

**Mechanosensitive Adaption basaler und suprabasaler
Keratinocyten in einem dreidimensionalen
Epidermaläquivalent unter zyklischer Dehnung**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Robin David Püllen

aus Neuss

Bonn

im Oktober 2022

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

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

Tag der Promotion: 25.01.2023

Erscheinungsjahr: 2023

Zusammenfassung

Die Epidermis erfüllt als äußere Hautbarriere eine essentielle Schutzfunktion. Gleichzeitig unterliegt dieses stratifizierte Epithel unterschiedlichsten mechanischen Belastungen. Dabei erfordert die Wahrung der Gewebeintegrität unter Dehnungsreizen im physiologischen Kontext eine ständige Anpassung der epidermalen Zellen. Die Umstrukturierung von Aktin-Stressfasern sowie die Ausrichtung der Zellen und Zellkerne werden dabei als eine Form der Anpassung auf zyklische Dehnung sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* beobachtet. Hierbei fokussierten sich bisherige Untersuchungen auf Analysen einzelner Zellen und einlagiger Zellschichten, die über Zell-Matrix-Adhäsionen an das Substrat binden. In der mehrschichtigen Epidermis bauen jedoch nur basale Zellen einen solchen Kontakt zur darunter liegenden Basalmembran auf. Suprabasale Zellen liegen dagegen in dreidimensionalem Kontakt zu Nachbarzellen vor und sind auf Zell-Zell-Verbindungen limitiert. Obwohl interzelluläre Kontakte bei substratadhäsiven Zellen *in-vitro* eine verstärkte und beschleunigte Reorientierung des Zellverbands unter zyklischer Dehnung ermöglichen, ist über eine potentielle Adaption suprabasaler Zellen wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein mehrschichtiges, submerses Modell aus epidermalen Keratinozyten auf einem elastischen Substrat generiert. Dieses vereinfachte Epidermaläquivalent (genannt SEE, engl. *Simplified Epidermal Equivalent*) wies auch ohne graduelle Differenzierung und Verhornung strukturelle Ähnlichkeiten zur vitalen Epidermis auf. In repetitiven Zugversuchen physiologischer Amplituden konnte außerdem ein vergleichbares mechanisches Verhalten tierischer Vollhautexplantate und SEEs beobachtet werden.

Durch die interzellulären Kontakte wurde eine Deformation des basalen Substrats nahezu unverändert auch über drei- bis fünf Zelllagen hinweg an der apikalen Oberfläche des SEEs nachgewiesen. Die suprabasalen Keratinozyten bildeten unter zyklischer Dehnung keine zu substratadhäsiven Zellen vergleichbaren Stressfasern aus, zeigten jedoch ebenso eine Parallelisierung und annähernd quer zur Dehnungsachse ausgerichtete Orientierung der Zellen und Zellkerne. Diese Adaption suprabasaler Zellen konnte vergleichbar auch in Abwesenheit eines funktionellen Mikrotubuli- oder Keratin-Netzwerks beobachtet werden. Dagegen wurde die Reorientierung basaler Stressfasern durch das Fehlern anderer Zytoskelettsysteme deutlicher beeinflusst.

Weiterhin konnte anhand ein- und mehrschichtiger Untersuchungen eine dehnungsinduzierte Strukturänderung des apikalen Aktinkortex im Zellverband nachgewiesen werden. Hierbei induzierte zyklische Dehnung anisotrope Aktinfilamente im isotropen Netzwerk des Kortex. Diese Filamente zeichneten sich durch periodische Anordnungen mit nicht-muskulärem

Myosin 2 aus und wurden durch den direkten Myosin-Inhibitor Blebbistatin reprimiert, während die Hemmung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase keinen Effekt zeigte. Dabei verliefen die Filamente quer zur Dehnungsachse in gegenüberliegende Zellgrenzen und wiesen zellübergreifend ähnliche Orientierungswinkel auf.

Diese Arbeit untersuchte erstmals *in-vitro* die räumliche Orientierung mehrschichtiger Zellsysteme unter zyklischer Dehnung und verdeutlicht die Bedeutung des dynamischen Aktinkortex und der interzellulären, mechanischen Kopplung für die mechanosensitive Adaption im Gewebeverband.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 LAGE, FUNKTION UND AUFBAU DER EPIDERMIS	1
1.2 ZYTOSKELETTALE NETZWERKE DER KERATINOZYTEN.....	5
1.2.1 Mikrotubuli.....	5
1.2.2 Intermediärfilamente der Keratinozyten.....	6
1.2.3 Aktin und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Mikrofilamente).....	7
1.3 ZELLVERBINDUNGEN DER EPIDERMIS	12
1.3.1 Zell-Matrix-Verbindungen.....	12
1.3.2 Zell-Zell-Verbindungen.....	13
1.4 MECHANOSENSORIK DER EPIDERMIS	18
1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 GERÄTE.....	24
2.2 OBJEKTIVE	25
2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	26
2.4 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	27
2.5 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	29
2.6 ANTIKÖRPER, FLUORESZIERENDE FARBSTOFFE UND KONJUGATE	30
2.7 PROGRAMME	31
2.8 PRÄPARATION ELASTISCHER ZELLKULTURSUBSTRATE.....	32
2.8.1 Herstellung der Elastomeroberflächen zur Zellkraftanalyse.....	32
2.8.2 Herstellung elastische Silikonsubstrate zur Dehnungsanalyse	32
2.8.3 Kovalente Bindung carboxylierter und fluoreszierender Partikel.....	33
2.8.4 Einbau und Präparation der Silikonkammern	34
2.9 ZELLKULTURTECHNIKEN	36
2.9.1 Kultivierung der Keratinozyten.....	36
2.9.2 Kryokonservierung und Auftauen eingelagerter Zellen	37
2.9.3 Zellzahlbestimmung.....	37
2.9.4 Generierung mehrschichtiger Epidermaläquivalente auf Elastomerkammern.....	38

2.9.5	<i>Aussaat einschichtiger Keratinozyten (Monolagen) auf elastischen Substraten</i>	38
2.9.6	<i>Biochemische Behandlung der Monolagen und SEEs</i>	39
2.10	PRÄPARATION UND SCHICHTDICKENBESTIMMUNG TIERISCHER VOLLHAUTEXPLANTATE	40
2.11	DURCHFÜHRUNG UNIAXIALER DEHNUNGSANALYSEN	42
2.11.1	<i>Spannungs-Dehnungs-Analysen im Gewebedehner</i>	42
2.11.2	<i>Durchführung zyklischer Dehnungsversuche</i>	44
2.11.3	<i>Mikroskopische Analyse des Deformationsfeldes mehrschichtiger SEEs</i>	45
2.12	IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG	46
2.13	KONFOKALE MIKROSKOPIE	48
2.14	ZUGKRAFTMIKROSKOPIE	49
2.15	BILDVERARBEITUNG	50
2.15.1	<i>Deformationsfeldcharakterisierung mehrschichtiger SEEs in Elastomerkammern</i>	50
2.15.2	<i>Auswertung der Orientierung basaler Aktin-Faserbündel</i>	50
2.15.3	<i>Abschätzung der apikalen Zellausrichtung</i>	51
2.15.4	<i>Ermittlung der Zellkerndichte</i>	52
2.15.5	<i>Bestimmung der Zellkernorientierung</i>	52
2.15.6	<i>Strukturanalyse des kortikalen F-Aktins</i>	54
2.15.7	<i>Auswertung zellulärer Zugkräfte</i>	55
2.16	STATISTISCHE AUSWERTUNG UND GRAPHISCHE DARSTELLUNG	56
3	ERGEBNISSE	57
3.1	ETABLIERUNG EINES MEHRLAGIGEN EPIDERMISMODELLS ZUR ZYKLISCHEN DEHNUNGSANALYSE	57
3.1.1	<i>Anpassung des Protokolls zur in-vitro Differenzierung unter submersen Bedingungen</i>	57
3.1.2	<i>Dreidimensionale Charakterisierung des entwickelten Epidermismodells</i>	60
3.1.3	<i>Vergleich mechanischer Eigenschaften des SEE mit nativem Hautgewebe</i>	65
3.2	ZELLULÄRE ADAPTION AUF ZYKLISCHE DEHNUNG IM SEE UND IN MONOLAGEN	70
3.2.1	<i>Dehnungsinduzierte Reorientierung der Aktin-Faserbündel</i>	70
3.2.2	<i>Ausrichtung apikaler Zellgrenzen unter Dehnung</i>	73
3.2.3	<i>Einfluss zyklischer Dehnung auf die Zellkernausrichtung und Dichte</i>	74
3.3	EINFLUSS DER ZYTOSKELETTSYSTEME AUF DIE DEHNUNGSINDUZIERTE REORIENTIERUNG IM SEE	79
3.3.1	<i>Stressfaser und Zellkernausrichtung unter Störung der Tubulin-Polymerisation</i>	79
3.3.2	<i>Organisation der Aktin-Stressfasern und Zellkerne in Keratin-freien Keratinozyten</i>	82
3.3.3	<i>Struktur des F-Aktins und der Kerne unter Störung der Aktin-Polymerisation</i>	85
3.4	POLARITÄT EPIDERMALER MONOLAGEN ALS MODELLSYSTEM DER MEHRSCHICHTIGEN EPIDERMIS	91
3.4.1	<i>Vergleich der dehnungsinduzierten Antwort in Monolagen und SEEs unter Cyto. D</i>	91
3.4.2	<i>Strukturänderungen im apikalen Kortex einschichtiger Keratinozyten unter Dehnung</i>	92
3.4.3	<i>Abhängigkeit der kortikalen Umstrukturierung von interzellulären Verbindungen</i>	94
3.4.4	<i>Aufbau dehnungsinduzierter Filamente bei eingeschränkter Formin-Nukleation</i>	96

3.4.5	<i>Einfluss des Myosin-Motorproteins auf die Struktur des F-Aktins unter Dehnung</i>	98
3.4.6	<i>Bedeutung der Myosin-Motoraktivität für die F-Aktin-Struktur unter Dehnung</i>	101
3.4.7	<i>Einfluss der Inhibitoren zur Störung des Aktomyosins auf die zelluläre Kontraktilität</i>	104
3.4.8	<i>Rolle des NMM2 in der dehnungsinduzierten Adaption suprabasaler Zellen im SEE</i>	106
4	DISKUSSION	111
4.1	ENTWICKLUNG EINES MEHRSCHTIGEN EPIDERMALÄQUIVALENTS AUF ELASTOMERSUBSTRATEN ...	111
4.2	CHARAKTERISIERUNG MECHANISCHER EIGENSCHAFTEN DER SEES	115
4.3	DEHNUNGSINDUZIERT REORIENTIERUNG IM EIN- UND MEHRSCHTIGEN EPITHEL.....	118
4.4	REORIENTIERUNG IM SEE UNTER STÖRUNG ZYTOSKELETTALER SYSTEME	120
4.5	DEHNUNGSINDUZIERT UMSTRUKTURIERUNG DES KORTIKALEN F-AKTINS	124
5	AUSBLICK	129
6	LITERATURVERZEICHNIS	131
7	DANKSAGUNG	144

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Anatomie der menschlichen Haut.</i>	2
<i>Abbildung 2: Schema der (De-)Polymerisation von filamentösem Aktin.</i>	8
<i>Abbildung 3: Struktureller Aufbau und Kontraktion des zellulären Aktomyosin.</i>	9
<i>Abbildung 4: Organisation des submembranen Aktomyosin-Kortex.</i>	10
<i>Abbildung 5: Schematische Übersicht der Zell-Zell-Verbindungen in Epithelien.</i>	14
<i>Abbildung 6: Differenzierungs- und lageabhängige Expression in stratifizierter Epidermis.</i>	16
<i>Abbildung 7: Kalzium-induzierte Bildung interzellulärer Kontakte beeinflusst die Aktin-Ausrichtung.</i> ...	21
<i>Abbildung 8: Gussform zur Produktion elastischer Silikonkammern.</i>	33
<i>Abbildung 9: Aufbau der Halter zur Stabilisierung elastischer Silikonkammern.</i>	35
<i>Abbildung 10: Präparation der ex-vivo Vollhautproben zur mechanischen Charakterisierung.</i>	40
<i>Abbildung 11: Aufbau der Zugapparatur für Gewebeproben.</i>	43
<i>Abbildung 12: Aufbau der Zugapparatur für uniaxiale Dehnungsversuche mit Elastomerkammern.</i>	44
<i>Abbildung 13: Postkonfluente Kultivierung als Methode zur epidermalen Stratifizierung auf Elastomeroberflächen.</i>	58
<i>Abbildung 14: Schema des angepassten Protokolls zur Generierung eines dehnbaren in-vitro Epidermismodells.</i>	60
<i>Abbildung 15: Dreidimensionaler Aufbau des vereinfachten Epidermaläquivalents auf Elastomer.</i>	61
<i>Abbildung 16: Lageabhängigkeit der Zellkontaktstrukturen im SEE.</i>	62
<i>Abbildung 17: Teilungsaktivität der Keratinozyten im SEE.</i>	63
<i>Abbildung 18: Kalibrierung des Deformationsfeldes im mehrlagigen SEE unter uniaxialer Dehnung.</i>	64
<i>Abbildung 19: Vergleich der Kraftrelaxation während repetitiver statischer Dehnung.</i>	66
<i>Abbildung 20: Viskoelastische und viskoplastische Eigenschaften unter statischer Dehnung.</i>	68
<i>Abbildung 21: Dehnungsinduzierte Reorientierung des F-Aktins in Monolagen und SEEs.</i>	70
<i>Abbildung 22: Quantitative und lageabhängige Auswertung der Aktin-Stressfaserorientierung.</i>	72
<i>Abbildung 23: Dehnungsinduzierte Ausrichtung apikaler Zellen im SEE.</i>	73
<i>Abbildung 24: Morphologie der Zellkerne in Monolagen und SEEs.</i>	75
<i>Abbildung 25: Dehnungsinduzierte Verschiebung der Zellkernachsen in Monolagen und SEEs.</i>	76
<i>Abbildung 26: Zellkerndichte in Monolagen und SEE unter zyklischer Dehnung.</i>	78
<i>Abbildung 27: Inhibition der Mikrotubuli durch Nocodazol.</i>	79
<i>Abbildung 28: Umstrukturierungen im mehrschichtigen SEE unter Dehnung und Störung der Tubulin-Polymerisation.</i>	80
<i>Abbildung 29: Dehnungsinduzierte Reorientierung des basalen F-Aktins und der Zellkerne unter Störung der Tubulin-Polymerisation.</i>	81
<i>Abbildung 30: Dehnungsinduzierte Ausrichtung im SEE in Abwesenheit von Keratinfilamenten.</i>	83
<i>Abbildung 31: Quantitative Auswertung der basalen F-Aktin- und Zellkernausrichtung in KtyI^{-/-}-SEEs.</i> 84	

Abbildung 32: <i>Dehnungsinduzierte Ausrichtung im mehrschichtigen SEE unter Störung der Aktin-Polymerisation.</i>	86
Abbildung 33: <i>Dehnungsinduzierte Reorientierung im SEE unter gestörter Aktin-Polymerisation.</i>	87
Abbildung 34: <i>Dehnungsinduzierte Strukturänderungen des kortikalen F-Aktins im SEE.</i>	89
Abbildung 35: <i>Quantitative Auswertung der Strukturausrichtung im apikalen und basalen Aktinkortex.</i>	90
Abbildung 36: <i>Dehnungsinduzierte Stressfaser- und Zellkern-Reorientierung in Monolagen unter Störung der Aktin-Polymerisation.</i>	91
Abbildung 37: <i>Dehnungsinduzierte Strukturänderungen des kortikalen F-Aktins in Monolagen.</i>	93
Abbildung 38: <i>Auswertung der Strukturausrichtung im Aktinkortex einschichtiger Keratinozyten.</i>	94
Abbildung 39: <i>Struktur des F-Aktins in kalzium-freien Monolagen unter Dehnung.</i>	95
Abbildung 40: <i>Strukturelle Anpassung im F-Aktin epidermaler Monolagen unter Formin-Inhibition.</i>	97
Abbildung 41: <i>Stressfaser- und Zellkern-Reorientierung in Monolagen bei zusätzlicher Störung der Formin-vermittelten Aktin-Polymerisation.</i>	98
Abbildung 42: <i>F-Aktin-Struktur unter Dehnung und paralleler Inhibition des Myosin-Motorproteins.</i>	99
Abbildung 43: <i>Orientierung des F-Aktins unter Dehnung und paralleler NMM2-Inhibition.</i>	101
Abbildung 44: <i>F-Aktin-Struktur unter Dehnung und paralleler Inhibition der MLCK.</i>	102
Abbildung 45: <i>Orientierung des F-Aktins unter Dehnung und paralleler MLCK-Inhibition.</i>	103
Abbildung 46: <i>Veränderung der zellulären Kräfte durch Störung des Aktomyosins.</i>	105
Abbildung 47: <i>Dehnungsinduzierte F-Aktin-Strukturänderungen basaler und apikaler Zellen unter Inhibition des Aktomyosins.</i>	107
Abbildung 48: <i>Myosin im apikalen Kortex gedehnter SEEs.</i>	109

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Auflistung verwendeter Geräte und Werkzeuge</i>	24
<i>Tabelle 2: Auflistung verwendeter Objektive zur Mikroskopie</i>	25
<i>Tabelle 3: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien</i>	26
<i>Tabelle 4: Verzeichnis verwendeter Chemikalien und Reagenzien</i>	27
<i>Tabelle 5: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen</i>	29
<i>Tabelle 6: Aufstellung eingesetzter Primärantikörper</i>	30
<i>Tabelle 7: Übersicht eingesetzter Sekundärantikörper</i>	31
<i>Tabelle 8: Bezeichnung der Fluoreszenzfarbstoffe und Peptidkonjugate</i>	31
<i>Tabelle 9: Genutzte kommerziell erhältliche oder frei zugängliche Programme</i>	31

Abkürzungsverzeichnis

ABPs	<i>engl. actin binding proteins</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AJ	<i>engl. Adherens Junction</i>
ATP	Adenosintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl. Deoxyribonucleic acid</i>
DP	Desmoplakin
Dsc	Desmocollin
Dsg	Desmoglein
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
F-Aktin	filamentöses Aktin
FA	Fokaladhäsion
FAK	<i>engl. focal adhesion kinase</i>
FFT	schnelle Fourier-Transformation (<i>engl. Fast Fourier Transformation</i>)
G-Aktin	globuläres Aktin
GEF	<i>engl. guanine nucleotide exchange factor</i>
h	Stunden (<i>engl. hours</i>)
HD	Hemidesmosom(en)
JAM	<i>engl. junctional adhesion molecule</i>
KtyI ^{-/-}	Homozygot deletierte Keratin Typ-I Mutante

LINC	<i>engl. linker of nucleoskeleton and cytoskeleton</i>
LSM	<i>engl. Laser Scanning Microscope</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
MIP	maximale Intensitätsprojektion
ML	Monolage
MLCK	<i>engl. myosin light chain kinase</i>
MTOC	<i>engl. microtubule organizing center</i>
NMM2	nicht-muskuläres Myosin 2
n.s.	nicht signifikant
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz
Pax.	Paxillin
PDMS	Polydimethylsiloxan
Pg	Plakoglobin
Pkp	Plakophilin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RhoA	<i>engl. Ras homolog family member A</i>
ROCK	<i>engl. rho-associated protein kinase</i>
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEE	<i>engl. Simplified Epidermal Equivalent</i>
SMIFH2	<i>engl. Small Molecule Inhibitor of Formin Homology 2 domain</i>
Src	<i>engl. cellular sarcoma kinase</i>
TJ	<i>engl. Tight Junction</i>
WST	Wasserscheidentransformation (<i>engl. Watershed Transformation</i>)
WT	Wildtyp
ZO	<i>lat. Zonula Occludens</i>

1 Einleitung

In ihrer Rolle als äußerste Schutzschicht ist die Haut kontinuierlich mechanischer Belastung ausgesetzt. Hierzu hat sich evolutionär ein hochspezialisierter Aufbau entwickelt, der nicht nur unter hohen Zugkräften die Integrität des Gewebes bewahrt, sondern auch eine kontinuierliche Selbsterneuerung vollzieht und durch verstärkte Zellteilung und/oder Verhornung zusätzlich auf wiederkehrende oder anhaltende mechanische Belastungen reagiert. Insbesondere die äußerste Hautschicht, die Epidermis, ist dabei für die protektive Barrierefunktion verantwortlich. Sie weist als strukturiertes Epithel aus mehreren Zellschichten eines primären Zelltyps eine stabile und dennoch kontinuierlich adaptierende interzelluläre Abhängigkeit auf. Die Grundlage für die herausragende mechanische Stabilität der Epidermis wird neben dem funktionalen Aufbau des Gewebes auch durch spezialisierte Strukturen auf zellulärer und molekularer Ebene gebildet. Durch mechanosensitive Bausteine und nachgeschaltete Signalwege sind epidermale Zellen außerdem in der Lage, mechanische Reize wahrzunehmen und auf diese zu reagieren. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den weitgehend unbekanntem Zellantworten auf zyklische Dehnung innerhalb der multizellulären, mehrschichtigen Epidermis. In den folgenden Ausführungen wird deshalb auf das Gewebe und den primär enthaltenen Zelltyp sowie auf die molekularen Strukturen, die für die mechanischen Eigenschaften von besonderer Bedeutung sind, näher eingegangen.

1.1 Lage, Funktion und Aufbau der Epidermis

Die Haut bedeckt als größtes Organ die gesamte äußere Körperoberfläche und ist die primäre Grenze zwischen dem Organismus und der Umwelt. Dabei erfüllt sie eine Vielzahl essentieller Aufgaben. Neben der Thermoregulation und der Sinneswahrnehmung ist die Funktion als Barriere und Schutz vor Schädigung durch chemische, biologische und physikalische Umwelteinflüsse von zentraler Bedeutung (Kanitakis, 2002). Dabei halten drei spezialisierte Hautschichten auch unter hoher mechanischer Belastung die Integrität des Gewebes bei gleichzeitiger Ausübung der regulatorischen und sensorischen Funktionen aufrecht [Abbildung 1 A] (Wong *et al.*, 2011). Das subkutane Fettgewebe (auch Subkutis oder Hypodermis genannt), stellt die unterste, lichtmikroskopisch abgrenzbare Hautschicht dar (Meves, 2006). Die Subkutis besteht aus einem Polster isolierender Fettzellen, das von Bindegewebssträngen durchzogen ist und so die Haut mit den darunterliegenden Faszien und Knochen verbindet. Die mechanischen Eigenschaften und damit auch die außergewöhnlich hohe Reißfestigkeit der Haut werden

hingegen von der darüber liegenden Hautschicht, der Dermis, dominiert (Yang *et al.*, 2015; Biggs *et al.*, 2020). Bei dieser handelt es sich um ein komplexes Bindegewebe aus Faserproteinen, die in einer gelartigen Grundsubstanz eingebettet sind (Eshel und Lanir, 2001; Joodaki und Panzer, 2018). Des Weiteren liegen in der Dermis u.a. sekretierende Fibroblasten, Sinneszellen, Haarfollikel und Adnexstrukturen (auch Hautanhangsgebilde genannt) sowie ein stark verzweigtes Gefäßsystem vor. Letzteres versorgt ebenfalls die äußerste Hautschicht, die selbst nicht durchblutet wird, mit Sauerstoff, Hormonen, Metaboliten und Nährstoffen. Die Zusammensetzung und vernetzte Struktur der extrazellulären Matrix (EZM) aus reißfesten Kollagenfaserbündeln, elastischen Faserproteinen und einer wasserbindenden Grundsubstanz aus Proteoglykanen führen dazu, dass sich Hautgewebe in materialwissenschaftlichen Zugversuchen nicht-linear elastisch, anisotrop, heterogen und sowohl viskoelastisch als auch teilweise viskoplastisch verhalten (Joodaki und Panzer, 2018; Püllen *et al.*, 2021).

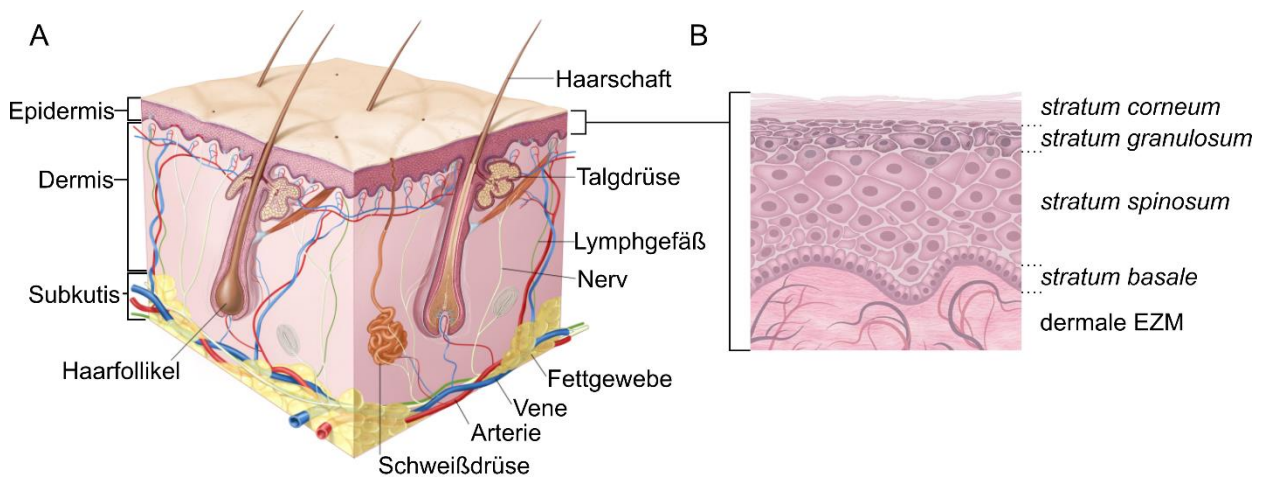


Abbildung 1: **Anatomie der menschlichen Haut.** Die drei unterschiedlichen Hautschichten sind morphologisch und funktionell deutlich voneinander abgrenzbar. Neben der hauptsächlich aus Fettzellen bestehenden Subkutis sind die Dermis mit den dazugehörigen Hautanhangsgebilden und die aufliegende Epidermis zu erkennen [A]. Die äußerste Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, welches durch einen graduellen Differenzierungsprozess von innen (basal) nach außen (apikal) histologisch in unterschiedliche Schichten stratifiziert werden kann [B]. Verändert nach PDQ-Cancer-Information-Summaries (2002) und Pfisterer *et al.* (2021).

Die zentrale, protektive Barrierefunktion der Haut wird insbesondere durch die äußerste Hautschicht, der Epidermis, ermöglicht. Diese stellt ein mehrlagiges, verhorntes und sich kontinuierlich selbsterneuerndes Plattenepithel dar (Baroni *et al.*, 2012). Mit einem Anteil von ca. 90-95 % finden sich als primärer Zelltyp in der Epidermis Keratinozyten, die in einem räumlich koordinierten Prozess einer regelmäßigen Teilung und anschließenden Differenzierung unterliegen (Kanitakis, 2002). Darüber hinaus lassen sich vereinzelt Zellen des Immunsystems (dendritische Langerhans-Zellen), Sinneszellen und pigmentbildende Melanozyten finden.

Durch den epidermalen Differenzierungsprozess, der auch von gerichteter Zellmigration begleitet wird, und die Polarität des Epithels kann die Epidermis histologisch in vier Hauptschichten stratifiziert werden [Abbildung 1 B] (Meves, 2006).

Dabei grenzt sich die Epidermis von der Dermis durch eine dünne Basalmembran mit charakteristischer Zusammensetzung aus Kollagenfibrillen sowie Glyko- und weiteren Proteinen ab (Biggs *et al.*, 2020). Mit dieser spezialisierten EZM sind die kubischen Keratinozyten der untersten epidermalen Schicht (*lat. stratum basale*) direkt über haftende Zell-Matrix-Kontakte [siehe auch Kapitel 1.3.1] verbunden. In der einlagigen Basalzellschicht weisen die Keratinozyten den geringsten Differenzierungsgrad und die höchste Proliferationsaktivität auf. In gesunder Epidermis treten hier täglich etwa 10 % der basalen Keratinozyten, die sich wiederum aus einem epidermalen Stammzellpool in geschützten Nischen speisen, in die Mitose ein (Solanas und Benitah, 2013). Spätestens nach einigen Teilungen entziehen diese Vorläuferzellen sich dem Zellzyklus und gehen in die terminale Differenzierung über (Meves, 2006). Dabei werden zunächst die Verbindungen zur Basalmembran abgebaut und die Migration zur apikal gelegenen Hornschicht (*lat. stratum corneum*) aufgenommen.

Die differenzierenden Keratinozyten nehmen im Volumen zu, verändern ihre zytoplasmatische Zusammensetzung und bauen vermehrt interzelluläre Kontaktstrukturen auf. Zunächst durchlaufen sie hierbei die Stachelzellschicht (*lat. stratum spinosum*), deren Namen auf das stachelförmige Aussehen der Zellen im histologischen Präparat zurückzuführen ist (Eckert, 1989). Im Verlauf der fortschreitenden Differenzierung flachen die Zellen morphologisch ab und bilden Granula aus Keratohyalin. Dies führt zur lichtmikroskopisch differenzierbaren Körnerzellschicht (*lat. stratum granulosum*), in der auch die versiegelnden und für die epidermale Barrierefunktion essentiellen *Tight Junctions* (*engl.*) [siehe auch Kapitel 1.3.2] zu finden sind. Nur an stark beanspruchten Körperregionen wie an den Händen und Füßen befindet sich daraufhin eine zusätzliche, histologische Schicht, die aufgrund einer besonders dichten Organisation des Zytokeratins und weiterer Proteine stark lichtbrechende Eigenschaften aufweist und deshalb als Glanzschicht (*lat. stratum lucidum*) bezeichnet wird (Meves, 2006).

Im Rahmen der finalen Differenzierung erfolgt anschließend die Degradation des Zellkerns und weiterer Organelle, die Dehydratation des Zytoplasmas und Sekretion verschiedener Lipide, bevor die Zellen in den epidermalen Zelltod übergehen und als Korneozyten Teil des wasserundurchlässigen *stratum corneum* werden. In Verbindung mit interzellulären Lipiden als Kitsubstanzen kann der Aufbau der *stratum corneum* dabei wie ein „Ziegelstein-Mörtel-Modell“ verstanden werden (Elias, 1988). Durch mechanische Abschilferung (auch

Desquamation genannt) und enzymatischen Abbau wird die Hornschicht kontinuierlich abgetragen und durch nachrückende, keratinisierende Zellen ersetzt (Baroni *et al.*, 2012).

Der multifaktoriell regulierte Differenzierungsprozess ist dabei zeitlich und räumlich mit einem charakteristischen Expressionsmuster typischer Proteine assoziiert, welches sowohl die Stabilität und Dynamik der interzellulären Verbindungen [siehe nachfolgend Kapitel 1.3] als auch den Anteil und Aufbau des zytoskelettalen Systems [siehe nachfolgend Kapitel 1.2] beeinflusst (Simpson *et al.*, 2011; Green *et al.*, 2019).

1.2 Zytoskelettale Netzwerke der Keratinozyten

Unter dem Begriff „Zytoskelette“ werden intrazelluläre Netzwerke aus Proteinfasern zusammengefasst, die u.a. für die Formgebung der Zelle, deren Migration und Elastizität aber auch für den intrazellulären Transport, die Kommunikation und die Zellteilung bedeutsam sind. Anhand dieser wenigen Beispiele lässt sich bereits erkennen, warum diese Netzwerke sensitiv auf eine Vielzahl natürlich vorkommender Toxine aus Pilzen und Pflanzen reagieren, sowie eine Reihe genetischer Veränderungen der Systeme mit schwerwiegenden Erkrankungen assoziiert sind (Tsuyama und Takenaka, 1997; Chamcheu *et al.*, 2011). Zytoskelettale Strukturen sind aus Protein-Untereinheiten zusammengesetzt und in ihrer Organisation dynamisch durch zahlreiche weitere Proteine reguliert. Dabei werden drei Fasersysteme, die Mikrotubuli, die Intermediärfilamente und das Aktin-Zytoskelett (auch Mikrofilamente genannt), unterschieden. Da diese Netzwerke für die Mechanobiologie der Epithelien eine zentrale Rolle einnehmen, werden die einzelnen Klassen im Folgenden näher beschrieben.

1.2.1 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind in besonderem Maße für den intrazellulären Stofftransport, der Lage von Organellen sowie für die Anordnung und Aufteilung der Chromosomen während der Zellteilung verantwortlich. Die kleinsten Untereinheiten stellen dabei Heterodimere aus α - und β -Tubulin dar, welche sich zu Protofilamenten zusammen lagern. Eine stabile Nukleation findet *in-vivo* ausgehend von sogenannten MTOC (*engl. microtubule organizing center*) statt. Das wohl bekannteste MTOC ist das für die Zellteilung bedeutsame Zentrosom (Wade, 2009). Ein einzelner Mikrotubulus besteht aus einer lateralen Anordnung von 13 Protofilamenten um einen zentralen Raum zu einer Röhrenstruktur mit einem Außendurchmesser von ungefähr 25 nm. Aufgrund der polaren, heterodimeren Grundbausteine und dem parallelen Aufbau der Protofilamente zeigen auch Mikrotubuli eine Polarität. Die beiden Enden unterscheiden sich in ihrer Polymerisationskinetik und können *in-vitro* in ein langsam wachsendes Minus-Ende und ein schnell wachsendes Plus-Ende unterteilt werden (Alberts, 2015). Dabei ist das Minus-Ende *in-vivo* häufig an MTOC angelagert, während das Plus-Ende interphasischer Zellen zur Zellperipherie hin wächst. Auf- und Abbau der Mikrotubuli liegen in einem dynamischen Gleichgewicht vor, das zum einen durch einen langsamen Aufbau nach erfolgter Nukleation und zum anderen durch schnellen Zerfall bestehender Mikrotubuli, der sogenannten dynamischen Instabilität, gekennzeichnet ist. Eine Reihe Mikrotubuli-assoziiierter Proteine sind in der Lage die Faserstrukturen zu stabilisieren bzw. zu destabilisieren und erlauben so wichtige, gerichtete

Transport- und Bewegungsvorgänge (Alberts, 2015; Brouhard, 2015). Dabei liegen Mikrotubuli der basalen Keratinozyten zentrosomal vor, während in suprabasalen Zellen eine zunehmende periphere Lokalisation beobachtet werden kann (Biggs *et al.*, 2020). Verglichen mit den anderen beiden Zytoskelettklassen, den Mikro- und Intermediärfilamenten, handelt es sich bei den röhrenförmigen Mikrotubuli um relativ starre Strukturen, die auch an der zellulären Formgebung maßgeblich beteiligt sind. Unter mechanischer Belastung in Form von Dehnung werden bestehende Mikrotubuli *in-vitro* zunächst unmittelbar und spontan depolymerisiert, sodass das Netzwerk kollabiert (Abraham *et al.*, 2019). Bei anhaltender zyklischer Dehnung einzelner Zellen auf elastischen Substraten konnte anschließend eine Neuausrichtung des Mikrotubuli-Netzwerks beobachtet werden. Dabei richteten sich die Fasern tendenziell weg von der uniaxialen Zugrichtung aus (Zielinski *et al.*, 2018).

1.2.2 Intermediärfilamente der Keratinozyten

Der Durchmesser der Intermediärfilamente ist mit 8-12 nm zwischen den dickeren Mikrotubuli (ca. 25 nm) und den dünneren Mikrofilamenten (ca. 7 nm) einzuordnen und aus diesem Grund auch namensgebend für diese große, heterogene Familie nicht-polarer Proteinnetzwerke. Die Genfamilie der Intermediärfilamente umfasst ca. 70 Proteine, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie und gewebetypischer Expression in 6 Gruppen klassifiziert werden können (Hatzfeld *et al.*, 2017). Dabei stellen Intermediärfilamente generell eine Stützstruktur dar, die der Zelle bzw. dem Gewebe mechanische Stabilität bei gleichzeitiger Anpassungsfähigkeit verleiht. In besonderem Maße kommt dies bei den für Epithelien bedeutsamen Zytokeratinen zum Tragen, die sich aus 17 funktionellen Genen der sauren Typ I Keratine und 20 funktionellen Genen der basischen Typ II Keratine zusammensetzen (Schweizer *et al.*, 2006). Keratinfilamente liegen intrazellulär als Heterodimere mit zentraler, helikaler Domäne aus je einem Typ I und einem Typ II Keratin vor, die sich in lateraler und antiparalleler Anordnung zu Tetrameren organisieren. Die weitere laterale Assoziation von vier Tetrameren bildet das Einheitslängenfilament, welches die vermutlich kleinste, bauliche Einheit der Keratine darstellt (Hatzfeld *et al.*, 2017). Maturierte Keratinfilamente entstehen durch longitudinale Verbindung der Einheitslängenfilamente und eventuell weiterer Organisation zu Bündeln. Dabei werden die Filamente kontinuierlich auf- und abgebaut, sodass die Einheitslängenfilamente einer zyklischen Wiederverwertung unterliegen. Da die antiparallelen Keratin-Heterodimere keine Polarität aufweisen, stellen auch die Filamente apolare Strukturen dar, deren Enden gleichermaßen zum Anbau neuer Oligomere geeignet sind (Windoffer *et al.*, 2011). Die große Sequenzdiversität der Keratine erlaubt durch spezifische

Kombination der Typ I und Typ II Keratine den Aufbau von Keratin-Netzwerken mit unterschiedlichen Eigenschaften (Simpson *et al.*, 2011). Darüber hinaus wird die funktionale Diversität durch zahlreiche posttranslationale Modifikationsstellen in der nicht-helikalen Kopf- und Schwanzdomäne der Keratinproteine zusätzlich erhöht (Bragulla und Homberger, 2009). In der stratifizierten Epidermis ist die Expression bestimmter Keratinkombinationen an die graduelle Differenzierung und Migration der Keratinozyten gekoppelt. So treten in basalen Keratinozyten die Keratine 5 und 14 in lockeren Bündeln auf, während suprabasale Keratinozyten nicht nur vermehrt Keratine exprimieren, sondern auch andere Heterodimere wie die Keratine 1 und 10 in dichter Organisation als Fibrillen aufweisen (Simpson *et al.*, 2011). Im Falle einer Verletzung und beginnender Wundheilung werden hingegen die Keratine 6, 16 und 17 exprimiert, während die Keratine 1 und 10 herunter reguliert werden (Bragulla und Homberger, 2009). Das Keratin-Netzwerk sichert somit lage- und bedarfsbezogen die nötige mechanische Integrität des Gewebes. Keratin-Intermediärfilamente weisen hierzu aufgrund ihres molekularen Aufbaus eine geringe Biegesteifigkeit auf und stellen eine Art mechanisches Puffersystem dar, welches sich auch in der nicht-linearen Dehnungsversteifung widerspiegelt (Köster *et al.*, 2015). Hierbei gerät das Keratin-Netzwerk unter mechanischer Deformation zunächst kaum unter Spannung und zeigt im Vergleich zu Mikrotubuli oder Mikrofilamenten eine geringe Steifigkeit. Erst mit zunehmender Dehnung nimmt die Steifigkeit stark zu und das Fasersystem weist auch unter hohen Amplituden enorme Reißfestigkeit auf (Fudge *et al.*, 2008). Anhand von Keratinozyten, bei denen durch genetische Modifikation die funktionelle Translation aller Keratine ausgeschaltet wurde (*engl. Keratin knock-out*), konnte außerdem eine deutlich verringerte Steifigkeit und Zellelastizität in rasterkraftmikroskopischen Analysen durch das Fehlen der Intermediärfilamente gezeigt werden (Ramms *et al.*, 2013).

1.2.3 Aktin und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Mikrofilamente)

Die dritte Klasse zytoskelettaler Netzwerke besteht als Grundbaustein aus einem ca. 375 Aminosäuren großen Monomer, dem hochkonservierten, globulären Aktin (G-Aktin) (Korn, 1982). In einem Adenosintriphosphat(ATP)-abhängigen Polymerisationsmechanismus assoziieren die ATP-bindenden G-Aktin-Monomere zu filamentösem Aktin (F-Aktin). Daraufhin wird das gebundene ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) und anorganisches Phosphat (Pi) hydrolysiert. Die Freisetzung des Pi hat anschließend eine Konformationsänderung des Aktinmoleküls und Destabilisierung der intermolekularen Aktin-Bindung zur Folge (Carlier, 1990). Daraus resultiert die Dissoziation des ADP-G-Aktin vom Filament. Nach Austausch des

ADP gegen ATP steht das freie ATP-G-Aktin mit hoher Affinität für ATP-F-Aktin wieder zur Anlagerung an das Filament zur Verfügung [Abbildung 2]. Durch die Tertiärstruktur des G-Aktin und der langsamen Hydrolyse des ATP zu ADP entlang des Filaments sind Aktin-Netzwerke polare Strukturen mit einem tendenziell wachsenden (+)-Ende und einem (-)-Ende, das durch einen höheren Anteil an dissoziierendem ADP-G-Aktin als Assoziation von ATP-G-Aktin verkürzt wird (Pollard, 2016).

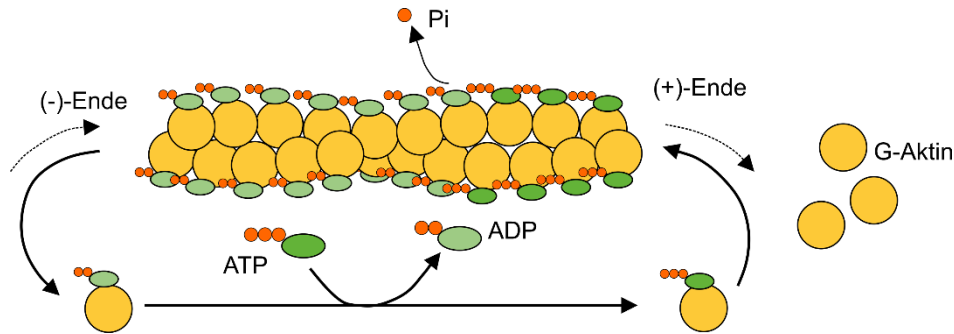


Abbildung 2: **Schema der (De-)Polymerisation von filamentösem Aktin.** Die nicht-kovalente Anlagerung von globulären Aktin-Monomeren (G-Aktin) ist von ATP abhängig, wobei ATP-Aktin eine höhere homologe Affinität als ADP-Aktin aufweist. Durch die Hydrolyse des ATP nach Bindung an das Filament und die Unterschiedliche Kinetik entsteht so ein schnell wachsendes (+)-Ende und ein tendenziell verkürzendes (-)-Ende.

F-Aktin ist dabei ein Filament mit einem Durchmesser von 7 nm aus zwei, helikal-gewundenen Ketten (Korn, 1982). Durch eine Vielzahl Aktin-bindender Proteine (ABPs) wird der kontinuierliche Auf- und Abbauprozess hochdynamisch und lokal reguliert, sodass sowohl ein Zerfall und ein schnelles Wachstum des Filaments als auch ein Netto-Gleichgewicht des Auf- und Abbaus, genannt Tretmühlenmechanismus, auftreten können (Fujiwara *et al.*, 2002). ABPs beeinflussen dabei durch Bindung von Monomeren oder direkte Interaktion mit dem Filament die Assoziations- und Dissoziationsrate an beiden Enden und ermöglichen außerdem die thermodynamisch ungünstige Nukleation. Die wohl bekanntesten Beispiele aus der Reihe der Aktinnukleationsfaktoren sind Arp2/3 Komplexe und Formine. Während Arp2/3 die Verzweigung eines bestehenden Filaments initiiert und am (-)-Ende verbleibt, bildet die Gruppe der Formine unverzweigte Aktinfilamente, in dem diese die Bildung von Aktin-Dimeren stabilisieren und die Assoziationsrate weiterer Aktin-Monomere am (+)-Ende stark erhöhen. Formine fungieren somit nicht nur als Nukleationsfaktoren, sondern verbleiben auch als Polymerasen am (+)-Ende des wachsenden Filaments (Pollard, 2016). Darüber hinaus ermöglichen ABPs die intrazelluläre Organisation in übergeordnete, dreidimensionale Strukturen, die Anheftung an membranständige Proteinkomplexe und über Motoproteine aus der Gruppe der Myosine auch die Generierung zellulärer Zugkräfte sowie den intrazellulären

Stofftransport (Alberts, 2015). Die Ausübung kontraktile Kräfte wird hierbei durch relative Verschiebung und damit Verkürzung antiparalleler angeordneter Aktinfilamente erreicht. Hierzu lagern sich in Keratinozyten bipolare Filamente aus nicht-muskulärem Myosin 2 (NMM2) an Aktin an und wandeln im Querbrückenzyklus chemische Energie in Form von ATP in mechanische Kräfte um [Abbildung 3 A] (Betapudi, 2014).

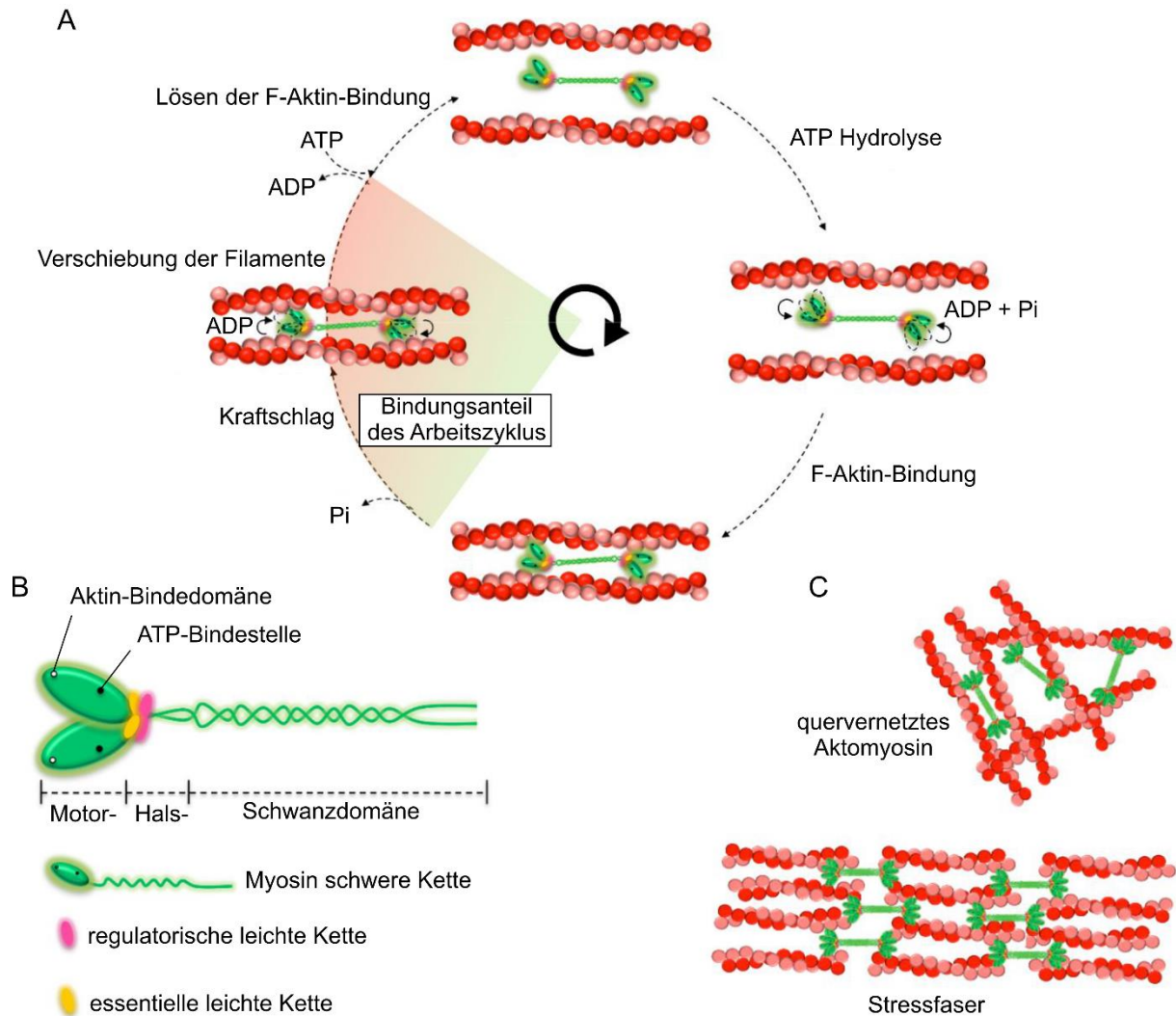


Abbildung 3: **Struktureller Aufbau und Kontraktion des zellulären Aktomyosin.** Durch die Assoziation des Motorproteins Myosin mit F-Aktin entsteht kontraktiles Aktomyosin. Die Ausführung des Querbrückenzyklus einschließlich des kraftausübenden Schlagmechanismus, bei dem bipolare Myosin-Filamente das assoziierte F-Aktin relativ zueinander verschieben, ist von einer ATP-Bindung und Hydrolyse abhängig [A]. Myosin wird aus mehreren Proteinketten zusammengesetzt und weist spezielle ATP- und Aktin-Bindedomänen sowie die Möglichkeit zur Regulation auf [B]. Durch Anlagerung weiterer Aktin-bindender Proteine liegt das Aktomyosin als kontraktiles Netzwerk oder in antiparalleler, muskelähnlicher Ausrichtung zu Stressfasern organisiert vor [C]. Verändert nach Brito und Sousa (2020).

NMM2 ist ein Hexamer und setzt sich aus zwei schweren Ketten zusammen, die jeweils im Komplex mit zwei leichten Ketten vorliegen [Abbildung 3 B]. Die schwere Kette gliedert sich in die Aktin-bindende Motordomäne (auch Kopfdomäne genannt), die flexible Halsdomäne und

die Schwanzdomäne, welche die Verdrillung mehrerer Myosin-Hexamere zu bipolaren Filamenten ermöglicht. Die leichten Ketten können in eine essentielle leichte Kette, mit rein struktureller Funktion, und eine regulatorische leichte Kette unterteilt werden.

Im Querbrückenzyklus liefert ATP die Energie zur Leistung der Arbeit und liegt gebunden an der Kopfdomäne des Motorproteins vor. [Abbildung 3A]. Durch die enzymatische Hydrolyse des ATP zu ADP und Pi (ATPase-Aktivität) erfolgt die Anlagerung an Aktin und durch die Freisetzung des Pi der kraftausübende Schlagmechanismus aufgrund einer Konformationsänderung des Myosins (Brito und Sousa, 2020). Liegt daraufhin kein weiteres ATP vor, bleiben die Kopfdomänen fest an Aktin gebunden. Erst der Austausch von ADP gegen ATP erlaubt die Rückfaltung und Ablösung vom Filament. Der Zyklus kann anschließend erneut ausgeführt werden.

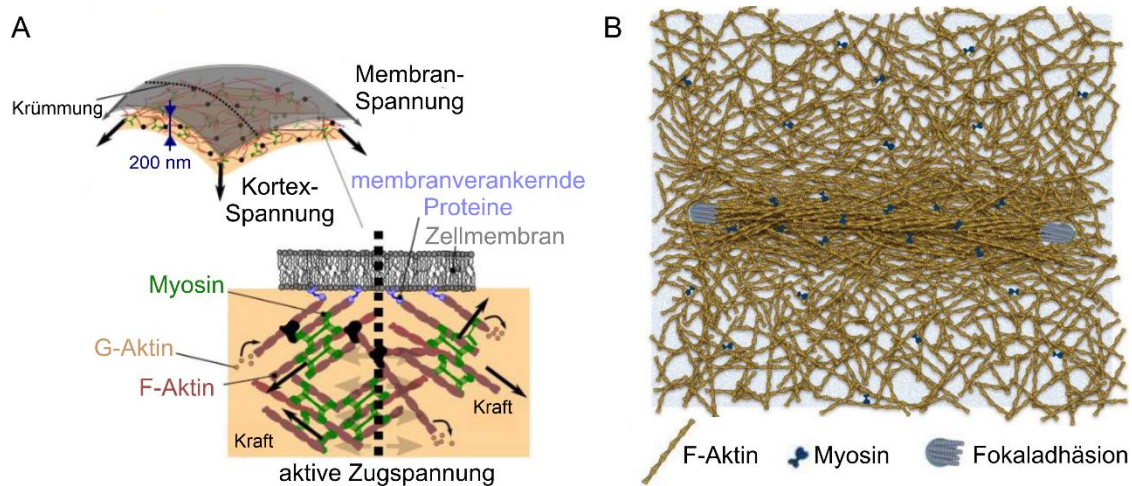


Abbildung 4: **Organisation des submembranen Aktomyosin-Kortex.** Kortikales F-Aktin interagiert mit Myosin sowie einer Fülle weiterer Proteine und liegt als dünne Schicht unterhalb der Zellmembran vor. Dabei ist das hochdynamische Netzwerk über diverse Komplexe mit der Membran selbst sowie mit zytoplasmatischen und extrazellulären Strukturen verbunden [A]. Sowohl die Dichte des Netzwerks als auch die intrinsische Zugspannung durch kraftausübende Myosin-Motorproteine wird räumlich und zeitlich reguliert. Durch parallele Anordnung von F-Aktin und vermehrte Myosin-Rekrutierung entstehen Stressfasern, die an mindestens einer Seite mit einer Fokaladhäsion eine Verbindung zur extrazellulären Matrix herstellen [B]. Verändert nach Kelkar *et al.* (2020) und Vignaud *et al.* (2021).

Die ATPase-Aktivität der NMM2-Komplexe wird durch die Phosphorylierung von Serin-19 und Threonin-18 der regulatorischen leichten Kette durch die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (*engl. myosin light chain kinase, MLCK*) oder die Rho-assoziierte Proteinkinase (*engl. rho-associated protein kinase, ROCK*) bis zu tausendfach gesteigert (Umemoto *et al.*, 1989; Brito und Sousa, 2020). Intrazellulär liegt F-Aktin häufig quervernetzt mit NMM2 und zeitweise über 150 weiteren ABPs in kontraktile Strukturen, genannt Aktomyosin, vor [Abbildung 3 C]. Der Hauptteil des zellulären F-Aktins ist dabei als dünnes, submembranes Netzwerk im Zellkortex organisiert,

dessen Zusammensetzung, Struktur, Dichte und Kontraktilität hochdynamisch reguliert werden [Abbildung 4 A] (Chugh und Paluch, 2018).

Durch inhomogene Regulation der intrinsischen Zugspannung werden aktive Formveränderungen während der Zellteilung, Apoptose, Adhäsion, Migration und Gewebeentwicklung angetrieben. Über verschiedene Signalwege, die eine lokale Veränderung der Aktinorganisation und Myosinaktivität bewirken, tritt das Aktomyosin außerdem in Strukturen höherer Ordnung auf (Vignaud *et al.*, 2021). Mechanobiologisch besonders bedeutsam ist dabei die Anordnung von Myosin und Aktinfilamenten, die über weitere kreuzvernetzende ABPs zu kontraktilen, muskelähnlichen Bündeln, den sogenannten Stressfasern, zusammengelagert sind [Abbildung 3 C, Abbildung 4 B]. In einem physiologischen Zellverband übt die Zelle zudem über transmembrane Kontaktstrukturen [siehe nachfolgend Kapitel 1.3], die mit dem submembranen Kortex verbunden sind, konstant Kräfte auf benachbarten Zellen und die umgebende Matrix aus. Die Kontaktstrukturen werden auf diese Weise unter mechanischer Zugspannung stabilisiert und die zytoskelettalen Systeme der benachbarten Zellen physikalisch verbunden (Charras und Yap, 2018). Das kortikale Aktin-Netzwerk und die darin eingebundenen Strukturen stellen aufgrund des hohen Vernetzungsgrads ein mechanisches Kontinuum dar und sind über die gesamte Zelle direkt oder indirekt miteinander verbunden [Abbildung 4 B] (Vignaud *et al.*, 2021).

1.3 Zellverbindungen der Epidermis

In mehrzelligen Organismen und Geweben, die in ihrem physiologischen Kontext mechanischer Belastung ausgesetzt sind, zählen die verbindenden Kontaktstrukturen zu den wichtigsten Interaktionsschnittstellen (Alberts, 2015). Bei auskleidenden Epithelien haften die Zellen über Zell-Matrix-Verbindungen auf einer dünnen Basalmembran und sind außerdem über Zell-Zell-Kontaktstrukturen direkt mit den angrenzenden Zellen und deren Zytoskelett verbunden. Die Epidermis weist in Abgrenzung zu einschichtigen Epithelien zusätzlich die Komplexität auf, dass nur die proliferierende Basalzellschicht in Kontakt zur Basalmembran steht. Die differenzierenden und migrierenden suprabasalen Keratinozyten liegen dagegen ausschließlich in Kontakt zu umgebenden Zellen vor (Simpson *et al.*, 2011). Die Dynamik der kontinuierlichen Selbsterneuerung bei gleichzeitiger Wahrung der Integrität unter mechanischer Belastung verdeutlicht die Relevanz der Zellverbindungen für die mechanischen Eigenschaften der Epidermis.

1.3.1 Zell-Matrix-Verbindungen

Die direkte Adhäsion der basalen Keratinozyten an Liganden der Basalmembran ist für die mechanische Stabilität der Epidermis von großer Bedeutung und äußert sich bei genetischer oder autoimmunbedingter Instabilität in schweren Krankheitsbildern (Turcan und Jonkman, 2015). Darüber hinaus spielen die Adhäsionskomplexe eine zentrale Rolle in der bidirektionalen Signaltransduktion und steuern direkt und indirekt Prozesse wie Migration, Proliferation und Differenzierung (Longmate und Dipersio, 2014). Die Zell-Matrix-Interaktion wird dabei über transmembrane Glykoproteinrezeptoren, den Integrinen, hergestellt. Diese setzen sich aus 18 α - und 8 β -Isoformen zu nicht-kovalenten Heterodimeren aus je einer α - und einer β -Untereinheit zusammen, die mit ihrer extrazellulären Domäne ligandenspezifische Bindungen eingehen (Shattil *et al.*, 2010). Intrazellulär stellen Adapterproteine wiederum eine rezeptorabhängige Verbindung zum Zytoskelett her.

Hemidesmosomen sind hierbei epitheliale Haftkomplexe, die über membranaufliegende Proteinplaques aus Plektin, BAPG1e (*engl. bullous pemphigoid antigen 1e*) und weiteren Proteinen den α_6/β_4 -Integrinrezeptor an das Netzwerk aus Keratinfilamenten anschließen (Walko *et al.*, 2015). Extrazellulär binden die Integrine der Hemidesmosomen an Laminine der Basalmembran.

Die transmembrane Kopplung der Basalmembran mit dem Aktin-Zytoskelett erfolgt ebenfalls über heterodimere Integrinrezeptoren und einem als Fokaladhäsion (*engl. Focal Adhesion, FA*)

bezeichneten intrazellulären Multi-Protein-Komplex. Bei diesen werden durch unterschiedliche Kombinationen der Integrin-Isoformen neben Laminin (z.B. α_3/β_1) u.a. Fibronectin (z.B. α_5/β_1) und Kollagen (z.B. α_2/β_1) von basalen Keratinozyten als EZM-Liganden erkannt (Watt und Jones, 1993). An den dynamischen FAs sind ausgehend von der Entwicklung initialer Fokalkomplexe über die Reifung zu maturierten FAs und der folgenden mechanosensitiven Abhängigkeit von externen und internen Zugkräften zeitweise weit über 100 Proteine an der Signal- und Kraftübertragung zwischen extra- und intrazellulären Strukturen beteiligt (Zaidel-Bar *et al.*, 2007; Kanchanawong *et al.*, 2010). Membranständige Integrinrezeptoren durchlaufen hierzu nach Aktivierung und Bindung ihres Liganden eine Konformationsänderung der intrazellulären Domäne, welche die Rekrutierung zytoplasmatischer Proteine und eine Klusterbildung membranständiger Integrine zur Folge hat (Harburger und Calderwood, 2009). Der sich bildende Komplex durchläuft daraufhin einen Reifungsprozess bei dem u.a. die Proteine Talin und Paxillin mit dem N-Terminus der β -Untereinheit interagieren und als mittelbarer und unmittelbarer Adapter für kortikales Aktin fungieren (Mitra *et al.*, 2005). Eventuell auftretende intrinsische oder extrinsische Zugkräfte bewirken eine Konformationsänderung der mechanosensitiven Proteine und legen Bindestellen für das ebenfalls mechanosensitive Protein Vinculin und die regulierenden Tyrosinkinase FAK (*engl. focal adhesion kinase*) und Src (*engl. cellular sarcoma kinase*) frei (Humphries *et al.*, 2007). Vinculin stabilisiert den Komplex und ermöglicht im aktivierten Zustand unter Zugspannung selbst die Bindung weiterer Aktinfilamente und ABPs, wodurch der Komplex zunehmend stabilisiert wird (Möhl *et al.*, 2009; Kirchenbüchler *et al.*, 2010). FAs erlauben somit nicht nur die zelluläre Haftung an einer EZM, sondern über mechanosensitive Proteine, Kinasen und nachgeschaltete Signalwege die Wahrnehmung und mechanisch-chemische Umwandlung externer Reize sowie über Aktomyosin auch die Ausübung von Kräften auf die Umwelt [siehe auch Kapitel 1.2.3].

1.3.2 Zell-Zell-Verbindungen

Für einen funktionellen, epithelialen Zellverband sind interzelluläre Verbindungen von essentieller Bedeutung. Diese können aufgrund ihrer Funktion in kommunizierende, haftende und verschließende Verbindungen unterschieden werden (Alberts, 2015).

Die ubiquitär in allen Wirbeltieren vorkommenden *Gap Junctions* (*engl.*) verbinden das Zytoplasma benachbarter Zellen und ermöglichen so einen direkten, regulierten Austausch von Signalmolekülen, Ionen und Sekundärmetaboliten. Hierzu bildet sich auf jeder Zellseite aus sechs Connexinen ein Connexon als Kanal in der Zellmembran aus und assoziiert mit einem Connexon

der benachbarten Zelle [Abbildung 5]. In der humanen Epidermis werden wenigstens neun der bekannten 21 Connexine abhängig von der Lage und dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten exprimiert und verbinden in unterschiedlicher Zusammensetzung und Durchlässigkeit das Zytoplasma des mehrschichtigen, multizellulären Gewebes (Mese *et al.*, 2007).

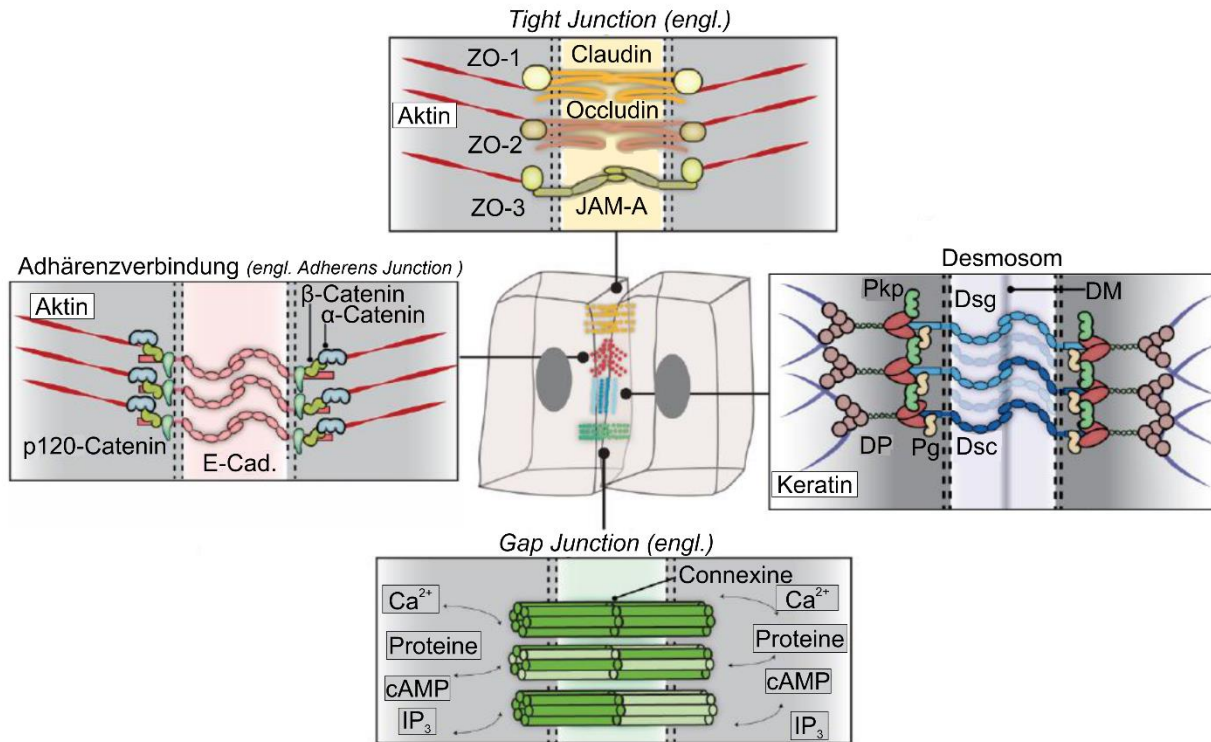


Abbildung 5: **Schematische Übersicht der Zell-Zell-Verbindungen in Epithelien.** Während *Gap Junctions* (engl.) den direkten Austausch löslicher Stoffe aus den Zytoplasmen benachbarter Zellen durch Bildung eines Kanals ermöglichen, verbinden Adhärenzverbindungen und Desmosomen die Aktin- und Keratinfilamente der Zellen über die Transmembranproteine E-Cadherin (Adhärenzverbindungen) bzw. Desmocollin (Dsc) und Desmoglein (Dsg). Auf zytoplasmatischer Seite erfolgt die Zytoskelettanbindung durch die Adapterproteine Plakophilin (Pkp), Plakoglobin (Pg), Desmoplakin (DP) sowie α -, β - und p120-Catenin. *Tight Junctions* (engl., TJ) bilden durch Occludin, Claudin und das assistierende JAM-A die apikale, parazelluläre Barriere und koppeln durch ZO-Proteine an das Aktin-Zytoskelett. Verändert nach Green *et al.* (2019).

Haftende Zellverbindungen sind anders als kommunizierende *Gap Junctions* mit dem Zytoskelett der Zellen verbunden. Die Adhärenzverbindungen (engl. *Adherens Junctions*, AJs) koppeln dabei das Aktin-Zytoskelett benachbarter Zellen miteinander, während Desmosomen die Keratin-Netzwerke miteinander verbinden. Beide Kontaktstrukturen weisen als transmembranes Element Proteine aus der Familie der Cadherine auf. Dabei handelt es sich um Adhäsionsproteine deren Konformationen und damit Bindungsaffinität sowie Anfälligkeit für proteolytische Degradation von der Assoziation mit Kalziumionen in den extrazellulären Domänen abhängig sind (Twiss und de Rooij, 2013; Su und Kowalczyk, 2017). Interessanterweise liegt in gesunder Epidermis ein Kalzium-Gradient mit der niedrigsten Konzentration im *stratum basale* und der

höchsten Konzentration im *stratum granulosum* vor und korreliert damit auch mit Dichte und Anzahl der Zellverbindungen (Baroni *et al.*, 2012). Kalzium ist hierbei nicht nur für die Aktivierung der Cadherine von Bedeutung, sondern ist ebenso ein wichtiger Co-Faktor für die Synthese kornealer Lipide und Proteine (Elsholz *et al.*, 2014).

AJs werden in der Epidermis durch epitheliales (E-)Cadherin sowie in der Basalzellschicht zusätzlich durch plazentales (P-)Cadherin aufgebaut, die als klassische Cadherine eine homophile Bindung mit angrenzenden E- und P-Cadherinen der Nachbarzelle eingehen (Twiss und de Rooij, 2013). Intrazellulär assoziieren die Proteine p120-Catenin an die Juxtamembrandomäne und β -Catenin an den C-Terminus der Cadherine [Abbildung 5]. Während p120-Catenin für die Regulation und Lebenszeit der Adhäsionsmoleküle eine entscheidende Rolle spielt, fungiert β -Catenin u.a. als Bindestelle für α -Catenin (Buckley *et al.*, 2014). Das Adapterprotein α -Catenin stellt wiederum eine Verbindung zum kortikalen F-Aktin her und weist zusätzlich Bindedomänen für Vinculin und α -Aktinin auf. Diese werden jedoch erst durch das Anlegen erhöhter Zugspannung und einer dadurch induzierten Konformationsänderung zugänglich (Steinbacher und Ebnet, 2018). Durch die Bindung weiterer Adapterproteine und Aktinfilamente sowie einer Erhöhung der Bindungsaffinität des α -Catenin zu F-Aktin wird der Komplex in der Folge unter extrinsischen oder intrinsischen Zugkräften stabilisiert (Pannekoek *et al.*, 2019). In vitaler Epidermis unterliegen die AJs und damit die Interaktion der angrenzenden Aktomyosin-Netzwerke dynamischen Auf-, Um- und Abbauprozessen (Takeichi, 2014). Die intra- und interzelluläre Spannung im kortikalen Aktomyosin nimmt in suprabasalen Schichten zu, sodass AJ-assoziiertes Vinculin insbesondere in Schichten des hochdifferenzierten *stratum granulosum* auftritt (Rübsam *et al.*, 2017). Darüber hinaus stellen AJs wichtige mechanosensitive Signalschnittstellen dar, die für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion, der epidermalen Homöostase und für Migrations- und Wundheilungsprozesse essentiell sind (Garcia *et al.*, 2018; Rübsam *et al.*, 2018).

Eine besondere Stellung im Hinblick auf die mechanische Integration und Stabilität epidermaler Gewebe nehmen Desmosomen ein. Bei diesen robusten Zell-Zell-Kontaktstrukturen erfolgt die Bindung im Interzellularspalt über die desmosomalen Cadherine Desmocollin und Desmoglein [Abbildung 5]. Diese transmembranen Adhäsionsproteine lagern sich sowohl hetero- als auch homophil zusammen und sind am intrazellulären C-Terminus mit den Adapterproteinen Plakoglobin, Plakophilin und Desmoplakin im desmosomalen Plaque organisiert (Simpson *et al.*, 2011; Hatzfeld *et al.*, 2017). Dabei stellt Desmoplakin die Verbindung zwischen den Keratinfilamenten und dem desmosomalen Plaque her. In stratifizierter Epidermis ändert sich

differenzierungs- und lageabhängig nicht nur das Expressionsmuster der Keratine [siehe auch Kapitel 1.2.2], sondern auch die Größe und Dichte der Desmosomen sowie die vorrangige Isoform desmosomaler Proteine. So werden Desmosomen basaler Keratinozyten aus Desmoglein 2 und Desmocollin 3 aufgebaut, während in höher differenzierten Schichten vermehrt Desmocollin 1 und Desmoglein 4 exprimiert werden [Abbildung 6]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Adhäsionsstärke der Desmosomen durch die Isoform-Kombination bestimmt wird, wobei die desmosomalen Cadherine der Basalzellschicht deutlich schwächere Bindungen als die Cadherine des höher differenzierten *stratum granulosum* ausbilden (Hatzfeld *et al.*, 2017).

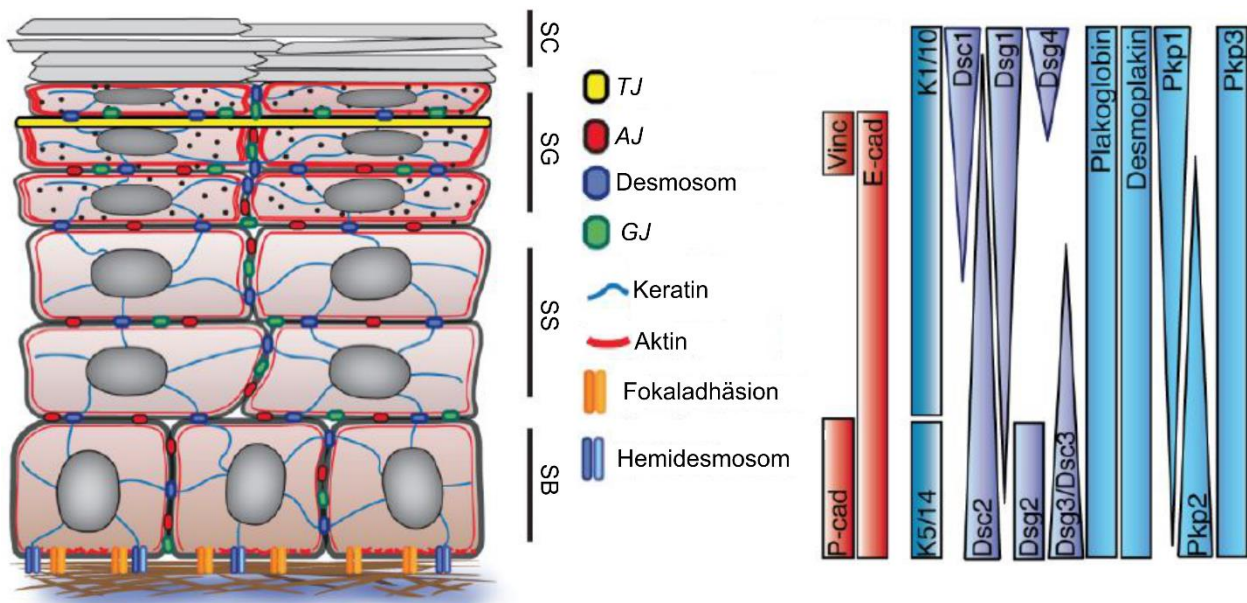


Abbildung 6: **Differenzierungs- und lageabhängige Expression in stratifizierter Epidermis.** Die schematische Darstellung zeigt die polare Expression einiger Proteine, die maßgeblich am Aufbau und für die Eigenschaften interzellulärer Verbindungen verantwortlich sind. Dabei unterscheidet sich die proliferierende Basalzellschicht (*lat. stratum basale*, SB) erheblich von höher differenzierten Schichten im *stratum spinosum* (*lat.*, SS) und *stratum granulosum* (*lat.*, SG). Neben der Expression bestimmter Keratin-Isoformen, ist die Positionierung der TJ-Barriere unterhalb des toten *stratum corneum* (*lat.*, SC) charakteristisch für die epidermale Gewebepolarität. Verändert nach Green *et al.* (2019).

Die Barrierefunktion der Epidermis ist neben der mechanischen Widerstandsfähigkeit die zentrale Aufgabe des Epithels und wird zusätzlich zur dichten Hornschicht durch die verschließenden Zellverbindungen, den *Tight Junctions* (*engl.*, TJs), ermöglicht (Baroni *et al.*, 2012). Bei diesen Kontaktverbindungen handelt es sich um gürtelförmigen Versiegelungen des Interzellularraums, wodurch eine Diffusionsbarriere des parazellulären Stofftransports aufgebaut wird (Brandner *et al.*, 2015).

TJs setzen sich aus den Transmembranproteinen Claudin und Occludin sowie Mitgliedern der JAM- (*engl. junctional adhesion molecule*) Familie zusammen [Abbildung 5]. Funktionelle TJs finden sich in gesunder Epidermis nur in der äußersten, vitalen Zellschicht unterhalb des verhornten *stratum corneum* [Abbildung 6]. Über die drei Isoformen der ZO-Proteine (*lat. Zonula Occludens*) sind TJs mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden (Brandner *et al.*, 2002). Für die Aufrechterhaltung der Zell- und Gewebepolarität sowie der Ausbildung der TJ-Barriere sind die Assoziation mit AJs und ein kontraktiles Aktomyosin nötig (Rübsam *et al.*, 2017).

1.4 Mechanosensorik der Epidermis

Die zelluläre Wahrnehmung mechanischer Reize (Mechanosensitivität) und anschließende Umwandlung in eine Vielzahl biologischer Folgeprozesse (Mechanotransduktion) sind aufgrund ihrer Bedeutung für physiologische und pathologische Vorgänge in den letzten Jahrzehnten zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Fragestellungen gerückt. Grundlage hierfür sind mechanosensitive Proteine, welche durch Konformationsänderung unter Zugspannung zusätzliche Bindedomänen, Proteasesequenzen oder Phosphorylierungsstellen frei geben oder deren Bindungsaffinität, Kinetik oder Öffnungswahrscheinlichkeit beeinflusst werden (Swaminathan und Gloerich, 2021). Häufig sind diese molekularen Mechanosensoren direkt oder indirekt mit dem Zytoskelett oder den Zellkontaktstrukturen assoziiert [siehe auch Kapitel 1.2 und 1.3]. Während Mikrotubuli und Aktin-Stressfasern unter höherer Zugspannung aufgelöst und in anderer Ausrichtung neu gebildet werden (Lee *et al.*, 2010; Abraham *et al.*, 2019), kann für bestimmte ABPs außerdem eine spannungsabhängige Affinitätsänderung beobachtet werden. So bindet NMM2 beispielsweise vermehrt an gedehntes F-Aktin und ermöglicht die Kreuzvernetzung und Stabilisierung von Aktinfilamenten und letztendlich den Aufbau eines kontraktilen Systems (Uyeda *et al.*, 2011).

Für Keratinozyten sowie einer Reihe weiterer Zelltypen stellt die Wahrnehmung der Substratelastizität und Topographie über Zell-Matrix-Adhäsionen und das angebundene Zytoskelett ein regulatorisches Element dar, das u.a. die Morphologie, Dichte, Proliferation, Migration und Zellkernorganisation beeinflusst (Helling *et al.*, 2019; Hunter-Featherstone *et al.*, 2021). So lässt sich bei zellulärer Adhäsion auf steiferen Substraten im Vergleich zur Adhäsion auf Oberflächen mit einer Steifigkeit von nur wenigen kPa eine vermehrte und verstärkte Ausbildung von Aktin-Stressfasern beobachten, die an mindestens einem Ende an eine FA gekoppelt sind (Prager-Khoutorsky *et al.*, 2011; Zarkoob *et al.*, 2015). Miroshnikova und Kolleg(en)*innen stellten außerdem fest, dass eine durch Proliferation veränderte Zelldichte basaler Keratinozyten *in-vitro* einen lokalen Abfall der kortikalen Spannung zur Folge hat und die Differenzierung und Delamination nahegelegener Zellen begünstigt, wodurch die basale Zelldichte wiederhergestellt wird (Miroshnikova *et al.*, 2018). Einen der zentralen Schalter im Rahmen der multifaktoriellen, epithelialen Kontaktüberwachung stellt hierzu der sogenannte Hippo-Signalweg dar. Dieser wird über vielfältige Schnittstellen, darunter auch Proteine der AJs und FAs, gesteuert (Schlegelmilch *et al.*, 2011; Zarkoob *et al.*, 2015). Über die Hippo-Kaskade werden letztendlich die nachgeschalteten Co-Transkriptionsfaktoren YAP und TAZ reguliert, welche bei geringer Hippo-Aktivität in den Zellkern relokalisieren und in Kombination mit

weiteren Faktoren die Transkription proliferationsfördernder Gene induzieren (Totaro *et al.*, 2018). Die Bedeutung dieses Signalwegs in der mechanosensitiven Regulation der Proliferations-Differenzierungs-Balance konnte auch anhand aufwändiger Analysen im Mausmodell verdeutlicht werden, bei denen den Tieren subkutane Expander eingesetzt und so equiaxiale Dehnungsreize appliziert wurden (Aragona *et al.*, 2020). Unter anhaltender Dehnung exprimierten basale Keratinozyten vermehrt Bestandteile der Zell-Zell-Kontakte und des Aktomyosin-Netzwerks und zeigten eine erhöhte Teilungsaktivität. Interessanterweise führte die Störung der Aktomyosin-Kontraktilität in gentechnisch-veränderten Mäusen zu einem Verlust der basalen Zellantwort auf den Dehnungsreiz einschließlich der Relokalisation von YAP/TAZ und letztendlich zum Auftreten von Barrieredefekten. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung konnte die Schlüsselrolle der über AJ-vermittelten, kortikalen Zugspannung suprabasaler Zellen der Epidermis für die Stratifizierung und Positionierung der TJ-Barriere gezeigt werden (Rübsam *et al.*, 2018). Seit langem ist außerdem bekannt, dass die Adhäsion an die Basalmembran den basalen Charakter der Keratinozyten erhält und Zellen ohne Integrinbindung in die epidermale Differenzierung übergehen (Adams und Watt, 1989).

Epidermales Gewebe ist in seiner Funktion als Kontaktfläche zur Umwelt häufig wiederkehrender Deformation in uniaxialer Richtung ausgesetzt. Derartige zyklische Dehnungen induzieren im *in-vitro*-Modell auf elastischen Substraten oberhalb eines Schwellwerts der Amplitude von etwa 3 % eine nahezu orthogonal zur Dehnungsrichtung liegende Orientierung der Zellkörper, deren Ausprägung sowohl vom Zelltyp als auch der Frequenz und maximalen Amplitude abhängig ist (Chien, 2007). Sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* konnte als eine weitere Form der Adaption bei Endothel- und Epithelzellen neben den Zellkörpern auch eine Ausrichtung der Zellkerne beobachtet werden (Sato und Ohashi, 2005; Nava *et al.*, 2020). Die prominenteste Antwort auf mechanische Belastung ist hingegen die Reorientierung der FA-assoziierten Stressfasern, die bereits für diverse Zellen beschrieben wurde (Hayakawa *et al.*, 2001; Faust *et al.*, 2011). Hierbei richten sich die Stressfasern unter zyklischer Dehnung in annähernd paralleler Anordnung weg von der Zugachse aus.

Anhand von mechanobiologischen Untersuchungen an einzelnen Endothelzellen konnte bereits gezeigt werden, dass alle Zytoskelettsysteme eine dehnungsinduzierte Umstrukturierung durchmachen. Die Faserbündel des Aktin-Zytoskeletts wiesen jedoch die früheste und deutlichste Reorientierung auf (Zielinski *et al.*, 2018). Mikrotubuli zeigten dagegen einen geringeren Grad der dehnungsinduzierten Ausrichtung, während Intermediärfilamente keine vergleichbare intrinsische Reorientierung aufwiesen (Springer *et al.*, 2019). Einige

Untersuchungen an Epithelzellen konnten aber zeigen, dass Zytokeratine unter anhaltender zyklischer Dehnung hoher Amplituden eine Bündelung und Verstärkung in peripheren Bereichen durchmachen (Russell *et al.*, 2004; Flitney *et al.*, 2009). Diese Anpassungsprozesse, insbesondere des F-Aktins, reduzieren höchstwahrscheinlich die mechanische Belastung der Zelle durch zyklische Substratdeformation und die resultierende Beeinträchtigung der molekularen Strukturen in Zugrichtung (Faust *et al.*, 2011; Livne *et al.*, 2014). Eine solche Adaption unter uniaxialer, zyklischer Dehnung stellt einen essentiellen Mechanismus zur Wahrung der Integrität und zum Überleben des Gewebes dar (DuFort *et al.*, 2011).

Aufgrund der Dichte an mechanosensorischen Proteinen und der direkten Verbindung zu kontraktilen Stressfasern standen die kraftübertragenden FAs im Fokus vieler wissenschaftlicher Arbeiten der letzten Jahre und lieferten erstaunliche Erkenntnisse zur Zell-Matrix-vermittelten Mechanotransduktion (Kirchenbüchler *et al.*, 2010; Niediek *et al.*, 2012; Zarkoob *et al.*, 2015). Im epithelialen Zellverband erfolgt die Mechanosensorik und Mechanotransduktion im besonderen Maße auch über interzelluläre AJs, die physikalisch mit dem aktiv kontraktilen Aktomyosin im Zellkortex gekoppelt sind (Yap *et al.*, 2018). Die apikale Extrusion einer apoptotischen Zelle aus einem einschichtigen Epithel vermittelt beispielhaft die mechanische Kommunikation über Cadherin-Komplexe. Dabei wird die kortikale Zugspannung durch intrinsische Regulation der Apoptose stark und konsekutiv erhöht und dadurch die Krafthomöostase ihrer direkten Nachbarn beeinflusst. Es kommt zur Rekrutierung von Vinculin in AJs, zur Elongation der Nachbarzellen und zur Aktivierung kraftinduzierender Signalkaskaden an den betreffenden Zellverbindungen (Lubkov und Bar-Sagi, 2014; Duszyc *et al.*, 2021). Auf diese Weise werden die kontinuierliche Integrität des Epithels gewahrt und gleichzeitig nachfolgende Signalkaskaden aktiviert, die durch nachrückende Zellen das Gleichgewicht wiederherstellen (Ohsawa *et al.*, 2018). Die mechanische Belastung wird dabei nicht nur in unmittelbarer Nähe zur Membran wahrgenommen und weitergeleitet, sondern über direkte Verbindungen des Zytoskeletts bis an den Zellkern herangetragen. Dieser ist über sogenannte LINC- (*engl. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*) Komplexe mit F-Aktin und Mikrotubuli verbunden (Miroshnikova und Wickstrom, 2022). Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen Integrin-vermittelter Spannung an den LINC-Komplex und der epidermalen Differenzierung (Carley *et al.*, 2021). Nava und Kolleg(en)*innen konnten außerdem zeigen, dass eine Substratdeformation zur Deformation des Zellkerns führte und eine Änderung der Chromatin-Zusammensetzung und rheologischen Eigenschaften zur Folge hat. Durch nachfolgende Ausrichtung des Kerns in orthogonaler Richtung wird die

wirkende Kraft auf dieses wichtige Organell und die enthaltene genetische Information minimiert und der ursprüngliche Chromatin-Status wiederhergestellt (Nava *et al.*, 2020).

An einlagigen Zellschichten muriner Keratinozyten (im Folgenden auch Monolagen genannt) wurde außerdem die herausragende Bedeutung interzellulärer Verbindungen auf das Reorientierungsverhalten als Adaption auf zyklische Dehnung gezeigt (Noethel *et al.*, 2018).

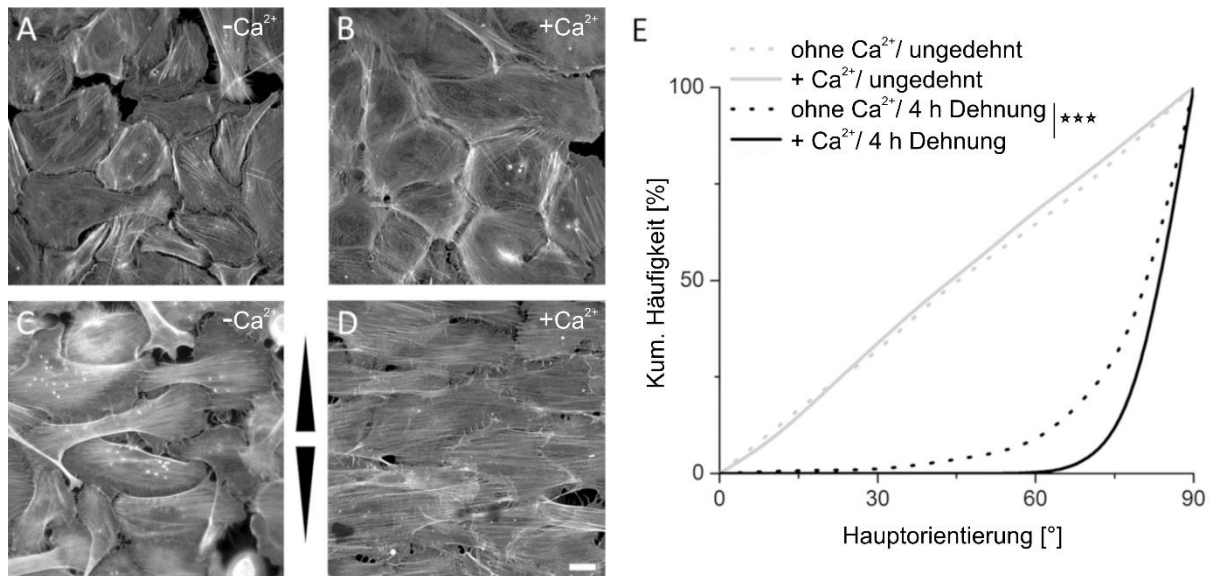


Abbildung 7: Kalzium-induzierte Bildung interzellulärer Kontakte beeinflusst die Aktin-Ausrichtung. Keratinozyten in kalzium-freier Umgebung orientieren unter zyklischer Dehnung nach 4 h die Aktin-Stressfasern waagrecht zur Dehnungsachse (Pfeilrichtung) [A, C]. Dieser Reorientierungsprozess erfolgt einheitlicher und mit höherer Effizienz nach der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten [B, D]. Anhand der Bestimmung des Hauptorientierungswinkels wird dieser kooperative Effekt, der durch die mechanische Kopplung der Zytoskelette benachbarter Zellen ermöglicht wird, quantifizierbar [E]. Ein Winkel von 0° entspricht hierbei der uniaxialen Dehnungsrichtung. Verändert nach Noethel *et al.* (2018).

Die Kalzium-induzierte Verbindung zytoskelettaler Netzwerke über Zell-Zell-Kontakte ermöglichte eine signifikant beschleunigte und verstärkte Umlagerung der Aktin-Stressfasern in nahezu 90° Orientierung zur Zugrichtung [Abbildung 7]. Für diese kooperative Organisation der Keratinozyten in einer Monolage spielt das AJ-Protein α -Catenin als Mechanosensor mit Anbindung an das Aktomyosin eine zentrale Rolle. Anhand von Dehnungsversuchen mit Keratinozyten, die funktionsbeeinträchtigende Mutationen für Proteine der Zell-Matrix- oder Zell-Zell-Verbindungen aufweisen, konnte gezeigt werden, dass FAs als mechanosensitives Element nach der Ausbildung von AJs für das Aktin-Reorientierungsverhalten nahezu entbehrlich sind (Noethel *et al.*, 2018). Dies deutet darauf hin, dass FAs für eine mechanosensitive Adaption mehrzelliger, gesunder Epithelien *in-vivo* eine untergeordnete Rolle einnehmen könnten.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Unsere Haut ist über die gesamte Lebenszeit unterschiedlichsten mechanischen Reizen ausgesetzt. Zur Aufrechterhaltung der essentiellen Barrierefunktion müssen epitheliale Zellen daher eine ständige Anpassung an die mechanische Belastung vornehmen. Obwohl Fokaladhäsionen als mechanosensitive Komplexe bekannt sind, konnten Untersuchungen an epithelialen Monolagen unter zyklischer Dehnung bereits beeindruckende Erkenntnisse zur mechanosensitiven Adaption im Zellverband und Bedeutung der interzellulär-kooperativen Effekte liefern (Noethel *et al.*, 2018). Die Epidermis stellt als äußerste Hautschicht tatsächlich auch ein mehrschichtiges, stratifiziertes Epithel dar, welches nur in der Basalzellschicht Zell-Matrix-Adhäsionen aufweist. Über mögliche dehnungsinduzierte Anpassungen suprabasaler Zellen, die ausschließlich über Zell-Zell-Verbindungen im dreidimensionalen Kontakt zu Nachbarzellen stehen (Simpson *et al.*, 2011), ist bisher hingegen wenig bekannt.

Etablierte Modelle zur vollständigen *in-vitro* Rekonstruktion der mehrschichtigen Epidermis sind aufgrund einer erforderlichen Kultivierung humaner Keratinozyten auf steifen und porösen Kunststoffeinsätzen an der Luft-Medien-Grenze nur eingeschränkt zur Anwendung in mechanobiologischen Analysen unter zyklischer Dehnung geeignet (Poumay *et al.*, 2004; Frankart *et al.*, 2012; Rikken *et al.*, 2020). Im Rahmen dieser Arbeit wird deshalb zunächst die zellbiologische Generierung eines mehrlagigen Modells aus Keratinozyten auf elastischen Substraten verfolgt. Apparative und methodische Grundlage hierzu bilden etablierte Systeme zur *in-vitro* Dehnungsanalyse (Faust *et al.*, 2011; Püllen *et al.*, 2022). Die anschließende Charakterisierung eines solchen Modellsystems soll die Möglichkeiten und Grenzen aufzeigen sowie die Vergleichbarkeit mit nativem Gewebe thematisieren. Zentral für das reproduzierbare Modell sind das Anlegen einer definierten Dehnung und eine mikroskopische Auswertung suprabasaler Keratinozyten im Vergleich zu Zellen mit Substratkontakt sowie entsprechender Monolagen.

Die Umstrukturierung und Reorientierung der Aktin-Stressfasern stellt in Einzelzellen und Monolagen eine frühe und deutliche Antwort auf zyklische, uniaxiale Dehnung dar (Noethel *et al.*, 2018). Darüber hinaus hat die interzellulär-vermittelte, kortikale Spannung in den suprabasalen Schichten der Epidermis einen bedeutenden Einfluss auf die Ausbildung der Gewebepolarität und den Aufbau der Barriere durch verschließende Zellkontakte (Rübsam *et al.*, 2017). Aus diesen Gründen wird die Struktur des Aktin-Zytoskeletts im Fokus dieser Arbeit stehen. Daneben zeigte sich in epidermalen Monolagen auch die dehnungsinduzierte

Ausrichtung der Zellkerne als mechanosensitiver Schutzmechanismus (Nava *et al.*, 2020) und soll als weiteres Merkmal einer biologischen Antwort auf die mechanische Belastung im mehrlagigen System analysiert werden.

Frühere Arbeiten weisen neben Aktin auch auf eine Beteiligung der Mikrotubuli und Intermediärfilamente an Reorientierungsprozessen hin (Morioka *et al.*, 2011; Zielinski *et al.*, 2018), weshalb deren Einfluss anhand von Keratin-Deletionsmutanten und dem Mikrotubuli-Inhibitor Nocodazol beurteilt werden soll. Die Aktin-Polymerisation wird außerdem durch Zugabe von Cytochalasin D, einem am (+)-Ende des Filaments bindenden Toxin, gestört. Aus der strukturierten Untersuchung des basalen F-Aktins, das in Kontakt zu Zell-Matrix-Adhäsionen steht, und des apikal gelegenen F-Aktins, welches primär im submembranen Kortex mit Anbindung an Zell-Zell-Verbindungen vorliegt, sollen so Rückschlüsse auf die mechanosensitiven Antworten dieser Strukturen in mehrschichtigen Epithelien gezogen werden. Von besonderem Interesse ist diese Betrachtung auch, da das Aktin-Zytoskelett zwar je nach Anbindung an Kontaktstrukturen und wahrgenommenen Reizen in Stressfasern und als kontraktiles Netzwerk im Kortex aufgebaut ist, diese Organisationsstrukturen allerdings in direkter mechanischer Interaktion stehen und sich wahrscheinlich gegenseitig dynamisch beeinflussen. Dabei ist die Fragestellung zur zellulären und molekularen Antwort auf mechanische Reize bei Zellen im Gewebeverbund ohne Substratkontakt in der wissenschaftlichen Literatur bisher weitgehend unbeantwortet. Dem Motorprotein Myosin kommt aufgrund der gesammelten Erkenntnisse zum Aktomyosin und der interzellulären Zugspannung in Epithelien vermutlich eine Schlüsselrolle sowohl als Mechanosensor und Kreuzvernetzer für Aktinfilamente als auch kraftausübendes und damit stabilisierendes Element zu. Aus diesem Grund sollen auch Inhibitoren der Aktomyosin-Regulation in Dehnungsanalysen eingesetzt und auf ihren Einfluss auf die Organisationsstruktur des F-Aktins analysiert werden.

Diese Arbeit soll damit erstmals direkte Daten zu dehnungsinduzierten Veränderungen der zellulären und molekularen Organisation suprabasaler Zellen in Abgrenzung zu Zellen der epidermalen Basalzellschicht liefern. Die Epidermis ist dabei aufgrund ihres stratifizierten, multizellulären Aufbaus und ihrer physiologischen Rolle als physikalische Grenzschicht zur Umwelt das ideale Modellgewebe. Durch die gewonnenen Erkenntnisse wird ein weiterer Schritt in Richtung eines besseren Verständnisses der Bedeutung integrierter und über Zellverbindungen gekoppelter Zytoskelettsysteme, insbesondere des kontraktiven, kortikalen Aktins, für die mechanosensitive Adaption unternommen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 1: Auflistung verwendeter Geräte und Werkzeuge

Gerät	Hersteller/Vertrieb
Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Arium Pro Reinstwassersystem	Sartorius, Göttingen
Autoklav DX-150	Systec, Linden
AxioCam 503 mono Kamera	Carl Zeiss, Jena
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Axio Imager.M2n Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Axio Vert.A1 Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Colibri 7 LED-Lichtquelle FR-R[G/Y]BV-UV	Carl Zeiss, Jena
Cryo 1 °C Freezing Container (Mr. Frosty)	Thermo Scientific, Braunschweig
Dehnungsapparatur für Silikonkammern	Institutsinterne Entwicklung und Konstruktion
Gewebedehnapparatur	Institutsinterne Entwicklung und Konstruktion
Gussformen für Silikonkammern	Institutsinterne Entwicklung und Konstruktion
Halter für Silikonkammern	Institutsinterne Entwicklung und Konstruktion
Heracell Vios 160i Brutschrank	Thermo Fisher, Waltham, MA USA
Inkubationssystem XL für Mikroskope	Carl Zeiss, Jena
JB1603-C/FACT Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen
Kreislaufthermostat RMS6	Lauda, Lauda-Königshofen
Laborflaschen (div. Größen), DURAN®	Schott AG, Mainz
LSM 880 + Airyscan	Carl Zeiss, Jena
Makro-Objektiv EF-S 60 mm	Canon, Tokio, Japan
MilliQ Gradient A10	Merck, Darmstadt
NewClassic MS Waage	Mettler Toledo, Gießen

2.2. Objektive

pH-Meter FiveEasy Plus	Mettler Toledo, Gießen
Präzisionspinzette DUMONT® Inox08, 5/45	Carl Roth, Karlsruhe
Quecksilberdampfampe HXP120	Carl Zeiss, Jena
Rotationsbeschichter Delta 10 TT	Süss MicroTec Lithography GmbH, Garching
Research Plus Pipetten (10 bis 1000 µl Volumen)	Eppendorf, Wesseling
Schüttler Rocker 2D	IKA, Bremen
Sigma 3-16L Zentrifuge	Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Stemi 508	Carl Zeiss, Jena
Sterilwerkbank Herasafe KS 12	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Spiegelreflex-Kamera EOS 600D	Canon, Tokio, Japan
Transferpettor 5 ml	Brand, Wertheim
Vacunsafe Absaugsystem	Integra, Biebertal
Vakuum Exsikkator	Duran, Wertheim
Vibratom VT1000 S	Leica Microsystems, Wetzlar
Vortex REAX top	Heidolph, Schwabach
Wärmeschrank 60 °C	Memmert, Schwabach
Wasserbad WNB 10	Memmert, Schwabach
Zellzähler Moxi™ Z	Orflo, Ketchum, ID, USA
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling

2.2 Objektive

Tabelle 2: Auflistung verwendeter Objektive zur Mikroskopie

Objektiv	Hersteller
EC Plan-Neofluar 40x/1,3 Öl Ph3	Carl Zeiss, Jena
LD A-Plan 10x/0,25 Ph1	Carl Zeiss, Jena
Plan-Apochromat 63x/1,4 Öl	Carl Zeiss, Jena
W Plan-Apochromat 40x/1,0 DIC	Carl Zeiss, Jena

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Übersicht verwendeter Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Acrodisc Syringe 25 mm/0,1 µm Filter	Pall Corporation, Dreieich
Deckgläser #0, Ø 15 mm	VWR, Darmstadt
Deckgläser #1, Ø 25 mm	Menzel, Braunschweig
Einbettformen (10 x 10 x 5 mm)	Sakura Finetek Europe, Umkirch
Immersol 518 F und W Immersionsöl	Carl Zeiss, Jena
Kimtech Science Präzisionstücher	Kimberly-Clark Professional, Koblenz
Kryoröhrchen	VWR, Darmstadt
Latexhandschuhe Gentle Skin	Meditrade, Kiefersfelden
Lochschale Ø 35 mm mit Ø 18 mm Loch	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Moxi™ Z Kassetten Typ S	Orflo, Ketchum, ID, USA
Objektträger geschnitten (76 x 26 x 1 mm)	VWR, Darmstadt
Petrischalen	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Star Lab, Hamburg
PVDF Transfermembran	Carl Roth, Karlsruhe
Rasierklingen Feather FA-10	Micro to Nano, Haarlem, Niederlande
Reaktionsgefäße (0,2, 0,5, 1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Wesseling
Reinraumhandschuhe Kimtech G3 NxT	Kimberly-Clark, Irving, TX, USA
Rührspatel (Einweg, Kunststoff)	Brand, Wertheim
Spitzen Transferpettor (1-5 ml)	Brand, Wertheim
Spritzen (5 und 50 ml, Luer-Lock)	Terumo, Tokio, Japan
Stripetten (5 ml, 10 ml, 50 ml)	VWR, Darmstadt
Zellkulturflaschen (plasmabehandelt) mit Schräghals und Filterdeckel (25 cm ² und 75 cm ²)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

2.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verzeichnis verwendeter Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
(D)-Glukose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-aminopropyltriethoxysilane (APTES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Adeninsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chelex® 100	VWR, Darmstadt
Choleratoxin from <i>Vibrio Cholerae</i>	Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA
Cytochalasin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol (vergällt 70% und absolut)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fibronektin, human	Corning, Corning, NY, USA
Fluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FluoSpheres® carboxylierte Partikel 0,2 µm (580/605) und (660/680)	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Formaldehyd ≥ 37 % in Lösung	Merck, Darmstadt
Fötales Rinderserum (FBS)	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HBSS (<i>engl. Hank's Balanced Salt Solution</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Insulin, human	Cellsystems, Troisdorf
Isopropanol (2-Propanol)	VWR, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
ML-7 hydrochlorid	TOCRIS, Bristol, UK

2.4. Chemikalien und Reagenzien

N-Hydroxysulfosuccinimid Natriumsalz (NHS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-L-Ascorbat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nocodazol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
para-Aminoblebbistatin	Motorpharma, Budapest, Ungarn
Penicillin-(10000 U/ml) Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ProLong™ Glass Eindeckmittel	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Salzsäure (HCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SMIFH2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SORTA-Clear™ 12	Smooth-On, Macungie, PA, USA
Streptomycin Sulfatsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sylgard™ 184 Kit	Dow Corning, Wiesbaden
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin-EDTA 0,05% in Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.5 Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen

Medien/Puffer/Lösungen	Komponenten
Blockierungspuffer Immunfluoreszenz	5 % Milchpulver in CB
EDC-Lösung	200 mg/ml EDC in Kopplungspuffer
Fixierungsreagenz	3,7% Formaldehyd in CB
Gewebemedium	DMEM/F-12 1:1 (2,5 mM L_Glutamin, 15 mM HEPES) 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
Glycin-Lösung	100 mM Glycin in CB
HaCaT-Medium	DMEM (4 mM GlutaMAX™, 25 mM Glukose) 10 % FBS 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin
Kalzium-Lösung	1 M CaCl ₂ in H ₂ O
Keratinocyten-Medium, murin	DMEM/F12 3,5:1,1 ($\leq 0,05$ mM Ca ²⁺)
Das Medium zur Kultivierung muriner Keratinocyten wurde freundlicherweise von Dr. M. Rübsam (AG Niessen, Abteilung für Dermatologie, CECAD, Universität zu Köln) zur Verfügung gestellt. Zur Reduzierung der Kalziumionen im fötalen Kälberserum wurden dabei je 50 ml Serum mit 8g Chelex 100 versetzt und für mindestens 16 Stunden auf einem Drehrad inkubiert. Nach einer Wiederholung dieses Vorgangs wurde das Serum steril filtriert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.	0,18 mM Adeninsulfat 1 nM Cholera toxin 5 mM EGF 0,5 µg/ml Hydrocortison 5 µg/ml Insulin 2 mM L-Glutamin 0,2 mM Natrium-L-Ascorbat 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin 10 % FBS (Chelex-behandelt)
Komplexierungspuffer	5 mM EGTA in PBS
Kopplungspuffer	50 mM MES (pH 6 mit NaOH) in ddH ₂ O
NHS-Lösung	200 mg/ml NHS in Kopplungspuffer
Permeabilisierungspuffer (1)	1 % Triton™ X-100 in CB

2.6. Antikörper, fluoreszierende Farbstoffe und Konjugate

Permeabilisierungspuffer (2)	0,2 % Triton™ X-100 + 0,2 % Tween® 20 in CB
phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (pH 7,4)	15,5 mM NaCl 0,105 mM KH ₂ PO ₄ 0,297 mM Na ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O in H ₂ O
Puffer zur Immunfluoreszenz	1 % Milchpulver 0,05 % Triton™ X-100 0,05 % Tween® 20 in CB-Puffer
Silanlösung	5 % APTES in Silanpuffer Inkubation für etwa 90 min bei RT
Silanpuffer	5 % in Ethanol (pH 4,5-5,5 mit Essigsäure)
Zytoskelett-Puffer (CB-Puffer), pH 6,1	150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 5 mM Glukose 10 mM MES 1 g/l Streptomycin in H ₂ O

2.6 Antikörper, fluoreszierende Farbstoffe und Konjugate

Tabelle 6: Aufstellung eingesetzter Primärantikörper

Epitop (Klon)	Spender	Hersteller/Vertrieb	Verdünnung
Desmoplakin 1	Meerschwein	Progen Biotechnik, Heidelberg	1:200
Keratin 14 (LL002)	Maus	Abcam, Cambridge, UK	1:100
Myosin 2A	Kaninchen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:200
Paxillin (5H11)	Maus	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA	1:300
Tubulin (YL 1/2)	Ratte	Merck, Darmstadt	1:200
ZO-1	Kaninchen	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA	1:100

2.7. Programme

Tabelle 7: Übersicht eingesetzter Sekundärantikörper

Reaktive Spezies	Spender	Konjugat	Hersteller/Vertrieb
Kaninchen	Huhn	Alexa Fluor™ 488	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor™ 488	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor™ 633	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Kaninchen	Ziege	Atto 655	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Maus	Esel	Alexa Fluor™ 488	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Maus	Ziege	Alexa Fluor™ 633	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA
Meerschwein	Esel	Alexa Fluor™ 488	Jackson Immuno, Cambridge, UK
Ratte	Ziege	Alexa Fluor™ 488	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA

Tabelle 8: Bezeichnung der Fluoreszenzfarbstoffe und Peptidkonjugate

Bezeichnung	Zielstruktur	Hersteller/Vertrieb
Alexa Fluor™ 405 Phalloidin	Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Alexa Fluor™ 633 Phalloidin	Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NucBlue™ (DAPI)	Zellkern (DNA)	Thermo Fisher, Waltham, MA, USA

2.7 Programme

Tabelle 9: Genutzte kommerziell erhältliche oder frei zugängliche Programme

Programme	Entwickler
Graphpad Prism Version 9	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Corel Draw Version 2019 (21)	Corel, München
Fiji ImageJ Version 1.53c	Offener Quellcode (publiziert in Schindelin <i>et al.</i> , 2012)
MatLab 9.0	MathWorks, Natick, MA, USA
Python	Python Software Foundation, Wilmington, NC, USA
ZEN blue 2.3	Carl Zeiss, Jena
ZEN black 8.0	Carl Zeiss, Jena

2.8 Präparation elastischer Zellkultursubstrate

Alle eingesetzten Elastomere stammen aus der Klasse der Silikone und werden aus Polydimethylsiloxan (PDMS) hergestellt. Durch katalysierte Quervernetzung der linearen Polymere wird hierbei ein inerte, biokompatibler und transluzenter Silikonkautschuk erzielt. Die generierten Elastomere weisen zudem über einen großen Dehnungsbereich linear-elastische Eigenschaften auf.

2.8.1 Herstellung der Elastomeroberflächen zur Zellkraftanalyse

Die Herstellung der Substrate zur Zugkraftmikroskopie erfolgte auf Basis des Elastomer-Kits Sylgard™ 184. Durch ein definiertes Mischungsverhältnis des Zweikomponentensystems bestehend aus Silikonöl und Quervernetzer können die mechanischen Eigenschaften des vernetzten Elastomers bestimmt werden. Das Elastizitätsmodul unterschiedlicher Mischungsverhältnisse wurde hierbei vor jedem Einsatz einer Charge durch sukzessive Indentationsprüfung bestimmt (beschrieben in Ulbricht *et al.*, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Zugkraftmikroskopie auf Oberflächen mit einer Steifigkeit von etwa 8 kPa. Hierzu wurden zu 54 Masseanteilen Basisöl je ein Masseanteil Vernetzer eingewogen und über mehreren Minuten durch händisches Rühren eine gute Durchmischung erreicht. Danach wurden eingeschlossene Luftblasen durch Unterdruck in einem Exsikkator entfernt. Das präparierte Gemisch wurde anschließend auf Deckgläser der Stärke #0 (etwa 100 µm) durch Rotationsbeschichtung (1800 rpm für 15 s bei voller Beschleunigung/Verzögerung) aufgetragen und so eine etwa 70-80 µm dicke Elastomerschicht erzielt. Nach Unterkleben der beschichteten Deckgläser in Lochschalen zur Zellkultivierung erfolgte die Aushärtung auf einem ebenen Untergrund über 16 h bei 60 °C.

2.8.2 Herstellung elastische Silikonsubstrate zur Dehnungsanalyse

Alle durchgeführten Dehnungsversuche wurden auf elastischen Silikonsubstraten definierter Geometrie (im Folgenden als Kammern bezeichnet) durchgeführt. Die Herstellung und Charakterisierung dieser Kammern wurde bereits im Detail beschrieben (Faust *et al.*, 2011; Püllen *et al.*, 2022) und wird an dieser Stelle deshalb nur in Kürze aufgeführt. Das flüssige Zweikomponentensystem SORTA-Clear™ 12 wurde im Mischungsverhältnis 1:1 (m/m) homogen durchmischt und zunächst für 5 min in Unterdruck vorentgast. Anschließend wurde das Gemisch in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 1 min bei 300 × g zentrifugiert, um die übrigen, eingeschlossenen Luftblasen zu entfernen. Die Abformung der Substrate erfolgte

durch Gussformen, die als Negativ die exakte Geometrie der späteren Kammern vorgaben. Dazu wurden eine Abformplatte und eine Umrandung aus Polystyrol mit einer Bodenplatte aus eloxiertem Aluminium verschraubt [Abbildung 8]. Die Abformplatte wies ein Plateau mit polierter, 20 x 20 mm großer Oberfläche auf, die die spätere Zelladhäsionsfläche abbildete. Durch Zugabe von 3,8 ml des viskosen PDMS-Gemischs mit Hilfe einer Direktverdrängerpipette wurden so Kammern mit einer Bodendicke von etwa 500 μm generiert. Ein umlaufender Rand von etwa 5 x 5 mm stabilisierte die Kammer und sicherte ein verlässliches, reproduzierbares, homogenes und uniaxiales Deformationsfeld bei späteren Dehnungsversuchen. Durch eingelassene Acrylglasstifte in der Abformplatte wurden außerdem Befestigungslöcher der später verwendeten Halter im Rand der Silikonkammern ausgespart. Die Platin-katalysierte Quervernetzung des PDMS-Gemischs erfolgte anschließend über Nacht bei Raumtemperatur auf einer ebenen Fläche. Die Gussformen wurden zum Ausbau der ausgehärteten Kammern auseinander gebaut und zur erleichterten Abtrennung aus der Form mit Isopropanol benetzt. Die hergestellten Kammern wiesen eine Steifigkeit von etwa 370 kPa auf.

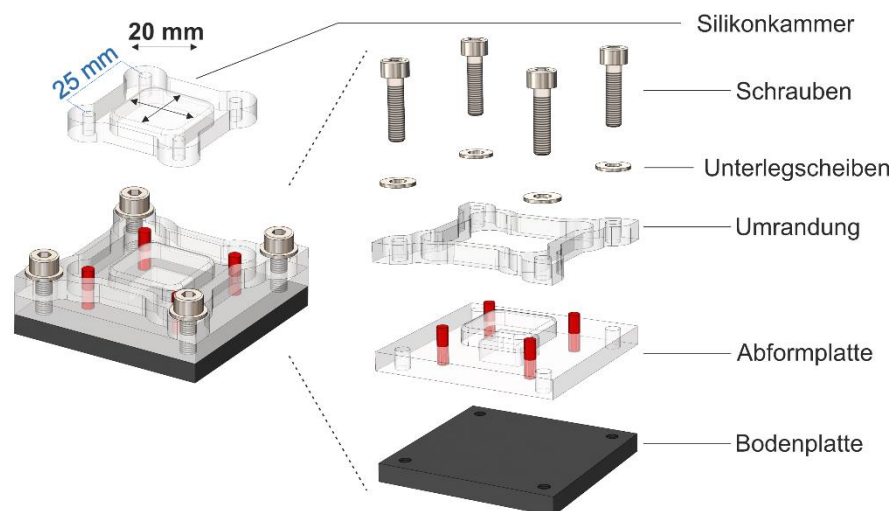


Abbildung 8: **Gussform zur Produktion elastischer Silikonkammern.** Die Substrate zur zellbiologischen Dehnungsanalyse (Silikonkammern) wurden durch Negativabformung eines kreuzvernetzenden PDMS-Gemischs hergestellt. Der dreiteilige Aufbau sichert eine vereinfachte (De-)Montage und ermöglicht die Herstellung der Silikonkammern mit reproduzierbarer Geometrie und definierten mechanischen Eigenschaften. Die ausgehärteten Kammern weisen einen inneren Bereich zur Zelladhäsion von 20 x 20 mm sowie einen umlaufenden Rand von 5 mm auf.

2.8.3 Kovalente Bindung carboxylierter und fluoreszierender Partikel

Zur Ermittlung des Deformationsfeldes und zur Zugkraftmikroskopie wurden sowohl 8 kPa Elastomeroberflächen als auch Silikonkammern mit fluoreszierenden Partikeln hergestellt. Im Anschluss an die Kreuzvernetzung des Silikonkautschuks erfolgte die kovalente Kopplung

dieser carboxylierten Partikel an die PDMS-Oberfläche (beschrieben in Ahrens *et al.*, 2019). Hierzu wurde die Oberfläche zunächst mit frisch präparierter Silanlösung (400 µl je Lochschale, 600 µl je Kammer) für 3 min silanisiert, mit Ethanol absolut gewaschen und mindestens 30 min bei RT unter Vakuum zur Vermeidung reaktiver Luftfeuchtigkeit getrocknet. In der Zwischenzeit wurden EDC und NHS in Kopplungspuffer angesetzt und zur Partikellösung (fluoreszierende, carboxylierte Partikel in Kopplungspuffer und 0,1% SDS) gegeben. Die auf diese Weise über 15 min aktivierten Partikel wurden anschließend direkt nach Belüftung der Oberflächen aufgegeben (200 µl je Lochschale und 400 µl je Kammer) und nach 30 s mehrfach mit dH₂O gewaschen. Bis zum Einsatz in zellbiologischen Versuchen erfolgte eine Lagerung in PBS bei 4 °C.

2.8.4 Einbau und Präparation der Silikonkammern

Zur Stabilisierung und Positionsfixierung der elastischen Silikonkammern wurden Halter konstruiert, die eine räumliche und zeitliche Trennung der zellbiologischen und immunzytochemischen Arbeitsschritte vom eigentlichen Dehnungsversuch in der uniaxialen Zugapparatur erlauben [Abbildung 9]. Die Kammerhalterteile bestehend aus Sockel, Klemmplatten und Fixierungsrahmen wurden hierzu zunächst mit 70 % Ethanol unter einer biologischen Sicherheitswerkbank gereinigt und die Silikonkammer zur Desinfektion kurz in Isopropanol geschwenkt. Anschließend wurde die Kammer unter Verwendung der Aussparungen im Rand von unten auf die Stifte der Sockel aufgeschoben und mit zwei Klemmplatten befestigt. Die Klemmplatten weisen nach Festschrauben einen definierten Abstand von 4,5 mm zum Sockel auf. Der resultierende Anpressdruck auf den ca. 5 mm starken Kammerrand verhinderte bei späteren Dehnungsexperimenten ein Herausgleiten der Kammer und stellte ein homogenes Deformationsfeld sicher. Der obere starre Fixierungsrahmen verbindet die beiden Sockel und ermöglicht durch Festdrehen der Schrauben eine Arretierung der Position. Auf diese Weise wurden die Silikonkammern zunächst entsprechend ihrer vorgegebenen Geometrie [Abbildung 8] auf eine Distanz der Sockelstifte von 25 mm eingebaut. Um ein Durchhängen des Kammerbodens durch den erhöhten Anpressdruck und das aufliegende Zellkulturmedium zu vermeiden, wurden die Kammern unter Verwendung der Zugapparatur [siehe Kapitel 2.11.2] anschließend auf 28 mm (+ 3 mm) Distanz gedehnt und in dieser Position (nachfolgend definiert als Ausgangsposition) durch die Rahmen fixiert. Vor einer weiteren Verwendung wurden die eingebauten Kammern über Nacht bei 37 °C im Inkubator gelagert, um das Abdampfen eventueller Lösemittelrückstände zu gewährleisten.

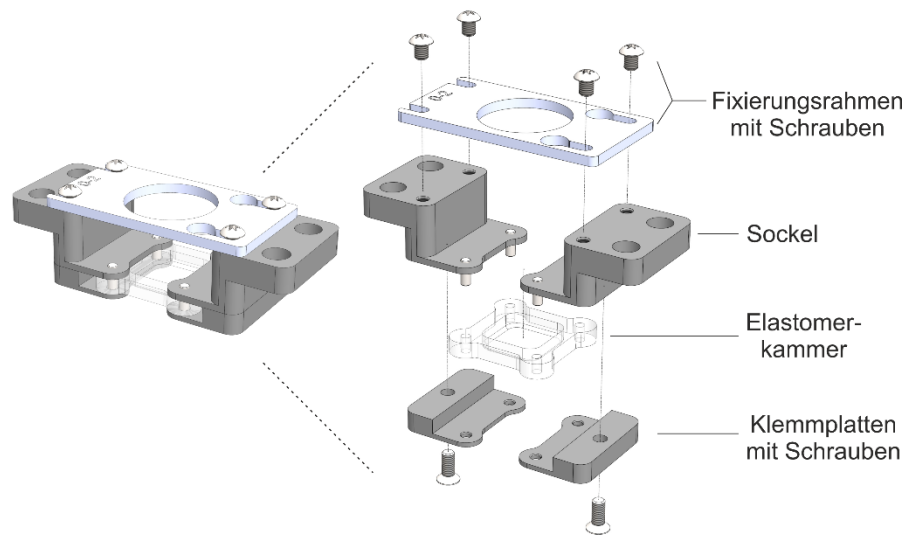


Abbildung 9: **Aufbau der Halter zur Stabilisierung elastischer Silikonkammern.** Die Elastomerkammern werden auf gegenüberliegenden Seiten jeweils zwischen eine Klemmplatte definierter Höhe und einem stabilen Sockel befestigt. Die Sockel ermöglichen die physische Verbindung der Kammer mit der Dehnungsapparatur. Zusätzlich erlaubt der Fixierungsrahmen auf der Oberseite die Arretierung der Sockel mit eingebauter Kammer und dadurch das Ausführen zellbiologischer Arbeiten außerhalb der Dehnungsapparatur

PDMS-Silikonoberflächen zeigen grundsätzlich hydrophobe Eigenschaften und sind unbehandelt zur Kultivierung adhärenter Zellen nur eingeschränkt geeignet. Die zelluläre Adhäsion wurde durch eine nicht-kovalente Beschichtung (Physisorption) mit humanem Fibronectin ermöglicht. Diese Beschichtung hatte auch eine Hydrophilisierung des Silikons zur Folge. Hierzu wurden die Kammeroberflächen vor der Aussaat von Zellen mit 600 μl Fibronectin (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in PBS bedeckt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Fibronectin ist ein verbreitetes EZM-Protein, dass die Adhäsion der Zellen durch Ligandenbindung und Ausbildung von Zell-Matrix-Adhäsionen bewirkt. Nach Abnehmen der Lösung konnten nachfolgend Zellen auf die Oberflächen ausgebracht werden. Dabei war ein Trockenfallen der Substrate zu vermeiden.

2.9 Zellkulturtechniken

Die nachfolgend beschriebenen zellbiologischen Arbeiten wurden zur Vermeidung von biologischen Kontaminationen unter einer biologischen Sicherheitswerkbank mit gefilterter Luftzufuhr durchgeführt. Zusätzlich wurden die Arbeiten zur Erhaltung der sterilen Bedingungen mit Einmalhandschuhen durchgeführt und alle Materialien vor Beginn äußerlich mit 70% Ethanol in Wasser desinfiziert. Die verwendeten Zellen wurden außerdem regelmäßig auf eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen getestet. Alle Lösungen, die in Kontakt mit lebenden Zellen kamen, wurden sofern nicht anders angegeben zuvor im Wasserbad auf 37 °C temperiert.

Die verwendeten primären Keratinozyten wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Niessen (Zellbiologie der Haut und Exzellenzcluster CECAD, Universität zu Köln) aus den Epidermen postnataler Mäuse nach bereits beschriebenem Vorgehen isoliert (Rübsam *et al.*, 2017) und freundlicherweise für die Arbeiten im Rahmen dieses Projekts zur Verfügung gestellt. Die Keratinozyten ohne funktionale Typ I Keratine (KtyI^{-/-}) wurden in der Abteilung für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Leipzig durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Magin durch das Cre/loxP-System in Mäusen generiert und die isolierten Keratinozyten ebenfalls freundlicherweise zur Verfügung gestellt. In einigen Vorexperimenten fand außerdem die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (*engl. Human adult low Calcium high Temperature*) Anwendung. Diese wurde dankenswerterweise durch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Leube (Molekulare und zelluläre Anatomie, RWTH Aachen) bereitgestellt und mit einer abweichenden Zusammensetzung des Zellkulturmediums analog zu murinen Keratinozyten kultiviert.

2.9.1 Kultivierung der Keratinozyten

Die routinemäßige Kultivierung der Zellen erfolgte in standardisierten Zellkulturflaschen mit adhäsionsvermittelnder Kunststoffoberfläche bei einer Temperatur von 32 °C, einem CO₂-Anteil von 5 % und erhöhter Luftfeuchtigkeit in einem Standard-Zellkulturinkubator. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte regulär alle 2 bis 3 Tage, wobei die Zellen bei Konfluenz passagiert und im Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf neue Zellkulturoberflächen aufgeteilt wurden. Hierzu wurde das Medium zunächst abgenommen, die Oberfläche mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und anschließend 1 ml Trypsin (0,05 % in EDTA) pro 25 cm² Oberfläche aufgegeben. Nach ca. 7 min bei 37 °C im CO₂-Inkubator lösten die Zellen sich aufgrund des enzymatischen Verdaus extrazellulärer Proteine vom Substrat. Die weitere Proteolyse wurde dann durch Zugabe des doppelten Volumens von FBS (15 %) in PBS gestoppt. Anschließend wurde die Suspension in ein

Zentrifugenröhrchen überführt, mit 120 x g für 150 s zentrifugiert und der resultierende Überstand vollständig abgenommen. Das Zellpellet konnte daraufhin in 1 bis 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen entsprechend in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium gegeben oder in Versuchen eingesetzt werden. Für die Analysen dieser Arbeit wurden nur Zellen der Zellkulturpassagen 7 bis 45 verwendet, die sich in einer Phase der aktiven Proliferation befanden. In diesem Zustand wurde eine annähernde Konfluenz bei einer Aufteilungsrate von 1:3 alle 2 bis 4 Tage erreicht. Bei verringertem Wachstumsverhalten, spätestens aber ab einer Passage > 45, wurde auf eingelagerte Aliquots jüngerer Passagen zurückgegriffen [siehe 2.9.2].

2.9.2 Kryokonservierung und Auftauen eingelagerter Zellen

Zur Einlagerung der Keratinozyten wurden diese nach beschriebenem Ablösen vom Zellkulturplastik einer 25 cm² Zellkulturflasche und anschließender Zentrifugation [siehe 2.9.1] in 500 µl Serum mit 10 % DMSO bei Raumtemperatur aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und in einem Isopropanol-gefüllten Gefriercontainer über Nacht mit einer Rate von 1 °C/min auf -80 °C heruntergekühlt. Die Langzeitlagerung erfolgte anschließend in flüssigem Stickstoff. Zur erneuten Kultivierung der eingelagerten Zellen wurden diese zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und direkt in 10 ml FBS (15%) in PBS überführt. Nach Zentrifugation bei 120 x g für 3 min konnte der DMSO-haltige Überstand abgenommen und das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und auf Zellkulturoberflächen ausgebracht werden. Die Zellen wurden nach dem Auftauen und vor dem Einsatz in Versuchen über mindestens zwei Passagen für eine Woche kultiviert.

2.9.3 Zellzahlbestimmung

Die für weiterführende Versuche zu ermittelnde Zellzahl in Suspension wurde durch das automatische Zellzählgerät Moxi™ Z und den Kassetten des Typs S bestimmt. Dieses Vorgehen sicherte einen beschleunigten Ablauf und reproduzierbare Ergebnisse. Entsprechend der Herstelleranweisung wurden 75 µl der zu messenden Suspension auf die Kassettenöffnung gegeben. Daraufhin wurde die Suspension durch einen Messbereich geleitet und auf Grundlage einer Einkanal-Impedanzmessung die Partikelzahl sowie das Volumen bestimmt. Aus diesen Werten ermittelte das Zählgerät direkt die Konzentration. Zelltrümmer und andere Fragmente konnten durch Eingrenzung des ausgewerteten Partikelvolumens aus der Bestimmung ausgeschlossen und gleichzeitig ein Maß für die Viabilität der Zellsuspension angegeben werden.

2.9.4 Generierung mehrschichtiger Epidermaläquivalente auf Elastomerkammern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur Herstellung vereinfachter, mehrschichtiger Modelle, genannt SEE (*engl. Simplified Epidermis Equivalent*), auf elastischen Silikonkammern entwickelt. Hierzu wurden murine Keratinozyten aus der Routinekultur bis zur Konfluenz in Zellkulturflaschen herangezogen. Daraufhin erfolgte ein Wechsel auf Keratinozyten-Medium, dem Kalziumchlorid-Lösung zugesetzt wurde (Endkonzentration 1,8 mM, im Folgenden Medium +Ca²⁺ genannt). Nach 24 h im Zellkulturinkubator wurden die Keratinozyten von der Oberfläche gelöst. Hierzu wurde das Medium verworfen und zunächst 5 mM EGTA in PBS zugegeben, um vorliegendes Kalzium zu komplexieren. Nach 1 min bei RT wurde der Komplexierungspuffer wieder abgenommen und die Zellen gemäß des Standardvorgehens unter Verwendung von 0,05 % Trypsin von der Oberfläche gelöst [siehe Kapitel 2.9.1]. Anschließend wurden die pelletierten Zellen in Medium +Ca²⁺ aufgenommen und die Suspension nach Zellzahlbestimmung auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Zur Aussaat auf Fibronectin-beschichtete Silikonkammern [siehe auch Kapitel 2.8.4] wurden jeweils 800 µl der Suspension (entspricht $1,6 \times 10^6$ Zellen) aufgegeben. Während der nachfolgenden 3-stündigen Adhärenzphase bei 37 °C im Zellkulturinkubator wurden die Kammern im Abstand von 15-20 min kurz L-förmig geschwenkt, um eine möglichst homogene Verteilung sicherzustellen. Dabei adhärten die Zellen innerhalb von 20-30 min zunächst auf der beschichteten PDMS-Oberfläche. Eine interzelluläre Adhärenz trat nach 2-3 h ein. Nach weiteren 3 h Inkubation wurden ca. 600 µl des Zellkulturmediums vorsichtig abgenommen und gegen frisches Medium +Ca²⁺ ersetzt. Abschließend wurden die SEEs für 18 h bei 37 °C kultiviert und konnten nach einem erneuten Wechsel des Mediums am Folgetag in Dehnungsversuchen eingesetzt werden.

2.9.5 Aussaat einschichtiger Keratinozyten (Monolagen) auf elastischen Substraten

In Anlehnung an das Protokoll zur Herstellung mehrschichtiger SEEs, das eine Vorinkubation in Medium +Ca²⁺ und ein anschließendes Ausbringen auf beschichteten Silikonkammern vorsieht [siehe 2.9.4], wurden ebenfalls einschichtige Vergleichskontrollen kultiviert. Abweichend vom beschriebenen Vorgehen wurden hierbei $2,5 \times 10^5$ Zellen je Kammer eingesetzt. Außerdem wurden nicht-adhärenente Zellen bereits nach 90 min abgenommen, die Kammern einmal mit PBS gespült und anschließend in 600 µl frischem Medium +Ca²⁺ für etwa 18 h bei 37 °C kultiviert.

Da neben einer zu SEE vergleichbaren Kalziuminkubationsdauer auch der Einfluss einer maximalen Zelldichte untersucht werden sollte, wurden im nächsten Schritt Monolagen ohne Vorinkubation in kalziumhaltigen Medium generiert. Hierzu wurden die Zellen aus der

Routinekultur gemäß des Standardvorgehens unter Verwendung von 0,05 % Trypsin von der Oberfläche gelöst [siehe Kapitel 2.9.1] und etwa 10^6 Zellen je Kammer in Keratinozyten-Medium ausgebracht. Nach etwa 2 h bei 37 °C im Zellkulturinkubator wurden nicht-adhärenente Zellen abgenommen, die Kammeroberfläche mit PBS abgespült und anschließend Medium +Ca²⁺ aufgegeben. Einzige Ausnahme bildeten hier Keratinozyten, die zur Untersuchung des Einflusses kalziumabhängiger Zellkontakte explizit ohne Kalziumzugabe weiter kultiviert wurden. Anschließend wurden die Zellen für etwa 18 h bei 37 °C inkubiert und in nachfolgenden Versuchen eingesetzt.

Zur Analyse zellulärer Zugkräfte wurden außerdem Zellkluster aus 2-4 Zellen auf weichen Elastomeroberflächen mit fluoreszierenden Partikeln [siehe Kapitel 2.8.1 und 2.8.3] verwendet. Dazu wurden die Keratinozyten nach beschriebenem Standardvorgehen unter Verwendung von 0,05 % Trypsin aus den Zellkulturflaschen der Routinekultur gelöst [siehe Kapitel 2.9.1] und je beschichtete Lochschale 8.000 Zellen in 500 µl Keratinozyten-Medium ausgebracht. Nicht-adhärenente Zellen im Medium wurden anschließend nach 2 h bei 37 °C verworfen und 500 µl Medium +Ca²⁺ aufgegeben. Daraufhin wurden die Zellkluster für etwa 18 h bei 37 °C kultiviert und dann in Versuchen zur Ermittlung kontraktile Zellkräfte [siehe Kapitel 2.14] eingesetzt.

2.9.6 Biochemische Behandlung der Monolagen und SEEs

Die zytoskelettalen Systeme und assoziierte Proteine wurden im Verlauf der systematischen Versuche an unterschiedlichen Stellen durch die Zugabe verschiedener Inhibitoren gehemmt. Dabei wurden die entsprechenden Substanzen aus einer Stocklösung in Zellkulturmedium verdünnt und ein Wechsel des Mediums entweder 15 min vor eventuellem Beginn eines Dehnungsversuchs durchgeführt oder im Rahmen der Zugkraftmikroskopie direkt zum Zellkulturmedium gegeben, sodass die Endkonzentrationen aller Versuchsansätze des jeweiligen Inhibitors gleich ausfielen.

Eingesetzt wurden 1 µM Nocodazol (Stock: 30 mM), 1 µM Cytochalasin D (Stock: 10 mM), 20 µM SMIFH2 (*engl. Small Molecule Inhibitor of Formin Homology 2 domain*, Stock: 50 mM), 20 µM para-Aminoblebbistatin (im Folgenden kurz Blebbistatin genannt, Stock: 50 mM) und 16 µM ML-7 (Stock: 40 mM). Alle Inhibitoren lagen hierbei in DMSO gelöst vor. Die finale DMSO-Konzentration im Medium überschritt demnach zu keinem Zeitpunkt 0,05 % (v/v). In parallelen Lösemittelkontrollen wurde gezeigt, dass die untersuchten Parameter von der Anwesenheit der maximalen DMSO-Konzentration allein nicht beeinflusst wurden.

2.10 Präparation und Schichtdickenbestimmung tierischer Vollhautexplantate

Die Hautgewebe der vorliegenden Untersuchungen wurden aus Ratten isoliert, die für andere Projekte zur Organentnahme eingesetzt wurden (Az.: 81-02.04.2018.A90, LANUV NRW). Aus diesem Grund wurden keine zusätzlichen Tiere geopfert.

Eine tragende Wistar-Ratte (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) wurde an Tag 18 der Embryonalentwicklung nach CO₂-Anästhesie dekapitiert. Anschließend wurden die Föten direkt entnommen und ebenfalls dekapitiert. Die Rückenhaut wurde entlang der Flanke bis zum Steiß eingeschnitten, vorsichtig entfernt und in kaltes HBSS übertragen. Zur Vermeidung mechanischer Belastung wurde auf die Entfernung subkutanen Fettgewebes verzichtet. Die Explantate wurden daraufhin in rechteckige Probe (16 x 5 mm) zugeschnitten, wobei die Längsachse in kranial-kaudaler Orientierung lag [Abbildung 10 A]. Die Gewebeproben wurden bis zur Verwendung in Gewebemedium bei 37 °C gelagert. Alle nachfolgenden Dehnungsversuche wurden innerhalb von 8 h nach Präparation begonnen.

Die adulte Haut des Muttertieres wurde ebenfalls vom Rücken entnommen. Hierzu wurde eine Region um die Wirbelsäule großflächig depiliert und die *in-situ* Abmessungen von 5 x10 mm in kranial-kaudaler Orientierung wasserfest markiert. Danach wurde die Haut um die Markierung großzügig ausgeschnitten und in kaltes HBSS überführt. Auch bei adultem Gewebe wurde auf die Entfernung des subkutanen Fettgewebes verzichtet, um eine mechanische Belastung durch die Präparation möglichst gering zu halten. Der exakte Probenzuschnitt der adulten Explantate erfolgte im Puffer, bevor die Proben in Gewebemedium bei 4 °C bis zur Verwendung innerhalb von 24 h gelagert wurden [Abbildung 10 B].

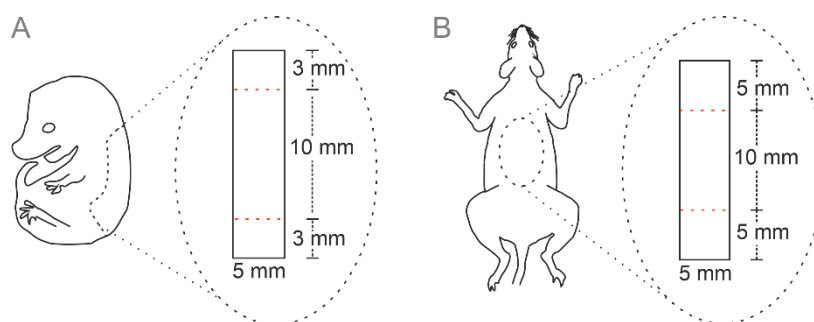


Abbildung 10: **Präparation der ex-vivo Vollhautproben zur mechanischen Charakterisierung.** Die Rattenhaut wurde vom Rücken in kranial-kaudaler Orientierung zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten direkt nach Dekapitation entnommen. Dabei unterschied sich die Haut von Föten des 18. Embryonalentwicklungstags [A] deutlich in Komplexität, Zusammensetzung und Vernetzung von adulter Haut [B]. Während der Präparation wurde auf eine Minimierung mechanischer Belastung geachtet und das subkutane Fettgewebe nicht entfernt. Alle nachfolgenden Zugversuche wurden innerhalb von 8 h (fötal) bzw. 24 h (adult) ausgeführt. Die Ausgangslänge orientierte sich an der präparierten Probengeometrie (Fixierungsposition in Apparatur durch rote Linie angedeutet).

Zur Schichtdickenbestimmung wurde parallel präparierte Rattenhaut über Nacht bei 4 °C in 3,7 % Formaldehyd in PBS fixiert. Nach einem kurzen Waschschrift in PBS wurde die adulte Haut mit einer scharfen Rasierklinge händisch in dünne Streifen geschnitten und lateral auf einem Objektträger platziert. Zur Vermeidung einer möglichen Austrocknung wurden einige Tropfen Puffer aufgegeben. Anschließend wurden Bilder der Querschnitte und eines entsprechenden Kalibrierungsmaßstabs an einem Stereomikroskop mit angeschlossener Spiegelreflex-Kamera aufgenommen. Da vergleichende Zugversuche mit entferntem Fettgewebe keinen Unterschied der Kraftlevel und Kurvenprogression zeigten, wurde hypodermales Gewebe im Rahmen der Querschnittsflächenermittlung zur Berechnung der mechanischen Spannung vernachlässigt.

Die fötale Haut wurde in flüssige Agarose in PBS (2 %, 60 °C) gegeben und in 10 x 10 x 5 mm Einbettformen bei RT ausgehärtet. Daraufhin wurden die Blöcke an einem Vibratom in 50 µm Scheiben geschnitten und die Schnitte auf Objektträger gesammelt. Die Aufzeichnung erfolgte an einem Lichtmikroskop mit bekannter Pixelskalierung. Die Schichtdicke wurde als Mittelwert mehrerer Messungen an unterschiedlichen Positionen angegeben.

Die Viabilitätsfärbung der fötalen Epidermis erfolgte durch Transfer gedehnter [siehe Kapitel 2.11.1] und ungedehnter Explantate in Gewebemedium mit 25 µg/ml Fluoresceindiacetat und 10 µg/ml Ethidiumbromid für 15 min bei 37°C. Eine Positivkontrolle wurde zuvor für 2 h in Medium mit 1 % Natriumazid inkubiert. Nach einem kurzen Waschschrift mit Gewebemedium erfolgte direkt die konfokale Fluoreszenzmikroskopie der Lebend-Tot-Färbung.

2.11 Durchführung uniaxialer Dehnungsanalysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mechanobiologische Untersuchungen an epidermalen *in-vitro* Modellen und *ex-vivo* Hautgeweben aus Ratten durchgeführt. Hierzu wurden spezielle Testsysteme institutsintern entwickelt, die eine bedarfsgerechte Durchführung reproduzierbarer, definierter und verlässlicher Analysen ermöglichen. Nachfolgend werden die Versuchsdurchführungen und die verwendeten Geräte beschrieben.

2.11.1 Spannungs-Dehnungs-Analysen im Gewebedehner

Die Zugversuche wurden in einer von J. Konrad (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) konstruierten Apparatur zur weggesteuerten Langzeit-Untersuchung vitaler Gewebe (auch Gewebedehner genannt) durchgeführt (detailliert beschrieben in Püllen *et al.*, 2021). Die eigentliche Bewegung wird hierbei von einem computergesteuerten Schrittmotor ausgeführt, der eine lineare Verschiebeeinheit antreibt. Die präzise räumliche und zeitliche Kontrolle der Versuchsparameter (u.a. Dehnungsfrequenz, Amplitude, Geschwindigkeit, Pausenzeiten) wird durch eine von W. Hürttlen (IBI-TAE, Forschungszentrum Jülich) auf Basis des grafischen Programmiersystems LabVIEW programmierte Steuerungssoftware reguliert. Die Gewebeprobe wird zunächst in einen immobilen Halterahmen und eine 5 mm breite, bewegliche Metallblechklammer eingebaut [Abbildung 11 A]. Dabei ist die Klammer über eine arretierbare Nadel und einen Titandraht mit der Verschiebeeinheit verbunden. Dazwischen kann zusätzlich eine Kraftmessdose angebracht werden und erlaubt so die Aufzeichnung der resultierenden Kräfte. Während der Versuche wird der Aufbau mit Gewebeprobe in eine temperaturregulierte Inkubationskammer eingesetzt, die zur Versorgung vitaler Zellen mit Zellkulturmedium gefüllt wird und durch ein Observationsfenster die frontale Beobachtung der Probe zu jedem Zeitpunkt ermöglicht.

Während für den Einbau der adulten Hautproben die im Zuge der Präparation gesetzten *in-situ* Markierungen genutzt werden konnten [siehe Kapitel 2.10], wurden für das Einsetzen der fötalen Rattenhaut und SEEs Transferrahmen aus PVDF-Membranen verwendet [Abbildung 11 B]. Diese stabilisierten die Gewebe während des Transfers in den Halter des Gewebedehners, reduzierten ein potentiell mögliches Einschneiden der fragilen Proben durch die Metallblechklammer und ermöglichten den reproduzierbaren Einbau einer definierten Ausgangs- bzw. Ursprungslänge. SEEs wurden nach beschriebenem Vorgehen in Silikonkammern generiert [siehe Kapitel 2.9.4]. Anschließend wurde eine Seitenwand der Kammer abgetrennt und die mehrlagige Zellschicht mit Präzisionspinzetten behutsam von der Oberfläche gelöst. Danach wurde jedes SEE entlang

der späteren Zugachse zweifach gefaltet und auf einen PVDF-Rahmen transferiert. Nachdem die fötale Haut oder das epidermale *in-vitro* Modell übertragen wurden, konnte die laterale Verbindung des C-förmigen PVDF-Rahmens vollständig durchtrennt werden. Ein Einfluss des Transferrahmens auf die Messung wurde damit ausgeschlossen.

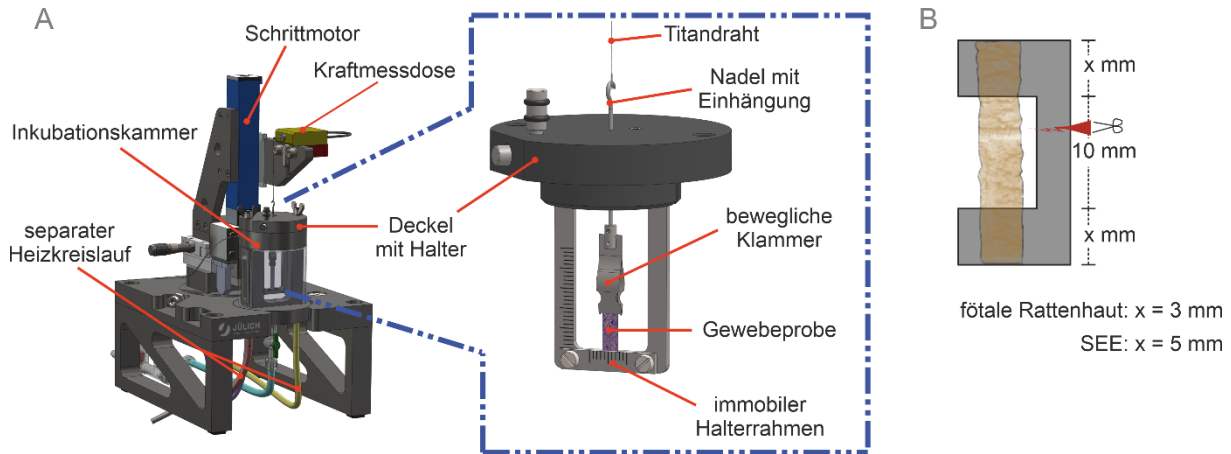


Abbildung 11: **Aufbau der Zugapparatur für Gewebeprouben.** Die Gewebeproube wird zwischen einem immobilen Halterahmen und einer beweglichen Metallblechklammer eingebaut, die in ihrer Position bis zum Einsetzen in die Inkubationskammer und Einhängen des Titandrahts arretiert werden kann. Die Inkubationskammer ist temperaturreguliert und mit Zellkulturmedium gefüllt. Anschließend kann die präzise gesteuerte Bewegung bei gleichzeitiger Aufzeichnung der resultierenden Kräfte erfolgen [A]. Der Transfer und die verlässliche Einhaltung der Ausgangslänge fötaler Haut und *in-vitro* SEE wurden durch zugeschnittene, C-förmige Rahmen aus PVDF (grau) erleichtert. Nach Einbau der Proben wurde die laterale Seite durchtrennt (angedeutet durch rote Markierung) [B].

Vor dem Beginn eines jeden Zugversuchs wurden Nadel und Titandraht physisch verbunden und die Arretierung gelöst. Anschließend wurde die Ausgangslänge unter Verwendung einer Spiegelreflex-Kamera mit Makro-Objektiv bekannter Skalierung auf 10 mm gesetzt. Nach einer etwa 30-minütigen Äquilibrierungsphase im gepufferten Gewebemedium konnte das Protokoll des Zugversuchs gestartet werden. Dabei wurden Fotos der Gewebe zu bestimmten Zeiten eines jeden Dehnungszyklus manuell aufgenommen und die resultierenden Kräfte kontinuierlich mit einer Frequenz von 10 Hz aufgezeichnet.

Neben der Bestimmung der mittleren Kraft und mechanischen Spannung wurde zur Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Hautgewebe eine Normalisierung der Kurven durchgeführt. Hierzu wurde die initiale Spannungsrelaxation eines jeden Zyklus in Bezug zur maximalen Spannung desselben Zyklus gesetzt und der Mittelwert aus mindestens drei Messungen für jeden Datenpunkt angegeben. Die Erholung der mechanischen Spannung wurde außerdem definiert als der Quotient aus dem mittleren Maximalwert eines Zyklus und des mittleren Maximalwerts des ersten Zyklus.

2.11.2 Durchführung zyklischer Dehnungsversuche

Zur uniaxialen Dehnung beschichteter und in Halter eingebauter Silikonkammern [siehe Kapitel 2.8.2 und 2.8.4] als linear-elastische Substrate einschichtiger und mehrschichtiger Keratinozyten [siehe Kapitel 2.9.4 und 2.9.5] wurde eine computergesteuerte Zugapparatur eingesetzt [Abbildung 12]. Diese wurde institutsintern (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) von W. Rubner konstruiert und anschließend kontinuierlich von J. Konrad weiterentwickelt. Dabei treibt ein Schrittmotor eine lineare Verschiebeeinheit an und ermöglicht die raumzeitlich kontrollierte Dehnung entlang einer Achse von bis zu sechs parallel eingesetzten Haltern mit elastischen Silikonkammern. Die gesamte Zugapparatur wurde für die Dauer der Zugversuche in einem Zellkulturinkubator bei 37 °C platziert und von außen durch eine Kabelverbindung angesteuert. Dabei erlaubte eine von W. Hürttlen (IBI-TAE, Forschungszentrum Jülich) auf Basis des grafischen Programmiersystems LabVIEW programmierte Steuerungssoftware die präzise Einstellung der Versuchsparameter (u.a. Zyklenzahl, Geschwindigkeit, Amplitude).

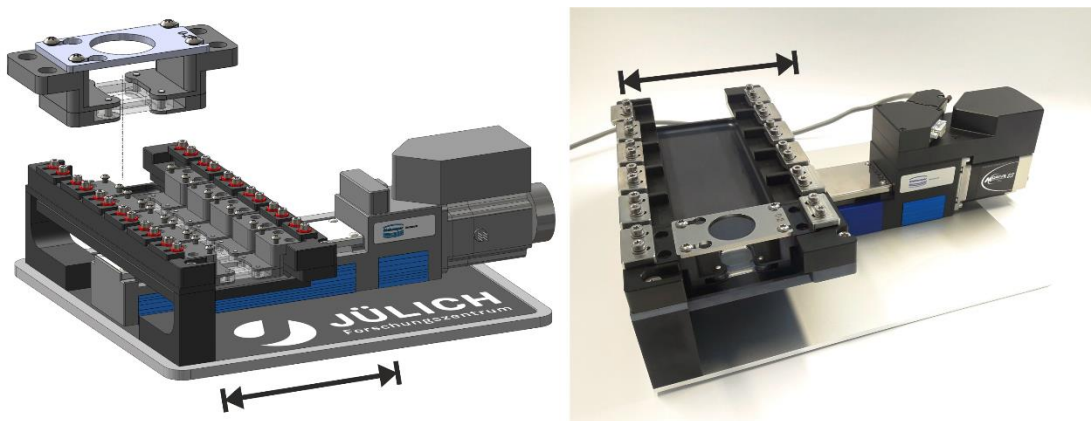


Abbildung 12: **Aufbau der Zugapparatur für uniaxiale Dehnungsversuche mit Elastomerkammern.** In der Apparatur konnten bis zu sechs Kammerhalter mit adhärennten Zellen auf Silikonkammern parallel eingebaut und unter präziser Computersteuerung entlang einer Achse gedehnt werden (Dehnungsrichtung durch Pfeile angedeutet). Dazu passt das Instrument mit den Abmessungen 350 x 280 x 100 mm in jeden Standard-Zellkulturinkubator. Zur graphischen Verdeutlichung ist der Aufbau sowohl als CAD-Abbildung (links) als auch Fotografie des realen Systems (rechts) dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Elastomerkammern zur Annäherung an einen sinusoidalen Dehnungsverlauf unter gleichschenkligen Trapezverläufen mit geeigneten Pausenzeiten gedehnt. Hierzu wurde bei einer maximalen Amplitude von 15 % der 23 mm langen Kammerachse eine Geschwindigkeit von 2,76 mm/s und eine Pausenzeit in Dehnungs- und Ausgangsposition von 0,4 s gewählt. Auf diese Weise wurde eine Frequenz von 300 mHz erreicht und über verschiedene Zeiträume angewendet. Der Einbau der Kammerhalter in die Zugapparatur erfolgte nach Wechsel des Zellkulturmediums (evtl. einschließlich Inhibitoren der Zytoskelettsysteme) über

Bohrungen in den Sockeln auf jeder Seite der eingebauten Kammer. Anschließend konnte der Fixierungsrahmen auf der Oberseite für die Dauer des Dehnungsversuchs gelöst und das Dehnungsprotokoll im Zellkulturinkubator zum gewünschten Zeitpunkt gestartet werden. Zur Reduzierung der Evaporation von Zellkulturmedium während des Versuchs wurden die Kammern in den Haltern mit zugeschnittenen Glasplatten und einem Streifen Parafilm® abgedeckt. Parallel wurden jeweils Kammern analog präpariert und ohne das Anlegen zyklischer Dehnung (im Folgenden auch ungedehnt genannt) mit prozessiert. Nach Ablauf des gewünschten Dehnungsintervalls wurde die Zugapparatur in Ausgangsposition gestoppt und sowohl die gedehnten als auch ungedehnten Keratinozyten in den Silikonkammern zügig fixiert. Während der Inkubationsphase des Fixierungsreagenz konnten die Fixierungsrahmen zur Arretierung der Kammerhalter wieder aufgeschraubt und die Halter zur nachfolgenden immunzytochemischen Färbung aus der Apparatur entnommen werden [siehe auch Kapitel 2.12].

2.11.3 Mikroskopische Analyse des Deformationsfeldes mehrschichtiger SEEs

Die Analyse des Deformationsfeldes bei Anlegen uniaxialer Dehnung wurde unter Bedingungen der Lebendzellmikroskopie an einem aufrechten Weitfeldmikroskop mit entsprechender Inkubationseinheit durchgeführt. Hierzu wurde ein vom beschriebenen Dehnungssystem [siehe Kapitel 2.11.2] abgewandelter Aufbau genutzt, der die Dehnung einer einzelnen Silikonkammer während der gleichzeitigen Lebendzellmikroskopie durch Eintauchobjektive ermöglicht. Dabei wurde sowohl die gleiche Antriebstechnik als auch LabVIEW-basierte Steuerungssoftware verwendet. Eingesetzt wurden SEEs [siehe Kapitel 2.9.4] auf Silikonkammern, die auf der Zelladhäsionsoberfläche mit fluoreszierenden Partikeln kovalent gekoppelt wurden [siehe Kapitel 2.8.3]. Nach Einbau der Kammer in die Zugapparatur, Entfernen des Fixierungsrahmens und Positionierung im Mikroskop, wurde eine Bildfläche in der Kammermitte fokussiert und durch passende Filtersätze sowohl die fluoreszierenden Partikel als auch die Oberfläche des SEE im Differentialinterferenzkontrast aufgezeichnet. Anschließend wurde die Kammer mit 0,1 mm/s schrittweise auf zunächst 15 % und dann 25 % gedehnt und anschließend ebenso schrittweise wieder bis zur Ausgangsposition entspannt. Dabei wurde der ausgewählte Bildausschnitt händisch durch Verfahren des Objektstischs verfolgt und an den entsprechenden Dehnungsschritten erneut dokumentiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden daraufhin exportiert und in der anschließenden Bildverarbeitung eingesetzt.

2.12 Immunzytochemische Färbung

Die Markierung zellulärer Proteine durch Bindung spezieller Moleküle oder spezifischer Antikörper erlaubt die direkte oder indirekte Darstellung im mikroskopischen Bild. Hierzu liegen die Stoffe, Peptide und Proteine an fluoreszierende Farbstoffe konjugiert vor oder besitzen selbst Eigenschaften als Fluorophor.

Für immunzytochemische Färbungen wurden die Zellen zunächst fixiert. Hierzu wurde das Medium auf den Silikonkammern verworfen und etwa 700 µl Formaldehyd (3,7 %) in CB aufgegeben. Nach 15 min (Monolagen) oder 30 min (SEEs) bei 37 °C konnte das Fixierungsreagenz verworfen und je 800 µl Glycin (100 mM) in CB zugegeben werden. Die Lösung zur Inaktivierung verbleibender Formaldehyd-Rückstände wurde nach 5 min (Monolage) oder 10 min (SEE) bei RT abgenommen und die Kammern zweimal mit CB gewaschen. Daraufhin konnte die eigentliche Färbung der zellulären Strukturen erfolgen.

Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden dabei auf einem zweidimensionalen Wippschüttler und, sofern nicht anders angegeben, bei RT ausgeführt. Bei Verwendung fluoreszierender Farbstoffe und Konjugate wurden alle Inkubationsschritte lichtgeschützt durchgeführt. Zunächst wurden die Zellmembranen unter Einsatz des Detergenz Triton™ X-100 (1 %, v/v) in CB permeabilisiert. Während dieser Schritt bei Monolagen über 10 min erfolgte, wurden SEEs 15 min in diesem Permeabilisierungspuffer belassen. Anschließend wurden die Kammern einmal mit CB gewaschen. Um auch basale Zellen des SEE zu erreichen, wurde bei diesen mehrschichtigen Modellen ein zweiter Permeabilisierungsschritt über 45 min in 0,2 % Triton™ X-100 und 0,2 % Tween® 20 in CB (v/v) durchgeführt und die Kammern danach erneut mit CB gewaschen.

Zur Markierung des F-Aktins wurden daraufhin 300 µl Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertes Phalloidin (0,1 µM) in Puffer zur Immunfluoreszenz aufgegeben und für 2 h bei RT (Monolage) oder über Nacht bei 4 °C (SEE) inkubiert. Danach wurden die Zellen für 10 min mit CB gewaschen. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte in einem zweiten Waschschrift. Hierbei wurden jeweils 500 µl CB und ein Tropfen des kommerziellen DAPI-Reagenz NucBlue™ auf die Kammern gegeben und für 15 min (Monolage) oder 1 h (SEE) inkubiert. Abschließend konnte die Lösung verworfen, die Kammern erneut mit CB gewaschen und eingedeckt (s. u.) werden.

Im Fall einer sekundären Immunfluoreszenzfärbung der SEEs wurden im Anschluss an die Permeabilisierung stattdessen zunächst unspezifische Proteinbindestellen gesättigt. Hierzu wurde 5 % Milchpulver in CB (m/v) für 4 h eingesetzt und anschließend verworfen. Danach erfolgte die Inkubation mit 300 µl Primärantikörperlösung (entsprechende Antikörper verdünnt

in Puffer zur Immunfluoreszenz) für 48-72 h bei 4 °C. Daraufhin wurde die Lösung abgenommen und die SEEs dreimal mit Puffer zur Immunfluoreszenz gewaschen. Die Markierung der Primärantikörper wurde durch Zugabe der Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörper erreicht. Hierzu wurden diese in einem Volumen von 300 µl (entsprechende Antikörper 1:300-1:500 verdünnt in Puffer zur Immunfluoreszenz) auf jede Kammer gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit CB über jeweils etwa 15 min konnten die gefärbten SEEs abschließend eingedeckt werden.

Hierzu wurde die Lösung auf den Monolagen und SEEs vollständig abgenommen und etwa 30 µl Eindeckmedium ProLong™ Glass mittig aufgegeben. Danach wurde ein Deckglas (Ø 15 mm, #1) luftblasenfrei aufgelegt und die Kammern für etwa 48 h im Dunkeln gelagert, um so eine Aushärtung des Eindeckmediums und damit finalen Brechungsindex von 1,52 zu erreichen. Zur Mikroskopie wurde abschließend ein längshalbierter Objektträger unter die Kammer geklebt. Dazu wurde auf den Objektträger durch Rotationsbeschichtung (1200 rpm für 7 s) eine Schicht aus frisch angesetzttem Elastomergemisch (SORTA-Clear™ 12, Mischungsverhältnis 1:1) aufgetragen. Bis zur Aushärtung des Silikons wurde der beschichtete Objektträger dann in inverser Orientierung auf dem Kammerboden befestigt. Nach Ausschnitt der präparierten Probe unter Verwendung einer scharfen Rasierklinge konnten die Modelle mikroskopisch analysiert werden.

2.13 Konfokale Mikroskopie

Eine mikroskopische Auswertung der immunzytochemisch gefärbten Proben erfolgte am LSM 880 (Carl Zeiss, Jena) ausgerüstet mit einem *AiryScan*-Detektorsystem. Neben Anregungslasern unterschiedlicher Wellenlängen wurden hierbei auf die entsprechenden Spektren der Fluorophore abgestimmte Band- und Langpassfilter eingesetzt. Die Aufnahmen wurden zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei gleichzeitig vertretbarer Aufnahmegeschwindigkeit im *Fast-AiryScan-Mode* (ZEN black, Carl Zeiss, Jena) mit einem Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,4 (Plan-Apochromat 63x/1,4) durchgeführt. Dabei wird statt einer Lochblende zur Begrenzung des Streulichts anderer Fokusebenen ein ellipsenförmiges Anregungsfeld eingesetzt, das durch 16 konzentrisch angeordnete Detektorelemente aus GaAsp-Fotoelektronenvervielfacher detektiert wird (Huff, 2016). Die Signale der Detektoren werden anschließend computergestützt zu einem konfokalen Bild mit hohem Kontrast bei geringer optischer Schichtdicke verrechnet. Aufgrund der parallel genutzten Detektoren bei gleichzeitiger Öffnung der Lochblende wurde jedes Fluorophorsignal nacheinander mit zur klassischen Konfokalmikroskopie vergleichbar niedrigen Laserintensitäten aufgenommen. Hierbei wurde für jeden Bildausschnitt zunächst die untere und obere Konfokalebene (im Folgenden auch nur Ebene) manuell festgelegt. Der Bildstapel wurde daraufhin als Mittelwert einer doppelten Rasterung mit einer Bildgröße von 1900 x 1900 Pixeln ($\cong 134,1 \times 134,1 \mu\text{m}$) bei einem Z-Abstand von 0,25 μm aufgenommen. Für jede Probe wurden dabei Bildausschnitte in sternförmiger Anordnung von der Kammermitte (max. 6 mm vom Zentrum) aufgenommen und nachfolgend im Rahmen der Bildverarbeitung eingesetzt.

2.14 Zugkraftmikroskopie

Zur Analyse des Einflusses direkter und indirekter Zytoskeletthinhibitoren auf die kontraktile Zellkräfte wurde die Technik der Zugkraftmikroskopie angewandt. Hierzu wurden Zellkluster aus 2-4 Zellen auf weichen Elastomeroberflächen mit fluoreszierenden Partikeln ausgebracht [siehe Kapitel 2.9.5] und unter Kultivierungsbedingungen der Lebendzellmikroskopie in einem Weitfeldmikroskop analysiert. Das Mikroskop verfügte neben der Inkubationseinheit über ein Colibri-LED-System zur Fluoreszenzanregung sowie passender Filtersätze. Die Beobachtung erfolgte durch ein EC-Plan-Neofluar 40x/1,30 Ölimmersionsobjektiv.

Nach vollständiger Abnahme des alten Mediums wurden zunächst 400 µl Zellkulturmedium +Ca²⁺ aufgegeben und Positionen mit entsprechenden Zellklustern an unterschiedlichen Stellen der Probe bestimmt. Anschließend erfolgte für jede Position die Aufzeichnung der fluoreszierenden Partikel und der Zellen im Phasenkontrast. Die biochemische Behandlung wurde durch Zugabe der entsprechenden Substanzen in 100 µl Zellkulturmedium erreicht. Dabei wurde die Konzentration so gewählt, dass die Zielkonzentration im Gesamtvolumen von 500 µl vorlag [siehe auch Kapitel 2.9.6]. Anschließend wurden die gewählten Positionen im Abstand von 5 min über einen Zeitraum von 20-30 min erneut aufgenommen. Hierbei wurde vor jedem Aufnahmeblock eine manuelle Nachkontrolle des Fokus durchgeführt. Zum Schluss jedes Durchlaufs wurde das Zellkulturmedium vorsichtig abgenommen und etwa 500 µl hochkonzentrierter Trypsin-Lösung (2,5 %) aufgegeben. Nach kurzer Inkubation lösten sich die Zellen von der Oberfläche und die entsprechenden Positionen konnten in Abwesenheit zellulärer Zugkräfte erneut aufgenommen werden. Die erhaltenen Sequenzen wurden daraufhin exportiert und in der anschließenden Bildverarbeitung eingesetzt.

2.15 Bildverarbeitung

Die konfokalen Bildstapel und Bildsequenzen der Weitfeldmikroskopie wurden nachfolgend durch das Bildverarbeitungsprogramm *Fiji*, welches eine Paketzusammenstellung des Grundprogramms *ImageJ* mit verschiedenen Zusatzprogrammen darstellt, bearbeitet und zum Einsatz in Bildverarbeitungsprogrammen neu angeordnet. Für quantitative Auswertungen wurden konfokale Stapel u.U. in kleinere Bildstapel oder Einzelbilder aufgetrennt. Zur besseren Sichtbarkeit qualitativer Darstellungen wurden Helligkeit und Kontrast innerhalb eines Kanals angepasst. Außerdem wurden aufgrund der geringen optischen Schichtdicke bei Übersichtsdarstellungen maximale Intensitätsprojektionen (MIP) weniger Ebenen und vergrößerte Teilbereiche eines Bildausschnitts abgebildet.

2.15.1 Deformationsfeldcharakterisierung mehrschichtiger SEEs in Elastomerkammern

Die Bestimmung der Deformationsparameter nach schrittweiser Dehnung und paralleler Mikroskopie basaler und apikaler Strukturen erfolgte unter Anwendung eines Matlab-basierten Auswertungsprogramms mit graphischer Benutzeroberfläche (genannt *AffineBeadsTracking*), das institutsintern von Dr. R. Springer (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) entwickelt wurde. Grundlage bildeten dabei rechteckige Ausschnitte, die über die aufgenommene Bildfläche der mikroskopischen Aufnahmen verteilt und unabhängig voneinander ausgewertet wurden. Dabei wurden die Auswertungsausschnitte ausgehend vom Ausgangsbild in den Folgebildern mittels Kreuzkorrelation verfolgt und die Suche bei Überschreiten des Schwellwerts des Kreuzkorrelationskoeffizienten von 0,6 als erfolgreich gewertet. Daraufhin wurde die affine Transformation für die gesamte Bildsequenz durchgeführt und die Deformationsparameter mittels Lucas-Kanade-Algorithmus bestimmt. Für die Ermittlung der mittleren Dehnung bzw. Kompression (Dehnung mit negativem Vorzeichen) in Zugrichtung und perpendicular zur Zugrichtung wurden nur Ausschnitte einbezogen, die über die vollständige Bildsequenz erkannt wurden und keine Entartung der affinen Transformation aufwiesen. Dabei wurden Mittelwert und Standardabweichung aus 130 Ausschnitten auf Ebene der Partikel und 102 Ausschnitten der Zelloberfläche aus mindestens drei unabhängigen Analysen mit jeweils unterschiedlichen Silikonkammern gebildet.

2.15.2 Auswertung der Orientierung basaler Aktin-Faserbündel

Die Bestimmung der Hauptorientierung länglicher Aktin-Bündel erfolgte mittels eines Auswertungsprogramms (genannt *Cellorientation*), das von G. Dreissen (IBI-2,

Forschungszentrum Jülich) institutsintern geschrieben und bereits in publizierten Daten Anwendung fand (Faust *et al.*, 2011; Noethel *et al.*, 2018; Lövenich *et al.*, 2021). Grundlage der Analysen stellte in Abwandlung zu früheren Arbeiten zunächst die Unterteilung des basalen Aktinbilds in ein Gitter aus zelläquivalenten Quadraten mit Hilfe eines Markierungsprogramms (genannt *CellMaskingManualMark*) dar. Hierzu wurde die mittlere Zelldichte eines Datensatzes anhand der ebenfalls gefärbten Zellkerne bestimmt und die Anzahl an Quadraten entsprechend der nächstgelegenen, mittleren Zellzahl je Bildausschnitt gewählt. Die nachfolgende Bestimmung des Hauptorientierungswinkels erfolgte für jedes zelläquivalente Quadrat. In analoger Weise wurde mit je einer zentralen Aufnahme der SEE-Bildstapel verfahren, um die Faserauswertung auf suprabasale Zellen anzuwenden.

Dabei wurde das Bild zunächst mit einem Gauß-Filter (Sigma = 15) geglättet und anschließend jedem Pixel auf Basis eines zweidimensionalen Strukturensors ein Orientierungsvektor zugeordnet, wobei die Richtung durch die umliegenden Grauwertgradienten vorgegeben wurde. Da jedoch nur Pixel ausgewertet werden sollten, die Aktin-Bündel repräsentierten, wurde noch eine Maske der Faserstrukturen erstellt. Dazu wurde das geglättete Bild mit einem Bandpass-Filter gefiltert und anschließend mit einem Schwellwert segmentiert (Schwellwert = Mittelwert des Bildes + 0,5 x Standardabweichung des Bildes). Für die weitere Auswertung wurde die Orientierung dann nur an den Stellen betrachtet, die zuvor maskiert wurden. Aus den verbleibenden Orientierungsvektoren aller Faserstrukturen wurde anschließend der Hauptorientierungswinkel jeder Zelle in Relation zur Dehnungsrichtung als natürliche Zahl zwischen 0-90° bestimmt. Dabei erfolgte die Quantifizierung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Zahl n wurde definiert als die Anzahl ausgewerteter Zellen bzw. zelläquivalenter Quadrate.

2.15.3 Abschätzung der apikalen Zellausrichtung

Die Bestimmung der zellulären Hauptachsenorientierung an der apikalen Seite mehrschichtiger SEEs erfolgte auf Basis der mikroskopischen Aufnahme des ZO-1-Signals. Unter Anwendung des Programms zur manuellen Markierung einzelner Zellen (*CellMaskingManualMark*) wurden die apikalen Zelloberflächen entlang des linearen Fluoreszenzsignals voneinander abgegrenzt. Das von G. Dreissen (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) entwickelte Programm *Cellorientation* passte anschließend eine Ellipse in jede markierte Zellfläche ein und bestimmte die Orientierungswinkel der Hauptachsen in Relation zur Dehnungsrichtung. Dabei wurden je 259 (ungedehnt), 203 (0,5 h

Dehnung) und 228 (6 h Dehnung) Zellen eines Versuchs aus jeweils neun zufällig über die Probe verteilten Bildausschnitten ausgewertet.

2.15.4 Ermittlung der Zellkerndichte

Die Zellkerne wurden in Monolagen und SEEs manuell ausgezählt. Hierzu wurden die Bildstapel der mehrschichtigen SEEs unter Beachtung einer orthogonalen Ansicht der fluoreszenzmarkierten Zellkerne in basale, suprabasale und apikale Zellschichten unterteilt. Diese Gliederung basierte für basale Zellen auf Zellkernen, die in den ersten 10-15 Ebenen ($\cong 2,5-4 \mu\text{m}$) an der jeweiligen zweidimensionalen Position in basoapikaler Z-Richtung als erste vorgefunden wurden, während apikale Zellkerne in den höheren Ebenen der jeweiligen Position als äußerste Zellkerne auftraten. Als suprabasale Schicht wurde zwischen den basalen und apikalen Auswertungsbereichen ein Stapel aus 7 Konfokalebene definiert und manuell ausgewertet.

Die in Z-Richtung getrennte Auswertung der SEEs erfolgte dabei über 17 (ungedehnt und 0,5 h Dehnung) bzw. 16 (6 h Dehnung) Bildstapel aus insgesamt vier unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Dehnungszeiträumen (ungedehnt, 0,5 h und 6 h Dehnung). Die Zellkerne einschichtiger Keratinozyten wurden getrennt für Zellen mit zu SEEs vergleichbarer Kalziuminkubationsphase (+Ca²⁺) und Zellschichten mit zu SEEs vergleichbarer Aussaatdichte (max. Dichte) ausgewertet. Dabei wurden aus drei unabhängigen Versuchen beider Herstellungsprotokolle 19 (+Ca²⁺) bzw. 18 (max. Dichte) Bildausschnitte der jeweiligen Untersuchungszeiträume ausgezählt.

2.15.5 Bestimmung der Zellkernorientierung

Sowohl in einschichtigen als auch in mehrschichtigen Modellen wurde die Hauptachsenorientierung der Zellkerne ermittelt. Hierzu wurden die Bildstapel der SEEs vor der eigentlichen Bildverarbeitung in basale und suprabasale Ebenen aufgeteilt. Die obere und untere Grenze der basalen Zellkerne wurde unter Berücksichtigung der orthogonalen Ansicht gesetzt und umfasste 10-15 Ebenen ($\cong 2,5-4 \mu\text{m}$) für WT-Keratinozyten und 6-8 Ebenen ($\cong 1,5-2 \mu\text{m}$) für KtyI^{-/-}-Zellen. Anschließend wurde ein Intermediärbereich der nachfolgenden 12-16 Ebenen (WT-Zellen) bzw. 5-8 Ebenen (KtyI^{-/-}-Zellen) aus der weiteren Analyse ausgeschlossen, da hier möglicherweise sowohl Zellen mit als auch ohne Substratkontakt vorlagen. Als suprabasale Zellkerne wurden deshalb nur Kerne definiert, die in Ebenen oberhalb des nicht ausgewerteten Intermediärbereichs vorlagen.

Die Bildstapel der Monolagen und basalen sowie suprabasalen SEE-Ebenen wurden daraufhin unter Anwendung eines von G. Dreissen (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) in Python programmierten Bildverarbeitungsprogramms (genannt *Nucleus_Orientation*) analysiert. Hierbei erfolgte zunächst eine Glättung der Bilder mit einem Gauß-Filter (Sigma = 20). Anschließend wurde für jede Ebene eines Stapels eine Maske erstellt. Dazu wurde mit Hilfe des Otsu-Schwelwertverfahrens ein Schwellwert ermittelt und die entsprechende Ebene segmentiert. Objekte, die kleiner als 12.000 Pixel waren, wurden entfernt und Löcher der Masken, die kleiner als 200 Pixel waren, wurden geschlossen. Weitergehend wurde die Maske durch morphologisches Schließen (Kreis mit Radius 5 Pixeln) und Öffnen (Kreis mit Radius 10 Pixeln) nachbearbeitet.

Im nächsten Schritt wurden zusammenhängende Zellkerne unter Anwendung der Wasserscheidentransformation (*engl. Watershed Transformation, WST*) getrennt. Dazu wurde zunächst von jeder Ebene der Zellmaske eine Distanztransformation durchgeführt und von dieser lokale Maxima mit einem Mindestabstand von 30 Pixeln gesucht. Diese Maxima wurden als Marker für die anschließende WST verwendet. Durch die Nachbearbeitung möglicherweise entstandene kleine Objekte, deren Fläche unter dem Schwellwert von 12.000 Pixeln lagen, wurden daraufhin ebenfalls entfernt.

Anschließend erfolgte die ebenenübergreifende, dreidimensionale Verbindung und Kennzeichnung zusammenhängender Objekte. Dabei wurden alle Objekte verworfen, die in weniger als 3 (Monolagen und basale SEEs) bzw. 4 (suprabasale SEEs) aufeinanderfolgenden Ebenen identifiziert wurden. Von den verbliebenen, zusammenhängenden Markierungen wurde danach die Ebene mit der größten Fläche ermittelt und nach Einpassen einer Ellipse die Orientierung der Hauptachse in Relation zur Dehnungsrichtung zwischen 0-90° bestimmt. Zellkerne, die den Bildrand berührten, wurden dabei nicht mit aufgeführt. Zur Reduzierung des Einflusses möglicher Zellkernfragmente und apoptotischer Zellkerne wurde außerdem ein Schwellwert für das Verhältnis der markierten Fläche zur Fläche einer konvexen Hülle (kleinstes konvexes Polygon) gesetzt und die entsprechenden Objekte aus der Auswertung ausgeschlossen. Abschließend erfolgte zusätzlich eine manuelle Kontrolle der markierten Bildstapel.

Die Quantifizierung der Zellkern-Hauptachsenorientierung zur Dehnungsrichtung erfolgte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Zahl n wurde definiert als die Anzahl ausgewerteter Zellkerne.

2.15.6 Strukturanalyse des kortikalen F-Aktins

Die quantitative Auswertung zur Abschätzung struktureller Veränderungen im Aktinkortex wurde auf Grundlage der schnellen Fouriertransformation (*engl. Fast Fourier Transformation, FFT*) durchgeführt. Diese diente der Ermittlung periodischer Strukturen und einer anschließenden Bestimmung der Orientierung dieser periodischen Strukturen.

Hierzu wurden zunächst Bildausschnitte des kortikalen F-Aktins an der basalen und apikalen Ebene aus den konfokalen Bildstapeln erstellt. Je Bildstapel wurden sechs basale und sechs apikale Ausschnitte des Fluoreszenzsignals mit einer Größe von 150×150 Pixel ($\cong 10,6 \times 10,6 \mu\text{m}$) über die Aufnahme verteilt ausgewählt. Die Ausschnitte wurden so gesetzt, dass die signalintensive Zellgrenze explizit nicht miteinbezogen wurde.

Die Auswertung erfolgte durch ein institutsintern von Dr. R. Springer (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) in Python programmiertes Bildverarbeitungsprogramm (genannt *FFT_Actin*). Dabei wurde jeder Bildausschnitt als zweidimensionale Funktion betrachtet und in den Frequenzraum transformiert. Das Programm berechnete das Amplitudenspektrum als Betrag der Fouriertransformierten des Bildes. Anschließend wurde in 1° -Schritten von 0 - 180° ausgehend vom Zentrum des Amplitudenspektrums eine Linie nach außen gesetzt (0° bzw. 180° entsprach der Dehnungsrichtung in den Ausgangsdaten) und jeweils die mittlere Intensität (bzw. mittlere Amplitude des Spektrums) entlang dieser Linie bestimmt. Die analysierte Linie wies einen Abstand vom Zentrum über 10 Werte und eine Länge von etwa $1/3$ der halben Bildgröße auf. Die Auftragung der mittleren Intensitäten gegen den Rotationswinkel wies bei einer vorhandenen periodischen Struktur lokale Maxima auf.

Die erhaltenen Absolutwerte der Intensitäten sind dabei aufnahmeabhängig und wurden anschließend zur Vergleichbarkeit der Datensätze und Reduzierung von Aufnahmeartefakten normiert. Hierzu wurde das jeweilige Intensitätsmaximum der Randbereiche (zwischen 0° - 39° und 140° - 179°) bestimmt und die relative Abweichung jedes Amplitudenwerts von diesem Maximum ermittelt ($\text{FFT}_{\text{norm.}}$). Anschließend wurde die Differenz der normierten Werte aller 6 h gedehnten und ungedehnten Proben berechnet und graphisch gegen den Orientierungswinkel aufgetragen. Der so definierte $\Delta\text{FFT}_{\text{norm.}}$ wies auf eine strukturelle Differenz bei Auftreten periodischer, orientierter Strukturen durch lokale Maxima hin. Die statistische Zahl n wurde definiert als die Anzahl ausgewerteter Bildausschnitte. Dabei wurden, sofern nicht anders angegeben, Ausschnitte mehrerer Bildstapel aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

2.15.7 Auswertung zellulärer Zugkräfte

Basierend auf den Bildsequenzen fluoreszierender Partikel aus der Zugkraftmikroskopie wurden die auf das Substrat ausgeübten, horizontalen Kräfte mit Hilfe eines institutsintern entwickelten Bildverarbeitungsprogramms (genannt *CellForceAnalysis*) analysiert. Das Programm wurde ursprünglich durch Dr. N. Kirchgessner und Dr. S. Houben entwickelt und von Dr. R. Springer (IBI-2, Forschungszentrum Jülich) an die gegebenen Anforderungen angepasst.

Zunächst wurden die fluoreszierenden Partikel auf der Oberfläche detektiert. Dazu wurde eine synthetische Suchvorlage eines Partikels generiert und über lokale Maxima der Kreuzkorrelation die anderen Partikel auf der Oberfläche bei Überschreiten des Schwellwerts des Kreuzkorrelationskoeffizienten von 0,7 identifiziert. Dabei stellte das erste Bild den Referenzwert ohne adhäsive Zellen und dementsprechend ohne Einwirkung zellulärer Zugkräfte dar. Nachfolgend wurden die Partikel der analysierten Zeitpunkte durch normierte Kreuzkorrelation in einem definierten Suchbereich detektiert und eine mögliche Verschiebung zur Referenz durch Verschiebungsvektoren angegeben. Zusätzlich wurde eine Korrektur einer möglichen unerwünschten Bildverschiebung (*engl. Drift*) durchgeführt. Hierzu wurden manuell mehrere zellfreie Bereiche in den Rändern der Klusteraufnahmen ausgewählt, die keine Deformation aufwiesen, und der Mittelwert der Verschiebung zu jedem Zeitpunkt als Probendrift definiert. Außerdem wurde der zu analysierende Bereich aufgrund der im Phasenkontrast erkennbaren Zellstrukturen durch einen Kreis festgelegt, der das jeweilige Zellkuster einschloss. Das Programm schätzte daraufhin auf Grundlage der linearen Elastizitätstheorie für Punktkräfte (Merkel *et al.*, 2007) das Kraft(vektor)feld ab und ermöglichte die Rückrechnung des Kraftbetrags pro Einheitsfläche [$\text{nN}/\mu\text{m}^2$] (Cesa *et al.*, 2007; Houben *et al.*, 2010). Innerhalb des ausgewählten Analysebereichs wurde so die wirkende kontraktile Gesamtkraft des Zellkusters aus der Summe aller Anteile ermittelt. Zur Angabe eines skalaren Maßes erfolgte abschließend die programminterne Berechnung der Formänderungsenergie in Femtojoule [fJ] (Müller und Pompe, 2016).

Auf diese Weise konnte für jede Position die Formänderungsenergie vor Zugabe der zu testenden Substanzen und über den zeitlichen Verlauf nach biochemischer Behandlung ermittelt werden. Für jede Position und jeden Zeitpunkt wurde anschließend die relative Änderung der Formänderungsenergie zum unbehandelten Ausgangszustand errechnet. Ausgewertet wurden dabei als statistische Zahl n die Anzahl der Zellkuster aus zwei unabhängigen Versuchen.

2.16 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die Berechnung statistischer Parameter und die graphische Aufarbeitung quantitativer Daten erfolgte unter Verwendung des Programms *GraphPad Prism* (Version 9, GraphPad Inc., La Jolla, KA, USA). Die dargestellten statistischen Maße wurden jeweils gekennzeichnet. Verwendet wurden der Zentralwert und das Konfidenzintervall mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % oder die Standardabweichung der Stichprobe. Dabei lagen die Datensätze nicht normalverteilt vor. Zur Prüfung der Unterscheidung zweier unabhängiger Stichproben wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test angewandt. Die Signifikanzniveaus wurden hierbei durchgehend definiert als **** = $p \leq 0,0001$; *** = $p \leq 0,001$; ** = $p \leq 0,01$; * = $p \leq 0,05$; n.s. = $p > 0,05$. Sofern nicht anders angegeben, stammten alle quantitativen Daten aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. Dabei entspricht n dem Umfang der analysierten Stichprobe aller ausgewerteten Datensätze.

3 Ergebnisse

Über die zelluläre Antwort suprabasaler Keratinozyten der mehrlagigen Epidermis auf zyklische Dehnung ist im Gegensatz zur Reaktion basaler Zellen, die aufgrund großer, mechanosensitiver Adhäsionskomplexe zum Substrat über andere mechanotransduktive Voraussetzungen verfügen, außerordentlich wenig bekannt. Grundlage für die Analyse dehnungsinduzierter Veränderungen ist zunächst ein Modellsystem, das eine reproduzierbare und definierte Untersuchung der Keratinozyten im mehrlagigen Aufbau auf einem elastischen Substrat ermöglicht. Aus diesem Grund wurde zu Beginn dieser Arbeit ein vereinfachtes *in-vitro* Modell entwickelt, bevor die dreidimensionale Auswertung zellulärer Strukturen unter uniaxialer Dehnung erfolgte. Anschließend wurde mit Hilfe genetisch-veränderter Zelllinien sowie durch den Einsatz selektiver Inhibitoren der Einfluss der zytoskelettalen Netzwerke auf dehnungsinduzierte Adaptionen näher untersucht.

3.1 Etablierung eines mehrlagigen Epidermismodells zur zyklischen Dehnungsanalyse

3.1.1 Anpassung des Protokolls zur *in-vitro* Differenzierung unter submersen Bedingungen

Neben der aufwändigen und langwierigen *in-vitro* Rekonstruktion vollständiger Epidermaläquivalente, die sich aufgrund der sensiblen Kultivierungsbedingungen nicht auf bereits etablierten Elastomersubstraten zur Dehnungsanalyse generieren lassen, stellt die Erhöhung der Kalziumkonzentration und weitere Kultivierung konfluenter, einlagiger Zellschichten muriner Keratinozyten (im Folgenden auch Monolagen genannt) ein Standardverfahren für die initiale *in-vitro* Differenzierung muriner Keratinozyten dar (Borowiec *et al.*, 2013; Ramms *et al.*, 2013; Büchau *et al.*, 2022). Hierbei werden aus postnatalen Mäusen isolierte Keratinozyten, die zur Erhaltung der basalen Proliferationsaktivität routinemäßig unter geringer Kalziumkonzentration ($\leq 50 \mu\text{M}$) kultiviert werden, auf Zellkultursubstraten ausgebracht. Nach Adhäsion der Zellen wird dann die Kalziumkonzentration für 24-72 h auf 1,2-2,0 mM angehoben und so die Bildung interzellulärer Kontakte induziert. Dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit unter Verwendung Fibronektin-beschichteter PDMS-Oberflächen genutzt, um eine dreidimensionale Entwicklung und Stratifizierung auf dem Elastomer zu erreichen. Auf diese Weise könnte eine zyklische Dehnung anschließend über das linear-elastische Substrat an basale und suprabasale Zellen appliziert werden. Obwohl genetisch aberrant und spontan immortalisiert, wurde hierzu zusätzlich die humane Keratinozyten-

Zelllinie HaCaT auf ihre Eignung zur mehrlagigen Entwicklung eines vereinfachten Epidermaläquivalents durch postkonfluente Kultivierung untersucht. Anders als primäre Keratinozyten werden HaCaT-Zellen routinemäßig in Zellkulturmedium mit erhöhter Kalziumkonzentration gehalten.

Bereits 4 h nach Aussaat hatten beide Zelltypen eine vollständig konfluente Monolage gebildet. Dabei wiesen HaCaT-Zellen eine dichte, epitheltypische Morphologie auf, während murine Keratinozyten eine gestrecktere Form zeigten [Abbildung 13 A]. Nach dem Wechsel auf erhöhte Kalziumkonzentration (4 h nach Adhäsion) arrangierten sich auch die murinen Keratinozyten in einer epitheltypischen, dichten Monolage (24 h nach Aussaat). Über den weiteren Kultivierungszeitraum (48-72 h) fanden sich, insbesondere im Ansatz mit HaCaT-Zellen, vermehrt kugelförmige Zellen auf der Epithelschicht. Diese Zellen wiesen keine stabile Adhärenz zu basalen HaCaT-Zellen auf und lösten sich in der Folge von der Monolage.

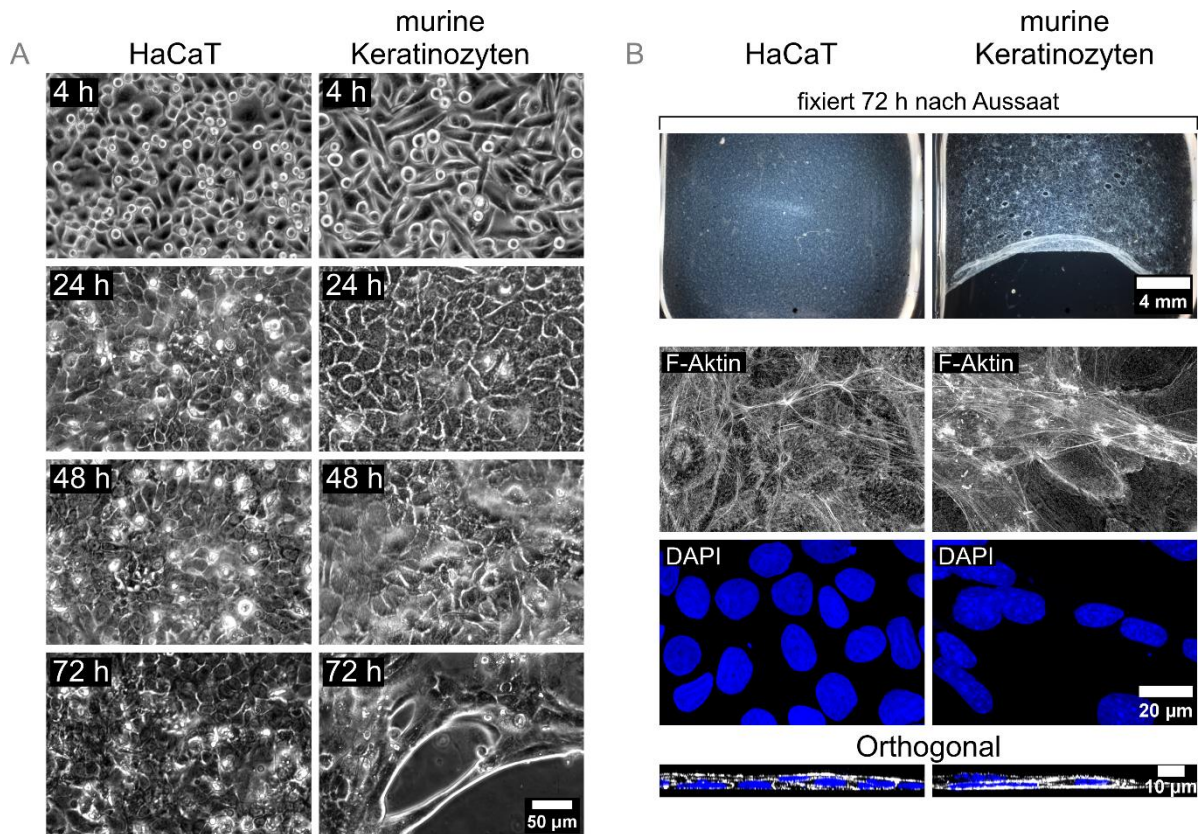


Abbildung 13: **Postkonfluente Kultivierung als Methode zur epidermalen Stratifizierung auf Elastomeroberflächen.** Die humane HaCaT-Zelllinie und murine Keratinozyten wurden auf elastischen Silikonsubstraten ausgesät, die zuvor nicht-kovalent mit Fibronektin beschichtet wurden. Anschließend erfolgte die lichtmikroskopische Beobachtung zu den angegebenen Zeitpunkten [A]. Murine Keratinozyten erhielten zum Zeitpunkt der ersten Aufnahme Zellkulturmedium mit erhöhter Kalziumkonzentration, während HaCaT-Zellen bereits zuvor in der gleichen Konzentration an Kalziumionen kultiviert wurden. Nach 72 h erfolgte die Fixierung und immunzytochemische Färbung sowie eine fotografische als auch fluoreszenzmikroskopische Bewertung der Integrität und Mehrschichtigkeit [B].

Bereits nach 48-72 h auf dem Substrat bildeten sich Löcher unterschiedlicher Größe innerhalb des murinen Zellverbands. Diese verminderte Substratadhäsion führte spätestens nach 72 h zur großflächigen Delamination der Epithelschicht [Abbildung 13 B].

In der anschließenden konfokalen Fluoreszenzmikroskopie des F-Aktins und der Zellkerne wiesen murine Keratinozyten in den noch adhärenen Zwischenbereichen eine gestreckte Form auf. Beide Zelltypen waren auch 72 h nach konfluenter Aussaat zu einem großen Teil als einschichtiges Epithel organisiert [Abbildung 13 B]. Darüber hinaus fanden sich vereinzelt Zellen, die zumindest mit einem überwiegenden Anteil der Zellmembran räumlich über den basalen Zellen angeordnet waren. Eine eindeutige Identifikation der vollständigen Delamination und damit Abbau sämtlicher Zell-Matrix-Interaktionen konnte aber für diese Zellen anhand der F-Aktin-Färbung nicht zweifelsfrei sichergestellt werden.

Da die ausschließliche Langzeitkultivierung in kalziumhaltigem Zellkulturmedium auf nicht-kovalent beschichteten PDMS-Oberflächen weder ein intaktes noch ein zufriedenstellend mehrschichtiges Epithel lieferte, waren Anpassungen an das Standardprotokoll zur initialen, *in-vitro* Differenzierung unter submersen Bedingungen nötig.

Aus den gesammelten Beobachtungen wurde die Hypothese abgeleitet, dass eine Vorinkubationsphase der murinen Keratinozyten in erhöhter Kalziumkonzentration und erst anschließendes Ausbringen auf Elastomersubstraten von Vorteil sein könnte [schematisch dargestellt in Abbildung 14]. In dieser ersten Phase auf Standard-Zellkulturplastik wurden so zellkontaktabhängige Signalwege vermutlich bereits aktiviert und nachgeschaltete Prozesse, einschließlich möglicher Änderungen der Expressionsmuster sowie der Rekrutierung benötigter Proteinkomplexe zur Membran, eingeleitet. Nach anschließendem Ablösen und Vereinzeln der Zellen konnten diese dann in vier bis fünffacher Dichte der Monolage auf Elastomersubstrate ausgebracht werden. Daraufhin adhärten die Zellen zunächst auf dem Fibronectin-beschichteten Substrat, bevor zwischen drei bis sechs Stunden nach Aussaat eine direkte, interzelluläre Adhärenz der vorher in Suspension vorliegenden Zellen auftrat. So konnte das Modellsystem bereits nach 24 h für die folgenden Analysen und Dehnungsexperimente eingesetzt werden. Die Verweilzeit der Keratinozyten auf dem Elastomersubstrat wurde auf diese Weise bei insgesamt vergleichbarer Kalzium-Inkubationsdauer reduziert.

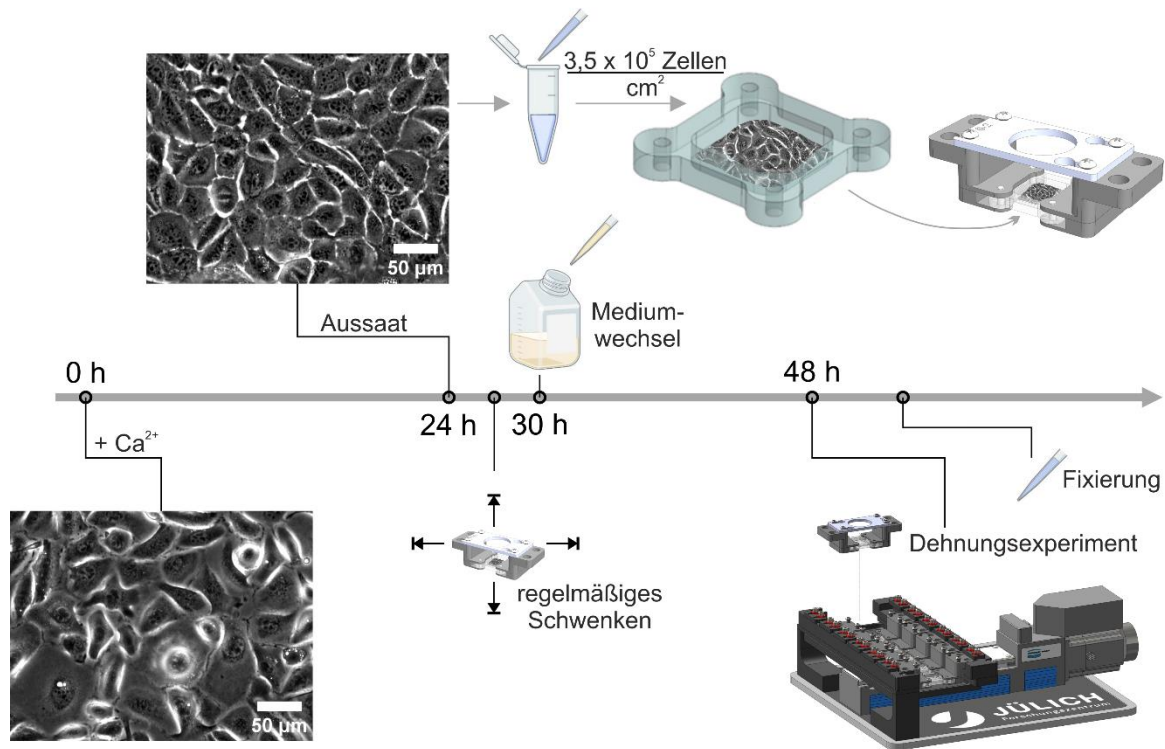


Abbildung 14: Schema des angepassten Protokolls zur Generierung eines dehnbaren *in-vitro* Epidermismodells. Die Ausbildung interzellulärer Kontakte wurde bei murinen Keratinozyten auf routinemäßig verwendetem Zellkulturplastik durch Zugabe von 1,8 mM Kalziumchlorid für 24 h initiiert und so die *in-vitro* Differenzierung unter submersen Bedingungen eingeleitet. Nach enzymatischer Delamination und Vereinzelung wurden die Zellen in hoher Dichte auf Fibronektin-beschichteten Elastomeroberflächen zur Dehnungsanalyse ausgebracht. Nach einer Adhärenz- und Inkubationsphase von 24 h waren nachfolgende mechanobiologische und immunzytochemische Anwendungen möglich.

3.1.2 Dreidimensionale Charakterisierung des entwickelten Epidermismodells

Das vorgestellte, angepasste Protokoll verhinderte eine vorzeitige Delamination primärer, initial-differenzierender Keratinozyten vom Elastomer innerhalb des Untersuchungszeitraums. Eine anschließende Fixierung und immunzytochemische Färbung bestätigte den mehrlagigen Aufbau durch orthogonale Anordnung konfokalmikroskopischer Aufnahmen (Z-Bildstapel) in drei bis fünf unterscheidbare Zellschichten [Abbildung 15]. Dabei wiesen die Zellkerne der basalen Zelllage die dichteste Organisation auf, während die Zellkerne zur apikalen Seite tendenziell eine abgeflachtere Form zeigten. Aufgrund des Einschlusses durch aufliegende Zellen fanden sich auch kleinere, durch DAPI angefärbte Fragmente apoptotischer Zellen in der basalen Schicht. Abgesehen von diesem *in-vitro* Artefakt waren die Keratinozyten aller Lagen auch nach längerer Kultivierungszeit vital. In räumlicher Nähe zum Substrat bildeten die Zellen darüber hinaus deutlich erkennbare Aktin-Faserbündel aus. Dagegen lag das Aktin-Zytoskelett suprabasaler Zellen als Netzwerk im Kortex lokalisiert vor. Vergleichbare Bündel konnten hier nicht gefunden

werden. Die Signalintensität des F-Aktins in der orthogonalen Ansicht deutete außerdem auf ein graduell dichteres kortikales Aktin-Netzwerk apikaler Zellen im Vergleich zur basalen Zellschicht hin.

Interessanterweise konnte das TJ-assoziierte Protein ZO-1 an Zellgrenzen basaler und suprabasaler Keratinozyten kaum detektiert werden. Dagegen wurde ZO-1, das als früher Marker reifender TJs gilt, jedoch in die äußerste Zellkontaktfläche des mehrschichtigen Modells rekrutiert [Abbildung 15]. Hier zeigte sich ein lineares, interzelluläres Signal an der äußersten, apikalen Seite, die die Zellschicht zum Medium hin abgrenzt Aufgrund erster phänotypischer Ähnlichkeiten zur Epidermis wurde das vereinfachte Epidermaläquivalent nachfolgend als SEE (*engl. Simplified Epidermis Equivalent*) bezeichnet und eingehender charakterisiert.

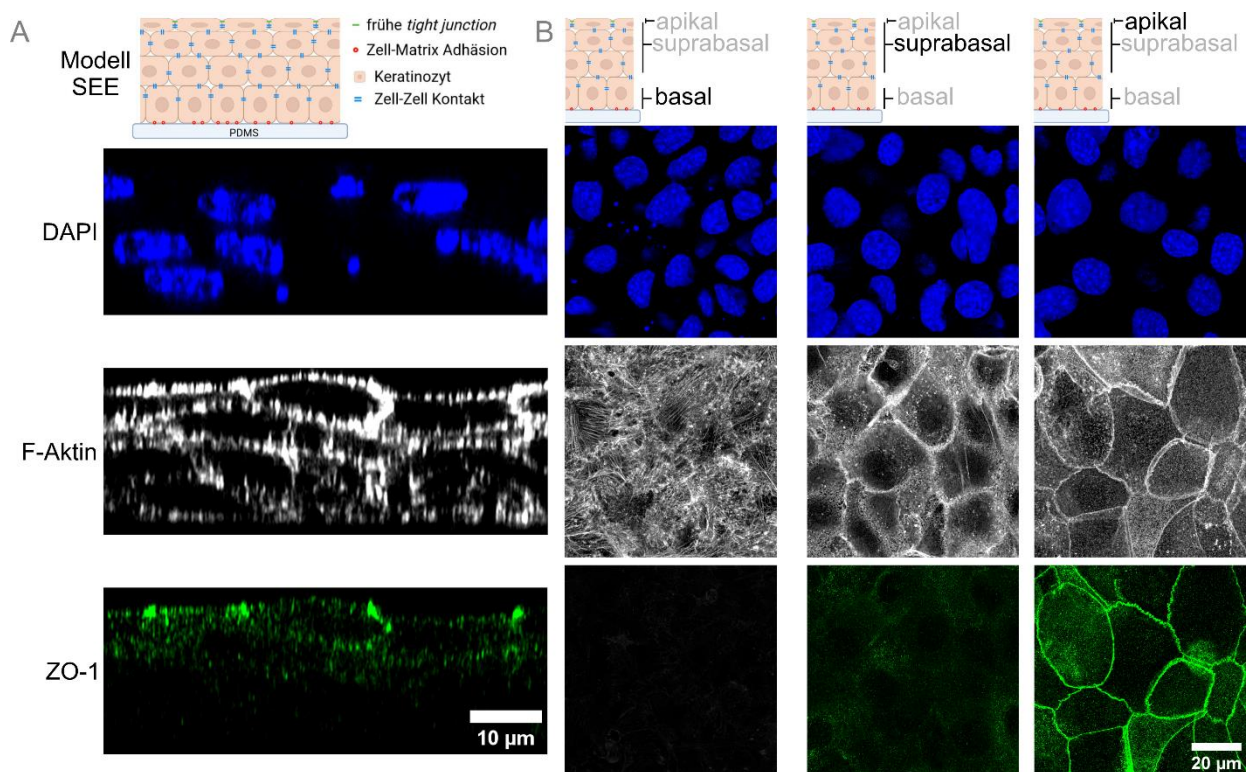


Abbildung 15: **Dreidimensionaler Aufbau des vereinfachten Epidermaläquivalents auf Elastomer.** Das skizzierte Modell, genannt SEE (*engl. Simplified Epidermis Equivalent*), war in drei bis fünf Zellschichten auf elastischem PDMS-Silikon organisiert (angedeutet durch Schema und orthogonale Z-Projektion des konfokalen Bildstapels) [A]. Dabei wies das Aktin-Zytoskelett schichtenabhängige Unterschiede in Struktur und Intensität auf. Das TJ-assoziierte Protein ZO-1 konnte ausschließlich in den äußersten Kontaktflächen der apikalen Zellen nachgewiesen werden [B].

Hierbei zeigte sich, dass die beobachteten Aktin-Faserbündel der basalen Keratinozyten an ihren Enden mit dem Protein Paxillin kolokalisiert vorlagen, welches Bestandteil der Fokaladhäsionen (*engl. Focal Adhesions, FAs*) ist [Abbildung 16]. Das Fibronektin-beschichtete Substrat lag somit über mechanosensitive FAs in Verbindung mit kontraktile Stressfasern der Basalzellschicht vor.

Aktin-Bündel in räumlicher Nähe zum basalen Substrat wurden aufgrund dessen im Verlauf dieser Arbeit als Stressfasern definiert. Im Gegensatz zu Konfokalebene(n) (im Folgenden auch nur Ebenen genannt) der Zell-Substrat-Grenzfläche waren in höheren Ebenen ausschließlich Proteine der interzellulären Verbindungen detektierbar. Suprabasale Zellen wiesen an Grenzflächen zu benachbarten Zellen in allen räumlichen Richtungen punktförmige Desmosomen auf. Diese wurden über das Adapterprotein Desmoplakin I detektiert, das den desmosomalen Haftkomplex mit Keratinfilamenten verknüpft. Im mikroskopischen Bild lag das zelltypische Keratin-Netzwerk dabei zytoplasmatisch mit erhöhter Dichte sowohl in direkter Umgebung des Zellkerns als auch in der Peripherie unterhalb der Zellmembran vor [Abbildung 16].

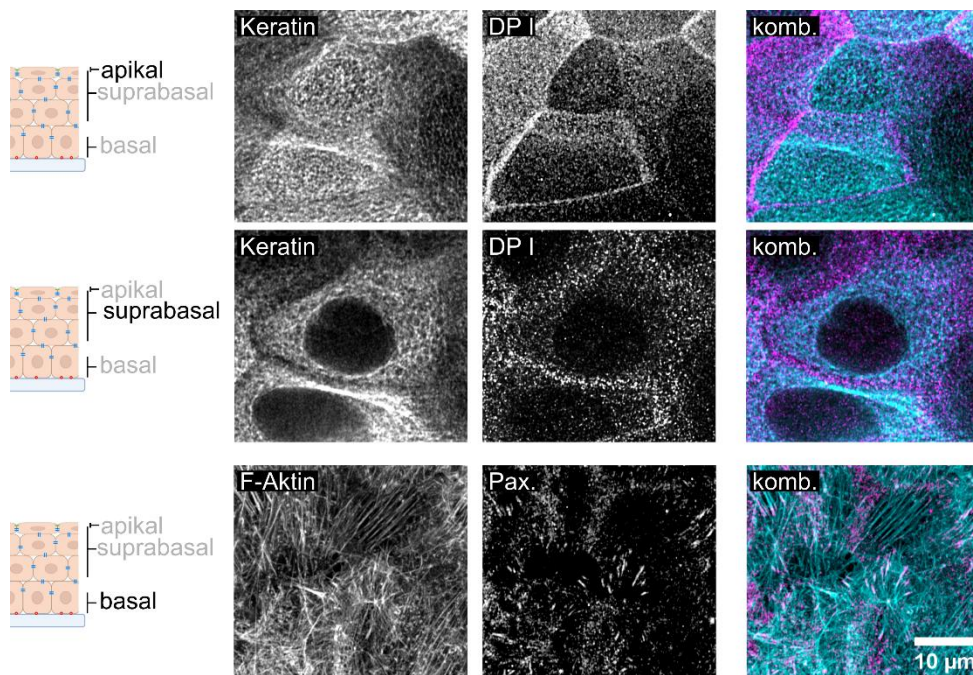


Abbildung 16: **Lageabhängigkeit der Zellkontaktstrukturen im SEE.** Zur Bestimmung der dreidimensionalen Organisation der Zellkontakte wurden mehrschichtige SEEs immunzytochemisch gefärbt und konfokalmikroskopisch aufgenommen. Im Z-Bildstapel konnte eine dreidimensionale, punktförmige Ausbildung von Desmosomen, die durch Markierung des Desmoplakin I (DP I) visualisiert wurden, nachgewiesen werden. Das FA-Protein Paxillin (Pax.) wurde nur an Enden von Aktin-Bündeln in räumlicher Nähe zum Substrat beobachtet. Das Schema deutet Lokalisation der Aufnahmeebenen an.

Ein kennzeichnendes Merkmal der polaren Epidermis ist die Abgrenzung einer proliferierenden Basalzellschicht von Zyklus-arretierten Zellen der suprabasalen Schichten. Zur Auswertung der Teilungsaktivität im mehrlagigen Modell wurden zufällig ausgewählte und über die Fläche des SEE verteilte Bildausschnitte herangezogen. Die Anordnung kondensierter DNA in der Äquatorialebene bei gleichzeitiger Bildung des Tubulin-Spindelapparats erlaubte die zweifelsfreie Identifikation einzelner Keratinozyten, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der späten Pro- oder Metaphase der Mitose befanden [Abbildung 17 A]. Dabei konnte in 14 von

48 zufälligen Bildfeldern mindestens eine mitotische Zelle gefunden werden. Jede dieser Zellen stand aufgrund ihrer räumlichen Lage in Kontakt zum Substrat und gehörte der basalen Schicht an. In keinem der konfokalen Bildstapel lagen damit derartige Zellteilungsereignisse bei Keratinozyten vor, die den suprabasalen Schichten zuzuordnen waren [Abbildung 17 B]. Bei nicht-mitotischen Keratinozyten aller Schichten lag das Netzwerk aus Mikrotubuli in dezentraler, zytoplasmatischer Organisation verteilt vor.

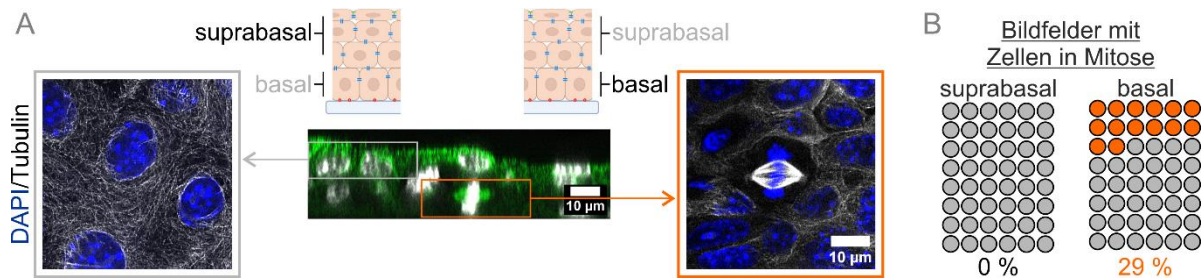


Abbildung 17: **Teilungsaktivität der Keratinozyten im SEE.** Der Aufbau der Spindelfasern und die äquatoriale Anordnung kondensierter DNA ermöglichten die Identifikation mitotischer Zellen im fixierten Modell (oranger Ausschnitt). Dagegen befand sich das Netzwerk aus Mikrotubuli bei Zellen im Zellzyklusarrest bzw. der Interphase in dezentraler Organisation (grauer Ausschnitt) [A]. Auf diese Weise konnten in Z-Stapeln von 48 zufällig ausgewählten Bildfeldern (graue Kreise) die mitotischen Teilungsereignisse (orange Kreise) in Abhängigkeit der räumlichen Lage bestimmt werden [B].

Im vorgestellten SEE liegen suprabasale Zellen ausschließlich in direkter mechanischer Kopplung der Zytoskelette über membranständige Zell-Zell-Kontaktstrukturen vor. Im Gegensatz zu etablierten und gut charakterisierten Dehnungsuntersuchungen mit Monolagen und Einzelzellen im PDMS-basierten Kammersystem (Noethel *et al.*, 2018; Püllen *et al.*, 2022) besteht hier nur bei basalen Keratinozyten eine Anbindung an das unter zyklischer Dehnung stehende Substrat. Inwiefern eine Dehnung durch das integrierte zytoskelettale System über Zellschichten hinweg kommuniziert wird, musste somit zunächst anhand einer Analyse des Deformationsfeldes überprüft werden.

Hierzu wurden Silikonkammern verwendet auf deren Oberfläche fluoreszierende Partikel im Größenbereich weniger hundert Nanometer kovalent gebunden wurden. Anschließend konnte die Dehnung, die durch instrumentelle Längenänderung an einer Achse angelegt wurde, sowohl an der basalen Kammeroberfläche anhand der Partikelverschiebung [Abbildung 18 B] als auch mittels Differentialinterferenzkontrast an der apikalen Zelloberfläche bestimmt werden [Abbildung 18 A].

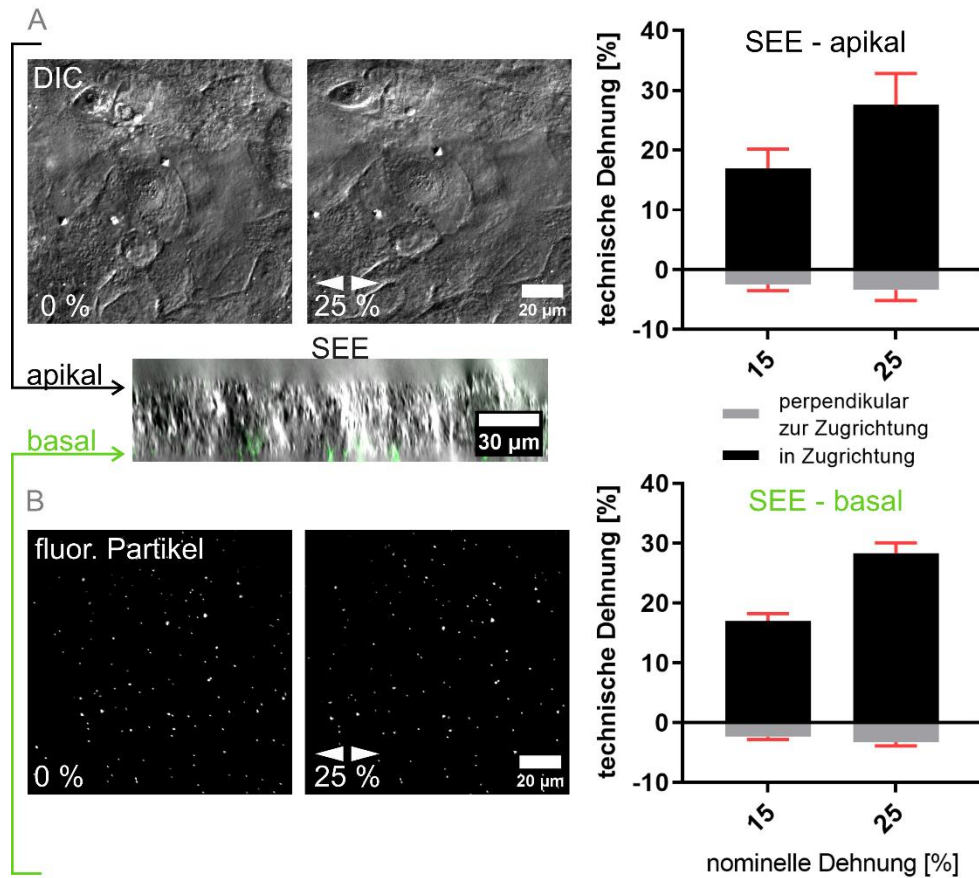


Abbildung 18: Kalibrierung des Deformationsfeldes im mehrlagigen SEE unter uniaxialer Dehnung. Kovalent gebundene Partikel ermöglichten durch einen fluoreszierenden Farbstoff die Bestimmung der Deformation an der basalen Elastomeroberfläche [B]. An der apikalen Zelloberfläche wurde die Dehnung in Zugrichtung (angedeutet durch weiße Pfeile) und perpendikular zur Zugrichtung mittel Differentialinterferenzkontrastmikroskopie (DIC) ermittelt [A]. Angegeben ist die mittlere Dehnung einschließlich Standardabweichung (rote Balken) aus 130 Auswertungsausschnitten (basal) bzw. 102 Ausschnitten (apikal) aus mindestens drei unabhängigen Dehnungsversuchen.

Dabei konnte die Deformation des Elastomers nahezu verlustfrei ebenso an der durchschnittlich etwa 22 μm höher liegenden Zelloberfläche beobachtet werden. Die Querkontraktion des Elastomers lag bei einer Dehnung in instrumenteller Zugrichtung von 16,9 % aufgrund der speziellen Kammergeometrie [siehe auch Kapitel 2.8.2] bei -2,4 %. Dieses uniaxiale Deformationsfeld wurde mit einer Querkontraktion von -2,5 % bei ebenfalls 16,9 % Längsdehnung auch an apikaler Seite beobachtet. Auch bei höherer Dehnungsamplitude des basalen Substrats von 28,4 % konnte eine vergleichbare Dehnung der oberen Zelllage von 27,5 % ermittelt werden (Querkontraktion: basal -3,3 %, apikal -3,4 %) [Abbildung 18]. Außerdem wurde im Verlauf der manuellen Nachfokussierung und Einstellung der Bildstapelgrenzen mit zunehmender Dehnung, eine abnehmende Schichtdicke (Änderung in Z-Richtung) des SEEs festgestellt. Repetitive Messungen der Positionen zeigten darüber hinaus, dass die Deformation bei Rückkehr zum Ausgangswert jeweils auch zur Ursprungsgeometrie zurückkehrte.

3.1.3 Vergleich mechanischer Eigenschaften des SEE mit nativem Hautgewebe

Unter hohen Dehnungsamplituden ($> 40\%$) werden die mechanischen Eigenschaften der Haut von der zunehmend parallelen Ausrichtung und Streckung sowie dem anschließenden Gleiten der dermalen Kollagenfasern bestimmt. Das Fasernetzwerk der Dermis verleiht dem Gewebe durch eine dehnungsabhängige Versteifung ein J-förmiges Verhalten im Spannungs-Dehnungs-Diagramm klassischer Zugprüfungen und seine beachtliche Reißfestigkeit (Yang *et al.*, 2015). Geringere Dehnungsamplituden, die im physiologischen Kontext vermutlich häufiger auftreten, beeinflussen auf dermalen Ebene vordergründig die gel-artige Grundsubstanz, während die eingebetteten Faserproteine ihre entspannte Struktur und zufällige Orientierung beibehalten (Eshel und Lanir, 2001; Yang *et al.*, 2015). Darüber hinaus ist anzunehmen, dass die multizelluläre, verhornte Epidermis gerade unter physiologischer Belastung ebenfalls zu den mechanischen Eigenschaften beiträgt.

Mithilfe eines neu entwickelten Testsystems zur Dehnungsanalyse vitaler Gewebe, das die Aufzeichnung auftretender Kräfte unter Dehnung in kontrollierter, wässriger Umgebung ermöglicht (nachfolgend auch Gewebedehner genannt), erfolgte deshalb ein direkter Vergleich des SEE mit *ex-vivo* Proben adulter und fötaler Vollhaut aus Ratten.

Die drei zur Analyse im Gewebedehner verwendeten Modellgewebe unterschieden sich dabei stark in ihrer Querschnittsfläche, Komplexität und Zusammensetzung und wurden unter bestmöglicher Vermeidung mechanischer Belastung und Veränderung präpariert. Während adulte Rattenhaut eine EZM-reiche Dermis von etwa $1500\ \mu\text{m}$ ($n=16$) sowie verhornte Epidermis von zusätzlich etwa $50\ \mu\text{m}$ Dicke aufwies, lag die dermo-epidermale Schichtdicke der embryonalen, unverhornten Epidermis bei unter $300\ \mu\text{m}$ ($n=14$). Dabei unterschied sich die dermale Zusammensetzung der aus Tag 18 der Embryonalentwicklung (E18) stammenden Hautproben u.a. im Grad der Kreuzvernetzung sowie dem Anteil fibrillärer Proteine und dermalen Fibroblasten von vollständig entwickelter Haut der erwachsenen Tiere. Beide Entwicklungszustände der Rattenhaut wurden in $5\ \text{mm}$ breite Probestücke präpariert. Das nahezu EZM-freie SEE wies eine mittlere Schichtdicke von $22\ \mu\text{m}$ auf ($n=17$) und wurde für die Analysen im Gewebedehner vom Elastomersubstrat gelöst. Die SEE wurden in vollständiger Breite von $20\ \text{mm}$ nach zweifacher Faltung im Gewebedehner eingesetzt.

3.1. Etablierung eines mehrlagigen Epidermismodells zur zyklischen Dehnungsanalyse

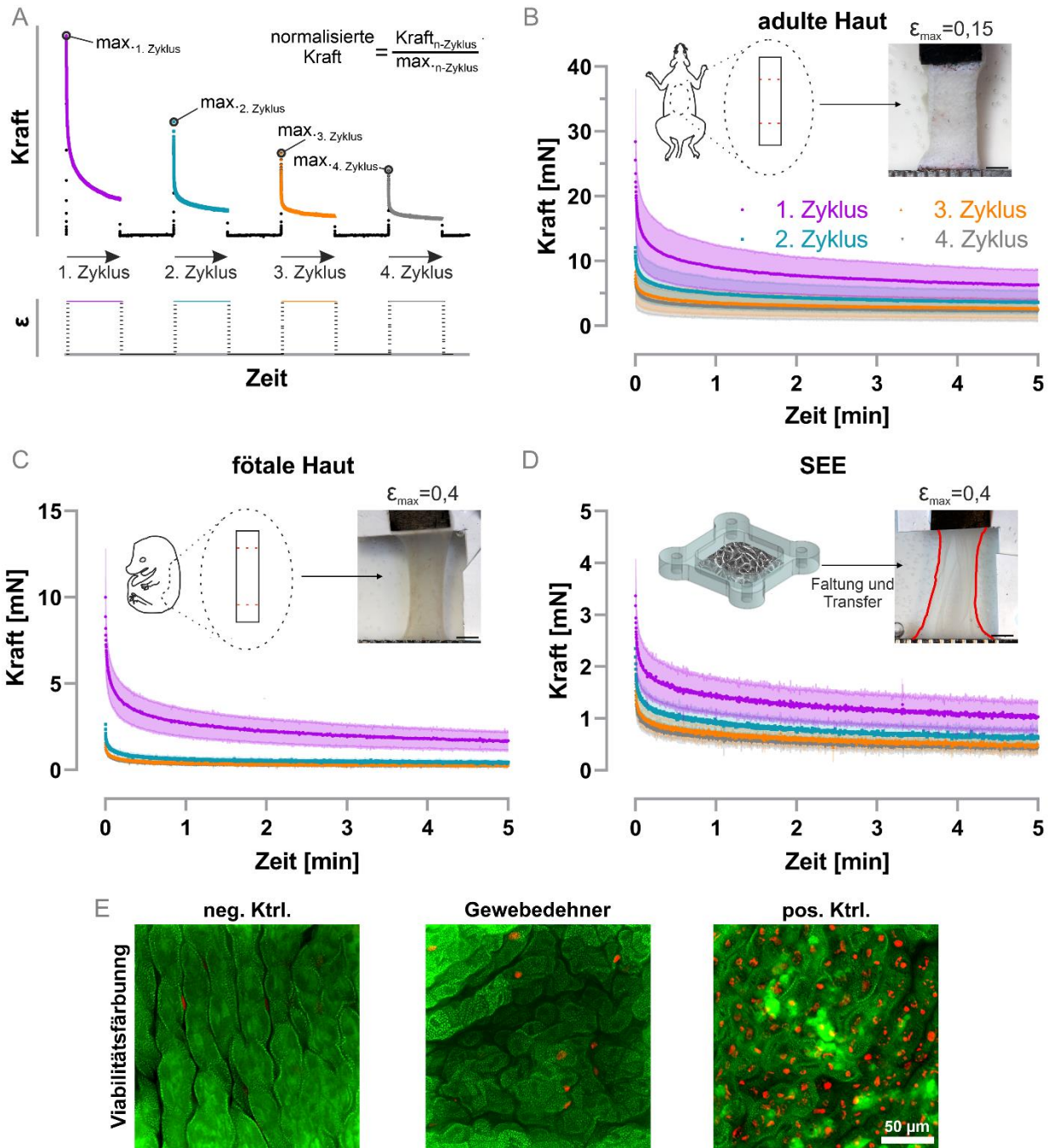


Abbildung 19: **Vergleich der Kraftrelaxation während repetitiver statischer Dehnung.** Die Modellgewebe unterschiedlicher Komplexität wurden nach Einbau in sich 4-mal wiederholenden Zyklen 60 min in Dehnungsposition gehalten und anschließend für weitere 60 min zur Ausgangsposition versetzt. Dabei wurden die resultierenden Kräfte kontinuierlich mit einer Rate von 10 Hz gemessen [A]. Für alle Zyklen wurden der initiale Kraftabfall der ersten 5 min für jedes Gewebe aufgetragen (dunkel: Mittelwert, hell: Standardabweichung, fötale Haut: $n=3$, adulte Haut und SEE: je $n=4$) [B-D]. Eine Färbung der fötalen Epidermis mit Fluoresceindiacetat (grün, lebend) und Ethidiumbromid (rot, tot) veranschaulichte die Biokompatibilität des Gewebedehners [E].

Zur Charakterisierung der mechanischen Eigenschaften wurden die Gewebe in vier aufeinanderfolgenden Zyklen für jeweils eine Stunde statisch unter Dehnung gehalten und anschließend für eine weitere Stunde entspannt [Abbildung 19 A]. Dabei wurde die maximal auftretende Kraft aller Proben unmittelbar nach Anlegen der ersten Dehnung erreicht. Unter Berücksichtigung der Querschnittsfläche konnte davon ausgegangen werden, dass mit Beginn des Zugversuchs eine vergleichbare Gewebespannung in den unterschiedlichen Präparaten auftrat. Die Dehnungsamplitude wurde so gewählt, dass zum einen die Messung der auftretenden Kräfte bei derart unterschiedlich aufgebauten Hautgeweben im gleichen apparativen Aufbau möglich ist und zum anderen eine durch die Grundsubstanz- und nicht Kollagenfaser-dominierte mechanische Antwort vorlag. Hierzu wurde eine Amplitude von 40 % für fötale Haut und SEEs sowie 15 % für adulte Haut angewandt. In zusätzlichen Kontrollexperimenten wurde unter Verwendung einer weiteren Kraftmessdose mit geringerer Empfindlichkeit und höherem Messbereich ein vergleichbares Verhalten bei unterschiedlichem absolutem Kraftniveau für 15 % und 40 % beobachtet.

Die anschließende Spannungsrelaxation erfolgte in einer ersten schnellen Phase, in der nach 5 min noch 30 % (adulte Haut), 17 % (fötale Haut) und 28 % (SEE) des initialen Maximalwerts gemessen werden konnten, und einer nachfolgenden deutlich langsameren, zweiten Relaxationsphase [Abbildung 19 B-D]. Ein stabiler Wert wurde jedoch auch nach einer Stunde unter Dehnung nur bei fötalem Gewebe erreicht. Da in den Wiederholungszyklen die gemessenen Kräfte der fötalen Haut aber auch innerhalb von Sekunden bis Minuten auf nahezu basale Werte abfielen, traten in der unvollständig entwickelten Dermis höchstwahrscheinlich primär plastische Effekte auf. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wies die E18 Rattenhaut auch die geringste Erholung der gemessenen Kräfte bei wiederholter Dehnung auf [Abbildung 20 B]. Haut der adulten Ratte zeigte zwar ebenfalls die deutlichste Veränderung vom ersten zum zweiten Dehnungszyklus, erholte sich aber in den Folgezyklen zu 70-80 % (3. Zyklus) bzw. 80-90 % (4. Zyklus) bezogen auf den vorherigen Maximalwert. Interessanterweise konnte für SEEs eine ebenso ausgeprägte, wenn auch nicht vollständige Erholung der gemessenen Kräfte bereits ab dem ersten Dehnungszyklus beobachtet werden [Abbildung 20 B]. Ferner wurde die Viabilität der fötalen Epidermis und der Keratinozyten des SEEs durch mikroskopische und durchflusszytometrische Messungen überprüft, um die Biokompatibilität des Messaufbaus für Keratinozyten zu verifizieren. Dabei konnte bestätigt werden, dass auch mehrstündige Zugversuche im Gewebedehner keinen übermäßigen Zelltod der epidermalen Zellen induzierten [Abbildung 19 E].

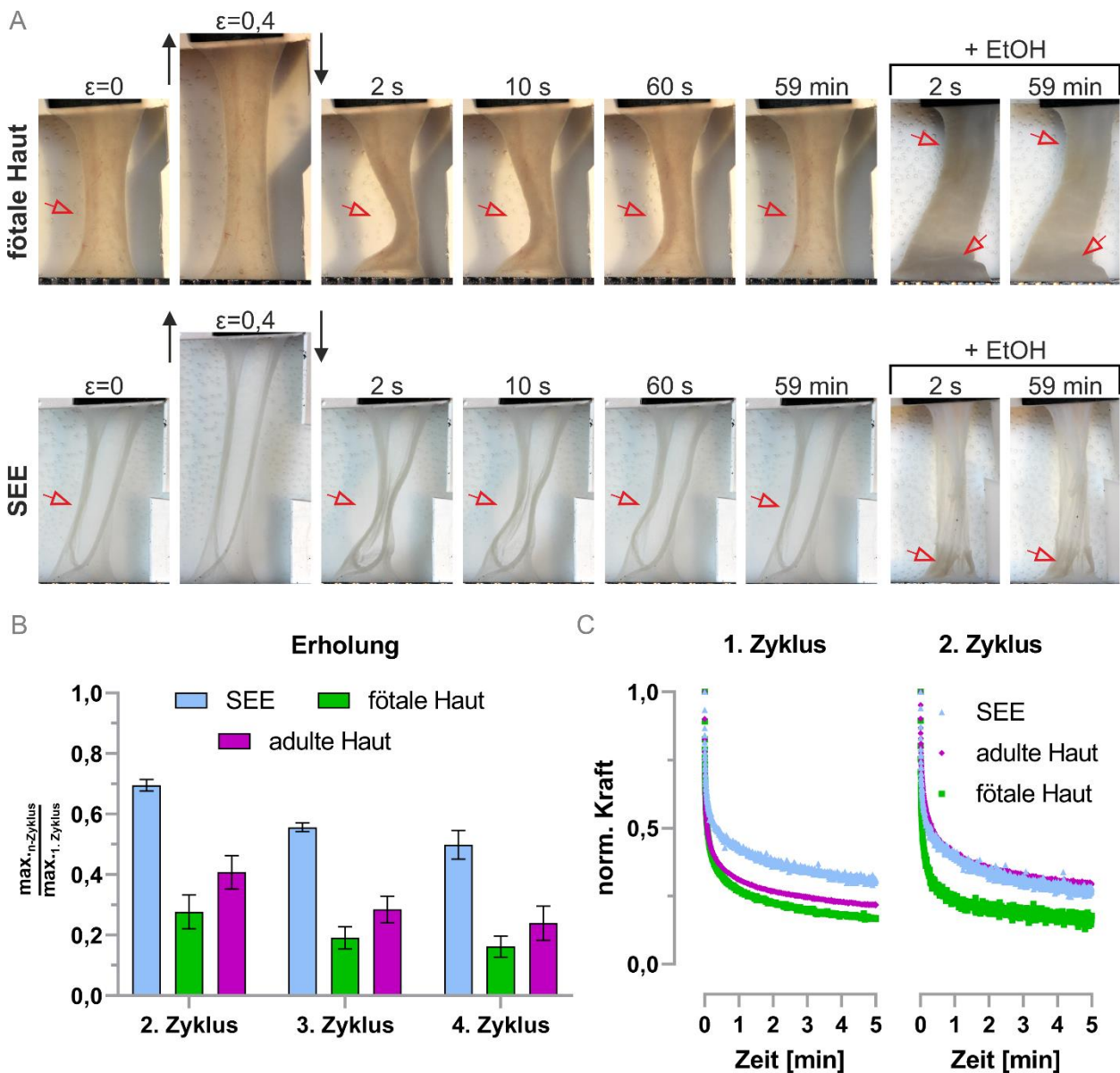


Abbildung 20: **Viskoelastische und viskoplastische Eigenschaften unter statischer Dehnung.** Aufnahmen auf der rechten Seite wurden während des Dehnungsprotokolls zu den angegebenen Zeitpunkten nach Rückkehr zur Ausgangsposition gemacht. Dabei zeigen die linken Aufnahmen die Gewebeabmessungen vor und während der Dehnung. Eine sichtbare Krümmung und anschließende Wiederherstellung der Gewebelänge (Verweis durch rote Pfeile) konnte reproduzierbar über alle Zyklen und unterschiedliche Proben beobachtet werden. Nach kurzer Denaturierung in EtOH erfolgte keine Wiederherstellung der Abmessungen [A]. Die Erholung der gemessenen Kraft bei Anlegen einer Dehnung nach 60 min in Ausgangsposition wurde als Verhältnis der Maximalkraft eines Zyklus durch die Maximalkraft der ersten Dehnung angegeben [B]. Eine vergleichende Betrachtung des Relaxationsverhaltens unterschiedlicher Gewebe wurde durch die Normalisierung der Kraftwerte eines jeden Zyklus zur initialen Maximalkraft desselben Zyklus ermöglicht [siehe schematisch Abbildung 19 A]. Nach Abschluss des 2. Zyklus war dabei keine Änderung des Verhaltens in den weiteren Folgezyklen zu beobachten [C]. Mittelwerte [B-C] und Standardabweichung [B] aus fötaler Haut: $n=3$ bzw. adulter Haut und SEE: je $n=4$ unabhängige Experimente.

Bei Rückkehr des Gewebedehners zur Ursprungsposition fiel die mechanische Spannung bei allen Zugversuchen und Zyklen auf die jeweiligen Ausgangswerte zurück. Dabei konnte insbesondere für SEE und fötale Haut beobachtet werden, dass die eingespannten Gewebe zunächst in Zugrichtung verlängert vorlagen und eine Krümmung aufwiesen. In der anschließenden Ruhephase wurde daraufhin unabhängig von der Anzahl der erlebten Zyklen eine Wiederherstellung der Ausgangslänge beobachtet [Abbildung 20 A]. Nach Denaturierung der Gewebe in Ethanol, erfolgte diese Erholung der Probengeometrie jedoch nicht mehr. Eine Längenänderung blieb in diesem Fall auch nach 60 min Ruhephase bestehen [Abbildung 20 A].

Die Normalisierung jedes Dehnungszyklus auf den initialen Maximalwert erlaubte darüber hinaus die vergleichende Betrachtung des Relaxationsverhaltens zwischen den Gewebeproben [Abbildung 20 C]. Dabei unterschied sich nur bei adulter Rattenhaut der erste Zyklus von den nachfolgenden Wiederholungszyklen. Bei fötaler Haut und SEE konnte hingegen ein unterschiedliches aber zwischen den Zyklen unverändertes Relaxationsverhalten beobachtet werden. Interessanterweise verhielt sich das zuvor mechanisch unbelastete, adulte Hautgewebe im ersten Zyklus wie unvollständig entwickelte Haut der Rattenembryos. Die normalisierte Relaxation aller nachfolgenden Zyklen entsprach hingegen dem Verhalten der EZM-freien SEE [Abbildung 20 C].

3.2 Zelluläre Adaption auf zyklische Dehnung im SEE und in Monolagen

3.2.1 Dehnungsinduzierte Reorientierung der Aktin-Faserbündel

Frühere Arbeiten konnten bereits zeigen, dass die Ausbildung interzellulärer Verbindungen einen verstärkenden, kooperativen Einfluss auf die dehnungsinduzierte Parallelisierung und Ausrichtung der Aktin-Stressfasern epidermaler Monolagen hat (Noethel *et al.*, 2018). Die Stressfasern orientierten sich hierbei nach Anlegen zyklischer Dehnung weg von der Zugachse. Das SEE bot nun die Möglichkeit die Zellantworten auf einen solchen Dehnungsreiz im mehrschichtigen Aufbau und im Vergleich zu parallel eingesetzten Monolagen zu untersuchen. Hierzu wurden die Keratinozyten in jeweiliger Dichte auf elastischen Silikonkammern mit einer Frequenz von 0,3 Hz und einer Amplitude von 15 % zyklisch gedehnt.

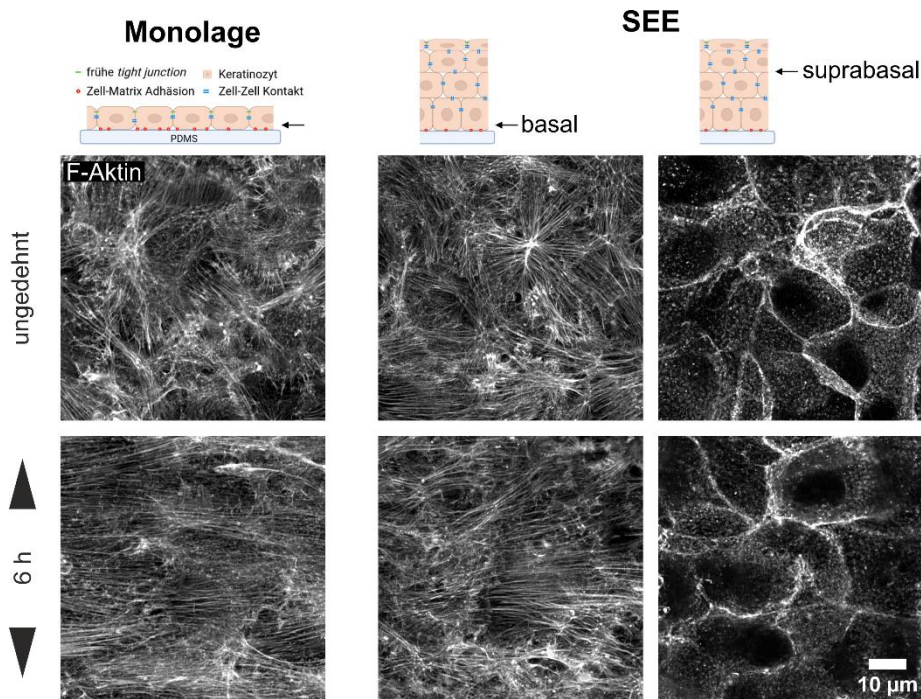


Abbildung 21: **Dehnungsinduzierte Reorientierung des F-Aktins in Monolagen und SEEs.** Einschichtige und mehrschichtige Keratinozyten wurden für 6 h einer zyklischen Dehnung von 15 % bei 0,3 Hz ausgesetzt. Nachfolgend wurden die Zellen fixiert, gegen F-Aktin gefärbt und konfokalmikroskopisch aufgenommen. Die dargestellten Aufnahmeebenen sind jeweils im oberen Schema angedeutet und die uniaxiale Zugrichtung durch schwarze Pfeile angegeben.

In mechanisch unbeanspruchten Proben lag das Aktin-Zytoskelett der basalen Keratinozyten mit Kontakt zum Substrat unabhängig von der Anwesenheit einer zusätzlichen, apikalen Zellschicht in Stressfasern organisiert vor [Abbildung 21]. Diese endeten häufig im Randbereich einzelner Zellen. Innerhalb der dichten Zelllage waren die Fasern dabei in alle Richtungen orientiert. Das Anlegen einer uniaxialen Dehnung über 6 h führte zur deutlichen, parallelen Umstrukturierung

der Stressfasern. Sowohl in Monolagen als auch basalen Zellen der SEEs war eine dehnungsinduzierte Ausrichtung zu beobachten. Dabei orientierten sich die Stressfasern in einer näherungsweise quer zur Zugrichtung verlaufenden Achse. Ein zum Teil sehr ähnlicher Orientierungswinkel angrenzender Zellen ließ in Monolagen den optischen Eindruck zellübergreifender Fasern erwecken und legte eine direkte, mechanische Einbindung der Zell-Zell-Kontakte nahe. In basalen Zellen der SEE waren ebenfalls ähnliche Winkel benachbarter Zellen zu finden. Die zellübergreifende Orientierung schien hier über die Fläche jedoch etwas weniger einheitlich und zusätzlich durch das Auftreten eingeschlossener Zellfragmente unterbrochen. Oberhalb der basalen Ebenen lag das Aktin-Zytoskelett im Kortex lokalisiert vor. Durch die Technik der lichtmikroskopischen Konfokalmikroskopie werden im filamentösen und verzweigten Aktinkortex vorwiegend Strukturen mit höherer Signalintensität dargestellt. Das Netzwerk aus Aktomyosin unterschiedlicher Dichte ließ sich in konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen dadurch als submembrane, dreidimensionale Verteilung aus punktförmigen und kurzfasrigen F-Aktin-Anhäufungen abbilden [Abbildung 21]. Durch zyklische Dehnung konnte tendenziell eine Orientierung der Zellkörper anhand der Aktin-markierten Zellgrenzen in ebenfalls perpendikularer Zugrichtung beobachtet werden. Sowohl ohne mechanische Belastung als auch nach Anlegen des extrinsischen Stimulus konnten innerhalb der suprabasalen Zellschichten keine zur basalen Ebene vergleichbaren Faserstrukturen beobachtet werden. Das Auftauchen kontraktile und Zellkontakt-assoziiierter Stressfasern wurde in Keratinozyten ohne Substratkontakt auch nach mehrstündiger Dehnung nicht induziert [Abbildung 21].

Die Quantifizierung der F-Aktin-Orientierung mithilfe einer Strukturtensor-basierten Analyse ermöglichte die Auswertung der dehnungsinduzierten Reorientierung zu verschiedenen Zeitpunkten. Dabei wurde ein Gitter aus Quadraten entsprechend der mittleren Zelldichte zur Unterteilung der Zellschicht in auswertbare Einzelzellen eingesetzt und der Hauptorientierungswinkel für jedes zelläquivalente Quadrat bestimmt. Während in ungedehnten Proben eine Gleichverteilung der auftretenden Winkel und damit ein linearer Zusammenhang bei Auftragung als kumulierte Häufigkeit zu beobachten war, induzierte bereits eine Dehnung über 30 min in Monolagen eine signifikante Verschiebung der Winkelhäufigkeiten, sodass 56 % der Zellen einen Winkel in 80-90° zur Zugrichtung zeigten [Abbildung 22]. Dieser Reorientierungsprozess äußerte sich zeitabhängig, da durch längere Dehnung eine weitere Verschiebung und Verengung der Winkel auf 77 % der Zellen im Intervall 80-90° erfolgte. Da eine zyklische Dehnung über 12 h jedoch zu keiner weiteren Veränderung gegenüber einer

Belastung über 6 h führte, war davon auszugehen, dass das Aktin-Zytoskelett unter den angewandten Parametern innerhalb von 6 h einen stabilen Orientierungszustand und damit erneute mechanische Homöostase erreicht hatte. Eine ähnliche zeitabhängige Verschiebung der Hauptorientierungswinkel zur Dehnungsachse konnte auch für basale Zellen der SEE ermittelt werden [Abbildung 22]. An der zellulären Kontaktebene zum elastischen Substrat waren dabei ebenfalls eine signifikante Umstrukturierung der Stressfasern nach 30 min und eine maximale Reorientierung unter Dehnung nach 6 h zu beobachten. Hier traten an der basalen Seite des mehrschichtigen Systems im Gegensatz zum einschichtigen Modell auch nach längerer Dehnung weiterhin Hauptorientierungswinkel $< 60^\circ$ auf. Nach dehnungsinduzierter Ausrichtung konnten 54 % der basalen Zellen mit einem Hauptorientierungswinkel im Intervall $80-90^\circ$ ermittelt werden.

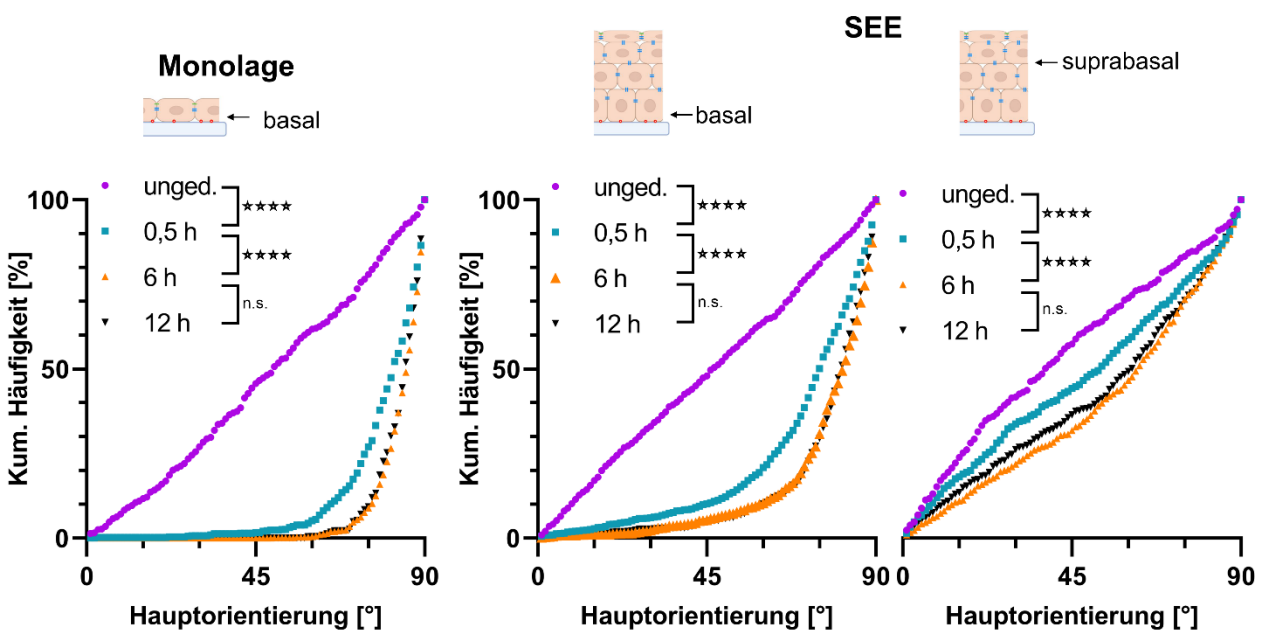


Abbildung 22: **Quantitative und lageabhängige Auswertung der Aktin-Stressfaserorientierung.** Monolagen und SEEs wurden über die angegebenen Zeiträume mit einer Frequenz von 0,3 Hz und einer Amplitude von 15 % gedehnt. Zur Bestimmung des Hauptorientierungswinkels je Zelle wurde ein quadratisches Gitter entsprechend der mittleren Zelldichte über die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen weniger Ebenen (im Schema oberhalb angedeutet) gelegt und die Winkel jedes zelläquivalenten Quadrats mittels Strukturtensor-basierter Bildverarbeitung ermittelt. Monolage unged.: $n=521$, 0,5 h: $n=544$, 6 h: $n=663$, 12 h: $n=225$; SEE basal unged.: $n=821$, 0,5 h: $n=1123$, 6 h: $n=878$, 12 h: $n=783$; SEE suprabasal unged.: $n=540$, 0,5 h: $n=828$, 6 h: $n=648$, 12 h: $n=576$.

In konfokalmikroskopischen Aufnahmen suprabasaler Zellen lagen unabhängig von der Dauer der zyklischen Dehnung keine vergleichbaren Aktin-Faserbündel vor. Die Auswertung mittels Strukturtensor-basierter Bildverarbeitung zeigte in suprabasalen Ebenen eine signifikante, dehnungsinduzierte Abweichung der ermittelten Winkel [Abbildung 22]. Ein Vergleich zwischen 6 h und 12 h deutete auch hier auf das Auftreten eines Gleichgewichts innerhalb von 6 h zyklischer Dehnung hin.

Für die gewählte gitterbasierte Auswertungslösung mittels Strukturtensor ist jedoch die Erkennung zusammenhängender Faserstrukturen grundlegend. Signalschwächere und unzusammenhängende Strukturen werden im Verlauf der Bildverarbeitung nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund wurde der errechnete Hauptwinkel suprabasaler Ebenen von der signalintensiven Zellgrenze dominiert und weniger durch einen flächenmäßig größeren Anteil an kortikalem Aktin bestimmt. Die in den quantitativen Daten angedeutete Ausrichtung im epidermalen Gewebe könnte damit eher durch eine Längsachsenorientierung der ellipsoiden Zellen als durch zelldurchspannende Aktin-Bündel gegeben sein.

3.2.2 Ausrichtung apikaler Zellgrenzen unter Dehnung

Da die Analyse des F-Aktins suprabasaler Ebenen auf die zelluläre Orientierung der Zellkörper hindeutete, wurde nachfolgend die dehnungsinduzierte Umstrukturierung apikaler Zellgrenzen näher betrachtet. In SEEs konnte der frühe TJ-Marker ZO-1 nur in den äußersten Zellkontakten der apikalen Keratinozyten nachgewiesen werden [siehe auch Kapitel 3.1.2]. Die sich daraus ergebene Möglichkeit der Zellumrandung ließ die Bestimmung der Längs- bzw. Hauptachsenorientierung einzelner Zellen auf der Oberfläche des SEE zu [Abbildung 23 A].

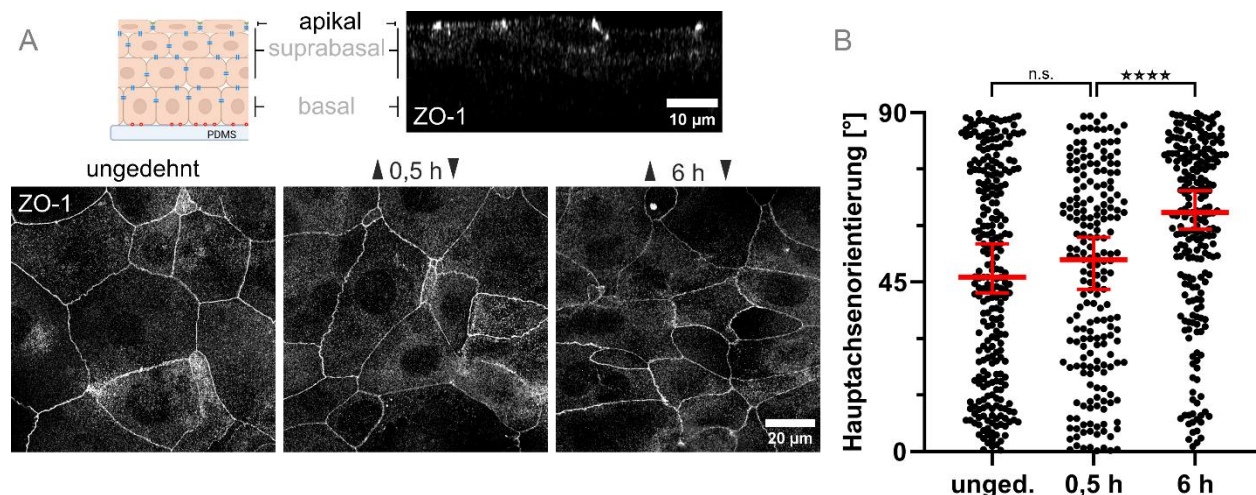


Abbildung 23: **Dehnungsinduzierte Ausrichtung apikaler Zellen im SEE.** Die definierte Begrenzung des ZO-1-Signals an apikalen Zellkontakten ermöglichte die Identifikation einzelner Zellumrandungen auf der Oberfläche der potentiell unter Dehnung gesetzten SEEs [A]. Durch Einpassen einer Ellipse wurde die Hauptachsenorientierung zur Zugrichtung (entspricht einem Winkel von 0°, angedeutet durch schwarze Pfeile in [A]) einzelner Zellen im Modellgewebe bestimmt [B]. In roten Balken sind der Zentralwert und das entsprechende 95 %-Konfidenzintervall angegeben.

Während die Zellorientierung in Abwesenheit mechanischer Belastung zufällig vorlag, erfolgte durch das Anlegen zyklischer Dehnung eine Reorientierung der Zellen im epidermalen Verbund. Dabei zeigte sich, dass nach 6 h der Stichprobenmedian aus 228 Zellen bei einem

Hauptachsenwinkel von 64° zur Dehnungsrichtung (bei 0°) und damit signifikant über dem Zentralwert von 46° ($n=259$ Zellen) für ungedehnte SEEs lag [Abbildung 23 B]. Die Hauptachse apikaler Zellen orientierte sich unter Dehnung somit zunehmend quer zur Zugrichtung. Eine erste Umstrukturierung und Parallelisierung der Orientierungsrichtung schien dabei eventuell bereits nach 30 min anhand des mittleren Winkels von 51° erkennbar, wenngleich die Hauptachsenverschiebung zu diesem Zeitpunkt noch nicht signifikant unterschiedlich zur ungedehnten Kontrolle vorlag.

3.2.3 Einfluss zyklischer Dehnung auf die Zellkernausrichtung und Dichte

Der Zellkern ist das Zellorganell mit der höchsten Steifigkeit und aufgrund des sensiblen, dicht gepackten Inhalts besonders vor mechanischen Belastungen geschützt, da diese auch zu Defekten im Chromatin führen können (Nava *et al.*, 2020). Darüber hinaus liegt in adhärennten Zellen eine direkte mechanische Kopplung der Kernmembran an alle drei Zytoskelettklassen vor (Miroshnikova und Wickstrom, 2022). Unter Verwendung des DNA-interkalierenden Farbstoffs DAPI erfolgte deshalb im Rahmen dieser Arbeit die schichtenabhängige Betrachtung der Zellkerne.

In ungedehnten Monolagen und SEEs fanden sich sowohl Zellkerne mit einer runderen als auch einer länglichen Form (bzw. einem zweidimensionalen Aspektverhältnis von nahezu 1 und deutlich > 1). In basalen Ebenen der SEEs lagen die Zellkerne dabei in dichter Organisation vor als in Monolagen und suprabasalen Zellschichten [Abbildung 24]. Die bereits anhand des F-Aktins sporadisch vorgefundenen, eingeschlossenen Zellfragmente in basalen Ebenen des mehrschichtigen Modells konnten auch anhand kondensierter, fragmentierter DNA identifiziert werden. Eine zyklische Dehnung über 6 h führte jedoch nicht zu einer wahrnehmbaren Steigerung der apoptotischen Fragmente. Dagegen wurde jedoch sowohl in Monolagen als auch SEEs eine dehnungsinduzierte Änderung der Zellkernmorphologie beobachtet. Die Kerne aller Ebenen wiesen hierbei eine insgesamt länglich-gestreckte Form im Vergleich zu ungedehnten Kontrollen auf [Abbildung 24]. Darüber hinaus zeigte sich unabhängig von einer räumlichen Nähe zum Substrat in allen Ebenen eine annähernd quer zur Dehnungsachse ausgerichtete Parallelisierung der Zellkerne.

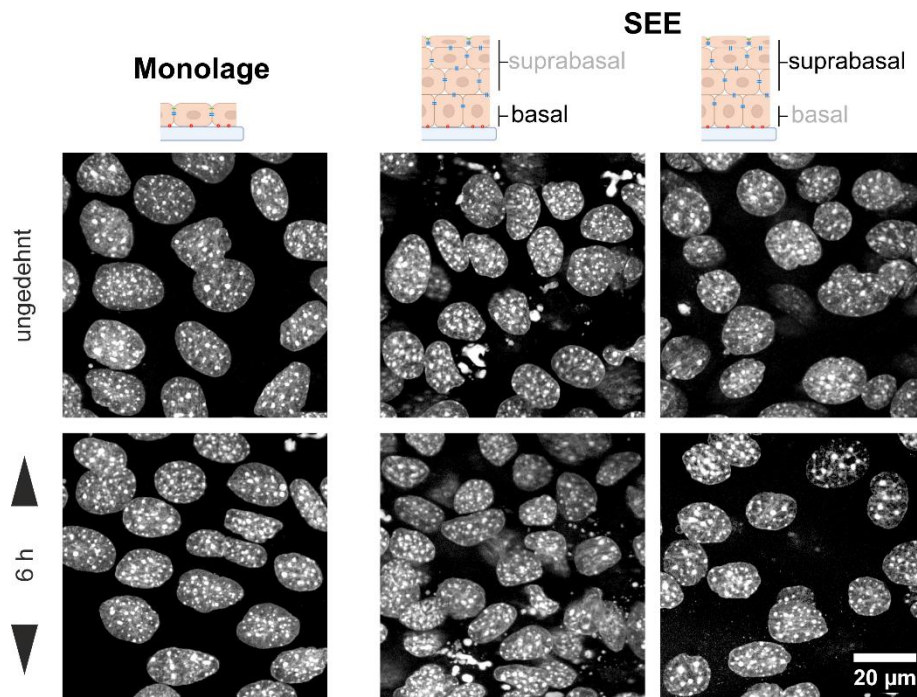


Abbildung 24: **Morphologie der Zellkerne in Monolagen und SEEs.** Die Darstellung der Kerne erfolgte durch den DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI in fixierten Proben und anschließender Konfokalmikroskopie. Monolagen und SEEs wurden zuvor zyklisch mit einer Frequenz von 0,3 Hz über eine Amplitude von 15 % gedehnt. Dargestellt sind jeweils maximale Intensitätsprojektionen (MIP) über wenige Ebenen der schematisch skizzierten Lage eines Z-Bildstapels. Die Zugrichtung ist durch schwarze Pfeile angedeutet.

Zur Quantifizierung dieser Ausrichtung wurde ein Programm zur Bildverarbeitung verwendet, das die zweidimensionale Fläche einzelner Kerne im Z-Bildstapel anhand des DAPI-Signals über mehrere Ebenen identifiziert und die Hauptachsenorientierung der flächenmäßig größten Ellipse bestimmt.

Dabei wurden unabhängig von der dreidimensionalen Organisation eine zufällige Verteilung der Orientierungswinkel und somit ein mittlerer Winkel um die 45° in ungedehnten Zellen vorgefunden. Bereits eine zyklische Dehnung über 30 min induzierte eine Umstrukturierung, die die Zellkerne weg von der uniaxialen Dehnungsachse ausrichtete [Abbildung 25]. Dieser Reorientierungseffekt war sowohl in den Schichten der SEEs als auch in Monolagen signifikant ausgeprägt. Hierbei konnte in gedehnten Monolagen mit 13° die stärkste Differenz der Zentralwerte gegenüber den ungedehnten Kontrollen ermittelt werden.

Durch längere Dehnung über einen Zeitraum von 6 h wurde die Ausrichtung in Richtung der quer zum Zug liegenden Achse sowohl in einschichtigen als auch mehrschichtigen Modellen weiterhin signifikant gesteigert. Hierbei traten vermehrt Winkel $> 60^\circ$ zur Zugrichtung auf, was zu einem mittleren Orientierungswinkel von etwa 71° in Monolagen und 59° in basalen bzw. 62° in suprabasalen Zellen der SEEs führte. Da eine Verdopplung des Dehnungszeitraums nahezu

keine weitere Verschiebung und Verengung der ermittelten Winkel zur Folge hatte (nicht signifikante Erhöhung der mittleren Orientierung um etwa 2°), ist vermutlich von der Einstellung eines Gleichgewichtszustandes nach einigen Stunden unter zyklischer Dehnung auszugehen. Dabei spielte es weder für die Effizienz noch für die Geschwindigkeit der Zellkernausrichtung eine Rolle, ob die Zellen Kontakt zum Substrat aufwiesen oder in suprabasalen Schichten nur durch interzelluläre Verbindungen mit ihren Nachbarn verbunden waren [Abbildung 25].

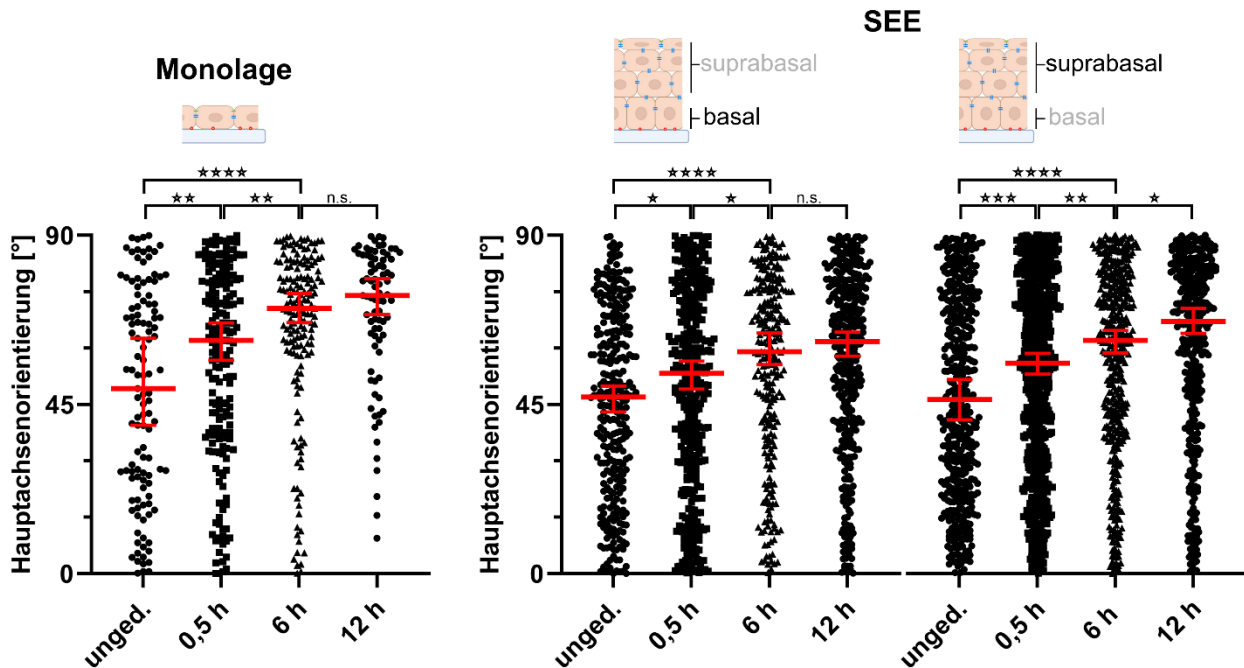


Abbildung 25: **Dehnungsinduzierte Verschiebung der Zellkernachsen in Monolagen und SEEs.** Anhand konfokaler Z-Bildstapel ungedehnter und über ansteigende Zeiträume gedehnter Modelle wurde die Hauptachse der Zellkerne bestimmt und deren Orientierungswinkel zur Dehnungsrichtung (bei 0°) ermittelt. Die Auswertung in SEEs erfolgte getrennt für Zellen der basalen Schicht und suprabasale Zellen (Schema oberhalb). Monolage unged.: $n=115$, 0,5 h: $n=187$, 6 h: $n=166$, 12 h: $n=81$; SEE basal unged.: $n=302$, 0,5 h: $n=408$, 6 h: $n=263$, 12 h: $n=374$; SEE suprabasal unged.: $n=465$, 0,5 h: $n=766$, 6 h: $n=451$, 12 h: $n=426$. In roten Balken sind der Zentralwert und das entsprechende 95 %-Konfidenzintervall angegeben.

Die mikroskopische Auswertung der Zellkerne deutete bereits darauf hin, dass sich die Zelldichte in Monolagen von der Dichte im basalen SEE unterschied [Abbildung 24]. Darüber hinaus ist aus anderen Arbeiten bekannt, dass mechanotransduktive Prozesse in Epithelien sowohl die Proliferation als auch die Zellextrusion induzieren können. Aus diesem Grund wurde die Zellkerndichte in Abhängigkeit des Dehnungszeitraums und der dreidimensionalen Lage im SEE analysiert. Dabei wurde innerhalb der untersuchten Z-Lage (basal, suprabasal und apikal) eine konstante, dehnungsunabhängige Dichte beobachtet. Die Anzahl der Zellkerne in Monolagen wurde ebenfalls durch zyklische Dehnung nicht beeinflusst. Interessanterweise zeigte sich aber, dass die Zelldichte im SEE von der basalen zur apikalen Seite abnahm und in der Basalzellschicht mit etwa 2600 Zellkernen je mm^2 die dichteste sowie apikal mit etwa

1600 Zellkernen je mm^2 die flächigste Konfiguration aufwies [Abbildung 26 A]. Dagegen wurden in konfluenten Monolagen signifikant weniger Zellkerne pro Fläche ($1300 \text{ Kerne}/\text{mm}^2$) identifiziert.

Aus dieser Beobachtung heraus stellte sich die Frage, ob die zweidimensionale Dichte einer Zellschicht einen Einfluss auf die dehnungsinduzierte Zellkernorientierung hat oder die ebenso apikale Anbindung an Nachbarzellen eine Rolle für die Adaption spielen. Die bisher als Vergleichskontrolle verwendeten Monolagen resultierten aus der Anpassung des SEE-Protokolls, sodass ebenfalls eine Vorinkubation und damit gleiche Differenzierungsphase in erhöhter Kalziumkonzentration erfolgte, dafür aber die Zellzahl und insbesondere die Adhäsionszeit verringert wurden. In zusätzlichen Analysen wurden deshalb Monolagen eingesetzt, die in überkonfluenten Zellkonzentration ausgebracht wurden. Nach Adhäsion auf dem Substrat wurden die nicht-adhäsiven Zellen abgenommen und erst danach auf ein Zellkulturmedium mit erhöhter Kalziumkonzentration gewechselt. Tatsächlich wurden auf diese Weise einschichtige Modelle mit höherer Zelldichte aber verkürzter Kalziuminkubation generiert, die auch nach 6 h unter Dehnung ihre Zahl von etwa $1700 \text{ Kernen je } \text{mm}^2$ nicht veränderten [Abbildung 26 A]. Allerdings verblieb die erhaltene Dichte nach wie vor signifikant niedriger als die in basalen Schichten der SEEs und war eher mit der Organisation suprabasaler und apikaler Schichten vergleichbar.

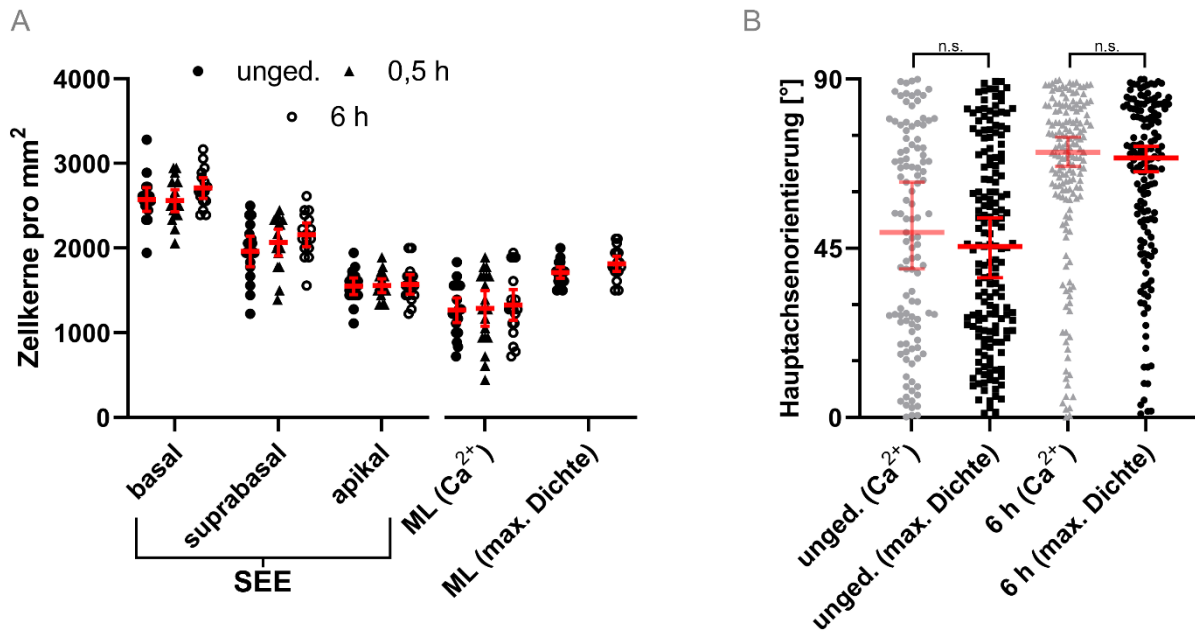


Abbildung 26: **Zellkerndichte in Monolagen und SEE unter zyklischer Dehnung.** Die Zellkerne pro Fläche wurden in Abhängigkeit der räumlichen Lage im mehrschichtigen SEE und in Monolagen sowie unter Einfluss zyklischer Dehnung unterschiedlicher Dauer ausgezählt [A]. Dabei wurden die Monolagen (ML) entsprechend des Protokolls für SEE mit verringerter Konzentration und Adhäsionszeit bei gleicher Kalzium-Vorinkubation (Ca²⁺) oder durch Einsatz überkonfluenter Zellkonzentrationen und nachträglichem Wechsel auf Kalzium (max. Dichte) generiert. Außerdem erfolgte der Vergleich der Zellkern-Hauptachsenverschiebung beider ML nach 6 h zyklischer Dehnung mit 0,3 Hz und 15 % [B]. In roten Balken sind der Zentralwert und das entsprechende 95 %-Konfidenzintervall angegeben.

Nachdem sich die dehnungsinduzierte Reorientierung der Zellkerne in Monolagen gegenüber der Ausrichtung in SEEs als geringfügig schneller und effizienter zeigte [Abbildung 25], wurde die Dichte der Monolage als Einflusskriterium überprüft. Dabei konnte weder in Abwesenheit einer mechanischer Belastung noch nach 6 h unter zyklischer Dehnung ein Unterschied in der Ausrichtung der Zellkerne festgestellt werden [Abbildung 26 B].

3.3 Einfluss der Zytoskelettsysteme auf die dehnungsinduzierte Reorientierung im SEE

3.3.1 Stressfaser und Zellkernausrichtung unter Störung der Tubulin-Polymerisation

Mikrotubuli stellen die starrste Zytoskelettklasse dar und sind u.a. maßgeblich an zellulären Formgebungsprozessen beteiligt [siehe auch Kapitel 1.2.1]. Ihre Rolle in der epidermalen Stressantwort auf zyklische Dehnung ist dabei aber weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurde das synthetische Pharmakon Nocodazol eingesetzt, welches freies β -Tubulin bindet und die Polymerisation der Mikrotubuli inhibiert [Abbildung 27].

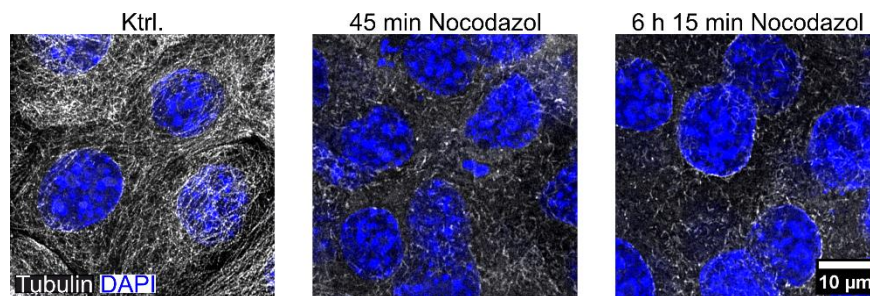


Abbildung 27: **Inhibition der Mikrotubuli durch Nocodazol.** SEEs wurden über die angegebenen Zeiträume mit Nocodazol behandelt und anschließend fixiert. Nach immunzytochemischer Färbung des Tubulin und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI erfolgte die konfokalmikroskopische Aufnahme. Dargestellt sind repräsentative Bildebenen der suprabasalen Keratinozyten.

Untersucht wurde sowohl der kurzzeitige als auch langzeitige Einfluss auf die basale F-Aktin- und Zellkernorganisation im SEE. Dabei wurde der Inhibitor jeweils 15 min vor Beginn eines Dehnungsversuchs zugegeben. Zur sprachlichen Vereinfachung wird in den nachfolgenden Beschreibungen auf die zusätzliche Angabe der Vorinkubationszeit von 15 min verzichtet und stattdessen der jeweils untersuchte Dehnungszeitraum (30 min bzw. 6 h) anstelle der vollständigen Inhibitor-Inkubationszeit (45 min bzw. 6 h und 15 min) sowohl für gedehnte als auch ungedehnte Proben angegeben.

Unabhängig von der Inkubationsdauer des Mikrotubuli-Inhibitors verliefen die Aktin-Stressfasern der basalen Zellschicht im mikroskopischen Bild in unstrukturierter, zufälliger Anordnung und vergleichbar zu SEEs, die ohne Nocodazol-Zugabe kultiviert wurden. Bereits eine Dehnung über 30 min, die entsprechend 15 min nach Zugabe des Inhibitors gestartet wurde, resultierte in einer deutlichen Umstrukturierung der basalen Stressfasern [Abbildung 28]. Dabei zeigte sich eine Ausrichtung und zellübergreifende Annäherung benachbarter Orientierungswinkel, die nur in einzelnen Zellen deutlich von einer annähernd perpendikularen Orientierung abwich. Eine längere Dehnung über 6 h hatte letztendlich eine weitere Vereinheitlichung der Stressfaserorientierung innerhalb der basalen Zellschicht zur Folge.

Eine grundsätzlich veränderte Morphologie der Zellkerne aufgrund des Nocodazols konnte ebenfalls weder in basalen noch in suprabasalen Schichten beobachtet werden. Auch unter Einfluss der Mikrotubuli-Polymerisationsinhibition erfolgte eine Reorientierung der Zellkerne in Richtung der Querachse zur Dehnungsrichtung, die nach 6 h deutlich zu beobachten aber ebenfalls bereits nach 30 min zu erkennen war [Abbildung 28]. Dabei konnte kein Unterschied zwischen Keratinozyten der untersten Ebene und Zellen der suprabasalen Schichten ausgemacht werden. Der Effekt der Polymerisationsinhibition zeigte sich nach 6 h jedoch im Auftreten von Zellen der basalen Schicht, die durch Inhibition der Spindelfasern in ihrer Mitose blockiert wurden und deren DNA als kondensiertes Chromatin ohne äquatoriale Anordnung vorzufinden waren [Abbildung 28].

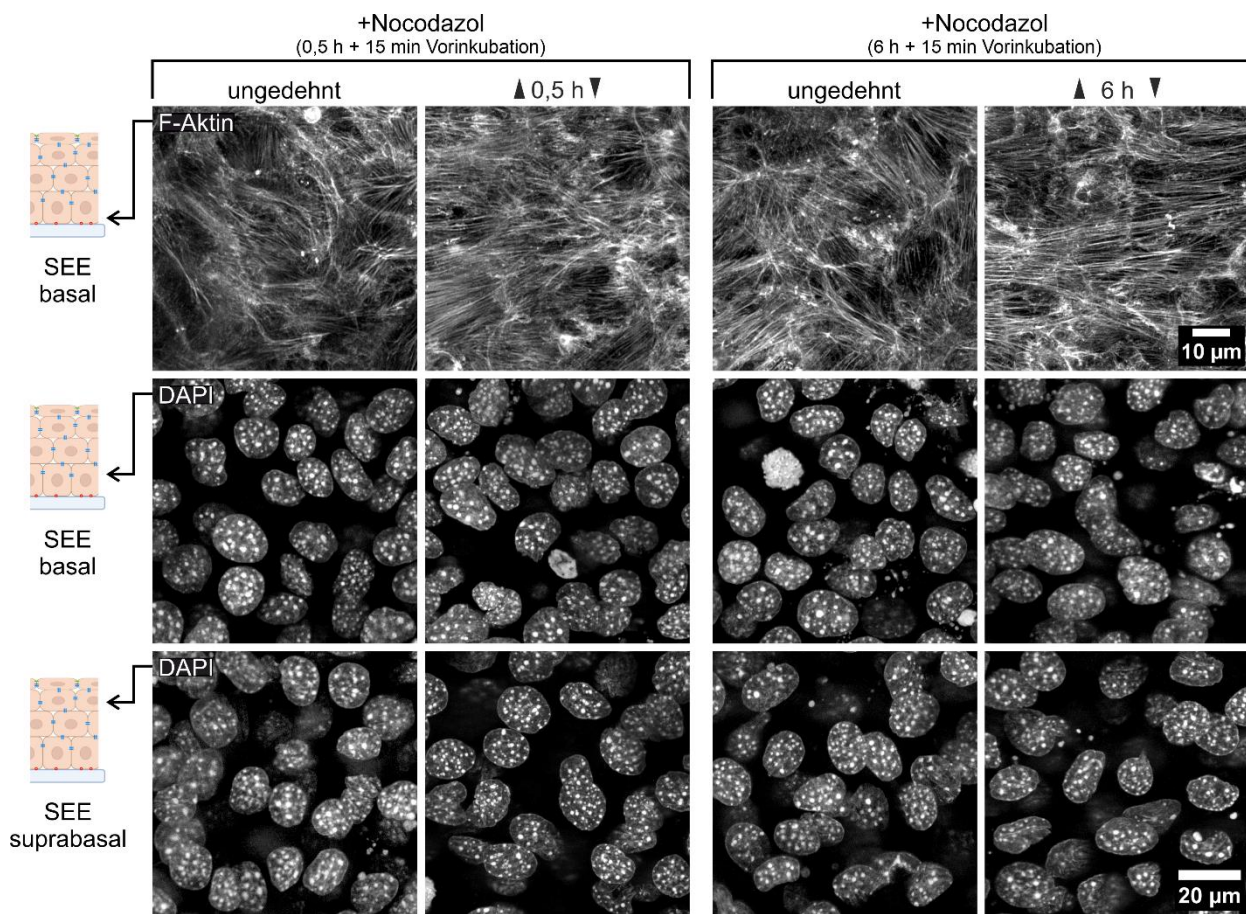


Abbildung 28: **Umstrukturierungen im mehrschichtigen SEE unter Dehnung und Störung der Tubulin-Polymerisation.** Nocodazol als Polymerisationsinhibitor der Mikrotubuli wurde jeweils 15 min vor Beginn der zyklischen Dehnung (Zugrichtung angedeutet durch schwarze Pfeile) zugegeben (angegeben als Vorinkubation) und mit parallelen Kontrollen, die keinen zusätzlichen Dehnungsreiz erfuhren, konfokalmikroskopisch analysiert. Die Aufnahmeebenen sind jeweils im Schema links angedeutet.

Die zuvor vorgestellte Quantifizierung der basalen Stressfaserorientierung sowie der basalen und suprabasalen Zellkern-Hauptachsenorientierung bestätigte die Beobachtungen der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Die Inhibition der Tubulin-Polymerisation hatte [80]

unabhängig von ihrer Wirkdauer keinerlei Einfluss auf die zufällige Orientierung der basalen Stressfasern oder der Zellkerne in den Schichten des SEE. Nach 30 min unter zyklischer Dehnung konnte bei etwa 50 % der Zellen ein Hauptorientierungswinkel der basalen Aktin-Fasern von 80-90° zur Zugrichtung festgestellt werden [Abbildung 29 A]. Nach 6 h steigerte sich dieser Anteil weiter auf 62 %. Somit äußerte sich diese dehnungsinduzierte Reorientierung sogar verstärkt gegenüber basalen Keratinozyten, deren Mikrotubuli-Netzwerk nicht gestört wurde. Im Vergleich zu vorherigen Analysen ohne Nocodazol konnte ein geringerer Anteil an Keratinozyten gefunden werden, deren F-Aktin noch eine Ausrichtung in 0-45° zur Zugrichtung aufwies (nach 0,5 h Dehnung: Kontrolle 10 %, +Nocodazol: 3 %).

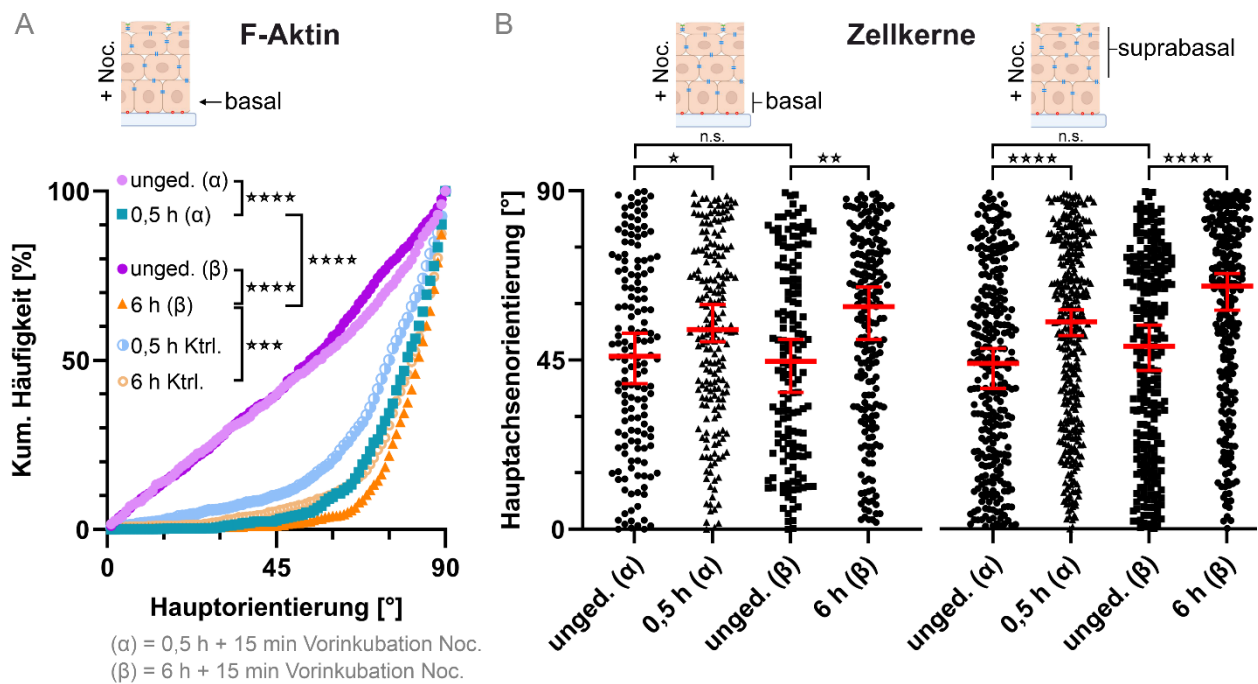


Abbildung 29: **Dehnungsinduzierte Reorientierung des basalen F-Aktins und der Zellkerne unter Störung der Tubulin-Polymerisation.** Nach Zugabe des Polymerisationsinhibitors Nocodazol wurden SEEs über 30 min und 6 h zyklisch gedehnt und die Hauptorientierung der basalen Aktin-Fasern zusammen mit entsprechenden ungedehnten Inhibitorcontrollen quantifiziert. Dabei entspricht 0° der uniaxialen Zugrichtung. Zu Vergleichszwecken wurden Daten gedehnter Kontrollen erneut aufgetragen [siehe auch Abbildung 22]. unged. (α): $n=874$, 0,5 h (α): $n=972$, unged. (β): $n=874$, 6 h (β): $n=874$ [A]. In Abhängigkeit der skizzierten Lage im mehrschichtigen SEE erfolgte ebenso die Bestimmung der Zellkern-Hauptachsen für basale und suprabasale Zellen. basal: unged. (α): $n=154$, 0,5 h (α): $n=199$, unged. (β): $n=156$, 6 h (β): $n=207$, suprabasal: unged. (α): $n=292$, 0,5 h (α): $n=360$, unged. (β): $n=265$, 6 h (β): $n=255$. In roten Balken sind der Zentralwert und das entsprechende 95 %-Konfidenzintervall angegeben [B].

Im Gegensatz dazu konnte kein Einfluss des veränderten Mikrotubuli-Netzwerks auf die dehnungsinduzierte Ausrichtung der Zellkerne beobachtet werden. Die Zellen aller räumlichen Ebenen wiesen eine vergleichbare Reorientierung auf, die die Hauptachsen zunehmend quer zur Zugrichtung ausrichtete [Abbildung 29 B]. Dabei konnte die Verschiebung der auftretenden Winkel bereits nach 30 min signifikant für basale und suprabasale Zellen mit einem mittleren

Orientierungswinkel von 53° bzw. 55° beobachtet werden. Eine fortgeführte Dehnung über 6 h resultierte auch unter Einfluss des Nocodazols in einer weiteren Parallelisierung der Hauptachsen, sodass sich Zentralwerte der ermittelten Stichprobe von 59° (basal) und 65° (suprabasal) einstellten. Die beobachteten Reorientierungseffekte der Kerne aller Schichten waren somit im Gegensatz zur Ausrichtung der basalen Aktin-Stressfasern mit den vorherigen Dehnungsanalysen ohne Inhibitor vergleichbar.

3.3.2 Organisation der Aktin-Stressfasern und Zellkerne in Keratin-freien Keratinozyten

Das Keratin-Netzwerk ist die zentrale Stützstruktur epidermaler Zellen und für die mechanischen Eigenschaften und hohe Belastungsfähigkeit essentiell [siehe auch Kapitel 1.2.2]. Zur Untersuchung des Einflusses dieser Zytoskelettklasse auf die angewandten Auswertungsparameter der basalen F-Aktin- und Zellkernausringung unter Dehnung wurde auf murine Keratinozyten zurückgegriffen, die keinerlei funktionelle Typ-I Keratine exprimieren (KtyI^{-/-}). Durch Deletion der entsprechenden Gene und Fehlen der heterodimeren Bindungspartner wurde bei diesen Zellen folglich kein Keratin-Netzwerk ausgebildet [Abbildung 30 B].

Die Generierung der SEEs aus KtyI^{-/-}-Zellen lieferte Epidermaläquivalente, die sowohl in der Anzahl an Zellschichten als auch der Gesamtschichtdicke verringert waren. In einigen Bereichen bildete sich trotz erhöhter Zellkonzentration in Suspension und verlängerter Adhäsionszeit keine suprabasale Zellschicht aus. Einschichtige Bereiche der KtyI^{-/-}-SEEs wurden jedoch nicht zur weiteren Auswertung herangezogen.

Die Keratin-freien Keratinozyten zeigten sich sowohl in der Routinekultur als auch in der basalen Schicht des SEE über die Fläche ausgebreiteter und flacher als wildtypische Zellen (WT-Zellen). Dies äußerte sich in einer sichtbar geringeren Zelldichte basaler und suprabasaler Ebenen [Abbildung 30 A]. Das basale Aktin-Zytoskelett lag zu WT-Zellen vergleichbar in FA-assoziierte Stressfasern organisiert vor. Gleichzeitig wirkte die Morphologie der Zellkerne jedoch durch das Fehlen der Intermediärfilamente beeinflusst, sodass neben Ellipsoiden auch eingeschnürte, aberrante Formen beobachtet werden konnten. Das Anlegen zyklischer Dehnung resultierte zunächst in keiner zu WT-Zellen vergleichbaren Umstrukturierung der Aktin-Faserbündel. Vielmehr fanden sich einzelne Zellen nach 30 min mit einer nahezu rechtwinkligen Ausrichtung zur Dehnungsachse, während der überwiegende Anteil basaler Zellen sich in der Organisation unbeeinflusst zeigte. Erst ein Dehnungsintervall von 6 h hatte eine erkennbare Reorientierung der Stressfasern in annähernd quer zur Dehnungsachse verlaufender Ausrichtung über viele

basale Keratinozyten hinweg zur Folge. Im Kontrast zu Dehnungsversuchen der WT-Zellen fiel auf, dass die Stressfasern selbst nach mehrstündiger, zyklischer Dehnung häufig im Randbereich der individuellen Zellen endeten. Die Bündel schienen hier nicht bis zur Zellgrenze zu verlaufen und weniger zellübergreifenden Orientierungswinkel benachbarter Keratinozyten aufzuweisen [Abbildung 30 A]. Diese Antwort auf mechanische Belastung unterschied sich damit deutlich vom bisher beobachteten kooperativen Reorientierungsverhalten basaler Stressfasern in einschichtigen und mehrschichtigen Untersuchungen. Abgesehen von einer zuvor beschriebenen Abweichung der Zellkernmorphologie konnte bei basalen und suprabasalen *KtyI^{-/-}*-Zellkernen hingegen nach 6 h vermehrt quer zur Dehnung ausgerichtete Hauptachsen beobachtet werden.

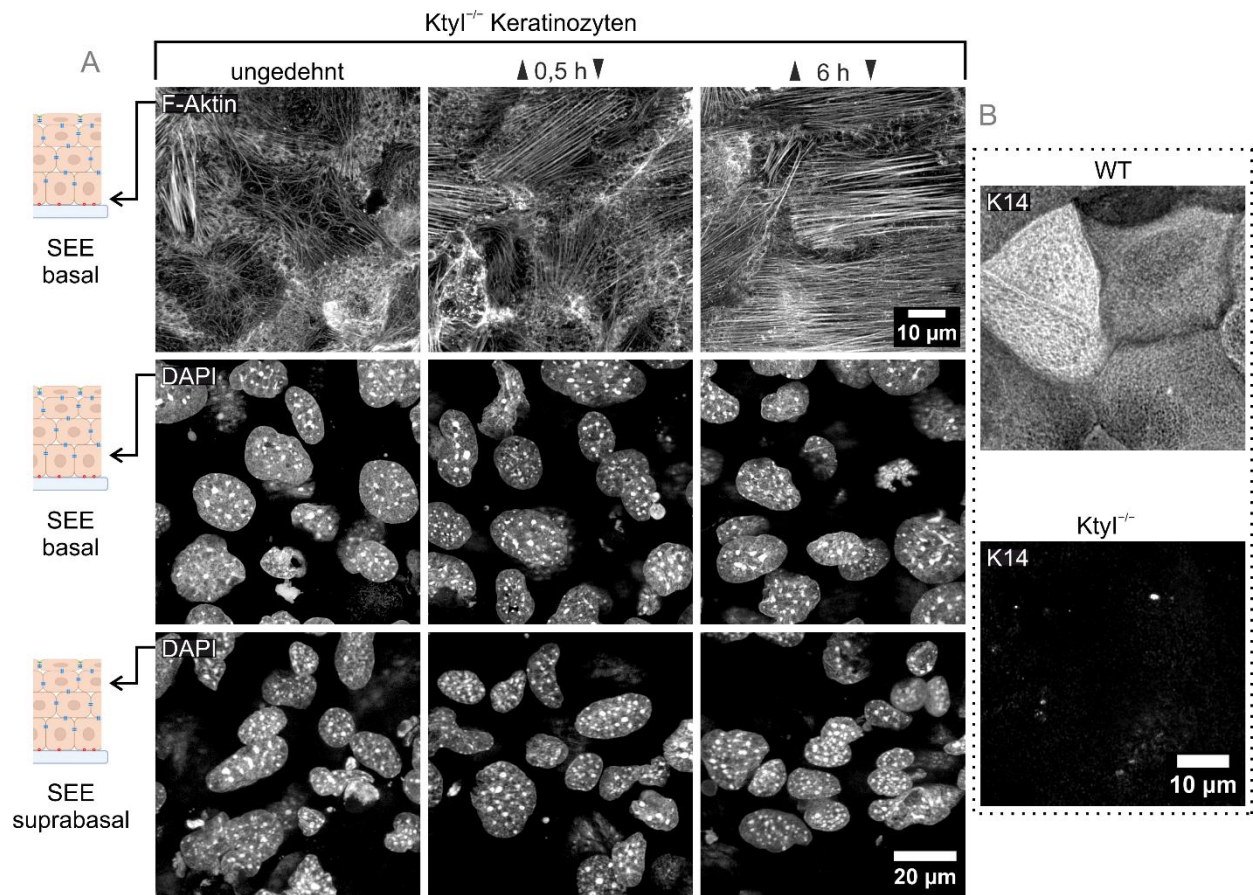


Abbildung 30: **Dehnungsinduzierte Ausrichtung im SEE in Abwesenheit von Keratinfilamenten.** Mehrschichtige SEEs wurden unter Verwendung von Keratinozyten aufgebaut, die kein funktionelles Keratin-Netzwerk exprimieren (*KtyI^{-/-}*) und u.a. negativ auf Keratin-14 (K14) getestet wurden [B]. Nach zyklischer Dehnung (uniaxiale Zugrichtung durch schwarze Pfeile angedeutet), Fixierung und Färbung des F-Aktins und der Zellkerne erfolgte die Konfokalmikroskopie [A]. Die Aufnahmeebenen werden durch das Schema links angegeben.

Die nachfolgende Quantifizierung der basalen Stressfasern bestätigte den Eindruck eines verminderten Reorientierungsverhaltens in *KtyI^{-/-}*-SEEs. Zwar konnte eine erste Verschiebung der Hauptorientierungswinkel bereits nach 30 min zyklischer Dehnung beobachtet werden, die

vorgefundene Winkelverteilung wich jedoch signifikant von der frühen und deutlichen Reorientierung in WT-SEEs ab [Abbildung 31 A]. Interessanterweise konnte selbst nach 6 h unter mechanischer Belastung keine vergleichbare Antwort des basalen F-Aktins induziert werden. Trotz Dehnung über mehr als 6.500 Zyklen innerhalb der 6 h wurde bei Zellen ohne intakte Keratinfilamente eine größere Anzahl Zellen mit Hauptorientierungswinkeln im Intervall 0-60° gefunden als bei Keratinozyten, die ein funktionelles Keratin-Netzwerk exprimierten.

Diese Beobachtung konnte auf die dehnungsinduzierte Ausrichtung der Zellkerne jedoch nicht übertragen werden. Auch ohne Keratinfilamente wurden sowohl in basalen als auch in suprabasalen Zellen eine zunehmende Parallelisierung und vermehrte quer zum Zug ausgerichtete Orientierung der Zellkerne beobachtet, die in ihrer Ausprägung und Geschwindigkeit auch nicht von der Anwesenheit mechanosensitiver Zell-Matrix-Adhäsionen abhängig zu sein schien [Abbildung 31 B]. Tatsächlich zeigte der direkte Vergleich der mittleren Orientierungswinkel aller ausgewerteter Zellkerne in basalen (58° nach 6 h) und suprabasalen (64° nach 6 h) Schichten der SEEs keinen Unterschied zwischen WT- und *KtyI*^{-/-}.

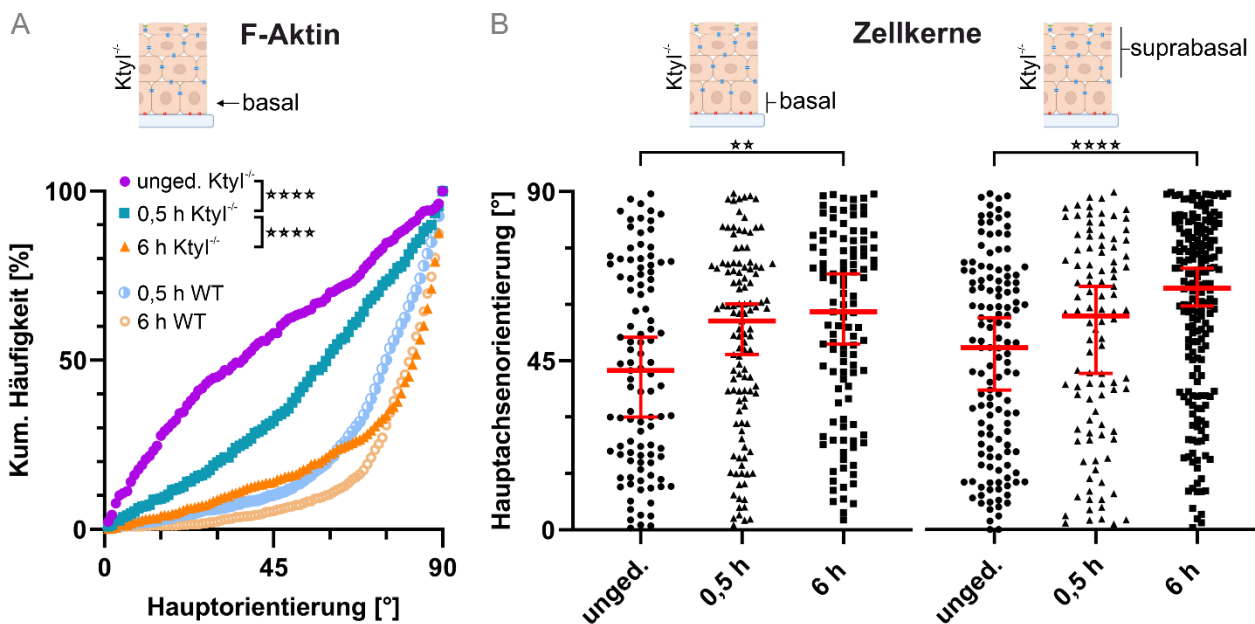


Abbildung 31: **Quantitative Auswertung der basalen F-Aktin- und Zellkernausrichtung in *KtyI*^{-/-} SEEs.** Die Hauptorientierungswinkel der Aktin-Faserbündel in basalen Ebenen der SEEs aus Keratin-freien Keratinozyten (*KtyI*^{-/-}) wurden nach zyklischer Dehnung über die angegebenen Zeiträume (Dehnungsrichtung entspricht 0°) ausgewertet und mit vorliegenden Reorientierungsdaten wildtypischer Keratinozyten (WT) [siehe auch Abbildung 22] und ungedehnter *KtyI*^{-/-} aufgetragen. unged.: *n*=300, 0,5 h: *n*=450, 6 h: *n*=600 [A]. Die Winkelbestimmung der Zellkern-Hauptachsen relativ zur Zugrichtung erfolgte nach beschriebenem Vorgehen getrennt für basale und suprabasale Zellen (angedeutet im Schema oberhalb). basal: unged.: *n*=103, 0,5 h: *n*=117, 6 h: *n*=111, suprabasal: unged.: *n*=135, 0,5 h: *n*=102, 6 h: *n*=189. In roten Balken sind der Zentralwert und das entsprechende 95 %-Konfidenzintervall angegeben [B].

3.3.3 Struktur des F-Aktins und der Kerne unter Störung der Aktin-Polymerisation

Nachdem für das Mikrotubuli- und Keratin-Netzwerk ganz unterschiedliche Auswirkungen auf die zelluläre Antwort bei zyklischer Dehnungsbelastung gefunden wurden, fokussierte sich die weitere Analyse auf die Bedeutung und Reaktion des Aktin-Zytoskeletts selbst. Die Polymerisation des dynamischen Aktin-Netzwerks lässt sich konzentrationsabhängig durch Cytochalasine inhibieren. Bei dieser Gruppe handelt es sich um zellpermeable Pilzmetabolite, die u.a. an das (+)-Ende des F-Aktins binden und die Assoziation von Aktin-Monomeren behindern. Aufgrund des zytotoxischen Effekts der vollständigen Polymerisationsinhibition wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Blick auf die Gesamtdauer der Dehnungsversuche eine mittlere Dosis des Inhibitors Cytochalasin D (Cyto. D) gewählt. Bei dieser Dosierung von 1 μM wurde in murinen Keratinozyten über den Untersuchungszeitraum keine übermäßige Apoptose induziert. Gleichzeitig wurde für die identische Konzentration bereits beschrieben, dass längere Filamente kollabierten und F-Aktin zu weiten Teilen im Zellkortex aggregierte sowie die Zellelastizität auf etwa die Hälfte abgesenkt wurde (Wakatsuki *et al.*, 2001). Tatsächlich zeigten sich auch in mikroskopischen Aufnahmen der SEE größere Aktin-Aggregate im Aktin-Zytoskelett [Abbildung 32].

Dabei war eine Bildung der Aggregate unabhängig von der Inkubationsdauer des Inhibitors wahrzunehmen. Sowohl nach kürzerer (30 min) als auch längerer (6 h) Einwirkung des Cyto. D lagen neben diesen Aggregaten zufällig ausgerichtete Stressfasern in der ungedehnten Basalzellschicht vor. Erstaunlicherweise konnte auch unter Störung der Aktin-Polymerisation bereits nach 30 min eine dehnungsinduzierte Reorientierung der basalen Aktin-Stressfasern beobachtet werden. Dabei ähnelte diese frühe Anpassung im mikroskopischen Bild der Umstrukturierung ohne Einfluss des Inhibitors. Das Fortführen der zyklischen Dehnung über 6 h hatte anschließend eine globale Ausrichtung der Faserbündel über die Zellen der basalen Schicht hinweg zur Folge. Hierbei orientierten sich die Stressfasern zwar in überwiegend einheitlicher, paralleler Ausrichtung, wiesen aber im Gegensatz zu gedehnten Kontrollen in geringerem Maße eine nahezu rechtwinklig zur Zugachse liegende Orientierung auf [Abbildung 32].

Im Gegensatz dazu präsentierte sich die Zellkernmorphologie im mikroskopischen Bild alleine durch die Störung der Aktin-Polymerisation über den Untersuchungszeitraum unauffällig gegenüber nicht-inhibierten Kontrollen. Ebenso konnte kein differentieller Effekt des Cyto. D für basale und suprabasale Zellen gefunden werden. Das Anlegen zyklischer Dehnung resultierte auch in behandelten SEEs in einer veränderten Ausrichtung der Zellkerne. Während der Anteil

der Kerne, die ihre Hauptachse quer zur Dehnung orientierten, durch den kurzzeitigen Dehnungsreiz bereits zunahm, war nach 6 h eine weitere, deutliche Parallelisierung der Zellkerne zu sehen. Diese Reorientierung wurde unabhängig von der zellulären Lokalisation im mehrschichtigen Modell und in ähnlicher Ausprägung zu nicht-inhibierten SEEs vorgefunden [Abbildung 32].

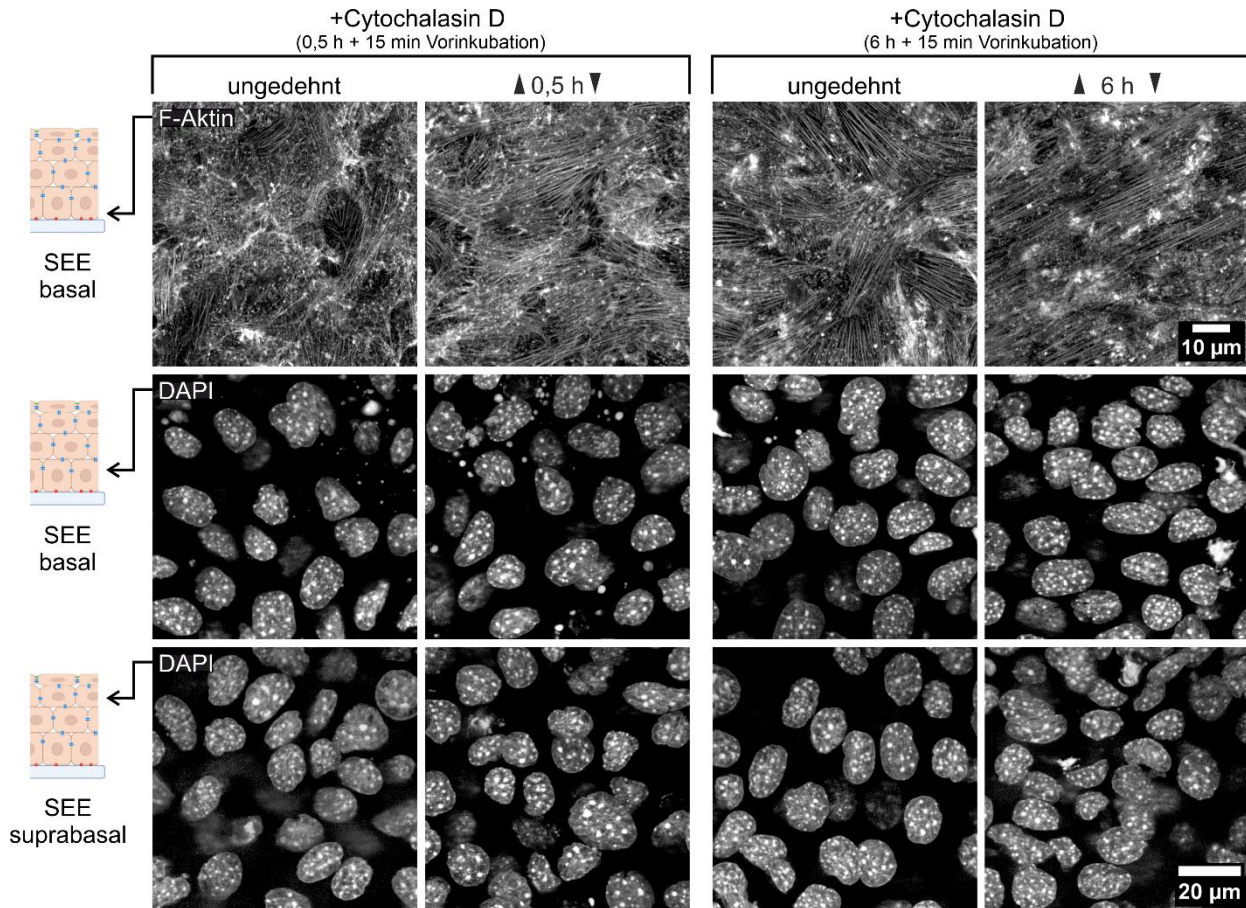


Abbildung 32: **Dehnungsinduzierte Ausrichtung im mehrschichtigen SEE unter Störung der Aktin-Polymerisation.** Die Polymerisation des F-Aktins wurde durch Zugabe von 1 µM Cytochalasin D jeweils 15 min vor Anlegen einer zyklischen Dehnung (Zugrichtung angedeutet durch schwarze Pfeile) eingeschränkt (angegeben als Vorinkubation). Die Färbung des F-Aktins und Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI sowie Aufnahme in Z-Bildstapeln erfolgte ebenso anhand paralleler Kontrollen, die keiner Dehnung ausgesetzt wurden. Die jeweiligen Aufnahmeebenen sind durch das Schema links angedeutet.

Die Unabhängigkeit der basalen Stressfaserorientierung vom Einfluss der Polymerisationsinhibition bestätigte sich auch in der quantitativen Auswertung der Winkelverteilung ohne extrinsischen Dehnungsreiz [Abbildung 33 A]. Das Anlegen zyklischer Dehnung führte anschließend auch bei inhibierten SEEs zur zeitabhängigen Reorientierung der Faserbündel an der Zell-Matrix-Grenze. Dabei konnte eine Verschiebung der angestrebten Ausrichtung bereits zu einem frühen Zeitpunkt beobachtet werden. Sowohl nach 30 min als auch nach 6 h zyklischer Dehnung nahmen etwa 61 % der Zellen einen Hauptorientierungswinkel $\geq 70^\circ$

zur Dehnungsrichtung ein. Bei SEEs ohne beeinflusstes Aktin-Zytoskelett lag dieser Wert zuvor bei 64 % nach 30 min und steigerte sich auf 81 % nach 6 h unter mechanischer Belastung. Eine veränderte Gesamtorientierung der Basalzellschicht nach Zugabe des Cyto. D, welche bereits im fluoreszenzmikroskopischen Bild zu erkennen war, äußerte sich über einem verminderten Auftreten der Winkel zwischen 80-90° (+ Cyto. D: 27 %, Kontrolle: 54 %) [Abbildung 33 A].

Die Analyse der Hauptachsen zeigte keinen vergleichbaren Einfluss durch die reduzierte Aktin-Polymerisation auf eine dehnungsinduzierte Ausrichtung der Zellkerne. Eine Reorientierung in Richtung der quer zur Zugrichtung verlaufenden Achse war hier ebenfalls bereits nach 30 min anhand des Zentralwerts von 52° erkennbar und steigerte sich bei längerer Dehnungsbelastung zusätzlich auf 60° [Abbildung 33 B]. Dabei war es unerheblich, ob ein direkter räumlicher Kontakt zum Substrat oder ausschließlich eine dreidimensionale Verbindung zu Nachbarzellen vorlag (suprabasal: 56° nach 30 min, 64° nach 6 h). Darüber hinaus äußert sich diese Antwort auf mechanische Belastung damit in einem Ausmaß, welcher mit SEEs ohne Inhibitoreinfluss vergleichbar ist (nach 6 h basal: 59°, suprabasal: 62°).

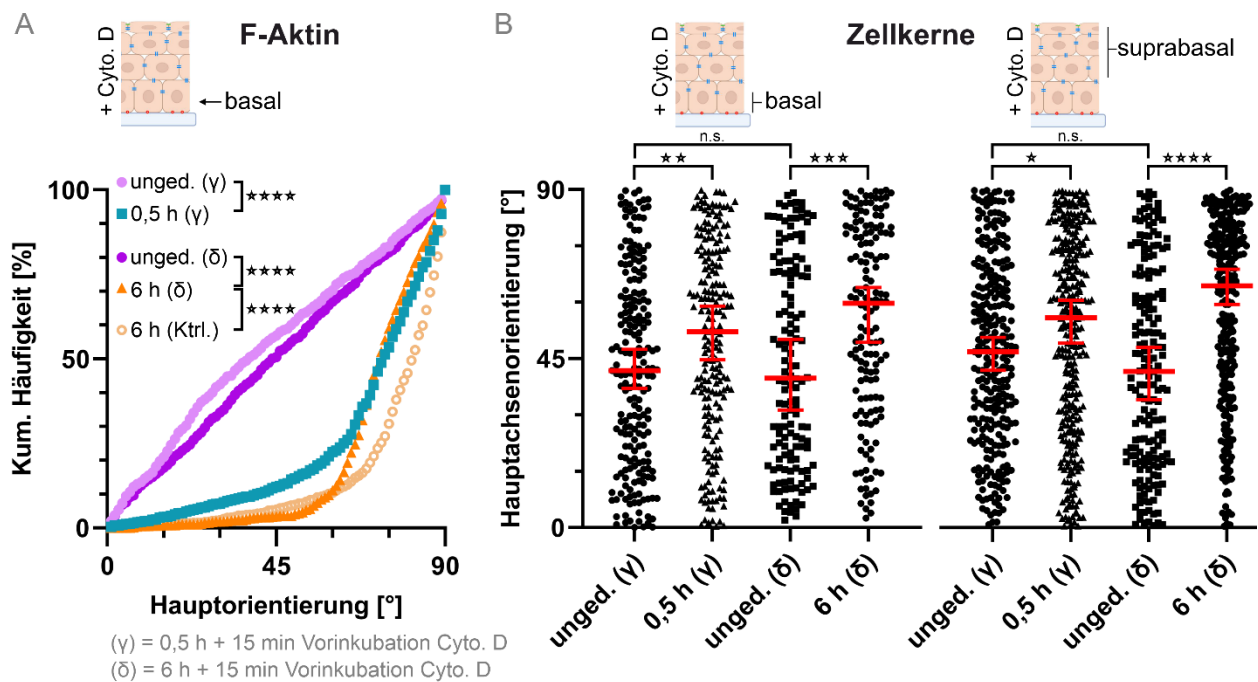


Abbildung 33: **Dehnungsinduzierte Reorientierung im SEE unter gestörter Aktin-Polymerisation.** Mehrschichtige SEEs wurden unter Zugabe von 1 μ M Cytochalasin D (Cyto. D) über die angegebenen Zeiträume behandelt und zyklisch gedehnt. Anschließend wurde die Hauptorientierung des F-Aktins je Zelle an der basalen Ebene bestimmt und mit einem zuvor ermittelten Wert unbehandelter SEEs (Ktrl.) nach 6 h Dehnung [siehe auch Abbildung 22] verglichen. unged. (γ), 0,5 h (γ), unged. (δ) je $n=726$, 6 h (δ): $n=762$ [A]. In Abhängigkeit der skizzierten Lage im mehrschichtigen Modell erfolgte die Bestimmung der basalen und suprabasalen Zellkern-Hauptachsen zur Zugrichtung. basal: unged. (γ): $n=207$, 0,5 h (γ): $n=208$, unged. (δ): $n=142$, 6 h (δ): $n=150$, suprabasal: unged. (γ): $n=279$, 0,5 h (γ): $n=318$, unged. (δ): $n=183$, 6 h (δ): $n=276$. In roten Balken sind der Zentralwert und das entsprechende 95 %-Konfidenzintervall angegeben [B].

Die gewonnenen Erkenntnisse der bisherigen Daten konnten zeigen, dass sich der strukturelle Aufbau des Aktin-Zytoskeletts im mehrschichtigen SEE an der basalen Kontaktfläche zum Substrat grundlegend von der kortikalen Organisation apikaler Ebenen unterscheidet. Die kontraktilen Stressfasern basaler Zellen wurden dabei in ihrem Reorientierungsverhalten durch die Störung der Aktin-Polymerisation und Einschränkung anderer Zytoskelettsysteme beeinflusst. Gleichzeitig erwies sich die dehnungsinduzierte Reorientierung der Zellkerne als Maß der zellulären Umstrukturierung von den ausgebildeten Kontaktstrukturen, der räumlichen Lage und dem Eingriff in die Zytoskelettsysteme unbeeinträchtigt. Infolgedessen konzentrierte sich die fluoreszenzmikroskopische Analyse auf die Struktur des kortikalen Aktins im Vergleich zur Ausrichtung der basalen Aktin-Bündel.

Bei eingehender Betrachtung einzelner Konfokalebene des F-Aktins im apikalen Zellkortex unter Einwirkung des Polymerisationsinhibitors Cyto. D fielen ähnliche signalintensive Aktin-Aggregate wie bereits in basalen Ebenen auf [Abbildung 34]. Während das kortikale F-Aktin-Netzwerk durch die Fluoreszenzmarkierung mit konjugiertem Phalloidin in unbehandelten Kontrollen als punktförmige und teilweise kurzfasrige Signale mit abgrenzbarem linearem Zell-Zell-Kontakt dargestellt werden konnte, zeigten sich im Kortex Cyto. D-behandelter SEEs vermehrt größere, heterogene Aggregate und eine Auflösung des linearen F-Aktin-Signals an den Zellgrenzen [Abbildung 34]. Erstaunlicherweise führte eine zyklische Dehnung des inhibierten Netzwerks über 6 h anschließend zum Auftauchen deutlich erkennbarer Filamentstrukturen im apikalen Kortex [Abbildung 34]. Ferner lagen diese Strukturen augenscheinlich in fast rechtwinkliger Ausrichtung zur Dehnungsachse vor. Damit konnten sie von den Stressfasern der basalen Aktin-inhibierten Zellen in Ausrichtung und Organisation deutlich abgegrenzt werden.

Aus diesem Grund erfolgte die fokussierte Analyse der apikalen Aktin-Signale in unbehandelten SEEs. Hier führte eine zyklische Dehnung über 6 h ebenfalls zu einer Umstrukturierung des Netzwerks und zur schwachen Ausbildung dünner Filamentstrukturen im Aktinkortex. Diese erschienen im mikroskopischen Bild als Aneinanderreihung punktförmiger Signale, die in gegenüberliegenden Zell-Zell-Kontakten endeten. Dabei zeigten diese Filamentstrukturen ebenfalls eine quer zur Zugrichtung weisende Orientierung [Abbildung 34].

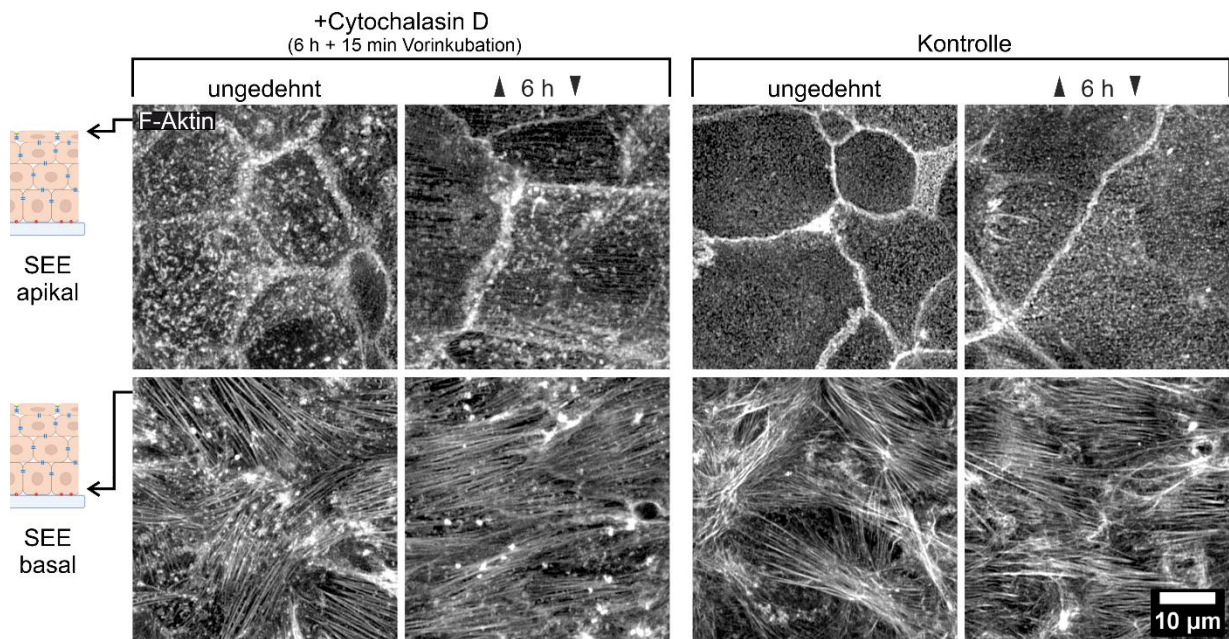


Abbildung 34: **Dehnungsinduzierte Strukturänderungen des kortikalen F-Aktins im SEE.** Die Aufnahme konfokaler Z-Bildstapel ermöglichte die räumlich-aufgelöste Darstellung des F-Aktins an der Substrat- und äußeren Mediumkontaktfläche mehrschichtiger Modelle (Aufnahmeebenen links schematisch dargestellt). Dabei wurden neben unbehandelten Kontrollen auch SEEs, die den Aktin-Polymerisationsinhibitor Cytochalasin D erhielten, für 6 h unter zyklische Dehnung gesetzt (uniaxiale Zugrichtung anhand schwarzer Pfeile erkennbar).

Da die Auswertung auf Basis des etablierten Strukturensors zur Quantifizierung feiner, schwacher und potentiell unterbrochener Filamentstrukturen keine zufriedenstellende Sensitivität aufwies, wurde die Methodik der quantifizierenden Bildverarbeitung angepasst. Zur Beurteilung der beobachteten Strukturänderung im kortikalen Aktin durch extrinsische mechanische Belastung wurden daher etwa $10 \times 10 \mu\text{m}$ (150×150 Pixel) Bildausschnitte einzelner Zellen an der basalen und apikalen Seite herangezogen. Diese Regionen von Interesse wurden manuell unter Vermeidung eines Einbezugs des Zellkontakts in die vorhandenen Bildfelder gelegt. Die F-Aktin-Signale wurden anschließend in den Fourier-Raum transformiert und nach Normalisierung die Differenz aus den mittleren Intensitäten jeden Winkels der gedehnten und ungedehnten SEEs ermittelt (im Folgenden: $\Delta\text{FFT}_{\text{norm.}}$) [siehe auch Kapitel 2.15.6]. Anhand der graphischen Auftragung für die Orientierung des basalen F-Aktins zur Dehnungsachse bei 0° bzw. 180° konnte der hohe Organisationsgrad dargestellt werden, der durch 6 h zyklische Dehnung an der Substratseite des SEE induziert wurde [Abbildung 35 A]. Hierbei belegte die strukturelle Analyse der schnellen Fourier-Transformation (*engl. Fast Fourier Transformation, FFT*) eine maximale Strukturorientierung bei 90° . Darüber hinaus konnte die basale Stressfaserorientierung unter Einfluss des Cyto. D weitergehend charakterisiert werden. Nach 6 h zyklischer Dehnung lag das Maximum aus der differentiellen Faserorientierung unter

teilinhibierter Aktin-Polymerisation bei 69°. Hierbei ergab die Analyse eine einseitige Vorzugsrichtung der Orientierung unter uniaxialer Dehnung, wodurch kein zweites Maximum im spiegelbildlichen Bereich zwischen 90°-180° auftrat.

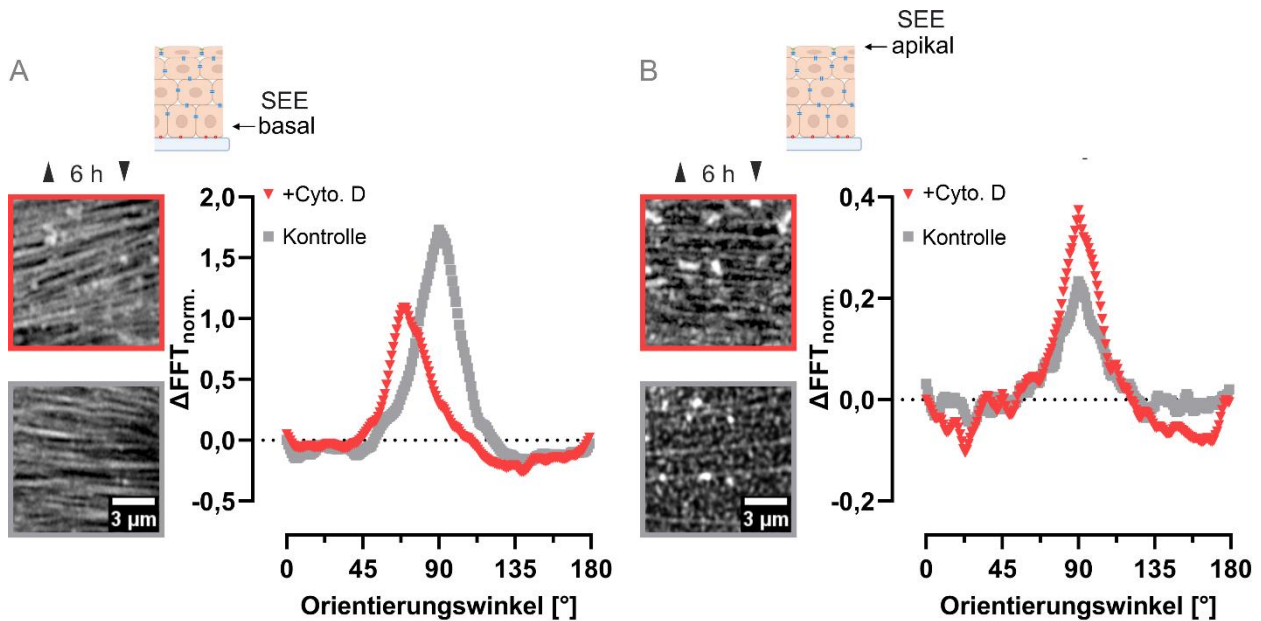


Abbildung 35: **Quantitative Auswertung der Strukturausrichtung im apikalen und basalen Aktinkortex.** Auf Basis der schnellen Fourier-Transformation wurden F-Aktin-Signale aus Bildausschnitten (repräsentative Beispiele nach 6 h Dehnung in Pfeilrichtung abgebildet) in den Fourier-Raum übertragen und die Intensitäten je Orientierungswinkel bestimmt. Dargestellt sind die FFT-Differenzen der über 6 h gedehnten und ungedehnten SEEs nach Normalisierung. Die Auswertung erfolgte getrennt für das basale Aktin-Zytoskelett [A] und den äußersten, apikalen Kortex [B]. Dabei wurden signalintensive Zell-Zell-Kontakte als Störeinfluss nicht mit einbezogen. Kontrolle - basal: $n=87$ (6 h), $n=94$ (unged.), Kontrolle - apikal: $n=108$ (6 h), $n=114$ (unged.); +Cyto. D: $n=114$ (6 h), $n=108$ (unged.)

Die FFT-Analyse der apikalen F-Aktin-Struktur an der Oberseite des SEE lieferte ebenfalls Maxima bei definierten Orientierungswinkeln als quantitatives Merkmal einer gegebenen Vorzugsrichtung und Organisation. Entsprechend der Ausrichtung der filamentösen Strukturen, die im mikroskopischen Bild erkennbar vorlagen, äußerte sich die dehnungsinduzierte Antwort unabhängig vom Einfluss des Inhibitors in einer rechtwinklig zur Zugrichtung angeordneten Orientierung [Abbildung 35 B]. Dabei wurden nach Zugabe des Cyto. D weniger punktförmige F-Aktin-Signale bei gleichzeitig verstärktem, dehnungsinduziertem Auftreten durchgehender Filamente als in Inhibitor-freien Kontrollen nach Dehnung beobachtet.

3.4 Polarität epidermaler Monolagen als Modellsystem der mehrschichtigen Epidermis

3.4.1 Vergleich der dehnungsinduzierten Antwort in Monolagen und SEEs unter Cyto. D

Die Zugabe des Polymerisationsinhibitors Cyto. D resultierte unter Dehnung in einer veränderten Hauptorientierung basaler Stressfasern der mehrschichtigen SEEs im Vergleich zu Kontrollen ohne Inhibitor. Zunächst sollte deshalb geklärt werden, ob eine dreidimensionale Organisation mit zusätzlichen apikalen Zellkontakten das basale Reorientierungsverhalten unter Störung der Aktin-Polymerisation beeinflusst. Hierzu wurden Monolagen nach Zugabe des Inhibitors ebenfalls über 6 h zyklisch gedehnt. Anschließend erfolgte die quantitative Auswertung der Stressfaser- und Zellkernorientierung nach zuvor beschriebenem Vorgehen. Die Faserausrichtung wurde durch die Zugabe des Inhibitors ohne zusätzlichen mechanischen Reiz nicht beeinflusst und lag in zufälliger Anordnung vor [Abbildung 36 A].

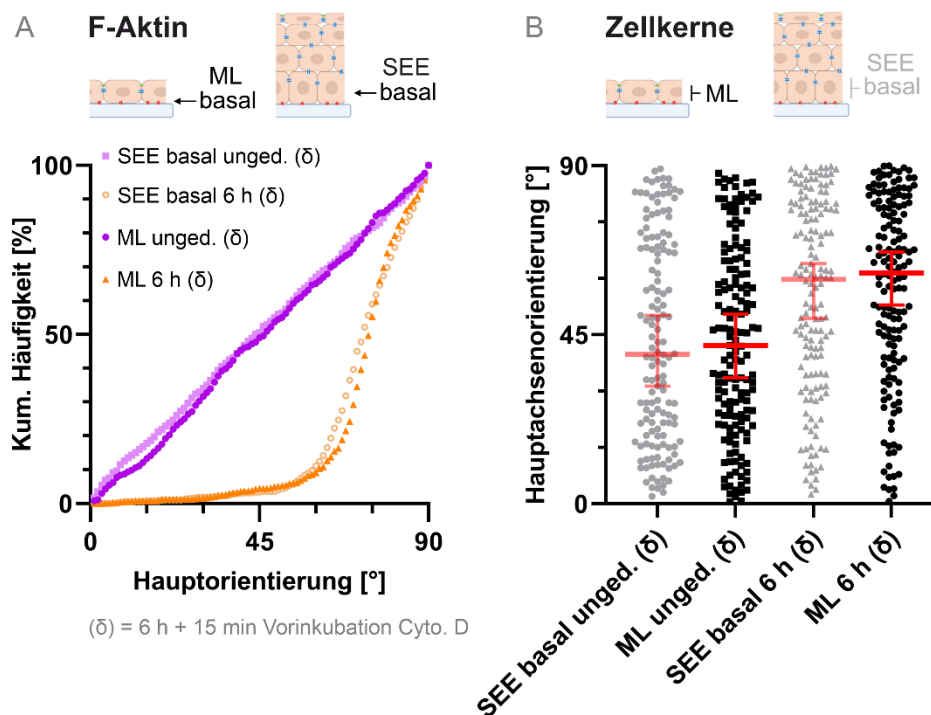


Abbildung 36: **Dehnungsinduzierte Stressfaser- und Zellkern-Reorientierung in Monolagen unter Störung der Aktin-Polymerisation.** Einschichtige Keratinozyten wurden nach Zugabe von 1 μ M Cyto. D zyklisch gedehnt. Anschließend wurde die Hauptorientierung der Aktin-Stressfasern je Zelle mittels Strukturtensor-basierter Auswertung bestimmt und mit ungedehnten Monolagen sowie bereits ermittelten Werten basaler Zellen im mehrschichtigen SEE [siehe auch Abbildung 33] verglichen. Monolage unged. (δ): $n=610$, 6 h (δ): $n=646$ [A]. Die Orientierung der Zellkern-Hauptachsen wurden ermittelt und mit der dehnungsinduzierten Ausrichtung (Zugrichtung entspricht 0°) der Basalzellschicht im SEE aufgetragen. Monolage unged. (δ): $n=157$, 6 h (δ): $n=156$. In roten Balken sind der Zentralwert und das entsprechende 95 %-Konfidenzintervall angegeben [B]. Die Auswertungsebenen sind im oberen Schema dargestellt.

Durch das Anlegen zyklischer Dehnung konnte anschließend die Reorientierung und Parallelisierung der Stressfasern beobachtet werden. Dabei war es unerheblich, ob die Zellen als Monolage organisiert waren oder zusätzlich Kontakt zu suprabasalen Zellen aufwiesen [Abbildung 36 A]. In beiden Systemen konnte unter Inhibitoreinfluss eine im Vergleich zu unbehandelten Keratinozyten früherer Analysen verringerte Ausrichtung der Orientierungswinkel beobachtet werden. Ferner wurde auch im Hinblick auf eine dehnungsinduzierte Parallelisierung der Zellkern-Hauptachsen kein Unterschied zwischen Monolagen und basalen SEEs gefunden. Auch nach Zugabe des Cyto. D erfolgte eine dehnungsinduzierte Reorientierung der Zellkerne und dadurch deutlich verminderte Anzahl an Kernen, die in Zugrichtung angeordnet vorlagen [Abbildung 36 B].

3.4.2 Strukturänderungen im apikalen Kortex einschichtiger Keratinozyten unter Dehnung

Die Analyse des apikalen Zellkortexes im mehrschichtigen SEE zeigte eine Umstrukturierung aufgrund des extrinsischen, mechanischen Reizes. Darüber hinaus wurde unter Einfluss des Inhibitors Cyto. D eine verstärkte Ausbildung quer zur Dehnungsachse orientierter Filamente im apikalen Kortex suprabasaler Zellen beobachtet. Nachdem eine Reorientierung basaler Stressfasern und Zellkerne unabhängig vom dreidimensionalen Aufbau der Keratinozyten auftrat, ergab sich die Frage, ob eine derartige Anpassung im Kortex auch bei substratadhäsiven, einschichtigen Keratinozyten zu beobachten sei. Hierzu wurden Monolagen mit und ohne Zugabe des Inhibitors ebenfalls über 6 h zyklisch gedehnt und die Struktur des F-Aktins im analogen Verfahren zu SEEs an der basalen und apikalen Seite konfokalmikroskopisch ausgewertet.

Eine Inhibition mit Cyto. D hatte auch in Monolagen das Auftreten von F-Aktin-Aggregaten und das Auflösen der linearen Zell-Zell-Grenzen zur Folge [Abbildung 37]. Dagegen wurden in Kontrollzellen, die keine zyklische Dehnung erfahren hatten, deutlich mehr punktförmige und dicht verteilte F-Aktin-Signale im apikalen Kortex sowie eine definierte, lineare Zellgrenze beobachtet. Das Anlegen zyklischer Dehnung induzierte bei diesen Zellen die Ausbildung filamentöser Strukturen, die die gesamte Längsachse der Zelle quer zur Dehnungsrichtung überspannten. An der basalen Kontaktfläche zum elastischen Substrat wurden hingegen signalintensive Aktin-Stressfasern beobachtet, die aus der zufälligen Anordnung durch den mechanischen Reiz heraus eine parallele und nahezu rechtwinklig zur Zugrichtung ausgelegte Orientierung einnahmen. Eine dehnungsinduzierte und darüber hinaus verstärkte Ausbildung apikaler Filamente wurde auch im Aktinkortex inhibierter Monolagen beobachtet [Abbildung 37].

Dabei lagen die Strukturen an gegenüberliegenden Seiten im direkten Kontakt zur Zellgrenze vor und setzten sich in ähnlicher Ausrichtung im angrenzenden Zellkortex fort. Interessanterweise wiesen die apikalen Filamente eine fast rechtwinklige Ausrichtung zur Zugachse auf, während basale Stressfasern Aktin-inhibierter Zellen eine erkennbar geringere Orientierung einnahmen als Stressfasern unbehandelter, gedehnter Monolagen.

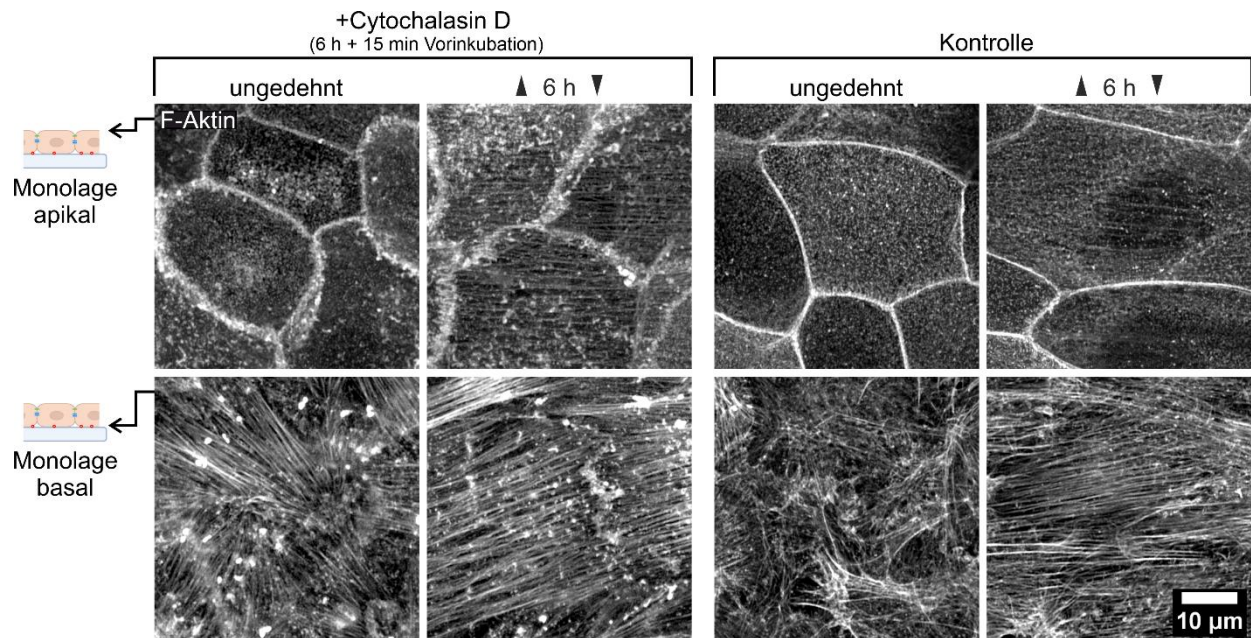


Abbildung 37: **Dehnungsinduzierte Strukturänderungen des kortikalen F-Aktins in Monolagen.** Die Aufnahme konfokaler Z-Bildstapel ermöglichte innerhalb derselben Zellen die räumlich-aufgelöste Darstellung fluoreszenzmarkiertem F-Aktins an der basalen Substratkontaktfläche und apikalen Oberseite (im Schema links angedeutet) in Monolagen aus murinen Keratinozyten. Dabei wurden neben unbehandelten Kontrollen auch Zellen, die den Aktin-Polymerisationsinhibitor Cytochalasin D erhielten, für 6 h unter zyklische Dehnung (uniaxiale Zugrichtung anhand schwarzer Pfeile erkennbar) gesetzt.

Die quantitative Auswertung der Strukturänderung im F-Aktin-Netzwerk an der basalen und apikalen Seite einschichtiger Keratinozyten auf elastischem Substrat bestätigte den Eindruck der Konfokalmikroskopie. Die Differenz der ermittelten Stressfaserorientierung in basalen Ebenen verdeutlichte den hohen Grad der Organisation unter zyklischer Dehnung [Abbildung 38 A]. Dabei konnte auch für Keratinozyten in Monolagen eine definierte aber geringere Winkelausrichtung unter Einfluss des Polymerisationsinhibitors beobachtet werden ($\Delta FFT_{norm.}$ -Maximum der Kontrolle bei 84° , unter Cyto. D bei 75° zur Zugrichtung bei 0° bzw. 180°). Im apikalen Aktinkortex der Zellen lagen im Gegensatz zu basalen Stressfasern schwächere F-Aktin-Strukturen vor. Dabei wurde unabhängig von der Wirkung des Inhibitors eine fast quer zur Dehnungsrichtung vorliegende Anordnung der beobachteten Filamente ermittelt. Während bei Kontrollen eine Ausrichtung im 90° Winkel zur Dehnung gezeigt werden konnte, wiesen die

Zellen unter gestörter Aktin-Polymerisation eine verstärkte Ausprägung der Filamente und eine maximale Orientierung bei 95° auf [Abbildung 38 B].

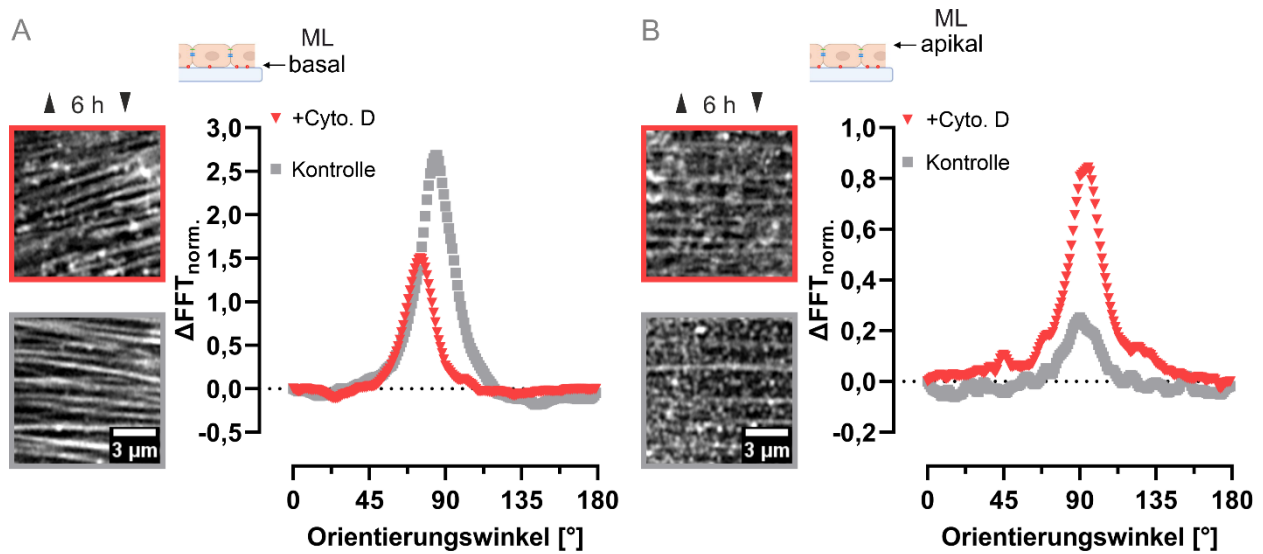


Abbildung 38: **Auswertung der Strukturausrichtung im Aktinkortex einschichtiger Keratinozyten.** Monolagen (ML) wurden zyklisch gedehnt (Zugrichtung durch Pfeile angedeutet) und nach räumlich-aufgelöster Konfokalmikroskopie des F-Aktins (repräsentative Beispiele dargestellt) die Strukturorientierung ermittelt. Hierzu wurde neben unbehandelten Kontrollen auch ML nach Gabe des Inhibitors Cyto. D ausgewertet. Dargestellt ist die Differenz der gedehnten und ungedehnten Fourier-Strukturanalyse nach Normalisierung gegen den Orientierungswinkel (0° bzw 180° entspricht uniaxialer Dehnungsrichtung). Die Auswertung erfolgte getrennt für die Stressfasern der basalen Seite [A] und den apikalen Kortex [B] (angedeutet im oberen Schema). Kontrolle: $n=108$ (unged. und 6), +Cyto. D: $n=108$ (6 h), $n=102$ (unged.)

3.4.3 Abhängigkeit der kortikalen Umstrukturierung von interzellulären Verbindungen

Die nahezu rechtwinklig zur Dehnungsrichtung vorgefundenen Aktinfilamente im Zellkortex konnten sowohl in substratadhäsiven Monolagen als auch auf der apikalen Seite suprabasaler Keratinozyten, die über keinen Substratkontakt verfügten, nachgewiesen werden. Dabei endeten die länglichen Filamente in gegenüberliegenden Zell-Zell-Grenzen. Diese Beobachtungen legten eine besondere Bedeutung interzellulärer Kontakte für die mechanosensitive Zellantwort nahe. Aus diesem Grund wurden in weiteren Untersuchungen Keratinozyten eingesetzt, die auch nach Adhäsion auf dem elastischen Substrat in geringer Kalziumkonzentration gehalten wurden. Dadurch wurde die kalziumabhängige Bindung der Cadherine nicht initiiert und der Aufbau von Desmosomen und AJs verhindert. Dabei wurde die überkonfluente Dichte bei Aussaat der Zellen beibehalten.

An der basalen Seite lagen auch bei diesen Zellen Aktin-Faserbündel in alle Richtungen vor. Wie bereits in früheren Arbeiten gezeigt, induzierte das Anlegen einer zyklischen Dehnung auch auf Einzelzellniveau bzw. in Abwesenheit von Kalzium eine annähernd quer zur Dehnungsrichtung

orientierte Umstrukturierung FA-assoziierter Stressfasern [Abbildung 39]. Im Gegensatz zum Zytoskelett der Keratinozyten, die nach Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten gedehnt wurden, lagen keine zellübergreifend einheitlichen Winkel benachbarter Stressfasern vor. Vielmehr ließen sich die individuellen Faserenden im Randbereich der individuellen Zellen lokalisieren. In konfokalmikroskopischen Aufnahmen der apikalen Seite konnte das kortikale F-Aktin-Netzwerk auch in Abwesenheit von Kalzium in Form von punktförmigen und kurzfasrigen Verdichtungen teilaufgelöst werden. Nach 6 h zyklischer Dehnung wurden im Kontrast zu Ca^{2+} -induzierten Monolagen nur vereinzelt Filamente im apikalen Kortex ausgemacht. Dabei orientierten sich diese an den Längsachsen der konvexen Zellkörper und damit überwiegend in anderer Richtung als basale Stressfasern derselben Zellen [Abbildung 39].

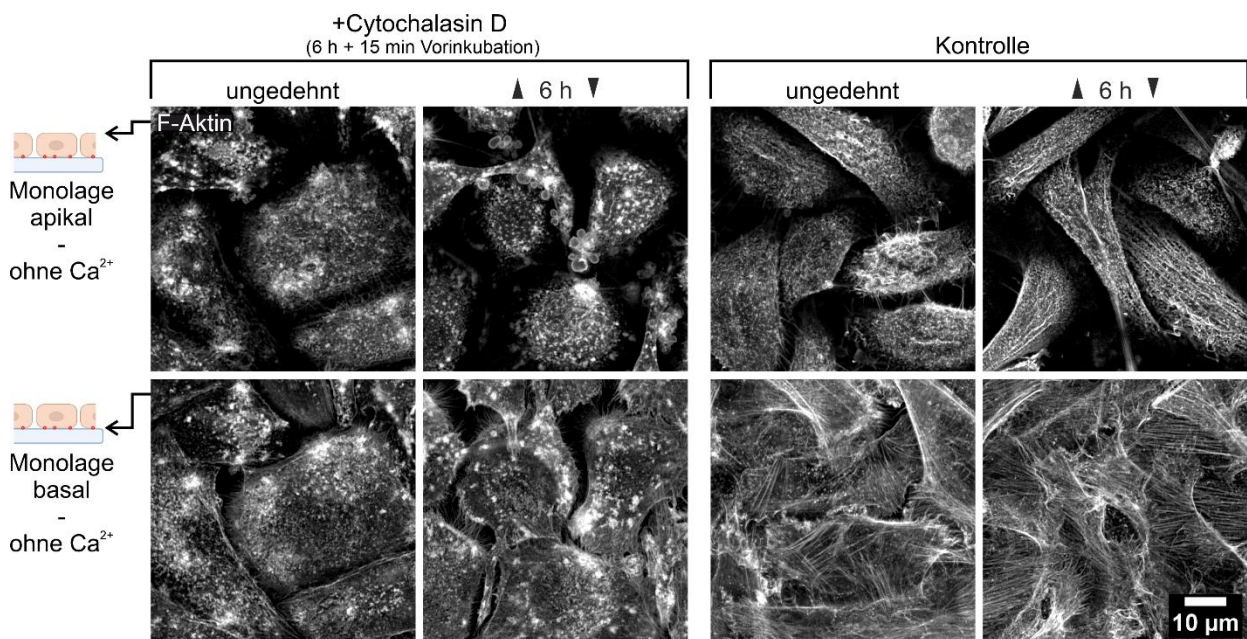


Abbildung 39: **Struktur des F-Aktins in kalzium-freien Monolagen unter Dehnung.** Keratinozyten wurden in hoher Dichte als Monolage ausgebracht und ohne Zugabe von Kalzium kultiviert, wodurch der Aufbau kalziumabhängiger Zell-Zell-Verbindungen verhindert wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe Cytochalasin D und das Anlegen zyklischer Dehnung über 6 h (Dehnungsrichtung durch schwarze Pfeile angedeutet). Repräsentativ abgebildet sind MIP weniger Ebenen des basalen und apikalen F-Aktins.

Zellen ohne kalziumabhängige Zell-Zell-Verbindungen reagierten darüber hinaus sensitiver auf die Störung der Aktin-Polymerisation durch Cyto. D. Bereits ohne zusätzlichen mechanischen Stimulus wurden nahezu keine vergleichbaren Stressfasern in der basalen Ebene identifiziert [Abbildung 39]. Die Zellen wiesen außerdem unabhängig vom Anlegen einer Dehnung eine insgesamt rundere Form der Zellkörper auf. Außerdem traten signalintensiven F-Aktin-Aggregate dehnungsunabhängig im gesamten Kortex auf. Daneben war jedoch keine Bildung von Faser- oder Filamentstrukturen im basalen und apikalen Zellkortex sichtbar.

3.4.4 Aufbau dehnungsinduzierter Filamente bei eingeschränkter Formin-Nukleation

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Bedeutung der direkten, mechanischen Verbindung benachbarter Zellen für die effektive und kooperative Strukturanpassung im Aktinkortex eines multizellulären Verbands unter zyklischer Dehnung gezeigt werden. Gleichzeitig sind die zugrundeliegenden, molekularen Mechanismen noch weitgehend unverstanden, die für eine zytoskelettale Adaption auf mechanische Reize wichtig sind. Aufgrund des Auftretens apikaler Filamente im hochdynamisch regulierten Zellkortex wurde eine Beteiligung linearer Aktinnukleationsfaktoren in Betracht gezogen. Die gefundenen kortikalen Aktinfilamente zeigten sich besonders prägnant in Zellen, die mit Cytochalasin D behandelt wurden. Auf Basis dieser Beobachtungen wurden Monolagen zusätzlich mit dem Formin-Inhibitor SMIFH2 (*engl. Small Molecule Inhibitor of Formin Homology 2 domain*) behandelt und analysiert.

Die zusätzliche Verwendung des Formin-Inhibitors zeigte gegenüber den Zellen, die nur mit 1 μM Cyto. D versetzt wurden, keinen sichtbaren Effekt [Abbildung 40]. Die basalen Stressfasern erschienen im mikroskopischen Bild möglicherweise dünner als bei Kontroll- oder Cyto. D-inhibierten Monolagen vorheriger Untersuchungen. Eine dehnungsinduzierte Reorientierung konnte hingegen gleichermaßen wie in Zellen induziert werden, die nur Cyto. D erhalten hatten ($\Delta\text{FFT}_{\text{norm.}}$ -Maximum bei 73°). Weiterhin zeigte SMIFH2 unter den gewählten Bedingungen keinen Effekt auf die Filamentbildung im apikalen Kortex. Nach 6 h zyklischer Dehnung ließen sich über die vollständige apikale Länge der Zellen und in quer zur Dehnungsachse orientierter Ausrichtung Aktinfilamente identifizieren. Die nachfolgende Auswertung mittels vorgestellter FFT-Strukturanalyse zeigte auch hier eine dehnungsinduzierte Reorientierung des F-Aktins apikaler Ebenen. Dabei waren Ausprägung und Orientierungswinkel unabhängig vom Einsatz des Formin-Inhibitors ($\Delta\text{FFT}_{\text{norm.}}$ -Maximum bei 90°) [Abbildung 40].

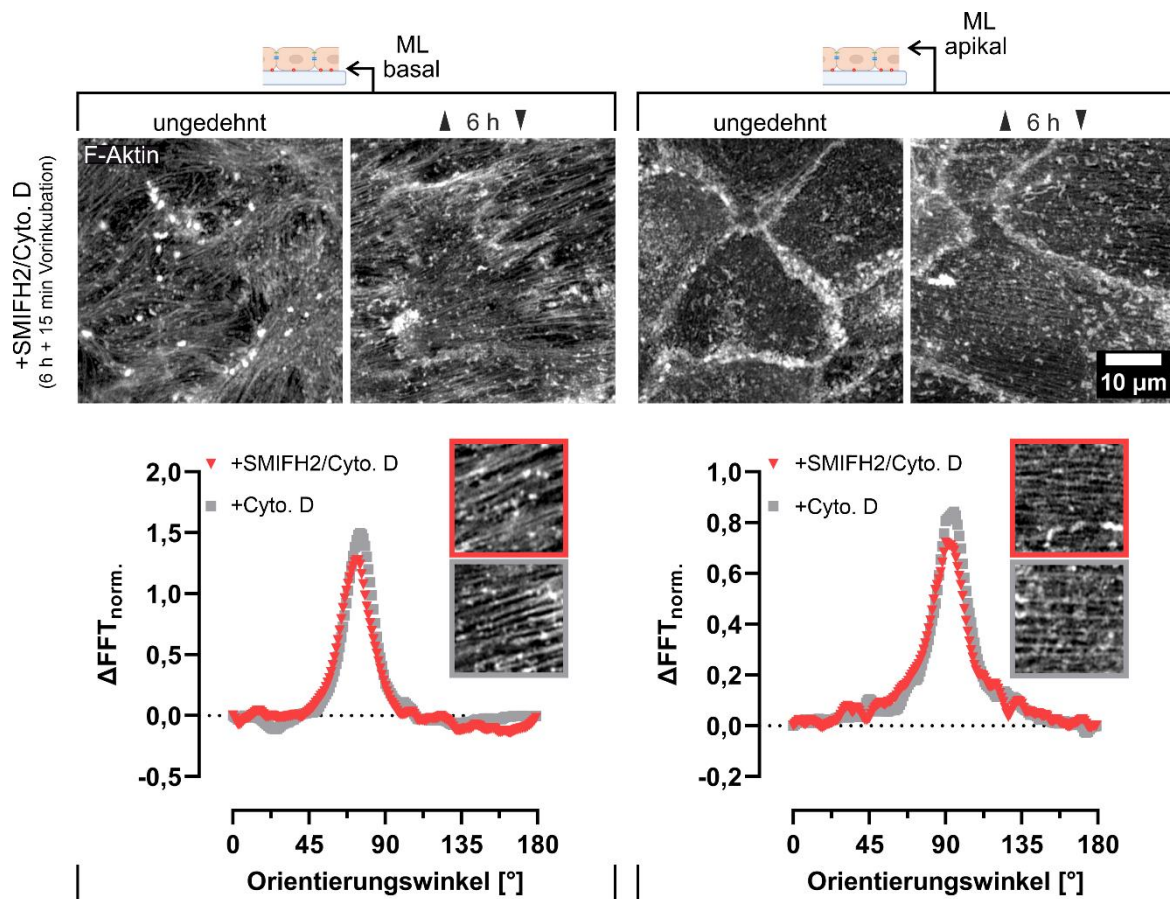


Abbildung 40: **Strukturelle Anpassung im F-Aktin epidermaler Monolagen unter Formin-Inhibition.** Keratinozyten wurden zusätzlich zu $1 \mu\text{M}$ Cyto. D mit $20 \mu\text{M}$ SMIFH2 versetzt und unter zyklische Dehnung gesetzt (Zugrichtung durch schwarze Pfeile markiert). Die konfokalmikroskopische Aufnahme ermöglichte die getrennte Auswertung des basalen und apikalen F-Aktins (repräsentative Beispiele in grau und rot, Auswertungsebenen angedeutet im oberen Schema). Dargestellt ist die Differenz der gedehnten und ungedehnten Fourier-Strukturanalyse (je $n=108$) gegen den Orientierungswinkel (0° bzw 180° entspricht uniaxialer Dehnungsrichtung). Daten unter ausschließlicher Zugabe von Cyto. D wurden zu Vergleichszwecken erneut aufgeführt [siehe auch Abbildung 38).

Nachdem die Strukturanalyse gezeigt hatte, dass die Inhibition der unverzweigten Aktin-Polymerisation über SMIFH2 unter den gewählten Rahmenbedingungen keine Schlüsselrolle bei der dehnungsinduzierten Kortexorganisation einnimmt, wurde zusätzlich ein Einfluss auf die Stressfaser- und Zellkernorientierung anhand zuvor beschriebener Bildverarbeitungslösungen ausgeschlossen. Tatsächlich ergab sich auch über eine Strukturtensor-basierte Auswertung der basalen Aktin-Stressfasern kein Unterschied durch die Zugabe des SMIFH2 [Abbildung 41 A]. Auch die Orientierung der Zellkern-Hauptachsen konnte weder durch die alleinige Inhibitorwirkung noch durch das zusätzliche Anlegen zyklischer Dehnung weitergehend beeinflusst werden [Abbildung 41 B].

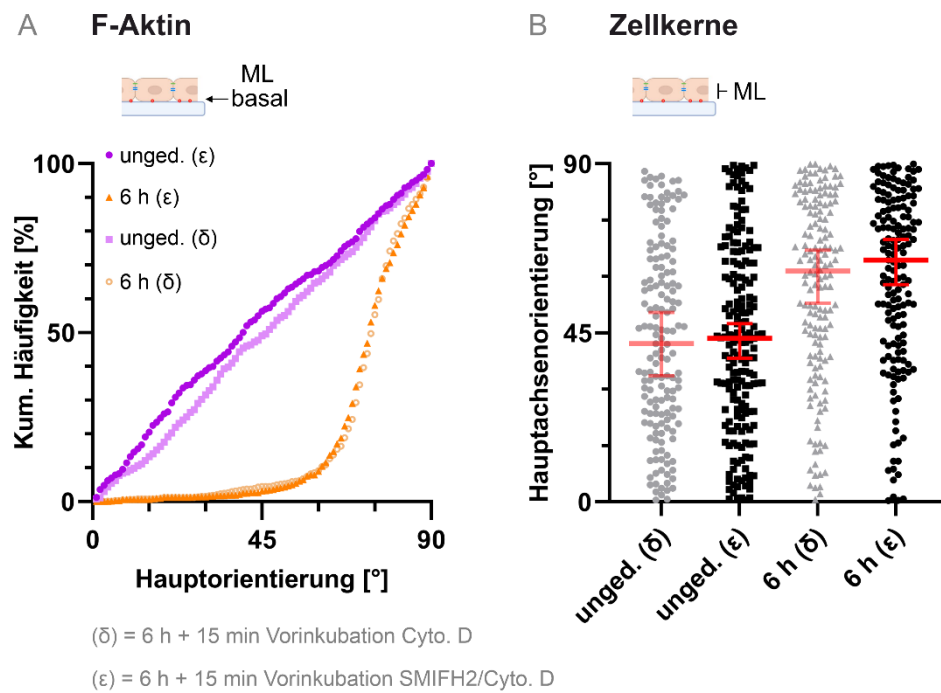


Abbildung 41: **Stressfaser- und Zellkern-Reorientierung in Monolagen bei zusätzlicher Störung der Formin-vermittelten Aktin-Polymerisation.** Einschichtige Keratinozyten wurden nach Zugabe von 20 μM Formin-Inhibitor SMIFH2 und 1 μM Cyto. D zyklisch gedehnt. Die Hauptorientierung der Stressfasern je Zelle wurde mittels Strukturtensor-basierter Auswertung bestimmt und mit ungedehnten Zellen sowie früheren Werten von Monolagen unter alleiniger Cyto. D-Gabe [siehe auch Abbildung 36] verglichen. Monolage unged. und 6 h (ε): $n=648$ [A]. Die Orientierung der Zellkern-Hauptachsen wurde ebenso ermittelt und mit der dehnungsinduzierten Ausrichtung (Zugrichtung entspricht 0°) der Monolagen unter alleiniger Cyto. D-Gabe aufgetragen. Monolage unged. (ε): $n=191$, 6 h (ε): $n=163$. In roten Balken sind der Zentralwert und das entsprechende 95 %-Konfidenzintervall angegeben [B].

3.4.5 Einfluss des Myosin-Motorproteins auf die Struktur des F-Aktins unter Dehnung

Die Dynamik des kortikalen Aktin-Netzwerks wird über eine Vielzahl assoziierter Proteine reguliert. Eine entscheidende Funktion nimmt dabei auch das Motorprotein Myosin ein. Nachdem die Nukleation über Formine unter den gewählten Rahmenbedingungen möglicherweise eine untergeordnete Rolle spielen könnte, wurden analoge Dehnungsversuche unter Verwendung des Myosin-Inhibitors Blebbistatin durchgeführt. Dabei wurde der Inhibitor, der in der Literatur verbreitet Anwendung findet und als selektiv für nicht-muskuläres Myosin 2 (NMM2) gilt, entweder zusätzlich zu Cyto. D oder unabhängig vom Aktin-Polymerisationsinhibitor eingesetzt.

Der gemeinsame Einsatz beider Inhibitoren hatte neben den durch Cyto. D hervorgerufenen Aggregaten und der Auflösung der linearen Zellgrenze im F-Aktin eine Reduktion der basalen Stressfasern zur Folge. Dabei waren die Fasern vereinzelt und mit zufälliger Orientierung jedoch auch nach über 6 h komplementärer Inhibition weiterhin in einem Großteil der Zellen zu finden [Abbildung 42]. An der apikalen Seite wiesen die Keratinozyten die typischen, heterogenen

Aggregate im Aktinkortex auf. Eine zyklische Dehnung induzierte annähernd keine Änderung im mikroskopischen Bild des apikalen Aktinkortex. Das Auftreten der deutlichen Filamente wurde hier nahezu vollständig unterbunden. Interessanterweise konnten bei gleichzeitigem Einsatz beider Inhibitoren auch in den basalen Ebenen keine ausgerichteten Aktin-Stressfasern beobachtet werden. Hier zeigte das F-Aktin eine diffuse Struktur und keine parallelen Fasern. Vielmehr wirkte das Phalloidin-markierte Aktin-Zytoskelett in Dehnungsrichtung verzogen [Abbildung 42].

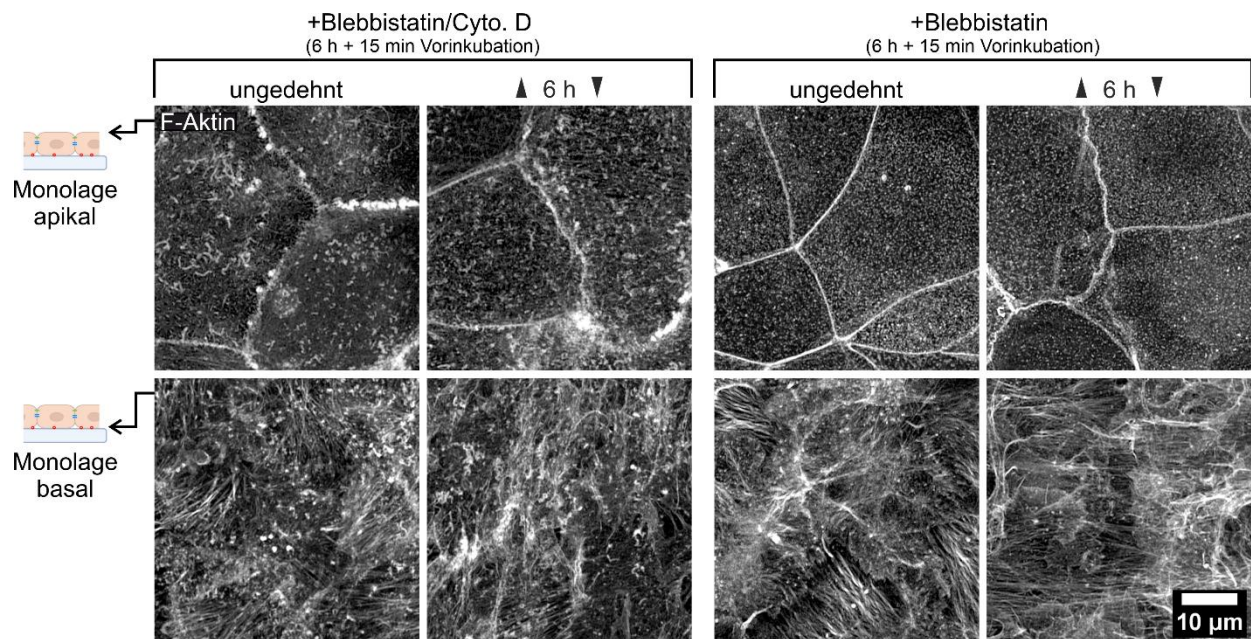


Abbildung 42: **F-Aktin-Struktur unter Dehnung und paralleler Inhibition des Myosin-Motorproteins.** Das Aktomyosin epidermaler Monolagen wurde mit 1 µM Cyto. D und/oder 20 µM Blebbistatin inhibiert. Anschließend erfolgte u.U. eine zyklische Dehnung (uniaxiale Zugachse durch Pfeile angedeutet) und konfokalmikroskopische Aufnahme des basalen und apikalen F-Aktins (Aufnahmeebenen im Schema links angedeutet).

Der Einsatz des Myosin-Inhibitors Blebbistatin ohne zusätzliche Inhibition der Aktin-Polymerisation verhielt sich in Abwesenheit eines Dehnungsreizes im apikalen Kortex unauffällig. Das F-Aktin zeigte sich vergleichbar zu Aufnahmen der Kortizes unbehauelter Keratinozyten. Während die linearen Zellgrenzen deutlich erkennbar vorlagen, wurde das kortikale Aktin der apikalen Oberfläche durch punktförmige Verdichtungen wiedergegeben.

An der basalen Kontaktfläche zum Substrat äußerte sich eine NMM2-Inhibition durch geschwungene und weniger gradlinige Aktin-Bündel, die zwar in zufälliger Orientierung jedoch in reduzierter Anzahl vorlagen. Eine zyklische Dehnung über 6 h induzierte das Auftreten länglicher F-Aktin-Strukturen [Abbildung 42]. Dabei waren die beobachteten Aktin-Bündel in Intensität und Organisation nicht mit den Stressfasern in Monolagen unter Dehnung vergleichbar, die keinem Inhibitor ausgesetzt waren. Vielmehr fanden sich neben dünneren Aktin-Bündeln

quer zur Zugrichtung auch längliche Strukturen parallel zur Dehnungsachse. Der überwiegende Anteil der vorhandenen F-Aktin-Strukturen wies jedoch eine eher quer zur Dehnung ausgerichtete Orientierung auf und zeigte somit eine eindeutige Antwort auf die wiederkehrende Deformation. Erstaunlicherweise konnte dagegen an der apikalen Oberfläche keine Veränderung im Zellkortex festgestellt werden. Das kortikale Aktin äußerte sich hier unabhängig vom Anlegen des mechanischen Reizes weiterhin nur durch punktförmiges F-Aktin. Dehnungsinduzierte Aktinfilamente im apikalen Kortex wurde nach Inhibition der Myosine durch Blebbistatin nicht mehr beobachtet [Abbildung 42].

Zur Quantifizierung der basalen Faserorientierung wurde anschließend unter Verwendung der beschriebenen Strukturtensor-basierten Bildverarbeitung die Hauptorientierung der Aktin-Bündel bestimmt [Abbildung 43 A]. Erwartungsgemäß wurde für Keratinozyten, die keiner mechanischen Belastung ausgesetzt wurden, eine Gleichverteilung der aufgetretenen Orientierungswinkel beobachtet. Dabei war es unerheblich, ob die Zellen zusätzlich mit Cyto. D oder ausschließlich mit Blebbistatin behandelt wurden. Unter zyklischer Dehnung trat bei komplementärer Inhibition keine vergleichbare Reorientierung des basalen F-Aktins auf. Vielmehr konnte die Beobachtung einer Verschiebung des diffusen Aktin-Zytoskeletts in Dehnungsrichtung durch eine Verringerung der Winkel bestätigt werden. Die Störung des NMM2 ohne zusätzlichen Einfluss auf die Aktin-Polymerisation hatte das Auftreten basalen F-Aktins, das eine überwiegend quer zur Dehnung verlaufende Ausrichtung aufwies, zur Folge. Dabei war die Orientierung gegenüber unbehandelten Keratinozyten jedoch vermindert. Während 26 % der Zellen nach 6 h Dehnung einen Hauptwinkel $\leq 70^\circ$ aufwiesen, lag dieser Anteil in unbehandelten Monolagen vorheriger Untersuchungen bei 6 %.

Eine nachfolgende FFT-Strukturanalyse unter Verwendung einzelner Bildausschnitte intrazellulärer Bereiche zeigte für das basale F-Aktin NMM2-inhibierter Zellen ebenfalls ein vermehrtes Auftreten von Aktin in näherungsweise 90° zur Zugrichtung [Abbildung 43 B]. Im Gegensatz dazu bestätigte sich das Fehlen vergleichbarer Reorientierungsprozesse in komplementär inhibierten Monolagen. Die Keratinozyten in Blebbistatin und Cyto. D zeigten dabei keine dehnungsinduzierten Strukturänderungen des apikalen F-Aktins. Erstaunlicherweise konnte das Ausbleiben einer Strukturanpassung unter mechanischer Belastung jedoch auch bei ausschließlicher Störung der Motorproteine beobachtet werden. Für die Struktur des apikalen Aktinkortex ergab sich damit keine differentielle Ausprägung zu Blebbistatin-behandelten Zellen, die keiner zyklischen Dehnung unterlegen waren [Abbildung 43 B]. Die Repression apikaler Filamente des Aktinkortex unter Dehnung in Abwesenheit funktionalen NMM2s konnte somit qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden.

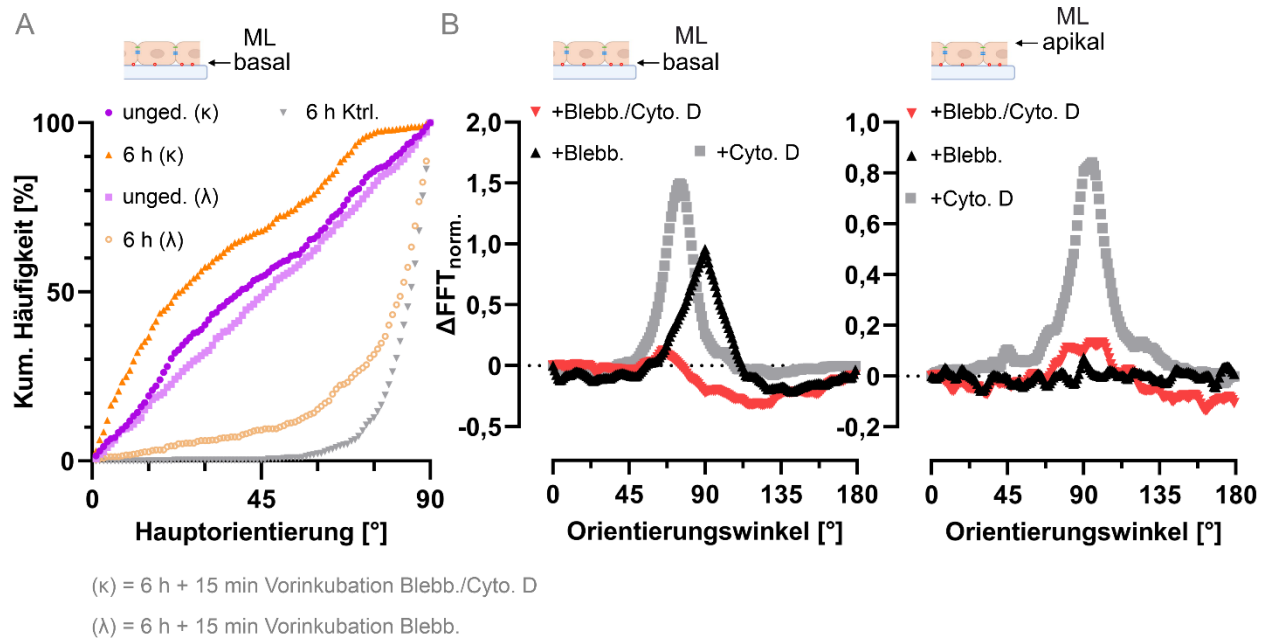


Abbildung 43: **Orientierung des F-Aktins unter Dehnung und paralleler NMM2-Inhibition.** Nach Inhibition durch Cyto. D und/oder Blebbistatin erfolgte eine zyklische Dehnung über 6 h. Die Hauptorientierung des basalen F-Aktins je Zelle wurde anschließend mittels Strukturtensor-basierter Auswertung bestimmt [A]. ML unged. und 6 h (κ): $n=648$, unged. und 6 h (λ): $n=450$. Außerdem wurde die FFT-Strukturanalyse des F-Aktins über die Differenz gedehnter und ungedehnter Monolagen nach Normalisierung durchgeführt (jeweils $n=108$). Die Auswertungsebenen sind im oberen Schema angedeutet [B]. 0° bzw 180° entspricht der uniaxialen Dehnungsrichtung. Daten unter Zugabe von Cyto. D wurden zu Vergleichszwecken erneut aufgeführt [siehe auch Abbildung 38].

3.4.6 Bedeutung der Myosin-Motoraktivität für die F-Aktin-Struktur unter Dehnung

Die NMM2-Proteine binden und vernetzen nicht nur F-Aktin, sondern üben auch durch die relative Verschiebung der Filamente die kontraktile Kräfte des kortikalen Aktomyosins aus. Die ATPase-Aktivität der Myosin-Motorproteine wird dabei durch Phosphorylierungen der leichten Ketten als ein regulatorisches Element stark erhöht. Um weitergehend zu prüfen, ob die Phosphorylierungen des NMM2 durch die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (*engl. myosin light chain kinase*, MLCK) einen Mechanismus der kortikalen Umstrukturierung durch extrinsische Dehnung darstellen könnte, wurden die vorherigen Analysen unter Verwendung des potenten MLCK-Inhibitors ML-7 in analoger Weise durchgeführt.

Dabei zeigte sich unter gleichzeitiger Anwendung des ML-7 und Cyto. D ein zur alleiniger Inhibition mit Cyto. D vergleichbares Bild des F-Aktins. In mikroskopischen Aufnahmen fanden sich Aktin-Aggregate im gesamten Zellkortex [Abbildung 44]. Außerdem lagen basale Stressfasern vor, die in ihrer zufälligen Orientierung und Ausprägung den Keratinozyten ohne ML-7 entsprachen. Das Anlegen zyklischer Dehnung hatte eine Reorientierung der Fasern zur Folge, die sich zellübergreifend in einer nahezu identischen Richtung anglichen. Die Ausrichtung

konnte qualitativ nicht von Cyto. D-inhibierten Monolagen ohne zusätzliche MLCK-Inhibitor unterschieden werden. Auch das apikale Bild demonstrierte eine vergleichbare Umstrukturierung des kortikalen Aktins. Nach 6 h zyklischer Dehnung bildeten sich Filamente aus, die rechtwinklig zur Zugrichtung vorlagen. Dabei traten diese Strukturen über die gesamte Fläche der Keratinozyten auf und deuteten eine Anbindung an das gegenüberliegende, laterale Zytoskelett und die dortigen Zell-Zell-Kontakte an [Abbildung 44].

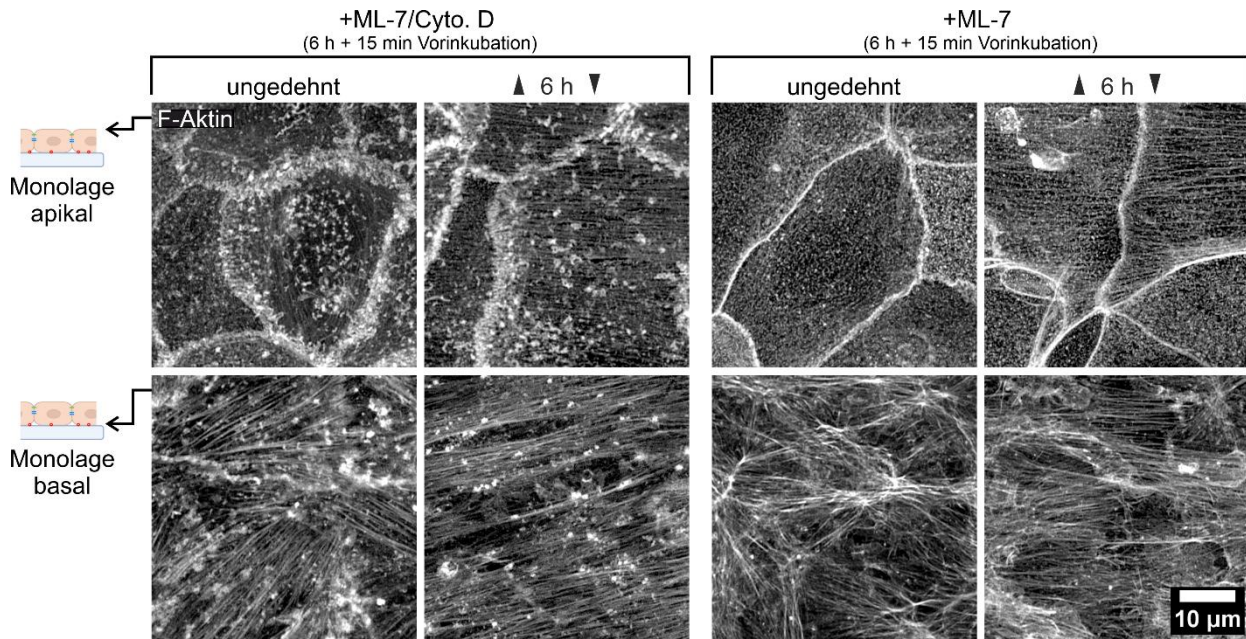


Abbildung 44: **F-Aktin-Struktur unter Dehnung und paralleler Inhibition der MLCK.** Das Aktomyosin epidermaler Monolagen wurde mit 1 μ M Cyto. D und/oder 20 μ M ML-7 gestört. Anschließend erfolgte u.U. eine zyklische Dehnung (uniaxiale Zugachse durch Pfeile angedeutet) und konfokalmikroskopische Aufnahme des basalen und apikalen F-Aktins (Aufnahmeebenen im Schema links angedeutet).

An der basalen Seite der Zellen, die ausschließlich den MLCK-Inhibitor ML-7 erhalten hatten, zeigten sich deutliche, zufällig orientierte Aktin-Bündel [Abbildung 44]. Diese lagen in Verteilung und Ausprägung vergleichbar zu Aufnahmen früherer Monolagen ohne jegliche Störung der zytoskelettalen Systeme vor. Ebenso konnte die punktförmige Struktur des apikalen Kortex und die lineare Zellgrenze durch die Markierung des F-Aktins gezeigt werden. Ein Unterschied zu Kontrollen, die kein ML-7 erhalten hatten, wurde dabei nicht festgestellt. Tatsächlich führte auch eine Dehnung unter MLCK-Inhibition zu einer ähnlichen Reorientierung wie bereits unter Kontrollbedingungen. Dabei lagen die Stressfasern der basalen Ebenen in nahezu quer zur Dehnung ausgelegter Orientierung vor. Im mikroskopischen Bild zeigten sich hier ähnliche Orientierungswinkel über benachbarte Zellen hinweg. An der apikalen Oberfläche induzierte die mechanische Belastung das Auftreten von Filamenten unterschiedlicher Stärke im

kortikalen Aktin. Diese F-Aktin-Signale lagen ebenfalls über die gesamte Zelllänge und in fast rechtwinkliger Orientierung zur Zugachse vor [Abbildung 44].

Die Quantifizierung der Stressfaser-Hauptorientierung mittels Strukturtensor-basierter Bildverarbeitung lieferte eine von der biochemischen Behandlung unabhängige Gleichverteilung auftretender Winkel. Erst nach zyklischer Dehnung zeigte sich die Reorientierung anhand der ermittelten Verschiebung in Richtung 90° zur Dehnungsachse [Abbildung 45 A].

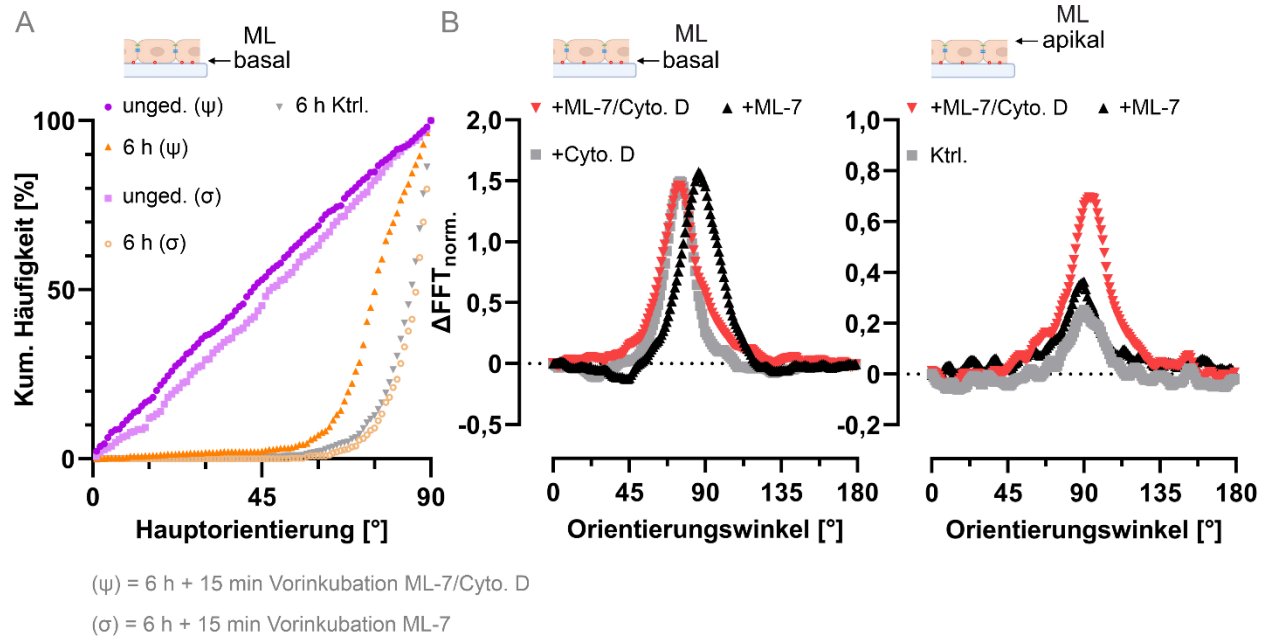


Abbildung 45: **Orientierung des F-Aktins unter Dehnung und paralleler MLCK-Inhibitor.** Nach Inhibition durch Cyto. D und/oder ML-7 wurden Keratinozyten über 6 h zyklisch gedehnt. Die Hauptorientierung der basalen Stressfasern je Zelle wurde anschließend mittels Strukturtensor-basierter Auswertung bestimmt [A]. ML unged. und 6 h (ψ): $n=648$, unged. und 6 h (σ): $n=450$. Außerdem wurde die FFT-Strukturanalyse des F-Aktins über die Differenz gedehnter und ungedehnter Monolagen nach Normalisierung durchgeführt (jeweils $n=108$). Die Auswertungsebenen sind im oberen Schema angedeutet [B]. 0° bzw. 180° entspricht der uniaxialen Dehnungsrichtung. Daten der unbehandelten Kontrolle und unter Zugabe von Cyto. D wurden zu Vergleichszwecken erneut aufgetragen [siehe auch Abbildung 38].

Dabei führte der gleichzeitige Einsatz von ML-7 und Cyto. D zu einer ähnlichen Anpassung wie eine alleinige Inhibition mit Cyto. D (+Cyto. D: 71 %, +ML-7/Cyto. D: 74 % der Zellen $\geq 70^\circ$). In Übereinstimmung mit der mikroskopischen Beobachtung äußerte sich die zyklische Dehnung bei ausschließlicher Gabe des MLCK-Inhibitors ML-7 dagegen in stärkerer Ausrichtung hin zu 90°. Dabei konnte auch quantitativ kein Unterschied zum Reorientierungsverhalten unbehandelter Kontrollen festgestellt werden. In beiden Monolagen wiesen nahezu 80 % der Zellen Orientierungswinkel zwischen 80-90° auf. Tatsächlich wurde die Unabhängigkeit dehnungsinduzierter Strukturänderungen im F-Aktin von der Anwesenheit des MLCK-Inhibitors auch durch die FFT-Strukturanalyse bestätigt [Abbildung 45 B]. Hierbei zeigte

sich an der basalen Kontaktfläche zum Substrat eine maximale Strukturorientierung bei 86°. Die alleinige und zusätzliche Gabe von Cyto. D. führte zur maximalen Strukturorientierung bei 75°. Im apikalen Kortex wurde das verstärkte Auftreten der Filamente durch die Gabe des Aktin-Polymerisationsinhibitors auch bei gleichzeitiger Inhibition der MLCK induziert. Hier konnte eine maximale Strukturorientierung bei 93° gezeigt werden. Die beobachteten Filamente im apikalen Kortex der ausschließlich mit ML-7-inhibierten Monolagen waren dagegen vergleichbar zu unbehandelten Kontrollen ausgeprägt und ebenso rechtwinklig zur Zugachse bei 0° bzw. 180° ausgerichtet [Abbildung 45 B]. Die Inhibition der Myosin-Phosphorylierungen durch MLCKs zeigte unter den gewählten Bedingungen somit im Gegensatz zur direkten Inhibition der Myosine durch Blebbistatin keinen Einfluss auf die kortikale Umstrukturierung unter extrinsischer Deformation.

3.4.7 Einfluss der Inhibitoren zur Störung des Aktomyosins auf die zelluläre Kontraktilität

Die in diesem Abschnitt eingesetzten Zellgifte wirken auf unterschiedliche Weise auf die Organisation und Aktivität des Aktomyosins ein. Dabei wurde jedoch ein differentieller Effekt der verwendenden Substanzen auf die kortikale F-Aktin-Struktur und deren Anpassungen unter zyklischer Dehnung beobachtet. Unter Anwendung der Zugkraftmikroskopie wurde deshalb der Einfluss dieser Inhibitoren auf die kontraktilen Kräfte der Keratinozyten näher untersucht. Hierzu wurde die von den Zellen auf das elastische Substrat ausgeübte Kraft über die Zeit analysiert. Die aus der Verformung des Substrats errechnete Formänderungsenergie [siehe auch Kapitel 2.15.7] wurde vor und nach Zugabe der jeweiligen Inhibitoren in der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen bestimmt. In Abbildung 46 wurde das Verhältnis E_{pot} als der Quotient aus der Formänderungsenergie zum jeweiligen Zeitpunkt und der Energie vor Zugabe der Zellgifte als Maß der relativen Änderung angegeben.

Während die Kontrolle des Lösemittels DMSO nahezu keinen Effekt auf die ausgeübten Zellkräfte zeigte, reduzierten sich die ermittelten Werte bereits 5 min nach Zugabe des Cyto. D auf 30 % des Ausgangswerts. Innerhalb der nachfolgenden Minuten fielen die auftretenden Zellkräfte weiter auf etwa 13 % ab und veränderten sich im weiteren Verlauf nicht mehr [Abbildung 46]. Diese drastische Verminderung der zellulären Kräfte im Aktomyosin deckte sich mit der fluoreszenzmikroskopischen Beobachtung eines eingeschränkten und verkürzten F-Aktins und dem Auftreten von Aggregaten, welche zuvor sowohl nach 45 min als auch nach 6 h gefunden wurden.

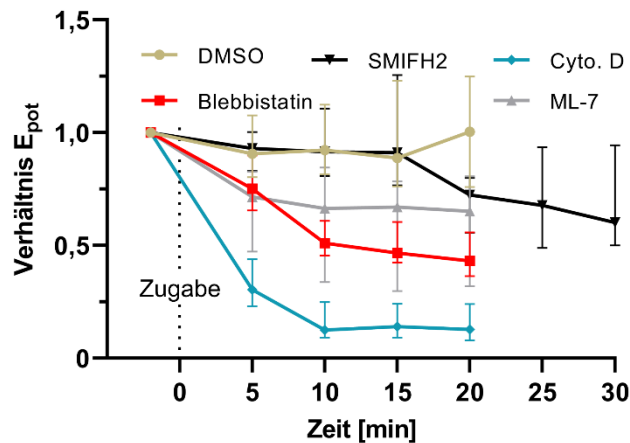


Abbildung 46: **Veränderung der zellulären Kräfte durch Störung des Aktomyosins.** Ermittelt wurden die am Substrat wirkenden kontraktile Kräfte der Keratinozyten durch Verformung des elastischen Substrats. Das Verhältnis E_{pot} gibt die errechneten Formänderungsenergien im Verhältnis zur ursprünglichen Formänderungsenergie 2 min vor Zugabe der Zellgifte an. Dargestellt sind der Zentralwert und das 95 %-Konfidenzintervall aus $n=15$ ($20 \mu\text{M}$ SMIFH2, $20 \mu\text{M}$ Blebbistatin, $0,05 \%$ DMSO), $n=14$ ($16 \mu\text{M}$ ML-7) und $n=12$ ($1 \mu\text{M}$ Cyto. D) Zellklustern zweier unabhängiger Versuche.

Einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die zelluläre Kontraktilität konnte auch für eine direkte und indirekte Beeinflussung des NMM2 durch Blebbistatin und den MLCK-Inhibitor ML-7 gefunden werden. Während Blebbistatin die Konformationsänderung der Myosine direkt blockiert, wird durch ML-7 eine durch Phosphorylierungen der Myosin-Untereinheiten hervorgerufene Aktivitätssteigerung inhibiert. Dabei sank in beiden Fällen die ermittelte Formänderungsenergie um fast 30 % innerhalb der ersten 5 min [Abbildung 46]. Über die nachfolgenden 15 min verminderten sich die Zellkräfte bei Einsatz des Blebbistatins auf etwa 45 % des ursprünglichen Niveaus. Die Inhibition der MLCKs hatte dagegen eine Schwächung der ermittelten Zellkräfte auf etwa 65 % der Kontrollzellen zur Folge. Die eingesetzten Zellgifte erreichten dabei nach 15 min ein Niveau, das sich in den nachfolgenden Minuten nicht ausgeprägt weiter veränderte und so einen stabilen Zustand der Inhibition eingenommen zu haben schien.

Im Gegensatz dazu zeigte die Formin-Inhibition durch SMIFH2 erst nach 15 min eine zur Kontrolle abweichende Formänderungsenergie, weshalb der Analysenzeitraum hierbei auf 30 min verlängert wurde. Die Keratinozyten wiesen 20 min nach SMIFH2-Zugabe noch 72 % der ursprünglichen potentiellen Energie auf. Im weiteren Verlauf war eine zusätzliche leichte Absenkung der Kontraktilität zu beobachten, sodass nach insgesamt 30 min nur noch 60 % der ursprünglichen Zellkräfte ermittelt werden konnten. Die Störung der Formine äußerte sich damit zeitlich versetzt, resultierte jedoch in einer Einschränkung der am Substrat wirkenden Kräfte, die mit der Auswirkung der MLCK-Inhibition durch ML-7 vergleichbar war.

Die Verminderung der kontraktilen Kräfte durch die eingesetzten Substanzen verdeutlichte, dass die gewählte Vorinkubation von 15 min bis zum Anlegen zyklischer Dehnung zur Störung des Aktomyosins ausgereicht hatte. Darüber hinaus wiesen diese Untersuchungen für alle verwendeten Inhibitoren sowie die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen unabhängig deren Funktionalität im Zellexperiment nach.

3.4.8 Rolle des NMM2 in der dehnungsinduzierten Adaption suprabasaler Zellen im SEE

Eine direkte Inhibition der Myosine durch Blebbistatin hatte erkennbare und quantifizierbare Auswirkungen auf die dreidimensionale Organisation des kortikalen F-Aktins unter Dehnung und verhinderte eine zu Kontrollen vergleichbare strukturelle Anpassung des basalen und apikalen Netzwerks. Dieser Effekt konnte an einschichtigen Keratinozyten durch die räumliche Auflösung bzw. getrennte Betrachtung des basalen und apikalen F-Aktins gezeigt werden. Abschließend sollte deshalb untersucht werden, ob sich eine kortikale Strukturveränderung suprabasaler Keratinozyten unter Dehnung in analoger Weise einschränken ließe. Hierzu wurden SEEs unter gleichzeitigem Einsatz von Cyto. D und Blebbistatin sowie alleiniger Blebbistatin-Gabe zyklisch gedehnt und die F-Aktin-Struktur der basalen und apikalen Ebenen mit entsprechenden Kontrollen verglichen [Abbildung 47].

Die basalen Ebenen des mehrschichtigen SEE zeigten sich dabei in fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in vergleichbarer Organisation zu Monolagen unter gleichen Bedingungen. Die Störung der NMM2-Motorproteine durch Blebbistatin hatte im Vergleich zu unbehandelten SEEs unter Dehnung eine verringerte Anzahl basaler Aktin-Bündel zur Folge. Darüber hinaus schienen die vorhandenen Bündel verkürzt und in geringerem Ausmaß in Richtung der quer zur Dehnungsrichtung verlaufenden Achse orientiert vorzuliegen. Dennoch ließ sich anhand der basalen FFT-Analyse eine Häufung der annähernd quer zur Zugachse vorliegenden F-Aktin-Strukturen ermitteln. Auf der anderen Seite wurden nach gleichzeitiger Gabe von Cyto. D und Blebbistatin sowie nachfolgender Dehnung keine linearen Stressfasern in der basalen Zellschicht mehr gefunden. Vielmehr zeigte das F-Aktin auch hier ein zur Monolage vergleichbares Bild in diffuser und zur Dehnungsrichtung verzogener Struktur. Eine FFT-Analyse der Strukturausrichtung einzelner Zellbereiche ergab hier entsprechend keine dehnungsinduzierte Vorzugsrichtung [Abbildung 47].

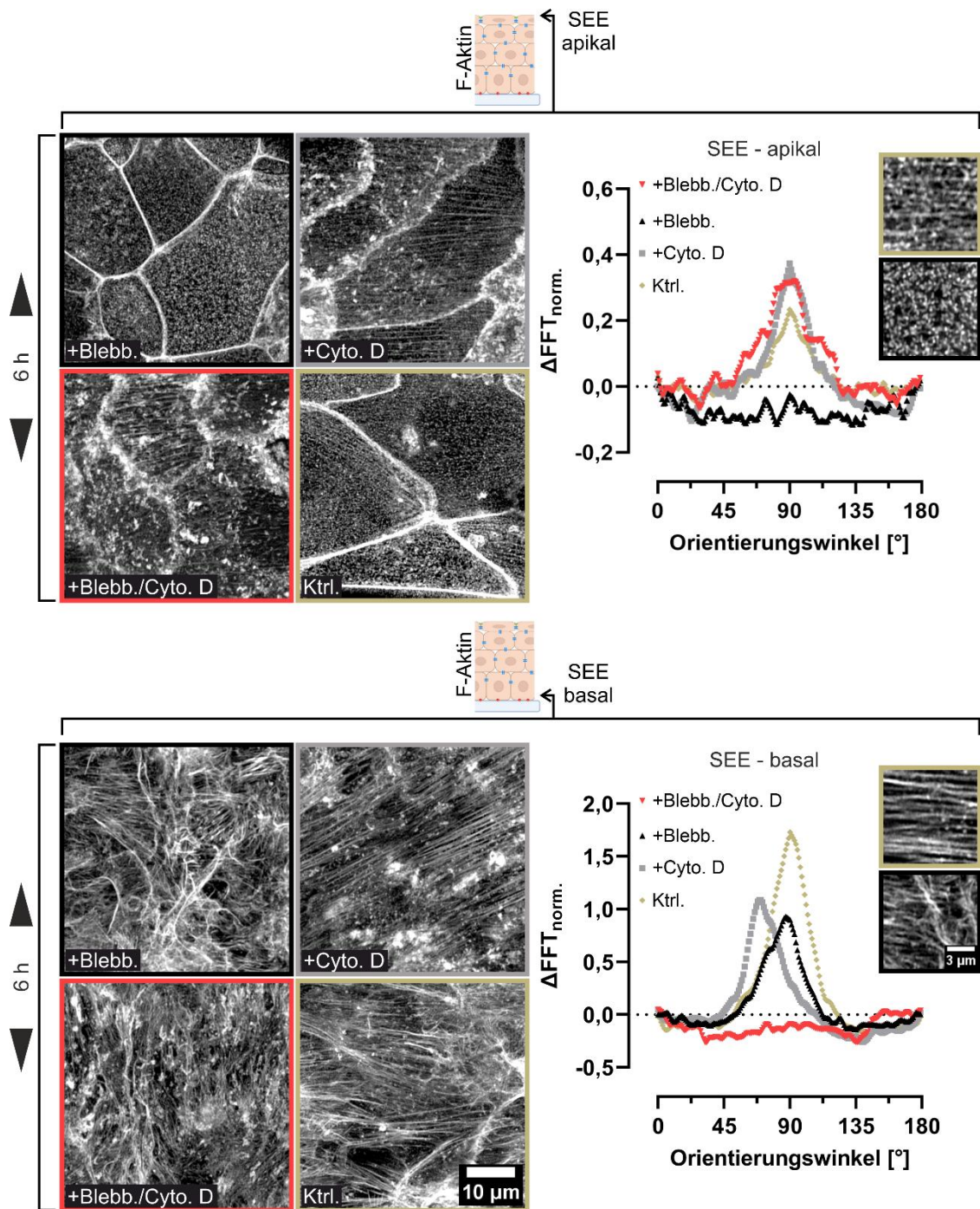


Abbildung 47: **Dehnungsinduzierte F-Aktin-Strukturänderungen basaler und apikaler Zellen unter Inhibition des Aktomyosins.** SEEs wurden unter Anwesenheit der jeweiligen Inhibitoren über 6 h zyklisch gedehnt (Dehnungsrichtung durch Pfeile angedeutet). Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen des F-Aktins als MIP weniger Ebenen der skizzierten Lage im mehrschichtigen SEE. Die FFT-Strukturanalyse erfolgte über die Differenz gedehnter und ungedehnter Zellen nach Normalisierung gegen den Orientierungswinkel (0° bzw. 180° entsprechen der Zugachse). basal: +Blebb. $n=66$ (6), $n=36$ (unged.), +Blebb./Cyto. D: $n=67$ (6 h), $n=36$ (unged.), apikal je $n=72$ (6 h), $n=36$ (unged.) aus jeweils zwei unabhängigen Dehnungsversuchen. Daten der unbehandelten Kontrollen (Ktrl.) und nach Zugabe von Cyto. D wurden zu vergleichszwecken mit aufgeführt.

Auf der Oberfläche des SEE und damit apikalen Seite der suprabasalen Zellen wurde bereits das Auftreten von Aktin in schwachen Filamenten bzw. eine Aneinanderreihung der punktförmigen F-Aktin-Signale in nahezu rechtwinkliger Orientierung zur Zugachse beobachtet. Dabei verliefen die länglichen Strukturen über die Fläche des submembranen, apikalen Kortex hinweg und endeten an gegenüberliegenden Zellgrenzen. Unter Einfluss des Inhibitors Cyto. D traten diese Filamente vermehrt und mit größerer Deutlichkeit auf [Abbildung 47]. Darüber hinaus setzten sich die Filamente häufig in der benachbarten Zelle ausgehend vom interzellulären Kontakt mit gleicher Ausrichtung fort. Die zusätzliche Gabe von Blebbistatin hatte wie bereits in Monolagen eine Auflösung der linearen, F-Aktin-markierten Zellgrenze zur Folge. Davon abgesehen zeigten sich ebenso im überwiegenden Teil der suprabasalen Zellen vermehrt Aktinfilamente, die eine maximale Strukturorientierung quer zur Zugachse aufwiesen. Darüber hinaus hemmte auch im SEE die alleinige Inhibition der Myosin-Motorproteine durch Blebbistatin die Ausbildung filamentöser Strukturen im apikalen Kortex unter Dehnung [Abbildung 47]. Das Aktin-Zytoskelett lag hier auch nach 6 h zyklischer Dehnung im konfokalmikroskopischen Bild als punktförmig, gleichverteilte Signale vor. Zusätzlich deuteten auch die sichtbaren Zellgrenzen im Gegensatz zu unbehandelten oder mit Cyto. D-behandelten Keratinozyten nach mehrstündiger Dehnung keine Reorientierung und Parallelisierung der Zellkörper an. Diese Repression der dehnungsinduzierten Adaption zeigte sich auch darin, dass anhand der FFT-Strukturanalyse keine Differenz zu apikalen Zellen im SEE gefunden werden konnte, die keiner zyklischen Dehnung unterlegen waren.

Die strukturelle Bedeutung des NMM2 für das Aktin-Netzwerk unter Dehnung zeigte sich überdies in immunzytochemischen Färbungen gedehnter SEEs. Das Myosin-Motorprotein lag verteilt im submembranen, apikalen Kortex vor. Dabei wurde an Zellgrenzen und in Bereichen mit dichterem Auftreten dehnungsinduzierter Aktinfilamente eine höhere Organisation des sonst punktförmigen NMM2-Signals zu länglichen Querstreifen beobachtet [Abbildung 48]. Die auffällige periodische Anordnung, die aus kontraktile Stressfasern, wie sie beispielsweise in glatten Muskelzellen vorkommen, bekannt ist, zeigte eine direkte Quervernetzung der kortikalen Aktinfilamente.

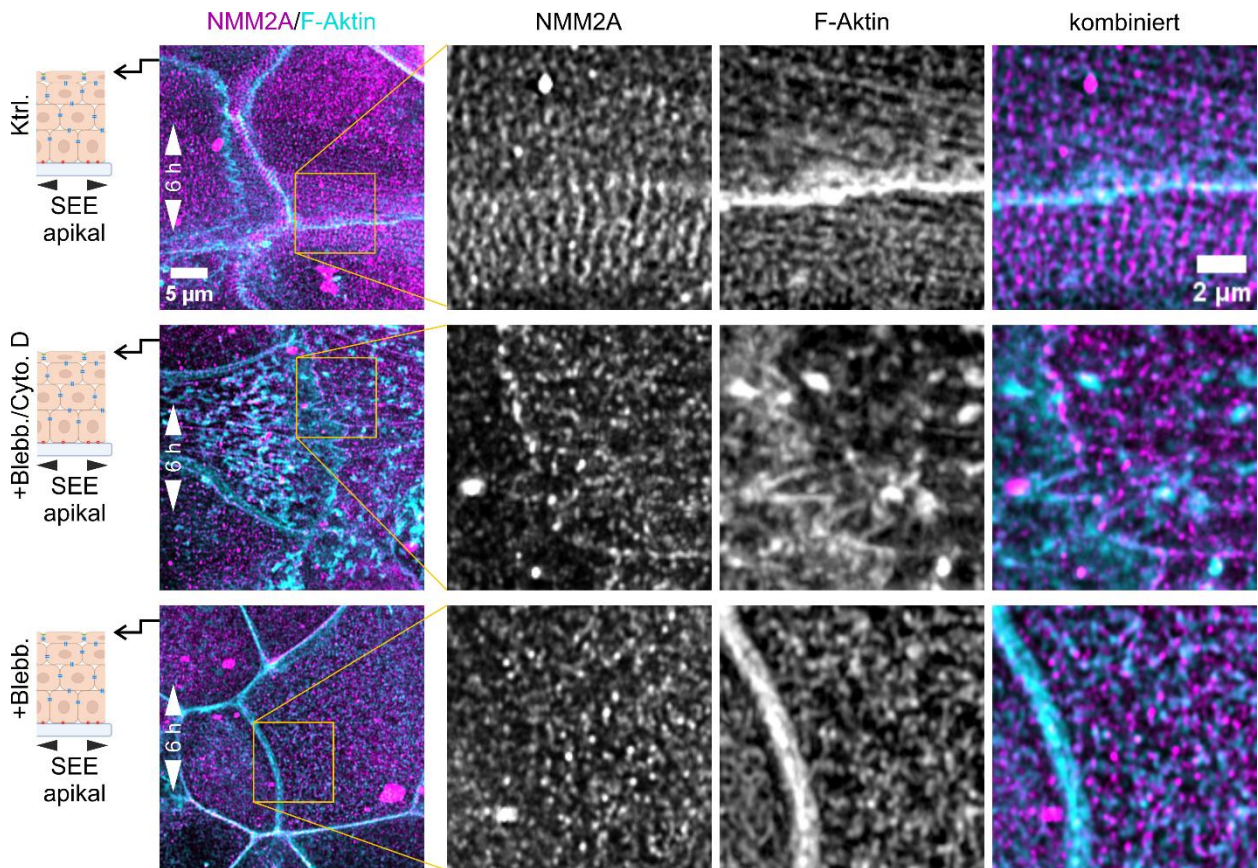


Abbildung 48: **Myosin im apikalen Kortex gedehnter SEEs.** Vor der immunzytochemischen Färbung des nicht-muskulären Myosins 2A (NMM2A) und des F-Aktins wurden mehrschichtige SEEs über 6 h gedehnt (uniaxiale Dehnungsrichtung im Bild links angedeutet) und dabei mit 1 µM Cyto. D und/oder 20 µM Blebbistatin behandelt. Gezeigt werden repräsentative Konfokalaufnahmen des apikalen Kortex (Aufnahmeebene im Schema links angedeutet). Ein vergrößerter Ausschnitt (orange Box) der markierten Strukturen ist zur Erhöhung des wahrnehmbaren Kontrasts in Graustufen abgebildet.

Im apikalen Kortex der Zellen, die gleichermaßen mit Blebbistatin und Cyto. D gedehnt wurden, fand sich dagegen keine vergleichbare, quergestreifte Anordnung. Entlang der auftretenden Aktinfilamente wurden zwar punktförmige Signale der Myosin-Färbung gefunden, eine höheren Organisation und Quervernetzung konnte jedoch nicht beobachtet werden [Abbildung 48]. Es zeigte sich, dass sowohl die Cyto. D-induzierten Aktin-Aggregate als auch das F-Aktin des Zell-Zell-Kontakts in diesen Keratinozyten keine deutliche Kolo-kalisation mit NMM2A aufwies. Eine ausschließliche Inhibition der Myosine durch Blebbistatin hatte eine gleichmäßige, punktförmige Verteilung des F-Aktins und der Myosin-Motorproteine zur Folge. Hierbei konnte selbst bei Strukturen mit hoher F-Aktin-Dichte, wie der interzellulären Verbindung, keine räumliche Assoziation des Aktins mit NMM2A festgestellt werden. Vielmehr lagen auch nach mehrstündiger Dehnung Myosin und Aktin in zufälliger Anordnung im submembranen Kortex vor.

Diese Daten konnten somit für die mehrschichtige Epidermis erstmalig eine mechanosensitive, strukturelle Adaption des Aktomyosin-Kortex auf zyklische Dehnung zeigen, die maßgeblich von der Ausbildung interzellulärer Verbindungen im Zellverband abhängt und in besonderer Weise durch nicht-muskuläres Myosin 2 reguliert wird.

4 Diskussion

Die zelluläre und zytoskelettale Adaption als Antwort auf extrinsische Dehnungsreize wurde bislang vornehmlich an substratadhäsiven Zellen untersucht. Dabei konnte jüngst auch die Bedeutung interzellulärer Verbindungen und damit ebenso integrierter zytoskelettaler Netzwerke für eine beschleunigte und verstärkte Ausrichtung der Zellen und deren Aktin-Stressfasern unter zyklischer Dehnung gezeigt werden (Noethel *et al.*, 2018). Ob und wie sich ein solches kooperatives Verhalten in Zellen äußert, die in ihrem physiologischen Kontext keine Adhäsionskontakte zu einer EZM aufweisen, ist bisher kaum untersucht. Tatsächlich weisen jedoch in der mehrschichtigen Epidermis nur basale Keratinozyten Zell-Matrix-Adhäsionen auf. Der bedeutend größere Anteil differenzierender, suprabasaler Zellen steht dagegen ausschließlich in Verbindung zu benachbarten Keratinozyten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein vereinfachtes Modellsystem der Epidermis auf einem elastischen Substrat entwickelt und unter zyklischer Dehnung untersucht. Auf diesem Weg konnte anhand epidermaler Keratinozyten, die in ihrem physiologischen Umfeld kontinuierlich unter mechanischer Belastung stehen, ein weiterer Schritt im Verständnis der zellulären Adaption auf zyklische Dehnung im Gewebeverband unternommen werden.

4.1 Entwicklung eines mehrschichtigen Epidermaläquivalents auf Elastomersubstraten

Kalziumionen spielen eine zentrale Rolle im Aufbau wichtiger interzellulärer Verbindungen und sind neben weiteren regulatorischen Elementen ein wesentlicher Differenzierungsfaktor epidermaler Keratinozyten (Hennings und Holbrook, 1983; Menon *et al.*, 1985). Dies zeigt sich auch an einem intraepidermalen Kalziumgradienten, der mit zunehmender Differenzierung vitaler Zellen in den oberen Schichten des gesunden Gewebes eine höhere Ionenkonzentration aufweist (Rinnerthaler *et al.*, 2015). Während die Expansion isolierter Keratinozyten aus der Mausepidermis in Kultur unter niedriger Kalziumkonzentration aufrecht erhalten bleibt, wird die Anhebung der extrazellulären Kalziumkonzentration (*engl. Ca²⁺-Switch*) konfluenter Keratinozyten als initiales *in-vitro* Differenzierungsmodell genutzt (Bikle *et al.*, 2012). Im Rahmen der hiesigen Modellentwicklung zur Dehnungsanalyse erfolgte der *Ca²⁺-Switch* zunächst nach dem Ausbringen einer dichten Monolage aus Keratinozyten auf elastischen Zellkultursubstraten, die aufgrund ihrer linear-elastischen Eigenschaften als artifizielle Basalmembran bzw. Dermis und zur Applikation der zyklischen Dehnung fungierten. Parallel wurde außerdem die humane

Keratinozytenzelllinie HaCaT, die routinemäßig unter hoher Kalziumkonzentration kultiviert wurde, auf derartigen Silikonsubstraten eingesetzt.

Bei postkonfluenter Kultivierung der HaCaT-Zellen ließen sich sowohl auf der Epithelschicht als auch frei im Zellkulturmedium vermehrt kugelförmige Zellen vorfinden. Die mikroskopische Auswertung 72 h nach Aussaat in hoher Dichte zeigte außerdem einen überwiegend einschichtigen Aufbau [Abbildung 13]. Das beobachtete Auftreten der vermutlich apoptotischen Zellen bei gleichzeitiger Homöostase der Zelldichte über den Untersuchungszeitraum, deutete auf eine Regulation der Proliferation und Zellexklusion in der konfluenten Zellschicht hin. Dabei stellt die Hemmung von Migration und Proliferation durch direkten Zell-Zell-Kontakt ein grundsätzliches Konzept der Gewebemöostase dar (Ribatti, 2017). Eine über Cadherine-vermittelte Kontaktinhibition ist dementsprechend bei vielen Tumorzellen überwunden (Mendonsa *et al.*, 2018). HaCaT-Keratinozyten gelten zwar als immortal und genetisch aberrant, zeigten aber bereits eine Abhängigkeit der Proliferationsaktivität von der Zelldichte und dem Aufbau Cadherin-abhängiger Zellverbindungen (Hirata *et al.*, 2017). Darüber hinaus ließ sich die nicht-tumorige Zelllinie HaCaT in Kokultur mit einer metastasierenden Melanomzelllinie bereits nach kurzer Zeit von den Tumorzellen verdrängen (Morais *et al.*, 2017). Eine submerse, postkonfluente Kultivierung der HaCaT-Zelllinie genügte dem zur Folge nicht als ausreichender Differenzierungsreiz und zum Aufbau eines mehrlagigen Modells.

Der *Ca²⁺-Switch* konfluenter Keratinozyten aus postnataler Mausepidermis hatte dagegen eine Änderung der gestreckten („Fibroblasten-ähnlichen“) Morphologie zur dichten Epithelschicht zur Folge. Die Keratinozyten nahmen hierbei in Abwesenheit von extrazellulärem Kalzium mehr Adhäsionsfläche des Fibronectin-beschichteten Substrats ein. Dagegen resultierte die Ausbildung interzellulärer Verbindungen selbst bei zuvor vollständiger Konfluenz bereits nach wenigen Stunden in einer zunehmenden Verdichtung der Zellen [Abbildung 13]. Die weitere Kultivierung in kalziumhaltigem Medium führte nach 48-72 h jedoch zur Bildung größerer Löcher und zur Delamination der Epithelschicht vom elastischen Substrat. Dabei wiesen die erneut zellfreien Bereiche auf dem Silikonsubstrat anschließend wieder hydrophobe Eigenschaften auf, die den wasserabweisenden Oberflächen vor einer hydrophilisierenden Beschichtung mit Fibronectin entsprachen. Dies deutete auf eine Ablösung der physisorbierten Fibronectin-Beschichtung hin, die sonst zu einer sichtbaren Hydrophilisierung der Oberfläche beiträgt. Darüber hinaus wurde eine solche Delamination der Zellschicht in vergleichbaren Arbeiten auf kommerziellem Zellkulturplastik nicht beobachtet (Rübsam *et al.*, 2017; Büchau *et al.*, 2022). Die wirkenden Van-Der-Waals-Interaktionen der Fibronectin-Physisorption auf

kreuzvernetztem PDMS sind dabei in ihrer Bindungsstärke vermutlich schwächer einzuordnen als die elektrostatischen Kräfte einer mit Sauerstoffplasma-behandelten Zellkulturplastikoberfläche zur Zellmembran (Lerman *et al.*, 2018).

Da die kalziuminduzierte Kopplung der Aktomyosin-Netzwerke benachbarter Zellen den Aufbau interzellulärer Zugspannung begünstigt (Priya und Yap, 2015) und darüber hinaus in früheren Arbeiten bereits ein Abbau der Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhäsionen bei initialer *in-vitro* Differenzierung durch Ca^{2+} -Switch beobachtet wurde (Hodivala und Watt, 1994), könnte das Auftreten der interzellulären mechanischen Zugspannung bei gleichzeitig verringerter Dichte der Fokaladhäsionen zur Bildung von Löchern und zur Delamination der Epithelschicht, einschließlich beschichteter EZM-Proteine, beitragen. Zusätzlich könnte eine Diskrepanz zwischen den interzellulär-wirkenden Zellkräften und der Zelldichte nach Zugabe des Kalziums zu einer Anisotropie der mechanischen Spannung in der Monolage führen, da die Zellteilung der Keratinozyten deutlich länger benötigt (minimale *in-vitro* Verdopplungszeit von 24 h, beschrieben in Jee *et al.* (1990)) als der initiale Aufbau kalziumabhängiger Zellverbindungen. In Vorversuchen der Modellentwicklung konnte in Übereinstimmung dieser Hypothese außerdem eine schnellere Delamination (< 24 h nach Ca^{2+} -Switch) bei nicht konfluenter Aussaatdichte oder inhomogener Adhäsion beobachtet werden. Eine mechanische Homöostase, vergleichbar zur epidermalen Basalzellschicht oder zu kontaktinhibierten Monolagen der HaCaT-Keratinozyten, könnte in diesem Fall möglicherweise noch nicht erreicht worden sein.

Die Ausbildung interzellulärer Verbindungen muriner Keratinozyten wurden aus diesem Grund nachfolgend bereits vor Aussaat auf beschichteten Silikonkammern durch Kalziumzugabe initiiert [Abbildung 14]. Die anschließend auf Kammern generierten vereinfachten Epidermaläquivalente (*engl. Simplified Epidermis Equivalent, SEEs*) zeigten eine höhere Zelldichte in der basalen Zellschicht als einschichtige Keratinozyten, die erst nach Adhäsion auf dem Elastomer mit kalziumhaltigem Medium versetzt wurden [Abbildung 26]. Keratinozyten der SEEs wiesen darüber hinaus eine geringere zweidimensionale Zelldichte in suprabasalen Schichten sowie eine flache Morphologie und die geringste Dichte in der apikalen Schicht auf. Damit ähnelt der Aufbau des SEEs prinzipiell der Architektur organotypischer Hautmodelle und vitaler Epidermis (Frankart *et al.*, 2012).

In gesunder Epidermis wird die interzelluläre TJ-Barriere zwischen terminal differenzierten Keratinozyten vor Einsetzen des epidermalen Zelltods im *stratum granulosum* ausgebildet und kann in Gewebepreparaten u.a. durch das frühe Markerprotein ZO-1 sichtbar gemacht werden (Pummi *et al.*, 2001). Obwohl die Keratinozyten des SEEs keine vergleichbare epidermale

Differenzierung durchlaufen, wurde das TJ-assozierte Protein ZO-1 ausschließlich in apikalen Zellgrenzen der SEE lokalisiert [Abbildung 15]. Rübsam und Kolleg(en)*innen konnten zeigen, dass die Positionierung der TJ-Barriere und Polarität des Gewebes maßgeblich durch einen Gradienten der Aktomyosin-vermittelten kortikalen Zugspannung und eine differentielle Ausbildung der AJs bestimmt werden. Dabei wurde in den obersten vitalen Zellen des *stratum granulosum* sowohl eine höhere Signalintensität des phosphorylierten, nicht-muskulären Myosins 2 (NMM2) als auch eine dichtere Organisation des kortikalen F-Aktins beobachtet. Epidermale Keratinozyten ohne funktionelles E-Cadherin waren dagegen nicht in der Lage, eine vergleichbare Barriere durch korrekte Positionierung der TJs aufzubauen (Rübsam *et al.*, 2017). Die immunzytochemische Färbung der SEEs zeigte neben apikal positioniertem, linearem ZO-1 auch eine nach außen ansteigende Signalintensität des fluoreszenzmarkierten F-Aktins [Abbildung 15]. Dies könnte auf eine dreidimensional unterschiedliche Ausprägung der kortikalen Zugspannung ebenso im SEE hindeuten und bei gleichzeitiger Abwesenheit apikaler Zellkontakte die Ausbildung der ZO-1-Polarität ohne epidermale Differenzierung ermöglichen.

Ein weiteres Merkmal gesunder Epidermis ist die kontinuierliche Erneuerung der abschilfernden apikalen Korneozyten durch nachrückende Zellen unterer Schichten (Baroni *et al.*, 2012). Dabei ist die multifaktoriell regulierte Zellteilung auf Keratinozyten des *stratum basale* begrenzt und findet überwiegend in paralleler Ausrichtung der Tochterzellen zur Basalmembran statt (Ipponjima *et al.*, 2016). Nach Delamination gehen die Keratinozyten hingegen in den Zellzyklusarrest über und nehmen die terminale Differenzierung auf. Eine dreidimensionale Auswertung der Zellteilungsereignisse im SEE hatte gezeigt, dass nur bei Zellen des Modells eine Mitose gefunden wurde, die im räumlichen Kontakt zum Substrat standen [Abbildung 17]. Frühere Arbeiten hatten in diesem Zusammenhang bereits eine Ligandenbindung durch β_1 -Integrine als notwendigen Faktor zur Verhinderung der epidermalen Differenzierung und Aufrechterhaltung der Proliferation identifiziert (Adams und Watt, 1989; Adams und Watt, 1990). So trug die Bindung an Fibronectin (bzw. Erkennung des RGD-Sequenzmusters) auf dem elastischen Silikon vermutlich zur Erhaltung der Proliferationsaktivität im vereinfachten Eidermaläquivalent bei, während die Zellen höherer Schichten in den Zellzyklusarrest übergingen. Immunzytochemische Färbungen bestätigten in diesem Zusammenhang, dass basale Zellen des SEEs über Fokaladhäsionen an das Substrat banden. Suprabasale Zellen zeigten hingegen an den Zellgrenzen ausschließlich Markerproteine der Zell-Zell-Kontakte.

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen fanden Miroshnikova und Kolleg(en)*innen in einer systematischen Untersuchung, dass eine Proliferation in der dichten Basalzellschicht zu

einer lokalen Einengung (*engl. crowding*) der Zellen führte. Die hierdurch hervorgerufene Deformation und der Abfall kortikaler Spannung induzierten die Differenzierung und Delamination umliegender Zellen, wodurch das ursprüngliche Gleichgewicht wiederhergestellt wurde. Gleichzeitig verstärkten delaminierte Zellen die kortikale Spannung durch erhöhte Myosin-Aktivität und wechselten zu einer E-Cadherin-dominierten Adhäsion (Miroshnikova *et al.*, 2018).

4.2 Charakterisierung mechanischer Eigenschaften der SEEs

Neben einer immunzytochemischen und mikroskopischen Charakterisierung des entwickelten SEEs, sollten auch die mechanischen Eigenschaften des Modellgewebes betrachtet werden. Die hierzu eingesetzte Apparatur zur Dehnung und Kraftmessung lebender Gewebe (auch Gewebedehner genannt) ermöglichte erstmals den direkten Vergleich von Vollhautexplantaten ausgewachsener (*adult*) und fötaler Ratten sowie des EZM-freien *in-vitro* Epidermaläquivalents. Dabei wurden die Gewebe unter bestmöglicher Vermeidung mechanischer Belastung präpariert und während der mechanischen Zugversuche zur Versorgung epidermaler Zellen in gepuffertem Zellkulturmedium bei 37 °C gehalten.

Kollagenreiche Bindegewebe wie die Dermis der Haut zeigen in klassischen Zugversuchen einen J-förmigen Zusammenhang im Spannungs-Dehnungs-Diagramm und damit eine charakteristische Dehnungsversteifung (Fung, 2013). Hierbei bestimmt zunächst die wasserbindende Grundsubstanz die sehr weichen Materialeigenschaften, sodass ansteigende Dehnungen eine geringe Erhöhung der mechanischen Spannung zur Folge haben. Erst allmählich werden daraufhin die fibrillären Proteine (insbesondere Kollagen und Elastin) ausgerichtet und gezogen, sodass nach einem kurzen Übergangsbereich ein linearer, starker Anstieg der Spannung unter Dehnung verzeichnet wird (Purslow *et al.*, 1998; Joodaki und Panzer, 2018). In den repetitiven Zugversuchen dieser Arbeit wurden Dehnungsamplituden im physiologischen Bereich ($\leq 40\%$) eingesetzt und vergleichsweise niedrige Gewebespannungen analysiert, die gemäß aufwändiger röntgendiffraktometrischer und elektronenmikroskopischer Analysen vorheriger Arbeiten noch keine dermale Kollagenfaserausrichtung und Streckung sowie kein interfibrilläres Gleiten zur Folge hatten (Yang *et al.*, 2015).

Bei wiederholter Dehnung des adulten Hautgewebes unterschied sich in den hiesigen Daten die erste Relaxationskurve von den Kurven nachfolgender Zyklen. Dieses von einer vorherigen Belastung abhängige Verhalten wird, wenn auch nicht vollständig verstanden, durch eine mikrostrukturelle Anpassung der komplexen Grundsubstanz und Ausrichtung eingebetteter,

fibrilliärer Komponenten erklärt (Lokshin und Lanir, 2009). Die hiesigen Untersuchungen zeigten, dass ein solcher ‚Erinnerungseffekt‘ auch unter niedrigen Dehnungsamplituden auftrat und darüber hinaus auch nach 60 min in entlasteter Ausgangsposition noch vorhanden war [Abbildung 19 B, Abbildung 20 C]. Diese Beobachtungen stützen die Vorstellung einer stabilen, dehnungsinduzierten Anpassung der dermalen Mikrostruktur. Außerdem konnte eine ähnliche Änderung der viskoelastischen Eigenschaften bei wiederholter Dehnung weder bei fötaler Haut noch SEEs beobachtet werden.

Dabei weisen die *in-vitro* Epidermaläquivalente keinerlei fibrilliäre EZM-Komponenten auf. Die mechanobiologisch-relevanten Proteine, wie Kollagene und Elastin, liegen im frühen Entwicklungszustand fötaler Haut dagegen noch nicht vollständig sekretiert und kreuzvernetzt vor (Coolen *et al.*, 2010). Eine vergleichsweise verminderte Viskoelastizität unvollständig entwickelter Haut wurde in diesem Zusammenhang auch in früheren Scherkriechversuchen beobachtet (Harada *et al.*, 2011). Hierbei konnte der mechanische Phänotyp fötaler Haut erstaunlich gut durch weiche Gele aus Gelatine modelliert werden. Darüber hinaus zeigten histologische Untersuchungen nach Kriechversuchen mit fötaler Haut deutliche Risse im dermalen und epidermalen Hautgewebe (Tsubouchi *et al.*, 2006). In den Untersuchungen dieser Arbeit äußerte sich das beschriebene Gel-artige Verhalten durch einen schnellen Abfall auftretender Kräfte nach Anlegen der Dehnung und einer außerordentlich geringen Erholung der auftretenden Maximalkraft nach 60 min Ruhephase in Ausgangsposition [Abbildung 19 C, Abbildung 20 B]. Diese Beobachtungen deuteten insgesamt auf eine plastische (irreversible) Deformation dermalen Strukturen der unvollständig entwickelten Haut hin.

Im Gegensatz dazu konnte sowohl für EZM-freie SEEs als auch fötale Haut bei Rückkehr des Gewebedehners zur Ausgangsposition eine Wiederherstellung der zunächst verlängerten Gewebe zur ursprünglichen Probengeometrie beobachtet werden [Abbildung 20 A]. Da dieser Effekt über alle Proben und Zyklen gefunden und darüber hinaus durch kurze Denaturierung in Ethanol blockiert werden konnte, könnte die Wiederherstellung der Gewebeabmessungen nach mechanischer Belastung ein von dermalen EZM unabhängiger Prozess sein. In früheren Analysen konnte anhand epithelialer Zellschichten, die in einem freischwebenden Versuchsaufbau durch Verkürzung der nominellen Bezugslänge gestaucht wurden, eine zeitabhängige Anpassung in Form einer nachfolgenden Glättung der entstandenen Krümmung und isovolumetrischen Angleichung der Zellschichtlänge zur Bezugslänge beobachtet werden (Wyatt *et al.*, 2020). Die entsprechende Verkürzung in X-Stauchungsrichtung ging hierbei mit einer Verlängerung der freien Z-Achse (bzw. Schichtdickenvergrößerung) einher, während nahezu keine Veränderung

der Y-Achse festgestellt wurde. Diese aktive Adaption an extrinsische Deformation konnte mit Fluktuationen beteiligter Proteine des Aktomyosinkortex in Verbindung gebracht werden und zeigte sich verantwortlich für die auftretende Spannungsrelaxation unter Dehnung (Khalilgharibi *et al.*, 2019). In diesem Zusammenhang könnte die Gewebegeometrie der *ex-vivo* Hautproben und *in-vitro* SEEs im Gewebedehner durch das Aktomyosin epidermaler Keratinozyten während der jeweiligen Ruhephase aktiv wiederhergestellt worden sein, während in EtOH denaturierte Gewebe mit und ohne EZM ihre Ausgangslänge nicht wiedererlangten.

Passenderweise äußerte sich hier das Verhalten der untersuchten Modellgewebe bei Wiederholung der Dehnung nach ausgeprägter Ruhephase [Abbildung 20 B]. Im Zuge einer zweiten Dehnung der SEEs konnten etwa 70 % der Maximalkraft des ersten Dehnungszyklus erneut gemessen werden. Adulte Haut zeigte dagegen einen substantiell größeren Abfall der auftretenden Maximalkraft bei Wiederholung des Dehnungsreizes. In den nachfolgenden Zyklen des Dehnungsprotokolls erholten sich danach beide Modellgewebe in ähnlichem Maße zum vorherigen Zyklus.

Des Weiteren verdeutlichten die normalisierten Relaxationskurven, dass mechanisch unbelastetes, adultes Vollhautgewebe im ersten Dehnungszyklus große Übereinstimmung mit dem Verhalten Gel-artiger, fötaler Haut zeigte [Abbildung 20 C]. Das Relaxationsverhalten aller nachfolgenden Zyklen (2.-4. Dehnungszyklus) äußerte sich hingegen nahezu identisch zum Verhalten der EZM-freien SEEs. Auf Grundlage dieser Beobachtungen wurde gefolgert, dass die mechanischen Eigenschaften der Haut und damit der Epidermis unter zyklischer Dehnung physiologischer Amplituden durch das SEE imitiert werden können. Auch wenn das Modell strukturell und molekular starke Vereinfachungen aufwies, bot es durch die mechanischen Ähnlichkeiten zu Vollhautgewebe unter wiederkehrender Deformation niedriger Amplituden die Möglichkeit der *in-vitro* Untersuchung mechanosensitiver Zellantworten im epidermalen Gewebeverband.

Analysen unter Deformation des mehrschichtigen SEEs auf elastischem Silikonsubstrat zeigten außerdem, dass eine uniaxiale Dehnung der Zell-Matrix-Adhäsionsfläche nahezu verlustfrei bis zur apikalen Zellstruktur übertragen wird [Abbildung 18]. Die zellübergreifende Verbindungen der zytoskelettalen Systeme über dreidimensional ausgebildete Zell-Zell-Kontakte trugen höchstwahrscheinlich zu einer direkten Vermittlung der mechanischen Einflüsse bei (Harris *et al.*, 2012). Dabei wurde die zelluläre Deformation vermutlich durch eine Reduzierung der Zellhöhe bzw. Schichtdicke (entlang der Z-Achse) kompensiert, sodass das Zellvolumen nahezu konstant blieb (Wyatt *et al.*, 2020).

4.3 Dehnungsinduzierte Reorientierung im ein- und mehrschichtigen Epithel

Die Reorientierung der Zellkörper, Zellkerne und Aktin-Bündel gehören zu den auffälligsten zellulären Adaptionsmechanismen auf zyklische Dehnung (Hayakawa *et al.*, 2001; Huang und Helmke, 2015). Unter einem wiederkehrenden mechanischen Reiz orientieren sich die Strukturen über die Zeit weg von der Dehnungsachse, um eine Belastung zu reduzieren und die mechanische Homöostase aufrecht zu erhalten (Wang *et al.*, 2001; Faust *et al.*, 2011). Während durch Untersuchungen an Einzelzellen eine Reihe FA-assoziiertes, mechanosensitiver Proteine mit einer dehnungsinduzierten Reorientierung der Aktin-Stressfasern in Verbindung gebracht werden konnten (Niediek *et al.*, 2012; Massou *et al.*, 2020), ist über die mechanosensitive Bedeutung interzellulärer Verbindungen für die mechanische Adaption noch vergleichsweise wenig bekannt. Dabei wird das mechanosensitive Protein Vinculin beispielsweise nicht nur zu FAs, sondern durch eine spannungsinduzierte Bindung an α -Catenin auch zu AJs rekrutiert (Bays und DeMali, 2017). In diesem Zusammenhang konnten Nöthel und Kolleg(en)*innen bereits zeigen, dass die Aktin-Stressfasern in einer substratadhäsiven Monolage aufgrund des Einflusses der mechanosensitiven AJ-Proteine verstärkt und beschleunigt reorientierten. Infolge der interzellulären Kopplung der Aktin-Zytoskelette über AJs richteten sich die Stressfasern benachbarter Zellen hierbei in nahezu identischen Winkeln annähernd quer zur Zugachse aus, wodurch eine Anbindung der AJs an die Aktin-Bündel angenommen wurde (Noethel *et al.*, 2018).

In den vorliegenden Untersuchungen wurden sowohl in Monolagen als auch basalen Zellen der SEEs Aktin-Stressfasern gefunden, die unter zyklischer Dehnung eine schnelle Reorientierung und Parallelisierung nahezu quer zur Dehnungsachse aufwiesen [Abbildung 22]. Während in mechanisch unbeanspruchten Zellen der basalen Schicht eine überwiegende Kollokalisierung der Stressfaserenden mit dem FA-Protein Paxillin gezeigt werden konnte, deutete die zellübergreifende Fortsetzung der Faserorientierung gedehnter Zelllagen ebenfalls auf eine direkte Einbindung der AJs hin. Die entsprechenden Aktin-Bündel befanden sich dabei in einschichtigen und mehrschichtigen Modellen weiterhin in den basalen Konfokalebene der Zelllagen und damit in räumlicher Nähe zum Substrat. Die lichtmikroskopisch sichtbaren Bündel sind hierbei Teil eines dichten Aktomyosin-Netzwerks des submembranen Kortex und stellen insgesamt ein mechanisches Kontinuum dar (Vignaud *et al.*, 2021). Daraus ergibt sich lokal wahrscheinlich eine physikalische Verbindung und mechanische Abhängigkeit der FAs und AJs (Weber *et al.*, 2011). Neben der direkten Vermittlung mechanischer Spannung besteht sowohl über gemeinsame Signalwege (z.B. Regulation der RhoA-Aktivität) als auch gleichermaßen beteiligte Proteine (z.B. Vinculin) eine Abhängigkeit und Kommunikation der

Adhäsionsstrukturen (Al-Kilani *et al.*, 2011; Zuidema *et al.*, 2020). Da für basale Keratinozyten im mehrschichtigen SEE im Vergleich zu Zellen konfluenter Monolagen eine geringfügig breitere Winkelverteilung der Stressfaserorientierung bei vergleichbarer Geschwindigkeit der Umstrukturierung gefunden wurde [Abbildung 22], könnten apikal liegende Zellverbindungen und die zusätzliche Kontaktfläche das Reorientierungsverhalten der Basalzellschicht beeinflussen. Ungeachtet der vereinzelt geringeren Orientierungswinkel im SEE demonstrierten die Untersuchungen aber die Reorientierung basaler Stressfasern als Adaptionmechanismus auf zyklische Dehnung erstmalig auch für die substratadhäsive Zellschicht mehrschichtige Zellsysteme.

Während die Bedeutung interzellulärer Verbindungen für eine schnelle und effektive Reorientierung basaler Stressfasern bereits gezeigt wurde (Noethel *et al.*, 2018), konnte anhand mehrschichtiger SEEs die Rolle eines adhäsiven Substratkontaktes für das generelle Auftreten dieses Phänotyps verdeutlicht werden. Bei suprabasalen Zellen wurden auch unter Einfluss eines zyklischen Dehnungsreizes keine vergleichbaren, zelldurchspannenden Aktin-Bündel beobachtet. Neben unterschiedlichen extrazellulären Bindungspartnern (EZM-Liganden und/oder benachbarte Transmembranproteine) unterschieden sich auch die physikalischen Umgebungseigenschaften basaler und suprabasaler Zellen. Dabei wurde bereits die zelluläre Wahrnehmung der Substratsteifigkeit und eine daraus folgende interne Anpassung der mechanischen Eigenschaften des Aktin-Zytoskeletts als regulierender Faktor der Stressfaserausbildung identifiziert (Doss *et al.*, 2020). Während auf harten Substraten polarisierte Stressfasern in erhöhter Anzahl ausgebildet wurden, wiesen Zellen auf weichen Substraten wenige, radiale Fasern auf (Prager-Khoutorsky *et al.*, 2011). Ob eine mechanosensitive Antwort auf die ungleichen mechanischen Eigenschaften angrenzender Zellmembranen (im Bereich weniger kPa) im Gegensatz zu steifen Elastomeroberflächen (etwa 370 kPa) oder die abweichende Ausprägung der Adhäsionsverbindungen für die unterschiedliche Ausbildung des F-Aktins in mehrschichtigen Epithelien ursächlich ist, konnte für suprabasale Keratinozyten anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden.

Interessanterweise reorientierten suprabasale Keratinozyten auch annähernd quer zur uniaxialen Zugachse, obwohl hier keine zelldurchspannenden Stressfasern, wie sie in der Basalzellschicht auftraten, identifiziert werden konnten. Dabei konnte nach 6 h zyklischer Dehnung auf der apikalen Oberfläche eine signifikante Ausrichtung der zellulären Hauptachsen ermittelt werden [Abbildung 23]. Darüber hinaus richteten sich auch die Zellkerne unabhängig von ihrer Schichtzugehörigkeit im mehrschichtigen Modell in Richtung der quer zur Dehnung

verlaufenden Achse aus [Abbildung 25]. Nava und Kolleg(en)*innen identifizierten anhand epidermaler Monolagen die suprazelluläre Ausrichtung der Zellen und Zellkerne als ein Adaptionsmechanismus zur Minimierung der mechanischen Zellkerndeformation und Wahrung der Genomintegrität (Nava *et al.*, 2020). Mechanische Signale werden dabei über Proteinkomplexe in der Kernmembran (*engl. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton, LINC*), die direkt an das zytoplasmatische Zytoskelett binden, an das Filamentsystem des Kerns und das eingebundene Chromatin übertragen (Shams *et al.*, 2017). Unter physiologischen Bedingungen werden durch diese mechanischen Verbindungen eine Vielzahl mechanotransduktiver Prozesse reguliert (Martino *et al.*, 2018). Beispielsweise wurde in epidermalen Keratinozyten gezeigt, dass die Transkription differenzierungsrelevanter Gene durch Zell-Matrix-vermittelte Spannung an den LINC-Komplexen reprimiert wird (Carley *et al.*, 2021). Für substratadhäsive Zellen wurden zudem FA-assoziierte Stressfasern identifiziert, die über den Zellkern verlaufen und über LINC-Komplexe mit der Kernhülle verbunden sind (Khatau *et al.*, 2009). In Versuchen auf Einzelzellebene wurde beobachtet, dass diese Zellkern-überspannenden Stressfasern durch Dehnung induziert wurden und für die Form und Orientierung der Zellkerne unter mechanischer Belastung verantwortlich waren (Hoffman *et al.*, 2020; Roshanzadeh *et al.*, 2020).

Im multizellulären System der vorliegenden Untersuchungen konnten derartige Stressfasern in direkter Umgebung und Ausrichtung des Zellkerns weder nach kurzen (30 min) noch längeren (6 h und 12 h) zyklischen Dehnungsintervallen unabhängig von der räumlichen Lage detektiert werden. Somit wurde gezeigt, dass die Organisationsstruktur des F-Aktins basaler, substratadhäsiver Zellen für die effektive und schnelle Reorientierung als Adaption auf zyklische Dehnung in der mehrschichtigen Epidermis eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Stattdessen deuten die mikroskopischen Aufnahmen und Reorientierungsdaten auf die hohe Relevanz der interzellulären Verbindungen und einer daraus resultierenden kooperativen Organisation der Zellen im Gewebeverband hin.

4.4 Reorientierung im SEE unter Störung zytoskelettaler Systeme

Die drei Zytoskelett-Klassen (Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente) tragen als dynamische, biopolymere Netzwerke insgesamt zu den mechanischen Eigenschaften einer eukaryotischen Zelle bei (Fletcher und Mullins, 2010).

Durch den Einsatz des Tubulin-Polymerisationsinhibitors Nocodazol wurde deshalb der Aufbau der Mikrotubuli im SEE gehemmt. Unter Vermeidung einer mechanischen Belastung wurde dabei keine Beeinflussung des basalen F-Aktins festgestellt. Bei Anlegen zyklischer Dehnung

zeigte sich die Reorientierung der Stressfasern in basalen Ebenen jedoch sowohl schneller als auch effizienter als in SEEs, die nicht mit Nocodazol behandelt wurden [Abbildung 29]. Darüber hinaus schienen Tubulin-inhibierte Keratinozyten unter Dehnung eine höhere Anzahl Stressfasern auszubilden als gedehnte Zellen mit intaktem Mikrotubuli-Netzwerk.

Ein regulatorischer Zusammenhang zwischen Mikrotubuli und dem Aktin-Zytoskelett besteht über die Signaltransduktion der Rho-GTPasen (Krendel *et al.*, 2002). Dabei führt der Abbau von Mikrotubuli zu einem höheren Anteil des Mikrotubuli-assoziierten Guanin-Nukleotid-Austauschfaktors H1 (GEF-H1, engl. *guanine nucleotide exchange factor H1*) und dadurch zu einer erhöhten Aktivität von RhoA. Folglich wird über nachgeschaltete Signalwege die Polymerisation von Aktin gesteigert, bestehende Filamente stabilisiert und die Kontraktilität durch verstärkte Myosin-Aktivität erhöht (Rape *et al.*, 2011). Die biochemische Aktivierung der RhoA-Signalkaskade führte in anderen Analysen bereits zu einer verstärkten Reorientierung einzelner Fibroblasten unter zyklischer Dehnung (Lövenich *et al.*, 2021). In der vorliegenden Arbeit konnte ein gesteigertes Reorientierungsverhalten nach Abbau der Mikrotubuli möglicherweise durch indirekt gesteigerte RhoA-Aktivität erstmalig auch im Zellverband gezeigt werden.

Obwohl Mikrotubuli und Aktin-Filamente direkt über kreuzvernetzende Proteine miteinander verbunden vorliegen (Mohan und John, 2015), scheinen die dehnungsinduzierten Umstrukturierungsprozesse somit überwiegend nicht in Abhängigkeit einer direkten Kopplung zu stehen. Darüber hinaus konnte nach Nocodazol-Zugabe über alle Schichten hinweg keine Veränderung der dehnungsinduzierten Zellkernausrichtung im Vergleich zu nicht-inhibierten SEE unter Dehnung beobachtet werden. Die Anbindung der Mikrotubuli an LINC-Komplexe könnte für die Reorientierung, ähnlich wie für die Positionierung der Zellkerne unter räumlich-beschränkten (engl. *physical confinement*) Kultivierungsbedingungen anderer Untersuchungen (Doolin *et al.*, 2019), somit eine untergeordnete Rolle gespielt haben oder durch die verbleibenden zytoskelettalen Systeme kompensiert worden sein.

Das Keratin-Netzwerk dient als schützendes Puffersystem gegenüber mechanischer Belastung und bestimmt maßgeblich die mechanischen Eigenschaften einzelner Keratinozyten und epidermaler Zellschichten (Ramms *et al.*, 2013; Karsch *et al.*, 2020). Interessanterweise wurde auch bei Keratinozyten, die kein funktionelles Keratin-Netzwerk exprimierten (KtyI^{-/-}), eine ausgeprägte dehnungsinduzierte Reorientierung der Zellkern-Hauptachsen beobachtet. Neben einer flacheren Zellmorphologie äußerte sich das Fehlen des Keratins im Auftreten aberranter Zellkernformen, die vermutlich in der Abwesenheit des perinukleären Keratin-Käfigs begründet waren (Windoffer *et al.*, 2011). Diese Verdichtung von Keratin-Filamenten um den Zellkern von

Keratinocyten stellt eine entscheidende Stützstruktur dar, deren molekulare Manipulation bereits Einfluss auf die Morphologie der Zellkerne basaler und suprabasaler Keratinocyten gezeigt hatte (Lee *et al.*, 2012). Die vorliegenden Analysen legen nahe, dass die Kern-Hauptachsen unabhängig vom Aufbau eines perinukleären Keratin-Käfigs unter zyklischer Dehnung ausgerichtet werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich die Reorientierung des basalen F-Aktins in *KtyI^{-/-}*-SEEs unter Dehnung gegenüber WT-SEEs vermindert [Abbildung 31]. Die Stressfasern wiesen in Abwesenheit des Keratin-Netzwerks nicht nur vermehrt Winkelorientierungen in Richtung der Dehnungsachse auf, sondern zeigten auch keine vergleichbaren Hauptorientierungswinkel benachbarter Zellen. In diesem Zusammenhang kam auffallend zum Vorschein, dass die basalen Stressfasern der *KtyI^{-/-}*-SEEs im Randbereich einer Zelle endeten und nicht, wie in WT-Keratinocyten, in gegenüberliegende Zellkontakte verliefen [Abbildung 30]. Diese Beobachtung deutete auf eine primär über Zell-Matrix-vermittelte Stressfaserorientierung hin, während die zellübergreifende Ausrichtung der Aktin-Bündel in WT-SEEs höchstwahrscheinlich ebenfalls durch interzelluläre Kontakte beeinflusst wurde.

Eine Reihe jüngerer Arbeiten konnte demonstrieren, dass Aktin- und Keratin-gekoppelte Kontaktstrukturen zur Matrix und zwischen angrenzenden Zellen in Aufbau und Regulation sowie Mechanosensorik deutliche Abhängigkeiten voneinander aufweisen (Leube *et al.*, 2015; Hatzfeld *et al.*, 2017; Zuidema *et al.*, 2020). So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Ausbildung der Desmosomen von E-Cadherin-vermittelten AJs abhängig ist und desmosomale Komponenten zeitweise durch AJs koordiniert und positioniert werden (Michels *et al.*, 2009; Green *et al.*, 2010). Ohne Keratinfilamente werden Desmosomen zwar gebildet, jedoch schnell endozytotisch wieder aufgenommen (Kröger *et al.*, 2013). Dies führt zu einer reduzierten und destabilisierten interzellulären Adhäsion. Karsch und Kolleg(en)*innen konnten außerdem zeigen, dass in Monolagen aus *KtyI^{-/-}*-Keratinocyten die Ausbildung Aktin-gekoppelter Zellverbindungen (AJs und TJs) beeinträchtigt und eine mechanische Kopplung benachbarter Keratinocyten innerhalb der Zellschicht reduziert vorlag (Karsch *et al.*, 2020). Eine zentrale Rolle bei der physischen Quervernetzung von Aktin- und Keratin-Filamenten in räumlicher Nähe zu Kontaktstrukturen nimmt dabei vermutlich das Protein Plectin ein, das den Aufbau des Keratin-Netzwerks im Zellkortex mit koordiniert (Prechova *et al.*, 2022).

Zusätzlich wurde beschrieben, dass *KtyI^{-/-}*-Keratinocyten im Vergleich zu WT-Zellen signifikant mehr Stressfasern und ein verändertes Aktomyosin aufwiesen (Karsch *et al.*, 2020). In diesem Zusammenhang konnte eine Erhöhung der zellulären Zugspannung durch RhoA-vermittelte

Signalwege und eine Stabilisierung von Fokaladhäsionen auch anhand von Keratinozyten ohne funktionelle Hemidesmosomen sowie durch die Keratin-Interaktion mit GEFs gezeigt werden (Fujiwara *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2020).

Die Dehnungsversuche dieser Arbeit verdeutlichen die Bedeutung des Keratin-Netzwerks für die mechanosensitive Adaption des Aktin-Zytoskeletts epidermaler Keratinozyten. Eine zellkooperative Antwort auf zyklische Dehnung wurde in den dargestellten Untersuchungen vermutlich aufgrund der beeinträchtigten Kopplung benachbarter Aktin-Zytoskelette sowie strukturellen Veränderungen im Aktomyosin gestört. Außerdem könnte eine verminderte interzelluläre Adhäsion für den verringerten, teilweise einschichtigen Aufbau der KtyI^{-/-}-SEEs im Vergleich zu WT-Keratinozyten verantwortlich sein.

Die Ausbildung interzellulärer Kontakte wurde experimentell auch durch die Störung der Aktomyosin-Dynamik aufgrund des Einsatzes des Aktin-Polymerisationsinhibitors Cytochalasin D (Cyto. D) in WT-Keratinozyten vermindert (Stevenson und Begg, 1994; Ramachandran und Srinivas, 2010). Die gewählte Dosis führte hierbei im epidermalen Zellverband nicht zur vollständigen Auflösung der basalen Aktin-Bündel. Stattdessen bildeten sich im submembranen Kortex Aktin-Aggregate aus, die bereits unter dem Einsatz von Cytochalasin für andere Zelltypen beschrieben wurden (Rotsch und Radmacher, 2000; Wakatsuki *et al.*, 2001) und in immunzytochemischen Färbungen keine Kolo-kalisation mit NMM2A aufwiesen [Abbildung 48]. Außerdem konnte eine deutliche Reduktion der zellulären Zugspannung, die von Zellklustern aus Keratinozyten auf das Substrat ausgeübt wurde, nach Zugabe des Inhibitors gleicher Konzentration nachgewiesen werden [Abbildung 46].

Interessanterweise richteten sich die basalen Stressfasern in ein- und mehrschichtigen Epithelien unter Cyto. D nach 6 h in annähernd 70° zur Dehnungsachse aus und wichen damit signifikant von der nahezu perpendikulären Orientierung unbehandelter Zellen unter Dehnung ab [Abbildung 33 und 36]. Die fast einheitlichen Winkelerorientierungen entsprachen somit prinzipiell eher einer dehnungsinduzierten Orientierung epidermaler Zellschichten vorangegangener Untersuchungen, die unter Veränderung des Deformationsfeldes und dadurch Verschiebung des Querkontraktionsverhältnisses gedehnt wurden (Noethel, 2018). Die molekularen Mechanismen dieser veränderten zellkooperativen Antwort auf zyklische Dehnung, insbesondere im Hinblick auf interzelluläre Verbindungen und das angebundene Aktomyosin-Netzwerk, übersteigen den Rahmen dieser Arbeit und bleiben Gegenstand zukünftiger Analysen.

Neben einer veränderten Reorientierung basaler Stressfasern unter Einfluss des Cyto. D wurde in konfokalmikroskopischen Aufnahmen des apikalen F-Aktin-Signals ein weiterer, nicht intuitiver Effekt des Aktin-Polymerisationsinhibitors beobachtet. Hier traten unter zyklischer Dehnung Aktinfilamente auf, die quer zur Zugachse ausgerichtet waren und gegenüberliegende Zellkontakte miteinander verbanden. Dabei schien es unerheblich, ob der apikale Kortex einer suprabasalen Zelle im mehrschichtigen SEE oder einer substratadhäsiven Zelle in einer Monolage ausgewertet wurde [Abbildung 34 und 37].

Cyto. D bindet mit hoher Affinität an das (+)-Ende eines Aktinfilaments und hemmt dort sowohl Polymerisation als auch Depolymerisation (Cooper, 1987). Außerdem induziert es die Dimerisierung und unterstützt möglicherweise die Nukleation von Aktin (Cooper, 1987). Des Weiteren bindet es G-Aktin und inhibiert die Interaktion von Aktin mit den ABPs der Familie ADF/Cofilin (Shoji *et al.*, 2012). Die Proteine der Familie ADF/Cofilin binden hierbei an ADP-Aktin, destabilisieren bestehende Aktinfilamente und hemmen den Austausch von ADP gegen ATP (Pavlov *et al.*, 2007; Kardos *et al.*, 2009). Dadurch beeinflusste Cyto. D die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts in zellbiologischen Analysen über seine Funktion als ‚Kappe‘ am (+)-Ende hinaus und reduzierte die Polymerisations- und Depolymerisationsrate (Shoji *et al.*, 2012).

Die auf diese Weise möglicherweise verstärkte Umstrukturierung des kortikalen F-Aktins, die durch einen zyklischen Dehnungsreiz induziert wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit in geringerer Ausprägung auch in Monolagen und SEEs beobachtet werden, die nicht mit Cyto. D behandelt wurden [Abbildung 35 und 38]. Nach zyklischer Dehnung traten im apikalen Aktinkortex unabhängig von einer Anbindung an das Substrat filamentöse Strukturen auf, die quer zur Dehnungsachse ausgerichtet waren.

4.5 Dehnungsinduzierte Umstrukturierung des kortikalen F-Aktins

Der Aktinkortex stellt ein submembranes Netzwerk aus Aktomyosin und assoziierten ABPs dar, dessen Struktur und Zusammensetzung innerhalb einer Zelle große, lokale und vom physiologischen Zustand abhängige Unterschiede aufweisen kann (Svitkina, 2020). Dabei werden in dynamischen Übergängen sowohl isotrope Netzwerke aus Aktinfilamenten unterschiedlicher Maschenweite als auch anisotrope Bündel innerhalb des Netzwerks ausgebildet (Eghiaian *et al.*, 2015). Während eine isotrope Organisation primär in suspendierten Zellen, Ausstülpungen der Zellmembran und im apikalen Kortex substratadhäsiver Einzelzellen vorliegt, wird eine anisotrope Bündelstruktur überwiegend im ventralen (basalen) Kortex adhäsiver Zellen beobachtet (Svitkina, 2020).

Die im Rahmen dieser Arbeit entdeckte dehnungsinduzierte, anisotrope Strukturänderung im apikalen Kortex des epidermalen Zellverbands könnte eine bisher nicht beschriebene Adaption des Aktin-Zytoskeletts auf extrinsische mechanische Belastung darstellen. Dabei verdeutlichte die Arbeitsgruppe um G. Charras anhand einschichtiger Epithelien kürzlich die Bedeutung des dynamischen Aktomyosins an Zell-Zell-Grenzen für die aktive Spannungsrelaxation der Zellschichten unter mechanischer Belastung (Khalilgharibi *et al.*, 2019; Wyatt *et al.*, 2020).

Einige Membranproteine und Zellkontaktstrukturen liegen intrazellulär in physischer Verbindung zum kortikalen Aktin vor und ermöglichen auf diesem Weg die bilaterale mechanische Kommunikation mit der umgebenden EZM und benachbarten Kortizes. Hierbei wird beispielsweise durch erhöhte, intrinsische Zugspannung die interzelluläre Verbindung über AJs stabilisiert und verstärkt (Pinheiro und Bellaiche, 2018). Dies hat gleichzeitig die lokale Umstrukturierung und Verstärkung des angebundenen Aktomyosins zur Folge (Yonemura, 2017). In diesem Zusammenhang wurden in konfluenten Zellschichten, bei denen die Keratinozyten aufgrund der geringen extrazellulären Kalziumkonzentration keine interzellulären Verbindungen aufbauen konnten, nur vereinzelt filamentöse Aktin-Strukturen im apikalen Kortex nach 6 h zyklischer Dehnung gefunden [Abbildung 39]. Diese lagen dabei jedoch entlang des polarisierten Zellkörpers und nicht wie basale Stressfasern derselben Zellen annähernd quer zur Zugachse orientiert vor. Bei zusätzlicher Anwendung von Cyto. D konnten weder basale Stressfasern noch apikale Filamente durch Dehnung induziert werden. Diese Beobachtung weist auf die Bedeutung der interzellulären Verbindungen für die strukturelle Adaption des gesamten Aktomyosins und der Zellen hin und steht in Übereinstimmung mit Dehnungsversuchen auf Einzelzellebene, die kein Reorientierungsverhalten nach Zugabe von Cyto. D detektieren konnten (Liu *et al.*, 2008).

Strukturelle Veränderungen im Aktinkortex werden u.a. durch kreuzvernetzende ABPs aber auch durch *de-novo* Nukleation und Steuerung der (De)Polymerisation reguliert (Kelkar *et al.*, 2020). Hierbei fungieren Formine als wichtige Nukleations- und Polymerisationsfaktoren im Aufbau kortikaler, anisotroper Aktinbündel (Eghiaian *et al.*, 2015). Im Kortex liegen Aktinfilamente mit freien (+)-Enden, die in Abhängigkeit des verfügbaren G-Aktin-Pools durch Anlagerung wachsen, und Filamente, die durch Formin-vermittelte Polymerisation verlängert werden, vor (Fritzsche *et al.*, 2013). Formin-assoziierte Filamente zeigten in Protein-Austausch-Analysen (bedingt durch eine zahlenmäßige Unterlegenheit bei eigentlich höherer Polymerisationsgeschwindigkeit der Einzelfilamente) eine geringere Fluktuationsdynamik und schienen dabei durchschnittlich länger ausgeprägt zu sein. Gleichzeitig wurden diese

unverzweigten Filamente durch Cofilin-bedingte Destabilisierung kontinuierlich aufgetrennt und trugen dadurch zum Auffüllen des freien G-Aktin-Pools und zur Bildung freier (+)-Enden bei (Fritzsche *et al.*, 2013). Die Störung der Cofilin-Interaktion bei Anwesenheit von Cyto. D beeinflusste in den hiesigen Dehnungsanalysen somit möglicherweise die Balance bzw. Dynamik dieser voneinander abhängigen Aktin-Subpopulationen. Daraus resultierte möglicherweise eine erhöhte Ausbildung filamentöser Strukturen im kortikalen Aktin aufgrund des mechanischen Dehnungsreizes.

Der gleichzeitige Einfluss des Formin-Inhibitors SMIFH2 bei Inhibition durch Cyto. D zeigte unter Dehnung keinen inhibitorischen Effekt auf die betrachteten Reorientierungsparameter und die Bildung apikaler Filamente [Abbildung 40 und 41]. Andere Arbeitsgruppen stellten bei vergleichbarer Konzentration fest, dass sich die dehnungsinduzierte Reorientierung von Einzelzellen und Zellkernen nach Zugabe von SMIFH2 abschwächte und E-Cadherin-abhängige Zellverbindungen durch reduzierte Formin-Aktivität im einschichtigen Epithel destabilisiert wurden (Rao und Zaidel-Bar, 2016; Hoffman *et al.*, 2020). Nishimura und Kolleg(en)*innen fanden außerdem heraus, dass die Eingliederung von Aktin in Stressfasern unter statischen Bedingungen durch den Formin-Inhibitor gehemmt wurde. Bei Anlegen zyklischer Dehnung zeigte sich die Fluktuation in Stressfasern jedoch verstärkt und vom Einfluss des SMIFH2 unabhängig (Nishimura *et al.*, 2021). Obwohl eine Reduktion der ausgeübten Zellkräfte ungedehnter Zellkluster durch SMIFH2 im Rahmen dieser Arbeit experimentell bestätigt wurde [Abbildung 46], kann eine unvollständige Inhibition der Formine unter den gewählten Bedingungen im Dehnungsversuch, einschließlich des eingesetzten Zelltyps im Verband und der zusätzlichen Gabe von Cyto. D, nicht ausgeschlossen werden. Der beobachtete Abfall zellulärer Zugkräfte trat zudem verspätet und in geringerer Ausprägung als in vergleichbaren Analysen auf (Nishimura *et al.*, 2021). Das Verständnis des Einflusses der Nukleation und Polymerisation im Aktinkortex konfluenter Zellschichten auf die strukturelle Adaption unter zyklischer Dehnung benötigt weitergehende, experimentelle Untersuchungen.

Eine zentrale Rolle in der Regulation der kortikalen Struktur und Funktion nehmen NMM2 Motorproteine ein, da diese unter lokaler und globaler Regulation die intrinsische Zugspannung im Aktomyosin generieren (Chugh und Paluch, 2018). Die systemische Inhibition der Myosine durch Zugabe von para-Aminoblebbistatin (Varkuti *et al.*, 2016, im Folgenden nur Blebbistatin genannt) verhinderte in Dehnungsuntersuchungen das Auftreten apikaler Filamente im Aktinkortex [Abbildung 42]. Auch bei gleichzeitigem Einfluss von Cyto. D wurden nahezu keine Aktinfilamente in quer zur Zugachse vorliegender Orientierung ausgebildet [Abbildung 43].

Blebbistatin bindet hierbei direkt an Myosin, hemmt die Freisetzung des Phosphats nach der ATP-Spaltung und blockiert die Kopfdomäne in einem Aktin-ungebundenen Zustand (Kovacs *et al.*, 2004). Somit wird nicht nur die kraftausübende Konformationsänderung unterbunden, sondern ebenfalls die Funktion als F-Aktin-Kreuzvernetzer blockiert.

Die ATPase-Aktivität der Myosine wird maßgeblich durch reversible Phosphorylierungen der regulatorischen leichten Ketten gesteigert. Diese erfolgen im Verlauf unterschiedlicher Signalwege durch eine Reihe von Kinasen mit intrazellulär-spezifischer Lokalisation und steuern lokal die Kontraktilität des Aktomyosins (Betapudi, 2014). Aufgrund ihrer vorherrschenden Stellung als Myosin-Kinasen wurden die MLCK (*engl. myosin light chain kinase*) und die durch RhoGTPasen-aktivierte ROCK (*engl. rho-associated protein kinase*) in einer Reihe von Untersuchungen charakterisiert und mit der Steuerung zellulärer Zugspannung in Verbindung gebracht (Kamm und Stull, 2001; Betapudi, 2014; Kelkar *et al.*, 2020). Die Hemmung der MLCK durch den selektiven MLCK-Inhibitor ML-7 konnte in den hiesigen Analysen das dehnungsinduzierte Auftreten nahezu quer zur Zugachse orientierter Aktinfilamente und Bündel nicht unterbinden [Abbildung 44 und 45]. Damit stand die MLCK-Inhibition im Gegensatz zur direkten Myosin-Blockierung unter Blebbistatin. Obwohl für beide ein negativer Einfluss auf die zellulären Zugkräfte nachgewiesen wurde, reduzierten sich die auf das Substrat ausgeübten Kräfte durch Blebbistatin tendenziell stärker als durch ML-7 [Abbildung 46]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigten Untersuchungen anderer kürzlich, dass ROCK in Keratinozyten eine dominierende Funktion ausfüllt und die MLCK für Migration, Kontraktilität und Zellmorphologie epidermaler Zellen eine untergeordnete Rolle einnimmt (Srinivasan *et al.*, 2019).

Nicht nur das Auftreten kortikaler, apikaler Aktinfilamente quer zur Zugachse, sondern auch die Blebbistatin-bedingte Repression dieses dehnungsinduzierten Phänotyps wurden nach Analysen im einschichtigen System ebenso im apikalen Zellkortex suprabasaler Keratinozyten des mehrschichtigen SEE bestätigt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass NMM2 mit den Aktinfilamenten assoziiert vorlag. Hierbei wurden die Filamente über NMM2 in regelmäßigen Abständen kreuzvernetzt, sodass ein periodisches Bandenmuster aus Aktin und Myosin im mikroskopischen Bild erkennbar wurde [Abbildung 48]. Diese Organisation wurde durch Zugabe von Blebbistatin, das die Anbindung von Myosin an Aktin hemmt, aufgehoben und wird üblicherweise in kontraktilen Stressfasern beobachtet (Kassianidou und Kumar, 2015).

Die von einer Anbindung an das Substrat unabhängige Zellantwort auf zyklische Dehnung im Aktinkortex epidermaler Zellverbände, die im Rahmen dieser Arbeit voraussichtlich erstmals

beschrieben wurde, weist damit eine NMM2-abhängige Dynamik auf. Ob die ATPase-Aktivität über ROCK (oder alternative Kinasen) oder primär die Kreuzvernetzung des isotropen Netzwerks durch Myosin für die strukturelle Anpassung verantwortlich waren, konnte aufgrund der bisherigen Daten nicht endgültig geklärt werden und bedarf zusätzlicher Untersuchungen.

Die effiziente Reorientierung der Zellen und Zellkerne suprabasaler Zellen bei gleichzeitiger Abwesenheit zelldurchspannender und unter zyklischer Dehnung ausgerichteter Aktin-Bündel, wie sie in substratadhäsiven Zellen auftreten, verdeutlicht die oftmals unterschätzte Bedeutung interzellulärer Adhäsionen und verbundener Zytoskelette. Es zeigt die mechanobiologische Kooperativität der Zellen innerhalb eines Verbands, bei deren Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen wir gerade erst am Beginn stehen.

5 Ausblick

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte vereinfachte Epidermaläquivalent (genannt SEE, *engl. Simplified Epidermis Equivalent*) erlaubte die Untersuchungen mehrschichtiger, zellbasierter Systeme unter Dehnung in einer kontrollierten, definierten Versuchsumgebung. Auf diese Weise wurden experimentelle Daten gewonnen, die das Verständnis der komplexen Mechanobiologie einzelner Zellen innerhalb ihres dreidimensionalen Gewebeverbands erweitern und neue Perspektiven in der Betrachtung interzellulärer Abhängigkeiten eröffnen können. Zukünftige *in-vitro* Analysen sollten in ihrer Interpretation gewonnener Daten den Einfluss der interzellulären Verbindungen und mechanischen Kopplung angrenzender Zytoskelette berücksichtigen. Hierbei scheint es großen Stellenwert einzunehmen, dass neben biochemischen Aspekten auch ein möglichst an der mechanobiologischen Situation *in-vivo* angelehntes Modellsystem angestrebt wird.

Aufbauend auf den Erkenntnissen der kortikalen Umstrukturierung unter zyklischer Dehnung könnten weiterführende Untersuchungen die molekularen Mechanismen innerhalb der zytoskelettalen Systeme und verbundener Strukturen unter mechanischer Belastung weiter aufklären. Dabei würde die Inhibition zusätzlicher Myosin-Kinasen (beispielsweise der ROCK durch den Inhibitor Y27632) bzw. die biochemische Aktivierung des Rho-abhängigen Signalwegs (beispielsweise durch Lysophosphatidinsäure (LPA)) bei gleichzeitiger zyklischer Dehnung die Regulation der Myosine im Aktinkortex möglicherweise weiter beleuchten. Von besonderem Interesse wäre auch der strukturelle Zusammenhang des Aktinkortex suprabasaler Zellen mit der Mechanosensorik interzellulärer Verbindungen. Dabei könnten Protein-Austausch-Analysen der desmosomalen und AJ-Zusammensetzung unter Dehnung sowie die Verwendung bestimmter Keratinozyten-Deletionsmutanten mechanosensitiver Proteine (beispielsweise für Vinculin) entscheidend zum Verständnis beitragen. Ebenso wäre der Aufbau der SEE aus humanen (immortalisierten) Keratinozyten mit krankheitsassoziierten, genetischen Veränderungen (beispielsweise bei Epidermolysis Bullosa Simplex) denkbar. Ein solches System könnte damit zur mechanobiologischen Aufklärung und Therapieerforschung genetischer Erkrankungen, die die Integrität und Stabilität der Epidermis beeinflussen, beitragen.

Methodisch interessant könnte hierbei auch die Transfektion bzw. Lipofektion apikaler Zellen im SEE sein, da hierbei womöglich innerhalb des mehrlagigen Systems eine apikale, transfizierte Zellschicht mit nicht-transfizierten Zellen basaler Schichten interagiert und zusätzlich unter mechanische Belastung gesetzt werden kann. Auf diese Weise könnten interzelluläre

Verbindungen und Abhängigkeiten zytoskelettaler Systeme in Abwesenheit von Zell-Matrix-Adhäsionen untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit unter zyklischer Dehnung im apikalen Kortex aufgetretenen Aktinfilamente lagen in direkter Verbindung zu periodisch-organisiertem NMM2 vor. Ob die strukturelle Polarität, die durch den uniaxialen Dehnungsreiz im kortikalen Aktin induziert wurde, auch eine anisotrope Verteilung der kortikalen Zugspannung zur Folge hat, könnte ebenfalls Gegenstand nachfolgender Analysen sein. Hierbei könnte die suprabasale Zellschicht nach Ausrichtung unter zyklischer Dehnung möglicherweise durch einen fokussierten Laser zerschnitten werden (auch Laserablation genannt), während die basale Zellschicht und das basale Aktin-Zytoskelett intakt blieben. Aus der Geschwindigkeit der aufklaffenden Schnittländer ließe sich anschließend eine Aussage zur intrinsischen Spannung ableiten und mit ungedehnten Kontrollen vergleichen.

Darüber hinaus wurden in den dargestellten Dehnungsversuchen uniaxiale Deformationsfelder angelegt. Dabei zeigten die vorliegenden Ergebnisse, dass das kortikale Aktin auf die Deformation durch Bildung filamentöser Strukturen quer zur Zugachse und damit weg von der mechanischen Belastung reagierte. Die zelluläre Antwort auf einen biaxialen oder equibiaxialen Dehnungsreiz war nicht Gegenstand dieser Arbeit und könnte in nachfolgenden Analysen weitere wertvolle Erkenntnisse über die Adaption im Gewebeverband liefern. Zusätzlich könnten Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Beendigung der zyklischen Dehnung Aufschluss darüber geben, ob die Ausrichtung der Zellen, Zellkerne und der Zytoskelette im Gewebeverband einen temporären Effekt darstellen und anschließend wieder eine zufällige Orientierung eingenommen wird oder das System insgesamt nachhaltig verändert bleibt.

Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse ergeben sich somit spannende Themenfelder zukünftiger Projekte, die das Forschungsgebiet der Mechanobiologie bereichern werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham, J. A., Linnartz, C., Dreissen, G., Springer, R., Blaschke, S., Rueger, M. A., Fink, G. R., Hoffmann, B. und Merkel, R. 2019. Directing Neuronal Outgrowth and Network Formation of Rat Cortical Neurons by Cyclic Substrate Stretch. *Langmuir*, 35(23), pp 7423-7431.
- Adams, J. C. und Watt, F. M. 1989. Fibronectin inhibits the terminal differentiation of human keratinocytes. *Nature*, 340(6231), pp 307-9.
- Adams, J. C. und Watt, F. M. 1990. Changes in keratinocyte adhesion during terminal differentiation: reduction in fibronectin binding precedes alpha 5 beta 1 integrin loss from the cell surface. *Cell*, 63(2), pp 425-35.
- Ahrens, D., Rubner, W., Springer, R., Hampe, N., Gehlen, J., Magin, T. M., Hoffmann, B. und Merkel, R. 2019. A Combined AFM and Lateral Stretch Device Enables Microindentation Analyses of Living Cells at High Strains. *Methods Protoc*, 2(2), pp.
- Al-Kilani, A., de Freitas, O., Dufour, S. und Gallet, F. 2011. Negative feedback from integrins to cadherins: a micromechanical study. *Biophys J*, 101(2), pp 336-44.
- Alberts, B. 2015. *Molecular biology of the cell*, Sixth edition., New York, NY: Garland Science, Taylor and Francis Group.
- Aragona, M., Sifrim, A., Malfait, M., Song, Y., Van Herck, J., Dekoninck, S., Gargouri, S., Lapouge, G., Swedlund, B., Dubois, C., Baatsen, P., Vints, K., Han, S., Tissir, F., Voet, T., *et al.* 2020. Mechanisms of stretch-mediated skin expansion at single-cell resolution. *Nature*, 584(7820), pp 268-273.
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V. und Wolf, R. 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*, 30(3), pp 257-62.
- Bays, J. L. und DeMali, K. A. 2017. Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions. *Cell Mol Life Sci*, 74(16), pp 2999-3009.
- Betapudi, V. 2014. Life without double-headed non-muscle myosin II motor proteins. *Front Chem*, 2(45).
- Biggs, L. C., Kim, C. S., Miroshnikova, Y. A. und Wickstrom, S. A. 2020. Mechanical Forces in the Skin: Roles in Tissue Architecture, Stability, and Function. *J Invest Dermatol*, 140(2), pp 284-290.
- Bikle, D. D., Xie, Z. und Tu, C. L. 2012. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 7(4), pp 461-472.
- Borowiec, A. S., Delcourt, P., Dewailly, E. und Bidaux, G. 2013. Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PLoS One*, 8(10), pp e77507.
- Bragulla, H. H. und Homberger, D. G. 2009. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. *J Anat*, 214(4), pp 516-59.

6. Literaturverzeichnis

- Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W. W. und Moll, I. 2002. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol*, 81(5), pp 253-63.
- Brandner, J. M., Zorn-Kruppa, M., Yoshida, T., Moll, I., Beck, L. A. und De Benedetto, A. 2015. Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers*, 3(1-2), pp e974451.
- Brito, C. und Sousa, S. 2020. Non-Muscle Myosin 2A (NM2A): Structure, Regulation and Function. *Cells*, 9(7), pp.
- Brouhard, G. J. 2015. Dynamic instability 30 years later: complexities in microtubule growth and catastrophe. *Mol Biol Cell*, 26(7), pp 1207-10.
- Büchau, F., Vielmuth, F., Waschke, J. und Magin, T. M. 2022. Bidirectional regulation of desmosome hyperadhesion by keratin isoforms and desmosomal components. *Cell Mol Life Sci*, 79(5), pp 223.
- Buckley, C. D., Tan, J., Anderson, K. L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W. I., Nelson, W. J. und Dunn, A. R. 2014. Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science*, 346(6209), pp 1254211.
- Carley, E., Stewart, R. M., Zieman, A., Jalilian, I., King, D. E., Zubek, A., Lin, S., Horsley, V. und King, M. C. 2021. The LINC complex transmits integrin-dependent tension to the nuclear lamina and represses epidermal differentiation. *Elife*, 10(
- Carrier, M. F. 1990. Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Adv Biophys*, 26(51-73).
- Cesa, C. M., Kirchgessner, N., Mayer, D., Schwarz, U. S., Hoffmann, B. und Merkel, R. 2007. Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns. *Rev Sci Instrum*, 78(3), pp 034301.
- Chamcheu, J. C., Siddiqui, I. A., Syed, D. N., Adhami, V. M., Liovic, M. und Mukhtar, H. 2011. Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Arch Biochem Biophys*, 508(2), pp 123-37.
- Charras, G. und Yap, A. S. 2018. Tensile Forces and Mechanotransduction at Cell-Cell Junctions. *Curr Biol*, 28(8), pp R445-R457.
- Chien, S. 2007. Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(3), pp H1209-24.
- Chugh, P. und Paluch, E. K. 2018. The actin cortex at a glance. *J Cell Sci*, 131(14), pp.
- Coolen, N. A., Schouten, K. C., Middelkoop, E. und Ulrich, M. M. 2010. Comparison between human fetal and adult skin. *Arch Dermatol Res*, 302(1), pp 47-55.
- Cooper, J. A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*, 105(4), pp 1473-8.
- Doolin, M. T., Ornstein, T. S. und Stroka, K. M. 2019. Nuclear Deformation in Response to Mechanical Confinement is Cell Type Dependent. *Cells*, 8(5), pp.

6. Literaturverzeichnis

- Doss, B. L., Pan, M., Gupta, M., Greci, G., Mege, R. M., Lim, C. T., Sheetz, M. P., Voituriez, R. und Ladoux, B. 2020. Cell response to substrate rigidity is regulated by active and passive cytoskeletal stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(23), pp 12817-12825.
- DuFort, C. C., Paszek, M. J. und Weaver, V. M. 2011. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(5), pp 308-19.
- Duszyc, K., Gomez, G. A., Lagendijk, A. K., Yau, M. K., Nanavati, B. N., Gliddon, B. L., Hall, T. E., Verma, S., Hogan, B. M., Pitson, S. M., Fairlie, D. P., Parton, R. G. und Yap, A. S. 2021. Mechanotransduction activates RhoA in the neighbors of apoptotic epithelial cells to engage apical extrusion. *Curr Biol*, 31(6), pp 1326-1336 e5.
- Eckert, R. L. 1989. Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev*, 69(4), pp 1316-46.
- Eghiaian, F., Rigato, A. und Scheuring, S. 2015. Structural, mechanical, and dynamical variability of the actin cortex in living cells. *Biophys J*, 108(6), pp 1330-1340.
- Elias, P. M. 1988. Structure and function of the stratum corneum permeability barrier. *Drug Development Research*, 13(2-3), pp 97-105.
- Elsholz, F., Harteneck, C., Muller, W. und Friedland, K. 2014. Calcium--a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur J Dermatol*, 24(6), pp 650-61.
- Eshel, H. und Lanir, Y. 2001. Effects of strain level and proteoglycan depletion on preconditioning and viscoelastic responses of rat dorsal skin. *Ann Biomed Eng*, 29(2), pp 164-72.
- Faust, U., Hampe, N., Rubner, W., Kirchgessner, N., Safran, S., Hoffmann, B. und Merkel, R. 2011. Cyclic stress at mHz frequencies aligns fibroblasts in direction of zero strain. *PLoS One*, 6(12), pp e28963.
- Fletcher, D. A. und Mullins, R. D. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 463(7280), pp 485-92.
- Flitney, E. W., Kuczmariski, E. R., Adam, S. A. und Goldman, R. D. 2009. Insights into the mechanical properties of epithelial cells: the effects of shear stress on the assembly and remodeling of keratin intermediate filaments. *FASEB J*, 23(7), pp 2110-9.
- Frankart, A., Malaisse, J., De Vuyst, E., Minner, F., de Rouvroit, C. L. und Poumay, Y. 2012. Epidermal morphogenesis during progressive in vitro 3D reconstruction at the air-liquid interface. *Exp Dermatol*, 21(11), pp 871-5.
- Fritzsche, M., Lewalle, A., Duke, T., Kruse, K. und Charras, G. 2013. Analysis of turnover dynamics of the submembranous actin cortex. *Mol Biol Cell*, 24(6), pp 757-67.
- Fudge, D., Russell, D., Beriault, D., Moore, W., Lane, E. B. und Vogl, A. W. 2008. The intermediate filament network in cultured human keratinocytes is remarkably extensible and resilient. *PLoS One*, 3(6), pp e2327.
- Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T. und Ishiwata, S. 2002. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat Cell Biol*, 4(9), pp 666-73.

- Fujiwara, S., Ohashi, K., Mashiko, T., Kondo, H. und Mizuno, K. 2016. Interplay between Solo and keratin filaments is crucial for mechanical force-induced stress fiber reinforcement. *Mol Biol Cell*, 27(6), pp 954-66.
- Fung, Y. C. 2013. *Biomechanics: Mechanical Properties of Living Tissues*: Springer New York.
- Garcia, M. A., Nelson, W. J. und Chavez, N. 2018. Cell-Cell Junctions Organize Structural and Signaling Networks. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(4), pp.
- Green, K. J., Getsios, S., Troyanovsky, S. und Godsel, L. M. 2010. Intercellular junction assembly, dynamics, and homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(2), pp a000125.
- Green, K. J., Jaiganesh, A. und Broussard, J. A. 2019. Desmosomes: Essential contributors to an integrated intercellular junction network. *F1000Res*, 8(
- Harada, K., Enosawa, S., Zhang, B., Yuan, W., Chiba, T. und Fujie, M. G. 2011. Evaluation of fetal tissue viscoelastic characteristics for robotic fetal surgery. *Int J Comput Assist Radiol Surg*, 6(6), pp 797-802.
- Harburger, D. S. und Calderwood, D. A. 2009. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 2), pp 159-63.
- Harris, A. R., Peter, L., Bellis, J., Baum, B., Kabla, A. J. und Charras, G. T. 2012. Characterizing the mechanics of cultured cell monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(41), pp 16449-54.
- Hatzfeld, M., Keil, R. und Magin, T. M. 2017. Desmosomes and Intermediate Filaments: Their Consequences for Tissue Mechanics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 9(6), pp.
- Hayakawa, K., Sato, N. und Obinata, T. 2001. Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching. *Exp Cell Res*, 268(1), pp 104-14.
- Helling, A. L., Viswanathan, P., Cheliotis, K. S., Mobasser, S. A., Yang, Y., El Haj, A. J. und Watt, F. M. 2019. Dynamic Culture Substrates That Mimic the Topography of the Epidermal-Dermal Junction. *Tissue Eng Part A*, 25(3-4), pp 214-223.
- Hennings, H. und Holbrook, K. A. 1983. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. *Exp Cell Res*, 143(1), pp 127-42.
- Hirata, H., Samsonov, M. und Sokabe, M. 2017. Actomyosin contractility provokes contact inhibition in E-cadherin-ligated keratinocytes. *Sci Rep*, 7(46326).
- Hodivala, K. J. und Watt, F. M. 1994. Evidence that cadherins play a role in the downregulation of integrin expression that occurs during keratinocyte terminal differentiation. *J Cell Biol*, 124(4), pp 589-600.
- Hoffman, L. M., Smith, M. A., Jensen, C. C., Yoshigi, M., Blankman, E., Ullman, K. S. und Beckerle, M. C. 2020. Mechanical stress triggers nuclear remodeling and the formation of transmembrane actin nuclear lines with associated nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell*, 31(16), pp 1774-1787.
- Houben, S., Kirchgeßner, N. und Merkel, R. Estimating force fields of living cells—comparison of several regularization schemes combined with automatic parameter choice. *Joint Pattern Recognition Symposium*, 2010. Springer, 71-80.

- Huang, L. und Helmke, B. P. 2015. Polarized actin structural dynamics in response to cyclic uniaxial stretch. *Cell Mol Bioeng*, 8(1), pp 160-177.
- Huff, J. 2016. The Fast mode for ZEISS LSM 880 with Airyscan: high-speed confocal imaging with super-resolution and improved signal-to-noise ratio. *Nature Methods*, 13(11), pp i-ii.
- Humphries, J. D., Wang, P., Streuli, C., Geiger, B., Humphries, M. J. und Ballestrem, C. 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol*, 179(5), pp 1043-57.
- Hunter-Featherstone, E., Young, N., Chamberlain, K., Cubillas, P., Hulette, B., Wei, X., Tiesman, J. P., Bascom, C. C., Benham, A. M., Goldberg, M. W., Saretzki, G. und Karakesisoglou, I. 2021. Culturing Keratinocytes on Biomimetic Substrates Facilitates Improved Epidermal Assembly In Vitro. *Cells*, 10(5), pp.
- Ipponjima, S., Hibi, T. und Nemoto, T. 2016. Three-Dimensional Analysis of Cell Division Orientation in Epidermal Basal Layer Using Intravital Two-Photon Microscopy. *PLoS One*, 11(9), pp e0163199.
- Jee, S. H., Wu, Y. C., Kuo, Y. F., Chang, S. F., Chang, C. H., Wu, R. und Lu, Y. C. 1990. Growth and characterization of normal human keratinocytes in F12 serum-free medium. *J Formos Med Assoc*, 89(7), pp 559-64.
- Joodaki, H. und Panzer, M. B. 2018. Skin mechanical properties and modeling: A review. *Proc Inst Mech Eng H*, 232(4), pp 323-343.
- Kamm, K. E. und Stull, J. T. 2001. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem*, 276(7), pp 4527-30.
- 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(7323), pp 580-4.
- Kanitakis, J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*, 12(4), pp 390-9; quiz 400-1.
- Kardos, R., Pozsonyi, K., Nevalainen, E., Lappalainen, P., Nyitrai, M. und Hild, G. 2009. The effects of ADF/cofilin and profilin on the conformation of the ATP-binding cleft of monomeric actin. *Biophys J*, 96(6), pp 2335-43.
- Karsch, S., Büchau, F., Magin, T. M. und Janshoff, A. 2020. An intact keratin network is crucial for mechanical integrity and barrier function in keratinocyte cell sheets. *Cell Mol Life Sci*, 77(21), pp 4397-4411.
- Kassianidou, E. und Kumar, S. 2015. A biomechanical perspective on stress fiber structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1853(11 Pt B), pp 3065-74.
- Kelkar, M., Bohec, P. und Charras, G. 2020. Mechanics of the cellular actin cortex: From signalling to shape change. *Curr Opin Cell Biol*, 66(69-78).
- Khalilgharibi, N., Fouchard, J., Asadipour, N., Barrientos, R., Duda, M., Bonfanti, A., Yonis, A., Harris, A., Mosaffa, P., Fujita, Y., Kabla, A., Mao, Y., Baum, B., Munoz, J. J., Miodownik, M., *et al.* 2019. Stress relaxation in epithelial monolayers is controlled by the actomyosin cortex. *Nat Phys*, 15(8), pp 839-847.

- Khatau, S. B., Hale, C. M., Stewart-Hutchinson, P. J., Patel, M. S., Stewart, C. L., Searson, P. C., Hodzic, D. und Wirtz, D. 2009. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(45), pp 19017-22.
- 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. *J Phys Condens Matter*, 22(19), pp 194109.
- Korn, E. D. 1982. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev*, 62(2), pp 672-737.
- Köster, S., Weitz, D. A., Goldman, R. D., Aebi, U. und Herrmann, H. 2015. Intermediate filament mechanics in vitro and in the cell: from coiled coils to filaments, fibers and networks. *Curr Opin Cell Biol*, 32(82-91).
- Kovacs, M., Toth, J., Hetenyi, C., Malnasi-Csizmadia, A. und Sellers, J. R. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem*, 279(34), pp 35557-63.
- Krendel, M., Zenke, F. T. und Bokoch, G. M. 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol*, 4(4), pp 294-301.
- Kröger, C., Loschke, F., Schwarz, N., Windoffer, R., Leube, R. E. und Magin, T. M. 2013. Keratins control intercellular adhesion involving PKC-alpha-mediated desmoplakin phosphorylation. *J Cell Biol*, 201(5), pp 681-92.
- Lee, C. F., Haase, C., Deguchi, S. und Kaunas, R. 2010. Cyclic stretch-induced stress fiber dynamics - dependence on strain rate, Rho-kinase and MLCK. *Biochem Biophys Res Commun*, 401(3), pp 344-9.
- Lee, C. H., Kim, M. S., Chung, B. M., Leahy, D. J. und Coulombe, P. A. 2012. Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. *Nat Struct Mol Biol*, 19(7), pp 707-15.
- Lerman, M. J., Lembong, J., Muramoto, S., Gillen, G. und Fisher, J. P. 2018. The Evolution of Polystyrene as a Cell Culture Material. *Tissue Eng Part B Rev*, 24(5), pp 359-372.
- Leube, R. E., Moch, M. und Windoffer, R. 2015. Intermediate filaments and the regulation of focal adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 32(13-20).
- Liu, B., Qu, M. J., Qin, K. R., Li, H., Li, Z. K., Shen, B. R. und Jiang, Z. L. 2008. Role of cyclic strain frequency in regulating the alignment of vascular smooth muscle cells in vitro. *Biophys J*, 94(4), pp 1497-507.
- Livne, A., Bouchbinder, E. und Geiger, B. 2014. Cell reorientation under cyclic stretching. *Nat Commun*, 5(3938).
- Lokshin, O. und Lanir, Y. 2009. Viscoelasticity and preconditioning of rat skin under uniaxial stretch: microstructural constitutive characterization. *J Biomech Eng*, 131(3), pp 031009.
- Longmate, W. M. und Dipersio, C. M. 2014. Integrin Regulation of Epidermal Functions in Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 3(3), pp 229-246.

6. Literaturverzeichnis

- Lövenich, L., Dreissen, G., Hoffmann, C., Konrad, J., Springer, R., Höhfeld, J., Merkel, R. und Hoffmann, B. 2021. Strain-induced mechanoresponse depends on cell contractility and BAG3-mediated autophagy. *Mol Biol Cell*, 32(20), pp ar9.
- Lubkov, V. und Bar-Sagi, D. 2014. E-cadherin-mediated cell coupling is required for apoptotic cell extrusion. *Curr Biol*, 24(8), pp 868-74.
- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarsky, V., Pagliari, S. und Forte, G. 2018. Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front Physiol*, 9(824).
- Massou, S., Nunes Vicente, F., Wetzel, F., Mehidi, A., Strehle, D., Leduc, C., Voituriez, R., Rossier, O., Nassoy, P. und Giannone, G. 2020. Cell stretching is amplified by active actin remodelling to deform and recruit proteins in mechanosensitive structures. *Nat Cell Biol*, 22(8), pp 1011-1023.
- Mendonsa, A. M., Na, T. Y. und Gumbiner, B. M. 2018. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene*, 37(35), pp 4769-4780.
- Menon, G. K., Grayson, S. und Elias, P. M. 1985. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol*, 84(6), pp 508-12.
- Merkel, R., Kirchgessner, N., Cesa, C. M. und Hoffmann, B. 2007. Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness. *Biophys J*, 93(9), pp 3314-23.
- Mese, G., Richard, G. und White, T. W. 2007. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 127(11), pp 2516-24.
- Meves, A. 2006. *Intensivkurs Dermatologie*: München ; Jena : Elsevier, Urban und Fischer.
- Michels, C., Buchta, T., Bloch, W., Krieg, T. und Niessen, C. M. 2009. Classical cadherins regulate desmosome formation. *J Invest Dermatol*, 129(8), pp 2072-5.
- Miroshnikova, Y. A., Le, H. Q., Schneider, D., Thalheim, T., Rubsam, M., Bremicker, N., Polleux, J., Kamprad, N., Tarantola, M., Wang, I., Balland, M., Niessen, C. M., Galle, J. und Wickstrom, S. A. 2018. Adhesion forces and cortical tension couple cell proliferation and differentiation to drive epidermal stratification. *Nat Cell Biol*, 20(1), pp 69-80.
- Miroshnikova, Y. A. und Wickstrom, S. A. 2022. Mechanical Forces in Nuclear Organization. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 14(1), pp.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A. und Schlaepfer, D. D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1), pp 56-68.
- Mohan, R. und John, A. 2015. Microtubule-associated proteins as direct crosslinkers of actin filaments and microtubules. *IUBMB Life*, 67(6), pp 395-403.
- Möhl, C., Kirchgessner, N., Schafer, C., Kupper, K., Born, S., Diez, G., Goldmann, W. H., Merkel, R. und Hoffmann, B. 2009. Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(6), pp 350-64.

- Morais, M. C. C., Stuhl, I., Sabino, A. U., Lautenschlager, W. W., Queiroga, A. S., Tortelli, T. C., Jr., Chammas, R., Suhov, Y. und Ramos, A. F. 2017. Stochastic model of contact inhibition and the proliferation of melanoma in situ. *Sci Rep*, 7(1), pp 8026.
- Morioka, M., Parameswaran, H., Naruse, K., Kondo, M., Sokabe, M., Hasegawa, Y., Suki, B. und Ito, S. 2011. Microtubule dynamics regulate cyclic stretch-induced cell alignment in human airway smooth muscle cells. *PLoS One*, 6(10), pp e26384.
- Müller, C. und Pompe, T. 2016. Distinct impacts of substrate elasticity and ligand affinity on traction force evolution. *Soft Matter*, 12(1), pp 272-80.
- Nava, M. M., Miroshnikova, Y. A., Biggs, L. C., Whitefield, D. B., Metge, F., Boucas, J., Vihinen, H., Jokitalo, E., Li, X., Garcia Arcos, J. M., Hoffmann, B., Merkel, R., Niessen, C. M., Dahl, K. N. und Wickstrom, S. A. 2020. Heterochromatin-Driven Nuclear Softening Protects the Genome against Mechanical Stress-Induced Damage. *Cell*, 181(4), pp 800-817 e22.
- Niediek, V., Born, S., Hampe, N., Kirchgessner, N., Merkel, R. und Hoffmann, B. 2012. Cyclic stretch induces reorientation of cells in a Src family kinase- and p130Cas-dependent manner. *Eur J Cell Biol*, 91(2), pp 118-28.
- Nishimura, Y., Shi, S., Li, Q., Bershadsky, A. D. und Viasnoff, V. 2021. Crosstalk between myosin II and formin functions in the regulation of force generation and actomyosin dynamics in stress fibers. *Cells Dev*, 168(203736).
- Noethel, B. 2018. *Mechanosensorische Prozesse zur Erkennung und Prozessierung zyklischer Dehnung während der epithelialen Differenzierung*. Dissertation Monografie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Noethel, B., Ramms, L., Dreissen, G., Hoffmann, M., Springer, R., Rubsam, 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. *Mol Biol Cell*, 29(19), pp 2317-2325.
- Ohsawa, S., Vaughen, J. und Igaki, T. 2018. Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in Epithelial Homeostasis. *Dev Cell*, 44(3), pp 284-296.
- Pannekoek, W. J., de Rooij, J. und Gloerich, M. 2019. Force transduction by cadherin adhesions in morphogenesis. *F1000Res*, 8(
- Pavlov, D., Muhrad, A., Cooper, J., Wear, M. und Reisler, E. 2007. Actin filament severing by cofilin. *J Mol Biol*, 365(5), pp 1350-8.
- PDQ-Cancer-Information-Summaries 2002. Skin Cancer Screening (PDQ(R)): Patient Version
Bethesda (MD).
- Pfisterer, K., Shaw, L. E., Symmank, D. und Weninger, W. 2021. The Extracellular Matrix in Skin Inflammation and Infection. *Front Cell Dev Biol*, 9(682414).
- Pinheiro, D. und Bellaiche, Y. 2018. Mechanical Force-Driven Adherens Junction Remodeling and Epithelial Dynamics. *Dev Cell*, 47(1), pp 3-19.

- Pollard, T. D. 2016. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8(8), pp.
- Poumay, Y., Dupont, F., Marcoux, S., Leclercq-Smekens, M., Herin, M. und Coquette, A. 2004. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res*, 296(5), pp 203-11.
- Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B. und Bershadsky, A. D. 2011. Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nat Cell Biol*, 13(12), pp 1457-65.
- Prechova, M., Adamova, Z., Schweizer, A. L., Maninova, M., Bauer, A., Kah, D., Meier-Menches, S. M., Wiche, G., Fabry, B. und Gregor, M. 2022. Plectin-mediated cytoskeletal crosstalk controls cell tension and cohesion in epithelial sheets. *J Cell Biol*, 221(3), pp.
- Priya, R. und Yap, A. S. 2015. Active tension: the role of cadherin adhesion and signaling in generating junctional contractility. *Curr Top Dev Biol*, 112(65-102).
- Püllen, R., Konrad, J., Merkel, R. und Hoffmann, B. 2021. Skin under Strain: From Epithelial Model Tissues to Adult Epithelia. *Cells*, 10(7), pp.
- Püllen, R., Konrad, J., Merkel, R. und Hoffmann, B. 2022. Cell Stretcher Assay to Analyze Mechanoresponses to Cyclic Stretching. In: Zaidel-Bar, R. (ed.) *Mechanobiology*. First edition ed. New York, NY: Humana Press.
- Pummi, K., Malminen, M., Aho, H., Karvonen, S. L., Peltonen, J. und Peltonen, S. 2001. Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 117(5), pp 1050-8.
- Purslow, P. P., Wess, T. J. und Hukins, D. W. 1998. Collagen orientation and molecular spacing during creep and stress-relaxation in soft connective tissues. *J Exp Biol*, 201(Pt 1), pp 135-42.
- Ramachandran, C. und Srinivas, S. P. 2010. Formation and disassembly of adherens and tight junctions in the corneal endothelium: regulation by actomyosin contraction. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(4), pp 2139-48.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(46), pp 18513-8.
- Rao, M. V. und Zaidel-Bar, R. 2016. Formin-mediated actin polymerization at cell-cell junctions stabilizes E-cadherin and maintains monolayer integrity during wound repair. *Mol Biol Cell*, 27(18), pp 2844-56.
- Rape, A., Guo, W. H. und Wang, Y. L. 2011. Microtubule depolymerization induces traction force increase through two distinct pathways. *J Cell Sci*, 124(Pt 24), pp 4233-40.
- Ribatti, D. 2017. A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Exp Cell Res*, 359(1), pp 17-19.
- Rikken, G., Niehues, H. und van den Bogaard, E. H. 2020. Organotypic 3D Skin Models: Human Epidermal Equivalent Cultures from Primary Keratinocytes and Immortalized Keratinocyte Cell Lines. *Methods Mol Biol*, 2154(45-61).

- Rinnerthaler, M., Streubel, M. K., Bischof, J. und Richter, K. 2015. Skin aging, gene expression and calcium. *Exp Gerontol*, 68(59-65).
- Roshanzadeh, A., Nguyen, T. T., Nguyen, K. D., Kim, D. S., Lee, B. K., Lee, D. W. und Kim, E. S. 2020. Mechanoadaptive organization of stress fiber subtypes in epithelial cells under cyclic stretches and stretch release. *Sci Rep*, 10(1), pp 18684.
- Rotsch, C. und Radmacher, M. 2000. Drug-induced changes of cytoskeletal structure and mechanics in fibroblasts: an atomic force microscopy study. *Biophys J*, 78(1), pp 520-35.
- Rübsam, M., Broussard, J. A., Wickstrom, S. A., Nekrasova, O., Green, K. J. und Niessen, C. M. 2018. Adherens Junctions and Desmosomes Coordinate Mechanics and Signaling to Orchestrate Tissue Morphogenesis and Function: An Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(11), pp.
- Rübsam, M., Mertz, A. F., Kubo, A., Marg, S., Jungst, C., Goranci-Buzhala, G., Schauss, A. C., Horsley, V., Dufresne, E. R., Moser, M., Ziegler, W., Amagai, M., Wickstrom, S. A. und Niessen, C. M. 2017. E-cadherin integrates mechanotransduction and EGFR signaling to control junctional tissue polarization and tight junction positioning. *Nat Commun*, 8(1), pp 1250.
- Russell, D., Andrews, P. D., James, J. und Lane, E. B. 2004. Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes. *J Cell Sci*, 117(Pt 22), pp 5233-43.
- Sato, M. und Ohashi, T. 2005. Biorheological views of endothelial cell responses to mechanical stimuli. *Biorheology*, 42(6), pp 421-41.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., *et al.* 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), pp 676-82.
- Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszk, J., Rodriguez, J. R., Zhou, D., Kreger, B. T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T. R. und Camargo, F. D. 2011. Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation. *Cell*, 144(5), pp 782-95.
- Schweizer, J., Bowden, P. E., Coulombe, P. A., Langbein, L., Lane, E. B., Magin, T. M., Maltais, L., Omary, M. B., Parry, D. A., Rogers, M. A. und Wright, M. W. 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol*, 174(2), pp 169-74.
- Shams, H., Soheilypour, M., Peyro, M., Moussavi-Baygi, R. und Mofrad, M. R. K. 2017. Looking "Under the Hood" of Cellular Mechanotransduction with Computational Tools: A Systems Biomechanics Approach across Multiple Scales. *ACS Biomater Sci Eng*, 3(11), pp 2712-2726.
- Shattil, S. J., Kim, C. und Ginsberg, M. H. 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4), pp 288-300.
- Shoji, K., Ohashi, K., Sampei, K., Oikawa, M. und Mizuno, K. 2012. Cytochalasin D acts as an inhibitor of the actin-cofilin interaction. *Biochem Biophys Res Commun*, 424(1), pp 52-7.

6. Literaturverzeichnis

- Simpson, C. L., Patel, D. M. und Green, K. J. 2011. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(9), pp 565-80.
- Solanas, G. und Benitah, S. A. 2013. Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(11), pp 737-48.
- Springer, R., Zielinski, A., Pleschka, C., Hoffmann, B. und Merkel, R. 2019. Unbiased pattern analysis reveals highly diverse responses of cytoskeletal systems to cyclic straining. *PLoS One*, 14(3), pp e0210570.
- Srinivasan, S., Das, S., Surve, V., Srivastava, A., Kumar, S., Jain, N., Sawant, A., Nayak, C. und Purwar, R. 2019. Blockade of ROCK inhibits migration of human primary keratinocytes and malignant epithelial skin cells by regulating actomyosin contractility. *Sci Rep*, 9(1), pp 19930.
- Steinbacher, T. und Ebnet, K. 2018. The regulation of junctional actin dynamics by cell adhesion receptors. *Histochem Cell Biol*, 150(4), pp 341-350.
- Stevenson, B. R. und Begg, D. A. 1994. Concentration-dependent effects of cytochalasin D on tight junctions and actin filaments in MDCK epithelial cells. *J Cell Sci*, 107 (Pt 3)(367-75.
- Su, W. und Kowalczyk, A. P. 2017. The VE-cadherin cytoplasmic domain undergoes proteolytic processing during endocytosis. *Mol Biol Cell*, 28(1), pp 76-84.
- Svitkina, T. M. 2020. Actin Cell Cortex: Structure and Molecular Organization. *Trends Cell Biol*, 30(7), pp 556-565.
- Swaminathan, V. und Gloerich, M. 2021. Decoding mechanical cues by molecular mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol*, 72(72-80.
- Takeichi, M. 2014. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15(6), pp 397-410.
- Totaro, A., Panciera, T. und Piccolo, S. 2018. YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nat Cell Biol*, 20(8), pp 888-899.
- Tsubouchi, K., Enosawa, S., Harada, K., Okamoto, J., Fujie, M. G. und Chiba, T. 2006. Evaluation of the relationship between the viscoelastic stress and strain of fetal rat skin as a guide for designing the structure and dynamic performance of a manipulator for fetal surgery. *Surg Today*, 36(8), pp 701-6.
- Tsuyama, S. und Takenaka, S. 1997. Relationships between cytoskeletal proteins and the toxic effects of drugs. *J Toxicol Sci*, 22(5), pp 383-95.
- Turcan, I. und Jonkman, M. F. 2015. Blistering disease: insight from the hemidesmosome and other components of the dermal-epidermal junction. *Cell Tissue Res*, 360(3), pp 545-69.
- Twiss, F. und de Rooij, J. 2013. Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling. *Cell Mol Life Sci*, 70(21), pp 4101-16.

- Ulbricht, A., Eppler, F. J., Tapia, V. E., van der Ven, P. F., Hampe, N., Hersch, N., Vakeel, P., Stadel, D., Haas, A., Saftig, P., Behrends, C., Furst, D. O., Volkmer, R., Hoffmann, B., Kolanus, W., *et al.* 2013. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr Biol*, 23(5), pp 430-5.
- Umemoto, S., Bengur, A. R. und Sellers, J. R. 1989. Effect of multiple phosphorylations of smooth muscle and cytoplasmic myosins on movement in an in vitro motility assay. *J Biol Chem*, 264(3), pp 1431-6.
- Uyeda, T. Q., Iwadate, Y., Umeki, N., Nagasaki, A. und Yumura, S. 2011. Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin II motor domain. *PLoS One*, 6(10), pp e26200.
- Varkuti, B. H., Kepiro, M., Horvath, I. A., Vegner, L., Rati, S., Zsigmond, A., Hegyi, G., Lenkei, Z., Varga, M. und Malnasi-Csizmadia, A. 2016. A highly soluble, non-phototoxic, non-fluorescent blebbistatin derivative. *Sci Rep*, 6(26141).
- Vignaud, T., Copos, C., Leterrier, C., Toro-Nahuelpan, M., Tseng, Q., Mahamid, J., Blanchoin, L., Mogilner, A., Thery, M. und Kurzawa, L. 2021. Stress fibres are embedded in a contractile cortical network. *Nat Mater*, 20(3), pp 410-420.
- Wade, R. H. 2009. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol*, 43(2), pp 177-91.
- Wakatsuki, T., Schwab, B., Thompson, N. C. und Elson, E. L. 2001. Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells. *J Cell Sci*, 114(Pt 5), pp 1025-36.
- Walko, G., Castanon, M. J. und Wiche, G. 2015. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. *Cell Tissue Res*, 360(2), pp 363-78.
- Wang, J. H., Goldschmidt-Clermont, P., Wille, J. und Yin, F. C. 2001. Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching. *J Biomech*, 34(12), pp 1563-72.
- Wang, W., Zuidema, A., Te Molder, L., Nahidiazar, L., Hoekman, L., Schmidt, T., Coppola, S. und Sonnenberg, A. 2020. Hemidesmosomes modulate force generation via focal adhesions. *J Cell Biol*, 219(2), pp.
- Watt, F. M. und Jones, P. H. 1993. Expression and function of the keratinocyte integrins. *Dev Suppl*, 185-92.
- Weber, G. F., Bjerke, M. A. und DeSimone, D. W. 2011. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J Cell Sci*, 124(Pt 8), pp 1183-93.
- Windoffer, R., Beil, M., Magin, T. M. und Leube, R. E. 2011. Cytoskeleton in motion: the dynamics of keratin intermediate filaments in epithelia. *J Cell Biol*, 194(5), pp 669-78.
- Wong, V. W., Akaishi, S., Longaker, M. T. und Gurtner, G. C. 2011. Pushing back: wound mechanotransduction in repair and regeneration. *J Invest Dermatol*, 131(11), pp 2186-96.
- Wyatt, T. P. J., Fouchard, J., Lisica, A., Khalilgharibi, N., Baum, B., Recho, P., Kabla, A. J. und Charras, G. T. 2020. Actomyosin controls planarity and folding of epithelia in response to compression. *Nat Mater*, 19(1), pp 109-117.

6. Literaturverzeichnis

- Yang, W., Sherman, V. R., Gludovatz, B., Schaible, E., Stewart, P., Ritchie, R. O. und Meyers, M. A. 2015. On the tear resistance of skin. *Nat Commun*, 6(6649).
- Yap, A. S., Duszyc, K. und Viasnoff, V. 2018. Mechanosensing and Mechanotransduction at Cell-Cell Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(8), pp.
- Yonemura, S. 2017. Actin filament association at adherens junctions. *J Med Invest*, 64(1.2), pp 14-19.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. und Geiger, B. 2007. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol*, 9(8), pp 858-67.
- Zarkoob, H., Bodduluri, S., Ponnaluri, S. V., Selby, J. C. und Sander, E. A. 2015. Substrate Stiffness Affects Human Keratinocyte Colony Formation. *Cell Mol Bioeng*, 8(1), pp 32-50.
- Zielinski, A., Linnartz, C., Pleschka, C., Dreissen, G., Springer, R., Merkel, R. und Hoffmann, B. 2018. Reorientation dynamics and structural interdependencies of actin, microtubules and intermediate filaments upon cyclic stretch application. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 75(9), pp 385-394.
- Zuidema, A., Wang, W. und Sonnenberg, A. 2020. Crosstalk between Cell Adhesion Complexes in Regulation of Mechanotransduction. *Bioessays*, 42(11), pp e2000119.

7 Danksagung

Meine Arbeit der letzten Jahre wurden von guten Menschen begleitet, die diese Dissertation ermöglicht oder zu einem guten Gelingen beigetragen haben.

Herr Prof. Dr. Rudolf Merkel möchte ich nicht nur für die generelle Möglichkeit der Promotion im Institut für biologische Informationsverarbeitung 2 (IBI-2) des Forschungszentrums Jülich danken, sondern ebenso für viele hilfreiche Diskussionen der aktuellen Versuche und geduldige Erklärungen physikalischer Zusammenhänge in einem zellbiologischen Umfeld.

Ein riesengroßer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Bernd Hoffmann. Du hast nicht nur vertrauen in meine Arbeit gezeigt und mir dabei immer eine offene Tür für Gespräche und wissenschaftliche Diskussionen gehalten, sondern in frustrierenden Tagen, Wochen und Monaten die entscheidende Motivation vermittelt, ohne die diese Arbeit vermutlich nicht entstanden wäre. Vielen Dank für die fachliche und persönliche Entwicklung, die ich machen durfte. Eine solche Betreuung während der Promotion ist absolut nicht selbstverständlich.

Ich möchte mich ebenfalls bei Herrn Prof. Dr. Jörg Höfeld für die Bereitschaft zur zeitintensiven Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Vielen Dank für den Vertrauensvorschuss in eine spannende Arbeit abseits des eigenen Themenfeldes.

Ich möchte mich auch bei den Mitgliedern des DFG Schwerpunktprogramms 1782 bedanken, die immer wieder neue Ideen und Expertise lieferten. Mein besonderer Dank gilt Dr. Matthias Rübsam (AG Niessen, Zellbiologie der Haut und Exzellenzcluster CECAD, Universität zu Köln) für Keratinozyten und Materialversorgung, anregende Gespräche und gute Musik bei spannenden Experimenten. Ich hoffe, wir kommen auch zukünftig dazu uns telefonisch über unerwartete Ergebnisse auszutauschen.

Meine Promotion war durch die globale Covid-19-Pandemie geprägt und hat nicht nur den Laboralltag erschwert, sondern auch die kollegialen Beziehungen strapaziert. Deshalb möchte ich mich bei meinen Kolleg(en)*innen des IBI-2 bedanken. Vielen Dank für den Austausch auf dem Flur, das Gespräch über Motorräder und Musik oder den ein oder anderen Kuchen in der Küche. Explizit danke ich Nils Hersch, Sven Gerlach und Georg Dreissen für die unkomplizierte Hilfe in Labor und am Computer. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Yannick Herfs für die Unterstützung bei Experimenten und Auswertungen der Zugkraftmikroskopie. Ebenfalls gebührt Jens Konrad mein Dank für die technische Unterstützung, Konstruktion und Anpassung unserer mechanobiologischen Aufbauten. Ich habe die Berührungspunkte mit der technischen

Entwicklung in einem zellbiologischen Umfeld sehr genossen und kann davon sicher in Zukunft profitieren. Selbstverständlich muss und möchte ich mich bei meinen Kollegen Lukas Lövenich und Julian Eschenbruch für die Motivation und Hilfe bedanken. Die Wochen wären ohne Aussicht auf den sicheren Dönerstag sehr grau verstrichen. Danke Julian, für die Vermittlung dieser Stelle, deine Freundschaft und Unterstützung.

Vielen Dank auch an die vielen Menschen im und außerhalb des Forschungszentrums, die in der hiesigen Kürze nicht zusätzlich namentlich erwähnt wurden, aber meine Arbeit an der ein oder anderen Stelle bereichert haben.

Zum Schluss haben auch Freunde und Familie meine Promotion begleitet. Vielen Dank an meine Eltern und Geschwister für die Unterstützung und gleichzeitige Freiheit meine Interessen zu verfolgen. Ihr habt mir den Weg geebnet und alle Chancen eröffnet. Mein herzlicher Dank richtet sich auch an meine Freundin für ihre Geduld und ihr Einfühlungsvermögen. Auch wenn die Welt von der ich manchmal gesprochen habe eine völlig unbekannte war, hast du dich als ausdauernde ZuhörerIn und Stütze erwiesen. Last but not least gilt mein besonderer Dank meinen besten Freunden Martin und Sebastian. Danke für eure jahrelange Freundschaft, vielen Ratschläge und bedingungslose Hilfsbereitschaft. Ohne Familie und Freunde wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Dafür und für alles was noch kommt werde ich euch immer dankbar sein.