

BIOMECHANISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES ZYTOSKELETTS  
FÜR DIE MECHANISCHE ANISOTROPIE UND DEHNBARKEIT VON  
MONOLAGEN EPITHELIALER ZELLEN

Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
eingereichte

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktor Rerum Naturalium  
Dr. rer. nat.

vorgelegt von

**DAVE AHRENS**

geboren in  
Aschersleben

Bonn, 2019



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

Erstgutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel  
Zweitgutachter: Prof. Dr. Moritz Sokolowski

Tag der Disputation: 22.07.2019  
Erscheinungsjahr: 2019



Für meine Familie



### BIOMECHANISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DES ZYTOSKELETTS FÜR DIE MECHANISCHE ANISOTROPIE UND DEHNBARKEIT VON MONOLAGEN EPITHELIALER ZELLEN

Die Haut ist eines der faszinierendsten Organe des menschlichen Körpers. Kenntnisse über ihre mechanischen Eigenschaften sind insbesondere in der Medizin von hoher Relevanz, wie z.B. während chirurgischer Eingriffe oder bei Hauttransplantationen. Obwohl die mechanischen Eigenschaften der Haut bereits lange Forschungsgegenstand waren, sind die dahinter stehenden molekularen Mechanismen kaum bekannt. Aus diesem Grund beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit einzelnen Hautschichten, Monolagen von Keratinozyten, welche mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie Studien der intrazellulären Strukturen ermöglichen. Zellmonolagen stellen dabei das einfachste multizelluläre Gewebe dar, an dem sich die Wechselwirkungen von Zellen u.a. anhand der interzellulären Verbindungen, wie Adherens Junctions und Desmosomen, untersuchen lassen. Sie ermöglichen außerdem eine explizite Manipulation des Zytoskeletts, einem komplexen, hochadaptiven System das maßgeblich den Zellen Form und mechanische Stabilität verleiht. Das Zytoskelett setzt sich aus drei filamentösen Netzwerken zusammen, die sich in ihren Eigenschaften ergänzen und miteinander wechselwirken können.

In dieser Arbeit wurde das Wechselspiel der mechanischen Eigenschaften epithelialer Monolagen mit der Organisation dieser zytoskellalen Untersysteme analysiert. Der dazu verwendete Ansatz basiert auf elastischen Silikonkautschukkamern, in denen eine physiologische Kultivierung von Zellmonolagen möglich ist. Diese Kammern sind über einen weiten Bereich linear elastisch und können mit Hilfe einer speziell dazu angefertigten Apparatur Mikrometer-genau gedehnt werden.

Weiterhin wurde ein zyklisches Dehnungsprotokoll verwendet, mit Hilfe dessen die auf den Kammern befindlichen Zellen entlang einer Achse senkrecht zur Dehnungsrichtung ausgerichtet werden können. Insbesondere wurde dadurch auch das Aktinzytoskelett der Zellen entlang derselben Achse ausgerichtet, womit ein biologisches Material mit veränderten mechanischen Eigenschaften erzeugt werden konnte. Einer der Schwerpunkte der Arbeit lag dabei auf der Kontraktilität und der Bruchdehnung dieser ausgerichteten Zellmonolagen, wobei ein mechanisch stark anisotropes Verhalten der Monolagen herausgearbeitet werden konnte. Insbesondere konnte dabei gezeigt werden, dass die von den Monolagen generierten Kräfte in Ausrichtungsrichtung um eine Größenordnung höher sind als senkrecht dazu. Auch der Einfluss der zellulären Ausrichtung für die Bruchdehnung der Monolagen konnte mit diesem System bestimmt werden. Diese war entlang

der zellulären Ausrichtungsrichtung signifikant kleiner als senkrecht dazu, wodurch eine weitere stark anisotrope Eigenschaft in ausgerichteten Zellschichten nachgewiesen werden konnte.

In einer weiteren Experimentreihe wurde der Einfluss der Keratine, einem weiteren zytoskeletalen Netzwerk, auf die Steifigkeit der Monolagen unter Dehnung untersucht. Obwohl Keratine einen Proteinanteil in Epithelien von bis zu 85% ausmachen können, bleiben ihre Funktionen in Zellen bisher weitestgehend ungeklärt. Daher wurden hier vergleichende Experimente einer Keratin-freien Keratinozyten-Zelllinie mit ihrem zugehörigen Wildtyp durchgeführt. Diese Keratin-knock-out Mutante wurde von der AG Magin (Leipzig) etabliert. Für die Analysen wurde ein neuer kombinierter Ansatz aus einem Rasterkraftmikroskop, einem Zellstretcher und einem Lichtmikroskop verwendet. Mit diesem war es möglich, Zellen bis zu 50% zu dehnen und durch lokale Mikroindentationen mechanisch zu analysieren. Insbesondere konnten damit die gleichen Zellen, die zuvor im relaxierten Zustand untersucht wurden, nach der Dehnung wiedergefunden werden. Damit konnte der Anstieg der Steifigkeiten einzelner Zellen ermittelt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Keratinozytenmonolagen sowohl bei 25% als auch bei 50% Dehnung signifikant versteifen. Um den Einfluss der Keratine auf das Verhalten der Monolagen unter Dehnung zu untersuchen, wurden diese Messungen mit der Keratin-freien Mutante wiederholt. Dabei reagierte die Keratin-KO-Mutante mit einer verringerten Versteifung unter Dehnung.

# INHALTSVERZEICHNIS

---

1	EINLEITUNG	1
1.1	Zytoskeletale Netzwerke	2
1.1.1	Aktinfilamente	3
1.1.2	Intermediärfilamente	6
1.1.3	Mikrotubuli	8
1.1.4	Mechanik der Biofilamente	9
1.2	Zelluläre Adhäsion	11
1.2.1	Interzelluläre Verbindungen	11
1.2.2	Zell-Matrix Adhäsion	14
1.3	Multizelluläre Gewebe	16
1.3.1	Aufbau der Epidermis	16
1.3.2	Mechanik von Zellen und Zellgewebe	19
1.4	Zielsetzung	20
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	23
2.1	Mikroskopietechniken	23
2.1.1	Kontrastverfahren	23
2.1.2	Rasterkraftmikroskopie	24
2.2	Berechnung der geometrischen Momente	29
3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Zellsubstrate	33
3.1.1	Herstellung und Aufbau der Kammern	33
3.1.2	Kalibration der lokal ankommenden Dehnung	37
3.2	Zellkultur	38
3.2.1	Differenzierung muriner Keratinozyten	38
3.2.2	Keratinozyten mit mutierten Keratinnetzwerken	39
3.2.3	Zellkulturprotokolle	40
3.3	Aufbau und Anpassungen der Stretchersysteme	41
3.3.1	Sechsfach-Stretcher	43
3.3.2	Einfach-Stretcher	43
3.3.3	Stretcher für Rasterkraftmikroskopie	44
3.4	Experimentmethoden	46
3.4.1	Kontraktilitätsanalysen	46
3.4.2	Ablationsexperimente	48
3.4.3	Streckfestigkeitsanalysen	50
3.4.4	Kraftspektroskopische Analysen	52

3.5	Materiallisten . . . . .	55
3.5.1	Puffer und Zellkulturmedien . . . . .	58
3.5.2	Antikörper und Farbstoffe . . . . .	61
3.6	Statistische Analysen . . . . .	62
4	ERGEBNISSE . . . . .	63
4.1	Anpassungen und Kalibration der Elastomerkammern . . . . .	63
4.1.1	Optimierung des Kammermaterials . . . . .	64
4.1.2	Kalibration der lokaler Dehnung . . . . .	65
4.1.3	Ermittlung der Verschiebungen auf der Kammeroberfläche . . . . .	66
4.1.4	Strukturierung der Zellmonolagen . . . . .	68
4.2	Reifung der Adhärenzverbindungen . . . . .	68
4.2.1	Analyse der Kontraktilität von Zellmonolagen . . . . .	69
4.2.2	Untersuchung der Kontraktilität in Abhängigkeit der Differenzierung der Adhärenzverbindungen . . . . .	72
4.2.3	Immunzytochemische Untersuchungen des Zytoskeletts und der Adhärenzverbindungen . . . . .	73
4.3	Anisotrope Effekte zellulärer Ausrichtung . . . . .	75
4.3.1	Generierung Anisotroper Zellmonolagen . . . . .	75
4.3.2	Einfluss der Aktinfilamentreorientierung auf die Kontraktilität . . . . .	77
4.3.3	Einfluss zellulärer Ausrichtung auf die Generierung Monolagen inhärenter Spannungen . . . . .	80
4.4	Morphologische Untersuchungen epithelialer Zellmonolagen unter Dehnung . . . . .	82
4.4.1	Test auf Widerstandsfähigkeit gegenüber hoher Dehnungen . . . . .	82
4.4.2	Keratine beeinflussen das Verhalten der Adhärenzverbindungen unter Dehnung . . . . .	85
4.5	Keratine - mechanischer Puffer der Zelle . . . . .	90
4.5.1	Anpassungen des Zellstretchers . . . . .	90
4.5.2	Optimierung der Parameter für die kraftspektroskopischen Messungen . . . . .	90
4.5.3	Versteifung epithelialer Monolagen unter Dehnung ist Keratinabhängig . . . . .	97
4.5.4	Bestimmung der effektiven Steifigkeit . . . . .	99
5	DISKUSSION . . . . .	101
5.1	Einordnung der Adhärenzverbindungen . . . . .	102
5.2	Kontraktilität anisotroper Zellmonolagen . . . . .	104
5.3	Transzelluläre Kraftübertragung in epithelialen Monolagen . . . . .	106
5.4	Dehnbarkeit ausgerichteter Zellmonolagen . . . . .	107
5.5	Kombination eines Rasterkraftmikroskops mit einem Zellstretcher . . . . .	108
5.6	Limitierungen der Anpassungsmodelle . . . . .	110
5.7	Einfluss der Keratine auf das Verhalten von Zellmonolagen unter Dehnung . . . . .	111

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	115
LITERATUR	117



## EINLEITUNG

---

Die Haut stellte die erste und wichtigste Schutzbarriere des Organismus vor äußeren Einflüssen dar. Besonders Kenntnisse über ihre mechanischen Eigenschaften wie ihre Dehnbarkeit oder die Verteilung der mechanischen Spannungen sind von hoher Relevanz für Wissenschaft und Medizin. Mechanische Spannung ist eine natürliche Eigenschaft der Haut, die erstmals vom französischen Chirurgen Guillaume Dupuytren im Jahr 1834 untersucht wurde. Seit dem sind über 30 von Chirurgen entwickelte Richtlinien zur Auswahl entsprechender Spannungslinien der Haut für operative Eingriffe bekannt (Wilhelmi et al., 1999). Die Kenntnis anisotroper Spannungsverteilungen der Haut spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Minimierung von Narbengewebe. Insbesondere für Transplantationen sind Kenntnisse über die physiologischen Bereiche mechanischer Belastungen der Haut essentiell. Weiterhin ermöglicht die einzigartige Anpassungsfähigkeit der Haut an mechanische Dehnungen erst eine normale Entwicklung des Organismus. Man bedenke allein die enormen Anpassungen der Haut am Bauch während einer Schwangerschaft.

Eine Vielzahl dieser Eigenschaften kann auf das komplexe Zusammenspiel einzelner Zellen zurückgeführt werden. Die Verbindungen zwischen Zellen in epithelialen Geweben entstehen dabei aus einem diffizilen, streng regulierten Zusammenspiel zytoskeletaler Proteine und zellulärer Adhäsionskomplexe. Obwohl viel über die biologischen Mechanismen dahinter bekannt ist, verbleiben die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften auf zellulärer Ebene weitestgehend unerforscht. Einer der Gründe dafür ist der Mangel an nicht-invasiven Methoden, die sowohl eine gezielte Manipulation auf zellulärer und subzellulärer Ebene als auch mechanische Analysen auf Gewebe-Ebene erlauben. Nicht zuletzt geht das höhere Level an Komplexität auch mit einer immer schwieriger werdenden Abstraktion der biologischen Systeme einher.

Das mechanische Gerüst der Zellen stellt das Zytoskelett mit seinen drei Untersystemen, den Aktinfilamenten, Intermediärfilamenten und Mikrotubuli, dar. Diese hochdynamischen Polymersysteme können miteinander synergistisch wechselwirken und bilden so ein vielschichtiges biologisches Material mit einzigartigen Merkmalen.

Zum Verständnis der komplexen, rheologischen Eigenschaften von Zellen, wie der Versteifung unter Dehnung (Janmey et al., 1991, Wang et al., 2002, Fernández et al., 2006), glasähnlichem Verhalten (Fabry et al., 2001, Desprat et al., 2005) oder Dehnungsinduzierte Fluidisierung (Treat et al. (2007)), ist eine Vielfalt experimenteller Techniken erforderlich, mit denen die verschiedenen Bereiche der Zelle zugänglich gemacht und

untersucht werden können. Ein Großteil dieser Techniken basiert auf der Analyse mechanischer Deformationen als Reaktion auf eine externe Krafteinwirkung. Dazu gehören beispielsweise Rasterkraftmikroskopie (Radmacher et al., 1992, Radmacher et al., 1996), optische Pinzetten (Henon et al., 1999, Raucher und Sheetz, 1999, Betz et al., 2009), magnetische Pinzetten (Wang et al., 1993, Bausch et al., 1999, Alenghat et al., 2000) und Mikrokugeln (Bursac et al., 2005, Hoffman et al., 2006, Matthews et al., 2006), oder die Aspiration von Zellen mittels Mikropipetten (Evans und Yeung, 1989, Tran-Son-Tay et al., 1991). In weiteren Studien wurden zelluläre Reaktionen auf mechanische Dehnung analysiert, wie z.B. Untersuchungen von Endothelzellmonolagen in Suspension (Harris et al., 2012), isolierten Zellen in einem optischen Stretcher (Guck et al., 2001, Guck et al., 2005) oder auf dehnbaren Substraten ausplattierte Zellen (Sawada et al., 2001, Kaunas et al., 2005, Jungbauer et al., 2008, Faust et al., 2011). Aus diesen Experimente geht ein klarer Hinweis auf die essentielle Abhängigkeit der Zellmechanik von mechanischer Dehnung hervor.

Eine besondere Herausforderung bei dieser Art von Experimenten ist die Wahl eines geeigneten Levels an Abstraktion, nach dem das Modellsystem ausgesucht wird und welches anschließend unter möglichst physiologischen Bedingungen analysiert werden kann. Der dabei geschlossene Kompromiss zwischen der Zugänglichkeit des Modells und der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den lebenden Organismus spiegelt die dabei auftretende Problematik wieder. Bisher fanden die mechanischen Untersuchungen des Zytoskelett vor allem *in vitro* anhand einzelner Biopolymere (Kreplak et al., 2005, Block et al., 2017) und -netzwerke (Janmey et al., 1991, Vahabi et al., 2016) statt oder im Kontext lebender Zellen mittels Depolymerisation zytoskellentaler Bestandteile (Lulevich et al., 2010, Gavara et al., 2006) oder Veränderungen des genetischen Hintergrundes (Seltmann et al., 2013, Mendez et al., 2014). Diese Versuche unterstreichen dabei die Rolle zytoskellentaler Filamente für die mechanischen Eigenschaften biologischer Proben.

### 1.1 ZYTOSKELLETALE NETZWERKE

Entscheidend für die Mechanik der Zellen ist das Zytoskelett, das zusammen mit einer Vielzahl von Motorproteine und Kreuzvernetzer das mechanische Gerüst von Zellen und Geweben darstellt. Die Hauptkomponenten des Zytoskeletts sind Netzwerke, deren Zusammenspiel von einer einzigartigen Dynamik geprägt ist. Sie bestehen aus Polymeren, die ihre Eigenschaften bestimmen. Charakteristisch für Polymere ist die Verknüpfung von Proteinen über nicht-kovalente Bindungen zu einer Kette. Dadurch ist es Zellen möglich, über Polymerisation und Depolymerisation ihr Zytoskelett effizient und zielgerichtet den äußeren Anforderungen anpassen (Boal, 2002). Im Zusammenspiel mit Signal- und Adapterproteinen sind diese Biopolymernetzwerke in der Lage wichtige Funktionen wie

Polarisation, Migration oder Separation der Chromosomensätze während der Zellteilung zu übernehmen (Alberts et al., 2002).

### 1.1.1 Aktinfilamente

Aktinfilamente (AF) bestehen dem Namen nach hauptsächlich aus Aktin und besitzen mit 5 bis 9 nm den kleinsten Durchmesser zytoskellertaler Filamente, weshalb sie häufig auch als Mikrofilamente bezeichnet werden. Zusammen mit dem Motorprotein Myosin bilden Aktinfilamente das Aktin-Myosin-System, welches Muskelkontraktion, intrazellulären Transport und Generierung mechanischer Spannungen z.B. während der Migration ermöglicht. Mithilfe einer Vielzahl von Schlüsselproteinen übernehmen AF weitere wichtige Aktivitäten wie Proliferation, Sekretion und Lipid-Synthese (Alberts et al., 2002).

AF können sich nach drei Ordnungsprinzipien in Zellen organisieren. Sie bilden Gel-artige, dichte Netzwerke unterhalb der Zellmembran (Aktinkortex), kommen als Parallelbündel in Mikrospeikes und Filopodien<sup>1</sup> vor oder können auch als kontraktile Filamentbündel (Stressfasern), die mit dem Zellsubstrat verbunden sind, ausgebildet werden (siehe auch [Abbildung 1.1](#)). Wie diese teils sehr verschiedenen Anordnungen von größtenteils gleichartigen AF generiert und stabilisiert werden können ist nicht vollständig bekannt. Es lässt sich jedoch mit hoher Sicherheit sagen, dass die Bündelungsproteine  $\alpha$ -Actinin und Fimbrin sowie das Gel-bildende Protein Filamin eine entscheidende Rolle spielen. Dabei wird vermutet, dass  $\alpha$ -Actinin für die Bildung von Stressfasern und Fimbrin für die Quervernetzung von AF in Filopodien ist. Filamin kann zwei sich überkreuzende AF verflechten, wodurch sich ein lockeres, viskoses Netzwerk bildet (Alberts et al., 2002). Dieses Geflecht bildet das mechanische Gerüst der Plasmamembran und ist Kernelement der Endozytose (Aufnahme externer Elemente).

Aktin-Typen in Säugergewebe können in drei Klassen unterteilt werden.  $\alpha$ -Aktine kommen in Skelettmuskeln und der glatten Muskulatur sowie den Herzmuskelzellen vor.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktine wurden als Bestandteile des Zytoskeletts gefunden, wobei  $\gamma$ -Aktine auch in der glatten Muskulatur auftauchen. Wie in Experimenten nachgewiesen werden konnte, unterscheiden sich die einzelnen Aktin-Typen *in vitro* kaum in ihren Eigenschaften (Alberts et al., 2002).

F-Aktin besitzt eine funktionale Polarität mit einem schnell wachsenden (+)- und einem langsam wachsenden (–)-Ende. Da die F-Aktin-Myosin-Komplexe in ihrer Form an Pfeilspitzen erinnern, wird das (–)-Ende häufig auch als *spitzes* und das (+)-Ende auch als *stumpfes* Ende bezeichnet. Untereinheit der AF ist globuläres Aktin (G-Aktin), welches in filamentöses Aktin (F-Aktin) polymerisieren kann und dabei eine doppel-

---

<sup>1</sup> Finger-ähnliche Ausläufer der Zelle

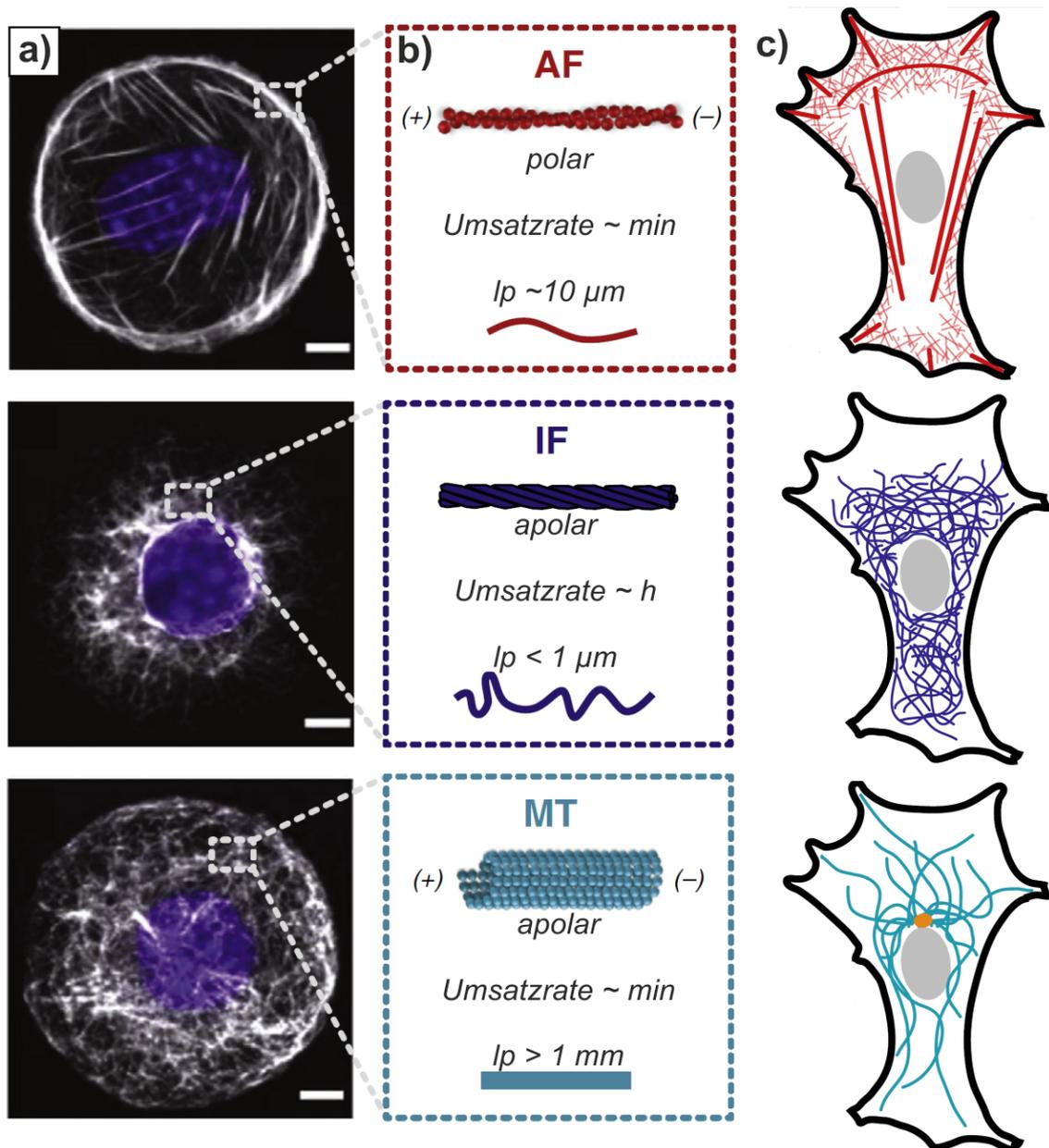


Abbildung 1.1: Vergleich der räumlichen Aufteilung zytoskeletaler Netzwerke: a) Immunfärbungen der jeweiligen Komponenten (*Filamente weiß, Zellkerne blau*) in NIH/3T3-Zellen. b) Die Biopolymere unterscheiden sich in ihrer Polarität, Umsatzrate und Persistenzlänge ( $l_p$ ). c) Schematische Darstellung der Filamente innerhalb der Zelle. Die Maßstabsbalken entsprechen 5  $\mu\text{m}$ . Abbildung aus Shabbir et al., 2014 (a) und Huber et al., 2015 (b und c)

helikale Struktur ausbildet (Holmes et al., 1990, siehe auch [Abbildung 1.2](#)). G-Aktin weist eine Bindungsstelle für ATP auf, die essenziell für die Polymerisation ist. Diese findet bevorzugt am Plusende der Filamente statt, wobei ATP von polymerisierten Aktin-Molekülen dephosphoryliert wird bis der Großteil des Filaments aus ADP-Aktin besteht. Bei der so genannten kritischen Konzentration  $C_k$  sind die Auf- ( $k_{\text{auf}}$ ) und Abbauraten

( $k_{ab}$ ) ausbalanciert mit  $C_k = \frac{k_{ab}}{k_{auf}}$ . Dabei ist die kritische Konzentration am Minus-Ende höher als am Plus-Ende.

$$C_k(-) > C_k(+)$$

Während der Polymerisation sinkt die Konzentration von G-Aktin bis sie kleiner als  $C_k(-)$ , aber immer noch größer als  $C_k(+)$  ist. Daraus folgt ein Zustand der als Treadmilling bzw. Tretmühlenmechanismus bezeichnet wird (Wegner, 1976). Dabei sind Polymerisation am (+)- und Depolymerisation am (-)-Ende ausgeglichen, wodurch sich die effektive Länge der Filamente nicht ändert. Dadurch haben AF-Netzwerk Umbauraten von nur wenigen Minuten (Huber et al., 2015), was u.a. entscheidend für die amöboide Migration ist.

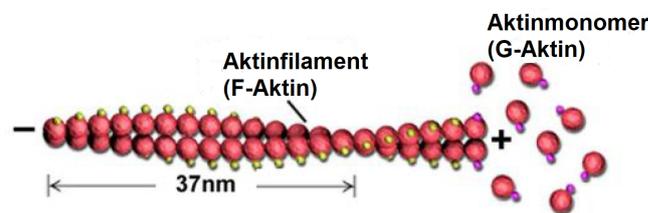


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau von F-Aktin. Aktinmonomere lagern sich bevorzugt am Plus-Ende der Filamente an. Abbildung verändert nach Alberts et al., 2002.

Die enorme Dynamik zellulärer AF kommt vor allem in mikroskopischen Zeitraffer Aufnahmen zur Geltung. Neben den hohen Polymerisationsraten sind dafür Motorproteine entscheidend. Im Fall der AF gehören diese zur Familie der Myosine. Die ersten entdeckten Myosine gehörten der Unterfamilie Myosin-II an, welche die in den Muskelzellen vorkommenden Myosine umfasst. Diese bestehen aus zwei Köpfen und einen stabförmigen langen Schwanz. Im Gegensatz dazu besitzen die in Nicht-Muskelzellen vorkommende Myosin I-Moleküle nur einen Kopf und eine kürzere Schwanzdomäne.

Die Motordomäne oder auch Motor-Kopf ist bei allen Myosinen konstant und kann mittels ATP-Hydrolyse zu +-Ende der AF „wandern“. Die Schwanzdomäne unterscheidet sich in den einzelnen Myosin-Untergruppen und kann an die Plasmamembran, Vesikel oder völlig unabhängig von der Kopfdomäne an einem zweiten AF binden. Je nach dem kann Myosin-I F-Aktin gegen die Plasmamembran verschieben, Vesikel entlang einzelner AF transportieren oder AF gegen ein anderes bewegen (Alberts et al., 2002, siehe auch [Abbildung 1.3](#)).

Die Funktion von Myosin II besteht darin, entgegengesetzt orientierte AF aneinander vorbei gleiten zu lassen, um so kontraktile AF-Bündel zu generieren. Es bildet dabei u.a. die molekulare Basis der Muskelkontraktion. Zusammen mit AF über nimmt Myosin II auch wichtige Funktionen in Nicht-Muskelzellen. Während der Zellteilung bildet der Aktin-Myosin-II-Komplex einen kontraktilen Ring. Dieser kann die sich teilende Zelle

mittig einschnüren bis die Cytokinese in zwei Tochterzellen abgeschlossen ist. Auch Stressfasern bestehen aus Bündeln aus Aktin- und Myosin-II-Filamenten. Stressfasern ermöglichen es, durch ihre Kopplung an die *Fokaladhäsionen* (siehe [Unterabschnitt 1.2.2](#)), Zug auf die zelluläre Unterlage bzw. Extrazelluläre Matrix (EZM), auszuüben. Neben seiner Rolle für die Kraftübertragung von Zellen auf ihre Unterlage bzw. Extrazelluläre Matrix (EZM), ist das Aktin-Myosin System auch in der Verknüpfung von Zelle zu Zelle beteiligt. AF und Myosin sind außerdem im sogenannten *Adhäsionsgürtel* (siehe auch [Unterabschnitt 1.2.1](#)) kontraktile angeordnet. Dabei wird vermutet, dass diese wichtige Aufgaben während der Faltung von Epithelzellschichten in der Embryogenese übernimmt (Alberts et al., 2002).

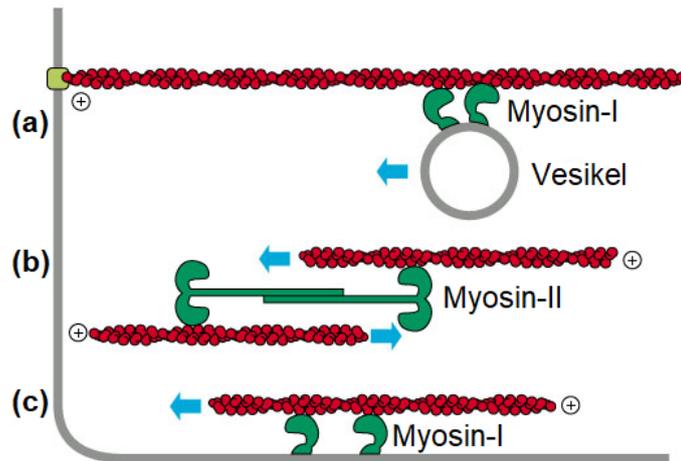


Abbildung 1.3: Die vielfältigen Aufgaben der Myosine in einer Eukaryontenzelle. Myosine sind verantwortlich für den Transport von Vesikeln entlang von AF (a) und für lokale Kontraktionen in AF-Bündeln (b). Sie ermöglichen außerdem Verschiebungen einzelner AF (c). Abbildung verändert nach Alberts et al., 2002.

### 1.1.2 Intermediärfilamente

Namensgeber der seilähnlichen Intermediärfilamente (IF) ist ihr Durchmesser, der mit 10 nm zwischen dem der Aktinfilamente und dem der Mikrotubuli liegt. Im Gegensatz zu AF und Mikrotubuli sind IF apolar und benötigen für ihren Zusammenbau keine chemische Energie aus ATP. Die daraus entstehenden Filamente verleihen der Zelle mechanische Festigkeit und gelten als enorm widerstandsfähig gegenüber mechanischen Belastungen (Janmey et al., 1991, Kreplak et al., 2005, Sivaramakrishnan et al., 2008, Fudge et al., 2008). Daher wird ihnen die Funktion als mechanischer Absorber, der Zugkräfte in Epithelien aufnehmen kann, zugesprochen (Alberts et al., 2002). Weiterhin wird das IF-Netzwerk auch als mechanischer "Integrator" der Vielzahl an Komponenten des zellulären Raums bezeichnet (Lazarides, 1980), der entscheidend die Steifigkeit der

Zellen beeinflusst (Seltmann et al., 2013, Ramms et al., 2013).

In den meisten Eukaryoten bilden die IF ein den Zellkern umfassendes Netzwerk, das sich bis zur Plasmamembran erstreckt und mit dieser wechselwirkt (Alberts et al., 2002, siehe auch [Abbildung 1.1](#)). Weiterhin bilden IF ein dichtes Geflecht unter der Kernhülle, die auch als Kernlamina bezeichnet wird.

IF bestehen aus Fasermolekülen mit einem aminoterminalen (N) und einem carboxyterminalen (C) Ende (Aufbau in [Abbildung 1.4](#)). Die zentralgelegene Domäne ist stäbchenförmig und besteht aus einer heptaden  $\alpha$ -Helix. Jeweils zwei der Fasermoleküle lagern sich zu Doppelwendel-Dimeren zusammen. Diese Dimere setzen sich antiparallel als Paare zu Tetrameren zusammen, woraus sich die unpolare Struktur der IF ergibt. Die Tetramere lagern sich dann entlang ihrer Längsachsen zu den schraubenförmigen IF zusammen (Alberts et al., 2002). Die apolar aufgebauten IFs polymerisieren wesentlich langsamer als AF und MT (im Minutenbereich) und haben eine Umbaurate von mehreren Stunden (Huber et al., 2015).

Derzeit sind 74 IF Proteine bekannt, die über 71 Gene verschlüsselt sind (Kim und Coulombe, 2007). Diese werden in fünf Hauptklassen unterteilt:

1. Keratinfilamente, von Epithelzellen und Zellen mit epithelialen Ursprung exprimiert
2. Vimentinfilamente, nachgewiesen in mesenchymalen Zellen und Zellen mesenchymalen Ursprungs
3. Desminfilamente, hauptsächlich in skeletalen-, glatten- und Herzmuskel-Zellen exprimiert
4. Glialfilamente gefunden in Glialzellen
5. Neurofilamente in Neuronen

Die vielfältigste Klasse bildet dabei die Familie der Keratine mit über 20 verschiedenen Filamenten in den Epithelien des Menschen (Alberts et al., 2002). Daneben gibt es acht weitere harte oder auch  $\alpha$ -Keratine, die vorallem in Haaren und Nägeln vorkommen. Entsprechend ihrer Aminosäure-Sequenz werden Keratine in Typ I (sauer) und Typ II (neutral/basisch) unterteilt. Keratinfilamente setzen sich immer aus Typ I und Typ II Polypeptiden zu Heterodimeren zusammen.

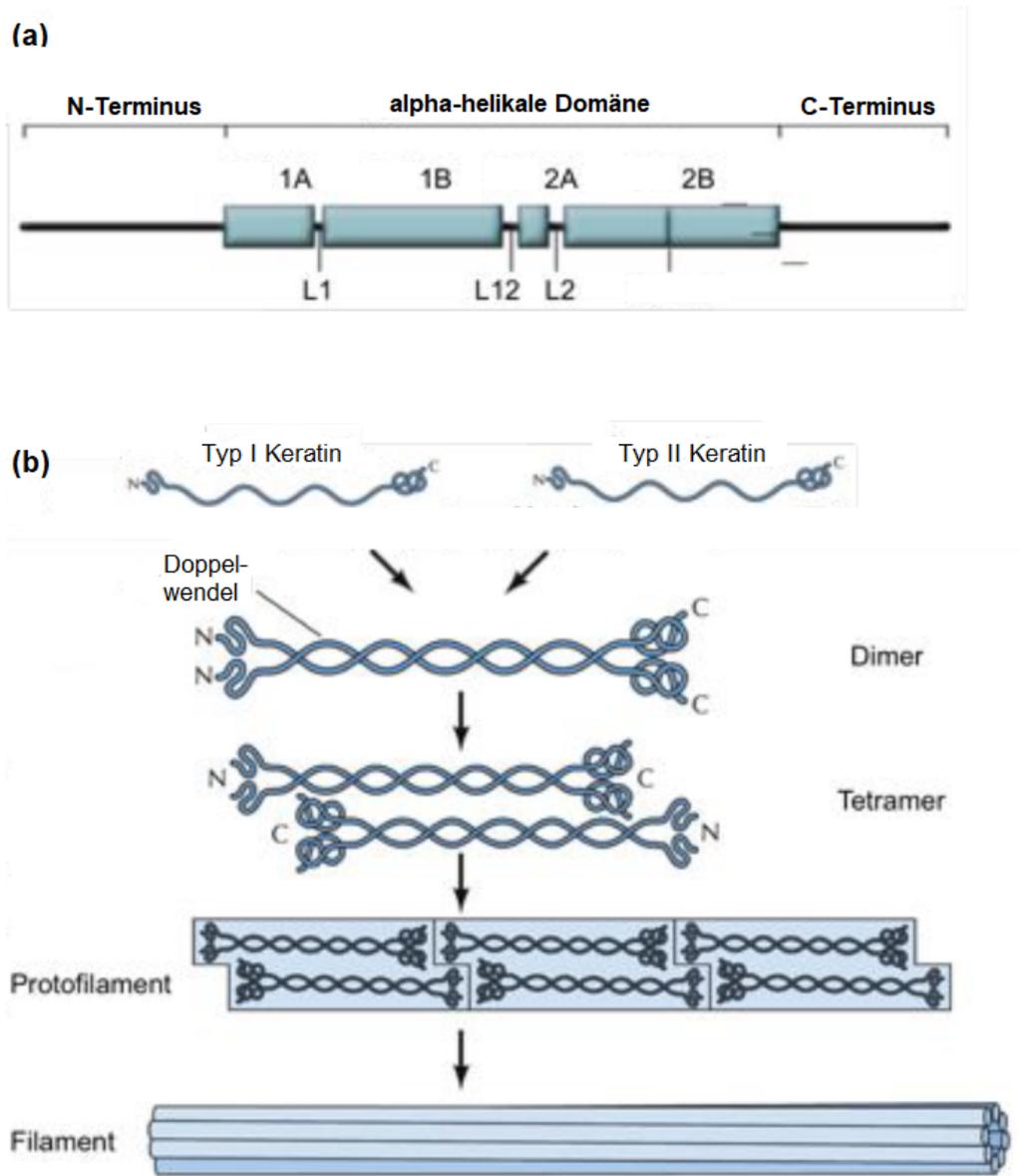


Abbildung 1.4: a) Dreiteilige Struktur der IF-Proteine: die zentrale alpha-helikale Domäne wird von drei Linkersequenzen (L1 bis L3) unterbrochen und von einer N-terminalen Kopf- und einer C-terminalen Schwanzdomäne flankiert. b) Schematische Darstellung der hierarchischen Struktur von Keratin IF. Die Untereinheiten der Filamente können über Dimerisierung saurer mit basischer Keratine gebildet werden. Abbildung verändert nach Alberts et al., 2002.

### 1.1.3 Mikrotubuli

Die Gruppe zytoskeletaler Polymere mit dem größten Durchmesser bilden Mikrotubuli (MT). Die 25 nm breiten Hohlzylinder weisen wie AF einen polaren Aufbau auf und bestehen aus Tubulin (Alberts et al., 2002). Ähnlich wie die Mikrofilamente besitzen sie ein (+)-Ende, an dem sich Untereinheiten anlagern können und ein (–)-Ende, welches

Tubulinmoleküle wieder verlieren kann. Zur Stabilisation der (–)-Enden sind diese in den meisten Zellen am Centrosom eingebettet, welches am Zellkern, nahe des Zellzentrums liegt. Neben der Stützfunktion dienen Mikrotubuli auch als Transportwege für Motorproteine. Motorproteine werden in zwei Familien unterteilt. *Kinesine*, die sich in Richtung des (+)-Endes und *Dyneine* die sich zum (–)-Ende der Mikrotubuli bewegen können. Weiterhin sind Mikrotubuli essentiell für die Separation replizierter Chromosomensätze während der Zellteilung.

#### 1.1.4 Mechanik der Biofilamente

Eine eher allgemeine Beschreibung der zytoskeletalen Filamente lässt sich mithilfe der Polymerphysik finden. Dabei werden chemische Details der Monomere unberücksichtigt gelassen, sollten aber für die Beschreibung biologischer Systeme stets im Blickfeld sein. Nichtsdestotrotz lassen sich mit Ansätzen aus der Physik viele Eigenschaften des Zytoskeletts beschreiben (siehe auch Storm et al., 2005 oder Bausch und Kroy, 2006).

Mit dem Modell der wurmartigen Kette ist es möglich, steife Polymere physikalisch zu beschreiben. Dabei wird ein einzelner Polymer als durchgängig flexibler, isotroper Stab der Länge  $l$  angenommen. Zur Biegedeformation des Stabs wird die folgende elastische Energie benötigt:

$$E_{\text{Biege}} = \frac{1}{2} \kappa \int \left( \frac{\delta \vec{t}_s}{\delta s} \right)^2 ds \quad (1.1)$$

mit dem Biegemodul  $\kappa$  und dem Tangentenvektor  $\vec{t}_s$  des Pfads des Polymers  $s \in (0, l)$

Diese Gleichung wurde u.a. auch von Kratky und Porod, 1949 zur Beschreibung ihrer Ergebnisse der Röntgenspektroskopie an Polymeren und von Helfrich zur Beschreibung der Fluktuationen von Lipidmembranen verwendet (Helfrich, 1978).

Ab Temperaturen über 0 K unterliegen Polymere thermischen Fluktuationen. Dabei kann gezeigt werden, dass die Korrelation zwischen den Tangentenvektoren entlang des Polymerpfades exponentiell abfällt. Die charakteristische *Persistenzlänge*  $l_p$  gibt dabei die Längenskala an, ab der die Orientierungen der Tangenten nicht mehr korrelieren.

$$\langle \vec{t}_s * \vec{t}_{s'} \rangle = \exp\left(-\frac{|s - s'|}{l_p}\right) \quad (1.2)$$

Weiterhin kann die Persistenzlänge verwendet werden, um Polymere anhand ihrer Biegesteifigkeit in *steif*, *semi-flexibel* und *flexibel* zu klassifizieren (Doi und Edwards, 1988) (siehe auch [Abbildung 1.1](#)).

Dabei werden Polymere, deren Filamentlänge wesentlich kleiner als ihre Persistenzlänge ist als *steif* bezeichnet. Ein Beispiel dafür sind Mikrotubuli mit einer Persistenzlänge

von 6.3 mm (Elbaum et al., 1996) und jedoch einer Gesamtlänge von 10 – 100  $\mu\text{m}$ . Anschaulich können sich diese auch als Stangen vorgestellt werden.

Polymere deren Persistenzlänge sich in der Größenordnung ihrer Gesamtlänge bewegt werden als *semi-flexibel* definiert. Einer der Vertreter semi-flexibler Biopolymere sind Aktinfilamente mit einer Persistenzlänge von 0.5 bis 9  $\mu\text{m}$  (Isambert et al., 1995) und einer Gesamtlänge zwischen 1  $\mu\text{m}$  und 100  $\mu\text{m}$ .

Als *flexibel* werden Polymere bezeichnet, deren Persistenzlänge wesentlich kleiner ist als ihre gesamte Filamentlänge. Ein Beispiel für flexible Biopolymere sind die Intermediärfilamente mit einer Persistenzlänge von 0.3 bis 1  $\mu\text{m}$  (Mücke et al., 2004) und einer Gesamtlänge in der Größenordnung von 10  $\mu\text{m}$ .

Mit diesem vergleichsweise einfachen Ansatz lässt sich gut ein erstes Bild über die Mechanik des Zytoskeletts machen. Dabei sind ihr Beitrag zur Steifigkeit der Zellen und das Verhalten der Biofilamente unter mechanischer Dehnung bis jetzt noch unberücksichtigt.

Verantwortlich für die Elastizität und Steifigkeit der Zelle werden in der Literatur vor allem AF und IF genannt (Huber et al., 2015, Wang und Stamenović, 2000, Seltmann et al., 2013, Ramms et al., 2013). Lokale Elastizitätsmessungen konnten dabei zeigen, dass IF vor allem die Steifigkeit des Zellzytoplasmas bestimmen und AF die des Zellkortex (Guo et al., 2013), wobei ihr relativer Beitrag zur Steifigkeit von externen Faktoren wie der Steifigkeit ihres Substrats (Mendez et al., 2014) und der mechanischen Belastung (Pritchard et al., 2014) abzuhängen scheint.

Wegen der komplexen Wechselwirkungen zytoskeletaler Filamente untereinander, sind vor allem rheologische Studien an *in vitro* Netzwerken ein guter Ansatz zur Erforschung der Mechanik von Biopolymeren. Dabei ist bekannt, dass *in vitro* Biopolymernetzwerke sich unter Dehnung versteifen (Janmey et al., 1991, Gardel et al., 2004, Pollard und Cooper, 2009), wodurch große Deformationen, welche die Integrität von Zellen und Geweben bedrohen, stark erschwert werden. Auf Scherdeformationen reagieren dabei *in vitro* AF- und IF-Netzwerke komplementär (Janmey et al., 1991). Bereits unter kleinen Dehnungen sind AF straff gespannt, während IF kaum mechanische Spannung aufweisen. Ab Scherdehnungen von über 20 % beginnen *in vitro* Aktinnetzwerke zu zerreißen. An diesem Punkt beginnen IF-Polymergele sich zu versteifen (Janmey et al., 1991).

Besonders IF sind für ihre hohe Dehnfähigkeit und mechanische Robustheit bekannt. Mit einem Rasterkraftmikroskop war es möglich, einzelne IF *in vitro* um 260 % (Kreplak et al., 2005) und um 350 % (Block et al., 2017) zu dehnen. Auch epitheliale Monolagen konnten Dehnungen von über 130 % ohne sichtbare Beschädigungen der IF überstehen (Fudge et al., 2008).

Aktuellere Studien belegen, dass neben der Charakterisierung der einzelnen Filamente, vor allem das Zusammenspiel der zytoskeletalen Netzwerke entscheidend für die Mechanik der Zelle ist. So stabilisieren AF und IF das Zytoplasma, womit ein Abknicken der MT verhindert wird. Die Kompressionskräfte, die MT in Zellen dabei aushalten können,

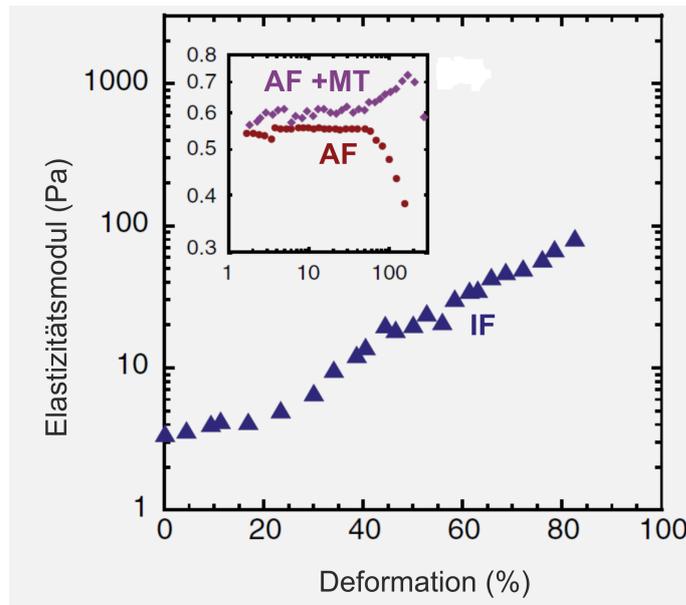


Abbildung 1.5: *In vitro* IF-Netzwerke unter hohen Dehnungen zeigen ein nicht-lineares Verhalten. MT unterdrücken inhomogene Deformationen der AF und versteifen dadurch AF unter Dehnung (*Eckdiagramm*). Abbildung aus Huber et al., 2015, Beschriftung geändert.

sind um ein hundertfaches höher als bei isolierten *in vitro* Filamenten (Brangwynne et al., 2006). Auch AF profitieren von dieser synergetischen Beziehung, so konnte gezeigt werden, dass die Versteifung von AF Netzwerken unter Dehnung in Anwesenheit von MT stark erhöht ist (Lin et al., 2011).

## 1.2 ZELLULÄRE ADHÄSION

### 1.2.1 Interzelluläre Verbindungen

Differenzierte Epithelzellen weisen eine asymmetrische Organisation ihrer Plasmamembran auf. Die Regionen der polarisierten Zellen werden dabei in *apikal* (Abbildung 1.6, oben), *lateral* (seitlich) und *basal* (unten) unterschieden (Lodish et al., 2013). Zur Vergrößerung ihrer Oberfläche bildet die apikale Membran eine Vielzahl fadenförmiger Zellfortsätze aus, die *Mikrovilli*. Mittels spezifischer Verbindungen ist die laterale Membran mit benachbarten Zellen im Gewebe und die basale Membran mit der extrazellulären Matrix (EZM) verbunden.

Zelluläre Verbindungen werden in drei Hauptgruppen unterteilt:

1. undurchlässige Verbindungen oder Tight Junctions
2. kommunizierende Verbindungen wie Gap Junctions

## 3. Haftverbindungen

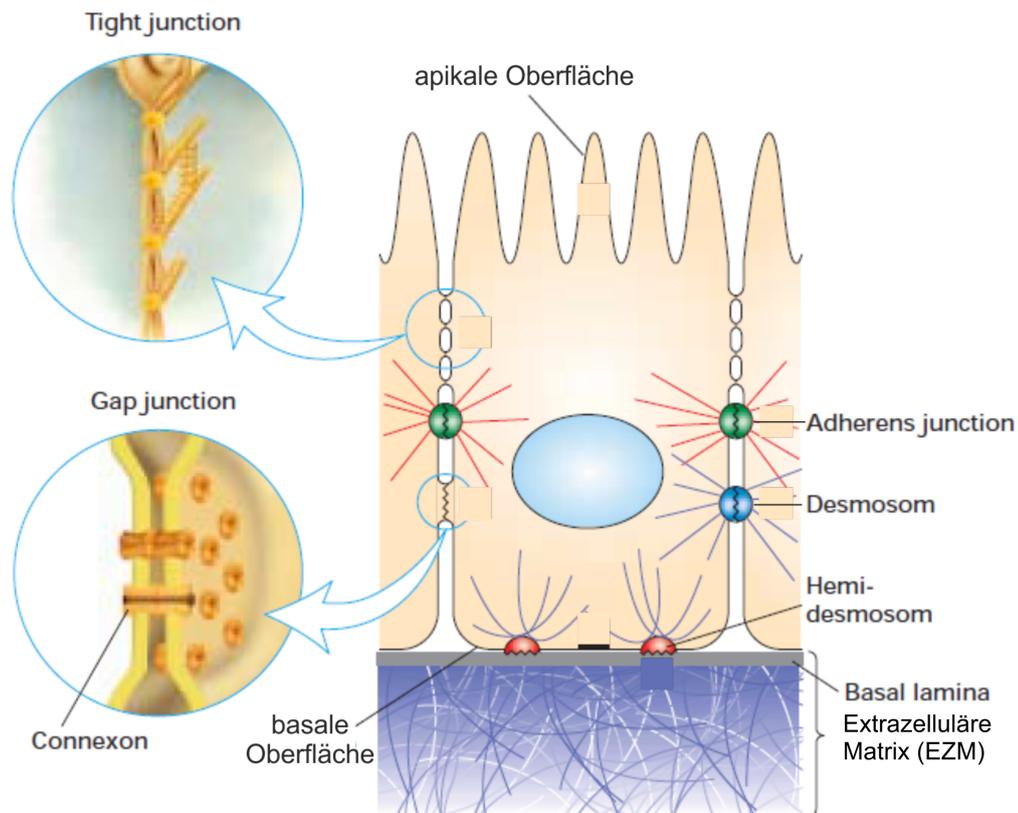


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung zellulärer Verbindungen in Epithelzellen. Während Tight Junctions eine undurchlässige Membran bilden, sorgen Gap Junctions für interzelluläre Signalübertragungen. Adherens Junctions verbinden Aktinnetzwerke benachbarter Zellen, Intermediärfilamente werden über Desmosome mit angrenzenden Zellen verlinkt und über Hemidesmosome mit der Basallamina. Abbildung verändert nach Lodish et al., 2013.

Tight Junctions, hauptsächlich in Epithelzellen gefunden, stellen undurchlässige Verbindungen dar, die einen Austausch von Substanzen innerhalb des interzellulären Raums verhindern (Anderson und Van Itallie, 2009). Auf zytoplasmatischer Seite sind diese über die Zonula occludens (ZO) mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Niessen, 2007). Wie auch über Gap Junctions und Haftverbindungen können Zellen über diese kommunizieren (Jamora und Fuchs, 2002).

Als Vertreter der kommunizierenden Verbindungen bilden die Gap Junctions eine direkte Verbindung zwischen benachbarten Zellen. Durch sie können Signale in Form von Ionen und kleinen Molekülen über röhrenartige Connexone zwischen den Zellen ausgetauscht werden (Simpson et al., 2011).

Haftverbindungen spielen die entscheidende Rolle bei Zell-Zell und Zell-Matrix Adhäsionen. Diese können jeweils in drei Elemente unterteilt werden: Zelladhäsionsmoleküle (ZAM), Adapterproteine und zytoskeletale Filamente (Lodish et al., 2013, siehe auch [Abbildung 1.7](#)). Dabei ist die Zellmembran mit Membranen anliegender Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM) über ZAM verbunden. Die Adapterproteine verbinden die ZAM mit dem Zytoskelett, welches die zellulären Adhäsionen mit dem zytoplasmatischen Raum verbindet.

Haftverbindungen können in zwei Gruppen unterteilt werden. Aktin-assoziierte Adhärenzverbindungen (engl. *adherens junctions*) lagern sich innerhalb ausgereifter Epithelschichten in Form von einem Adhärenzgürtel (lat. *Zoluna adhaerens*) um die Zellen herum an (Alberts et al., 2002). Dabei bilden die Adherens Junctions zusammen mit kortikalem Aktin und Myosin einen Komplex (Lodish et al., 2013). Über die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Cadherine (von engl. *Calcium adhering*) können Zellen Adhäsionen zu angrenzenden Zellen initiieren. Das vor allem in Epithelgewebe vorkommende E-Cadherin ist dabei über die lateralen Zelloberflächen verteilt und akkumuliert in den *Adherens Junctions*.

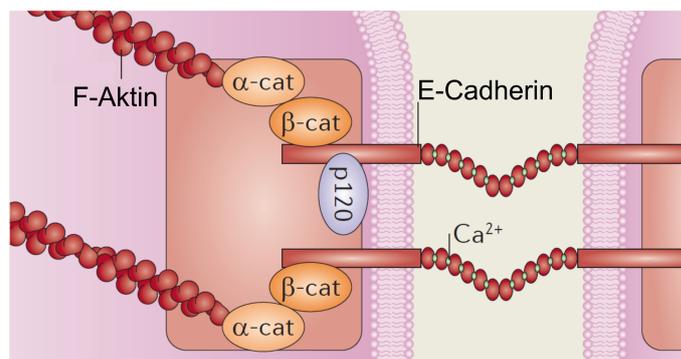


Abbildung 1.7: Schematischer Aufbau einer Adhärenz Junction. Die zytosomatische Domäne des E-Cadherin bindet über die Adapterproteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin ( $\alpha$ -cat,  $\beta$ -cat) an das Aktinzytoskelett und ist über das Protein p120-Catenin (p120) an der Signaltransduktion der Zelle beteiligt. Abbildung aus Simpson et al., 2011, Beschriftungen geändert.

Die zweite Untergruppe der Haftverbindungen bilden die knopfartigen Desmosome, welche die IF-Netzwerke benachbarter Zellen miteinander verbinden ([Abbildung 1.8](#)). Ähnlich zu den Adhärenz Junctions verbinden sich Desmosome benachbarter Zellen über Mitglieder der Cadherin-Familie, den Desmogleinen und Desmocollinen. Über das zytosomatische Plaque, bestehend aus Plakoglobin und Desmoplakin sind diese mit dem IF-Netzwerk verbunden.

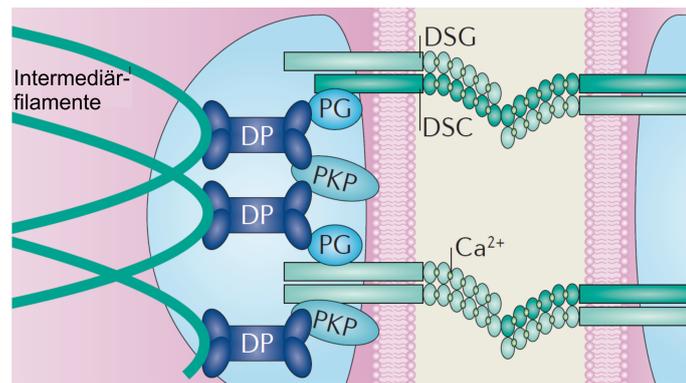


Abbildung 1.8: Schematischer Aufbau eines Desmosoms. Die zum zytoplasmatischen Plaque gehörenden Proteine Desmoplakin (DP) und Plakoglobin (PG) stellen das Verbindungsglied der desmosomalen Cadherine Desmoglein (DSG) und Desmocollin (DSC) und der IF dar. Abbildung aus Simpson et al., 2011, Beschriftungen geändert.

### 1.2.2 Zell-Matrix Adhäsion

Die bereits erwähnten Stressfasern der Zelle verlaufen als kontraktile Bündel aus Aktinfilamenten parallel zur Zellmembran. Die Stressfasern enden in den sogenannten *Fokaladhäsionen* über die sie mit der ECM verbunden sind (Abbildung 1.9 a). Dabei können Fokaladhäsionen die Reifung von Stressfasern anregen und umgekehrt können kontraktile Kräfte die Reifung der Fokaladhäsionen befördern (Oakes und Gardel, 2014, Tojkander et al., 2011).

Über die sogenannten *Hemidesmosome* ist das IF Netzwerk der Zellen mit der Basallamina verbunden (Abbildung 1.9 b). Integrine fungieren dabei als Adhäsionsrezeptoren und ZAM. Die Kombination einer kleinen Auswahl an  $\alpha$  und  $\beta$ -Ketten ermöglicht dabei die Formation einer Vielzahl verschiedener Integrine, die die Bindung zu unterschiedlichen Liganden der EZM ermöglichen. Besonders die Gruppe der  $\alpha6\beta4$ -Integrine gelten als wichtige Rezeptoren epithelialer Hemidesmosome (Alberts et al., 2002).

Mittels der Zell-Matrix Adhäsionen prüfen Zellen aktiv ihre Umgebung. Über Fokalkontakte können Zellen mithilfe der Aktin-Myosin Komplexes an ihrer Unterlage ziehen und entsprechende Signale an das Zytoskelett weiterleiten (Alberts et al., 2002). Abhängig von der Steifigkeit der Substrate können sie dabei unterschiedlich reagieren (Discher et al., 2005). Beispielsweise konnten Engler et al., 2004 zeigen, dass Skelettmuskelzellen höhere Adhäsionskräfte auf harten als auf weichen Substraten ausbilden. Auch Epithelzellen reagieren auf die Substratsteifigkeit. So zeigen auf steifen Gelen ( $E \sim 30$  bis  $100$  kPa)<sup>2</sup> adhärente Zellen sehr klare, stabile Fokaladhäsionen, während die gleichen Zellen auf

<sup>2</sup> Das Elastizitätsmodul  $E$  stellt die Proportionalitätskonstante für die Korrelation zwischen Spannung und Dehnung bei der Verformung linear-elastischer Festkörper dar.

weichen Substraten ( $E \sim 1 \text{ kPa}$ ) diffuse Adhäsionskomplexe mit einer höheren Dynamik ausbilden (Pelham und Wang, 1997). Auch die Stressfasern von Zellen sind auf harten Substraten stärker ausgeprägt und höher organisiert als auf weichen (Discher et al., 2005).

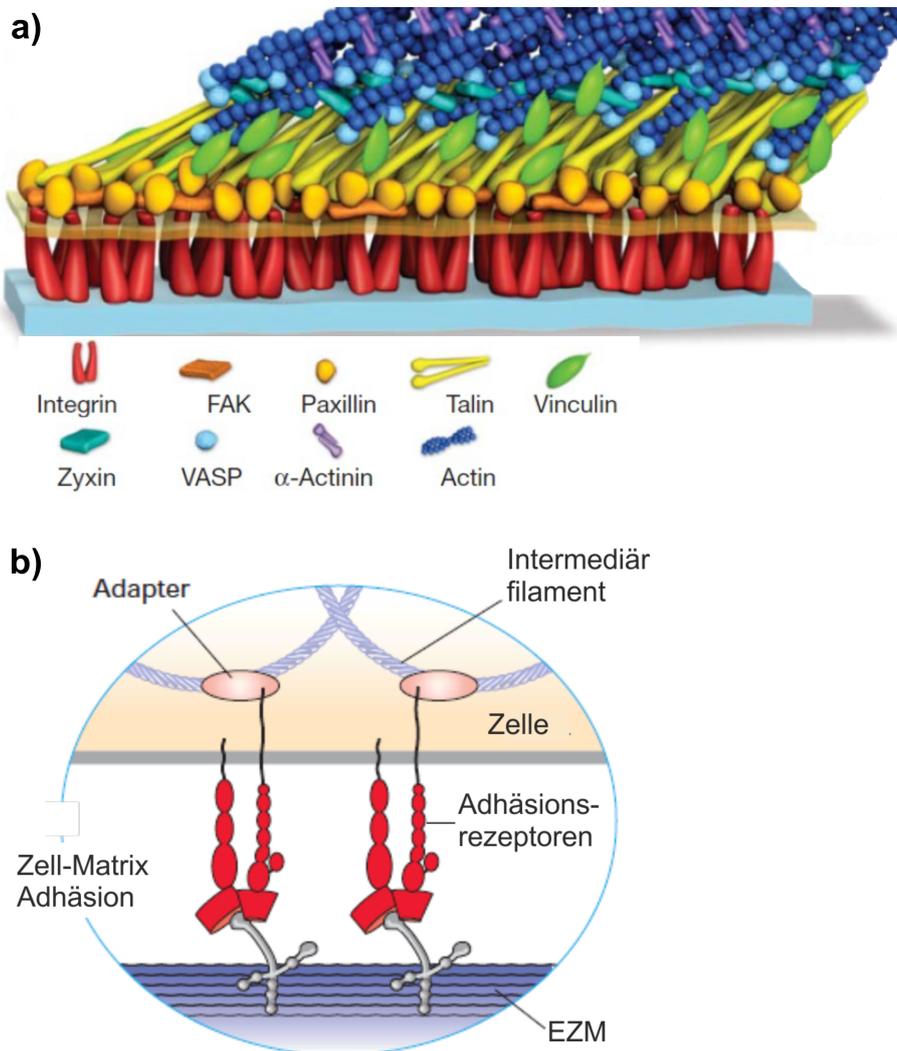


Abbildung 1.9: a) Schematischer Aufbau einer Fokaladhäsion. *von oben nach unten*: Das Aktinzytoskelett ist über eine kraftübertragende Schicht, bestehend aus Vinculin und Talin, mit der transmembranalen Integrinschicht verbunden. Diese kann extrazellulär an Proteine der extrazellulären Matrix anknüpfen. b) Schematischer Aufbau eines Hemidesmosoms. Die Intermediärfilamente sind über Adapterproteine mit der Integrinschicht (Adhäsionsrezeptoren) assoziiert, die wiederum an die EZM binden. Abbildungen verändert nach Kanchanawong et al., 2010 (a) und Lodish et al., 2013 (b)

Verbindung	Zelladhäsionsmoleküle	extra-zellulärer Ligand	assoziierte Filamente des Zytoskeletts	Adapterproteine
<b>Adherens Junction</b>	klassische Cadherine (E-Cadherin)	Cadherine (Nachbarzelle)	Aktin-Filamente	Catenine, Vinculin, $\alpha$ -Actinin, Plakoglobin
<b>Desmosom</b>	Desmosomale Cadherine (Desmogleine, Desmocolline)	Cadherine (Nachbarzelle)	Intermediär-Filamente	Desmoplakine, Plakoglobin
<b>Integrin-basierte Adhäsion, Fokaladhäsionen</b>	Integrine	Proteine der EZM	Aktin-Filamente	Talin, Vinculin, $\alpha$ -Actinin
<b>Hemidesmosom</b>	$\alpha_6\beta_4$ -Integrin	Proteine der EZM (Basalmembran)	Intermediär-Filamente	Desmoplakin-ähnliches Protein

Tabelle 1.1: Zusammenfassung der Haftverbindungen der Zelle. Verändert nach Alberts et al., 2002

### 1.3 MULTIZELLULÄRE GEWEBE

#### 1.3.1 Aufbau der Epidermis

Die Haut gehört zu den mechanisch faszinierendsten Organen. Neben ihrer enormen Widerstandsfähigkeit ist sie in der Lage, die Temperatur und den Wasserhaushalt des Organismus zu regulieren. Außerdem ist sie am Stoffaustausch mit der Umwelt beteiligt (Chuong et al., 2002). Sie kann in drei Schichten unterteilt werden,

1. Die Unterhaut bildet die *Subcutis*, deren Hauptfunktion die Speicherung von Wärme- und Energiereserven ist.
2. Die *Dermis* oder auch Lederhaut enthält Haarfollikel, Blutgefäße und Schweißdrüsen, und versorgt die darüber liegende Epidermis.

3. Die Oberhaut bildet die *Epidermis*, welche den Organismus vor physikalischen und chemischen Reizen schützt und eine Barriere, u. a. auch durch ihren Säureschutzmantel, für Mikroorganismen darstellt.

Der Aufbau der Epidermis unterliegt einer besonderen Dynamik. Sie besteht zu 90 % aus Keratinozyten, die entsprechend ihrer Differenzierung in vier Schichten unterteilt werden. In der untersten Schicht, der *Stratum basale* oder auch Basalmembran sind die polaren Zellen zylinderförmig angeordnet und mithilfe von Hemidesmosomen an dieser verankert. Durch asymmetrische Mitose bleibt ein Teil der epidermalen Stammzellen zur Proliferation an der Basalschicht haften, während ein Teil der Tochterzellen Richtung Hautoberfläche migriert (Eckert, 1989, Simpson et al., 2011). Der Calcium-Gehalt dieser Schichten ist umso höher, je weiter diese von der Basallamina entfernt liegen (Elias et al., 2002). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient initiiert dabei die Differentiation der Keratinozyten, was weitreichenden Konsequenzen zur Folge hat. Zunächst verlieren sie ihre Teilungsfähigkeit und werden allmählich flacher. In der Stachelzellschicht oder auch *Stratum spinosum* bauen die Zellen ihre Verbindungen zueinander aus, was diesen, dem Namen entsprechend, ein stachelförmiges Aussehen verleiht. Während der Differenzierung ändert sich auch die Spezifität ihrer ZAM, so wird beispielsweise ab der *Stratum spinosum* Desmocollin 1 exprimiert und ab der *Stratum granulosum* auch Desmoglein 4 (Arnemann et al., 1993, King et al., 1997). Selbst die Zusammensetzung des Keratinzytoskellets, welches in der Basalzellschicht bis zu 85 % des zellulären Proteinanteils ausmachen kann, ändert sich während dieses Prozesses (Fuchs und Weber, 1994). In den suprabasalen Schichten wird die Expression von K5 – und K14 – Keratinen mit der Ausbildung von K1 und K10 ersetzt (Fuchs, 1993, Szeverenyi et al., 2008). In der nächsten Schicht, der *Stratum granulosum*, beginnt der Abbau der Zellen, die in Korneozyten umgewandelt werden. Dabei verhornen die Zellen, flachen weiter ab und bilden Keratingranula im Zellinneren. In der obersten Schicht, der *Stratum corneum* angekommen, sterben die Zellen ab und bilden die Hornschicht (Eckert, 1989).

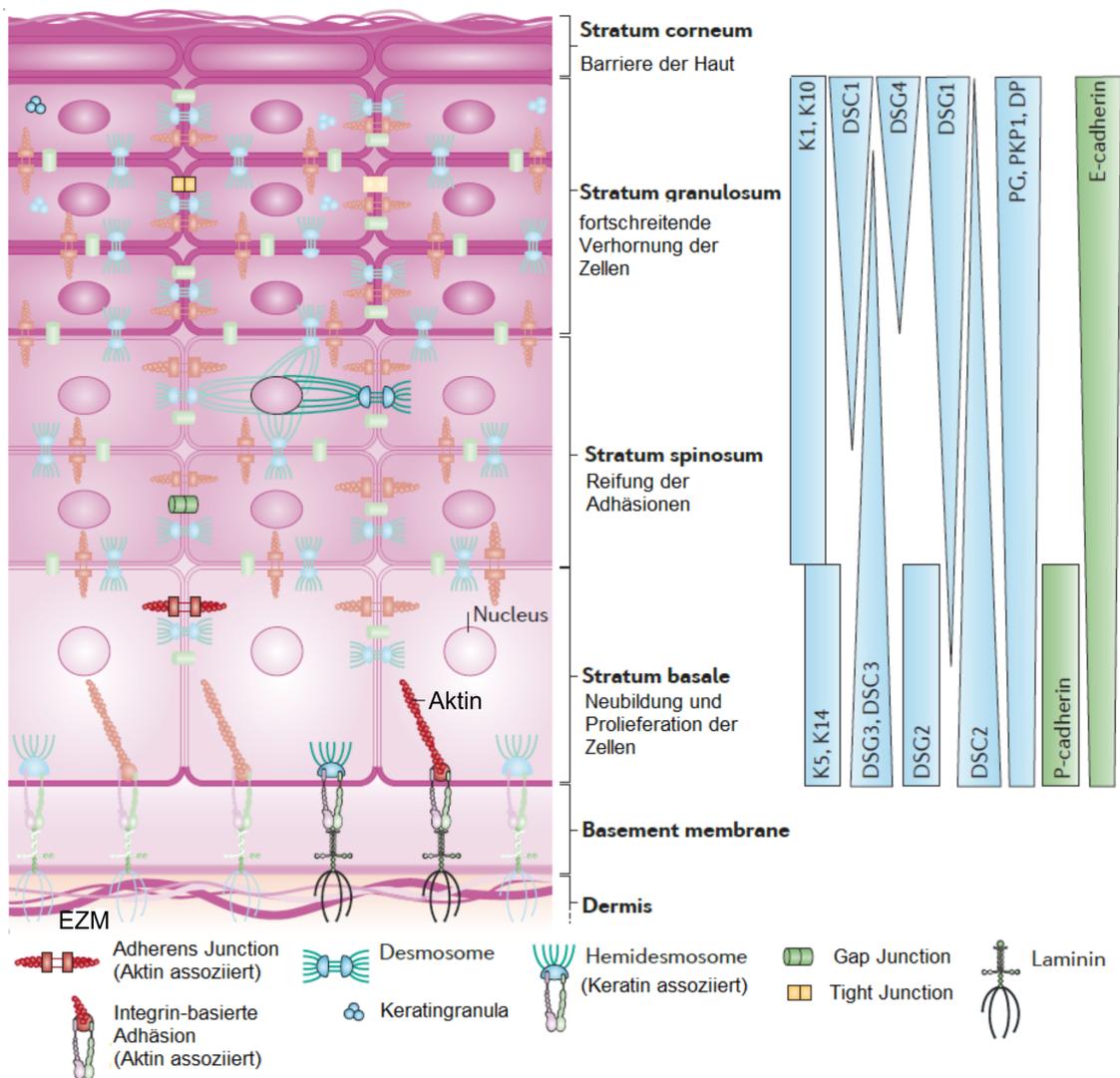


Abbildung 1.10: Die vier Schichten der Epidermis sind mittels Hämatoxylin-Eosin-Färbung dargestellt (*links oben*). Durch eine streng regulierte Differentiation der Zellschichten unterscheiden sich diese in ihrer Zusammensetzung und Funktion, und sorgen für eine konstante Erneuerung der Haut (*Mitte*). Insbesondere die Unterschiede der Schichten im Desmosom-Keratin-Komplex (*blau, rechts Schema* und der ZAM der Adherens Junction (*grün* sind ausführlicher dargestellt: K1, Keratin1; K5, Keratin5 usw. DP, Desmoplakin; DSC, Desmocollin; E-Cadherin, epitheliales Cadherin; P-Cadherin, plazentales Cadherin; PG, Plakoglobulin; PKP1, Plakophilin1. Abbildung aus Simpson et al., 2011, Beschriftungen geändert

### 1.3.2 *Mechanik von Zellen und Zellgewebe*

Eine charakteristische Eigenschaft zellulären Materials ist die Viskoelastizität. Dadurch können sich Zellen zum Teil wie elastische Festkörper und zum Teil wie viskose Flüssigkeiten verhalten. Die zelluläre Antwort auf mechanische Reize ist dabei stark von der Zeitskala abhängig (Kasza et al., 2007).

Für kleine Zeitskalen zwischen Sekundenbruchteilen und Sekunden verhalten sich Zellen hauptsächlich elastisch. Dort bestimmen vor allem die zytoskeletalen Netzwerke die zelluläre Reaktion (Gardel et al., 2003, Hoffman et al., 2006, Deng et al., 2006). Wirken externe Kräfte bereits im Bereich von mehreren Sekunden, können diese Änderungen in den Fokaladhäsionen, der Kontraktilität und der Zellsteifigkeit auslösen (Jiang et al., 2005, Matthews et al., 2006, Lele et al., 2006).

Viskose Reaktionen der Zellen können u.a. mit einem Mikroplatten-Rheometer nachgewiesen werden. Dabei können einzelne Fibroblasten, wie in (Fernández et al., 2006), zwischen zwei parallelen, biochemisch-funktionalisierten Platten adhären. Werden diese zyklisch und uniaxial gedehnt, lässt sich eine Phasenverschiebung zwischen Zelllänge und Zugkraft messen, die nur durch die viskosen Eigenschaften der Zelle erklärbar ist (Fernández et al., 2006). Unter längerfristigen mechanischen Reizen beginnen Zellen ihre Orientierung zu ändern und sich auszurichten. Collinsworth et al., 2000 konnten zeigen, dass Myozyten (Muskelfaserzellen), die mehrere Tagen statischer Dehnung ausgesetzt sind, sich in Dehnungsrichtung orientieren und an Länge zunehmen. Wird stattdessen eine zyklische Dehnung mit einer genügend hohen Frequenz verwendet, beginnen Zellen und Zellmonolagen sich senkrecht zur Dehnungsrichtung zu orientieren, um die mechanische Belastung zu verkleinern (Wang et al., 2001, Noethel et al., 2018). Dabei reorientiert sich zunächst das Aktinzytoskelett bevor die Zellform zeitverzögert dazu folgt (Faust et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden Monolagen von Keratinozyten untersucht. Diese aus einer Zellschicht bestehenden Kolonien sind das einfachste multizelluläre Gewebe, an dem sich die Auswirkungen zellulärer Adhäsion studieren lassen.

Von einem mechanischen Standpunkt aus betrachtet, ist der Übergang von weitestgehend separiert agierenden Einzelzellen zur strukturell völlig veränderten, im Kollektiv vorgehenden Monolage hochinteressant. Harris et al., 2012 konnten zeigen, dass eine allein an zwei gegenüberliegenden Stangen befestigte Monolage sich um zwei Größenordnungen steifer verhält als eine isolierte Zelle, die auf einem Substrat adhären ist. Solche Synergien sind auch auf der Einzelzellebene bekannt. Elastizitätsmessungen mit einem Rasterkraftmikroskop konnten eine ca. doppelt so hohe Steifigkeit über dem Zellkern von Zellen innerhalb von Monolagen (Homborg et al., 2015) als über Zellkernen isolierter Einzelzellen (Ramms et al., 2013) ermitteln.

#### 1.4 ZIELSETZUNG

Das Thema der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zweier mechanischer Eigenschaften der Haut, der Anisotropie der mechanischen Spannungen und der Dehnbarkeit. Bisher wurden diese Eigenschaften vor allem *in vivo* am Tiermodell (Liang et al., 1988, Zhou et al., 2013) oder an menschlicher *post mortem* Haut (Gibson et al., 1965) untersucht. Dabei mangelt es jedoch an Studien auf zellulärer Ebene, die Aufschluss über die molekulare Basis hinter diesen Eigenschaften geben.

Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit wurden Mikrogewebe aus Zellen der Oberhaut (Keratinozyten) untersucht. Diesen können als Monolagen stabile, interzelluläre Verbindungen aufbauen. Explizit stehen dabei zwei Hauptbestandteile des Zytoskeletts im Vordergrund, Aktin- und Intermediärfilamente. Während Aktinfilamente zusammen mit dem Motorprotein Myosin maßgeblich für die Generierung mechanischen Spannungen in Zellen und Zellgeweben bekannt sind (Tomasek et al., 1992 Gavara et al., 2006), gelten Intermediärfilament als mechanisch besonders robust und Dehnbar (Janmey et al., 1991, Block et al., 2017). Dabei wurden zwei Kernhypothesen aufgestellt.

1. Aktinfilamente geben die Ausrichtung mechanischen Spannungen innerhalb von Monolagen vor. Die kollektive zytoskellatale Ausrichtung korreliert dabei mit der Kooperativität der Zellen.
2. Intermediärfilamente fungieren als mechanischer Puffer, der Zellen vor hohen mechanischen Dehnungen schützt.

Der Großteil mechanischer Untersuchungen von Zellen fand bislang auf der Ebene von Einzelzellen statt. Durch die Inkubation von Keratinozyten in Kulturmedium mit erhöhter Calciumkonzentration lassen sich Differenzierungsprozesse wie die Ausbildung von Zell-Zell Adhäsionen *in vitro* steuern (O'Keefe et al., 1987). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Aktinfilamente von Keratinozytenmonolagen und die Monolagen selbst sich durch zyklische Dehnung ausrichten lassen (Noethel et al., 2018). Die Kombination aus der so erzeugten Anisotropie mit der kontrollierten Ausbildung der Adhärenzverbindungen ermöglicht es im Rahmen der vorliegende Arbeit Untersuchungen zum Einfluss der Ausrichtung des Aktinzytoskeletts auf die mechanischen Eigenschaften der Monolagen durchzuführen. Auch gezielte mechanische Analysen der Funktionen von Intermediärfilamenten in lebenden Zellen waren bisher nur schwer durchführbar, da es sich bei den Intermediärfilamenten um eine sehr große Familie handelt, die vor allen in Epithelzellen einen hohen Anteil der intrazellulären Proteine ausmacht. Dank der Etablierung einer Epithelzelllinie deren Intermediärfilamente vollständig fehlen durch die AG Magin (Universität Leipzig), sind Studien zur Rolle der Intermediärfilamente für die mechanischen Eigenschaften von Zellen im Rahmen dieser Arbeit möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ziele gesetzt:

- Untersuchung zur Rolle zytoskeletaler Ausrichtung für die Kontraktilität der Zellmonolagen und der gewebeinternen mechanischen Spannungen
- Test der Widerstandsfähigkeit ausgerichteter Monolagen gegenüber hohen mechanischen Dehnungen
- Charakterisierung des Einflusses der Intermediärfilamente auf die mechanischen Eigenschaften von Zellmonolagen unter Dehnung



## THEORETISCHE GRUNDLAGEN

---

### 2.1 MIKROSKOPIETECHNIKEN

Seit Beginn der biologischen Forschung waren die großen Entdeckungen auch stets mit der Entwicklung neuer oder der Weiterentwicklung vorhandener mikroskopischer Methoden verknüpft. Eines der ersten Mikroskope wurde von Robert Hooke verwendet, der 1665 während des Studiums von Hohlräumen in einem Stück Flaschenkork, den Begriff der Zelle maßgeblich prägte. Heutzutage ist eine Vielzahl mikroskopischer Techniken vorhanden, die umfassende Untersuchungen zellulärer Objekte in zwei oder drei Dimensionen erlauben. Der folgende Abschnitt soll den Leser einen kurzen Überblick der Arbeitsprinzipien der verwendeten Techniken gegeben.

#### 2.1.1 Kontrastverfahren

Aufgrund der geringen Unterschiede der Brechungsindizes zwischen Zellen und ihrem umgebenden Medium fällt der daraus resultierende Amplitudenkontrast sehr gering aus. Folgende Verfahren wurden daher zur Kontrasterhöhung verwendet:

*Phasenkontrast:* Wie im Namen enthalten, macht sich die Phasenkontrastmikroskopie die Veränderung der Phase des Lichtstrahl bei Transmission der Probe zunutze. Um Phasenverschiebung in eine Amplitudenverschiebung umwandeln zu können, wird zunächst das einfallende Licht auf einen bestimmten Einfallswinkel beschränkt. Dadurch fallen Lichtstrahlen, die die Probe nicht passieren, auf den *Phasenring* und werden sowohl gedämpft als auch in ihrer Phase um  $90^\circ$  verschoben. Passieren jedoch Lichtstrahlen transparente Objekte werden diese ablenkt und fallen nicht auf den Phasenring (Murphy und Davidson, 2013). Objekt und Hintergrundlicht können dann entsprechend in der Bildebene interferieren und somit Kontrast erzeugen. *verwendet für:* Zellkultur; Ablationsexperimente

*Differentialinterferenzkontrast (DIC):* Der auf Polarisationsmikroskopie beruhende Differentialinterferenzkontrast nutzt die Interferenz paralleler, senkrecht zueinander polarisierter Strahlenpaare zur Kontrasterzeugung aus. Diese werden in einem entsprechenden Prisma erzeugt und passieren die Probe voneinander getrennt. Die Distanz zwischen den Strahlenpaaren, auch *Scherdistanz* genannt, ist genauso klein wie oder kleiner als

die Auflösung des Mikroskops (Murphy und Davidson, 2013). Transmittieren nun die Strahlenpaare die Probe, legen diese bei lokalen Unterschieden der Brechungsindizes unterschiedliche optische Wege zurück und erzeugen danach durch Interferenz im Gegenstück zum vorher beschriebenen Prisma elliptisch polarisiertes Licht. Im Gegensatz zum linear polarisierten Hintergrund, kann dieses Licht den entsprechend eingestellten Analysator durchdringen und sorgt somit für den gewünschten Kontrast. Da der Kontrast nur vom (lokalen) Gradienten der Brechungsindizes abhängt, wird er auch als differentiell bezeichnet. Ein großer Vorteil vom DIC gegenüber dem Phasenkontrast besteht darin, dass die Kontrasterzeugung nicht so stark vom einfallenden Winkel des transmittierten Lichts abhängt wie beim Phasenkontrastverfahren. Dadurch wird die Kontrasterzeugung auch bei Verwendung von Elastomerkammern mit zum Teil intransparenten, lokal streuenden Einschlüssen weniger stark beeinträchtigt und wurde daher für einen Großteil der Experimente präferiert. *verwendet für*: alle Experimente am Aufbau des aufrechten Mikroskops, Rasterkraftmikroskopie an Zellen

*Fluoreszenzmikroskopie*: Mit entsprechender Markierung können intrazelluläre Proteine mit Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Dabei können die Farbstoffe mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden, wobei Elektronen der Farbstoffe vorübergehend auf ein höheres Energieniveau gebracht werden. Dieser Zustand ist instabil und resultiert in einem Übergang der Elektronen vom höheren wieder zurück zum Ursprungsniveau, wobei die freiwerdende Energie wieder in Form von Licht abgegeben wird. Da das emittierte Licht jedoch eine größere Wellenlänge als das anregende Licht aufweist, kann es mit einem entsprechenden Filtersystem vom anregenden Licht getrennt detektiert werden (Murphy und Davidson, 2013). *verwendet für*: Immunzytochemische Analysen, Deformationsexperimente der K14-Mutante

### 2.1.2 Rasterkraftmikroskopie

Zur Ermittlung lokaler Zellsteifigkeiten wurde in dieser Arbeit Rasterkraftmikroskopie (RKM) verwendet. RKM, entwickelt von Gerd Binnig, Calvin Quate und Christoph Gerber im Jahr 1986 (Binnig et al., 1986), wurde ursprünglich zur mechanischen Bildgebung eingesetzt. Das Herzstück der RKM stellt dabei eine an einem Metallchip befestigte Nadel dar, der *Cantilever*. Die Spitze des Cantilevers kann durch Wechselwirkungen mit der zu untersuchenden Probe<sup>1</sup> ausgelenkt werden. Dabei rastern zwei Piezo-Elemente gitterförmig die Oberfläche (in x- und y-Richtung) ab. Ein drittes Piezo-Element reguliert dabei in vertikaler Richtung nach (z-Richtung). Die Auslenkung des Cantilevers wird

<sup>1</sup> z.B. durch *van der Waals*-Kräfte oder Pauli Repulsion

dabei über optische Sensoren aufgenommen ([Abbildung 2.1](#)) und mittels Computer zu einem Abbild der Oberflächentopografie zusammengesetzt.

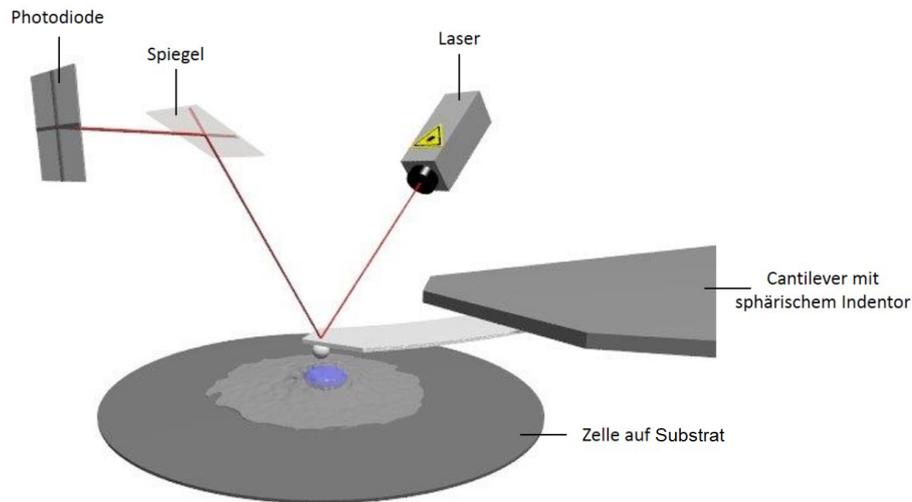


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des RKM-Messprinzips: Die Höhe der Cantilever-Spitze wird über die Reflexion eines Laserstrahls an dessen Rückseite kontrolliert. Trifft der Laserstrahl auf die Vier-Quadranten-Photodiode während der Cantilever ausgelenkt ist, tritt eine Photospannung auf, welche mit der Auslenkung korreliert. Abbildung aus Jungen, 2017

Das Anwendungsfeld der RKM-Techniken wurde seit der Entwicklung der RKM stark erweitert. Insbesondere der Einsatz in Flüssigkeiten ermöglicht dabei die Analyse biologischer Proben unter physiologischen Bedingungen, welches zur breiten Anwendung des Rasterkraftmikroskops in der Zellbiologie bzw. biologischen Physik führte. In dieser Arbeit wurde das RKM zur kraftspektroskopischen Analyse zellulärer Monolagen verwendet. Dabei wurde nicht über die Oberflächen gerastert, sondern die Zellen vertikal indentiert (eingedrückt). Die Auslenkung der Cantileverspitze wird dazu in Abhängigkeit von der Höhe des vertikalen Piezo-Elements (*z-Piezo*) detektiert. In [Abbildung 2.2](#) ist eine Messung schematisch dargestellt. Ein Messzyklus kann in Annäherungs- und Rückzugsphase unterteilt werden. Während ersterer wird der Cantilever auf die Probe abgesenkt bis dieser sie berührt. Anschließend drückt dieser die Zellen ein bis ein vorher definierter Kraft-Sollwert erreicht ist. Einzig diese Phase wird für die Steifigkeitsanalysen verwendet. Sobald der Sollwert erreicht ist, beginnt die Rückzugsphase, wobei in den ersten Momenten der gebildete Kontakt zwischen Cantilever und Zelle den rückwirkenden Kräften standhalten kann. Sobald diese Kräfte hoch genug sind, um die Adhäsion zu lösen, kann der Cantilever in seine ursprüngliche Position zurückgefahren werden.

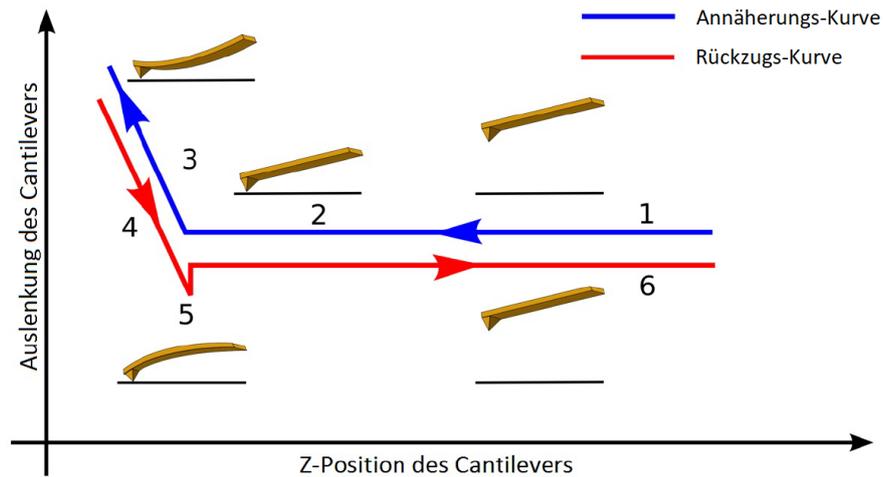


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines Messzyklus. Die Annäherungskurve (blau, von rechts nach links) unterteilt sich in Annäherungsphase (1), Kontaktpunkt (2) und Indentation (3). Die Rückzugskurve (rot, von links nach rechts) bestehend aus Relaxation (4), dem Punkt maximaler Adhäsion (5) und Rückzugsphase (6), schließt sich dieser an. Abbildung aus Jungen, 2017.

Die während der Indentation gemessene Höhe des z-Piezos  $h_z$  beinhaltet zwei parallel aufgenommene Größen: Ein linearer, elastischer Anteil  $d$ , der die Auslenkung des Cantilevers angibt und die tatsächliche Indentation  $\delta$  in die zelluläre Probe. Das Verhältnis dieser Größen zueinander kann wie folgt angegeben werden:

$$h_z = d + \delta \quad (2.1)$$

Die Auslenkung des Cantilevers kann mit der in [Unterunterabschnitt 2.1.2.1](#) ermittelten Federkonstante  $k$  entsprechend dem Hookeschen Gesetz extrapoliert werden:

$$d = F/k \quad (2.2)$$

mit der Kraft  $F$ .

Damit berechnet sich die Indentation über:

$$\delta = h_z - F/k \quad (2.3)$$

#### 2.1.2.1 Kalibration

Die reinen Messdaten beinhalten die Höhe des z-Piezo-Elements und die Auslenkung der Cantileverspitze. Um die zwischen Cantilever und Probe wirkenden Kräfte berechnen zu

können, wurde vor jeder Messung die Sensitivität der Photodiode und die Federkraftkonstante des Cantilevers ermittelt. Erstere kann über eine Photospannung-Abstandskurve in einer Petrischale ermittelt werden. Da bei dieser Art von Messungen ausschließlich Cantilever verwendet werden die wesentlich weicher als Petrischalen sind, kann dabei die Substratindentation vernachlässigt werden. Dadurch kann die Auslenkung des Cantilevers, detektiert mit einer Photospannung, in Abhängigkeit von der Höhe des Z-Piezos aufgenommen werden. Aus geometrischen Überlegungen kann eine lineare Korrelation zwischen der Photospannung  $U_C$  und der Höhe des z-Piezos  $h_z$  während der Indentation angenommen werden. Der Kehrwert des Anstiegs dieser Funktion wird im Folgenden als *Sensitivität*  $s$  bezeichnet:

$$s = \frac{1}{A} = \frac{\Delta h_z}{\Delta U_C} \quad (2.4)$$

mit  $A$ , dem Anstieg der Anpassung.

Eine effiziente Methode zur Ermittlung der Federkonstante  $k$  des Cantilevers ist die nach Hutter und Bechhoefer, 1993, die das Schwingungsspektrum des Cantilevers zur Berechnung verwendet. Mit entsprechender Software ist sie sehr schnell und automatisiert anwendbar. Im Folgenden wird der Cantilever als eindimensionaler harmonischer Oszillator angenommen und die vertikale Auslenkung des Cantilevers  $d$  als einziger Freiheitsgrad:

$$\frac{1}{2} m \omega_0^2 \langle d^2 \rangle = E_{\text{thermisch}} = \frac{1}{2} k \langle d^2 \rangle \quad (2.5)$$

mit der Masse des Cantilevers  $m$ , der Resonanzfrequenz  $\omega_0$ , Federkonstante  $k$  und der mittleren quadratischen Verschiebung  $\langle d^2 \rangle$ , welche durch das thermische Rauschen hervorgerufen wird.

Über das Äquipartitionstheorem kann der Zusammenhang der mittleren Energie eines Systems mit seiner Temperatur angegeben werden. Dabei besitzt im thermischen Gleichgewicht des Systems jeder Freiheitsgrad die gleiche mittlere Energie.

$$\frac{1}{2} k \langle d^2 \rangle = E_{\text{thermisch}} = \frac{1}{2} k_B T \quad (2.6)$$

mit der Boltzmann Konstante  $k_B$  und der Temperatur  $T$ .

Mittels Durchstimmen der Frequenzen kann das zugehörige Schwingungsspektrum des Cantilevers in Medium aufgenommen werden. Seine spektrale Leistungsdichte  $P$

kann mit einer Lorentzfunktion um seine Resonanzfrequenz modelliert werden (siehe auch [Abbildung 2.3](#)):

$$P = \frac{D/(2\pi^2)}{(Q/f_0)^2(f_0^2 - f^2)^2 + f^2} \quad (2.7)$$

Mit der Frequenz  $f$ , der charakteristischen Frequenz des Cantilevers  $f_0 = \frac{k}{4\pi^2 m}$ , dem Reibungskoeffizienten  $\gamma$  im Medium, dem Qualitätsfaktor des Cantilevers  $Q = \frac{\sqrt{mk}}{\gamma}$ , der Masse des Cantilevers  $m$  und  $D = \frac{k_B T}{\gamma}$ .

Die Fläche unter der Anpassungskurve entspricht dabei der Energie des Systems für den Resonanzfall. Durch Integration kann  $\langle d^2 \rangle$  analytisch berechnet werden und so mithilfe von [Gleichung 2.6](#) auch die Federkonstante  $k$ .

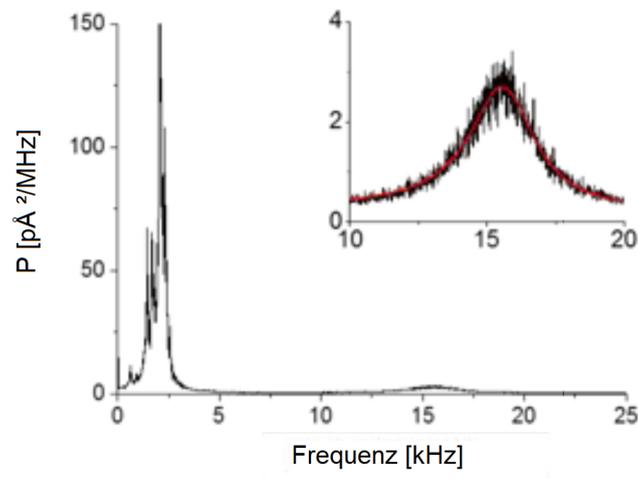


Abbildung 2.3: Ermittlung der Cantilever-Federkonstante über die spektrale Leistungsdichte. Das Spektrum des verwendeten Cantilevertyps ist hier beispielhaft gezeigt. *oben rechts*: Vergrößerung des Spektrums um das zweite Resonanz-Maxima mit Lorentz-anpassung (*rot*). Abbildung verändert nach Fabris, 2016.

## 2.2 BERECHNUNG DER GEOMETRISCHEN MOMENTE

In [Unterabschnitt 4.3.3](#) wurden Zellmonolagen ablatiert. Um die dabei entstehenden Risse analysieren zu können wurden Ellipsen an die Risse mithilfe der Bildmomente der Rissflächen angepasst. Dieses Vorgehen ist im Folgenden skizziert. Die Bildmomente geben das gewichtete Mittel der Pixelintensitäten des Bildes wieder. Da die hier ermittelten Flächen binär sind und somit jedem Pixel der gleiche Grauwert zugeordnet ist, können die Bildmomente mathematisch mit den Momenten eines massebehafteten starren Körpers mit konstanter Dichte verglichen werden. Dabei entspricht sein Moment nullter Ordnung seiner Masse, mit dem Moment erster Ordnung kann der Massenmittelpunkt (der hier auch dem geometrischen Mittelpunkt entspricht) berechnet werden und die Momente zweiter Ordnung sind mit seinen Trägheitsmomenten verknüpft.

Allgemein ist das Moment  $(p+q+r)$ ten-Grades definiert als

$$M_{pqr} = \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} \int_{-\infty}^{\infty} x^p x^q x^r f(x, y, z) dx dy dz \quad (2.8)$$

mit  $p, q, r = 0, 1, 2, \dots$  und  $f(x, y, z)$  ist stetig.

Für die hier verwendeten 2D-Grauwertbilder mit den Pixelkoordinaten  $\vec{x}_m = [x_m, y_m]^T$ ,  $m = 1, \dots, n$ , und den Grauwerten  $g(x, y) = 1$  ist das Moment definiert als:

$$M_{ij} = \sum_{m=1}^n \sum_{m=1}^n x_m^i y_m^j g(x, y) \quad (2.9)$$

mit  $i, j = 0, 1, 2$

Der Schwerpunkt der markierten Fläche  $\bar{x}, \bar{y}$  kann dann über die Momente bestimmt werden:

$$(\bar{x}, \bar{y}) = \left( \frac{M_{10}}{M_{00}}, \frac{M_{01}}{M_{00}} \right) \quad (2.10)$$

Für die translations-invarianten zentralen Momente  $\mu_{ij}$  ergibt sich durch Verschiebung der Momente in den Schwerpunkt:

$$\mu_{ij} = \sum_{m=1}^n \sum_{m=1}^n (x_m^i - \bar{x})(y_m^j - \bar{y}) g(x, y) \quad (2.11)$$

und für die Orientierung  $\theta$ , dem Drehwinkel der Hauptachse:

$$\tan 2\theta = \frac{2\mu_{11}}{\mu_{20} - \mu_{02}} \quad (2.12)$$

Weiterhin kann die Pixelverteilung über die Kovarianz-Matrix  $C$  dargestellt werden. Diese ist definiert über die äußeren Produkte der Pixelkoordinaten nach Verschiebung des Koordinatensystems in den Schwerpunkt:

$$C = \frac{1}{n} \sum_{m=1}^n \begin{pmatrix} x_m - \bar{x} \\ y_m - \bar{y} \end{pmatrix} (x_m - \bar{x} \ y_m - \bar{y}) \quad (2.13)$$

$$C = \frac{1}{n} \begin{pmatrix} \sum_{m=1}^n (x_m - \bar{x})^2 & \sum_{m=1}^n (x_m - \bar{x})(y_m - \bar{y}) \\ \sum_{m=1}^n (x_m - \bar{x})(y_m - \bar{y}) & \sum_{m=1}^n (y_m - \bar{y})^2 \end{pmatrix} \quad (2.14)$$

$$C = \frac{1}{\mu_{00}} \begin{pmatrix} \mu_{20} & \mu_{11} \\ \mu_{11} & \mu_{02} \end{pmatrix} \quad (2.15)$$

Folgend wurde eine an den Achsen ausgerichtete nicht-isotrope 2D Gauss-Funktion an die Fläche angepasst. Dabei wurde für den Mittelwert  $(\bar{x}, \bar{y})$  verwendet. Die Varianzen in beiden Richtungen wurden über die Diagonalelemente von  $C$  berechnet:

$$\sigma_x^2 = \mu_{20}/\mu_{00} \quad (2.16)$$

$$\sigma_y^2 = \mu_{02}/\mu_{00} \quad (2.17)$$

Durch [Gleichung 2.12](#) ist die Orientierung der Fläche bekannt, womit auch die Gaussfunktion orientiert werden kann und bei einer bestimmten Höhe in  $z$  entspricht die von der Gaussfunktion umrandete Fläche der passendsten elliptischen Annäherung:

$$R = \{(x, y) : ax^2 + bxy + cy^2 \leq 1\} \quad (2.18)$$

wobei die Bedingung  $ac \geq b^2$  die elliptische Form sicher stellt.

Es kann außerdem gezeigt werden, dass die zentralen Momente zweiter Ordnung mit den Koeffizienten der Ellipse verknüpft sind:

$$C = \frac{1}{\mu_{00}} \begin{pmatrix} \mu_{20} & \mu_{11} \\ \mu_{11} & \mu_{02} \end{pmatrix} = \frac{1}{\eta} \begin{pmatrix} c & -b \\ -b & a \end{pmatrix} \quad (2.19)$$

Ohne Beschränkung der Allgemeinheit können für eine an den Koordinatenachsen ausgerichtete Ellipse ( $b=0$ ) die beiden Halbachsen  $x = \pm\sqrt{\frac{1}{a}}$  und  $y = \pm\sqrt{\frac{1}{c}}$  angegeben

werden. Mit  $\mu_{11} = 0$ , da  $b = 0$  können die Eigenwerte der Kovarianz-Matrix  $\lambda_{1/2}$  so berechnet werden, dass sie zusammen mit [Gleichung 2.16](#) und [Gleichung 2.17](#) die Relationen  $\lambda_1 = \mu_{20}/\mu_{00}$  und  $\lambda_2 = \mu_{02}/\mu_{00}$  ergeben. Wegen [Gleichung 2.19](#) gilt:  $a = \frac{\mu_{02}}{\eta\mu_{00}}$ . Mit der Determinante  $\det(C) = (\mu_{20}\mu_{02} - \mu_{11}^2/\mu_{00}^2)$  und  $\eta = 4\det(C)$  folgt für das Ergebnis für die große Halbachse der Ellipse:

$$\sqrt{\frac{1}{a}} = \sqrt{\frac{\eta\mu_{00}}{\mu_{02}}} = \sqrt{\frac{4\mu_{20}\mu_{02}\mu_{00}}{\mu_{00}^2\mu_{02}}} = \sqrt{\frac{4\mu_{20}}{\mu_{00}}} = 2\sqrt{\frac{\mu_{20}}{\mu_{00}}} = 2\sqrt{\lambda_1} \quad (2.20)$$

Die Berechnung der kleinen Halbachse erfolgt äquivalent zur großen Halbachse.



## MATERIAL UND METHODEN

---

Einer der Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit war die Etablierung neuer Methoden zur mechanischen Charakterisierung epithelialer Zellmonolagen. Das betraf sowohl Anpassungen der Substrate zur Zellkultivierung, vorgestellt in [Abschnitt 3.1](#), als auch die Entwicklung des Protokolls zur Generierung anisotroper Monolagen in [Abschnitt 3.2](#). Weiterhin wurden Anpassungen der *Stretchersysteme*<sup>1</sup> aus [Abschnitt 3.3](#) an die verwendeten Methoden durchgeführt, die anschließend in [Abschnitt 3.4](#) vorgestellt werden. Dazu gehören Kontraktilitäts- und Ablationsexperimente anisotroper Monolagen, Streckfestigkeitsversuche an epithelen Mikrogeweben sowie kraftspektroskopischen Analysen gedehnter Zellmonolagen. Die verwendeten Geräte und Materialien sind in [Abschnitt 3.5](#) tabellarisch aufgelistet.

### 3.1 ZELLSUBSTRATE

#### 3.1.1 Herstellung und Aufbau der Kammern

In der vorliegenden Arbeit wurden Elastomerkammern<sup>2</sup> zur Kultivierung von Zellen und Streckexperimente entsprechend Faust et al., [2011](#) verwendet.

Aufgrund seiner hohen Biokompatibilität und Transparenz, wurde das PDMS Elastomer<sup>3</sup> Sylgard (Dow Corning GmbH) benutzt. Für Dehnungsexperimente mit hohen Amplituden wurde ein Protokoll zur Verwendung von Silpuran (Wacker AG) erstellt. Beide Elastomere sind Zweikomponenten-Systeme, bei denen jeweils das Mischungsverhältnis ihre Steifigkeit und Elastizität nach der Kreuzvernetzung bestimmt. Die verwendeten Mischungsverhältnisse mit den entsprechenden Eigenschaften sind in [Tabelle 3.1](#) dargestellt.

Das zur Kammerherstellung verwendete Gussverfahren ist ausführlich in Faust et al., [2011](#) beschrieben. Dazu wurden die Elastomere in den entsprechenden Kreuzvernetzer-zu-Basisöl Verhältnissen gemischt und im Exsikkator mittels Vakuum entgast, womit eine spätere Luftblasenbildung im Silikon während der Kreuzvernetzung deutlich reduziert werden konnte. Anschließend wurden die flüssigen Elastomere exakt bis zur Unterkante der dreiteiligen Formen ([Abbildung 3.1](#)) gegossen. Für Sylgard wurde eine

---

<sup>1</sup> bezeichnen die im Institut entwickelten Dehnungsapparaturen, im Folgenden auch als *Stretcher* bezeichnet

<sup>2</sup> auch Silikonkautschukammern

<sup>3</sup> PDMS abgek. für Polydimethylsiloxan

Hitze-beschleunigte Kreuzvernetzung verwendet, bei der das Basisöl (vinylterminiertes Dimethylsiloxan) mit dem Kreuzvernetzer (Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan-Copolymer) durch katalytische Hydrolyse bei 60 °C reagiert.

Für Silpuran wurde das Verhältnis der A- zur B-Komponente (anderes, unbekanntes Polymer) so angepasst, dass der Anteil der für die Mikroskopie störenden Füllmaterialien reduziert werden konnte, ohne dass dabei die Dehnfähigkeit der Kammern stark beeinträchtigt wurde. Des Weiteren wurden alle Arbeitsschritte vor dem Kreuzvernetzen des Silikons im Kühlraum bei 6 °C durchgeführt, da bei Raumtemperatur das Silikon bereits während des Abgießens fest wurde. Das Entgasen des Silikons erfolgte entsprechend auf Eis.

Die Kreuzvernetzung von Sylgard erfolgte im Heizschrank für 16 h bei 60 °C bzw. von Silpuran über Nacht bei Raumtemperatur. Nach dem Ausbau der Kammern wiesen diese eine Vertiefung von 2 cm x 2 cm auf, in der später die Zellen kultiviert werden konnten. Der Boden unterhalb dieser Vertiefung verfügte über eine Stärke von 400 µm.

Da sich Silpuran als stark hydrophob und zugleich zytotoxisch erwies, wurden die Silpurankammern mit dem weniger hydrophoben, biokompatiblen Sylgard beschichtet. Dazu wurden die bereits kreuzvernetzten Kammern mit 150 µL Sylgard mittels Lackschleuder beschichtet (7 s bei 900 Umdrehungen pro Minute, Rampe 1, Lackschleuder Delta 10 TT, Süss MicroTec). Durch diesen Arbeitsschritt war es möglich, auch kleinere Steifigkeiten (wie 15 kPa) zu verwenden ohne dass die Kammerböden durchgingen. Die so produzierten Schichten wiesen eine Dicke von 130 µm (Mittelwert ± Quartile von 10 µm) auf, welche mithilfe eines aufrechten Mikroskops (Axio Imager M2) und eines 40x/1.0 NA W Plan-Apochromat Eintauchobjektivs bestimmt wurde. Dazu wurde die Differenz der *Z-Positionen*<sup>4</sup> zwischen *Signal*- und *Referenz*-Mikrokugeln (entsprechend [Abbildung 4.1](#)) in zwei unabhängigen Kammern ermittelt. Diese Werte wurden wegen des veränderten optischen Wegs in Sylgard (Brechungsindex  $n = 1.43$ ) korrigiert.

#### 3.1.1.1 Aufbau der Kammern für Kontraktilitätsanalysen

Für die Kontraktilitätsanalysen wurden Kammern aus Silpuran ( $E = 370 \text{ kPa}$ <sup>5</sup>) verwendet, die nach dem oben beschriebenen Protokoll mit 15 kPa Sylgard beschichtet wurden. Dabei handelt es sich um eine für Zellkraftanalysen von Epithelzellen übliche Steifigkeit (siehe auch Kirchenbüchler et al., 2010). Um die von den Zellen verursachten Deformationen auf den Oberflächen der Elastomere aufnehmen zu können<sup>6</sup>, wurden diese mit fluoreszierenden Mikrokugeln (Durchmesser  $d = 0.1 \text{ µm}$ , Anregung/Emission: 540/560 nm) kovalent gekoppelt. Dazu wurden die PDMS-Oberflächen für 3 min in 5 %-

<sup>4</sup> entsprechend der Position des Fokustriebes

<sup>5</sup> Das Elastizitätsmodul oder auch Youngsche Modul  $E$  ist ein Materialkennwert aus der Werkstofftechnik bekannt

<sup>6</sup> hierbei konnten ausschließlich Scherungen in der Ebene der Oberflächen detektiert werden

Massenanteil	Massenanteil	E [kPa]	Streckfestigkeit [%]
Basisöl (Sylgard)	Kreuzvernetzer		
40	1	50	30 - 40
50	1	15	> 40
Massenanteil	Massenanteil		
Silpuran A	Silpuran B		
1	4	370	> 100

Tabelle 3.1: Übersicht der Mischungsverhältnisse und Steifigkeiten der verwendeten Elastomere. Die Streckfestigkeit gibt die maximal tolerierte Dehnung an. *oben*: verwendete Verhältnisse für Sylgard, *unten*: Verhältnisse Silpuran

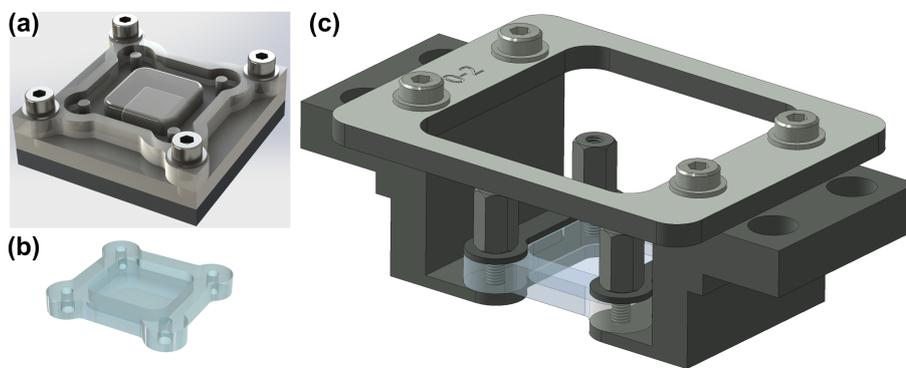


Abbildung 3.1: Mittels dreiteiliger Gussformen (a) werden Elastomerkammern (b) hergestellt. Diese können dann mittels Kammerhalter (c) für die Kultivierung von Zellen verwendet werden. Abbildung: J. Konrad.

tiger-APTES-Lösung<sup>7</sup> (vol/vol) inkubiert. Die Verdünnung erfolgte in 95 %-tigem Ethanol in Wasser (vol/vol) wobei ein pH-Wert von 4.5 – 5.5 mit Essigsäure eingestellt wurde. Darauf folgte ein Waschschriff mit Ethanol mit anschließender Vakuumtrocknung. Die fluoreszierenden Kugeln wurden mittels 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) und N-hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (Sulfo-NHS) via 15-minütiger Inkubation in MES-Puffer (2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure) aktiviert. Dabei wurden 0.1 %-tiges Natriumdodecylsulfat, 0.6 ppm Mikrokugeln<sup>8</sup>, 20 mg mL<sup>-1</sup> EDC und 20 mg mL<sup>-1</sup> NHS in MES-Puffer verwendet. Darauffolgend wurden die silanisierten Substrate für 1 min in der Lösung mit den aktivierten Kugeln inkubiert und anschließend gründlich mit Wasser gewaschen.

<sup>7</sup> (3-Aminopropyl)triethoxysilan

<sup>8</sup> engl. parts per million, *Anteile pro Million*

### 3.1.1.2 *Aufbau der Kammern für Ablationsexperimente*

Der Fokus der Kammeranpassung für die Schneidlasereperimente lag auf einer größtmöglichen Transmissivität der Kammerböden, da das verfügbare Schneidlasermodule nur in Kombination mit einem inversen konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 880) verfügbar war. Dazu wurde auf Kammern aus Sylgard (50 kPa) zurückgegriffen, da diese aufgrund des geringeren Anteils an intransparenten Füllmaterialien eine bessere Transparenz als Kammern aus Silpuran aufwiesen. Weiterhin wurden diese Kammern, wie bereits oben beschrieben, mit einer weiteren Schicht Sylgard (15 kPa) beschichtet, um dieselbe Substratsteifigkeit wie jene die für die Kontraktilitätsanalysen benutzt wurde zu verwenden.

### 3.1.1.3 *Aufbau der Kammern für Streckfestigkeitsanalysen*

Da für die Streckfestigkeitsversuche ein besonders dehnbares Kammermaterial nötig war, wurde auf Silpuran zurückgegriffen. Um die für die Auswertung notwendigen affinen Transformationen berechnen zu können (siehe auch [Unterabschnitt 3.4.3](#)), war es weiterhin nötig eine Referenz in die verwendeten Kammern einzubauen. Dazu wurde nach der Kreuzvernetzung der Kammern eine Schicht fluoreszierender Mikrokugeln (Durchmesser  $d = 0.5 \mu\text{m}$ , Anregung/Emission: 505/515 nm) physisorbiert und danach die zweite Elastomerschicht aufgetragen (Sylgard, 15 kPa). Die Zellmonolagen hatten keinen messbaren Einfluss auf die Positionen der Referenzkugeln. Dazu wurden die Positionen der Referenzkugeln vor und nach dem Ablösen der Zellmonolagen ermittelt und die Verrückungen entsprechend berechnet (siehe [Unterabschnitt 3.4.1](#)). Dabei konnte außer einem die gesamte Probe betreffenden Drift kein spezifisch zuordenbares Signal identifiziert werden. Das Protokoll zur Physisorption der Mikrokugeln wurde in mehreren Vortests von L. Reinmuth etabliert. Dazu wurde die Kugelsuspension in einem Verhältnis von 1 : 1000 in PBS (vol/vol) verdünnt und mindestens dreimal auf die Kammermitte pipettiert und wieder abgenommen.

### 3.1.1.4 *Aufbau der Kammern für RKM-Versuche*

Für die Rasterkraftmikroskopieversuche wurde Silpuran als Kammermaterial benutzt, um auch hier große Dehnungsamplituden verwenden zu können. Diese wurden wie oben beschrieben mittels Lackschleuder mit 50 kPa-Sylgard beschichtet.

### 3.1.1.5 *Aufbau der Kalibrationskammern*

Für die Ermittlung der lokal ankommenden Dehnung wurde der gleiche Kammeraufbau wie für die RKM-Versuche verwendet, wobei eine Schicht fluoreszierender Kugeln wie in [Unterabschnitt 3.1.1.1](#) beschrieben auf die Kammeroberfläche gekoppelt wurde. Zur Bestimmung der Stärke der per Lackschleuder aufgetragenen Sylgardschichten wur-

den die in [Unterunterabschnitt 3.1.1.1](#) beschriebenen Signal- und Referenz-Mikrokugeln entsprechend als Markierungen verwendet.

#### 3.1.1.6 Herstellung der Kontrollsubstrate

Für die Kontrollexperimente der Kontraktilitätsanalysen, die keine Dehnung der Zellen erforderten, wurden ca. 80  $\mu\text{m}$  starke, quadratische Deckgläser (20 x 20 mm, Typ # 00) mit Sylgard (15 kPa) beschichtet. Dazu wurden 150  $\mu\text{L}$  des Elastomers mittig auf das Deckglas gegeben und per Rotationsbeschichtung verteilt (1800 Umdrehungen pro Minute für 15 s, Rampe 1). Die so beschichteten Gläser wurden mit der Elastomerschicht nach oben unter Lochschalen gedrückt und bei 60 °C für 16 h im Heizschrank inkubiert.

#### 3.1.2 Kalibration der lokal ankommenden Dehnung

In dieser Arbeit erwähnte Dehnungsamplituden beziehen sich immer auf den zurückgelegten Verfahrensweg der Stretcher, der verwendeten Dehnung. Um die lokal bei den Zellen ankommende Dehnung zu ermitteln, wurde eine wie oben beschriebene Kalibrationskammer ohne Zellen verwendet. Dabei wurden die fluoreszierenden Mikrokugeln auf denselben Positionen sowohl vor als auch nach den einzelnen Dehnungsamplituden entsprechend dem in [Unterabschnitt 3.4.4](#) beschriebenen Protokoll aufgenommen. Dazu wurde ein aufrechtes Mikroskop (Axio Imager M2) mit einem 40x/1.0 NA W Plan-Apochromat Objektiv und der in [Abschnitt 3.3](#) beschriebene Einfach-Stretcher verwendet. Die während der Dehnung verwendete Geschwindigkeit von  $v = 0.15 \text{ mm/s}$  ermöglichte ein gleichzeitiges Nachfahren des Mikroskoptisches. Zur Auswertung wurden die affinen Transformationen<sup>9</sup> von je ca. 100 rechteckigen Bereichen in fünf, über die relevante Kammerfläche verteilten Regionen begutachtet ([Abbildung 4.2](#)). Die 30  $\mu\text{m}$  x 30  $\mu\text{m}$  großen Bereiche beinhalteten jeweils über 100 Mikrokugeln. Nachfolgend wurde dazu das Programm *affine beads tracking*, geschrieben von R. Springer, verwendet. Dafür mussten zunächst mittels normierter Kreuzkorrelation die entsprechenden Bereiche nach Dehnung wiedergefunden werden (siehe auch Kirchenbüchler, 2011). Die normierte Kreuzkorrelation kann nach [Gleichung 3.1](#) berechnet werden. Der damit ermittelte Korrelationskoeffizient  $r$  ist ein Maß für die Ähnlichkeit der Verteilungen der Grauwerte<sup>10</sup>. Der Korrelationskoeffizient ist  $r = 1$  bei vollständiger Übereinstimmung der Muster und  $r = 0$  bei keiner Übereinstimmung. Als Suchwert wurde  $r = 0.6$  verwendet, mit dem pro Bildbereich 15,000 - 30,000 Muster wieder gefunden werden konnten.

<sup>9</sup> Abbildung von Punkten bei der sowohl die Kollinearität als auch die Parallelität der Urbildpunkte bewahrt werden. Sind kollineare Punkte vorhanden, werden auch die Teilverhältnisse der Bildpunkte bewahrt.

<sup>10</sup> Im Gegensatz dazu wurden keine Binärbilder von Kugeln auf schwarzem Hintergrund für das *Tracking* verwendet.

*Randbemerkung:* Da später in der Arbeit auch quantitative Ergebnisse aus anderen Publikationen zitiert werden, wurde für diese Arbeit von vornherein der Punkt als Dezimaltrennzeichen verwendet und entsprechend das Komma als Tausendertrennzeichen.

$$r = \frac{\sum_x \sum_y (A_{xy} - \bar{A})(B_{xy} - \bar{B})}{\sqrt{\sum_x \sum_y (A_{xy} - \bar{A})^2 \sum_x \sum_y (B_{xy} - \bar{B})^2}} \quad (3.1)$$

mit A; B...Grauwerte Bild A; Bild B

$\bar{A}$ ;  $\bar{B}$  ... mittlere Grauwerte

x; y ... Pixelkoordinaten

Um die Dehnung der oben beschriebenen Bereiche berechnen zu können, wurden diese vom Zustand ohne Dehnung in den gedehnten gemorpht, was mittels affiner Transformation durchgeführt wurde. Diese wurde mit dem in Baker und Matthews, 2004 beschriebenen Lucas-Kanade-Algorithmus berechnet.

Aus der daraus erhaltenen Abbildungsmatrix wurden die Diagonalelemente  $\epsilon_{xx}$  und  $\epsilon_{yy}$  für die weiteren Analysen verwendet.

## 3.2 ZELLKULTUR

In dieser Arbeit wurden Experimente an murinen Keratinozyten mit unterschiedlichen genetischen Hintergründen durchgeführt. Die Kultivierung fand bei 32 °C in einer 5 % (vol/vol) CO<sub>2</sub>-Atmosphäre statt. Für die Langzeitkultur wurde ein Zellkulturmedium mit einer geringen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 50 µM verwendet, um eine Ausbildung von Zell-Zell Kontakten zu vermeiden. Sowohl die vergleichsweise niedrige Kulturtemperatur als auch der geringe Ca<sup>2+</sup>-Gehalt konnten spontane Differenzierungen der Zellen unterdrücken. Zur besseren Adhäsion wurden die Elastomeroberflächen mit Fibronectin (human, Corning), einem der Proteine der extrazellulären Matrix, beschichtet und über Nacht bei 4 °C kultiviert. Hierfür wurden 550 µL für Kammern und 300 µL für beschichtete Lochschalen mit einer Konzentration von 20 µg mL<sup>-1</sup> in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung; life technologies) verwendet.

### 3.2.1 Differenzierung muriner Keratinozyten

Die in [Abschnitt 4.3](#) verwendeten murinen Keratinozyten (E-Cadherin Wildtyp) wurden in der AG Niessen (Center für molekulare Medizin, Abteilung Dermatologie, Universität zu Köln) isoliert. Vor der Zellaussaat auf Kammern oder beschichtete Lochschalen wurde das Fibronectin abgenommen und 2-Kammer Ibidi-Kultureinsätze auf die Substratoberflächen geklebt. Die Kammern maßen jeweils 7 mm x 3 mm. Es wurden pro Kammer

10,000 Zellen in einem Volumen von 100  $\mu\text{L}$  Kulturmedium ausgesät. Somit konnten pro Elastomerkammer zwei mechanisch separierte Monolagen generiert werden<sup>11</sup>. Nach einer Adhärenzzeit von einer Stunde wurden die Einsätze vorsichtig wieder von den Oberflächen entfernt.

Danach wurde das Kulturmedium mit 550  $\mu\text{L}$   $\text{Ca}^{2+}$ -supplementiertem Medium (1.8 mM) ausgetauscht. Das Calcium diente der kontrollierten Differenzierung der Monolagen, wobei diese Zell-Zell-Kontakte ausbildeten. Das wie oben beschrieben supplementierte Medium wurde immer über Nacht auf der Kultur gelassen und die nachfolgenden Messungen wurden am nächsten Tag, in einem Zeitraum von 16 h bis 24 h nach Calcium-Zugabe durchgeführt. Zur Vereinfachung werden die so kultivierten Zellen im Folgenden auch als *gereift* bezeichnet. Die Zellkammern der Kultureinsätze werden durch eine 500  $\mu\text{m}$ -breite Wand separiert, die dann später auch dem Abstand der beiden Monolagen entsprach. Das Zellwachstum gereifter Monolagen über Nacht in diese Lücke war nie größer als ca. 50  $\mu\text{m}$  pro Seite. Für die Untersuchungen der zellulären Kontakte in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltigem Medium wurden entsprechend Zeiträume von 40 h bis 48 h nach Zugabe von Calcium verwendet. Für die Kontrollen (0 h  $\text{Ca}^{2+}$ ) wurden die gleichen Zeiträume wie die der gereiften Monolagen ohne die Verwendung von  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementiertem Medium benutzt. Diese werden im Folgenden auch als *nicht gereift* bezeichnet. Da die nicht differenzierten Keratinozyten wegen der fehlenden Einbindung in den Zellverband mobiler waren, wurden die Ibidi-Einsätze erst direkt vor Beginn der zyklischen Dehnung entfernt, ohne dass dabei das oben beschriebene Artefakt beobachtet werden konnte. Dadurch wurde ein Zuwachsen/Migration in die Lücke über Nacht verhindert. Für die Versuche an nicht gereiften Monolagen ohne Präkonditionierung wurden gleiche Zeiträume eingehalten, respektive wurden die Ibidi-Einsätze 4 h vor den Kontraktilitätsanalysen entfernt.

Direkt vor den Messungen wurde das Medium erneut mit 25 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) supplementiertem Medium (1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) ausgetauscht. Alle Messungen wurden innerhalb der nächsten 60 min durchgeführt.

### 3.2.2 Keratinozyten mit mutierten Keratinnetzwerken

Zur Untersuchung des Keratinzytoskeletts in [Abschnitt 4.5](#) wurde eine Keratin-*knock-out*-Mutante verwendet, die in der AG Magin (Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie, Universität Leipzig) etabliert wurde. Diese konnte erstmals den gesamten Keratin Typ I Genkomplex deletieren. Da aber zur Bildung von Keratin-

<sup>11</sup> unter der Annahme eines ausreichenden Abstands

Intermediärfilamenten immer sowohl der saure als auch der basische Dimerisationspartner nötig sind, blieb in Folge dessen die Bildung jegliche Keratine aus.

Zur mikroskopischen Untersuchung der Keratinfilamente in lebenden Zellen wurde die Rescue-Zelllinie KtyI<sup>-/-</sup> K14 verwendet. Zur Generierung der Zelllinie wurde in der AG Magin mithilfe von lentiviraler Transduktion wurde cDNA von murinem Keratin 14 in KO-Zellen eingebracht. Durch das so eingebrachte, saure K14 und die vorhandenen, basischen Keratinen konnte wieder ein stabiles Keratinnetzwerk entstehen (Vijayaraj et al., 2009, Kroeger et al., 2013).

Für die Elastizitätsmessungen wurden pro Elastomerkammer 100,000 Zellen ausgesät und durch vorsichtiges Schieben der Kammern zu einer gleichmäßigen Zellmonolage über die Kammeroberfläche (4.4 cm<sup>2</sup>) verteilt. Die Zellen wurden in einem Volumen von 550 µL ausgesät. Um ein Durchhängen des Kammerbodens aufgrund des Gewichts des Mediums zu verhindern, wurde in Faust et al. Faust et al., 2011 für Sylgardkammern (50 kPa) eine Vordehnung um 7.5 % der ursprünglichen Kammerlänge ermittelt. In dieser Arbeit wurden 10 % Vordehnung verwendet. Für die verwendeten Silpuran-kammern konnte wegen der höheren Steifigkeit (370 kPa) ein geringeres Durchhängen angenommen werden. Nach einer Adhärenzzeit von 8 h wurde das Kulturmedium durch 1.8 mM Ca<sup>2+</sup> supplementiertes Medium ausgetauscht. Für die Messungen wurde wie oben HEPES supplementiertes Medium verwendet. Alle Messungen wurden innerhalb der nächsten 75 min durchgeführt.

### 3.2.3 Zellkulturprotokolle

#### *Immunfärbungen*

Mittels immunzytochemischer Färbungen konnten Proteine des Zytoskeletts und der zellulären Adhäsionen sichtbar gemacht und dadurch die Differenzierung und Ausrichtung der Monolagen charakterisiert werden. Dazu erfolgte eine Fixierung der Zellen in 3.7%-tigem Paraformaldehyd (PFA) in Zytoskelett(CB)-Puffer für 20 min bei 37 °C, welche mit 20 mM Glycin-CB abgestoppt wurde. Anschließend wurden die Zellmembranen mit 0.5%-tigem Triton in CB-Puffer für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Dadurch konnten die verwendeten Antikörper in die Zellen eindringen. Nach dem darauffolgenden dreimaligen Waschen mit CB-Puffer wurden die unspezifischen Antikörperbindestellen mit Milchpulver blockiert. Dazu wurde mit 5%-tiger Milchpulver-CB-Lösung für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben mit der primären Antikörperlösung (1 : 200 in CB) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit 1%-tiger Milchpulver-CB-Lösung gewaschen. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden danach die Proben in sekundärer Antikörperlösung (1 : 200 in CB) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Proben drei-

mal mit CB gewaschen. Die Analyse der gefärbten Strukturen erfolgte mittels aufrechten Mikroskops (Axio Imager M2) und 40x/1.0 NA W Plan-Apochromat Objektivs.

#### *Passage der Zellen*

Nach dem Zuwachsen der Kulturflächen auf 90 % Konfluenz<sup>12</sup>, wurden die Zellen einmalig mit 37 °C warmem PBS gewaschen und für 10 min bis 15 min in Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die enzymatische Reaktion des Trypsins mit serumhaltigem Medium abgestoppt und anschließend die Zellsuspension für 3 min bei 180 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und entsprechend für folgende Experimente verwendet oder auf 40 % Konfluenz in Kulturflaschen für die Langzeitkultur ausgesät. Die Zellzahl wurde dabei mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

#### *Kryokonservierung*

Die Kryokonservierung erfolgte in Keratinozyteneinfriermedium (300,000 Zellen auf 500 µL pro Kryoröhrchen) bei –80 °C in flüssigem Stickstoff.

### 3.3 AUFBAU UND ANPASSUNGEN DER STRETCHERSYSTEME

Die zur Dehnung der Elastomerkammern verwendeten Apparaturen wurden von W. Rubner entwickelt. Im Folgenden werden diese Apparaturen als *Stretcher* bezeichnet. Die zugehörige Software zur Ansteuerung der Stretcher wurde von W. Hürttlen entwickelt. Weitere technische Anpassungen wurden von J. Konrad durchgeführt. Die verwendeten Stretcher basieren auf einem Linearantrieb mit integriertem Getriebe (RB35, Conrad Electronic SE) und können ausschließlich für uniaxiale Dehnungen verwendet werden (siehe auch Faust et al., 2011). Der Schrittmotor kann die geforderten Amplituden mit einer Genauigkeit von 20 µm anfahren, wobei die Varianz der Amplituden während der Versuche nicht mehr als 10 µm betrug.

Zur Kultivierung der Zellen und zum Einbau der Elastomerkammern in die Stretcher wurden *Kammerhalter* verwendet. Darin wurden die Elastomerkammern ohne Vorspannung eingebaut und mit entsprechenden Klemmplättchen und Muttern fixiert. Anschließend wurden die Kammerhalter samt Kammern in die Stretcher eingebaut und um 10 % vorgedehnt. Damit konnte ein Durchhängen des Kammerbodens nach Befüllen der Kammern mit Kulturmedium vermieden werden (siehe auch Faust et al., 2011). Außerdem wurde somit auch das Sichtfeld für die Untersuchungen mit dem aufrechten Mikroskop vergrößert, da dadurch die verwendeten Eintauchobjektive mehr Platz zu den Kammerrändern zur Verfügung hatten. Für die Berechnung der Dehnungsamplituden

---

<sup>12</sup> Bedeckungsgrad

wurde die Kammerlänge nach Vordehnung verwendet. Eine Auflistung der verwendeten Amplituden ist in [Tabelle 3.2](#) zu finden. Dehnungen in den zur angewandten Dehnung transversalen Richtungen wurden vernachlässigt.

Die vorgespannten Kammern wurden über Nacht bei 4 °C mit Fibronektinlösung (20 µg mL<sup>-1</sup> in PBS) beschichtet.

Verwendung	Amplitude (mm)	Geschwindigkeit (mm/s)	Pausenlänge (s)
zyklische Dehnung (14%)	3.08	2.464	0.417
lineare Dehnung (25%)	5.5	0.15	-
lineare Dehnung (50%)	11	0.15	-
lineare Dehnung (75%)	16.5	0.15	-

Tabelle 3.2: Auflistung der zur Dehnung verwendeten Parameter. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Kammerlänge in Dehnungsrichtung nach Vordehnung auf 22 mm.

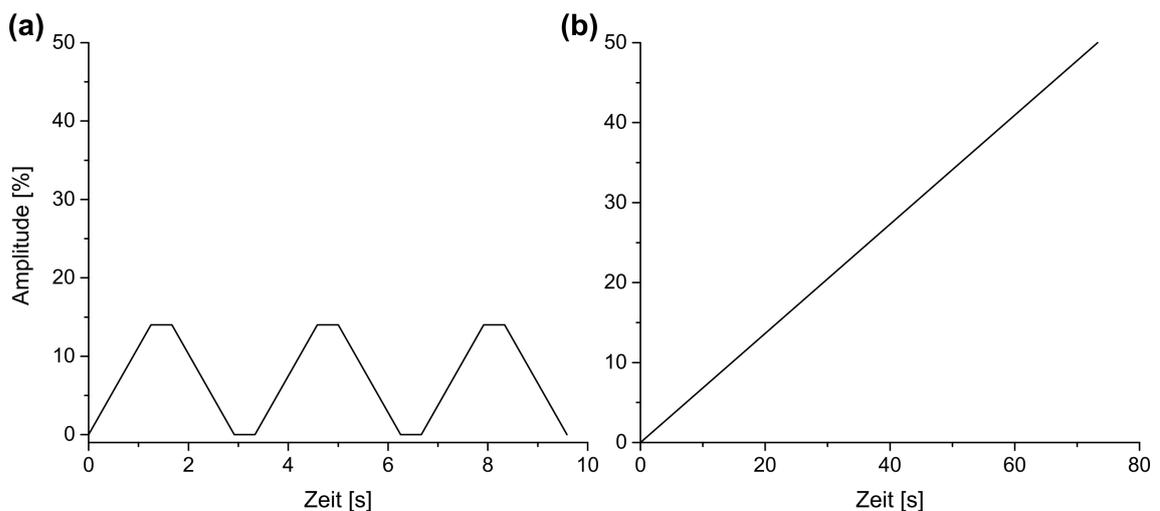


Abbildung 3.2: Darstellung der Stretch-Protokolle als Amplitude der angewandten Dehnung in Abhängigkeit von der Zeit: a) zyklisch, b) linear

### 3.3.1 Sechsfach-Stretcher

Für die Ausrichtung der Zellmonolagen wurde ein sechsfach-Stretcher verwendet, der die parallele Dehnung von sechs Proben ermöglichte (Abbildung 3.3). Dazu wurde das gleiche Protokoll wie bereits in Noethel et al., 2018 verwendet. Mit einer Frequenz von 300 mHz wurden die Zellen für vier Stunden im Inkubator unter Zellkulturbedingungen zyklisch gedehnt. Zwischen den Dehnungs- und Relaxationsphasen wurden Pausen eingehalten, die mittels Anpassung einer Trapezfunktion an die entsprechende Sinusfunktion berechnet wurden (siehe Abbildung 3.2). Die verwendeten Parameter sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

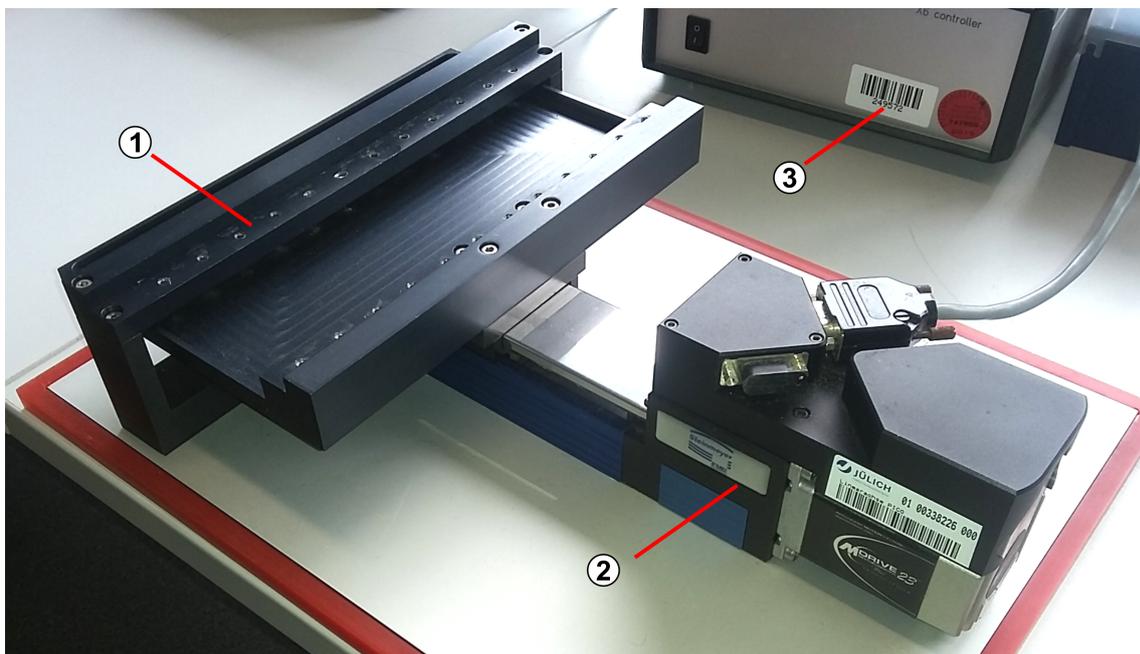


Abbildung 3.3: Aufnahme des Sechsfach-Stretchers: Die in (1) befindlichen Bohrungen ermöglichen den parallelen Einbau von sechs Elastomerkammern. Der computergesteuerte Linearantrieb (2) ist mit der Kontrolleinheit (3) verbunden und kann Amplituden von bis zu 200 % der ursprünglichen Kammerlänge in Dehnungsrichtung anfahren.

### 3.3.2 Einfach-Stretcher

Sowohl für die Streckfestigkeitsanalysen als auch zur Fixierung der Kammern während der Kontraktilitätsanalysen wurde ein Einfach-Stretcher verwendet. Dieser Stretcher wurde entsprechend so angepasst, dass er unter einem aufrechten Mikroskop verwendet

und die Proben mittels Eintauchobjektiven ( $NA = 1.0$ )<sup>13</sup> mikroskopiert werden konnten ([Abbildung 3.4](#)). Dazu wurde der Stretcher auf eine Metallplatte geschraubt die in einen speziell angefertigten Adapter auf dem Mikroskoptisch passte. Weiterhin wies die Metallplatte mittig eine Aussparung auf, wodurch die Proben von unten mit dem Kondensator beleuchtet werden konnten. Da die verwendeten Eintauchobjektive in direktem Kontakt mit dem die Zellen umgebenden Medium standen, konnte eine wesentlich bessere optische Auflösung als mit inverser Mikroskopie erzielt werden, bei welcher durch den Kammerboden hätte mikroskopiert werden müssen. Bei Letzterer hätte das Licht sowohl zwei zusätzliche Grenzflächen als auch den ca. 500  $\mu\text{m}$  starken Kammerboden inklusive der mikroskopischen Einschlüsse passieren müssen. Hinzu käme, dass die inverse Mikroskopie nur mit Luftobjektiven mit einem entsprechenden Arbeitsabstand möglich gewesen wäre, welche ein deutlich schlechteres Auflösungsvermögen besitzen<sup>14</sup> ( $NA \leq 0.6$ ).

Mit diesem Aufbau konnte eine Auflösung erzielt werden, die es erstmals ermöglichte die von Zellen verursachten Verrückungen fluoreszierender Kugeln aufzunehmen und entsprechend zu analysieren.

### 3.3.3 *Stretcher für Rasterkraftmikroskopie*

Der für die Rasterkraftmikroskopie verwendete Stretcher basiert auf dem Einfach-Stretcher. Dieser wurde so angepasst, dass parallel zu den Stretchexperimenten auch Licht- und Rasterkraftmikroskopie möglich war. Der RKM-Stretcher wurde eigens für die hier verwendeten Analysen entwickelt und ist näher in [Unterabschnitt 4.5.1](#) beschrieben.

<sup>13</sup> Die *numerische Apertur* (NA) korreliert nach der Abbe'schen Auflösungsformel direkt mit dem Vermögen des Objektivs, Objekte gerade noch getrennt wahr zu nehmen:  $d = \frac{\lambda}{NA}$  mit dem kleinstmöglich auflösbaren Abstand zweier Objekte  $d$  und der Wellenlänge  $\lambda$

<sup>14</sup> Diese sind hier erwähnt, da sie trotzdem bei den RKM- und Ablationsversuchen zum Einsatz kamen und der Leser sie somit besser im Verhältnis zu dem hier beschriebenen System beurteilen kann.

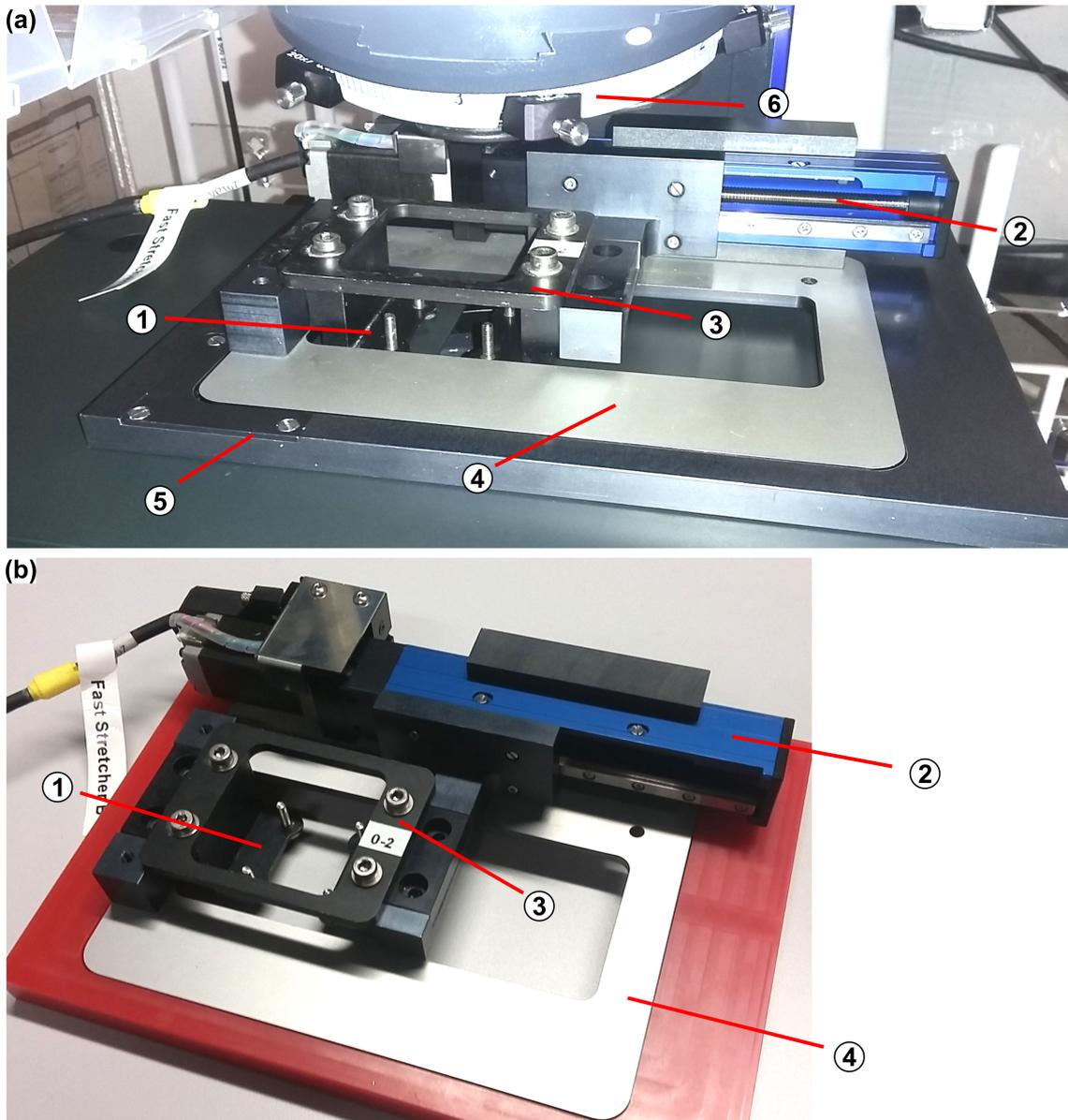


Abbildung 3.4: Experimentaufbau am aufrechten Mikroskop mit Einfach-Stretcher (a) und Einzelaufnahme des Einfach-Stretchers (b): Der Kammerhalter (*hier ohne Elastomerkammer gezeigt*) (1) kann von oben in den Einfach-Stretcher (2) eingesetzt und verschraubt werden. Für die Dehnungsexperimente kann dann der Halterahmen (3) abgeschraubt werden. Der digital gesteuerte Einfach-Stretcher ist auf einer Metallplatte (4) verschraubt, die in den zugehörigen Tisch-Adapter (5) eingesetzt werden kann. Der Objektivrevolver (6) befindet sich danach direkt über dem Kammerhalter und ermöglicht so die Verwendung von Eintauchobjektiven.

### 3.4 EXPERIMENTMETHODEN

#### 3.4.1 Kontraktilitätsanalysen

Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit L. Reinmuth durchgeführt. Dafür wurde der in [Abbildung 3.4](#) gezeigte Aufbau verwendet. Für die Bildgebung wurde ein aufrechtes Mikroskop (Axio Imager M2) und ein 40x/1.0 NA W Plan-Apochromat Objektiv verwendet. Die Zellen wurden wie in [Unterabschnitt 3.2.1](#) beschrieben kultiviert und entsprechend [Unterabschnitt 3.3.1](#) präkonditioniert. Für jede Probe wurden sowohl Aufnahmen der Zellen im Durchlichtkanal als auch von den zugehörigen Signal-Mikrokugeln im Fluoreszenzkanal an derselben Stelle gemacht. Dabei wurden die Positionen so angefahren, dass zwei Drittel des Bildausschnitts die Zellmonolage und ein Drittel die leere Kammer zeigten. Da die Kammern meist eine leichte Schräglage aufwiesen, konnte nur ein Teil des Bildbereichs der Kammer scharf abgebildet werden. Daher wurde pro Kanal ein Z-Stapel aufgenommen, mit dem später diese Schräglage rechnerisch kompensiert werden konnte. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass in dem Bereich vor der Monolage keine weiteren Zellen lagen, da diese die Verschiebungsfelder verfälscht hätten. Pro Kammer wurden so maximal fünf Positionen in einem Zeitraum von maximal 20 min aufgenommen. Danach wurden die Zellen abgelöst, in dem sie erst mit Milli-Q® Wasser gespült und dann mit zehnfach-konzentriertem Trypsin für 5 min inkubiert wurden. Beide Arbeitsschritte wurden wiederholt, gefolgt von zwei weiteren Waschschrritten mit Milli-Q®-Wasser. Anschließend wurden nochmals die oben erwähnten Positionen angefahren und entsprechende Referenzaufnahmen in der leeren Kammer in beiden Kanälen durchgeführt.

##### 3.4.1.1 Prozessierung der Rohdaten

Für die Auswertung der Kontraktilitätsanalysen wurden die aufgenommenen Z-Stapel mit dem Fiji-Plugin *extended depth of field* prozessiert. Dabei wurden die fokussierten Bildanteile der einzelnen Ebenen verwendet, um diese mittels wavelet-Algorithmus (siehe auch Forster et al., 2004) zu einem scharfen Bild rechnerisch zusammzusetzen. Die nächsten Schritte wurden mit dem von N. Kirchgeßner und S. Houben entwickelten Programm *Cell Force Analysis* durchgeführt.

Zur Driftkorrektur wurden mindestens fünf Rechtecke manuell über den gesamten Randbereich des Bildes verteilt auf die zellfreie Seite gesetzt (siehe auch [Abbildung 3.5](#)). Anschließend wurden die Verschiebungen der gleichen Rechtecke in den Bildpaaren vor/nach Trypsinierung der Zellen ermittelt. Dazu wurde die wie bereits in [Unterabschnitt 3.1.2](#) beschriebene normalisierte Kreuzkorrelation verwendet um glei-

che Grauwertmuster der Oberflächenkugeln innerhalb der Rechtecke wieder zu finden. Über dem Mittelwert der Verschiebungen der einzelnen Rechtecke wurden dann die vorher/nachher-Aufnahmen zueinander Drift-korrigiert.

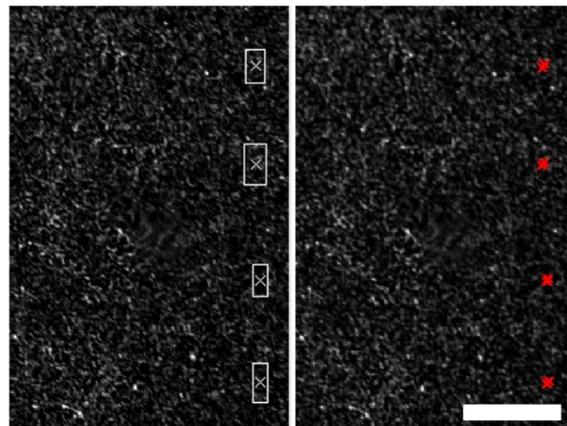


Abbildung 3.5: Korrektur des Drifts: Zur Verdeutlichung ist eine Vergrößerung des zellfreien Rands dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht  $20\ \mu\text{m}$ .

Anschließend wurden die Verrückungen der Mikrokugeln, ausgehend von ihren Positionen auf dem Bild *vor* dem Ablösen der Zellen zu den entsprechenden Positionen *nach* dem Ablösen, ermittelt. Dazu wurde jeweils manuell ein *Bereich von Interesse* (kurz: BvI<sup>15</sup>) ausgewählt. Dieser wurde mittig in das Durchlichtbild der Zellen vor dem Ablösen in den zellfreien Bereich gelegt. Dabei schnitt der zunächst quadratische,  $45\ \mu\text{m} \times 45\ \mu\text{m}$ -große Bereich den Rand der Zellmonolage an einer Seite. Um den Bereich an den Rand anzupassen wurde dieser in zur Ausrichtung des Randes paralleler Richtung (Y-Richtung) in fünf gleichgroße Streifen unterteilt<sup>16</sup>. Anschließend wurde jeder Streifen so weit in Richtung Monolagenrand verschoben, dass dieser ihn mit einer Seite berührte. Dazu wurden jeweils die Schnittpunkte der Mittellinien der Streifen mit dem Rand bestimmt (siehe auch [Abbildung 3.6 c](#)). Bei diesen Anpassungen wurden Filopodien-artige Zellausläufer wie in [Abbildung 3.6 d](#)) gezeigt nicht berücksichtigt. Im nächsten Schritt wurde jeder der Streifen nochmals unterteilt, um auch die Abhängigkeit der Kugelverrückungen vom Abstand des Randes untersuchen zu können. Daher wurde die Unterteilung in zur Orientierung des Randes senkrechter Richtung (x-Richtung) durchgeführt, was pro Streifen neun gleichgroße Rechtecke ergab<sup>17</sup>. Anschließend wurden die Bereiche verwendet, um die Verrückungen der Oberflächenkugeln im zugehörigen Fluoreszenzkanal zu analysieren. Dazu war die Unterteilung in y-Richtung nicht mehr notwendig, sodass jeweils fünf Rechtecke mit gleichen Abständen zum Rand wieder zusammengefasst wurden<sup>18</sup>. Entscheidend für die Zuordnung der Verrückungen zu den einzelnen Bereichen war

<sup>15</sup> der *Bereich von Interesse* wird allgemein als Übersetzung aus dem Englischen für den bekannteren Begriff *region of interest* verwendet.

<sup>16</sup> was jeweils  $45\ \mu\text{m} \times 9\ \mu\text{m}$  ergab

<sup>17</sup> und damit  $5\ \mu\text{m} \times 9\ \mu\text{m}$

<sup>18</sup> wodurch die letztendlich analysierten Flächen pro Abstandsintervall  $5\ \mu\text{m} \times 9\ \mu\text{m}$  groß waren

ausschließlich die jeweilige Kugelposition *vor* dem Ablösen der Zellen. Dabei wurden allein die Vektorbeiträge in x-Richtung betrachtet, da in dieser Richtung das größte zu erwartende Signal war. Mögliche Scherbeiträge waren im direkten Vergleich gering und wurden nicht analysiert (vergleiche dazu [Abbildung 3.6 b](#)).

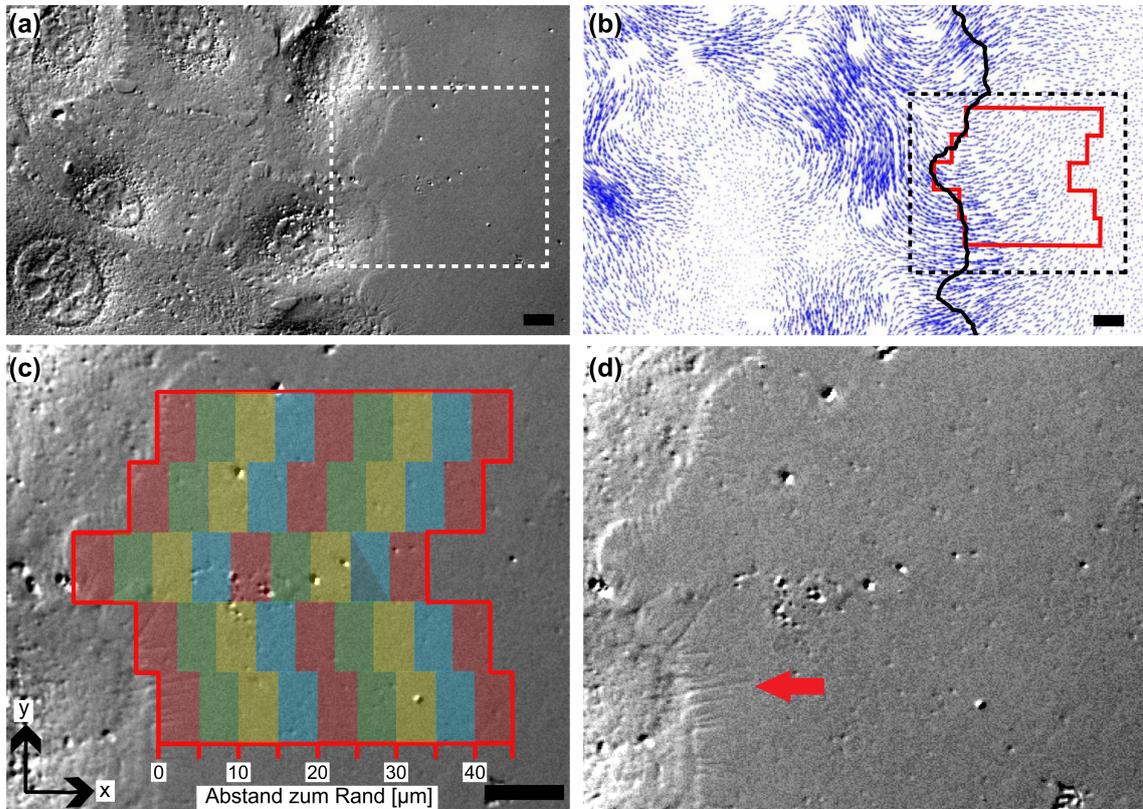


Abbildung 3.6: Ermittlung der Bereiche von Interesse: Für die unter der Zellmonolage (a) befindlichen Kugeln wurden die Verrückungen nach Ablösen der Zellen (blaue Pfeile in b) ermittelt. Zur besseren Anschaulichkeit wurden die Verrückungen (b) mit dem Faktor 8 multipliziert. Die gestrichelten Rechtecke der oberen Abbildungen markieren die Ausschnitte, die für die unteren Abbildungen verwendet wurden. Der Monolagenrand wurde manuell angenähert und die Verrückungen wurden entsprechend ihres Abstandes zum Geweberand unterteilt (c). Die spitzen Ausläufer (roter Pfeil in d) wurden dabei nicht berücksichtigt. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.2 Ablationsexperimente

Für die Ablationsexperimente wurden die Zellen wie in [Unterabschnitt 3.2.1](#) beschrieben kultiviert und wie in [Unterabschnitt 3.3.1](#) präkonditioniert. Die Experimente wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop (LSM 880) und einem 40x/0.6 NA LD-Achroplan Objektiv durchgeführt, wobei die Konfokalität nicht zur Bildgebung genutzt wurde sondern ausschließlich der Durchlichtkanal mit Phasenkontrast. Die

Schnitte wurden mit einem im Aufbau des LSM integrierten Schneidlasersystem (Rapp Opto Electronic GmbH) durchgeführt. Dabei wurde eine Laserintensität von 20 % ohne Neutralfilter verwendet, entsprechend 8.4mW (Bei einer Maximalleistung von 42mW und einer Wellenlänge von  $\lambda = 355\text{nm}$ ).

Die Schnittlänge betrug  $70\ \mu\text{m}$  und wurde es jeweils 30 mal für 1 ms belichtet. Für die ausgerichteten Zellmonolagen wurden bis zu sechs Schnitte pro Monolage durchgeführt, jeweils drei Schnitte parallel und drei senkrecht zur Ausrichtungsrichtung. Dabei wurden entsprechend große Abstände zwischen den einzelnen Schnitten gewählt (mindestens  $700\ \mu\text{m}$ ). Das Ablationsexperiment dauerte nicht länger als 30 min pro Kammer.

Die Schnitte erfolgten, soweit möglich, entlang der Zell-Zell-Kontakte ([Abbildung 3.7 b](#)). Da diese meist nicht auf einer Geraden angeordnet waren, waren dabei Abweichungen der Schnitte von den Kontakten von bis zu 40 % der gesamten Schnittlänge möglich<sup>19</sup>. Durch die Ausrichtung der Zellen erfolgten die Schnitte bei *horizontal* ausgerichteten Zellen meist an zwei aneinandergrenzenden Zell-Zell-Kontakten, bei *vertikalen* meist an einem einzelnen. Für die nicht ausgerichteten Zellen wurden auch zwei Schnitte pro Monolage entlang der Zell-Zell Kontakte durchgeführt.

#### 3.4.2.1 Prozessierung der Rohdaten

Der zeitliche Abstand zwischen dem Schnitt und den Aufnahmen der analysierten Löcher ([Abbildung 3.7](#)) betrug 90 s. Die Löcher wurden manuell mit einer von G. Dreissen geschriebenen Matlab-Routine umrandet ([Abbildung 3.7 d](#)). Weiterhin wurden mit der in Matlab enthaltenen *moment*-Funktion die zweiten geometrischen Momente<sup>20</sup> der Pixelverteilungen dieser Flächen berechnet und damit die großen und kleinen Halbachsen einer elliptischen Anpassung ermittelt ([Abbildung 3.7 e](#)). Die Berechnung ist ausführlich in [Abschnitt 2.2](#) dargestellt.

---

<sup>19</sup> Hierbei handelt es sich um eine grobe Schätzung per Augenmaß.

<sup>20</sup> engl. *central moments*

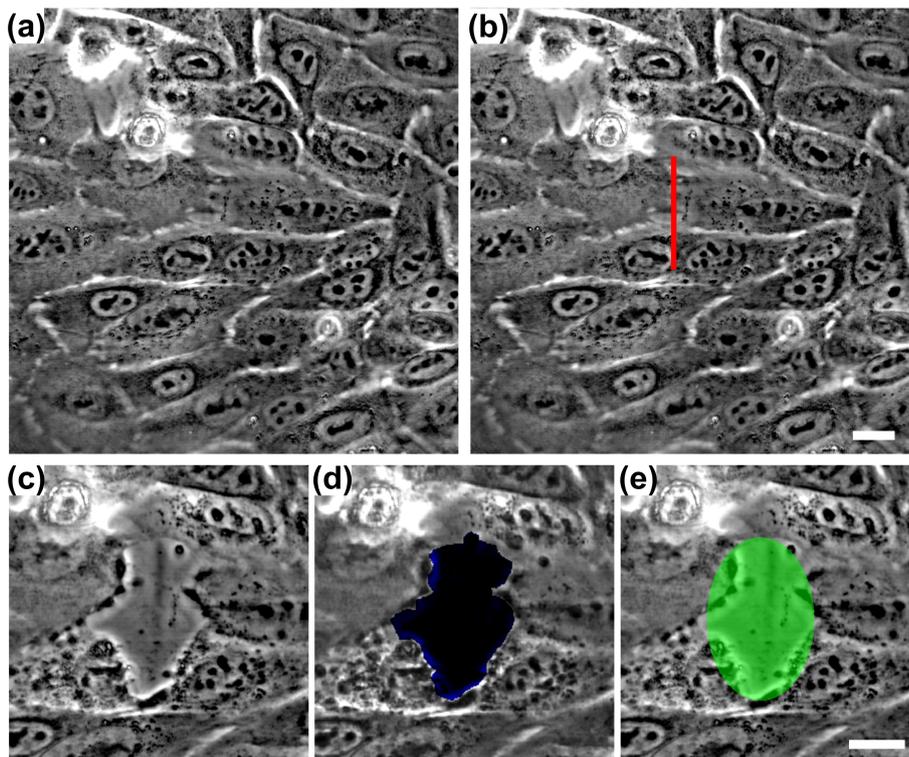


Abbildung 3.7: Darstellung eines Ablationsexperiments am Beispiel einer *horizontal* ausgerichteten Zellmonolage. Der präkonditionierten Monolage (a) wurde ein Schnitt (*rot*) entlang ihrer Zell-Zellverbindungen zugefügt (b). Das dadurch entstandene Loch ist vergrößert in (c) dargestellt. Die so entstandene Fläche wurde manuell ermittelt (d) und elliptisch angepasst (e). Die Maßstabsbalken entsprechen  $20\ \mu\text{m}$ .

### 3.4.3 Streckfestigkeitsanalysen

Die Probenvorbereitung erfolgte wieder wie bereits in [Unterabschnitt 3.2.1](#) und [Unterabschnitt 3.3.1](#) beschrieben. Die Streckfestigkeitsanalysen wurden mit dem in [Abbildung 3.4](#) gezeigten Aufbau durchgeführt. Alle Aufnahmen wurden mithilfe eines aufrechten Mikroskops (Axio Imager M2) und einem  $40\times/1.0\ \text{NA}\ \text{W}$  Plan-Apochromat Objektiv durchgeführt. Zur Ermittlung der Streckfestigkeit wurden pro Monolage mindestens zwei Positionen angefahren. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Monolagen dort keine oder nur sehr kleine Lücken im Zellrasen aufwiesen (siehe auch [Abbildung 4.18](#)). Für jede dieser Positionen wurde ein z-Stapel im Fluoreszenzkanal zur Aufnahme der Referenzkugeln und einer im Durchlichtkanal zur Aufnahme der Zellmonolage erzeugt. Anschließend wurde die Kammer linear gedehnt (die verwendeten Parameter sind in [Tabelle 3.2](#) dargestellt). Nach jeweils 50% und 75% Dehnung wurden nochmals Aufnahmen der gleichen Positionen im Fluoreszenz- und Durchlichtkanal gemacht.

Für die Auswertung wurden zunächst aus den aufgenommenen z-Stapeln wie in [Unterabschnitt 3.4.1](#) die entsprechenden scharfen Bilder nachträglich berechnet. Somit konnten die gleichen Bilder bei unterschiedlichen Dehnungen verglichen werden. Dazu wurde für jede Position ein rechteckiger,  $150\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$  großer BvI mittig in den Bildausschnitt im Durchlichtkanal gelegt. Die in [Unterabschnitt 3.1.2](#) bereits beschriebene affine Transformation wurde anhand der Referenz-Mikrokugeln im Referenzkanal exakt unter der BvI durchgeführt. Anhand dieser konnten sowohl die Diagonalelemente des ermittelten Verzerrungstensors  $\epsilon_{xx}$  und  $\epsilon_{yy}$  als auch der Translationsvektor  $\bar{t} = \begin{pmatrix} t_x \\ t_y \end{pmatrix}$  für die entsprechenden Mikrokugelmuster ermittelt werden. Es wurde angenommen, dass die über den Referenzkugeln liegenden Zellmonolagen dieselbe Transformation erfuhren. Daher wurde diese auf die äußeren Abmessungen der BvI im ursprünglichen Zustand ohne Kammerdehnung angewandt, was daher eine Verlängerung der horizontalen Seiten des Rechtecks in Dehnungsrichtung und eine Verkürzung der vertikalen Seiten senkrecht zur Dehnungsrichtung bedeutete.

Wie bereits erwähnt, fanden während der Dehnungen auch immer Translationen relativ zum Objektiv statt, die über den ermittelten Translationsvektor auch auf die BvI angewandt wurden. Der so transformierte BvI wurde in das Bild der gedehnten Monolage gelegt. Dadurch konnten die gleichen Strukturen im gedehnten Zustand wiedergefunden und über dieselben Bereiche wie im ungedehnten Zustand analysiert werden ([Abbildung 3.8](#)). Die Risse innerhalb dieser BvI wurden, wie in [Unterabschnitt 3.4.2](#) bereits beschrieben, manuell markiert. Dabei musste der Flächeninhalt der Risse mindestens  $10\ \mu\text{m}^2$  betragen, um in die Analysen mit aufgenommen zu werden.

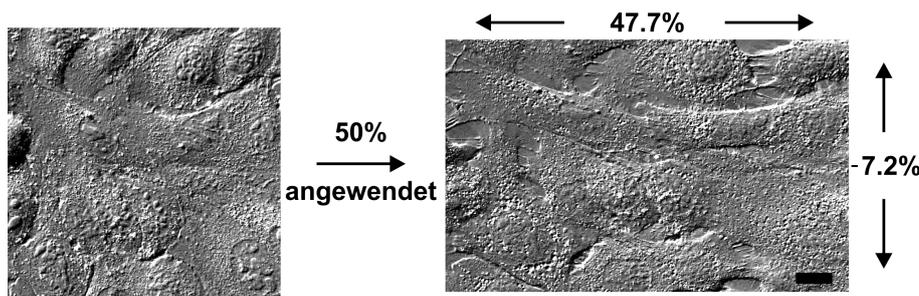


Abbildung 3.8: Ermittlung des Bereichs von Interesse im gedehnten Zustand der Monolage. Dazu wurde die affine Transformation berechnet und auf die äußeren Abmessungen des BvI der gedehnten Monolage angewandt. Der Maßstabsbalken entspricht  $20\ \mu\text{m}$ .

#### 3.4.4 Kraftspektroskopische Analysen

Für die kraftspektroskopischen Analysen erfolgte die Bildgebung mithilfe eines inversen Mikroskops (Axiovert 200) und eines 40x/0.6 NA Plan-Neofluar Objektivs (korr. für 0–1.5 mm). Eine allgemeine Beschreibung des Messprinzips des Rasterkraftmikroskops sowie die verwendeten Methoden zur Kalibrierung sind in [Unterabschnitt 2.1.2](#) ausführlich beschrieben. Die verwendeten Parameter zur Kammerdehnung sind in [Tabelle 3.2](#) dargestellt. Die Proben wurden wie in [Unterabschnitt 3.2.2](#) beschrieben vorbereitet.

Der verwendete Cantilever (Arrow-TL1, Nanoworld) wies eine Federkonstante von  $k = 0.3 \text{ mN}$  auf und war damit zum einen steif genug um genügend tief in die relevanten Bereiche der Zellen dringen zu können, und zum anderen sensibel genug um zelluläre Signale detektieren zu können. Die Resonanzfrequenz des Cantilevers betrug  $f_0 = 6 \text{ kHz}$ . Zur Verbesserung des Reflexionsvermögens des Lasers und damit auch der Sensitivität verfügte die Rückseite des Cantilevers über eine Ti/Au Beschichtung. Für die Cantileverspitze wurde eine Sphäre verwendet, die eine größere Kontaktfläche bot als die üblich verwendeten konischen oder pyramidalen Spitzen. Dadurch wurde das Risiko die Proben zu beschädigen verkleinert und ein größerer Durchschnitt über zelluläre Bestandteile konnte mit einer Messung ermittelt werden. Die verwendete Siliziumsphäre (Kisker) wurde mittels Zweikomponenten-Klebesystem (Uhu plus Endfest 300) unterseitig am spitzen Ende des Cantilevers angeklebt (siehe auch Ramms et al., 2013). Der exakte Radius der Mikrosphäre betrug  $r = 3.6 \text{ }\mu\text{m}$  und wurde mithilfe eines aufrechten Mikroskops (Axio Imager M2) und eines 40x/0.6 NA LD-Achroplan Objektivs bestimmt. Um mögliche Varianzen der Spitzengeometrie auszuschließen, wurden alle Messungen mit derselben Mikrosphäre durchgeführt.

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor jeder Messung wurde der Cantilever zur thermischen Equilibrierung für 30 min in eine mit Kulturmedium (30 mM HEPES) gefüllte Petrischale getaucht. Darauf folgte die Kalibrierung in derselben Petrischale, welche anschließend mit der zu untersuchenden Probe ausgetauscht wurde. Für die Kraft-Abstandskurven wurde ein Kraft-Sollwert von 1.5 nN gewählt. Wegen der viskoelastischen Eigenschaften von Zellen ist der viskose Anteil des detektierten Signals kleiner, wenn diese langsam verformt werden. Daher wurde eine eher geringe Annäherungsgeschwindigkeit von  $0.5 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$  verwendet.

Um den Cantilever nach der Indentation wieder von der Probe zu lösen wurde für die Rückzugsphase eine höhere Geschwindigkeit von  $2 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$  verwendet. Die Abtastrate der Kraft-Abstands-Messungen betrug 2 kHz. Wegen der hohen Störanfälligkeit wurde jede Messung an selber Stelle sechsmal hintereinander durchgeführt. Um dabei den Proben Zeit zur Relaxation zu geben, wurden zwischen den einzelnen Messzyklen Pausen von 2 s gemacht. Pro Kammer wurden Indentationen im Bereich der Zelllamellen

und -adhäsionen für zwei bis drei Zellen<sup>21</sup> nacheinander für 0 %, 25 % und 50 % Dehnung durchgeführt.

#### 3.4.4.1 Prozessierung der Kraft-Abstandskurven

Die aufgenommenen Kraft-Abstandskurven wurden zunächst mit dem Programm *JPK Data Processing* prozessiert. Damit wurden die aufgrund der vertikalen Laserauslenkung auftretenden Spannungen auf der Photodiode mithilfe der zuvor bestimmten Sensitivität und Federkonstante des Cantilevers in Kraftwerte umgewandelt. Weiterhin wurde die Grundlinie im zellkontaktfreien Bereich der Kurve über eine Verschiebung entlang der Kraft-Achse und Drehung so korrigiert, dass sie entsprechend mit der Nulllinie der Kraft übereinstimmte. Danach wurde die in [Unterabschnitt 2.1.2](#) beschriebene Korrektur zur Auslenkung der Cantileverspitze verwendet. Zur Ermittlung des Kontaktpunkts des Cantilevers mit der Probe wurde, wie bereits zuvor auch in Ramms et al., 2013, eine von R. Springer geschriebene Matlab-Routine verwendet. Dazu wurden zunächst die Kurven mittels gleitendem Durchschnitt in Intervallen von 25 Datenpunkten (entsprechend 6.25 nm pro Interval) geglättet. Danach wurde die dritte Ableitung der geglätteten Kurve berechnet und deren höchstes lokales Maximum in einer ca. 1  $\mu\text{m}$  großen Umgebung des Übergangspunktes vom linearen Teil der Kurve (kein Probenkontakt) zum gekrümmten Teil (Probenkontakt) ermittelt ([Abbildung 3.9](#)). Während die erste Ableitung einer Kurve ihren Anstieg und die zweite Ableitung ihr Krümmungsverhalten angibt, beschreibt die dritte Ableitung wie stark sich ihr Krümmungsverhalten ändert. In einer Umgebung des Maximums von 50 Datenpunkten wurde wieder gemittelt und dieser Wert als Kontaktpunkt angenommen. Danach wurden die Kraft-Abstands-Kurven entsprechend so skaliert, dass Kraft und Indentation im Kontaktpunkt genau null ergaben.

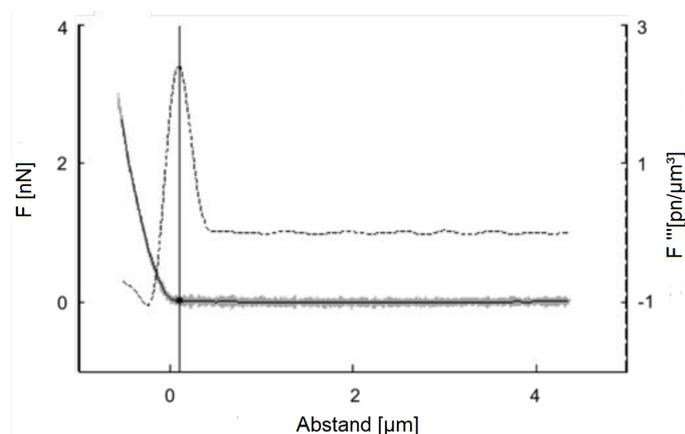


Abbildung 3.9: Ermittlung des Kontaktpunktes auf der Kraft-Abstandskurve (durchgezogene Linie). Dabei war das Maximum der dritten Ableitung der Kraft nach dem Abstand ausschlaggebend (gestrichelte Linie). Abbildung nach Fabris, 2016.

<sup>21</sup> bzw. Zellpaaren

#### 3.4.4.2 *Kontrollmessungen ohne Zellen*

Die Kontrollmessungen in leeren Elastomerkammern wurden wie in [Unterabschnitt 3.4.4](#) beschrieben, jedoch ohne Zellen, durchgeführt. Dabei wurde wegen der Klebrigkeit der Elastomeroberflächen statt Kulturmedium eine Tritonlösung (2 % vol/vol, Triton X-100, Sigma) verwendet, welches die Adhäsion der Cantileverspitze an die Oberfläche hinreichend gut verringern konnte. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte wie oben beschrieben ([Unterabschnitt 3.4.4.1](#)).

#### 3.4.4.3 *Rauschanalysen*

Zur Analyse des Hintergrundrauschens wurden die Auslenkungen der Cantileverspitze während der Annäherungskurve im Abstand von 5 – 15 µm zur leeren Kammer in Kulturmedium aufgenommen. Für die Annäherung wurden die in [Unterabschnitt 3.4.4.1](#) angegebenen Parameter verwendet. Das Rauschen im Kraft-Zeit-Signal wurde mittels *schneller Fourier-Transformation* analysiert (Origin 2015 G). Dabei wurde nach der Zeit integriert und eine dreieckige Fensterfunktion zur Verminderung des Leck-Effekts<sup>22</sup> verwendet.

#### 3.4.4.4 *Flächenanalyse gedehnter Zellen*

Die Ermittlung der Zellflächen erfolgte wie bereits in [Unterabschnitt 3.4.2](#) beschrieben. Dabei wurden Zell-Zelladhäsionen nicht berücksichtigt, ähnlich wie in [Abbildung 3.6](#). Die Aufnahmen wurden während der RKM Messungen, direkt vor der jeweiligen Indentation, in einem Abstand von ca. 10 bis 15 min gemacht.

---

<sup>22</sup> engl. *leakage effect*

## 3.5 MATERIALLISTEN

Gerät	Spezifikation	Hersteller
Analog Vortex Schüttler	Vortex Schüttler, 120 V	VWR
Exsikkator	DURAN Vakuum Exsikkator	DURAN Group GmbH
Feinwaage	Cubis Analysenwaage	Sartorius
Inkubator		Thermo Fischer Scientific, Waltham
konfokales Laser-Scanning Mikroskop	LSM 880	Carl Zeiss
Schneidlaser	UGA-42 Fire Fly	Rapp OptoElectronic GmbH
Lackschleuder	Delta 10 TT	Süss-MicroTec
Lichtmikroskop	Axio Imager M2	Carl Zeiss
Lichtmikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss
Objektiv	5x/0.16 NA EC Plan-Neofluar	Carl Zeiss
Objektiv	10x/0.3 NA W N-Achroplan	Carl Zeiss
Objektiv	40x/0.6 NA LD-Achroplan	Carl Zeiss
Objektiv	40x/1.0 NA W Plan- Apochromat	Carl Zeiss
pH-Meter		Knick
Rasterkraftmikroskop	Nano Wizard 2	JPK

Tabelle 3.3: Geräte

Verbrauchsmaterial	Hersteller
FluoSpheres (540/560), carboxiliert, 100 nm	Invitrogen
FluoSpheres (505/515), carboxiliert, 500 nm	Invitrogen
FluoSpheres (365/415), carboxiliert, 200 nm	Invitrogen
Cantilever (Arrow-TL1 Au)	Nano World
Silizium Mikrosphären (PSI-5.0, GbR)	Kisker Biotech
Culture-Inserts 2 Well for self-insertion	Ibidi
Zellkulturflaschen (25 cm <sub>2</sub> , 75 cm <sub>2</sub> )	BD Biosciences
Zellkulturschalen (18 mm Loch, Durchmesser: 35 mm)	Cell E & G, LLC
Zellkulturschalen ( $\mu$ -dish, Durchmesser: 35 mm)	Ibidi
Deckgläser (80 $\mu$ m)	Menzel Gläser
Deckgläser (170 $\mu$ m)	Menzel Gläser
Einfrierbox (Mr. Frosty)	Nalgene Nunc
Handschuhe Pure G3	Kimberly-Clark Professional
Kyroröhrchen	VWR
Kimtech Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark Professional
Linsenreinigungstuch	Whatman
Stripetten (5ml, 10ml, 50ml)	VWR
Pipettenspitzen (10 $\mu$ l; 200 $\mu$ l; 1250 $\mu$ l)	Starlab
Wägeschiffchen (div. Größen)	VWR

Tabelle 3.4: Verbrauchsmaterialien

Chemikalie	Hersteller
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC)	Sigma-Aldrich
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich
(3-Aminopropyl)triethoxysilan (ARPTES)	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Ethanol absolut	Merck
Ethanol vergällt (97%)	Merck
Ethylenglykol-bis(2-aminoethyl-ether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich
Fibronektin (human)	Corning
Fluoromount	Sigma-Aldrich
Glukose	Merck
Glycin	Sigma-Aldrich
Ham's F12 Zellkulturmedium	Gibco
Isopropanol	Merck
Kryo-SFM Gefriermedium	PromoCell Inc
Magermilchpulver	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
N-hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (Sulfo-NHS)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd 37% (PFA)	Merck
Penicillin/Streptomycin (10,000 units/ml)	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) pH 7.2 (1X)	Gibco
Silpuran 2430 Zweikomponentensystem	Wacker
Sylgard 184 Silikon Elastomer Kit	Dow Corning
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	Sigma-Adrich
UHU plus endfest 300	UHU, Bühl

Tabelle 3.5: Chemikalien

Name	Version	Herausgeber
ImageJ (Fiji)	1.51	National Institute of Health
Extended Depth of Field (ImageJ Plugin)		Implementierung: Alex Prudencio Algorithmus: Forster et al., <a href="#">2004</a>
JPK Data Processing	5.0.96	JPK instruments
MATLAB	2015 A64-Bit	The MathWorks Massachusetts
Origin	2015G 64bit	Originlab Northampton
Corel Draw	X7 (17)	Corel Corporation

Tabelle 3.6: Programme

### 3.5.1 Puffer und Zellkulturmedien

Chemikalie	Menge
EGTA	1.902g/l
Glukose	0.9g/l
MES	1.95g/l
MgCl <sub>2</sub>	0.476g/l
NaCl	8.77g/l
Streptomycin	1g/l

Tabelle 3.7: Zytoskelettpuffer (CB) pH 6.1

### 3.5.1.1 Keratinozytenmedium (Köln)

Das Medium zur Kultivierung der murinen Keratinozyten aus Köln (ECadCtrl, AG Niessen) wurde in der AG Niessen vorbereitet. Dazu wurden 450 ml FAD+ (DMEM/Ham's F12) Medium (Biochrom) mit 50 ml Ca<sup>2+</sup>-freien, fötalen Kälberserum (PAA) versetzt. Das Serum wurde mit Chelex 100 behandelt.

Zusatz	Hersteller	Stockkonzentration	Finalkonzentration
Vitamin C	Sigma Aldrich	0.025 g	0.2 mM
Adenin	Sigma Aldrich	750 µl	0.18 mM
Hydrokortison	Sigma Aldrich	50 µl	0.5 µg/ml
Insulin	Sigma Aldrich	500 µl	5 µg/ml
EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor)	Invitrogen	10 mg/ml	10 ng/ml
Choleratoxin	Sigma Aldrich	5 µl	1 nM
L-Glutamin	Biochrom	200 mM	2mM
Penicillin	Biochrom	5 ml	100 U/ml
Streptomycin	Biochrom	5 ml	100 µg/ml

Tabelle 3.8: Zusätze für 500 ml Köln-Zellkulturmedium FAD+ (DMEM/Ham's F12)

3.5.1.2 *Keratinocytenmedium (Leipzig)*

Das Medium zur Kultivierung der murinen Keratinozyten mit mutierten Keratinnetzwerken (Kera I WT, Kera I -/-, Kera I -/- K14, AG Magin (Leipzig)) wurde in der AG Leube (Aachen) vorbereitet. Dazu wurden 450 ml FAD+ (DMEM/Ham's F12) Medium (Merck) mit 50 ml Ca<sup>2+</sup>-freien, fötalen Kälberserum (PAA) versetzt.

Zusatz	Hersteller	Stockkonzentration	Finalkonzentration
Adenin	Sigma Aldrich	45 mM	0.18 mM
Hydrokortison	Sigma Aldrich	1 mg/ml	0.5 µg/ml
Insulin	Sigma Aldrich	5 mg/ml	5 µg/ml
EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor)	Invitrogen	10 mg/ml	10 ng/ml
Choleratoxin	Sigma Aldrich	0.01 mM	10 <sup>-7</sup> mM
Glutamin	Invitrogen	200 mM	2mM
Penicillin	Invitrogen	10,000 U/ml	100 U/ml
Streptomycin	Invitrogen	10 mg	100 µg/ml

Tabelle 3.9: Zusätze für 500 ml Leipzig-Zellkulturmedium FAD+ (DMEM/Ham's F12)

## 3.5.2 Antikörper und Farbstoffe

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Anti-Desmoplakin 1 (aus Meerschweinchen)	DP-1	Progen
Anti-E-Cadherin (aus Maus)	610182	BD Bioscience
Anti-Keratin pan (aus Kaninchen)	10550	Progen

Tabelle 3.10: primäre Antikörper

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Alexa Fluor 488 Anti-Maus (aus Huhn)	A21200	Life Technologies
Alexa Fluor 488 Anti-Kaninchen (aus Huhn)	A21441	Life Technologies
Anti-Keratin pan (aus Kaninchen)	10550	Progen

Tabelle 3.11: sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Alexa Fluor 546 Phalloidin	A22283	Life Technologies

Tabelle 3.12: Farbstoffe

### 3.6 STATISTISCHE ANALYSEN

Wenn nicht anders angegeben, wurden für die statistische Analyse der Ergebnisse der parameterfreie Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Signifikanzen sind in den Abbildungen und Tabellen wie folgend angegeben: ns für  $P > 0.05$ ; \* für  $P < 0.05$ ; \*\* für  $P < 0.01$ ; \*\*\* für  $P < 0.001$ .

## ERGEBNISSE

---

Das Thema der vorliegenden Arbeit sind biomechanische Analysen der mechanischen Eigenschaften von Keratinozyten-Monolagen. Dazu wurden die folgenden Schwerpunkte gesetzt.

Zunächst wird die Entwicklung und Charakterisierung des verwendeten Modellsystem, bestehend aus Zellmonolage und Substrat, in [Abschnitt 4.1](#) charakterisiert. Anschließend werden in [Abschnitt 4.2](#) die verwendeten Zellen hinsichtlich der Differenzierung ihrer Adhärenzverbindungen analysiert. Darauffolgend sind in [Abschnitt 4.3](#) die Ergebnisse zu den Untersuchungen mechanischen Spannungen der Monolagen und in [Abschnitt 4.4](#) ihrem Verhalten unter Dehnung dargestellt. Die Experimente zu der besonderen Rolle der Keratine in Zellen unter hohen mechanischen Belastungen sind in [Abschnitt 4.5](#) dargestellt.

### 4.1 ANPASSUNGEN UND KALIBRATION DER ELASTOMERKAMMERN

Die hier verwendeten Methoden basierten auf dem Elastomerkammer-Ansatz nach Faust et al., 2011. Diese Kammern bestehen aus einem Silikonkautschuk der sie besonders elastisch und dehnbar macht. Die mechanischen Eigenschaften der Elastomerkammern lassen sich über das Verhältnis des bei der Herstellung verwendeten Kreuzvernetzers zum Basisöl einstellen. Dadurch konnten anwendungsspezifische Anpassungen durchgeführt werden. Diese sind detailliert in [Abschnitt 3.1](#) dargestellt.

Insgesamt übernahmen die verwendeten Elastomerkammern drei Funktionen. Während die biologischen Proben unter physiologischen Bedingungen in den Kammern kultiviert wurden, war es parallel dazu nötig, die Kontraktion der Zellen darin zu analysieren. Dazu wurden fluoreszierende Mikrokugeln auf die Substratoberfläche gekoppelt. Durch *Nachführung*<sup>1</sup> der Kugeln war es möglich die durch die Zellen verursachten Verformungen auf der Oberfläche zu analysieren. Um diese Verformungen besser sichtbar zu machen wurden die Kammern vorher mit einem besonders weichen Silikonkautschuk beschichtet, der es den Zellen ermöglichte ihre Unterlagen stärker zu verformen (siehe auch [Abbildung 4.1](#)). Mithilfe von Kammerhaltern und Zellstretchern, Apparaturen zur Dehnung von Zellen, können die Elastomerkammern zyklisch oder linear gedehnt werden (siehe auch [Abschnitt 3.3](#)). Da die Zellen auf ihrer Kammer-Unterlage adhären, werden sie, wenn der Stretcher uniaxial an der Kammern zieht, entsprechend

---

<sup>1</sup> engl. tracking

auch gedehnt. Für eine exakte Bestimmung der mikroskopischen Dehnung der Kammer wurde eine zweite Mikrokugelschicht auf die Kammer vor der Beschichtung mit Silikon angebracht.

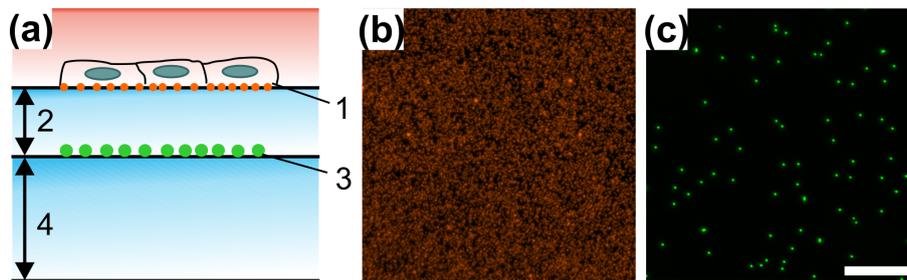


Abbildung 4.1: (a) Schematischer Aufbau der Elastomerkammern. In den Elastomerkammern können Zellen kultiviert werden. Die Wechselwirkung mit ihrem Untergrund kann über fluoreszierende *Signal*-Mikrokugeln (1) sichtbar gemacht werden. Die darunter liegende Silikonschicht (15 kPa, 130  $\mu\text{m}$  dick) (2) ist für Zellkraftanalysen optimiert. Eine zweite, von den Zellen unbeeinflusste, *Referenz*-Mikrokugelschicht (3) kann zur Ermittlung der mikroskopischen Verformungen der Kammer verwendet werden. Das System wird von einer stabileren Elastomerschicht (370 kPa, 400  $\mu\text{m}$  dick) getragen, welche für hohe Dehnungsamplituden optimiert ist. Die Fluoreszenzbilder der Signalkugeln sind in (b) und der Referenzkugeln in (c) abgebildet. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Nachfolgend werden die Ergebnisse der durchgeführten Kammeroptimierungen und -kalibrationen beschrieben diese betreffen die Anpassungen des Kammermaterials, die Kalibration der lokalen und globalen Kammerdehnung sowie der Optimierung des Protokolls zur Strukturierung der Zellmonolagen.

#### 4.1.1 Optimierung des Kammermaterials

Für einige der durchgeführten Versuche, den Streckfestigkeitsanalysen sowie den kraftspektroskopischen Analysen, war es notwendig, besonders hohe Dehnungsamplituden von bis zu 75% anzuwenden. Die für diese Art von Anwendung üblicherweise verwendeten Silikonsysteme (Sylgard) erlauben jedoch nur maximale Dehnungen von 40% bevor Risse auftreten. Daher wurde auf das sonst in der Prothetik und Orthopädie verwendete Silikon Silpuran (Silpuran 2430) zurückgegriffen. In einer Reihe von Vortests wurde das Mischungsverhältnis der Silpurankomponenten optimiert. Dazu wurden die Elastomerkammern in den in [Unterabschnitt 3.3.2](#) vorgestellten Einfachstretcher eingespannt. Anschließend wurden sie maximal auf bis zu 200% gedehnt und die Dauer bis zum Riss ermittelt ([Tabelle 4.1](#)). Dabei konnte gezeigt werden, dass die nach dem optimierten Protokoll (siehe [Unterabschnitt 3.1.1](#)) hergestellten Elastomerkammern aus Silpuran Amplituden von 200% über Nacht von 100% für mehrere Tage stand halten können. Damit konnte das Problem der Kammerelastizität gelöst werden.

Mischungsverhältnis	Transparenz	angelegte Dehnung	maximale Dauer der statischen Dehnung
2.5 : 1	gering	Riss bei 130 %	-
1 : 1	mäßig	zu fest, Dehnung nur bis 70 % möglich	-
1 : 4	mäßig	200 %	16 h
1 : 10	mäßig	200 %	7 h

Tabelle 4.1: Optimierung der Elastomerkammern durch Anpassung der Mischungsverhältnisse der Komponenten. Für die folgenden Experimente wurde das Verhältnis eins zu vier verwendet.

#### 4.1.2 Kalibration der lokaler Dehnung

Um abschätzen zu können, welcher Anteil der verwendeten Dehnung<sup>2</sup> tatsächlich lokal bei den Zellen ankommt, wurden die Elastomerkammern kalibriert. Dafür wurde zunächst die lokal ankommende Dehnung in fünf rechteckigen Regionen ([Abbildung 4.2](#)) ermittelt.

Die laterale Dehnung  $\epsilon_{xx}$  in Dehnungsrichtung und die dazu transversale Stauchung sind in [Tabelle 4.2](#) als Anteile der angelegten Dehnung dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die verwendete Dehnung direkt in lokal ankommende Dehnung transferieren ließ, mit kleinen Abweichungen von bis zu 3% bei höheren Amplituden. Es konnten keine signifikanten Schwankungen der lokalen Dehnungen über den analysierten Kammerbereich ermittelt werden. Die ankommende Dehnung verhielt sich homogen.

Weiterhin wurde die effektive Poissonzahl  $\kappa$  aus den beiden Größen berechnet:

$$\kappa = -\frac{\epsilon_{yy}}{\epsilon_{xx}} \quad (4.1)$$

Dieser beschreibt das Verhältnis ankommender Stauchung zu Dehnung des untersuchten Kammerausschnitts. Dabei sind die verwendeten Randbedingungen wie die breiteren Ränder der Elastomerkammern und die Fixierung der Kammern zwischen Kammerhalter und Klemmplättchen inkludiert (siehe auch Faust et al., 2011).

<sup>2</sup> welche dem Verfahrenweg des Stretchers entspricht.

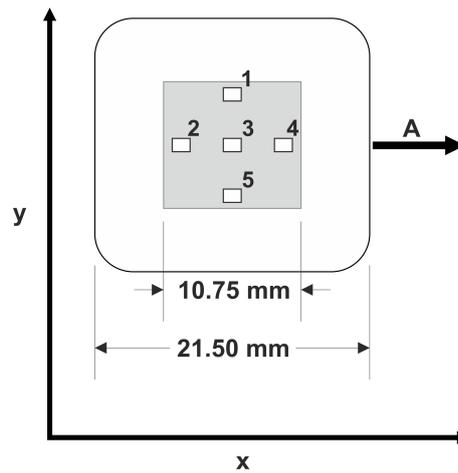


Abbildung 4.2: Lokale Dehnungen wurden in fünf Regionen (1-5, jeweils 1.40 mm x 1.05 mm im Kammerinneren (*grau*) ermittelt. Die folgenden Messungen wurden ausschließlich im inneren Bereich durchgeführt.

	Dehnung	$\epsilon_{xx}$	$\epsilon_{yy}$	$\kappa$	n
Position 1	25%	$25 \pm 1\%$	$-6 \pm 0\%$	0.22	76
	50%	$47 \pm 6\%$	$-9 \pm 2\%$	0.19	
Position 2	25%	$24 \pm 1\%$	$-4 \pm 0\%$	0.17	93
	50%	$47 \pm 2\%$	$-7 \pm 2\%$	0.15	
Position 3	25%	$25 \pm 1\%$	$-5 \pm 1\%$	0.19	94
	50%	$47 \pm 2\%$	$-8 \pm 2\%$	0.17	
Position 4	25%	$24 \pm 1\%$	$-4 \pm 1\%$	0.18	64
	50%	$47 \pm 1\%$	$-7 \pm 1\%$	0.15	
Position 5	25%	$25 \pm 1\%$	$-5 \pm 0\%$	0.22	34
	50%	$47 \pm 1\%$	$-9 \pm 0\%$	0.19	

Tabelle 4.2: Die lokal ankommenden Dehnungen wurden wie in [Unterabschnitt 3.1.2](#) beschrieben ermittelt.  $\epsilon_{xx}$  wurde in Dehnungsrichtung gemessen,  $\epsilon_{yy}$  senkrecht dazu. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen. n gibt die Anzahl an Rechtecken an und  $\kappa$  die effektive Poissonzahl, entsprechend für jede Region berechnet.

#### 4.1.3 Ermittlung der Verschiebungen auf der Kammeroberfläche

Da biologische Proben naturgemäß eine hohe Variabilität aufweisen wurden für die Versuche, die auf linearer Kammerdehnung basierten dieselben Zellen bei unterschiedlichen Dehnungsamplituden analysiert. Das betrifft die Streckfestigkeitsanalysen ([Unterabschnitt 4.4.1](#)), die Untersuchungen des Keratin 14 unter Dehnung ([Unterabschnitt 4.4.2](#))

und die kraftspektroskopischen Analysen (Abschnitt 4.5). Dadurch blieb die angelegte Dehnung der einzige Parameter der während einer Messung extern variiert wurde.

Um den Ansatz für die Experimente mit hohen Dehnungsamplituden umsetzen zu können, musste ein weiteres Problem gelöst werden. Da der hier verwendete uniaxiale Stretcher einen mobilen und einen immobilen Arm besaß, konnten die Kammern nur von einer Seite aus gedehnt werden. Dadurch wurde der zuvor untersuchte Kameraausschnitt während der Dehnung aus dem Blickfeld des Mikroskops gezogen. Wie in Abbildung 4.3 gezeigt, blieben Positionen nahe des immobilen Arms auch nach Dehnung in dessen Nähe, während Positionen nahe des mobilen Arms um fast die gesamte Amplitude der angewandten Dehnung verschoben wurden. Diese Verschiebungen durch Nachfahren des Zellstretcher während der Dehnung kompensiert werden. Dazu konnten die Positionen nach der Dehnung mit der linearen Anpassung in Abbildung 4.3 c) abgeschätzt werden. Damit war es möglich, gleiche Zellen im gedehnten Zustand wiederzufinden und entsprechend zu analysieren.

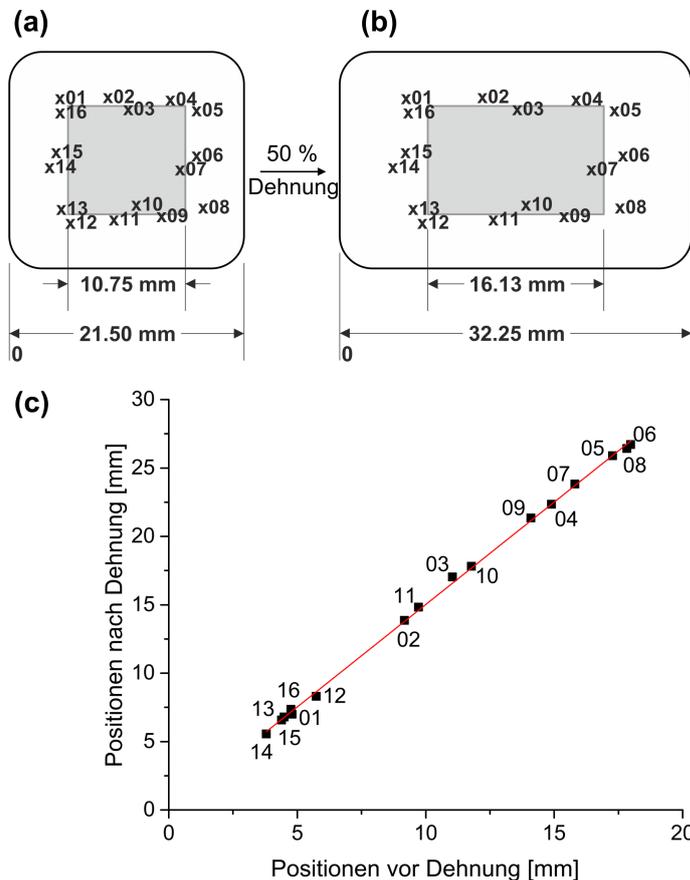


Abbildung 4.3: Auswirkungen der Positionen auf der Kammer auf die Verschiebung relativ zum Objektiv. Markiert sind Positionen um den inneren Bereich der Kammer (grau). Dieselben Positionen sind vor (a) und nach 50% Dehnung (b) dargestellt. Es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen den Positionen vor und nach Dehnung (c). Die Positionen geben den Abstand zum unbeweglichen Kammerteil, parallel zur Dehnungsrichtung an.  $n=1$

#### 4.1.4 Strukturierung der Zellmonolagen

Zur Strukturierung der Zellmonolagen wurden Kultureinsätze (Ibidi) wie in [Unterabschnitt 3.2.1](#) beschriebenen verwendet. Dadurch konnten pro Elastomerkammer zwei rechteckige Zellmonolagen analysiert werden. Die genauen Maßen sind in [Abbildung 4.4](#) dargestellt.

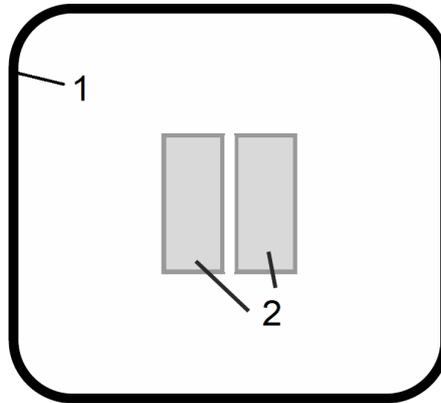


Abbildung 4.4: Schematische Darstellung einer Kammeroberfläche mit strukturierten Zellmonolagen. Der Vertiefung der Elastomerkammern (1, *schwarz umrahmt*) ist im relaxierten Zustand 2 cm x 2 cm groß, die Zellmonolagen (2, *grau*) 7 mm x 3 mm. Die Lücke zwischen den Monolagen entspricht 500 µm. Die Größenverhältnisse sind maßstabsgetreu.

Bezüglich der Kammerbeschichtung mit Fibronectin, einem Protein der extrazellulären Matrix zur Initiierung der Zelladhäsion, wurden zwei Protokolle getestet. Bei ersterem wurden nur die Flächen innerhalb der Kultureinsätze beschichtet. Dadurch verblieb die spätere Lücke zwischen den Monolagen ohne Beschichtung. Bei einem zweiten Ansatz wurde die gesamten Kammer beschichtet, *inklusive* der Lücke. Dabei wurden die Einsätze nach dem Beschichten und kurz vor der Zellaussaat in die Kammern geklebt. Ein Vorteil der ersten Variante war die geringere Rauigkeit des Monolagenrandes (siehe auch [Abbildung 4.5](#)). Trotzdem wurde die zweite Variante verwendet, da damit Monolagenränder erzeugt werden konnten, bei denen die Zellen weniger stark am Rand ausgerichtet sind. Gerade für die Kontraktilitätsanalysen war die Integrität der Zellen in den Randbereichen der Monolagen entscheidend.

## 4.2 REIFUNG DER ADHÄRENZVERBINDUNGEN

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mechanischen Eigenschaften von Zellmonolagen zu analysieren. Wie auch in [Unterabschnitt 1.3.1](#) beschrieben ist für die Entwicklung von Zell-Zell Adhäsionen, und damit auch von mechanisch stabilen Keratinozyten-Monolagen, das Signal zur Differenzierung Voraussetzung. Da die Ausbildung der

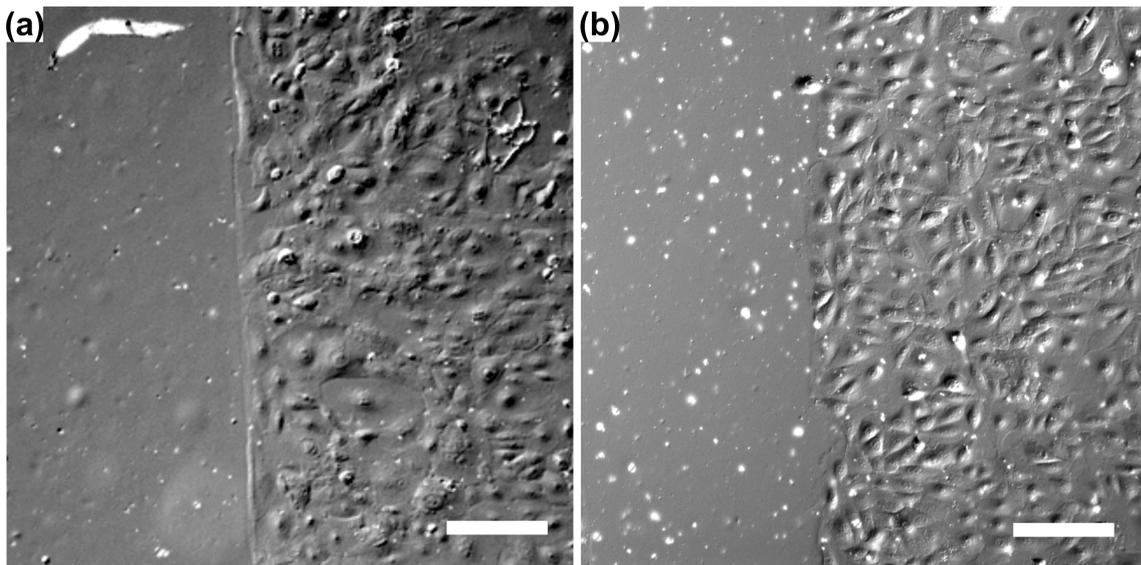


Abbildung 4.5: Einfluss der Kammerbeschichtung auf die Morphologie der Monolagenränder: a) nur der von den Zellen bedeckte Bereich wurde beschichtet; b) sowohl der bedeckte als auch der nicht bedeckte Bereich wurde beschichtet. Die Maßstabsbalken entsprechen 200  $\mu\text{m}$ .

Adhärenzstrukturen von Epithelzellen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig erfolgt (siehe auch O'Keefe et al., 1987, Miroshnikova et al., 2018), konnte auch die Reifung der Zellverbindung im Labor mit einer entsprechenden Inkubation der Zellen in  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementiertem Medium gesteuert werden. Nachfolgend werden die Ergebnisse zur Untersuchung Kontraktilität der Zellmonolagen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer in  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementiertem Medium vorgestellt und anschließend die Adhärenzverbindungen über immunzytochemische Färbungen charakterisiert.

#### 4.2.1 Analyse der Kontraktilität von Zellmonolagen

Die hier dargestellten Ergebnisse entstanden aus der Zusammenarbeit mit L. Reinmuth. Der verwendete Ansatz zur Untersuchung der Zell-Kontraktilität beruht auf der Analyse der Substratdeformationen, die von Zellen auf weichen Substraten hervorgerufen werden können (siehe auch Harris et al., 1980). Diese können mithilfe von Mikrokugeln sichtbar gemacht werden (Abschnitt 4.1). Wegen der Trübung der verwendeten Elastomerkammern war jedoch keine inverse Mikroskopie mit ausreichender Auflösung möglich. Um die Mikroskopie durch den Kammerboden zu vermeiden wurden ein aufrechtes Mikroskop mit Eintauchobjektiven verwendet. Da Zellen jedoch einen anderen Brechungsindex als das sie umgebende Kulturmedium besitzen, veränderte sich auch der optische Lichtweg und ein Teil der Mikrokugeln erschien mutmaßlich deswegen nicht mehr in der Fokusebene (siehe auch Abbildung 4.6). Daher wurden für die Kontraktilitätsversuche ausschließlich Bereiche vor den Zellen, innerhalb der 500  $\mu\text{m}$ -breiten Lücke zwischen den

beiden Monolagen, zur Analyse verwendet.

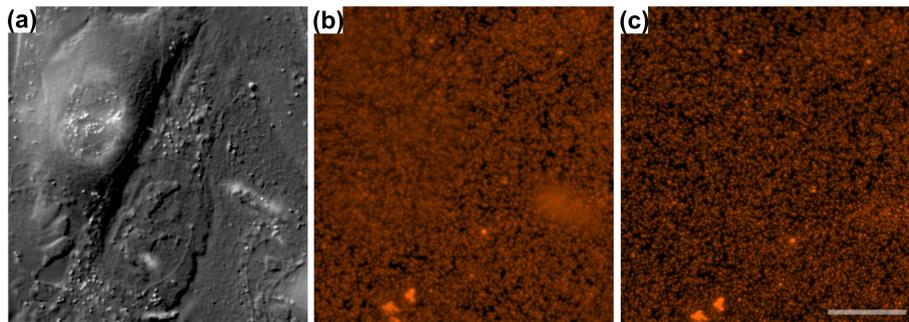


Abbildung 4.6: a) Aufnahme mehrerer Zellen innerhalb einer Monolage. Die direkt darunter befindlichen Mikrokuugeln sind sowohl vor dem Ablösen der Zellen (b) als auch danach (c) dargestellt. Der Maßstabsbalken entspricht  $20\ \mu\text{m}$ .

Zur Analyse der Kontraktilität der Monolagen wurden rund  $2000\ \mu\text{m}^2$  großen Bereiche von Interesse (BvI) definiert, in dem die Verrückungen der Mikrokuugeln analysiert wurden. Die Ermittlung der Verrückungen ist ausführlich in [Unterabschnitt 3.4.1](#) beschrieben.

Im Folgenden ist die Prozedur zur Analyse der Verrückungen anhand von einem Beispiel einer undifferenzierte Zellmonolage dargestellt. Die Verrückungen der Mikrokuugeln wurden vom Zustand maximaler Verschiebung unter Zelleinfluss auf den relaxierten Zustand nach Ablösen der Zellen ermittelt. Dabei waren die Verrückungen in Richtung des Zell-freien Bereichs orientiert (siehe auch [Abbildung 4.14](#)), sodass waren von einer Kontraktilität ausgegangen werden kann.

Aus [Abbildung 4.7](#) wird ersichtlich, dass näher am Monolagenrand gelegende Mikrokuugeln im Schnitt höhere Verrückungen aufwiesen als weiter entfernte. Dieses Verhalten konnte für alle untersuchten Konditionen beobachtet werden. Weiterhin wurden die Verteilungen der Verrückungen einzelner Mikrokuugeln in Abhängigkeit vom Abstand zum Monolagenrand analysiert ([Abbildung 4.7](#)). Während Mikrokuugeln in unmittelbarer Nähe des Monolagenrands näherungsweise normalverteilt waren, konnte dies für einen Großteil der Verteilungen, nicht angenommen werden, da diese bezüglich sehr kleiner und sehr großer Verrückungen weit „auseinanderliefen“. Daher wurden im Folgenden die Mediane der Kugelverrückungen in  $5\ \mu\text{m}$ -Abständen zum Monolagenrand berechnet, beginnend in direkter Nähe zum Monolagenrand bis zu einem Abstand von  $45\ \mu\text{m}$  Entfernung zum Rand in Dehnungsrichtung. Dabei wurde nur der vektorielle Beitrag senkrecht zum Monolagenrand (horizontale Richtung) verwendet.

Weiterhin wurden die Verteilungen der ermittelten Mediane über die Gesamtheit aller Messungen pro Kondition analysiert. Dabei passten weder Gaußsche Normalverteilungen noch log-Normalverteilungen ([Abbildung 4.8](#)). Die Abweichung der Mittelwerte von den Medianen waren dabei sehr klein. Im Falle undifferenzierter Monolagen betrug die

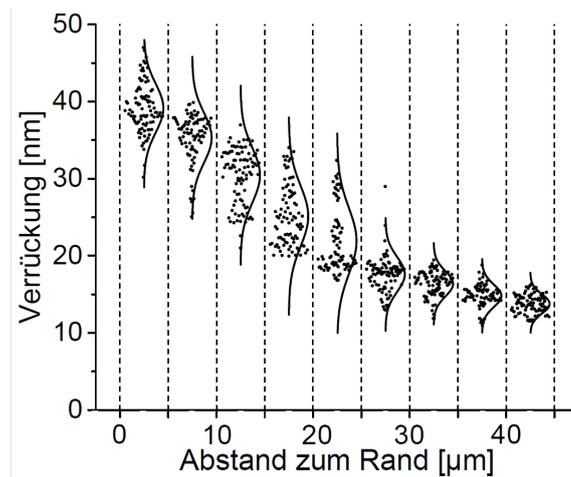


Abbildung 4.7: Verteilung der Mikrokugelverrückungen in Abhängigkeit vom Abstand zum Monolagenrand am Beispiel eines Bereichs von Interesse (BvI). BvI wurde für undifferenzierte Monolagen ohne Präkonditionierung aufgenommen. Einzelne Punkte stellen die Verrückungen einzelner Mikrokugeln dar, die Kurven sind jeweils Anpassungen einer Gaußverteilung pro Abstandsintervall.

Differenz nur ca. 4 nm. Daher wurden, konsistent zu [Abbildung 4.7](#) die Mediane mit den zugehörigen Quartilen für alle Messreihen berechnet.

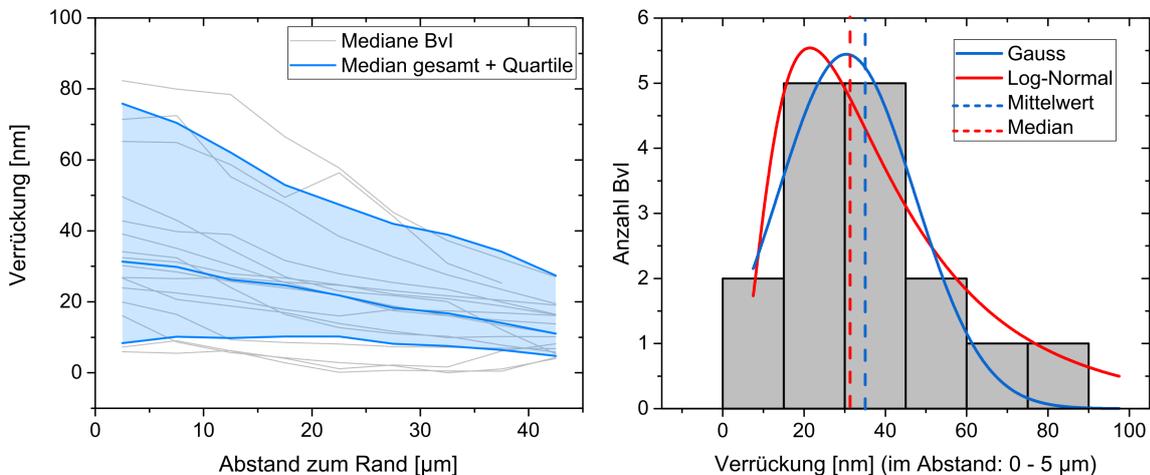


Abbildung 4.8: Verrückung der Mikrokugeln am Beispiel undifferenzierter Monolagen ohne Präkonditionierung. *links*: Mediane der Verrückungen einzelner Messungen in Abhängigkeit zum Monolagenrand. Die grauen Linien stellen die Mediane dar, die in einzelnen BvI ermittelt wurden, die blaue Linie (*Mitte*) den Median der BvI-Messungen mit dem ersten (25% der Messwerte *untere, blaue Linie*) und dem dritten Quartil (75% der Messwerte *obere, blaue Linie*). *rechts*: Histogramm mit Anzahl der BvI über die Mediane ihrer Verrückungen im Abstand 0–5 µm zum Monolagenrand.

#### 4.2.2 Untersuchung der Kontraktilität in Abhängigkeit der Differenzierung der Adhärenzverbindungen

Zur Optimierung der Dauer der Differenzierung der Zell-Zell Adhäsionen, wurde das Kontraktilitätsverhalten von Zellmonolagen bei 0h, 16 - 24h und 40 - 28h Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementiertem Medium verglichen. Dabei zeigten Monolagen, die 16 - 24h unter erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultiviert wurden, die höchsten Kontraktionen für alle untersuchten Abstandsintervalle zum Rand. Statistische Analysen wurden nur für Kugelverrückungen im Nahbereich des Randes (0 bis 5  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt. Die Verrückungen der bis zu 24 h differenzierten Monolagen waren dabei signifikant höher als die über zwei Tage gereiften Zellen (siehe auch [Abbildung 4.9](#)). Die Kontraktionen der undifferenzierten Monolagen (0 h  $\text{Ca}^{2+}$ ) unterschieden sich nicht signifikant von denen der beiden anderen Konditionen. Das durchaus überraschende Ergebnis empfiehlt einen Tag gereifte Monolagen für alle weiterführenden Analysen, da für diese das beste Signal-Rausch-Verhältnis zu erwarten war.

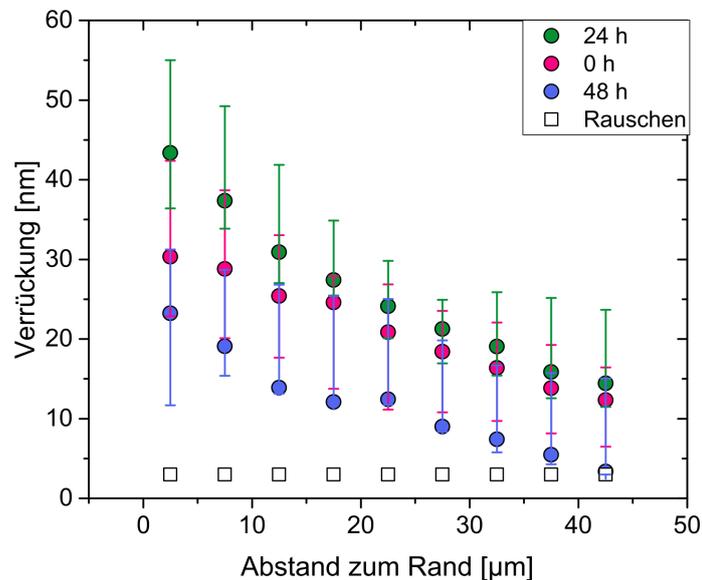


Abbildung 4.9: Analyse der Monolagen-Kontraktilität in Abhängigkeit der Differenzierung der Zelladhäsionen. Die Kreise entsprechen den Medianen der Verrückungen für alle untersuchten Bereiche von Interesse pro Kondition und Abstandsintervall zum Rand. Die Fehlerbalken umfassen 50% der Messwerte (erstes bis drittes Quartil). Es wurden mehr als zehn Bereiche von Interesse in mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen pro Kondition analysiert (genaue Anzahl in [Abbildung 4.16](#)), bei der 48 h-Kondition jedoch nur fünf Bereichen in zwei unabhängigen Messungen.

### 4.2.3 Immunzytochemische Untersuchungen des Zytoskeletts und der Adhärenzverbindungen

Für einen Überblick bezüglich der Reifung der Adhärenzverbindungen und der Organisation der zytoskeletalen Netzwerke wurde diese immunzytochemisch analysiert.

Dabei wurde für die Charakterisierung der Adherens Junctions die E-Cadherine und das Aktinzytoskelett *gereifter* und *nicht gereifter* Zellmonolagen nach Fixierung der Zellen angefärbt. Die Bezeichnungen *gereift* bzw. *nicht gereift* bezeichnen die Inkubationsdauer in  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementiertem Medium. Mit *gereift* ist dabei eine Fixierung nach 16 h Inkubation in  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementiertem Medium gemeint, mit *nicht gereift* ist die Kontrolle mit einer Fixierung nach 0 h Inkubation, 16 h nach Zellaussaat gemeint. Dabei weisen die E-Cadherine in gereiften Monolagen eine Reißverschluss-ähnliche<sup>3</sup> Organisation auf, während bei undifferenzierten Zellen kein spezifisches E-Cadherin Fluoreszenz-Signal auszumachen war ([Abbildung 4.10](#)).

Klare Unterschiede waren auch bei der Organisation des Aktinzytoskeletts zu beobachten. Während die Aktinfasern in gereiften Monolagen vorrangig eine kortikale Organisation aufwiesen, zeigten undifferenzierte Zellen sowohl eine kortikale Ausprägung des Aktin Fluoreszenz-Signals als auch stark ausgebildete Stressfasern.

Zur immunzytochemischen Analyse der Desmosome und Keratinnetze wurden Antikörper für Desmoplakin und Keratin (pan) verwendet. Die gereiften Monolagen wiesen punktförmige Desmoplakin Fluoreszenz-Signale im Bereich der Zell-Zell-Kontakte auf, wobei das Keratinnetzwerk um den Zellkern dichter als in der Zellperipherie organisiert war. Die undifferenzierten Zellen wiesen kein spezifisches Desmosomen Signal auf, ihre Keratinnetze ähnelten denen der gereiften Monolagen. Im Vergleich zu den undifferenzierten Zellen weisen die über einen Tag gereiften Zellmonolagen deutliche Adhärenzverbindungen auf. Zusammen mit den Ergebnissen aus [Unterabschnitt 4.2.2](#) sind damit mechanisch stabile Zellmonolagen mit Blick auf die folgenden Messungen anzunehmen.

---

<sup>3</sup> aus der Literatur auch als *zipper* bekannt

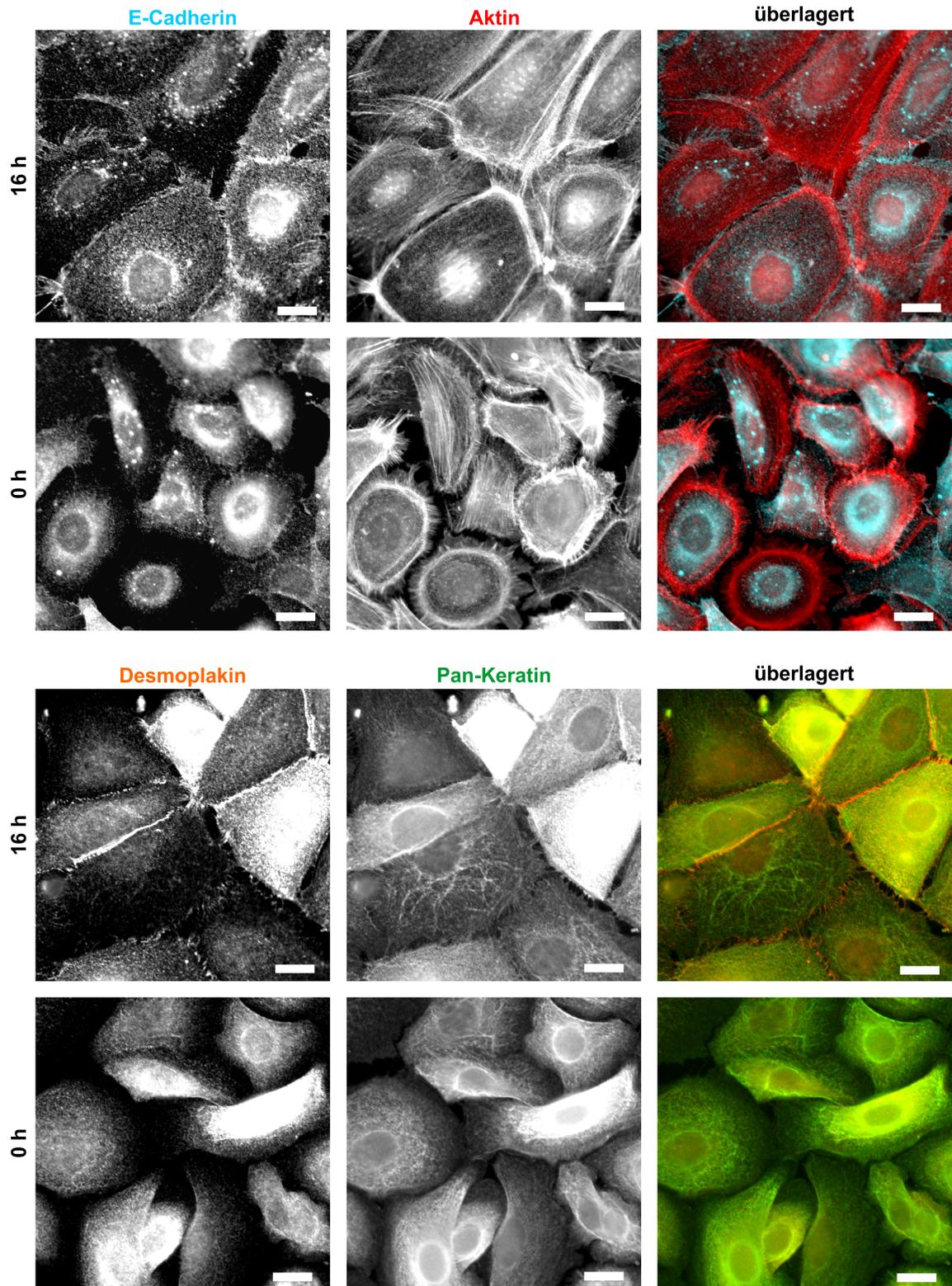


Abbildung 4.10: Immunfluoreszenzaufnahmen ausgewählter Zelladhäsionsproteine und Proteine des Zytoskeletts. Diese wurden jeweils in gereiften (für 16 h unter erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultiviert) und nicht gereiften (0 h) Monolagen analysiert. Die Zellen wurden für die Immunfärbungen mit Paraformaldehyd fixiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 μm. Pro Kondition wurden mindestens zwei unabhängige Messungen durchgeführt.

### 4.3 ANISOTROPE EFFEKTE ZELLULÄRER AUSRICHTUNG AUF DIE KONTRAKTILITÄT EPITHELIALER MONOLAGEN

#### 4.3.1 Generierung Anisotroper Zellmonolagen

Im nächsten Schritt galt es ein Modellsystem zu finden, das gezielte Analysen anisotroper Zellmonolagen ermöglicht. Mit Blick auf eine Keratinozyten Monolage in [Abbildung 4.11](#) fällt auf, dass ein hoher Anteil an Zellen eine gestreckte bzw. polare Morphologie aufweist. Dabei scheint die Orientierung der Ausrichtungen der Zellkörper sich zum Teil über mehrere Zellen fortzusetzen, was auf eine zelluläre Kooperation hindeutet. Eine allgemein präferierte Orientierung der Zellen kann dabei jedoch nicht beobachtet werden.

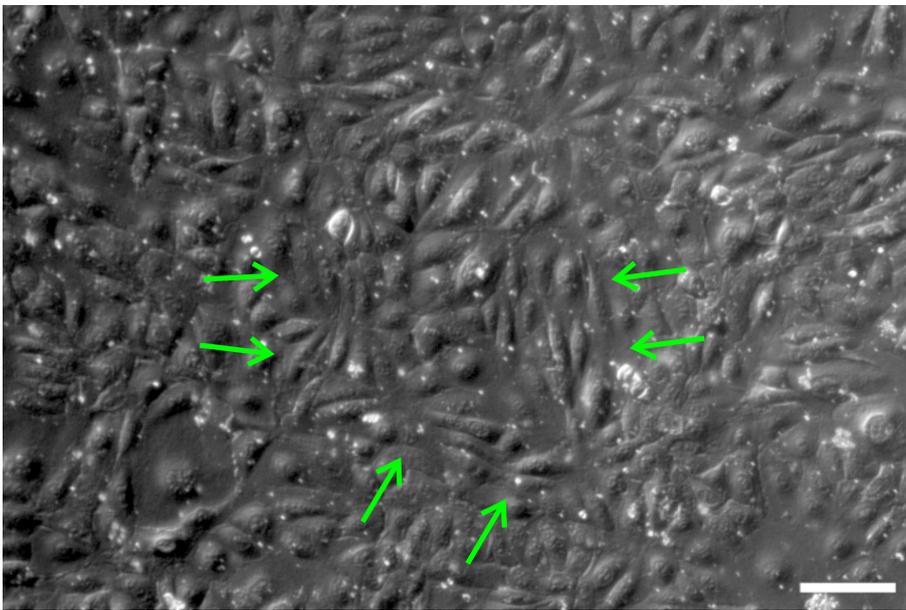


Abbildung 4.11: Aufnahme einer Keratinozytenmonolage. Ein Teil der Zellen weist eine Polarisierung auf (*grüne Pfeile*). Die Aufnahme erfolgte nach 16 h Reifung der Adhärenzverbindungen Medium mit erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ . Der Maßstabsbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Es wurden Aufnahmen von über zehn unabhängigen Proben durchgeführt.

Aus verschiedenen Studien (Hayakawa et al., 2000, Wang et al., 2001) ist bekannt, dass sich Zellen unter bestimmten Bedingungen während zyklischer Dehnung ausrichten und ihr Aktinzytoskelett umbauen. Dabei orientieren sich sowohl Aktinfilamentbündel als auch der Zellkörper in zur Dehnung transversaler Richtung, um dadurch die von den Zellen zu tolerierenden Kräfte zu minimieren. Dieser Effekt ist auch für den hier verwendeten Zelltyp bekannt (Noethel et al., 2018). In [Abbildung 4.12](#) sind immunzytochemische Aufnahmen des Aktinzytoskeletts von gedehnten Zellen und ihrer Kontrolle ohne Präkonditionierung gezeigt. Die Fixierung der gedehnten Zellen fand ca. 60 min nach Ende

des Dehnungsprotokolls statt, womit die zelluläre Ausrichtung als stabil über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zeiträume angenommen werden kann. Die Dichte der ausgerichteten Filamentbündel war dabei höher als die der nicht-präkonditionierten Aktinfilamente.

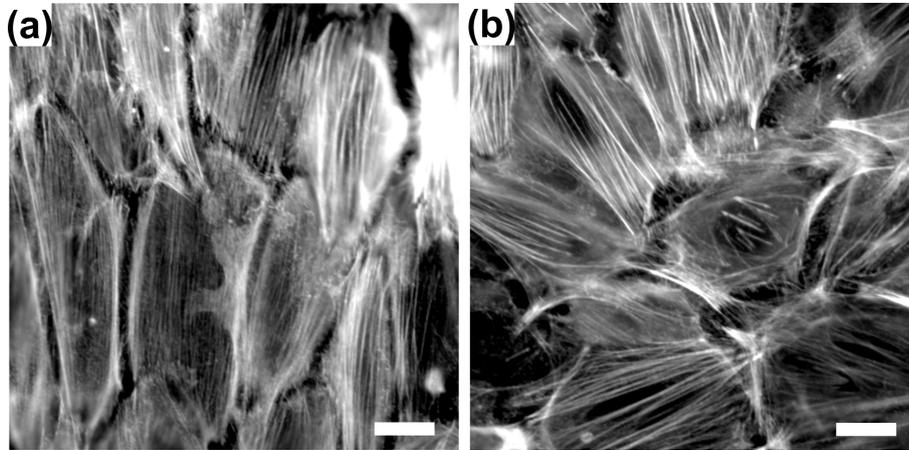


Abbildung 4.12: Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfilamente fixierter Keratinozytenmonolagen. a) Die Zellen wurden für 4 h mit 300MHz um 14 % zyklisch gedehnt. 60 min nach Beendigung des Dehnungsprotokolls wurden sie mit Paraformaldehyd fixiert. b) Die Kontrollzellen wurden nicht gedehnt. Für beide Bedingungen wurden die Zellen für 16 h in  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementierten Medium inkubiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ . Es wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt.

Für die folgenden Versuche wurden die ausgerichteten Zellmonolagen entsprechend ihrer Orientierung als *vertikal* oder *horizontal* ausgerichtet bezeichnet und Monolagen ohne vorherige Konditionierung als *Kontrolle*<sup>4</sup>. Die Kennzeichnung bezieht sich dabei allein auf die Ausrichtung im Bildbereich<sup>5</sup>. Einzig der Analysebereich bzw. die Orientierung der Lücke zwischen den Monolagen wurde in den folgenden Versuchen variiert, indem die Zellkultur-Einsätze entsprechend vor der Zellaussaat ausgerichtet wurden. Für die Untersuchungen vertikal ausgerichteter Monolagen wurden die Einsätze vor der Zellaussaat so orientiert, dass auch die Lücke vertikal, also senkrecht zur Dehnungsrichtung orientiert war (siehe auch [Abbildung 4.13](#)). Zur Generierung horizontal ausgerichteter Monolagen wurden die Ibidi-Einsätze um 90° gedreht und wiesen damit eine Orientierung parallel zur Dehnungsrichtung auf. Um die spätere Auswertung zu vereinfachen, wurden für die Kontraktilitätsanalysen auch die Aufnahmen entsprechend um 90° gedreht. Für die Kontrolle wurde der Einsatz senkrecht zur Dehnungsrichtung orientiert. Nach diesem

<sup>4</sup> Die Bezeichnung wurde bewusst zurückhaltend gewählt, um den Eindruck zu vermeiden, vorher nicht gedehnte Zellen würden keinerlei Ausrichtung aufweisen. Wie jedoch in [Abbildung 4.11](#) und [Abbildung 4.12](#) ersichtlich, ist dies nicht der Fall

<sup>5</sup> da die zytoskeletale Orientierung während zyklischer Dehnung stets senkrecht zur Dehnungsrichtung erfolgt

Schema war es möglich, Analysen in Abhängigkeit der zytoskeletalen Ausrichtung durchzuführen.

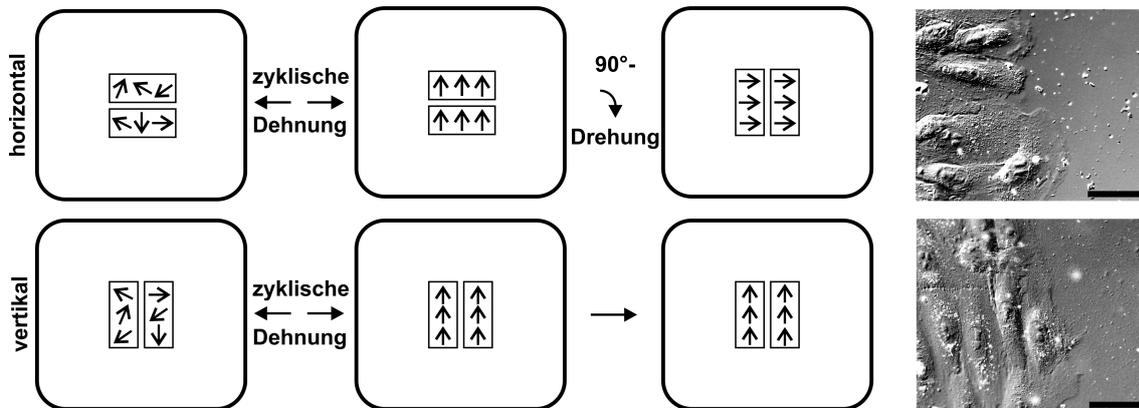


Abbildung 4.13: Schematische Darstellung der Generierung anisotroper Zellmonolagen. Die Maßstabsbalken entsprechen  $50\ \mu\text{m}$ .

#### 4.3.2 Einfluss der Aktinfilamentreorientierung auf die Kontraktilität

Weiterhin wurden an den anisotropen Zellmonolagen richtungsabhängige Untersuchungen zur Kontraktilität durchgeführt. Dazu wurde der in [Unterabschnitt 4.2.1](#) beschriebene Ansatz verwendet. Die hier beschriebenen Ergebnisse entstanden in Zusammenarbeit mit L. Reinmuth (Bachelorarbeit). Dabei wurde zwischen Analysen parallel zur zytoskeletalen Ausrichtung (horizontal) und senkrecht dazu (vertikal) entsprechend [Abbildung 4.14](#) unterschieden. Die quantitativen Ergebnisse der Kontraktilitätsanalysen sind in [Abbildung 4.15](#) dargestellt, die zugehörigen Signifikanzanalysen in [Abbildung 4.16](#). Dabei ergab sich für gereifte Monolagen mit Zell-Zell Adhäsionen ein klares Bild. Mikrokugelveerrückungen horizontal ausgerichteter Monolagen waren mit von rund  $180\ \text{nm}$  im Median um eine Größenordnung höher als senkrecht ausgerichtete mit ca.  $10\ \text{nm}$  im Median. Dabei wurden Verrückungen im Nahbereich des Monolagenrandes mit einem Abstand der Mikrokugeln zum Rand zwischen  $0$  und  $5\ \mu\text{m}$  analysiert. Ausschlaggebend für die Ermittlung der Abstände waren die Fluoreszenzaufnahmen der Signal-Mikrokugeln vor dem Ablösen der Zellen. Zellen ohne vorherige Konditionierung<sup>6</sup> wiesen Verrückungen im Nahbereich von ca.  $45\ \text{nm}$  im Median auf, die zwischen denen der beiden anderen Konditionen lagen.

Weiterhin wurden undifferenzierte Zellen ohne Zell-Zell-Adhäsionen analysiert, um den möglichen Einfluss dieser auf die Traktionskräfte zu untersuchen. Dabei zeigten ebenfalls die horizontal ausgerichtete Zellen die höchsten Verrückungen mit Medianen

<sup>6</sup> zyklische Dehnung

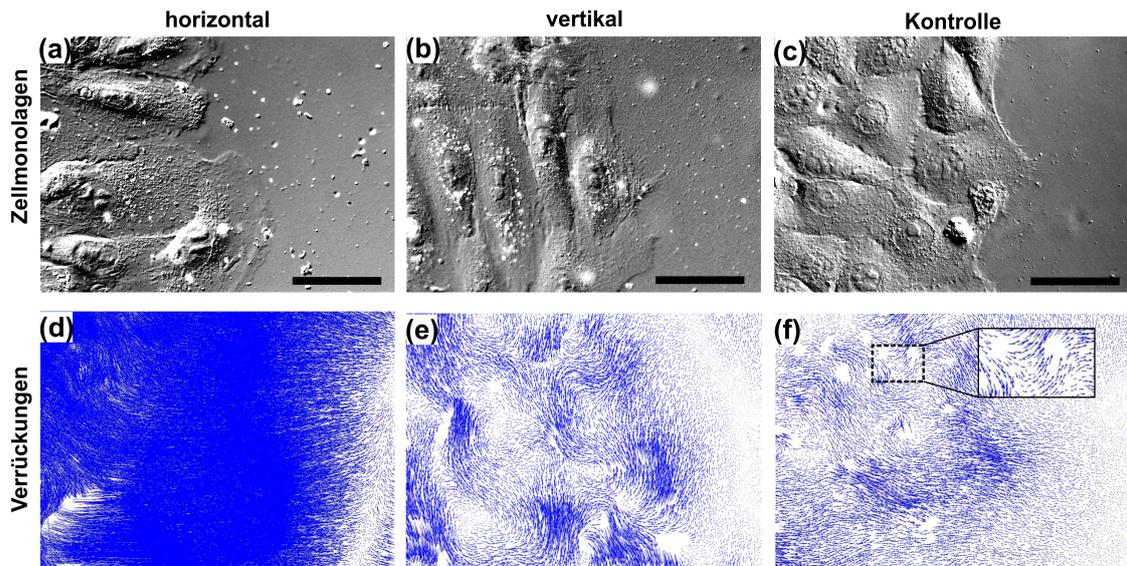


Abbildung 4.14: a-c) Darstellung der Monolagen entsprechend ihrer zytoskeletalen Ausrichtung. d-f) Die Verrückungen der einzelnen Mikrokugeln (blaue Pfeile) wurden zur besseren Veranschaulichung mit dem Faktor acht multipliziert (Vergrößerung in f). Die Maßstabsbalken entsprechen  $50\ \mu\text{m}$ .

von rund  $75\ \text{nm}$  im Nahbereich, während zwischen vertikal ausgerichteten Zellen und denen ohne Präkonditionierung keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten (jeweils  $20\ \text{nm}$  und  $25\ \text{nm}$  im Median). Im direkten Vergleich horizontal ausgerichteter Monolagen zeigten gereifte Monolagen ( $180\ \text{nm}$ ) mehr als doppelt so hohe Verrückungen wie undifferenzierte Zellen ( $75\ \text{nm}$ ).

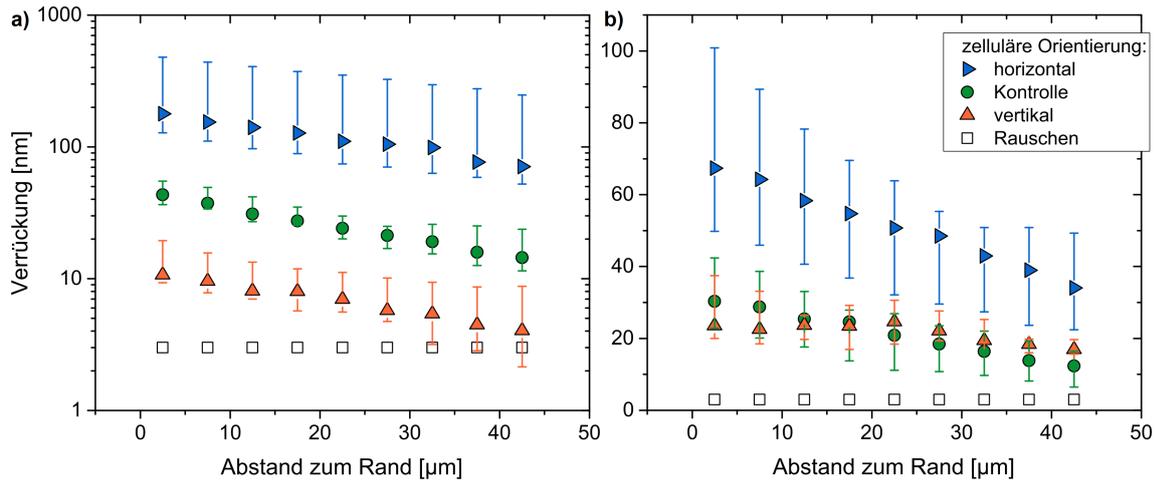


Abbildung 4.15: Zusammenfassung der Kontraktilitätsanalysen anisotroper Zellmonolagen. Die Verrückungen der Mikrokugeln sind in Abhängigkeit ihres Abstands zum Monolagenrand dargestellt. Variiert wurde die zelluläre Ausrichtung in gereiften (a) und nicht gereiften (b) Monolagen. Die Symbole entsprechen den Medianen der Verrückungen für alle untersuchten Bereiche von Interesse pro Kondition und Abstandsintervall zum Rand. Die Fehlerbalken umfassen 50% der Messwerte (erstes bis drittes Quartil). Insgesamt wurden mehr als zehn Bereiche von Interesse in mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen pro Kondition analysiert (genaue Anzahl in [Abbildung 4.16](#))

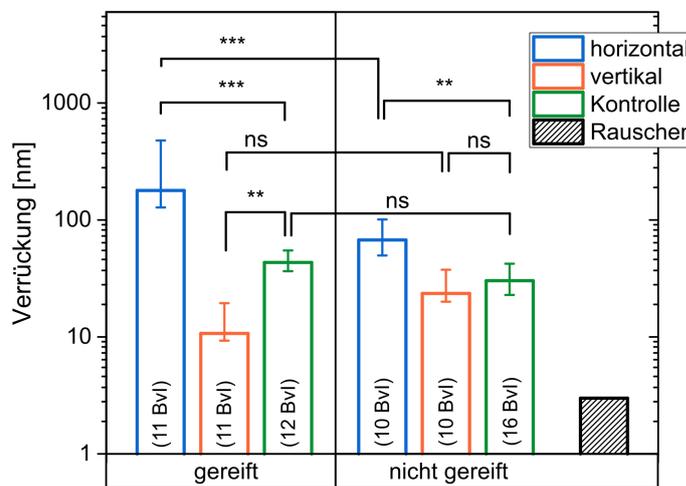


Abbildung 4.16: Signifikanzanalysen der Kontraktilitätsergebnisse. Die hier gezeigten Ergebnisse beziehen sich die auf Verrückungen im Abstand von 0–5 µm zum Rand. Die Anzahl der analysierten Bereiche von Interesse (BvI) ist auf dem zugehörigen Balken dargestellt. Die Signifikanzniveaus wurden mit einem zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft: ns für  $p$ -Wert  $> 0.05$ ;  $p$ -Wert(\*)  $< 0.05$ ;  $p$ -Wert(\*\*)  $< 0.01$ ;  $p$ -Wert(\*\*\*)  $< 0.001$ .

### 4.3.3 Einfluss zellulärer Ausrichtung auf die Generierung Monolagen inhärenter Spannungen

Nach den Analysen der Kontraktilität vor den Monolagen, wurde als nächstes untersucht, wie die Ausrichtung die mechanischen Spannungen innerhalb der Monolagen beeinflusst. Gibt es eine aktive Kraftübertragung von Zellen zu ihren Nachbarn und wie weit reicht diese? Inwiefern hat die zytoskeletale Ausrichtung Einfluss darauf?

Für die Untersuchung dieser Fragen wurden Ablationsexperimente mit einem gepulsten UV-Laser an gereiften Zellmonolagen durchgeführt. Dazu wurden die Monolagen wie in [Unterabschnitt 4.3.1](#) beschrieben präkonditioniert. Die entstandenen Risse wurden nach einem konstanten Zeitintervall nach den Ablationen aufgenommen. Die Bilder der Risse wurden verwendet, um eine elliptische Anpassung an das entstandene Loch zu berechnen. Die Rechnung dazu ist detailliert in [Abschnitt 2.2](#) dargestellt. Das Seitenverhältnis der Halbachsen der Ellipsen wie folgt berechnet:

$$\text{Seitenverhältnis} = \frac{\text{große Halbachse}}{\text{kleine Halbachse}} \quad (4.2)$$

Dabei wiesen die Löcher, bei denen die Schnitte parallel zur Ausrichtung erfolgten, die größten Seitenverhältnisse mit 7.2 im Median auf. Die kleinsten Seitenverhältnisse mit 1.4 im Median zeigten Schnittlöcher nach Schnitten die senkrecht zur Ausrichtung orientierten waren. Diese Löcher wiesen eine eher runde Form auf. ([Abbildung 4.17](#)). Die Seitenverhältnisse der Löcher der Kontrollen lagen 3.8 im Median zwischen den beiden anderen Konditionen. Eine klare Ausrichtung der Zellen ohne vorherige Konditionierung konnte dabei nicht ausgemacht werden.



#### 4.4 MORPHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN EPITHLIALER ZELLMONOLAGEN UNTER DEHNUNG

##### 4.4.1 Test auf Widerstandsfähigkeit gegenüber hoher Dehnungen

Neben der anisotropen Effekte stand auch die Dehnbarkeit bzw. Streckfestigkeit der Zellmonolagen im Fokus. Dazu wurden die Monolagen sowohl ohne als auch mit vorherige Ausrichtung statisch gedehnt und die entstandenen Risse untersucht. Dabei wurde das in [Unterabschnitt 4.3.1](#) vorgestellte Schema zur Generierung anisotroper Monolagen verwendet, wobei für *horizontal* ausgerichtete Monolagen, neben dem Kultureinsatz zur Zellaussaat auch die Kammer gedreht werden musste, da die Richtung der statischen Dehnung variiert wurde (entsprechend [Abbildung 4.13](#)). Dazu mussten die Kammern nach der Präkonditionierung aus ihrem Halter ausgebaut, um 90° gedreht und wieder eingebaut werden.

Die Ergebnisse der Streckfestigkeitsanalysen sind in [Abbildung 4.18](#) dargestellt. Sowohl für 50% als auch für 75% Dehnung wurden die Rissflächen  $A_{50}$  und  $A_{75}$  innerhalb der affin transformierten Bereiche ermittelt (siehe auch [Unterabschnitt 3.4.3](#)). Weiterhin wurden die Rissflächen der gleichen Bereiche im ungedehnten Zustand  $A_0$  verwendet und mithilfe der für 50% und 75% Dehnung ermittelten affinen Parameter transformiert.

$$A_{\text{affin};50} = (1 + \epsilon_{xx;50})(1 + \epsilon_{yy;50})A_0 \quad (4.3)$$

$$A_{\text{affin};75} = (1 + \epsilon_{xx;75})(1 + \epsilon_{yy;75})A_0 \quad (4.4)$$

mit  $\epsilon_{xx}$  und  $\epsilon_{yy}$ , den Diagonalelementen des Verzerrungstensors

Danach wurden von den Rissflächen der gedehnten Monolagen die extrapolierten Flächen abgezogen. Damit wurden soweit möglich nur die durch die Dehnung entstandenen Risse berücksichtigt.

$$A_{\text{Riss};50} = A_{50} - A_{\text{affin};50} \quad (4.5)$$

$$A_{\text{Riss};75} = A_{75} - A_{\text{affin};75} \quad (4.6)$$

Die durch die Dehnung entstandenen Rissflächen waren für alle untersuchten Konditionen signifikant größer als die vorhandenen Risse im ungedehnten Zustand. Dabei wiesen parallel zur statischen Dehnungsrichtung orientierte (horizontale) Monolagen klar die größte kumulierte Rissfläche mit  $10300 \mu\text{m}^2$  auf. Da diese bereits unter 50% Dehnung

fast vollständig zerrissen, wurden sie nicht weiter auf 75% gedehnt, da diese Daten bezüglich der Streckfestigkeit der Zellmonolagen nicht weiter aussagekräftig wären. Monolagen mit vertikaler Ausrichtung zeigten mit einer kumulierten Rissfläche von  $1300 \mu\text{m}^2$  im Median bei 50% Dehnung kein signifikant anderes Verhalten als Monolagen die vorher nicht konditioniert wurden mit  $2600 \mu\text{m}^2$ . Beide Konditionen reagierten bei der Kammerdehnung von 50% auf 75% mit einem leichten Anstieg der Rissgrößen (auf einen Median der kumulierten Rissfläche von  $2500 \mu\text{m}^2$  bei vertikal ausgerichteten Monolagen und  $5100 \mu\text{m}^2$  bei der Kontrolle). Auffällig dabei war, dass die Risse allein im Bereich der Zell-Zell-Adhäsionen auftraten. Eine Ausdehnung der Zellkörper in Dehnungsrichtung konnte für alle Konditionen beobachtet werden. Zur Kontrolle wurden auch die Rissflächen der Monolagen im ungedehnten Zustand analysiert, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konditionen festgestellt werden konnten.

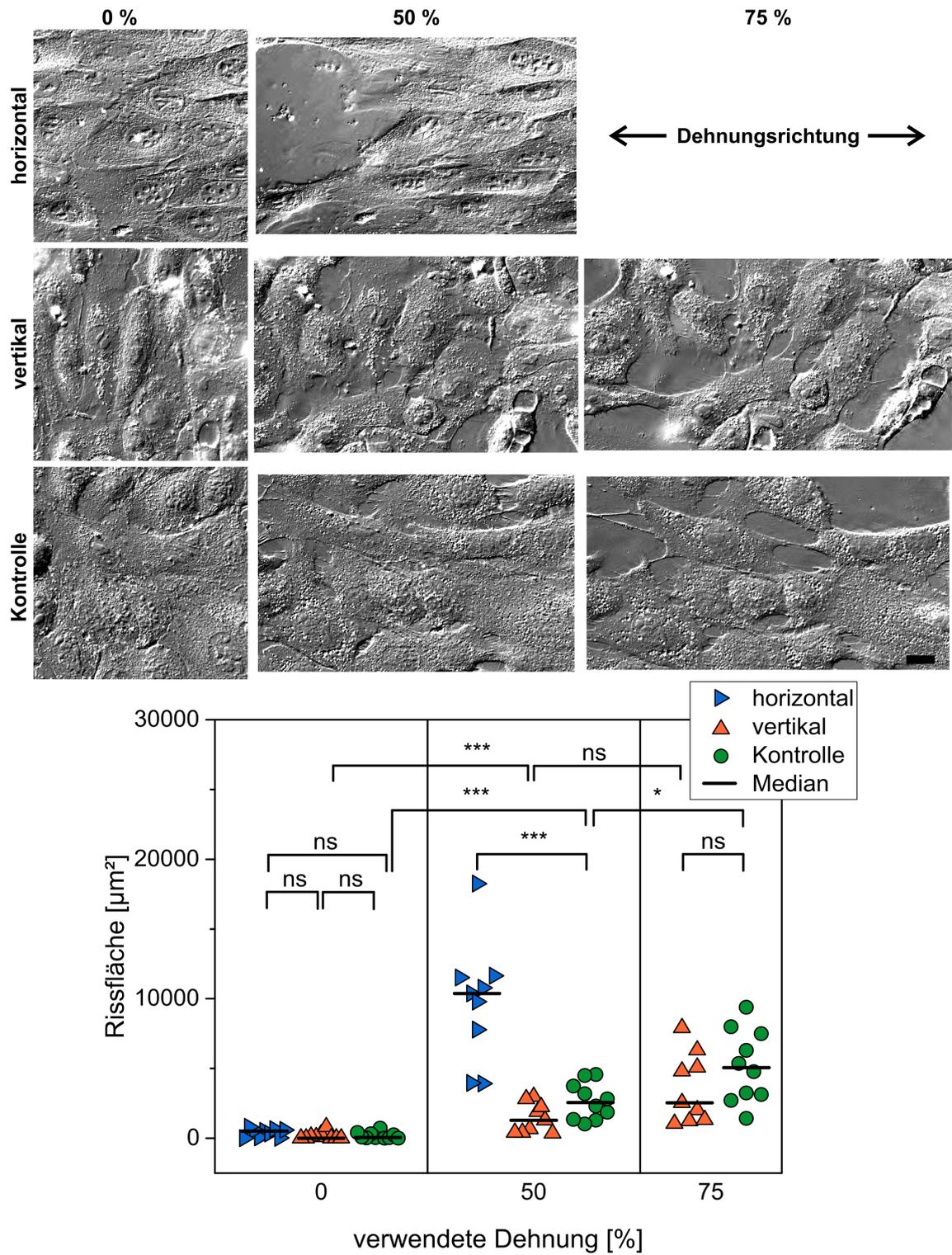


Abbildung 4.18: Streckfestigkeitsanalysen anisotroper Zellmonolagen. a) Die Ausschnitte der Abbildungen der Monolagen sind entsprechend ihrer Dehnung affin transformiert. Die Richtung der statischen Dehnung ist im Diagramm angezeigt. Der Maßstabsbalken entspricht  $20\ \mu\text{m}$ . b) Die Punktwolken der Rissflächen sind in Abhängigkeit von der zellulären Ausrichtung und angewandten Dehnung dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht dabei der Summe der Rissflächen für einen Bereich von Interesse. Die Analysen vertikal ausgerichteter Monolagen und der Kontrolle wurden in zwei voneinander unabhängigen Messungen durchgeführt, die der horizontal ausgerichteten in drei. Die Signifikanzen wurden mit einem zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft: ns für p-Wert  $> 0.05$ ; p-Wert(\*)  $< 0.05$ ; p-Wert(\*\*)  $< 0.01$ ; p-Wert(\*\*\*)  $< 0.001$ .

#### 4.4.2 Keratine beeinflussen das Verhalten der Adhärenzverbindungen unter Dehnung

Als nächsten wurde untersucht, welche Rolle Keratine für Zellmonolagen unter Dehnung spielen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Keratine maßgeblich für die mechanischen Eigenschaften von Epithelzellen beeinflussen (Seltmann et al., 2013, Ramms et al., 2013). Dieser Einfluss wurde jedoch noch nicht in lebenden Zellen unter hohen Dehnungen analysiert. Um erstes Bild vom Verhalten der Keratine unter Dehnung in lebenden Zellen zu erhalten, wurde die Rescue-Zelllinie KtyI -/- K14 verwendet (siehe auch [Unterabschnitt 3.2.2](#)). Diese Zelllinie bildet keine Keratine aus, bis auf ein Keratin14-GFP-Konstrukt, welches die Analyse des Keratin14-Netzwerks (K14) in lebenden Zellen ermöglicht. Zunächst wurden die Zellen als Monolage in die Elastomerkammern ausgesät. Anschließend wurden diese in 25 %-Schritten gedehnt und aufgenommen, bis zu einer maximalen Amplitude von 75 %. Durch das fluoreszierende, an das K14-Netzwerk gekoppelte, GFP (*green fluorescent protein*) war es möglich die Verformung des K14-Netzwerks unter Dehnung aufzunehmen (siehe auch [Abbildung 4.19](#)). Wie erwartet wurden dabei die Maschen des Netzwerks in Richtung der angelegten Dehnung gestreckt und senkrecht dazu gestaucht. Die Zellmonolagen waren während der Dehnungen von bis zu 75 % über den Zeitraum der Messung stabil (ca. 20 min). Es konnten keine Risse oder ähnliches beobachtet werden ([Abbildung 4.19](#)). Damit konnte eine Reaktion von Keratinen in lebenden Zellen auf Dehnung aufgenommen werden, wobei die Deletion der Keratin-I Gene, mit Ausnahme von K14, keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Integrität der Monolagen, trotz hoher Dehnungen, hatte.

Um die Ergebnisse der K14-Mutante besser einordnen zu können, wurde das Dehnexperiment mit Monolagen der vollständigen Keratin knock-out Mutante und ihres zugehörigen Wildtyps, in dem noch alle Keratine vorhanden sind, wiederholt. Zusätzlich wurden auch die Desmosome der Zellen untersucht, von denen bekannt ist, dass sie die Keratinnetze benachbarter Zellen verbinden. Dazu wurde das desmosomale Protein Desmoplakin I immunzytochemisch angefärbt ([Abbildung 4.20](#)).

Bei 0 % Dehnung konnten keine Unterschiede zwischen den Zell-Zell-Verbindungen des Wildtyps und denen der knock-out Mutante beobachtet werden. Die Desmosome beider Zelllinien zeigten eine punktförmige Ausprägung im Bereich der Zell-Zell-Kontakte. Unter Dehnung jedoch machten sich starke Unterschiede zwischen den Zelllinien bemerkbar. Bei 50 % angelegter Dehnung bildete sich eine Zähnung im Bereich der Zell-Zell-Adhäsionen des Wildtyps aus<sup>7</sup>. Die dabei entstehenden fadenähnlichen *Membrantether* waren besonders in Dehnungsrichtung ausgeprägt. Bei der KO-Mutante konnte keine Zähnung beobachtet werden. Dort ausgeprägte Zell-Verbindungen liefen eher linienartig ohne Unterbrechungen entlang der Zell-Zell Grenzen. Unter Dehnung konnten keine Unterschiede der KO-Adhäsionen im Vergleich zu 0 % festgestellt werden, unter der

<sup>7</sup> Interessanterweise zeigte der K14 Rescue dieses Verhalten nicht, er ähnelte dabei eher der KO-Mutante (vergl. [Abbildung 4.19](#)).

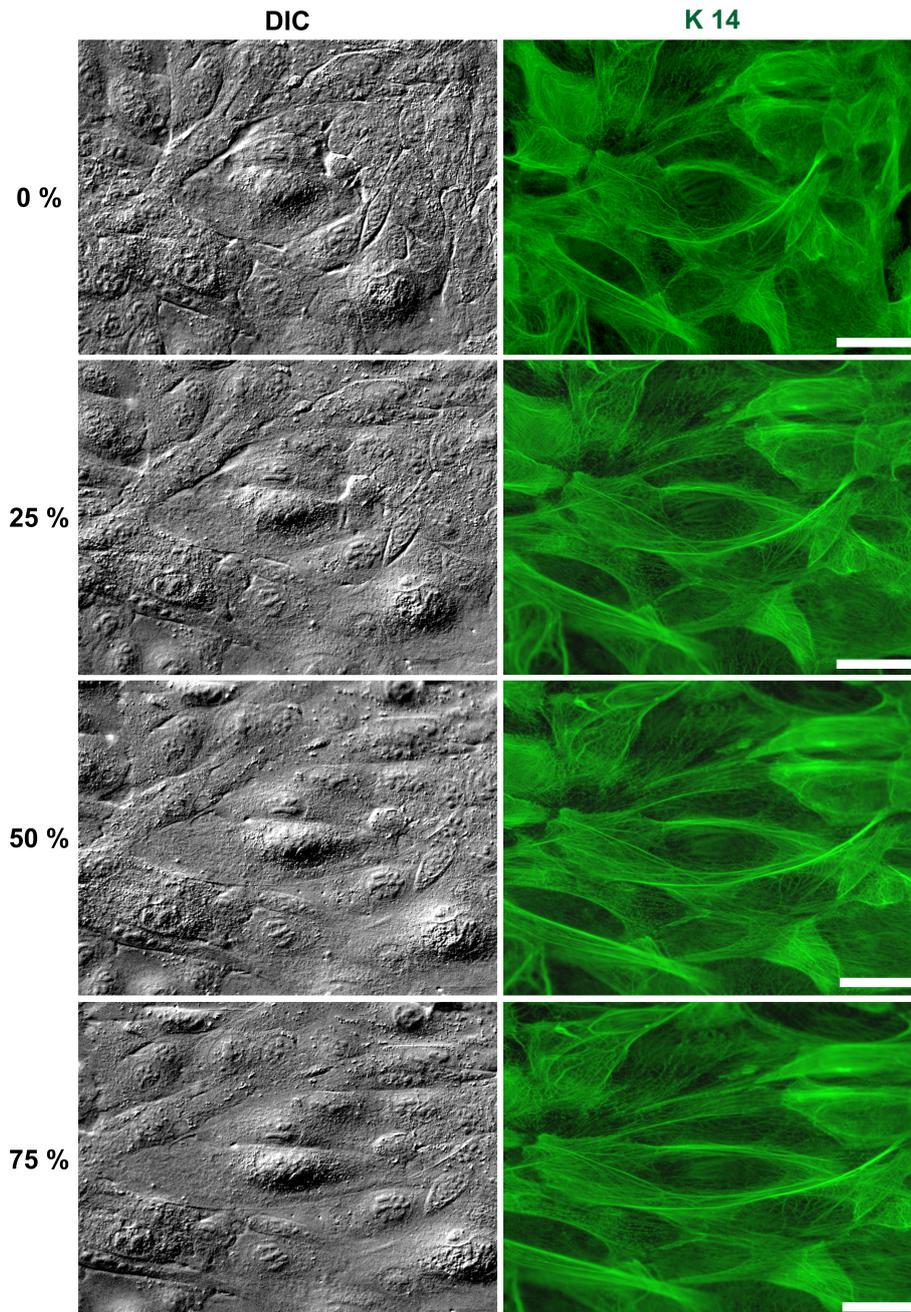


Abbildung 4.19: Aufnahmen einer Monolage der K14-Res Mutante (*links*) und des zugehörigen Keratin 14 (Epifluoreszenz; *rechts*) während unterschiedlicher Dehnungszustände. Die angelegte Dehnung erfolgte dabei horizontal und 16 h nach Calcium-Zugabe. Die Aufnahmen wurden in einem zeitlichen Abstand von ca. fünf Minuten pro Dehnungsschritt aufgenommen. Die Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ . Der Umfang der unabhängigen Messungen beträgt zwei, wobei hier nur eine Position abgebildet ist.

Bedingung, dass die Verbindungen auch vor Dehnung integer waren und keine Lücken aufwiesen.

Durch die immunzytochemischen Untersuchungen der Desmosome des Wildtyps konnte eine Kolo­kalisierung des Desmoplakin-Signals mit den einzelnen Membrantethern gezeigt werden. Interessanterweise war dabei das Desmoplakin-Signal nicht mehr punktförmig, sondern entlang der Membrantether ausgerichtet. Die knock-out Mutante zeigte sowohl vor als auch nach Dehnung punktförmige Signale.

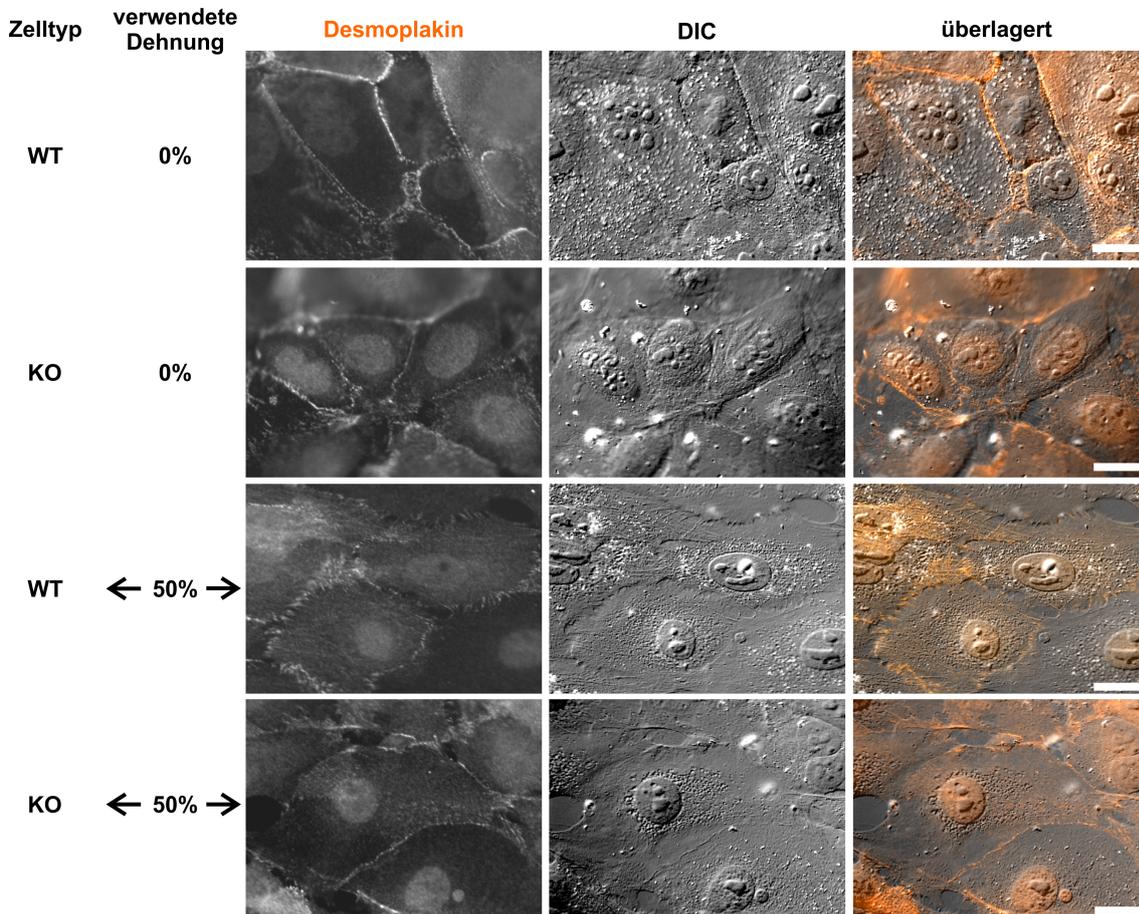


Abbildung 4.20: Analyse der Zell-Zell Kontakte der Keratin I WT und KO Zelllinien in Abhängigkeit der angelegten Dehnung (horizontal). Die Fixierung der Zellen erfolgte 16 h nach Calcium-Zugabe. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 µm. Der Umfang unabhängiger Messungen beträgt für jede Kondition zwei.

Um diese Beobachtungen zu quantifizieren wurde die Änderung der Zellflächen unter Dehnung ermittelt (Abbildung 4.21). Dabei wurden die Zell-Zell Kontakte explizit nicht berücksichtigt, um die Bildung der Membrantether charakterisieren zu können (siehe auch Unterunterabschnitt 3.4.4.4). Die relativen Flächenänderungen  $a_{rel}$  wurden von 0 auf 25 % und von 25 auf 50 % wie folgend ermittelt:

$$a_{rel;25}[\%] = \left( \frac{A_{25}}{A_0} - 1 \right) * 100 \quad (4.7)$$

$$a_{rel;50}[\%] = \left( \frac{A_{50}}{A_{25}} - 1 \right) * 100 \quad (4.8)$$

mit  $A$ , den ermittelten Flächen mit Bezug auf die Amplitude der angelegten Dehnung in %.

Für beide Intervalle war die relative Flächenänderung der knock-out Mutante signifikant größer als die des Wildtyps. Damit konnte ein stark unterschiedliches Verhalten der Zellmonolagen in Abhängigkeit von der Anwesenheit der Keratine gezeigt werden.

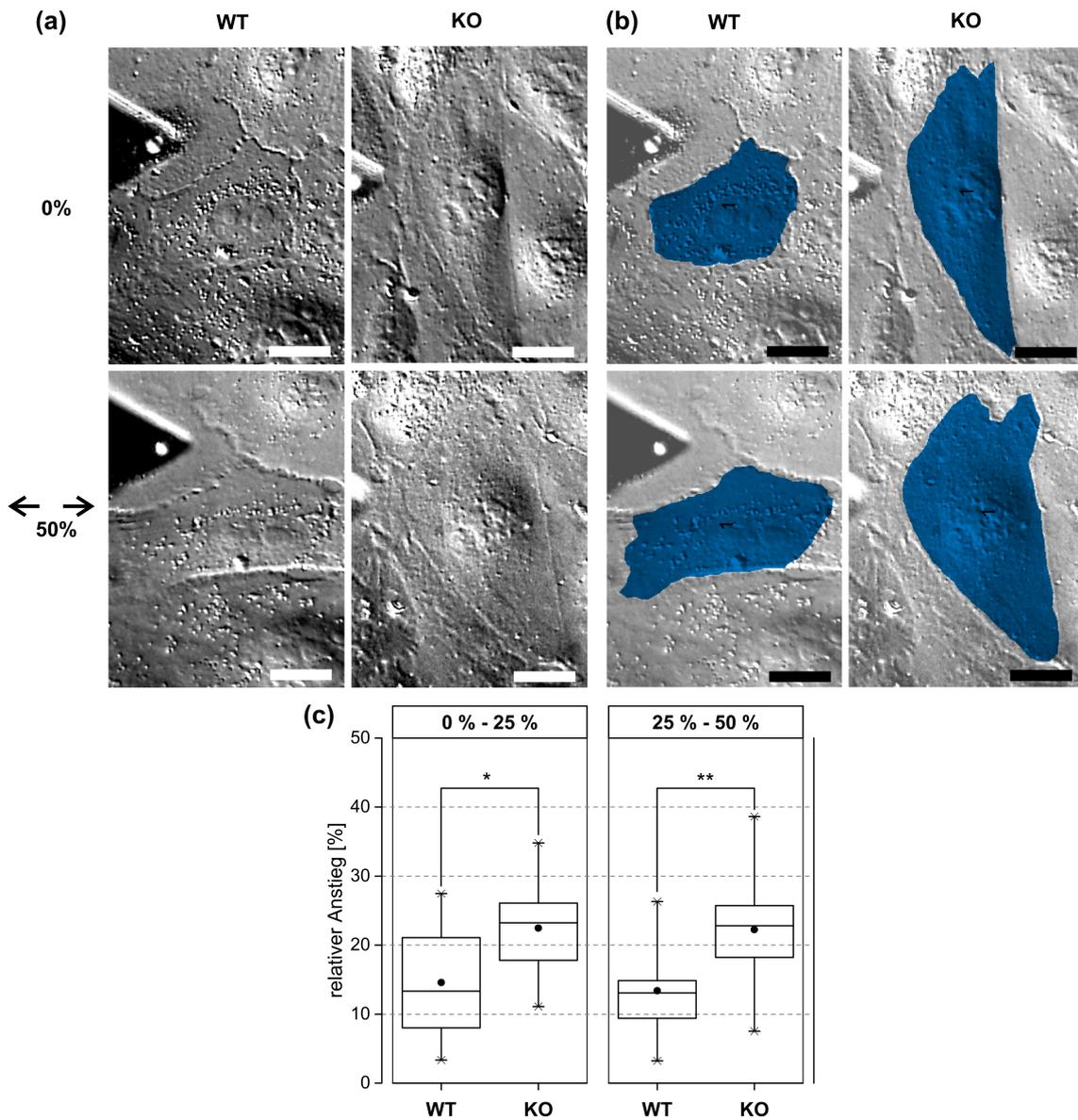


Abbildung 4.21: (a) Abbildung einzelner Zellen in Monolage. Die angelegte Dehnung erfolgte horizontal. b) Die Flächen gleicher Zellen wurden vor und nach Dehnung analysiert (*blau*). Zur Untersuchung der Adhärenzverbindungen wurden diese dabei explizit nicht berücksichtigt. Die Maßstabsbalken entsprechen  $20\ \mu\text{m}$ . c) Boxplots der relativen Flächenänderungen während 25% angelegter Dehnung, für zwei Intervalle (jeweils *linke* und *rechte* Seite) für Wildtyp und knockout Zellen. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die Mediane, die schwarzen Punkte die Mittelwerte. Die Boxen selbst umfassen 50% der gemessenen Werte (vom ersten bis dritten Quartil) und die Balken 100%. Für den WT wurden 15 Flächen in 6 voneinander unabhängigen Messungen analysiert und für die KO-Mutante 14 Flächen in 8 unabhängigen Messungen.

#### 4.5 KERATINE - PUFFERSYSTEM VON HOHEN MECHANISCHEN BELASTUNGEN

Wegen ihrer hohen Präsenz und der Eigenschaft isolierter Intermediärfilamente (Janmey et al., 1991) unter Dehnung zu versteifen, wird vermutet, dass Keratine bzw. IF als eine Art mechanischer Puffer fungieren, der die Gewebeintegrität unter hohen mechanischen Belastungen gewährleisten soll. Um dieses Verhalten in lebenden Zellen zu untersuchen, wurde das in [Unterabschnitt 4.4.2](#) vorgestellte Keratin-knock-out/Wildtyp-System verwendet. Zur mechanischen Untersuchung der Zellen wurde eine neue Technik entwickelt, die es ermöglichte, gleichzeitig zu dehnen und mit einem Rasterkraftmikroskop zu analysieren.

##### 4.5.1 *Anpassungen des Zellstretchers*

Für die folgenden kraftspektroskopischen Analysen mussten weitere Anpassungen am Stretcher vorgenommen werden. Diese wurden in Zusammenarbeit mit W. Rubner und J. Konrad durchgeführt. Insbesondere Rasterkraftmikroskope sind sehr kompakt gebaut, um möglichst wenig mechanische Schwingungen aus der Umwelt aufzunehmen. Daher musste ein Stretchersystem inklusive passender Kammerhalter entwickelt werden, welches in den verfügbaren Platz zwischen RKM-Kopf und Tisch des inversen Mikroskops passte. Dazu wurde zunächst die Höhe des Stretchers deutlich reduziert und ein entsprechender Adapter für die horizontale Mikrometer-Verstellung angepasst (siehe auch [Abbildung 4.22](#)). So konnte der Stretcher auf den Mikroskoptisch geschraubt und darauf mit einer Genauigkeit im Mikrometer-Bereich bewegt werden. Dadurch konnten nicht nur auf den Kammern adhärenzte Zellen präzise angefahren werden sondern auch während der Dehnung die untersuchten Proben nachverfolgt werden. Somit war es möglich die gleichen Positionen auf den Zellen bei unterschiedlichen Dehnungen zu untersuchen (siehe auch [Unterabschnitt 4.1.3](#)).

Weiterhin wurde die Höhe der Kammerhalter soweit wie möglich verringert (siehe [Abbildung 4.23c](#)). Da jedoch der Schrittmotor sich nicht auf dieses Maß verkleinern ließ, wurde stattdessen der Verbindungsteg zwischen Kammerhalter und Schrittmotor soweit verlängert, dass der Motor neben dem RKM-Kopf verwendet werden konnte ([Abbildung 4.23a](#)). Mit diesen Anpassungen konnten Dehnungsexperimente auf dem Mikroskoptisch durchgeführt werden, wobei Zellen auf den Kammern durch inverse Lichtmikroskopie gefunden und mit dem RKM indentiert werden konnten.

##### 4.5.2 *Optimierung der Parameter für die kraftspektroskopischen Messungen*

Eine wichtige Frage, die es für die Streckexperimente an Zellen zu klären galt, war die der geeigneten Dehnungsamplituden. Aus Janmey et al., 1991 ist bekannt, dass *in vitro*

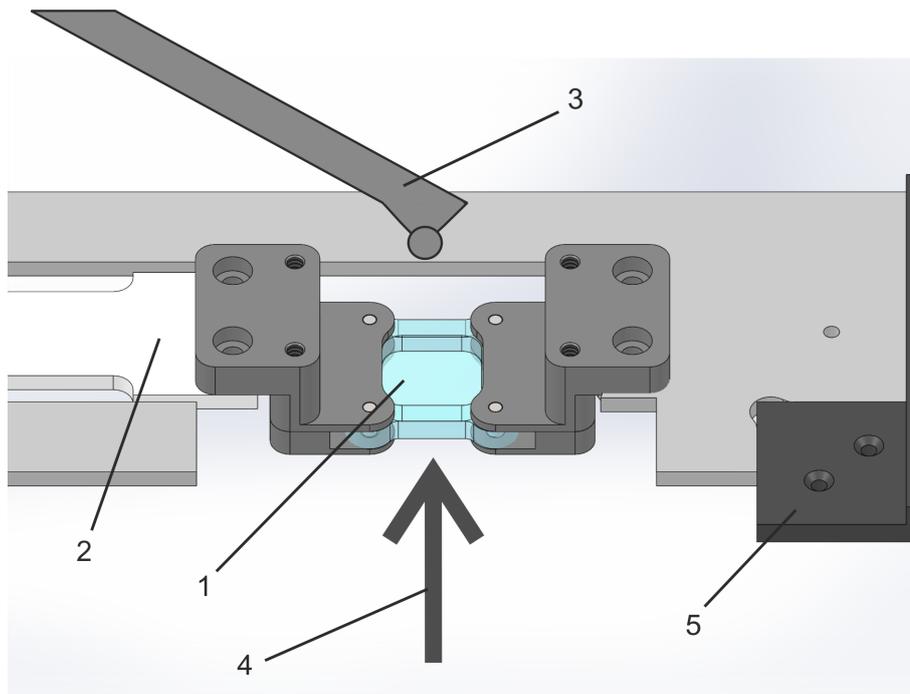


Abbildung 4.22: Schema des Versuchsaufbaus für die RKM-Analysen: Die zu untersuchenden Zellen können in den Elastomerkammern (1) kultiviert werden. Diese sind über eine bewegliche Brücke (2) mit dem RKM-Stretcher verbunden. Gleichzeitig ist Rasterkraftmikroskopie von oben (3) und Lichtmikroskopie von unten (4) möglich. Ein Adapter (5) ermöglicht die Fixierung des Stretchers an die horizontale Verstellung des RKM-Tisches. Die Skizze ist nicht maßstabsgerecht.

Keratin-Biogele erst bei relativ hohen Amplituden (ab 20 % Dehnung) beginnen sich zu versteifen. Die hier verfolgte Hypothese ist, dass dieses Verhalten auch für Keratinnetzwerke in lebenden Zellen gilt.

Um mögliche Wechselwirkungen zwischen den Elastomerkammern und dem RKM zu ermitteln wurde das Rauschen direkt über dem Kammerboden analysiert (siehe auch [Abbildung 4.24](#)). Dazu wurden Kraft-Abstandskurven an den gleichen Stellen auf der Kammer für unterschiedliche Dehnungen aufgenommen. Die Messungen erfolgten in Kulturmedium über dem Kammerboden, jedoch ohne direkten Kontakt zur Oberfläche ([Abbildung 4.24 a](#)). Dabei stellte sich heraus, dass das Rauschen bei höheren Dehnungen zunahm, wobei ein Peak um 200 Hz den größten Anteil hatte ([Abbildung 4.24 b-d](#)). Weitere Peaks wurden bei Frequenzen zwischen 400 und 600 Hz aufgenommen, wobei für diese keine Systematik gefunden werden konnte. Die Quelle des erhöhten Rauschens konnte nicht gefunden werden.

Aufgrund der Korrelation des Rauschens mit der Dehnung wurden die Proben nacheinander bei 25 % und 50 % Dehnung analysiert. Diese Werte wurden gewählt um im

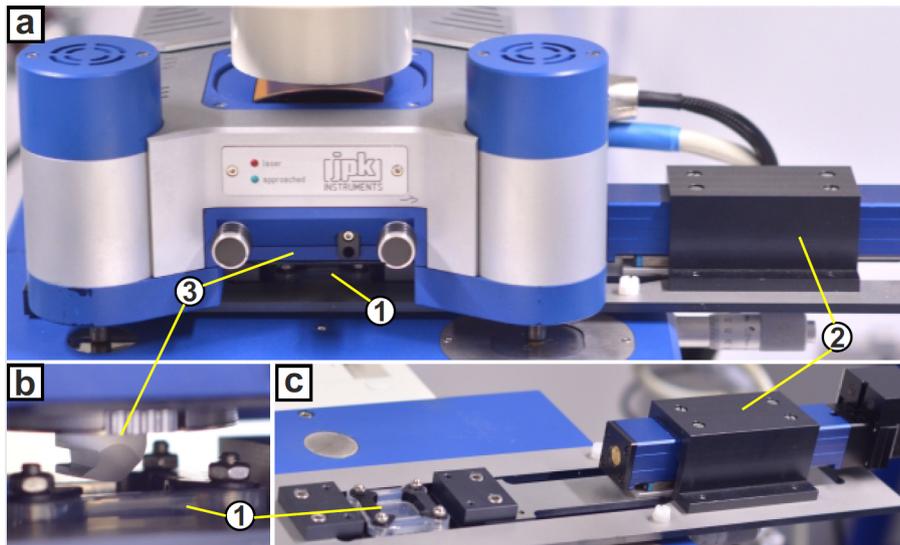


Abbildung 4.23: Anpassungen des RKM-Stretchers. a) Vorderansicht: Der Aufbau ermöglicht kraftspektroskopische Analysen der Proben, während diese parallel dazu in einer Elastomerkammer (1) kultiviert werden können. Diese können dann mit dem extraflachen RKM-Stretcher (2) gedehnt werden. Das RKM (3) fügt sich millimetergenau in den Aufbau. b) Fokussierung auf die Elastomerkammer mit dem darüber befindlichen Glasblock. c) Das Absetzen des RKM-Kopfes ermöglicht die Sicht auf den Stretcher.

Bereich der vorhergesagten Versteifung der Keratine zu indentieren, in dem gleichzeitig das Rauschen noch sinnvolle Messungen zuließ.

Weiterhin wurden verschiedene Strategien zur Reduktion der Variabilität verfolgt. Dabei wurde jede Messung sechsmal an derselben Stelle wiederholt (Abbildung 4.25). Wegen der hohen Reproduzierbarkeit der Kurven wurden die einzelnen Indentationen für jede Messung gemittelt. Weiterhin wurde für alle Messungen derselbe Cantilever verwendet. Da während der Dehnung die Zellen nachverfolgt werden konnten (Abbildung 4.23) wurde darauf geachtet, dass für die analysierten Zellen bzw. Zellpaaren auf denselben Stellen für jede Dehnungsamplitude gemessen werden konnte.

Ein Teilaspekt der nachfolgenden Untersuchungen, war die Unterscheidung verschiedener Bereiche innerhalb einzelner Zellen.

Da der Keratin WT unter Dehnung eine Membrantetherbildung zeigte und die KO-Mutante nicht, wurden insbesondere die Bereiche der zellulären Adhäsionen analysiert. Dabei wurde auf eine zur Dehnungsrichtung senkrechte Orientierung der Zell-Zell-Verbindungen geachtet (siehe auch Abbildung 4.26). Der zweite Fokuspunkt lag über dem Zytoplasma, welches einen hohen Anteil von Keratin zeigte (Abbildung 4.19). Dabei wurde mittig zwischen dem Nukleus und den Verbindungen zu den benachbarten Zellen indentiert. Bei jeder Messung wurde auf denselben Positionen bei unterschiedlichen

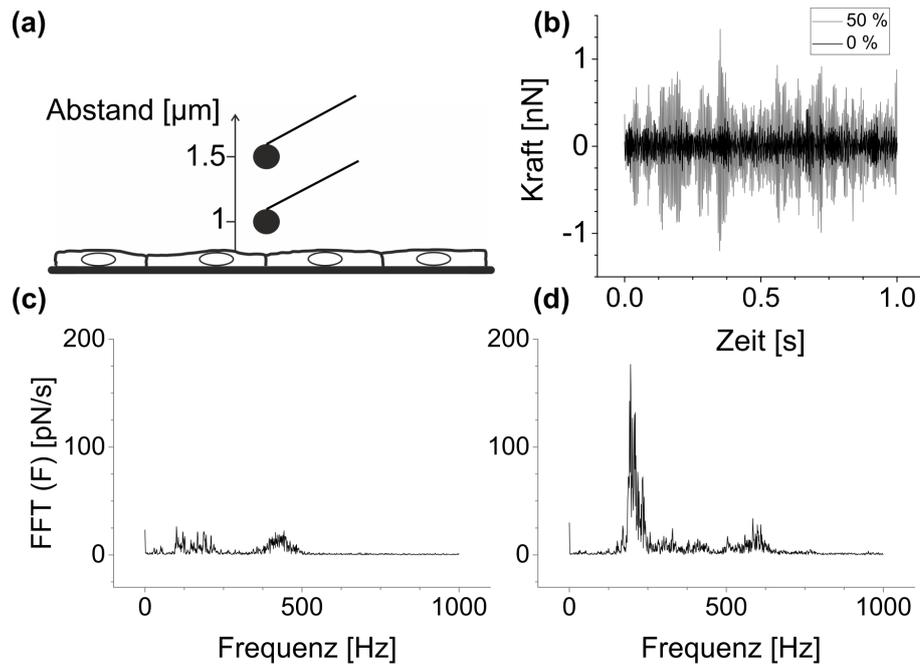


Abbildung 4.24: a) Aufnahmeprinzip der Kraftkurven für die Rauschanalysen. Der Cantilever (schwarze Sphäre mit Balken) nähert sich dabei der Zellmonolage bis auf 1  $\mu\text{m}$ . b) Beispiele der Kraftsignale in Abhängigkeit von der Aufnahmezeit; *schwarz*: 0% Dehnung, *grau*: 50% Dehnung. Absolutwerte der schnellen Fourier-Transformation der Kraftsignale bei 0%(c) und 50% (d).

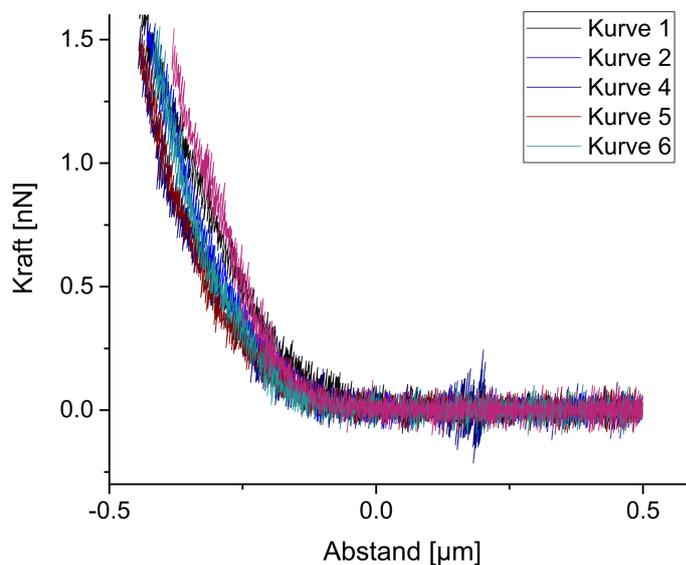


Abbildung 4.25: Superposition von sechs Kraftkurven. Die Kurven wurden auf derselben Position über der Lamelle einer WT-Zelle während 0% Dehnung aufgenommen.

Dehnungen indentiert.

Zur Analyse der Kraftkurven wurde ausschließlich der Annäherungsteil der Kraftkurven verwendet. Eine solche Kurve ist beispielhaft in [Abbildung 4.27](#) dargestellt.

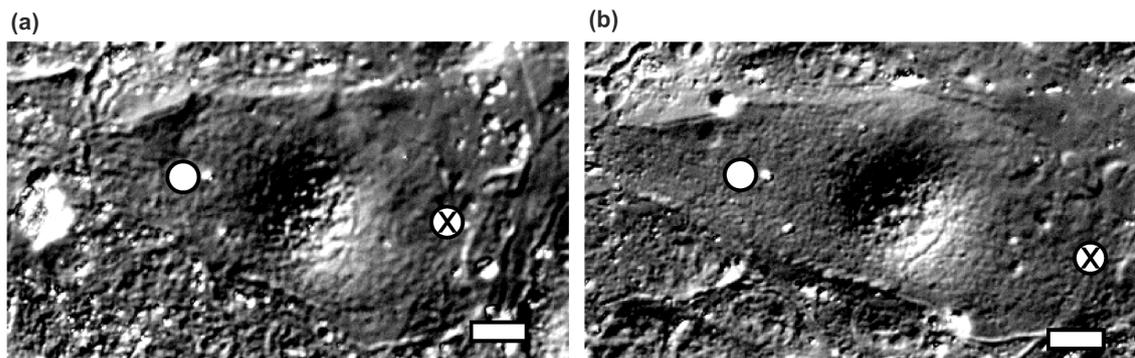


Abbildung 4.26: Aufnahme einer Keratin KO-Zelle, relaxiert (a) und gedehnt (b). Die angelegte Dehnung von 50 % erfolgte in horizontaler Richtung. Die weißen Punkte markieren Indentationen über den Zell-Zell-Verbindungen, Kreuze über den Lamellen. Die Maßstabsbalken entsprechen 20  $\mu\text{m}$ .

Entscheidend war dabei die *Indentationstiefe*, die sich als Abstand vom Kontakt des Cantilevers mit der Probe bis Eindringtiefe an einem festgelegten Kraft-Sollwert definiert.

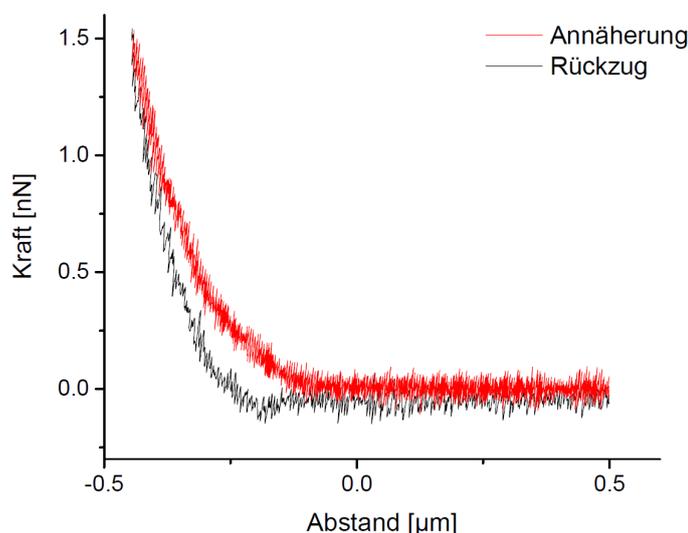


Abbildung 4.27: Die dargestellte Kraft-Abstands-Kurve beschreibt einen vollständigen Annäherungs- (rot) und Rückzugs- (schwarz)-Zyklus. Dabei wurde auf einer WT-Zelle bei 0 % Dehnung indentiert. Die hier gezeigte Kurve wurde nicht geglättet.

Ausgehend von Ramms et al., 2013 wurde zunächst ein Kraftsollwert von 0.5 nN verwendet. Da jedoch das Rauschen auf gedehnten Kammern eine ähnliche Größenordnung hatte, wurde im folgenden ein Wert von 1.5 nN verwendet, um das Signal-Rausch Verhältnis zu erhöhen. Zur weiteren Analyse sind die Indentationstiefen abhängig von der Kraft von 1.0 bis 1.5 nN in [Abbildung 4.28](#) dargestellt. Aufgrund der starken Oszillationen des Cantilevers wurde häufig allein durch das Rauschen der Kraftsollwert von 1.5 nN erreicht, ohne das die zugehörige Indentationstiefe erreicht wurde. Daher wurden die Indentationsdaten nach der Glättung bei 1.3 nN abgelesen, womit das Problem umgangen

werden konnte. Wie in [Abbildung 4.28](#) ersichtlich, waren die Unterschiede zwischen den erreichten Indentationstiefen bei 1.3 nN und 1.5 nN nur geringfügig. Über dem Bereich von 1.0 bis 1.5 nN war zudem die Reihenfolge der Indentationstiefen, geordnet nach den untersuchten Konditionen, bis auf minimale Abweichungen identisch.

Die Lamellen undifferenzierter Keratinozyten (nach Kultivierung mit geringer Ca-Zufuhr) weisen laut Ramms et al., [2013](#) eine Schichtdicke von 4  $\mu\text{m}$  auf. Bei Indentation mit einer Kraft von 1.3 nN wird eine Tiefe von 500 – 1000 nm erreicht, was demnach mindestens 10 % der Zelldicke entspricht. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die angewandte Kraft ausreichend war, um auch zytoskeletale Strukturen zu indentieren.

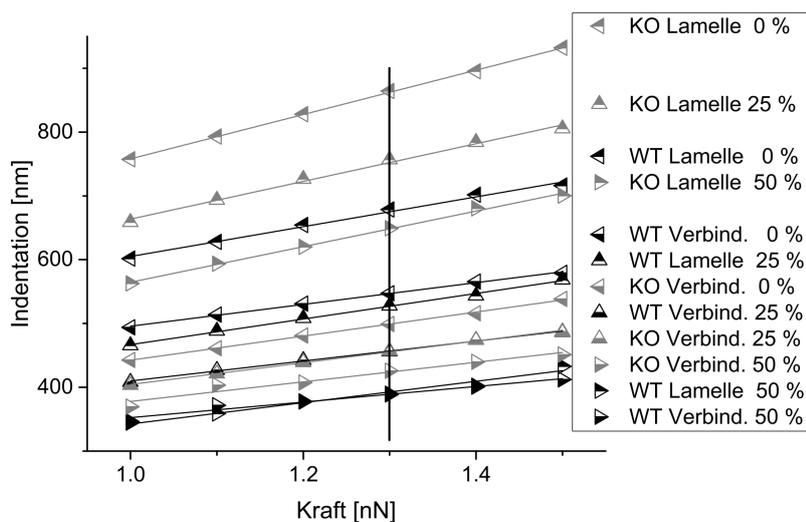


Abbildung 4.28: Gemittelte Indentationstiefen als Funktion der Kraft für Keratin Wildtyp und knock-out Zellen bei drei unterschiedlicher Dehnungszustände. Die einzelnen Messpunkte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus 14 Einzelmessungen. Die Unsicherheiten entsprechen denen in [Abbildung 4.30](#) und sind zur besseren Übersicht nicht gezeigt. Die auf der vertikalen Linie bei 1.3 nN liegenden Daten entsprechen den Daten in [Abbildung 4.30](#). Insgesamt wurden 14 Zellen pro Kondition indentiert, bei den KO Lamellen jedoch nur 13. Es wurden sechs unabhängige Messungen pro Zelllinie durchgeführt.

Zur Ermittlung des direkten Einfluss der Elastomerkammern auf die Indentationen, wurden RKM Messungen in Kammern ohne Zellen durchgeführt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde auf denselben Positionen indentiert, während unterschiedliche Dehnungsamplituden gehalten wurden ([Abbildung 4.29](#)). Im Vergleich zu den Indentationstiefen auf Zellen mit 500 – 1000 nm (siehe auch [Abbildung 4.30](#)), waren die Indentationen auf dem Substrat mit 75 nm eine Größenordnung kleiner. Darüber hinaus konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messungen bei unterschiedlichen Dehnungsamplituden festgestellt werden, was die nachfolgenden Analysen enorm vereinfachte.

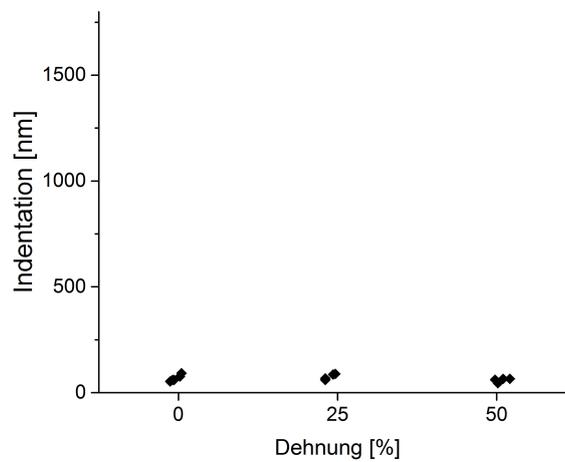


Abbildung 4.29: RKM Indentationen des Substrats in Abhängigkeit von der angelegten Dehnung. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die gleiche Skalierung wie in [Abbildung 4.30](#) gewählt. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von vier aufeinanderfolgenden Messungen dar. Pro Dehnungsamplitude sind vier Punkte dargestellt. Die Indentationstiefen wurden bei einem Kraftwert von 1.3 nN abgelesen. Die Standardabweichungen für die Einzelmessungen lag bei ca. 10%. Zur besseren Übersicht sind diese nicht dargestellt.

### 4.5.3 Versteifung epithelialer Monolagen unter Dehnung ist Keratin-abhängig

Die nachfolgenden Messungen wurden ausschließlich an differenzierten Zellmonolagen durchgeführt, die sich während der Experimente stabil verhielten, ohne zu reißen. Die aufgenommenen Änderungen der Indentationstiefen in Abhängigkeit von der angelegten Dehnung sind in [Tabelle 4.3](#) und [Abbildung 4.30](#) dargestellt, die statistischen Analysen dazu in [Tabelle 4.4](#).

Die Ergebnisse der RKM-Messungen auf den Lamellen von Zellen mit intaktem Keratinzytoskelett (WT) lieferten eine klare Reduktion der Indentationstiefen bei 25 % und 50 %. Diese Reduktion konnte in einem kleineren Maße auch für die Keratin-KO Zellen gemessen werden. Interessanterweise konnte eine signifikante Versteifung gedehnter Zell-Zell Verbindungen nur zwischen WT Zellen beobachtet werden, nicht jedoch für KO Zellen.

Weiterhin waren die Zellverbindungen der KO-Mutante steifer als ihre Lamellen für alle analysierten Dehnungsamplituden. Im Gegensatz dazu wiesen die Adhäsionen und Lamellen des WT keine signifikanten Unterschiede untereinander auf.

Insgesamt konnte für die Steifigkeit der Zell-Zell-Verbindungen keine Abhängigkeit von der Keratin Anwesenheit festgestellt werden. Für die Lamellen jedoch war der Wild-Typ signifikant steifer als die KO-Mutante bei 25 % und 50 %.

Bereich	0 %			25 %			50 %		
	Mittel [nm]	Quartile [nm]	n	Mittel [nm]	Quartile [nm]	n	Mittel [nm]	Quartile [nm]	n
Lamelle WT	680	460/740	14	530	420/590	14	390	310/510	14
Lamelle KO	900	630/1170	13	760	600/880	13	660	480/760	13
Adhäsion WT	540	420/630	14	460	350/540	14	370	310/420	14
Adhäsion KO	500	340/600	14	460	340/560	14	430	330/450	14

Tabelle 4.3: Mittelwerte der Indentationstiefen entsprechend [Abbildung 4.30](#). Quartile: 25 % der Daten sind kleiner oder gleich dem ersten Quartil (*linker Wert*); 75 % der Daten sind kleiner oder gleich dem dritten Quartil (*rechter Wert*). n gibt die Anzahl indenterter Zellen an. Insgesamt wurden sechs unabhängige Messungen pro Zelllinie durchgeführt.

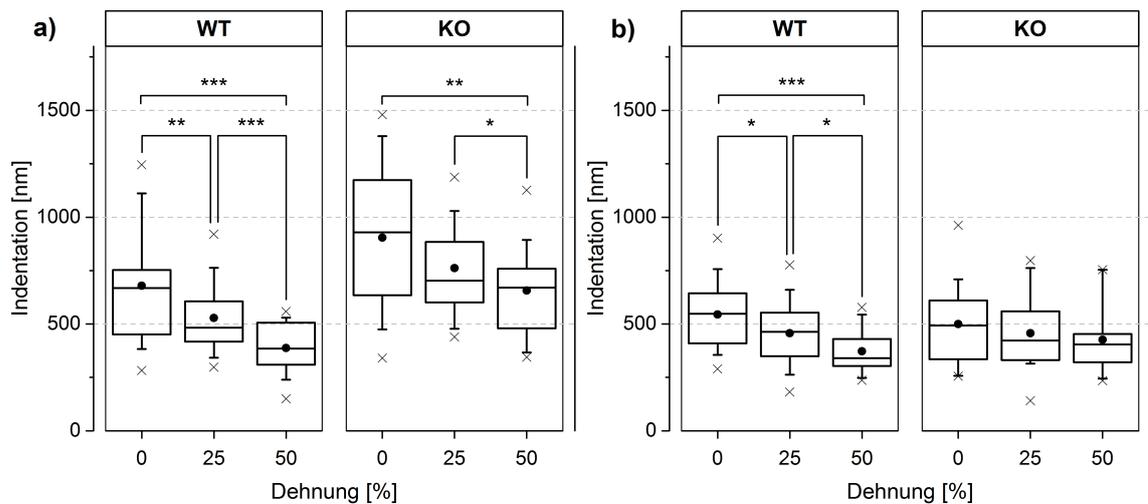


Abbildung 4.30: Zusammenfassung der mechanischen Analysen gedehnter Keratinozyten Monolagen. Die Kraftkurven wurden über der Zelllamelle (a) und den Zell-Zell-Adhäsionen (b) für verschiedene Dehnungsamplituden aufgenommen. Dabei sind in den Diagrammen jeweils *links* die Werte für die Keratin Wildtyp Zellen und *rechts* die Werte für die Keratin knock-out Zellen dargestellt. Die Indentationstiefen wurden bei 1.3 nN abgelesen. Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die Mediane, die schwarzen Punkte die Mittelwerte. Die Boxen selbst umfassen 50% der gemessenen Werte (vom ersten bis dritten Quartil), die Balken 80% und die Kreuze 100%. Insgesamt wurden 14 Zellen pro Kondition indentiert, bei den KO Lamellen jedoch nur 13. Es wurden sechs unabhängige Messungen pro Zelllinie durchgeführt.

Vergleich	Lam. Vs. Verbind.	Lam. Vs. Verbind.	WT Vs. KO	WT Vs. KO
Bereich/Zelle	WT	KO	Lam.	Verbind.
0%	ns	**	ns	ns
25%	ns	***	**	ns
50%	ns	**	**	ns

Tabelle 4.4: Signifikanzanalysen entsprechend [Abbildung 4.30](#). Die Signifikanzen wurden mit einem zweiseitigen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test überprüft: ns für p-Wert > 0.05; p-Wert(\*) < 0.05; p-Wert(\*\*) < 0.01; p-Wert(\*\*\*) < 0.001.

#### 4.5.4 Bestimmung der effektiven Steifigkeit

Zur weiteren Analyse der Ergebnisse wurde ein Potenzgesetz an die Kraft-Abstandskurven angepasst:

$$F = A\delta^b \quad (4.9)$$

mit der Kraft  $F$ , der Indentation  $\delta$  und den freien Parametern  $A$  und  $b$ . Im entspannten Zustand (0% Dehnung) betrug der Exponent im Median 2.03 für Messungen auf der WT Lamelle und 2.12 auf KO Lamelle. Für alle weitere Konditionen wurden höhere Exponenten gefunden, wobei diese mit der angelegten Dehnung korrelierten ([Abbildung 4.31](#)). Das bei Indentationen auf Zellen meist verwendete *Hertz-Modell* (siehe auch Radmacher et al., 1996) enthält jedoch einen Exponenten von 1.5 und passte damit zu keiner der analysierten Konditionen. Stattdessen wurde wie in Ramms et al., 2013 der Exponent auf  $b = 2$  gesetzt und die *effektive Steifigkeit*  $A_2$  wurde wie folgt definiert:

$$F = A_2\delta^2 \quad (4.10)$$

Zur Berechnung wurde die Taylor-Näherung

$$\delta(F) \approx \delta(F_0) + \frac{d}{dF}(\delta(F_0))(F - F_0) \quad (4.11)$$

wie in [Abbildung 4.28](#) gezeigt an  $\delta(F)$  angepasst. Dazu wurde der Bereich  $F \in [1.0 \text{ nN}; 1.5 \text{ nN}]$  und der Zentralwert  $F_0 = 1.25 \text{ nN}$  verwendet.

Aus [Gleichung 4.9](#) errechnet sich der Anstieg  $\frac{d}{dF}(\delta(F)) = \frac{1}{2\sqrt{A}} \frac{1}{\sqrt{F}}$  und für die effektive Steifigkeit:

$$A_2 = \frac{1}{4F_0 \frac{d}{dF}(\delta(F_0))} \quad (4.12)$$

Diese betrug für die Messungen auf der WT Lamelle  $A_2^{WT} = 3.6 \text{ kPa}$  (0.62 kPa) und für die KO Lamelle  $A_2^{KO} = 1.6 \text{ kPa}$  (s.d. 0.11 kPa).

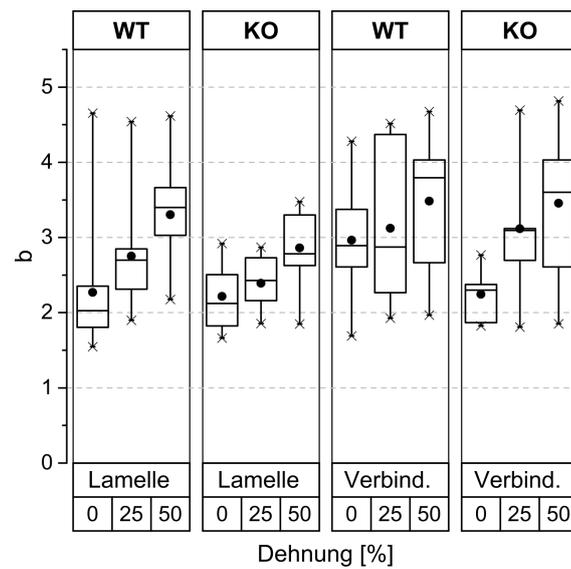


Abbildung 4.31: Exponenten des Potenzgesetzes (Gleichung 4.9). Die horizontalen Linien innerhalb der Boxen repräsentieren die Mediane, die schwarzen Punkte die Mittelwerte. Die Boxen selbst umfassen 50% der gemessenen Werte (vom ersten bis dritten Quartil) und die Balken 100%. Für die Anpassungen wurden dieselben Daten wie in [Abbildung 4.30](#) verwendet. Insgesamt wurden 14 Zellen pro Kondition indentiert außer für die KO Lamellen mit 13 analysierten Zellen. Es wurden sechs unabhängige Messungen pro Zelllinie durchgeführt.

## DISKUSSION

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit standen zwei grundlegende Eigenschaften der Haut, die mechanische Anisotropie und die Dehnbarkeit, welche auf zellulärer Ebene untersucht wurden. Zum einen wurde analysiert, welchen Einfluss die Ausrichtung der Aktinfilamente auf die mechanischen Spannungen der Zellmonolagen und auf die Kooperativität der Zellen hat. Zum anderen wurde der Einfluss der Keratine auf das Verhalten der Monolagen bei hohen Dehnungen analysiert. Dabei wurde das Zytoskelett auf intrazellulärer Ebene manipuliert und als Folge dessen die Änderungen der mechanischen Eigenschaften auf zellulärer Ebene untersucht.

Der hier verwendete Ansatz zur Generierung anisotroper Zellmonolagen beruht auf physiologischen Umbauprozessen der Aktinfilamente und ermöglicht dabei mechanische Analysen lebender Zellen ohne Beschädigungen des Zytoskeletts. Dazu wurden Keratinozytenmonolagen mit gereiften Adhärenzverbindungen zyklisch gedehnt. Als Folge dessen orientierten sich die Zellen senkrecht zur Dehnungsrichtung, um die von den Zellen zu tolerierenden Kräfte zu minimieren. Dass diese Ausrichtung auch mit der Reorientierung von Aktinfilamentbündeln senkrecht zur angelegten Dehnung verbunden ist, konnte bereits für Einzelzellen gezeigt werden (Hayakawa et al., 2000, Wang et al., 2001). In Noethel et al., 2018, wie auch in der vorliegenden Arbeit, konnte außerdem die dehnungsinduzierte Ausrichtung der Aktinfaserbündel in Keratinozytenmonolagen in Anwesenheit von Zell-Zell-Verbindungen gezeigt werden. In bereits publizierten Studien wurden zur Untersuchung von AF meist Ansätze verwendet, die entweder eine Beschädigung einzelner Filamentbündel oder die chemische Auflösung des gesamten Aktinzytoskeletts mit sich zogen. Neben Ablationsexperimenten (Shen et al., 2005, Maxwell et al., 2005) fand dabei vor allem der Abbau von Aktinfilamenten mittels depolymerisierender Substanzen wie Latrunculin A oder Cytochalasin D große Anwendung (Lulevich et al., 2010, Gavara et al., 2006). Ein Nachteil dieser Ansätze ist, dass dabei synergistische Wechselwirkungen zwischen zytoskeletalen Proteinen (Huber et al., 2015) nicht vollständig berücksichtigt werden können. Auch sekundäre, kompensatorische Effekte wie z.B. eine durch Aktindepolymerisation verursachte Hochregulierung der Keratingene (Chang et al., 2014) sind bei diesen Ansätzen zusätzlich zu berücksichtigen.

Weiterhin sind Untersuchungen der mechanischen Funktionen von Intermediärfilamenten in lebenden Zellen stets eine große Herausforderung, da es für diese keine Substanzen zur Depolymerisation wie für Aktin (Seltmann et al., 2013) oder Mikrotubuli (Gavin, 2010) gibt. Mit einem anderen Ansatz gelang es der AG Magin (Leipzig) die Expression von Keratinen in Keratinozyten vollständig zu unterbinden (Seltmann et al., 2013).

Durch Abschalten des entsprechenden Gen-Clusters konnten zwei Keratin-knock-out Mutanten etabliert werden. In dieser Arbeit kam dabei die KO I Mutante mit dem zugehörigen Wildtyp zum Einsatz. Eine mögliche Kompensation des Fehlens der Keratine, z.B. durch andere zytoskeletale Proteine kann dabei nicht völlig ausgeschlossen werden. In Seltmann et al., 2013 wurden dazu jedoch immunzytochemische Analysen an undifferenzierten Keratinozytenmonolagen durchgeführt. Dabei konnten keine Unterschiede in der Organisation von Aktin und Tubulin in der KO-Mutante im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Auch Western-Blot Analysen zeigten gleiche Expressionslevel von Aktin und Tubulin in diesen Zelllinien (Seltmann et al., 2013).

### 5.1 EINORDNUNG DER ADHÄRENZVERBINDUNGEN

Die Reifung zellulärer Adhärenzverbindungen lässt sich *in vitro* durch Inkubation der Zellen in Medium mit erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration initiieren (O'Keefe et al., 1987). Zur Differenzierung der hier verwendeten Keratinozyten wurden diese für 16 h in  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementiertem Medium inkubiert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zelladhäsion ist ein physiologischer Prozess, der eng mit einer Reihe weiterer intrazellulärer Ereignisse verknüpft ist, wie z.B. enzymatischen Reaktionen oder Änderungen in der Elastizität der Plasmamembran (Takeichi, 1977). Während Aktinfilamente undifferenzierter Keratinozyten insbesondere an Zell-Matrix-Adhäsionen gekoppelt sind, tritt die Kopplung des Aktinzytoskeletts differenzierter Epithelzellen vermehrt an Zell-Zell Adhäsionen auf (Kubler et al., 1991, Vaezi et al., 2002).

Immunzytochemische Analysen der Adherens Junctions und Desmosome der hier verwendeten Zellkolonien ermöglichten eine Einordnung der Adhärenzverbindungen hinsichtlich ihrer Differenzierung. Nach den 16 h Reifung konnte dabei eine deutliche Akkumulationen der E-Cadherin- und Desmoplakin-Fluoreszenzsignale im Bereich der Zell-Zell Adhäsionen gezeigt werden, die im Vergleich zu 0 h Differenzierung noch nicht auszumachen war. In Yonemura et al., 1995 wird die Reifung maligner Brustdrüsenzellen anhand der Organisation ihrer Adhäsionsproteine und Aktinfilamente entsprechend in ein frühes, ein fortgeschrittenes (bzw. mittleres) und ein spätes Stadium klassifiziert. Die hier untersuchten Zellen wiesen nach 16 h  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation eine größtenteils lückenlose Monolage mit einer deutlich peripheren Organisation der Aktinfilamentbündel im Bereich der Zell-Zell-Adhäsionen auf. Das Profil der E-Cadherine war dabei eher gepunktet mit Ansätzen zu einer kontinuierlichen Linie. Dieses Verhalten kann als Hinweis auf die beginnende Fusion der Cadherin basierten Zell-Zell-Kontakte zum Adhäsionsgürtel<sup>1</sup> interpretiert werden. Dieses Stadium fortgeschrittener Reifung wurde für die in Yonemura et al. untersuchten Zellen zeitiger, bereits nach 7–12 h  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation erreicht. 24–36 h  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation wurde in Yonemura et al als spätes Stadium kennzeichnet, welches u. a.

---

<sup>1</sup> *Zoluna adherens*

ein kontinuierliches E-Cadherin Signal und eine höhere Packungsdichte der Zellen in der Monolage aufzeigt. Diese Effekte konnten hier nicht beobachtet werden, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen keine vollständig ausgereiften Adherens Junctions aufwiesen.

Die Einordnung der Desmosome ist schwieriger, da sich diese allein anhand der verwendeten Immunfärbungen nicht klar in verschiedene Stadien unterteilen lassen. Auch konnten keine auffälligen Änderungen der Keratine, dem mit den Desmosomen assoziierten zytoskeletalen Untersystem, während der Differenzierung beobachtet werden. Matthey et al., 1990 verwendeten u. a. Western Blot, um die desmosomalen Proteine Desmocollin dg2/3a,b in MDCK Zellen (Nieren-Zelllinie) zu charakterisieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Plateau in der Akkumulation der Desmocolline erst nach 24 – 32 h an den Zelloberflächen erreicht wird. Daher ist anzunehmen, dass auch der Desmosom/Keratin Adhäsionskomplex der verwendeten Zellen nach den 16 h  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation noch nicht ausgereift war.

Relevant für die Kontraktilitätsanalysen war vorrangig ein maximales Signal-Rausch Verhältnis der durch die Zellen verursachten Verschiebungen der Mikrokugeln. Dazu wurden diese in Abhängigkeit von der Reifung der Zell-Zell Verbindungen untersucht. Da aus statistischen Gründen die Beschränkung auf einen Zeitpunkt sehr aufwändig ist, wurden anstatt der obigen 16 h  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation 16 bis 24 h verwendet und entsprechend 40 bis 48 h  $\text{Ca}^{2+}$  für den Vergleich mit länger gereifter Proben. Die Kontrolle erfolgte dabei ohne Inkubation unter erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Überraschenderweise zeigten dabei Zellkolonien, die 16 bis 24 h in  $\text{Ca}^{2+}$  inkubiert wurden, die höchste und die nach 40 – 48 h  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation die niedrigste Kontraktilität.

In Miroshnikova et al., 2018 wurden die Zell-Zell-Adhäsionskräfte zwischen einzelnen Epithelzellen gemessen. Den größten Adhäsionskräfte konnte dabei bereits nach 12 h  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation gemessen werden. Im Vergleich zu den Kräften nach einer 48 h Differenzierung konnten keine signifikanten Unterschiede zu 12 h gemessen werden. Mit Blick auf Adhärenzverbindungen allein lässt sich das oben beschriebene Kontraktilitätsverhalten jedoch nicht erklären. Neben der Kopplung der Zellen aneinander ist vor allen die Adhäsion der Zellen auf ihrem Substrat relevant. Dazu ist bekannt, dass nach Initiierung der Differentiation Keratinozyten sich von der Basal Lamina zum Stratum Spinosum<sup>2</sup> bewegen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Fokaladhäsionen, die ein wichtiges Element in der Zell-Substrat-Adhäsion darstellen, abgebaut werden, was zu einer Verminderung der Kontraktilität führen könnte (Simpson et al., 2011, Miroshnikova et al., 2018). Beide Effekte zusammen, das Plateau der Adhäsionskräfte nach 12 h  $\text{Ca}^{2+}$ -Inkubation und der Abbau der Fokaladhäsionen, könnten erklären, warum bereits im Stadium fortgeschrittener Reifung das Maximum an Kontraktilität erreicht wurde.

---

<sup>2</sup> Schicht der Oberhaut, auch als Stachelzellschicht bezeichnet.

## 5.2 KONTRAKTILITÄT ANISOTROPER ZELLMONOLAGEN

Als nächstes wurde untersucht, wie die Ausrichtung der Aktinfilamente die kollektive Kontraktilität der Zellmonolagen beeinflusst. Bereits von Harris et al., 1980 konnte gezeigt werden, dass Zellen stark genug sind, um auf weichen Substraten ihren Untergrund zu verformen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Eigenschaft verwendet, um die Kontraktilität der Monolagen zu analysieren. Dazu wurden Silikonkautschukkamern mit fluoreszierenden Mikrokugeln beschichtet, die es damit ermöglichen Zellen homogen und reproduzierbar zu dehnen und die Kontraktilität der Zellen über die Verschiebungen der Mikrokugeln aufzunehmen.

Ein klarer Nachteil der Kamern war, dass eine scharfe Abbildung der Mikrokugeln wegen der Dicke des Kammerbodens nur mit einem aufrechten Mikroskop möglich, da mit diesem Aufnahmen der Zellen von oben gemacht werden konnten. Da direkt unter Zellen liegende Mikrokugeln nur durch die Zellen durch mikroskopiert werden können kam es zu Artefakten (siehe auch [Abbildung 4.6](#)), die eine sinnvolle Auswertung dieser Daten verhinderten. Daher wurden ausschließlich Bereiche unmittelbar vor der Monolage analysiert, wobei die gemessenen Verschiebungen ihren Abständen zu den Monolagenrändern zugeordnet werden konnten. Dabei fielen die Verrückungen der Mikrokugeln mit wachsenden Abstand bei allen Konditionen ab. Obwohl die Verrückungen vor gereiften Zellmonolagen im Median um ca. 10% größer waren als die vor undifferenzierten Einzelzellen, waren diese Unterschiede nicht signifikant. Im Gegensatz zur Literatur konnte damit keine Abhängigkeit der Kontraktilität von der Größe der Monolagen festgestellt werden. In Mertz et al., 2012 konnte gezeigt werden, dass die Traktionskräfte in der Peripherie gereifter Keratinozytenmonolagen nach 18–24 h in  $\text{Ca}^{2+}$ -supplementiertem Medium am höchsten sind, während sie im Zentrum der Zellkolonien auf null abfallen. Weiterhin korrelieren die Traktionen positiv mit dem Radius der jeweiligen Zellkolonie. Dabei ist jedoch in Betracht zu ziehen, dass die differenzierten Zellmonolagen hier mit undifferenzierten Zellen ohne Zell-Zell Kontakte verglichen wurden, während in Mertz *et al.* differenzierte Monolagen isolierten Einzelzellen gegenüber gestellt wurden, die auch unter hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kultiviert wurden. Daher ist der Abbau der Fokaladhäsionen (Simpson et al., 2011, Miroshnikova et al., 2018) während der Differenzierung als mögliche Ursache dieser Abweichungen denkbar.

Für undifferenzierte Keratinozyten-Monolagen ohne Zell-Zell Verbindungen konnte eine hohe Übereinstimmung der Orientierung der Hauptachse der Kontraktionen mit der zellulären Orientierung ermittelt werden. Dabei waren die Verschiebungen in Orientierungsrichtung der Zellen um ca. 140% größer als in dazu transversaler Richtung und um 120% größer als bei nicht präkonditionierten Zellen. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Rape et al., 2011, in dem sie die Form adhärenter Fibroblasten durch Mikrostrukturierung der Adhäsionsflächen manipulierte. Dabei konnte gezeigt werden, dass rechteckige Zellen sowohl höhere maximale Traktionen als auch größere Adhäsions-

onsflächen ihrer Fokale ausbilden als quadratische Zellen. Während die Traktionskräfte der quadratischen Zellen in den Ecken am größten waren, zeigten rechteckigen Zellen maximale Kräfte an den kurzen Außenseiten. Beide Beobachtungen weisen auf eine positive Korrelation der Kräfte mit dem Abstand zwischen Zellmitte und Peripherie hin. Wurde das Seitenverhältnis der rechteckigen Zellen jedoch von 2.8 auf 11 erhöht, sanken die maximalen Kräfte wieder. Den Zusammenhang zwischen kontraktilen Zellkräften in Monolagen und dem Aktin-Myosin-System konnten Gavara et al., 2006 herstellen. Dabei wurden Aktinfilamente von Epithel-Zellen mittels Cytochalasin D depolymerisiert, was in einem Rückgang der Zellkräfte um 47% resultierte.

Einen außerordentlichen Effekt konnte hier für die zelluläre Ausrichtung auf die Kontraktilität differenzierter Monolagen mit gereiften Adhäsionsverbindungen gezeigt werden. Die dazu gemessenen Substratverformungen waren entlang der Ausrichtungsachse um das vierfache größer als bei Monolagen ohne vorherige Konditionierung und sogar um das 15-fache größer als transversal zur Ausrichtungsachse. Damit konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Ausrichtung einen wesentlich höheren Einfluss auf die Kontraktilität der Zellkolonien hat als die alleinige Anwesenheit von zellulären Adhäsionen. Ausrichtung und Reifung der Zellverbindungen zusammen potenzierten diesen Effekt. Die Ergebnisse geben einen Hinweis auf aktive, multizelluläre Kooperation, wodurch die kontraktilen Kräfte die einzelner Zellen um ein Vielfaches übersteigern. Die Analogie zu Ferromagneten, bei denen eine gleichgerichtete mikroskopische Ordnung eine weitreichende makroskopische Wirkung zur Konsequenz hat, ist hier naheliegend.

Saez et al., 2007 konnten einen weiteren Hinweis auf die Korrelation zytoskeletaler Organisation mit der Anisotropie kontraktiler Kräfte in Zellmonolagen liefern. Durch die Kultivierung von Nierenzellen (MDCK) auf Substraten mit anisotroper Steifigkeit, konnte eine Orientierung von sowohl Fokaladhäsionen als auch Aktinfilamentbündeln in Richtung höherer Steifigkeiten gezeigt werden. Weiterhin waren die kontraktilen Kräfte in Richtung zytoskeletaler Orientierung, wie auch in der vorliegenden Arbeit, signifikant höher als in dazu transversaler Richtung.

Da ein Großteil der Messungen auf Elastomerkammern eine höhere Varianz der Messwerte als die Kontrollmessungen auf PDMS-beschichteten Deckgläsern<sup>3</sup> zeigten, ist von einem systematischen Fehler auszugehen, der von den Kammern hervorgerufen wurde. Bei einem Teil der Proben konnte weiterhin eine entlang des Sichtbereichs zunehmende Verschiebung der Mikrokugeln beobachtet werden, die auf eine Schräglage der Kammer hindeutet. Obwohl diese durch eine nachträgliche Prozessierung der Fluoreszenzaufnahmen korrigiert werden konnte, bleibt der Einfluss der Korrekturen auf die Verschiebungsfelder unklar. Da Silikone auf Temperaturschwankungen sensibler reagieren als Glas, kann auch von einem höheren Drift der Kammern ausgegangen werden, womit auch die hohe Varianz erklärt werden kann.

---

<sup>3</sup> betreffend die Kontraktilitätsanalysen von Zellen ohne Präkonditionierung

## 5.3 TRANSZELLULÄRE KRAFTÜBERTRAGUNG IN EPITHELIALEN MONOLAGEN

Um die Generierung mechanischer Spannungen auch innerhalb von Zellmonolagen zu untersuchen, wurden Ablationsexperimente in Zellmonolagen mit ausgerichteten Aktinfilamenten durchgeführt. Dazu wurden die Seitenverhältnisse der elliptischen Anpassungen der Schnittlöcher analysiert. Dabei konnte eine größere Ausdehnung der Schnittlöcher in Ausrichtungsrichtung als transversal dazu gezeigt werden. Damit konnte die Hypothese, dass die Anisotropie von Spannungsverteilungen innerhalb zellulärer Monolagen mit der zytoskeletalen Ausrichtung korreliert bestätigt werden. Weiterhin wiesen morphologische Änderungen der nächsten und übernächsten Zellnachbarn der ablatierten Zellen direkt nach den Laserablationen auf weitreichende transzelluläre Kopplungen hin.

Eine aktuellere Studie weist auf den Zusammenhang zwischen der Anisotropie mechanischer Spannungen in Geweben und der Ausrichtung von Zellteilungen hin. Campinho et al., 2013 konnten zeigen, dass sich Zellteilungen während Zebrafisch-Epibolien entlang der Spannungsachsen im Gewebe orientieren. Dadurch werden anisotrope Spannungen im Gewebe reduziert. Weitere Studien deuten auf die Abhängigkeit der mechanischen Spannungen von der Kontraktilität der Aktin-Myosin-Komplexe in Zellmonolagen hin (Kaefer et al., 2007, Krieg et al., 2008).

Die mechanischen Effekte kooperativer Schaltungen zwischen Zellen in epithelialen Monolagen wurde in der Vergangenheit vor allem während kollektiver Zellmigration mittels Wundheilungsexperimenten (Poujade et al., 2007) und Zellkraftanalysen studiert (Trepate et al., 2009, Angelini et al., 2010, Tambe et al., 2011). In Sunyer et al., 2016 wurde die Migration von Epithelzellkolonien entlang Steifigkeitsgradienten ihrer ECM untersucht (auch bekannt als Durotaxis). Dabei konnte eine klare Kollektivmigration hin zu steiferen Bereichen ihrer Substrate nachgewiesen werden, was isolierte Einzelzellen nur in einer sehr abgeschwächten Form zeigten. Weiterhin konnten Sunyer *et al.* mit einer Durchtrennung der Zellmonolagen mittel Laserablation ihre Durotaxis drastisch reduzieren. Damit konnte ein Zusammenhang zwischen weitreichender, transzellulärer Kraftübertragung und Kollektivmigration hergestellt werden. Auch einen deutlichen Hinweis auf die Rolle des Aktin-Myosin-Komplexes in der Kollektivmigration konnten Sunyer *et al.* geben. Dazu wurde die Myosin-Kontraktilität mittels Blebbistatin inhibiert, was eine signifikante Reduktion der Durotaxis zur Folge hatte.

#### 5.4 ROLLE DER ZYTOSKELLETALEN AUSRICHTUNG FÜR DIE DEHNBARKEIT EPITHELIALER MONOLAGEN

Weiterhin wurde der Einfluss des Aktinzytoskeletts auf das Verhalten der Zellmonolagen unter Dehnung untersucht. Die dazu verwendeten Kammern ermöglichten eine fast eins zu eins Übertragung der verwendeten Dehnung auf die bei den Zellen ankommende Dehnung. Dadurch war eine kontrollierte und exakte Dehnung der Zellen möglich. Zur Charakterisierung des Dehnungsverhalten der Elastomerkammern wurde die effektive Poissonzahl errechnet. Diese war vergleichbar zu der in Faust et al., 2011 ermittelten Zahl für Kammern mit der selben Geometrie, aber weicherem Material (50 kPa).

Neben der Rolle des Aktinzytoskeletts als Generator kontraktiver Kräfte ist sein Einfluss auf das Verhalten von Monolagen unter Dehnung kaum erforscht. Eine Ausnahme bildet dabei eine Studie von Janmey et al., 1991, in der die rheologischen Eigenschaften von Biopolymergelen *in vitro* untersucht wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Aktinnetzwerke bereits ab Dehnungen von 20% beschädigt werden. Zur Überprüfung, wie die Orientierung der Aktinfilamente die Streckfestigkeit von Mikrogeweben beeinflusst, wurden zuvor ausgerichtete Monolagen linear gedehnt. Monolagen mit zytoskellentaler Ausrichtung in Streckrichtung konnten dabei nach 50% Dehnung beinahe vollständig fragmentiert werden. Die Schwachstelle der Monolagen stellen dabei klar die Zell-Zell-Adhäsionen dar. Zwischen zur Dehnung senkrecht ausgerichteten Monolagen und Zellkolonien ohne Präkonditionierung konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, was auf eine eher untergeordnete Rolle der Ausrichtung des Aktinzytoskeletts für die Streckfestigkeit der Monolagen hinweist.

In diesem Zusammenhang ist eine Studie von Kirchenbüchler et al., 2010 hochinteressant. Dort wurden Myofibroblasten mittels Deformation ihrer Substrate linear gedehnt. Während dabei die Fokaladhäsionen den Substratverformungen folgen konnten, verhielten sich in Dehnungsrichtung orientierte Stressfasern sehr steif mit einer mittleren Dehnung von unter 20% der Substratdeformation. Weiterhin konnten Hinweise auf plastische Deformationen an den Stressfaserenden aufgezeigt werden.

Die mechanische Anisotropie ist ein wesentlicher Unterschied zu den isotropen *in vitro* Biopolymergelen (Janmey et al., 1991).

Smith et al., 2003 konnten glatte Muskelzellen durch zyklische Dehnung ausrichten und ihre Steifigkeit in Abhängigkeit ihrer Orientierung messen. Dabei waren Zellen in Ausrichtungsrichtung signifikant steifer als in dazu transversaler Richtung und als die nicht-ausgerichtete Kontrolle. Zwischen den Steifigkeiten senkrecht zur zytoskellentalen Ausrichtung und die der Kontrolle konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Aus dem Hookeschen Gesetz lässt sich ableiten, dass höhere Steifigkeiten bei gleicher Dehnung mit höheren Kräften korrelieren, was eine größere mechanische Belastung der in Dehnungsrichtung orientierten Strukturen erklärt. Da die Bruchstellen lediglich im

Bereich der Zell-Zell Adhäsionen auftraten, ist daher auch eine höhere Kraftübertragung entlang der Aktinfilamentbündel wahrscheinlich.

#### 5.5 KOMBINATION EINES RASTERKRAFTMIKROSKOPS MIT EINEM ZELLSTRETCHER ERMÖGLICHT LOKALE MECHANISCHE ANALYSEN GEDEHNTER ZELLEN

In der Literatur wird die Funktion der Intermediärfilamente zur mechanischen Integration des Zellinneren beschrieben (Lazarides, 1980). Dabei schaffen sie ein komplexes Netzwerk, welches unterschiedliche Bereiche der Zelle verbindet, begonnen von der Lamina des Nukleus über eine Vielzahl an Zellorganellen bis hin zu den Kontakten zu benachbarten Zellen über Desmosome und zur Basallamina über Hemidesmosome (Alberts et al., 2002). Wegen dieser Eigenschaften und ihrer hohen Flexibilität (Kreplak und Fudge, 2006) und Dehnbarkeit (Kreplak et al., 2005, Fudge et al., 2008) wird außerdem Intermediärfilamenten die Funktion als eine Art Sicherheitsgurt gegen hohe Dehnungen nahe gelegt, (Ma et al., 2001).

Wegen des Mangels an geeigneten Methoden, war es bisher kaum möglich, das Verhalten der Intermediärfilamente in lebenden Zellen unter Dehnung zu untersuchen. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Methode entwickelt mit der identische Positionen auf Zellen bei unterschiedlichen Dehnungen wiedergefunden und mechanisch analysiert werden konnten. Die dazu verwendeten Kammern wiesen eine Dehnbarkeit von über 100 % ihrer ursprünglichen Größe auf. Damit waren sie bezüglich ihrer Streckfestigkeit mit den Silikon, die in Fudge et al., 2008 verwendet wurden, vergleichbar und ließen höhere Dehnungen als beispielsweise in Faust et al., 2011 zu. Diese Amplituden sind nötig um den Bereich der physiologischen Dehnung der Haut von über 40 % gänzlich abdecken zu können (Gibson et al., 1965, Lanir und Fung, 1974). Ein Nachteil an diesem Ansatz ist, dass eine konfokale Abbildung der gedehnten Proben durch den Kammerboden wegen der Dicke des Bodens nicht möglich war. Wie auch in Farquhar und Palade, 1963 oder Hull und Staehelin, 1979 beschrieben, sind Adherens Junctions und Desmosome durch eine große räumliche Nähe gekennzeichnet, was jedoch ohne die Konfokalität nur schwer aufzulösen ist. Immersionsobjektive, welche die nötige Auflösung und Arbeitsabstand bieten, konnten nicht verwendet werden, da sie typischerweise nur im direkten Kontakt zum Kammerboden verwendet werden können. Infolgedessen gab der elastische Boden während des Fokussierens auf die Proben nach, was eine scharfe Abbildung unmöglich machte.

Im Besonderen zeichnet den Elastomerkammer-Ansatz die hohe Kontrolle über die Dehnung, die Möglichkeit zur Kultivierung von Zellen unter physiologischen Bedingungen und der im Vergleich zu ähnlichen Techniken wie Harris et al., 2012 kleine experimentelle Aufwand aus.

Die Kombination des Elastomerkammer-Ansatzes mit einem Rasterkraftmikroskop ermöglicht lokale mechanische Analysen homogener gedehnter Zellmonolagen, die vorher nicht möglich waren. Obwohl in Wang und Stamenović, 2000 bereits lokale Analysen von verformten Zellen durchgeführt werden konnten, konnte diese jedoch nicht global, sondern nur lokal mittels Verschiebungen magnetisierter Mikrokugeln mechanisch stimuliert werden. Auch in Harris et al., 2012 konnten „freie“ Zellmonolagen, die an einzig an zwei parallelen Stäben befestigt waren, homogen gedehnt werden. Dadurch konnten die Monolagen ohne den Einfluss ihres Substrates analysiert werden. Im Vergleich zur hier verwendeten Technik waren jedoch keine lokalen mechanischen Analysen, z.B. zur Unterscheidung der Reaktionen der Adhärenzverbindungen von denen der Zelllamella, möglich.

Weiterhin wurde die neue Methode hinsichtlich ihrer Performance charakterisiert. Dabei konnte durch eine Rauschanalyse eine allgemeine Vergrößerung des Hintergrundrauschens für große Dehnungen ermittelt werden. Eine mögliche Ursache könnte eine Verschiebung der Resonanzfrequenzen der Elastomerkammern während der Dehnung in Richtung der unbekanntenen Störfrequenz sein. Der direkte Nachweis konnte jedoch nicht erbracht werden, da wegen der kompakten Bauweise des Rasterkraftmikroskops der Spielraum der Dehnungsamplituden stark limitiert wurde. Überraschenderweise zeigten die Ergebnisse der Indentationen einen gegenteiligen Trend, bei dem die Streuung der Messergebnisse bei großen Dehnungen sogar kleiner wurde. Wenngleich auch unterschiedliche Strategien zur Reduktion der Varianz hier zur Anwendung kamen, konnte dieser Effekt nicht abschließend geklärt werden. Somit wurde für alle weiteren Analysen dieser Rauscheffekt nicht weiter beachtet. Trotzdem stellt er ein hohes Störpotential auch für zukünftige Messungen dar und entsprechende Maßnahmen, wie z.B. die Mittlung über mehrere Messungen an identischen Positionen, sollten getroffen werden.

Eine weitere wichtige Kontrollmessung waren RKM-Indentationen auf Kammeroberflächen ohne Zellen. Dabei waren die erreichten Indentationstiefen klein gegen die auf Zellen, bei sonst gleichen Bedingungen. Somit waren die hier durchgeführten Indentationen von Zellen auf Elastomerkammern vergleichbar zu denen auf harten Substraten wie Glas wie z.B. in Homberg et al., 2015.

Die vergleichsweise hohe Streuung bei der Messung der Steifigkeiten der Zellen mit dieser Methode war nicht überraschend. Wegen der hohen Dynamik des Zytoskeletts und der damit sich ständig ändernden Form der Zellen sind Messungen dieser Art immer Momentaufnahmen. Auch die starke Heterogenität der Zellen in Kombination mit der verwendeten Cantileverspitze erhöht die Chancen auf z.B. Mikrofilamentbündeln oder Zellorganellen zu indentieren. So wurde, obwohl eine vergleichsweise große, selbst geklebte Spitze verwendet wurde, nur ca. 0.6% der Zelloberfläche während der Indentationen deformiert.

## 5.6 LIMITIERUNGEN DER ANPASSUNGSMODELLE

Zur Ermittlung der zelluläre Elastizität wurde ein Potenzgesetz an die Kraft-Abstandskurven angepasst, wobei überraschenderweise der darin enthaltene freie Exponent mit höheren Dehnungsamplituden zunahm.

Wegen dieser Korrelation scheiterte der Versuch das sonst für Zellindentationen übliche Hertzmodell anzuwenden (siehe auch Radmacher et al., 1996). Die Legitimation ein Hertzmodell zur Modellierung der Indentation einer Sphäre in lebende Zellen zu verwenden ist aufgrund der hier nicht vorhandenen Randbedingungen stark begrenzt. Die dazu nötigen Voraussetzungen, wie eine perfekte Sphäre, die einen homogenen, linear elastischen, isotropen und unendlichen Halbraum indentiert, können von lebenden Zellen mit komplexeren mechanischen Eigenschaften nicht erfüllt werden. Besonders problematisch dabei ist die Viskoelastizität von Zellen, wonach sich diese zum Teil wie ein elastischer Festkörper und zum Teil wie eine viskose Flüssigkeit verhalten. Diese äußert sich z.B. in der Hysterese der RKM-Kraft-Deformationskurven (siehe [Abbildung 4.27](#)) oder in der höheren Steifigkeit die allein durch größere Indentationsgeschwindigkeiten während RKM-Indentationen auf Zellen beobachtet wurden (Butt et al., 2005).

Speziell für kraftspektroskopische Messungen an biologischen Proben kann die präzise Bestimmung des Kontaktpunktes der Cantileverspitze mit der Probe entscheidend darüber sein, ob auftretende Effekte in den messbaren Bereich fallen oder nicht. Während auf harten Oberflächen der Kontaktpunkt mit einer Präzision im Nanometerbereich bestimmt werden kann, tritt für weiche Proben eine klar identifizierbare Auslenkung selbst bei Cantilevern mit geeigneter Federkonstante nicht instantan auf, sondern äußert sich in einer zunächst leicht ansteigenden Kurve.

Nichtsdestotrotz konnten für einen Teil der Ergebnisse die Exponenten aus dem freien Potenzgesetz aus früheren Publikationen reproduziert werden. Messungen, die unter gleichen Bedingungen wie in Ramms et al., 2013 oder Homberg et al., 2015 (keine Dehnung, Indentation auf Zelllamelle) aufgenommen wurden sind damit vergleichbar zu bereits publizierten Studien.

Im Vergleich zu undifferenzierten Keratin knock-out Zellen, untersucht in Ramms et al., 2013, konnte für KO-Zellen innerhalb von Monolagen kein Unterschied in der effektiven Steifigkeit ermittelt werden. Beim Wildtyp waren Zellen im Verband im Schnitt um 70 % steifer als in Isolation. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch den Verbund zu anderen Zellen Keratine bereits ohne äußere Dehnung unter Spannung stehen. Zur genauen Analyse dieses Effekts müssten jedoch weitere Faktoren wie z.B. Höhe und Ausbreitung der Zellen mit betrachtet werden.

In Homberg et al., 2015 wurden die Zellnuklei von Zellen im Verband indentiert, wobei diese um 30 % weicher waren als die hier untersuchten Zelllamellen, sowohl für den Wild-Typ als auch für die Keratin knock-out Mutante. Das gleiche Verhältnis der Steifigkeiten von Nuklei zu Lamellen wurde auch für isolierte Zellen in Ramms et al.,

2013 gefunden. Daher scheint weder die Anwesenheit der Keratine noch die Ausbildung von Adhäsionen zu benachbarten Zellen das Verhältnis der Steifigkeiten innerhalb der Zellen maßgeblich zu beeinflussen.

Für die weiteren Analysen wurden die Indentationstiefen bei konstantem Kraft-Sollwert als Vergleichsgröße verwendet. Obwohl dadurch der quantitative Vergleich zu bereits publizierten Ergebnissen erheblich erschwert wurde, konnte eine ausreichende Effektstärke durch dieses Vorgehen erzielt werden.

## 5.7 EINFLUSS DER KERATINE AUF DAS VERHALTEN VON ZELLMONOLAGEN UNTER DEHNUNG

Zum Testen der Hypothese, dass Keratine als mechanischer Puffer in Zellen unter Dehnung fungieren, wurden Keratinozytenmonolagen mit der oben vorgestellten Methode linear gestreckt und in Abhängigkeit von der angewandten Dehnungsamplitude mechanisch analysiert.

Dabei konnte eine Versteifung der Zelllamellen unter Dehnung gezeigt werden, die in Anwesenheit der Keratine stärker in Erscheinung trat als in deren Abwesenheit. Außerdem konnte herausgearbeitet werden, dass der Einfluss der Keratine mit höheren mechanischen Belastungen größer wurde. Während bei 0% Dehnung die Indentationen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Steifigkeiten der Lamellen des Wildtyps und der Keratin knock-out Mutante ergaben, war unter 25% Dehnung die für den WT erzielte Indentationstiefe um 30% als für den KO. Bei 50% angelegter Dehnung konnte sogar eine um 40% verminderte Indentation auf den WT- gegenüber den KO-Zellen gezeigt werden, womit die Sicherheitsgurt-Hypothese verifiziert werden konnte.

Die Ergebnisse der kraftspektroskopischen Analysen decken sich mit einer Studie von Wang und Stamenović, 2000. Dort wurden 4.5 µm-große magnetisierte Mikrokugeln mittels Ligand-Rezeptor-Bindung an Fibroblasten adhärirt. Durch Magnetfelder konnten diese ähnlich wie Kompassnadeln zur Rotation gebracht und damit die Zellen verformt werden. Durch vergleichende Messungen mit Vimentin-freien Zellen konnte auch hier eine höhere Versteifung unter großen mechanischen Belastungen von Zellen in Anwesenheit von Intermediärfilamenten gezeigt werden, als in der zugehörigen knock-out Mutante.

Dieser Effekt konnte auch durch Bertaud et al., 2010 mit einer *coarse-grained* (grobkörnigen) Simulation reproduziert werden.

Die Eigenschaft unter hohen Dehnungen zu versteifen, ist sowohl für isolierte Intermediärfilamente (Block et al., 2017) als auch für Aktin (Gardel et al., 2004, Pollard und Cooper, 2009) - und Vimentin-Polymergele (Janmey et al., 1991) bekannt. Jedoch ist der Vergleich von lebenden Zellen zu *in vitro* Biopolymer-Gelen mit einiger Vorsicht zu ziehen. Bei Polymergelelen handelt es sich um passive Minimalsysteme die in der

Regel mittels Scher-Deformation mechanisch untersucht werden. Problematisch dabei ist, dass die komplexen Prozesse lebender Zellen wie der zytoskeletale Umbau unter hohen Belastungen (Collinsworth et al., 2000, Wang et al., 2001) oder die dynamische Organisation der kreuzvernetzenden Proteine in der Zelle (Huber et al., 2015) meist nur unzulässig modelliert werden können.

Ein weiterer zu beachtender Aspekt dieser Arbeiten ist, dass die Versteifungen meist in Richtung der Dehnung gemessen wurden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte jedoch die Analyse der Steifigkeiten senkrecht zur Zugrichtung. In diesem Zusammenhang ist die Arbeit von Vahabi et al., 2016 hochinteressant. Dort wurden Kollagen- und Fibrinogen Netzwerke sowohl scher- als auch uniaxial gedehnt. Dabei wurde wie in dieser Arbeit eine Versteifung senkrecht zur Dehnungsrichtung beobachtet. Die Versteifung wird damit erklärt, dass bei Dehnung von Netzwerken der Anteil der darin enthaltenen straff gedehnten Polymere sich erhöht und gleichzeitig der Anteil gekrümmter, nicht unter Spannung stehender Polymere verringert.

Eine ausführliche Erklärung zur Versteifung kreuzvernetzter Aktin-Polymernetzwerke unter Dehnung liefert auch Huisman et al., 2007. Mittels Simulationen konnten dort gezeigt werden, dass Polymere ohne äußere Dehnung zunächst keine präferierte Orientierung aufweisen. Sobald dann Dehnung von außen angelegt wird, beginnen diese sich in Dehnungsrichtung zu biegen und zu rotieren. Je größer dabei die Dehnungsamplitude ist, desto mehr Filamente orientierten sich parallel zur Dehnungsrichtung. Infolgedessen spielt die Dehnungsdeformation der Polymere eine immer größere Rolle während die der zuvor dominierenden Biegedeformation schrumpft. Da für Vimentin-Intermediärfilamente ein bis zu dreimal so hohes Youngsches Modul als Biegemodul ermittelt wurde (Guzmán et al., 2006), kann damit auf eine nicht-lineare Korrelation bzw. eine Versteifung geschlossen werden.

Diese Ausrichtung der Maschen der Polymernetzwerke konnte auch in der vorliegenden Arbeit für das Keratin 14-Netzwerk der K14 Rescue Mutante beobachtet werden (Abbildung 4.19).

Weiterhin wurden der Einfluss der Keratine auf die interzelluläre Kraftübertragung innerhalb von Monolagen unter Dehnung untersucht. Die morphologischen Untersuchungen der zellulären Adhäsionen lieferten dabei einen Hinweis auf die Kraftübertragung von Zelle zu Zelle innerhalb epithelialer Monolagen. Die Kolo-kalisation des desmosomalen Proteins Desmoplakin mit der sich unter Dehnung ausbildenden Zähnung der Zell-Zell Adhäsionen bzw. der Entwicklung von Membrantethern in Bereich der Adhärenzverbindungen war dabei aufschlussreich. Die gleiche Art der Zähnung in Keratinozyten wird auch in Green et al., 1987 ohne Externe Dehnung und in Harris et al., 2012 unter Dehnung beschrieben. Die Vermutung liegt nahe, dass die Zähnung vor allen in nicht ausgereiften Adhärenzverbindungen unter mechanischer Spannung auftaucht. In Yonemura et al., 1995 konnte dieses Verhalten auch für Epithelzellen beobachtet werden,

wobei nach 36 h Differenzierung nicht mehr auftrat. Dabei wurden die Zellen jedoch nicht extern gedehnt. Interessanterweise zeigte die Keratin knock-out Mutante ein anderes Verhalten. Die dazu untersuchten Zelladhäsionen können sowohl vor als auch nach der Dehnung als eine durchgehende Linie beschrieben werden, wobei die Desmosomen gleiche punktförmige Signale wie der Wildtyp aufwiesen. Bei der Untersuchung der Zellverbindungen unter Dehnung, konnte eine im Mittel höhere Dehnung im WT als innerhalb der KO Monolagen gezeigt werden. Damit einhergehend war die relative Ausdehnung des Zellkörpers beim Wildtyp kleiner als bei den KO-Zellen. Dies könnte als Hinweis auf die mechanische Kopplung von Keratinen an Desmosome gedeutet werden.

Beide Effekte, die Zähnung der Adhäsionen und die Gewichtung der Dehnung auf die Zellverbindungen des Wildtyps können mit der Funktion der Keratine als verbindendes Netzwerk der Zellorganellen (Lazarides, 1980) in Zusammenhang gebracht werden. Dazu ist es hilfreich, die Analogie zu in Reihe geschalteter, mechanischer Federn zu bemühen. Werden diese linear gedehnt, erfahren dabei weichere Federn eine höhere Dehnung als härtere, wobei die mechanische Spannung beider Federn gleich ist. Nimmt man nun an, dass Keratine das entscheidende Element zur mechanischen Kopplung vom Zellinneren zu den zellulären Verbindungen wären, würde dies die unterschiedlichen Reaktionen der Zelladhäsionen der Keratin-knock-out Mutante und des Wildtyps erklären. Einen wichtigen Hinweis darauf liefert eines der Ergebnisse der Kraftspektroskopischen Analysen (Unterabschnitt 4.5.3). Dort konnte gezeigt werden, dass neben den Lamellen auch die Zell-Zell Adhäsionen zwischen Keratin Wildtyp Zellen unter Dehnung versteifen. Überraschenderweise konnte keine Versteifung der Zell-Zell Adhäsionen zwischen keratinfreien Zellen gemessen werden. Dadurch kann geschlussfolgert werden, dass auf die Zellverbindungen zwischen den KO Zellen weniger Kräfte als zwischen den WT Zellen übertragen werden, wodurch die Zähnung ausblieb. Für WT-Zellen ist eine Verminderung des Zugwiderstandes als Folge der Zähnung zu erwarten und damit auch die größere Dehnung im Bereich der Zell-Zell Adhäsionen. Dabei ist anzunehmen, dass die erhöhte Dehnungsversteifung der Keratin-enthaltenden Lamellen gegenüber den Keratin-freien die Effekte im Wildtyp verstärkt.



## ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

---

In der vorliegenden Arbeit wurden die mechanische Anisotropie und Dehnbarkeit der Haut anhand von Zellmonolagen untersucht. Dabei wurde herausgearbeitet, wie die zelluläre Ausrichtung die Generierung mechanischer Spannungen in Zellmonolagen beeinflusst und welche Faktoren entscheidend für die Widerstandsfähigkeit der Monolagen gegenüber hohen Dehnungen sind. Durch mechanische Analysen ausgerichteter Monolagen konnte sowohl die Rolle der Adhärenzverbindungen als auch die der Orientierung des Aktinzytoskeletts für die Kontraktilität der Monolagen charakterisiert werden. Insbesondere konnte dabei ein Beispiel der Relevanz multizellulärer Kooperativität für die Mechanik von Zellkollektiven geben werden. Eine größere Systematik in die Untersuchungen zur Kontraktilität könnte dabei eine Beschränkung der Adhärenzflächen der Zellmonolagen bringen. Wie in früheren Arbeiten (Mertz et al., 2012) bereits gezeigt, ist die Kontraktilität von Monolagen von der Größe der jeweiligen Zellkolonie abhängig. Mittels Mikrostrukturierung der Elastomerkammern, könnte dazu eine Reihe Adhärenzflächen mit exponentiell steigender Größe generiert werden. Dafür könnte beispielsweise ein Mikrokontaktdruck, wie in Hampe et al., 2014 verwendet, oder eine photolithografische Strukturierung, wie in Theodoly et al., 2018, benutzt werden. Weiterhin wäre es in diesem Zusammenhang auch interessant zu prüfen, ob unter bestimmten Bedingungen die von der Monolage generierten Kräfte ausreichen, um diese zu zerreißen. Ergänzende Echtzeitaufnahmen der Monolagen während des Ausrichtungsprozesses unter Dehnung könnten dabei sehr aufschlussreich sein, wobei auch der Einfluss der Dauer der Dehnung interessant wäre. Weiterhin könnten Messungen der Zellhöhen und Steifigkeiten mit dem in [Abschnitt 4.5](#) vorgestellten Setup diese Experimentreihen komplettieren.

Mittels Ablationsversuchen konnte gezeigt werden, dass mechanische Spannungen auch innerhalb ausgerichteter Monolagen sich anisotrop verhalten. Eine interessante Fortführung dieser Experimente wären Ablationen mit Variationen der Abstände der Schnitte zum Rand der Monolage, um das Profil der mechanischen Spannung in Monolagen näher bestimmen zu können. In diesem Zusammenhang wäre auch die Kombination dieser Experimente mit der bereits oben beschriebenen Mikrostrukturierung der Adhäsionsflächen sinnvoll, um auch die Geometrie der Monolagen mit einzubeziehen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Ausrichtung der Aktinfilamente auch die Streckfestigkeit der Zellmonolagen entscheidend beeinflusst. Ergänzend dazu könnte die Rolle der Orientierung des Aktinzytoskeletts auf die Versteifung der Monolagen unter Dehnung untersucht werden. Dazu würde sich die in [Abschnitt 4.5](#) vorgestellte Methode anbieten. Zur näheren Analyse der Bruchmechanik wären Aufnahmen

der Rissentstehung in Monolagen mit fluoreszenzmarkierten Aktinfilamenten während der Dehnung hochinteressant. Dazu müsste jedoch die Verschiebung der Probe aus dem Bildbereich während der Dehnung durch exaktes "Mitfahren" des Stretchers kompensiert werden, was nur mit hohem technischen Aufwand möglich ist.

Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit eine neue Methode zur mechanischen Charakterisierung gedehnter Zellen entwickelt. Dazu wurde ein Rasterkraftmikroskop mit einer Apparatur zur Zelldehnung und einem Lichtmikroskop kombiniert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Keratinozytenmonolagen mit intakten Intermediärfilamenten unter Dehnung stärker versteifen als Monolagen, denen diese komplett fehlten, womit die besondere Relevanz der Intermediärfilamente für Zellen unter Dehnung herausgearbeitet werden konnte. Weiterführend könnte eine Kombination dieser Experimente mit dem in [Abschnitt 4.3](#) verwendeten Ansatz mögliche Wechselwirkungen der Keratinfilamente mit dem Aktinzytoskelett aufzeigen. Dazu wären vergleichende Messungen zwischen Keratin-knock-out- und Wildtypmonolagen, die zuvor zyklisch gedehnt wurden, denkbar. Sowohl Streckfestigkeitsanalysen als auch Untersuchungen der mechanischen Spannungen dieser Systeme könnten dabei neue Erkenntnisse liefern.

Weiterhin wurden die Zell-Zell-Verbindungen unter Dehnung morphologisch charakterisiert, wobei insbesondere die Rolle der Intermediärfilamente für das Verhalten der zellulären Adhärenzverbindungen unter Dehnung herausgearbeitet werden konnte. Dazu wären weitere Messungen mit dem Rasterkraftmikroskop im Bereich der Zell-Zell-Verbindungen von Interesse. Eine feinere Cantileverspitze könnte dabei Versteifungseffekte einzelner Membrantether auflösen und ein dreidimensionales Bild der Strukturen unter Dehnung liefern.

## LITERATUR

---

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4. Aufl. Garland.
- Alenghat, Francis J., Fabry, Ben, Tsai, Kenneth Y., Goldmann, Wolfgang H. und Ingber, Donald E. (2000). „Analysis of Cell Mechanics in Single Vinculin-Deficient Cells Using a Magnetic Tweezer“. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277.1, S. 93–99.
- Anderson, J. M. und Van Itallie, C. M. (2009). „Physiology and function of the tight junction“. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1.2, a002584.
- Angelini, T. E., Hannezo, E., Treppe, X., Fredberg, J. J. und Weitz, D. A. (2010). „Cell Migration Driven by Cooperative Substrate Deformation Patterns“. *Phys. Rev. Lett.* 104 (16), S. 168104.
- Arneemann, J., Sullivan, K.H., Magee, A.I., King, I.A. und Buxton, R.S. (1993). „Stratification-related expression of isoforms of the desmosomal cadherins in human epidermis“. *Journal of Cell Science* 104.3, S. 741–750.
- Baker, S. und Matthews, I. (2004). „Lucas-Kanade 20 Years On: A Unifying Framework“. *International Journal of Computer Vision* 56.3, S. 221–255.
- Bausch, A. R. und Kroy, K. (2006). „A bottom-up approach to cell mechanics“. *Nature Physics* 2, S. 231.
- Bausch, A. R., Möller, W. und Sackmann, E. (1999). „Measurement of Local Viscoelasticity and Forces in Living Cells by Magnetic Tweezers“. *Biophysical Journal* 76.1, S. 573–579.
- Bertaud, J., Qin, Z. und Buehler, M. J. (2010). „Intermediate filament-deficient cells are mechanically softer at large deformation: A multi-scale simulation study“. *Acta Biomaterialia* 6.7, S. 2457–2466.
- Betz, T., Lenz, M., Joanny, J.-F. und Sykes, C. (2009). „ATP-dependent mechanics of red blood cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.36, S. 15320–15325.
- Binnig, G., Quate, C. F. und Gerber, Ch. (1986). „Atomic Force Microscope“. *Phys. Rev. Lett.* 56 (9), S. 930–933.
- Block, J., Witt, H., Candelli, A., Peterman, E. J. G., Wuite, G. J. L., Janshoff, A. und Koester, S. (2017). „Nonlinear Loading-Rate-Dependent Force Response of Individual Vimentin Intermediate Filaments to Applied Strain“. *Phys. Rev. Lett.* 118 (4), S. 048101.
- Boal, D. (2002). *Mechanics of the Cell*. Cambridge University Press.
- Brangwynne, C. P., MacKintosh, F. C., Kumar, S., Geisse, N. A., Talbot, J., Mahadevan, L., Parker, K. K., Ingber, D. E. und Weitz, D. A. (2006). „Microtubules can bear enhanced

- compressive loads in living cells because of lateral reinforcement". *The Journal of Cell Biology* 173.5, S. 733–741.
- Bursac, P., Lenormand, G., Fabry, B., Oliver, M., Weitz, D. A., Viasnoff, V., Butler, J. P. und Fredberg, J. J. (2005). „Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell". *Nature Materials* 4, S. 557.
- Butt, H. J., Cappella, B. und Kappl, M. (2005). „Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications". *Surface Science Reports* 59.1, S. 1–152.
- Campinho, P., Behrndt, M., Ranft, J., Risler, T., Minc, N. und Heisenberg, C. P. (2013). „Tension-oriented cell divisions limit anisotropic tissue tension in epithelial spreading during zebrafish epiboly". *Nature Cell Biology* 15, S. 1405.
- Chang, Tzu-Hao, Huang, Hsien-Da, Ong, Wei-Kee, Fu, Yun-Ju, Lee, Oscar K., Chien, Shu und Ho, Jennifer H. (2014). „The effects of actin cytoskeleton perturbation on keratin intermediate filament formation in mesenchymal stem/stromal cells". *Biomaterials* 35.13, S. 3934–3944.
- Chuong, C. M., Nickoloff, B. J., Elias, P. M., Goldsmith, L.A., Macher, E., Maderson, P.A., Sundberg, J. P., Tagami, H., Plonka, P. M. und Thestrup-Pedersen, K. (2002). „What is the true function of skin?" *Experimental Dermatology* 11.2, S. 159–187.
- Collinsworth, A. M., Torgan, C. E., Nagda, S. N., Rajalingam, R. J., Kraus, W. E. und Truskey, G. A. (2000). „Orientation and length of mammalian skeletal myocytes in response to a unidirectional stretch". *Cell and Tissue Research* 302.2, S. 243–251.
- Deng, L., Trepap, X., Butler, J. P., Millet, E., Morgan, K. G., Weitz, D. A. und Fredberg, J. J. (2006). „Fast and slow dynamics of the cytoskeleton". *Nature Materials* 5, S. 636.
- Desprat, N., Richert, A., Simeon, J. und Asnacios, A. (2005). „Creep Function of a Single Living Cell". *Biophysical Journal* 88.3, S. 2224–2233.
- Discher, D. E., Janmey, P. und Wang, Y. (2005). „Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate". *Science* 310.5751, S. 1139–1143.
- Doi, M. und Edwards, S. F. (1988). *The Theory of Polymer Dynamics*. Oxford University Press.
- Eckert, R. L. (1989). „Structure, function, and differentiation of the keratinocyte". *Physiological Reviews* 69.4, S. 1316–1346.
- Elbaum, M., Kuchnir, F., D. und Libchaber, A. (1996). „Buckling Microtubules in Vesicles". *Phys. Rev. Lett.* 76 (21), S. 4078–4081.
- Elias, P. M., Brown, B. E., C., D., Feingold, K. R. und Ahn, S. K. (2002). „Origin of the Epidermal Calcium Gradient: Regulation by Barrier Status and Role of Active vs Passive Mechanisms". *Journal of Investigative Dermatology* 119.6, S. 1269–1274.
- Engler, A. J., Griffin, M. A., Sen, S., Bonnemann, C. G., Sweeney, H. L. und Discher, D. E. (2004). „Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness". *The Journal of Cell Biology* 166.6, S. 877–887.

- Evans, E. und Yeung, A. (1989). „Apparent viscosity and cortical tension of blood granulocytes determined by micropipet aspiration“. *Biophysical Journal* 56.1, S. 151–160.
- Fabris, G. (2016). „Cellular biomechanics in 2D and 3D epithelial model tissues: from keratin intermediate filaments to breast gland in vitro reconstructed basement membranes“. Diss. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Fabry, B., Maksym, G. N., Butler, J. P., Glogauer, M., Navajas, D. und Fredberg, J. J. (2001). „Scaling the Microrheology of Living Cells“. *Phys. Rev. Lett.* 87 (14), S. 148102.
- Farquhar, M. G. und Palade, G. E. (1963). „JUNCTIONAL COMPLEXES IN VARIOUS EPITHELIA“. *The Journal of Cell Biology* 17.2, S. 375–412.
- Faust, U., Hampe, N., Rubner, W., Kirchgeßner, N., Safran, S., Hoffmann, B. und Merkel, R. (Dez. 2011). „Cyclic Stress at mHz Frequencies Aligns Fibroblasts in Direction of Zero Strain“. *PLOS ONE* 6.12, S. 1–16.
- Fernández, P., Pullarkat, P. A. und Ott, A. (2006). „A Master Relation Defines the Nonlinear Viscoelasticity of Single Fibroblasts“. *Biophysical Journal* 90.10, S. 3796–3805.
- Forster, B., Van De Ville, D., Berent, J., Sage, D. und Unser, M. (2004). „Complex wavelets for extended depth-of-field: A new method for the fusion of multichannel microscopy images“. *Microscopy Research and Technique* 65.1-2, S. 33–42.
- Fuchs, E. und Weber, K. (1994). „INTERMEDIATE FILAMENTS, Structure, Dynamics, Function and Disease“. *Annual Review of Biochemistry* 63.1, S. 345–382.
- Fuchs, Elaine (1993). „Epidermal differentiation and keratin gene expression“. *Journal of Cell Science* 1993.17, S. 197–208.
- Fudge, D., Russell, D., Beriault, D., Moore, W., Lane, E. B. und Vogl, A. W. (Juni 2008). „The Intermediate Filament Network in Cultured Human Keratinocytes Is Remarkably Extensible and Resilient“. *PLOS ONE* 3.6, S. 1–9.
- Gardel, M. L., Valentine, M. T., Crocker, J. C., Bausch, A. R. und Weitz, D. A. (2003). „Microrheology of Entangled F-Actin Solutions“. *Phys. Rev. Lett.* 91 (15), S. 158302.
- Gardel, M. L., Shin, J. H., MacKintosh, F. C., Mahadevan, L., Matsudaira, P. und Weitz, D. A. (2004). „Elastic Behavior of Cross-Linked and Bundled Actin Networks“. *Science* 304.5675, S. 1301–1305.
- Gavara, N., Sunyer, R., Roca-Cusachs, P., Farré, R., Rotger, M. und Navajas, D. (2006). „Thrombin-induced contraction in alveolar epithelial cells probed by traction microscopy“. *Journal of Applied Physiology* 101.2, S. 512–520.
- Gavin, R.H. (2010). *Cytoskeleton Methods and Protocols*. 2. Aufl. Humana Press.
- Gibson, T., Kenedi, R. M. und Craik, J. E. (1965). „The mobile micro-architecture of dermal collagen, A bio-engineering study“. *BJS* 52.10, S. 764–770.
- Green, K. J., Geiger, B., Jones, J. C., Talian, J. C. und Goldman, R. D. (1987). „The relationship between intermediate filaments and microfilaments before and during the formation of desmosomes and adherens-type junctions in mouse epidermal keratinocytes.“ *The Journal of Cell Biology* 104.5, S. 1389–1402.

- Guck, J., Ananthakrishnan, R., Mahmood, H., Moon, T. J., Cunningham, C. C. und Käs, J. (2001). „The Optical Stretcher, A Novel Laser Tool to Micromanipulate Cells“. *Biophysical Journal* 81.2, S. 767–784.
- Guck, J., Schinkinger, S., Lincoln, B., Wottawah, F., Ebert, S., Romeyke, M., Lenz, D., Erickson, H. M., Ananthakrishnan, R., Mitchell, D., Käs, J., Ulvick, S. und Bilby, C. (2005). „Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence“. *Biophysical Journal* 88.5, S. 3689–3698.
- Guo, M., Ehrlicher, A. J., Mahammad, S., Fabich, H., Jensen, M. H., Moore, J. R., Fredberg, J. J., Goldman, R. D. und Weitz, D. A. (2013). „The Role of Vimentin Intermediate Filaments in Cortical and Cytoplasmic Mechanics“. *Biophysical Journal* 105.7, S. 1562–1568.
- Guzmán, C., Jeney, S., Kreplak, L., Kasas, S., Kulik, A.J., Aebi, U. und Forró, L. (2006). „Exploring the Mechanical Properties of Single Vimentin Intermediate Filaments by Atomic Force Microscopy“. *Journal of Molecular Biology* 360.3, S. 623–630.
- Hampe, N., Jonas, T., Wolters, B., Hersch, N., Hoffmann, B. und Merkel, R. (2014). „Defined 2-D microtissues on soft elastomeric silicone rubber using lift-off epoxy-membranes for biomechanical analyses“. *Soft Matter* 10 (14), S. 2431–2443.
- Harris, A. R., Peter, L., Bellis, J., Baum, B., Kabla, A. J. und Charras, G. T. (2012). „Characterizing the mechanics of cultured cell monolayers“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.41, S. 16449–16454.
- Harris, A.K., Wild, P. und Stopak, D. (1980). „Silicone rubber substrata, a new wrinkle in the study of cell locomotion“. *Science* 208.4440, S. 177–179.
- Hayakawa, K., Hosokawa, A., Yabusaki, K. und 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, S. 17.
- Helfrich, W. (1978). „Steric Interaction of Fluid Membranes in Multilayer Systems“. *Zeitschrift für Naturforschung A* 33.3, S. 305.
- Henon, S., Lenormand, G., Richert, A. und Gallet, F. (1999). „A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers“. *Biophysical Journal* 76.2, S. 1145–1151.
- Hoffman, B. D., Massiera, G., Van Citters, K. M. und Crocker, J. C. (2006). „The consensus mechanics of cultured mammalian cells“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103.27, S. 10259–10264.
- Holmes, Kenneth C., Popp, David, Gebhard, Werner und Kabsch, Wolfgang (1990). „Atomic model of the actin filament“. *Nature* 347, S. 44.
- Homberg, M., Ramms, L., Schwarz, N., Dreissen, G., Leube, R. E., Merkel, R., Hoffmann, B. und Magin, T. M. (2015). „Distinct Impact of Two Keratin Mutations Causing Epidermolysis Bullosa Simplex on Keratinocyte Adhesion and Stiffness“. *Journal of Investigative Dermatology* 135.10, S. 2437–2445.

- Huber, F., Boire, A., López, M. P. und Koenderink, G. H. (2015). „Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up“. *Current Opinion in Cell Biology* 32, S. 39–47.
- Huisman, E. M., Dillen, T. van, Onck, P. R. und Giessen, E. Van der (2007). „Three-Dimensional Cross-Linked F-Actin Networks: Relation between Network Architecture and Mechanical Behavior“. *Phys. Rev. Lett.* 99 (20), S. 208103.
- Hull, B. E. und Staehelin, L. A. (1979). „The terminal web. A reevaluation of its structure and function.“ *The Journal of Cell Biology* 81.1, S. 67–82.
- Hutter, J. L. und Bechhoefer, J. (1993). „Calibration of atomic-force microscope tips“. *Review of Scientific Instruments* 64.7, S. 1868–1873.
- Isambert, H., Venier, P., Maggs, A. C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D. und Carlier, M. F. (1995). „Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins.“ *J Biol Chem* 270.19, 11437–44.
- Jamora, C. und Fuchs, E. (2002). „Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton“. *Nature Cell Biology* 4, E101–E108.
- Janmey, P. A., Euteneuer, U., Traub, P. und Schliwa, M. (1991). „Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks.“ *The Journal of Cell Biology* 113.1, S. 155–160.
- Jiang G. and Huang, A. H., Cai, Y., Tanase, M. und Sheetz, M. P. (2005). „Rigidity sensing at the leading edge through  $\alpha 5 \beta 3$  integrins and RPTP $\alpha$ “. *Biophysical journal* 90.5, S. 1804–9.
- Jungbauer, S., Gao, H., Spatz, J. P. und Kemkemer, R. (2008). „Two Characteristic Regimes in Frequency-Dependent Dynamic Reorientation of Fibroblasts on Cyclically Stretched Substrates“. *Biophysical Journal* 95.7, S. 3470–3478.
- Jungen, L. (2017). „Mechanobiologische Untersuchungen zur Rolle von Keratin, Aktin und Adhaerenzverbindungen waehrend der Differenzierung epithelialer Zellen in vitro“. Diss. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kaefer, J., Hayashi, T., Maree, A. F. M., Carthew, R. W. und Graner, F. (2007). „Cell adhesion and cortex contractility determine cell patterning in the Drosophila retina“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.47, S. 18549–18554.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F. und Waterman, C. M. (2010). „Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions“. *Nature* 468.7, S. 580.
- Kasza, K. E., Rowat, A. C., Liu, J., Angelini, T. E., Brangwynne, C. P., Koenderink, G. H. und Weitz, D. A. (2007). „The cell as a material“. *Current Opinion in Cell Biology* 19.1, S. 101–107.
- Kaunas, R., Nguyen, P., Usami, S. und Chien, S. (2005). „Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102.44, S. 15895–15900.

- Kim, S. und Coulombe, P. (2007). „Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. Genes development“. *Genes development* 21.13, 1581–97.
- King, I. A., Angst, B. D., Hunt, D. M., Buxton, R. S., Kruger, M. und Arnemann, J. (1997). „Hierarchical expression of desmosomal cadherins during stratified epithelial morphogenesis in the mouse“. *Differentiation* 62.2, S. 83 –96.
- Kirchenbüchler, D. (2011). „Kraftkopplung in Zellen“. Diss. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kirchenbüchler, D., Born, S., Kirchgeßner, N., Houben, S., Hoffmann, B. und Merkel, R. (2010). „Substrate, focal adhesions, and actin filaments: a mechanical unit with a weak spot for mechanosensitive proteins“. *Journal of Physics: Condensed Matter* 22.19, S. 194109.
- Kratky, O. und Porod, G. (1949). „Röntgenuntersuchung gelöster Fadenmoleküle“. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 68.12, S. 1106–1122.
- Kreplak, L. und Fudge, D. (2006). „Biomechanical properties of intermediate filaments: from tissues to single filaments and back“. *BioEssays* 29.1, S. 26–35.
- Kreplak, L., Bär, H., Leterrier, J.F., Herrmann, H. und Aebi, U. (2005). „Exploring the Mechanical Behavior of Single Intermediate Filaments“. *Journal of Molecular Biology* 354.3, S. 569 –577.
- Krieg, M., Arboleda-Estudillo, Y., Puech, P.-H., Kaefer, J., Graner, F., Mueller, D. J. und Heisenberg, C.-P. (2008). „Tensile forces govern germ-layer organization in zebrafish“. *Nature Cell Biology* 10, S. 429.
- Kroeger, C., Loschke, F., Schwarz, N., Windoffer, R., Leube, R. E. und Magin, T. M. (2013). „Keratins control intercellular adhesion involving PKC-mediated desmoplakin phosphorylation“. *The Journal of Cell Biology* 201.5, S. 681.
- Kubler, M.D., Jordan, P.W., O’Neill, C.H. und Watt, F.M. (1991). „Changes in the abundance and distribution of actin and associated proteins during terminal differentiation of human epidermal keratinocytes“. *Journal of Cell Science* 100.1, S. 153–165.
- Lanir, Y. und Fung, Y.C. (1974). „Two-dimensional mechanical properties of rabbit skin-II. Experimental results“. *Journal of Biomechanics* 7.2, S. 171 –182.
- Lazarides, E. (1980). „Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space“. *Nature* 283, S. 249–255.
- Lele, T. P., Pendse, J., Kumar, S., Salanga, M., Karavitis, J. und Ingber, D. E. (2006). „Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells“. *Journal of Cellular Physiology* 207.1, S. 187–194.
- Liang, M. D., Briggs, P., Heckler, F. R. und Futrell, J. W. (1988). „Presuturing—A New Technique for Closing Large Skin Defects“. *Plastic and Reconstructive Surgery* 81.5, 694–702.

- Lin, Yi-Chia, Koenderink, Gijssje H., MacKintosh, Frederick C. und Weitz, David A. (2011). „Control of non-linear elasticity in F-actin networks with microtubules“. *Soft Matter* 7 (3), S. 902–906.
- Lodish, H. F., Berk, A., Kaiser, C. A. und Krieger, M. (2013). *Molecular Cell Biology*. 7. Aufl. W. H. Freeman.
- Lulevich, V., Yang, H., Isseroff, R. R. und Liu, G. (2010). „Single cell mechanics of keratinocyte cells“. *Ultramicroscopy* 110.12, S. 1435–1442.
- Ma, L., Yamada, S., Wirtz, D. und Coulombe, P. A. (2001). „A hot-spot mutation alters the mechanical properties of keratin filament networks“. *Nature Cell Biology* 3, S. 503.
- Mattey, D.L., Burdge, G. und Garrod, D.R. (1990). „Development of desmosomal adhesion between MDCK cells following calcium switching“. *Journal of Cell Science* 97.4, S. 689–704.
- Matthews, B. D., Overby, D. R., Mannix, R. und Ingber, D. E. (2006). „Cellular adaptation to mechanical stress, role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels“. *Journal of Cell Science* 119.3, S. 508–518.
- Maxwell, I., Chung, S. und Mazur, E. (2005). „Nanoprocessing of subcellular targets using femtosecond laser pulses“. *Medical Laser Application* 20.3, S. 193–200.
- Mücke, N., Kreplak, L., Kirmse, R., Wedig, T., Herrmann, H., Aebi, U. und Langowski, J. (2004). „Assessing the Flexibility of Intermediate Filaments by Atomic Force Microscopy“. *Journal of Molecular Biology* 335.5, S. 1241–1250.
- Mendez, M. G., Restle, D. und Janmey, P. A. (2014). „Vimentin Enhances Cell Elastic Behavior and Protects against Compressive Stress“. *Biophysical Journal* 107.2, S. 314–323.
- Mertz, A. F., Banerjee, S., Che, Y., German, G. K., Xu, Y., Hyland, C., Marchetti, M. C., Horsley, V. und Dufresne, E. R. (2012). „Scaling of Traction Forces with the Size of Cohesive Cell Colonies“. *Phys. Rev. Lett.* 108.19, S. 198101.
- Miroshnikova, Y. A., Le, H. Q., Schneider, D., Thalheim, T., Rübsam, M., Bremicker, N., Polleux, J., Kamprad, N., Tarantola, M., Wang, I., Balland, M., Niessen, C. M., Galle, J. und Wickström, S. A. (2018). „Adhesion forces and cortical tension couple cell proliferation and differentiation to drive epidermal stratification“. *Nature Cell Biology* 20.1, S. 69–80.
- Murphy, D. B. und Davidson, M. W. (2013). *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. 2. Aufl. Wiley-Blackwell.
- Niessen, C. M. (2007). „Tight Junctions/Adherens Junctions, Basic Structure and Function“. *Journal of Investigative Dermatology* 127.11, S. 2525–2532.
- Noethel, B., Ramms, L., Dreissen, G., Hoffmann, M., Springer, R., Rübsam, M., Ziegler, W. H., Niessen, C. M., Merkel, R. und Hoffmann, B. (2018). „Transition of responsive mechanosensitive elements from focal adhesions to adherens junctions on epithelial differentiation“. *Molecular Biology of the Cell* 29.19, S. 2317–2325.

- O'Keefe, E. J., Briggaman, R. A. und Herman, B. (1987). „Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes“. *Journal of cell biology* 105.2, S. 807–817.
- Oakes, P. W. und Gardel, M. L. (2014). „Stressing the limits of focal adhesion mechanosensitivity“. *Current Opinion in Cell Biology* 30, S. 68 –73.
- Pelham, R. J. und Wang, Y. (1997). „Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94.25, S. 13661.
- Pollard, T. D. und Cooper, J. A. (2009). „Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement“. *Science* 326.5957, S. 1208–1212.
- Poujade, M., Grasland-Mongrain, E., Hertzog, A., Jouanneau, J., Chavrier, P., Ladoux, B., Buguin, A. und Silberzan, P. (2007). „Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.41, S. 15988–15993.
- Pritchard, R. H., Shery Huang, Y. Y. und Terentjev, E. M. (2014). „Mechanics of biological networks, from the cell cytoskeleton to connective tissue“. *Soft Matter* 10 (12), S. 1864–1884.
- Radmacher, M., Tillmann, R. W., Fritz, M. und Gaub, H. E. (1992). „From molecules to cells: imaging soft samples with the atomic force microscope“. *Science* 257.5078, S. 1900–1905.
- Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C.M., Cleveland, J.P. und Hansma, P.K. (1996). „Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope“. *Biophysical Journal* 70.1, S. 556 –567.
- Ramms, L., Fabris, G., Windoffer, R., Schwarz, N., Springer, R., Zhou, C., Lazar, J., Stiefel, S., Hersch, N., Schnakenberg, U., Magin, T. M., Leube, R. E., Merkel, R. und Hoffmann, B. (2013). „Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.46, S. 18513–18518.
- Rape, A. D., Guo, W. und Wang, Y. (2011). „The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions“. *Biomaterials* 32.8, S. 2043 –2051.
- Raucher, D. und Sheetz, M. P. (1999). „Characteristics of a Membrane Reservoir Buffering Membrane Tension“. *Biophysical Journal* 77.4, S. 1992 –2002.
- Saez, A., Ghibaudo, M., Buguin, A., Silberzan, P. und Ladoux, B. (2007). „Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.20, S. 8281–8286.
- Sawada, Y., Nakamura, K., Doi, K., Takeda, K., Tobiume, K., Saitoh, M., Morita, K., Komuro, I., De Vos, K., Sheetz, M. und Ichijo, H. (2001). „Rap1 is involved in cell stretching modulation of p38 but not ERK or JNK MAP kinase“. *Journal of Cell Science* 114.6, S. 1221–1227.
- Seltmann, K., Fritsch, A. W., Kaes, J. A. und Magin, T. M. (2013). „Keratins significantly contribute to cell stiffness and impact invasive behavior“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.46, S. 18507–18512.

- Shabbir, S. H., Cleland, M. M., Goldman, R. D. und Mrksich, M. (2014). „Geometric control of vimentin intermediate filaments“. *Biomaterials* 35.5, S. 1359–1366.
- Shen, N., Datta, D., Schaffer, C. B., LeDuc, P., Ingber, Donald E. und Mazur, E. (2005). „Ablation of cytoskeletal filaments and mitochondria in live cells using a femtosecond laser nanoscissor“. *Molecular and Cellular Biology* 2.1, S. 17–25.
- Simpson, C. L., Patel, D. M. und Green, K. J. (2011). „Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, S. 565.
- Sivaramakrishnan, Sivaraj, DeGiulio, James V., Lorand, Laszlo, Goldman, Robert D. und Ridge, Karen M. (2008). „Micromechanical properties of keratin intermediate filament networks“. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.3, S. 889–894.
- Smith, P. G., Deng, L., Fredberg, J. J. und Maksym, G. N. (2003). „Mechanical strain increases cell stiffness through cytoskeletal filament reorganization“. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 285.2, S. 456–463.
- Storm, C., Pastore, J. J., MacKintosh, F. C., Lubensky, T. C. und Janmey, P. A. (2005). „Nonlinear elasticity in biological gels“. *Nature* 435, S. 191.
- Sunyer, R., Conte, V., Escribano, J., Elosegui-Artola, A., Labernadie, A., Valon, L., Navajas, D., Garcia-Aznar, J. M., Munoz, J. J., Roca-Cusachs, P. und Trepap, X. (2016). „Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission“. *Science* 353.6304, S. 1157–1161.
- Szeverenyi, I., Cassidy, A. J., Chung, C. W., Lee, B. T.K., Common, J. E.A., Ogg, S. C., Chen, H., Sim, S. Y., Goh, W. L.P., Ng, K. W., Simpson, J. A., Chee, L. L., Eng, G. H., Li, B., Lunny, D. P., Chuon, D., Venkatesh, A., Khoo, K. H., McLean, W.H. I., Lim, Y. P. und Lane, E. B. (2008). „The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases“. *Human Mutation* 29.3, S. 351–360.
- Takeichi, M. (1977). „Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins“. *Journal of cell biology* 75.2, S. 464–474.
- Tambe, D. T., Corey Hardin, C., Angelini, T. E., Rajendran, K., Park, C. Y., Serra-Picamal, X., Zhou, E. H., Zaman, M. H., Butler, J. P., Weitz, D. A., Fredberg, J. J. und Trepap, X. (2011). „Collective cell guidance by cooperative intercellular forces“. *Nature* 10, S. 469.
- Theodoly, O., Garcia-Seyda, N., Bedu, F., Luo, X., Gabriele, S., Mignot, T., Giermanska, J., Chapel, J.-P., Métivier, M. und Valignat, M.-P. (2018). „Live nanoscopic to mesoscopic topography reconstruction with an optical microscope for chemical and biological samples“. *PLOS ONE* 13.12, S. 1–14.
- Tojkander, S., Gateva, G., Schevzov, G., Hotulainen, P., Naumanen, P., Martin, C., Gunning, P. W. und Lappalainen, P. (2011). „A Molecular Pathway for Myosin II Recruitment to Stress Fibers“. *Current Biology* 21.7, S. 539–550.

- Tomasek, J. J., Haaksma, C. J., Eddy, R. J. und Vaughan, M. B. (1992). „Fibroblast contraction occurs on release of tension in attached collagen lattices, Dependency on an organized actin cytoskeleton and serum“. *The Anatomical Record* 232.3, S. 359–368.
- Tran-Son-Tay, R., Needham, D., Yeung, A. und Hochmuth, R.M. (1991). „Time-dependent recovery of passive neutrophils after large deformation“. *Biophysical Journal* 60.4, S. 856–866.
- Trepap X. Wasserman, M. R., Angelini, T. E., Millet, E., Weitz, D. A., Butler, J. P. und Fredberg, J. J. (2009). „Physical forces during collective cell migration“. *Nature Physics* 5, S. 426.
- Trepap X., Deng, L., An, S. S., Navajas, D., Tschumperlin, D. J., Gerthoffer, W. T., Butler, J. P. und Fredberg, J. J. (2007). „Universal physical responses to stretch in the living cell“. *Nature* 447, S. 592.
- Vaezi, A., Bauer, C., Vasioukhin, V. und Fuchs, E. (2002). „Actin Cable Dynamics and Rho/Rock Orchestrate a Polarized Cytoskeletal Architecture in the Early Steps of Assembling a Stratified Epithelium“. *Developmental Cell* 3.3, S. 367–381.
- Vahabi, M., Sharma, A., Licup, A. J., Oosten, A. S. G. van, Galie, P. A., Janmey, P. A. und MacKintosh, F. C. (2016). „Elasticity of fibrous networks under uniaxial prestress“. *Soft Matter* 12 (22), S. 5050–5060.
- Vijayaraj, P., Kroeger, C., Reuter, U., Windoffer, R., Leube, R. E. und Magin, T. M. (2009). „Keratins regulate protein biosynthesis through localization of GLUT1 and -3 upstream of AMP kinase and Raptor“. *The Journal of Cell Biology* 187.2, S. 175–184.
- Wang, J. H. C., Goldschmidt-Clermont, P., Wille, J. und Yin, F. C. P. (2001). „Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching“. *Journal of Biomechanics* 34.12, S. 1563–1572.
- Wang, N. und Stamenović, D. (2000). „Contribution of intermediate filaments to cell stiffness, stiffening, and growth“. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 279.1, S. C188–C194.
- Wang, N., Butler, J. P. und Ingber, D. E. (1993). „Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton“. *Science* 260.5111, S. 1124–1127.
- Wang, N., Tolic-Norrelykke, I. M., Chen, J., Mijailovich, S. M., Butler, J. P., Fredberg, J. J. und Stamenović, D. (2002). „Cell prestress. I. Stiffness and prestress are closely associated in adherent contractile cells“. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 282.3, S. C606–C616.
- Wegner, A. (1976). „Head to tail polymerization of actin“. *Journal of Molecular Biology* 108.1, S. 139–150.
- Wilhelmi, B. J., Blackwell, S. J. und Phillips, L. G. (1999). „Langer’s lines: to use or not to use“. *Plastic and reconstructive surgery* 104.1, 208–214.
- Yonemura, S., Itoh, M., Nagafuchi, A. und Tsukita, S. (1995). „Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization, similarities and differences

between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells". *Journal of Cell Science* 108.1, S. 127–142.

Zhou, S., Wang, J., Chiang, C., Sheng, L. und Li, Q. (2013). „Mechanical Stretch Upregulates SDF-1alpha in Skin Tissue and Induces Migration of Circulating Bone Marrow-Derived Stem Cells into the Expanded Skin". *STEM CELLS* 31.12, S. 2703–2713.



## DANKSAGUNG

---

Die Jahre der Forschung in Jülich waren von einer Reihe großartiger Kollegen und Freunden begleitet, die mich bei so vielen Dingen unterstützen und motivierten, und hier erwähnt werden sollen.

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Rudolf Merkel bedanken, für die inspirierenden Diskussionen und die Möglichkeiten an spannenden, teils eigenen Projekten arbeiten zu können. Besonders der ansteckende Enthusiasmus und die stets offene Bürotür für Probleme jeglicher Art waren enorm hilfreich und motivierend.

Dr. Bernd Hoffmann danke ich für das Näherbringen der "anderen"(biologischen) Seiten meiner Projekte und seine unermüdliche Geduld, die er bei den so häufig überlangen und kontroversen Diskussionen aufbrachte.

Besonders Laura Schmitt, meiner langjährigen Bürokollegin, verdanke ich so vieles, nicht zuletzt die ein oder andere Kaffee- und Volleyballrunde.

Ich möchte Lisa Reinmuth für eine gelungene Zusammenarbeit und die vielen fachlichen Diskussionen danken.

Jens Konrad, Wolfgang Rubner und Dr. Sabine Diluweit möchte ich danken für die umfassende technische Unterstützung und ihren unschätzbaren Rat.

Ein großes Dankeschön geht an unsere Techniker und Laboranten, die "den Laden am Laufen halten" und mit deren Unterstützung die meisten Projekte überhaupt erst ermöglichen: Christina Linnarz, Nils Hersch, Jens Konrad, Sven Gerlach, Simone Stiefel und Nico Hampe. Und selbstverständlich auch unserem stets hilfsbereiten, Kaffee- und Laufbegeisterten IT-Team Georg Dreissen und Dr. Ronald Springer.

Euch, Dr. Erik Nötzel-Reiss, Laura Schmitt und Jella Abraham möchte ich für die Hilfen beim erstellen meiner Promotionsschrift nochmals danke sagen!

Weiterhin möchte ich Krishna Sridar, Lisann Esser, Jella Abraham, Dr. Agnes Czisar und Dr. Tobias Braun für hilfreiche Diskussionen und die lockere, unverkrampfte Arbeitatmosphäre danken.

Zum Schluss möchte ich für die viele Unterstützung und Rückendeckung meiner lieben Familie danken, besonders meiner Mutti und meiner Oma.