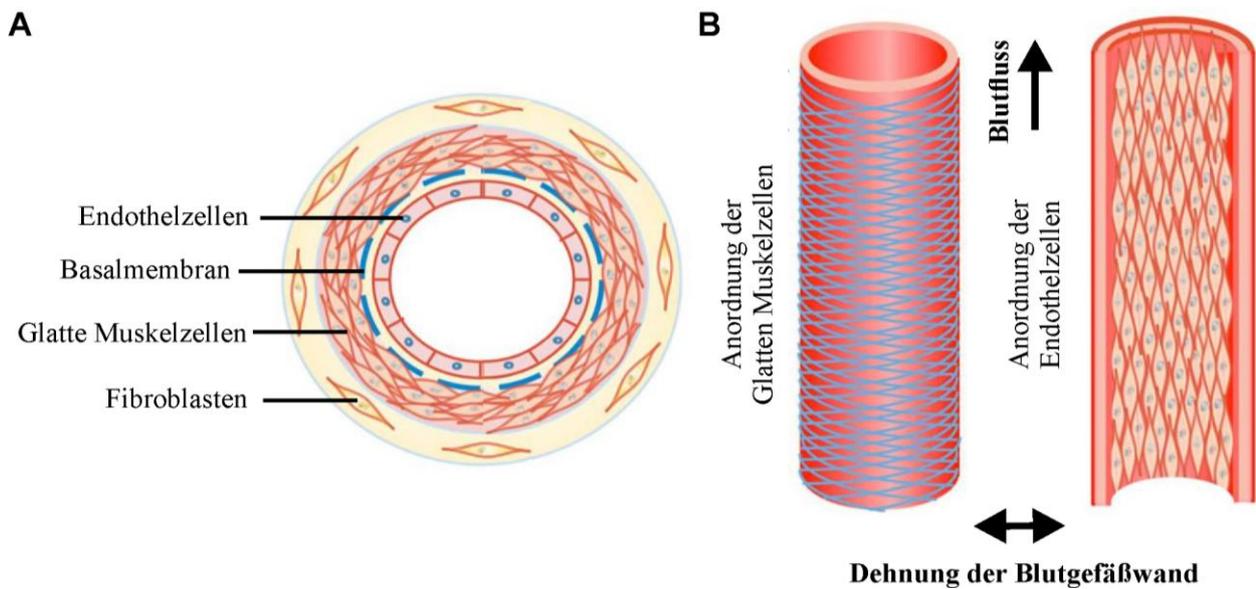
# 1 Einleitung

## 1.1 Mechanosensitive Wahrnehmung von Zellen

Eine Vielzahl unterschiedlicher mechanischer Signale wirken permanent auf multizelluläre Systeme ein und üben einen permanenten Einfluss auf die Gewebshomöostase aus. Diese Signale können massiven Einfluss auf die zelluläre Morphogenese, Zellmigration, Zellproliferation- und differenzierung sowie die Adhäsion und Kommunikation mit der extrazellulären Matrix (EZM) haben (Wang and Thampatty, 2006; Wolfenson *et al.*, 2019). Die Wahrnehmung und Umwandlung mechanischer Reize ist daher eine grundlegende und notwendige Fähigkeit von Zellen sich an Umweltbedingungen anzupassen und zu überleben (DuFort *et al.*, 2011; Yusko and Asbury, 2014).

Neben der Umgebungselastizität als nahezu omnipräsentes mechanisches Signal sind besonders Dehnungs- und Kontraktionsreize mechanobiologisch von großer Wichtigkeit. Diese treten beispielhaft bei jeder Bewegung, jedem Atemzug und jedem Herzschlag auf. Am Beispiel von Blutgefäßen bewirkt das Zusammenspiel von durch die Herzmuskulatur ausgelöstem pulsierendem Blutfluss sowie die Kontraktilität der die Arterien umgebenden glatten Muskulatur, eine permanente mechanische Reizung der Organe und Gewebe in Form von Dehnung, Kompression, Scher- und Torsionskräften (Bukoreshtliev *et al.*, 2013; Swaminathan and Gloerich, 2021).

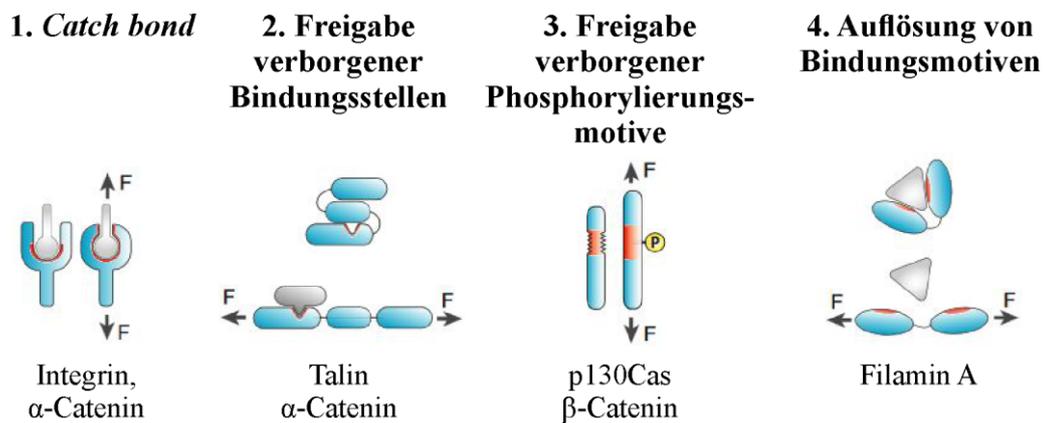
Während mechanische Reize durch Bewegung zumeist heterogener Natur sind, stellen durch Atmung, Herzschlag oder Darmperistaltik verursachte Reize zyklische Dehnungen dar, die zumeist uniaxial, sprich in eine Hauptrichtung orientiert sind. So wird eine überwiegend uniaxiale, zyklische Dehnung auch auf Fibroblasten und glatte Muskelzellen, welche die Endothelzellen der Blutgefäße umkleiden, durch den Herzschlag tangential zum Blutfluss hervorgerufen (Abbildung 1.1) (Wang; and Wang, 2019). Dies ist ebenso in glatten Muskelzellen der Fall, welche das Lungengewebe umkleiden und durch die Atmung zyklisch gedehnt werden (Jensen *et al.*, 2021).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Blutgefäßes.** (A) Dargestellt ist der Querschnitt eines Blutgefäßes sowie (B) ein Längsschnitt mit der Anordnung der Zellen zur Richtung des Blutflusses und der Dehnung der Blutgefäßwand. Verändert nach (Wang; and Wang, 2019).

Mechanische Reize werden in den Zellen über mechanosensitive Strukturen und Proteine wahrgenommen. Einige der wichtigsten Strukturen stellen dabei das Aktin-Zytoskelett der Zelle und die damit verknüpften Fokaladhäsionen (FAs) als Zell-Matrix-Adhäsionen sowie die Zell-Zell-Adhäsionen der Adhärenzverbindungen (AJs = *Adherens junctions*) dar. Speziell die Adhärenzkomplexe sind aus einer Reihe mechanosensitiver Proteine aufgebaut, die in der Lage sind mechanische Reize in chemische Signale umzuwandeln und so eine zelluläre Anpassung zu ermöglichen (Swaminathan and Gloerich, 2021).

Mechanosensitive Proteine agieren zumeist über eine Konformationsänderung auf mechanische Signale, die unterschiedliche Auswirkungen haben können (Abbildung 1.2). So kann die Lebensdauer einer Protein-Protein-Interaktion mechanosensitiver Proteine unter Dehnung direkt erhöht werden. Diese sogenannten „*catch bonds*“ (z.B. bei Bindung der Proteine Integrin oder  $\alpha$ -Catenin) stehen im Gegensatz zu normalen Protein-Bindungen, sogenannten „*slip bonds*“, deren Lebenszeit mit zunehmender Krafteinwirkung abnimmt. Weiterhin können durch die Konformationsänderungen in mechanosensitiven Proteinen verborgene Bindungsstellen nach außen freigegeben werden, die zuvor in inneren, hydrophoben Domänen des Proteins verborgen lagen. Diese können nachfolgend für die Bindung weiterer Proteine (z.B. bei Talin oder  $\alpha$ -Catenin) oder für posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen (z.B. bei p130Cas oder  $\beta$ -Catenin) zur Verfügung stehen. Die Bindungsmotive bestimmter mechanosensitiver Proteine, wie beispielsweise Filamin, können durch Krafteinwirkung allerdings auch aufgelöst werden (zusammengefasst in (Swaminathan and Gloerich, 2021)).



**Abbildung 1.2: Mechanismen von mechanosensitiven Proteinen.** Dargestellt sind vier Mechanismen, wie mechanosensitive Proteine mechanische in chemische Signale umwandeln können. Verändert nach (Swaminathan and Gloerich, 2021).

Aufgefaltete Proteine haben nach Beendigung des mechanischen Reizes die Möglichkeit sich in ihre Ausgangskonformation zurückzufalten (Yao *et al.*, 2016) oder aber müssen nach irreversibler Entfaltung aus dem System entfernt werden (Höfeld *et al.*, 2021). Diese Erkennung und der nachfolgende Abbau beschädigter Proteine über das Proteasom oder die Autophagosomen ist essentiell für die zelluläre Homöostase und das Überleben der Zelle (Klaips *et al.*, 2018). Fehlfunktionen in diesen Abbaumechanismen können zu verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson, Myopathien und unterschiedlichen Formen von Krebs führen (Arndt *et al.*, 2010; Hartl, 2017; Hipp *et al.*, 2019). Aufgrund der enormen Bedeutung mechanosensitiver Proteine für die Signaltransduktion mechanischer in chemische Signale werden diese im Folgenden ausführlich erläutert.

## 1.2 Die Kontraktilität der Zelle

Die Kontraktilität der Zelle wird in dieser Arbeit an der Ausprägung des Kontraktilen Apparats durch die Dicke und Häufigkeit der Aktin-Stressfasern und FAs definiert und bezieht sich nicht auf gemessene Zellkräfte. Die Zellkontraktilität wird u.a. über die Elastizität der Umgebung beeinflusst. Die mechanischen Eigenschaften der extrazellulären Matrix werden über die Adhäsionsstrukturen der FAs in das Zellinnere übertragen. Intrazellulär werden dadurch Signalkaskaden ausgelöst und bewirken über die Umwandlung in chemische Signale eine mechanosensitive Antwort in Form einer Umstrukturierung des Zytoskeletts und der Adhäsionsstrukturen. Da diese mechanosensitiven Prozesse eine tragende Rolle in dieser Arbeit haben, wird auf den Aufbau und die Mechanosensitivität dieser Strukturen und Prozesse in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

### 1.2.1 Die extrazelluläre Matrix (EZM)

Die extrazelluläre Matrix (EZM) beschreibt den zellfreien Interzellularraum aller Organe und Gewebe, bestehend aus einer Diversität aus Grundsubstanzen und Faserproteinen. Die EZM ist eine hochdynamische Signalplattform und beeinflusst einerseits biochemisch über Wachstumsfaktoren und Zytokine und andererseits mechanisch über ihre Zusammensetzung und Modifikationen die Morphogenese, Homöostase und Differenzierung von Zellen und Geweben. Weitere Funktionen der EZM sind die Formgebung und der Zusammenhalt des Gewebes (Frantz *et al.*, 2010).

Den Hauptbestandteil der EZM machen die Grundsubstanzen wie die zu den Glykosaminoglykanen gehörende Hyaluronsäure aus. In dem langkettigen Aufbau des Polysaccharids kann Wasser eingelagert werden, gibt dem Gewebe dadurch seine Form und stützt die umliegenden Zellen (Schaefer and Schaefer, 2010).

Bei den Faserproteinen machen Kollagene, mit 30 % der Proteinmasse im gesamten Körper, den Hauptbestandteil aus. Die tripel-helikale Struktur der Kollagene verleiht dem Gewebe seine Zugfestigkeit und Steifigkeit. Zusätzlich dienen Kollagene als Bindungspartner für weitere Glykoproteine wie Fibronectin, Laminin und andere EZM Bestandteile (Frantz *et al.*, 2010). An verschiedene Bindungsmotive der einzelnen EZM Bestandteile können die Integrin-Rezeptoren der Zelle binden und so kommunizieren, adhären und migrieren (Zaidel-Bar *et al.*, 2007).

Die gewebespezifische Steifigkeit der EZM bestimmt über ihre Zusammensetzung die Polarität und den Phänotyp der Zellen (Prager-Khoutorsky *et al.*, 2011). Durch die EZM und weitere mechanische Einflüsse wird das Aktin-Zytoskelett der Zelle stark beeinflusst (Humphrey *et al.*, 2014).

## 1.2.2 Das Aktin-Zytoskelett

Aktin ist das am stärksten exprimierte Protein in den meisten eukaryotischen Zellen und stellt neben Tubulin und den diversen Proteinen der Familie der Intermediärfilamente die dritte Gruppe zytoskelettaler Proteine dar, welche der Zelle ihre Form und Festigkeit geben. Durch die Aktin Polymerisation und die Assoziation mit Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) werden höher geordnete Proteinstrukturen aufgebaut zu denen Filopodien (Svitkina *et al.*, 2003), Myofibrillen (Epstein and Fischman, 1991) und Stressfasern (Weber and Groeschel-Stewart, 1974) gehören. Über das Aktin-Zytoskelett sind Zellen in der Lage zelleigene Kräfte zu erzeugen sowie extrazelluläre Kräfte ins Zellinnere weiterzuleiten. Über Aktinfilamente werden zudem eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie beispielsweise Transportvorgänge, Migration oder Zellteilung vermittelt (Khaitlina, 2014; Svitkina, 2018; Moore *et al.*, 2021). Da in dieser Arbeit Aktin-Stressfasern von besonderer Bedeutung sind, wird deren Aufbau, Funktion und Mechanosensitivität im Anschluss genauer erläutert.

### 1.2.2.1 De-/Polymerisation des Aktin-Zytoskeletts und Aufbau von Aktin-Stressfasern

Die kleinste Untereinheit des Aktin-Zytoskeletts ist das 42 kDa (Kilodalton) große, hochkonservierte, globuläre Aktin (G-Aktin), welches über seine ATPase-Aktivität zu polarem, filamentösen Aktin (F-Aktin) polymerisiert. Zwei F-Aktin Moleküle lagern sich wiederum helikal zu einem Filament mit einem Durchmesser von 7 nm aneinander (Korn, 1982). Die Polymerisations- und Depolymerisationsreaktion sind hochdynamisch und vielfältig reguliert.

Der Startpunkt der *de novo* Ausbildung des F-Aktins ist die Nukleation, bei der sich drei G-Aktine zu einem Nukleus aneinander lagern (Wegner and Engel, 1975). Dieser Prozess wird über Hilfsproteine wie Formin oder den Komplex aus den Aktin-ähnlichen Proteinen 2 und 3 (Arp2/3) stabilisiert. Formin stützt dabei die Dimersierung von G-Aktin während Arp2 und Arp3 zwei der Moleküle für den Nukleus imitieren und ein weiteres ATP-G-Aktin Molekül binden. Die Stabilität dieses Komplexes ist höher als nur aus zwei ATP-G-Aktin Molekülen, sodass die Anlagerung

weiterer Aktin-Moleküle mit höherer Wahrscheinlichkeit vor der Dissoziation des Nukleus eintritt (Otomo *et al.*, 2005; Pollard, 2007).

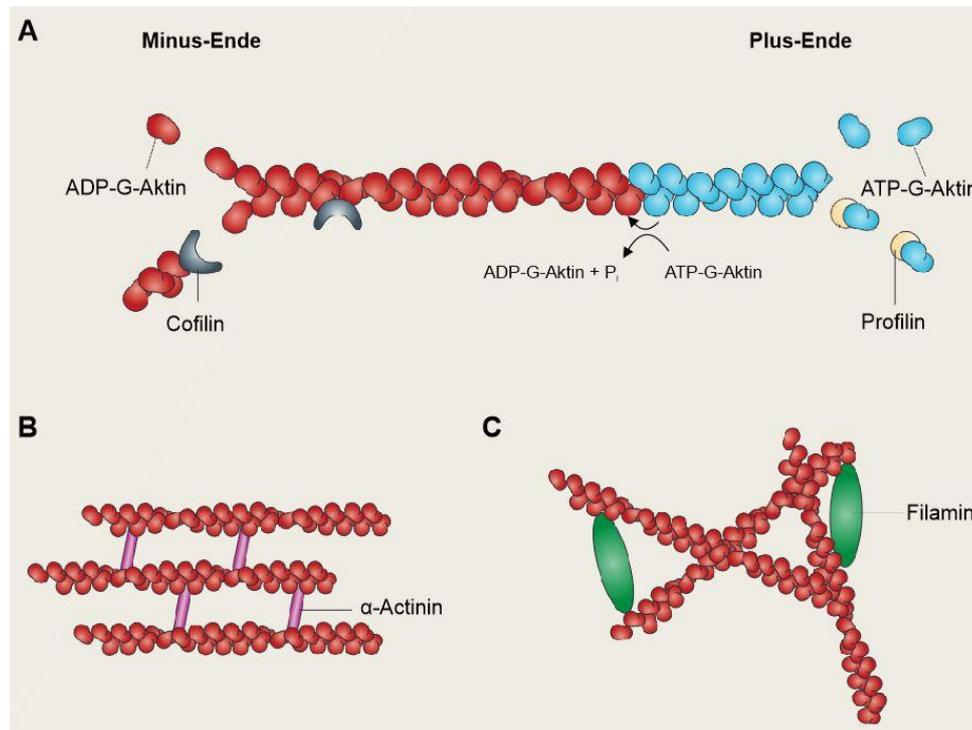
Bei der Zusammenlagerung zweier ATP-G-Aktin Moleküle kommt es zur Hydrolyse des ATP zu ADP, wodurch die Bindungsstärke zum Nachbarmolekül nachlässt und die ADP-G-Aktin Moleküle wieder dissoziieren können. Die Anlagerung von neuen ATP-G-Aktin Molekülen am Plus-Ende des F-Aktins wird gefördert durch Aktin-Polymerisations-Faktoren wie Profilin. Dieser hat eine hohe Affinität zu freiem ATP-G-Aktin und lagert dieses an das Plus-Ende des F-Aktins an, gefolgt von der Dissoziation des Profilins (Pring *et al.*, 1992) (Abbildung 1.3 A).

Am Minus-Ende verläuft die Dissoziation von ADP-G-Aktin Molekülen jedoch schneller ab, als die Anlagerung von ATP-G-Aktin, was durch Aktin-Depolymerisierungs-Faktoren (ADF) wie Cofilin über seine hohe Affinität zu ADP-G-Aktin und im Besonderen durch die Endwindung der helikalen Struktur bewirkt wird (McGough and Chiu, 1999; Tanaka *et al.*, 2018). Weiterhin verhindert Cofilin die Ausbildung höhergeordneter Aktin-Strukturen am Minus-Ende durch eine kompetitive Inhibition der Myosin-II Bindung an Aktin (Wiggin *et al.*, 2012).

Dissoziierte ADP-G-Aktin Monomere können nach einem Austausch des ADP gegen ATP, über die höhere Bindungsaffinität zu ATP, wieder für die Polymerisation am wachsenden Plus-Ende genutzt werden. Läuft die Polymerisation am Plus-Ende genauso schnell wie die Depolymerisation am Minus-Ende des Aktinfilaments, spricht man von einem Tretmühlenmechanismus (Fujiwara *et al.*, 2002).

Die so entstehenden Aktinfilamente können über weitere ABPs stabilisiert und zu einer Vielzahl unterschiedlicher übergeordneter Aktinfilament-Strukturen in der Zelle aufgebaut werden. So wird beispielsweise durch eine bipolare Anordnung von 10-30 Aktinfilamenten (Cramer *et al.*, 1997), die über das ABP  $\alpha$ -Aktinin zu parallelen Aktinfilamentbündeln angeordnet werden, der Aufbau kontraktile Bündeln, den sogenannten Stressfasern, ermöglicht (Abbildung 1.3 B) (Lazarides and Burridge, 1975).

Filamin als weiteres ABP verknüpft hingegen senkrecht zueinander angeordnete Aktinfilamente untereinander oder koppelt F-Aktin an unterschiedliche Membranproteine (Abbildung 1.3 C) (Wang *et al.*, 1975; Nakamura *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der (De-) Polymerisation und Verzweigung des Aktin-Zytoskeletts.** (A) Gezeigt ist die ATP-abhängige, hochdynamische Polymerisations- und Depolymerisationsreaktion am Plus- und Minus-Ende des F-Aktins. (B) Einzelne F-Aktine werden wiederum über  $\alpha$ -Aktinin zu parallelen Aktinfilamentbündeln, genannt Aktin-Stressfasern, verbunden und (C) zusätzlich über Filamin mit antiparallelen Filamenten verzweigt. Verändert nach (Cingolani and Goda, 2008).

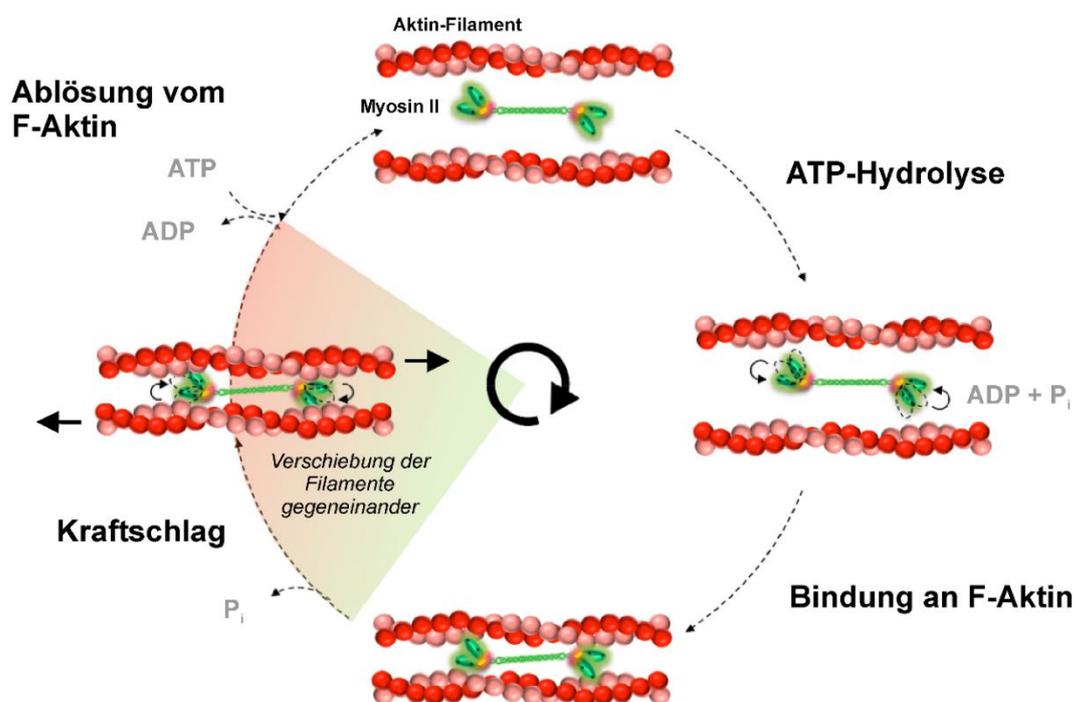
#### 1.2.2.2 Die Kontraktion des Aktomyosins

Durch Einlagerung von Myosin Typ II Molekülen in  $\alpha$ -Aktinin verknüpfte F-Aktin Bündel werden kontraktile Aktomyosin Strukturen aufgebaut. Dies ermöglicht eine gegeneinander verlaufende Verschiebung der Aktinfilamente der Zellen zur Erzeugung zellulärer Zugkräfte. Dabei gewährt das  $\alpha$ -Aktinin Homodimer einen ausreichenden Abstand der Aktinfilamente für die Einlagerung von Myosin II (Langanger *et al.*, 1986).

Die Ras homologe GTPase A (RhoA) ist als Mitglied der Rho Familie kleiner GTPasen dabei besonders wichtig für die zugrundeliegende Signalkaskade zur Ausbildung von Stressfasern über die Einlagerung von Myosin II in die Aktinfilamentbündel und damit die Kontraktilität der Zelle (Ridley and Hall, 1992; Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Durch die RhoA vermittelte Aktivierung der Rho-assozierten Kinase I (ROCK I) wird die Phosphorylierung der regulatorisch wirkenden Myosin leichten Kette (MLC) (Amano *et al.*, 1996) und parallel die Inaktivierung der MLC Phosphatase bewirkt (Kimura *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung der MLC hat hierbei einen aktivierenden Einfluss auf Myosin II.

Die Kontraktibilität der Stressfasern wird erst durch die Aktivierung von Myosin II und die Wechselwirkung mit den Aktinfilamenten ermöglicht (Weber and Groeschel-Stewart, 1974). Myosin II bildet ein Dimer mit zwei globulären Kopf- und zwei  $\alpha$ -helikal angeordneten Schwanzdomänen zur Stabilisierung des Dimers. Zwei dieser Dimere lagern sich über die Schwanzdomänen antiparallel zu einem Tetramer zusammen und verbinden so zwei Aktinfilamente. Jedes Dimer besitzt vier strukturelle, regulatorische, leichte Ketten und zwei schwere Ketten, welche die Kopfdomäne mit der katalytischen ATPase-Aktivität und der Aktinbindestelle beinhaltet (Heissler and Manstein, 2013).

Die Myosin Kopfdomäne ist in der Lage sowohl ADP als auch ATP in einem wiederkehrenden Zyklus zu binden. Hierbei bindet die Kopfdomäne mit gebundenem ADP in einem Winkel von  $50^\circ$  fest an das Aktinfilament (Abbildung 1.4). Durch den Austausch von ADP zu ATP dissoziiert die Kopfdomäne und steht nun orthogonal zum Aktinfilament. Über die von ROCK I vermittelte Phosphorylierung der MLC wird die ATPase Aktivität induziert. Nach der Hydrolyse von ATP zu ADP und  $P_i$  bindet die Kopfdomäne erneut an das Aktinfilament. Durch die Dissoziation des  $P_i$  kommt es zu einem Kraftschlag bei dem der Neigungswinkel der Myosin Kopfdomäne auf  $50^\circ$  zurückklappt, wofür die Energie aus der Hydrolyse genutzt wird. Die beiden Myosin Dimere sind dabei fest an die Aktinfilamente gebunden und es kommt folglich zu einer Verschiebung der Filamente gegeneinander (Brito and Sousa, 2020).



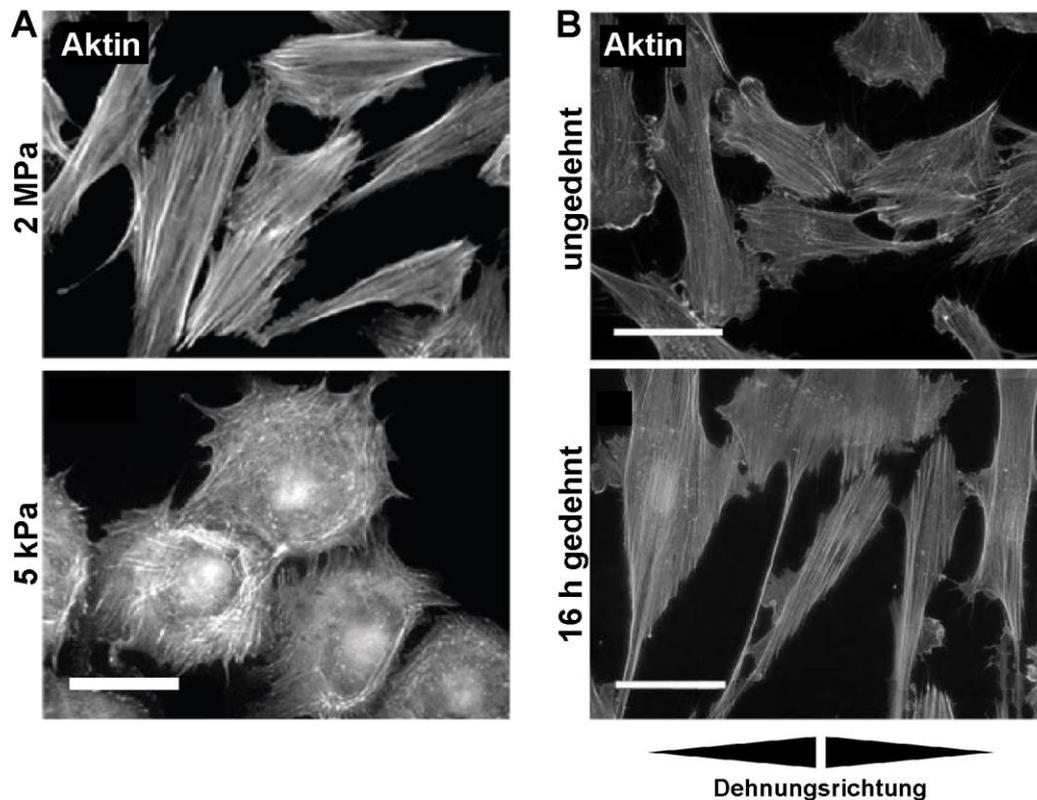
**Abbildung 1.4: Die Kontraktion des Aktomyosins.** Dargestellt ist die Myosin-induzierte Kontraktion zweier Aktin-Stressfasern unter Hydrolyse von ATP. Verändert nach (Brito and Sousa, 2020).

### 1.2.2.3 Die Mechanosensitivität des Aktin-Zytoskeletts

Neben der Kontraktilität des Aktomyosins zur Erzeugung zellulärer Zugkräfte reagiert das Aktin-Zytoskelett auch auf äußere mechanische Reize. Während Aktinfilamentbündel in migrierenden Zellen aus relativ wenigen Aktinfilamenten bestehen und hoch dynamisch agieren, sind die Aktomyosinbündel in nicht-migrierenden Zellen wie Fibroblasten, glatten Muskelzellen oder Endothelzellen deutlich stärker ausgeprägt und weniger dynamisch (Tojkander *et al.*, 2012). Neben einer Reihe weiterer Faktoren wird die Ausprägungsstärke von Stressfasern hierbei auch durch die Substratelastizität der zellulären Umgebung beeinflusst. So weisen bei der Kultivierung von Fibroblasten auf Glas als 2 MPa hartes Substrat die Zellen starke, parallel angeordnete Stressfasern auf, wohingegen diese bei der Kultivierung auf 5 kPa weichem Elastomersubstrat kaum vorhanden bzw. nur sehr dünn und durcheinander angeordnet vorliegen (Abbildung 1.5 A) (Prager-Khoutorsky *et al.*, 2011).

Neben der Substratelastizität beeinflusst auch eine Dehnung des Substrats das Aktin-Zytoskelett. Prominente Stressfasern sind in Endothelzellen *in vivo* durch die starke mechanische Beanspruchung über den hydrostatischen Blutdruck, die Scherkräfte des Blutflusses und die zyklische Dehnung der Blutgefäßwand bedingt. Die Stressfasern sind in den Endothelzellen *in vivo* parallel zur Flussrichtung des Blutes angeordnet (Wong *et al.*, 1983; Dartsch and Betz, 1989). *In vitro* konnte in Mikrofluidiksystemen durch Simulation der Scherkräfte des Blutflusses ebenfalls eine Ausrichtung der Zellkörper sowie des Aktin-Zytoskeletts parallel zur Richtung des angelegten Flusses beobachtet werden (Sato and Ohashi, 2005).

Bei Anlegung von zyklischer Dehnung von Endothelzellen kommt es hingegen zu einer Reorientierung der Zellkörper und der Aktinfilamente orthogonal zur Dehnungsrichtung (Dartsch and Betz, 1989). Die Reorientierung der Aktin-Stressfasern entgegen der Zugrichtung der Dehnung konnte für eine Vielzahl weiterer Zelltypen sowohl auf Einzel- als auch Monozellebene nachgewiesen werden (Abbildung 1.5 B) (Hayakawa *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2001; Jungbauer *et al.*, 2008; Faust *et al.*, 2011; Neidlinger-Wilke *et al.*, 2014; Noethel *et al.*, 2018). Zelluläre Reorientierung auf mechanische Reize scheint damit einen universellen, konservierten Mechanismus darzustellen, auch wenn die exakte Ausrichtung der Aktin-Stressfasern leicht zwischen verschiedenen Zelltypen variiert und zudem von einer Reihe weiterer Faktoren wie Frequenz (Tondon *et al.*, 2012) und Intensität (Faust *et al.*, 2011) der mechanischen Belastung abhängt.



**Abbildung 1.5: Aktin-Stressfasern in Abhängigkeit der Substratelastizität und zyklischer Dehnung.** (A) Gezeigt sind humane Vorhautfibroblasten 6 h nach Aussähen auf 5 kPa weichem und 2 MPa hartem Polydimethylsiloxan (PDMS) immungefärbt gegen Aktin mit TRITC-Phalloidin. Der Maßstab ist 40 µm. (B) Gezeigt sind Aktin immungefärbte Nabelschnurfibroblasten nach Kultivierung für 6 h auf 50 kPa PDMS Substraten und anschließend 16 h zyklischer, uniaxialer Dehnung bei einer Amplitude von 32 % bzw. einer ungedehnten Kontrolle. Die Maßstab ist 50 µm. Verändert nach (Faust *et al.*, 2011; Prager-Khoutorsky *et al.*, 2011).

Das Verhalten der Reorientierung als Antwort auf Dehnung ist von verschiedenen mechanischen Parametern abhängig. So bewirkt zyklische Dehnung eine Reorientierung der Aktin-Stressfasern von glatten Muskelzellen orthogonal zur Zugrichtung, wohingegen dieses Verhalten bei einer statisch aufrechterhaltenen Dehnung nicht beobachtet werden konnte (Hayakawa *et al.*, 2000). Entgegen dazu konnte bei einer sehr langsamen, statischen Dehnung sogar eine Reorientierung von Myozyten in Zugrichtung beobachtet werden (Collinsworth *et al.*, 2000).

Darüber hinaus ist der Grad der Reorientierung entgegen der Dehnungsrichtung auch von der Amplitude und der Frequenz der Dehnung abhängig. So konnte im Vergleich zu einer Frequenz von 1 Hz keine Reorientierung von Aktin-Stressfasern bei einer Frequenz von 10 mHz bei Endothelzellen beobachtet werden (Lee *et al.*, 2010).

Reorientierung erst oberhalb eines Schwellenwerts der Frequenz konnte auch für Fibroblasten bestätigt werden (Jungbauer *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte eine beschleunigte Ausrichtung entgegen der Dehnungsrichtung mit Verdopplung der Dehnungsfrequenz von 0,5 auf 1 Hz in glatten Muskelzellen nachgewiesen werden (Hayakawa *et al.*, 2001).

Zusätzlich zu der frequenzabhängigen Dehnungsstärke, konnte auch eine Abhängigkeit von der Form des Dehnungsimpulses aufgezeigt werden. Dabei wurde zusätzlich festgestellt, dass die Zellen sensitiver auf die Amplitude als auf die Frequenz der Dehnung reagieren (Tondon *et al.*, 2012). So führte eine Erhöhung der Amplitude zu einer stärkeren Reorientierung, wobei auch hier ein Schwellenwert von etwa 3 % unabhängig vom Zelltyp zur Induktion der Reorientierung überschritten werden muss (Dartsch and Betz, 1989; Chien, 2007; Faust *et al.*, 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich Zellen in einem Winkel der minimalen Dehnung und nicht im Winkel der minimal auf sie einwirkenden Kräfte ausrichten (Faust *et al.*, 2011).

Die Reorientierung der Aktin-Stressfasern findet über verschiedene Prozesse statt. So konnte sowohl eine schrittweise, dynamische Rotation von intakten Stressfasern (Ahmed *et al.*, 2010), als auch eine teilweise Auflösung von existierenden und eine parallele Neubildung von Stressfasern orthogonal zur Dehnungsrichtung beobachtet werden (Hayakawa *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Enden von Stressfasern teilweise zusammen mit den dazugehörigen Fokaladhäsionen erhalten blieben und für die Neubildung von Stressfasern entgegen der Dehnungsrichtung genutzt wurden (Lee *et al.*, 2010).

Neben der Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts richten sich durch die zyklische Dehnung auch die anderen zytoskelettalen Strukturen und der gesamte Zellkörper gegen die Dehnungsrichtung aus. Das mechanosensitive Aktin-Zytoskelett reagiert als erstes, gefolgt von den Mikrotubuli, den Intermediärfilamenten und dem gesamten Zellkörper (Hayakawa *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2001; Faust *et al.*, 2011; Zielinski *et al.*, 2018). Dennoch ist die Reorientierung sowohl von der Anwesenheit von Aktin-Stressfasern (Lee *et al.*, 2010), als auch vom Mikrotubuli-Zytoskelett abhängig (Morioka *et al.*, 2011). Die Reorientierung ist dabei abhängig von der Existenz der Aktin-Stressfasern, deren Anzahl und Dicke wiederum von der Stärke des mechanischen Reizes der Dehnung abhängt (Smith *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 2004; Yoshigi *et al.*, 2005).

Der Grund für die zelluläre, mechanosensitive Anpassung ist das Streben der Zelle die eigene mechanische Homöostase aufrechtzuerhalten (Discher *et al.*, 2005; DuFort *et al.*, 2011). Um der mechanischen Belastung auszuweichen, strukturieren die Zellen ihr Zytoskelett daher so um, dass es im Winkel der geringsten mechanischen Belastung ausgerichtet ist und somit entgegen der Richtung der zyklischen Dehnung (Faust *et al.*, 2011). Hierbei ist die Adaptation der Zellen auf starke mechanische Beanspruchung ein essentieller Mechanismus für die Integrität und das Überleben des Gewebes (Discher *et al.*, 2005; Zielinski *et al.*, 2018).

Bei der Lebendzellanalyse von Myofibroblasten unter Dehnung wurde festgestellt, dass die Verschiebung des für die Adhäsion der Zellen verwendeten elastischen Substrats und des Aktin-Zytoskeletts identisch sind und das Aktin-Zytoskelett somit sehr steif agiert. Lediglich die Endbereiche der Aktin-Stressfasern zeigten eine Deformation. Dadurch konnte vermutet werden, dass speziell in diesen Bereichen mechanosensitive Proteine vorliegen, um so optimal intrazelluläre Deformationen detektieren zu können (Kirchenbüchler *et al.*, 2010).

An ihren Enden sind Aktin-Stressfasern bei Substratadhäsion mit mindestens einer Fokaladhäsion verbunden. Diese bildet die Verbindung zum Extrazellulärraum und erlaubt so die Übertragung zelleigener Kräfte sowie die Wahrnehmung extrazellulärer, mechanischer Reize. Andererseits können Aktin-Stressfasern auch mit Adhärenzverbindungen im Kontakt mit umgebenen Zellen stehen. Damit stellen diese beiden Proteinkomplexe optimale Strukturen zur Wahrnehmung und Übertragung mechanischer Signale dar und sind dementsprechend mit einer Vielzahl an Proteinen mit mechanosensitiven Eigenschaften ausgestattet.

### 1.2.3 Fokaladhäsionen (FAs)

Fokaladhäsionen (FAs) sind hochregulierte Proteinkomplexe, die eine Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett der Zelle und den Proteinen der EZM vermitteln (Abercrombie and Dunn, 1975; Izzard and Lochner, 1980). FAs geben der Zelle ihre Stabilität bei der Adhäsion, ermöglichen die Übertragung von Aktomyosin-basierten Kräften auf die Umgebung (Lekka *et al.*, 2021) und dienen ebenso der Signalwahrnehmung und -weiterleitung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere (Riveline *et al.*, 2001). Die Adhäsionskontakte werden initial als Fokalkomplexe gebildet und reifen nur durch mechanische Kräfte zu einer vollständigen FA aus.

#### 1.2.3.1 Aufbau und Funktion der FA

FAs stellen über transmembrane Integrin-Rezeptoren und mit über 50 weiteren Kern-Proteinen (Zamir and Geiger, 2001) große Strukturen innerhalb der Zelle dar, die bereits 1971 bei Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop als Plaques detektiert werden konnten (Abercrombie *et al.*, 1971) (Abbildung 1.6).

Mitglieder der transmembranen Integrin Molekülfamilie sind neben den FAs auch an weiteren Adhäsionsstrukturen wie Hemidesmosomen beteiligt. Das komplexe Integrin Adhäsionsnetzwerk besteht aus mindestens 156 Komponenten mit 690 Interaktionsmöglichkeiten (Zaidel-Bar *et al.*, 2007). Funktionale Integrin-Rezeptoren sind aus einer nicht kovalent verknüpften  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit aufgebaut. Aus 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten können dabei 24 verschiedene Kombinationen funktionaler Integrin-Rezeptoren gebildet werden (Hynes, 2002; Shattil *et al.*, 2010).

Extrazellulär binden die Integrin-Rezeptoren an spezifische Proteine der EZM und werden je nach Bindungsspezifität in verschiedene Gruppen klassifiziert. So bindet das Integrin Heterodimer  $\alpha 5 \beta 1$  über eine gemeinsam ausgebildete Bindetasche an die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD-Sequenz), die besonders häufig in den EZM Proteinen Fibronectin oder Vitronectin vorkommt (Humphries *et al.*, 2006).

Ohne ein aktivierendes Signal liegt das Integrin Heterodimer in einer inaktiven, geschlossenen Form vor, welches intrazellulär durch negativ regulierende Proteine wie Filamin stabilisiert wird (Pouwels *et al.*, 2012). Die Bindung eines spezifischen, extrazellulären Proteins bewirkt eine Aktivierung gefolgt von der Öffnung der Struktur (Pouwels *et al.*, 2012). Nachfolgend werden durch die Bindung zytoplasmatischer FA-Proteine an die intrazelluläre Domäne der Integrine Regulationsmechanismen induziert und das Integrin über seine mechanosensitiven Eigenschaften

als *catch-bond* in seiner Konformation und damit der Bindung an Fibronectin stabilisiert (Kong *et al.*, 2009).

Bei der frühen Entwicklung eines Fokalkomplexes spielt das Protein Talin, welches mit Filamin um die Inaktivierung und Aktivierung des Integrin Rezeptors konkurriert, eine entscheidende Rolle (Kiema *et al.*, 2006). Talin liegt in seiner inaktiven Form zytoplasmatisch vor und bindet nach Aktivierung N-terminal an  $\beta$ -Integrin (Critchley and Gingras, 2008). Eine Talin Dimerisierung über die C-terminalen Domänen bewirkt einer Clusterbildung von weiteren Integrin Rezeptoren (Smith and McCann, 2007). Talin interagiert wiederum entweder direkt oder über weitere Adapterproteine mit dem Aktin-Zytoskelett und stellt damit eine wichtige Verbindungsstelle zwischen den Integrinen und dem Aktin dar (Hemmings *et al.*, 1996; Calderwood and Ginsberg, 2003).

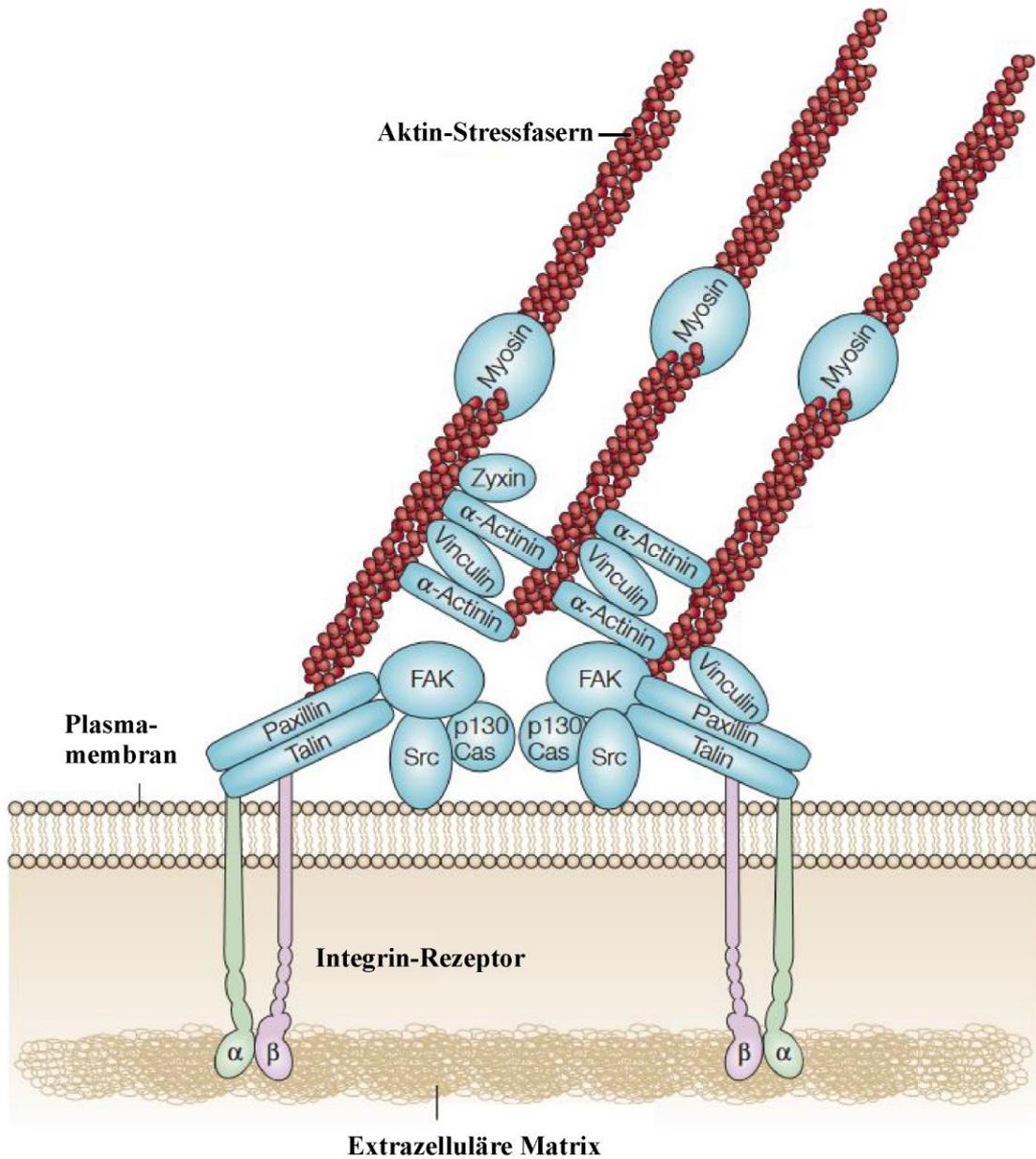
Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) (Chen *et al.*, 1995) und Vinculin (Burrige and Mangeat, 1984) sind die direkten Bindungspartner von Talin. Andere Untersuchungen sprechen sogar dafür, dass FAK bereits vor Talin zur Ausbildung einer Adhäsion zum Integrin-Rezeptor rekrutiert wird (Lawson and Schlaepfer, 2012). Der genaue Mechanismus ist jedoch bisher noch ungeklärt. Die hydrophoben, nach innen gerichteten Vinculin-Bindestellen von Talin werden erst durch eine Öffnung der Konformation für die Bindung zugänglich. Dies geschieht über die Bindung des Aktomyosins und verstärkt somit kraftinduziert die Stabilität des Komplexes (Fillingham *et al.*, 2005; del Rio *et al.*, 2009; Carisey *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2014).

Die frühzeitig in der FA integrierten Proteine FAK und Vinculin rekrutieren in der weiteren Reifung über ihre Bindestellen zahlreiche weitere Proteine (Zaidel-Bar *et al.*, 2007; Carisey and Ballestrem, 2011). Über die Bindung an Talin durchläuft das autoinhibierte Vinculin selbst eine Konformationsänderung zur aktiven Form, wodurch Bindungsstellen zugänglich werden (Bakolitsa *et al.*, 2004; Carisey *et al.*, 2013). Dadurch wird die Bindung des Multiadapterproteins Paxillin ermöglicht (Turner *et al.*, 1990), welches wiederum mit den Tyrosinkinasen FAK und *cellular sarcoma* Kinase (Src) interagiert und damit maßgeblich zur Reifung der FA beiträgt (Turner, 1998). FAK und Src haben eine tragende Schlüsselrolle in der Verstärkung der FA durch die Phosphorylierung zahlreicher Adhäsionsproteine wie Paxillin, Vinculin oder p130Cas (Schaller, 2001). Dies führt zu einer Veränderung der Proteinkonformation (Huang *et al.*, 2014) und damit einer veränderten Bindungskinetik zu ihren jeweiligen Bindungspartnern (Möhl *et al.*, 2009; Küpper *et al.*, 2010). Die erhöhte Kinetik ist unerlässlich für die initiale Bildung von FAs (Zaidel-Bar *et al.*, 2007).

Nach Einbau der phosphorylierten Proteine werden diese meist wieder dephosphoryliert und dadurch in ihrer Bindung stabilisiert (Möhl *et al.*, 2012). Phosphorylierungen der Proteine Paxillin und p130Cas werden wiederum durch Bindungspartner erkannt und interagieren letztlich mit Signalproteinen der Rho-Familie kleiner GTPasen und beeinflussen somit die weitere Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts (Turner, 2000).

Zusätzlich bindet der Arp2/3 Komplex an die geöffnete Vinculinstruktur (DeMali *et al.*, 2002), wodurch die im vorherigen Kapitel beschriebene Nukleation neuer Aktinfilamente (1.2.2.1) zur Verstärkung von Aktinbündeln gefördert wird. Somit induziert die Bindung der initialen FA an Aktinfilamente einerseits die Reifung der FA, andererseits die gereifte FA wiederum die Ausbildung des Aktomyosins.

Über viele weitere Protein-Protein-Wechselwirkungen und insbesondere Protein-Phosphorylierungen kommuniziert die Zelle somit hochdynamisch über FAs mit dem Extrazellularraum (Swaminathan and Gloerich, 2021). Dabei spielt insbesondere die Umwandlung mechanischer in chemische Signale eine tragende Rolle für die Reifung und Verstärkung der FAs auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.



**Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Fokaladhäsion (FA).** Die FA verbindet die extrazelluläre Matrix über einen transmembranen Integrin-Rezeptor sowie einer Vielzahl zyttoplasmatischer Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle. Verändert nach (Mitra *et al.*, 2005).

### 1.2.3.2 Reifung der FA über mechanosensitive Proteine

Während die initiale Bildung eines Fokalkomplexes nicht von Zellkräften abhängt, wird die Reifung und Verstärkung zur FA zwingend durch physikalische Kräfte bewirkt. Dabei führen sowohl Aktin-Polymerisations-abhängige und Aktomyosin-basierte Kräfte im Zellinneren (Balaban *et al.*, 2001), als auch extern angelegte Kräfte sowie die erhöhte Steifigkeit der die Zellen umgebenden EZM zur Verstärkung der FA (Riveline *et al.*, 2001).

Hierbei spielen mechanosensitive Proteine eine maßgebliche Rolle und eine Reihe der FA-Proteine fungiert als solche. Wie bereits zuvor beschrieben (1.1), können mechanosensitive Proteine auf mechanische Signale auf unterschiedliche Arten erkennen und in chemische Signale umwandeln (Swaminathan and Glierich, 2021). Die genauen Mechanismen der wichtigsten mechanosensitiven Proteine der FA werden im Folgenden genauer erläutert.

Talin stellt ein zentrales mechanosensitives Proteine der FA dar. Insgesamt besitzt Talin 11 Vinculin-Bindestellen (Gingras *et al.*, 2005), die jedoch in der ungebundenen Form in der Tertiärstruktur des Proteins verdeckt liegen (Fillingham *et al.*, 2005). Diese verborgenen Bindestellen werden erst durch externe Krafteinwirkung freigelegt und ermöglichen die Bindung von Vinculin (del Rio *et al.*, 2009; Hirata *et al.*, 2014b). Die zunehmende Krafteinwirkung korreliert mit der Freilegung von Vinculin-Bindestellen und bewirkt über jedes zusätzliche Vinculin Molekül eine Zunahme der benötigten Krafteinwirkung zur Auflösung der Adhäsion (Grashoff *et al.*, 2010). Durch diesen Mechanismus wird auch die Zunahme der Adhäsionsstärke mit steigender Substratelastizität erklärt, weil bei Adhäsion auf weichem Substrat von einer nur unvollständigen Öffnung der Talinstruktur ausgegangen wird (Hirata *et al.*, 2014a).

Neben Talin ist auch Filamin als mechanosensitives Protein beschrieben. Während über die Isoformen Filamin A und B die Bindung zwischen Aktin-Stressfasern und den Integrin-Rezeptoren vermittelt wird (Nakamura *et al.*, 2011), verknüpft Filamin C die Membranrezeptoren mit den Aktinfilamenten an der Z-Scheibe der Sarkomere der quergestreiften Muskulatur (Mao and Nakamura, 2020).

Das Multidomänenprotein liegt dabei als Homodimer vor (Nakamura *et al.*, 2011), das nur über die letzten Domänen verknüpft ist und folglich eine hohe Deformationsfähigkeit und eine Konformationsöffnung als Reaktion auf Krafteinwirkung erlaubt (Rognoni *et al.*, 2014). So wird die Bindung von Filamin A an  $\beta$ -Integrin durch eine autoinhibierte Bindungstasche nur unter Öffnung der Struktur bei bereits sehr geringen Kräften durch Dehnung ermöglicht und

gewährleistet auf diese Weise eine Stabilisierung des Zellkortex (Rognoni *et al.*, 2012). Allerdings wird die Bindung von Filamin an  $\beta$ -Integrin bei zu großer Krafteinwirkung wieder aufgelöst (Swaminathan and Gloerich, 2021). Für die Filamin Isoformen A und C ist unter mechanischer Dehnung ein selektiver Autophagie-Abbauweg beschrieben über den die entfalteten Ig-Domänen 19-21 von Filamin erkannt werden und so die Autophagie induzieren (siehe 1.3.3.2).

Das ebenfalls mechanosensitive Protein p130Cas besitzt sowohl N- als auch C-terminal Bindedomänen für die Tyrosinkinase Src mit einer dazwischen liegenden Substratdomäne (Nakamoto *et al.*, 1997). Die Substratdomäne besteht aus 15 Tyrosin-Phosphorylierungsstellen mit YxxP Motiv, die mit Ig-Domänen in einer Tertiärstruktur verpackt und ohne Krafteinwirkung verborgen vorliegen (Defilippi *et al.*, 2006). Durch mechanische Dehnung kommt es zu einer Freisetzung der verborgenen Phosphorylierungsstellen und einer verstärkten Phosphorylierung der YxxP Motive. Diese Phosphorylierung wird über Src Kinasen vermittelt. Die Anzahl phosphorylierter YxxP Motive ist dabei abhängig von der Amplitude der Dehnung und vermittelt die Aktivierung des Ras-ähnlichen Proteins 1 (Rap1) (Sawada *et al.*, 2006).

Über die GTPase Rap1 wird unter anderem die Affinität der Integrine an die Proteine der EZM verstärkt (Hattori and Minato, 2003). Weiterhin ist die Phosphorylierung von p130Cas für die Reorientierung als mechanosensitive Antwort auf zyklische Dehnung notwendig, da eine Deletion von p130Cas sowie Mutationen der YxxP Motive zu einer Verlangsamung der Reorientierung führten (Niediek *et al.*, 2012).

Das Protein Vinculin (*lat. vinculum* = Bindung), welches sowohl in der Stabilisierung von FAs als auch AJs (siehe 1.2.4) eine wichtige Rolle spielt, ist ein mechanosensitives Protein, das über die ebenfalls mechanosensitiven Proteine Talin und  $\alpha$ -Catenin kraftinduziert rekrutiert wird (siehe 1.2.3.1 und 1.2.4). Mechanische Kräfte bewirken das Öffnen der autoinhibierten Konformation. Die Öffnung wird durch Bindung an weitere FA-Proteine an die Vinculin Kopf- und Schwanzdomäne ermöglicht. Durch Öffnung der Struktur kommt es zur Freigabe weiterer Proteinbindestellen (Atherton *et al.*, 2016). Vinculin vermittelt über seine Schwanzdomäne zudem eine *catch-bond* mit F-Aktin und verstärkt somit unter Bindungsstärke der Adhäsionsstrukturen mit dem Aktomyosin Netzwerk (Huang *et al.*, 2017).

#### 1.2.4 Adhärenzverbindungen (AJs)

Neben der Zell-EZM-Verankerung der FA ist auch die Zell-Zell-Verbindung der Adhärenzverbindung (AJ = *Adherens junction*) mit dem Aktin-Zytoskelett verknüpft und hat eine tragende mechanosensitive Rolle in der Homöostase von Zellschichten und Geweben (Bazzoni and Dejana, 2004) (Abbildung 1.7).

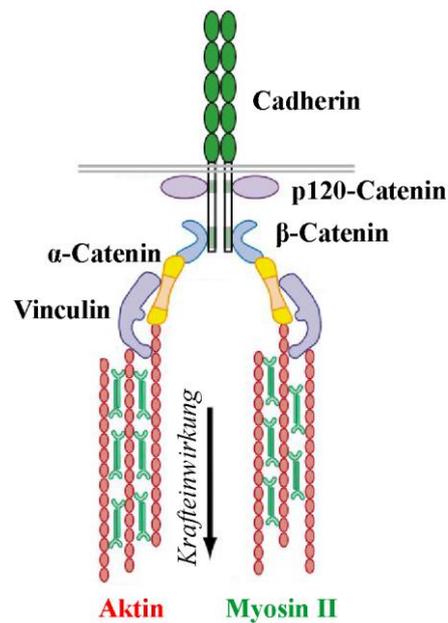
Die zentralen Moleküle zum Aufbau der AJ stellen die transmembranen Cadherine dar, die gewebespezifisch eingeordnet werden, wie z.B. E-Cadherin (epitheliales Cadherin). Cadherine liegen als Homodimere vor und bestehen aus einer intrazellulären, einer transmembranen und einer extrazellulären Domäne. Auf der extrazellulären Domäne liegen fünf Wiederholungen einer Kalziumbindestelle. Bei Anwesenheit von Kalzium-Ionen ( $\text{Ca}^{2+}$ ) lagern diese sich an die Bindestellen an und bewirken eine Konformationsänderung und damit Stabilisierung der Cadherine. Dadurch kann im Interzellularraum eine Bindung eines ebenfalls durch Kalzium stabilisierten Cadherin-Moleküls einer benachbarten Zelle über eine homophile Bindung erfolgen (Twiss and de Rooij, 2013).

Die Cadherine sind über die transmembrane Domäne in der Zellmembran verankert und wechselwirken intrazellulär mit Proteinen der Catenin-Familie, über die eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett hergestellt wird (van Roy and Berx, 2008). Das Protein p120-Catenin bindet an die juxtamembrane Region des Cadherins, stabilisiert die Adhäsion an der Zelloberfläche durch eine Clusterbildung mit weiteren Cadherinen und induziert so regulatorische Signalkaskaden über Rho GTPasen (Kourtidis *et al.*, 2013).  $\beta$ -Catenin bindet wiederum C-terminal an E-Cadherin und ist essentiell für die Ausbildung einer stabilen Adhäsionsstruktur durch die Rekrutierung des Aktin-bindenden  $\alpha$ -Catenins (Twiss and de Rooij, 2013).

$\alpha$ -Catenin ist das am besten untersuchte mechanosensitive Protein in AJs und ist essentiell für die Übertragung mechanischer Signale zwischen Zellen (Yonemura *et al.*, 2010). Dabei ist die kraftinduzierte Auffaltung der Struktur und die Freigabe von verborgenden Vinculin-Bindungsstellen abhängig von der vorherigen Bindung an Aktin und  $\beta$ -Catenin (Angulo-Urarte *et al.*, 2020).

Die Bindung von Vinculin ermöglicht nachfolgend die Stabilisierung der Adhäsionsstruktur (Twiss and de Rooij, 2013). Die Rekrutierung des Mechanosensors Vinculin erfolgt hierbei erst nach Phosphorylierung am Tyr822 durch Bindung an sowohl  $\alpha$ -Catenin als auch  $\beta$ -Catenin (Bays *et al.*, 2014). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Anwesenheit von AJs in Keratinozyten Monozellschichten für eine Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts als Reaktion auf zyklische

Dehnung notwendig ist (Noethel *et al.*, 2018). Daher wurden diese Strukturen in der vorliegenden Arbeit neben den mechanosensitiven FAs ebenfalls untersucht.

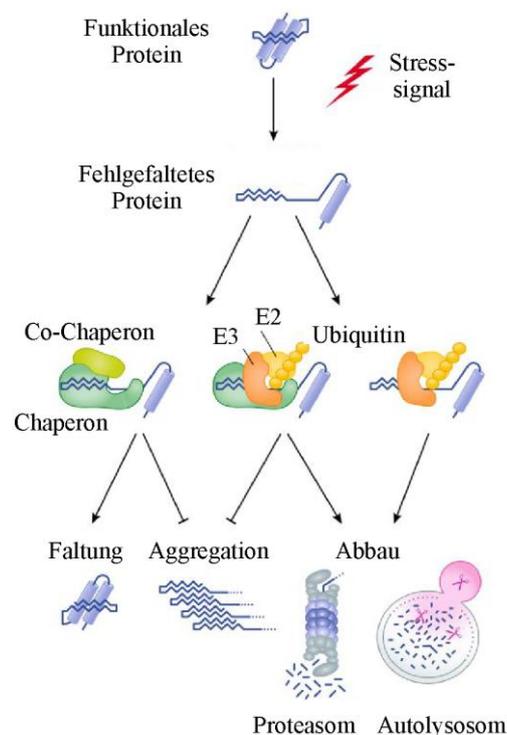


**Abbildung 1.7: Schematische Darstellung einer Adhärenzverbindung (AJ).** Dargestellt ist eine AJ nach einer kraftinduzierten Stabilisierung durch Vinculin. Verändert nach (Twiss and de Rooij, 2013).

### 1.3 Proteinhomöostase (Proteostase)

Die Proteinhomöostase (Proteostase) beschreibt das zelluläre Gleichgewicht zwischen der Neusynthese, bestehend aus Transkription, Translation und der Faltung zum funktionalen Protein und dem Abbau von Proteinen. Die Proteinhomöostase ist dabei essentiell für die Aufrechterhaltung eines hohen Levels funktionaler Proteine und den Abbau irreversibel beschädigter oder fehlgefalteter Proteine. Über die Proteinhomöostase ist die Zelle zudem in der Lage sich an extreme Stressbedingungen wie Nährstoffmangel, Beschädigung von Zellorganellen, Infektionen, Temperaturwechsel oder auch mechanischen Stress anzupassen und zu überleben (Jayaraj *et al.*, 2020).

Bei einer Störung des zellulären Gleichgewichts kann es zur Aggregation fehlgefalteter, nicht-funktionaler Proteine in der Zelle kommen und damit schwerwiegende neuronale Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson, aber auch verschiedene Muskelerkrankungen verursachen (Arndt *et al.*, 2010; Hartl, 2017; Hipp *et al.*, 2019; Klionsky *et al.*, 2021). Fehlgefaltete Proteine in einer gesunden Zelle werden entweder durch molekulare Chaperone erkannt und in ihre funktionale Form zurückgefaltet, oder falls irreversibel zerstört, mit Hilfe der Chaperone über das proteasomale oder autolysosomale System abgebaut (Abbildung 1.8) (Klaips *et al.*, 2018).



**Abbildung 1.8: Schematische Darstellung der Rückfaltung und des Abbaus von fehlgefalteten Proteinen.** Fehlgefaltete Proteine müssen entweder durch das Chaperon-System in die funktionale Form zurückgefaltet, oder mit Hilfe der Chaperone durch das Ubiquitin-Proteasom-System oder das Autolysosom zur Vermeidung von toxischen Proteinaggregaten abgebaut werden. Verändert nach (Höhfeld *et al.*, 2021).

### 1.3.1 Das Molekulare Chaperon-System

Proteine der Chaperonfamilie interagieren mit anderen Proteinen und falten diese in ihre funktionale, dreidimensionale Struktur nach der Neusynthese und Beschädigung oder binden zur Aufrechterhaltung der Struktur intakte Proteine (Hartl, 1996). Chaperone werden unter Stressbedingungen häufig verstärkt exprimiert und daher auch als Hitzeschockproteine (HSP) bezeichnet. Sie werden nach ihrem Molekulargewicht in verschiedene Gruppen unterteilt wie z.B. HSP70 oder HSP90 (Hartl *et al.*, 2011).

Die N-terminale Bindung der Chaperone an hydrophobe Bereiche entfalteter Proteine erfolgt unter ATP-Hydrolyse (Jeng *et al.*, 2015). Die Bindung und Funktion der Chaperone wird durch Co-Chaperone reguliert, die in der Regel nicht direkt mit dem Substrat interagieren. Die J-Domänenproteine (JDP) sind Multidomänenproteine, die durch eine Bindung an die Nukleotid- und Substratbindedomäne das Substratprotein zum HSP70 rekrutieren. Die JDPs stimulieren nach Bindung an HSP70 die ATP-Hydrolyse und damit die Bindung zwischen HSP70 und Substratprotein (Faust *et al.*, 2020).

Die Freigabe des Substratproteins nach Faltung ist über Bindung von Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs) an HSP70 reguliert. *B-cell lymphoma 2 associated anthanogen 3* (BAG3) ist der am stärksten an HSP70 bindende NEF (Rauch and Gestwicki, 2014; Rauch *et al.*, 2017). BAG3 ist als Mitglied der BAG-Proteinfamilie ein hochkonserviertes Multidomänenprotein, welches mit seiner BAG-Domäne an die Nukleotidbindedomäne von HSP70 bindet (Klimek *et al.*, 2017). Dies bewirkt die Freilassung von ADP von HSP70 und ermöglicht folglich die erneute Bindung von ATP (Rauch *et al.*, 2017). Über weitere Bindemotive interagiert BAG3 wiederum mit anderen kleinen Hitzeschockproteinen wie z.B. HSPB8, die weitere Funktionen im HSP70 Chaperon-System haben (Arndt *et al.*, 2010; Klimek *et al.*, 2017). Die kleinen Hitzeschockproteine (sHSP) sind ATP-unabhängig in ihrer Funktion und verhindern häufig die Aggregation fehlgefalteter Proteine. Die verschiedenen sHSPs sind dabei entweder ubiquitär oder nur gewebespezifisch vorhanden und können auch stressinduziert z.B. durch mechanischen Stress verstärkt exprimiert werden (Boelens, 2020; Collier and Benesch, 2020). HSPB8 ist besonders in stark mechanisch beanspruchten Zellen wie Muskelzellen vorhanden und interagiert zusätzlich mit Proteinen, die mit dem Aktin-Zytoskelett oder Intermediärfilamenten in Verbindung stehen wie z.B. Filamin (Collier and Benesch, 2020).

Ist ein Protein irreversibel zerstört, kann es vom Chaperon-System nicht mehr rückgefaltet werden und wird durch Kooperation mit den Abbauwegen des Proteasoms oder der Autophagie für die Bereitstellung von Aminosäuren recycelt (Gamerding *et al.*, 2009).

### 1.3.2 Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist der häufigste zelluläre Abbauweg für Proteine. Dabei werden die abzubauenen Proteine durch eine Ubiquitinierung markiert, durch das 26S-Proteasom erkannt und abgebaut (Sahu and Glickman, 2021). Das 26S-Proteasom ist ein Komplex aus der katalytischen 20S Untereinheit und ein bis zwei regulatorischen 19S Untereinheiten. Dabei erkennen die 19S Untereinheiten die ubiquitinierten Proteine und die 20S Untereinheit baut diese proteolytisch ab (Arrigo *et al.*, 1988; Eytan *et al.*, 1989).

Die Ubiquitinierung der Proteine erfolgt zuvor durch ein Konjugationssystem aus drei Enzymen. Das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 hydrolysiert dabei an Ubiquitin gebundenes ATP und stellt somit eine Bindung zum Ubiquitin her. Das Ubiquitin-konjugierende Enzym E2 übernimmt anschließend den Ubiquitinrest vom E1 und bindet die Ubiquitin-Ligase E3. Die Ubiquitin-Ligase erkennt das abzubauenen Protein und ermöglicht die Übertragung des Ubiquitinrests von E2 auf das Protein über eine kovalente Bindung (Hochstrasser, 1996). Da der Proteasom-vermittelte Abbau für diese Arbeit nur am Rande eine Rolle spielt, wird dieser hier nicht weiter erläutert.

### 1.3.3 Autophagie

Der Begriff Autophagie aus dem altgriechischen „*sich selbst verzehrend*“ wurde 1963 von de Duve erstmalig verwendet und bezeichnet den komplexen, zellulären Prozess zum Abbau zelleigener Bestandteile wie fehlgefaltete Proteine, Proteinaggregate und ganze Zellorganellen (Dikic and Elazar, 2018).

Autophagie findet auf einem basalen Niveau kontinuierlich innerhalb der Zelle statt und wird insbesondere in Stresssituationen wie Nährstoffmangel (Wang and Qin, 2013), oxidativem Stress (Filomeni *et al.*, 2015) oder mechanischem Stress (Ulbricht *et al.*, 2013) verstärkt ausgelöst. Die Autophagie dient dem Überleben der Zelle durch Bereitstellung grundlegender Nährstoffe in Stresssituationen und dem Abbau nicht benötigter Zellbestandteile.

Der eigentliche Abbaumechanismus beruht dabei auf der Funktion des Lysosoms. Im Gegensatz zum Proteasom sind Lysosomen in der Lage neben Proteinen auch eine Vielzahl weiterer Molekülklassen abzubauen, darunter Kohlenhydrate, Lipide und Nukleinsäuren. Der Abbau wird durch über 50 saure Hydrolaseenzyme ermöglicht. Diese sind zum Schutz der Zelle nur im sauren pH-Wert (4,5-5,5) des Lysosoms aktiv. Dieser wird durch eine vakuoläre ATPase (V-ATPase) erreicht, welche die Protonen ins Innere des Lysosoms schleust (Yang and Wang, 2021).

### 1.3.3.1 Hauptformen der Autophagie

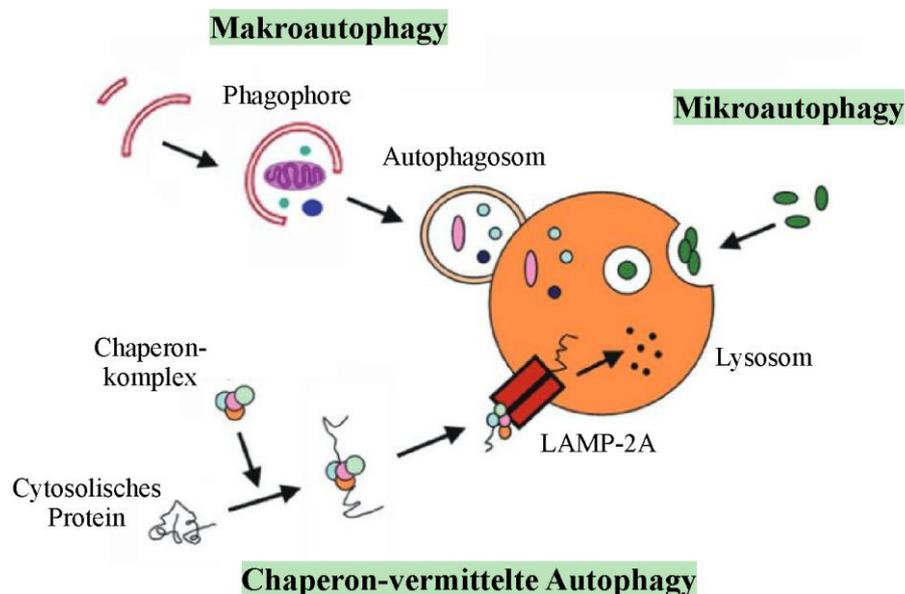
Autophagie wird grob in die drei Formen Makroautophagie, Mikroautophagie und Chaperon-vermittelter Autophagie eingeteilt (Abbildung 1.9) (Wang and Qin, 2013).

Die Makroautophagie beschreibt den Hauptmechanismus der Autophagie, bei der Teile der Membran des Endoplasmatischen Retikulums oder auch anderer Organellen die abzubauenen Proteine oder Organellen umschließen (Ausbildung einer Phagophore), bis diese ganz von einer Doppelmembran umschlossen sind.

Das so entstandene Autophagosom (AP) wird anschließend zum Lysosom transportiert. Dort fusioniert die äußere Membran des AP mit der des Lysosoms und das komplette AP wird mitsamt der Fracht vollständig durch die sauren Hydrolasen im Lysosom abgebaut (Feng *et al.*, 2014).

Bei der Mikroautophagie kommt es nicht zur Ausbildung von APs, sondern zur direkten Aufnahme der abzubauenen Substrate durch Einstülpung der lysosomalen Membran und dem anschließenden Abbau (Schuck, 2020).

Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden Substrate vom Hitzeschockprotein HSC70 erkannt, gebunden und rezeptorvermittelt über das lysosomal-assoziierte Protein 2a (LAMP-2A) ins Lysosom geschleust und abgebaut (Kaushik and Cuervo, 2018).



**Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der Hauptautophagieformen.** Es wird zwischen den drei Autophagieformen Makroautophagie, Mikroautophagie und der Chaperon-vermittelten Autophagie unterschieden. Verändert nach (Wang and Qin, 2013).

### 1.3.3.2 Chaperon-assistierte, selektive Autophagie (CASA)

Nachdem der Prozess der Autophagie lange als unspezifisch galt, wurden in den letzten Jahren zahlreiche selektive Autophagie-Stoffwechselwege aufgedeckt (Dikic and Elazar, 2018). Die Chaperon-assistierte, selektive Autophagie (CASA) spielt in dieser Arbeit eine wichtige Rolle und wird im Folgenden ausführlich erläutert.

CASA stellt eine Unterkategorie der Makroautophagie dar, die bisher größtenteils in Muskel- und Nervenzellen untersucht wurde (Arndt *et al.*, 2010; Ulbricht *et al.*, 2013). CASA beschreibt ein Zusammenspiel des Chaperons HSC70, des Co-Chaperons BAG3 und dem kleinen Hitzeschockprotein HSPB8 sowie einiger anderer Adapterproteine (Abbildung 1.10) (Arndt *et al.*, 2010; Ulbricht and Höhfeld, 2013).

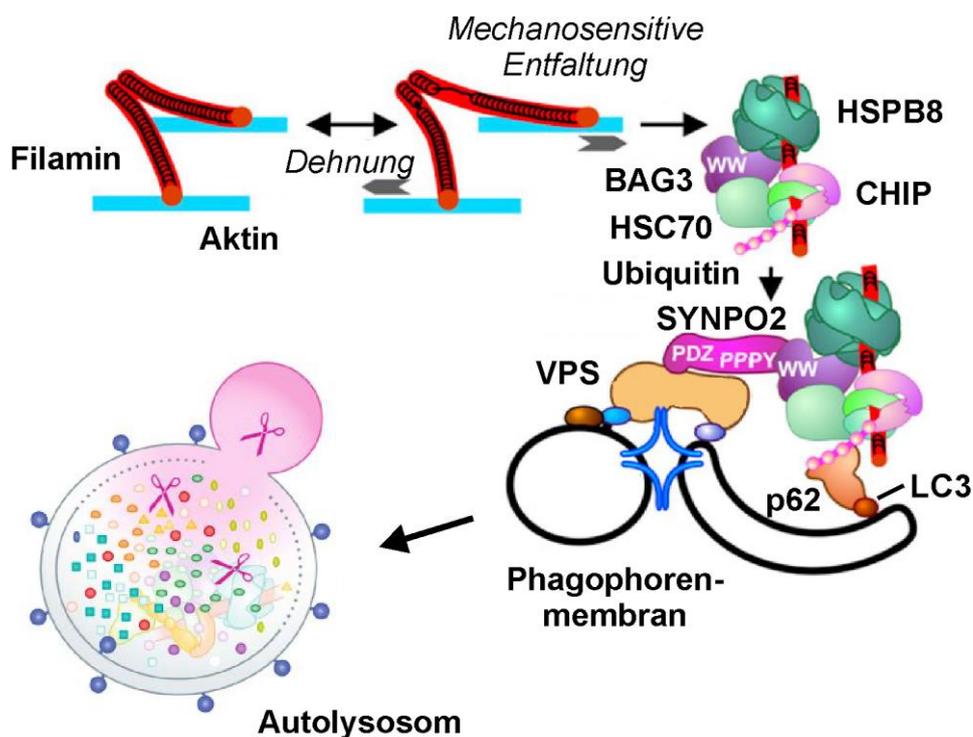
Die abzubauenen Proteine werden durch das sHSP HSPB8 erkannt und über das Co-Chaperon BAG3 die Bindung zum HSC70 vermittelt, welches ebenfalls an das abzubauenen Protein bindet. Durch die HSC70-assoziierte Ubiquitin-Ligase CHIP/STUB1 (*C terminus of HSC70-interacting protein*) wird das Zielprotein ubiquitiniert und somit durch den Ubiquitin-Adapter p62/ SQSTM1 erkannt. Das Adapterprotein p62 vermittelt schließlich die Bindung an die Phagophorenmembran über LC3/ ATG8 (Ulbricht and Höhfeld, 2013; Höhfeld *et al.*, 2021).

Die drei gewebespezifischen Spleißvarianten von LC3 (A, B und C) werden über die Cysteinprotease ATG4 durch die Abtrennung eines Glycinrests am C-Terminus von pro-LC3 zu LC3-I geschnitten. Mittels der Übertragung eines Phosphatidethanolamin (PE) an LC3-I vermittelt von ATG7 (Lipidation) wird dieses zu LC3-II und kann über das Phospholipid in die Phagophorenmembran eingebaut werden (Tanida *et al.*, 2004). Für die Fusion des APs mit dem Lysosom ist weiterhin eine Phosphorylierung des Threonin 50 von LC3 über die Serin-Threonin-Kinasen 3 und 4 (STK3 und STK4) notwendig (Wilkinson *et al.*, 2015).

Zusätzlich wird über das HSC70 und HSPB8 bindende Protein BAG3 mittels seiner WW Domäne eine Verbindung des Komplexes zum Adapterprotein Synaptopodin 2 (SYNPO2) durch eine Prolin-reiche Domäne vermittelt. Die PDZ-Domäne des SYNPO2 bindet wiederum an den membranfusionierenden Komplex aus SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive attachment receptor*) und VPS (*vacuolar protein sorting*) Proteinen und gewährleistet so eine spätere Fusion mit dem Lysosom (Chen and Scheller, 2001; Ulbricht *et al.*, 2013).

Die CASA wurde bisher in glatten Muskelzellen und der quergestreiften Muskulatur für den Abbau von mechanisch beschädigtem Filamin beschrieben (Arndt *et al.*, 2010; Ulbricht *et al.*, 2013). Dabei bindet BAG3 an die Ig-Domänen 19-21 des beschädigten Filamins und rekrutiert die Hitzeschockproteine HSC70 und HSPB8. Hierdurch wird der Abbau des Proteins durch die CASA initiiert (Ulbricht *et al.*, 2013; Klimek *et al.*, 2017).

Der Abbau konnte sowohl für die Isoform Filamin C in quergestreifter Muskulatur als auch für die Isoform Filamin A in glatter Muskulatur nachgewiesen werden (Ulbricht *et al.*, 2013). Der Abbau von Filamin konnte durch eine zyklische Dehnung des Substrats der glatten Muskelzellen initiiert und durch Inhibition des lysosomalen Abbaus verhindert werden (Ulbricht *et al.*, 2013). Ein über Krafttraining induzierter Abbau von Filamin konnte ebenso in der humanen Muskulatur untersucht werden (Ulbricht *et al.*, 2015) und deutet damit auf eine Organismen übergreifende Rolle der CASA für den Abbau von Filamin und möglicherweise auch weiterer mechanosensitiver Proteine hin.



**Abbildung 1.10: Schematische Darstellung der Chaperon-assistierten, selektiven Autophagie (CASA).** Dargestellt ist der Abbau von irreversibel beschädigtem Filamin nach mechanischer Entfaltung durch zyklische Dehnung über die Chaperon-assistierte, selektive Autophagie. Verändert nach (Ulbricht *et al.*, 2013; Höhfeld *et al.*, 2021).

Bei Fehlfunktionen im Abbau von Filamin in der Skelettmuskulatur kann dies zu verschiedenen Muskeldystrophien führen (Fürst *et al.*, 2013). Weiterhin bewirkt ein Aminosäureaustausch der HSPB8-Bindestelle in BAG3 restriktive Kardiomyopathien in Mäusen (Kimura *et al.*, 2021). Darüber hinaus wurden in Kardiomyozyten neben andern Sarkomer-Proteinen das mechanosensitive Protein Spektrin, welches ebenfalls eine Verbindung zwischen Aktin-Zytoskelett und Membranproteinen vermittelt, als potenzielle Klienten der CASA Maschinerie beschrieben (Martin *et al.*, 2021).

Neben der essentiellen Notwendigkeit der CASA in allen Muskelzellsubtypen, gewinnt CASA auch zunehmend Bedeutung in anderen Zellkontexten. So wird HSPB8 in der Induktion und Progression von Tumorerkrankungen (Cristofani *et al.*, 2021) insbesondere auch im Zusammenhang mit den weiteren Komponenten der CASA Maschinerie (Roperto *et al.*, 2018) aktuell untersucht.

Zusätzlich lassen sich auch alle Komponenten der CASA Maschinerie in den mechanisch stark belasteten Podozyten, bedingt durch den Blutfluss bei der Nieren-Filtrations-Barriere, aufweisen (Rinschen *et al.*, 2018). Zusätzlich deutet die Anwesenheit von Filamin im Podozyten-Super-Komplex auf die einen Zelltyp-übergreifenden Mechanismus der CASA hin (Höhfeld *et al.*, 2021). Darüber hinaus spielen mechanische Signale in einer Vielzahl an Immunzellen, bedingt durch die Scherkräfte des Blutflusses und die Migration ins umliegende Gewebe, eine tragende Rolle (zusammengefasst in (Höhfeld *et al.*, 2021)). So konnten beispielsweise durch Stimulation der Adhäsion von T-Lymphoblasten die Expression von BAG3 und Filamin erhöht werden (Ulbricht *et al.*, 2013).

### 1.3.3.3 Abbau-unabhängige Funktionen von BAG3

BAG3 hat neben seiner Beteiligung in CASA durch seine zahlreichen Bindedomänen auch viele weitere Interaktionsmöglichkeiten in vielfältigen Signalwegen (Sherman and Gabai, 2022).

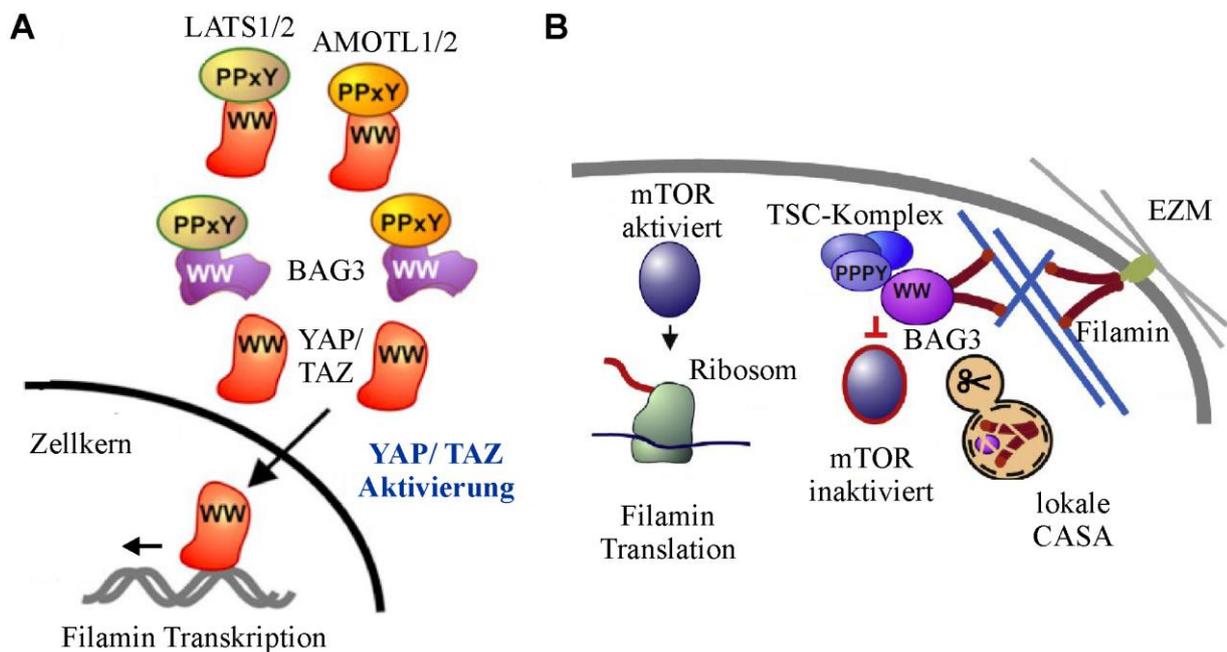
So interagiert BAG3 über seine WW Domäne auch mit Proteinen des Hippo-Signalwegs (Salah and Aqeilan, 2011). BAG3 bewirkt über die Bindung der Inhibitoren *large tumor suppressor* Kinasen 1 und 2 (LATS1/2) und die Angiomotin-ähnlichen Proteine 1 und 2 (AMOTL1/2) die Freisetzung des Yes-assoziierten Proteins (YAP) und des homologen transkriptionalen Co-Aktivators mit PDZ-Bindemotiv (TAZ) (Abbildung 1.11 A) (Ulbricht *et al.*, 2013).

Diese Transkriptions-Co-Aktivatoren stimulieren im unphosphorylierten Zustand u.a. die Transkription von Filamin über den TEA-Domänen Transkriptionsfaktor (TEAD) und gewährleisten dadurch die Aufrechterhaltung eines funktionalen Filamin-Proteinpools und damit

eine Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts unter mechanischer Beanspruchung (Ulbricht *et al.*, 2013).

Zusätzlich interagiert BAG3 mit dem Tuberösen Sklerosekomplex (TSC-Komplex), wodurch lokal an den Stressfasern mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) gehemmt und CASA induziert wird (Abbildung 1.11 B). Im Gegensatz dazu bleibt mTOR im Zytosol aktiv und stimuliert die Translation von Filamin (Kathage *et al.*, 2017).

Dadurch ist BAG3 nicht nur für den Abbau, sondern auch für die Neusynthese von Filamin und möglicher weiterer mechanosensitiver Proteine wichtig und für die Homöostase von Muskelzellen bei mechanischer Beanspruchung unerlässlich.



**Abbildung 1.11: BAG3 vermittelte Transkription und Translation von Filamin.** Dargestellt ist (A) die BAG3 vermittelte Aktivierung der Transkriptions-Co-Aktivatoren YAP/TAZ zur Transkriptions-initiation von Filamin sowie (B) die BAG3 abhängige lokale Inhibition von mTOR an den Stressfasern bei gleichzeitiger Aktivierung von mTOR im Zytosol der Zelle zur Förderung der Translation. Verändert nach (Ulbricht *et al.*, 2013; Kathage *et al.*, 2017).

## 1.4 Ziel der Arbeit

Die Zellen und Gewebe unseres Körpers sind ständigen mechanischen Reizen ausgesetzt. Um die zelluläre Homöostase aufrecht zu erhalten und zu überleben, müssen sich die Zellen kontinuierlich an diese Reize anpassen. Dies geschieht maßgeblich über mechanosensitive Proteine und Adhäsionsstrukturen des Aktin-Zytoskeletts sowie des Zytoskeletts selbst. Mechanosensitive Proteine vermitteln die Umwandlung mechanischer in chemische Signale über Konformationsänderungen. Bei einer irreversiblen Zerstörung der Proteinkonformation, müssen die Proteine erkannt und aus dem zellulären System entfernt werden, um Fehlfunktionen der Zelle zu verhindern. Die genauen Mechanismen des Abbaus sind bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Ein intensiv diskutierter Abbauweg mechanosensitiver Proteine stellt dabei die Chaperon-assistierte, selektive Autophagie (CASA) dar. So konnte für das mechanosensitive Protein Filamin der Abbau mechanisch beschädigten Filamins in quergestreifter und glatter Muskulatur über CASA nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass CASA weitere mechanosensitive Proteine nach mechanischer Auffaltung und Beschädigung abbaut, insbesondere an den mechanosensitiven Adhäsionsstrukturen der FAs und AJs.

Um diese Hypothese zu untersuchen, wird in dieser Arbeit die uniaxiale, zyklische Dehnung als mechanischer Reiz in glatten Muskelzellen und anderen Zelltypen sowohl bei Einzelzellen als auch Monozellschichten angewendet. Dieser mechanische Reiz ist für viele Zellen unseres Körpers hoch relevant und stellt eine gute Möglichkeit für einen klar definierbaren Reiz dar. Um aufzuklären, ob Autophagie im Zusammenhang mit mechanischer Dehnung von Zellen steht, soll die Autophagie zunächst nach Dehnung mit physiologischen Parametern zeitlich quantifiziert werden. In einem nächsten Schritt soll diese zeitliche Analyse mit der Aktin und Zellkörper Reorientierung entgegen der Dehnungsrichtung in Korrelation gesetzt werden.

Da mechanosensitive Moleküle an mechanisch prädestinierten Stellen der Zelle lokalisiert sind, wird ein enger Zusammenhang zwischen Zellkontraktilität und Mechanosensitivität postuliert. Aus diesem Grund sollen die vorher genannten Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen Reorientierung und Autophagie auch unter positiver sowie negativer Modifikation der Zellkontraktilität wiederholt werden. Zu diesem Zweck soll einerseits die Kontraktilität der Zellen, bemessen an Aktin-Stressfasern und FAs, über die RhoA-Signalkaskade verstärkt induziert und andererseits inhibiert werden.

Um den möglichen Einfluss der CASA Maschinerie in dem Prozess der Mechanosensitivität zu untersuchen, soll des Weiteren das am Abbau beteiligte Protein BAG3 in den Zellen durch eine nicht funktionale Mutante ersetzt oder genetisch inhibiert werden. Anschließend wird der Einfluss von BAG3 in der Reorientierung der Zellen analysiert. Da BAG3 ebenfalls eine Rolle in der Initiation der Transkription von Filamin hat, soll der Einfluss der Inhibition von YAP sowie der gesamten Proteinbiosynthese in der Reorientierung ebenfalls untersucht werden.

Nach der Analyse der grundlegenden Zusammenhänge zwischen Autophagie und Mechanosensitivität, sollen die mechanosensitiven Proteine der FAs und AJs und einiger an der CASA Maschinerie beteiligten Proteine nach uniaxialer, zyklischer Dehnung detailliert quantifiziert werden. Bei einer gleichzeitigen Untersuchung der Proteinkonzentrationen bei blockiertem lysosomalen Abbau der Autophagosomen, sollen weitere mögliche Klienten der CASA ermittelt werden. Im Anschluss soll das mechanische Signal über eine biaxiale, zyklische Dehnung aufrechterhalten und auf diese Weise ein dauerhafter mechanischer Reiz auf die Proteine untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist es unter dem Einfluss einer zyklischen Dehnung die zunehmende Bedeutung der CASA und deren spezifische Selektivität in der zellulären Mechanosensitivität über weitere Abbauclienten in den mechanosensitiven Adhäsionsstrukturen der FAs und AJs zu erweitern. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen damit dem besseren Verständnis der komplexen zellulären Regulationsmechanismen der mechanosensitiven Adaptation von Zellen auf mechanische Reize und dem Einfluss von Fehlfunktionen dienen.



---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Analog Vortex Mixer	VWR, Radnor, USA
Cryo Einfriercontainer (Mr. Frosty)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Exsikkator	Duran, Wertheim, Deutschland
Feinwaage AX26 Comperator	Mettler Toledo, Columbus, USA
Feinwaage JB 1603-C/ FACT	Mettler Toledo, Columbus, USA
Feinwaage TE 214S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	B Medical Systems, Hosingen, Luxemburg
Gel Dokumentationssystem GelDoc Station XR <sup>+</sup>	Bio-Rad, Hercules, USA
Gussform für elastische Silikonkammern	Eigenbau; Forschungszentrum Jülich, Deutschland
Heizblock SBH 130 D	Stuart Equipment, Staffordshire, Vereinigtes Königreich
Inkubator Heracell 150i	Thermo Fisher, Waltham, USA
Kammerhalterung für elastische Silikonkammern	Eigenbau; Forschungszentrum Jülich, Deutschland
konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 880)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Magnetrührer RCT Basic	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroskop Axio Observer	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop Axio Vert. A1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mini-Protean Elektrophorese System	Bio-Rad, Hercules, USA
Moxi Z Mini Zellzählgerät	Orflo, Ketchum, USA
Objektiv 40x C-Apochromat/ 1.2 W Autocorr M27	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Objektiv 40x EC-Plan Neofluar/1.3 Öobjektiv	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Objektiv 63x Plan-Apochromat/1.4 Öobjektiv	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Pipetten 10 µl bis 5000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipettierhelfer accu-jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
Schüttler ROCKER 2D digital	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Sterilwerkbank Herasafe KS	Thermo Fisher, Waltham, USA
Transferringpipette	Brand, Wertheim, Deutschland
Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Vortex Genie 2	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Wärmeschrank UN75	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad WNE 10	Memmert, Schwabach, Deutschland
Western Blot System Mini Trans-Blot	Bio-Rad, Hercules, USA
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 8R	Heraeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 8R	Thermo Fisher, Waltham, USA
Zugapparatur für Dehnungsexperimente	Eigenbau; Forschungszentrum Jülich, Deutschland

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Material	Hersteller
4-20% Mini-Protean TGX Precast Proteingele	Bio-Rad, Hercules, USA
Deckgläser #0, Ø 15 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Deckgläser, 80-120 µm Dicke, Ø 25 mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Filterpapier für Western Blots	Bio-Rad, Hercules, USA
Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Kanülen Sterican Gr. 18	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Kimtech Science Präzisionswischtücher	KC-Professional, Roswell, USA
Kryo-Ettiketten	Cole Parmer, Wertheim, Deutschland
Kryo-Röhrchen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Latexhandschuhe	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
Linsenreinigungstücher	Whatman, Maidstone, Vereinigtes Königreich

---

Moxi Kassetten S	Gemini Bio, West Sacramento, USA
Nitrilhandschuhe	Ansell, Richmond, Australien
Nitrocellulosemembran für Western Blots	GE Healthcare, Solingen, Deutschland
Objektträger	Thermo Fisher, Waltham, USA
Parafilm	Bemis, Oshkosh, USA
Petrischalen Ø 90 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen (diverse Größen)	Star Lab, Hamburg, Deutschland
Plastikrührspatel	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,2-2 ml	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 ml und 50 ml	BD Biosciences, San Jose, USA
Reinraumhandschuhe	Kimberly-Clark, Irving, USA
Spritzen 1 ml	Terumo, Laguna, Philippinen
Stanniol Aluminiumfolie	Korff AG, Dietzenbach, Deutschland
Stripetten 5 ml, 10 ml, 20 ml und 50 ml	VWR, Darmstadt, Deutschland
Wägeschiffchen, 41x41x8 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Wägeschiffchen, 89x89x25 mm	VWR, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 225 cm <sup>2</sup>	Corning, New York, USA
Zellschaber	Corning, New York, USA

---

---

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

Chemikalie	Hersteller
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
BCIP/ NBT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Chloroquin-diphosphat (CQ)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Cryo-SFM Einfriermedium	PromoCell GmbH Heidelberg, Deutschland
Cycloheximide (CHX)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
D-Glukose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DMEM (1x)	Thermo Fisher, Waltham, USA
DMEM (1x) GlutaMAX-I	Thermo Fisher, Waltham, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Fibronektin (human)	Corning, New York, USA)
Fluoromount Aqueous Mounting Medium	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Fötale Kälberserum (FCS) Premium (South America)	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
GlutaMAX (100x)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Promochem, Wesel, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Lämmli-Ladepuffer (4x)	Bio-Rad, Hercules, USA
Lipofecatamine 3000	Thermo Fisher, Waltham, USA

Lysophosphaditsäure (LPA)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Methanol	VWR, Darmstadt, Deutschland
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-H Aldehyd)	PeptaNova, Sandhausen, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Paraformaldehyd 37 %	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Phosphat gepufferte Saline pH 7,2 (PBS)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Ponceau S Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Protease-Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Protein Längenmarker 10 bis 250 kDa	Thermo Fisher, Waltham, USA
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Streptomycin Sulfatsalz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning, Wiesbaden, Deutschland
Tris Base	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Triton-X-100	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Trypsin/ EDTA (0,05%)	Thermo Fisher, Waltham, USA
Verteporfin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Y-27632	Stemcell Technologies, Vancouver, Kanada
β-Mercaptoethanol	Merck, Dramstadt, Deutschland

## 2.4 Puffer und Lösungen

**Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen**

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Komponenten</b>
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	15,5 mM NaCl 0,105 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,297 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12 H <sub>2</sub> O
Protein-Transfer-Puffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % Methanol
Lämmli-Puffer (1x)	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS
Lyse-Puffer zur Proteinisolation	RIPA-Puffer + Protease-Inhibitor-Cocktail 1:100
Zytoskelettpuffer (CB-Puffer), pH 6,1	150 mM NaCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM EGTA 5 mM D-Glukose 10 mM MES 1 g/l Streptomycin

## 2.5 Verwendete Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien

Zelltyp und Beschreibung	Herkunft	Wachstumsmedium	EnfriermEDIUM	Kultivierungsbedingungen
<b>A7r5 Wildtyp</b> (glatte Muskelzellen aus der Ratte)	AG Jörg Höfeld, Institut für Zellbiologie, Universität Bonn	DMEM (1 g/L Glukose, Pyruvat; ohne Glutamin, ohne Phenolrot) +10 % FCS Premium (Pan Biotech) +1 % Penicillin /Streptomycin +2 mM GlutaMAX	Wachstumsmedium +5 % DMSO	37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> Wassergesättigte Atmosphäre
<b>A7r5 mCHERRY-LC3B</b> (glatte Muskelzellen aus der Ratte)	AG Dagmar Wachten, Institut für angeborene Immunität, Universitätsklinikum Bonn			
<b>MEF Wildtyp</b> (murine Embryonale Fibroblasten)	AG van Echtendeckert, Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Bonn	DMEM (1x) GlutaMAX-I +10 % FCS (Gibco) +1 % Penicillin /Streptomycin	Cryo-SFM Medium	
<b>MEF ATG5-KO</b> und <b>MEF Wildtyp</b> Zellen	AG Terje Johansen UiT The Arctic University of Norway			

<b>Murine Keratinozyten Wildtyp</b>	AG Carien Niessen, Department of Dermatology, CECAD, Universität Köln	DMEM/ Ham F12 Medium (<0,5 mM Calcium) +10 % FCS Gold (Paa Laboratories) +1 % Glutamin (Biochrom) +1 % Penicillin/ Streptomycin +0,18 mM Adenin (Sigma) +0,5 mg/ml Hydrocortison (Sigma) +5 µg/ml Insulin (Sigma) +10 ng/ml EGF (Sigma) +0,05 µg/µl Cholera toxin (Sigma) +5 µg/ml Vitamin C (Sigma)	90 % FCS + 10 % DMSO	32 °C, 5 % CO <sub>2</sub> Wassergesättigte Atmosphäre	
<hr/> <b>Podozyten Wildtyp (human)</b> <hr/>					
<b>Podozyten BAG3-KO Klon 3</b>	AG Thomas Benzing, Klinik II für Innere Medizin Universitätsklinikum Köln	RPMI 1640 +10 % FBS Premium (Pan Biotech) +1 % Insulin-Transferrin-Selenium +1 % Penicillin /Streptomycin	Wachstumsmedium +40 % FBS +10 % DMSO	32 °C, 5 % CO <sub>2</sub> Wassergesättigte Atmosphäre	
<b>Podozyten BAG3-KO Klon 10</b>				Differenzierte Podozyten Wildtyp	7 Tage vor Aussähen bei 37 °C, 5 % CO <sub>2</sub>
Differenzierte Podozyten BAG3-KO Klon 3				Differenzierte Podozyten BAG3-KO Klon 10	Wassergesättigte Atmosphäre

## 2.6 Antikörper und fluoreszierende Farbstoffe

**Tabelle 6: Verwendete Primärantikörper**

Gerichtet gegen	Hergestellt in	Hersteller	Bestellnummer
BAG3 (polyklonal)	Kaninchen	Proteintech, Rosemont, USA	10599
Catenin-alpha	Kaninchen	Sigma, St. Louis, USA	C2081
Filamin A	Kaninchen	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab76289
HSPC70	Maus	Sigma, St. Louis, USA	SAB3701436
LC3B (monoklonal)	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	#2775
LC3B (polyklonal)	Kaninchen	Novus Biologicals, Littelton, USA	NB100-2220
p130Cas	Maus	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA	610272
Paxillin	Maus	Invitrogen, Carlsbad, USA	AHO0492
Talin	Maus	Sigma, St. Louis, USA	T3287
Tubulin-alpha ( $\gamma$ 1/2)	Ratte	Merck-Millipore, Burlington, USA	MAB1864
Vimentin (VIM-13.2)	Maus	Sigma, St. Louis, USA	V5255
Vinculin	Kaninchen	Invitrogen, Carlsbad, USA	700062

**Tabelle 7: Verwendete Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbungen**

Antikörper	Herstellung in	Gerichtet gegen	Hersteller	Bestellnummer
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit	Ziege	Kaninchen	Invitrogen, Carlsbad, USA	A3562
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse	Esel	Maus	Invitrogen, Carlsbad, USA	A21202

**Tabelle 8: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blot Analysen**

Antikörper	Herstellung in	Gerichtet gegen	Hersteller	Bestellnummer
Alkaline Phosphatase Anti-Kaninchen	Ziege	Kaninchen	Sigma, St. Louis, USA	A3812
Alkaline Phosphatase Anti-Ratte	Ziege	Ratte	Sigma, St. Louis, USA	A8438
Alkaline Phosphatase Anti-Maus	Ziege	Maus	Sigma, St. Louis, USA	A3562

**Tabelle 9: Verwendete fluoreszierende Farbstoffe**

Bezeichnung	Markierung von	Hersteller	Bestellnummer
Alexa Fluor™ 546 Phalloidin	F-Aktin	Invitrogen by Thermo Fisher, Waltham, USA	A22283
4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)	DNA/ RNA	Invitrogen by Thermo Fisher, Waltham, USA	R37606

## 2.7 Plasmide

**Tabelle 8: Verwendete Plasmide**

Bezeichnung	Proteinname	Resistenzgen	Ursprung	Herkunft
pEGFP-C1	GFP	Kanamycin	Aequorea victoria	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
pCMV-BAG3-WT	BAG3	Kanamycin	Homo sapiens	AG Prof. Dr. Höhfeld (Uni Bonn)
pCMV-BAG3-WAWA	BAG3	Kanamycin	Homo sapiens	AG Prof. Dr. Höhfeld (Uni Bonn)
mCHERRY-eGFP-LC3B	LC3B	Ampicillin	Homo sapiens	AG Prof. Dr. Höhfeld (Uni Bonn)

## 2.8 Programme

**Tabelle 9: Verwendete Programme**

Programm	Hersteller
Corel Draw (Version 17.1.0.572)	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
EndNote (Version X7.1 Bld 7705)	Clarivate Analytics, London, Vereinigtes Königreich
GraphPad Prism (Version 7.04)	GraphPad Software, San Diego, USA
Image J (Version 2.0.0-rc-69/1.52p)	National Institute of Health, Maryland, USA
Image Lab (Version 6.0.1 build 34)	Bio-Rad, Hercules, USA
Matlab (R2105b und höher)	MathWorks, Massachusetts, USA
Python (Version 3.8)	Python Software Foundation, Walmington, USA
Zen Black (Version 14.0.0.201)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Zen Blue (Version 3.2.0.0000)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

## 2.9 Herstellung von Zellkultursubstraten

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen aus Polystyrol. Für die Experimente wurden Substrate aus elastischem Polydimethylsiloxan sowie Glassubstrate hergestellt, um die mechanischen Eigenschaften der Zellen zu untersuchen. Diese hängen von der Elastizität ihrer Umgebung ab. Deswegen wurden in den *in vitro* Experimenten elastische Substrate verwendet, die den *in vivo* Bedingungen der Zellen möglichst nahe kommen.

### 2.9.1 Herstellung von elastischem Polydimethylsiloxan (PDMS)

Die Herstellung des Silikonkautschuks für elastische Zellkultursubstrate erfolgte mit dem Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit. Das Zweikomponentensystem besteht aus vinylterminiertem Dimethylsiloxan (Basisöl) und dem Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan Copolymer (Quervernetzer). Bei einer wärmekatalysierten Hydrolyse reagiert die Vinylgruppe des Basisöls mit dem Copolymer und bildet einen elastischen Silikonkautschuk.

Über die Variation des Mischungsverhältnisses von Basisöl und Quervernetzer lassen sich unterschiedlich steife Elastomere im Bereich von 0,6 kPa bis zu einigen GPa erzeugen. Das Silikonelastomer ist gasdurchlässig und chemisch inert, weshalb es für die Kultivierung von lebenden Zellen eine hohe Biokompatibilität besitzt. Aufgrund der zusätzliche Farblosigkeit und der linear-elastischen Eigenschaften bis zu einem Dehnungsbereich von 100 % ist das Elastomer weiterhin ideal für die in dieser Arbeit gemachten Dehnungsexperimente und die anschließende Mikroskopie geeignet.

Bei der Herstellung der elastischen Silikonkammern für die Dehnungsexperimente wurde der Quervernetzer im Gewichtsverhältnis 1:40 zum Basisöl eingewogen, wodurch ein Elastizitätsmodul von 50 kPa erzielt wurde. Um ein gleichmäßiges Elastomer zu gewährleisten, wurde das Gemisch für zehn Minuten mit einem Plastikspatel durchmischt und anschließend zur Entfernung von untergerührten Luftblasen im Exsikkator entgast. Das Gemisch wurde nun für die Herstellung der elastischen Silikonkammern verwendet.

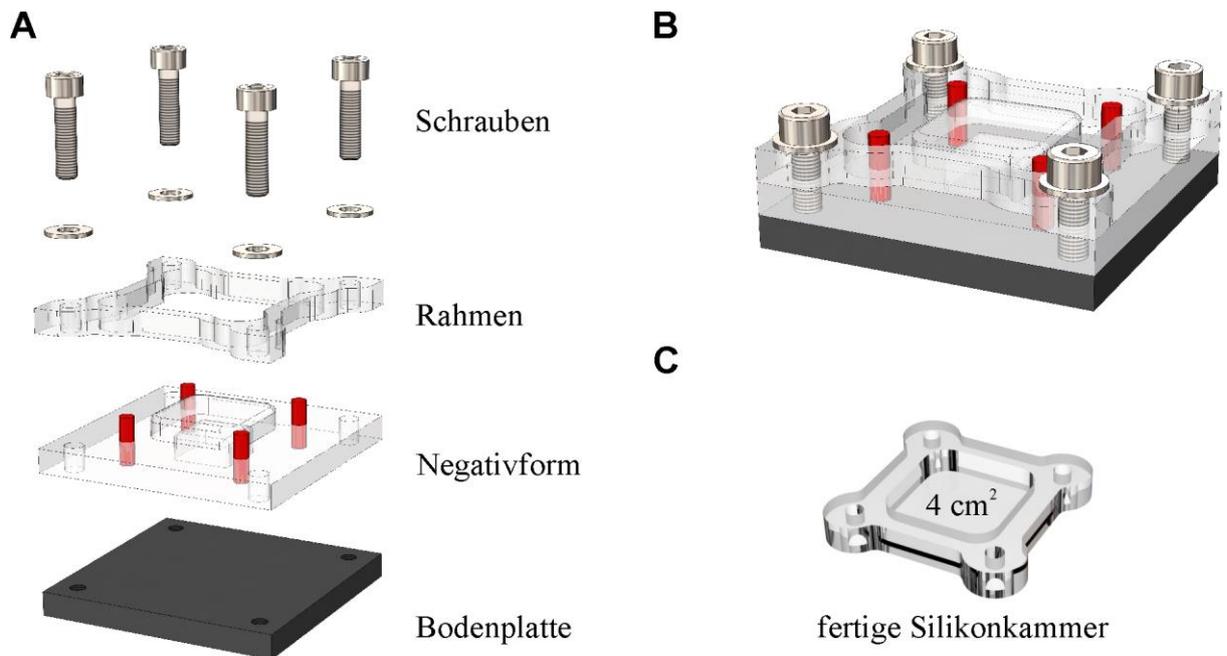
## 2.9.2 Herstellung von elastischen Silikonkammern für Dehnungsexperimente

Für Dehnungsexperimente von adhären Zellen wurden elastische Silikonkammern über die Abformung einer Gussform hergestellt. Die Gussform besteht aus einer quadratischen Bodenplatte aus eloxiertem Aluminium an der zwei Polystyrolplatten verschraubt sind (Abbildung 2.1).

Die Polystyrolplatten dienen dabei als Negativform der Silikonkammer. Die untere Platte weist eine 2 cm x 2 cm große Erhöhung auf, die eine Vertiefung in der späteren Zugkammer für die Kultivierung der adhären Zellen mit flüssigem Medium ermöglicht. An den vier Ecken der Polystyrolplatte sind zylinderförmige Acrylgasstifte eingelassen, die der Silikonkammer zur Abformung von Befestigungseinlassungen dienen. Die Acrylgasstifte stehen 0,5 cm über dem Boden der ersten Polystyrolplatte. Auf der ersten Platte liegt wiederum eine zweite auf, die als 0,5 cm hoher Rahmen für die Abformung dient. Dieser Rahmen ist mit Schrauben an der Aluminiumplatte und der ersten Polystyrolplatte befestigt.

Zur Abformung der Silikonkammern wurde nicht quervernetztes Elastomer exakt bis zum Rand der Negativform mit einer Transferpipette befüllt (3,84 ml), wodurch sich eine Dicke der Silikonkammer von 0,5 cm am Rand und 400-500  $\mu\text{m}$  in der Vertiefung zur Kultivierung der Zellen ergab. Für die Dehnungsexperimente wurde ausschließlich Elastomer mit einer Steifigkeit von 50 kPa verwendet. Nach Befüllung der Negativform der Silikonkammern mit dem Gemisch wurden die Elastomerkammern für 16 h bei 60 °C ausgehärtet. Dabei verbindet sich das Copolymer mit den Vinylgruppen des Basisöls in der wärme-katalysierten Reaktion über einen Platinkatalysator und bildet das elastische Silikonelastomer. Nach der Quervernetzung wurden die Silikonkammern aus den Abformungen herausgelöst und für die Dehnungsexperimente verwendet.

Die in Abbildung 3.15 genutzten 5 kPa Elastomerkammern wurden auf die gleiche Weise hergestellt und die Vertiefung zur Kultivierung der Zellen nach Quervernetzung zusätzlich mit 50  $\mu\text{l}$  5 kPa weichem (Mischungsverhältnis 1:60) nicht quervernetztes Elastomer benetzt und erneut für 16 h bei 60 °C ausgehärtet. Daraus ergab sich eine zusätzliche Schicht von etwa 500  $\mu\text{m}$  Dicke auf den Silikonkammern.



**Abbildung 2.1: Aufbau der Gussformen zur Herstellung von elastischen Silikonkammern.** Dargestellt ist die negative Gussform in (A) Einzelkomponenten und in (B) der zusammengebauten Form sowie (C) eine fertig abgeformte Silikonkammer (zur Verfügung gestellt von Jens Konrad, IBI-2, FZJ).

### 2.9.3 Herstellung von Glassubstraten

Zur Mikroskopie von Zellen auf nicht-elastischen Substraten wurden Glassubstrate produziert. Dafür wurden Deckgläser am Rand kreisförmig mit 1:10 gemischtem Silikonelastomer mittels einer Kanüle benetzt und unter Lochschalen geklebt, sodass die Mitte des Deckglases frei von Elastomer war. Anschließend wurde eine Aushärtung des Elastomers für 16 h bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt, zum Verkleben der Deckgläser mit den Zellkulturschalen.

## 2.10 Zellkultur

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte unter routinierten Standardbedingungen und für jedes Experiment wurden neue Zellen aus der Routinezellkultur für das Aussähen auf elastischen Silikonkammern verwendet und nach den Experimenten verworfen. Nicht mehr benötigte Zellen wurden bis zum erneuten Auftauen der Zellen für die Routinezellkultur kryokonserviert.

### 2.10.1 Routinezellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Inkubator bei 32 °C für die murinen Keratinozyten und die humanen Podozyten und bei 37 °C für die murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF), glatten Muskelzellen (A7r5) und differenzierten, humanen Podozyten in wassergedämpfter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub>.

Jeder Zelltyp wurde in seinem entsprechenden Wachstumsmedium kultiviert (Tabelle 5). Das Medium wurde alle 2-3 Tage durch neues Medium ausgetauscht. Die Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert und anschließend passagiert. Dafür wurden zunächst alle benötigten Lösungen in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Zuerst wurde das Wachstumsmedium verworfen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit einer 0,05 % Trypsin/ EDTA-Lösung von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst. Dabei löst Trypsin, ein Gemisch aus mehreren Peptidasen, die Verankerungen der Zellen zur Oberfläche des unterliegenden Substrats. EDTA komplexiert zweiwertige Kationen, die zur Ausbildung von Adhäsionsstrukturen notwendig sind.

Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Reaktion durch Zugabe von Wachstumsmedium abgestoppt und die Zellen bei 180 x g für 4 min in einem 15 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert. Dabei wurden die Zellen pelletiert und das darüber liegende Medium-Trypsin/ EDTA-Gemisch verworfen. Die Zellen wurden anschließend in frischem Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellzahl mit einem automatischen Zellzählgerät (Moxi Z Mini) bestimmt. Hierbei wird die Zellsuspension durch eine Zell-erkennende Zone geschleust, in der der Anstieg der Spannung proportional zur Partikelgröße und -anzahl gemessen wird. Dadurch kann die Zellzahl automatisch berechnet werden. Die Zellen wurden anschließend in einer entsprechenden Verdünnung mit neuem Wachstumsmedium zur Weiterkultivierung in einer neuen Zellkulturflasche oder für Dehnungsexperimente auf den Elastomer- oder Glassubstraten ausgesät.

### 2.10.2 Kryokonservierung der Zellen

Zur Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen nach dem Ablösen von der Zellkulturflasche in zelltypspezifischem Einfriermedium (4 °C) (Tabelle 5) mit einer definierten Zellzahl resuspendiert und in Kryo-Röhrchen aliquotiert. Diese wurden über Nacht bei -80 °C in einem Einfrierbehälter für Zellen (*Mr. Frosty*) mit einer Abkühlungsrate von -1 °C/ min eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryo-Röhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-196 °C) zur Langzeitlagerung überführt und dort gelagert.

Beim erneuten Auftauen der Zellen für die Routinezellkultur wurden die eingefrorenen Zellen in 10 ml Wachstumsmedium resuspendiert, zentrifugiert und das Zellpellet erneut in frischem Wachstumsmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche aus Polystyrol überführt.

### 2.10.3 Aussähen von Zellen auf elastischen Silikonkammern

Im Gegensatz zu den Polystyrol Zellkulturflaschen sind die Elastomersubstrate aus PDMS extrem hydrophob, was eine Kultivierung der Zellen ohne eine vorherige Beschichtung nicht garantieren kann. Aus diesem Grund wurden die Substrate zunächst mit humanem Fibronectin beschichtet. Fibronectin ist ein Protein der EZM, welche den Zellen die Verankerungen mit ihrem Substrat ermöglicht. Weiterhin bewirkte die Beschichtung mit Fibronectin, dass die Oberfläche der Substrate durch das hydrophile Protein weniger hydrophob ist. Deswegen wurden eine bessere Verteilung des Zellkulturmediums und eine gleichmäßige Zellzahl auf den Substraten gewährleistet.

Die Funktionalisierung der Oberfläche erfolgte nach Zugabe von 500 µl der Fibronectin-Lösung (20 µg/ µl in PBS) für 1 h bei 37 °C im Zellkulturinkubator. Anschließend wurde die Lösung verworfen und die Zellsuspension mit der gewünschten Zellzahl in einem Volumen von 500 µl auf dem Substrat ausgesät. Für Experimente mit Einzelzellen wurden bei den glatten Muskelzellen 3.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> und bei den Fibroblasten und Podozyten 10.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> verwendet. Für die Monozellschichten wurden 12.500 Zellen pro cm<sup>2</sup> bei den glatten Muskelzellen und 20.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> bei den Keratinozyten ausgesät. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen auf der Oberfläche wurde durch kreuzförmiges Schwenken gewährleistet.

## 2.11 Verwendung von Medikamenten

Für die Aktivierung oder Inaktivierung verschiedener Stoffwechselwege in den Zellen wurden unterschiedliche Medikamente als Medienzusätze in den Zellkulturexperimenten eingesetzt. Die Kontrollen in den Experimenten enthielten die identischen Volumina der Lösemittel des jeweiligen Medikaments, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen.

### 2.11.1 Inhibition des Abbaus durch das Lysosom und das Proteasom

Die Inhibition des Lysosoms erfolgte durch die Zugabe von 100  $\mu$ M Chloroquin-diphosphat (CQ) (gelöst in MilliQ H<sub>2</sub>O) 1 h vor den Dehnungsexperimenten. CQ dringt aufgrund seiner membranpermeablen Eigenschaften in unprotonierter Form in das Lysosom ein und bewirkt einen Anstieg des pH-Werts, indem es im sauren Bereich des Lysosoms protoniert wird. In dem basischeren pH-Werte verlieren die sauren Hydrolasen im Lysosom ihre Aktivität, während CQ in der protonierten Form die Membran des Lysosoms nicht mehr passieren kann und somit innerhalb des Lysosoms akkumuliert. Die Autophagosomen können durch die sauren Hydrolasen im Lysosom nicht mehr abgebaut werden und akkumulieren in der Zelle (Ashoor *et al.*, 2013).

Die Inkubation der Zellen für 16 h mit 100 nM Bafilomycin A1 (BafA1) (gelöst in DMSO, Endkonzentration im Medium: 0,06 Vol% DMSO) vor Dehnung inhibiert ebenfalls die Aktivität des Lysosoms. BafA1 blockiert dabei die vakuoläre ATPase (V-ATPase), welche Protonen in das Innere des Lysosoms pumpt und unterdrückt ebenfalls die Aktivität der sauren Hydrolasen des Lysosoms (Singh and Bhaskar, 2019).

Die Aktivität des proteasomalen Abbauwegs erfolgte durch Behandlung mit MG132, einem synthetischen Peptid-Aldehyd (Z-Leu-Leu-Leu-CHO), welches zellpermeabel ist. MG132 verhindert den Abbau von Ubiquitin-markierten Proteinen durch Inhibition verschiedener Proteasen des Proteasoms. Die Behandlung mit 10  $\mu$ M MG132 erfolgte durch eine Zugabe von 1  $\mu$ l einer 10 mM Stammlösung, gelöst in DMSO (Endkonzentration im Medium: 0,1 Vol% DMSO) 1 h vor den Dehnungsexperimenten.

### 2.11.2 Aktivierung der RhoA- und Inhibition der ROCK-Signalkaskade

Für die Aktivierung der RhoA-induzierten Zellkontraktilität wurden die Kontrollen in serumfreien Medium kultiviert, weil die zur Aktivierung verwendete Lysophosphatidsäure (LPA) im Serum des Zellkulturmediums ebenfalls enthalten ist. Die RhoA Aktivierung erfolgte durch die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  LPA 30 min vor der Dehnung der Zellen. LPA induziert durch Bindung an G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) die Aktivierung von RhoA und die damit aktivierte Signalkaskade zur Verstärkung von Stressfasern und Fokaladhäsionen (Xiang *et al.*, 2013).

Die Inaktivierung der in der Signalkaskade folgenden Rho-assoziierten Kinase (ROCK) wurde durch die Inkubation mit 20  $\mu\text{M}$  Y-27632 (gelöst in PBS) 1 h vor Dehnung der Zellen bewirkt. Y-27632 hemmt dabei selektiv die von p160ROCK induzierte Bildung von Stressfasern in glatten Muskelzellen (Uehata *et al.*, 1997).

### 2.11.3 Inhibition der Proteinbiosynthese und des Transkriptionsfaktors YAP

Zur Blockierung der Proteinbiosynthese wurde die Zellen in Medium mit 100  $\mu\text{M}$  Cycloheximid (CHX) (gelöst in MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$ ) für 24 h vor der Dehnung inkubiert. Das Antibiotikum CHX inhibiert die Initiation der Proteinbiosynthese durch die Bindung an die große ribosomale Untereinheit, weswegen die weitere Bindung von transfer-RNA am Ribosom und damit die Translation zur Aminosäurekette unterdrückt wird (McKeehan and Hardesty, 1969).

Die Inhibition des Transkriptionsfaktors YAP wurde durch die Inkubation der Zellen mit 3  $\mu\text{M}$  Verteporfin (gelöst in DMSO, Endkonzentration im Medium: 0,09 Vol% DMSO) 24 h vor Dehnung der Zellen bewirkt. Verteporfin inhibiert dabei die Translokation von YAP in den Zellkern und so die Interaktion von YAP mit dem transkriptionalen Verstärkungsfaktor TEF (TEAD) (Liu-Chittenden *et al.*, 2012).

## 2.12 Durchführung von uniaxialen Dehnungsexperimenten mit elastischen Substraten

Zur Untersuchung der mechanosensitiven Eigenschaften der Zellen wurden diese auf linear-elastischen Silikonkammern ausgesät und mittels einer computergesteuerten Apparatur uniaxial, zyklisch gedehnt. Die Silikonkammern wurden zunächst in einer Kammerhalterung eingebaut (Abbildung 2.2 A). Die Kammerhalterung besteht aus zwei fixierenden Elementen aus eloxiertem Aluminium, die jeweils zwei Stäbe zum Durchstoßen der Löcher im Rahmen der Silikonkammern haben. Die Kammer wird in der Halterung mit dem Inkubationsraum nach oben eingebaut und von unten mit zwei weiteren Elementen aus Aluminium fixiert, die wiederum mit je einer Schraube in den oberen fixierenden Elementen verschraubt sind. Die oberen fixierenden Elemente werden oberhalb mit einem Rahmen und vier Schrauben befestigt. Dieser Rahmen ermöglicht einen Spielraum die beiden fixierenden Elemente einige Millimeter auseinanderzuziehen und den Rahmen an einer bestimmten Position festzuziehen.

Die gesamte Kammerhalterung wurde vor dem Einbau der Silikonkammer auf 1,5 mm von ihrem Nullpunkt aus vorgedehnt und anschließend mit dem Rahmen befestigt. Dies verhinderte das Durchhängen des Kammerbodens bei der Zugabe der Zellsuspension und gewährleistete daher eine gleichmäßige Verteilung der Zellen. Vor dem Einbau der Silikonkammern wurden diese kurz in Isopropanol desinfiziert. Nach dem Zusammenbau wurde die Kammerhalterung mit der Kammer ü.N. in Kunststoffboxen mit Deckel im Zellkulturinkubator bei 37 °C gelagert, um Alkoholreste vor dem Aussähen der Zellen verdampfen zu lassen.

Die von Jens Konrad (IBI-2, FZJ) entwickelte Zugapparatur ist eine lineare Verschiebeeinheit, die über einen Schrittmotor angetrieben wird (Abbildung 2.2 B). In der Halterung ist Platz für sechs nebeneinander angeordnete Zugkammern mit Halterung, die gleichzeitig unter identischen Parametern gedehnt werden können. Dadurch war es möglich Zeitreihen unter identischen Bedingungen aufzunehmen und mehrere Kammern bei der Proteinisolation zu vereinen. Die Zugapparatur konnte in den Zellkulturinkubator gestellt und dort durch die Computersteuerung außerhalb des Inkubators bedient werden, sodass die Kultivierungsbedingungen für die Zellen nicht beeinträchtigt wurden. Die Software zur Bedienung der Zugapparatur wurde auf Basis des Programmiersystems LabVIEW von W. Hürttlen (FZJ) programmiert. Für die zyklische Dehnung kann mit dem Programm der Verfahrensweg (Amplitude), die Geschwindigkeit (Frequenz), die Pausenzeiten sowie die Zyklenzahl definiert werden.

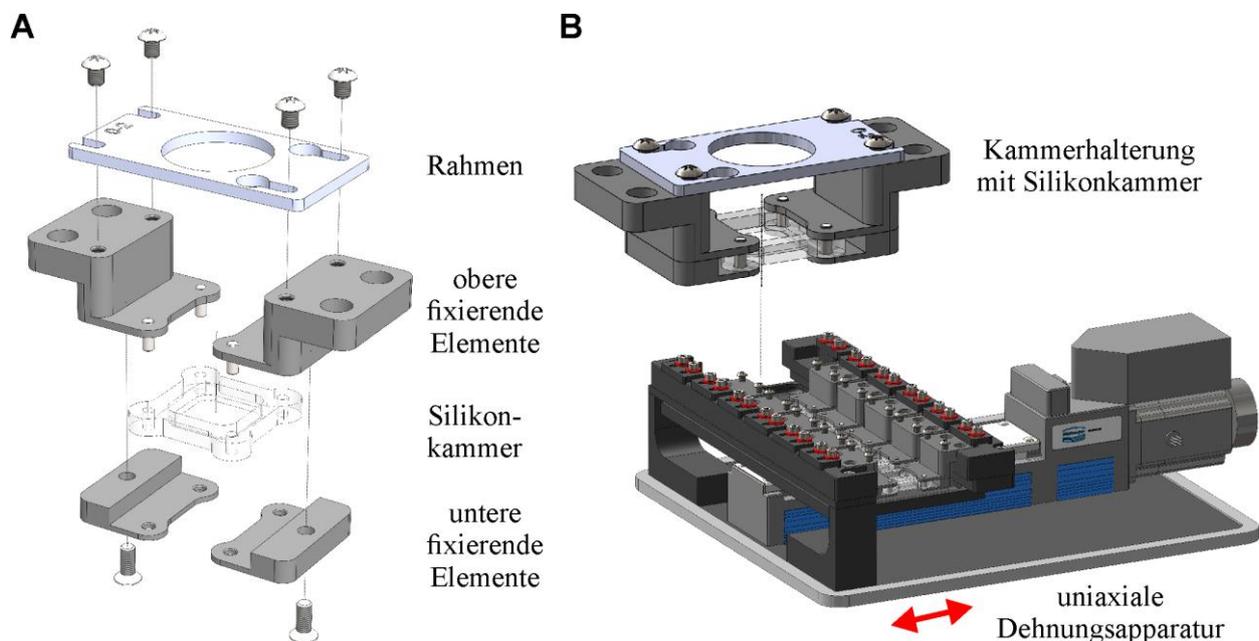
In dieser Arbeit wurde eine Frequenz von 300 mHz gewählt und die weiteren Parameter so berechnet, dass ein annähernd sinusoidaler Dehnungsverlauf angewendet wurde. Für die

Amplitude von 20 % (4,3 mm) wurde bei gleichbleibender Pausenzahl nach jedem Zyklus von 0,417 Sekunden eine Geschwindigkeit von 3,44 mm/ s verwendet.

Die Elastomerkammern wurden nach dem Einbau in die Kammerhalterung und dem Ausdampfen mit Fibronectin funktionalisiert und die Zellen auf den Kammern ausgesät. Zum Schutz vor der Verdunstung des Mediums und möglichen Kontaminationen wurde die Kammer mit einer Glasplatte und einem darüber gespannten Parafilmstreifen abgedeckt.

Nach Überprüfen der Adhäsion der Zellen, wurde die Kammer in ihrem vorgedehnten Zustand in die Zugapparatur über vier Löcher in den fixierenden Elementen eingesetzt und über eine Schraube an der Zugvorrichtung auf jeder Seite fixiert. Anschließend wurde der Rahmen der Kammerhalterung abgeschraubt und das Zellkulturmedium in den Elastomerkammern durch neues Medium ausgetauscht.

Bei einigen Experimenten wurden zusätzliche Medikamente dem Medium hinzugefügt (2.11). Nach dem Medien austausch wurden die Kammern erneut abgedeckt und die Zugapparatur in den Zellkulturinkubator gestellt. Anschließend oder nach der abgelaufenen Vorinkubationszeit wurde das Dehnungsexperiment mit der Computersteuerung gestartet und nach der entsprechenden Dehnungsdauer in der Ausgangsposition (1,5 mm Vordehnung) gestoppt. Nun wurde die Kammerhalterung nach Befestigung des Rahmens aus der Zugapparatur ausgebaut und weiter für eine Immunzytochemische Färbungen fixiert oder für die Proteinisolation verwendet.

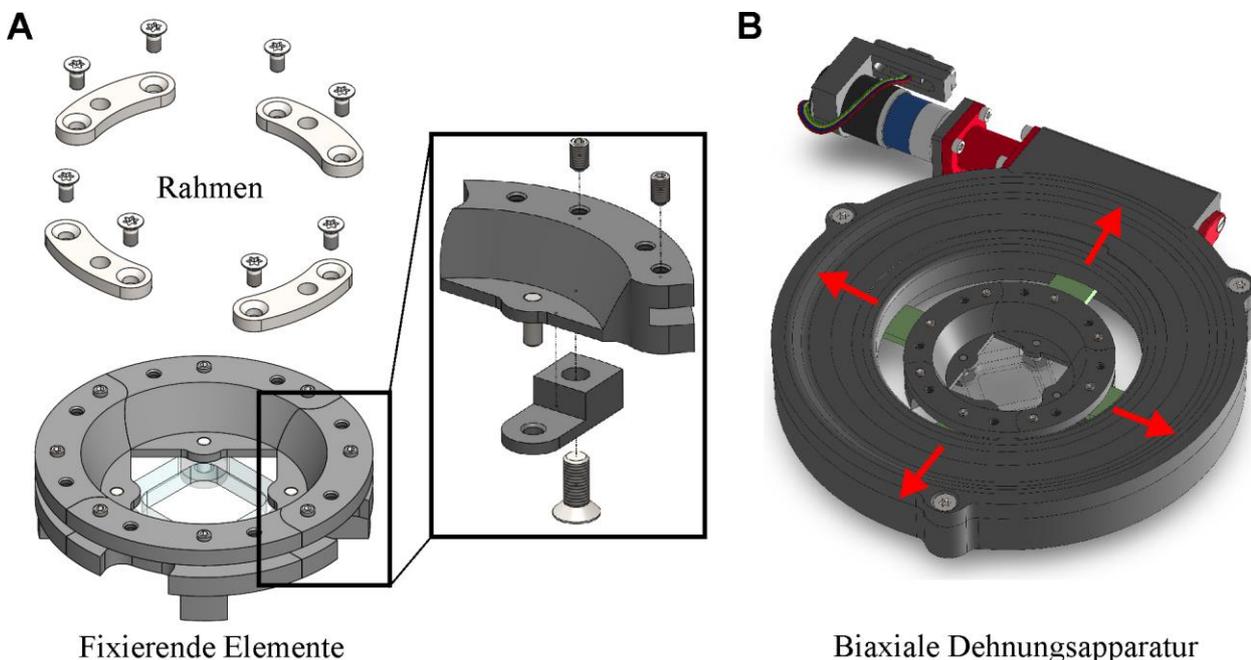


**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Kammerhalterungen und der Dehnungsapparatur für uniaxiale Dehnung.** Gezeigt sind (A) die Einzelkomponenten der Kammerhalterung vor und (B) nach Zusammenbau mit einer Silikonkammer sowie die uniaxiale Dehnungsapparatur. Der rote Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung (zur Verfügung gestellt von Jens Konrad, IBI-2, FZJ).

### 2.13 Durchführung von biaxialen Dehnungsexperimenten mit elastischen Silikonkammern

Im letzten Kapitel dieser Arbeit wurde eine equibiaxiale Dehnung der Zellen mit einer biaxialen Dehnungsapparatur durchgeführt (Abbildung 2.3) (entwickelt von Jens Konrad, IBI-2, FZJ). Dazu wurden die Kammern wie unter 2.12 beschrieben in die biaxiale Kammerhalterung (entwickelt von Jens Konrad, IBI-2, FZJ) unter sterilen Bedingungen eingebaut. Im Gegensatz zur uniaxialen besteht die biaxiale Kammerhalterung aus vier fixierenden Elementen, an denen jede Ecke der Silikonkammer befestigt wird. Hierbei war eine Vordehnung der Kammer von 1,5 mm in beide Richtungen zur Vermeidung des Durchhängens des Kammerbodens bereits vorgegeben.

Die biaxiale Dehnungsapparatur besteht aus vier beweglichen Armen, an denen jeweils eines der fixierenden Elemente befestigt wird. Nach Ablösen der Rahmen wurde die equibiaxiale Dehnung der Kammer durch simultanes Verfahren der beweglichen Arme bei einer Frequenz von 300 mHz und einer Amplitude von 10 % oder 20 % (in Summe 20 % in x- und 20 % in y-Richtung) gestartet. Nach der Dehnungsdauer wurde die Kammer in der Ausgangsposition gestoppt, die Rahmen auf die fixierenden Elemente geschraubt und die Zellen für die IFs fixiert oder für die Proteinisolationen verwendet.



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Kammerhalterungen und der Dehnungsapparatur für biaxiale Dehnung.** Gezeigt sind (A) die biaxiale Kammerhalterung und (B) die biaxiale Dehnungsapparatur. Die roten Pfeile zeigen die Dehnungsrichtungen (zur Verfügung gestellt von Jens Konrad, IBI-2, FZJ).

## 2.14 Immunzytochemische Färbungen (IFs) zellulärer Proteine

Immunzytochemische Färbungen (IFs) dienen der Markierung einzelner zellulärer Proteine und der anschließenden mikroskopischen Detektion. Die IFs erfolgten entweder über spezifische Proteine oder Peptide, die an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt waren oder ein Antikörperpaar bei dem der primäre Antikörper das Zielprotein bindet und der sekundäre Antikörper, gekoppelt an einen Fluoreszenzfarbstoff, spezifisch den primären Antikörper markierte.

Nach der Durchführung des Experiments wurden die Zellen fixiert, um einen bestimmten Zeitpunkt zu analysieren. Hierfür wurden zwei verschiedene Methoden durchgeführt, je nachdem welche Proteine untersucht wurden. Bei beiden Methoden wurde das Medium nach Ende des Experiments verworfen und durch die Fixierungslösung ersetzt. Bei der Paraformaldehydfixierung (PFA-Fixierung) wurden die Zellen mit 500  $\mu$ l 3,7 % PFA in Zytoskelettpuffer (CB-Puffer) für 15 min bei 37 °C im Zellkulturinkubator fixiert. PFA denaturiert dabei die Proteine in der Zelle. Zum Abstoppen der Reaktion wurde die PFA-Lösung verworfen und das Substrat zweimal mit je 500  $\mu$ l 100 mM Glycin in CB-Puffer gewaschen. Das Glycin in der Lösung stoppt dabei die Reaktion des PFA ab.

Bei der Methanol-Fixierung wurden 500  $\mu$ l 4 °C kalten Methanols (100 %) auf die Zellen pipettiert und für 10 min bei -20 °C fixiert. Dabei verdrängt Methanol intrazelluläres Wasser und denaturiert die Proteine in der Zelle. Anschließend wurde das Methanol verworfen und das Substrat zweimal mit CB-Puffer gespült. Nach der Methanol-Fixierung wurden die Silikonkammern für mindestens 1 h bei RT zum Ausdampfen inkubiert. Für die IFs des Proteins LC3B zur Markierung von APs wurde die Methanol-Fixierung verwendet, für alle anderen IFs eine PFA-Fixierung. Alle weiteren Inkubationen erfolgten wenn nicht anders beschrieben bei Raumtemperatur (RT).

Nach der Fixierung der Zellen wurde die Zellmembran permeabilisiert mittels einer Inkubation mit 0,5 % Triton-X-100 in CB-Puffer für 10 min. Anschließend wurde die Lösung verworfen und die Substrate dreimal mit je 500  $\mu$ l CB-Puffer gewaschen. Bei Proben für die Aktin Reorientierungsanalyse erfolgte ausschließlich die Färbungen des Aktin-Zytoskeletts. Dazu wurde nach der Permeabilisierung der Membran, Phalloidin gekoppelt an einen Alexa Farbstoff (Alexa Fluor 546 Phalloidin) 1:500 verdünnt in CB-Puffer für 1 h auf den Zellen inkubiert. Phalloidin ist ein Toxin des grünen Knollenblätterpilzes, welches spezifisch an filamentöses Aktin (F-Aktin) bindet. Aufgrund der spezifischen Affinität des Phalloidins zum F-Aktin musste bei dieser Färbung keine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen erfolgen.

Bei der Markierung anderer Proteine durch spezifische primäre Antikörper wurde nach der Permeabilisierung der Zellmembran zunächst eine Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen durch eine Inkubation mit 5 % Milchpulver (MP) in CB-Puffer für 1 h durchgeführt. Daraufhin erfolgte die Zugabe des primären Antikörpers in einer 1:500 Verdünnung in 1 % MP in CB-Puffer über ü.N. bei 4 °C.

Nach der Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers wurden die Proben dreimal mit je 500 µl CB-Puffer gewaschen. Nun geschah die Zugabe des sekundären Antikörpers 1:500 verdünnt in 1 % MP in CB-Puffer unter der Zugabe von 1:1000 verdünntem 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI) für 1 h. DAPI markiert dabei spezifisch die DNA in den Zellkernen über die Bindung an AT-reiche Abschnitte doppelsträngiger DNA. Sowohl der sekundäre Antikörper als auch DAPI trugen lichtempfindliche, fluoreszierende Farbstoffe und daher liefen ab diesem Zeitpunkt alle Inkubationen möglichst im Dunkeln unter einer Abdeckung mit Aluminiumfolie ab. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Zellen dreimal mit je 500 µl CB-Puffer gewaschen, um ungebundenen sekundären Antikörper und damit unspezifische Signale zu entfernen.

Zum Abschluss wurden die Proben für die Mikroskopie eingedeckt mit einem Eindeckmedium, um die Proben zu konservieren und die Mikroskopie von gedehnten Elastomerkammern überhaupt zu ermöglichen. Dazu wurde der CB-Puffer verworfen und die Probe einmal mit H<sub>2</sub>O (MilliQ) gewaschen, um alle Salze des Puffers zu entfernen. Nach der Entfernung des H<sub>2</sub>O wurden 18 µl Fluoromount Eindeckmedium auf die Mitte des Substrats luftblasenfrei pipettiert. Darauf wurde ein Deckglas (d=15 mm, #0) gelegt. Unter die gedehnten Elastomerkammern wurde ein halber Objektträger geklebt, um die elastische Kammer zu schützen und eine stabile Auflagefläche zu gewährleisten. Die zu mikroskopierenden Proben wurden nun ü.N. getrocknet.

Am nächsten Tag wurden die Ränder der gedehnten Elastomerkammern von dem Inkubationsraum, auf dem die Zellen adhäreren, mit einem Skalpell abgetrennt. Nun bestanden diese Proben aus einem Objektträger mit einer aufgeklebten Elastomerkammer, den darauf liegenden Zellen in dem Eindeckmedium und einem Deckglas. Für die Mikroskopie mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop wurden die Objektträger auf dem Kopf liegend mikroskopiert. Die Zellen auf Glassubstraten wurden aufrecht mikroskopiert.

## 2.15 Transfektion mit Lipofectamine 3000

Zur Expression artifizieller Proteine, die entweder an einen Fluoreszenzfarbstoff oder zusammen mit einem Plasmid für ein fluoreszierendes Protein co-transfiziert wurden, wurden DNA Plasmide über eine Lipofektion in die Zellen eingebracht und von diesen exprimiert. Die Transfektion erfolgte durch das Lipofectamine 3000 Transfektions Kit nach Angaben des Herstellers.

Die Transfektion wurde nach dem Aussähen der Zellen auf dem entsprechenden Substraten nach 16 h Inkubation durchgeführt. Pro Mikroskopiesubstrat wurden 1,5 µl Lipofectamine 3000 Reagenz in 28 µl OptiMEM Medium in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 3 s mit einem Vortex durchmischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde 0,5 µl Plasmid-DNA (1 µg/ µl) (Tabelle 8) in 28 µl OptiMEM Medium gelöst und 1 µl P3000 Reagenz zugegeben. Anschließend wurden beide Lösungen vereint und für 10 min bei RT inkubiert.

Die Plasmid-Lösung wurde mit einer Pipette auf das Substrat mit den adhären Zellen pipettiert und das Substrat zehn Mal kreuzförmig geschwenkt, um die Transfektionskomplexe gleichmäßig auf der Oberfläche der Zellen zu verteilen. Die Inkubation der Zellen erfolgte für 24 h bei Standardkultivierungsbedingungen vor Beginn des weiteren Experiments.

## 2.16 Mikroskopie

Zur Analyse der immunzytochemischen Markierung einzelner Proteine und der transfizierten Zellen wurden das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM880 (Carl Zeiss) und das Weitfeldfluoreszenzmikroskop Cell Observer (Carl Zeiss) genutzt. Durch verschiedene Anregungslichtquellen wurden die fluoreszierenden Farbstoffe, welche die Zielproteine in der Zelle markieren zur Fluoreszenz angeregt und über das aufgenommene Emissionssignal detektiert.

### 2.16.1 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM 880)

Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie wurden verschiedene Anregungslaser mit unterschiedlichen Wellenlängen zur Anregung der bei der IF eingesetzten Fluorophore genutzt (Diodenlaser: 405 nm, Argon-Ionen-Laser: 488 nm, Dioden-gepumpter-Festkörperlaser: 561 nm und ein Helium-Neon-Laser: 633 nm). Für die Detektion des Fluoreszenzsignals nach Anregung der Fluorophore mit den Anregungslasern, wurden unterschiedliche Kombinationen an Band- und Langpass-Filtersätzen gewählt, um das Emissionssignal von der Anregungswellenlänge abzutrennen.

Bei dem verwendeten FAST Airyscan Modus des LSM 880 wurden durch die Erzeugung eines ellipsenförmigen Anregungslasers im Gegensatz zum normalen LSM Modus vier Pixelreihen des Bildes gleichzeitig abgerastert und zur Fluoreszenz angeregt. Zur Detektion wurde ein hexagonaler Flächendetektor aus 16 konzentrisch angeordnete GaAsp Detektorelementen genutzt, von der jeder einzelne eine Lochblende darstellt und somit die Konfokalität in diesem Modus erzeugt. Aus den 16 eingegangenen Signalen wurde schließlich ein einzelnes Bild durch Zen berechnet. Durch die Öffnung der Lochblende musste jedes Emissionssignal in einer einzelnen Spur hintereinander aufgenommen werden. Die Aufnahmen mit dem FAST Airyscan Modus zeigen eine bessere Auflösung und ein besseres Signal-Hintergrund Rauschverhältnis als im LSM-Modus.

Zur Aufnahme des Aktin-Zytoskeletts und der Paxillin IFs wurde eine 40x EC Plan Neofluar/ 1.3 Ölobjektiv und für die Aufnahme der LC3B-Punkte ein 63x Plan Apochromat/ 1.4 Ölobjektiv genutzt. Bei den Lebendzellanalysen wurde ein 40x C-Apochromat/ 1.2 Wasserobjektiv verwendet.

#### **2.16.2 Weitfeldfluoreszenzmikroskopie (Cell Observer)**

Im späteren Verlauf der Arbeit wurden die Aufnahmen des Aktin-Zytoskeletts für die Reorientierungsanalysen mit dem nicht-konfokalen Weitfeldfluoreszenzmikroskop (Cell Observer, Carl Zeiss) durchgeführt. Dabei diente eine Colibri LED (Colibri 7 LED, Carl Zeiss) als Lichtquelle mit allen benötigten Wellenlängen für die Anregung der Fluorophore. Für die Anregung des Phalloidin Alexa Fluor 561 wurde eine Wellenlänge von 555 nm für die Anregung und der Filter 43 HE DsRed (Carl Zeiss) zur Abtrennung des Fluoreszenzsignals von der Anregungswellenlänge gewählt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte über die AxioCam 712 mono (Carl Zeiss).

## 2.17 Proteinquantifizierungen mittels Western Blot Analyse

Zur Auftrennung der zellulären Proteine nach ihrem Molekulargewicht und zur relativen Quantifizierung ihrer Menge in Abhängigkeit der Bedingungen in dem jeweiligen Experiment wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Für die Analyse erfolgte eine Proteinisolation, eine Auftrennung der zellulären Proteine in Abhängigkeit ihrer molaren Masse in einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und schließlich der Western Blot zur Übertragung der Proteinbanden auf eine Trägermembran aus Nitrozellulose. Darauf wurden die zu untersuchenden Proteine über ein enzymimmunologisches Verfahren quantitativ nachgewiesen.

### 2.17.1 Proteinisolation und Denaturierung der Proteine

Die Isolation des Rohproteinextrakts der Zellen erfolgte nach Durchführung des jeweiligen Experiments durch zweimaliges Waschen der Zellen mit 4 °C kalter, Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) zur Entfernung abgelöster Zellen und des im Medium enthaltenen Serumproteins. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle weiteren Schritte auf Eis, um den Abbau der Proteine durch zelleigene Proteasen zu verhindern.

Nach Entfernen des PBS wurde ein denaturierender Lyse-Puffer (RIPA-Puffer) versetzt mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC) auf die Zellen gegeben. Das enthaltene IGEPAL CA-630 permeabilisiert als nicht-ionisches, nicht-denaturierendes Reagenz die Zellmembran; Natriumdeoxychilat solubilisiert die Proteine und Natrium Dodecylsulfat (SDS) denaturiert als anionisches Tensid die Proteine. Der PIC verhindert nach dem Auflösen der Zellmembranen den Abbau der Proteine über die zelleigenen Proteasen, die beim Zellaufschluss freigesetzt werden.

Nach Zugabe des Lyse-Puffers wurden die Zellen zusätzlich mechanisch mit einem Zellschaber von der Oberfläche des Substrats abgekratzt und das Lysat nach Übertragung in ein Reaktionsgefäß 20 Mal mit einer Kanüle in einer Spritze hoch- und runtergezogen, um die Zellyse durch die Scherung der Zellen am Kanülenausgang mechanisch zu verstärken. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 10.000 x g zur Abtrennung von größeren Zelltrümmern. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen.

Nun erfolgte die Zugabe von 4-fach Lämmli Puffer versetzt mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und eine Hitzedenaturierung bei 95 °C für 5 min. Dabei wirkt das enthaltene Lithiumdodecylsulfat (LDS) genau wie SDS denaturierend, während  $\beta$ -Mercaptoethanol Disulfidbrücken in Proteinen zu freien

Thiolen spaltet. Dadurch wird die Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine aufgelöst, sodass sie als reine Aminosäureketten vorliegen (Primärstruktur). Durch die Auffaltung der Proteine kommt es zu einer Anlagerung des LDS an die Aminosäuren und versetzt ihnen damit eine negative Ladung, welche die Eigenladung der Proteinseitenketten deutlich überlagert. Somit ist die negative Ladung rein abhängig von der Größe des Proteins. Nach der Hitzedenaturierung wurden die Proteine abgekühlt und entweder für eine längere Lagerung bei -20 °C eingefroren oder direkt für die SDS-PAGE weiter verwendet.

### 2.17.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE wurden die Proteinextrakte der einzelnen Proben eines Experiments zu gleichen Volumina für die Auftrennung eingesetzt. Die kommerziellen Gradientengele (4-20 %) wurden nach Herstellerangaben verwendet. Vor der Beladung der Taschen mit den Proteinextrakten wurden die Taschen zunächst zweimal mit 1-fach Lämmli-Puffer ausgespült, um den Lagerungspuffer auszutauschen. In die äußeren Taschen der Gele wurden jeweils ein Längenmarker und dazwischen die Proteinextrakte des Experiments gefüllt.

Nach der Beladung wurde für 10 min eine Spannung von 80 V angelegt, damit die Proteine zunächst das Sammelgel durchlaufen konnten, gefolgt von einer Spannung von 120 V für weitere 80 Minuten zur Auftrennung der Proteine im Trenngel. Das Sammelgel enthält eine geringere Polyacrylamid-Konzentration und dient der Fokussierung der Proteine, während das Trenngel die Separierung nach der Größe bewirkt.

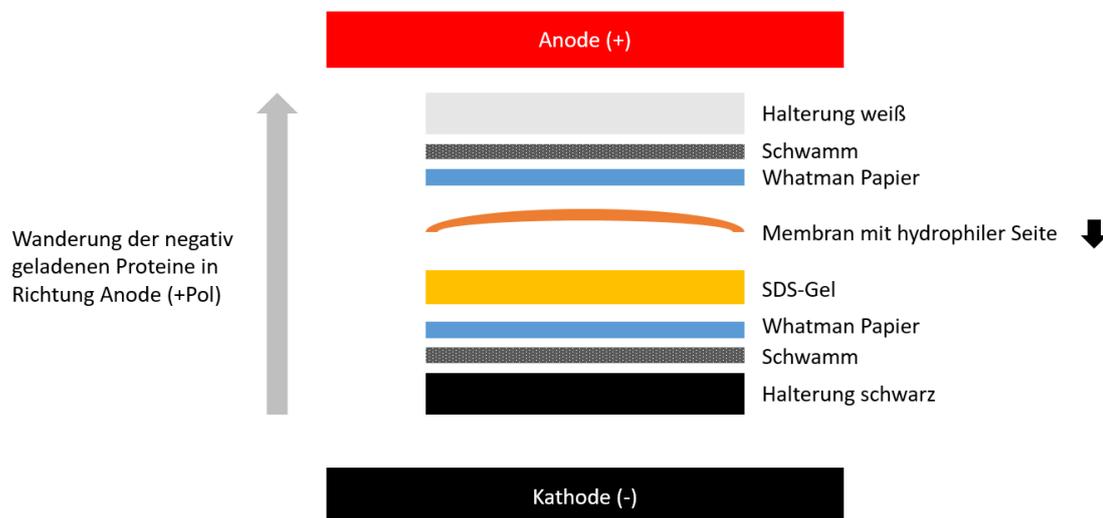
Die Proteine wanderten dabei durch das Anlegen der elektrischen Spannung aufgrund der Beladung mit negativ geladenen LDS/ SDS entsprechend ihres Molekulargewichts in Richtung der Anode (Pluspol). Dabei wandern kleine Proteine schneller durch die poröse Matrix des Polyacrylamidgels als große Proteine, die durch die Maschen des Netzwerks stärker zurückgehalten werden. Aufgrund der Verwendung von Gradientengelen konnten Proteine in einem Größenbereich von 10-300 kDa in einem Gel aufgetrennt werden.

### 2.17.3 Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde ein Western Blot für die Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran vorgenommen, da die Proteine in dem instabilen Gel für eine Immundetektion nur schwer zugänglich sind.

Beim Western Blot wurde ein Sandwich aus zwei Schwämmen, zwei Whatman Filterpapieren, dem SDS Gel und der Nitrozellulosemembran (anodenseitig) angefertigt (Abbildung 2.4). Die Schwämme und Filterpapiere verhindern dabei die Austrocknung des Western Blots und garantieren die Versorgung mit Transferpuffer. Das zusammengebaute Sandwich wurde nun luftblasenfrei zwischen zwei Halterungen gepresst, um eine Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran zu ermöglichen. Der Proteintransfer erfolgte in einem Protein-Transferpuffer mit 20 % Methanol.

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode (Pluspol) bis zur Nitrozellulosemembran, an der sie über ionische und polare Wechselwirkungen absorbieren. Methanol im Transferpuffer verhindert das Schwellen des Gels während des Transfers und verbessert die Absorption der Proteine an die Membran durch Entfernung des LDS/ SDS von den Proteinen. Die Übertragung der Proteine erfolgte ü.N. bei 4 °C und 300 mA.



**Abbildung 2.4: Schematischer Aufbau eines Western Blots.** Der Western Blot dient der Übertragung der Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran.

#### 2.17.4 Enzymimmunologische Färbung der Proteine

Nach der Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde eine reversible Färbung aller Proteine zur Überprüfung der Übertragung und zur Quantifizierung der Gesamtproteinmenge mit Ponceau S durchgeführt. Ponceau S ist ein roter Azofarbstoff, der reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen aller Proteine bindet. Dazu wurde die Membran für 5 min mit einer fertigen Ponceau S Lösung bei 15 rpm und RT inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen, um ungebundenen Farbstoff zu entfernen. Die Proteinbanden wurden nun mit dem Gel-Dokumentationssystem (GEL Doc XR<sup>+</sup>) und mit Hilfe des Programms Image Lab aufgenommen. Anschließend wurde die Membran mit 0,1 M Natronlauge für 30 s entfärbt.

Alle folgenden Inkubationen erfolgten wenn nicht anders angegeben bei RT und 15 rpm. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 5 % MP in PBS für 1 h blockiert. Nachfolgend wurde der primäre Antikörper zur Markierung des Zielproteins entsprechend verdünnt ( $\alpha$ -Tubulin 1:500, alle anderen AK 1:1000) in 1 % MP in PBS auf die Membran gegeben und ü.N. bei 4 °C und 15 rpm inkubiert.

Nach Entfernung des überschüssigen Primärantikörpers wurde dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen und die Membran für 1 h mit 1:2000 in 1 % MP in PBS verdünntem sekundären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper war bei den Western Blot Analysen an eine alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt und jeweils gegen den Herstellungsorganismus des primären Antikörper gerichtet.

Nach der Inkubation wurde erneut dreimal für je 10 min mit PBS gewaschen und das Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) in Kombination mit Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) zugegeben und bis zur Entwicklung der Proteinbanden inkubiert. Durch die alkalische Phosphatase wird BCIP zu 5-Brom-4-Chlorindolyl und Phosphat hydrolysiert. Als Folgereaktion werden zwei 5-Brom-4-Chlorindolyl Moleküle zu dem tiefblauen Farbstoff 5',5'-Dibrom-4,4'-Dichlorindigo (Dimer) oxidiert. Parallel zur Oxidationsreaktion wird das Di-Tetrazoliumsalz (NBT) zum blauen Di-Formazansalz reduziert.

Die Reaktion wurde durch Verwerfen der Färbelösung und zweimaliges Waschen mit PBS und zusätzlich einmal mit H<sub>2</sub>O (MilliQ) abgestoppt. Nach dem vollständigen Trocknen der Membran wurden die Banden mit dem Gel-Dokumentationssystem detektiert.

## 2.18 Auswertungen

Die Auswertung aller Rohdaten dieser Arbeit erfolgte über Matlab oder Python basierte, selbstgeschriebene Programme, entwickelt von Georg Dreissen oder Dr. Ronald Springer (beide IBI-2, FZJ). Zusätzlich wurden Zen Black und Image J zur Bildbearbeitung genutzt. Im Folgenden sind die einzelnen Auswertungen genauer beschrieben.

### 2.18.1 Analyse der Aktin Orientierung

Für die Analyse der Aktin Orientierung wurden aus den aufgenommenen z-Bilderstapeln jeweils die maximalen Intensitätsprojektionen mit Zen erzeugt. Mit Hilfe eines Matlab basierten Programms wurden zunächst Einzelzellen in der Übersichtsaufnahme markiert oder ein Raster aus Rechtecken repräsentativ für die Anzahl an Zellen über das gesamte Bild einer Monozellschicht gelegt.

Über ein weiteres Programm wurde daraufhin der Hauptorientierungswinkel der in den Zellen angefärbten Aktin-Stressfasern in Relation zur Dehnungsrichtung für jede Zelle bestimmt. Dafür wurde bei den Einzelzellen jede Zellmarkierung am Rand um eine vorab definierte Anzahl an Pixeln verkleinert, um kortikale Aktin-Randfasern aus der Analyse auszuschließen. Bei der Auswertung wurde zunächst der 2D Strukturtensor bestimmt (Jähne, 2002), indem jedem Pixel des Bildes ein Orientierungsvektor, basierend auf den umliegenden Grauwerten, zugeordnet wurde. Um in dem markierten Bereich jedoch ausschließlich Aktin-Stressfasern zu analysieren, wurden Pixel, die keine Stressfasern repräsentieren, vorab ausgeschlossen. Hierzu wurde das gesamte Bild mit einer  $7 \times 7$  Pixel großen Binomialmaske geglättet und das Resultat vom Originalbild subtrahiert, um feine Strukturen hervorzuheben. Im Anschluss wurde das resultierende Bild erneut durch einen  $7 \times 7$  Pixel großen Binomialfilter geglättet. Für die Markierung der Stressfasern wurden nun Bereiche definiert, deren Grauwerte heller waren als der mittlere Grauwert des prozessierten Bildes.

Aus den Orientierungsvektoren der verbleibenden Stressfasern in jeder Zelle wurde schließlich der Hauptorientierungswinkel der gesamten Aktin-Stressfasern pro Zelle zur Dehnungsrichtung bestimmt.

### 2.18.2 Quantifizierung der LC3B-positiven APs

Zur Quantifizierung der LC3B-positiven APs (LC3B-Punkte) innerhalb der Zellen wurden die z-Bilderstapel importiert und eine Projektion der maximalen Intensität des LC3B-Signals erzeugt, welches anschließend noch mit einem Gauß Filter (Sigma gleich 1) geglättet wurde. Um funktionale LC3B-Punkte aus dem maximalen Intensitäts-Bild vom Hintergrund zu trennen, wurde für jedes einzelne Experiment ein manuell festgelegter Intensitäts-Schwellwert verwendet, der innerhalb eines Experiments konstant gehalten wurde. Anschließend wurde noch ein Schwellwert für die Mindestgröße der Strukturen festgelegt, abhängig vom Zelltyp und den Aufnahmebedingungen am Mikroskop.

Um zusammenliegende Strukturen voneinander zu trennen wurde der *Watershed*-Algorithmus verwendet. Dazu wurde die Distanztransformation der Strukturen berechnet und lokale Maxima mit einem Mindestabstand von 5 Pixeln als Marker für den *Watershed*-Algorithmus zur Trennung von zusammenliegenden Strukturen genutzt.

Die verbliebene Anzahl an Strukturen wurde als Anzahl der LC3B-Punkte pro Zelle ausgewertet. Bei den Einzelzellen wurden die LC3B-Punkte pro Zelle für jede Zelle einzeln analysiert. Zu diesem Zweck wurde für jedes Bild eine Zellmaske berechnet und alle Strukturen außerhalb der Zellmaske verworfen. Für die Bestimmung der Zellmaske wurde der mittlere Grauwert des maximalen Intensitäts-Bildes als Schwellwert für die Maskierung verwendet. Die Zellmaske wurde durch binäres Schließen (Strukturelement mit Radius 10 Pixel) weiter prozessiert und Löcher mit einer Fläche unter 10.000 Pixeln wurden entfernt.

Bei den Monozellschichten wurden die LC3B-Punkte durch die Anzahl der per Hand gezählten Zellkerne pro Bild geteilt, um so auf die LC3B-Punkte pro Zelle zu kommen.

### 2.18.3 Quantifizierung der Western Blot Banden

Zur Quantifizierung der Western Blot Banden wurden Rechtecke gleicher Größe über die einzelnen Banden der Membran sowie unterhalb jeder Bande für das Hintergrundsignal händisch definiert. Daraufhin wurde der mittlere Grauwert des Rechteckes bestimmt und davon der Grauwert des Hintergrunds abgezogen, sodass nur noch der Grauwert des spezifischen Signals übrig blieb. Die verbliebenen Grauwerte wurden in Bezug zur Gesamtproteinmenge als relative Proteinmenge in Prozent zur Kontrolle ausgewertet. Die Quantifizierung der Gesamtproteinmenge erfolgte durch die Abmessung des mittleren Grauwerts jeder Bande von 250 bis 37 kDa der aufgenommenen Ponceau S Färbung.

#### 2.18.4 Statistische Analysen

Zur Bestimmung der 95 % Konfidenzintervalle (CI95) der kumulierten Häufigkeiten der dehnungsinduzierten Aktin Reorientierung wurde die Methode der *bias-corrected and accelerated (BCa) bootstrap intervals* genutzt (Efron, 1994). Dazu wurde aus allen analysierten Daten einer Gruppe 5000 Stichproben gezogen und das entsprechende Konfidenzintervall bestimmt.

Die Signifikanzen wurden mit GraphPad Prism mittels t-Test berechnet. Die Experimente wurden wenn nicht anders angegeben immer mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die daraus resultierenden Signifikanzniveaus wurden folgendermaßen definiert:

$p \geq 0,05$  nicht signifikant (ns)

$p < 0,05$  \* signifikant

$p < 0,01$  \*\* hoch signifikant

$p < 0,001$  \*\*\* höchst signifikant



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die Aktin Reorientierung nach uniaxialer, zyklischer Dehnung ist abhängig vom lysosomalen Abbau der Autophagosomen

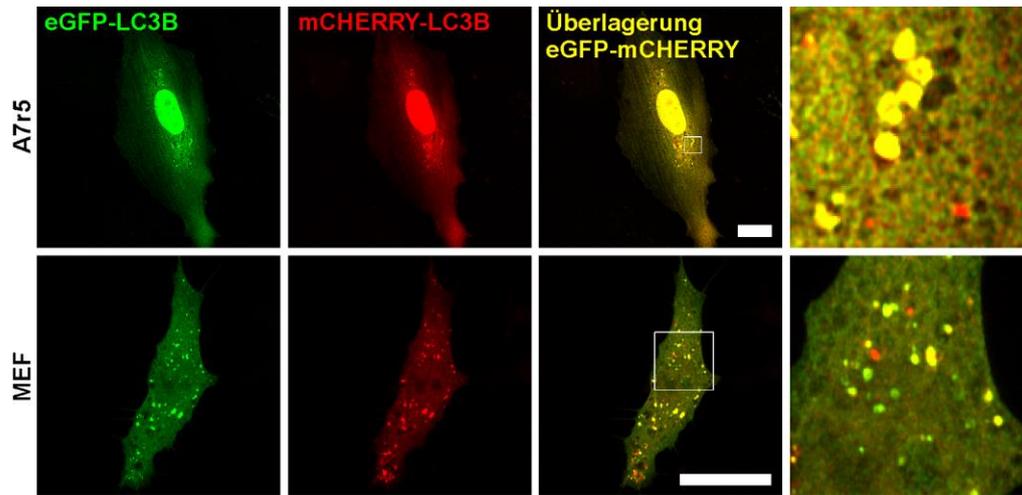
Im ersten Schritt dieser Arbeit wurde über die bereits bekannte Einwirkung der Substratelastizität auf Autophagie der Einfluss stärkerer mechanischer Beanspruchung in Form von Dehnung des zellulären Substrats auf die Induktion von Autophagosomen (APs) untersucht.

Dazu wurde die Dynamik der AP-Bildung sowohl unter natürlichen Bedingungen als auch unter mechanischer Beanspruchung für die zwei Zelltypen der glatten Muskelzellen und der Fibroblasten analysiert. Daraufhin wurde die zelluläre, mechanosensitive Antwort der Reorientierung der zytoskelettalen Strukturen sowie des gesamten Zellkörper zur Dehnungsrichtung zeitlich untersucht sowie die Auswirkung einer Blockierung des lysosomalen Abbaus von APs auf die Reorientierungsprozesse.

##### 3.1.1 Autophagosomen sind hoch dynamisch und durch uniaxiale, zyklische Dehnung mechanisch induzierbar

Zunächst wurde zur Überprüfung der Ausbildung von APs in zwei verschiedenen Zelltypen eine transiente Transfektion eines mCHERRY-eGFP-LC3B Plasmids zur Markierung der APs untersucht (Abbildung 3.1).

Dabei zeigten sowohl die glatten Muskelzellen der Ratte (A7r5) sowie die murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF) grün und rot fluoreszierende Punkte im Zytoplasma. Die daraus kolokalisierten gelben Punkte markieren dabei die Autophagosomen (APs). Aufgrund des reduzierten pH-Werts und dem damit einhergehenden Quenching des GFP-Signals charakterisieren nur rot fluoreszierende Punkte APs, die bereits mit dem Lysosom verschmolzen sind und als Autolysosomen (ALs) bezeichnet werden.



**Abbildung 3.1: Autophagosomen in verschiedenen Säugetierzellen.** Dargestellt sind glatte Muskelzellen (A7r5) und murine, embryonale Fibroblasten (MEF) kultiviert auf Fibronectin (FN) beschichteten Glassubstraten 24 h nach Transfektion mit einem mCHERRY-eGFP-LC3B Plasmid als Markerprotein für Autophagosomen (gelb) und Autolysosomen (rot). Der Maßstab ist 20  $\mu\text{m}$ .

Mittels Lebendzellanalysen transient-transfizierter, glatter Muskelzellen mit dem mCHERRY-eGFP-LC3B Plasmid wurde im Folgenden die Lebensdauer und Dynamik von APs sowie ALs untersucht (Abbildung 3.2). Da bei Transfektionen verschiedene Plasmidmengen von den Zellen aufgenommen werden, exprimierten diese auch unterschiedlich stark die eingebrachten Proteine. Daher wurde hier beispielhaft sowohl eine stark (Abbildung 3.2 B) als auch eine schwach exprimierende Zelle (Abbildung 3.2 C) innerhalb einer Aufnahme dargestellt.

Bei der stark exprimierenden Zelle zeigten die markierten APs kein dynamisches Verhalten durch eine Ansäuerung zu ALs und während der gesamten Aufnahmezeit von einer Stunde konnten keine ALs innerhalb der Zelle detektiert werden. Dahingegen zeigte die insgesamt schwach exprimierende Zelle ein sehr dynamisches Verhalten und insgesamt deutlich schwächere, aber dafür mehr APs und ALs (Abbildung 3.2 C). Innerhalb der Zelle waren alle Prozesse der Neubildung eines APs, der Ansäuerung zum AL und der Dissoziation des ALs detektierbar. Jeder einzelne dieser Prozesse dauerte nur wenige Minuten. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um einen reinen Funktionsnachweis und keine statistische Auswertung.

Um die hohe Dynamik der APs zu verdeutlichen, wurde nach der ersten Stunde der mikroskopischen Analyse (0-60 min) der Abbau der APs für eine weitere Stunde mittels Chloroquin-diphosphat (CQ) blockiert (60-120 min) (Abbildung 3.2 D). CQ akkumuliert dabei im Lysosom und bindet Protonen, wodurch der pH-Wert ansteigt und die Hydrolasen innerhalb des Lysosoms nicht mehr aktiv sind und die APs nicht mehr abbauen können. Durch die Inkubation

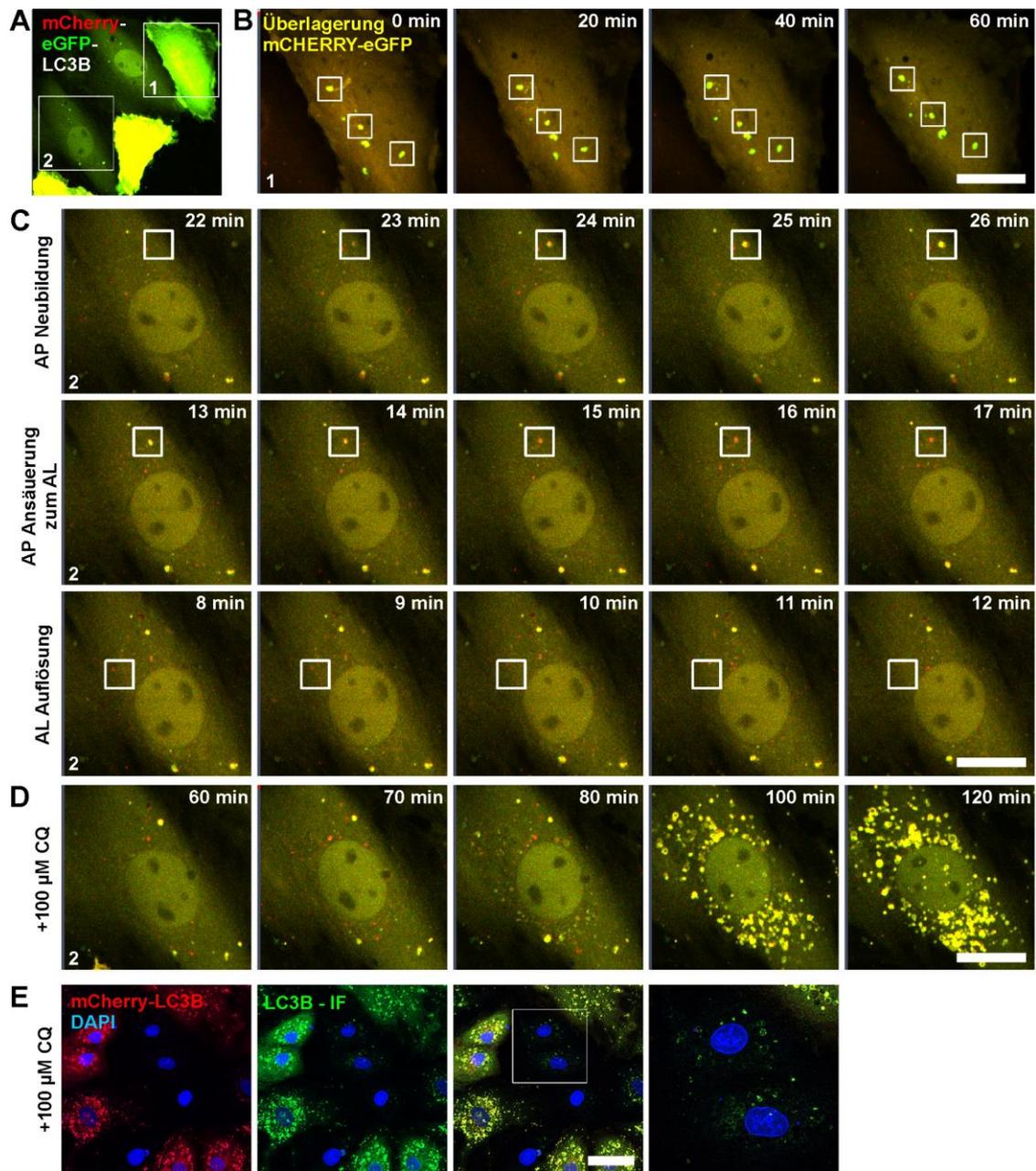
---

mit CQ kam es zu einer massiven Akkumulation der APs innerhalb der Zelle und ALs waren nicht mehr zu beobachten.

Da die unterschiedlich stark exprimierenden Zellen durch die transiente Transfektion für die Vergleichbarkeit in den weiteren Analysen ein Problem darstellen würden, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob stabil transfizierte A7r5 Zellen ein homogeneres und natürlicheres AP Muster aufweisen würden.

Zu diesem Zweck wurde eine Mischkultur aus A7r5 Wildtyp (WT) und stabil transfizierten A7r5 mCHERRY-LC3B Zellen auf die Dynamik der APs hin untersucht (Abbildung 3.2 E). Durch die Inkubation mit CQ wurde der Abbau der APs für eine Stunde blockiert und alle Zellen nach Fixierung zusätzlich gegen das AP Markerprotein LC3B immunzytochemisch gefärbt. Beim Vergleich der WT Zellen, die kein mCHERRY-LC3B Signal zeigen, mit den stabil transfizierten Zellen, konnte beobachtet werden, dass transfizierte Zellen eine deutlich stärkere Akkumulation der APs aufwiesen als WT Zellen.

Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl transiente LC3B Expression als auch stabil-transfizierte Zellen starken Überexpressionsartefakten unterworfen waren. Um diese für alle nachfolgenden Analysen auszuschließen, wurde auf die Expression von LC3B-Fusionsproteinen zum Nachweis der APs verzichtet. Stattdessen wurden nur noch immunzytochemische Färbungen gegen das AP Markerprotein LC3B zur Quantifizierung der natürlichen APs eingesetzt, um die *in vivo* Bedingung bestmöglich nachzuahmen.



**Abbildung 3.2: Überexpression von mCHERRY-eGFP-LC3B durch transiente und stabile Transfektion in A7r5 Zellen.** (A-C) Gezeigt sind Lebendzellanalysen von glatten Muskelzellen kultiviert auf FN beschichteten Glassubstraten 24 h nach Transfektion mit einem mCHERRY-eGFP-LC3B Plasmid zur Markierung von Autophagosomen (APs; grün und rot) und Autolysosomen (ALs; nur rot) in Wachstumsmedium für eine Aufnahmezeit von 1 h sowie (D) direkt nach Zugabe von Wachstumsmedium mit 100  $\mu\text{M}$  Chloroquin-diphosphat (CQ) für eine weitere Stunde. Die Überlagerung beider Kanäle resultiert dabei in einem gelben Signal und markiert nur die APs. Der Maßstab ist 20  $\mu\text{m}$ . (E) Dargestellt ist eine Mischkultur aus A7r5 Wildtyp und stabil exprimierenden A7r5-mCHERRY-LC3B Zellen kultiviert auf FN beschichtetem Glassubstrat, fixiert und immunzytochemisch gefärbt gegen LC3B (LC3B-IF) nach 1 h Inkubation mit Medium mit 100  $\mu\text{M}$  (CQ). Der Maßstab ist 50  $\mu\text{m}$ . Zusätzlich ist eine Vergrößerung eines Bildausschnitts gezeigt.

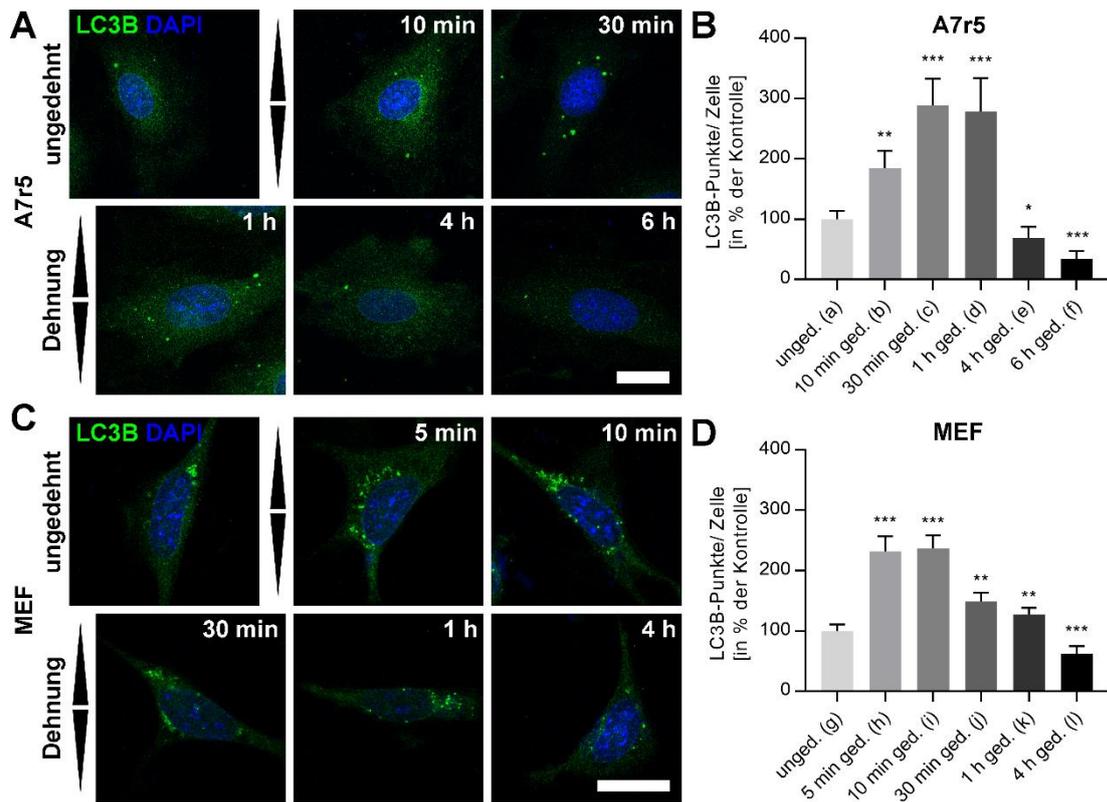
Um die Dynamik der APs unter mechanischer Belastung zu analysieren, wurden die Zellen auf linear-elastischen Silikonsubstraten nach FN Beschichtung kultiviert, die für verschiedene Zeiträume uniaxial, zyklisch unter physiologischen Bedingungen (20 %, 300 mHz) gedehnt wurden.

Durch die Dehnung konnte eine signifikante Zunahme der LC3B-positiven APs pro Zelle sowohl in den A7r5 (Abbildung 3.3 A und B), als auch MEF Zellen (Abbildung 3.3 C und D) festgestellt werden. Dabei war die Zunahme an APs sowohl abhängig vom Zelltyp als auch der Dauer der Dehnung.

Bei den glatten Muskelzellen kam es bereits nach 10 min Dehnung zu einem hoch signifikanten Anstieg der APs auf 184 % (2,3 APs pro Zelle) im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle (1,3 APs pro Zelle; 100 %). Das Maximum lag nach 30 min Dehnung (3,7; 289 %) vor und war damit höchst signifikant zur Kontrolle angestiegen. Nach 1 h Dehnung war die Zahl der APs pro Zelle nur leicht verändert (3,5; 278 %). Nach 4 h Dehnung (0,9; 69 %) sank die Zahl der APs pro Zelle signifikant unter das Niveau der ungedehnten Kontrolle, was sich nach 6 h Dehnung höchst signifikant weiter fortsetzte (0,4; 34 %).

Eine ähnliche Dynamik der APs induziert durch die zyklische Dehnung konnte bei MEF Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.3 C und D). Hier konnte bereits nach 5 min (36,8 APs pro Zelle; 232 %) bis 10 min Dehnung (37,5; 236 %) eine höchst signifikante Zunahme der APs pro Zelle im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle (16; 100 %) identifiziert werden. Nach 30 min (24; 149 %) und 1 h Dehnung (20; 127 %) lag die Zahl der APs pro Zelle immer noch hoch signifikant über der ungedehnten Kontrolle, sank aber nach 4 h Dehnung höchst signifikant unter den Wert der ungedehnten Kontrolle (10; 62 %).

Um den zeitlichen Verlauf der Induktion der LC3B-positiven APs pro Zelle mit möglichen mechanosensorischen Prozessen zu korrelieren, wurde im folgenden Schritt die Reorientierung der zytoskelettalen Strukturen sowie des Zellkörpers als Reaktion auf die uniaxiale, zyklische Dehnung analysiert. Darüber hinaus wurde der Abbau der APs durch das Lysosom blockiert, um dessen Einfluss auf die Prozesse der Reorientierung zu untersuchen.



**Abbildung 3.3: Mechanische Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 und MEF Einzelzellen.** (A) Gezeigt sind LC3B Immunfärbungen in glatten Muskelzellen (A7r5) und (C) Fibroblasten (MEF) nach uniaxialer, zyklischer Dehnung bei 20 % und 300 mHz für die dargestellten Zeitpunkte kultiviert auf FN beschichteten Elastomersubstraten und einer ungedehnten Kontrolle. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung an. Der Maßstab ist 20  $\mu\text{m}$ . (B und D) Dargestellt ist eine relative Quantifizierung der LC3B-Punkte jeder gedehnten Zelle (ged.) in Bezug zur ungedehnten Kontrolle (unged.) aus den Immunfärbungen (A und C) für alle untersuchten Zeitpunkte. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM aller ausgewerteten Zellen (n). Die angegebenen Signifikanzen stehen immer im Bezug zur ungedehnten Kontrolle ( $n_a = 72$ ,  $n_b = 54$ ,  $n_c = 55$ ,  $n_d = 50$ ,  $n_e = 54$ ,  $n_f = 55$ ,  $n_g = 72$ ,  $n_h = 74$ ,  $n_i = 75$ ,  $n_j = 69$ ,  $n_k = 71$ ,  $n_l = 66$ ).

### 3.1.2 Das Aktin-Zytoskelett und der Zellkörper zeigen einen Zelltyp-spezifischen, zeitlichen Verlauf in der Reorientierung nach uniaxialer, zyklischer Dehnung

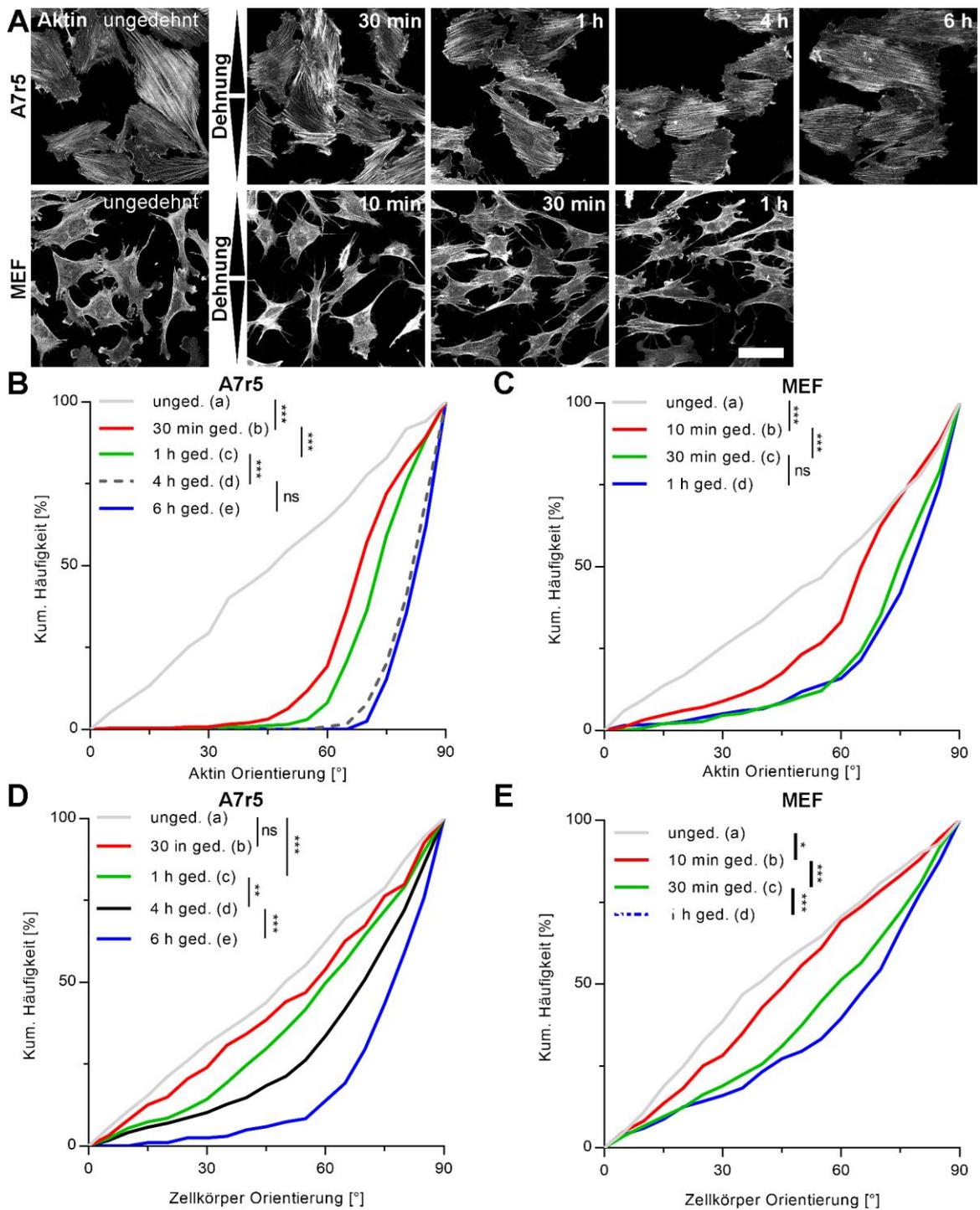
Die Reorientierung des Zellkörpers und des Zytoskeletts als Reaktion auf uniaxiale, zyklische Dehnung wurde bereits in verschiedenen Zelltypen untersucht, ohne dabei den zeitlichen Verlauf genau zu analysieren. Daher wurde der Hauptorientierungswinkel des Aktin-Zytoskeletts und des Zellkörpers jeder Zelle für die glatten Muskelzellen und die Fibroblasten analysiert und in einer kumulierten Häufigkeitsverteilung dargestellt. Dabei zeigten die beiden Zelltypen ein unterschiedliches Verhalten in der Stärke und Geschwindigkeit der Reorientierung.

Die mittlere Orientierung des Aktin-Zytoskeletts der glatten Muskelzellen lag bei der ungedehnten Kontrolle bei  $46^\circ$  und entsprach damit einer zufälligen Verteilung. Diese verschob sich nach 30 min Dehnung höchst signifikant auf einen mittleren Winkel von  $68^\circ$  relativ zur Dehnungsrichtung (Abbildung 3.4 A und B). Nach 1 h und 4 h Dehnung verschob sich dieser Winkel jeweils weiter höchst signifikant auf  $73^\circ$  und  $81^\circ$ . Nach 6 h Dehnung konnte keine weitere signifikante Veränderung festgestellt werden ( $82^\circ$ ).

Bei den Fibroblasten lag die mittlere Orientierung des Aktin-Zytoskeletts der ungedehnten Kontrolle bei  $53^\circ$  und verschob sich nach 10 min Dehnung höchst signifikant auf  $65^\circ$  und nach 30 min Dehnung weiter höchst signifikant auf  $74^\circ$  (Abbildung 3.4 A und C). Nach 1 h Dehnung ( $77^\circ$ ) war keine weitergehende signifikante Veränderung zum vorherigen Zeitpunkt von 30 min Dehnung feststellbar.

Die mittlere Reorientierung des Zellkörpers beider Zelltypen als Reaktion auf die uniaxiale, zyklische Dehnung lief verzögert im Vergleich zum Aktin Zytoskelett ab. Die Zellkörper der glatten Muskelzellen zeigten nach 30 min Dehnung ( $52^\circ$ ) keine signifikante Veränderung in der Orientierung zur ungedehnten Kontrolle ( $47^\circ$ ) (Abbildung 3.4 D). Erst nach 1 h Dehnung ( $57^\circ$ ) konnte ein höchst signifikanter Unterschied beobachtet werden. Auch zwischen 1 h und 4 h ( $64^\circ$ ) Dehnung sowie zwischen 4 h und 6 h ( $74^\circ$ ) Dehnung wurden mit zunehmender Reorientierung der Zellkörper signifikante Unterschiede aufgezeichnet.

Bei der mittleren Orientierung der Zellkörper konnte bei MEF Zellen zwischen allen Zeitpunkten ebenfalls ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 3.4 E). Die mittlere Orientierung des Zellkörpers verschob sich hierbei von  $42^\circ$  bei der ungedehnten Kontrolle nach 10 min Dehnung auf  $46^\circ$ , nach 30 min auf  $55^\circ$  und nach 1 h auf  $59^\circ$ . Insgesamt konnte damit zudem gezeigt werden, dass glatte Muskelzellen deutlich stärker mit einer Reorientierung auf zyklische Dehnung reagierten, als Fibroblasten.

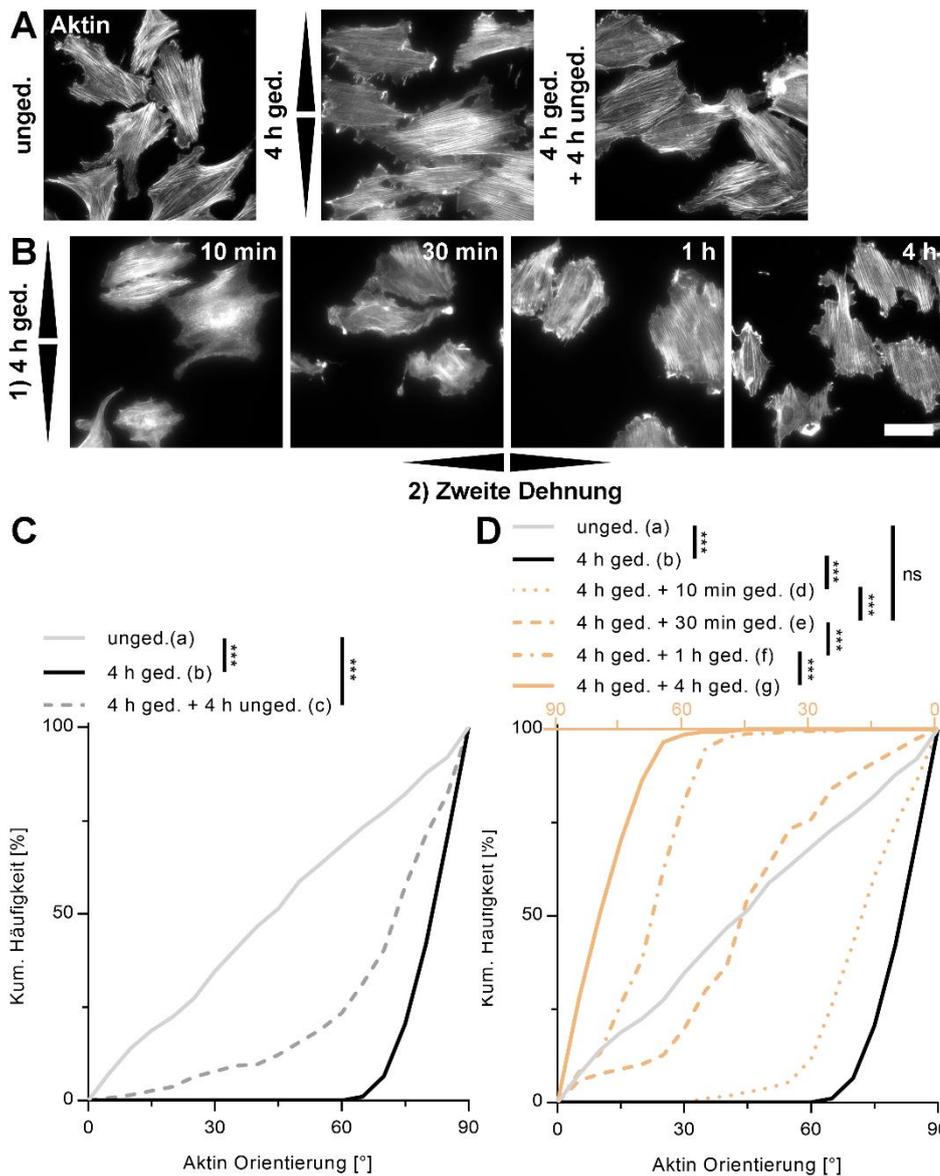


**Abbildung 3.4: Aktin und Zellkörper Reorientierung orthogonal zur Dehnungsrichtung als mechanosensitive Antwort auf uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 und MEF Einzelzellen.** (A) Dargestellt ist das Aktin-Zytoskelett von glatten Muskelzellen (A7r5) und Fibroblasten (MEF). Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät, für die beschriebenen Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt und nach Fixierung zur Markierung des Aktin-Zytoskeletts mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung an. Der Maßstab ist 50  $\mu\text{m}$ . (B-E) Der Hauptorientierungswinkel des Aktin Zytoskeletts (B und D) und des Zellkörpers (C und E) jeder Zelle wurde ausgewertet und die kumulierte Häufigkeitsverteilung aller Zellen (n) für die angegebenen Zeitpunkte in den Winkeln von 0° bis 90° zur Dehnungsrichtung aufgetragen (A7r5:  $n_a = 292$ ,  $n_b = 254$ ,  $n_c = 259$ ,  $n_d = 244$ ,  $n_e = 203$ ; MEF:  $n_a = 336$ ,  $n_b = 280$ ,  $n_c = 396$ ,  $n_d = 304$ ).

Um zu überprüfen, ob die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts für die Zellen nur einmalig möglich ist, wurde im nächsten Experiment nach 4 h zyklischer Dehnung die Silikonkammer um 90° gedreht und die Zellen entweder ohne Dehnung weiter kultiviert oder für weitere 10 min bis 4 h orthogonal zur ersten Dehnungsrichtung gedehnt (Abbildung 3.5 A-D).

Dabei ergab sich, dass der mittlere Orientierungswinkel des Aktin-Zytoskelett der glatten Muskelzellen nach 4 h Dehnung von 81° nach weiteren 4 h ohne Dehnung höchst signifikant auf 68° absank (Abbildung 3.5 C).

Durch eine zusätzliche Dehnung orthogonal zur Zugrichtung der ersten Dehnung konnte dies noch verstärkt werden. Der mittlere Orientierungswinkel sank jeweils höchst signifikant nach 10 min der zweiten Dehnung auf 72°, nach 30 min auf 45°, nach 1 h auf 45° und nach 4 h auf 11° ab (Abbildung 3.5 D). Dabei ist jeweils der Orientierungswinkel in Bezug zur ersten Dehnungsrichtung genannt. In Bezug zur zweiten Dehnungsrichtung lag der mittlere Orientierungswinkel nach 4 h der zweiten Dehnung somit bei 78° und damit war das Aktin-Zytoskelett nach der zweiten Dehnung genauso stark reorientiert wie nach der ersten Dehnung. Dies bedeutet, dass die Aktin Reorientierung der Zellen wiederholt durch die Zellen vollzogen werden kann.



**Abbildung 3.5: Aktin Reorientierung bei zweifacher, uniaxialer, zyklischer Dehnung mit Änderung der Dehnungsrichtung um 90° in A7r5 Einzelzellen.** (A und B) Gezeigt ist das Alexa Fluor Phalloidin gefärbte Aktin-Zytoskelett von glatten Muskelzellen (A7r5). (A) Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und für 4 h uniaxial, zyklisch gedehnt (4 h ged.), für weitere 4 h ohne Dehnung weiter kultiviert (4 h ged. + 4 h unged.) oder (B) für die gezeigten Zeiträume uniaxial, zyklisch weiter gedehnt, aber dabei orthogonal zur Zugrichtung der ersten Dehnung. Die Pfeile zeigen die Richtungen der ersten und zweiten Dehnung an. Der Maßstab beträgt 50 µm. (C und D) Der Hauptorientierungswinkel des Aktin-Zytoskeletts jeder Zelle wurde ausgewertet und die kumulierte Häufigkeitsverteilung aller Zellen (n) für die angegebenen Zeitpunkte in den Winkeln von 0° bis 90° zur ersten (schwarz) und zweiten (braun) Dehnungsrichtung für jeden Dehnungszeitraum in einem Histogramm aufgetragen ( $n_a = 459$ ,  $n_b = 292$ ,  $n_c = 268$ ,  $n_d = 180$ ,  $n_e = 157$ ,  $n_f = 175$ ,  $n_g = 285$ ).

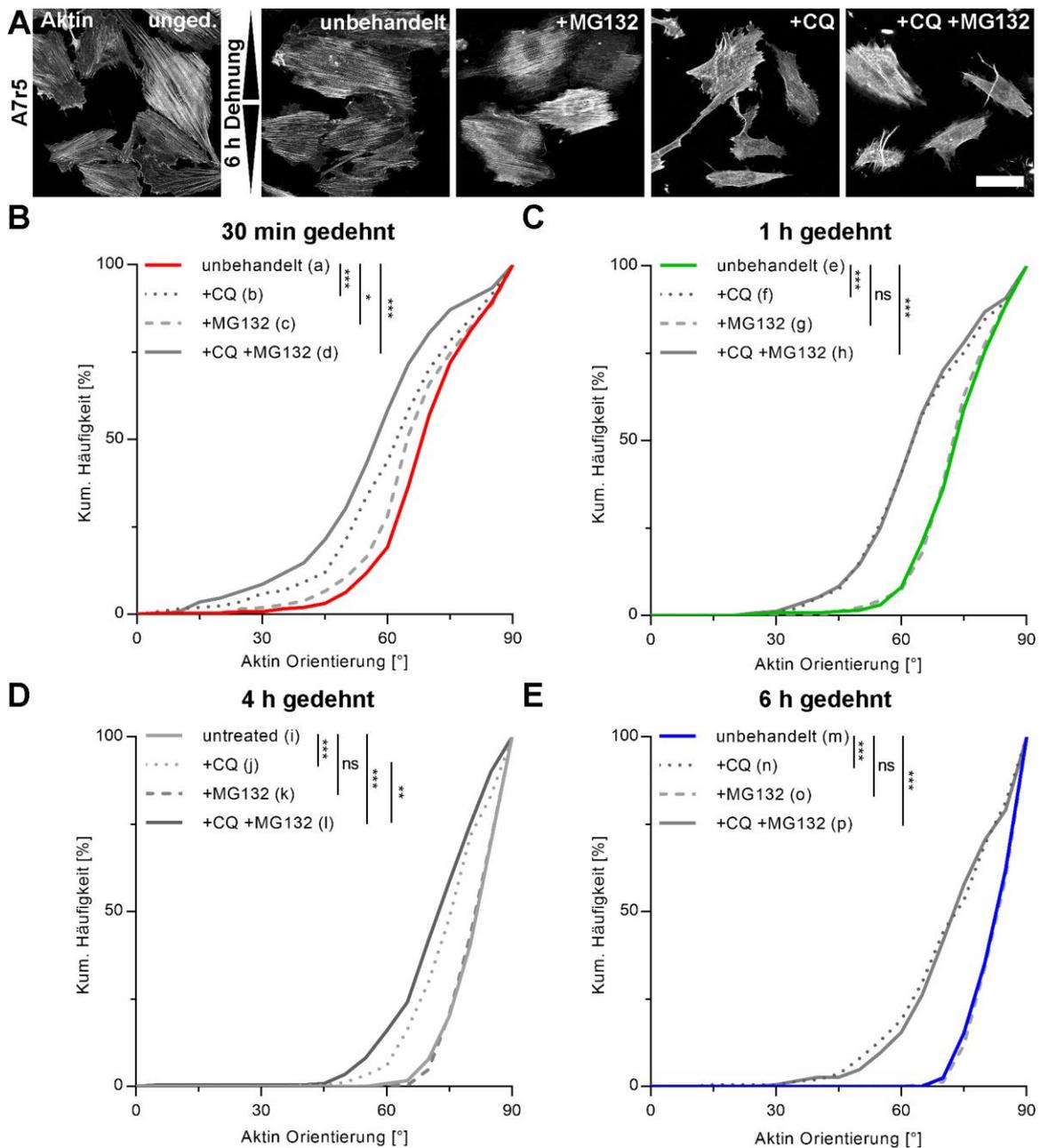
Aus den Ergebnissen der ersten beiden Abschnitte (3.1.1 und 3.1.2) wurde die Hypothese aufgestellt, dass es einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen dehnungsinduzierten LC3B-positiven APs und der Reorientierung des Zellkörpers sowie des Aktin-Zytosketts der Zellen als mechanosensitive Antwort auf die uniaxiale, zyklische Dehnung gibt.

### 3.1.3 Die Reorientierung des Zellkörpers und des Zytoskeletts ist abhängig vom lysosomalen Abbau der Autophagosomen

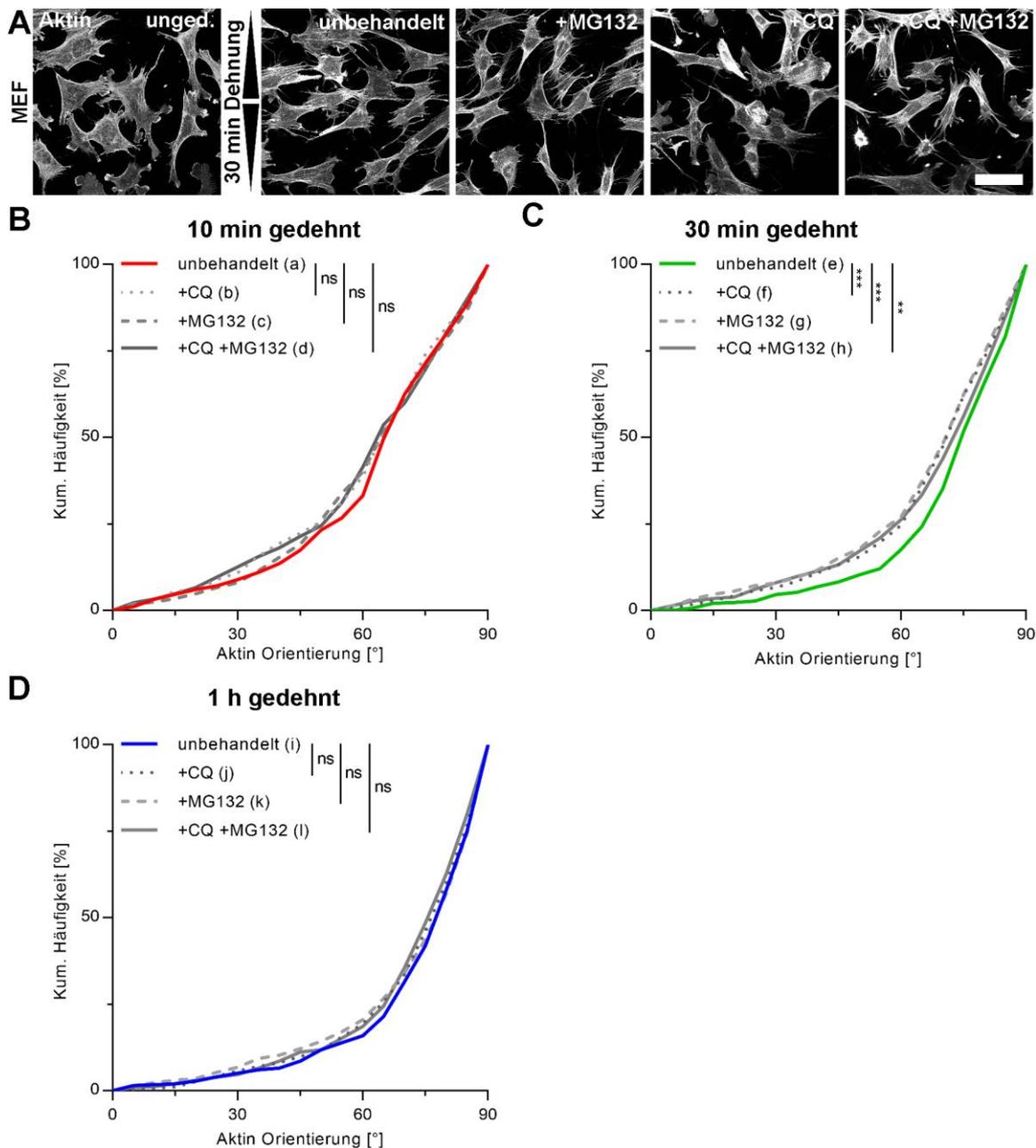
Um die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen AP Bildung und Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts zu überprüfen, wurde die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts bei blockiertem lysosomalem Abbau untersucht. Diese Analysen wurden durch Blockierungsexperimente des Proteasoms ergänzt, da beide Abbaumechanismen der Zelle sich gegenseitig regulieren können. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Reorientierung des Aktin Zytoskeletts der glatten Muskelzellen bei allen Dehnungszeiträumen höchst signifikant durch die Blockierung des Abbaus durch das Lysosom abgeschwächt, jedoch nicht durch die Blockierung des Proteasoms beeinträchtigt wurde (Abbildung 3.6 A).

Die Blockierung des Abbaus durch das Lysosom bewirkte bei den glatten Muskelzellen nach 30 min Dehnung eine Abschwächung der mittleren Aktin Reorientierung von  $68^\circ$  auf  $61^\circ$  (Abbildung 3.6 B), nach 1 h von  $72^\circ$  auf  $64^\circ$  (Abbildung 3.6 C), nach 4 h von  $81^\circ$  auf  $75^\circ$  (Abbildung 3.6 D) und nach 6 h Dehnung von  $82^\circ$  auf  $71^\circ$  (Abbildung 3.6 E). Die Blockierung des Proteasoms bewirkte nach 30 min Dehnung eine signifikante schwächere Aktin Reorientierung auf einen mittleren Winkel von  $66^\circ$ . Zu allen weiteren Zeitpunkten wurde keine Veränderung durch die Blockierung des Proteasoms festgestellt (Abbildung 3.6 C-E). Die Blockierung des Lysosoms und des Proteasoms zusammen verzögerte zu jedem Zeitpunkt die Aktin Reorientierung ebenfalls höchst signifikant, unterschied sich jedoch nicht von der Blockierung des Lysosoms allein.

Bei der Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts der Fibroblasten hatte die Blockierung des Lysosoms bzw. des Proteasoms sowie beider Blockierungen parallel nach 10 min Dehnung keinerlei Auswirkungen (Abbildung 3.7 A und B). Nach 30 min Dehnung zeigte sowohl die Blockierung des Lysosoms eine Abschwächung der Aktin Reorientierung von  $71^\circ$  auf  $67^\circ$  als auch die Blockierung des Proteasoms von  $71^\circ$  auf  $65^\circ$  (Abbildung 3.7 C). Die Kombination beider Blockierungen bewirkte ebenfalls zum gleichen Zeitpunkt eine hoch signifikante Abschwächung auf  $67^\circ$ . Analysen nach 1 h zyklischer Dehnung konnten die signifikante Reduktion der Reorientierung jedoch für keine Blockierung bestätigen. Hier verhielten sich alle Proben identisch zur nicht blockierten Kontrolle (Abbildung 3.7 D).

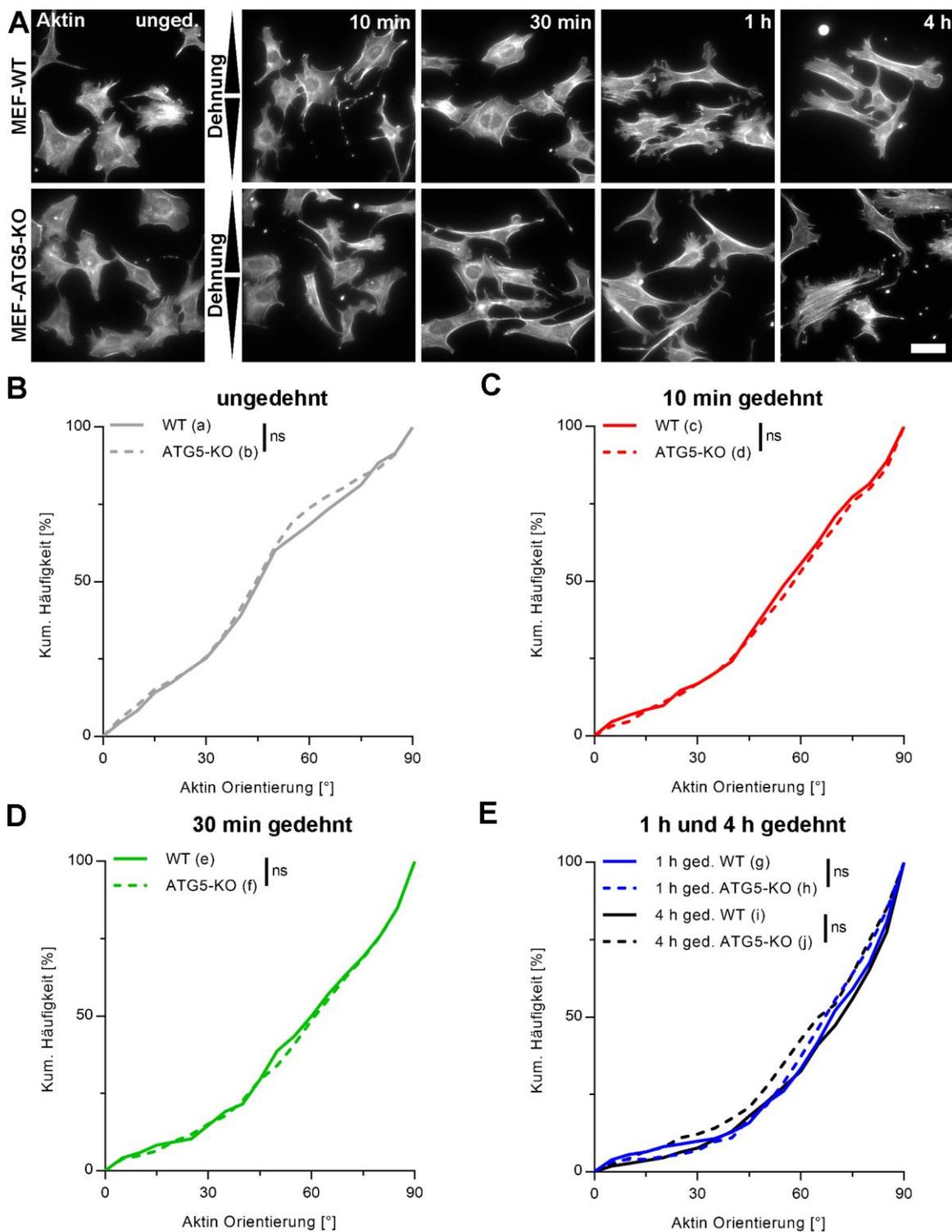


**Abbildung 3.6: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen und des Proteasoms in A7r5 Einzelzellen.** (A) Gezeigt ist das Aktin-Zytoskelett von glatten Muskelzellen (A7r5). Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 1 h Vorinkubation mit Chloroquin-diphosphat (CQ) und/ oder MG132 zur Blockierung des lysosomalen Abbaus und/ oder des Abbaus durch das Proteasom für die beschriebenen Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt. Das Aktin-Zytoskelett wurde mittels Alexa Fluor Phalloidin nach Fixierung gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung. Der Maßstab beträgt 50  $\mu\text{m}$ . (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 254$ ,  $n_b = 249$ ,  $n_c = 256$ ,  $n_d = 257$ ,  $n_e = 259$ ,  $n_f = 255$ ,  $n_g = 256$ ,  $n_h = 252$ ,  $n_i = 244$ ,  $n_j = 251$ ,  $n_k = 248$ ,  $n_l = 232$ ,  $n_m = 203$ ,  $n_n = 199$ ,  $n_o = 219$ ,  $n_p = 187$ ).



**Abbildung 3.7: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen und des Proteasoms in MEF Einzelzellen.** (A) Gezeigt ist das Aktin-Zytoskelett von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF). Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 1 h Vorinkubation mit Chloroquin-diphosphat (CQ) und/ oder MG132 zur Blockierung des lysosomalen Abbaus und/ oder des Abbaus durch das Proteasom für die beschriebenen Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt und das Aktin-Zytoskelett nach Fixierung mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung. Der Maßstab beträgt 50  $\mu\text{m}$ . (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen ( $n$ ) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 280$ ,  $n_b = 304$ ,  $n_c = 287$ ,  $n_d = 270$ ,  $n_e = 437$ ,  $n_f = 451$ ,  $n_g = 428$ ,  $n_h = 438$ ,  $n_i = 396$ ,  $n_j = 455$ ,  $n_k = 428$ ,  $n_l = 429$ ).

Da der Einfluss des lysosomalen Abbaus auf die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts als Antwort auf uniaxiale, zyklische Dehnung in den Fibroblasten nicht zu allen untersuchten Dehnungszeitpunkten eindeutig war, wurde im Folgenden der Einfluss der Initiation der Autophagie auf den Reorientierungsprozess analysiert. Hierfür wurde die Aktin Reorientierung nach Dehnung von MEF Wildtyp und MEF ATG5-KO Zellen ausgewertet (Abbildung 3.8 A-E). ATG5 ist dabei für die Lipidation von LC3-I zu LC3-II und damit für die AP Bildung notwendig. Bei der Reorientierungsanalyse ergab sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Beeinträchtigung auf die mittlere Aktin Reorientierung. Die Herkunft der MEF WT Zellen in diesem Experiment ist dabei nicht identisch mit den bisher und im Folgenden verwendeten MEF Zellen.



**Abbildung 3.8: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung in MEF WT und ATG5-KO Einzelzellen.** (A) Gezeigt ist das Aktin-Zytoskelett von WT und ATG5-KO murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF). Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h Inkubation für die beschriebenen Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt und das Aktin-Zytoskelett nach Fixierung mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung. Der Maßstab beträgt 50  $\mu\text{m}$ . (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 241$ ,  $n_b = 276$ ,  $n_c = 286$ ,  $n_d = 284$ ,  $n_e = 292$ ,  $n_f = 265$ ,  $n_g = 234$ ,  $n_h = 247$ ,  $n_i = 222$ ,  $n_j = 255$ ).

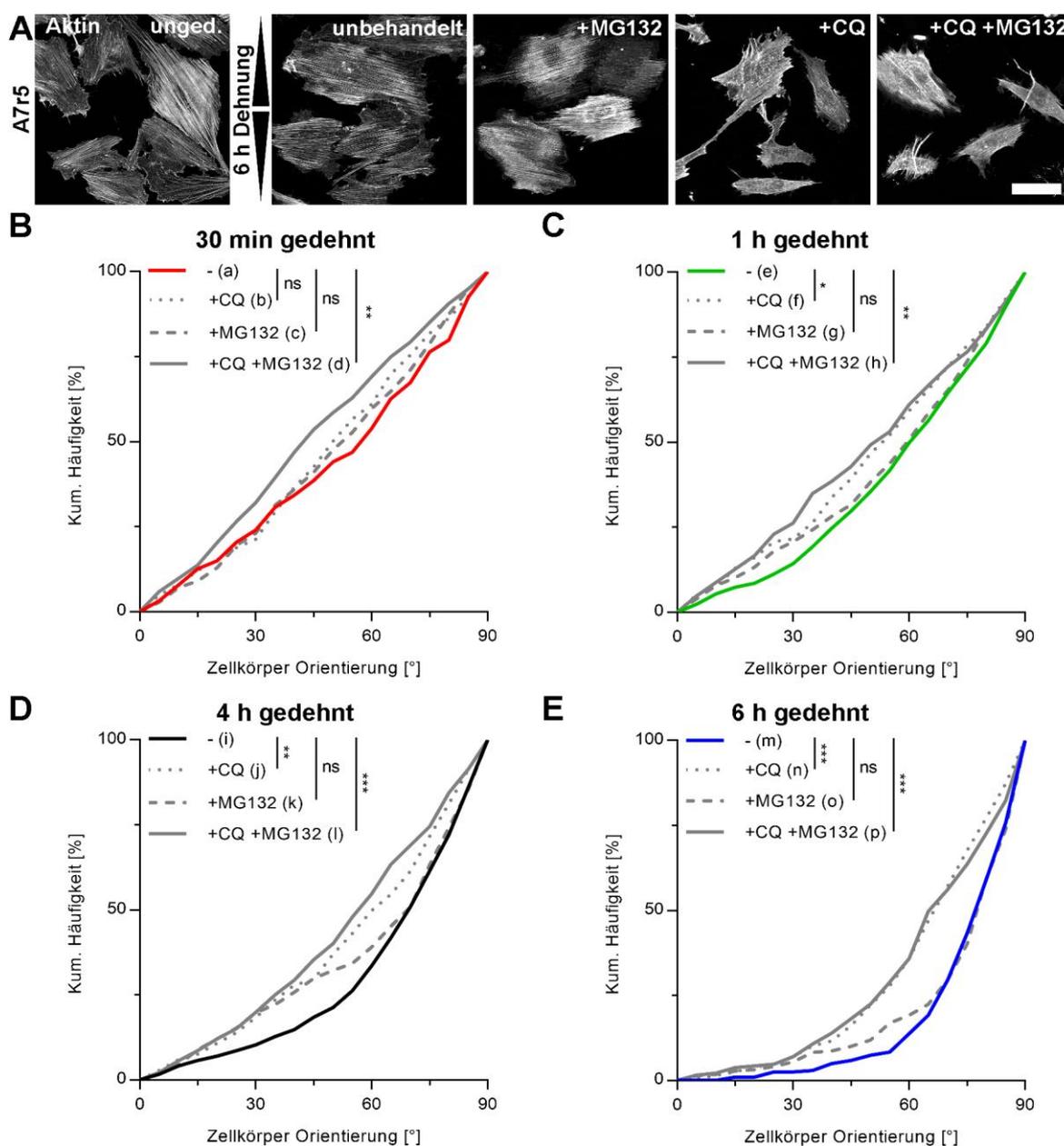
Da neben dem Aktin-Zytoskelett ebenfalls der Zellkörper und die Intermediärfilamente auf die uniaxiale, zyklische Dehnung reagieren, wurde im nächsten Abschnitt auch der Einfluss des lysosomalen Abbaus auf diese Prozesse in den glatten Muskelzellen analysiert.

Zu diesem Zweck wurde von den zuvor bereits untersuchten A7r5 Zellen die Reorientierung des Zellkörpers für alle Dehnungszeitpunkte nach uniaxialer, zyklischer Dehnung untersucht (Abbildung 3.9). Die Blockierung des Proteasoms zeigte dabei zu keinem Dehnungszeitpunkt eine Auswirkung (Abbildung 3.9 A-E). Die Reorientierung des Zellkörpers war jedoch nach 1 h Dehnung signifikant durch die Blockierung des Lysosoms verlangsamt und wies eine Veränderung des mittleren Orientierungswinkels von  $57^\circ$  auf  $51^\circ$  auf (Abbildung 3.9 B).

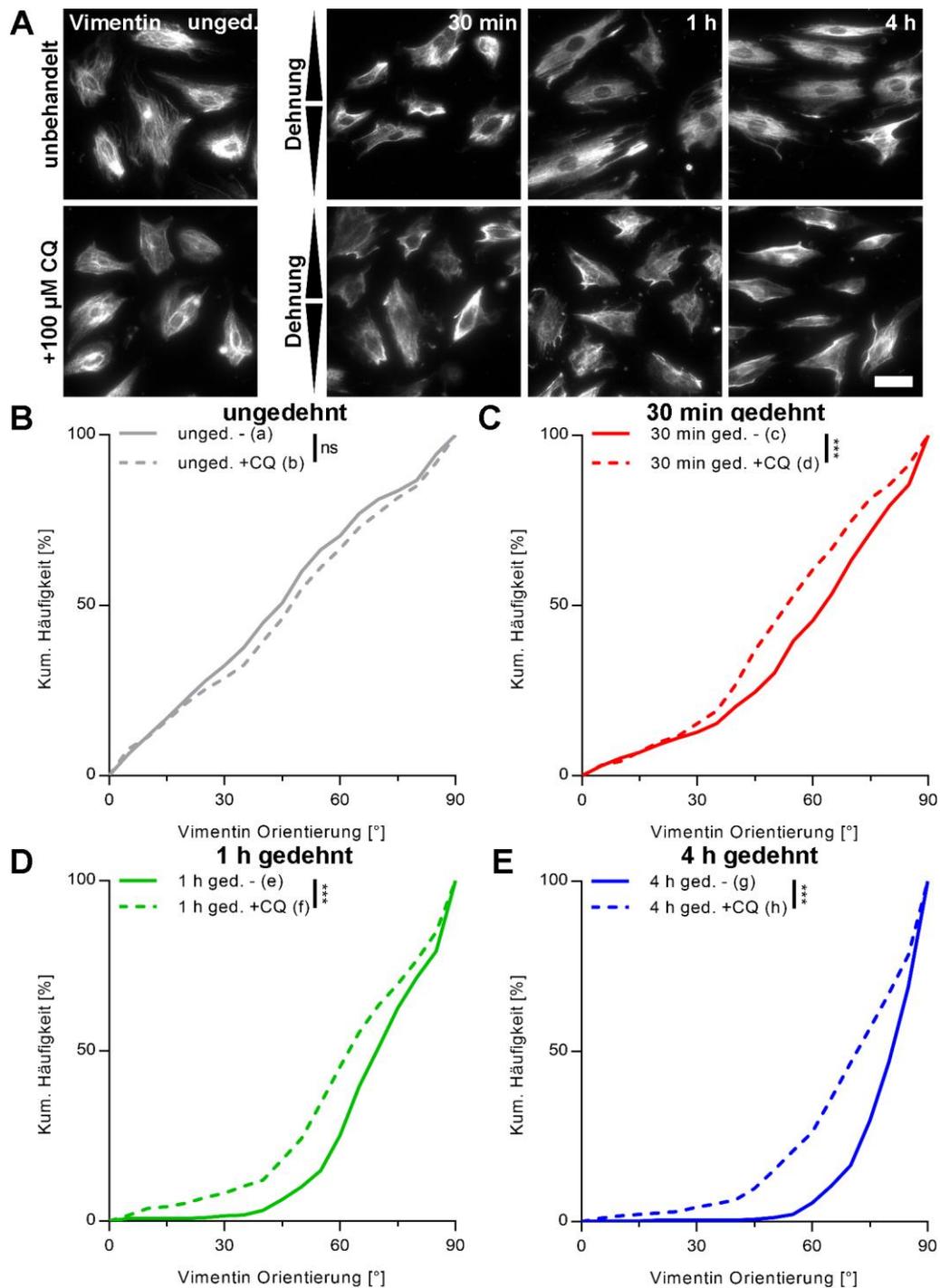
Die Blockierung des Proteasoms und des Lysosoms zeigte nach 1 h Dehnung eine noch stärkere Abschwächung auf  $49^\circ$  und schon nach 30 min Dehnung eine signifikante Abschwächung von  $52^\circ$  auf  $44^\circ$ , wo die Blockierung des Lysosoms alleine keine Veränderung zeigen konnte (Abbildung 3.9 C). Die mittlere Reorientierung des Zellkörpers wurde nach 4 h hoch signifikant (von  $64^\circ$  auf  $56^\circ$ ) und nach 6 h Dehnung höchst signifikant (von  $74^\circ$  auf  $63^\circ$ ) durch Blockierung des Lysosoms abgeschwächt (Abbildung 3.9 D und E). Die zusätzliche Blockierung des Proteasoms zeigte eine noch stärkere Abschwächung auf  $54^\circ$  nach 4 h und auf  $64^\circ$  nach 6 h Dehnung.

Für die Reorientierung des Intermediärfilaments Vimentin konnte zu allen Dehnungszeitpunkten bei A7r5 Zellen eine höchst signifikante Abschwächung der Vimentin Reorientierung festgestellt werden (Abbildung 3.10 A-E). Die mittlere Reorientierung des Vimentin wurde nach 30 min von  $59^\circ$  auf  $53^\circ$ , nach 1 h von  $69^\circ$  auf  $61^\circ$  und nach 4 h Dehnung von  $78^\circ$  auf  $68^\circ$  durch die Blockierung des lysosomalen Abbaus abgeschwächt.

Damit konnte in diesen Zellen der deutliche Effekt der AP-abhängigen lysosomalen Degradation auf die Reorientierung aller untersuchten Zytoskelett-Systeme sowie des Zellkörper nachgewiesen werden.



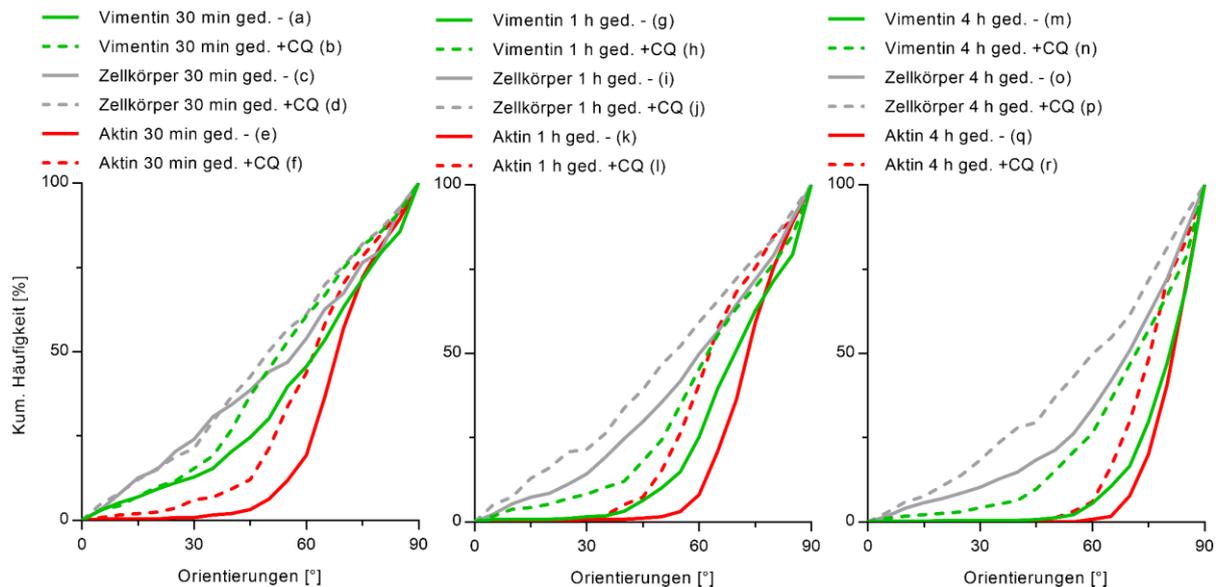
**Abbildung 3.9: Zellkörper Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen und des Proteasoms in A7r5 Einzelzellen.** (A) Gezeigt ist das Aktin-Zytoskelett von glatten Muskelzellen (A7r5). Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 1 h Vorinkubation mit CQ und/ oder MG132 zur Blockierung des lysosomalen Abbaus und/ oder des Abbaus durch das Proteasom für die beschriebenen Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt. Das Aktin-Zytoskelett wurde nach Fixierung mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung. Der Maßstab beträgt 50  $\mu\text{m}$ . (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen ( $n$ ) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 254$ ,  $n_b = 249$ ,  $n_c = 256$ ,  $n_d = 257$ ,  $n_e = 259$ ,  $n_f = 255$ ,  $n_g = 256$ ,  $n_h = 252$ ,  $n_i = 244$ ,  $n_j = 251$ ,  $n_k = 248$ ,  $n_l = 232$ ,  $n_m = 203$ ,  $n_n = 199$ ,  $n_o = 219$ ,  $n_p = 187$ ).



**Abbildung 3.10: Vimentin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen in A7r5 Einzelzellen.** (A) Gezeigt sind IFs von Vimentin von glatten Muskelzellen (A7r5). Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 1 h Vorinkubation mit CQ zur Blockierung des lysosomalen Abbaus für die beschriebenen Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt und nach Fixierung immunzytochemisch gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung. Der Maßstab beträgt 50  $\mu$ m. (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 446$ ,  $n_b = 434$ ,  $n_c = 305$ ,  $n_d = 325$ ,  $n_e = 377$ ,  $n_f = 399$ ,  $n_g = 417$ ,  $n_h = 471$ ).

Der zeitliche Vergleich aller auf ihre Reorientierung hin untersuchten Systeme konnte des Weiteren eine klare Reihenfolge der Reorientierung des Aktin- und Vimentin-Zytoskeletts sowie des Zellkörpers der glatten Muskelzellen darlegen.

Diese zeigten, dass das Aktin-Filamentsystem primär auf die uniaxiale, zyklische Dehnung reagiert und nachfolgend Vimentin und schließlich der Zellkörper reorientieren (Abbildung 3.11). Zusätzlich wurde erkannt, dass alle diese Prozesse durch die Blockierung des Abbaus durch das Lysosom verlangsamt wurden.



**Abbildung 3.11: Vergleich der Aktin, Vimentin und Zellkörper Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von Autophagosomen in A7r5 Einzelzellen.** Dargestellt sind Histogramme zu den kumulierten Häufigkeitsverteilungen des Aktin- und Vimentin-Zytoskeletts und des Zellkörpers von A7r5 Einzelzellen nach uniaxialer, zyklischer Dehnung und anschließender immunzytochemischer Färbung zusammengefasst aus Abbildung 3.6, Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10.

Im ersten Kapitel dieser Arbeit (3.1) konnte ein Zusammenhang zwischen den Reorientierungsprozessen innerhalb der Zelle als mechanosensitive Antwort auf uniaxiale, zyklische Dehnung und dem Abbau von APs, besonders in glatten Muskelzellen festgestellt werden. Aufgrund des stärksten und schnellsten Einflusses der Dehnung auf die Aktin Reorientierung, wurde für die weiteren Untersuchungen der Fokus auf das Verhalten des Aktin-Zytoskeletts und der damit assoziierten Proteinstrukturen gelegt.

### **3.2 RhoA und ROCK induzieren die Zellkontraktilität und damit die dehnungsinduzierte Autophagie**

Basierend auf den unterschiedlichen Effekten der Blockierung des AP-abhängigen, lysosomalen Abbaus bei MEF und A7r5 Zellen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die entsprechenden Unterschiede mit der unterschiedlich starken Ausbildung der entsprechenden mechanosensorischen Strukturen, im Besonderen der Stärke und Häufigkeit von Aktin-Stressfasern (SFs) und Fokaladhäsionen (FAs) zusammenhängt.

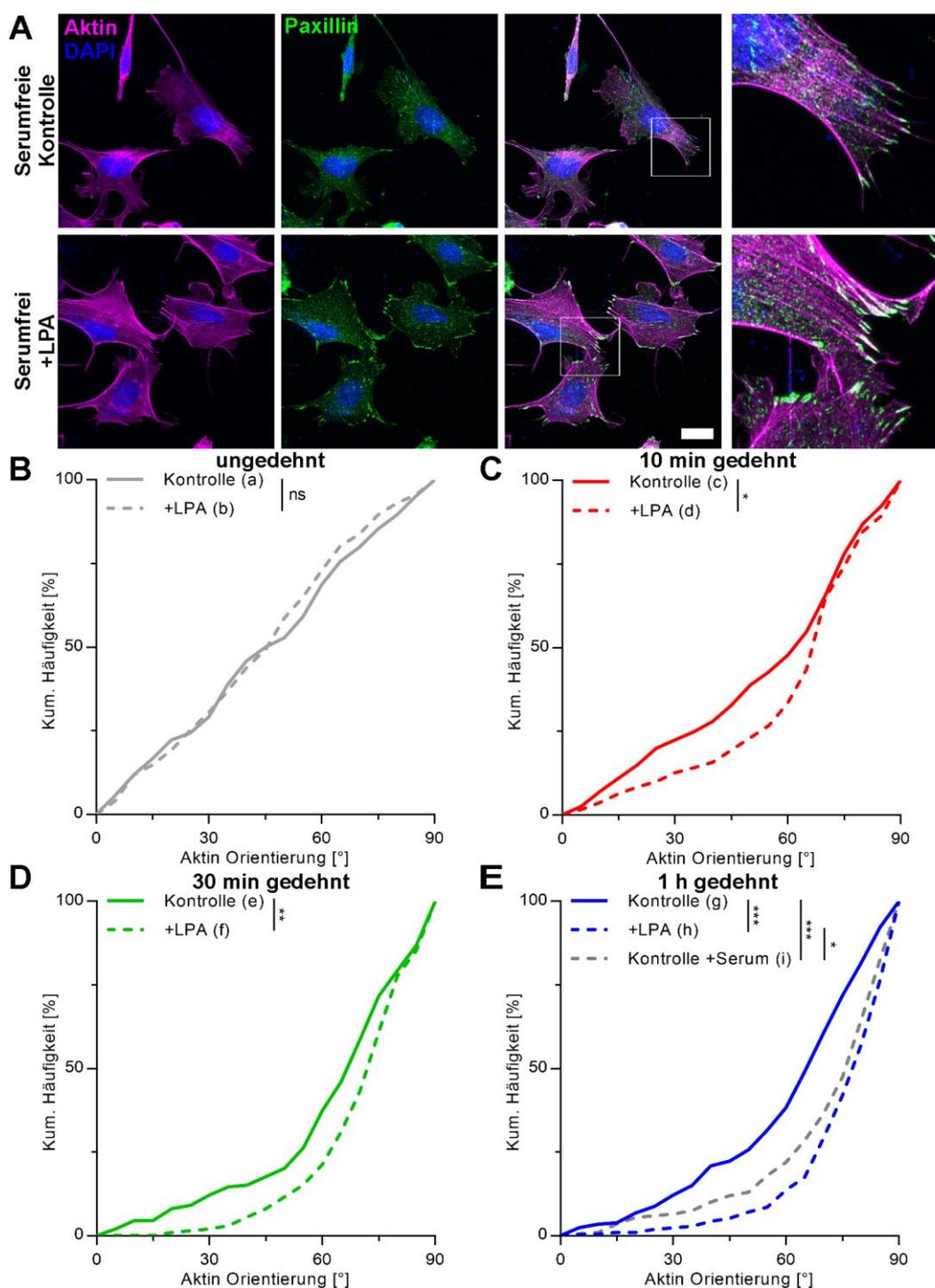
Um dies zu überprüfen, wurde die Zellkontraktilität der Zellen moduliert. Zu diesem Zweck wurde die Verstärkung von SFs und FAs durch eine Induktion der Ras homologue GTPase A (RhoA) in den Fibroblasten initiiert bzw. und eine Inhibition der in der Signalkaskade folgenden Rho-assoziierten Protein Kinase (ROCK) in den glatten Muskelzellen zur Reduktion der SFs und FAs induziert. Anschließend wurde der Einfluss der Behandlungen auf die Aktin Reorientierung und die Induktion von APs betrachtet.

#### **3.2.1 RhoA Induktion in Fibroblasten verstärkt die Aktin Reorientierung und die dehnungsinduzierte Autophagie**

Die zur Induktion von RhoA verwendete Lysophosphatidsäure (LPA) ist im Blutserum und damit auch im Standardzellkulturmedium in geringen Mengen vorhanden. Aus diesem Grund wurden die Fibroblasten für diese Experimente als Kontrolle in serumfreien Medium kultiviert. Durch die Zugabe von LPA wurde alternativ die RhoA Signalkaskade aktiviert.

Durch die Aktivierung von RhoA konnte 30 min nach Zugabe von LPA eine Zunahme an Aktin-Stressfasern und eine Vergrößerung an FAs in den MEF Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.12 A). Bereits nach 10 min uniaxialer, zyklischer Dehnung der Zellen konnte eine signifikante Zunahme der mittleren Aktin Reorientierung durch die Aktivierung von RhoA von  $54^\circ$  auf  $61^\circ$  festgestellt werden (Abbildung 3.12 C). Die Zunahme war nach 30 min Dehnung von  $62^\circ$  auf  $69^\circ$  hoch signifikant und nach 1 h Dehnung von  $60^\circ$  auf  $74^\circ$  höchst signifikant.

Zusätzlich zeigten die RhoA aktivierten Zellen nach 1 h Dehnung eine signifikant stärkere Aktin Reorientierung mit einem mittleren Winkel von  $74^\circ$  zur Dehnungsrichtung im Vergleich zu einer Kontrolle, die dauerhaft mit serumhaltigen Medium kultiviert und gedehnt wurde ( $69^\circ$ ).

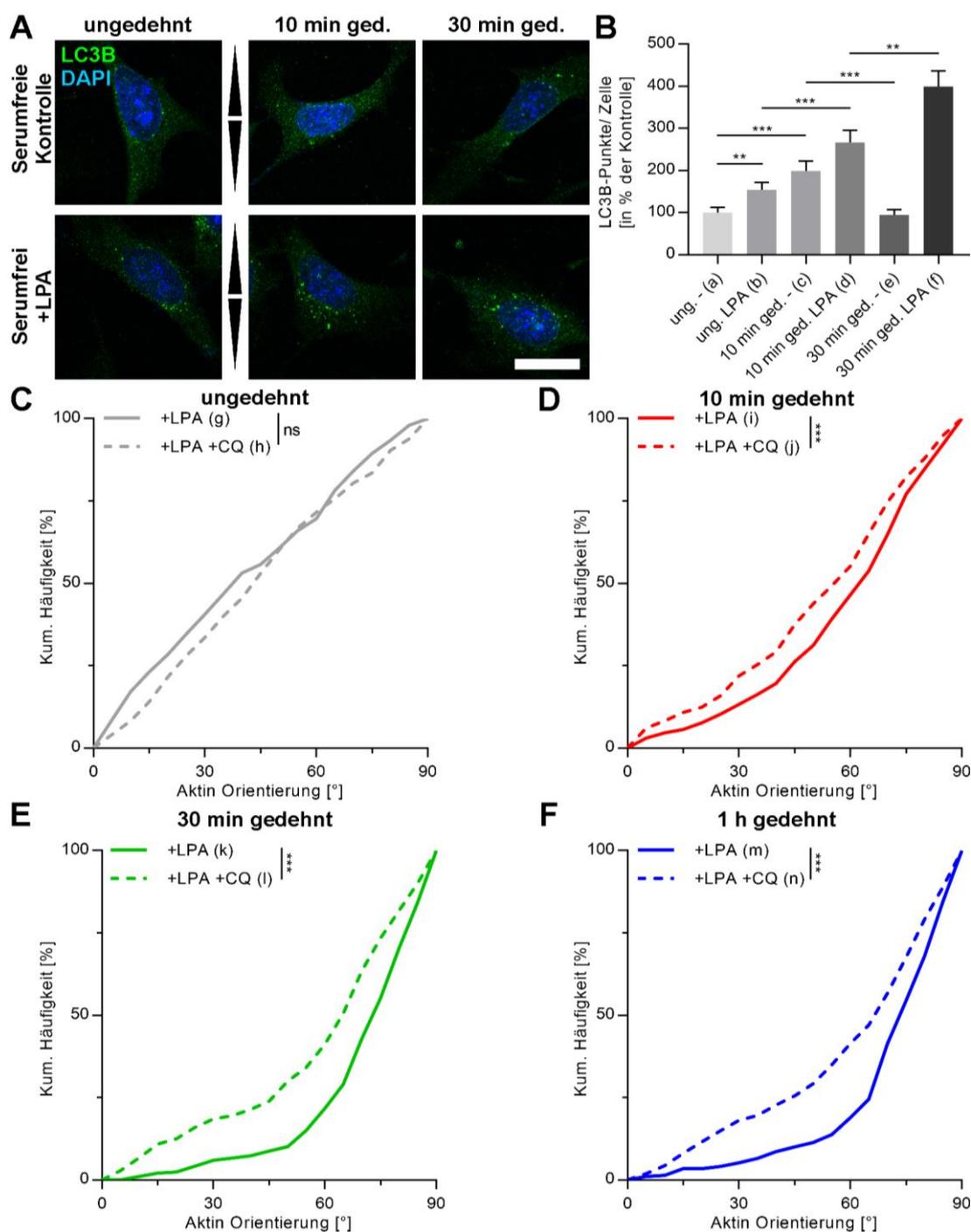


**Abbildung 3.12: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei verstärkter RhoA Induktion in MEF Einzelzellen.** (A) Gezeigt sind Färbungen von Paxillin und Aktin von murinen, embryonalen Fibroblasten (MEF). Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h das Medium gegen serumfreies Medium oder serumfreies Medium mit 50  $\mu$ M Lysophosphatidsäure (LPA) ausgetauscht. Nach 30 min erfolgte die Dehnung für die genannten Zeiträume und nach Fixierung die immunzytochemische Färbung von Paxillin sowie die Markierung des Aktin mittels Alexa Fluor Phalloidin. Zusätzlich ist jeweils eine Vergrößerung eines Bildausschnitts gezeigt. Der Maßstab ist 20  $\mu$ m. (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 144$ ,  $n_b = 203$ ,  $n_c = 201$ ,  $n_d = 191$ ,  $n_e = 198$ ,  $n_f = 197$ ,  $n_g = 206$ ,  $n_h = 212$ ,  $n_i = 200$ ).

Um eine mögliche Korrelation zwischen erhöhter Aktin Reorientierung und AP Bildung zu analysieren, wurde wie im zuvor gezeigten Experiment die RhoA Aktivität in den Fibroblasten durch serumfreies Medium unterdrückt bzw. durch Zugabe von LPA aktiviert und nachfolgend die Zahl der LC3B-positiven APs pro Zelle nach uniaxialer, zyklischer Dehnung quantifiziert.

Hierbei zeigte die serumfreie Kontrolle nach 10 min Dehnung einen höchst signifikanten Anstieg von 7 (100 %) bei der ungedehnten Kontrolle auf im Mittel 15 (199 %) APs pro Zelle (Abbildung 3.13 A und B). Nach 30 min Dehnung sanken diese jedoch wieder höchst signifikant auf das Niveau der ungedehnten Kontrolle ab (7; 95 %). Durch die Aktivierung von RhoA kam es bereits ohne Dehnung zu einer hoch signifikanten Zunahme auf 10 APs pro Zelle (154 %). Diese nahmen durch 10 min Dehnung höchst signifikant auf 21 APs pro Zelle (267 %) und nach 30 min Dehnung weiter hoch signifikant im Vergleich zum vorherigen Zeitpunkt auf 31 APs pro Zelle (399 %) zu.

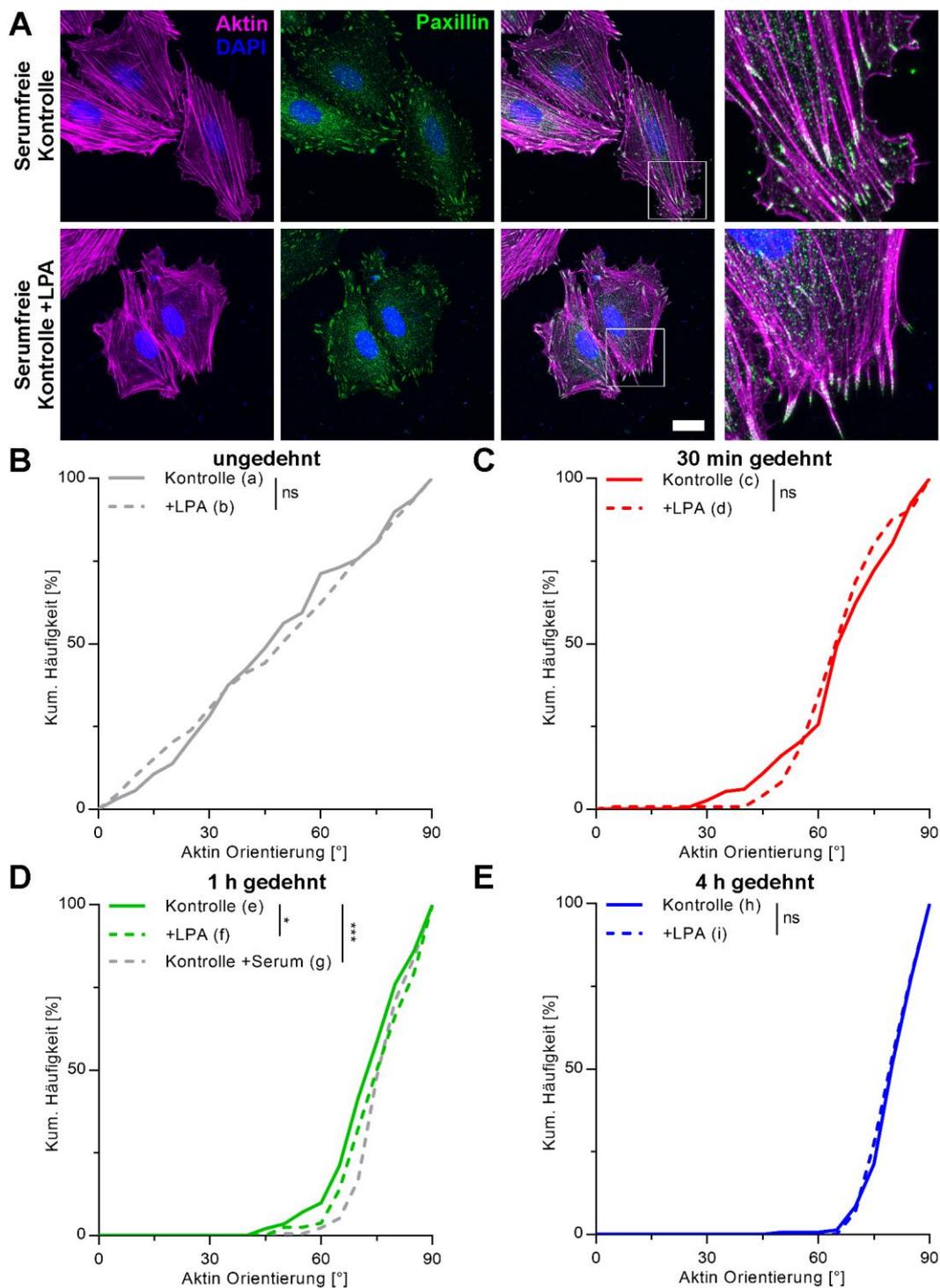
Aufgrund der Zunahme an dehnungsinduzierten APs nach RhoA Aktivierung in Fibroblasten wurde als nächstes getestet, ob unter diesen Bedingungen die Blockierung des Abbaus durch das Lysosom nun auch eine wichtige Rolle in der Aktin Reorientierung spielt. Hierzu wurde erneut RhoA in Fibroblasten aktiviert und die Aktin Reorientierung mit oder ohne blockiertem Abbau durch das Lysosom (CQ) nach Dehnung analysiert. Im Ergebnis kam es zu allen Dehnungszeitpunkten zu einer höchst signifikant abgeschwächten Aktin Reorientierung durch die Blockade des Lysosom-abhängigen AP Abbaus (Abbildung 3.13 C-F). Dabei sank der mittlere Hauptorientierungswinkel nach 10 min Dehnung von  $58^\circ$  bei der Kontrolle auf  $51^\circ$ , nach 30 min Dehnung von  $69^\circ$  auf  $58^\circ$  und nach 1 h Dehnung von  $70^\circ$  auf  $59^\circ$  ab.



**Abbildung 3.13: Aktin Reorientierung und Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei RhoA Induktion in MEF Einzelzellen.** (A) Gezeigt sind LC3B IFs in MEF Zellen nach uniaxialer, zyklischer Dehnung und einer ungedehnten Kontrolle. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h das Medium gegen serumfreies Medium mit 50  $\mu$ m LPA oder ohne Zusatz (Kontrolle) ausgetauscht und für 30 min inkubiert. Nach Dehnung für die angegebenen Zeitpunkte wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung an. Der Maßstab ist 20  $\mu$ m. (B) Dargestellt ist eine relative Quantifizierung der LC3B-Punkte pro Zelle in Bezug zur ungedehnten, serumfreien Kontrolle. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM aller Zellen (n) ( $n_a = 98$ ,  $n_b = 73$ ,  $n_c = 50$ ,  $n_d = 58$ ,  $n_e = 52$ ,  $n_f = 49$ ). (C-F) Parallel wurde das Aktin-Zytoskelett nach Färbung in fixierten Proben ausgewertet. Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_g = 303$ ,  $n_h = 292$ ,  $n_i = 301$ ,  $n_j = 315$ ,  $n_k = 286$ ,  $n_l = 313$ ,  $n_m = 290$ ,  $n_n = 321$ ).

Um zu prüfen, welchen Effekt die RhoA Aktivierung in den bereits stark reorientierenden glatten Muskelzellen hat, wurde unter identischen Bedingungen wie zuvor bei den Fibroblasten die Aktin Reorientierung analysiert.

Zunächst konnte in den Aktin und Paxillin IFs keine Veränderung der SFs und FAs durch eine RhoA Aktivierung im Vergleich zur serumfreien Kontrolle beobachtet werden (Abbildung 3.14 A). Diese Ergebnisse deuten auf eine bereits starke Aktivierung der RhoA Kinase unter Kontrollbedingungen hin. Anschließend ergab folgerichtig auch die Auswertung der Aktin Reorientierung nach uniaxialer, zyklischer Dehnung zu keinem Dehnungszeitpunkt ein verändertes Verhalten im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.14 B-E).



**Abbildung 3.14: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei verstärkter RhoA Induktion in A7r5 Einzelzellen.** (A) Gezeigt sind Paxillin und Aktin Färbungen von glatten Muskelzellen. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h das Wachstumsmedium gegen serumfreies Medium (Kontrolle) oder serumfreies Medium mit 50  $\mu\text{M}$  LPA ausgetauscht. Nach 30 min Vorinkubation erfolgte eine uniaxiale, zyklische Dehnung für die genannten Zeiträume und nach Fixierung die immunzytochemische Färbung des Paxillins sowie die Markierung des Aktins mittels Alexa Fluor Phalloidin. Zusätzlich ist jeweils eine Vergrößerung eines Bildausschnitts gezeigt. Der Maßstab ist 20  $\mu\text{m}$ . (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 160$ ,  $n_b = 138$ ,  $n_c = 148$ ,  $n_d = 147$ ,  $n_e = 42$ ,  $n_f = 158$ ,  $n_g = 173$ ,  $n_h = 155$ ,  $n_i = 160$ ).

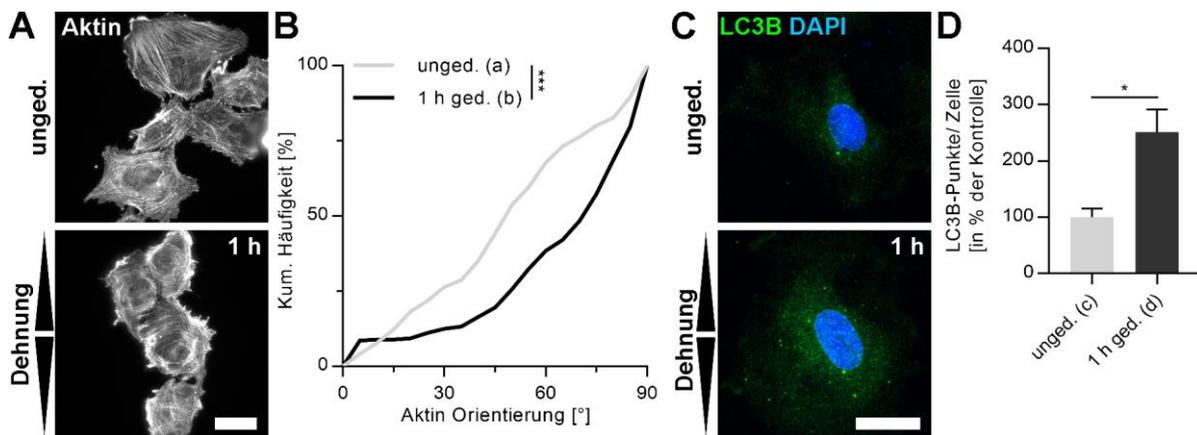
### 3.2.2 ROCK Inhibition verhindert die Zellkörper Reorientierung und die dehnungsinduzierte Autophagie in glatten Muskelzellen

Zur Überprüfung der Hypothese, dass die ohnehin starke Kontraktilität der glatten Muskelzellen für die effektive Reorientierung des Aktin Zytoskeletts verantwortlich ist, wurde die Zellkontraktilität nachfolgend reduziert.

In einem ersten Schritt wurde durch Kultivierung auf weicherem Substrat die Ausbildung von Aktinfilamenten abgeschwächt. Hierzu wurden die Zellen auf Elastomersubstraten ausgesät, die zusätzlich mit 5 kPa weichem Elastomer beschichtet wurden.

Nach 1 h uniaxialer, zyklischer Dehnung konnte weiterhin eine höchst signifikante Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts mit einem mittleren Orientierungswinkel von  $63^\circ$  im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle ( $49^\circ$ ) festgestellt werden (Abbildung 3.15 A und B). Die Reorientierung war jedoch auf den weicheren Substraten schwächer als auf den in dieser Arbeit verwendeten Standard-Elastomersubstraten (50 kPa), bei denen die Mittlere Orientierung nach 1 h bei  $73^\circ$  lag (Abbildung 3.4).

Folglich wurde die Induktion der APs nach Dehnung auf den weichen Elastomersubstraten ausgewertet. Hierbei konnte nach 1 h Dehnung eine signifikante Zunahme von 1,7 (100 %) auf 4,3 (251 %) APs pro Zelle analysiert werden (Abbildung 3.15 C und D). Die Induktion war damit ebenfalls schwächer als auf den 50 kPa Substraten (278 %; Abbildung 3.3).



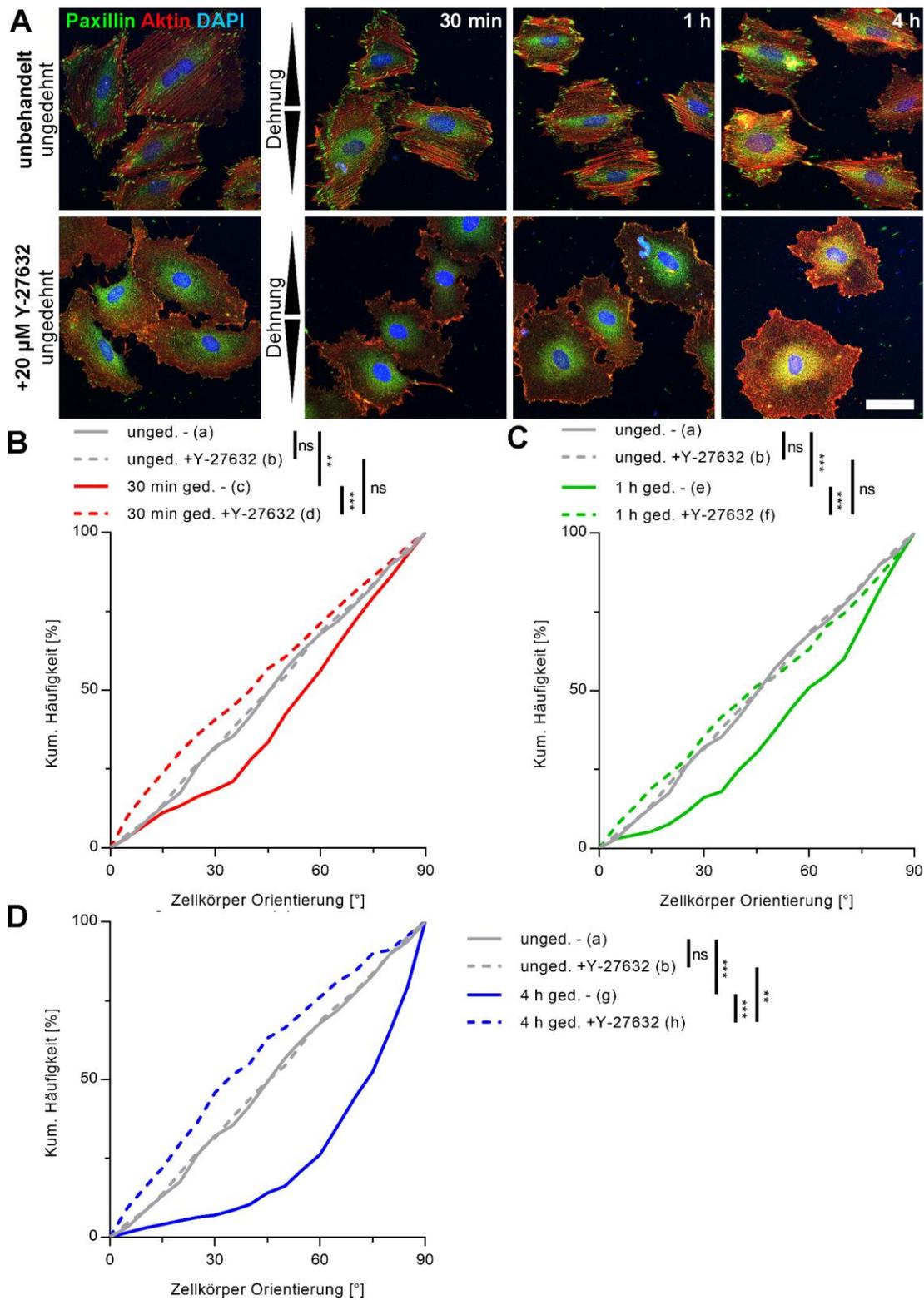
**Abbildung 3.15: Aktin Reorientierung und Induktion von LC3B-positiven APs auf 5 kPa Elastomersubstraten durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 Einzelzellen.** (A und C) Gezeigt sind Färbungen des Aktin-Zytoskeletts und von LC3B in A7r5 Zellen. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten, die zusätzlich mit 5 kPa weichem Elastomer beschichtet wurden, ausgesät und uniaxial, zyklisch für 1 h gedehnt und nach Fixierung für die entsprechenden Strukturen immunzytochemisch oder mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung. Der Maßstab ist (A) 50 µm und (B) 20 µm. (C) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 220$ ,  $n_b = 281$ ). (D) Die relative Anzahl an LC3B-Punkten pro Zelle in Bezug zur ungedehnten Kontrolle wurde dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM aller ausgewerteter Zellen (n) ( $n_c = 58$ ,  $n_d = 52$ ).

Um im Folgenden die Zellkontraktilität noch stärker abzuschwächen, wurde die in der RhoA Signalkaskade nachfolgende Rho-assoziierte Protein Kinase (ROCK) inhibiert und anschließend das Aktin-Zytoskelett und die APs nach Dehnung ausgewertet.

Dabei konnte nach 1 h Inkubation mit dem Inhibitor Y-27632 eine vollständige Auflösung der SFs und FAs in den glatten Muskelzellen bewirkt werden (Abbildung 3.16 A). Da nun nicht mehr die Reorientierung der SF analysiert werden konnte, wurde für diese Experimente die Reorientierung des gesamten Zellkörpers ausgewertet. Hierbei zeigten die Zellkörper bei den unbehandelten A7r5 Zellen eine hoch signifikante Zunahme des mittleren Orientierungswinkels von  $46^\circ$  bei der ungedehnten Kontrolle auf  $53^\circ$  nach 30 min Dehnung (Abbildung 3.16 B). Der Winkel stieg nach 1 h weiter signifikant auf  $57^\circ$  und von 1 h zu 4 h Dehnung weiter höchst signifikant auf  $68^\circ$  an (Abbildung 3.16 C-D).

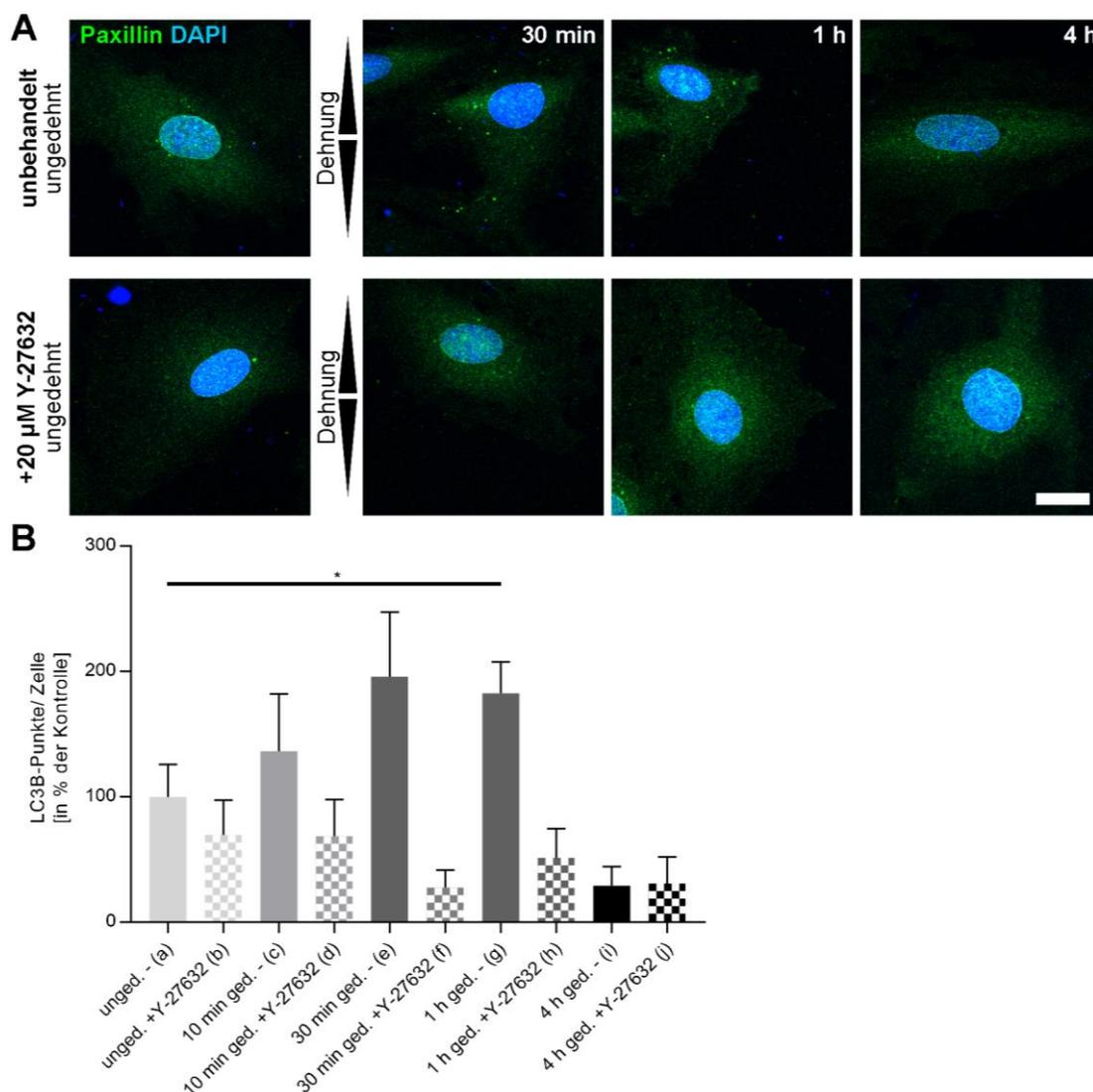
Im Gegensatz dazu war der mittlere Reorientierungswinkel der ROCK-inhibierten glatten Muskelzellen nach 30 min ( $41^\circ$ ) und 1 h Dehnung ( $45^\circ$ ) unverändert und nach 4 h Dehnung ( $38^\circ$ ) sogar hoch signifikant niedriger als der, der ungedehnten Kontrolle ( $45^\circ$ ) (Abbildung 3.16 B-D). Der mittlere Hauptorientierungswinkel der unbehandelten Zellen war damit zu jedem Dehnungszeitpunkt höchst signifikant höher als bei den ROCK-inhibierten Zellen.

Die ROCK Inhibition unterdrückte die Kontraktilität der Zellen und damit auch die mechanosensitive Antwort in Form der Zellkörper Reorientierung. Diese wurde nicht nur blockiert, sondern es wurde sogar eine Reorientierung in Zugrichtung bewirkt.



**Abbildung 3.16: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei ROCK Inhibition in A7r5 Einzelzellen.** (A) Gezeigt sind Färbungen von Paxillin und Aktin von glatten Muskelzellen. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h Inkubation das Medium gewechselt (unbehandelt) oder gegen Medium mit 20  $\mu$ M Y-27632 ausgetauscht. Nach 1 h Vorinkubation erfolgte die Dehnung für die genannten Zeiträume und nach Fixierung die immunzytochemische Färbung des Paxillins sowie die Markierung des Aktins mittels Alexa Fluor Phalloidin. Der Maßstab ist 50  $\mu$ m. (B-D) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 252$ ,  $n_b = 226$ ,  $n_c = 233$ ,  $n_d = 236$ ,  $n_e = 261$ ,  $n_f = 247$ ,  $n_g = 271$ ,  $n_h = 247$ ).

Um zusätzlich den Zusammenhang der Zellkontraktilität mit der Autophagie zu untersuchen, wurde folglich nach ROCK Inhibition die dehnungsinduzierten LC3B-positiven APs quantifiziert. Bei der Analyse der ROCK-inhibierten A7r5 Zellen ergab sich zu keinem Dehnungszeitpunkt eine Zunahme der APs pro Zelle (Abbildung 3.17 A und B). Im Gegensatz dazu konnte bei den unbehandelten A7r5 Zellen nach 1 h Dehnung die signifikante Zunahme von 1,6 (100 %) auf 2,9 (183 %) APs pro Zelle wie in Abschnitt 3.1.1 bestätigt werden.



**Abbildung 3.17: Mechanische Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung nach ROCK Inhibition in A7r5 Einzelzellen.** (A) Gezeigt sind LC3B IFs in glatten Muskelzellen (A7r5) nach uniaxialer, zyklischer Dehnung für die dargestellten Zeitpunkte kultiviert auf FN beschichteten Elastomersubstraten und einer ungedehnten Kontrolle nach 1 h Vorinkubation mit Medium mit 20 µM Y-27632 oder Normalmedium (unbehandelt). Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung an. Der Maßstab ist 20 µm. (B) Dargestellt ist eine relative Quantifizierung der LC3B-Punkte jeder gedehnten Zellen in Bezug zur ungedehnten, unbehandelten Kontrolle (unged. -) aus den IFs in (A). Die Daten stammen aus einem einzelnen Experiment und sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM aller ausgewerteten Zellen (n). Außer der Angabe gab es keine weiteren signifikanten Unterschiede ( $n_a = 18$ ,  $n_b = 16$ ,  $n_c = 20$ ,  $n_d = 18$ ,  $n_e = 19$ ,  $n_f = 20$ ,  $n_g = 19$ ,  $n_h = 18$ ,  $n_i = 19$ ,  $n_j = 14$ ).

Zusammenfassend konnte im zweiten Kapitel (3.2) gezeigt werden, dass die dehnungsinduzierten LC3B-positiven APs sowie die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts durch die Aktivierung von RhoA in Fibroblasten verstärkt werden.

Im Gegensatz dazu konnte nach Aktivierung von RhoA in den glatten Muskelzellen keine Beeinträchtigung festgestellt werden. Daher wurde durch die Inhibition von ROCK die Zellkontraktilität reduziert, wodurch wiederum keine Reorientierung der Zellkörper und damit auch keine Induktion von LC3B-positiven APs durch Dehnung ausgelöst wurden.

### 3.3 Die Proteinbiosynthese durch den Transkriptionsfaktor YAP verstärkt die Aktin Reorientierung in glatten Muskelzellen

In den bisherigen Untersuchungen wurde der Einfluss der zellulären Abbaumechanismen insbesondere des Abbaus von Autophagosomen durch das Lysosom auf die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts untersucht. Folglich wurde vermutet, dass auch die Neusynthese von Proteinen eine wichtige Rolle in dem Prozess spielen muss.

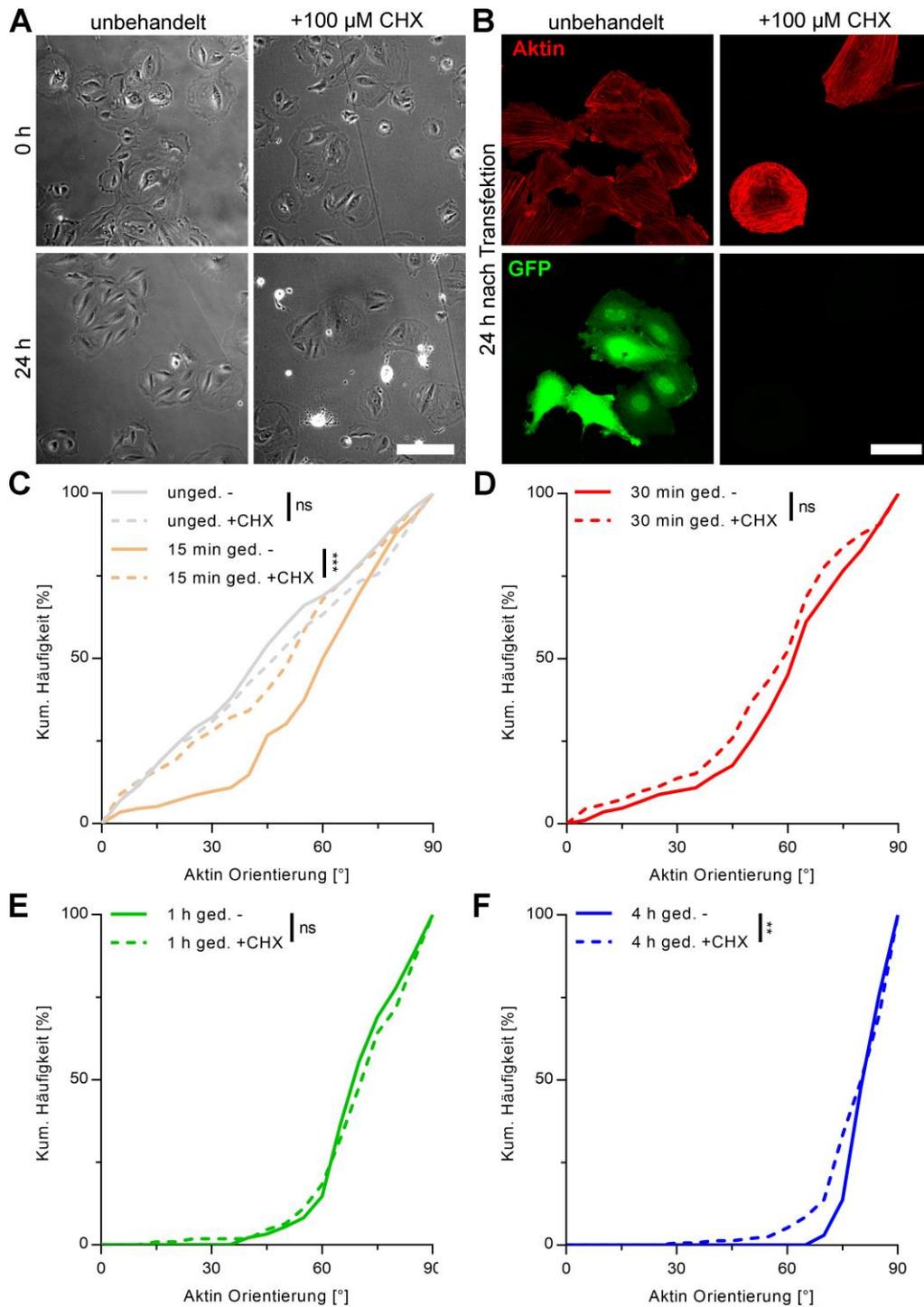
Deshalb wurde in diesem Kapitel die gesamte Proteinbiosynthese durch Blockade des Ribosoms, als auch die Inhibition des Transkriptionsfaktors YAP bewirkt und der Einfluss auf die Aktin Reorientierung der glatten Muskelzellen nach Dehnung analysiert.

#### 3.3.1 Blockierte Proteinbiosynthese verzögert die Aktin Reorientierung

Eine Inkubation der glatten Muskelzellen für 24 h mit 100  $\mu$ M Cycloheximid (CHX) zur Blockierung der Translation an den Ribosomen zeigte im Vergleich zu höheren Konzentrationen nur eine geringe Toxizität auf die Zellen (Abbildung 3.18 A; Bachelorarbeit Jonathan Mayr 2021). Da CHX wachstumshemmend und damit auch zelltoxisch ist, wurde diese kleinste Konzentration mit der geringsten Toxizität für die weiteren Experimente genutzt.

Bei der Transfektion der glatten Muskelzellen mit einem eGFP-Plasmid und einer gleichzeitigen Zugabe von CHX wurde nach 24 h die Effizienz der Blockierung der Proteinbiosynthese überprüft (Abbildung 3.18 B). Dabei konnte im Gegensatz zur Kontrolle ohne CHX keine grün-fluoreszierende Zelle detektiert werden.

Da die gewählte CHX-Konzentration bei geringer Toxizität eine effiziente die Proteinbiosynthesehemmung ermöglichte, wurde nach 24 h Vorinkubation mit CHX die Aktin Reorientierung nach Dehnung analysiert. Ohne Dehnung zeigten Kontrolle und CHX behandelte Zellen eine zufällige Verteilung mit mittleren Aktin Orientierungswinkeln von  $44^\circ$  und  $47^\circ$ . Nach 15 min Dehnung wiesen die CHX behandelten Zellen jedoch eine höchst signifikante Verlangsamung der Aktin Reorientierung mit einem mittleren Winkel von  $58^\circ$  bei der unbehandelten Kontrolle auf  $47^\circ$  auf (Abbildung 3.18 C). Nach 30 min und 1 h Dehnung konnte kein Unterschied zwischen den unbehandelten und den Zellen mit blockierter Proteinbiosynthese festgestellt werden (Abbildung 3.18 D und E). Nach 4 h Dehnung war der mittlere Reorientierungswinkel hoch signifikant geringer ( $78^\circ$ ) als bei der unbehandelten Kontrolle ( $80^\circ$ ) (Abbildung 3.18 F).



**Abbildung 3.18: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei blockierter Proteinbiosynthese.**

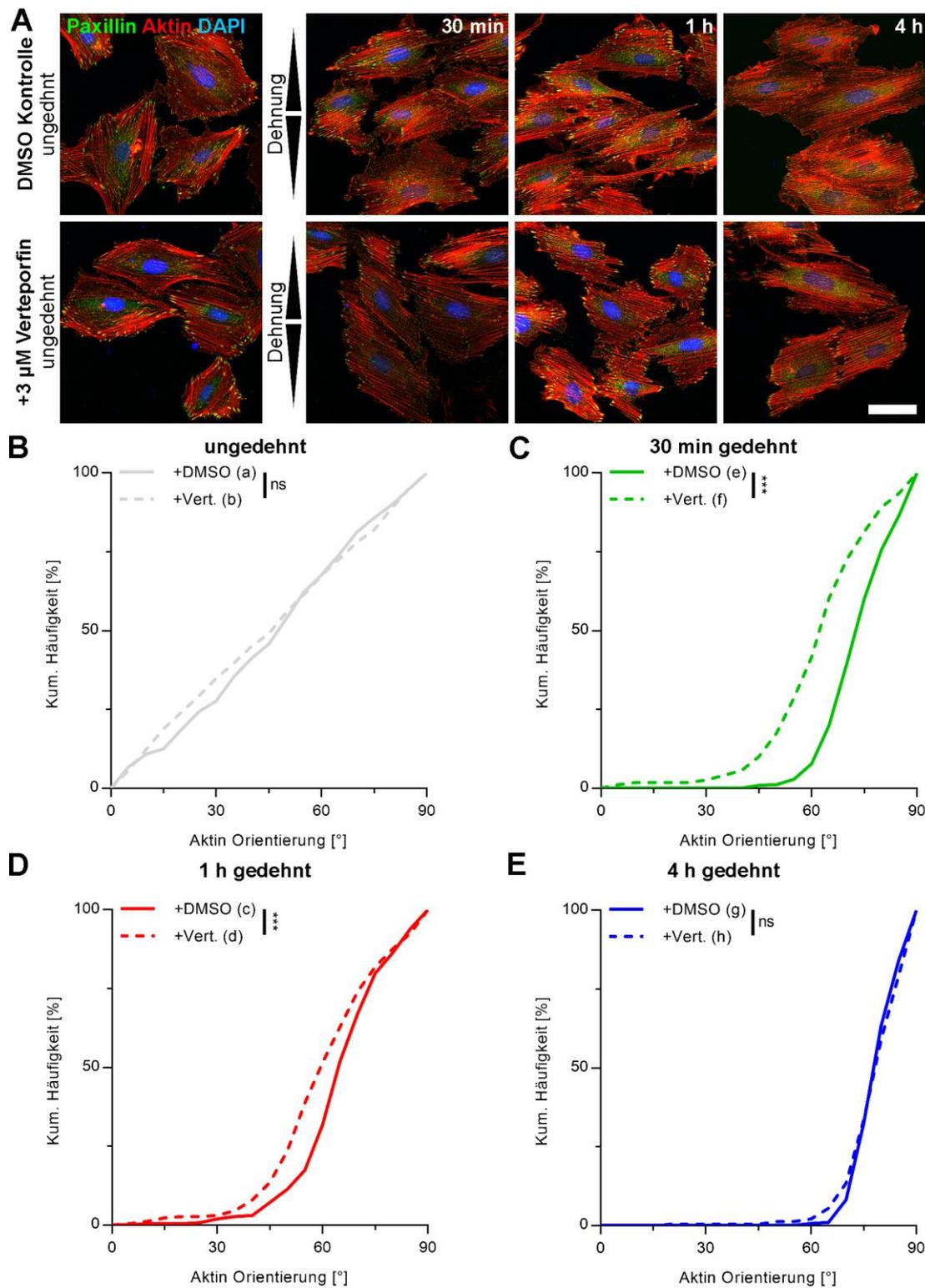
(A) Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von A7r5 Zellen nach 24 h in Medium mit 100  $\mu\text{M}$  CHX und einer unbehandelten Kontrolle. Der Maßstab ist 200  $\mu\text{m}$ . (B) Die Zellen wurden 24 h nach Aussähen auf Glas in Medium mit 100  $\mu\text{M}$  CHX oder unbehandelte Kontrollen mit einem eGFP Plasmid transfiziert und die Expression nach 24 h überprüft. Der Maßstab ist 50  $\mu\text{m}$ . (C-F) A7r5 Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 24 h Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  CHX oder unbehandelt (-) für die beschriebenen Zeiträume gedehnt und nach Fixierung Das Aktin mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 174$ ,  $n_b = 188$ ,  $n_c = 176$ ,  $n_d = 193$ ,  $n_e = 193$ ;  $n_f = 204$ ,  $n_g = 184$ ,  $n_h = 109$ ,  $n_i = 168$ ,  $n_j = 153$ ). Alle in dieser Abbildung dargestellten Ergebnisse wurden in der Bachelorarbeit von Jonathan Mayr (2021, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn) erarbeitet.

### 3.3.2 YAP Inhibition verlangsamt die Aktin Reorientierung

Da der Transkriptionsfaktor YAP eine wichtige Rolle in der CASA spielt, wurde dieser durch Inkubation mit Verteporfin für 24 h vor Dehnung blockiert und anschließend die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts analysiert.

In den immunzytochemischen Analysen für Aktin und Paxillin konnte durch die YAP Inhibition zunächst keine Veränderung in der zellulären Zellkontraktilität beobachtet werden (Abbildung 3.19 A). Unter Dehnung konnte bei YAP Inhibition jedoch sowohl nach 30 min (von 65° auf 60°) als auch 1 h Dehnung (von 73° auf 62°) eine höchst signifikante Verlangsamung der Aktin Reorientierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 3.19 C und D). Diese Verlangsamung hatte jedoch keinen Einfluss auf den finalen Reorientierungswinkel nach 4 h Dehnung, da hier sowohl für Verteporfin behandelte als auch für die unbehandelten A7r5 Zellen kein Unterschied im mittleren Aktin Reorientierungswinkel detektiert werden konnte (Abbildung 3.19 B und E).

Im dritten Kapitel (3.3) konnte somit gezeigt werden, dass die Neusynthese von Proteinen u.a. auch durch den Transkriptionsfaktor YAP für eine schnelle Aktin Reorientierung als mechanosensitive Antwort auf uniaxiale, zyklische Dehnung notwendig ist.



**Abbildung 3.19: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des Transkriptionsfaktors YAP.** (A) Gezeigt sind Paxillin und Aktin Färbungen von glatten Muskelzellen. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h Inkubation das Medium für weitere 24 h gegen Medium mit 3  $\mu\text{M}$  Verteporfin in DMSO oder nur DMSO (Kontrolle) ausgetauscht. Nach der Vorinkubation erfolgte die Dehnung für die genannten Zeiträume und nach Fixierung die IF des Paxillins sowie die Markierung des Aktins mittels Alexa Fluor Phalloidin. Der Maßstab ist 50  $\mu\text{m}$ . (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 297$ ,  $n_b = 267$ ,  $n_c = 264$ ,  $n_d = 266$ ,  $n_e = 348$ ;  $n_f = 269$ ,  $n_g = 317$ ,  $n_h = 239$ ).

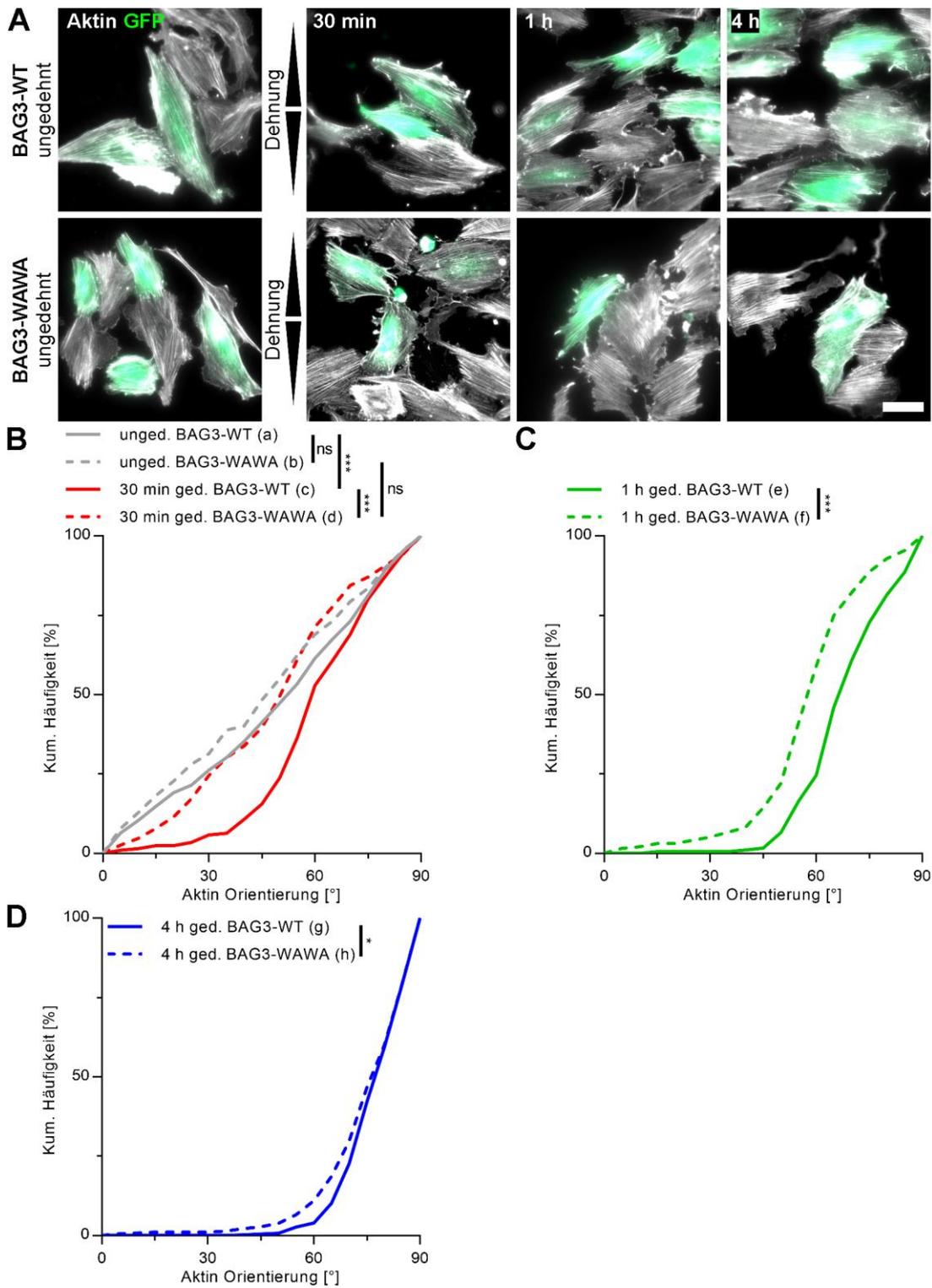
### 3.4 BAG3 vermittelt die Aktin Reorientierung

Der molekulare Chaperonregulator 3 (BAG3) ist an der Chaperon-assistierten, selektiven Autophagie und dem mechanisch induzierten Abbau des mechanosensitiven Proteins Filamin beteiligt. Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass BAG3 auch in der Aktin Reorientierung der glatten Muskelzellen eine Funktion ausüben muss. Um dies zu prüfen, wurde im nächsten Kapitel der Einfluss einer nicht funktionalen, dominant-negativen BAG3-Mutante auf die Aktin Reorientierung sowie von BAG3-KO Zellen überprüft.

#### 3.4.1 Nicht funktionales BAG3 verlangsamt die Aktin Reorientierung in glatten Muskelzellen

Um den Einfluss von BAG3 in der Aktin Reorientierung der glatten Muskelzellen zu überprüfen, wurden A7r5 Zellen auf Elastomersubstraten entweder mit einem BAG3-Wildtyp oder der nicht funktionalen, dominant-negativen Mutante BAG3-WAWA, bei der zwei Alanine an Position 26 und 49 jeweils durch Tryptophan ersetzt wurden (Kathage *et al.*, 2017), zusammen mit einem eGFP-Plasmid transfiziert und nach 24 h gedehnt. Nach der Dehnung wurde das Aktin-Zytoskelett gefärbt und die Aktin Reorientierung der grün-fluoreszierenden Zellen ausgewertet. Es wurde angenommen, dass durch Co-Transfektion diese Zellen ebenfalls das jeweilige BAG3-Plasmid trugen.

Dabei zeigte sich, dass die Aktin Reorientierung der BAG3-WAWA Zellen nach 30 min (von 60° auf 48°) und 1 h Dehnung (von 68° auf 57°) höchst signifikant im Vergleich zu den BAG3-WT Zellen verlangsamt war (Abbildung 3.20 A-C). Dabei wiesen die BAG3-WAWA Zellen nach 30 min Dehnung keine signifikante Änderung des mittleren Orientierungswinkels verglichen mit der ungedehnten Kontrolle auf. Nach 4 h Dehnung verblieb die mittlere Aktin Reorientierung der BAG3-WAWA Zellen mit 74° im Vergleich zum WT mit 77° auf signifikant schwächerem Niveau (Abbildung 3.20 D).

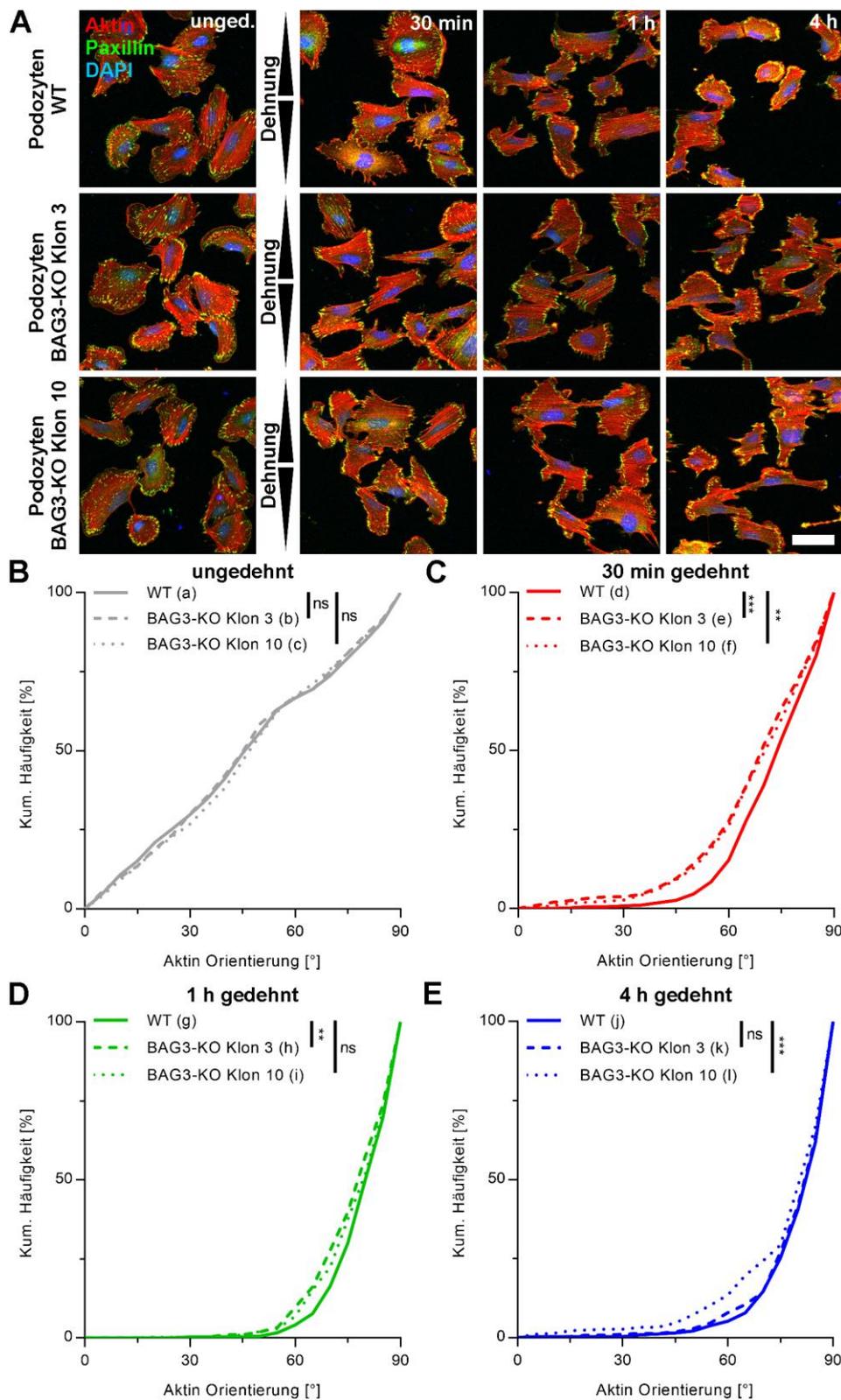


**Abbildung 3.20: Einfluss von BAG3 in der Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 Einzelzellen.** (A) Gezeigt sind Färbungen des Aktin-Zytoskeletts von A7r5 glatten Muskelzellen nach einer Co-Transfektion mit GFP- und einem BAG3-Plasmid. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h Inkubation mit einem GFP-Plasmid sowie entweder einem BAG-WT oder einer nicht funktionalen BAG3-WAWA Mutante co-transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für die genannten Zeiträume gedehnt und nach Fixierung Aktin mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Der Maßstab ist 50  $\mu\text{m}$ . (B-D) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel der grünen Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 298$ ,  $n_b = 242$ ,  $n_c = 206$ ,  $n_d = 192$ ,  $n_e = 183$ ;  $n_f = 195$ ,  $n_g = 275$ ,  $n_h = 223$ ).

### 3.4.2 Verlangsamte Aktin Reorientierung in BAG3-KO Podozyten

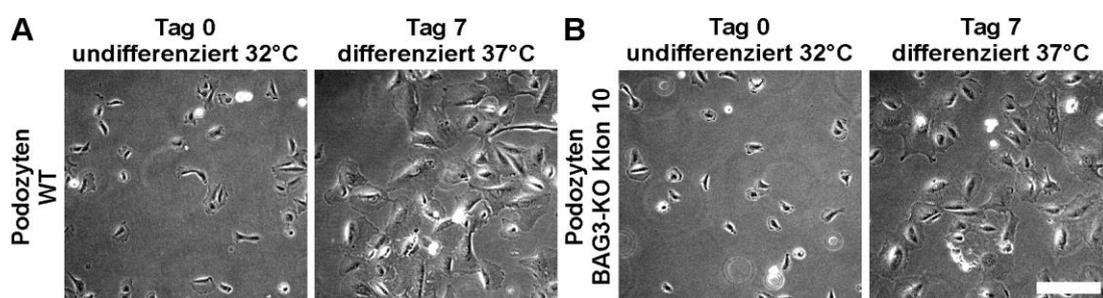
Für die weitergehende Untersuchung von BAG3 auf die Aktin Reorientierung wurden ein Wildtyp und zwei BAG3-KO Klone humaner Podozyten von der AG Thomas Benzing (Nephrologie, Uniklinik Köln) zur Verfügung gestellt.

Bei Betrachtung immunzytochemischer Färbungen für Paxillin und Aktin unterschieden sich die BAG3-KO Podozyten nicht von ihrem Wildtyp (Abbildung 3.21 A). Bei der Aktin Reorientierung wiesen die BAG3-KO Klon 3 Zellen nach 30 min Dehnung eine höchst signifikante Verlangsamung mit einem mittleren Reorientierungswinkel von  $67^\circ$  und die Klon 10 Zellen eine hoch signifikante Verlangsamung mit  $68^\circ$  je im Vergleich zur Wildtyp Kontrolle mit  $72^\circ$  (Abbildung 3.21 A-C) auf. Nach 1 h Dehnung zeigten die BAG3-KO Klon 3 Podozyten wiederum eine hoch signifikante Verlangsamung von  $79^\circ$  beim WT auf  $76^\circ$ , wohingegen Klon 10 keinen signifikanten Unterschied mit  $77^\circ$  zeigte (Abbildung 3.21 D). Dahingegen hatten die BAG3-KO Klon 10 Zellen nach 4 h Dehnung eine höchst signifikante Verlangsamung von  $80^\circ$  beim WT auf  $67^\circ$  aufgewiesen, jedoch wies Klon 3 mit  $79^\circ$  keinen signifikanten Unterschied auf (Abbildung 3.21 E).



**Abbildung 3.21: Einfluss von BAG3 in der Aktin Reorientierung in undifferenzierten, humanen Podozyten.** (A) Dargestellt sind Paxillin und Aktin Färbungen von humanen WT und zwei unabhängigen Klonen von BAG3-KO Podozyten. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h Inkubation für die beschriebenen Zeiträume gedehnt und nach Fixierung Paxillin immunzytochemisch und Aktin mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung an. Der Maßstab ist 50 µm. (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 252$ ,  $n_b = 473$ ,  $n_c = 463$ ,  $n_d = 393$ ,  $n_e = 403$ ,  $n_f = 406$ ,  $n_g = 366$ ,  $n_h = 422$ ,  $n_i = 442$ ,  $n_j = 344$ ,  $n_k = 391$ ,  $n_l = 520$ ).

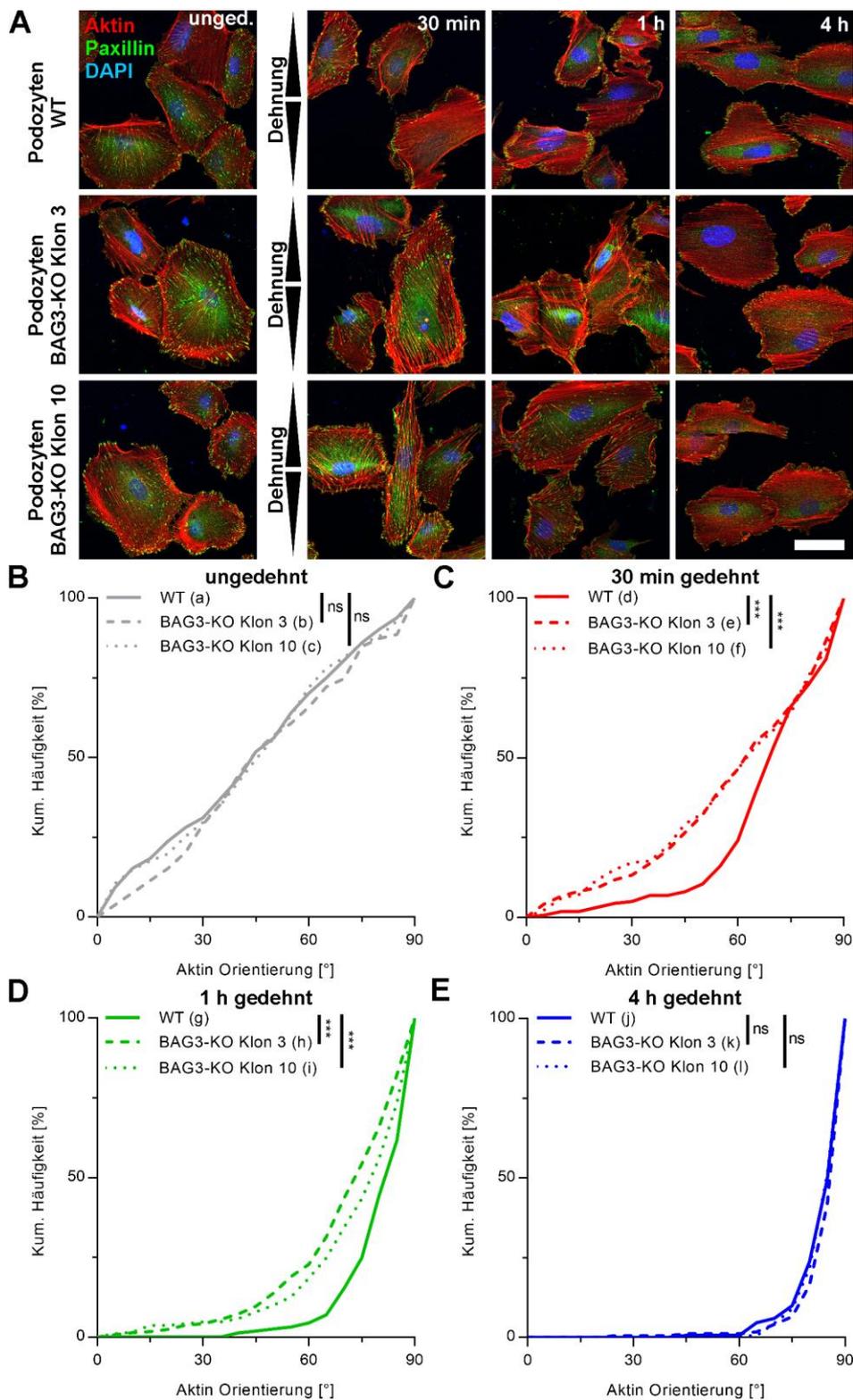
Aufgrund der nicht eindeutigen Unterschiede in der Aktin Reorientierung der BAG3-KO Podozyten im Vergleich zum Wildtyp, wurden die Zellen durch einen Wechsel der Kultivierungstemperatur von 32 °C auf 37 °C für eine Woche differenziert. Während der Differenzierung verändern die Podozyten ihr Expressionsmuster für verschiedene Markerproteine, die *in vivo* bei der Reifung ebenfalls nachweislich verändert werden. Während der Differenzierung konnte beobachtet werden, dass die Zellen deutlich größere Adhäsionsflächen und Lamellipodien ausbildeten. Die Proliferationsfähigkeit der Zellen nahm jedoch ab, da die Zellen in den sieben Tagen Kultivierung bei 37 °C nicht passagiert werden mussten (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22: Differenzierung von humanen Podozyten durch einen Temperaturwechsel von 32 °C auf 37 °C.** Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von (A) humanen Wildtyp Podozyten (WT) sowie (B) BAG3-KO Podozyten kultiviert auf Polystyrol Zellkulturflaschen bei 32 °C und nach sieben Tagen Kultur bei 37 °C. Der Maßstab ist 200 µm.

Nach sieben Tagen Kultivierung bei 37 °C konnte für Paxillin und Aktin IFs kein Unterschied in den Proteinen zwischen BAG3-KO und WT Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.23 A). Die Anzahl an SFs und FAs schien aber durch die Differenzierung der Podozyten deutlich anzusteigen, jedoch wurde hier kein direkter Vergleich vorgenommen.

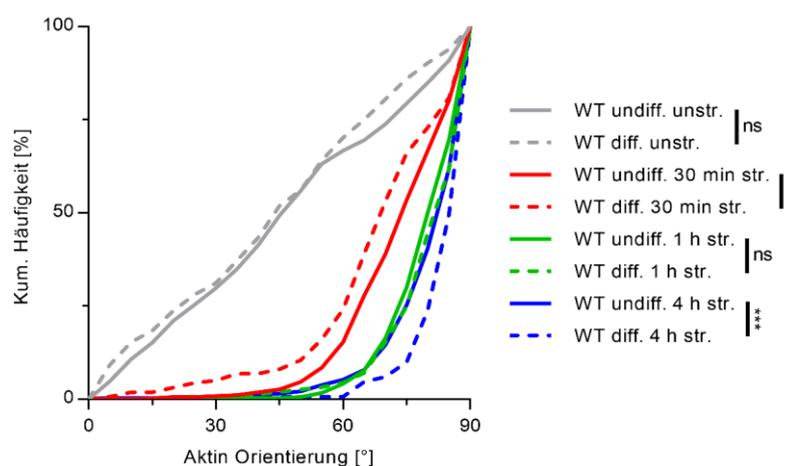
Unter Dehnung zeigten beide Klone der differenzierten BAG3-KO Zellen eine höchst signifikante Abschwächung der Aktin Reorientierung mit mittleren Orientierungswinkeln von 59° (Klon 3) und 58° (Klon 10) im Vergleich zu den Wildtyp Zellen mit 68° (Abbildung 3.23 B). Nach 1 h Dehnung blieb die höchst signifikante Verlangsamung der Aktin Reorientierung für beide BAG3-KO Zellklone mit mittleren Winkeln von 69° (Klon 3) und 72° (Klon 10) im Vergleich zum WT mit 79° erhalten (Abbildung 3.23 C). Nach 4 h Dehnung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und den BAG3-KO Zellen festgestellt werden (Abbildung 3.23 D), was erneut für eine Verlangsamung der Reorientierung, nicht jedoch für einen Einfluss auf den reorientierten Endzustand sprach.



**Abbildung 3.23: Einfluss von BAG3 in der Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung in differenzierten, humanen Podozyten.** (A) Dargestellt sind Färbungen von differenzierten, humanen WT und zwei unabhängigen Klonen von BAG3-KO Podozyten. Die Zellen wurden nach sieben Tagen Kultivierung bei 37 °C auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h Inkubation für die beschriebenen Zeiträume gedehnt und nach Fixierung zur Markierung von Aktin mittels Alexa Fluor Phalloidin und Paxillin immunzytochemisch gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung an. Der Maßstab ist 50  $\mu$ m. (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 164$ ,  $n_b = 158$ ,  $n_c = 182$ ,  $n_d = 162$ ,  $n_e = 196$ ,  $n_f = 181$ ,  $n_g = 157$ ,  $n_h = 289$ ,  $n_i = 189$ ,  $n_j = 151$ ,  $n_k = 170$ ,  $n_l = 179$ ). In dieser Abbildung sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

Neben dem Einfluss von BAG3 auf die Reorientierung der Podozyten konnte auch der Einfluss der Differenzierung der Wildtyp Podozyten im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen festgestellt werden.

Beim Vergleich der Aktin Reorientierungen zeigte sich, dass die differenzierten Zellen nach 30 min Dehnung eine signifikant schwächere Reorientierung aufwiesen als die undifferenzierten Zellen. Nach 1 h Dehnung konnte kein Unterschied festgestellt werden und nach 4 h Dehnung zeigten die differenzierten Zellen eine höchst signifikant stärkere Aktin Reorientierung als die undifferenzierten Zellen (Abbildung 3.24). Dies verdeutlicht eine langsamere aber letztlich stärkere Aktin Reorientierung der differenzierten Podozyten.



**Abbildung 3.24: Vergleich der Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung von undifferenzierten und differenzierten, humanen WT Podozyten.** Dargestellt sind die aus Abbildung 3.21 und Abbildung 3.23 zusammengefassten kumulierten Aktin Hauptorientierungswinkel aller undifferenzierten und differenzierten WT Podozyten (n) nach uniaxialer, zyklischer Dehnung.

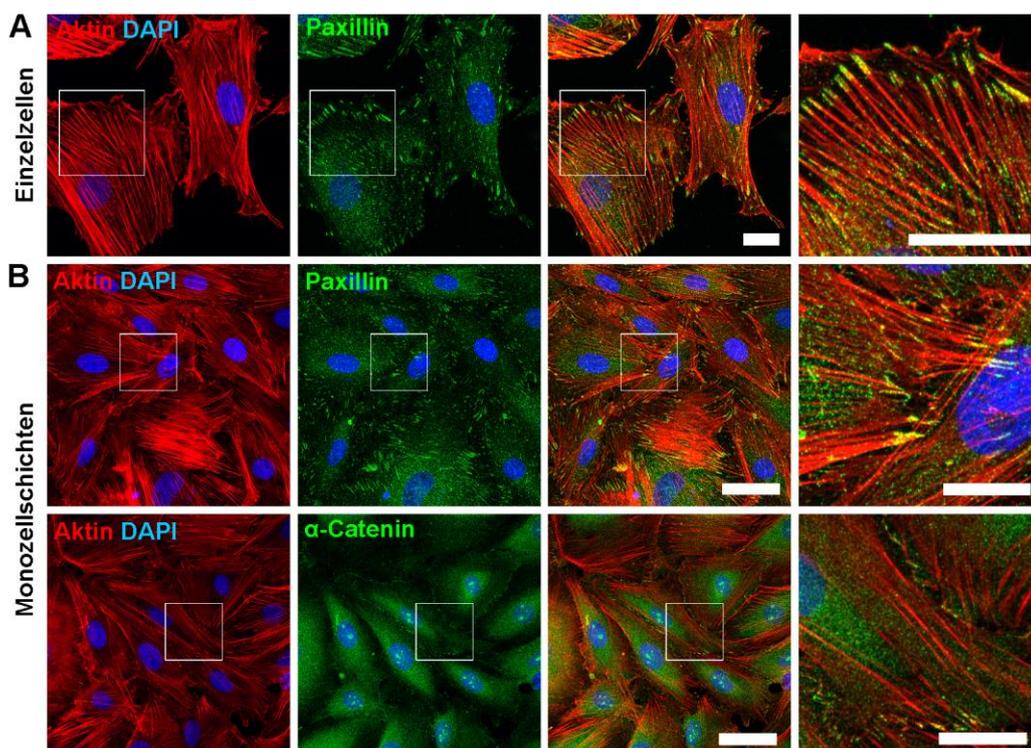
Zusammenfassend zeigen die Daten des vierten Kapitels (3.4), dass BAG3 in der Aktin Reorientierung als mechanosensitive Antwort auf uniaxiale, zyklische Dehnung sowohl bei glatten Muskelzellen als auch bei humanen Podozyten eine tragende Rolle spielt.

### 3.5 Monozellschichten verhalten sich vergleichbar wie Einzelzellen

Alle bisherigen Untersuchungen wurden auf Einzelzellebene durchgeführt und sich dabei auf mögliche mechanosensitive Strukturen fokussiert, die Zellen an die umgebende EZM kontaktieren. Um diese Analysen auch auf Strukturen der Zell-Zell-Kontakte zu erweitern, wurden die wichtigsten Experimente in Monozellschichten wiederholt. Diesbezüglich wurde die Aktin Reorientierung in glatten Muskelzellen und Keratinozyten Monozellschichten zeitlich und unter blockiertem Abbau durch das Lysosom analysiert, sowie unter gleichen Bedingungen die Autophagie quantifiziert.

#### 3.5.1 Dehnungsinduzierte Aktin Reorientierung und Autophagie sind übertragbar auf Monozellschichten

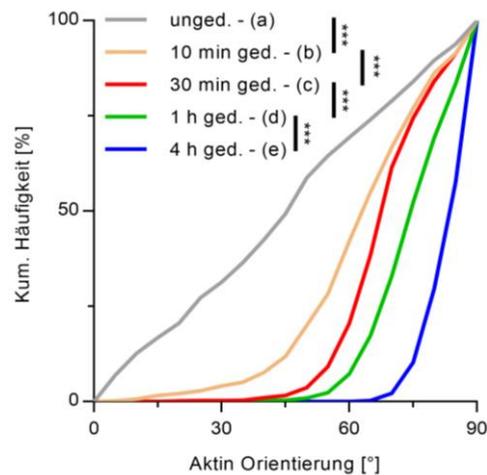
Im ersten Schritt wurden IFs von Einzelzellen und Monozellschichten glatter Muskelzellen erstellt, um die unterschiedlichen Adhäsionsstrukturen in beiden Zellsystemen zu vergleichen. IFs für das Protein Paxillin konnten keinen offensichtlichen Unterschied in den FAs bei A7r5 Einzelzellen und Monozellschichten aufzeigen (Abbildung 3.25 A und B). Für Monozellschichten konnte zusätzlich durch Einsatz von AKs gegen  $\alpha$ -Catenin der Aufbau von Adhärenzverbindungen (AJs) nachgewiesen werden (Abbildung 3.25 B).



**Abbildung 3.25: Vergleich von A7r5 Einzelzellen und Monozellschichten.** Gezeigt sind A7r5 Einzelzellen und Monozellschichten mit Alexa Fluor Phalloidin markiertem Aktin-Zytoskelett und immunzytochemisch gefärbtem Paxillin oder  $\alpha$ -Catenin. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h Inkubation fixiert und gefärbt. Zusätzlich ist rechts jeweils eine Vergrößerung eines Bildausschnitts gezeigt.

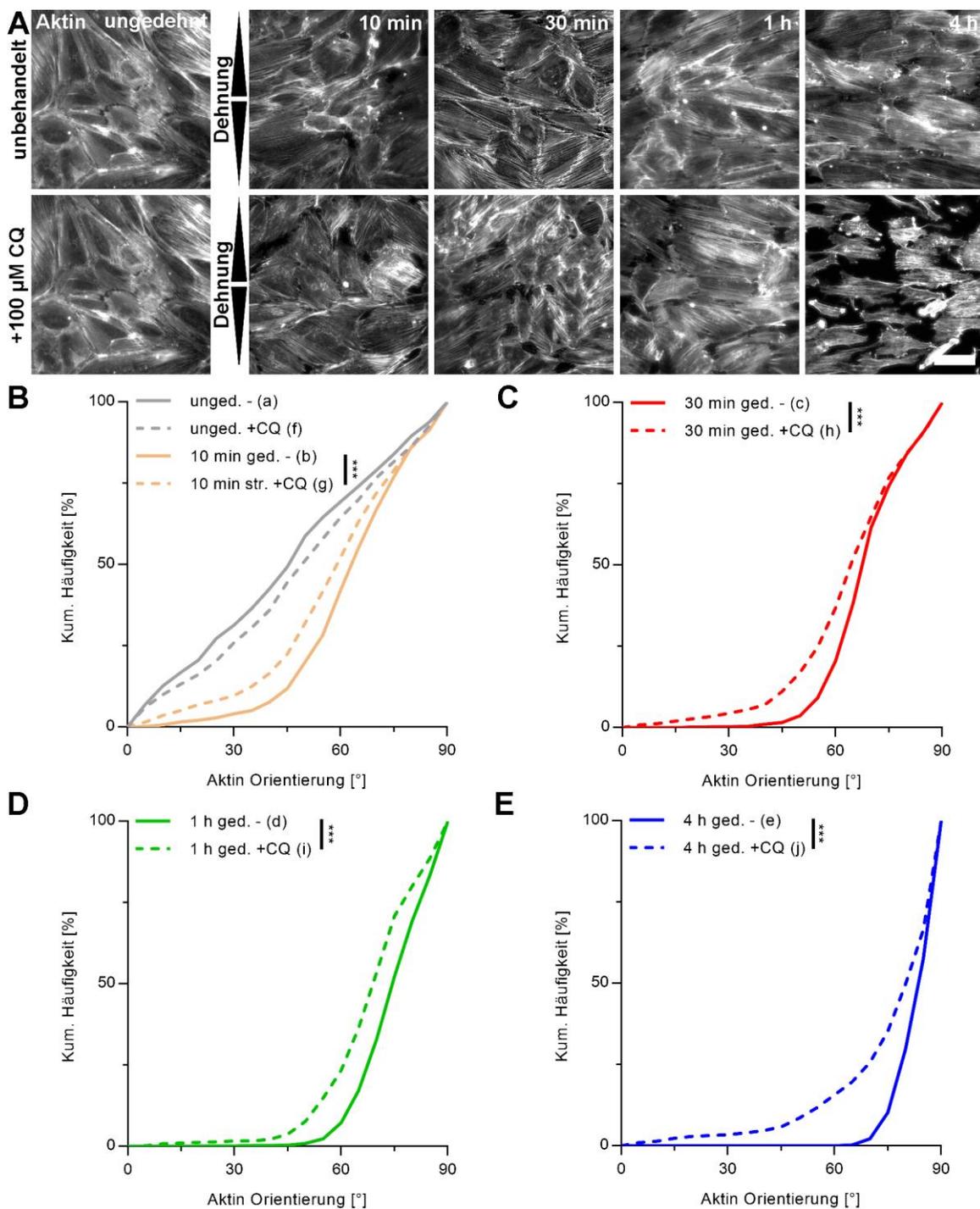
Im Folgenden wurde die Aktin Reorientierung der A7r5 Monozellschichten nach Dehnung untersucht. Zu diesem Zweck wurde über jedes Bild ein Raster aus Quadraten gelegt, welches die durchschnittliche Anzahl an Zellen in jedem Bild repräsentierte. Diese Zahl wurde durch Auszählung per Hand im Vorfeld bestimmt und musste durchgeführt werden, da einzelne Zellgrenzen nicht mehr klar Software-basiert erkannt werden konnten.

Dabei ergab sich nach Dehnung der A7r5 Monozellschichten zwischen 10 min bis 4 h zwischen jedem Dehnungszeitpunkt eine höchst signifikante Zunahme des mittleren Aktin Orientierungswinkels (Abbildung 3.26). Dieser lag bei der ungedehnten Kontrolle bei  $45^\circ$  und nach 10 min Dehnung bei  $62^\circ$ , nach 30 min bei  $68^\circ$ , nach 1 h bei  $74^\circ$  und nach 4 h Dehnung bei  $83^\circ$  zur Dehnungsrichtung.



**Abbildung 3.26: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 Monozellschichten.** Gezeigt sind die Hauptorientierungswinkel des Aktin-Zytoskeletts aller Zellen ( $n$ ) einer Monozellschicht aus den in Abbildung 3.27 gezeigten Färbungen. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 48 h Inkubation für die beschriebenen Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt. Nach der Fixierung wurde das Aktin-Zytoskelett mittels Alexa Fluor Phalloidin markiert und für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben ausgewertet ( $n_a = 990$ ,  $n_b = 975$ ,  $n_c = 975$ ,  $n_d = 975$ ,  $n_e = 770$ ).

Anschließend wurde die Aktin Reorientierung der A7r5 Monozellschichten unter CQ blockiertem lysosomalen Abbau der APs ausgewertet. Zu jedem Dehnungszeitpunkt zeigte sich eine höchst signifikante Verlangsamung der Aktin Reorientierung durch eine Abnahme des mittleren Orientierungswinkels zur Dehnungsrichtung von  $62^\circ$  auf  $57^\circ$  nach 10 min, von  $68^\circ$  auf  $63^\circ$  nach 30 min, von  $74^\circ$  auf  $68^\circ$  nach 1 h und von  $83^\circ$  auf  $75^\circ$  nach 4 h Dehnung jeweils im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.27 A-E).



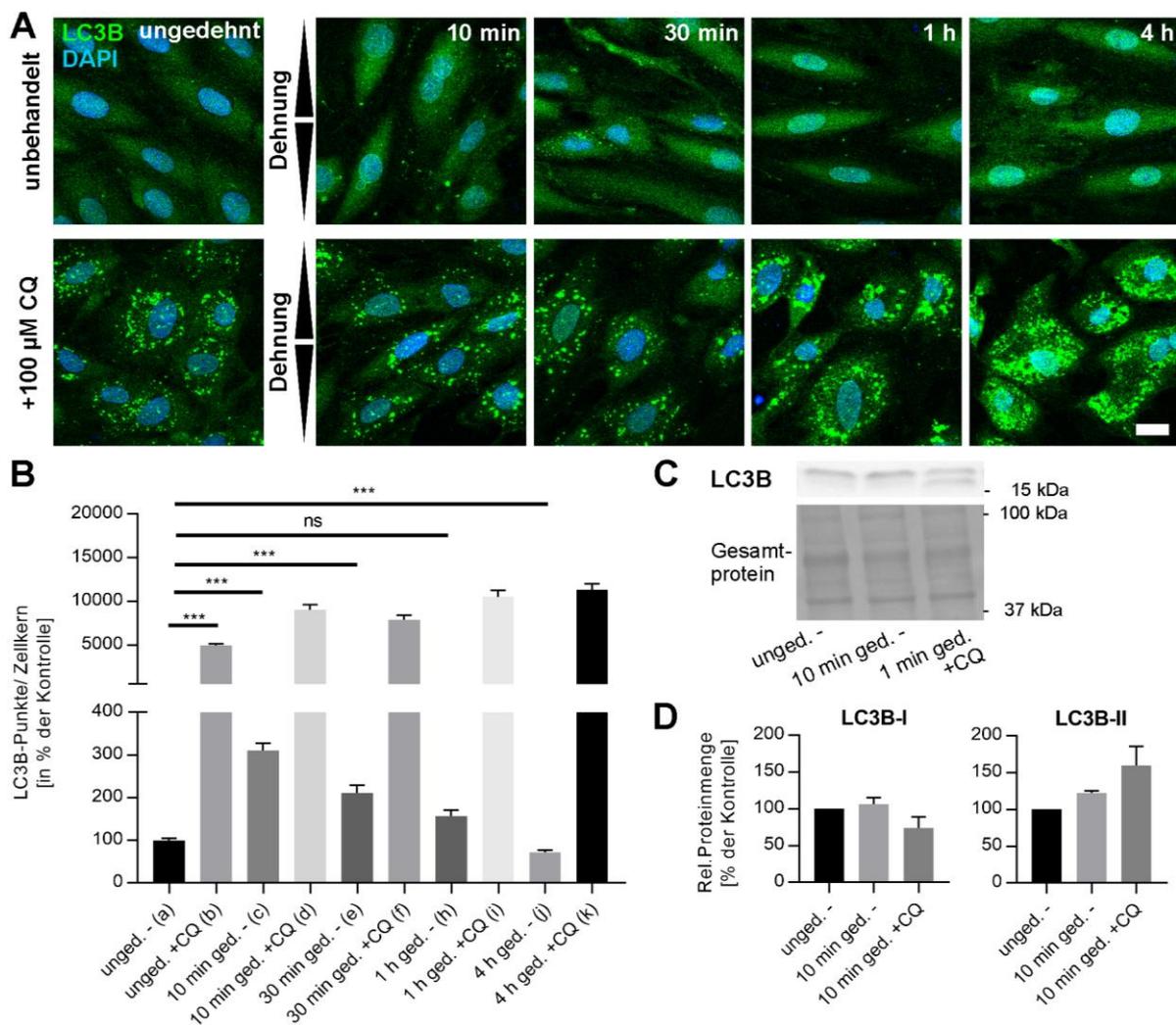
**Abbildung 3.27: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von APs in A7r5 Monozellschichten.** (A) Gezeigt ist das Aktin-Zytoskelett von A7r5 Monozellschichten. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und für 48 h inkubiert. Nach 1 h Vorinkubation mit CQ zur Blockierung des lysosomalen Abbaus wurden die Zellen für die beschriebenen Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt. Das Aktin-Zytoskelett wurde nach Fixierung mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung. Der Maßstab beträgt 50  $\mu$ m. (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_{a-c}$ : siehe Abbildung 3.26,  $n_f = 770$ ,  $n_g = 975$ ,  $n_h = 990$ ,  $n_i = 945$ ,  $n_j = 750$ ).

Im nächsten Schritt wurden die LC3B-positiven APs pro Zelle in den A7r5 Monozellschichten unter Dehnung quantifiziert. Die gesamte Anzahl an APs pro Bild wurde dabei durch die Anzahl an Zellen pro Bild berechnet. Zusätzlich wurden die Zellen mit blockiertem Abbau durch das Lysosom identisch ausgewertet.

Es ergab sich eine höchst signifikante Zunahme der APs pro Zelle von 1,4 (100 %) bei der ungedehnten Kontrolle auf 4,5 (311 %) APs pro Zelle nach 10 min Dehnung (Abbildung 3.28 A und B). Die Anzahl sank nach 30 min Dehnung auf 3,0 (211 %) APs pro Zelle ab, war aber immer noch höchst signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. Nach 1 h Dehnung konnte mit 2,4 (157 %) APs pro Zelle keine signifikante Veränderung zur Kontrolle festgestellt werden, wohingegen nach 4 h Dehnung eine höchst signifikante Abnahme mit 1,0 (71 %) APs pro Zelle im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle ermittelt wurde.

Für Zellen mit blockiertem Abbau durch das Lysosom kam es bereits durch die Vorinkubation bei den ungedehnten Zellen zu einer höchst signifikanten Zunahme auf 70 APs pro Zelle (4900 %) verglichen mit den unbehandelten Zellen (1,4; 100 %). Durch die Dehnung nahm die Zahl der APs pro Zelle mit Ausnahme der 30 min gedehnten Zellen weiter zu (bei 10 min 135, bei 30 min 112, bei 1 h 161 und bei 4 h 170 APs pro Zelle). Alle Werte zwischen unbehandelter Kontrolle und den CQ behandelten Zellen waren zu jedem Dehnungszeitpunkt höchst signifikant.

Zusätzlich wurde unter identischen Bedingungen wie zuvor nach 10 min Dehnung eine Quantifizierung von LC3B mittels Western Blot Analyse vorgenommen. Dabei konnte zwischen der Vorform LC3B-I und der membrangebundenen Form LC3B-II unterschieden werden. Durch die 10 min Dehnung kam es zu einer nur leichten Zunahme von LC3B-I auf 106 % und von LC3B-II auf 122 % im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle (100 %) (Abbildung 3.28 C und D). Bei blockiertem Abbau durch das Lysosom sank LC3B-I auf 74 % ab, wohingegen LC3B-II auf 159 % zunahm. Die Ergebnisse der Protein Quantifizierung von LC3B sind aufgrund der geringen Wiederholungszahl des Experiments nicht signifikant.

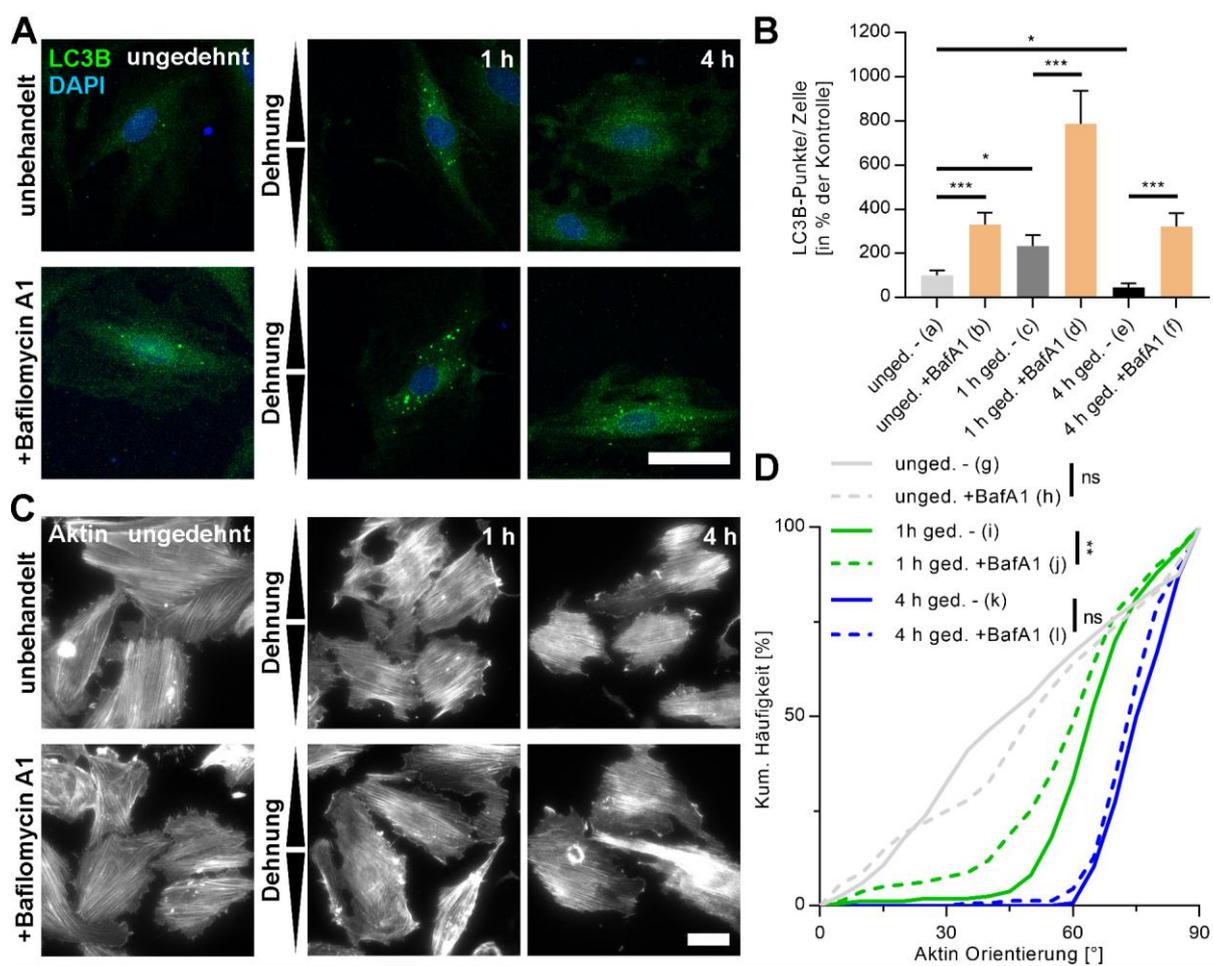


**Abbildung 3.28: Mechanische Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung in A7r5 Monozellschichten.** (A) Gezeigt sind IFs von LC3B in A7r5 Monozellschichten nach uniaxialer, zyklischer Dehnung für die dargestellten Zeitpunkte und einer ungedehnten Kontrolle. Die Zellen wurden 48 h auf FN beschichteten Elastomersubstraten kultiviert und für 1 h mit Medium mit 100  $\mu$ M CQ oder Normalmedium vorinkubiert. Nach der Dehnung wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung an. Der Maßstab ist 20  $\mu$ m. (B) Dargestellt ist eine relative Quantifizierung der LC3B-Punkte jeder gedehnten Zelle (ged.) in der Monozellschicht in Bezug zur ungedehnten Kontrolle (unged.). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM aller ausgewerteten Zellen (n). Alle Werte zwischen unbehandelter Kontrolle (-) und den CQ behandelten Zellen (+CQ) sind zu jedem einzelnen Messzeitpunkt höchst signifikant ( $***p < 0.0001$ ) ( $n_a = 72$ ,  $n_b = 54$ ,  $n_c = 55$ ,  $n_d = 50$ ,  $n_e = 54$ ,  $n_f = 55$ ,  $n_g = 72$ ,  $n_h = 74$ ,  $n_i = 75$ ,  $n_j = 69$ ,  $n_k = 71$ ,  $n_l = 66$ ). (C) Unter den identischen Bedingungen wie in (A) wurden nach 10 min Dehnung Western Blot Analysen aus den Rohproteinextrakten für LC3B durchgeführt und (D) LC3B-I und LC3B-II relativ zur ungedehnten Kontrolle normiert auf die eingesetzte Gesamtproteinmenge quantifiziert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse in (D) sind nicht signifikant.

Um den zuvor gezeigten enormen Anstieg an LC3B-positiven APs pro Zelle durch die Blockierung des Abbaus durch das Lysosom mittels CQ zu überprüfen, wurde in einem einfach durchgeführten Experiment die Funktion des Lysosoms mit dem V-ATPase Inhibitor Bafilomycin A1 (BafA1) unterdrückt und die APs und die Aktin Reorientierung unter Dehnung analysiert.

Durch die Blockierung mit BafA1 konnte ebenfalls ein höchst signifikanter Anstieg auf 5,4 (330 %) APs pro Zelle im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (1,6; 100 %) detektiert werden (Abbildung 3.29 A und B). Während die unbehandelten Zellen nach 1 h Dehnung einen signifikanten Anstieg auf 3,8 (233 %) APs pro Zelle zeigten, stieg die Zahl bei den BafA1 behandelten Zellen auf 12,9 (788 %) APs pro Zelle an. Nach 4 h Dehnung sanken sowohl in unbehandelten Zellen die APs Zahlen signifikant auf 0,7 (45 %), als auch die BafA1 behandelten Zellen auf 5,3 (322 %) pro Zelle ab.

Bei der Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts konnte durch die Blockierung der V-ATPase mit BafA1 nach 1 h Dehnung die zuvor gezeigte hoch signifikante Verlangsamung des mittleren Aktin Orientierungswinkels auf  $58^\circ$  im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mit  $64^\circ$  bestätigt werden (Abbildung 3.29 C und D). Nach 4 h Dehnung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied mehr beobachtet werden.



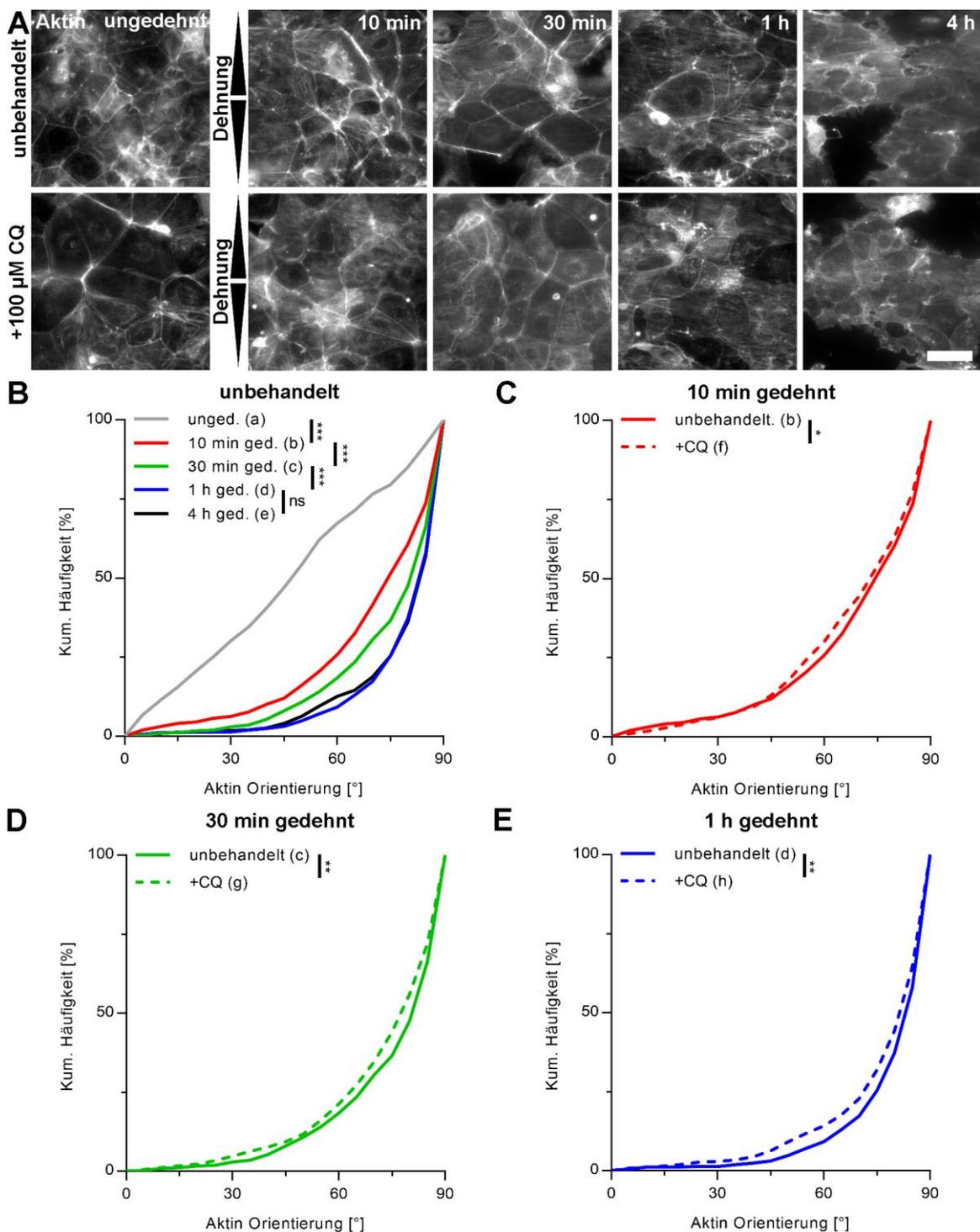
**Abbildung 3.29: Einfluss der Blockierung der V-ATPase auf die Aktin Reorientierung und die Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung.** (A) Gezeigt sind LC3B und (C) Aktin Färbungen von A7r5 Zellen kultiviert auf FN beschichteten Elastomersubstraten nach 1 h und 4 h zyklischer Dehnung sowie einer ungedehnten Kontrolle, nach 16 h Vorinkubation mit 100 nM Bafilomycin A1 (BafA1) oder unbehandeltem Wachstumsmedium (-). Die Zellen wurden nach Fixierung immunzytochemisch gegen LC3B und mittels Alexa Fluor Phalloidin gegen Aktin gefärbt. Der Maßstab ist 50  $\mu$ m. (B) Die relative Quantifizierung der LC3B-Punkte pro Zelle ist im Bezug zur ungedehnten, unbehandelten Kontrolle (unged. -) gezeigt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM aller ausgewerteten Zellen (n). (D) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_a = 19$ ,  $n_b = 18$ ,  $n_c = 20$ ,  $n_d = 20$ ,  $n_e = 19$ ,  $n_f = 20$ ,  $n_g = 151$ ,  $n_h = 172$ ,  $n_i = 160$ ,  $n_j = 159$ ,  $n_k = 146$ ,  $n_l = 156$ ). Die in dieser Abbildung gezeigten Ergebnisse stammen aus jeweils einem einzelnen Experiment.

### **3.5.2 Die Aktin Reorientierung und Induktion von APs sind übertragbar auf Keratinozyten Monozellschichten**

Zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse wurde die Aktin Reorientierung und die dehnungsabhängige Induktion von LC3B-positiven APs auch in einer Epithelzellschichten muriner Keratinozyten untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass für die Aktin Reorientierung zwischen den einzelnen Dehnungszeitpunkten bis zu 1 h Dehnung höchst signifikante Zunahmen im mittleren Orientierungswinkel von  $47^\circ$  bei der ungedehnten Kontrolle auf  $69^\circ$  nach 10 min, auf  $74^\circ$  nach 30 min auf  $76^\circ$  nach 1 h Dehnung festgestellt werden konnten (Abbildung 3.30 A und B). Der mittlere Reorientierungswinkel lag nach 4 h Dehnung bei  $78^\circ$ . Eine vollständige Reorientierung konnte damit bereits nach 1 h aufgezeigt werden.

Bei Blockierung des lysosomalen APs Abbaus konnte für die mittlere Aktin Reorientierung erneut nach 10 min Dehnung eine signifikante Reduktion auf  $68^\circ$ , nach 30 min eine hoch signifikante Verringerung auf  $72^\circ$  und nach 1 h auf  $76^\circ$  aufgezeigt werden (Abbildung 3.30 C-E). Reorientierungsanalysen nach 4 h Dehnung konnten aufgrund mechanischer Belastung der Monozellschichten und damit einhergehender Rupturen der Zellverbände nicht durchgeführt werden (Abbildung 3.30 A).

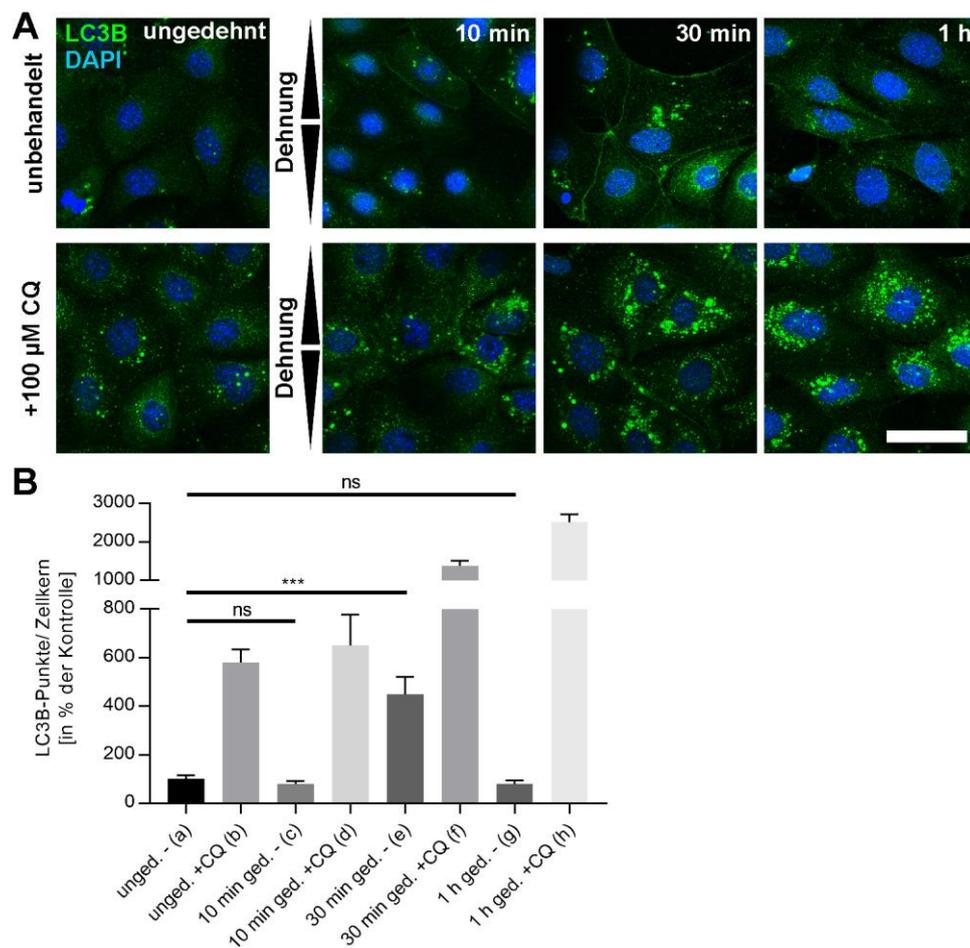


**Abbildung 3.30: Aktin Reorientierung durch uniaxiale, zyklische Dehnung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus von APs in Keratinozyten Monozellschichten.** (A) Gezeigt sind Färbungen des Aktin-Zytoskeletts von murinen Keratinozyten Monozellschichten. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach 1 h Vorinkubation mit CQ zur Blockierung des lysosomalen Abbaus wurden die Zellen für die beschriebenen Zeiträume uniaxial, zyklisch gedehnt, fixiert und das Aktin mittels Alexa Fluor Phalloidin gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung. Der Maßstab beträgt 50  $\mu$ m. (B-E) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen (n) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen aufgetragen ( $n_{a-h} = 900$ ).

Bei der Analyse der LC3B-positiven APs in den Keratinozyten Monozellschichten kam es nach 30 min Dehnung zu einem höchst signifikanten Anstieg mit 22 (448 %) APs pro Zelle im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle mit 5 (100 %) APs pro Zelle (Abbildung 3.31 A und B). Nach 10 min (4; 79 %) und 1 h (4; 81%) Dehnung war keine signifikante Veränderung zur Kontrolle mehr feststellbar.

Bei Blockierung des lysosomalen AP Abbaus mittels CQ kam es bereits ohne zusätzliche Dehnung zu einem höchst signifikanten Anstieg auf 29 (580%) APs pro Zelle im Vergleich zur unbehandelten, ungedehnten Kontrolle. Durch die zusätzliche Dehnung nahm die Anzahl nach 10 min weiter auf 32, nach 30 min auf 69 und nach 1 h Dehnung auf 125 APs pro Zelle zu. Alle Werte zwischen unbehandelten Zellen und Zellen mit blockiertem Abbau durch das Lysosom waren höchst signifikant.

Zusammenfassend konnte im fünften Kapitel (3.5) die Induktion von LC3B-positiven APs und die Aktin Reorientierung in Abhängigkeit des Abbaus durch das Lysosom in Monozellschichten sowohl für glatte Muskelzellen als für Keratinozyten nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.31: Mechanische Induktion von LC3B-positiven APs durch uniaxiale, zyklische Dehnung in Keratinozyten Monozellschichten.** (A) Gezeigt sind IFs von LC3B in murinen Keratinozyten Monozellschichten nach uniaxialer, zyklischer Dehnung für die dargestellten Zeitpunkte und einer ungedehnten Kontrolle. Die Zellen wurden für 24 h auf FN beschichteten Elastomersubstraten kultiviert und für 1 h mit Medium mit 100  $\mu$ M CQ oder Normalmedium vorinkubiert. Nach der Dehnung wurden die Zellen fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Der Pfeil zeigt die Dehnungsrichtung an. Der Maßstab ist 50  $\mu$ m. (B) Dargestellt ist eine relative Quantifizierung der LC3B-Punkte jeder gedehnten Zelle (ged.) in der Monozellschicht in Bezug zur ungedehnten Kontrolle (unged.). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM aller ausgewerteten Zellen (n). Alle Werte zwischen unbehandelter Kontrolle (-) und den CQ behandelten Zellen (+CQ) sind zu jedem Messzeitpunkt höchst signifikant (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ). Die Werte stammen aus drei unabhängigen Experimenten, bei denen jeweils zehn Bilder pro Gruppe ausgewertet wurden. Alle in dieser Abbildung dargestellten Ergebnisse wurden in der Masterarbeit von Schinya Ibrahim (2022, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf) erarbeitet.

### **3.6 Abbau von mechanosensitiven Proteinen durch uniaxiale Dehnung bei aktiver Autophagie**

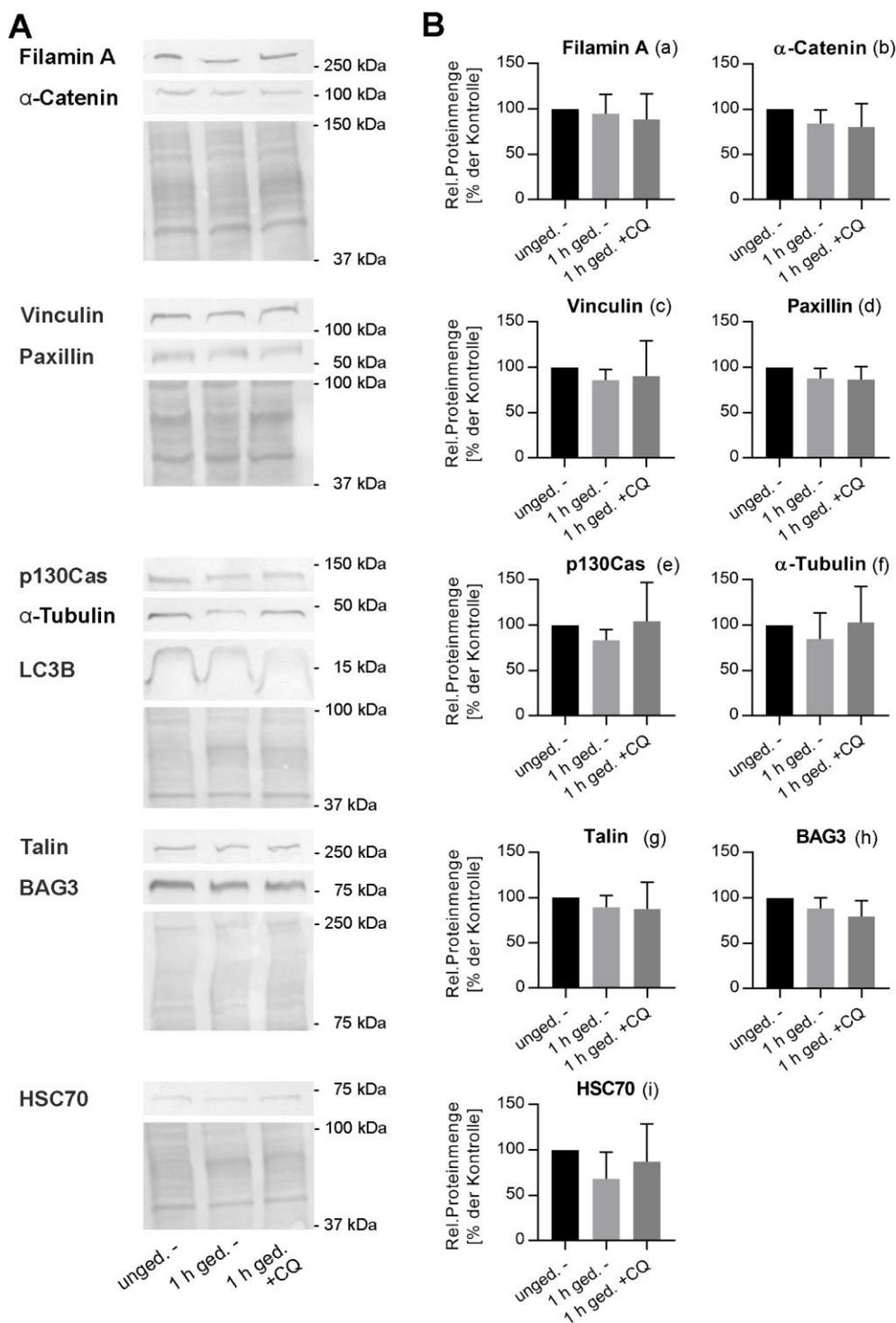
Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts als mechanosensitive Antwort auf uniaxiale, zyklische Dehnung von der Anzahl und Stärke an SFs und FAs abhängt und durch den lysosomalen Abbau der APs beschleunigt wird und auch die Neusynthese von Proteinen unterstützend wirkt.

Jedoch wurde bis hierhin nicht auf die an diesem Zusammenhang beteiligten Proteine eingegangen. Um diesen Aspekt näher zu charakterisieren wurden im Folgenden verschiedene mechanosensitive Proteine aus zellulären Adhäsionsstrukturen der FAs und AJs sowie einiger Autophagie-bezogene Proteine nach uniaxialer, zyklischer Dehnung quantifiziert.

#### **3.6.1 Kein Abbau von mechanosensitiven Proteinen nach kurzer Dehnungsdauer**

Zur Quantifizierung der mechanosensitiven Proteine wurden nach Dehnung Western Blot Analysen durchgeführt. Es wurden die Rohproteinextrakte von zwei Elastomersubstraten vereinigt, um höhere Proteinkonzentrationen zu erreichen. Im ersten Schritt wurden die Zellen für 1 h in An- und Abwesenheit von CQ gedehnt und mit ungedehnten, unbehandelten Zellen verglichen. Der Abgleich der spezifischen Proteinmenge erfolgte auf die Gesamtproteinmenge, die mittels Ponceau S Färbung ermittelt wurde.

Dabei ergab sich für keines der untersuchten Proteine nach 1 h Dehnung mit oder ohne Inhibition des Abbaus durch das Lysosom eine signifikante Veränderung der quantifizierten Proteinmenge (Abbildung 3.32 A und B).



**Abbildung 3.32: Protein Quantifizierungen mittels Western Blot Analysen nach 1 h uniaxialer, zyklischer Dehnung von A7r5 Monozellschichten.** (A) Gezeigt sind Western Blot Membranen von ungedehnten (unged.), 1 h gedehnten (ged. -) und 1 h gedehnten A7r5 Monozellschichten nach 1 h Vorinkubation mit CQ (1 h ged. +CQ) für mechanosensitive FA- und AJ-Proteine, sowie einiger Autophagie-bezogener Proteine. Die Größe der mitgelaufenen Markerproteine ist am rechten Bildrand in Kilodalton (kDa) angezeigt. Unter den Proteinbanden ist jeweils eine Gesamtproteinfärbung dargestellt, die als Referenz für die eingesetzten Proteinmengen genutzt wurde. (B) Dargestellt ist eine Quantifizierung der relativen Proteinmenge in Bezug zur ungedehnten Kontrolle abgeglichen auf die Gesamtproteinmenge aus allen Experimenten (n). Die Ergebnisse sind nicht signifikant ( $n_a = 6$ ,  $n_b = 6$ ,  $n_c = 6$ ,  $n_d = 6$ ,  $n_e = 3$ ,  $n_f = 9$ ,  $n_g = 6$ ,  $n_h = 6$ ,  $n_i = 3$ ).

### 3.6.2 Abbau von mechanosensitiven Proteinen nach längerer Dehnung

Um einen möglichen Effekt auf die Konzentration mechanosensitiver Proteine über einen längeren Zeitraum zu analysieren, wurde die Quantifizierung nach einer auf 4 h uniaxialer, zyklischer Dehnung unter gleichen Bedingungen wie im vorherigen Abschnitt durchgeführt. Hierbei konnten für die Proteine  $\alpha$ -Catenin,  $\alpha$ -Tubulin, Paxillin, LC3B und HSC70 signifikante Veränderungen ermittelt werden (Abbildung 3.33 A und B).

So zeigte das AJ-Protein  $\alpha$ -Catenin nach 4 h Dehnung eine signifikant geringere Proteinmenge mit 70 % der ungedehnten Kontrolle, welche bei blockiertem Abbau der APs durch das Lysosom mit 67 % der ungedehnten Kontrolle noch geringer war.

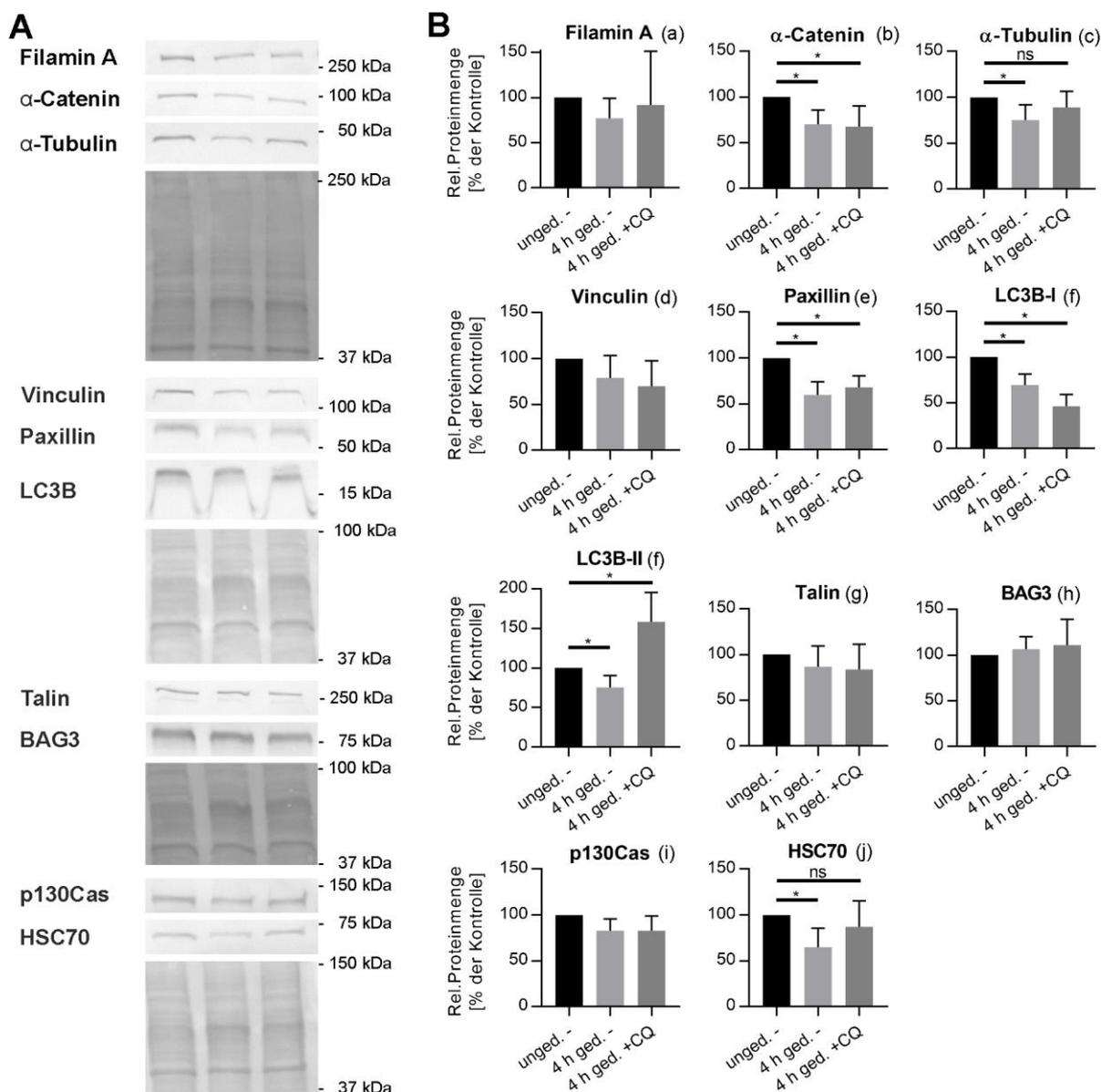
Auch das Mikrotubuliprotein  $\alpha$ -Tubulin war nach 4 h Dehnung signifikant in der Proteinmenge auf 75 % der ungedehnten Kontrolle verringert, wohingegen die Zellen nach Dehnung mit blockiertem Abbau durch das Lysosom mit 89 % keine signifikante Veränderung zeigten.

Das FA-Protein Paxillin wies nach 4 h Dehnung eine signifikant geringere Proteinmenge mit 60 % der ungedehnten Kontrolle auf. Die Paxillin Proteinmenge nahm ebenfalls signifikant unter Dehnung bei blockiertem Abbau durch das Lysosom mit 68 % ab. Dieser Abbau war aber damit tendenziell geringer, als bei aktivem Abbau.

Für das Autophagieprotein LC3B wurden die nicht membrangebundene Vorform LC3B-I und die membrangebundene Form LC3B-II einzeln analysiert. Dabei zeigte LC3B-I nach 4 h Dehnung eine signifikante Abnahme auf 69 % bei aktivem Abbau und eine signifikante Abnahme auf 46 % bei blockiertem Abbau durch das Lysosom, jeweils im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle. Bei LC3B-II konnte nach 4 h Dehnung eine signifikante Abnahme auf 75 % detektiert werden, während ein signifikanter Anstieg von LC3B-II auf 158 % durch die Dehnung bei Blockierung des Lysosoms festgestellt wurde.

Das Hitzeschockprotein HSC70 sank gleichzeitig nach 4 h Dehnung signifikant auf 65 % der ungedehnten Kontrolle ab, während nach 4 h Dehnung mit blockiertem Abbau durch das Lysosom mit 87 % der Proteinmenge keine signifikante Veränderung vorlag.

Das sechste Kapitel konnte darlegen, dass mehrere der untersuchten Proteine durch längere mechanische Belastung in ihrer Proteinmenge abnehmen, während dies bei blockiertem Abbau der APs durch das Lysosom nicht oder nur in geringerem Maß der Fall war.



**Abbildung 3.33: Protein Quantifizierungen mittels Western Blot Analysen nach 4 h uniaxialer, zyklischer Dehnung von A7r5 Monozellschichten.** (A) Gezeigt sind Western Blot Membranen von ungedehnten (unged.), 4 h gedehnten (ged. -) und 4 h gedehnten A7r5 Monozellschichten nach 1 h Vorinkubation mit CQ (1 h ged. +CQ) für verschiedene mechanosensitive Proteine. Die Größe der mitgelaufenen Markerproteine ist am rechten Bildrand in kDa angezeigt. Unter den Proteinbanden ist jeweils eine Gesamtproteinfärbung dargestellt, die als Referenz für die eingesetzten Proteinmengen genutzt wurde. (B) Dargestellt ist eine Quantifizierung der relativen Proteinmenge in Bezug zur ungedehnten Kontrolle abgeglichen auf die Gesamtproteinmenge aus allen Experimenten (n) ( $n_a = 6$ ,  $n_b = 6$ ,  $n_c = 6$ ,  $n_d = 6$ ,  $n_e = 6$ ,  $n_f = 6$ ,  $n_g = 6$ ,  $n_h = 5$ ,  $n_i = 6$ ,  $n_j = 6$ ).

### **3.7 Stabile mechanische Belastung durch biaxiale Dehnung bewirkt den Abbau mechanosensitiver Proteine**

Nachdem alle bisherigen Untersuchungen den Einfluss uniaxialer, zyklischer Dehnung betrachtet haben, wurde im letzten Kapitel ein anderes System und damit auch eine veränderte mechanische Belastung in Form von biaxialer Dehnung auf die Zellen angewandt.

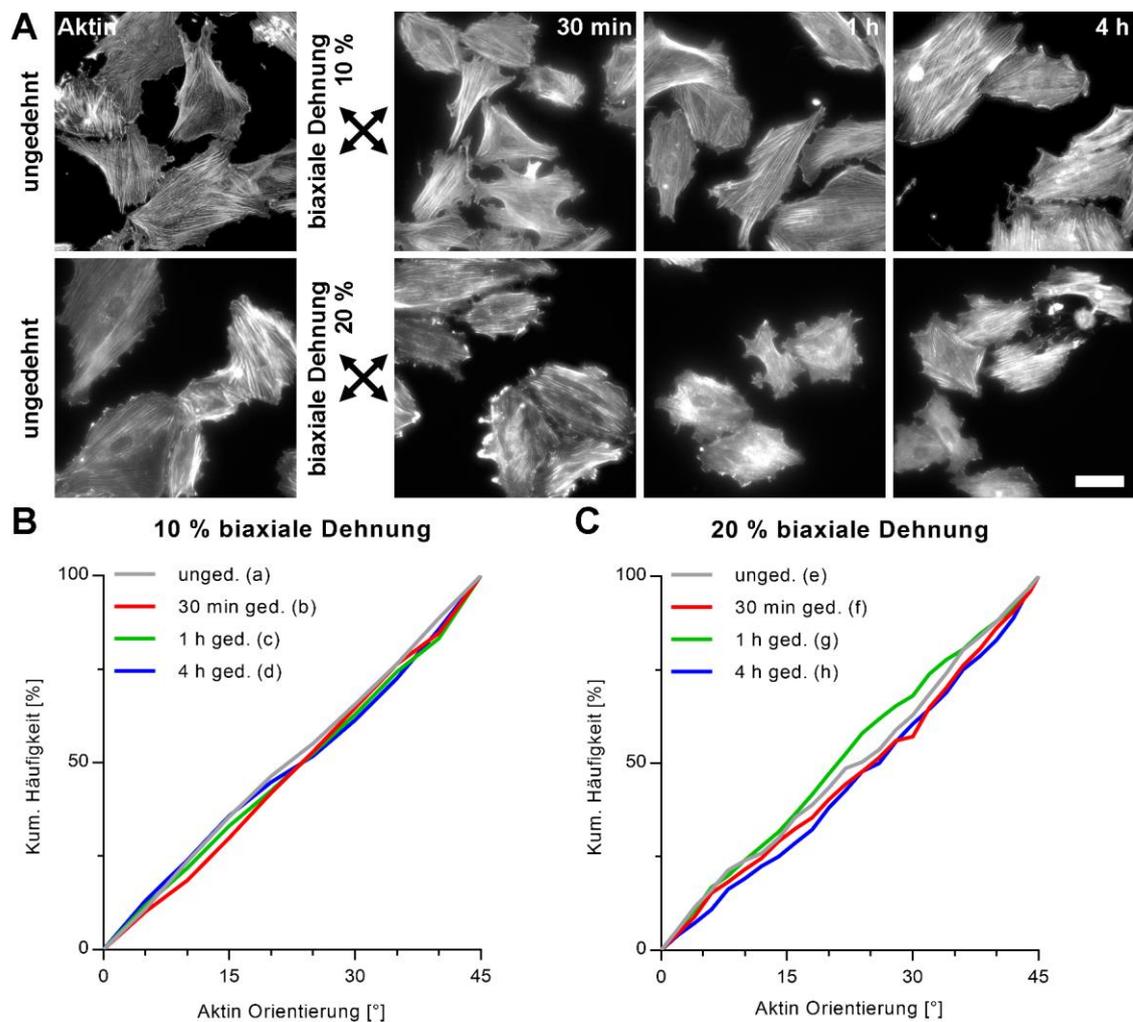
Hierbei wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Zellen bei einer biaxialen Dehnung der mechanischen Beanspruchung durch eine Reorientierung nicht ausweichen können und daher dauerhaft eine Stressreaktion in Form von Autophagie und damit auch einen verstärkten Abbau von mechanosensitiven Proteinen zeigen müssen.

Diese Hypothese wurde durch die Analyse der Aktin Reorientierung, der LC3B-positiven APs und der Proteinmengen der mechanosensitiven Proteine nach biaxialer Dehnung untersucht.

#### **3.7.1 Keine Aktin Reorientierung nach biaxialer, zyklischer Dehnung**

Zunächst wurde die mechanosensitive Antwort des Aktin-Zytoskeletts nach biaxialer, zyklischer Dehnung analysiert. Es wurde dabei identisch zu den Analysen bei uniaxialer Dehnung verfahren. Jedoch wurde der Hauptorientierungswinkel in den Winkeln von 0° bis 45° zur Dehnungsrichtung angegeben.

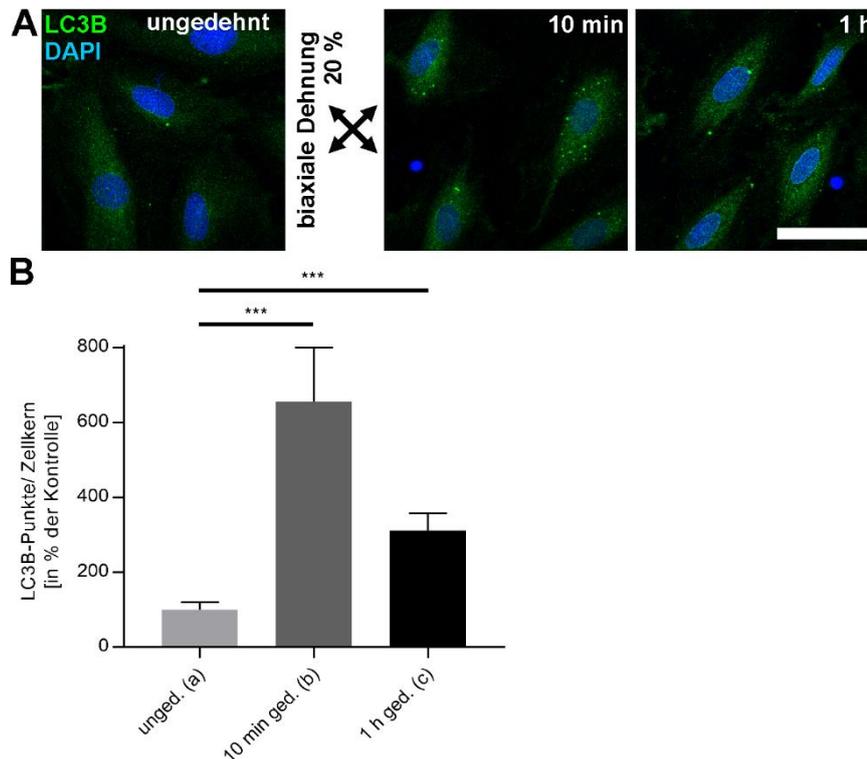
Hierbei konnte nach 30 min, 1 h und 4 h Dehnung weder bei einer Amplitude von 10 % noch bei 20 % eine Veränderung der Hauptorientierung des Aktin-Zytoskeletts hervorgerufen werden (Abbildung 3.34 A und B). Da das Aktin-Zytoskelett nach 20 % biaxialer, zyklischer Dehnung immer noch intakt war und die Zellen auch noch nach 4 h Dehnung auf dem Substrat adhärirten, wurde die höhere Amplitude für die weiteren Experimente gewählt.



**Abbildung 3.34: Orientierung des Aktin-Zytoskeletts nach biaxialer, zyklischer Dehnung in A7r5 Einzelzellen.** (A) Dargestellt ist das Aktin-Zytoskelett von A7r5 Einzelzellen nach 10 % und 20 % biaxialer, zyklischer Dehnung für die beschriebenen Zeiträume. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 16 h Inkubation gedehnt, fixiert und Aktin mittels Phalloidin-Fluorophor markiert. Die Pfeile zeigen die Dehnungsrichtungen. Der Maßstab ist 50  $\mu\text{m}$ . (B-C) Die kumulierten Hauptorientierungswinkel aller Zellen ( $n$ ) wurden für die angegebenen Zeitpunkte wie in Abbildung 3.4 beschrieben in Histogrammen von  $0^\circ$  bis  $45^\circ$  aufgetragen. Die gedehnten Zellen (ged.) zeigten zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied (ns) zur ungedehnten Kontrolle (unged.) (ns  $p > 0.05$ ) ( $n_a = 386$ ,  $n_b = 325$ ,  $n_c = 339$ ,  $n_d = 313$ ,  $n_e = 304$ ,  $n_f = 268$ ,  $n_g = 291$ ,  $n_h = 276$ ).

### 3.7.2 Induktion von APs durch biaxiale Dehnung

Bei der Analyse der LC3B-positiven APs konnte nach 10 min biaxialer, zyklischer Dehnung ein höchst signifikanter Anstieg von 0,9 (100 %) bei der ungedehnten Kontrolle auf 6,0 (655 %) APs pro Zelle festgestellt werden (Abbildung 3.35 A und B). Die Anzahl nahm nach 1 h Dehnung nicht weiter zu, war allerdings mit 2,9 APs pro Zelle noch immer höchst signifikant im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle erhöht.

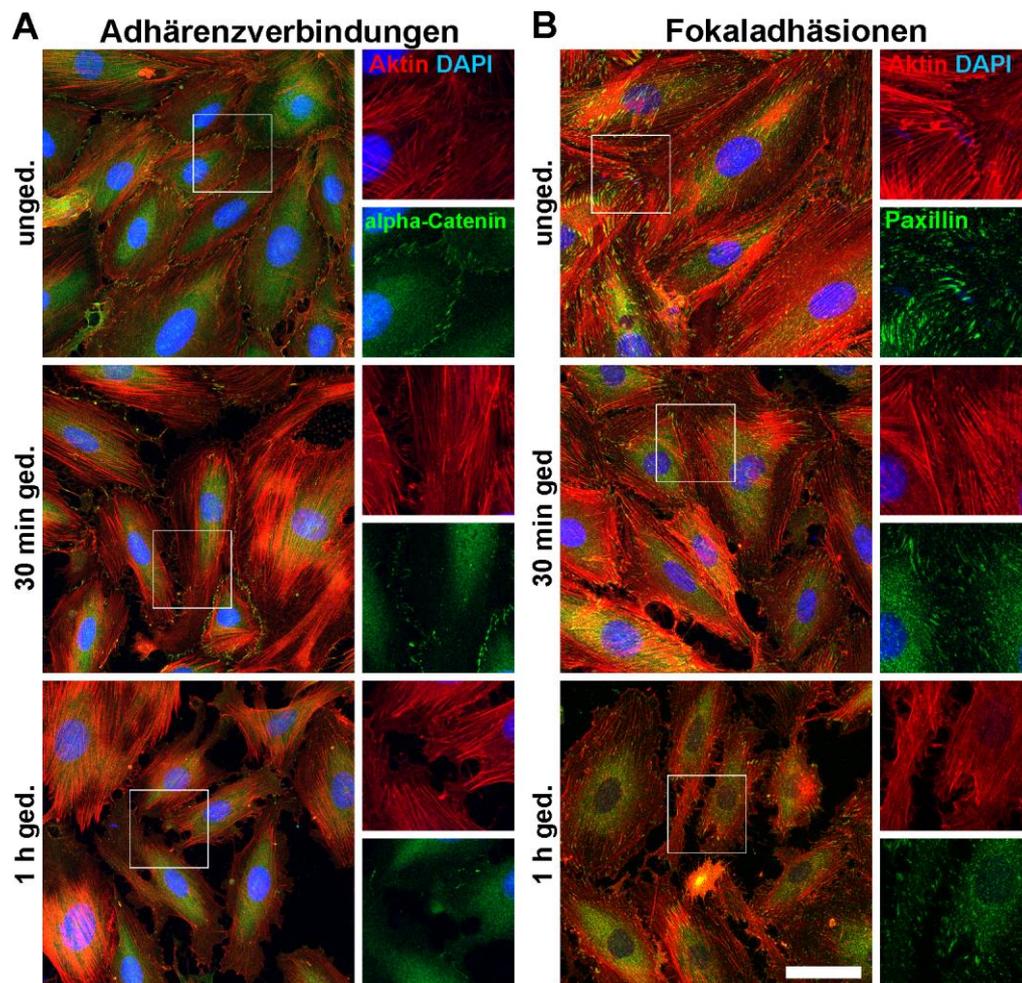


**Abbildung 3.35: Mechanische Induktion von LC3B-positive APs nach biaxialer, zyklischer Dehnung in A7r5 Monozellschichten.** (A) Gezeigt sind IFs von LC3B in A7r5 Monozellschichten nach 20 % biaxialer, zyklischer Dehnung bei 300 mHz für die beschriebenen Zeiträume. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 48 h Inkubation gedehnt, fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Der Maßstab ist 50  $\mu$ m. (B) Die relative Quantifizierung der LC3B-Punkte pro Zelle ist im Bezug zur ungedehnten Kontrolle (unged.) gezeigt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM aller ausgewerteten Zellen (n) ( $n_a = 24$ ,  $n_b = 23$ ,  $n_c = 18$ ). In dieser Abbildung sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt.

### 3.7.3 Abbau von mechanosensitiven Proteinen durch biaxiale Dehnung

Für die Analyse der mechanosensitiven Strukturen der FAs und der AJs wurden zunächst IFs für die Proteine  $\alpha$ -Catenin und Paxillin zusammen mit Aktin nach 30 min und 1 h biaxialer, zyklischer Dehnung sowie einer ungedehnten Kontrolle durchgeführt.

Hierbei konnte eine Abnahme des Fluoreszenzsignals sowohl bei  $\alpha$ -Catenin als auch bei Paxillin mit zunehmender Dehnung beobachtet werden (Abbildung 3.36 A und B). Weiterhin konnten Lücken in der Monozellschicht mit zunehmender Dehnung festgestellt werden.



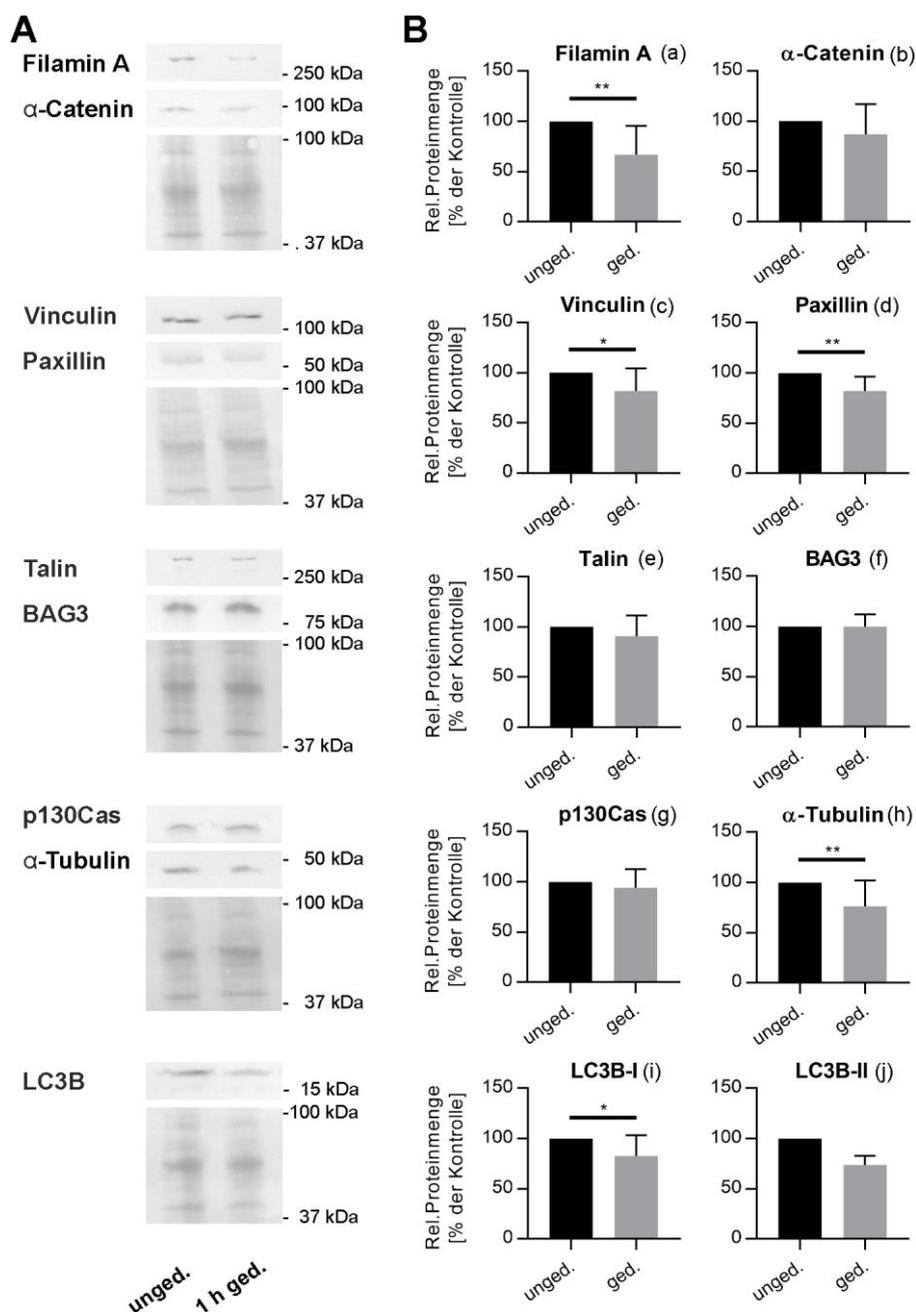
**Abbildung 3.36: FAs und AJs nach biaxialer, zyklischer Dehnung in A7r5 Monozellschichten.** Gezeigt sind Färbungen des Aktin-Zytoskeletts mittels Phalloidin und immunzytochemisch gefärbtes (A)  $\alpha$ -Catenin oder (B) Paxillin von A7r5 Monozellschichten nach 20 % biaxialer, zyklischer Dehnung bei 300 mHz für die beschriebenen Zeiträume. Die Zellen wurden auf FN beschichteten Elastomersubstraten ausgesät und nach 48 h Inkubation gedehnt, fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Zusätzlich ist jeweils eine Vergrößerung eines Bildausschnitts mit den einzelnen Fluoreszenzsignalen gezeigt. Der Maßstab ist 50  $\mu$ m.

Um die rein beobachtete Abnahme des Fluoreszenzsignals auswerten zu können, wurden im letzten Experiment Proteinanalysen nach 1 h biaxialer Dehnung mittels Western Blot Quantifizierung für verschiedene, mechanosensitive Proteine in FAs und AJs sowie einiger Autophagie-bezogener Proteine durchgeführt.

Hierbei konnte eine hoch signifikante Abnahme von Filamin A auf 67 % im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 3.37 A und B). Das FA- und AJ-Protein Vinculin nahm im gleichen Zeitraum nach Dehnung signifikant auf 82 % und das FA-Paxillin ebenfalls hoch signifikant auf 82 % jeweils zur ungedehnten Kontrolle ab.

$\alpha$ -Tubulin nahm durch die 1 h biaxiale Dehnung hoch signifikant auf 76 % ab. Die Proteinmenge von LC3B-I nahm ebenfalls signifikant auf 83 % der ungedehnten Kontrolle ab. Die Proteine  $\alpha$ -Catenin, Talin, BAG3, p130Cas und LC3B-II zeigten hingegen keine signifikanten Veränderungen nach 1 h biaxialer Dehnung.

Zusammenfassend konnte im letzten Kapitel dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein Anstieg an LC3B-positiven APs durch eine biaxiale, zyklische Dehnung trotz nicht vorhandener Aktin Reorientierung mechanisch induziert werden kann und parallel ein Abnahme der Proteine Filamin A,  $\alpha$ -Tubulin, Vinculin, Paxillin und LC3B-I stattfindet.



**Abbildung 3.37: Protein Quantifizierung mittels Western Blot Analysen nach 1 h biaxialer, zyklischer Dehnung von A7r5 Monozellschichten.** (A) Gezeigt sind Western Blot Membranen von ungedehnten (unged.) und 1 h biaxial gedehnten (1 h ged.) A7r5 Monozellschichten für verschiedene mechanosensitive FA- und AJ-Proteine, sowie einiger Autophagie-bezogene Proteine. Die Größe der mitgelaufenen Markerproteine ist am rechten Bildrand in kDa angezeigt. Unter den Proteinbanden ist jeweils eine Gesamtproteinfärbung dargestellt, die als Referenz für die eingesetzten Proteinmengen genutzt wurde. (B) Dargestellt ist eine Quantifizierung der relativen Proteinmenge in Bezug zur ungedehnten Kontrolle abgeglichen auf die Gesamtproteinmenge aus allen Experimenten (n) ( $n_a = 11$ ,  $n_b = 9$ ,  $n_c = 12$ ,  $n_d = 11$ ,  $n_e = 8$ ,  $n_f = 9$ ,  $n_g = 8$ ,  $n_h = 16$ ,  $n_i = 9$ ,  $n_j = 3$ ).

---

## 4 Diskussion

Die mechanosensitive Wahrnehmung der Zellen und der Abbau von beschädigten Proteinen stellen grundlegende Mechanismen für die Aufrechterhaltung der Homöostase und das Überleben der Zellen dar. Fehlfunktionen in diesen Prozessen führen zu zahlreichen Erkrankungen. Die genauen Zusammenhänge sind jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war es die dehnungsinduzierte Mechanosensitivität des Aktin-Zytoskeletts in Hinblick auf die Zellkontraktilität, bemessen an der Dicke und Häufigkeit von SFs und FAs, mit dem Abbauweg der Autophagie in Zusammenhang zu bringen. Zusätzlich sollten weitere Abbauklanten der BAG3-vermittelten CASA in den mechanosensitiven Proteinen der FAs und AJs identifiziert werden, um die Selektivität des Abbauwegs zu erweitern und ihn besser zu verstehen.

### 4.1 Dehnungsinduzierte Autophagie und Aktin Reorientierung

Die Autophagie beschreibt einen über das Lysosom vermittelten Abbauweg für zytosolische Proteine und ganze Zellorganellen. Die Autophagie wird über unterschiedlichste Stressbedingungen induziert. Dabei ist die Induktion über mechanische Reize bisher nur in geringem Ausmaß untersucht worden (King, 2012).

Nachdem in vorherigen Arbeiten bereits die verstärkte Induktion von APs auf steifen Substraten (230 kPa) im Vergleich zu weichen Substraten (0,6 kPa) in glatten Muskelzellen untersucht werden konnte (Ulbricht *et al.*, 2013), wurde in dieser Arbeit in ersten Experimenten unterschiedliche Anzahlen an APs in verschiedenen Zelltypen ohne mechanische Einflüsse unter ansonsten identischen Bedingungen beobachtet (Abbildung 3.1) und quantifiziert (Abbildung 3.3).

Die Dynamik der APs und ALs hat im Forschungsgebiet der Autophagie eine entscheidende Rolle und so wurden in dieser Arbeit zunächst Lebendzellanalysen auf steifen Glassubstraten mit den glatten Muskelzellen durchgeführt. In den schwach exprimierenden mCHERRY-eGFP-LC3B Zellen wurden sehr geringe Lebenszeiten von wenigen Minuten von APs und ALs beobachtet (Abbildung 3.2 C). Bei der Inhibition des Abbaus durch das Lysosom kam es weiterhin zu einer massiven Akkumulation der APs (Abbildung 3.2 D und Abbildung 3.28).

Folglich bestätigen die vorliegenden Daten die hohe Dynamik der über Dynein an den Mikrotubuli transportierten Strukturen (Jahreiss *et al.*, 2008).

Die Inhibition des lysosomalen Abbaus der APs durch Chloroquin ist ausführlich beschrieben (Ashoor *et al.*, 2013) und es kam zu ähnlichen Effekten durch die Blockade der vakuolären ATPase (Abbildung 3.29). Aus diesen Gründen wurde CQ als häufig eingesetztes Medikament z.B. als Autophagie-Inhibitor in der Chemotherapie (Della Porta *et al.*, 2020), weiter für die Inhibition in dieser Arbeit verwendet. Dennoch wäre es äußerst interessant die durch die beiden Inhibitoren akkumulierte APs genauer nach ihrer Herkunft zu untersuchen, weil die Akkumulation mit CQ deutlich stärker war. Allerdings wurde die Inhibition mit BafA1 nur einmalig durchgeführt und nicht für den Zelltyp und die Bedingungen optimiert. Weiterhin wurde die Stabilität des Inhibitors im Medium nicht überprüft, durch die eine geringere Inhibition nach längeren Dehnungszeitpunkten möglicherweise zu erklären wäre.

Zu Beginn dieser Arbeit war das rekombinante mCHERRY-eGFP-LC3B Konstrukt durch eine transiente Transfektion des DNA-Plasmids in die Zellen eingebracht worden und es konnte keine gleichmäßige Expression des rekombinanten Proteins in allen Zellen gewährleistet werden.

Durch vermutlich überlagernde Überexpressionsartefakte konnten nicht in allen Zellen ein dynamisches Verhalten der APs beobachtet werden (Abbildung 3.2 B und C). Um eine gleichmäßige Expression des rekombinanten Proteins in allen Zellen zu erreichen, wurde in der Doktorarbeit von Philipp Leyendecker (AG Dagmar Wachten, Uni Bonn) eine stabile Transfektion des mCHERRY-LC3B Konstrukts in das Genom der glatten Muskelzellen integriert.

Zunächst war nur eine Mischkultur der transient-transfizierten und Wildtyp Zellen vorhanden und so wurde weiterhin eine verstärkte Expression in den mCHERRY-LC3B Zellen im Vergleich zum WT festgestellt (Abbildung 3.2 E). Aus diesen Grund wurde zum Ende dieser Arbeit in Kooperation mit der Doktorarbeit von Maithreyan Kuppusamy (ZEA-3 & IBI-2; FZJ) eine Selektion transfizierter Zellen sowie eine Einzelklonzelllinie aus der Mischkultur etabliert. Bei diesem Einzelzellklon soll nur eine geringe Expression des Konstruktes erreicht werden, sodass diese monoklonale Zelllinie für die weiteren Analysen in den kommenden Projekten dienen wird.

Unter diesen Umständen sollen Lebendzellanalysen möglichst nah an den physiologischen Bedingungen auch unter zyklischer Dehnung ermöglicht werden. In dieser Arbeit wurden für die Analysen ausschließlich IFs des Markerproteins LC3B nach vorheriger Fixierung vorgenommen. Mit einer zusätzlichen stabilen mCHERRY-eGFP-LC3B Zelllinie könnten über dieselbe Herangehensweise zukünftig auch Flussanalysen zwischen APs und ALs durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die Induktion der Autophagie in verschiedenen Zelltypen durch eine uniaxiale, zyklische Dehnung sowohl in Einzelzellen (Abbildung 3.3) als auch Monozellschichten (Abbildung 3.28 und Abbildung 3.30) quantifiziert. Da zuvor bereits die hohe Dynamik der APs beobachtet werden konnte, wurden zu Beginn der Dehnung sehr frühe Zeitpunkte analysiert. Mit einer stabilen mCHERRY-LC3B Zelllinie wird die Dynamik zukünftig zeitlich noch detaillierter analysiert werden können. Im Gegensatz zu der hier angewandten Auswertung vieler Zellen einer Probe wird auch die Analyse einer einzelnen Zelle während der Dehnung in Lebendzellanalysen möglich sein. Dennoch konnte hier eine zeitlich- und Zelltyp-spezifische Induktion der APs quantifiziert werden, die durch die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts zu erklären ist (Abbildung 3.3, Abbildung 3.4, Abbildung 3.26 und Abbildung 3.30).

Wie in vorherigen Arbeiten bereits ausführlich untersucht, reorientieren die Zellen ihr Zytoskelett und den gesamten Zellkörper sowohl bei Einzelzellen (Hayakawa *et al.*, 2000) als auch bei Monozellschichten (Noethel *et al.*, 2018) ab bestimmten Schwellwerten der Amplitude (Chien, 2007) und der Frequenz (Lee *et al.*, 2010) der Dehnung. Die Reorientierung ist dabei orthogonal zur Dehnungsrichtung im Winkel minimaler Deformation/ minimalem Stress, um so dem mechanischen Stress auszuweichen und überleben zu können (Faust *et al.*, 2011).

Dabei wurden in dieser Arbeit erstmalig im direkten Vergleich zweier Zelltypen Unterschiede in der Geschwindigkeit und Stärke der Reorientierung sowohl des Aktin-Zytoskeletts als auch des Zellkörpers unter ansonsten identischen Bedingungen festgestellt (Abbildung 3.4). Die Reorientierung ist dabei kaum beeinflusst in der Stärke und Geschwindigkeit zwischen Einzelzellen (Abbildung 3.4) und Monozellschichten (Abbildung 3.26) in den glatten Muskelzellen.

Dies lässt sich dadurch erklären, dass die FAs sich durch die Zelldichte in den glatten Muskelzellen nicht verändern (Abbildung 3.25) und so die mechanosensitive Wahrnehmung gleich bleibt. Die zusätzlich vorhandenen AJs sind in den Zellen im Vergleich zu Epithelzellschichten (Noethel *et al.*, 2018) sehr schwach ausgeprägt und scheinen für diesen Zelltyp von geringerer Bedeutung in der mechanosensitiven Wahrnehmung zu sein.

Aus diesem Grund wurden auch die Keratinozyten Monozellschichten analysiert. Für den Epithelzelltyp konnten die vorherigen Daten zur AP Induktion (Abbildung 3.31) und der Reorientierung (Abbildung 3.30) bestätigt werden. Die unterschiedlichen zeitlichen Verläufe der AP Induktion lassen sich dabei durch die ebenfalls unterschiedlichen zeitlichen Aktin Reorientierungen der Zellen in Abhängigkeit ihrer Kontraktilität erklären. So konnte zwischen

Fibroblasten und glatten Muskelzellen bereits eine Korrelation zwischen dehnungsinduzierten AP-Anstieg und der Aktin Reorientierung aufgezeigt werden, wodurch auch das Maximum der APs Anzahl zeitlich verschoben ist bei unterschiedlichen Zelltypen.

Allerdings war der Einfluss der Blockierung des lysosomalen Abbaus der APs auf die Aktin Reorientierung in den Keratinozyten geringer als in den glatten Muskelzellen. Dies unterstützt die Bedeutung der FAs in dem Zusammenhang zwischen Reorientierung und Autophagie, weil die Mechanosensitivität in den Epithelzellschichten bei zunehmender Zelldichte von FAs zu AJs wechselt (Noethel *et al.*, 2018). Die AJs nehmen dabei eine schützende Rolle in der mechanosensitiven Wahrnehmung ein, indem sie die mechanischen Reize auf die Gesamtheit der Zellen übertragen. Dies ist aufgrund der vorliegenden Daten in den glatten Muskelzellen vermutlich nicht oder nur in geringerem Ausmaß der Fall. Weiterhin konnte bei den Proteinanalysen eine Unabhängigkeit des AJ-Proteins  $\alpha$ -Catenin vom lysosomalen Abbau der APs analysiert werden.

Im direkten Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts (Abbildung 3.4 und Abbildung 3.26), welches als schnellstes auf die Dehnung reagiert (Abbildung 3.11) (Zielinski *et al.*, 2018), und der Induktion der APs (Abbildung 3.3 und Abbildung 3.28) konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der LC3B-positiver APs nach der abgeschlossenen Reorientierung sogar unter den Wert der ungedehnten Kontrolle abfällt.

Die Reorientierung der Zellen und damit die Minimierung der Zellelongation und des mechanischen Stresses (Faust *et al.*, 2011) könnte die verminderte Autophagie nach längeren Dehnungszeitpunkten im Vergleich zur ungedehnten Kontrolle erklären. Andererseits ist auch ein Abbau wichtiger Proteine für die Autophagie sowie eine eingeschränkte Neusynthese dieser denkbar, was durch den Rückgang der APs bei längerer biaxialen Dehnung und damit stabiler mechanischer Beanspruchung bestätigt wird (Abbildung 3.35).

Jedoch muss die Induktion der APs auch von der zu Beginn der Dehnung zufälligen Orientierung der untersuchten Zelle zur Dehnungsrichtung und damit zwingend vom Ausmaß des mechanischen Stresses bei Anwendung der Dehnung abhängen. Deswegen wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die glatten Muskelzellen nach einer Vorausrichtung durch eine erste Dehnung alle orthogonal zur Dehnung ausgerichtet sind und anschließend bei einer zweiten Dehnung, 90° entgegen der ersten Dehnungsrichtung, erneut einen kompletten Reorientierungsprozess durchlaufen können (Abbildung 3.5). Dies verdeutlicht die Unabdingbarkeit der Zellen mechanische Reize nicht ignorieren zu können (Yusko and Asbury, 2014) und immer wieder eine Ausrichtung der

geringsten Deformation anzunehmen, um die Homöostase und das Überleben zu gewährleisten (Faust *et al.*, 2011).

Äußerst interessant wäre es die Induktion der APs bei der zweiten Dehnung der Zellen zu quantifizieren, um so ein gleichmäßigeres Verhalten innerhalb der Zellpopulation zu erreichen. Es wurde jedoch der erstmalige mechanische Reiz auf die Zellen untersucht und diese Idee nicht weiter verfolgt. Anstelle dessen wurde in den späteren Versuchen die biaxiale Dehnung angewandt, um den mechanischen Stress dauerhaft aufrechtzuerhalten.

Der direkte Zusammenhang der AP Induktion mit der Aktin Reorientierung konnte durch die abgeschwächte Reorientierung bei Blockierung des lysosomalen Abbaus in den glatten Muskelzellen erstmalig in dieser Arbeit nachgewiesen werden (Abbildung 3.6). Die Zelldichte spielt dabei keine Rolle, da die Verlangsamung sowohl in Monozellschichten der glatten Muskelzellen (Abbildung 3.27) als auch der Keratinozyten (Abbildung 3.30) beobachtet werden konnte.

Bei den glatten Muskelzellen mit blockiertem lysosomalen Abbau konnte weiterhin aufgezeigt werden, dass die Zellen deutlich kleiner wurden nach der Dehnung. Zusätzlich wurden in den Monozellschichten mit blockiertem lysosomalen Abbau der APs bei zunehmender Dehnungsdauer vermehrt Lücken in der Monozellschicht betrachtet. Dies kann auf die Dringlichkeit des lysosomalen Abbaus für die Homöostase der Zellen hindeuten, weil im Gegensatz dazu die Zellmorphologie der Fibroblasten unverändert war. Eine Toxizität allein aufgrund der CQ Konzentration wurde ausgeschlossen, da keine Veränderung der Zellzahl auf den Substraten gezeigt werden konnte. Die verwendete CQ-Konzentration gilt weiterhin als Standardkonzentration bei Zellkulturversuchen (Mauthe *et al.*, 2018) und wurde auch beim selben Zelltyp schon für längere Zeiträume (16 Stunden) auf den Zellen inkubiert (Klimek *et al.*, 2019).

Weiterhin scheint die Autophagie in den Fibroblasten, wenn auch mechanisch induzierbar, keine essentielle Notwendigkeit für die Homöostase der Zellen zu haben, da sowohl bei blockiertem lysosomalen Abbau (Abbildung 3.7) als auch bei den ATG5-KO Fibroblasten (Abbildung 3.8) keine morphologischen Veränderungen und keine Beeinträchtigung der Aktin Reorientierung analysiert werden konnte.

Dies könnte einerseits an der ohnehin sehr schwachen und inhomogenen Aktin Reorientierung der Fibroblasten, aber auch an einem stärkeren Abbau durch das Proteasom liegen, da die Inhibition beider Abbauwege zumindest zu Beginn der Dehnung eine Verzögerung in der Reorientierung nach sich zogen. Möglicherweise werden durch die dehnungsinduzierten APs beschädigte Proteine

oder Bestandteile abgebaut, die nicht für den Aufbau des Aktin-Zytoskeletts oder der FAs notwendig sind. Dies bestätigen die Analysen der ATG5-KO Fibroblasten (Abbildung 3.8), obwohl hier die Induktion der APs unter Dehnung in Abhängigkeit von ATG5 noch untersucht werden muss. Die Unterschiede in der Aktin Reorientierung der WT Fibroblasten in Abbildung 3.4 und Abbildung 3.8 sind durch die unterschiedliche Herkunft der beiden Zelllinien zu begründen (Tabelle 5).

Letztlich zeigen die vorliegenden Daten aber, dass die Abhängigkeit der Reorientierung von der Autophagie auf andere Zelltypen übertragbar ist, wenn auch nicht mit gleich starken Auswirkungen für jeden Zelltyp.

Interessanterweise waren die Reorientierung des Zellkörpers (Abbildung 3.9) und des Vimentin-Zytoskeletts (Abbildung 3.10) in den glatten Muskelzellen ebenfalls durch die Blockierung des lysosomalen Abbaus verlangsamt. Das Aktin-Zytoskelett reagiert als schnellstes auf die Dehnung vor dem Vimentin-Zytoskelett und dem Zellkörper (Zielinski *et al.*, 2018). Da diese Ergebnisse bestätigt werden konnten (Abbildung 3.11), wurde davon ausgegangen, dass hauptsächlich das Aktin-Zytoskelett in der Reorientierung beeinflusst wird und nachfolgend auch die anderen Strukturen gleichermaßen verlangsamt reagieren. Die Hypothese konnte durch die Auflösung des Aktin-Zytoskeletts in den glatten Muskelzellen demonstriert werden, da sich dort die Zellkörper in Dehnungsrichtung positionierten (Abbildung 3.16). Um die Vermutung für das Aktin- und Vimentin-Zytoskelett zu bestätigen, müsste das Experiment allerdings unter den identischen Bedingungen bei blockiertem lysosomalem Abbau wiederholt werden.

## 4.2 Zellkontraktilität in dehnungsinduzierte Autophagie und Aktin Reorientierung

Die Kontraktilität der Zelle gemessen an SFs und FAs wird neben dem Einfluss der Substratelasizität (Prager-Khoutorsky *et al.*, 2011) und der angelegten Zugkräfte (Faust *et al.*, 2011) durch Signalmoleküle wie LPA (Xiang *et al.*, 2013) und auch durch den Zelltyp definiert. Während Aktin Stressfasern in motilen Zellen aufgrund ihrer hohen Dynamik sehr dünn ausfallen, sind die Stressfasern in nicht-motilen Zellen deutlich stärker und stabiler ausgeprägt (Tojkander *et al.*, 2012). Ebenso unterscheiden sich Stressfasern innerhalb nicht-motiler Zellen in der Ausprägung und Anzahl.

Während die Fibroblasten (Abbildung 3.12) und Keratinozyten (Abbildung 3.30) vergleichsweise dünne SFs zeigten, waren in den glatten Muskelzellen deutlich dickere und zumeist parallel angeordnete Stressfasern zu beobachten (Abbildung 3.14). Die SFs in den glatten Muskelzellen mündeten an ihren Enden jeweils in einer FA während die SFs in den Fibroblasten öfters in einer gemeinsamen FA endeten.

Diese Zellkontraktilität ist noch weiter erhöht bei der quergestreiften Skelettmuskulatur. Bei der Entstehung von Muskelfasern differenzieren und verschmelzen Muskelvorläuferzellen (Myoblasten) zu den mehrkernigen Myotuben, die sich wiederum zu Muskelfasern anordnen. Die kleinste funktionale Einheit im Skelettmuskel ist das Sarkomer. Dieses besteht aus parallel angeordneten Aktinfilamenten, die an der Z-Scheibe verankert sind und den dazwischenliegenden Myosindimeren. Die Muskelkontraktion der quergestreiften Muskulatur ist im Gegensatz zu der glatten Muskulatur und der Herzmuskulatur die einzige bewusst gesteuert Muskelkontraktion (Frontera and Ochala, 2015). Der strukturierte Aufbau der Sarkomere in der quergestreiften Muskulatur macht diese hoch kontraktile und dadurch für die Untersuchung des Abbaus von Filamin C über die CASA bedeutend (Arndt *et al.*, 2010; Kathage *et al.*, 2017).

Die mechanische Beanspruchung durch die Muskelkontraktion (*in vitro* über eine elektrische Puls-Stimulation (EPS) bewirkte (Orfanos *et al.*, 2016)) ist jedoch eine andere mechanische Beanspruchung als die zyklische Dehnung.

Aus diesem Grund wurde mit den stark kontraktile, glatten Muskelzellen gearbeitet, in denen die CASA ursprünglich beschrieben worden war (Ulbricht *et al.*, 2013). Die Kontraktilität der glatten Muskelzellen ist ebenfalls hoch, folglich sind die Zellen für die Untersuchung von mechanosensitiven Proteinen gut geeignet.

Die Zellkontraktilität wird über die RhoA Signalkaskade reguliert (Nobes and Hall, 1995). Durch die nachfolgende Aktivierung von ROCK wird der verstärkte Einbau von Myosin in Aktinfilamente reguliert und der kontraktile Apparat aufgebaut (Amano *et al.*, 1996). Für Fibroblasten ist eine verstärkte Adhäsionsstärke von FA-Proteinen durch eine Serum- und eine reine LPA-Stimulation bereits beschrieben worden (Gallant *et al.*, 2005).

Während eine Aktivierung von RhoA mit LPA in den Fibroblasten ebenfalls zu einer verstärkten Kontraktilität und damit stärkeren Aktin Reorientierung (Abbildung 3.12) und eine Zunahme der dehnungsinduzierten APs (Abbildung 3.13) führte, zeigte dies bei den glatten Muskelzellen keine Effekte (Abbildung 3.14).

Dies kann durch die höhere Dynamik in den Fibroblasten im Vergleich zu den glatten Muskelzellen erklärt werden. Während die Kontraktilität und die dehnungsinduzierte Aktin Reorientierung durch eine Verminderung der Substratelastizität nur geringfügig abnahm, konnte dennoch eine Induktion von APs bewirkt werden (Abbildung 3.15). Dies spricht einerseits für die Übertragung der Ergebnisse auf weiche noch physiologischere Substrate und andererseits für eine gewisse Unabhängigkeit der glatten Muskelzellen von äußeren Faktoren zur Aufrechterhaltung der Kontraktilität und der Autophagie zum Erhalt der Zellhomöostase.

Dass auf dem weichen Substrat nach einer Stunde Dehnung eine ähnliche Anzahl an APs (Abbildung 3.15) wie bei den Standard Elastomersubstraten (Abbildung 3.3) beobachtet wurde, könnte durch eine Verlangsamung der Reorientierung und damit auch der maximalen APs Anzahl zu einem späteren Dehnungszeitpunkt zu erklären sein. Wie bereits ausführlich beschrieben hängt die mechanosensitive Wahrnehmung von der Elastizität der Umgebung ab (Prager-Khoutorsky *et al.*, 2011) und würde damit die Verzögerung in der mechanosensitiven Antwort erklären. Diese zeitliche Verschiebung müsste durch eine ausführlicher zeitliche Analyse der Aktin Reorientierung und der APs auf den weichen Substraten untersucht werden.

Eine teilweise vorkommende Auflösung von SFs oder eine Reduktion zu schwachen SFs wurde in vorherigen Arbeiten bereits über den Inhibitor Y-27632 bewirkt, was in einer dehnungsinduzierten Reorientierung der verbleibenden Fasern in Dehnungsrichtung resultierte (Lee *et al.*, 2010). Bei einer ROCK Inhibition konnte in dieser Arbeit die eindeutige Abhängigkeit der Autophagie von der Zellkontraktilität durch die RhoA Signalkaskade belegt werden (Abbildung 3.16 und Abbildung 3.17). Durch die vollständige Auflösung von SFs und FAs und die Reorientierung der Zellkörper in Dehnungsrichtung konnte die Reorientierung entgegen der Dehnungsrichtung in Abhängigkeit von der Zellkontraktilität bewiesen werden (Abbildung 3.16).

Diese Daten bestätigten die vorherige Vermutung, dass der lysosomale Abbau lediglich die Aktin Reorientierung verlangsamt und die Effekte beim Vimentin-Zytoskelett und dem Zellkörper nur nachfolgend verzögert werden. Durch die Auflösung des Aktin-Zytoskeletts und der FAs ist die Zelle nicht mehr in der Lage die externen mechanischen Signale wahrzunehmen und in eine intrazelluläre chemische Antwort umzuwandeln.

Obwohl ROCK in aktiver Form an Beclin 1 bindet, dieses phosphoryliert und damit die Beclin 1-abhängige Autophagie fördert (Gurkar *et al.*, 2013), wurde der Einfluss in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da diese Autophagie hauptsächlich auf Nährstoffmangel zurückzuführen ist. Dennoch sollten die vorliegenden Daten durch weitere Inhibitoren des Aktin-Zytoskeletts und der FAs bestätigt werden.

Weiterhin konnten durch die Aktivierung (Fibroblasten) und die Inhibition der AP Induktion (glatte Muskelzellen) durch Beeinflussung der Zellkontraktilität über RhoA die Unterschiede bei der Blockierung des lysosomalen Abbaus in der Aktin Reorientierung beider Zelltypen erklärt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Kontraktilität der Zelle von Fibroblasten zu glatten Muskelzellen und letztlich der Skelettmuskulatur (Arndt *et al.*, 2010; Kathage *et al.*, 2017) mit der Mechanosensitivität und der Autophagie korreliert, wohingegen Autophagie trotzdem in allen untersuchten Zelltypen mechanisch durch Dehnung induziert werden konnte.

Von besonderer Interesse ist, dass auch ein p62-abhängiger Abbau über Autophagie von RhoA selbst beschrieben ist (Belaid *et al.*, 2013). Eine dehnungsinduzierte Reduktion von RhoA und ROCK in Endothelzellen (DiPaolo and Margulies, 2012) und die vorliegenden Daten dieser Arbeit unterstützen diese Untersuchungen.

### 4.3 BAG3 in der mechanosensitiven Aktin Reorientierung

Der molekulare Chaperonregulator BAG3 wurde initial als beteiligtes Protein im Abbau von aggregierten und toxischen Proteinen in Nervenzellen und später auch im Abbau des Mikrotubuli assoziierten Proteins Tau über Autophagie beschrieben (Lei *et al.*, 2015).

Der Einfluss von BAG3 in Muskelzellen wurde erst nachfolgend untersucht. Dabei führen Mutation in BAG3 zu zahlreichen Myopathien und Cardiomyopathien (Kimura *et al.*, 2021). Zusätzlich wurde BAG3 ausführlich in glatten Muskelzellen untersucht. Vorherige Studien konnten zeigen, dass die Zahl der APs durch eine Deletion von BAG3 mittels siRNA deutlich verringert wird (Ulbricht *et al.*, 2013) und das Protein somit essentiell für die Markierung und den Abbau von mechanisch beschädigtem Filamin ist (Kathage *et al.*, 2017).

Die beiden Abbauwege durch das Proteasom und der Autophagie können sich gegenseitig regulieren (Ji and Kwon, 2017) und eine Inhibition des Proteasoms führt zu einer transkriptionalen Hochregulierung von BAG3 (Wang *et al.*, 2008). Dies deutet auf die besondere Notwendigkeit des Proteins in der Mechanosensitivität der Zellen hin. Die Untersuchungen der Aktin Reorientierung der BAG3-WT und der dominant negativen Form BAG3-WAWA in den glatten Muskelzellen konnte die Bedeutung des Proteins in der Adaptation auf den mechanischen Stress bestätigen (Abbildung 3.20).

Jedoch muss hier noch untersucht werden, ob BAG3 die CASA rekrutiert oder ob mögliche bisher unbekannte Faktoren in diesem Prozess involviert sind (Gamerdinger *et al.*, 2011). Dennoch ist durch die verwendete BAG3-WAWA Mutante mit einer inaktivierten WW Domäne (Tryptophan zu Alanin Substitution an Position 26 und 49) (Kathage *et al.*, 2017) die Interaktion zum Adapterprotein SYNPO-2 über dessen PPxY Motiv inhibiert (Ji *et al.*, 2019), welches für die Induktion der Autophagie unerlässlich ist (Merabova *et al.*, 2015). All dies spricht für einen Mechanismus mit Ähnlichkeit zur CASA. Um den genauen Mechanismus der BAG3-Interaktion in diesem Prozess zu untersuchen, wurden zusätzlich weitere BAG3-Phosphorylierungsmutanten in der Aktin Reorientierung auf die gleiche Weise analysiert, jedoch nicht in diese Arbeit eingebettet, weil diese Daten bisher noch unveröffentlicht sind.

Der geringe Einfluss der BAG3-WAWA Mutante auf die Aktin Reorientierung nach längerer Dehnungsdauer könnte durch zwei Faktoren zu erklären sein. Einerseits muss die Notwendigkeit von BAG3 sowie die Transfektion eine geringe Toxizität in den glatten Muskelzellen bewirken, wodurch einzelne Zellen bei zusätzlichem mechanischem Stress absterben könnten. Andererseits war der BAG3-WT in den Zellen immer noch vorhanden und könnte somit besonders zu späteren Dehnungszeitpunkten die fast vollständige Aktin Reorientierung vermitteln.

Aus diesen Gründen wurde die Analyse mit den aus der AG Thomas Benzing (Nephrologie, Uniklinik Köln) zur Verfügung gestellten WT und BAG3-KO Podozyten wiederholt.

Podozyten sind hochdifferenzierte, epitheliale Zellen, die durch ihre starke Verzweigung die äußere Schicht der Filtrationsbarriere an der glomerulären Basalmembran der Niere bilden. Die Podozyten sind verantwortlich für die Stabilisierung der Kapillaren gegen den hohen Kapillardruck, sodass die Zellen ebenfalls eine hohe mechanische Belastbarkeit haben müssen (Höfeld *et al.*, 2021). Fehlfunktionen in der Mechanosensitivität können deswegen zu verschiedenen Erkrankungen führen (Kriz, 2006). Das Protein Filamin hat in Podozyten eine tragende mechanosensitive Rolle (Höfeld *et al.*, 2021) und alle Komponenten der CASA wurden bei einer Proteomanalyse in den Zellen nachgewiesen (Rinschen *et al.*, 2018). In den Podozyten wird aus diesem Grund die Rolle der CASA und insbesondere von BAG3 untersucht.

Bei der Untersuchung der undifferenzierten, humanen Podozyten ergaben teilweise hoch signifikante Verlangsamungen der Aktin Reorientierung der BAG3-KO Podozyten im Vergleich zum WT (Abbildung 3.21), aber diese Effekte waren nicht für beide BAG3-KO Klone gleichermaßen zu den Dehnungszeitpunkt von einer und vier Stunden konsistent. Dies könnte durch die ohnehin geringen Effekte bei den undifferenzierten Zellen zu erklären sein, die bei einer zu geringen Anzahl an Zellen nicht mehr statistisch signifikant ausfallen.

Da *in vivo* eine Differenzierung der Podozyten zur Hochregulation der Podozyten Markerproteine wie z.B. Nephrin und Podocin führt (Saleem *et al.*, 2002), wurde dies *in vitro* über eine Änderung der Kultivierungsbedingungen bewirkt (Abbildung 3.22). Die deutlich stärkere und auch konsistente Verlangsamung in der Aktin Reorientierung der differenzierten Podozyten im Vergleich zum WT zeigt damit, dass die differenzierten Zellen stärker auf das Co-Chaperon BAG3 angewiesen sind (Abbildung 3.23).

Dennoch konnte hier nach der abgeschlossenen Aktin Reorientierung kein Unterschied zwischen den BAG3-KO Podozyten und den WT Zellen beobachtet werden. Dies deutet auf eine Schutzfunktion von BAG3 in der Mechanosensitivität der Zellen hin, die aber über weitere, bisher unbekannte Faktoren ausgeglichen werden kann.

Die Differenzierung der WT Podozyten zeigte eine deutliche Zunahme in der Zellgröße (Abbildung 3.22) und damit einhergehend auch eine zunächst langsamere aber letztlich stärkere Aktin Reorientierung (Abbildung 3.24). Dies gibt zusammen mit den Reorientierungsdaten der glatten Muskelzellen und Fibroblasten einen weiteren Hinweis darauf, dass die Reorientierung

nicht nur von ihrer relativen Kontraktilität der Zelle, sondern auch von ihrer Gesamtzahl an Stressfasern und FAs abhängen muss.

Zur Klärung, ob BAG3 bei der Reorientierung der Podozyten die Autophagie unter Dehnung einleitet oder sonstige Funktionen erfüllt, muss eine Quantifizierung der LC3B-positiven APs wie in den vorherigen Experimenten durchgeführt werden. Nach der bisherigen Hypothese, sollten die BAG3-KO Podozyten keine dehnungsinduzierten APs bilden und damit beschädigte Proteine in der Zelle nicht abbauen können, was die Reorientierung negativ beeinträchtigt.

Darüber hinaus konnte der Einfluss des Transkriptions-Co-Aktivators YAP in der Aktin Reorientierung der glatten Muskelzellen festgestellt werden (Abbildung 3.19). Die Freisetzung von YAP wird dabei über BAG3 vermittelt (Ulbricht *et al.*, 2013).

Neben der Induktion der Autophagie ist auch der Einfluss von BAG3 auf den Hippo-Signalweg im Prozess der Aktin Reorientierung in dieser Arbeit bestätigt worden. Fehlendes BAG3 bewirkt die Freisetzung der Inhibitoren LATS1/2 und AMOTL1/2, welche YAP binden und auf diese Weise die Transkription von Filamin für die Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts blockiert (Klimek *et al.*, 2017). Durch die geringere Konzentration des stabilisierenden Proteins kann das Aktin-Zytoskelett nur in abgeschwächter Form aufgebaut werden und die Aktin-Reorientierung verläuft verlangsamt.

BAG3 ist nicht nur in dem Abbau von beschädigten Proteinen sondern auch an deren Neusynthese beteiligt. Diese Erkenntnis konnte im Prozess der Aktin Reorientierung als mechanosensitive Antwort auf eine uniaxiale, zyklische Dehnung verdeutlicht werden. Auch die Blockierung der gesamten Proteinbiosynthese konnte nach kurzen Dehnungszeiträumen eine verlangsamte Aktin Reorientierung bewirken (Abbildung 3.18). Aus diesem Grund muss der Einfluss möglicher weiterer, neusynthetisiert Proteine weiter untersucht werden. Neben Filamin wird die Transkription anderer Proteine über alternative mechanosensitive Transkriptionsfaktoren wie YAP (Dupont *et al.*, 2011) durch den mechanischen Reiz hochreguliert. Zusätzlich spricht die geringe Lebensdauer der APs (Abbildung 3.2) für einen schnellen Abbau von Autophagieproteinen, die bei einer 24-stündigen Blockierung der Proteinbiosynthese vermutlich in wesentlich geringeren Konzentrationen in der Zelle vorhanden sind und dadurch die Aktin Reorientierung schlechter vermitteln können.

#### 4.4 Dehnungsinduzierter Abbau von mechanosensitiven Proteinen in Fokaladhäsionen durch Autophagie

Die Mechanosensitivität einzelner Zellen ist zwingend von der Wahrnehmung extrazellulärer Signale über die Adhäsionskomplexe der FAs, verbunden mit dem Aktin-Zytoskelett der Zelle, abhängig. Die Wahrnehmung wird über eine Reihe mechanosensitiver Proteine vermittelt, die durch Dehnung eine Konformationsänderung über verschiedene Mechanismen mechanische in chemische Signale umwandeln (Swaminathan and Glierich, 2021). Diese Signalumwandlung kann zu einer Verstärkung von Proteinbindungen (Kong *et al.*, 2009), zur Freigabe verborgener Bindungsmotive (Hirata *et al.*, 2014b) oder Phosphorylierungsmotive (Defilippi *et al.*, 2006) sowie auch zur Auflösung von Bindungen führen (Ehrlicher *et al.*, 2011).

Bisher ist jedoch ungewiss, wie zelluläre Systeme die unterschiedliche Stärke mechanischer Signale wahrnehmen können. Während für einige mechanosensitive Proteine wie p130Cas und Fibronectin eine schrittweise, kraftabhängige Entfaltung der Proteinstruktur beschrieben ist (Paci and Karplus, 1999; Lu *et al.*, 2013), wurde für andere Proteine wie Talin eine wiederholte Entfaltung und Rückfaltung nachgewiesen (Yao *et al.*, 2016). Bereits bei kleinen Dehnungsamplituden konnte eine Ausdehnung von Proteinen an den Kontaktstellen zwischen den FAs und dem Aktin-Zytoskelett festgestellt werden (Kirchenbuechler *et al.*, 2010). Es ist weiterhin unklar, ob wiederholte Zyklen der Entfaltung und Rückfaltung bei einer zyklischen Dehnung, sowie sehr starke Entfaltungen aufgrund hoher Dehnungsamplituden, eine fehlerfreie Rückfaltung durch Chaperone überhaupt möglich ist.

Die untersuchte Quantifizierung der mechanosensitiven Proteine nach der kurzen uniaxialen, zyklischen Dehnung unterstützt das Potenzial der Proteine eine gewisse Kapazität an mechanischer Belastung tolerieren zu können, ohne irreversibel beschädigt und abgebaut zu werden (Abbildung 3.32). Allerdings waren in einigen Proteinen Tendenzen zu einem dehnungsinduzierten Abbau erkennbar. Bisher war allgemein unklar, ob die Mechanosensitivität und die daraus folgenden zellulären Antworten überhaupt zu einem Abbau spezifischer Proteine, insbesondere über den Abbauweg der Autophagie, führt.

Für das phosphorylierte Protein p130Cas ist eine spezifische Regulation über das UPS in den FAs von migrierenden Zellen beschrieben worden (Teckchandani and Cooper, 2016).

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Zusammenhängen ist für das Protein Filamin ein genauer Mechanismus zwischen kraftinduzierter Entfaltung und Abbau durch die Chaperon-assistierte, selektive Autophagie in der Skelettmuskulatur (Arndt *et al.*, 2010; Ulbricht *et al.*, 2015; Kathage *et al.*, 2017) und der Glatten Muskulatur (Ulbricht *et al.*, 2013) beschrieben.

Filamin quervernetzt das Aktin-Zytoskelett und stellt eine Verbindung zur Zellmembran über eine kraftinduzierte Bindung zu  $\beta$ -Integrin her und stabilisiert den Zellkortex (Rognoni *et al.*, 2012). Allerdings wird diese Bindung bei zu großer Krafteinwirkung wieder aufgelöst und führt über die Erkennung der entfalteten Ig-Domänen 19 bis 21 über BAG3 zum Abbau durch die CASA (Ulbricht *et al.*, 2013). Die Untersuchungen wurden hierbei in den glatten Muskelzellen hauptsächlich über eine erhöhte Substratelastizität vorgenommen.

Der Abbau von Filamin A durch eine längere uniaxiale, zyklische Dehnung auf weichen Substraten tendenziell beobachtet werden, welcher bei einem blockierten Abbau durch das Lysosom geringer war (Abbildung 3.33). Jedoch waren diese Ergebnisse nicht signifikant. Allerdings konnte ein starker Abbau von Filamin A bei einer kürzeren, biaxialen Dehnung gezeigt werden (Abbildung 3.37). Ob dieser Abbau durch die Autophagie insbesondere die CASA vermittelt wird, muss in weiteren Untersuchungen bestätigt werden.

Neben Filamin konnte in dieser Arbeit erstmalig der dehnungsinduzierte Abbau der Proteine  $\alpha$ -Catenin,  $\alpha$ -Tubulin, Paxillin, LC3B-I und -II und HSC70 nach längerer uniaxialer, zyklischer Dehnung in den glatten Muskelzellen festgestellt werden (Abbildung 3.33). Der geringere Abbau der Proteine  $\alpha$ -Tubulin, Paxillin, LC3B-II und HSC70 bei blockiertem Abbau durch das Lysosom deutet auf einen autophagosomalen Abbau der Proteine unter mechanischer Dehnung hin.

In den letzten Jahren wurden einige Studien über den Zusammenhang zwischen Autophagie und dem Abbau von FAs insbesondere in migrierenden Tumorzellen veröffentlicht und man spricht in dem Zusammenhang von FA-Phagie (zusammengefasst in (Lu *et al.*, 2021)). Ein vermehrter Abbau von FAs über selektive Autophagie wird mit einem erhöhten Potenzial zur Migration in Tumorzellen assoziiert und die Inhibition der Autophagie als vielversprechendes Ziel in der Verhinderung der Metastasierung von z.B. Brustkrebs erforscht (Lu *et al.*, 2021). Der Mechanismus des Abbaus hängt vom zellulären Hintergrund und den Rezeptoren zur Erkennung der Zielmoleküle ab.

So wurde erstmalig die direkte Interaktion von dem FA-Protein Paxillin mit LC3B und damit der Abbau über die Autophagie in migrierenden Brustkrebszellen beschrieben (Sharifi *et al.*, 2016). Die Co-Lokalisation von LC3B und Paxillin ist am migrierenden Ende der Zellen stärker und die FAs werden häufiger abgebaut. Darüber hinaus konnte eine Zunahme der Anzahl und Größe von

FAs durch eine Runterregulierung der Autophagogene ATG5 und ATG7 beobachtet werden (Kenific *et al.*, 2016a; Sharifi *et al.*, 2016). Diese Daten bestätigen die Hypothese, dass die Autophagie die Stabilität der FAs negativ reguliert.

Sowohl der Nachbar des BRCA1-Gen-1-Proteins (NBR1) wird als Autophagie Rezeptor von bisher noch unbekanntem Zielproteinen (Kenific *et al.*, 2016a) als auch das *Casitas B-lineage* Lymphom Protein (c-Cbl) als Rezeptor für den Abbau von Paxillin in Brustkrebszellen beschrieben (Chang *et al.*, 2017). NBR1 wurde zuvor bereits als Autophagie Rezeptor des mechanosensitiven Proteins Titin, welches für den Aufbau der Sarkomere notwendig ist, beschrieben (Lange *et al.*, 2005). c-Cbl bindet Paxillin mit einer Phosphorylierung an Tyrosin 118, während LC3 direkt mit Paxillin phosphoryliert an Tyrosin 40 bindet. Die Rezeptormoleküle haben ebenso wie p62 in der CASA gemeinsam, dass sie über die LC3-interagierende Domäne (LIR) an LC3 und über eine Ubiquitin-bindende Domäne (UBD) an das Zielprotein binden (Kenific *et al.*, 2016b). Allerdings kann die Erkennung des Zielproteins auch unabhängig von Ubiquitin erfolgen.

Mit all diesen Erkenntnissen ist der LC3B-vermittelte Abbau von Paxillin in Tumorzellen als mechanosensitiver Mechanismus auf gesunde Zellen möglicherweise übertragbar. Ob dieser Abbau in den glatten Muskelzellen über eine direkte Interaktion mit LC3B oder wie bei Filamin über BAG3 und CASA (Ulbricht *et al.*, 2013) und bereits bekannte oder bisher unbekannte Rezeptoren vermittelt wird, muss noch untersucht werden.

Aufgrund des geringeren Abbaus von HSC70 bei inhibierten Lysosom, ist eine Assoziation des bei der CASA involvierten Hitzeschockproteins jedoch naheliegend. Die Hypothese korreliert mit dem Modell des Zusammenhangs zwischen kraftinduzierter Protein-Entfaltung und der Bindung von Chaperonen (Kim *et al.*, 2013), die bei einer langsamen Protein-Rückfaltung die Initiation zum Abbau vermitteln können. Eine verlangsamte Rückfaltung nach verstärkter Krafteinwirkung konnte bereits für Filamin gezeigt werden (Rognoni *et al.*, 2012). Zusätzlich spricht die Abnahme von LC3B-I und LC3B-II unter Dehnung sowie die Akkumulation von LC3B-II bei blockiertem lysosomalen Abbau für die Hypothese des lysosomalen Abbaus.

Allerdings konnte in dieser Arbeit keine Veränderung von BAG3 unter Dehnung festgestellt werden. Dies könnte auf die massive Präsenz des Proteins in den glatten Muskelzellen und die Verwendung eines polyklonalen Antikörpers zurückzuführen sein, weshalb kleine Veränderungen in der Proteinmenge nur schwer zu detektieren sind.

Weiterhin kann dies durch den stressinduzierten Hitzeschockfaktor 1 (HSF1) begründet werden, welcher eine schützende Rolle bei mechanischem Stress einnimmt (Höfeld *et al.*, 2021). Dieser

Transkriptionsfaktor wird stressinduziert hochreguliert und fördert die Expression von einigen Proteinen, darunter auch die CASA Komponenten HSP70, BAG3, p62 und Ubiquitin, wodurch die CASA wiederum den Abbau von beschädigten Proteinen fördert (Barna *et al.*, 2018). Durch eine mögliche Neusynthese von BAG3 bei längeren Dehnungszeitpunkten könnte die nicht veränderte Proteinmenge auch erklärt werden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die untersuchten Proteine zunächst wie sonst üblich auf Tubulin abgeglichen (Ulbricht *et al.*, 2013; Kathage *et al.*, 2017; Klimek *et al.*, 2019). Tubulin zeigte nach zyklischer Dehnung auffällige Veränderungen und aus dem Grund wurde auf den Abgleich mit dem Gesamtprotein gewechselt. Ob die Abnahme von  $\alpha$ -Tubulin durch die zyklische Dehnung durch die mechanische Beschädigung der Mikrotubuli selbst oder über einen teilweisen Abbau der Strukturen mit den APs geschieht, da diese über die Mikrotubuli transportiert werden, muss noch geklärt werden. Die Mikrotubuli werden außerdem zum Transport von Autophagieproteinen wie LC3 und des Rezeptorproteins NBR1 genutzt, was einen Abbau der Strukturen über Autophagie durchaus nachvollziehbar macht (Kenific *et al.*, 2016b).

Die signifikante Abnahme von  $\alpha$ -Catenin unter Dehnung wurde als einzige durch die Inhibition des lysosomalen Abbaus verstärkt (Abbildung 3.33). Eine Inhibition der Autophagie führt zu einer Verstärkung des proteasomalen Abbaus (Ji and Kwon, 2017) und der Abbau von  $\alpha$ -Catenin über das Proteasom wurde bereits beschrieben (Suzuki *et al.*, 2008). Mit diesen Untersuchungen ist ein Abbau von  $\alpha$ -Catenin über APs sehr unwahrscheinlich. Um dies zu überprüfen, sollte derselbe Versuch noch einmal bei blockiertem Abbau durch das Proteasom wiederholt werden.

Zusätzlich wäre es äußerst interessant die Akkumulation von Proteinen in den APs durch die Blockierung des lysosomalen Abbaus ohne zusätzlich mechanische Belastung zu analysieren. Auch unter nicht gestressten Bedingungen kam es durch die Blockierung zu einem massiven Anstieg der APs (Abbildung 3.28). Dies lässt vermuten, dass die Mechanismen zum Abbau der Proteine auf einem basalen Niveau immer existent sind und unter mechanischen Reizen nur verstärkt auftreten.

Interessanterweise wurden durch die längere uniaxiale, zyklische Dehnung die klassischen mechanosensitiven Proteine der FA nicht abgebaut (Abbildung 3.33). Dies spricht für eine hohe mechanische Belastbarkeit der Proteine und der gesamten Strukturen. Im Mechanismus der Aktin Reorientierung kann dies entweder für einen Erhalt der bereits vor der Dehnung bestehenden FAs

für die Ausbildung neu ausgerichteter SFs an den alten FAs wie postuliert durch (Lee *et al.*, 2010) sprechen oder für eine hoch effektive Rückfaltung beschädigter mechanosensitiver Proteine über das molekulare Chaperon-System (Hartl, 1996).

Es wurde vermutet, dass die vorherige Ausrichtung der Zellen vor Anwendung der Dehnung nur den Abbau von Proteinen in Zellen in Zugrichtung bewirken kann. Deswegen wurde die dauerhafte mechanische Belastung der biaxialen Dehnung angewandt.

Eine weitere Möglichkeit wäre hier die Vorausrichtung aller Zellen durch eine uniaxiale Dehnung und eine anschließende zweite Dehnung orthogonal zur ersten, wie in Abbildung 3.5 angewandt. Allerdings müsste in dem Fall ein vorheriger Abbau von AP-Proteinen bei der ersten Reorientierung berücksichtigt werden.

Bei einer biaxialen Dehnung kam es hingegen nicht zu einem Ausweichen des Aktins im Winkel minimaler Deformation wie bei der uniaxialen Dehnung (Faust *et al.*, 2011) (Abbildung 3.34), was durch die ständige Aufrechterhaltung des mechanischen Reizes zu erklären ist. Trotz nicht induzierter Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts wurde durch den mechanischen Reiz die Autophagie induziert (Abbildung 3.35).

Aus diesen Gründen wurde von einem ähnlichen Mechanismus des Abbaus wie bei der uniaxialen Dehnung ausgegangen. Im Gegensatz zu einer vorher festgestellten Depolymerisation des Aktin-Zytoskeletts bei biaxialer Dehnung bei einer Amplitude von zwölf Prozent (Lavagnino *et al.*, 2015) wurde keine Veränderung im Aktin-Zytoskelett der glatten Muskelzellen beobachtet (Abbildung 3.36).

Dies deutet auf die hohe mechanische Belastbarkeit der Zellen hin. Allerdings wurde in der zuvor genannten Untersuchung eine Frequenz von einem Hertz für zwei Stunden angewandt. Die glatten Muskelzellen zeigten nach einer Stunde biaxialer Dehnung zumindest eine verringerte Zellgröße und schwächere Adhäsionsstrukturen, was vermuten lässt, dass eine weitere Verstärkung der Dehnungsparameter die Ablösung der Zellen vom Substrat verursachen könnte. Ebenfalls eine Abnahme der Zellgröße konnte bei der biaxialen Dehnung von murinen Podozyten beobachtet werden (Endlich *et al.*, 2001). Ob diese Adaptation auf die biaxiale Dehnung ebenfalls nur über das Aktin-Zytoskelett vermittelt wird, wäre durch eine Inhibition von ROCK zu untersuchen und vermutlich äußerst aufschlussreich.

Der dauerhafte mechanische Stress der biaxialen Dehnung verursachte wie zuvor bei der uniaxialen Dehnung den Abbau der Proteine  $\alpha$ -Tubulin, Paxillin und LC3B-I und darüber hinaus den Abbau der mechanosensitiven Proteine Filamin A und Vinculin (Abbildung 3.37). Eine Abnahme der FAs konnte durch die Paxillin IF nach Dehnung ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 3.36).

Die signifikante Abnahme von Filamin A und Vinculin bei einer biaxialen Dehnung verstärkt die vorherige Annahme, dass die klassischen mechanosensitiven Proteine eine gewisse Kraft in eine gezielte Richtung überstehen können ohne irreversibel beschädigt zu werden. Dies könnte durch die Ausrichtung von Adhäsionsstrukturen in einem möglichst orthogonalen Winkel zur Dehnung (Greiner *et al.*, 2013) oder eine erhöhte Austauschdynamik der Proteine liegen (Sigaut *et al.*, 2018). Durch eine biaxiale Dehnung ist diese Ausrichtung nicht mehr möglich und macht die Beschädigung der Proteine somit unausweichlich.

## 5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte erstmalig eine Induktion von LC3B-positiven APs durch eine zyklische Dehnung in unterschiedlichen Zelltypen und Zelldichten bei einer gleichzeitigen Aktin Reorientierung entgegen zur Dehnungsrichtung untersucht werden. Zukünftig wird durch die Etablierung einer stabilen mCHERRY-LC3B Zelllinie die Quantifizierung der APs in Lebendzellanalysen unter Dehnung in einer zeitlich noch präziseren Analyse möglich sein. Die beiden dehnungsinduzierten, zellulären Prozesse wurden durch die Blockierung des lysosomalen Abbaus in einen direkten Zusammenhang gebracht.

Es wurde nicht nur die Reorientierung des Aktin-Zytoskeletts, sondern auch die des Zellkörpers und des Vimentin-Zytoskeletts durch die Blockierung des lysosomalen Abbaus der APs verlangsamt. Jedoch muss noch überprüft werden, ob die Strukturen auch nach Auflösung des Aktin-Zytoskeletts durch den blockierten Abbau in ihrer Reorientierung verzögert oder nur durch den Effekt beim Aktin-Zytoskelett nachfolgend verlangsamt werden.

Die Zelltyp-abhängigen Unterschiede in der Stärke und Geschwindigkeit der Aktin Reorientierung und der Induktion von APs konnte über die RhoA-induzierte Zellkontraktilität gemessen an SFs und FAs begründet werden. RhoA verstärkt die Aktin Reorientierung und die Anzahl an dehnungsinduzierten APs, während eine Inhibition von ROCK beides verhindert. Bei einer Abschwächung der Zellkontraktilität auf weicheren Substraten konnte sowohl eine Aktin Reorientierung als auch eine Induktion von APs beobachtet werden. Inwiefern sich die zeitlichen Verläufe auf weicheren Substraten verschieben, sollte noch untersucht werden. Ferner muss analysiert werden, warum die Kontraktilität der glatten Muskelzellen von einer LPA Induktion unabhängig zu sein scheint. Zu diesem Zweck müssen die weiteren Signalkaskaden zur Ausbildung von SFs und FAs inhibiert werden und die identischen Analysen erfolgen.

Zusätzlich konnte in dieser Arbeit der positive Einfluss des Co-Chaperons BAG3 auf die Aktin Reorientierung festgestellt werden und deutet auf eine dehnungsinduzierte, BAG3-abhängige Autophagie hin. Die Ergebnisse wurden sowohl durch eine Überexpression von nicht funktionalem BAG3 als auch durch BAG3-KO Zellen erzielt.

Ob BAG3 dehnungsinduziert die CASA oder bisher unbekannte selektive Autophagie-Abbauwege initiiert, muss genauer aufgeklärt werden. Ferner muss untersucht werden, ob alle

dehnungsinduzierten APs von BAG3 abhängen sind oder in den BAG3-KO Zellen unter Dehnung dennoch APs gebildet werden.

Bisher war zudem noch unklar, ob es bei einer zyklischen Dehnung überhaupt zu einem Abbau von Proteinen kommt. In dieser Arbeit wurde erstmalig der dehnungsinduzierte Abbau der Proteine Paxillin, LC3B-I und -II, HSC70 und  $\alpha$ -Tubulin nach einer längeren, zyklischen Dehnung festgestellt. Dieser Abbau war für die Proteine Paxillin, LC3B-II, HSC70 und  $\alpha$ -Tubulin geringer bei blockiertem lysosomalen Abbau. Diese Untersuchungen deuten auf Paxillin als weiteren Klienten der CASA hin.

Um den genauen Mechanismus des Abbaus von Paxillin in den glatten Muskelzellen unter zyklischer Dehnung zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen erfolgen. Zunächst sollten Analysen der Phosphorylierung und Ubiquitinierung von Paxillin unter Dehnung durchgeführt werden. Sollte eine der bekannten Phosphorylierungsstellen durch die mechanische Beanspruchung verstärkt phosphoryliert werden, können mittels *small interfering RNA* (siRNA) verschiedene Rezeptorproteine blockiert und anschließend der Abbau unter Dehnung analysiert werden. Alternativ können über Co-Immunpräzipitationen die am Abbau beteiligten Proteine ermittelt werden. Mit diesen Analysen könnte der mechanisch-induzierte Abbau von Paxillin über die Autophagie, der bisher nur in Tumorzellen detektiert worden ist, weiter bestätigt werden.

Um den mechanischen Stress in den Zellen aufrechtzuerhalten wurde eine biaxiale, zyklische Dehnung angewandt, bei der keine Aktin Reorientierung aber dennoch eine Induktion von APs festgestellt wurde. Warum die Anzahl an dehnungsinduzierten APs nicht dauerhaft aufrechterhalten werden kann, muss dabei noch aufgeklärt werden. Durch die biaxiale Dehnung konnte auch nach kurzer Dehnungsdauer ein Rückgang der Proteine Paxillin, LC3B-I und  $\alpha$ -Tubulin beobachtet werden. Weiterhin wurde eine Abnahme der Proteine Filamin A und Vinculin detektiert. Ob der Abbau der Proteine ebenfalls über Autophagie vermittelt wird, muss weiter analysiert werden.

Zu diesem Zweck wurde zum Ende dieser Arbeit die Konstruktion eines mehrfach biaxialen Stretchers eingeleitet, um die Probenanzahl zu erhöhen. Unter identischen Bedingungen wird parallel die Analyse bei blockiertem lysosomalen Abbau ermöglicht. Zusätzlich wären längere, biaxiale Dehnungen interessant, da die Beschädigung der Proteine mit steigender Dehnungsdauer zunehmen sollte.



---

## Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M., and Dunn, G.A. (1975). Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Experimental cell research* 92, 57-62.
- Abercrombie, M., Heaysman, J.E., and Pegrum, S.M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Experimental cell research* 67, 359-367.
- Ahmed, W.W., Kural, M.H., and Saif, T.A. (2010). A novel platform for in situ investigation of cells and tissues under mechanical strain. *Acta biomaterialia* 6, 2979-2990.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *The Journal of biological chemistry* 271, 20246-20249.
- Angulo-Urarte, A., van der Wal, T., and Huveneers, S. (2020). Cell-cell junctions as sensors and transducers of mechanical forces. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes* 1862, 183316.
- Arndt, V., Dick, N., Tawo, R., Dreiseidler, M., Wenzel, D., Hesse, M., Fürst, D.O., Saftig, P., Saint, R., Fleischmann, B.K., Hoch, M., and Höhfeld, J. (2010). Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Current biology : CB* 20, 143-148.
- Arrigo, A.P., Tanaka, K., Goldberg, A.L., and Welch, W.J. (1988). Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* 331, 192-194.
- Ashoor, R., Yafawi, R., Jessen, B., and Lu, S. (2013). The contribution of lysosomotropism to autophagy perturbation. *PloS one* 8, e82481.
- Atherton, P., Stutchbury, B., Jethwa, D., and Ballestrem, C. (2016). Mechanosensitive components of integrin adhesions: Role of vinculin. *Experimental cell research* 343, 21-27.
- Bakolitsa, C., Cohen, D.M., Bankston, L.A., Bobkov, A.A., Cadwell, G.W., Jennings, L., Critchley, D.R., Craig, S.W., and Liddington, R.C. (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* 430, 583-586.
- Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., and Geiger, B. (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature cell biology* 3, 466-472.
- Barna, J., Csermely, P., and Vellai, T. (2018). Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75, 2897-2916.
- Bays, J.L., Peng, X., Tolbert, C.E., Guilluy, C., Angell, A.E., Pan, Y., Superfine, R., Burrridge, K., and DeMali, K.A. (2014). Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell-cell and cell-matrix adhesions. *The Journal of cell biology* 205, 251-263.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological reviews* 84, 869-901.
- Belaid, A., Cerezo, M., Chargui, A., Corcelle-Termeau, E., Pedeutour, F., Giuliano, S., Ilie, M., Rubera, I., Tauc, M., Barale, S., Bertolotto, C., Brest, P., Vouret-Craviari, V., Klionsky, D.J., Carle, G.F., Hofman, P., and Mograbi, B. (2013). Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis, and genomic stability. *Cancer research* 73, 4311-4322.
- Boelens, W.C. (2020). Structural aspects of the human small heat shock proteins related to their functional activities. *Cell stress & chaperones* 25, 581-591.
- Brito, C., and Sousa, S. (2020). Non-Muscle Myosin 2A (NM2A): Structure, Regulation and Function. *Cells* 9.
- Bukoreshtliev, N.V., Haase, K., and Pelling, A.E. (2013). Mechanical cues in cellular signalling and

- 
- communication. *Cell and tissue research* 352, 77-94.
- Burridge, K., and Mangeat, P. (1984). An interaction between vinculin and talin. *Nature* 308, 744-746.
- Calderwood, D.A., and Ginsberg, M.H. (2003). Talin forges the links between integrins and actin. *Nature cell biology* 5, 694-697.
- Carisey, A., and Ballestrem, C. (2011). Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *European journal of cell biology* 90, 157-163.
- Carisey, A., Tsang, R., Greiner, A.M., Nijenhuis, N., Heath, N., Nazgiewicz, A., Kemkemer, R., Derby, B., Spatz, J., and Ballestrem, C. (2013). Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Current biology : CB* 23, 271-281.
- Chang, C.H., Bijian, K., Qiu, D., Su, J., Saad, A., Dahabieh, M.S., Miller, W.H., Jr., and Alaoui-Jamali, M.A. (2017). Endosomal sorting and c-Cbl targeting of paxillin to autophagosomes regulate cell-matrix adhesion turnover in human breast cancer cells. *Oncotarget* 8, 31199-31214.
- Chen, H.C., Appeddu, P.A., Parsons, J.T., Hildebrand, J.D., Schaller, M.D., and Guan, J.L. (1995). Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *The Journal of biological chemistry* 270, 16995-16999.
- Chen, Y.A., and Scheller, R.H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2, 98-106.
- Chien, S. (2007). Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 292, H1209-1224.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *The Journal of cell biology* 133, 1403-1415.
- Cingolani, L.A., and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature reviews. Neuroscience* 9, 344-356.
- Collier, M.P., and Benesch, J.L.P. (2020). Small heat-shock proteins and their role in mechanical stress. *Cell stress & chaperones* 25, 601-613.
- Collinsworth, A.M., Torgan, C.E., Nagda, S.N., Rajalingam, R.J., Kraus, W.E., and Truskey, G.A. (2000). Orientation and length of mammalian skeletal myocytes in response to a unidirectional stretch. *Cell and tissue research* 302, 243-251.
- Cramer, L.P., Siebert, M., and Mitchison, T.J. (1997). Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *The Journal of cell biology* 136, 1287-1305.
- Cristofani, R., Piccolella, M., Crippa, V., Tedesco, B., Montagnani Marelli, M., Poletti, A., and Moretti, R.M. (2021). The Role of HSPB8, a Component of the Chaperone-Assisted Selective Autophagy Machinery, in Cancer. *Cells* 10.
- Critchley, D.R., and Gingras, A.R. (2008). Talin at a glance. *Journal of cell science* 121, 1345-1347.
- Dartsch, P.C., and Betz, E. (1989). Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation. *Basic research in cardiology* 84, 268-281.
- Defilippi, P., Di Stefano, P., and Cabodi, S. (2006). p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends in cell biology* 16, 257-263.
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* 323, 638-641.
- Della Porta, A., Bornstein, K., Coye, A., Monrief, T., Long, B., and Parris, M.A. (2020). Acute chloroquine and hydroxychloroquine toxicity: A review for emergency clinicians. *The American journal of emergency medicine* 38, 2209-2217.
- DeMali, K.A., Barlow, C.A., and Burridge, K. (2002). Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin:

- coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *The Journal of cell biology* 159, 881-891.
- Deng, L., Fairbank, N.J., Fabry, B., Smith, P.G., and Maksym, G.N. (2004). Localized mechanical stress induces time-dependent actin cytoskeletal remodeling and stiffening in cultured airway smooth muscle cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 287, C440-448.
- Dikic, I., and Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19, 349-364.
- DiPaolo, B.C., and Margulies, S.S. (2012). Rho kinase signaling pathways during stretch in primary alveolar epithelia. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 302, L992-1002.
- Discher, D.E., Janmey, P., and Wang, Y.L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 310, 1139-1143.
- DuFort, C.C., Paszek, M.J., and Weaver, V.M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nature reviews. Molecular cell biology* 12, 308-319.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., and Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 474, 179-183.
- Efron, B., and Robert J. Tibshirani. (1994). *An introduction to the bootstrap*. CRC press.
- Ehrlicher, A.J., Nakamura, F., Hartwig, J.H., Weitz, D.A., and Stossel, T.P. (2011). Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature* 478, 260-263.
- Endlich, N., Kress, K.R., Reiser, J., Uttenweiler, D., Kriz, W., Mundel, P., and Endlich, K. (2001). Podocytes respond to mechanical stress in vitro. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 12, 413-422.
- Epstein, H.F., and Fischman, D.A. (1991). Molecular analysis of protein assembly in muscle development. *Science* 251, 1039-1044.
- Eytan, E., Ganoth, D., Armon, T., and Hershko, A. (1989). ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 7751-7755.
- Faust, O., Abayev-Avraham, M., Wentink, A.S., Maurer, M., Nillegoda, N.B., London, N., Bukau, B., and Rosenzweig, R. (2020). HSP40 proteins use class-specific regulation to drive HSP70 functional diversity. *Nature* 587, 489-494.
- Faust, U., Hampe, N., Rubner, W., Kirchgessner, N., Safran, S., Hoffmann, B., and Merkel, R. (2011). Cyclic stress at mHz frequencies aligns fibroblasts in direction of zero strain. *PloS one* 6, e28963.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell research* 24, 24-41.
- Fillingham, I., Gingras, A.R., Papagrigoriou, E., Patel, B., Emsley, J., Critchley, D.R., Roberts, G.C., and Barsukov, I.L. (2005). A vinculin binding domain from the talin rod unfolds to form a complex with the vinculin head. *Structure* 13, 65-74.
- Filomeni, G., De Zio, D., and Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell death and differentiation* 22, 377-388.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of cell science* 123, 4195-4200.
- Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified tissue international* 96, 183-195.
- Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T., and Ishiwata, S. (2002). Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nature cell biology* 4, 666-673.

- 
- Fürst, D.O., Goldfarb, L.G., Kley, R.A., Vorgerd, M., Olive, M., and van der Ven, P.F. (2013). Filamin C-related myopathies: pathology and mechanisms. *Acta neuropathologica* 125, 33-46.
- Gallant, N.D., Michael, K.E., and Garcia, A.J. (2005). Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Molecular biology of the cell* 16, 4329-4340.
- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Hartl, F.U., and Behl, C. (2009). Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *The EMBO journal* 28, 889-901.
- Gamerding, M., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Clement, A.M., and Behl, C. (2011). BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO reports* 12, 149-156.
- Gingras, A.R., Ziegler, W.H., Frank, R., Barsukov, I.L., Roberts, G.C., Critchley, D.R., and Emsley, J. (2005). Mapping and consensus sequence identification for multiple vinculin binding sites within the talin rod. *The Journal of biological chemistry* 280, 37217-37224.
- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., and Schwartz, M.A. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* 466, 263-266.
- Greiner, A.M., Chen, H., Spatz, J.P., and Kemkemer, R. (2013). Cyclic tensile strain controls cell shape and directs actin stress fiber formation and focal adhesion alignment in spreading cells. *PloS one* 8, e77328.
- Gurkar, A.U., Chu, K., Raj, L., Bouley, R., Lee, S.H., Kim, Y.B., Dunn, S.E., Mandinova, A., and Lee, S.W. (2013). Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nature communications* 4, 2189.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- Hartl, F.U. (2017). Protein Misfolding Diseases. *Annual review of biochemistry* 86, 21-26.
- Hartl, F.U., Bracher, A., and Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475, 324-332.
- Hattori, M., and Minato, N. (2003). Rap1 GTPase: functions, regulation, and malignancy. *Journal of biochemistry* 134, 479-484.
- Hayakawa, K., Hosokawa, A., Yabusaki, K., and Obinata, T. (2000). Orientation of Smooth Muscle-Derived A10 Cells in Culture by Cyclic Stretching: Relationship between Stress Fiber Rearrangement and Cell Reorientation. *Zoological science* 17, 617-624.
- Hayakawa, K., Sato, N., and Obinata, T. (2001). Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching. *Experimental cell research* 268, 104-114.
- Heissler, S.M., and Manstein, D.J. (2013). Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 1-21.
- Hemmings, L., Rees, D.J., Ohanian, V., Bolton, S.J., Gilmore, A.P., Patel, B., Priddle, H., Trevithick, J.E., Hynes, R.O., and Critchley, D.R. (1996). Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *Journal of cell science* 109 ( Pt 11), 2715-2726.
- Hipp, M.S., Kasturi, P., and Hartl, F.U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. *Nature reviews. Molecular cell biology* 20, 421-435.
- Hirata, H., Chiam, K.H., Lim, C.T., and Sokabe, M. (2014a). Actin flow and talin dynamics govern rigidity sensing in actin-integrin linkage through talin extension. *Journal of the Royal Society, Interface* 11.
- Hirata, H., Tatsumi, H., Lim, C.T., and Sokabe, M. (2014b). Force-dependent vinculin binding to talin in live cells: a crucial step in anchoring the actin cytoskeleton to focal adhesions. *American journal of physiology. Cell physiology* 306, C607-620.

- Hochstrasser, M. (1996). Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annual review of genetics* 30, 405-439.
- Höhfeld, J., Benzing, T., Bloch, W., Fürst, D.O., Gehlert, S., Hesse, M., Hoffmann, B., Hoppe, T., Huesgen, P.F., Kohn, M., Kolanus, W., Merkel, R., Niessen, C.M., Pokrzywa, W., Rinschen, M.M., Wachten, D., and Warscheid, B. (2021). Maintaining proteostasis under mechanical stress. *EMBO reports* 22, e52507.
- Huang, D.L., Bax, N.A., Buckley, C.D., Weis, W.I., and Dunn, A.R. (2017). Vinculin forms a directionally asymmetric catch bond with F-actin. *Science* 357, 703-706.
- Huang, Y., Day, R.N., and Gunst, S.J. (2014). Vinculin phosphorylation at Tyr1065 regulates vinculin conformation and tension development in airway smooth muscle tissues. *The Journal of biological chemistry* 289, 3677-3688.
- Humphrey, J.D., Dufresne, E.R., and Schwartz, M.A. (2014). Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 802-812.
- Humphries, J.D., Byron, A., and Humphries, M.J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science* 119, 3901-3903.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.
- Izzard, C.S., and Lochner, L.R. (1980). Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study. *Journal of cell science* 42, 81-116.
- Jähne, B. (2002). *Digital Image Processing*. Springer 5. Edition.
- Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* 9, 574-587.
- Jayaraj, G.G., Hipp, M.S., and Hartl, F.U. (2020). Functional Modules of the Proteostasis Network. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 12.
- Jeng, W., Lee, S., Sung, N., Lee, J., and Tsai, F.T. (2015). Molecular chaperones: guardians of the proteome in normal and disease states. *F1000Research* 4.
- Jensen, L.F., Bentzon, J.F., and Albarran-Juarez, J. (2021). The Phenotypic Responses of Vascular Smooth Muscle Cells Exposed to Mechanical Cues. *Cells* 10.
- Ji, C., Tang, M., Zeidler, C., Höhfeld, J., and Johnson, G.V. (2019). BAG3 and SYNPO (synaptopodin) facilitate phospho-MAPT/Tau degradation via autophagy in neuronal processes. *Autophagy* 15, 1199-1213.
- Ji, C.H., and Kwon, Y.T. (2017). Crosstalk and Interplay between the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Molecules and cells* 40, 441-449.
- Jungbauer, S., Gao, H., Spatz, J.P., and Kemkemer, R. (2008). Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates. *Biophysical journal* 95, 3470-3478.
- Kathage, B., Gehlert, S., Ulbricht, A., Ludecke, L., Tapia, V.E., Orfanos, Z., Wenzel, D., Bloch, W., Volkmer, R., Fleischmann, B.K., Fürst, D.O., and Höhfeld, J. (2017). The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1864, 62-75.
- Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2018). The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature reviews. Molecular cell biology* 19, 365-381.
- Kenific, C.M., Stehbens, S.J., Goldsmith, J., Leidal, A.M., Faure, N., Ye, J., Wittmann, T., and Debnath, J. (2016a). NBR1 enables autophagy-dependent focal adhesion turnover. *The Journal of cell biology* 212, 577-590.
- Kenific, C.M., Wittmann, T., and Debnath, J. (2016b). Autophagy in adhesion and migration. *Journal of cell science* 129, 3685-3693.

- 
- Khaitlina, S.Y. (2014). Intracellular transport based on actin polymerization. *Biochemistry. Biokhimiia* 79, 917-927.
- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C.L., Baldassarre, M., Wegener, K.L., Campbell, I.D., Ylanne, J., and Calderwood, D.A. (2006). The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Molecular cell* 21, 337-347.
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual review of biochemistry* 82, 323-355.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- Kimura, K., Ooms, A., Graf-Riesen, K., Kuppusamy, M., Unger, A., Schuld, J., Daerr, J., Lothar, A., Geisen, C., Hein, L., Takahashi, S., Li, G., Roll, W., Bloch, W., van der Ven, P.F.M., Linke, W.A., Wu, S.M., Huesgen, P.F., Höhfeld, J., Fürst, D.O., Fleischmann, B.K., and Hesse, M. (2021). Overexpression of human BAG3(P209L) in mice causes restrictive cardiomyopathy. *Nature communications* 12, 3575.
- King, J.S. (2012). Mechanical stress meets autophagy: potential implications for physiology and pathology. *Trends in molecular medicine* 18, 583-588.
- Kirchenbüchler, D., Born, S., Kirchgessner, N., Houben, S., Hoffmann, B., and Merkel, R. (2010). Substrate, focal adhesions, and actin filaments: a mechanical unit with a weak spot for mechanosensitive proteins. *Journal of physics. Condensed matter : an Institute of Physics journal* 22, 194109.
- Klaips, C.L., Jayaraj, G.G., and Hartl, F.U. (2018). Pathways of cellular proteostasis in aging and disease. *The Journal of cell biology* 217, 51-63.
- Klimek, C., Jahnke, R., Wordehoff, J., Kathage, B., Stadel, D., Behrends, C., Hergovich, A., and Höhfeld, J. (2019). The Hippo network kinase STK38 contributes to protein homeostasis by inhibiting BAG3-mediated autophagy. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research* 1866, 1556-1566.
- Klimek, C., Kathage, B., Wordehoff, J., and Höhfeld, J. (2017). BAG3-mediated proteostasis at a glance. *Journal of cell science* 130, 2781-2788.
- Klionsky, D.J., Petroni, G., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J.M., Cadwell, K., Cecconi, F., Choi, A.M.K., Choi, M.E., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.I., Cuervo, A.M., Deretic, V., Dikic, I., Elazar, Z., Eskelinen, E.L., Fimia, G.M., Gewirtz, D.A., Green, D.R., Hansen, M., Jaattela, M., Johansen, T., Juhasz, G., Karantza, V., Kraft, C., Kroemer, G., Ktistakis, N.T., Kumar, S., Lopez-Otin, C., Macleod, K.F., Madeo, F., Martinez, J., Melendez, A., Mizushima, N., Munz, C., Penninger, J.M., Perera, R.M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D.C., Ryan, K.M., Sadoshima, J., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, H.U., Simon, A.K., Simonsen, A., Stolz, A., Tavernarakis, N., Tooze, S.A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q., Galluzzi, L., and Pietrocola, F. (2021). Autophagy in major human diseases. *The EMBO journal* 40, e108863.
- Kong, F., Garcia, A.J., Mould, A.P., Humphries, M.J., and Zhu, C. (2009). Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *The Journal of cell biology* 185, 1275-1284.
- Korn, E.D. (1982). Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiological reviews* 62, 672-737.
- Kourtidis, A., Ngok, S.P., and Anastasiadis, P.Z. (2013). p120 catenin: an essential regulator of cadherin stability, adhesion-induced signaling, and cancer progression. *Progress in molecular biology and translational science* 116, 409-432.
- Kriz, W. (2006). *Biologie der Podozyten*. Springer Medizin 3/2006.
- Küpper, K., Lang, N., Möhl, C., Kirchgessner, N., Born, S., Goldmann, W.H., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2010). Tyrosine phosphorylation of vinculin at position 1065 modifies focal adhesion dynamics and cell tractions. *Biochemical and biophysical research communications* 399, 560-564.
- Langanger, G., Moeremans, M., Daneels, G., Sobieszek, A., De Brabander, M., and De Mey, J. (1986). The

- molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells. *The Journal of cell biology* 102, 200-209.
- Lange, S., Xiang, F., Yakovenko, A., Vihola, A., Hackman, P., Rostkova, E., Kristensen, J., Brandmeier, B., Franzen, G., Hedberg, B., Gunnarsson, L.G., Hughes, S.M., Marchand, S., Sejersen, T., Richard, I., Edstrom, L., Ehler, E., Udd, B., and Gautel, M. (2005). The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* 308, 1599-1603.
- Lavagnino, M., Gardner, K.L., and Arnoczky, S.P. (2015). High magnitude, in vitro, biaxial, cyclic tensile strain induces actin depolymerization in tendon cells. *Muscles, ligaments and tendons journal* 5, 124-128.
- Lawson, C., and Schlaepfer, D.D. (2012). Integrin adhesions: who's on first? What's on second? Connections between FAK and talin. *Cell adhesion & migration* 6, 302-306.
- Lazarides, E., and Burridge, K. (1975). Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell* 6, 289-298.
- Lee, C.F., Haase, C., Deguchi, S., and Kaunas, R. (2010). Cyclic stretch-induced stress fiber dynamics - dependence on strain rate, Rho-kinase and MLCK. *Biochemical and biophysical research communications* 401, 344-349.
- Lei, Z., Brizzee, C., and Johnson, G.V. (2015). BAG3 facilitates the clearance of endogenous tau in primary neurons. *Neurobiology of aging* 36, 241-248.
- Lekka, M., Gnanachandran, K., Kubiak, A., Zielinski, T., and Zemla, J. (2021). Traction force microscopy - Measuring the forces exerted by cells. *Micron* 150, 103138.
- Liu-Chittenden, Y., Huang, B., Shim, J.S., Chen, Q., Lee, S.J., Anders, R.A., Liu, J.O., and Pan, D. (2012). Genetic and pharmacological disruption of the TEAD-YAP complex suppresses the oncogenic activity of YAP. *Genes & development* 26, 1300-1305.
- Lu, C., Wu, F., Qiu, W., and Liu, R. (2013). P130Cas substrate domain is intrinsically disordered as characterized by single-molecule force measurements. *Biophysical chemistry* 180-181, 37-43.
- Lu, J., Linares, B., Xu, Z., and Rui, Y.N. (2021). Mechanisms of FA-Phagy, a New Form of Selective Autophagy/Organellophagy. *Frontiers in cell and developmental biology* 9, 799123.
- Mao, Z., and Nakamura, F. (2020). Structure and Function of Filamin C in the Muscle Z-Disc. *International journal of molecular sciences* 21.
- Martin, T.G., Myers, V.D., Dubey, P., Dubey, S., Perez, E., Moravec, C.S., Willis, M.S., Feldman, A.M., and Kirk, J.A. (2021). Cardiomyocyte contractile impairment in heart failure results from reduced BAG3-mediated sarcomeric protein turnover. *Nature communications* 12, 2942.
- Mauthe, M., Orhon, I., Rocchi, C., Zhou, X., Luhr, M., Hijlkema, K.J., Coppes, R.P., Engedal, N., Mari, M., and Reggiori, F. (2018). Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 14, 1435-1455.
- McGough, A., and Chiu, W. (1999). ADF/cofilin weakens lateral contacts in the actin filament. *Journal of molecular biology* 291, 513-519.
- McKeehan, W., and Hardesty, B. (1969). The mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in rabbit reticulocytes. *Biochemical and biophysical research communications* 36, 625-630.
- Merabova, N., Sariyer, I.K., Saribas, A.S., Knezevic, T., Gordon, J., Turco, M.C., Rosati, A., Weaver, M., Landry, J., and Khalili, K. (2015). WW domain of BAG3 is required for the induction of autophagy in glioma cells. *Journal of cellular physiology* 230, 831-841.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 56-68.
- Möhl, C., Kirchgessner, N., Schafer, C., Hoffmann, B., and Merkel, R. (2012). Quantitative mapping of averaged focal adhesion dynamics in migrating cells by shape normalization. *Journal of cell science*

- Möhl, C., Kirchgessner, N., Schafer, C., Küpper, K., Born, S., Diez, G., Goldmann, W.H., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2009). Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell motility and the cytoskeleton* 66, 350-364.
- Moore, A.S., Coscia, S.M., Simpson, C.L., Ortega, F.E., Wait, E.C., Heddleston, J.M., Nirschl, J.J., Obara, C.J., Guedes-Dias, P., Boecker, C.A., Chew, T.L., Theriot, J.A., Lippincott-Schwartz, J., and Holzbaur, E.L.F. (2021). Actin cables and comet tails organize mitochondrial networks in mitosis. *Nature* 591, 659-664.
- Morioka, M., Parameswaran, H., Naruse, K., Kondo, M., Sokabe, M., Hasegawa, Y., Suki, B., and Ito, S. (2011). Microtubule dynamics regulate cyclic stretch-induced cell alignment in human airway smooth muscle cells. *PloS one* 6, e26384.
- Nakamoto, T., Sakai, R., Honda, H., Ogawa, S., Ueno, H., Suzuki, T., Aizawa, S., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1997). Requirements for localization of p130cas to focal adhesions. *Molecular and cellular biology* 17, 3884-3897.
- Nakamura, F., Stossel, T.P., and Hartwig, J.H. (2011). The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell adhesion & migration* 5, 160-169.
- Neidlinger-Wilke, C., Galbusera, F., Pratsinis, H., Mavrogonatou, E., Mietsch, A., Kletsas, D., and Wilke, H.J. (2014). Mechanical loading of the intervertebral disc: from the macroscopic to the cellular level. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* 23 Suppl 3, S333-343.
- Niediek, V., Born, S., Hampe, N., Kirchgessner, N., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2012). Cyclic stretch induces reorientation of cells in a Src family kinase- and p130Cas-dependent manner. *European journal of cell biology* 91, 118-128.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.
- Noethel, B., Ramms, L., Dreissen, G., Hoffmann, M., Springer, R., Rubsam, M., Ziegler, W.H., Niessen, C.M., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2018). Transition of responsive mechanosensitive elements from focal adhesions to adherens junctions on epithelial differentiation. *Molecular biology of the cell* 29, 2317-2325.
- Orfanos, Z., Godderz, M.P., Soroka, E., Godderz, T., Rummyantseva, A., van der Ven, P.F., Hawke, T.J., and Fürst, D.O. (2016). Breaking sarcomeres by in vitro exercise. *Scientific reports* 6, 19614.
- Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., and Rosen, M.K. (2005). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* 433, 488-494.
- Paci, E., and Karplus, M. (1999). Forced unfolding of fibronectin type 3 modules: an analysis by biased molecular dynamics simulations. *Journal of molecular biology* 288, 441-459.
- Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 36, 451-477.
- Pouwels, J., Nevo, J., Pellinen, T., Ylanne, J., and Ivaska, J. (2012). Negative regulators of integrin activity. *Journal of cell science* 125, 3271-3280.
- Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2011). Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nature cell biology* 13, 1457-1465.
- Pring, M., Weber, A., and Bubb, M.R. (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* 31, 1827-1836.
- Rauch, J.N., and Gestwicki, J.E. (2014). Binding of human nucleotide exchange factors to heat shock

- protein 70 (Hsp70) generates functionally distinct complexes in vitro. *The Journal of biological chemistry* 289, 1402-1414.
- Rauch, J.N., Tse, E., Freilich, R., Mok, S.A., Makley, L.N., Southworth, D.R., and Gestwicki, J.E. (2017). BAG3 Is a Modular, Scaffolding Protein that physically Links Heat Shock Protein 70 (Hsp70) to the Small Heat Shock Proteins. *Journal of molecular biology* 429, 128-141.
- Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Rinschen, M.M., Godel, M., Grahammer, F., Zschiedrich, S., Helmstadter, M., Kretz, O., Zarei, M., Braun, D.A., Dittrich, S., Pahmeyer, C., Schroder, P., Teetzen, C., Gee, H., Daouk, G., Pohl, M., Kuhn, E., Schermer, B., Kuttner, V., Boerries, M., Busch, H., Schiffer, M., Bergmann, C., Kruger, M., Hildebrandt, F., Dengjel, J., Benzing, T., and Huber, T.B. (2018). A Multi-layered Quantitative In Vivo Expression Atlas of the Podocyte Unravels Kidney Disease Candidate Genes. *Cell reports* 23, 2495-2508.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *The Journal of cell biology* 153, 1175-1186.
- Rognoni, L., Most, T., Zoldak, G., and Rief, M. (2014). Force-dependent isomerization kinetics of a highly conserved proline switch modulates the mechanosensing region of filamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 5568-5573.
- Rognoni, L., Stigler, J., Pelz, B., Ylanne, J., and Rief, M. (2012). Dynamic force sensing of filamin revealed in single-molecule experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 19679-19684.
- Roperto, S., Russo, V., Rosati, A., Ceccarelli, D.M., Munday, J.S., Turco, M.C., and Roperto, F. (2018). Chaperone-assisted selective autophagy in healthy and papillomavirus-associated neoplastic urothelium of cattle. *Veterinary microbiology* 221, 134-142.
- Sahu, I., and Glickman, M.H. (2021). Proteasome in action: substrate degradation by the 26S proteasome. *Biochemical Society transactions* 49, 629-644.
- Saleem, M.A., O'Hare, M.J., Reiser, J., Coward, R.J., Inward, C.D., Farren, T., Xing, C.Y., Ni, L., Mathieson, P.W., and Mundel, P. (2002). A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 13, 630-638.
- Sato, M., and Ohashi, T. (2005). Biorheological views of endothelial cell responses to mechanical stimuli. *Biorheology* 42, 421-441.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M.P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015-1026.
- Schaefer, L., and Schaefer, R.M. (2010). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell and tissue research* 339, 237-246.
- Schaller, M.D. (2001). Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochimica et biophysica acta* 1540, 1-21.
- Schuck, S. (2020). Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *Journal of cell science* 133.
- Sharifi, M.N., Mowers, E.E., Drake, L.E., Collier, C., Chen, H., Zamora, M., Mui, S., and Macleod, K.F. (2016). Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell reports* 15, 1660-1672.
- Shattil, S.J., Kim, C., and Ginsberg, M.H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game.

- 
- Nature reviews. Molecular cell biology 11, 288-300.
- Sherman, M.Y., and Gabai, V. (2022). The role of Bag3 in cell signaling. *Journal of cellular biochemistry* 123, 43-53.
- Sigaut, L., von Bilderling, C., Bianchi, M., Burdisso, J.E., Gastaldi, L., and Pietrasanta, L.I. (2018). Live cell imaging reveals focal adhesions mechanoresponses in mammary epithelial cells under sustained equibiaxial stress. *Scientific reports* 8, 9788.
- Singh, B., and Bhaskar, S. (2019). Methods for Detection of Autophagy in Mammalian Cells. *Methods in molecular biology* 2045, 245-258.
- Smith, P.G., Garcia, R., and Kogerman, L. (1997). Strain reorganizes focal adhesions and cytoskeleton in cultured airway smooth muscle cells. *Experimental cell research* 232, 127-136.
- Smith, S.J., and McCann, R.O. (2007). A C-terminal dimerization motif is required for focal adhesion targeting of Talin1 and the interaction of the Talin1 I/LWEQ module with F-actin. *Biochemistry* 46, 10886-10898.
- Suzuki, T., Ueda, A., Kobayashi, N., Yang, J., Tomaru, K., Yamamoto, M., Takeno, M., and Ishigatsubo, Y. (2008). Proteasome-dependent degradation of alpha-catenin is regulated by interaction with ARMc8alpha. *The Biochemical journal* 411, 581-591.
- Svitkina, T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M., and Borisy, G.G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *The Journal of cell biology* 160, 409-421.
- Swaminathan, V., and Gloerich, M. (2021). Decoding mechanical cues by molecular mechanotransduction. *Current opinion in cell biology* 72, 72-80.
- Tanaka, K., Takeda, S., Mitsuoka, K., Oda, T., Kimura-Sakiyama, C., Maeda, Y., and Narita, A. (2018). Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly. *Nature communications* 9, 1860.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 2503-2518.
- Teckchandani, A., and Cooper, J.A. (2016). The ubiquitin-proteasome system regulates focal adhesions at the leading edge of migrating cells. *eLife* 5.
- Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *Journal of cell science* 125, 1855-1864.
- Tondon, A., Hsu, H.J., and Kaunas, R. (2012). Dependence of cyclic stretch-induced stress fiber reorientation on stretch waveform. *Journal of biomechanics* 45, 728-735.
- Turner, C.E. (1998). Paxillin. *The international journal of biochemistry & cell biology* 30, 955-959.
- Turner, C.E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nature cell biology* 2, E231-236.
- Turner, C.E., Glenney, J.R., Jr., and Burrige, K. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *The Journal of cell biology* 111, 1059-1068.
- Twiss, F., and de Rooij, J. (2013). Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 4101-4116.
- Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., and Narumiya, S. (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389, 990-994.
- Ulbricht, A., Eppler, F.J., Tapia, V.E., van der Ven, P.F., Hampe, N., Hersch, N., Vakeel, P., Stadel, D., Haas, A., Saftig, P., Behrends, C., Fürst, D.O., Volkmer, R., Hoffmann, B., Kolanus, W., and Höfeld, J. (2013). Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy.

- Current biology : CB 23, 430-435.
- Ulbricht, A., Gehlert, S., Leciejewski, B., Schiffer, T., Bloch, W., and Höhfeld, J. (2015). Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle. *Autophagy* 11, 538-546.
- Ulbricht, A., and Höhfeld, J. (2013). Tension-induced autophagy: may the chaperone be with you. *Autophagy* 9, 920-922.
- van Roy, F., and Berx, G. (2008). The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65, 3756-3788.
- Wang, H.Q., Liu, H.M., Zhang, H.Y., Guan, Y., and Du, Z.X. (2008). Transcriptional upregulation of BAG3 upon proteasome inhibition. *Biochemical and biophysical research communications* 365, 381-385.
- Wang, J.H., and Thampatty, B.P. (2006). An introductory review of cell mechanobiology. *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 5, 1-16.
- Wang, K., Ash, J.F., and Singer, S.J. (1975). Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 4483-4486.
- Wang, Y., and Qin, Z.H. (2013). Coordination of autophagy with other cellular activities. *Acta pharmacologica Sinica* 34, 585-594.
- Wang, Z., and Wang, W.Z.C.X.F.W.C.M.N.L.E.S.T.a.X. (2019). Geometric anisotropy on biomaterials surface for vascular scaffold design: engineering and biological advances. *J. Phys. Mater.*
- Weber, K., and Groeschel-Stewart, U. (1974). Antibody to myosin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 4561-4564.
- Wegner, A., and Engel, J. (1975). Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophysical chemistry* 3, 215-225.
- Wiggin, O., Shaw, A.E., DeLuca, J.G., and Bamburg, J.R. (2012). ADF/cofilin regulates actomyosin assembly through competitive inhibition of myosin II binding to F-actin. *Developmental cell* 22, 530-543.
- Wilkinson, D.S., Jariwala, J.S., Anderson, E., Mitra, K., Meisenhelder, J., Chang, J.T., Ideker, T., Hunter, T., Nizet, V., Dillin, A., and Hansen, M. (2015). Phosphorylation of LC3 by the Hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy. *Molecular cell* 57, 55-68.
- Wolfenson, H., Yang, B., and Sheetz, M.P. (2019). Steps in Mechanotransduction Pathways that Control Cell Morphology. *Annual review of physiology* 81, 585-605.
- Wong, A.J., Pollard, T.D., and Herman, I.M. (1983). Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science* 219, 867-869.
- Xiang, S.Y., Dusaban, S.S., and Brown, J.H. (2013). Lysophospholipid receptor activation of RhoA and lipid signaling pathways. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 213-222.
- Yang, C., and Wang, X. (2021). Lysosome biogenesis: Regulation and functions. *The Journal of cell biology* 220.
- Yao, M., Goult, B.T., Chen, H., Cong, P., Sheetz, M.P., and Yan, J. (2014). Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation. *Scientific reports* 4, 4610.
- Yao, M., Goult, B.T., Klapholz, B., Hu, X., Toseland, C.P., Guo, Y., Cong, P., Sheetz, M.P., and Yan, J. (2016). The mechanical response of talin. *Nature communications* 7, 11966.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., and Shibata, M. (2010). alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature cell biology* 12, 533-542.

- 
- Yoshigi, M., Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Yost, H.J., and Beckerle, M.C. (2005). Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *The Journal of cell biology* 171, 209-215.
- Yusko, E.C., and Asbury, C.L. (2014). Force is a signal that cells cannot ignore. *Molecular biology of the cell* 25, 3717-3725.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature cell biology* 9, 858-867.
- Zamir, E., and Geiger, B. (2001). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science* 114, 3583-3590.
- Zielinski, A., Linnartz, C., Pleschka, C., Dreissen, G., Springer, R., Merkel, R., and Hoffmann, B. (2018). Reorientation dynamics and structural interdependencies of actin, microtubules and intermediate filaments upon cyclic stretch application. *Cytoskeleton* 75, 385-394.

## Publikationen und Kongressbeiträge

### Akzeptierte Publikationen:

L. Lövenich, G. Dreissen, C. Hoffmann, J. Konrad, R. Springer, J. Höfeld, R. Merkel und B. Hoffmann. *Strain-induced mechanoresponse depends on cell contractility and BAG3-mediated autophagy* (2021). *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 32, No. 20. DOI: 10.1091/mbc.E21-05-0254

### Geplante Publikationen:

S. Tarazi, G. Dreissen, J.-A. Abraham, M. Hoffmann, S. Gerlach, L. Lövenich, R. Springer, R. Scharr, R. Merkel, und B. Hoffmann. *Functional resistance of neuronal networks against strain*.

### Kongressbeiträge:

L. Lövenich, M. Kuppusamy, P. Huesgen, J. Höfeld, R. Merkel und B. Hoffmann. *Strain-induced mechanoresponse depends on cell contractility and BAG3-mediated autophagy* (2021). Poster Internationale Konferenz *Mechanical Stress Protection* (FOR2743).

M. Kuppusamy, L. Lövenich, B. Hoffmann, R. Merkel und P. Huesgen. *The fate of mechanosensitive proteins – Protein dynamics under mechanical stress*. Poster Internationale Konferenz *Mechanical Stress Protection* (FOR2743).



## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Rudolf Merkel für die Möglichkeit bedanken an Seinem Institut meine Doktorarbeit anfertigen zu dürfen. Vielen Dank für Ihre Unterstützung in unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen und Vorträgen, Ihre hilfreichen Ratschläge und Ihr Vertrauen.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater PD Dr. Bernd Hoffmann für die großartige Betreuung dieser Arbeit. Ich danke Dir für dein Vertrauen in mich, die unzähligen wissenschaftlichen Besprechungen und Diskussionen, Deine Ratschläge und Ideen und Deine Motivationen, wenn es mal nicht so lief wie erhofft. Durch Dich habe ich unglaublich viel gelernt und Du hast mich bei allen Vorschlägen und Ideen unterstützt und diese Arbeit damit unglaublich vorangetrieben.

Ich danke Prof. Dr. Jörg Höhfeld für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und die exzellente Leitung der Forschergruppe *Mechanical Stress Protection* (FOR2743). Deine Ratschläge und Ideen haben diese Arbeit in vielen Diskussionen und Besprechungen ebenfalls stets vorangebracht.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei den zahlreichen Kooperationspartnern und Mitgliedern der Forschergruppe *Mechanical Stress Protection* (FOR2743) für die Ratschläge und Unterstützung dieses Projekts. Ein besonderer Dank geht dabei an Prof. Dr. Dieter Fürst, Prof. Dr. Carien Niessen, Prof. Dr. Terje Johansen, Prof. Dr. Thomas Benzing, Prof. Dr. Dagmar Wachten sowie Dr. Ingo Plagmann und Philipp Leyendecker.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Prof. Dr. Pitter Huesgen und Maithreyan Kuppusamy für die gute Zusammenarbeit in unseren Projekten sowie allen Besprechungen und Diskussionen bedanken.

Vielen Dank auch an Georg Dreissen und Dr. Ronald Springer für eure Unterstützung bei allen Auswertungen sowie an Jens Konrad für die Hilfe mit den *Stretchern* und allen sonstigen technischen Fragen. Vielen Dank an Julian und Robin für den Austausch untereinander, die gemeinsamen Pausen und die gegenseitige Motivation. Ich danke Jonathan Mayr und Schinya Ibrahim für die Mitarbeit an diesem Projekt und das Vertrauen eure Bachelor- und Masterarbeit

---

mit betreuen zu dürfen. Weiterhin danke ich allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts IBI-2 Mechanobiologie für die Zusammenarbeit und die tolle Atmosphäre.

Der größte Dank geht an meine Familie und ganz besonders an meine Eltern, ohne die dieser Weg niemals möglich gewesen wäre. Ihr habt mich immer bei allem unterstützt und gefördert und ohne euch hätte ich es niemals hierhin geschafft. Auch wenn ich das nicht immer zu schätzen vermocht habe, möchte ich euch meinen allergrößten Dank aussprechen!

