

Ultrastrukturelle Analyse sowie Steuerung der Substratadhäsion kardialer Zellen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Doctor rerum naturalium)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thorsten Jonas

aus

Bonn

Bonn 2011

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel
 2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck
- Tag der Promotion: 11.05.2012
Erscheinungsjahr: 2012

Für meinen Sohn Fynn

Zusammenfassung

Fokaladhäsionen symbolisieren nicht nur einfache starre Verankerungspunkte der Zelle an das extrazelluläre Substrat, sondern sie stellen hochdynamische Multiproteinaggregate innerhalb der Zelle dar, die je nach Anforderung auf molekularer Ebene modifiziert und angepasst werden können. Über die mechanische Kopplung der Zelle an das zu Grunde liegende Substrat werden sowohl externe, als auch interne chemische und physikalische Stimuli aufgenommen, verarbeitet und weitergeleitet.

Fokaladhäsionen spielen eine essentielle Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen und auf unterschiedlichen zellulären Ebenen, die das Überleben der Zelle sichern. Dazu gehören Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung, Genexpression, Migration, Kraftaufnahme sowie die Kraftübertragung.

In den letzten Jahrzehnten wurden viele unterschiedlichen Aspekte der Fokaladhäsionen intensiv unter Verwendung vieler verschiedener Methoden, wie z. B. Immunfluoreszenz, Elektronenmikroskopie sowie biochemischer Analysenverfahren untersucht. Hierbei konnten viele Informationen über die molekulare Zusammensetzung und die Dynamik von Fokaladhäsionen gesammelt werden. Allerdings ist über die ultrastrukturelle Architektur, die diesen dynamischen Prozessen zugrunde liegt, nur wenig bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Ultraschallbehandlung der Zellen das kortikale Zytoskelett fast vollständig beseitigt werden kann. Mit dieser Kombination aus konfokaler Mikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie und deren Überlagerung, konnten die Adhäsionsstrukturen in den Zellen lokalisiert werden. Die anschließende Untersuchung dieser Bereiche ließ die Identifizierung von rundlichen Strukturen zu, die in direktem Kontakt zur Stressfaser und dem Substrat stehen.

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Herstellung und Anwendung einer neuartigen mikrostrukturierten Folie, mit deren Hilfe erstmals reproduzierbar definierte, adhäsive Flächen auf elastischen Silikonkautschuksubstraten erstellt werden können. Diese definierten adhäsiven Flächen können mit Zellen kultiviert werden, wobei der vorgegebene Raum gänzlich von den Zellen beansprucht wird und es dadurch zur

Formierung definierter Mikrokolonien kommt. Diese Technik bietet nun die Möglichkeit den Einfluss der Geometrie und der Elastizität in einem Experiment zu kombinieren und zu untersuchen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Fokaladhäsionen	12
1.2	Extrazelluläre Matrix	13
1.3	Fibronektin	14
1.4	Integrine	14
1.5	Vinculin.....	15
1.6	Stressfasern	17
1.7	Sarcomer	18
1.8	Elastische Oberflächen aus Silikonkautschuk.....	19
1.9	Substratelastizität und Zellverhalten	20
1.10	Mikro-Kontaktdruck	21
1.11	Geometrie adhäsiver Flächen	21
1.12	Zellsysteme	22
1.12.1	Kardiale Myozyten.....	22
1.12.2	Kardiale Fibroblasten – Myofibroblasten	23
1.13	Ziele der Arbeit.....	24
2	Material und Methoden.....	25
2.1	Materialien.....	25
2.1.1	Verbrauchsmaterialien.....	25
2.1.2	Verwendete Geräte.....	26
2.1.3	Chemikalien.....	27
2.1.4	Nährmedien und Lösungen	28
2.1.5	Verwendete Zelltypen	29
2.1.6	Antikörper und Farbstoffe.....	30
2.1.7	Software	30

2.2	Zellsubstrate.....	31
2.2.1	Herstellung spezieller Glassubstrate für die Elektronenmikroskopie	32
2.2.2	Herstellung elastischer Substrate aus Silikonkautschuk	33
2.3	Herstellung von mikrostrukturierten Stempeln	37
2.4	Beschichtung der Substrate	38
2.5	Zellkultur	39
2.5.1	Isolierung kardialer Myozyten und Fibroblasten aus pränatalen Rattenherzen	39
2.5.2	Passagieren von Zellen	40
2.5.3	Kryokonservierung	41
2.5.4	Kultivierung kryokonservierter Zellen	41
2.6	Mikroskopie	42
2.6.1	Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie	42
2.6.2	Rasterelektronenmikroskopie	43
2.7	Präparationsmethoden	45
2.7.1	Sekundäre Immunfluoreszenz.....	45
2.7.2	Zellpräparation für die Rasterelektronenmikroskopie	46
2.8	Kombinierte Zellpräparation für die Untersuchung von Fokaladhäsionen	51
2.8.1	Extrahierung und Fixierung	51
2.8.2	Ultraschallbehandlung der Zellen	51
2.8.3	Sekundäre Immunfluoreszenz.....	52
2.8.4	Vergrößerung der Nanogoldpartikel	54
2.9	Digitale Bildverarbeitung.....	54
2.9.1	Überlagerung von zueinander gehörenden LSM- und REM-Daten	54
3	Ergebnisse	56
3.1	Fokale Zelladhäsionen – Untersuchungen zur Ultrastruktur	56
3.1.1	Beseitigung des kortikalen Zytoskeletts -Ultraschallbehandlung der Zellen.....	56
3.1.2	Fokaladhäsionen entlang von Stressfasern	61
3.1.3	Fokaladhäsionen an den Enden von Stressfasern	76

3.1.4	Goldmarkierung von Adhäsions- assoziierten Strukturen.....	78
3.2	Erzeugung definierter Mikro-Zellkolonien auf elastischen Silikonkautschuk-Substraten	80
3.2.1	Fertigung einer mikrostrukturierten Lochmasken-Folie für die Erzeugung geometrisch definierter Zellverbände auf hochelastischen Silikonkautschuk-Substraten	80
3.2.2	Charakterisierung der mikrostrukturierten Folie	85
3.2.3	Toxizitätsanalyse der mikrostrukturierten Folien aus Epoxid-Kleber.....	87
3.2.4	Fibronektin-Beschichtung auf elastischen Silikonkautschuk-Substraten unter Verwendung einer mikrostrukturierten Folie - Erzeugung definierter Mikrokolonien.....	88
3.2.5	Geometrisch definierte Zellverbände auf verschiedenen hochelastischen Silikonkautschuk-Substraten.....	92
3.2.6	Geometrisch definierte Zellverbände auf elastischen PDMS-Substraten mit eingebetteten fluoreszierenden Kugeln.....	106
4	Diskussion	108
4.1	Fokale Zelladhäsionen – Untersuchungen zur Ultrastruktur	108
4.1.1	Die Probenpräparation und ihre Effekte.....	109
4.1.2	Ultrastrukturelle Analyse von Fokaladhäsionen entlang von Stressfasern und an Stressfaserenden.....	112
4.2	115
4.3	Erzeugung definierter Mikrokolonien auf elastischen Silikonkautschuksubstraten – die nächste Ebene der Komplexität	115
4.3.1	Herkömmliches Verfahren der Mikrostrukturierung von Zellsubstraten.....	115
4.3.2	Mikrostrukturierung elastischer Zellsubstrate	116
4.3.3	Die mikrostrukturierte Folie und ihre Eigenschaften	118
5	Ausblick.....	122
6	Abkürzungsverzeichnis.....	123
7	Literaturverzeichnis.....	126

1 Einleitung

Die Wahrnehmung der direkten Umwelt ist für eine Zelle in Bezug auf ihre Funktion von entscheidender Bedeutung. Die Adhäsion von Zellen an die sie umgebende EZM sowie die Bindung von Zellen untereinander basiert auf einem komplexen biologischen Zusammenspiel vieler verschiedener Proteine innerhalb und außerhalb der Zelle. Diese Wechselwirkungen spielen beispielsweise bei der Entstehung von Organen und Geweben während der Embryogenese eine Rolle, ermöglichen die Migration, sind beteiligt an der Wundheilung sowie der Immunantwort und sind verantwortlich für das gerichtete Wachstum von Axonen und Dendriten. Adhäsionsstrukturen stellen darüber hinaus nicht nur einfache Verankerungspunkte der Zelle an das ihr zugrunde liegende Substrat dar, sondern bilden auch eine zentrale Einheit, über die die Zelle mit der extrazellulären Umgebung wechselseitig kommuniziert. Die Umgebung kann sowohl umgebende Zellen (Zell-Zell-Adhäsionen) als auch extrazelluläre Matrix (EZM) (Zell-Matrix-Adhäsionen) darstellen.

Auf der Ebene der Zell-Matrix-Adhäsionen spielen Fokaladhäsionen (FA) eine entscheidende Rolle. Innerhalb der FAen wird die Kopplung des Zytoskeletts mit der EZM über spezifische Transmembranproteine, den Integrinen, vermittelt. Diese binden zum einen an spezifische Sequenzen der EZM und zum anderen an weitere Proteine der FAen, den Adapterproteinen innerhalb der Zelle. Die Adapterproteine stellen die direkte Verbindung zwischen den Integrinen und dem Zytoskelett her. Über die FAen vermittelte Kopplung von Zytoskelett und EZM, ist die Zelle nicht nur in der Lage fest an die Matrix zu binden, sondern auch mit Hilfe dieser Strukturen Kräfte auf sie zu übertragen (A. Bershadsky, Kozlov, & Benjamin Geiger, 2006).

Aufgrund seiner mannigfaltigen Aufgaben, stellen FAen hochdynamische Strukturen dar, deren molekularer Aufbau je nach Funktion stark variieren kann (Adams, J. C. 2000). Grundlegende Mechanismen und der generelle Aufbau von FAen sind beschrieben (Zamir, E and B. Geiger, 2001), doch sind noch viele Fragen in Bezug auf die Kopplung zwischen FAen und Aktin sowie im Aufbau von FAen unter natürlichen Bedingungen noch größtenteils ungeklärt. Im Folgenden werden daher die Grundbestandteile von FAen sowie die für diese Dissertation wichtigen Punkte näher beschrieben.

1.1 Fokaladhäsionen

Fokaladhäsionen wurden erstmals mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in kultivierten Fibroblasten, als elektronendichte Regionen der ventralen Plasmamembran beschrieben (Abercrombie, Heaysman,

& Pegrum, 1971). Diese Regionen stehen in engem Kontakt zum Substrat und haben einen Abstand von weniger als 10-15 nm zur EZM (Abercrombie & G a Dunn, 1975; Abercrombie et al., 1971; I. I. Singer, 1982a). FAen bilden die Schnittstelle zwischen dem Zellinneren und der extrazellulären Umgebung. Über FAen werden darüber hinaus Informationen aufgenommen, weitergegeben und ausgetauscht, sowie die durch das Actomyosin generierte Kraft übertragen. Diese Aufgaben werden von einer Vielzahl unterschiedlichster Proteine bewerkstelligt. Zu ihnen zählen Transmembranproteine der Integrinfamilie, Adapter- bzw. Ankerproteine, wie Vinculin (B Geiger, 1979a), Talin (Burrige & Connell, 1983), Zyxin (Y Wang, 2003) oder Paxillin (Turner, Glenney, & Burrige, 1990), Signalproteine (Kinasen und Phosphatasen) sowie Strukturproteine des Zytoskeletts (Lo, 2006; Petit & Thiery, 2000). Zurzeit weit über 156 Proteine beschrieben, die direkt bzw. indirekt mit FAen assoziiert sind. Sie stellen das sogenannte „Adhesome“ dar (Zaidel-Bar, Itzkovitz, Ma'ayan, Iyengar, & Benjamin Geiger, 2007).

FAen sind keine starren Strukturen, sondern unterliegen dynamischen Veränderungen. Diese werden zum einen durch die Wechselwirkung der Zelle mit der EZM sowie der Krafterzeugung durch den kontraktilen Apparat der Zelle ausgelöst (Goffin et al., 2006; Zamir & B Geiger, 2001a). Zum anderen kann diese Veränderung auch durch äußere Kräfteinflüsse hervorgerufen werden (Malek & Izumo, 1996).

1.2 Extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix (EZM) stellt ein hochorganisiertes Netzwerk aus unterschiedlichen Makromolekülen dar, das schon früh in der Evolution vielzelliger Organismen entstanden ist (Schütz, Skorokhod, I. M. Mu, & W. E. G. Mu, 2001). Die EZM wird von den Zellen selbst synthetisiert und sekretiert. Sie besteht zum einen aus unverzweigten Polysacchariden, den Glykosaminoglykanen, und zum anderen aus Proteinen, die gebunden an Glykosaminoglykanen, die Gruppe der Proteoglykane bilden. Ein wichtiger Vertreter der Glykosaminoglykanen ist das Hyaluronan (Hyaluronsäure), das eine zentrale Rolle in der Hydratation und Elastizität der EZM einnimmt (Vakonakis & Campbell, 2007). Wichtige Protein-Vertreter der EZM sind Kollagen, Elastin, Fibronectin, Laminin und Fibrillin (Vakonakis & Campbell, 2007). Die EZM ist keine unveränderliche und starre Struktur, die nur der Zellverankerung oder der Stabilisierung von Geweben dient, sondern stellt ein dynamisches System dar, das von den Zellen permanent modelliert und umgeformt wird.

1.3 Fibronektin

In Vertebraten ist Fibronektin (FN) ein ubiquitär verbreitetes EZM-Multidomänenprotein, das die Adhäsion der Zelle an die EZM über Integrine ermöglicht. Es wird von Zellen synthetisiert und als lösliches Dimer in die extrazelluläre Umgebung sekretiert. Dort wird es im Anschluss durch einen komplexen Prozess, der Fibrillogenese, zu einem Netzwerk aus unlöslichen FN-Fibrillen zusammengesetzt (Wierzbicka-Patynowski & Jean E Schwarzbauer, 2003). Das FN-Heterodimer ist aus zwei langen Polypeptidketten (je ca. 2500 Aminosäuren) mit je einem Molekulargewicht von ca. 230 kDa aufgebaut. Die FN-Untereinheiten sind an ihren C-terminalen Enden über zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft. Jede von ihnen besteht aus Typ-I, Typ-II und Typ-III Wiederholungsmodulen. Jeder Satz von Wiederholungsmodulen beinhaltet Bindedomänen für bestimmte FN-Liganden. Darunter sind Bindestellen für Kollagen, Heparin, Integrine und für FN selbst. Die Adhäsion einer Zelle an Fibronektin beruht auf der Interaktion zwischen der Zell-Bindedomäne des FN mit der Sequenz RGD (Arg-Gly-Asp) und einem Fibronektin-Integrinrezeptor, meist $\alpha_5\beta_1$ -Integrin (J E Schwarzbauer & Sechler, 1999).

1.4 Integrine

Integrine bilden eine große Familie von Zelloberflächenrezeptoren, die den direkten Kontakt der Zelle zur EZM vermitteln und nur im Reich der Metazoen anzutreffen sind (Hynes, 2002). Sie sind in der Lage chemische und mechanische Signale auf beiden Seiten der Membran zu übermitteln.

Integrine sind nicht-kovalent gebundene Heterodimere, die aus einer α - und einer β -Untereinheit aufgebaut sind. Jede Untereinheit besteht aus einer großen N-terminalen extrazellulären Domäne (>700 Aminosäuren), einer einzelnen transmembranen α -Helix (Typ-I-Transmembranproteine), sowie einer kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne (13-70 AS). In Säugern wurden bislang 18 α - und 8- β Untereinheiten beschrieben. Da der Bindungspartner verschiedener α - und β -Untereinheiten nicht streng festgelegt ist, konnten bisher 24 unterschiedliche Integrin-Heterodimer identifiziert werden. Jedes dieser Heterodimere ist durch ein charakteristisches Bindungsverhalten gegenüber bestimmten EZM-Molekülen ausgezeichnet (Hynes, 2002; Ziegler, Gingras, Critchley, & Emsley, 2008). Die extrazellulären Domänen der Integrin-Untereinheiten binden direkt an ihre Liganden in der EZM, wohingegen die kurzen zytoplasmatischen Domänen der Untereinheiten über Adapterproteine an das Zytoskelett gekoppelt werden.

Die häufigsten Vertreter der Integrin-Rezeptorfamilie, die in FAen und anderen EZM-Adhäsionen anzutreffen sind, sind zum einen der klassische Fibronektin-Rezeptor aus $\alpha_5\beta_1$ -Untereinheiten und der Vitronektin-Rezeptor mit der Kombination aus $\alpha\beta$ 3-Untereinheiten (Benjamin Geiger, A.

Bershadsky, Roumen Pankov, Yamada, & G, 2001). Beide Integrin-Heterodimere binden an die RGD- (Arg-Gly-Asp) Erkennungssequenz ihrer Liganden, wobei die Bindung über zweiwertige Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+}) vermittelt wird (Mould, Akiyama, & Humphries, 1995). Die Bindung von Integrinen an ihre EZM-Liganden führt zu einer Anhäufung von weiteren Integrinen innerhalb der Zellmembran. Auf der zytoplasmatischen Seite assoziieren die kurzen C-terminalen Domänen der Integrine primär mit dem FA-Protein Talin und nachfolgend mit einem Komplex weiterer Adapterproteine, die das Signal zum Aufbau von Aktinfilamenten fördert. Im Gegenzug veranlasst die Neuordnung von Aktinfilamenten zu gebündelten Fasern, den sogenannten Stressfasern, eine weitere Anhäufung von Integrinen in der Membran und erhöht dadurch die Matrix-Anbindung (Giancotti, 1999). Der beschriebene Mechanismus stellt eine wichtige Grundvoraussetzung für die hohe Dynamik von Adhäsionsstrukturen dar. Während erste Adhäsionsstrukturen noch Fokalkomplexe genannt werden, gehen diese durch ihre Reifung in FAen über (Giancotti, 1999; Zamir & B Geiger, 2001b).

1.5 Vinculin

Vinculin ist ein hochkonserviertes ubiquitär expremiertes Anheftungs- und Kopplungsprotein, das neben den Fokaladhäsionsstrukturen auch in anderen Adhäsionsstrukturen, wie etwa in Costameren von Muskelzellen, anzutreffen ist. Vinculin wurde erstmal 1979 beschrieben (B Geiger, 1979b) und stellt ein wichtiges Ankerproteine in Fokaladhäsionen dar (B Geiger, 1979a; I. I. Singer, 1982b). Vinculin besteht aus 1066 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 116 kDa (Bakolitsa et al., 2004). Erste rasterelektronenmikroskopische sowie kristallographische Untersuchungen an Vinculin zeigten, dass das Protein aus einer globulären Kopfdomäne besteht, die über eine hoch flexible prolinreiche Verbindungsregion mit einer kurzen flexiblen Schwanzdomäne verbunden ist (Winkler, Lünsdorf, & Jockusch, 1996). Vinculin enthält in allen drei Untereinheiten Bindungsstellen für viele verschiedene Bindungspartner (Ziegler, Liddington, & Critchley, 2006). Die Kopfdomäne bietet Bindungsstellen für α -Actinin, Catenin und Talin, sowie eine intramolekulare Bindungsstelle für die Vinculin-Schwanzdomäne. Die flexible Schwanzdomäne hingegen kann zusätzlich auch Bindungen mit Arp2/3 (DeMali, 2004), Paxillin, F-Actin, Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) und weiteren sauren Phospholipiden eingehen. Die die Kopf- und Schwanzdomäne verbindene prolinreiche Region bietet Bindungsstellen für VASP, Ponsin und Vinexin (Zamir & B Geiger, 2001a). Vinculin kann in zwei Konformationszuständen vorkommen. Hierbei sind sämtliche Bindungsstellen im inaktiven Zustand vermutlich aufgrund der intramolekularen Interaktion zwischen der Kopf- und Schwanzdomäne verdeckt (siehe Abb. 1.1). Ein Model besagt, dass erst durch die Interaktion von Vinculin mit einem Liganden (z. B. $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) eine Konformationsänderung erfolgen kann, bei der

die Bindung zwischen der Kopf- und Schwanzdomäne gelöst und das Molekül von einem inaktiven Zustand in einen aktiven Zustand überführt wird (DeMali, 2004). Aufgrund der Vielzahl von Bindungsstellen für viele unterschiedliche Adhäsionsproteine nimmt Vinculin eine wichtige Ausnahmestellung in FAen ein. Zellen, in denen Vinculin herunter reguliert wird, zeigen eine verringerte Adhäsion an Matrixproteine, eine erhöhte Migrationsrate und kleinere sowie eine geringere Zahl an Adhäsionsstrukturen als der Wildtyp (Coll et al., 1995; Saunders et al., 2006; T Volberg et al., 1995). Des Weiteren wird die Wichtigkeit von Vinculin durch die Tatsache untermauert, dass *Vinculin* (-/-) Embryonen der Maus sich nicht über den zehnten Tag der Embryonalentwicklung hinaus entwickeln und starke Neuralrohr- und Gehirndefekte sowie Herzfehlbildungen aufweisen (Xu, Baribault, & E. D. Adamson, 1998).

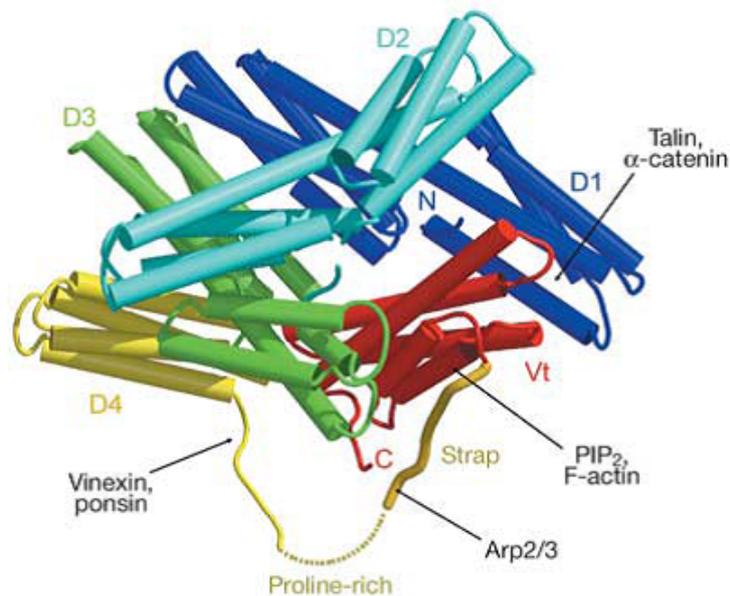


Abbildung. 1.1 Domänenstruktur von Vinculin in seiner autoinhibierten Konformation. Die verschiedenen Domänen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt. D1-D4 sind Domänen der Kopfregion, Vt steht für die Vinculin-Schwanz-Domäne. Zusätzlich sind einige wichtige Liganden-Bindungsstellen angegeben (Bakolitsa et al., 2004).

1.6 Stressfasern

Die Kräfte, die von der Zelle über die Fokaladhäsionen auf das Substrat übertragen werden, werden unter anderem durch eine komplexe und kontraktile Struktureinheit der Zelle, den sogenannten Stressfasern generiert (Kreis, Thomas E and Birchmeier, 1980). Diese Strukturen setzen sich aus Bündeln, bestehend aus 10-30 Aktinfilamenten zusammen (Cramer, Siebert, & Mitchison, 1997) und werden hauptsächlich über das Aktin-kreuzvernetzende Proteine α -Actinin (Lazarides & Burridge, 1975) untereinander gekoppelt. Neben α -Actinin konnten innerhalb von Stressfasern noch weitere kreuzvernetzende Proteine wie z. B. Fascin, Espin und Filamin nachgewiesen werden (Adams, 1995; B. Chen et al., 1999; K. Wang, Ash, & S. J. Singer, 1975). Die Einlagerung von Myosin¹-Molekülen (hier Myosin II) komplettiert den Grundaufbau der Stressfaser (Tatjana M Svitkina et al., 1989; Weber, K. and Groeschel-Stewart, 1974). Der periodische Einbau von α -Actinin-Banden im Wechsel mit Myosin-Banden (Weber, K. and Groeschel-Stewart, 1974) entlang der Stressfaser führt bei spezifischen Färbungen zu einem gestreiften Muster, wie es auch von der Sarcomerstruktur der Muskelzellen her bekannt ist. Die parallele Ausrichtung der Aktinfilamentbündel innerhalb der Stressfaser ist auf die langgestreckte Struktur von α -Actinin (Lazarides & Burridge, 1975) zurück zu führen. Dadurch wird ein relativ großer Abstand zwischen den einzelnen Filamentbündeln gewährleistet, der die Einlagerung von Myosin II unterstützt. Die Generierung der Kraft innerhalb der Stressfaser wird durch Myosin II vermittelt, das die Aktinfilamente gegeneinander verschiebt. Dabei wird eine Zugspannung innerhalb der Stressfaser aufgebaut, die dann über die Fokaladhäsionspunkte der Zelle an die extrazelluläre Matrix übertragen wird (Pellegrin & Mellor, 2007). Dabei bestimmt die Polarität der Aktinfilamente innerhalb der Stressfaser die Bewegungsrichtung der Myosin II-Motoren.

Die Entstehung von Stressfasern in verschiedenen Zelltypen² erfolgt auf unterschiedliche Art und Weise (Hotulainen & Lappalainen, 2006; Pellegrin & Mellor, 2007), allerdings können die entstandenen Stressfasern je nach ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden (Hotulainen & Lappalainen, 2006; Small et al., 1998):

- Ventrale Stressfasern
- Dorsale Stressfasern
- Transversale kreisbogenförmige Stressfasern

Ventral lokalisierte Stressfasern sind über Fokaladhäsionen mit der extrazellulären Matrix verbunden und durchspannen die Zelle nahezu auf der gesamten Länge des ventralen Substrats (Burridge, 1986).

¹ Familie von ATP abhängigen Motorproteinen.

² Migrierende und sich ausbreitende Zellen („spreading“).

Dorsale Stressfasern sind nur an einem Ende mit einer Fokaladhäsion verbunden, während sich das andere freie Ende vermutlich in Richtung der dorsalen Oberflächen der Zelle in einer „losen“ Matrix aus Aktinfilamenten verzweigt (Heath, G. A. Dunn, & Causeway, 1978).

Transversale bogenförmige Aktinbündel bilden sich bei ausbreitenden („spreading“) Fibroblasten und in migrierenden Zellen direkt hinter der Lamelle der Zelle und sind nicht an Fokaladhäsionen gebunden. Kurz nach ihrer Bildung bewegen sie sich in Richtung Zellkern, wo sie abgebaut werden (Small et al. 1998; Heath, 1983). Die drei Stressfaserklassen sind schematisch in Abb. 1.2 dargestellt.

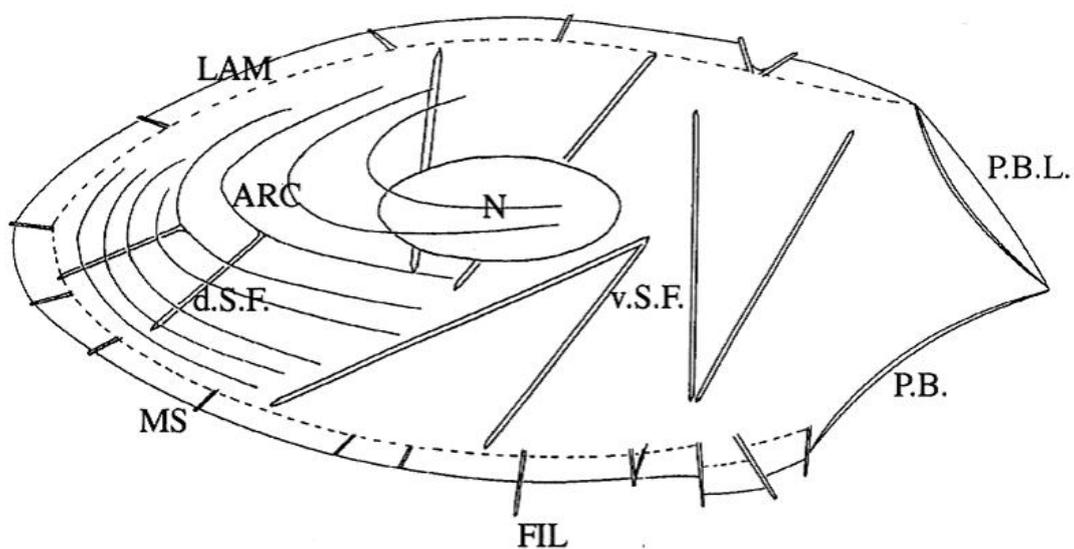


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung unterschiedlicher Aktinfilament „Subkompartimente“ innerhalb des Aktinzytoskeletts eines sich ausbreitenden Fibroblasten. LAM, Lamellipodium; MS, Mikrospitze; FIL, Filopodium; P.B., periphere Bündel; P.B.L., periphere Bündel mit Lamellipodium; v.S.F., ventrale Stressfasern; d.S.F., dorsale Stressfasern; ARC, transversale Bögen; N, Kern (entnommen aus Small, J. V. et al 1998).

1.7 Sarcomer

Actomyosin-Einheiten von Muskelzellen stellen im Vergleich zu den zuvor beschriebenen in Stressfasern eingelagerten Myosin II Molekülen von nicht-Muskelzellen, eine stabile und hochorganisierte Struktureinheit dar. Diese, als Sarcomere bezeichneten, kontraktile Grundeinheiten bilden Myofibrillen aus, die nahezu das gesamte Zellvolumen ausfüllen.

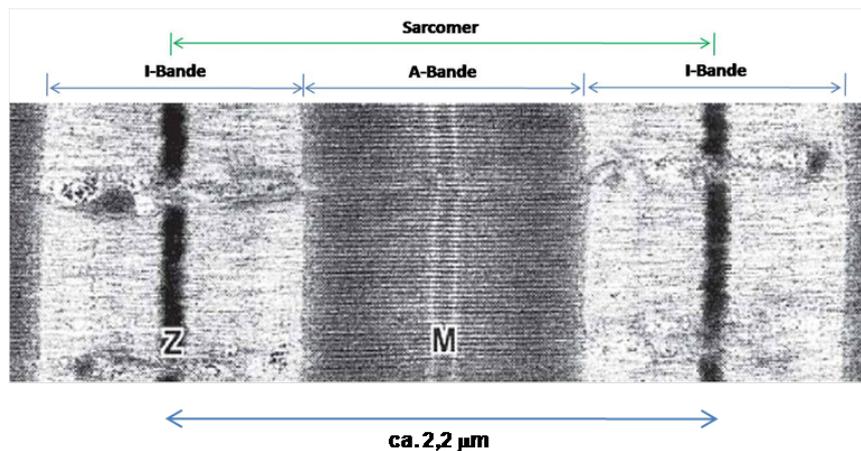


Abb. 1.3: EM-Aufnahme eines negativ kontrastierten Ultradünnschnittes einer Sarcomereinheit einer Muskelzelle. Im Bild markiert sind A-Bande: dicke Filamente aus Myosin, I-Bande: dünne Filamente aus Aktin (M) sowie die M-Bande und (Z) die Z-Bande, (Agarkova & Perriard, 2005).

Wie in der Abb. 1.3 zu erkennen ist, werden die einzelnen Sarcomereinheiten rechts und links von den sogenannten Z-Banden begrenzt. Diese sind aus einer Vielzahl von Proteinen aufgebaut und dienen den antiparallel angeordneten dünnen Aktinfilamenten und assoziierten Proteinen benachbarter Sarcomereinheiten als Verankerungspunkte. Die I-Banden bestehen hauptsächlich aus den in der Z-Scheibe verankerten Aktinfilamenten und ihren assoziierten Proteinen (z. B. Tropomyosin, Troponin-Komplex). Die Z-Scheibe bildet die Mitte der I-Bande aus. Während der Muskelkontraktion verkürzen sich die I-Banden durch Ineinandergleiten von Aktinfilamenten und Myosinfilamenten. Die A-Bande besteht aus den dicken Myosinfilamenten. In der Mitte der A-Bande liegt die M-Bande, die vermutlich für die Querverbindung der dicken Filamente verantwortlich ist (Agarkova & Perriard, 2005). Die durch Aktomyosin-Einheiten entstehende Kontraktion und die daraus resultierende Kraft, wird in Höhe der Z-Scheiben über spezialisierte, muskeltypische Adhäsionsstrukturen, genannt Costamere, an die EZM übermittelt.

1.8 Elastische Oberflächen aus Silikonkautschuk

Kreuzvernetztes Polydimethylsiloxan (PDMS) ist ein ungiftiges Elastomer, das eine optische Dichte von ca. 1.41 besitzt und sich aus zwei Komponenten hergestellt wird. Diese Komponenten stellen zum einen ein vinyl-terminiertes Polydimethylsiloxan als Grundsubstanz dar, zum anderen handelt es sich um ein Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan Copolymer als Kreuzvernetzer. Bei der Fertigung des Elastomers kommt es unter Wärmezufuhr (60°C) und eines als Katalysator wirkenden

Platinkomplexes, zu einer Vernetzung der beiden Komponenten. Der Platinkomplex vermittelt hierbei eine Hydrierung der beiden endständigen Vinylgruppen mit Hydrid Siloxan-Gruppen des Kreuzvernetzers. Das Elastizitätsmodul E kann durch unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Kreuzvernetzer und Grundsubstanz genau eingestellt werden. Kalibrationen unterschiedlicher Elastizitäten haben gezeigt, dass sich kreuzvernetztes PDMS elastisch deformieren lässt und die Deformation sich über einen großen Bereich linear verhält. Kreuzvernetztes PDMS ist unter Deformation weiterhin volumenstabil (Querdehnzahl $\sigma = 0,5$) (Claudia M Cesa et al., 2007). Da kreuzvernetzte PDMS Substrate transparent sind, in jede beliebige Form gegossen werden können und eine lange Stabilität aufweisen bieten sie ein nützliches Werkzeug für die Analyse von Zellverhalten und Zellkräften, wobei sie hier als naturnahes Substrat dienen.

1.9 Substratelastizität und Zellverhalten

Neben der chemischen Zusammensetzung der Zellumgebung, spielen auch ihre physikalischen Eigenschaften eine wichtige Rolle, So beeinflusst die Elastizität der extrazellulären Matrix sowohl die Morphologie und Proteinexpression der Zelle als auch die Differenzierung (Discher, Janmey, & Y.-L. Wang, 2005; Pelham & Y. L. Wang, 1997; Peyton & Putnam, 2005).

Jedes Gewebe im Organismus besitzt eine gewebespezifische Elastizität die zwischen den Geweben um einige Größenordnungen variieren kann. Das weichste Gewebe in Säugetieren stellt das Gehirn da, mit einer Elastizität von ca. 1 kPa (Sharp, Restrepo, & Gall, 2009). Die Elastizität von gestreiftem Muskelgewebe liegt bei ca. 10 kPa. Knochen stellen das härteste Gewebe in Säugern da, mit einer Steifigkeit von bis zu 430 MP (Goldstein, A., Wilson, D. L., Sonstegard, D. A. and Matthews, 1983; Nishikawa, Goldstein, & Nierras, 2008). In einem einfachen aber sehr eindrucksvollen Experiment wurden Mesenchymale Stammzellen (MSCs) auf unterschiedlich Steife Hydrogelen kultiviert, die die Elastizität verschiedener Gewebe simulierten (Engler et al., 2006). Stammzellen, die beispielsweise auf Substraten kultiviert wurden, die die Steifigkeit von Gehirngewebe simulierten, zeigten eine Neuronen spezifische Morphologie. Kultivierung kardialer Myozyten auf elastischen Substraten von ca. 10 kPa fördert die Ausbildung des für diese Zellen typischen gestreiften Actomyosin-Musters und führt zu der typischen Schlagfrequenz von 1 Hz. Die Zellkultivierung auf harten Substraten, wie Glas oder Plastik führt zu einem artifiziellen Zellverhalten und zu einer artifiziellen Morphologie (Cukierman, Roumen Pankov, & Stevens, 2001; Discher, Janmey, & Y.-li Wang, 2005)

1.10 Mikro-Kontaktdruck

Das Mikro-Kontaktdruck-Verfahren (engl. Micro contact printing, μ CP) stellt eine einfach anzuwendende Technik dar, mit der man komplexe Moleküle in einer definierten Musterung auf ein Substrat übertragen kann (G M Whitesides et al., 2001). Es wurde erstmalig von A. Kumar und G.M. Whitesides vorgestellt (Kumar & G.M. Whitesides, 1993).

Zunächst wird auf eine Siliziumscheibe ein Photolack aufgebracht. Über fotolithographische Techniken können verschiedene Muster in den Photolack eingebracht werden. Die Siliziumscheibe mit dem mikrostrukturierten Photolack dient dann im nächsten Schritt als Matrize für die Herstellung eines mikrostrukturierten Silikonkautschuk-Stempels. Das noch nicht kreuzvernetzte flüssige PDMS wird auf den Photolack gegeben und füllt dabei die Mikrostrukturen im Lack aus. Unter Wärmezufuhr kreuzvernetzt das PDMS und härtet aus. Anschließend wird der mikrostrukturierte Stempel von der Siliziumscheibe gelöst und die strukturierte Seite kann mit verschiedenen Molekülen beschichtet werden, die dann auf ein Substrat (Glas, Plastik) übertragen werden können.

1.11 Geometrie adhäsiver Flächen

Die unter Abschnitt 1.10 beschriebene Methode der Mikrostrukturierung von Zellsubstraten wurde in den folgenden Jahren in immer mehr Bereichen der Zellbiologie eingesetzt, um verschiedene Zellprozesse zu beleuchten. Hierbei zeigte sich, dass die Mikrostrukturierung von Zellsubstraten einen starken Einfluss auf das Verhalten von Zellen hat. Unter anderem konnten Effekte im Bereich des Ausbreitungs („spreading“)- und Adhäsionsverhaltens (Lehnert et al., 2004), der Migration (Fricke et al., 2011; Parker et al., 2002), der Apoptose (Chen et al., 1997), sowie der Proliferation und des Zellwachstums (O’Neill et al., 1986) festgestellt werden.

In der Arbeit von Chen et al. (C. S. Chen, 1997) wurde gezeigt, dass eine große Anzahl an Zellen, die auf kleinen adhäsiven Flächen kultiviert wurden, aus der Wachstumsphase in die Apoptose wechseln. Dieser Effekt konnte bei Zellen auf unstrukturierten Substraten nicht beobachtet werden. Eine weitere Verkleinerung der adhäsiven Fläche führte zu einem weiteren Anstieg von apoptotischen Zellen (C. S. Chen, 1997). Dieses Zellverhalten konnte in einer späteren Arbeit bestätigt werden (Dike et al., 1999).

Besonders deutlich wird der Effekt der Formvorgabe von adhäsiven Flächen, hervorgerufen durch die Mikrostrukturierung des Substrates in der Organisation von Sarcomerstrukturen von kardialen Myozyten (Bray, Sheehy, & Parker, 2008; N. A. Geisse, Sheehy, & Parker, 2009; Parker, Tan, Christopher S Chen, & Tung, 2008). Hier konnte gezeigt werden, dass die Größe der Myozyten auf

adhäsiven Inseln mit unterschiedlicher Form, aber gleicher Fläche, konstant bleibt. Zudem konnte gezeigt werden, dass Myozyten auf rechteckigen adhäsiven Inseln mit einem naturnahen Aspektverhältnis (Verhältnis von Länge zu Breite) die *in vivo* uniaxiale Orientierung der Myofibrillen aufweisen.

1.12 Zellsysteme

1.12.1 Kardiale Myozyten

Kardiale Myozyten gehören zu den mechanisch am stärksten arbeitenden Zellen des Körpers. Im Menschen pumpen Myozyten bis zu 7000 Liter Blut am Tag durch die Blutbahnen und sie kontrahieren mit gleichbleibender Effizienz bis zu drei Milliarden Mal und mehr während einer menschlichen Lebensspanne (Severs, 2000). Bezogen auf die Architektur des Kontraktionsapparats von Myozyten, sind diese Skelettmuskelzellen sehr ähnlich. Wie diese, sind sie durch Sarcomere gekennzeichnet, die über Costamere mit der äußeren Membran und der EZM in Kontakt stehen. Sarcomere einzelner Myofibrillen sind parallel übereinander angeordnet, so dass auch Myozyten eine quergestreifte Strukturierung aufweisen. Die Kontraktion selbst wird, ebenfalls ähnlich zu Skelettmuskelzellen, über Membrandepolarisation als Reaktion auf ein neuronales Signal hin induziert. Innerhalb der Zelle führt die Depolarisation über komplizierte, hier nicht näher beschriebene Regulationswege, zu stark erhöhten Ca^{2+} Konzentrationen, die schließlich die Kontraktion von Myosin induzieren (Rüegg, J. C. 1998). Ein großer und für die Verwendung von kardialen Myozyten als Zellsystem im Labor wichtiger Unterschied ist die Tatsache, dass Herzmuskelzellen Einzelzellen mit jeweils einem Zellkern darstellen. Dies ermöglicht, nach der Isolierung von Myozyten, Einzelzellanalysen zu verschiedensten Fragestellungen, z. B. in Bezug auf Adhäsionen und Kraftgenerierung.

Neueste Untersuchungen konnten zeigen, dass der Aufbau von Myofibrillen sowie deren Anheftung über Costamere an die äußere Zellmembran für isolierte Myozyten stark von der Elastizität sowie der Topographie der Substrate abhängt (Kajzar, C M Cesa, Kirchgeßner, B Hoffmann, & R Merkel, 2008). So werden auf harten, planaren Zellkulturoberflächen Myofibrillen über Costamere an das Substrat gebunden, zusätzlich werden die Enden der Myofibrillen über Stressfasern an FAen an die Oberfläche gekoppelt. (Claudia M Cesa et al., 2007). Mit elastischen mikrostrukturierten Silikonkautschuk-Substraten lassen sich die von der Zelle generierenden Kräfte bestimmen. Elastische, dreidimensionale Substrate hingegen erlaubten es Myozyten auch als Einzelzellen ein natürliches

Myofibrill und Adhäsionsverhalten aufzubauen. Artificielle Stressfasern sowie FAen waren nahezu nicht vorhanden (Kajzar et al., 2008).

1.12.2 Kardiale Fibroblasten – Myofibroblasten

Kardiale Fibroblasten stellen die zahlenmäßig größte Gruppe von Zellen im Muskelgewebe des Herzens (Myokardium). In gesundem Herzgewebe besteht ihre Hauptfunktion in der Produktion von EZM an die speziell Myozyten binden. Kardiale Fibroblasten stellen relativ kleine, wenig Stressfasern aufbauende, Zellen dar (R. D. Brown, Ambler, Mitchell, & Long, 2005). Liegt allerdings eine Gewebsverletzung, etwa nach einem Herzinfarkt, vor kommt es sowohl zur Versteifung des entsprechenden Bereichs (physikalisches Signal) als auch zur lokalen Ausschüttung von Cytokinen (chemisches Signal). Beide Signaltypen führen zur Aktivierung kardialer Fibroblasten. Diese werden hierdurch zur Einwanderung in den geschädigten Gewebsbereich, zur Zellteilung sowie zur Differenzierung zu Myofibroblasten angeregt (B. Hinz et al., 2007). Durch die Differenzierung kommt es zur Ausbildung starker Stressfasern sowie zum Aufbau deutlich erhöhter Zellkräfte. Gleichzeitig steigt die Sekretion von EZM Molekülen stark an. Krafterzeugung sowie die veränderte EZM versteifen das umgebende Gewebe und führen zur Erhöhung des mechanischen Stresses für umgebende Zellen im Bereich der Differenzierung (Tomasek, Giulio Gabbiani, Boris Hinz, Chaponnier, & R. a Brown, 2002). Myofibroblasten sind durch das Protein α -smooth muscle actin (α -SMA) charakterisiert, das in großer Anzahl in den Stressfasern lokalisiert ist (B. Hinz et al., 2007). Bedingt durch die erhöhte Krafterzeugung bilden Myofibroblasten auch eine bestimmte Form von FAen aus. Diese FAen sind deutlich größer als die anderer Fibroblasten (ca. 20 μ m im Vergleich zu etwa 5 μ m) und werden als „supermature“ oder „fibrillar“ focal adhesions bezeichnet (Boris Hinz, 2007).

In Kultur verläuft die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten über eine Zwischenstufe, den sogenannten Protomyofibroblasten. Aufgrund ihrer Differenzierungsfähigkeit und der Ausbildung von großen Stressfaser- und FA-Strukturen, stellen sie für die hier vorliegende Arbeit ein wichtiges Zellsystem dar.

1.13 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Ultrastruktur von Adhäsionsstrukturen mit Hilfe eines kombinierten Mikroskopieverfahrens aus konfokaler Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie untersucht, sowie die Anheftung der Adhäsionsstrukturen an das Zytoskelett von Myofibroblasten. Dazu wurde das kortikale Zytoskelett der Zelle durch eine Ultraschallbehandlung entfernt. Über die Fluoreszenzmarkierung des Fokaladhäsions Proteins Vinculin konnten zunächst die Adhäsionsbereiche in der Zelle lokalisiert werden. Diese Bereiche wurden dann anschließend im Rasterelektronenmikroskop auf ihre Ultrastruktur hin untersucht. Für die Auswertung der Bilddaten aus den konfokalen und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde ein digitales Bildbearbeitungsprogramm mittels MATLAB Software erarbeitet.

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung und Anwendung einer mikrostrukturierten Folie, mit deren Hilfe definierte adhäsive Flächen auf elastischen Silikonkautschuksubstraten erstellt werden können, auf denen Zellen in Mikrokolonien kultiviert werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller/Ort
Deckgläser 80 µm (#00), 26 x 26 mm	Menzel, Braunschweig
Deckgläser 170 µm +- 5 µm 26x26 mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
2-Komponenten-Epoxy-Kleber EPO-TEK 302-3M	Epoxy Technology, Massachusetts, USA
1-Komponenten UV-härtender Epoxy-Kleber EPO-TEK® UVO-114-Kleber	Epoxy Technology, Massachusetts, USA
Finder-Netzchen Kupfer (200 mesh) G239	Plano GmbH, Wetzlar
Fluoreszierende Kugeln, Ø 0,2 µm (Crimson F8806) 625/645	Invitrogen, Darmstadt
Glas-Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Kimtech Reinigungstücher	Kimtech Kimberly-Clark, United Kingdom
Linsenreinigungspapier 10 x 13 cm	Neolab, Heidelberg
Lochschalen Ø 3,5 cm (mit vorgebohrten 1,8 cm Löchern)	Cell E&G LLC, USA
Lochschalen Ø 3,5 cm (mit vorgebohrten 1,4 cm Löcher)	Cell E&G LLC, USA
µ-Dish Ø 3,5 cm, high	Ibidi, Martinsried
MED-6340 Firm Silicone Gel	Nusil Silicone Technology, USA
Molekularsieb 0,3 nm Perlform	Merck, Darmstadt
Objektträger, 76 x 26 mm	Thermo Scientific, Menzel, Braunschweig
Pipettenspitzen (unterschiedliche Größen)	Eppendorf, Wesseling/Belzdorf
Plastik-Pipetten 5ml	VWR, Darmstadt
Plastik-Pipetten 10 ml	VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Sylgard 184 Silicone Elastomer Kit	Dow Corning, Wiesbaden
Zellkulturschalen Ø 3,5 cm	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen Ø 6 cm	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen 15 ml	BD Bioscience, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BD Bioscience, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15 ml	VWR, Darmstadt
Zentrifugenröhrchen 50 ml	VWR, Darmstadt

2.1.2 Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller/Ort
Axiovert 40 CFL-Mikroskop	Carl Zeiss, Jena
Begasungsbrutschrank Typ B12	Heraeus, Osterode
Begasungsbrutschrank Typ 311	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts
Beschichtungseinheit MTM-20 (für Cressington 208 HR)	EO-Elektronen-Optik-Service GmbH, Dortmund
Stereomikroskop	Carl Zeiss, Jena
Cell Observer	Carl Zeiss, Jena
Kathodenzerstäubungsanlage Balzers SCD004 (Sputter Coater)	Baltec, Lichtenstein
Kathodenzerstäubungsanlage Cressington 208 HR (Sputter Coater)	EO-Elektronen-Optik-Service GmbH, Dortmund
Kritisch-Punkt-Trocknungsanlage CPD030	Baltec, Lichtenstein
Laser Scanning Microscope (LSM) 510 Meta	Carl Zeiss, Jena
Laser Scanning Microscope (LSM) 710	Carl Zeiss, Jena
Leo-1550 Rasterelektronenmikroskop (REM)	Carl Zeiss, Jena
Reinstwasseranlage (MilliQ)	Millipore, USA
Neubauer Zählkammer, Neubauer Improved	LaborOptik, Bad Homburg
Plan-Neofluar DIC 25x /0,8 Imm Objektiv	Carl Zeiss, Jena
Plan-Apochromat 63x/1,4 NA DIC Öl-Objektiv	Carl Zeiss, Jena
Schraubenmuttern, M16 (DIN 985) ca. 30g	Lager (ICS-7)

Spin-coater Delta 10 TT	Süss MicroTec Lithography GmbH, Garching
Sterilbank Hera Safe (HS12)	Heraeus, Osterode
Tischzentrifuge R219	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Sonopuls Ultraschall-Homogenisator HD 2070	
Ultraschallstab MS72 aus Titanium	Bandelin, Berlin
UV-Tisch ECX-15.M	Vilber Lourmat, Marne La Vallee, Frankreich
Vakuumpumpe RC6	Vacuubrad, Wertheim
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., USA
Wärmeschrank UE 400	Memmert, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Kühl-Zentrifuge 3-16K	Sigma-Aldrich, München

2.1.3 Chemikalien

Name	Hersteller/Ort
Kryomedium Cryo-SFM	PromoCell GmbH, Heidelberg
Desoxyribonuklease II (DNase), 10.000 Units/ml	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraessigsäure EDTA	Sigma-Aldrich, München
GoldEnhance Solution Kit	Nanoprobes, USA
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethanol, vergällt (97%)	Merck, Darmstadt
Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure EGTA	Sigma-Aldrich, München
Fetal Bovine Serum (FBS) für RPMI-Medium	Sigma-Aldrich, München
fötales Kälberserum(FKS) (FBS Superios) speziell für Myozytenmedium	Biochroma AS / Berlin
MM+	
Fibronektin (FN) human Plazenta	BD Bioscience, Heidelberg
Gelmount	Gelmount Sigma, Taufkirchen
Glukose	Sigma-Aldrich, München
Glutaraldehyd (GA) 25%	Merck, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich, München
Hanks Balanced Salt Solution Modified (HBSS)	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
ITS Liquid Media Supplement (100x):	Sigma-Aldrich, München

Insulin (1 mg/ml from bovine pancreas)	
Transferrin (0,55 mg/ml human transferrin)	
Sodiumselenit (0,5 µg/ml)	
Kalziumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver (Skim Milk Powder)	Fluka / Oberhaching
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure MES	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, München
Nutrient Mixture F 10 Ham Pulver (MM-)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd (PFA) 37%	Merck, Darmstadt
Penizillin/Streptavidin, 10.000 Units/ml	Sigma-Aldrich, München
Pluronic 127	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RPMI-1640	Sigma-Aldrich, München
Trichloro(1 <i>H</i> , 1 <i>H</i> , 2 <i>H</i> , 2 <i>H</i> -perfluorooctyl)silan (Trichlorosilane)	Sigma-Aldrich, München
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA Lösung (TE): 0,05% Trypsin, 0,2% Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München

2.1.4 Nährmedien und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Stopplösung für die Fixierung	30 mM Glycin in CB
Block-Lösung zur Antikörperverdünnung für die Immunfluoreszenz	2% Magermilchpulver in CB
Block-Lösung für die Immunfluoreszenz	5% Magermilchpulver in CB
Block-Lösung für Primärisolation	MM- und 33% FKS NaCl 150 mM MgCl ₂ 5 mM EGTA 5 mM Glukose 5 mM MES(2(N-Morpholino)-

	Ethansulfonsäure 10 mM
	pH 6,1 (HCl/NaOH)
Fixierlösung	3,7% PFA in CB
Fixierlösung für die Nachfixierung	2% GA in CB
Lösung zur Extrahierung der Zellmembran	1% Triton X-100 in CB
	Nutrient Mixture F10 Häm (N6635)
MM-	17 mmol/l NaHCO ₃
	pH 7,1 NaOH/HCL
	MM-
	10% FKS
MM+	1:200 ITS
	10.000 Units/l Penicillin
	10 mg/ml Streptomycin
	NaCl 1,37 M
	KCl 27 mM
Phosphate Buffer Saline PBS (10x) (phosphatgepufferte Salzlösung)	Na ₂ HPO ₄ 100 mM
	KH ₂ PO ₄ 17,6 mM
	pH 6,8 (HCl/NaOH)
	RPMI-1640
RPMI+	10% inaktiviertes FBS (1 h bei 60°C)
	1:100 Penizillin/Streptavidin

2.1.5 Verwendete Zelltypen

Zelltyp	Nährmedium	Quelle
Embryonale Myozyten aus der Ratte	MM+	Primäre Isolation (s. Punkt 2.4.1)
Embryonale kardiale Fibroblasten aus der Ratte	MM+	Primäre Isolation (s. Punkt 2.4.1)
3T3 Fibroblasten (Zelllinie)	RPMI-1640	Institute of Complex Systems: Bioelectronics (ICS-8)

2.1.6 Antikörper und Farbstoffe

Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Maus-anti-Vinculin, IgG1 Monoklonal, Klon hVIN-1	1:100	Sigma-Aldrich, München
Maus-anti α -Actinin	1:100	Sigma-Aldrich, München

Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Ziege-anti-Maus-Cy3 Alexa Fluor® 594	1:200	Dianova, Hamburg
FluoroNanogold™-anti-mouse Fab'	1:200	Nanoprobes, USA
Alexa Fluor® 546 goat-anti- rabbit IgG (H+L)	1:100	Invitrogen, USA
Ziege-anti-Maus IgG-Atto 633	1:1000	Sigma-Aldrich, München

Phalloidin

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Alexa-Phalloidin Alexa Fluor® 488 Phalloidin	1:100	Invitrogen, USA

2.1.7 Software

Software	Quelle
ImageJ, 1.44 bundled with 32-bit Java 1.6.0	National Institute of Health
LSM-Image Browser Version 4.2	Carl Zeiss, Jena
Matlab, Matlab Rel. 7.2-9.4	MathWorks, München
Photoshop CS4	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA

2.2 Zellsubstrate

Für die verschiedenen Experimente in dieser Arbeit wurden unterschiedliche Substrate für die Zellkultivierung verwendet. Als Basis für alle verwendeten und selbst hergestellten Substrate dienten Glasoberflächen, die entweder selbst als Zellsubstrat, oder als Trägermaterial für elastische Silikonkautschuksubstrate fungierten.

Glasoberflächen als Zellsubstrat wurden für die Elektronenmikroskopie, im Besonderen für die Untersuchung der Ultrastruktur von Fokaladhäsionen verwendet und hierfür, wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben, speziell präpariert.

Substrate aus Silikonkautschuk wurden zum einen über die Rotationsbeschichtung (Abschnitt 2.2.2 (B)) und zum anderen über ein standardisiertes Abdruckverfahren (Abschnitt 2.2.2 (A)) auf die Glasoberflächen aufgebracht und für Experimente an definierten Mikrogeweben verwendet.

Für die Kultivierung von adhärenenten Zellen und ihre anschließende mikroskopische Untersuchung auf diesen Substraten wurden besondere Beobachtungskammern angefertigt. Dabei wurden die unterschiedlichen Zellsubstrate unter den Boden von speziellen Zellkulturschalen geklebt, die ein Loch (\varnothing 18 mm) im Schalenboden besaßen. Silikonkautschuk diente hierbei als Klebstoff.

Sämtliche Glas- und Silikonkautschuksubstrate wurden mit dem EZM-Protein Fibronectin beschichtet (Abschnitt 2.4).

Die in dieser Arbeit verwendeten Objektive mit hoher numerischer Apertur sind auf eine Standarddeckglasdicke von 170 μm bei einem Brechungsindex von 1,5255 korrigiert. Daher wurden für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit Deckgläser mit einer Dicke von 170 μm \pm 5 μm (Herstellerangaben) verwendet. Aufgrund der zuvor erwähnten Deckglasdickenkorrektur der verwendeten Objektive wurde auch für die elastischen Oberflächen eine Gesamtdicke von 170 μm erzielt. Da die Elastizität des kreuzvernetzten Silikonkautschuks einen wichtigen Parameter für spätere Analysen darstellt, musste gewährleistet werden, dass diese nicht durch das als Trägermaterial dienende Glas an der Oberfläche des Elastomers beeinträchtigt wird (Merkel et al. 2007). Aus diesem Grund wurden bei der Herstellung der verschiedenen Elastomersubstrate 80 μm dicke Deckgläser verwendet, auf die eine 80 μm dicke Schicht aus Silikonkautschuk aufgebracht wurde.

2.2.1 Herstellung spezieller Glassubstrate für die Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur von fokalen Adhäsionsstrukturen sowie ihre Anbindung an das Aktinzytoskelett wurden zwei unterschiedliche Mikroskopietechniken miteinander kombiniert. Für die elektronenmikroskopische Identifizierung der gleichen Zelle aus der immunhistologischen Färbung und der damit verbundenen ultrastrukturellen Untersuchung der Fokaladhäsionen musste ein Koordinatensystem auf dem Glasboden der Probenkammer aufgebracht werden.

Die 170 µm dicken Deckgläser (26x26 mm, Marienfeld, Lauda-Königshofen) wurden zunächst mit 70% Ethanol gereinigt und anschließend in die Kathodenzerstäubungsanlage (Cressington 208 HR (Sputter Coater), EO-Elektronen-Optik-Service GmbH, Dortmund) gegeben. Ein Finder-Netzchen aus Kupfer (3,05 mm Ø, 200 mesh, Plano GmbH, Wetzlar) wurde in der Mitte der Deckgläser platziert. Um gewährleisten zu können, dass nur der Bereich des Deckglases mit dem Finder-Netzchen mit einer dünnen Metallschicht (ca. 15 nm) aus der Kathodenzerstäubung beschichtet wurde, wurde eine spezielle Abdeckung hergestellt. Als Abdeckung diente eine kleine Zellkulturschale (3,5 cm Ø) mit einem 3,4 mm großen Loch in der Mitte des Schalenbodens. Die kleine Öffnung im Schalenboden wurde dabei über dem Finder-Netzchen platziert. Ein Aufbringen der Metallschicht ohne die Abdeckung würde für eine komplette Beschichtung des Deckglases sorgen. Diese Komplettbeschichtung würde bei der späteren Verstärkung von Nanogold-Partikeln (Abschnitt 2.8.4), die kovalent an einen Sekundärintikörper gebunden sind, mit verstärkt werden und die einzelnen Goldpartikel wären nicht mehr vom Hintergrund der Probe zu unterscheiden. Nach der Beschichtung mit Platin/Palladium (Pt/Pd) wurde die Abdeckung entfernt und die Finder-Netzchen mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig von den Deckgläsern abgenommen. Diese Deckgläser wurden dann mittels Silikonkautschuk in die Probenkammern eingeklebt und anschließend mit 70% Ethanol gereinigt. Die Abb. 2.1 zeigt eine REM-Aufnahme einer Glasoberfläche mit aufgebrachtem Koordinatengitter und Zellen. Im Anschluss wurden die Glasoberflächen, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben mit Fibronectin beschichtet und Zellen auf ihnen ausgesät.

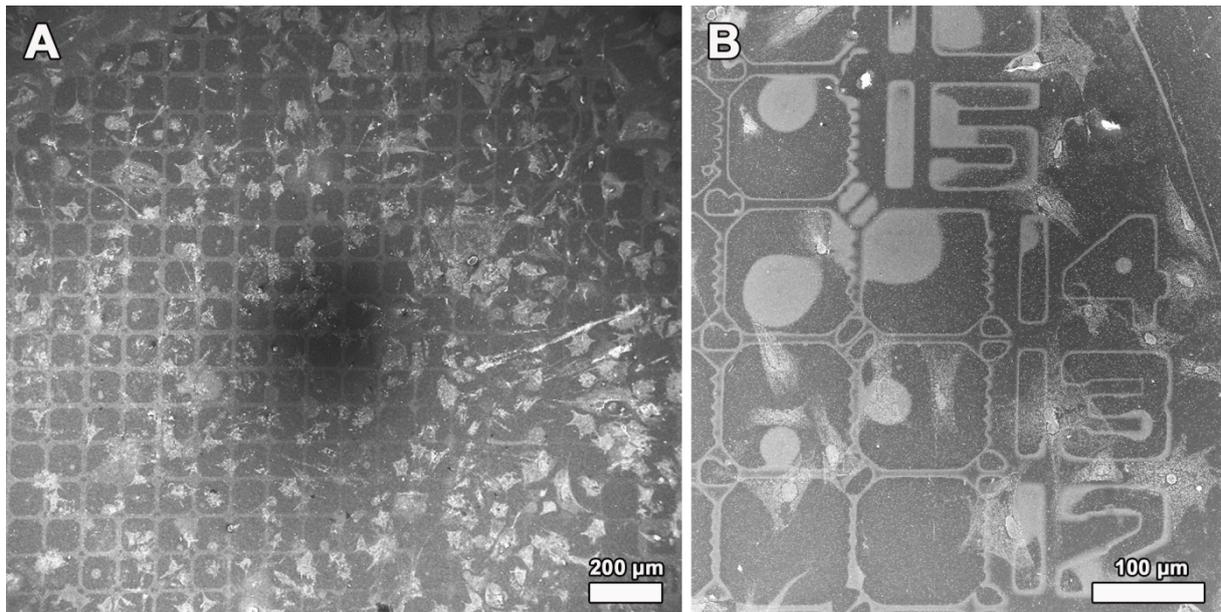


Abbildung 2.1. Glassubstrat mit Koordinatengitter. Für die Analyse der Ultrastruktur von FAen wurden Zellen auf speziell präparierten Glasoberflächen ausgesät. Ein mittels Kathodenzerstäubung aufgebrachtes Koordinatengitter erleichterte die Identifizierung und das Wiederfinden ein und derselben fokalahäsions-markierten Zelle aus der Immunfluoreszenz im Elektronenmikroskop (EM). (A) und (B) zeigen elektronenmikroskopische Aufnahmen des aufgebrachten Koordinatengitters. (A) Übersichtsaufnahme des Koordinatengitters bestehend aus Kästchen und Zahlen mit Zellen. (B) zeigt eine Vergrößerungsaufnahme des aufgebrachten Gitters. Die Zahlen und Kästchen, die ein Wiederfinden der Zellen im EM erleichtern, sind deutlich erkennbar.

2.2.2 Herstellung elastischer Substrate aus Silikonkautschuk

Die Untersuchung von Zellen im Labor findet im Allgemeinen auf „harten“ Oberflächen mit artifizialen Steifigkeiten im Bereich von Gigapascal wie Glas oder Plastik statt. Diese, für die Zelle unnatürliche Umgebung, spiegelt sich im Verhalten der Zelle sowie in ihrer Morphologie wieder (Abschnitt 1.9). Elastomere aus kreuzvernetzten Polydimethylsiloxan (PDMS) bieten aufgrund ihrer Eigenschaften die Möglichkeit der naturnahen Analyse von Zellen im Laboralltag. Die in dieser Arbeit verwendeten 2-Komponenten PDMS-Elastomere Systeme (SYLGARD 184 SILICONE ELASTOMER KIT, Dow Corning und MED-6340 KIT, Nusil Silicone Technology) bestehend aus Grundsubstanz und Kreuzvernetzer, können in unterschiedlichen Steifigkeiten hergestellt werden, sind optisch transparent und biokompatibel. Das Elastomer Sylgard 184 wurde für die Herstellung von mikrostrukturierten und unstrukturierten kreuzvernetzten Silikonkautschuksubstraten verwendet, während das Elastomer MED-6340 nur für die Herstellung von unstrukturierten Substraten genutzt wurde.

Die Reaktion der Kreuzvernetzung für Sylgard 184 ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Die Grundsubstanz beinhaltet Siloxan Oligomere mit enständigen Vinylgruppen. Der Kreuzvernetzer beinhaltet zudem kreuzvernetzende Siloxan Oligomere, die mindestens drei Silizium-Hydrid-Bindungen besitzen. Die Grundsubstanz umfasst zudem einen Platin-basierten Katalysator, der das Elastomer über eine

organometallische Vernetzungsreaktion aushärtet. Die Hydrierung der Doppelbindung am Silizium führt zu einer kovalenten Bindung zwischen den Vinylgruppen der Grundsubstanz und den Silizium-Hydriden des Kreuzvernetzers und resultiert in einer Si-CH₂-CH₂-Si Verbindung zwischen Grundsubstanz und Kreuzvernetzer. Die Vielzahl der Reaktionsstellen erlaubt die Ausbildung eines dreidimensionalen Netzwerks. Änderungen im Verhältnis von Grundsubstanz zu Kreuzvernetzer beeinflussen die Eigenschaften des Elastomers. Ein geringerer Anteil von Kreuzvernetzer im Verhältnis zur Grundsubstanz führt zu weicheren Silikonkautschuksubstraten. Ein Anstieg der Temperatur beschleunigt die kreuzvernetzende Reaktion (Lisenky et al., 1999).

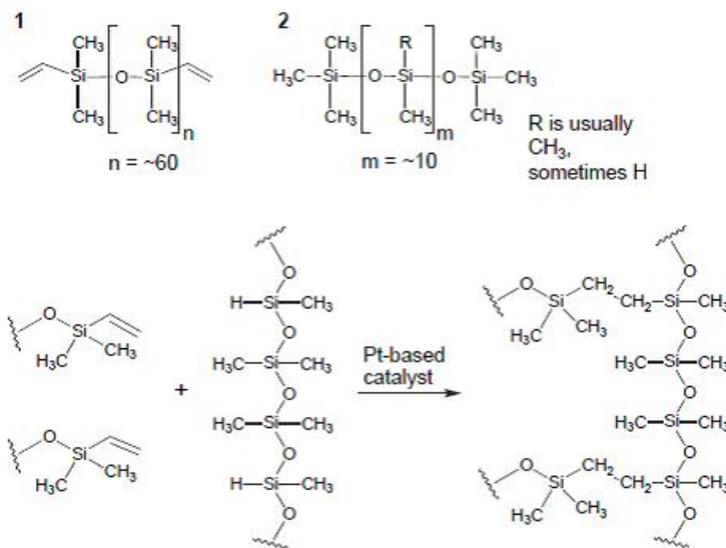


Abbildung 2.2 Reaktion der Kreuzvernetzung. (1) Der Kreuzvernetzer aus Siloxan-Oligomeren mit endständigen Ethenylgruppen. (2) Siloxan-Oligomer der Grundsubstanz mit wenigen Vinylgruppen enthält zusätzlich einen Platin-Katalysator. Werden (1) und (2) miteinander gemischt, kommt es zu einer organometallische vermittelten Kreuzvernetzung der Methyl- und Ethylengruppen. (Lisenky et al. 1999)

(A) Herstellung mikrostrukturierter elastischer Silikonkautschuksubstrate

Die Herstellung von mikrostrukturierten Silikonkautschuksubstrate basiert auf dem Protokoll von Claudia Cesa (Claudia M Cesa et al., 2007) und wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente angepasst. Die verwendeten mikrostrukturierten Siliziumscheiben dienten als Maske und wurden von Nico Hampe (ICS-7) mit standardisierter fotolithographischen Techniken hergestellt. Die Kalibrierung der hier verwendeten Silikonkautschuksubstrate wurde nach der Methode von Cesa et al. ebenfalls von Nico Hampe durchgeführt. Die Mikrostrukturierung auf den Siliziumscheiben besteht aus einem regelmäßigen Gitter aus quadratischen 2 µm breiten und 500 nm hohen Vertiefungen mit einer Gitterkonstante von 3,5 µm.

Vor Beginn der Herstellung der mikrostrukturierten Silikonkautschukoberflächen wurden die Siliziumscheiben für 10 min bei 130°C ausgeheizt. Während dieses Vorgangs wurden die Grundsubstanz und der Kreuzvernetzer in einem Verhältnis von 50:1 (entspricht ca. 15 kPa nach Vernetzung) zusammengegeben, intensiv durchmischt und mit einer Vakuumpumpe in einem Exsikkator für mindestens 20 min bei Raumtemperatur (RT) bei ca. $2 \cdot 10^{-3}$ mbar entgast. Vor dem Aufbringen der noch unvernetzten Elastomer-Mischung auf die mikrostrukturierten Siliziumscheiben, wurden diese für 15 min bei RT mit Trichloro(1H, 1H, 2H, 2H-perfluorooctyl)silan in einem Exsikkator unter einem Vakuum von $2 \cdot 10^{-3}$ mbar silanisiert. Dieser Vorgang führt zu einer Reduzierung der Haftung und erleichtert somit später das Ablösen des kreuzvernetzten Silikonkautschuks von den Siliziumscheiben. Zusätzlich zu der Mikrostruktur wurden fluoreszierende Kugeln in die oberste Schicht der Silikonkautschukoberfläche eingebracht. Hierzu wurden zunächst 10 µl der wässrigen Lösung aus fluoreszierenden Kugeln (Crimson Beads, Invitrogen) für 5 min bei $5 \cdot 10^3 \times g$ und 4°C sedimentiert. Der wässrige Überstand wurde entfernt und das Sediment aus fluoreszierenden Kugeln mit 100 µl der entgasten Elastomer-Mischung vermengt. Mit einem Plastikspatel wurde ein kleiner Teil dieser Mischung auf eine Siliziumscheibe gegeben und unter Verwendung von fusselfreien Tüchern (Kimtech Reinigungtücher, Kimtech Kimberly-Clark) in die 500 nm tiefen Löcher der Mikrostruktur eingerieben. Anschließend wurde der Überschuss der Mischung ebenfalls mit einem fusselfreien Tuch von der Siliziumscheibe entfernt. Danach wurde ein Tropfen der verbliebenen und entgasten Elastomer-Mischung ohne Kugeln auf die Siliziumscheibe gegeben. Rechts und links der Mikrostruktur wurden Bruchstücke von 80 µm dicken Deckgläsern als Abstandshalter platziert. Auf die Abstandshalter wurde ein 80 µm dickes Deckglas gegeben, dass im Anschluss von einem Objektträger überdeckt wurde. In Höhe der Abstandshalter wird der Stapel aus Siliziumscheibe, Abstandhalter, Deckglas und Objektträger mit Klammern fixiert und mechanisch zusammengedrückt. Hierbei verteilt sich die PDMS-Mischung auf der mikrostrukturierten Siliziumscheibe und wurde im Anschluss für 16 h bei 60°C ausgehärtet. Nach der Kreuzvernetzung wurde das Deckglas mit dem kreuzvernetztem Silikonkautschuk unter Verwendung von Isopropanol von der Siliziumscheibe gelöst und wie bereits beschrieben, von unten in die Probenkammern eingeklebt.

(B) Herstellung elastischer Silikonkautschuksubstrate - Rotationsbeschichtung

Für die Fertigung elastischer Zellsubstrate verschiedener Steifigkeiten ohne Mikrostrukturierung wurde die Methode der Rotationsbeschichtung (engl. spin coating) eingesetzt. Mit diesem, aus der Mikrosystemtechnik stammenden Verfahren, können dünne und gleichmäßige Schichten innerhalb kürzester Zeit auf ein Substrat (hier: Glas) aufgebracht werden. Für die Herstellung solcher Substrate wird zunächst das Trägermaterial (Glas) mittels Vakuum auf dem Drehteller des Rotationsbeschichters fixiert. Eine ausreichende Menge der Elastomerlösung wird in die Mitte des

Trägermaterials gegeben und durch Rotation gleichmäßig darauf verteilt, wie weiter unten im Detail beschrieben wird

Im Falle der Herstellung von Silikonkautschuksubstrate ohne Mikrostrukturierung wurden im ersten Schritt die gewünschten Massenverhältnisse von Grundsubstanz zu Kreuzvernetzer der beiden Elastomer-Systeme zusammengegeben, intensiv durchmischt und wie schon zuvor beschrieben entgast. Die unterschiedlichen Mischungsverhältnisse sind in den folgenden Tabellen angegeben.

Sylgard 184

Massenverhältnis (Grundsubstanz:Kreuzvernetzer)	Elastizität in kPa
50:1	15
55:1	10
70:1	2
75:1	< 2

MED-6340

Massenverhältnis (Grundsubstanz:Kreuzvernetzer)	Elastizität in kPa
1,6:1	15

Im nächsten Schritt wurden 80 µm dicke Deckgläser auf dem Drehteller des Rotationsbeschichters (spin-coater Delta 10 TT, Süss MicroTec Lithography GmbH, Garching) gegeben und über Vakuumsaugung von unten auf dem Drehteller fixiert. Einige Tropfen der jeweiligen Polymerlösung wurden in die Mitte des Deckglases gegeben und bei 2500 U/m für 20 sec (bei Sylgard® 184) bzw. 3000 U/m für 20 sec (bei MED-6340) auf dem Deckglas gleichmäßig verteilt. Die so hergestellten Silikonkautschuksubstrate wurden dann unter den Boden der Lochschalen eingeklebt. Hierbei diente die durch Rotation aufgebraachte Elastomerschicht am Deckglasrand ebenfalls als Klebstoff. Im letzten Schritt erfolgte die Aushärtung der Elastomer-Gemische für 16 h bei 60°C.

2.3 Herstellung von mikrostrukturierten Stempeln

Die hier verwendeten mikrostrukturierten Stempel dienten als Basis für die Fertigung der unter Abschnitt 3.2.1 vorgestellten und in dieser Arbeit etablierten mikrostrukturierten Folie für die Erzeugung geometrisch definierter Zellverbände auf hochelastischen Silikonkautschuk-Substraten.

Die für die Herstellung von mikrostrukturierten Stempeln benötigten Siliziumscheiben wurden von Nico Hampe (ICS-7) mit standard fotolithographischen Techniken hergestellt. Es standen vier unterschiedlich mikrostrukturierte Siliziummasken für die Stempelherstellung zur Verfügung:

Strukturmuster der Siliziumscheibe	Geometrie
Strukturmuster 1	Quadratischen und rechteckigen 25 µm hohe Vertiefungen mit Kantenlängen von 25-400 µm
Strukturmuster 2	Quadratische 25 µm hohe Vertiefungen mit Kantenlänge von 50 µm und 100 µm, sowie rechteckige 25 µm hohe Vertiefungen mit Kantenlänge von 10 x 100 µm, 20 x 100 µm, 50 x 100 µm bzw. 10 x 200 µm, 20 x 200 µm, 50 x 200 µm
Strukturmuster 3	Linien von 25 µm Tiefe mit unterschiedlicher Breite von 2, 5, 10, 20, 50 und 70 µm.
Strukturmuster 4	Linien von 25 µm Tiefe und 50 µm mit einem Abstand von 50 µm zueinander

Die Herstellung der Stempel erfolgte unter Verwendung von Sylgard 184 in einem Verhältnis von 10:1 von Grundsubstanz zu Kreuzvernetzer. Die Elastomer-Mischung wurde durchmischt und entgast (siehe oben). Die Unterseite eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes wurde in Höhe der 0,5 ml-Marke abgeschnitten, so dass man eine kleine zylinderförmige Gussform mit einem Innendurchmesser von ca. 1 cm erhielt. Die so erhaltene Gussform wurde dann mit der ursprünglichen Öffnung über der Mikrostruktur der Siliziumscheibe platziert. Die Gussform wurde mit 700 µl der entgasten Elastomer-Mischung befüllt und für 1 h bei 60°C ausgehärtet. Im Anschluss wurde der nun kreuzvernetzte Stempel aus der Form gelöst und nochmals für 2 h bei 180°C ausgehärtet. Dieser Schritt führte dazu, dass das Stempelmateriale noch härter wurde. Um gewährleisten zu können, dass sich die Stempel während der Folienherstellung leichter vom Objektträger sowie von der Folie lösen ließen, wurden sie im letzten Schritt mit Trichloro(1H, 1H, 2H, 2H-perfluorooctyl)silan bei $2 \cdot 10^{-3}$ mbar silanisiert (s. auch 2.2.2 (A)).

2.4 Beschichtung der Substrate

Alle in dieser Arbeit verwendeten Substrate aus Glas und Silikonkautschuk wurden vor der Zell-Aussaat mit Fibronectin (FN) beschichtet. Die Erstellung von geometrisch definierten adhäsiven Inseln aus FN erfolgte durch eine in dieser Arbeit etablierten mikrostrukturierten Folie, die hier als Lochmaske diente. Für die Beschichtung von 1 cm^2 der jeweiligen Oberfläche wurden $2,5 \text{ }\mu\text{g}$ FN eingesetzt. Für die Beschichtung einer Oberfläche wurden $500 \text{ }\mu\text{l}$ der FN/PBS-Lösung auf die Glasoberfläche, respektive Elastomer-Oberfläche gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Im Falle der FN-Beschichtung von elastischen Oberflächen durch die als Lochmaske dienende Folie, wurde diese zunächst auf die Silikonkautschuksubstrate aufgebracht und dann mit der Fibronectin/PBS-Lösung überdeckt. Da sich an den Ecken der geometrisch definierten Aussparungen der Folie Luftblasen bildeten, wurden die Probenkammer mit der Folie und der Beschichtung in einen Exsikkator gegeben und dort kurz unter Vakuum entgast. Danach folgte die Inkubation für 30 min bei 37°C . Im nächsten Schritt wurde die FN/PBS-Lösung entfernt und das Substrat mit der noch verbliebenen Folie kurz unter Schwenken der Probenkammer mit 2 ml PBS bei RT gewaschen. Die Pufferlösung wurde entfernt und die Folie vorsichtig vom Silikonkautschuksubstrat abgelöst und das Substrat wurde anschließend nochmals kurz mit je 1 ml PBS gewaschen. Nach diesem Waschschritt erfolgte die Passivierung der Bereiche ohne FN-Beschichtung mit 1% Pluronic 127 in deionisiertem Wasser. Pluronic 127 ist ein nicht toxisches Poloxamer, das als nicht-ionisches Tensid stark an die hydrophoben Ketten der Silikonkautschukoberfläche bindet, allerdings nicht an die hydrophilen Regionen der FN-Beschichtung (Tan et al., 2004; Raghavan et al., 2010). Durch diese zusätzliche Behandlung der Oberflächen sind die Zellen nicht in der Lage außerhalb der „adhäsiven Inseln“ aus FN an das Substrat zu binden. Für die Passivierung wurden $500 \text{ }\mu\text{l}$ der Pluronic-Lösung auf die elastischen Silikonkautschuksubstrate gegeben und für 20-30 min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wurde die Pluronic-Lösung entfernt und die Oberflächen dreimal mit je 2 ml deionisiertem Wasser gewaschen. Erst dann erfolgte die Aussaat der Zellen zwischen $7,5 \cdot 10^4$ bis $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Oberfläche.

2.5 Zellkultur

Die hier dargelegten Zellarbeiten wurden ausnahmslos unter sterilen Bedingungen unter einer dafür vorgesehenen Sterilwerkbank durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellsysteme wurden bei 37°C, 5% CO₂ Begasung und gesättigter, feuchter Atmosphäre in einem Brutschrank kultiviert. Um eine ausreichende Nährstoffversorgung der kultivierten Zellen zu gewährleisten, wurden sie alle zwei Tage mit frischem Medium versorgt. Die zelltypspezifischen Nährmedien, sowie alle verwendeten Puffer, wurden vor der Verwendung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.5.1 Isolierung kardialer Myozyten und Fibroblasten aus pränatalen Rattenherzen

Für die Gewinnung von kardialen Myozyten und Fibroblasten wurden die Herzen von 17-18 Tage alten Rattenembryonen isoliert. Die getöteten Tiere wurden im Anschluss an die Isolierung ordnungsgemäß entsorgt.

Hierzu wurde das trüchtige Muttertier (Wistar Charles River, Sulzfeld) zunächst mit CO₂ betäubt und anschließend mittels einer Guillotine dekaptiert. Unter Zuhilfenahme einer feinen Schere wurde zunächst das Bauchfell entfernt und die Bauchhöhle des Tieres vorsichtig geöffnet. Der Uterus mit den darin befindlichen Embryonen wurde entnommen und sofort auf Eis gelagert. Die daran anschließenden Arbeitsschritte wurden alle unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt.

Die Embryonen wurden zunächst einzeln dem Uterus entnommen und in kleinen, mit Hanks Balanced Salt Solution Modified (HBSS, Sigma) befüllten Zellkulturschalen (Ø 3,5 cm) dekaptiert. Unter Zuhilfenahme einer feinen Pinzette wurde der Thorax geöffnet und Herz und Lunge entnommen. Unter einem Stereomikroskop (Carl Zeiss, Jena) wurden der Herzbeutel, die Aorta und das Lungengewebe vorsichtig mit einer feinen Pinzette entfernt und die Herzen mit Vor- und Hauptkammer in 14 ml kaltes HBSS überführt. Die gesammelten Embryonenherzen wurden dann im Anschluss (Waschschritt) mittels einer Pasteurpipette in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen, gefüllt mit 14 ml frischem HBSS überführt und bis zum darauffolgenden Schritt auf Eis gelagert.

Mit Hilfe einer Pasteurpipette wurden die Herzen in eine Zellkulturschale gegeben, das überschüssige HBSS vorsichtig abgenommen und anschließend unter Zugabe von 500 µl Trypsin-EDTA (TE) und zwei steriler Skalpelle in ca. 1 mm² große Gewebestücke zerkleinert. Die Gewebestücke wurden dann in ein neues Zentrifugenröhrchen, gefüllt mit 8 ml 0,05% TE, überführt und für 8 min unter vorsichtigem Hin- und Herschwenken bei 37°C inkubiert. Während dieses Präparationsschritts sedimentierten die

Gewebestücke und wurden vom Überstand getrennt. Der Überstand wurde verworfen, weil er kaum vitale Zellen enthält, sondern nahezu ausschließlich Zelltrümmer.

Zur vollständigen Auftrennung der verbliebenden Gewebestücke wurden diese im nachfolgenden Schritt für 2 min mit 10.000 Units DNase bei Raumtemperatur (RT) sowie nachfolgend in 6 ml frischer TE-Lösung für weitere 8 min bei 37°C unter vorsichtigem Hin- und Herschwenken inkubiert.

Da der Überstand, nach der zweiten Trypsinbehandlung bereits vereinzelte Zellen enthielt, wurde dieser vorsichtig abgenommen und in ein neues 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Für die Inaktivierung des Trypsins und der damit verbundenen Inhibierung des weiteren „Zellverdaus“, wurde das 15 ml Zentrifugenröhrchen mit Blockierlösung auf 14 ml aufgefüllt und auf Eis gelagert.

Die noch verbliebenden Gewebestücke wurden erneut mit 100 µl (10.000 Units) DNase für 2 min bei RT inkubiert und anschließend ein drittes Mal in 6 ml TE im 37°C warmen Wasserbad für 8 min vorsichtig geschwenkt. Verbliebene Gewebestücke wurden entfernt und die Zellsuspension des dritten Verdauschritts mit 8 ml Blocklösung versetzt. Anschließend wurden die Zellsuspensionen des zweiten und dritten Verdauschritts für 10 min bei 200 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden in MM+ aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und die Zellzahl anschließend mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Für die weitere Kultivierung der Zellen wurden sie zu jeweils $5 \cdot 10^5$ Zellen in mittlere Zellkulturschalen ausgesät. Für die Erstellung von kleinen, geometrisch definierten Zellkolonien wurden 65.000 bis 75.000 Zellen auf die Silikonkautschuk-Substrate ausgebracht. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt. Die hier beschriebene Methode führt zu einer primären Mischkultur aus Myozyten und Fibroblasten, die in der Regel bis zu zwei Wochen kultiviert wurde. Die Isolierung von 10-14 embryonalen Herzen führte in der Regel zu einer Zellausbeute zwischen $4 \cdot 10^6$ – $6 \cdot 10^6$ Zellen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung an Fokaladhäsionen wurde an kardialen Fibroblasten durchgeführt, die mindestens fünf Tage kultiviert wurden und zu $6,5 \cdot 10^4$ Zellen auf die Glasoberflächen ausgebracht wurden.

2.5.2 Passagieren von Zellen

Zu Beginn wurden PBS, Medium und Trypsin EDTA (TE) im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die mit FN beschichteten Substrate (Silikonkautschuk oder Glas) wurden mit 2 ml MM+ aufgefüllt und bis zur Verwendung im Zellkulturschrank aufbewahrt.

Das Medium wurde von den Zellkulturschalen (Nunc, Wiesbaden, Ø 6 cm) abgenommen und die Zellen einmal kurz mit 5 ml einfach PBS gewaschen. Danach wurde 1 ml TE zu den Zellen gegeben und für 2 min bei 37°C inkubiert. Nach 2 min wurde die TE-Einwirkung durch die Zugabe von 1 ml

Medium abgestoppt. Der Inhalt der Zellkulturschale wurde in ein 15 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt und für 3 min bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment/Pellet wurde in 1 ml Medium aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. 10 µl der Zellsuspension wurden in die Neubauer-Zählkammer gegeben und die Gesamtzellzahl bestimmt. Im Anschluss wurde die gewünschte Anzahl von Zellen (zwischen $4 \cdot 10^4$ - $6,5 \cdot 10^4$ Zellen auf Glas und $7,5 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ Zellen auf Elastomer-Substraten) auf die zuvor vorbereiteten und beschichteten Substraten ausgesät.

2.5.3 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff (-196°C), dient der strukturerhaltenen, kontaminationsfreien sowie mutationfreien Langzeitaufbewahrung von Zellen (Zelllinien bzw. Zellen aus Primärisolationen).

Das Einfrieren der Zellen erfolgt in einem speziellen, chemisch definierten und serumfreien Kryo-Medium (Cryo-SFM, PromoCell GmbH, Heidelberg). Die kryoprotektive Hauptkomponente des Kryo-Mediums besteht aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und schützt die Zellen während des Vorgangs der Kryokonservierung vor Schädigungen durch Wasserkristallisation (Mazur, 1970).

Die zur Kryokonservierung vorgesehenen Zellen sollten sich in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befinden, damit die Zellen nach dem Auftauen zu einem späteren Zeitpunkt schnell wieder in einen proliferierenden Zustand übergehen.

Die Zellen wurden zunächst trypsiniert und im Anschluss für 6 min bei 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet vorsichtig in Einfriermedium aufgenommen und resuspendiert. Die Zellkonzentration wurde auf $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml eingestellt und dann zu je 200.000 Zellen/Kryoröhrchen überführt. Zunächst wurden die Kryoröhrchen in ein mit Isopropanol gefülltes Einfriermodul gegeben. Isopropanol sorgt für eine gleichmäßige Abkühlung der Zellen von $1^\circ\text{C}/\text{min}$. Anschließend wurde das Einfriermodul über Nacht bei -80°C gelagert und am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen mit den Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

2.5.4 Kultivierung kryokonservierter Zellen

Vor Beginn des Auftauvorgangs der kryokonservierten Zellen wurden die entsprechenden Kulturmedien im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Probe wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und schnell im Wasserbad aufgetaut, in das vorgelegte Medium überführt und zweimal vorsichtig resuspendiert. Dieser Schritt dient der Verdünnung des zelltoxischen DMSO, das dem

Einfriermedium zugesetzt wurde. Die frisch aufgetauten Zellen wurden nun für 5 min bei 200xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das nach der Zentrifugation resultierende Zellsediment wurde im vorgewärmten (37°C) zellspezifischen Medium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung in eine Gewebekulturschale überführt.

2.6 Mikroskopie

2.6.1 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

In einem konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (LSM) werden die zu untersuchenden Proben punktweise bestrahlt und punktweise gemessen (Smith, 2008). Die Besonderheit an einem konfokalen LSM ist seine konfokale Lochblende. Diese ist in einer zur Zwischenbildebene und dadurch zur Objektebene des Mikroskops konjugierten Ebene angeordnet. Durch diese konfokale Blende kann nur Licht detektiert werden, welches diese Blende auch passiert. Licht außerhalb der konfokalen Blende wird vom Detektor nicht detektiert. Hierdurch wird die Detektion von Streulicht vermieden. Dies wiederum führt zu einer Erhöhung des Kontrasts. Der Durchmesser der Lochblende entscheidet hierbei über die Größe des Bereichs aus der Licht von der Probe auf den Detektor treffen kann (optische Schichtdicke). Die Proben werden mittels eines fokussierten Laserstrahls über zwei Scanner in x- und y-Richtung „abgerastert“. Die Zellen auf den Glas- und Silikonkautschuk-Substraten wurden mit Hilfe eines inversen konfokalen Laser-Raster-Mikroskops (LSM 510 Meta bzw. LSM 710 Meta, Carl Zeiss, Jena) analysiert. Für die Mikroskopie der Zellen auf den Glassubstraten wurde das Objektiv Plan-Apochromat 63x 1,4 NA Öl-Immersion (Zeiss, Jena) genutzt. Dieses und das Plan-Neofluar 25x/0,8 Imm.-Objektiv wurden für die Untersuchung von Zellen auf elastischen Silikonkautschuk-Substraten verwendet. Für die Untersuchung der Proben wurden ein Argon-Laser (488 nm) und ein He/Ne1 Laser (543 nm) verwendet. Immunfluoreszenzaufnahmen mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden nacheinander („Multitrack-Modus“) aufgenommen. Dieser Modus reduziert ein Signalübersprechen („crosstalk“) von verschiedenen Farbstoffen, da einmal nacheinander die Anregung bei 488 nm bzw. 543 nm erfolgt und Filtersätze optimal angepasst werden können. Dabei diente als Hauptfarbteiler der HFT 488/543. Als NebenfARBteiler (NFT) für eine Anregung mit 488 nm wurde ein Umlenkspiegel verwendet, während für eine Anregung mit 543 nm kein NFT verwendet wurde. Für die 488 nm Argon-Laserlinie wurde ein Bandpassfilter BP 505-530 und für die 543 nm Ne/He-Laserlinie ein Langpassfilter LP 560 genutzt. Um ein Ausbleichen der Proben zu verhindern, wurden die Laserleistungen gering gehalten.

2.6.2 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop ist ein vielseitig einsetzbares elektronenoptisches Instrument für die Analyse und Vergrößerung von Oberflächenstrukturen (Topographie). Gegenüber dem Lichtmikroskop verfügt das REM über eine 100fach größere Tiefenschärfe, was für die topographischen Untersuchungen von Proben ein großer Vorteil ist. Das Auflösungsvermögen ist im REM abhängig vom Elektronenstrahldurchmesser. Je kleiner sein Durchmesser, umso besser können zwei benachbarte Strukturen optisch klar voneinander getrennt werden. Aufgrund der großen Tiefenschärfe können mit dem REM auch sehr raue Oberflächen abgebildet werden.

Prinzip

In einem evakuierten System werden durch Glühemission Elektronen aus einem Wolframdraht (Kathode) herausgelöst. Diese Elektronen werden mit Hilfe eines starken elektromagnetischen Feldes (Anode) auf die Probe hin beschleunigt. Der Elektronenstrahl wird durch elektromagnetische Linsen auf einen Durchmesser von bis zu 3 nm verkleinert. Dieser Primärelektronenstrahl wird durch ein Ablenkspulsystem zeilenförmig über die Probe geführt (Rastern). Hierbei bestimmt die Größe des abgerasterten Bereichs die Vergrößerung. Trifft der Primärelektronenstrahl auf die Probe, kommt es insbesondere zur Freisetzung von Rückstreuелеktronen (RE) und Sekundärelektronen (SE) an der Probenoberfläche. Die Sekundärelektronen besitzen eine geringere Energie (< 50 eV) als die erzeugten Rückstreuелеktronen (> 50 eV).

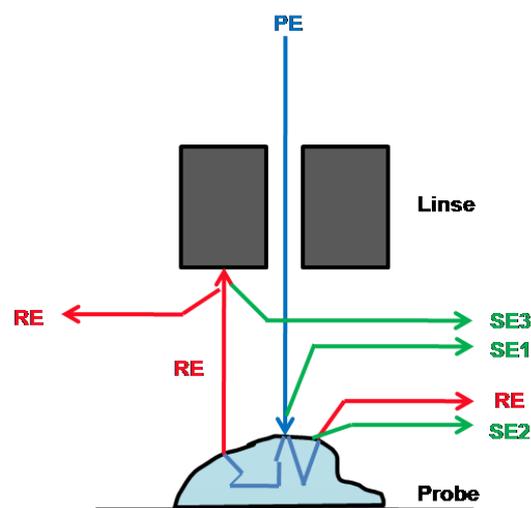


Abbildung 2.3. Schematische Darstellung der Erzeugung von Wechselwirkungsprodukten durch den Primärelektronenstrahl in einem Elektronenmikroskop. Primärelektronenstrahl (PE), Rückstreuелеktronen (RE), Sekundärelektronen verschiedener Gruppen (SE1, SE2 und SE3).

Die Entstehung der Sekundärelektronen ist das Resultat inelastischer Streuung der Primärelektronen an den Atomkernen bzw. an den Elektronenhüllen des Probenmaterials. Die drei Arten von Sekundärelektronen sind in der Abb. 2.3 gezeigt. Diese Einteilung ist abhängig von ihrem

Entstehungsort und dem Austrittsbereich aus der Probe. Sekundärelektronen der Gruppe 1 (SE1) entstehen unmittelbar in dem Bereich der Probe, die vom Primärelektronenstrahl (PE) getroffen wird. Die Gruppe 2 der Sekundärelektronen (SE2) entsteht durch Mehrfachstreuung im Probenmaterial. Sie verlassen die Probe in einem größeren Abstand zum Eintrittsbereich des Primärelektronenstrahls. Die in der Abb. 2.3 aufgeführten Sekundärelektronen der Gruppe 3 (SE3) werden durch Rückstreuetelektronen gebildet, die z.B. auf Bauteile der Vakuumkammer treffen. Sie spielen für die eigentliche Bildinformation keine Rolle, da sie in sehr großem Abstand zum Eintrittsbereich des Primärelektronenstrahls entstehen. Dennoch sorgen sie für eine Auflösungsver schlechterung durch Hintergrundrauschen. Rückstreuetelektronen entstehen durch elastische Streuung in einem deutlich tieferen Bereich der Probe und tragen so zu einer Tiefeninformation der Probe bei. Die Rückstreu- und Sekundärelektronen werden über einen Szintillator-Photomultiplier-System zunächst in ein optisches Signal und im Anschluss daran wieder zu einem elektrischen Signal verarbeitet. Über dieses verstärkte Signal wird der Kontrast sowie die Helligkeit einer Bildröhre gesteuert, deren Schreibstrahl synchron zum Primärelektronenstrahl abgelenkt wird (Bildentstehung am Monitor).

Die präparierten Zellen auf Glasoberflächen wurden mit Hilfe eines REM (LEO 1550, Zeiss, Jena) analysiert. Die Proben wurden in einem Arbeitsabstand von ca. 3 mm zur Feldemissionskathode positioniert und mit einer Beschleunigungsspannung von 2-10 kV untersucht. Für die Detektion der Sekundärelektronen bei geneigtem Probenstück wurde ein SE2-Detektor verwendet. Bei der Detektion der Sekundärelektronen, bei denen keine Neigung des Probenstückes vorlag, wurde der InLens-Detektor verwendet. Der InLens-Detektor ist besonders geeignet für Bildaufnahmen bei niedrigen Beschleunigungsspannungen und einem geringen Arbeitsabstand zur Probe (s.o.). Aufgrund seiner Positionierung innerhalb des Strahlengangs, ist er in der Lage mit hoher Effizienz Sekundärelektronen der Gruppe 1 (SE1) zu detektieren. Diese Elektronen entstehen im unmittelbaren Zentrum des Elektronenstrahls. Des Weiteren erhält man über diesen Detektor hauptsächlich Informationen über die Oberfläche des jeweiligen Probenobjekts, da er fast keine Rückstreuetelektronen (RE) oder Sekundärelektronen der Gruppen 2 und 3 detektiert. Die beiden zuletzt genannten Elektronengruppen können allerdings bei einem größeren Arbeitsabstand vom SE2-Detektor detektiert werden. Die Abb. 2.4 zeigt den schematischen Aufbau der Probenkammer des hier verwendeten Rasterelektronenmikroskops.

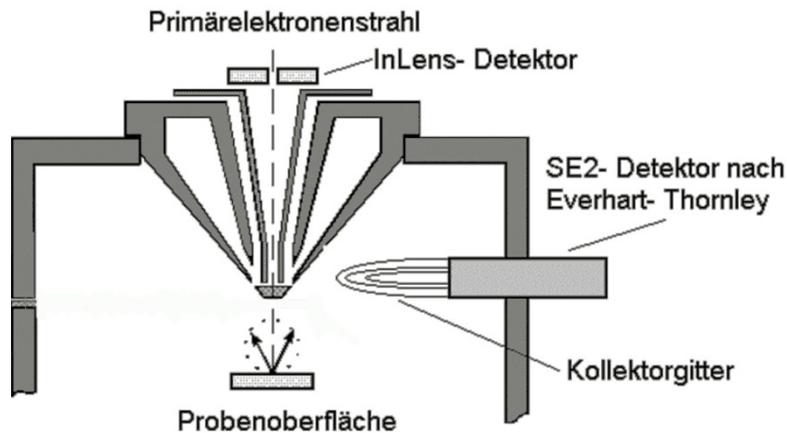


Abbildung 2.4. Schematischer Aufbau der Probenkammer des LEO1550 REM. [Abbildung aus dem Handbuch zur Softwaresteuerung des LEO 1550, verändert]

2.7 Präparationsmethoden

Vor Beginn der in diesem Abschnitt beschriebenen Präparationsmethoden, wurde zunächst die benötigte Pufferlösung (Zytoskelettpuffer (CB)), das Detergenz (1% Triton-X-100 in CB), sowie das Fixans (3,7% Paraformaldehyd (PFA) in CB, bzw. 2% Glutaraldehyd (GA) in CB) im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Der hier verwendete Puffer sorgt aufgrund seiner Zusammensetzung dafür, dass gerade das Zytoskelett der Zellen während der Präparationen stabilisiert wird. Der Puffer beinhaltet einen Chelatkomplex, der dafür sorgt, dass ein Großteil des endogenen Kalziums „weggefangen“ wird, um den Abbau des Aktinzytoskeletts im Speziellen durch Kalzium aktivierte und Aktin depolymerisierende Proteine (z. B. Gelsolin, (T D Pollard, 1986)) zu minimieren. Magnesiumchlorid und ein pH unterhalb des neutralen pH, sorgen für eine zusätzliche Stabilisierung des Zytoskeletts und der assoziierten Proteine (Small, 1988).

2.7.1 Sekundäre Immunfluoreszenz

Zellen auf Glas- und Silikonkautschuksubstraten (Sylgard 184 und MED-6340) wurden mit Hilfe der sekundären Immunfluoreszenz für die spätere Analyse am konfokalen LSM angefärbt. Über spezifische Antikörper-Bindungen sowie die Bindung von fluoreszenz- markierten Phalloidintoxinen konnten Proteine innerhalb der Zellen angefärbt und sichtbar gemacht werden. Zellen, die auf Silikonkautschukoberflächen mit gefärbten adhäsiven Inseln, bzw. mit fluoreszierenden Kugeln und ungefärbten adhäsiven Inseln kultiviert wurden, erhielten nur eine Färbungen des Aktinzytoskeletts unter der Verwendung der Fluorophor gekoppelten Phalloidintoxine.

Zu Beginn der Präparation wurden die Zellen zunächst unter vorsichtigem Schwenken der Beobachtungskammer zweimal mit je 2 ml CB gewaschen, um Medium- sowie Zellreste zu beseitigen. Im Anschluss an erfolgte die Fixierung der Zellen mit dem Fixanz. Dazu wurden die Zellen mit 500 µl 3,7% PFA in CB für 30 min bei 37°C im Brutschrank. Die Fixierung der Zellen wurde durch die Entfernung des Fixanz und dem anschließenden Waschschrift für 5 min mit 2 ml 30 mM Glycin in CB bei Raumtemperatur (RT) abgestoppt. Nach der Fixierung erfolgte die Extrahierung der Zellmembran. Im weiteren Verlauf der Präparation der Zellen ermöglichte die Entfernung der Zellmembran den jeweils verwendeten Antikörpern und Phalloidintoxinen an ihre Zielproteine innerhalb der Zelle zu binden. Hierzu wurden die Zellen für 5 min bei 37°C mit 500 µl 1% Triton X-100 in CB behandelt und anschließend zweimal, unter vorsichtigem Schwenken der Probe, mit je 2 ml CB gewaschen. Vor der Inkubation der Zellen mit dem primären bzw. sekundären Antikörper, wurden diese zunächst mit 300 µl 5% Milchpulver in CB für 35 min bei 37°C inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Die Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen primären Antikörper erfolgte für 1 Stunde bei 37°C. Hierbei wurde der Antikörper in einem Verhältnis von 1:100 in 100 µl 2% Magermilchpulver in CB aufgenommen. Anschließend wurde die Primärantikörper-Lösung entfernt und die Zellen dreimal mit je 1 ml Block-Lösung (5% Magermilchpulver in CB) bei RT gewaschen. Die Inkubation mit dem jeweiligen Fluorophor gekoppelten Sekundärantikörper, erfolgte ebenfalls für 1h bei 37°C. Der Zweitantikörper wurde in einem Verhältnis von 1:200 in 100 µl 2% Magermilchpulver in CB aufgenommen. Für die Visualisierung des Aktinzytoskeletts der Zellen, wurde gleichzeitig fluoreszenzmarkiertes Phalloidintoxin in einem Verhältnis von 1:100 in den Ansatz gegeben. Im Anschluß wurde die Sekundärantikörper-Lösung von der Probe entfernt und zweimal mit je 2 ml CB bei RT für 5 min gewaschen. Anschließend wurde die Probe analysiert bzw. bis zur Verwendung bei 4°C in einer Dunkelbox gelagert.

Zellen auf Silikonkautschuk-Substraten mit gefärbten adhäsiven geometrischen Inseln bzw. mit fluoreszierenden Kugeln und ungefärbten geometrischen adhäsiven Inseln, wurden nur mit Alexa Phalloidin angefärbt. Hierzu wurden die Zellen nach der oben beschriebenen Fixierung und Membranextraktion mit 1:100 Alexa Phalloidin in 100 µl CB für 35 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden im Anschluss mit je 2 ml CB gewaschen und dann analysiert.

2.7.2 Zellpräparation für die Rasterelektronenmikroskopie

Die Visualisierung von biologischen Proben im Vakuum eines Elektronenmikroskops setzt besondere Präparationsschritte voraus. Hierbei spielen die Entwässerung und die Trocknung der Proben eine entscheidende Rolle. Ohne die vorhergehende Entwässerung würden biologische Probe im Vakuum des Elektronenmikroskops durch die explosionsartige Verdampfung des Wassers zerstört werden.

Die Luft-Trocknung von biologischen Proben führt, aufgrund der starken Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit, zu verschiedenen Effekten, wie z.B. der Schrumpfung der Probe oder ihrer Kollabierung, was zu einem Abflachen der Probe führen kann (Anderson, 1982). Um solche Trocknungsartefakte weitestgehend zu verhindern wurden in dieser Arbeit spezielle Trocknungsmethoden eingesetzt, die die Oberflächenspannung an der Grenzfläche von Flüssigkeit und Luft schwinden lassen. Neben der Gefriertrocknung wird auch die hier angewandte Kritisch-Punkt-Trocknung für die Trocknung biologischer Proben verwendet

Extrahierung und Fixierung der Zellen

Anders als in der Präparation für die sekundäre Immunfluoreszenz, wurde für die rasterelektronenmikroskopische Probenpräparation zunächst die Zellmembranen entfernt und darauf folgend die Fixierung der Zellen vorgenommen. Diese Abfolge von Präparationsschritten war notwendig, um am Ende ein membranbefreites Zytoskelett im REM zu erhalten.

Die Zellen wurden zunächst vorsichtig zweimal mit je 2 ml CB gewaschen und nachfolgend mit 500 µl 1% Triton in CB für 5 min bei 37°C inkubiert. Das Detergenz wurde entfernt und die Zellen zweimal kurz (vorsichtiges Schwenken der Probenkammer) mit je 1 ml CB gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 30 min bei 37°C mit 500 µl GA in CB. Das Fixierungsmittel wurde abgenommen und die Zellen zweimal für je 5 min mit 2 ml 30 mM Glycin in CB bei RT gewaschen. Im nächsten Schritt wurde die Zellprobe für die Entwässerung in eine aufsteigende Ethanolreihe eingesetzt und ist im Folgenden beschrieben.

Ethanol Reihe – Dehydrierung der Zellen

Die Dehydrierung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer ansteigenden Ethanol-Reihe, für die im Vorfeld der Präparation je 500 ml der entsprechenden Ethanol-Konzentrationen (10, 30, 50, 70 und 90% Ethanol) angesetzt wurden. Die Probenaufbewahrung während der Dehydrierung erfolgte in einem speziellen quadratischen und von Svitkina und Borisy (T M Svitkina & Borisy, 1998) vorgestellten Probenhalter mit Deckel (Abb. 2.5) der von Herrn Fleischhauer am ICS-7 hergestellt wurde. Der hier gezeigte Probenhalter ist für 26 x 26 mm Deckgläser ausgelegt.

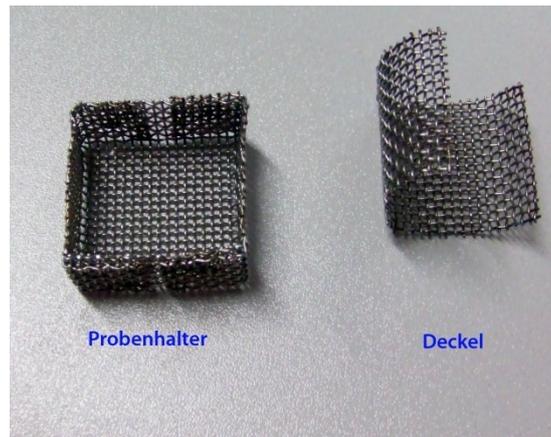


Abbildung 2.5 Probenhalter für die Dehydrierung und Kritisch-Punkt-Trocknung.

Die Deckgläser mit aufgebrachtem Koordinatengitter mussten zunächst aus den Probenkammern mit Hilfe eines erhitzten Skalpells herausgeschnitten werden. Um dabei ein Austrocknen der Proben zu verhindern wurde der CB-Puffer abgenommen und das Deckgläschen mit entsprechend zurechtgeschnittenem, feuchtem Reinigungspapier für optische Gläser (Neolap, Heidelberg) abgedeckt. Das Deckglas wurde in den in Abb. 2.6 gezeigten Probenhalter für die Dehydrierung und die Kritisch-Punkt-Trocknungs-Anlage gelegt und sofort in ein mit 50 ml 10% Ethanol befüllten Becherglas überführt. Runde Deckgläschen, die in 6-well Schalen inkubiert wurden, wurden nach der Fixierung ebenfalls mit entsprechend zurechtgeschnittenem, feuchtem Reinigungspapier für optische Gläser abgedeckt und aus den 6-well Schalen direkt in den Probenhalter überführt (Abb. 2.6).

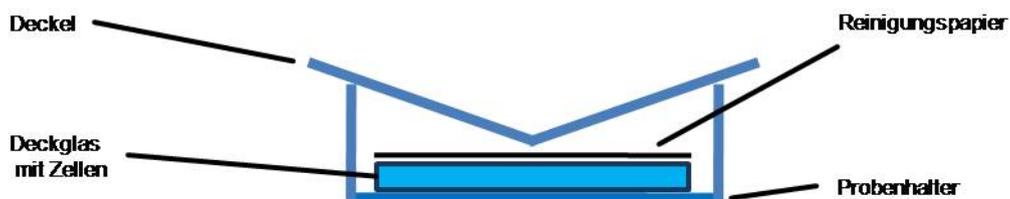


Abb.2.6. Skizze des Probenhalters für die Kritisch-Punkt-Trocknung. Die Abbildung zeigt die Anordnung des Probendeckglases und des Reinigungspapiers (Schutz vor dem Austrocknen der Probe). (Nach Svikina, T. M. und G. G. Borisy, 1998)

Die Probe wurde für jeweils 10 min in 10, 30, 50, 70, 90% und 99% Ethanol entwässert, gefolgt von zwei weiteren Dehydrierungsschritten für jeweils 10 min in 40 ml absolutem Ethanol auf Molekularsieb.. Im Anschluss an die Ethanol-Reihe erfolgte die „Kritisch-Punkt-Trocknung“.

Probentrocknung für die Elektronenmikroskopie – Kritisch Punkt-Trocknung (KPT)

Die Trocknung einer biologischen Probe an Luft würde aufgrund der Oberflächenspannung an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Luft zu ihrer Zerstörung führen. Um diesen Effekt zu reduzieren, nutzt man für die Trocknung biologischer Proben, neben der Gefriertrocknung, die Kritisch-Punkt-Trocknung.

Jede Flüssigkeit besitzt einen kritischen Punkt, der durch die Parameter kritische Temperatur (T_{krit}) und kritischer Druck (p_{krit}) bestimmt wird. An diesem Punkt existieren bei gleicher Dichte Gas und Flüssigkeit gleichwertig nebeneinander und die zu trocknende Probe wird keiner zerstörerischen Oberflächenspannung ausgesetzt.

Entscheidend für die Kritisch-Punkt-Trocknung (KPT) ist, dass die kritische Temperatur in der Nähe der Raumtemperatur und der kritische Druck möglichst niedrig liegen sollen. Wasser besitzt eine kritische Temperatur von 374,1°C und einen kritischen Druck von 217,5 bar. Diese extremen Parameter würden eine biologische Probe zerstören und ein hoher technischer Aufwand müsste betrieben werden. Daher wird das Wasser zunächst in der Ethanol-Reihe durch das geeignete Austauschmedium Ethanol ersetzt. In der KPT-Anlage wird dann das Austauschmedium gegen das Trocknungsmedium CO_2 ausgetauscht. CO_2 eignet sich deshalb als Trocknungsmedium, da es eine kritische Temperatur von 31°C und einen kritischen Druck von 73,8 bar besitzt.

Zellproben wurden mit dem Probenhalter (Abb. 2.5) in die Druckkammer der Kritisch-Punkt-Trocknungsanlage (CPD030, Baltec) überführt. Die Kammer wurde mit Ethanol absolut (auf Molekularsieb) befüllt, bis die Probe in dem Probenhalter, vollständig mit Ethanol überdeckt war. Die Kammer wurde verschlossen und auf 8°C heruntergekühlt. Im Anschluss wurde das in der Kammer befindliche Ethanol in Zehn Schritten gegen das Trocknungsmedium CO_2 ausgetauscht. Hierbei wurde zunächst im ersten Schritt die Kammer vollständig mit flüssigen CO_2 aufgefüllt. Ein Rührfisch im unteren Bereich der Druckkammer sorgte während der ganzen Behandlung dafür, dass sich das Dehydrierungsmedium und das Trocknungsmedium miteinander vermischen konnten. Nach zehn Minuten wurde das Gemisch in der Kammer so weit abgelassen, dass die Proben gerade noch mit Flüssigkeit bedeckt waren. Die Kammer wurde erneut mit flüssigem CO_2 aufgefüllt und der Inhalt für 10 min vermischt. Dieser Schritt wurde acht Mal wiederholt und führte so zu einem nahezu vollständigen Austausch von Ethanol zu flüssigem CO_2 . Für die anschließende Kritisch-Punkt-Trocknung der Probe wurde die Druckkammer nur noch bis zur Hälfte mit flüssigem CO_2 aufgefüllt. Zudem wurde die Probenkammer im Anschluss an die Austauschschritte auf 40°C erhitzt und auch während der anschließenden Entlassung des Gases aus der Kammer auf 40°C gehalten. Nachdem kein Druck mehr in der Kammer vorhanden war, wurde die Probe entnommen und direkt in die Kathodenzerstäubungsanlage überführt.

Aufbringen eines Metallfilms – Kathodenzerstäubung

Um biologische Proben im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersuchen zu können, müssen diese nach der Kritisch-Punkt-Trocknung durch einen Metallfilm elektrisch und thermisch leitend gemacht werden.

In einer mit einem Inertgas (hier: Argon) gefüllten Vakuumkammer, wird zwischen der Anode (Probenteller) und der Kathode (Target) aus dem zur Zerstäubung bestimmten Material (hier: Gold bzw. Pt/Pd) ein elektrisches Feld aufgebaut. Die Elektronen des erzeugten elektrischen Feldes werden beschleunigt und kollidieren mit den Argon-Atomen, welche dadurch ionisiert werden. Dieses Gemisch aus Argon-Ionen und Elektronen wird als Plasma bezeichnet. Die Ionen werden in Richtung Kathode beschleunigt und schlagen dort Metallatome aus. Die austretenden Atome des Schichtmaterials treffen, aufgrund einer Mehrfachstreuung an den Plasmapartikeln, ohne eine strenge Ausrichtung auf die Probe. Dort bildet sich ein dünner Metallfilm. Die so präparierten Proben können durch diese Art der Präparation im REM untersucht werden.

Gold-Sputtern

Das Sputtern der Proben mit Gold (Au) wurde an der BALZERS SCD004 Sputter Coater – Anlage durchgeführt. Die Schichtdicke des Metallfilms lag zwischen 10-15 nm. Nach Überführung der Probe in die Vakuumkammer wurde diese evakuiert. Nach Erreichen eines Vakuums von 6×10^{-2} mbar, wurde die Kammer 2-3 Mal für 10-15 sec. mit Argon gespült. Die Kammer wurde wieder auf 6×10^{-2} mbar eingestellt und die Proben für 30 sec bei einer Spannung von 20 mA „besputtert“.

Platin/Palladium-Sputtern

Die Besputterung mit Platin/Palladium (Pt/Pd) wurde an der Cressington 208 HR Sputteranlage mit der Beschichtungseinheit MTM-20 durchgeführt. Die Zellproben für die Untersuchung der Ultrastruktur von Fokaladhäsionen wurde bei einem Vakuum von 3×10^{-2} mbar, und einer Spannung von 60 mA mit einem ca. 2 nm dicken Schicht aus Platin/Palladium beschichtet.

2.8 Kombinierte Zellpräparation für die Untersuchung von Fokaladhäsionen

Die Untersuchung der Ultrastruktur von Fokaladhäsionen beinhaltet die Kombination unterschiedlicher Präparations- und Mikroskopiemethoden. Die Kombination aus konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (Abschnitt 2.6.1) und Rasterelektronenmikroskopie (Abschnitt 2.6.2) und insbesondere die Lage der zu untersuchenden Multi-Protein-Aggregate innerhalb der Zelle, erforderten besondere Präparationsschritte während der Probenherstellung, sowie ein Datenanalyseverfahren, das die Bildüberlagerung von zueinander gehörenden Daten aus der konfokalen Lichtmikroskopie und der Elektronenmikroskopie ermöglichte. Die einzelnen Präparationsschritte werden in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

2.8.1 Extrahierung und Fixierung

Anders als in der zuvor beschriebenen sekundären Immunfluoreszenz, wurde die Permeabilisierung in diesem Fall vor der Fixierung der Zellen durchgeführt. Dieser Schritt führte zu einer annähernd vollständigen Entfernung der Zellmembranen und hinterließ somit ein nahezu membranbefreites Zytoskelett, (Abschnitt 3.1.1), das die ultrastrukturelle Untersuchung von Fokaladhäsionen und ihrer Anbindung an das Aktinzytoskelett erleichterte. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 3,7% PFA in CB, da die Fixierung mit 2% GA in CB nur sehr schwache bis gar keine Fluoreszenzsignale in der Immunfluoreszenz zuließ. Die Nachfixierung der Zellen hingegen wurde mit 2% GA in CB realisiert.

Die Zellen wurden zweimal kurz mit je 2 ml warmen CB gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte mit 500 µl 1% TritonX-100 in CB für 5 min bei 37°C. Nach zweimaligem Waschen (vorsichtiges leichtes Schwenken) mit je 2 ml CB wurden die Zellen für 30 min bei 37°C mit 500 µl 3,7% PFA in CB fixiert. Das Fixanz wurde anschließend entfernt und die Zellen mit 2 ml 30 mM Glycin in CB für 5 min bei RT gewaschen. Vor Beginn der sekundären Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit Ultraschall behandelt und im nächsten Abschnitt beschrieben.

2.8.2 Ultraschallbehandlung der Zellen

Die Ultraschallbehandlung wurde mit Hilfe des Sonopuls Ultraschall-Homogenisator HD 2070 und dem dazugehörenden Ultraschallstab MS72 aus Titanium (Bandelin, Berlin) durchgeführt und erfolgte jeweils nach der Fixierung und vor der Antikörperinkubation der Zellen. Der verwendete Ultraschallstab besitzt an seiner Spitze einen Durchmesser von 2 mm und sorgt für eine mehrfache Amplitudenverstärkung (Erreichen von höchster Ultraschallleistungsdichte in Flüssigkeiten).

Funktionsprinzip des Ultraschallgerätes

Die Netzenergie wird durch den Hochfrequenzgenerator des Gerätes in Hochfrequenzenergie mit einer Frequenz von 20 kHz umgewandelt. Ein an den Hochfrequenzgenerator angeschlossener Ultraschallwandler setzt die Hochfrequenzenergie in Ultraschall um. An der Ultraschallstabspitze entstehen so mechanische Auslenkungen mit einer Frequenz von 20 kHz, die dann in die Probe weitergeleitet werden. Die an den Ultraschallwandler angebrachte Ultraschallspitze wirkt als mechanischer Transformator und ermöglicht eine vielfache Verstärkung der Ultraschall-Amplitude an der Spitze.

Die Probenkammern wurden je zweimal für 2 sec und 100% Intensität mit dem Ultraschallstab behandelt. Dazu wurden die Kammern (3,5 cm Ø) bis zum Schalenrand mit CB-Pufferaufgefüllt und unter dem Gerät positioniert. Der Ultraschallstab wurde bis kurz vor den Schalenboden in den CB-Puffer eingetaucht und die Probe wie oben beschrieben sonifiziert (Abb. 2.7).

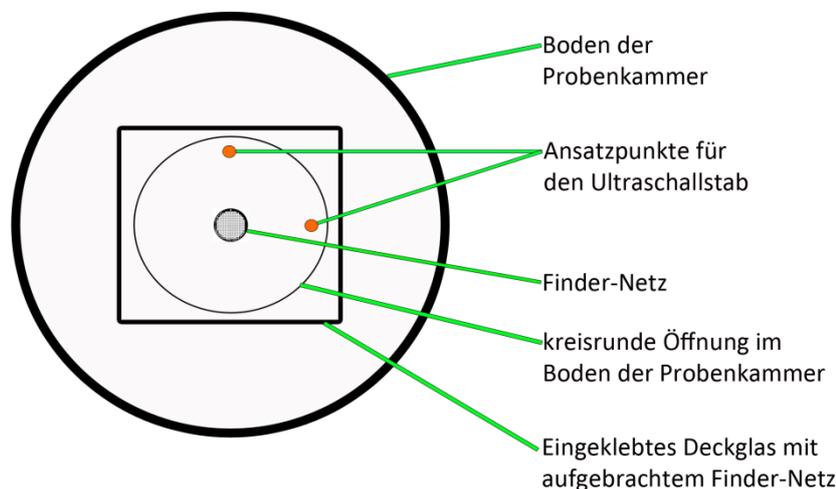


Abb. 2.7. Ansatzpunkte der Behandlung der Zellen mit dem Ultraschallstab. Die Skizze zeigt die Punkte (orange Punkte) an, an denen der Ultraschallstab in der Probenkammer angesetzt wurde.

2.8.3 Sekundäre Immunfluoreszenz

Die Ultraschall-behandelten Proben wurden mit 300 µl 5% Magermilchpulver in CB für 35 min bei 37°C geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Maus-anti-Vinculin, IgG1 Monoklonal, Klon hVIN-1) in 100 µl 2% Magermilchpulver in CB in einem Verhältnis von 1:100 für 1 h bei 37°C. Die Primäantikörper-Lösung wurde entfernt und die Zellen dreimal mit je 1 ml Block-Lösung (5% Magermilchpulver in CB) bei RT gewaschen. Im Anschluss erfolgte der Inkubationsschritt mit dem Zweitantikörper. Für die Markierung der Primäantikörper wurden zwei unterschiedliche Sekundäantikörper verwendet. Zum einen wurde ein sekundärer Ziege-anti-Maus

Cy3 Antikörper eingesetzt und zum anderen ein spezieller Sekundärantikörper der gleichzeitig kovalent an ein Fluorophor (Alexa Fluor® 546) und an ein Nanogoldpartikel gebunden ist (Abb. 2.8).

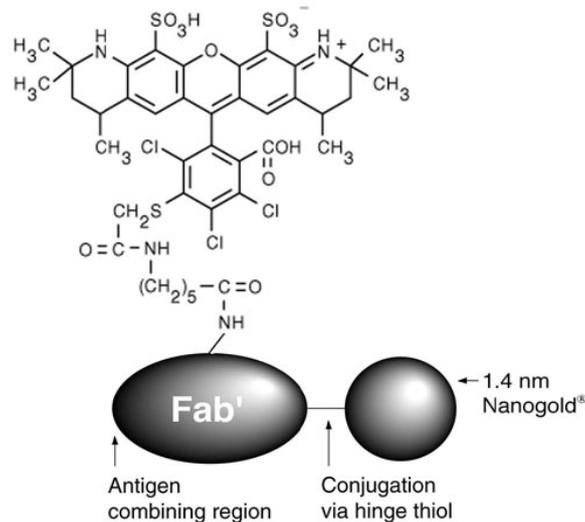


Abbildung 2.8 Alexa Fluor®594 FluoroNanogold™-anti-maus Fab'. Das Antigen-bindende Antikörperfragment (Fab') ist kovalent an den Alexa Fluor® 594 Farbstoff und an ein 1,4 nm Nanogoldpartikel gebunden. Quelle: Nanoprobes.

Dieser Antikörper kann sowohl in der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie sowie der Elektronenmikroskopie eingesetzt werden und ist somit für die Kombination dieser beiden Mikroskopietechniken geeignet. Beide Sekundärantikörper wurden in einem Verhältnis von 1:200 in 100 µl 2% Magermilchpulver in CB aufgenommen. Für die Visualisierung des Aktinzytoskeletts wurde Alexa 488-Phalloidin in einem Verhältnis von 1:100 zu der Sekundärantikörperlösung hinzugegeben und im Falle des Cy3 markierten Antikörpers für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit der Proben mit dem Alexa Fluor® 594 FluoroNanogold™ Antikörper betrug mindestens 2 h bei 37°C. Die Proben wurden bei RT zweimal vorsichtig mit je 2 ml CB gewaschen und in 2 ml frischem CB am LSM untersucht. Nach Beendigung der Untersuchungen, wurden die Proben für 20 min mit 500 µl 2% GA in CB bei 37°C nachfixiert und anschließend dreimal mit je 2 ml 30 mM Glycin in CB bei RT gewaschen, sowie zwei weitere Male mit je 2 ml deionisiertem Wasser.

2.8.4 Vergrößerung der Nanogoldpartikel

Die Vergrößerung des Umfangs der Goldnanopartikel wurde vor der Dehydrierung und Trocknung mit Hilfe des GoldEnhance Solution Kit (Nanoprobes, Yaphank, NY, USA) durchgeführt. Das Kit besteht aus vier Lösungen:

- Verstärkerlösung (A)
- Aktivatorlösung (B)
- Initiatorlösung (C)
- Pufferlösung (D)

Die Lösungen wurden nach dem Protokoll der Firma in gleichen Mengen zusammengegeben. Zunächst wurde jeweils 10 µl der Lösungen (A) und (B) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter Verwendung des Vortexers vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurden jeweils 10 µl der Lösungen (C) und (D) hinzugegeben und gründlich miteinander vermischt (Vortexer). Anschließend wurde das deionisierte Wasser aus den Probenkammern entfernt und die Zellen bei RT für 50 sec mit der „Verstärker-Lösung“ für 50 sec inkubiert. Der Vorgang wurde durch die Entfernung der „Verstärker-Lösung“ und anschließendem dreimaligen Waschschrift mit deionisiertem Wasser abgestoppt. Die so durchgeführte Verstärkung resultierte in ca. 30 nm großen Nanogoldpartikel. Im Anschluss wurden die Proben Dehydriert, getrocknet und mit einem dünnen ca. 2 nm dicken Pt/Pd-Film beschichtet (Abschnitt 2.7.2).

2.9 Digitale Bildverarbeitung

Für die Auswertung und Überlagerung von zueinander gehörenden LSM- und REM-Bilddaten wurde ein digitales Bildverarbeitungsprogramm auf der Basis von Matlab (Rel. 7.2, MathWorks, München) für diese Aufgabe entwickelt. Dies hier vorgestellte und verwendete Programm wurde von Dr. Norbert Kirchgeßner (aktuelle Adresse: Institut für Agrarwissenschaften ETH Zürich (CH-Zürich), vormals ICS-7, FZ Jülich) erstellt.

2.9.1 Überlagerung von zueinander gehörenden LSM- und REM-Daten

Die hier gewonnenen zueinander gehörenden unterschiedlichen Bilddaten aus der konfokalen Lichtmikroskopie und der Elektronenmikroskopie einer Zelle, wurden mit Hilfe des Programms „reg_manual“ ausgewählt, überlagert und angepasst. Dazu wurde in den jeweiligen Bilddaten jeweils

ein Paar von Kontrollpunkten markiert. Diese Kontrollpunkte beschreiben die aus Rotation und Verschiebung bestehende Transformation, mit der die LSM- und REM-Bilder zur Deckung gebracht werden. Die beiden Bilddaten wurden übereinander gelegt und konnten innerhalb des Programms durch Rotation und Verschiebung feiner aneinander angepasst werden. Die Skalierung wird zudem durch die in den Bilddaten vorhandenen Pixelgrößen ausgeglichen. Die Daten aus der Überlagerung wurden nachfolgend in drei Bilddateien gleicher Dimension gespeichert. Hierbei gibt `reg_base_1.tif` die REM-Datei wieder, `reg_input_1.tif` steht für den grünen Kanal der LSM-Daten und `reg_input2.tif` für den roten Kanal der LSM-Daten. Mit Hilfe von ImageJ wurden die einzelnen Farbkanäle gewählt und zu einem Farbbild zusammengefügt. Als Basisbilddatei diente das REM-Bild `reg_base_1.tif`. Das grüne LSM-Bild `reg_input_1.tif` (Aktin-Zytoskelett) sowie das rote LSM-Bild `reg_input_2.tif` (Vinculin als Marker für fokale Adhäsionen) konnten dann einzeln oder gemeinsam über das REM-Bild gelegt und als Farbbild gespeichert werden.

3 Ergebnisse

Teil 1

3.1 Fokale Zelladhäsionen – Untersuchungen zur

Ultrastruktur

Für die Analyse der Ultrastruktur wurde die konfokale Lichtmikroskopie mit der Rasterelektronenmikroskopie kombiniert. Diese Kombination verlangte nach speziellen Präparationsschritten sowie der Erstellung eines neuen Datenanalyseverfahrens zur Generierung von Überlagerungsdaten aus LSM- und REM-Aufnahmen, um die Position von Adhäsionsstrukturen innerhalb der Zelle genau zu bestimmen.

3.1.1 Beseitigung des kortikalen Zytoskeletts -

Ultraschallbehandlung der Zellen

Das kortikale Zytoskelett

Auf zweidimensionalen Oberflächen sind Zellen über fokale Adhäsionsstrukturen mit dem darunter liegenden, aus extrazellulären Matrixproteinen bestehenden Substrat, fest verbunden. In Bereichen dieser Zell-Matrix-Anbindung kommt es, wie im Abschnitt 1.1 beschrieben, zu engen Kontakten zwischen der ventralen Plasmamembran der Zelle und der extrazellulären Matrix. Die unterhalb der Zelle lokalisierten fokalen Adhäsionsstrukturen werden zudem von einem dichten und komplexen kortikalen Zytoskelettnetzwerk überbedeckt. Die Abbildung 3.1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme dieses dichten Netzwerks beispielhaft an einem primär isolierten kardialen Fibroblasten.

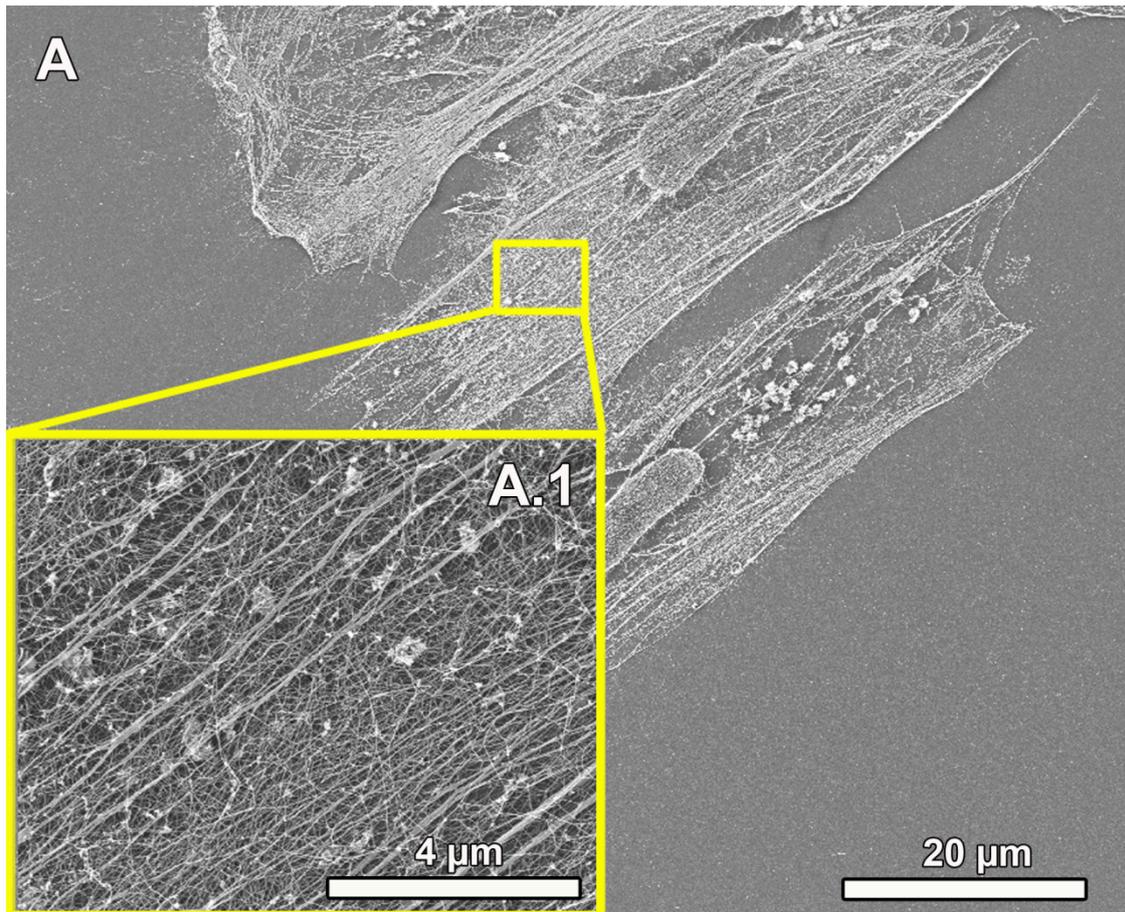


Abbildung 3.1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des kortikalen Zytoskeletts von kardialen Fibroblasten. (A) zeigt die Übersichtsaufnahme von drei kardialen Fibroblasten. Die Zellen wurden mit Detergenz behandelt, wodurch die Zellmembranen extrahiert und das Zytoskelett der Zelle freigelegt wurde. Für die Visualisierung der Proben im Elektronenmikroskop sorgte ein dünner Beschichtungsfilm aus Gold (10-15 nm). Die gelbe Box in A.1 zeigt die Vergrößerung des kortikalen Zytoskeletts der Zelle in (A). Das kortikale Zytoskelett stellt ein komplexes und dichtes Netzwerk aus unterschiedlich dicken Aktin-Filamenten dar.

Ein entscheidender Schritt zur Untersuchung der Ultrastruktur von Fokaladhäsionen ist die Beseitigung des kortikalen Zytoskeletts der Zellen, da es eine Beobachtungsbarriere für die rasterelektronenmikroskopische Analyse darstellt. Es verdeckt die nahe am Substrat liegenden Adhäsionsstrukturen und behindert somit die oberflächenabtastende Untersuchung dieser Strukturen mit dem Rasterelektronenmikroskop. Daher wurden die Zellen nach der von Heuser et al. Beschriebenen Methode mit Ultraschall behandelt (Heuser, 2000)

Bereiche, die unterhalb der Zelle lokalisiert sind und vor der Ultraschallbehandlung durch das kortikale Zytoskelett verdeckt wurden, sind nun für die hochauflösende elektronenmikroskopische Analyse zugänglich.

Der Effekt der Ultraschallbehandlung auf die zellulären Strukturen wird in Abb. 3.2 veranschaulicht. Skizze (A) zeigt die schematische Seitenansicht einer Zelle ohne die Behandlung mit Ultraschall. Die Stressfasern (SF, grün) der Zelle sind über FAs (rot) mit der EZM (blau) verbunden und werden von dem kortikalen Zytoskelett (KZ, schwarz) und dem Zellkern (ZK) überdeckt. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme in (A.1) zeigt einen kardialen Fibroblasten ohne die

Behandlung mit Ultraschall. Das Substrat unterhalb der Zelle, sowie alle substratnahen zellulären Strukturen werden von dem dichten kortikalen Zytoskelett vollständig überdeckt und sind so für die hochauflösenden rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen unzugänglich. Eine Vergrößerung des dichten kortikalen Zytoskelett ist nochmals in der gelben Box in (A.1) wiedergegeben.

Werden Zellen einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt, führt dies zum Verlust eines Großteils des kortikalen Zytoskeletts. Die Auswirkung der Ultraschallbehandlung einer Zelle ist schematisch in Abb. 3.2 (B) dargestellt, sowie in der REM-Aufnahme in (B.1). Das kortikale Zytoskelett der Zelle ist nahezu vollständig durch den Ultraschallimpuls beseitigt worden. Zurück bleiben der ovale Zellkern und die parallel zueinander liegenden dicken Stressfasern

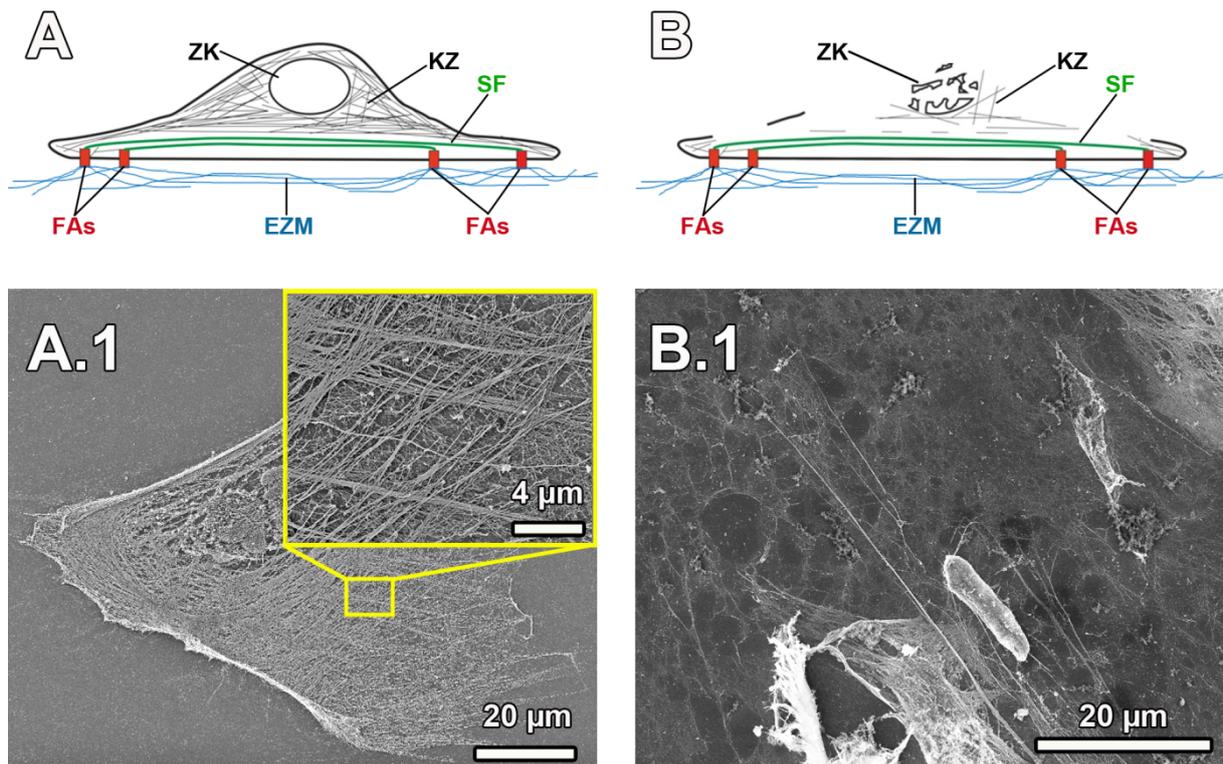


Abbildung 3.2 Ultraschallbehandlung der Zelle - Beseitigung des kortikalen Zytoskeletts. (A) zeigt die schematische Seitenansicht einer Zelle mit Stressfasern (SF, grün) die über FAs (rot) mit der EZM (blau) verbunden sind. Darüber erstreckt sich in schwarz das kortikale Zytoskelett (KZ) und der Zellkern (ZK). Die untere Aufnahme (A.1), zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines kardialen Fibroblasten, sowie das kortikale Zytoskelett der Zelle ohne die Behandlung mit Ultraschall. Eine Vergrößerung des kortikalen Zytoskeletts ist in der gelben Box wiedergegeben. Der Effekt der Ultraschallbehandlung wird schematisch in der Abbildung (B) und in der elektronenmikroskopischen Aufnahme in (B.1) dargestellt. Das kortikale Zytoskelett ist nahezu vollständig entfernt. Der Zellkern und parallel zueinander liegende Stressfasern, sowie das unter der Zelle liegende Substrat sind durch die Ultraschallbehandlung freigelegt worden.

Nach der Beseitigung des kortikalen Zytoskeletts war es für die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur von Fokaladhäsionen notwendig, diese Bereiche näher einzugrenzen und zu bestimmen. Für die genauere Positionsbestimmung dieser Bereiche im Rasterelektronenmikroskop wurden die Fokalenadhäsionen der Zellen zunächst über die sekundäre Immunfluoreszenz angefärbt. Als Marker für die Fokaladhäsionen diente hierbei ein Antikörper gegen Vinculin. Das Aktinzytoskelett wurde über eine Phalloidin färbung markiert. Im nachfolgenden Schritt konnten, durch das auf die Glasoberfläche aufgebrachte Koordinatengitter (Abschnitt 2.2.1), die ausgesuchten Zellen aus der Immunfluoreszenz im EM wiedergefunden werden. Die so gewonnenen, zueinander gehörenden Bilddaten aus der konfokalen Lichtmikroskopie und der Elektronenmikroskopie einer Zelle, wurden im nächsten Schritt mit Hilfe des Programms „reg_manual“ (Abschnitt 2.8.2) ausgewählt, überlagert und angepasst.

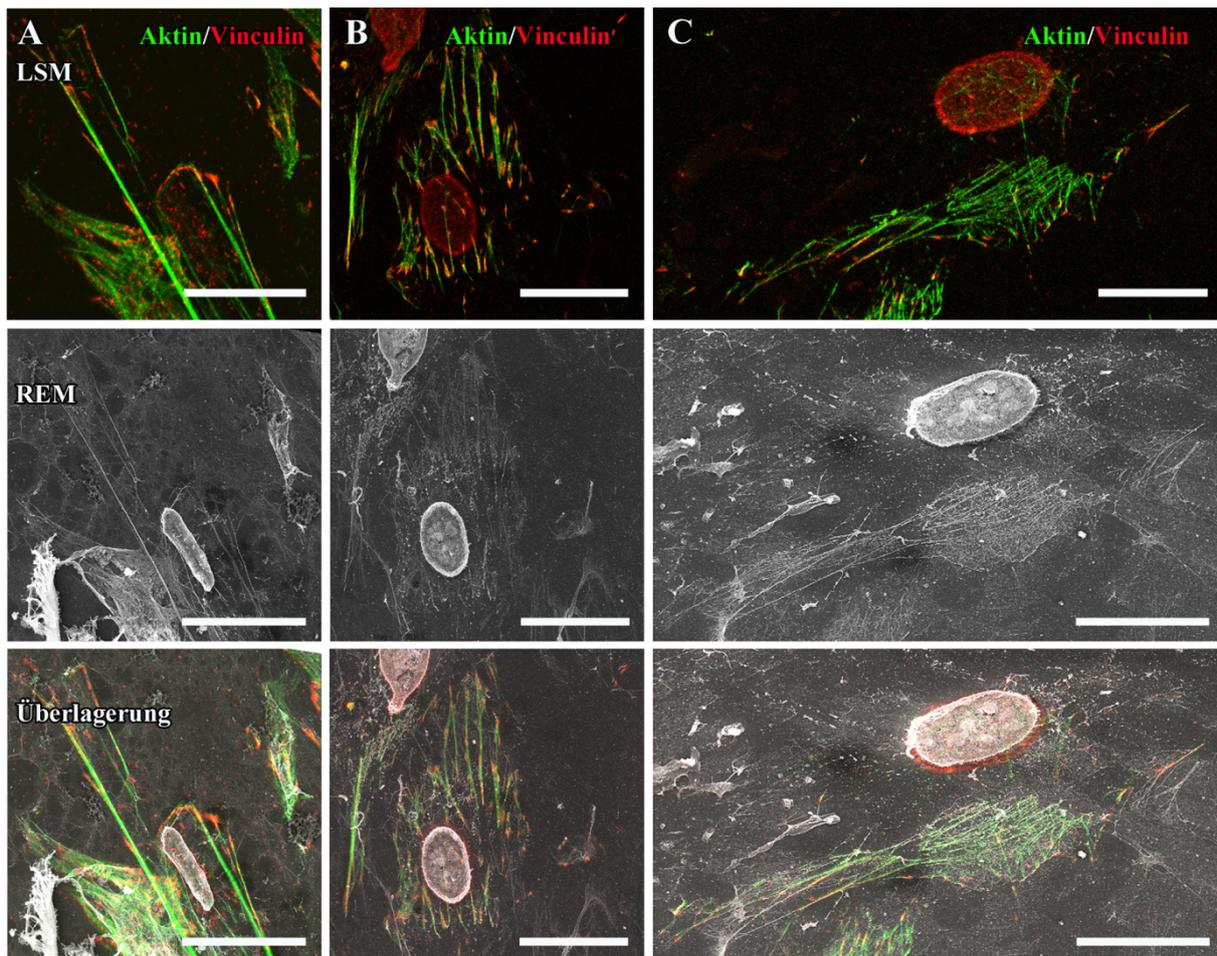


Abbildung 3.3 Überlagerung von LSM- und REM-Daten zur Lokalisierung von Fokal Adhäsionen. Obere Zeile zeigt Immunfärbungen von drei unterschiedlichen Zellen (A), (B), und (C) nach der Behandlung mit Ultraschall. Die Aktinfilamente sind in grün (Alexa Phalloidin 488) dargestellt und die Fokaladhäsionen sind in Rot (Cy3) über eine Vinculin-Färbung markiert. Die mittlere Zeile zeigt REM-Aufnahmen derselben Zellen in (A), (B) und (C) nach Dehydrierung und Kritisch-Punkt-Trocknung. In der untersten Zeile ist die Überlagerung der zwei unterschiedlichen Datensätze derselben Zellen dargestellt. Maßstab = 20 µm

Diese überlagerten Datensätze, ermöglichten eine genauere Bestimmung der FAs-Bereiche in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen für die anschließenden hochauflösenden REM Untersuchungen. Die Methode der Bildüberlagerung ist in Abb. 3.3 dargestellt. Die oberste Zeile zeigt Immunfluoreszenzfärbungen von drei unterschiedlichen kardialen Fibroblasten (A), (B) und (C) nach der Behandlung mit Ultraschall. Die Aktinfilamente sind mit Alexa 488 Phalloidin grün, FAen über eine Antikörper Färbung gegen Vinculin rot (Cy3) markiert. Die mittlere Zeile der Abb. 3.3 zeigt die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Zellen in (A), (B) und (C) nach Dehydrierung und Kritisch-Punkt-Trocknung. Durch die Überlagerung der beiden zueinander gehörenden Bilddaten, dargestellt in der untersten Zeile von Abb. 3.3, konnten nun die FAs-Bereiche näher eingegrenzt und anschließend im REM hochauflösend untersucht werden.

Mit Hilfe der hier vorgestellten Überlagerungstechnik wurden die Bereiche, die ein Vinculin-Signal aufwiesen im REM bezüglich ihrer Ultrastruktur näher analysiert. Typischerweise zeigten die Immunfluoreszenzen Signale für Fokaladhäsionen in der Peripherie der Zelle, entlang von

Stressfasern (SF) sowie an deren Enden. Nachfolgend werden die gewonnenen Daten aus der hochaufgelösten Untersuchung von lokalisierten Fokaladhäsions-Bereichen dargestellt.

Für eine bessere Orientierung innerhalb der Bilddaten wurden Vergrößerungsbildserien der einzelnen untersuchten Bereiche der Zellen erstellt. Als Basis für die nachfolgend aufgeführten Vergrößerungsbildserien, dienten Übersichtsbilder aus der Überlagerung von LSM- und REM- Daten. Bereiche mit einem Signal für Fokaladhäsionen im Überlagerungsdatensatz wurden über einen weiteren Vergrößerungsausschnitt bestehend aus einem REM Bild dargestellt, das bereits mehr Details der zellulären Strukturen enthielt. Das jeweils letzte Bild aus einer Vergrößerungsbildserie zeigt das finale hochaufgelöste Bild des Vinculin markierten Adhäsions-Bereiches der Zelle. Grüne Boxen markieren die jeweiligen vergrößerten Bereiche.

3.1.2 Fokaladhäsionen entlang von Stressfasern

Die Abb. 3.4 zeigt eine Vergrößerungsbildserie eines, über Vinculin markierten, Fokaladhäsions-Bereiches eines kardialen Fibroblasten. Das Bild in (A) zeigt die Überlagerung des Vinculin-Signals aus den konfokalen LSM-Daten mit den entsprechenden zugehörigen REM-Daten der Zelle. Deutlich zu erkennen sind die dicken Aktin-Stressfaserbündel, die die Zelle parallel zueinander durchspannen. Entlang dieser Stressfasern sind Vinculin-Signale zu erkennen. Die grüne Box in (A) markiert den Bereich der Zelle der in (B) vergrößert wiedergegeben wird. In dieser Vergrößerungsstufe sind bereits mehr Details der zellulären Strukturen zu erkennen. Die grüne Box in (B) markiert den finalen Vergrößerungsbereich, der jeweils im letzten Bild der Vergrößerungsbildserie dargestellt wird. In diesem Bildausschnitt wird der markierte Fokaladhäsions-Bereich aus (A) hochauflösend dargestellt. Die Abb. 3.4 (C) zeigt Aktinfilamentbündel, die über kleine rundliche Strukturen (rS) mit dem darunter liegenden Substrat verbunden sind. Hierbei wird zwischen zwei Strukturen unterschieden. Zum einen rundliche Strukturen, die entlang des Filamentbündels lokalisiert und direkt mit ihm verbunden sind (Markierung durch grüne Pfeile 1-3). Zum anderen Strukturen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Aktinfilamenten liegen, aber nicht direkt mit ihnen verknüpft sind (markiert durch gelbe Pfeile). Der blaue Pfeil weist auf ein Aktinfilament hin, das an einer der rS endet bzw. entspringt und so eine V-Gabelung bildet. Das benachbarte Aktinfilament läuft in einem leichten Knick über diese Struktur hinweg. Die rundlichen Strukturen entlang des Filamentbündels (grüne Pfeile 1 und 2) sind flacher als die Struktur an der Gabelung (grüner Pfeil 3). Das oberste dieser Strukturen (grüner Pfeil 1) ist direkt mit dem Filamentbündel verbunden, während die darunter liegende, kleinere rS (grüner Pfeil 2) über feine Filamente mit dem Filamentbündel und der rS der Gabelung verbunden ist. Auch die Verbindung zur oberhalb liegenden Struktur wird über ein Filamentbündel gewährleistet. Der Durchmesser dieser dünnen „Verbindungs-Filamente“ liegt bei ca.

10 nm. Die kleinere der beiden flachen rS weist einen Durchmesser von ca. 170 nm auf, während der Durchmesser der größeren flachen Struktur bei etwa 200 nm liegt. Dies gilt auch für die runde Struktur von der die Gabelung der Filamentbündel ausgeht. Das Filamentbündel, das direkt mit allen drei rS in direktem Kontakt steht, besitzt einen Durchmesser von ca. 60 nm. Das Filamentbündel, das am Gabelungspunkt endet bzw. entspringt liegt ebenfalls bei einem Durchmesser von ca. 60 nm.

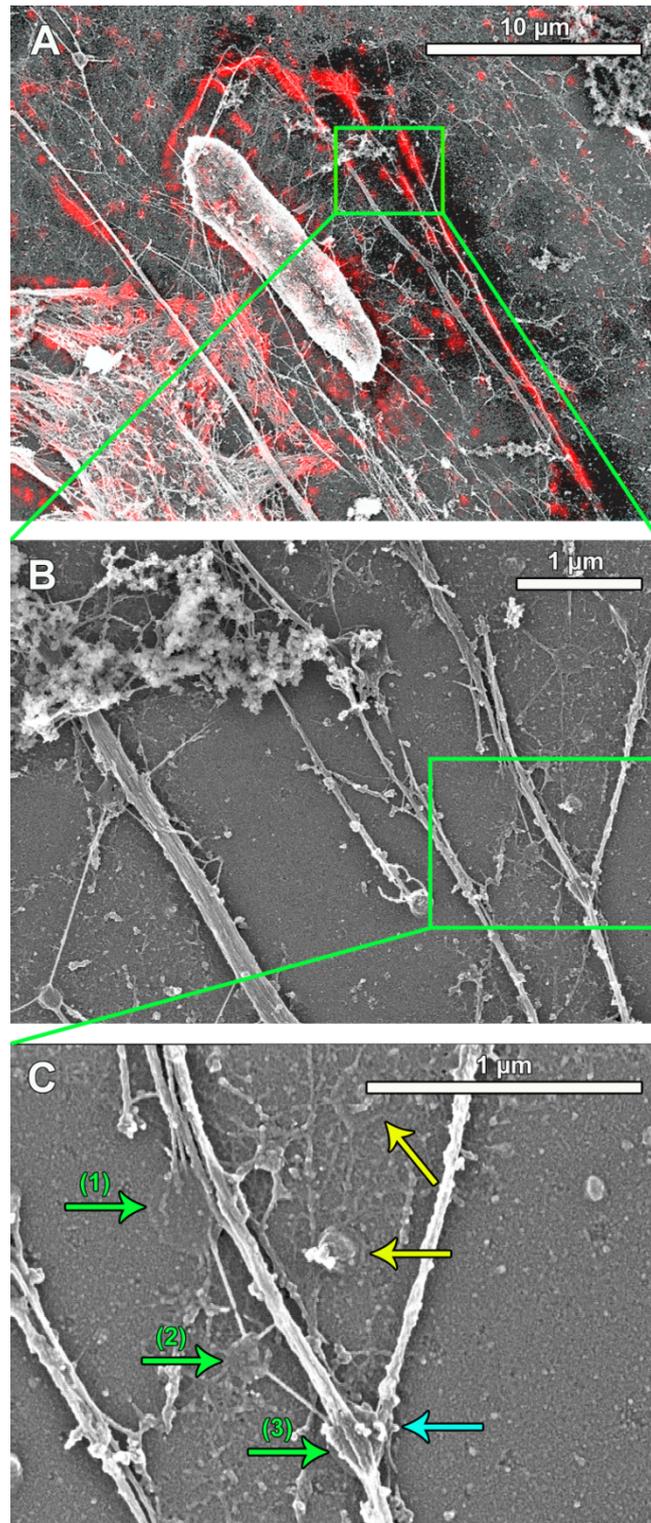


Abbildung 3.4 Vergrößerungsbildserie von lokalisierten Fokalen-Adhäsions-Bereichen. (A) zeigt einen Überlagerungsdatensatz aus LSM- und REM-Daten eines kardialen Fibroblasten. Die Fokal Adhäsionen sind über eine Vinculin-Färbung rot markiert. Die grünen Boxen in (A) und (B) markieren jeweils die nächste Vergrößerungsstufe in den nachfolgenden REM-Bildern. (C) zeigt die Vergrößerung des Fokalen-Adhäsions Bereiches aus (A). (C) zeigt Filamente, die über kleine rundliche Strukturen mit dem Substrat verbunden sind. Die grünen Pfeile markieren die rundlichen Strukturen, die direkt mit den Aktinfilamenten verbunden sind. Über die gelben Pfeile werden rundliche Strukturen markiert, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Aktinfilamenten liegen, aber nicht direkt mit ihnen verknüpft sind. Der blaue Pfeil weist auf ein Aktinfilament hin, das an einer der rundlichen Strukturen endet bzw. entspringt und so eine V-Gabelung bildet.

Ein weiterer Bereich innerhalb der Zelle aus Abb.3.4, der ebenfalls ein Vinculin-Signal aufzeigte, ist in Abb. 3.5 aufgeführt. Der in dieser Vergrößerungsbildserie untersuchte Bereich (blauer Stern in Abb. 3.5 (A)) liegt ein Stückchen unterhalb des Bereiches, der in Abb. 3.4 gezeigt ist (gelber Stern in Abb. 3.5 (A)) und ist mit derselben peripheren Stressfaser assoziiert, wie die rS, die das Zentrum der beschriebenen Gabelung in der Abb. 3.4 (C) bildet. Das periphere Aktinbündel steht über eine rS mit dem Substrat in direktem Kontakt (grüner Pfeil 1). Die rundliche Struktur ist unterhalb des Aktinbündels lokalisiert und hat einen Durchmesser von ca. 170 nm. Ein ca. 20 nm feines Aktinfilamentbündel trennt sich von dem peripher liegenden dicken Aktinbündel (\emptyset ca. 70 nm) und endet direkt in der rS. In Höhe der Kontaktstelle zwischen dem dicken peripheren Aktinbündel und der Struktur, trennt sich ein schmaleres Filamentbündel von der übrigen Faser und bindet an eine daneben liegende Aktinfaser.

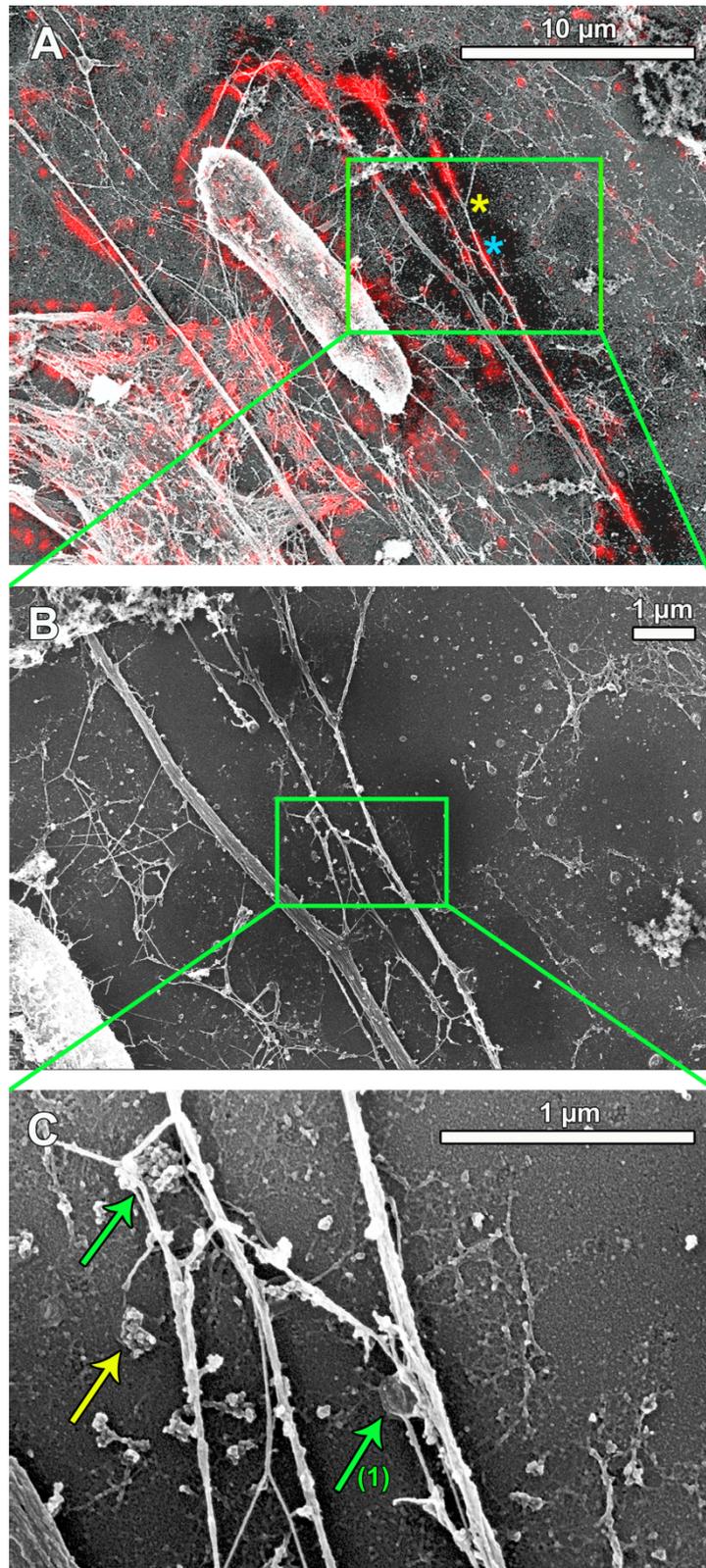


Abbildung 3.5 Vergrößerungsbildserie von lokalisierten FAs-Bereichen. (A) zeigt einen Überlagerungsdatensatz aus LSM- und REM-Daten eines kardialen Fibroblasten. Die Fokal Adhäsionen sind über eine Vinculin-Färbung rot markiert. Die grünen Boxen in (A) und (B) markieren jeweils die nächste Vergrößerungsstufe in den nachfolgenden REM-Bildern. (C) zeigt die hochauflösende Vergrößerung des Adhäsions Bereiches aus (A). Die grünen Pfeile in (C) markieren die rundlichen Strukturen, die direkt mit den Aktinbündeln verbunden sind. Der gelbe Pfeil markiert eine rundliche Struktur, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Aktinfilamenten liegt, aber nicht direkt mit ihnen verknüpft ist. Der blaue Stern markiert den hier untersuchten Bereich innerhalb der Zelle. Der gelbe Stern markiert den in Abb. 3.5 beschriebenen Bereich in der Zelle.

Ein Bereich mit einem besonders ausgeprägten Vinculin-Signal in der Überlagerung von LSM- und REM-Daten ist in der Vergrößerungsbildserie in Abb. 3.6 gezeigt. In der Abb. 3.6 (C) sind zwei rS (grüne Pfeile) zu sehen, die mit einer, ca. 330 nm dicken Stressfaser verbunden sind. Ein etwa 30 nm dickes Aktinbündel, über das die Stressfaser mit beiden Strukturen in direktem Kontakt steht, ist farblich in türkis hervorgehoben. Die einzelnen Aktinbündel, die die Stressfaser bilden, sind deutlich voneinander zu unterscheiden. Die obere, rundliche Struktur besitzt einen Durchmesser von ca. 270 nm und ist vom Erscheinungsbild flacher als die etwa 1,9 μm entfernt liegende zweite Struktur mit einem Durchmesser von ca. 170 nm. Im Bereich der Kontaktstelle zwischen dem farblich markierten Aktinbündel und der oberen, flachen Struktur, sind drei kurze, filamentöse, fingerartige Fortsätze (\emptyset ca. 25 nm) zu erkennen, die sich mit einem Abstand von 30 nm zueinander über die rundliche Struktur wölben (roter Pfeil). Die Strukturen sind nochmals vergrößert in (D) und (E) dargestellt. Der rote Pfeil markiert in (D) die filamentösen fingerartigen Fortsätze. Der Bereich der Stressfaser, der direkt an die Strukturen bindet ist Türkis unterlegt, während die runden Strukturen gelb markiert sind.

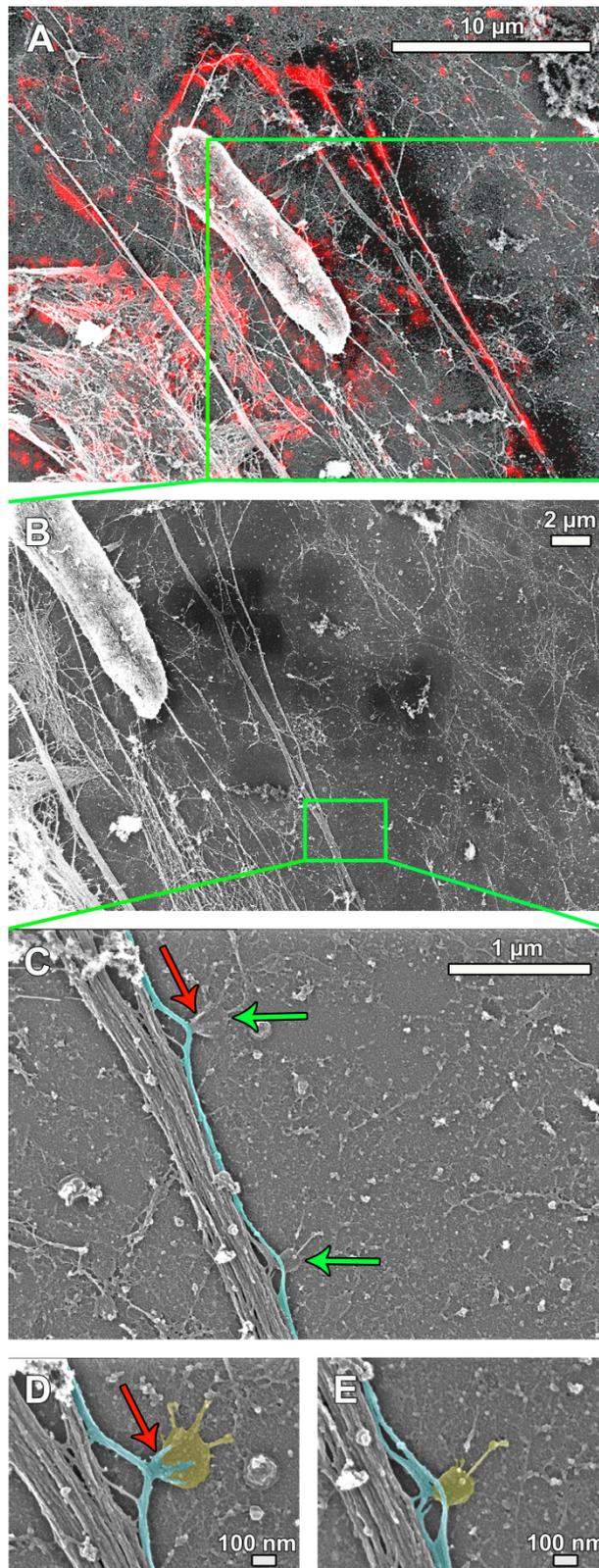


Abbildung 3.6 Vergrößerungsbildserie von lokalisierten FAs-Bereichen. (A) zeigt einen Überlagerungsdatensatz aus LSM- und REM-Daten eines kardialen Fibroblasten. Die FAs sind über eine Vinculin-Färbung rot markiert. Die grünen Boxen in (A) und (B) markieren jeweils die nächste Vergrößerungsstufe in den nachfolgenden REM-Bildern. (C) zeigt die hochauflösende Vergrößerung des Adhäsions- Bereiches aus (A). Die grünen Pfeile in (C) markieren die rundlichen Strukturen, die direkt mit den Stressfasern verbunden sind. Der rote Pfeil markiert drei kurze, filamentöse Fortsätze an der Verbindungsstelle zwischen Stressfaser und rundlicher Struktur, die sich über die Struktur wölben. (D) und (E) zeigen die Strukturen mit ihrer Anbindung an die Stressfaser nochmals vergrößert. Die Strukturen sind zur besseren Kenntlichmachung gelb markiert, der Bereich der Stressfaser, der direkt an die Strukturen bindet ist türkis markiert.

Die in den Abbildungen 3.4 – 3.6 dargestellten rundlichen Strukturen konnten auch in weiteren Zellproben gefunden und untersucht werden. Diese sind nachfolgend aufgeführt.

Die Abb. 3.7 zeigt eine Vergrößerungsbildserie eines kardialen Fibroblasten. Das Bild aus der Überlagerung mit den rot markierten Fokal Adhäsionen ist in (A) dargestellt. Die grüne Box in (A) definiert den Bereich, der in (B) vergrößert dargestellt ist. Für eine bessere Orientierung innerhalb der Bildserie, wurde auch hier ein Datensatz aus der Überlagerung verwendet. Zusätzlich in grün ist das Aktinzytoskelett markiert (Alexa488 Phalloidin). Die grüne Box in (B) gibt den Bereich der Zelle an, der in (C) hochauflösend dargestellt wird. Die grünen Pfeile in (C) markieren rundliche Strukturen, die mit Zytoskelettfilamenten assoziiert sind. Der gelbe Pfeil deutet auf eine rundliche Struktur ohne Verbindung zum Zytoskelett hin. Allerdings befindet sich diese Struktur in direkter Nachbarschaft zu den übrigen kreisrunden Strukturen und den Filamenten. Die markierten rS haben einen Durchmesser von etwa 170-200 nm. Vergleicht man den in (C) wiedergegebenen Bereich mit dem grün umrandeten Bereich in (B), erkennt man eine deutliche Überlagerung der Vinculin-Signale aus der Immunfluoreszenz in Rot, mit den rundlichen Adhäsions- assoziierten Strukturen aus der Elektronenmikroskopie.

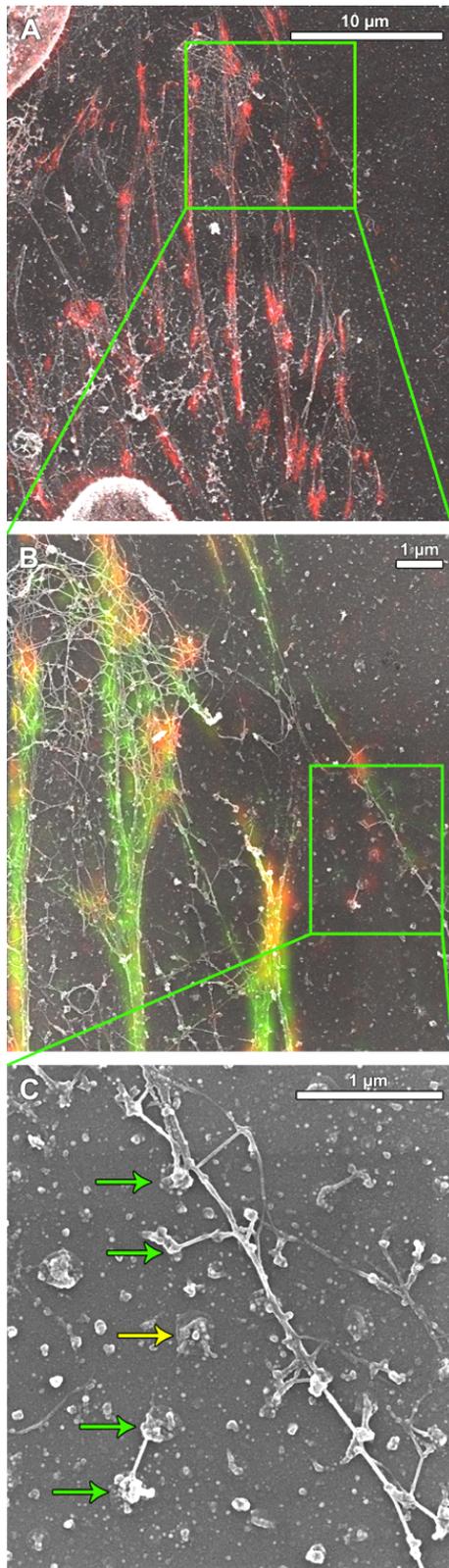


Abbildung 3.7 Vergrößerungsbildserie von lokalisierten FAs-Bereichen. (A) und (B) zeigen einen Überlagerungsdatensatz aus LSM- und REM-Daten eines kardialen Fibroblasten. Die FAs sind über eine Vinculin-Färbung rot markiert. In (B) ist zusätzlich das Aktinzytoskelett grün markiert. Die grünen Boxen in (A) und (B) markieren jeweils die nächste Vergrößerungsstufe in den nachfolgenden REM-Bildern. (C) zeigt die hochauflösende Vergrößerung des Adhäsionsmarkierten Bereiches aus (A). Die grünen Pfeile in (C) markieren die rundlichen Strukturen, die direkt mit Filamenten verbunden sind. Der gelbe Pfeil markiert eine rundliche Struktur, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Aktinfilamenten und den umliegenden rundlichen Strukturen liegt, aber nicht direkt mit ihnen verknüpft ist.

Die Abbildung 3.8 zeigt eine Vergrößerungsbildserie eines weiteren kardialen Fibroblasten. Für eine bessere Orientierung innerhalb der Bilddaten, wurde eine zusätzliche Vergrößerungsstufe in die Bildserie eingefügt. Hier sind die rundlichen Adhäsions- assoziierten Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 200 nm durch grüne Pfeile markiert (D) und direkt mit den Filamenten des Zytoskeletts verbunden. Ein ca. 40 nm dickes Filamentbündel verläuft über eines der rundlichen Strukturen hinweg. Feinere Filamente entspringen bzw. enden in der weiter rechts liegenden Struktur. Die beiden hier dargestellten Strukturen befinden sich ebenfalls entlang einer peripheren Stressfaser.

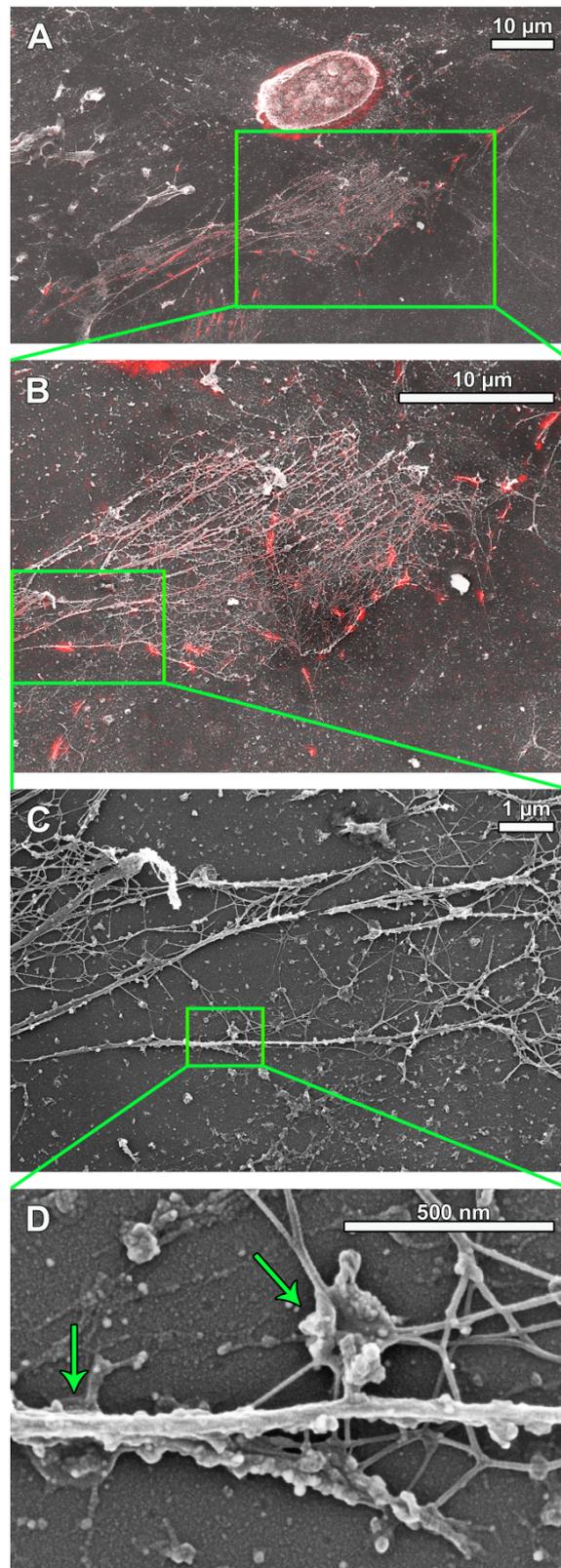


Abbildung 3.8 Vergrößerungsbildserie von lokalisierten FAs-Bereichen. (A) und (B) zeigen einen Überlagerungsdatensatz aus LSM- und REM-Daten eines kardialen Fibroblasten. Die Fokaladhäsionen sind über eine Vinculin-Färbung rot markiert. Die grünen Boxen in (A), (B) und (C) markieren jeweils die nächste Vergrößerungsstufe in den nachfolgenden REM-Bildern. (D) zeigt die hochauflösende Vergrößerung des Fokaladhäsions Bereiches aus (A). Die grünen Pfeile in (D) markieren die runden Strukturen, die direkt mit Filamenten verbunden sind.

Die Abbildung 3.9 zeigt eine weitere Vergrößerungsbildserie des kardialen Fibroblasten aus Abb. 3.8. In diesem Bereich sind eine Vielzahl der rS zu sehen (grüne Pfeile in (C)). Vier der rundlichen Strukturen sind direkt mit dem peripheren Faserbündel (\varnothing ca. 80-100 nm) verbunden (grüne Pfeile 1-4), während eine fünfte rundliche Struktur (grüner Pfeil 5) über ein ca. 30 nm dickes Filament mit dem peripheren Faserbündel und einer rundlichen Struktur (grüner Pfeil 3) verbunden ist. Die mit dem grünen Pfeil 5 markierte Struktur mit einem Durchmesser von ca. 250 nm, ist in einem Abstand von ca. 500 nm von dem peripheren Faserbündel innerhalb der Zellgrenze lokalisiert. Fünf ca. 25 nm dicke Filamentbündel entspringen bzw. enden in dieser rS. Die Durchmesser der einzelnen rS liegen zwischen ca. 150 und 250 nm. Drei der Strukturen (grüner Pfeil 1, 3 und 4) sind unterhalb des peripheren Filamentbündels lokalisiert. Eine ca. 500 nm lange und 40 nm dicke Aktinfaser verbindet das periphere Filamentbündel mit einer rundlichen Struktur (grüner Pfeil 2). Im Kontaktbereich zwischen der Verbindungsfaser und dem dickeren peripheren Filamentbündel, kommt es zu einer Aufspaltung der Verbindungsfaser in drei einzelne ca. 10 nm dünne Filamente (roter Pfeil).

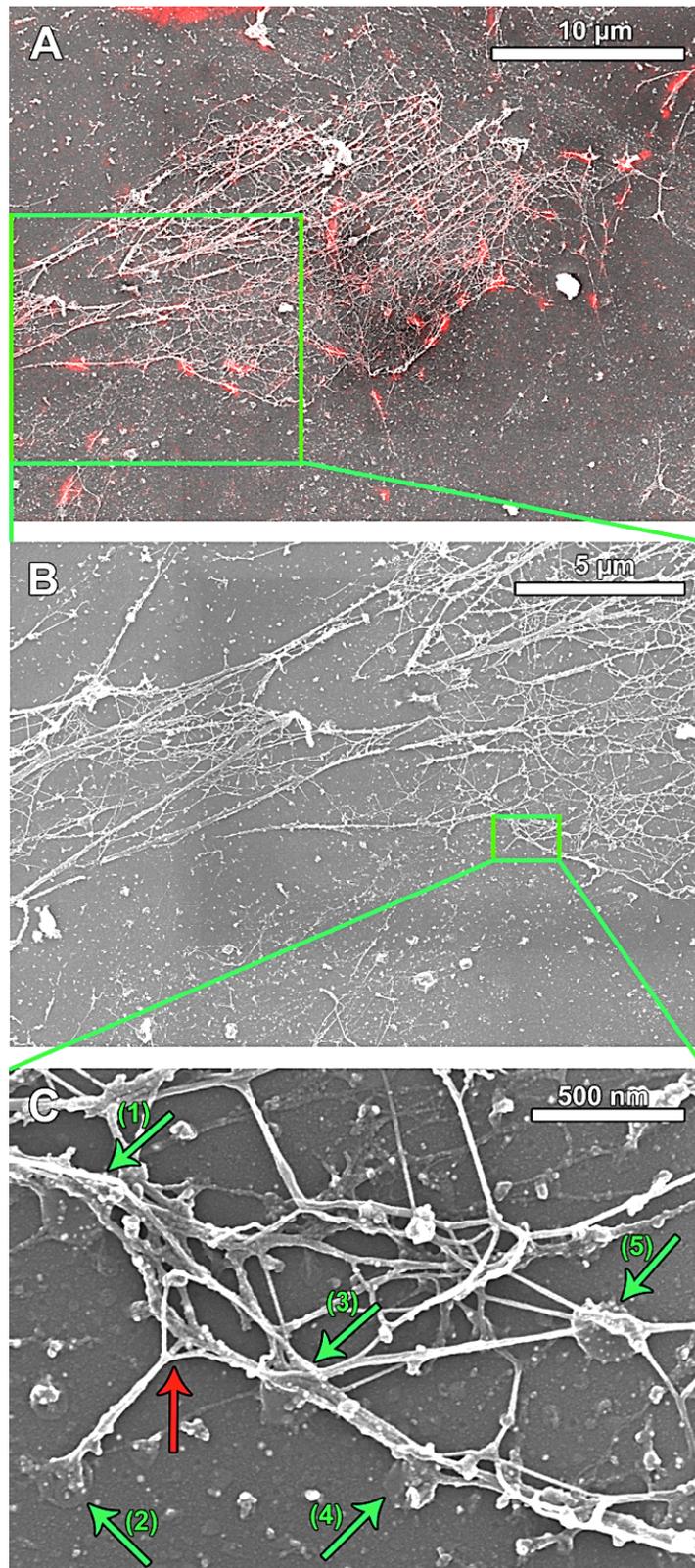


Abbildung 3.9 Vergrößerungsbildserie von lokalisierten FAs-Bereichen. (A) zeigt einen Überlagerungsdatensatz aus LSM- und REM-Daten eines kardialen Fibroblasten. Die Fokaladhäsionen sind über eine Vinculin-Färbung rot markiert. Die grünen Boxen in (A) und (B) markieren jeweils die nächste Vergrößerungsstufe in den nachfolgenden REM-Bildern. (C) zeigt die hochauflösende Vergrößerung des Adhäsions- Bereiches aus (A). Die grünen Pfeile in (C) markieren die rundlichen Strukturen, die direkt mit Filamenten verbunden sind. Roter Pfeil markiert eine Aufspaltung eines Faserbündels.

Die Abbildung 3.10 zeigt eine sehr ähnliche rundliche Struktur, wie sie bereits in Abb. 3.6 zu sehen ist (grüner Pfeil in (C)). Ein etwa 40 nm dickes Aktinbündel der Stressfaser ist mit der Struktur (\varnothing ca. 120 nm) verbunden. Die einzelnen Aktinbündel der 130 nm breiten Stressfaser sind, wie in Abb. 3.6, deutlich voneinander zu unterscheiden. Im Bereich der Kontaktstelle zwischen dem Aktinbündel der Stressfaser und der rundlichen Struktur, sind zwei kurze, filamentöse, fingerartige Fortsätze (\varnothing ca. 25 nm) zu erkennen, die sich über die Struktur wölben (roter Pfeil). Im Gegensatz zu den in der Abb. 3.6 gezeigten Adhäsions-assoziierten Strukturen, ist die hier aufgezeigte Struktur nahe des Stressfaserendes lokalisiert. Zudem ist sie mit einem Durchmesser von 120 nm deutlich kleiner und auch flacher als die Strukturen in der Abb. 3.6.

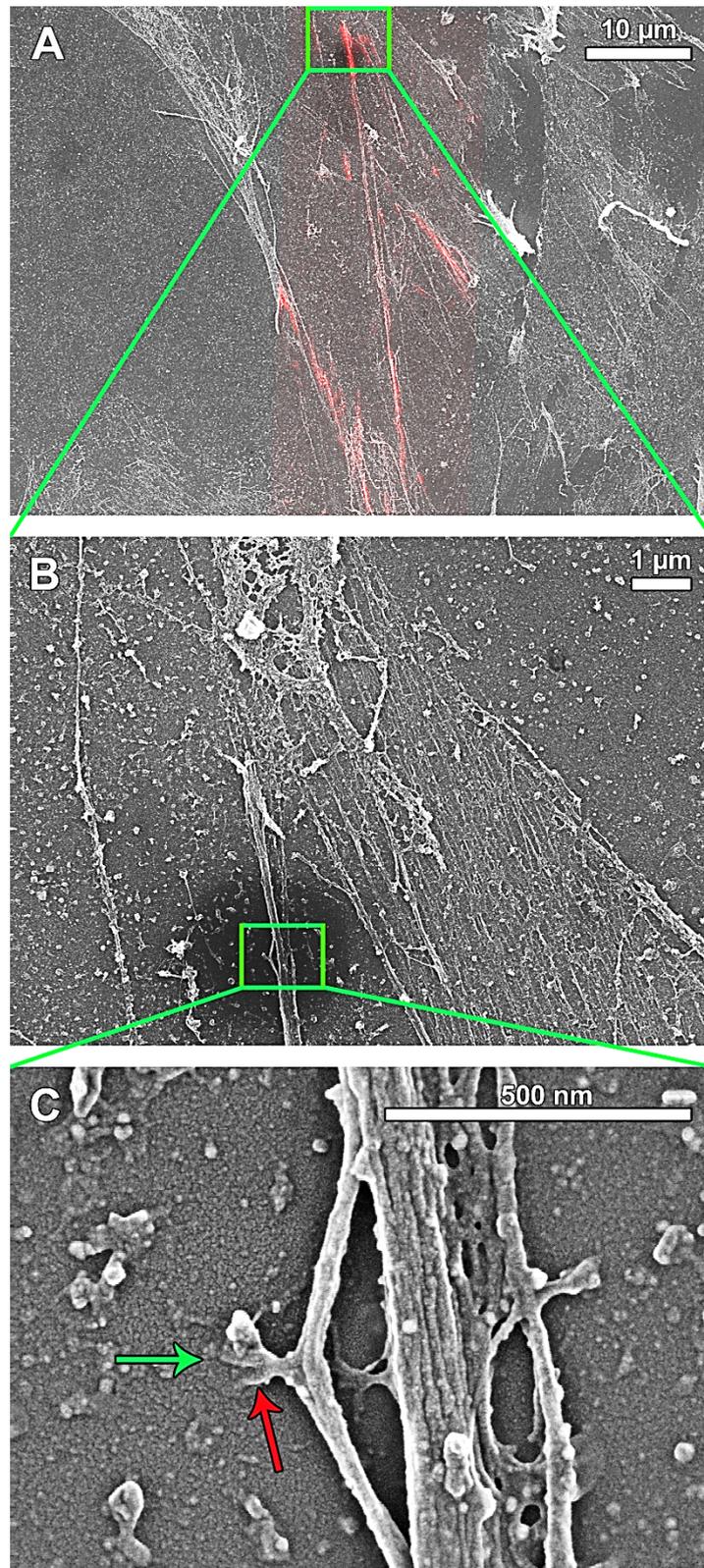


Abbildung 3.10 Vergrößerungsbildserie von lokalisierten FAs-Bereichen. (A) zeigt einen Überlagerungsdatensatz aus LSM- und REM-Daten eines kardialen Fibroblasten. Die FAs sind über eine Vinculin-Färbung rot markiert. Die grünen Boxen in (A) und (B) markieren jeweils die nächste Vergrößerungsstufe in den nachfolgenden REM-Bildern. (C) zeigt die hochauflösende Vergrößerung des FAs-markierten Bereiches aus (A). Der grüne Pfeil markiert eine rundliche Struktur die direkt über ein Filamentbündel mit der SF verbunden ist. Der rote Pfeil markiert zwei kurze, filamentöse Fortsätze an der Verbindungsstelle zwischen SF und rundlicher Struktur, die sich über die Adhäsions- assoziierte rundliche Struktur wölben.

3.1.3 Fokaladhäsionen an den Enden von Stressfasern

Neben der strukturellen Untersuchung von Adhäsions-Bereichen, die entlang von Stressfasern anzutreffen sind, wurden auch die Bereiche von Stressfaser-Enden analysiert. Die Abbildung 3.11 zeigt eine Vergrößerungsbildserie eines solchen Bereiches. Die grüne Box in (A) definiert den Ausschnitt, der in (B) wiedergegeben wird. Auch an den Enden von Stressfasern, sowie in ihrer unmittelbaren Umgebung sind die bereits vorgestellten rundlichen Strukturen zu erkennen. Strukturen, die unmittelbar mit Filamenten verbunden sind, werden durch grüne Pfeile markiert. Gelbe Pfeile markieren rundliche Strukturen ohne direkte Filamentanbindung. Ein feines, mit einem blauen Pfeil markiertes Filamentbündel (ca. 40 nm) ist mit zwei rundlichen Strukturen direkt verbunden. Im Bereich der Enden von Stressfasern scheinen die Fasern auszudünnen und feiner zu werden und in den rundlichen Adhäsions-assoziierten Strukturen zu enden.

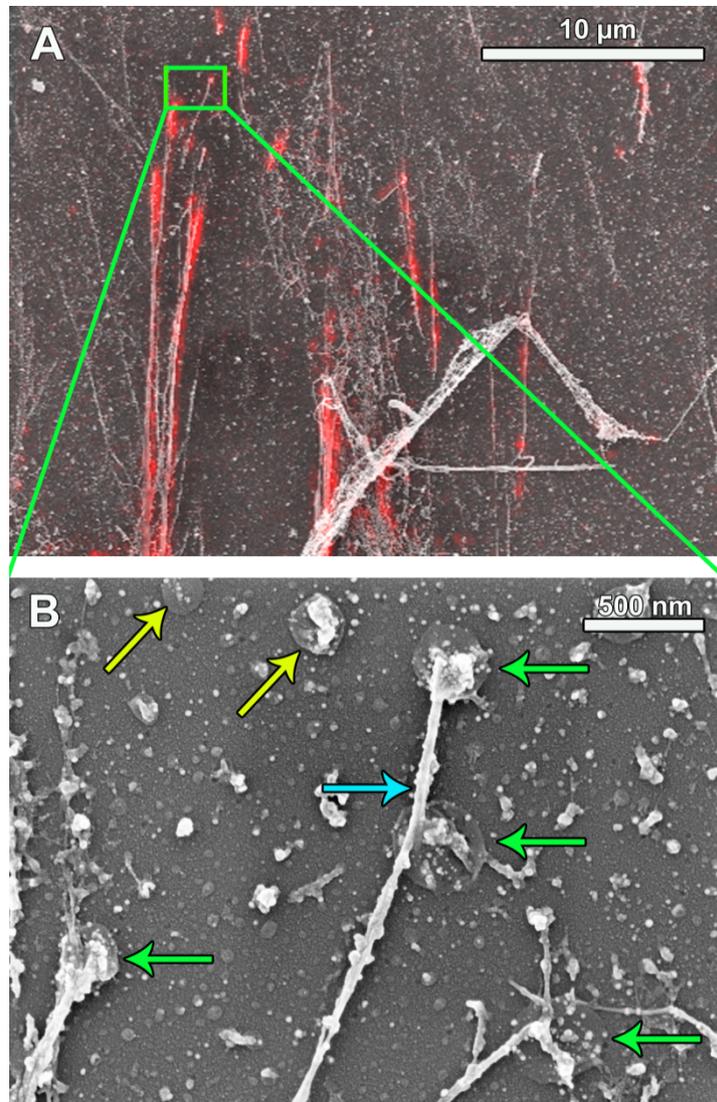


Abbildung 3.11 Vergrößerungsbildserie von lokalisierten FAs-Bereichen an den Enden von Stressfasern. (A) zeigt einen Überlagerungsdatensatz aus LSM- und REM-Daten eines kardialen Fibroblasten. Die Fokaladhäsionen sind über eine Vinculin-Färbung rot markiert. Die grüne Box in (A) markiert den Bereich, der in (B) vergrößert dargestellt wird. Die grünen Pfeile markieren rundliche Strukturen, die direkt mit Filamentbündeln verbunden sind. Über die gelben Pfeile werden rundliche Strukturen markiert, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Aktinfilamenten liegen, aber nicht direkt mit ihnen verbunden sind. Ein feines Aktinbündel (ca. 40 nm), das direkt mit zwei der rundlichen Strukturen assoziiert ist, ist mit einem blauen Pfeil markiert

3.1.4 Goldmarkierung von Adhäsions- assoziierten Strukturen

Die Abbildung 3.12 zeigt eine Vergrößerungsbildserie eines kardialen Fibroblasten. Die Markierung von Vinculin erfolgte hier über einen Sekundärantikörper, an den sowohl ein Fluorophor als auch ein Nanogoldpartikel gebunden ist. Die Überlagerung der LSM- und REM-Daten ist in (A) dargestellt. Die Fokaladhäsionen sind hier rot markiert und das Aktinzytoskelett grün (Alexa 488 Phalloidin). Die grünen Boxen definieren den Bildausschnitt, der nachfolgend vergrößert dargestellt wird. Der grüne Pfeil in (C) markiert eine rundliche Struktur, die ein darüber laufendes Filamentbündel mit dem darunter liegenden Substrat verbindet. Feine Filamentbündel (ca. 20 nm) entspringen bzw. enden an der runden Struktur (\emptyset 330 nm). Die gelben Pfeile markieren verstärkte Goldpartikel des Antikörpers (Abschnitt 2.8.4) mit einem Durchmesser von ca. 30 nm. Auch der in (C) dargestellte hochaufgelöste Bereich, mit seiner rundlichen, Adhäsions- assoziierten Struktur, zeigte in der Überlagerung ein signifikantes Vinculin-Signal in (A).

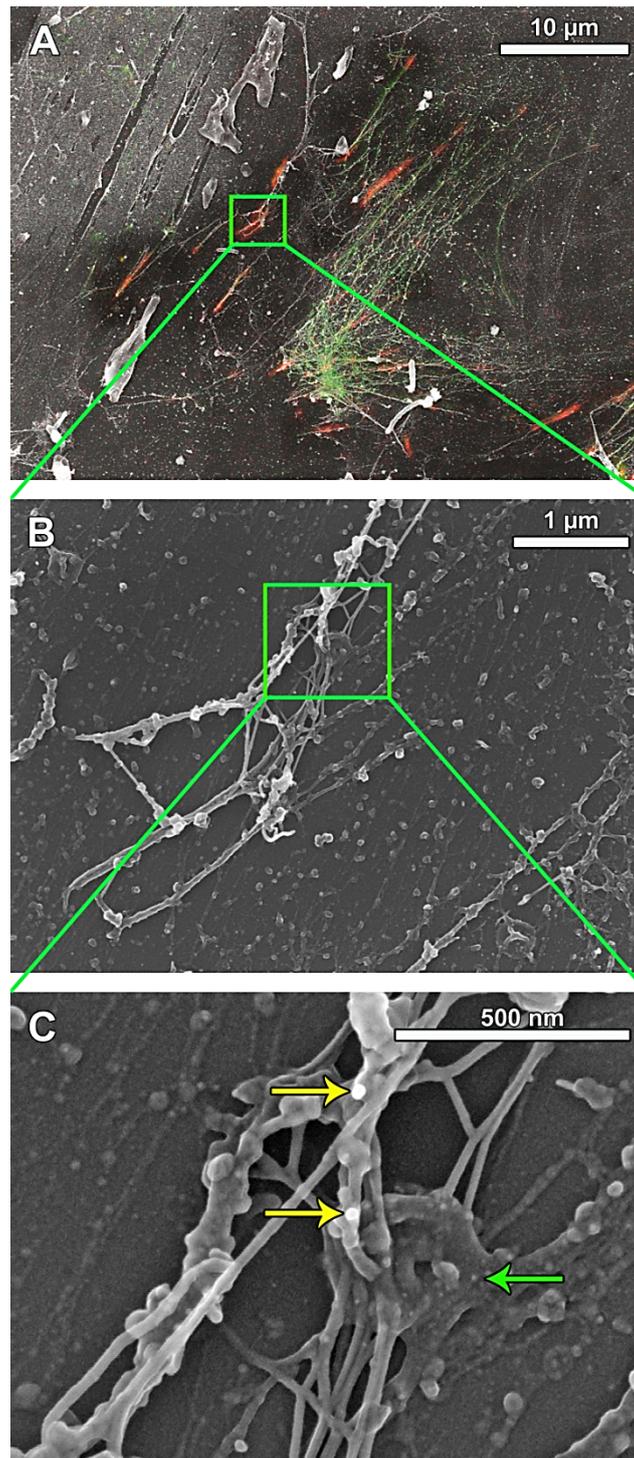


Abbildung 3.12 Vergrößerungsbildserie einer Goldmarkierung von lokalisierten Adhäsions- assoziierten Strukturen. Die Probe wurde mit einem sekundären Antikörper markiert, an dem gleichzeitig ein Fluorophor und an ein Goldpartikel kovalent gebunden ist (s. Text). (A) Datensatz aus der Bildüberlagerung eines kardialen Fibroblasten. Die Fokaladhäsionen sind über Vinculin rot markiert, das Aktinzytoskelett über Alexa 488 Phalloidin grün. Grüne Boxen definieren den Bereich, der in den nachfolgenden Bildern vergrößert dargestellt wird. (C) Der grüne Pfeil markiert eine rundliche Struktur, die direkt mit Filamentbündeln verbunden ist. Die gelben Pfeile in (C) markieren zwei Goldpartikel mit einem Durchmesser von ca 30 nm.

Teil 2

3.2 Erzeugung definierter Mikro-Zellkolonien auf elastischen Silikonkautschuk-Substraten

Die Beschichtung von elastischen Silikonkautschuksubstraten mit Matrixproteinen in Form von definierten „adhäsiven Inseln“ und der damit verbundenen Erzeugung von kleinen definierten Mikrokolonien (μK) mittels einer in dieser Arbeit etablierten Lochmasken-Folie, war ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit.

3.2.1 Fertigung einer mikrostrukturierten Lochmasken-Folie für die Erzeugung geometrisch definierter Zellverbände auf hochelastischen Silikonkautschuk-Substraten

Die Fertigung der hier vorgestellten mikrostrukturierten Folien verlief in drei Schritten:

- Die Abformung der mikrostrukturierten Maske durch Polymerisierung des Folienmaterials
- Die Entfernung der Maske von der Folie
- Das Ablösen der Folie vom Trägermaterial

Für die Herstellung der Folie wurden mikrostrukturierte Stempel aus Silikonkautschuk als Maske benötigt (Stempelherstellung: Abschnitt 2.3). Als Folienmaterial dienten zum einen ein 2-Komponenten Epoxid Kleber (EPO-TEK 302-3M), der unter Wärmezufuhr kreuzvernetzt und zum anderen ein unter ultraviolettem (UV)-Licht aushärtender 1-Komponenten Epoxid-Kleber (EPO-TEK UVO-114) der Firma EPOXY Technology (Billerica, MA, USA). Nachfolgend ist exemplarisch die Herstellung der mikrostrukturierten Folie, unter Verwendung des UV- härtenden Klebers dargestellt. Die Herstellung einer mikrostrukturierten Folie unter Verwendung des 2-Komponenten Epoxid-Klebers erfolgt bis auf den Aushärteprozess (hier: für mindestens drei Stunden bei 65°C) in der gleichen Weise wie für den UV-härtenden Kleber.

Die als Maske dienenden mikrostrukturierten Silikonkautschuk-Stempel (s. Abschnitt 2.3) und Objektträger wurden zunächst silanisiert. Im Anschluss wurden die Stempel auf die Objektträger abgestellt und auf einen UV-Tisch gegeben. Die Stempel wurden nachfolgend mit ca. 30 g schweren Schraubenmuttern (M16 nach DIN 985) beschwert und der UV-härtende 1-Komponenten Epoxid-Kleber um etwa ein Viertel des Stempelrandes platziert. Aufgrund von Kapillar- und Adhäsionskräften zieht sich der Kleber in die Hohlräume zwischen der Mikrostrukturierung des Stempels und dem

Objektträger. Um gewährleisten zu können, dass die gesamten Hohlräume der Mikrostrukturierung vom Klebstoff aufgefüllt wurden, fand die Kreuzvernetzung des Klebers erst 15-20 min nach der Platzierung des Klebers um die Stempel statt. Das Aushärten des UV-Klebers wurde für 40 min bei 312 nm durchgeführt (Abb. 3.13).

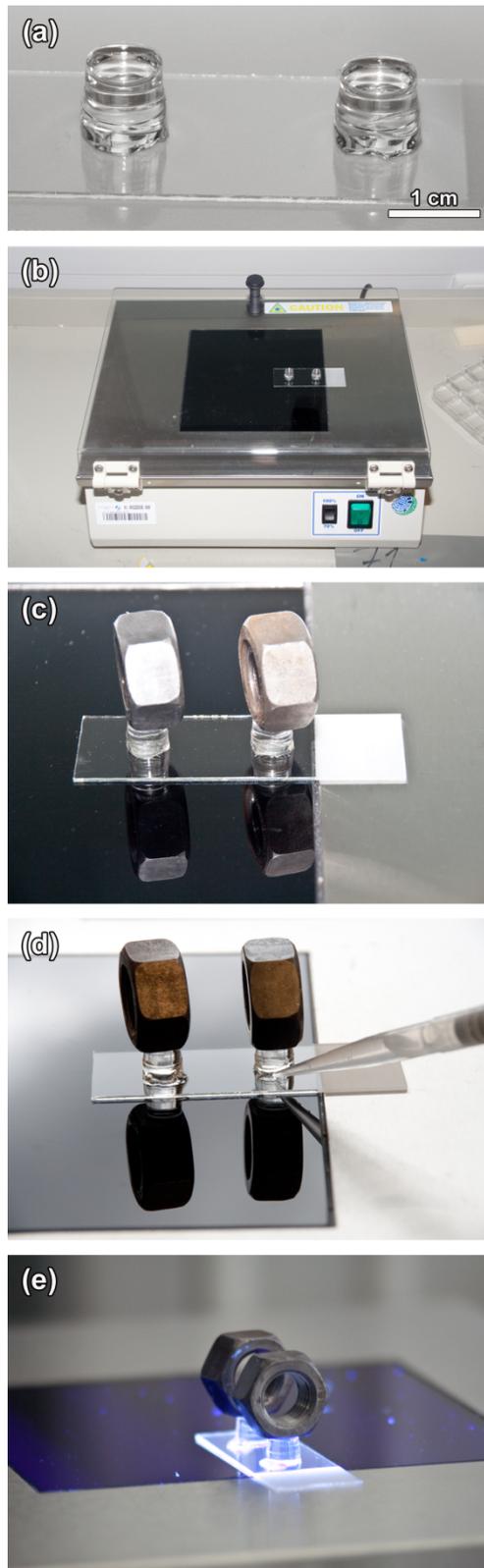


Abbildung 3.13: Folienherstellung – Platzierung des Klebers und anschließende Kreuzvernetzung unter UV-Licht. (A) silanisierte Stempel aus Silikonkautschuk werden auf silanisierte Objektträger positioniert. (B) Der Objektträger mit Stempeln wird auf einen UV-Tisch gegeben. (C) Die Stempel werden mit Schraubenmuttern (M16 nach DIN 934, ca. 30 g) beschwert. (D) UV-Kleber wird mittels Pipette um den Stempelrand platziert. (E) Der Kleber wird unter UV-Bestrahlung ausgehärtet.



Abbildung 3.14: Abnehmen des Silikonkautschukstempels von der ausgehärteten Kleberfolie. Nach der Behandlung mit UV-Licht, wird der mikrostrukturierte Stempel aus Silikonkautschuk von der ausgehärteten Kleberfolie abgelöst.

Nach der Polymerisierung des UV-Klebers wurden die Schraubenmuttern entfernt und die Stempel vorsichtig mit einer Abrollbewegung vom Objektträger gelöst (Abb. 3.14).

Im nächsten Schritt wurde die mikrostrukturierte Folie aus UV-härtendem Kleber mit Hilfe einer Rasierklinge vorsichtig vom Objektträger gelöst und der überschüssige Kleberrand mit einer feinen Schere entfernt. Die gebrauchsfertige Folie hat einen Durchmesser von ca. 1 cm (Abb. 3.15). Die genaue Anwendung der Folie für die Erzeugung von Mikrokolonien ist unter Punkt 3.2.3 aufgeführt.

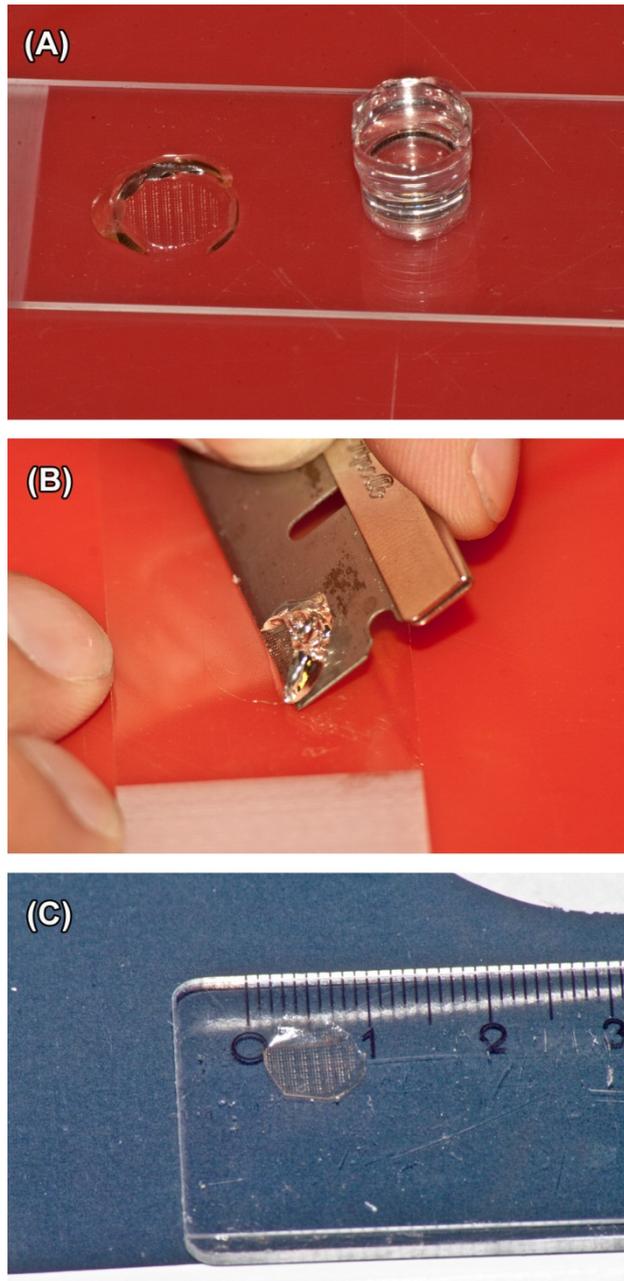


Abbildung 3.15: Ablösen der Kleberfolie. (A) Zeigt die mikrostrukturierte Folie aus UV-härtendem Kleber auf einem silanisierten Objektträger nach der Behandlung mit UV-Licht und nach Ablösen des Silikonkautschukstempels. (B) Mit Hilfe einer Rasierklinge wird die Folie vorsichtig vom Objektträger gelöst. (C) Der überschüssige Kleberrand der mikrostrukturierten Folie wird mit einer feinen Schere entfernt. Die gebrauchsfertige Folie hat einen Durchmesser von ca. 1 cm.

3.2.2 Charakterisierung der mikrostrukturierten Folie

Nach dem Aushärten des Klebers, erhält man eine ca. 10-15 μm dicke Folie mit mikrostrukturierten Löchern mit einer glatten Ober- und Unterseite. Die mikrostrukturierten Löcher der Folie werden im nachfolgenden als Mikrostruktur der Folie bezeichnet. Die Folie verfügt über eine erhöhte Steifigkeit, die für einen Erhalt der Form und Geometrie der Mikrostruktur sorgt. Gleichzeitig ist die Folie aufgrund ihrer geringen Dicke aber flexibel genug, so dass sie eine hohe Biegsamkeit aufweist, ohne dabei zu zerbrechen. Die Abbildung 3.16 zeigt REM-Aufnahmen der mikrostrukturierten Folie aus UV-härtendem Epoxid-Kleber mit unterschiedlichen geometrischen Strukturen. Die Mikrostruktur erscheint in den Aufnahmen heller als die glatte Oberfläche der Folie. Die Abbildung 3.16 (A) zeigt die Aufsicht eines Bereiches des Strukturmusters 1 (Abschnitt 2.3). Von links nach rechts sind unterschiedliche, scharfkantige geometrische Aussparungen mit unterschiedlichen Größen (400 x 400 μm bis 25 x 25 μm) innerhalb der Folie zu erkennen. In der Abbildung 3.16 (A.1) ist die Folie aus (A) nochmals dargestellt. Bei dieser Aufnahme wurde die Probe um 30° geneigt. Zu erkennen ist, neben der Oberseite, auch die Unterseite der Folie, sowie die unterschiedlichen geometrischen Formen der Löcher in der Folie. Ein Teil der Folie ist umgebogen, und verdeutlicht zum einen die Flexibilität der Folie und zum anderen die Kapazität der Folie für die Formerhaltung der verschiedenen geometrischen Muster. Das Strukturmuster 2 (Abschnitt 2.3) ist in Abb. 3.16 (B) und (B.1) dargestellt. Die Aufsicht in (B) zeigt Blöcke von rechteckigen Aussparungen mit unterschiedlichen Kantenlängen des Strukturmusters 2. Die Aufnahme (B.1) zeigt die Folie aus (B) unter einem Beobachtungswinkel von 30°. Hier ist die wiederkehrende Musterabfolge der Mikrostrukturierung über die gesamte Folie deutlich zu erkennen. Eine dritte Folie mit dem Strukturmuster 3 (Abschnitt 2.3), bestehend aus Linien unterschiedlicher Breite, ist in Abb. 3.16 (C) wiedergegeben. Die Linienbreiten von links nach rechts betragen 2, 5, 10, 20, 50 und 70 μm mit jeweils 100 μm Abstand zwischen den einzelnen Linien und wiederholen sich über die Folie. Das Strukturmuster 4, bestehend aus 50 μm breiten Linien mit 50 μm Abstand zueinander ist als elektronenmikroskopisches Bild nicht vorhanden. Es wird jedoch in einer konfokalen lichtmikroskopischen Aufnahme eines Zelladhäsionsexperiment unter Abb. 3.19 dargestellt.

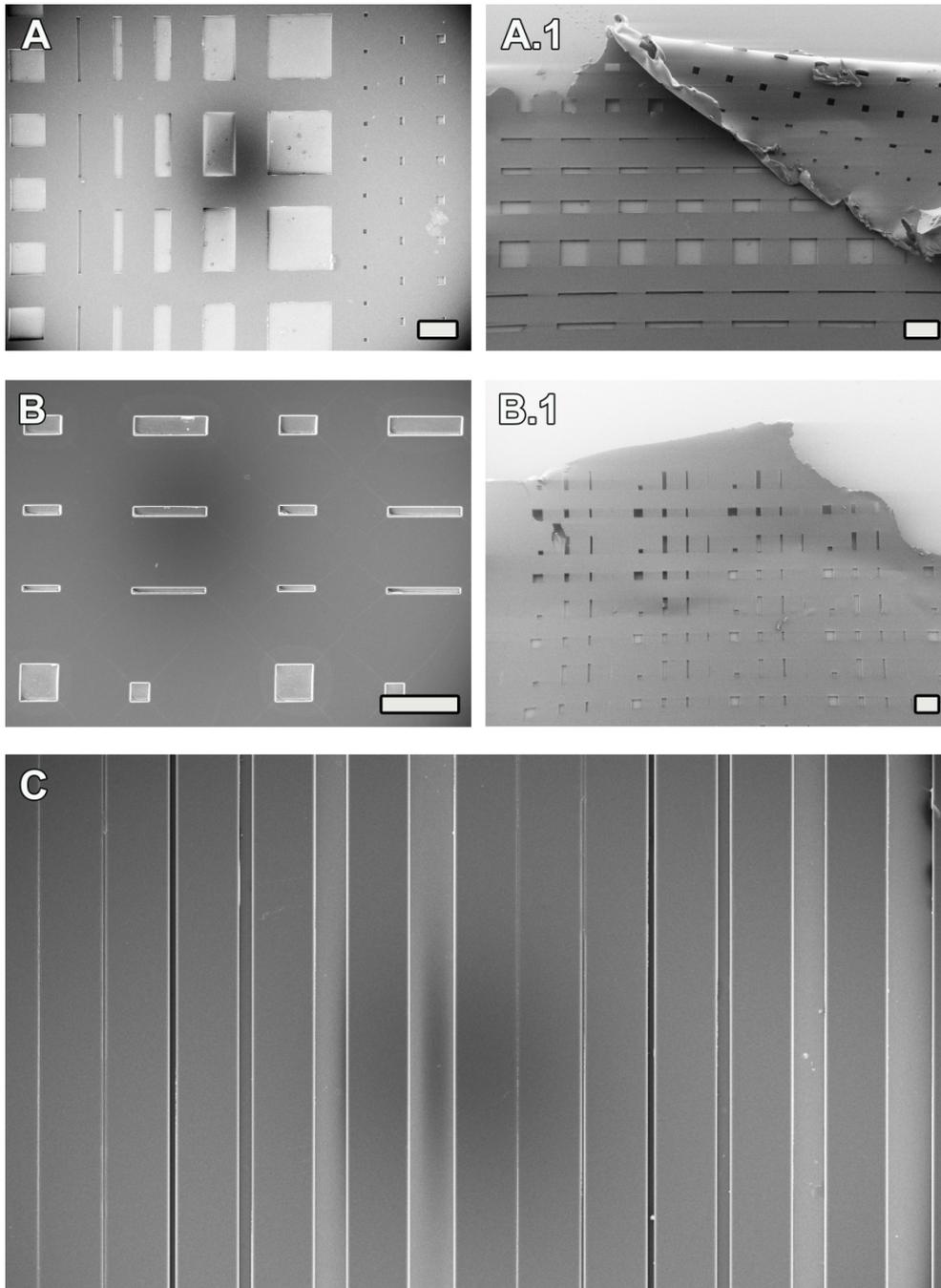


Abbildung 3.16 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen mikrostrukturierter Folien aus UV-härtendem Epoxid-Kleber mit unterschiedlichen geometrischen Strukturen. (A), (B) und (C) mikrostrukturierte Folien. (A) zeigt die Aufsicht einer Folie. Die definierten Aussparungen innerhalb der Folie erscheinen im Vergleich zur glatten Oberfläche der Folie heller. Die (A.1) zeigt das Strukturmuster aus (A) unter einer Probenneigung von 30° . Ein Teil der Folie ist umgebogen. (B) zeigt die Aufsicht einer Folie des Strukturmusters 2. Die Aufnahme (B.1) zeigt die Folie aus (B) unter einer Neigung von 30° . Eine dritte Form der Mikrostrukturierung der Folie ist in (C) wiedergegeben. Sie besteht aus sechs unterschiedlich breiten und sich wiederholenden Streifen. Maßstab: $200\ \mu\text{m}$

3.2.3 Toxizitätsanalyse der mikrostrukturierten Folien aus Epoxid-Kleber

Die Erstellung von mikrostrukturierten Folie mittels der hier verwendeten Kleber konnte in dieser Arbeit bereits gezeigt werden. Für die Arbeit mit Zellen und der Erstellung von Mikrokolonien allerdings musste zunächst ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Folienmaterialien eine toxische Wirkung auf die Zellen ausüben. Hierzu wurden Kurz- und Langzeitkultivierung der Zellen auf beiden Folienmaterialien durchgeführt. Des Weiteren wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob es auf der einen Seite möglich ist, die Folien mit Matrixprotein zu beschichten und auf der anderen Seite Erkenntnisse darüber zu erhalten, inwieweit es hierbei zu einer homogenen Verteilung des Beschichtungsproteins kommt. Die Ergebnisse zu diesen Untersuchungen werden nachfolgend dargestellt.

Die Abbildung 3.17 zeigt Fibroblasten (3T3), die auf den mit Fibronektin beschichteten mikrostrukturierten Folien wachsen. Die Zellen können sowohl auf der Folie, bestehend aus dem ausgehärteten 2-Komponenten Kleber, als auch auf der Folie bestehend aus dem ausgehärteten 1-Komponenten Kleber kultiviert werden. (A) zeigt Fibroblasten 2 h nach der Aussaat auf der Folie aus 2-Komponenten Kleber. Hierbei werden zwei Punkte sehr deutlich. Zum einen sind die meisten Zellen schon auf der Folie adhärirt und zum anderen bedeutet dies gleichzeitig, dass sich die Folien mit Matrixprotein beschichten lassen. Der letztere Punkt wird besonders in der Abb. 3.17 (B) verdeutlicht. Die Abbildung zeigt die Immunfärbung von Fibroblasten, die für 24 h auf der Folie aus UV-härtendem 1-Komponenten Kleber kultiviert und anschließend mittels der Immunfluoreszenz analysiert wurden. Zusätzlich wurde die Lösung aus Beschichtungsprotein (hier: Fibronektin) über einen zugesetzten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus IgG-Atto 633, Verdünnung 1000:1) rot markiert. Hierbei konnte eine homogene Verteilung der Beschichtung auf der Folie nachgewiesen werden. In der Bildmitte ist eine quadratische 100 µm Aussparung in der Folie zu sehen. Auch eine längere Kultivierung von Zellen auf beiden Folientypen zeigte keinerlei morphologischen Einfluss auf die Zellen(C).

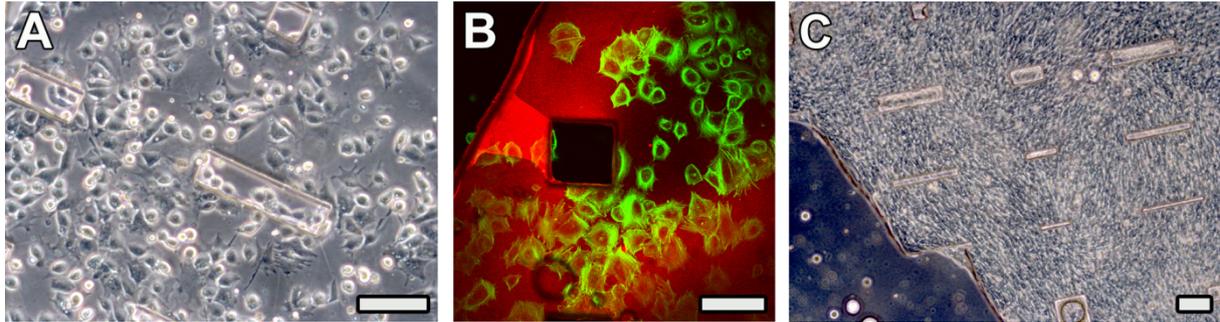


Abbildung 3.17 Mikrostrukturierte Folie mit adhärennten Zellen. (A) 3T3 Fibroblasten 2 h nach Aussaat auf einer mikrostrukturierten Folie, bestehend aus 2-Komponenten Epoxid-Kleber. Einige der Zellen sind vollständig auf der Folie adhärennt. (B) 3T3 Fibroblasten nach einer Immunfärbung. Die Zellen wurden 24 h auf einer mikrostrukturierten Folie bestehend aus dem 1-Komponenten Epoxid-Kleber kultiviert. Das Aktinzytoskelett der Zellen wurde mit Alexa 488 Phalloidin (grün) angefärbt. Die Beschichtung der Folie erfolgte mit Fibronectin. Für die Visualisierung des Fibronectins, sorgte ein sekundärer Antikörper (Ziege-anti-Maus IgG-Atto 633, rot), der zu der Fibronectinlösung hinzugeben wurde. (C) zeigt einen dichten Zellrasen von Fibroblasten nach fünftägiger Kultivierung auf einer mikrostrukturierten, beschichteten Folie. Maßstab: 100 μm .

3.2.4 Fibronectin-Beschichtung auf elastischen Silikonkautschuk-Substraten unter Verwendung einer mikrostrukturierten Folie - Erzeugung definierter Mikrokolonien

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hier etablierten Folien in unterschiedlichen Mikrostrukturierungen hergestellt werden können (Abschnitt 3.2.2). In einem nächsten Schritt wurden die verschiedenen Mikrostrukturierungen der Folien mittels einer Proteinbeschichtung auf elastische Silikonkautschuksubstrate übertragen und im Hinblick auf die Beschichtungseffektivität, als auch auf die Homogenität hin untersucht. Die Kultivierung von Zellen auf diesen adhäsiven Flächen führt zur Bildung definierter Mikrozellkolonien (μZK). Für die Übertragung und Erstellung der nachfolgend gezeigten definierten Flächen des Strukturmusters 1 und 4, bestehend aus dem Matrixprotein Fibronectin, wurden Silikonkautschuk-Substrate (Sylgard 184) mit Elastizitäten von 15 kPa und 10 kPa verwendet. Für die Visualisierung der Beschichtung wurde der Fibronectinlösung ein fluoreszierender sekundärer Antikörper zugesetzt. Das Aktinzytoskelett der Zellen wurde mit Hilfe Alexa Fluor 488 Phalloidin markiert.

Für die Erstellung der mikrostrukturierten Flächen aus Fibronectin wird die Folie auf die Silikonkautschukoberfläche aufgebracht und mit der Fibronectin-Lösung überdeckt. Da sich an den Ecken der geometrisch definierten Aussparungen der Folie Luftblasen bildeten und es somit in diesen Bereichen zu keiner Beschichtung kommen kann, werden die Probenkammern mit der Folie und der Fibronectin-Lösung in einen Exsikkator gegeben und dort kurz unter Vakuum entgast. Danach folgte die Inkubation für 30-60 min bei 37°C. Im nächsten Schritt wird die Fibronectin-Lösung entfernt und

das Substrat mit der noch verbleibenden Folie mehrmals unter Schwenken der Probenkammer mit 2 ml PBS bei RT gewaschen, um etwaige Fibronectin-Reste zu beseitigen. Die Waschlösung wird entfernt und die Folie anschließend mit einer feinen Pinzette vorsichtig von der Oberfläche des Substrats abgelöst. Vor dem nächsten Schritt wird das Substrat nochmals zweimal mit Pufferlösung (PBS) gewaschen. Nach diesem Waschschrift erfolgte die Passivierung der Bereiche ohne die Fibronectin-Beschichtung mit 1% Pluronic 127 in deionisiertem Wasser. Pluronic 127 ist ein nicht-toxisches Poloxamer, das als nicht-ionisches Tensid stark an die hydrophoben Ketten der Silikonkautschuk-Oberfläche bindet, allerdings nicht an die hydrophilen Regionen der Fibronectin-Beschichtung (Tan et al., 2004; Raghavan et al., 2010; Amiji & Park, 1992; Bohner, Ring, & Caldwell, 2002). Durch diese zusätzliche Behandlung der Oberflächen sind die Zellen nicht in der Lage außerhalb der adhäsiven Flächen aus Fibronectin an das Substrat zu binden. Für die Passivierung wurden 500 µl der Pluronic-Lösung auf die elastischen Silikonkautschuksubstrate gegeben und für 20-30 min bei 37°C inkubiert. Nachfolgend wird die Pluronic-Lösung entfernt und die Oberflächen dreimal mit je 2 ml deionisiertem Wasser gewaschen. Erst dann erfolgte die Aussaat der Zellen mit einer Konzentration zwischen $7,5 \cdot 10^4$ bis $1 \cdot 10^5$ Zellen pro Zellsubstrat.

Die Abbildung 3.18 (A) bis (D) zeigt vier unterschiedliche Mikrokolonien nach Färbung gegen Aktin, bestehend aus primären Myozyten und Fibroblasten auf einem Elastomer Substrat mit einer Steifigkeit von 15 kPa, die auf definierten adhäsiven Inseln aus Fibronectin (markiert über Ziege-anti-Maus IgG-Atto 633) adhärirt sind. Die Zellen wurden vor der Färbung für 12 Stunden auf den Substraten kultiviert. Die Strukturierung unter Verwendung der Folie des Strukturmusters 1 liefert scharfkantige, adhäsive Inseln aus Fibronectin (roter Kanal in Bild (A) bis (D)), die den adhärierenden Zellverbänden eine Adhäsionsfläche vorgeben. Die Zellen, die auf diesen Fibronectin-Flächen wachsen, füllen den ihnen gegebenen Platz vollständig aus und bilden kleine definierte Zellverbände bzw. Mikrokolonien aus. Die Zellen auf den Fibronectin-Inseln wachsen nicht über die Grenzen der Beschichtung hinweg, sondern bleiben auf die adhäsiven Flächen beschränkt. Dieser Effekt ist deutlich in den Überlagerungskämen der Abbildung 3.18 (A) bis (D) zu erkennen. Die Beschichtung innerhalb der Mikrostrukturen ist nahezu homogen verteilt.

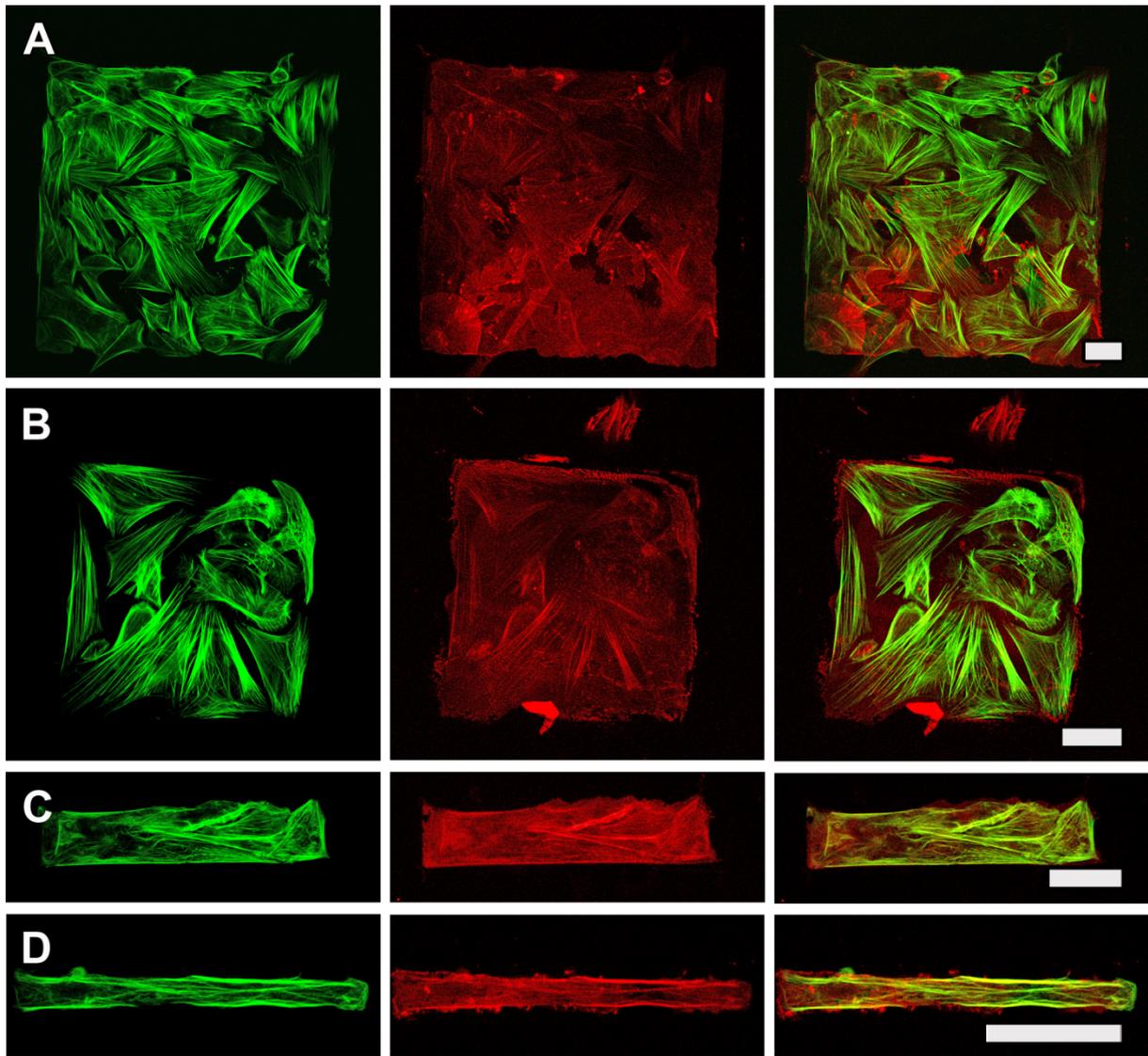


Abbildung 3.18 Rechteckige adhäsive Flächen aus Fibronectin und die Erstellung von Mikrokolonien aus primären Myozyten und Fibroblasten unter Verwendung einer mikrostrukturierten Folie. (A) bis (D) zeigen vier unterschiedliche Mikrokolonien aus primären Myozyten und Fibroblasten erstellt unter Verwendung einer Folie des Strukturmusters 1. Das Aktinzytoskelett der Zellen ist grün markiert (Alexa 488 Phalloidin). Die adhäsiven Flächen aus Fibronectin sind über die Zugabe eines fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper (Ziege-anti Maus Atto 633) rot markiert. Die Zellen füllen die ihnen gegebenen adhäsiven Flächen aus Fibronectin aus und wachsen nicht über den Rand der adhäsiven Flächen hinweg. Maßstab: 50 μm .

Mit Hilfe der Folie lassen sich ebenfalls Mikrostrukturierungen aus Matrixprotein mit hohen Aspektverhältnissen auf elastische Silikonkautschuksubstraten übertragen. Die Abbildung 3.19 zeigt adhäsive 50 μm breite Linien aus Fibronectin (rot, Alexa Fluor® 546 Ziege-anti Hase IgG (H+L)) auf einer 10 kPa Oberfläche, die mit einer Folie des Strukturmusters 4 erstellt wurde und mit Fibroblasten (3T3) (grün) bewachsen ist. Die Beschichtung mit Fibronectin ist nicht über die gesamte Länge der adhäsiven Inseln gleichmäßig homogen verteilt (markiert durch die gelben Pfeile in (B)). In diesen Randbereichen sind keine Zellen adhärirt (C). Bis auf diese kleinen Randbereiche sind die länglichen adhäsiven Bereiche der Oberfläche vollständig mit Zellen bedeckt und bilden die längliche, scharfe Abgrenzung zum umliegenden Substrat aus

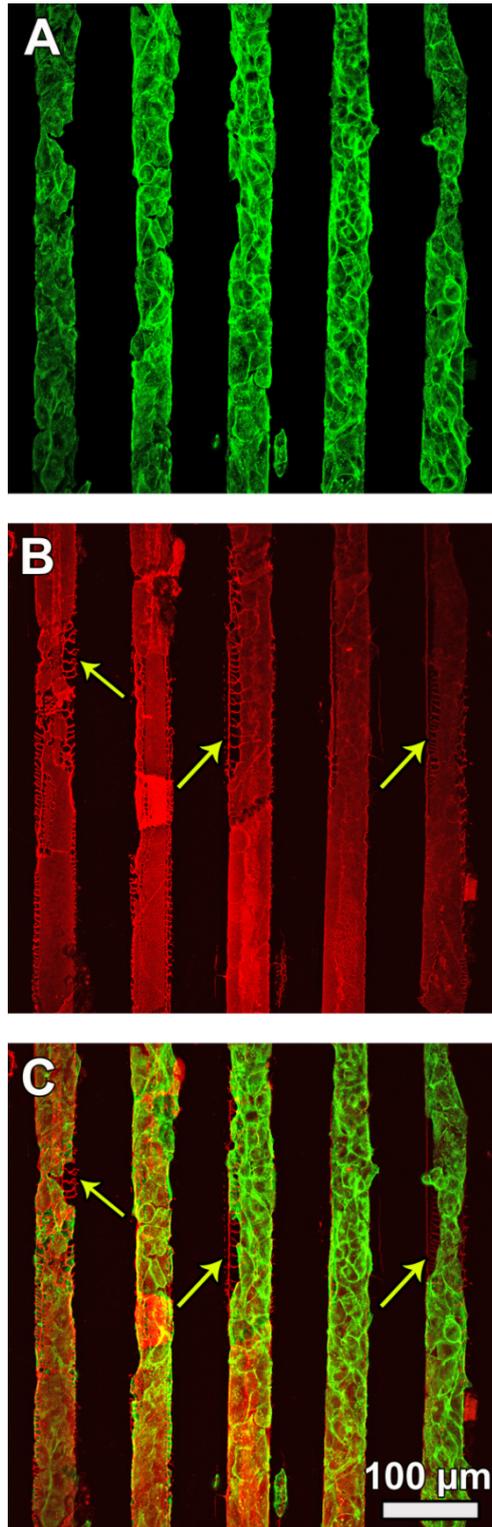


Abbildung 3.19 Definierte adhäsive Linien aus Fibronektin und die Erstellung von Mikrokolonien unter Verwendung einer mikrostrukturierten Folie auf 10 kPa Substraten aus PDMS. (A) 50 µm breite längliche Zellkolonien (grün, Alexa Fluor® 488 Phalloidin), die auf länglichen adhäsiven Fibronektin-Inseln (rot, Alexa Fluor® 546 Ziege-anti-Hase). Die gelben Pfeile in (B) markieren Bereiche, an denen es keine homogene Beschichtung durch Fibronektin gibt. (C) In diesen Bereichen sind auch keine Zellen anzutreffen.

3.2.5 Geometrisch definierte Zellverbände auf verschiedenen hochelastischen Silikonkautschuk-Substraten

Für die Erzeugung geometrisch definierter Zellverbände wurde die mikrostrukturierte Folie auf Silikonkautschuk-Substraten (Sylgard® 184 und MED-6340) platziert und anschließend durch die Folie mit Fibronectin beschichtet. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen zum einen jeweils eine Übersichtsaufnahme dieser definierten Zellverbände aus primär isolierten Myozyten und Fibroblasten und zum anderen Vergrößerungen von beispielhaften Zellverbänden auf den jeweiligen Oberflächen, markiert durch rote und blaue Boxen. Exemplarisch werden hier Zellverbände für zwei unterschiedliche Elastizitäten von 15 kPa bzw. < 2kPa dargestellt. Für eine bessere Visualisierung der Zellverbände wurde das Aktinzytoskelett (grün) der Zellen angefärbt, sowie das myozytenspezifische Protein α -Actinin (rot) immunhistologisch markiert. Die Beschichtung der Silikonkautschuk-Substrate erfolgte mit mikrostrukturierten Folien der Strukturmuster 1-3, die unter Abschnitt 2.3 vorgestellt wurden.

Definierte Zellverbände auf PDMS-Oberflächen mit einer Elastizität von 15 kPa

Für die Herstellung von elastischen Silikonkautschuk-Substraten mit einer Steifigkeit von 15 kPa dienen die 2-Komponenten PDMS-Elastomer Systeme MED-6340 und Sylgard® 184.

Die Abbildung 3.20 (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme von distinkten und definierten Zellverbänden nach dem Strukturmuster 2 auf einer Substrat bestehend aus MED-6340. Die Beschichtung der Oberflächen durch die Folie mit Matrixprotein resultiert in unterschiedlichen und scharfkantigen Zellverbänden. Beispielhaft hierfür sind zwei geometrisch unterschiedliche Zellverbände, markiert durch die rote und blaue Box, in (B) und (C) vergrößert dargestellt. Vereinzelt sind die feinen rechteckigen Strukturen nicht vollständig mit Zellen bewachsen. Die Markierung über α -Actinin zeigt, dass viele Myozyten in den einzelnen definierten μ ZK vorhanden sind. Zellen, die sich direkt an den Rändern der Zellverbände befinden zeigen eine eher gestreckte und längliche Morphologie auf. Dies gilt vor allem für die Zellen an den Rändern der rechteckigen μ ZK. Zellen in quadratischen Zellverbänden zeigen eine etwas andere Morphologie. Die Zellen sind über einen nahezu rechten Winkel in den Ecken der quadratischen Kolonie aufgespannt.

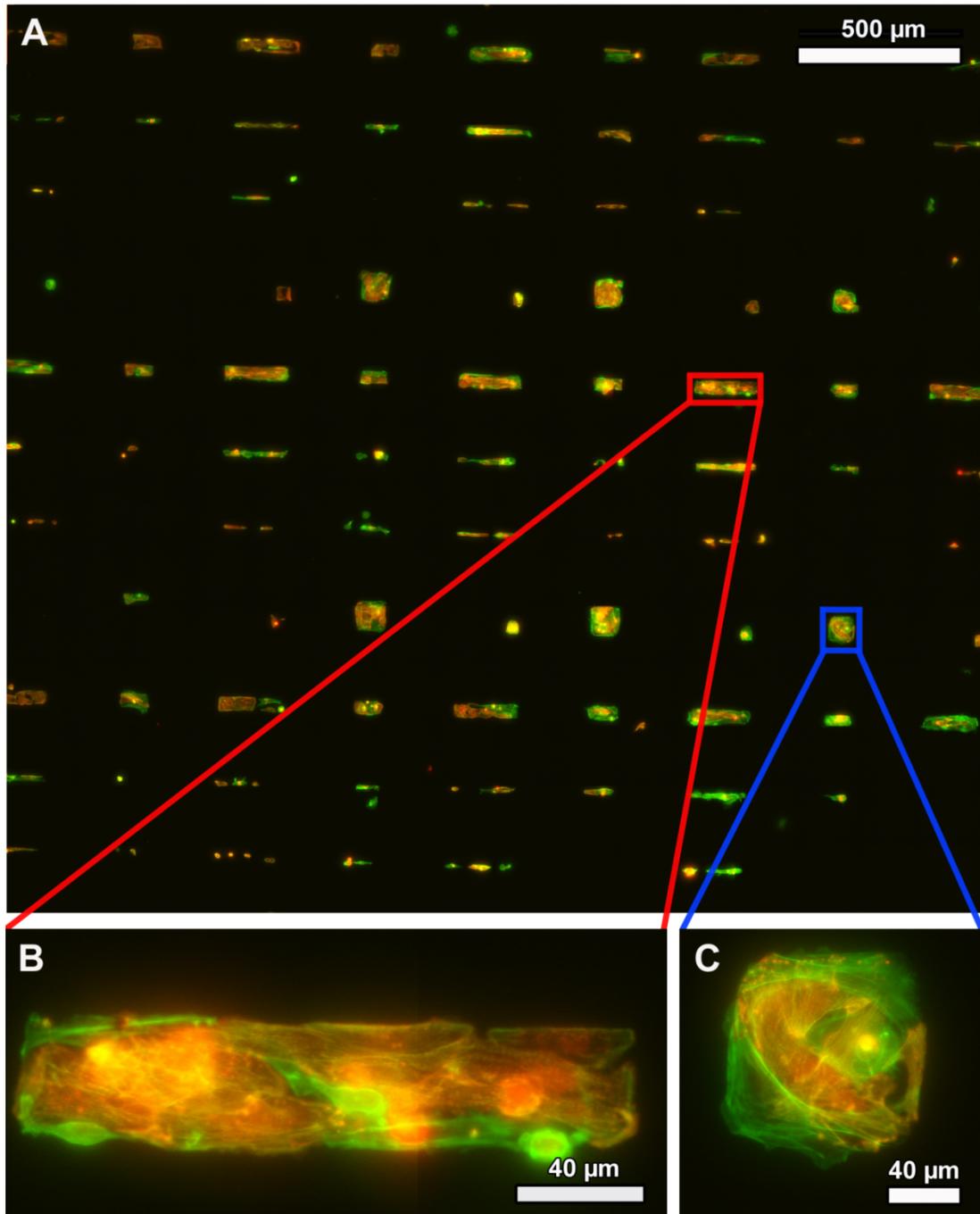


Abbildung 3.20 Definierte Zellverbände aus primären Myozyten und Fibroblasten auf einem elastischen Silikonkautschuk-Substrat (MED-6340) mit einer Elastizität von 15 kPa. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme definierter Zellverbände aus Myozyten und Fibroblasten. Die Beschichtung der Oberfläche erfolgte durch eine Folie des Strukturmusters 2. Das Aktinzytoskelett ist in grün dargestellt, das Protein α -actinin ist rot markiert. (B) und (C) zeigen Vergrößerungen zweier Zellverbände mit unterschiedlicher Geometrie, markiert durch die rote und blaue Box.

Die Abbildung 3.21 (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme der definierten μ ZK nach dem Strukturmuster 2 auf einem Substrat bestehend aus Sylgard® 184. Der hier dargestellte Ausschnitt der Oberfläche ist größer als der in Abb. 3.20 gezeigte. Es sind weitaus mehr μ ZK zu erkennen. Auch hier sind vereinzelte μ ZK auszumachen, die nicht vollständig mit Zellen bewachsen sind. Die Vergrößerungen einer rechteckigen (B) und einer quadratischen (C) Zellkolonie zeigt scharfkantige Zellgrenzen zum umliegenden Substrat auf. Zudem zeigt hier die gestreifte α -Actinin-Färbung an, dass deutlich mehr Myozyten in den Kolonien vorhanden sind als Fibroblasten. Dies gilt auch für die beiden vergrößerten Kolonien in (B) und (C). Zellen, die rechteckige μ ZK bilden, zeigen im Vergleich zu quadratischen Kolonien eine eher gestreckte Morphologie auf. Während in quadratischen Kolonien die Zellen ausgedehnter und rundlicher aussehen. Ausnahmen sind hier allerdings die Zellen, die sich in den Randbereichen befinden. Sie spannen sich entweder über die Ecken auf oder richten sich entlang der Kanten aus, wie in Abb. 3.20 (C) zu sehen.

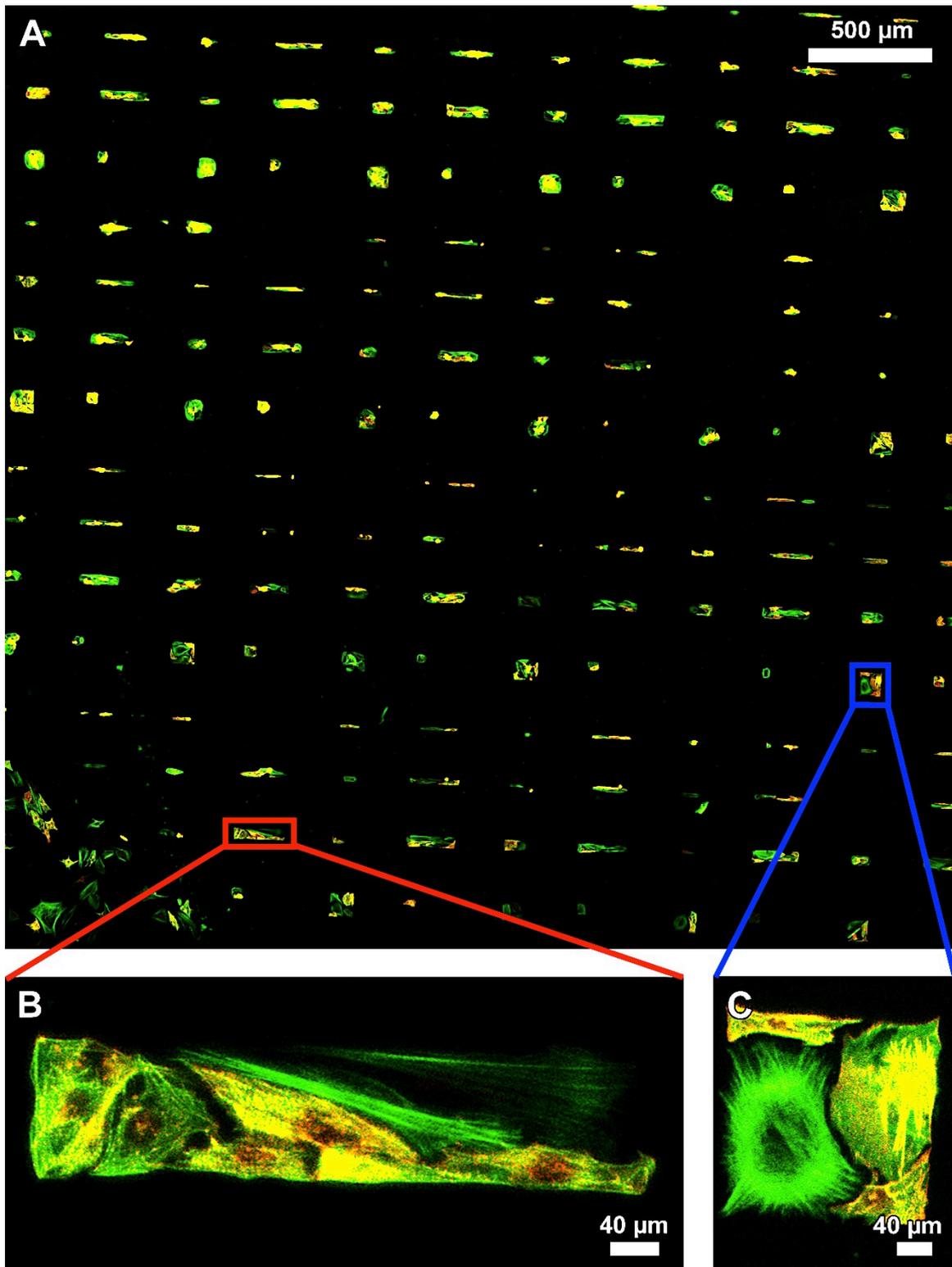


Abbildung 3.21 Definierte Zellverbände aus primären Myozyten und Fibroblasten auf einem elastischen Silikonkautschuk-Substrat (Sylgard 184) mit einer Elastizität von 15 kPa. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme definierter Zellverbände aus Myozyten und Fibroblasten. Die Beschichtung der Oberfläche erfolgte durch eine Folie des Strukturmusters 2. Das Aktinzytoskelett ist in grün dargestellt, das Protein α -actinin ist rot markiert. (B) und (C) zeigen Vergrößerungen zweier Zellverbände mit unterschiedlicher Geometrie, markiert durch die rote und blaue Box.

In Abbildung 3.22 sind Mikro-Zellkolonien auf einer elastischen Oberfläche aus Sylgard® 184 dargestellt, die durch eine Folie des Strukturmusters 1, erstellt wurden. Die Übersichtsaufnahme (A) zeigt unterschiedliche scharfkantige, in ihrer Größe variierenden μ ZK. Die Vergrößerungen ausgewählter μ ZK ist in (B) und (C) wiedergegeben. Die kleine Kolonie in (B) liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zu den quadratischen $400 \times 400 \mu\text{m}$ großen Zellverbänden und besteht aus Myozyten (α -Actinin). Die Vergrößerung in (C) zeigt eine μ ZK, die hauptsächlich aus Fibroblasten besteht. In der linken unteren Ecke sind Myozyten lokalisiert, die im rechten Winkel entlang der Grenzen des Zellverbandes adhärirt sind.

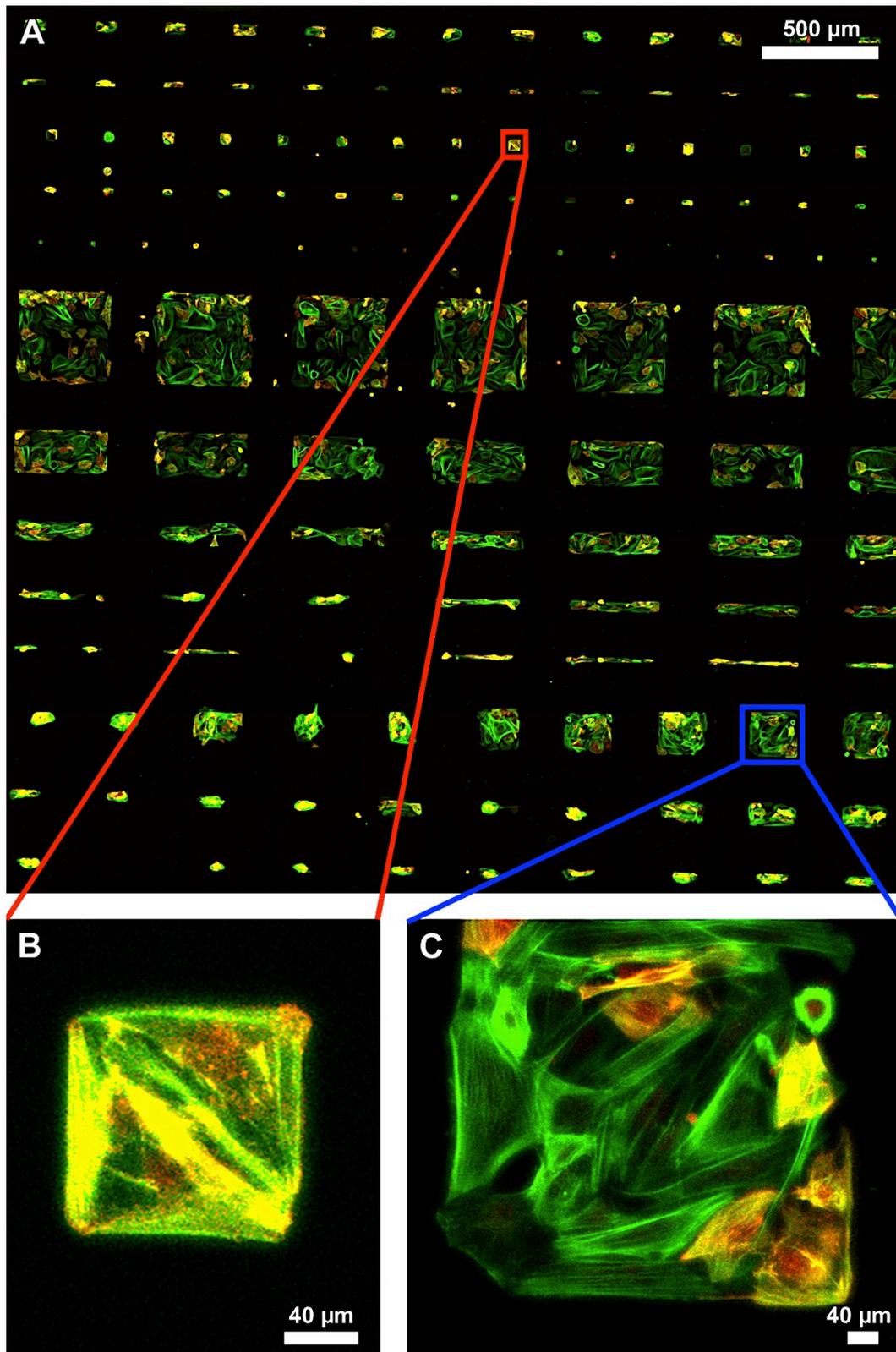


Abbildung 3.22 Definierte Zellverbände aus primären Myozyten und Fibroblasten auf elastischer PDMS-Oberfläche (Sylgard 184) mit einer Elastizität von 15 kPa. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme definierter Zellverbände aus Myozyten und Fibroblasten. Die Beschichtung der Oberfläche erfolgte durch eine Folie des Strukturmusters 1. Das Aktinzytoskelett ist in grün dargestellt, das Protein α -actinin ist rot markiert. (B) und (C) zeigen Vergrößerungen zweier quadratischer Zellverbände, markiert durch die rote und blaue Box.

Eine weitere Möglichkeit der Mikro-Zellkolonie Anordnung ist in Abbildung 3.23 zu sehen. Hier sind die Zellen in unterschiedlich breiten und durchgehenden Linien (Strukturmuster 3) auf der elastischen Oberfläche (Sylgard® 184) angeordnet. In den Vergrößerungen (B) und (C) ist deutlich zu erkennen, dass diese Linien ebenfalls scharfe Kanten aufweisen. Im Vergleich zu den eckigen Strukturen in den vorherigen Abbildungen, besitzen die Zellen hier durchgehend eine längliche und gestreckte Morphologie. Des Weiteren sind die Zellen entlang der Linien angeordnet.

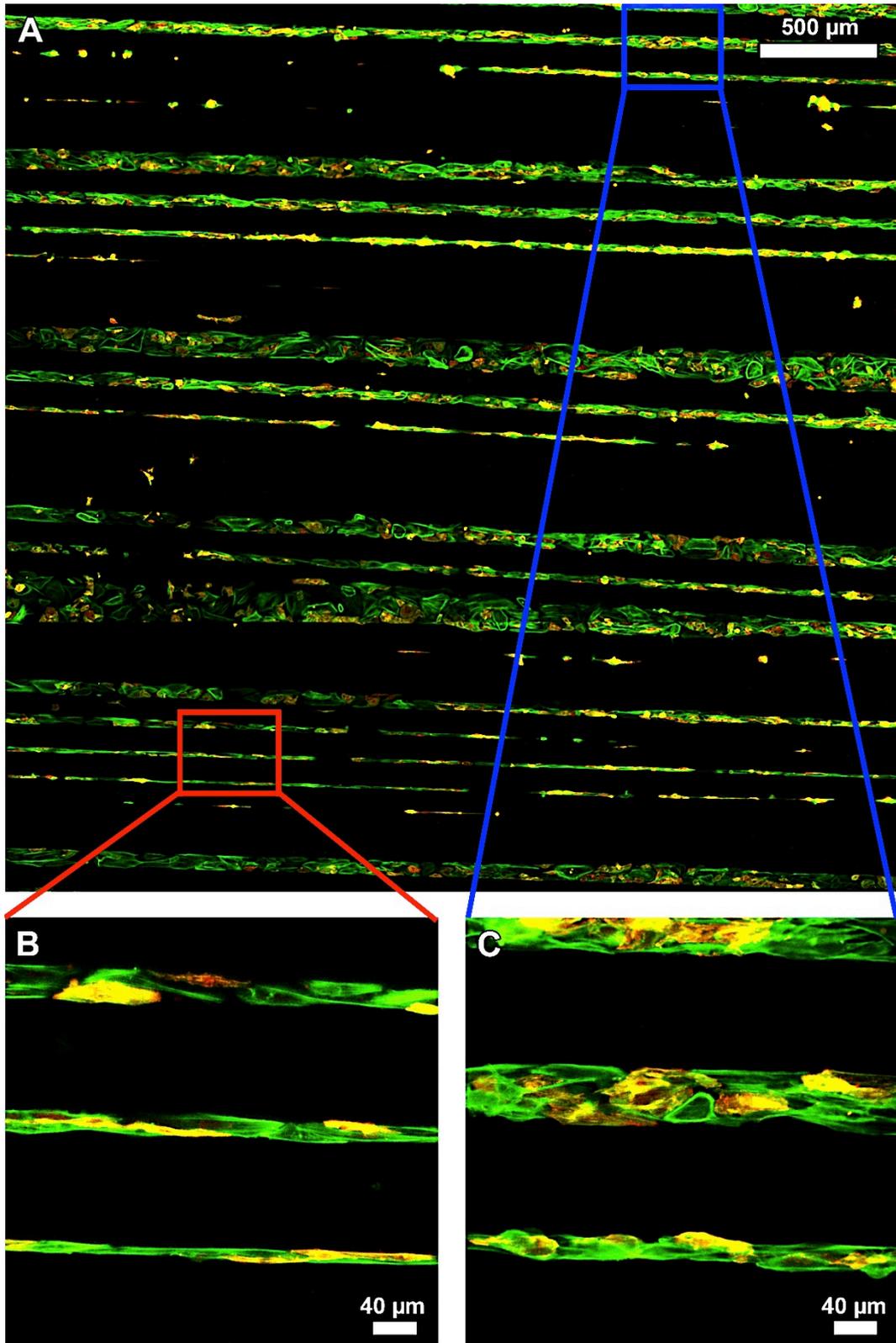


Abbildung 3.23 Definierte Zellverbände aus primären Myozyten und Fibroblasten auf elastischer PDMS-Oberfläche (Sylgard 184) mit einer Elastizität von 15 kPa. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme definierter Zellverbände aus Myozyten und Fibroblasten. Die Beschichtung der Oberfläche erfolgte durch eine Folie des Strukturmusters 3. Das Aktinzytoskelett ist in grün dargestellt, das Protein α -actinin ist rot markiert (B) und (C) zeigen Vergrößerungen von unterschiedlich breiten Linien aus Zellen, markiert durch die rote und blaue Box.

Definierte Zellverbände auf PDMS-Oberflächen mit einer Elastizität von < 2 kPa

Für die Herstellung von elastischen Oberflächen mit einer Steifigkeit von < 2 kPa diente das 2-Komponenten PDMS-Elastomer Systeme Sylgard® 184.

Die Abbildung 3.24 (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme von Zellverbänden nach dem Strukturmuster 2. Die Beschichtung der Oberflächen durch die Folie mit Matrixprotein resultiert in unterschiedlichen Zellverbänden, die weniger scharfkantig sind, als die zuvor gezeigten Kolonien auf 15 kPa Oberflächen. Dies wird deutlich in den Vergrößerungen (B) und (C). Die hier gezeigten Kolonien weisen eine rechteck-ähnliche Geometrie auf mit weichen Kantenabgrenzungen zum umliegenden Substrat. Im Vergleich zu den in Abb. 3.20 und 3.21 gezeigten μ ZK auf 15 kPa Oberflächen sind hier mehr μ ZK auszumachen, die nicht vollständig mit Zellen bewachsen sind. Dies gilt vor allem für die kleinen feinen länglichen „rechteckigen“ Kolonien.

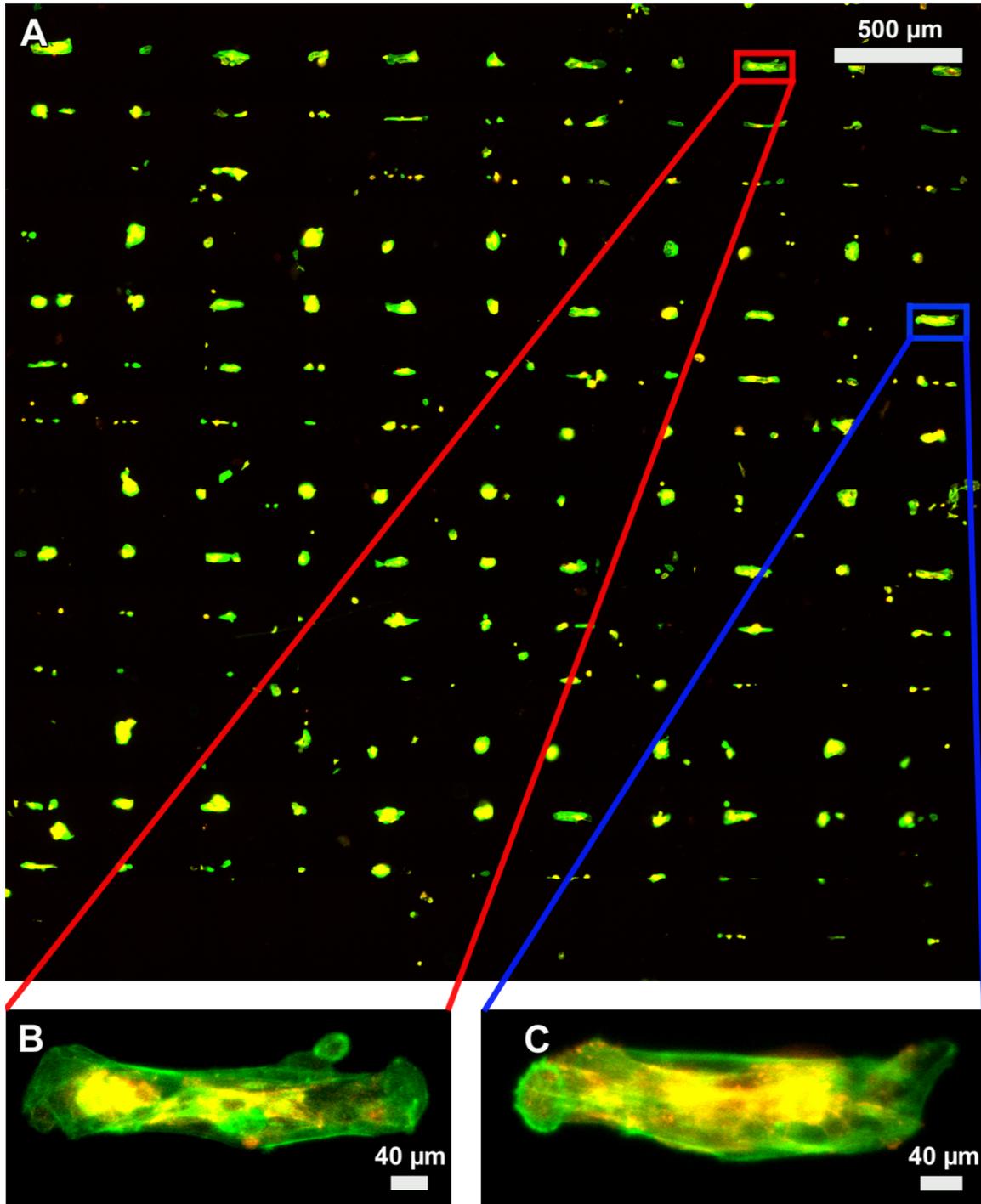


Abbildung 3.24 Definierte Zellverbände aus primären Myozyten und Fibroblasten auf elastischer PDMS-Oberfläche (Sylgard 184) mit einer Elastizität von 2 kPa. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme definierter Zellverbände aus Myozyten und Fibroblasten. Die Beschichtung der Oberfläche erfolgte durch eine Folie des Strukturmusters 2. Das Aktinzytoskelett ist in grün dargestellt, das Protein α -actinin ist rot markiert. (B) und (C) zeigen Vergrößerungen zweier rechteckiger Zellverbände, markiert durch die rote und blaue Box.

Die Abbildung 3.25 zeigt μ ZK, die durch die Beschichtung einer Folie mit dem Strukturmuster 1 erzeugt wurden. Dieses Strukturmuster liefert neben kleinen und sehr kleinen Zellverbänden auch deutlich größere Zellkolonien als das Strukturmuster 2. Die μ ZK im Allgemeinen, aber besonders die größeren μ ZK zeigen in der Übersichtsaufnahme deutlich schärfere Grenzen zum umliegenden Substrat auf (A). Dies spiegelt besonders die Vergrößerung der Zellkolonie in (C) wieder. Hier weist der Verband in der oberen linken Ecke zwei scharfe Seitenkanten auf. Die beiden übrigen Seiten zeigen eine Einstülpung (roter Pfeil) bzw. ein Auswachsen der Zellen über die Zellverbandsgrenze hinaus auf (blauer Pfeil). Die Abb. 3.25 (B) zeigt eine μ ZK, die sich auf der Probe in direkter Nachbarschaft zu der in (C) gezeigten Kolonie befindet. Sie weist eine quadratische Grundform auf. Vergleicht man die beiden Zellkolonien miteinander, erkennt man, dass die Kolonie in (B) Kanten zum umliegenden Substrat aufweist, diese aber nicht so klar sind wie in (C).

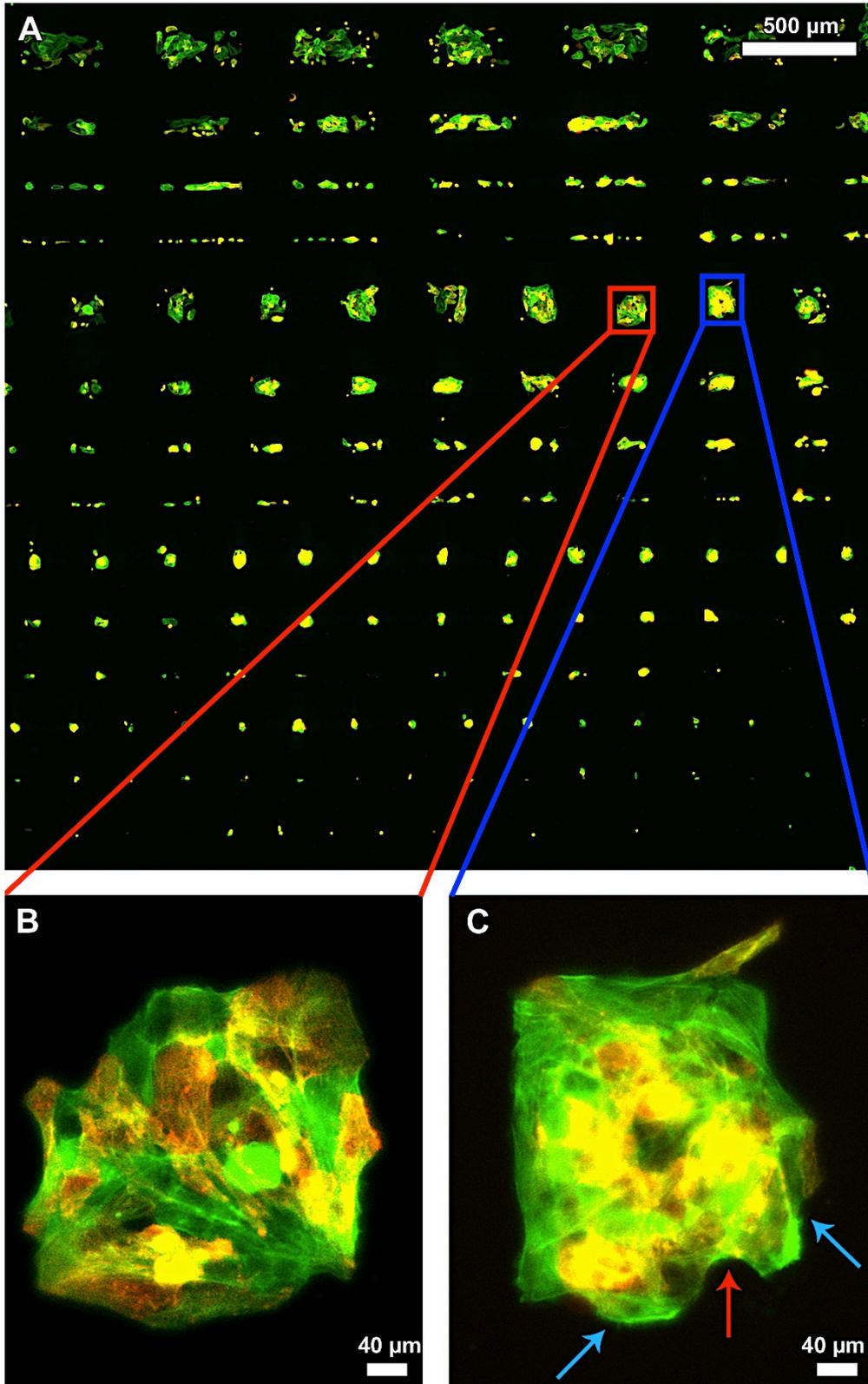


Abbildung 3.25 Definierte Zellverbände aus primären Myozyten und Fibroblasten auf elastischer PDMS-Oberfläche (Sylgard 184) mit einer Elastizität von < 2 kPa. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme definierter Zellverbände aus Myozyten und Fibroblasten. Die Beschichtung der Oberfläche erfolgte durch eine Folie des Strukturmusters 1. Das Aktinzytoskelett ist in grün dargestellt, das Protein α -actinin ist rot markiert. (B) und (C) zeigen Vergrößerungen zweier quadratischer Zellverbände, markiert durch die rote und blaue Box.

Die Abbildung 3.26 zeigt Mikro-Zellkolonien, die in unterschiedlich breite Linien (Strukturmuster 3) auf der Oberfläche (< 2 kPa) angewachsen sind. Vergleicht man diese Aufnahme mit der in Abb. 3.23 erkennt man, dass die Linien aus Zellen teilweise unterbrochen sind. Deutlich zu erkennen ist dies bei den feinen Linien aus Zellen. Die zuvor gezeigten μ Zk auf Oberflächen mit einer Elastizität von < 2 kPa zeigten nur ansatzweise scharfe Abgrenzungen zum umgebenden Substrat. Die hier dargestellten Linien aus Zellen allerdings weisen trotz einer Elastizität von < 2 kPa scharfe Zellabgrenzungen auf. In den Abbildungen 3.26 (B) und (C) ist dies deutlich zu erkennen. Die beiden breiteren Linien sind vollständig mit Zellen bewachsen, wohingegen die feine Linie in (B) nur vereinzelte Zellen aufzeigt.

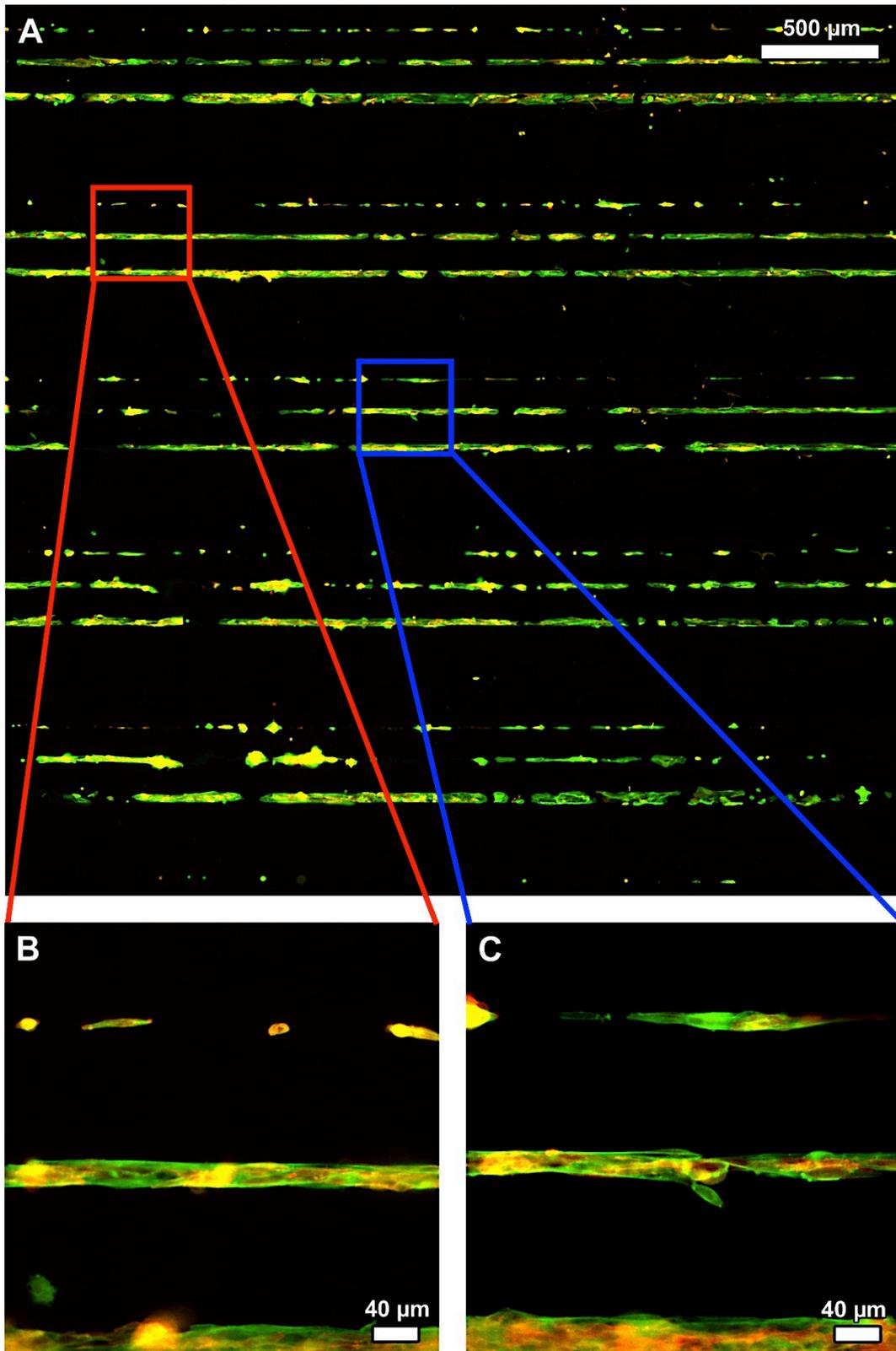


Abbildung 3.26 Definierte Zellverbände aus primären Myozyten und Fibroblasten auf elastischer PDMS-Oberfläche (Sylgard 184) mit einer Elastizität von < 2 kPa. (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme definierter Zellverbände aus Myozyten und Fibroblasten. Die Beschichtung der Oberfläche erfolgte durch eine Folie des Strukturmusters 3. Das Aktinzytoskelett ist in grün dargestellt, das Protein α -actinin ist rot markiert. (B) und (C) zeigen Vergrößerungen von unterschiedlich breiten Linien aus Zellen, markiert durch die rote und blaue Box.

3.2.6 Geometrisch definierte Zellverbände auf elastischen PDMS-Substraten mit eingebetteten fluoreszierenden Kugeln

Auf elastischen Substraten könne Zellkräfte analysiert werden. In unserer Arbeitsgruppe werden hierfür Silikonkautschuk-Substrate mit eingebetteten fluoreszierenden Kugeln verwendet. Auch diese Substrate können mit Hilfe der Folie mikrostrukturiert

Für die Herstellung elastischer Substrate mit eingebetteten fluoreszierenden Kugeln, wurde das 2-Komponenten-System Sylgard® 184 verwendet. Diese Substrate wurden unter Verwendung der mikrostrukturierten Folie beschichtet. Für die Erstellung von μ ZK auf den Substraten dienten primäre Myozyten und Fibroblasten bzw. Fibroblasten der Zelllinie 3T3. Das Aktinzytoskelett der Zellen wurde unter Verwendung des Phalloidintoxins grün markiert.

Die Abbildung 3.24 zeigt unterschiedliche Mikro-Zellkolonien auf 15 kPa Substraten mit eingebetteten fluoreszierenden Kugeln. Die Abb. 3.27 (A) zeigt eine Übersichtsaufnahme mit vier definierten Zellkolonien aus Fibroblasten (3T3), die durch die Beschichtung der Substrate mit einer Folie des Strukturmusters 2 erstellt wurden. Alle vier Kolonien zeigen scharfe Zellabgrenzungen auf. Die deutlich zu erkennenden roten Linien rühren von einer ungenügenden Verteilung der fluoreszierenden Kugeln während der Substratherstellung. Die Zellen in (B) bis (F) zeigen μ ZK primärer Myozyten und Fibroblasten, die durch die Beschichtung der Oberfläche mit der Folie des Strukturmusters 2 erstellt wurden. Gezeigt sind jeweils die einzelnen Zellkolonien (grün) die Oberfläche mit eingebetteten fluoreszierenden Kugeln unter der Zelle (rot) und eine Überlagerung der einzelnen Kanäle. Die geometrischen Formen der einzelnen Kolonien sind deutlich zu erkennen und werden durch scharfe Zellkanten abgebildet.

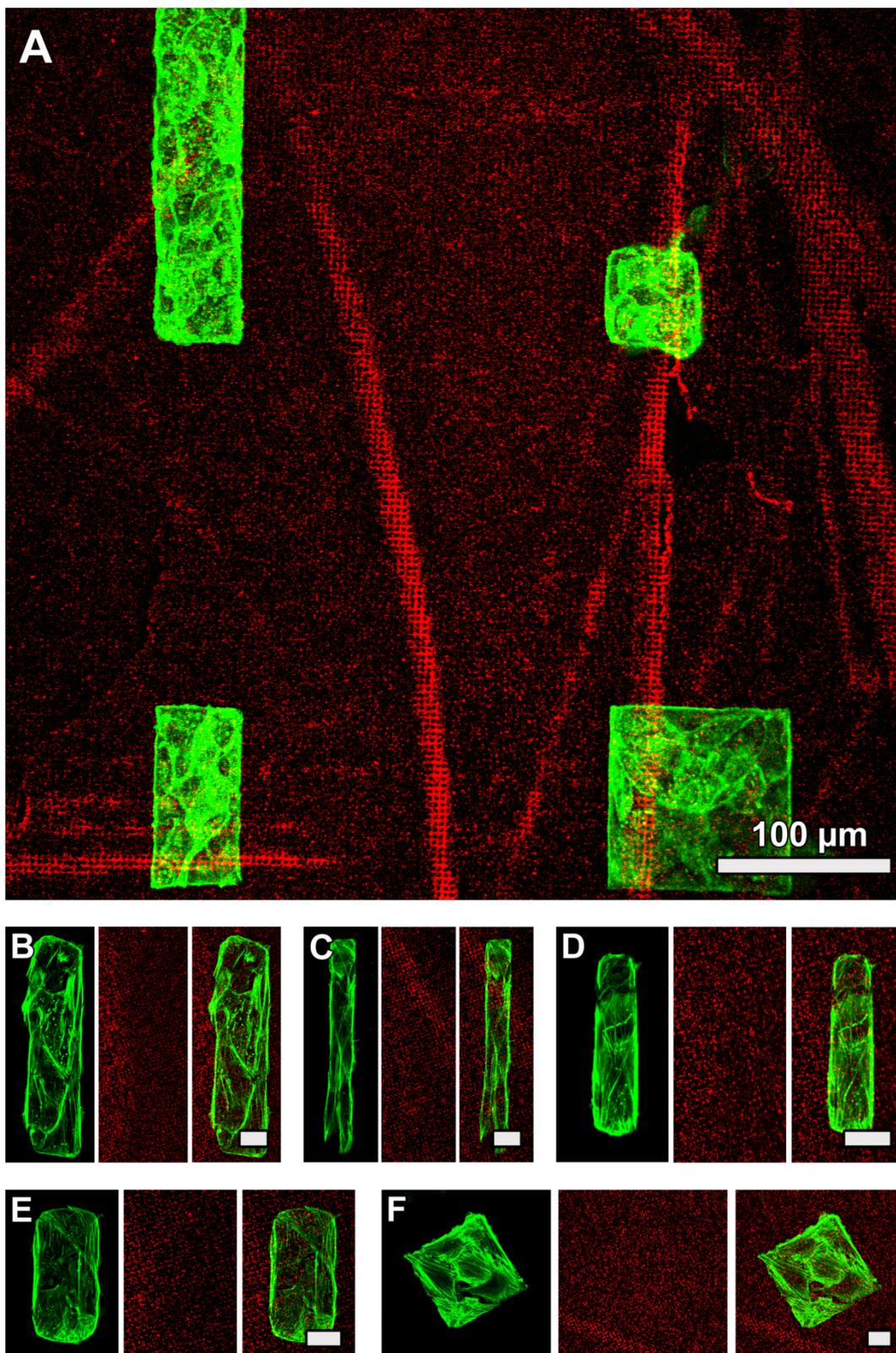


Abbildung 3.27 Mikro-Zellkolonien auf elastischen Oberflächen mit eingebetteten fluoreszierenden Kugeln (rot). (A) Übersichtsaufnahme von vier μ ZK aus Fibroblasten (3T3) erstellt durch das Strukturmusters 2 auf elastischen Oberflächen. (B) bis (F) zeigen Vergrößerungen einzelner μ ZK primärer Myozyten und Fibroblasten erstellt durch das Strukturmusters 1. Maßstab: 25 μ m.

4 Diskussion

4.1 Fokale Zelladhäsionen – Untersuchungen zur

Ultrastruktur

Fokaladhäsionen symbolisieren nicht nur einfache starre Verankerungspunkte der Zelle an das extrazelluläre Substrat, sondern stellen dynamische Strukturen innerhalb der Zelle dar, die je nach Anforderung auf molekularer Ebene modifiziert und angepasst werden können. Neben der Verankerung der Zelle an die extrazelluläre Matrix werden hier auch sowohl externe als auch interne chemische und physikalische Signale aufgenommen, verarbeitet und weitergeleitet. Fokaladhäsionen spielen eine essentielle Rolle in verschiedenen zellulären Prozessen und auf unterschiedlichen zellulären Ebenen, die das Überleben der Zelle sichern. Hierzu gehören Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung, Genexpression, Migration, Kraftaufnahme sowie die Kraftübertragung (A. D. Bershadsky, Balaban, & Benjamin Geiger, 2003; Eyckmans, Boudou, Yu, & Christopher S Chen, 2011; Petit & Thiery, 2000). In den letzten Jahrzehnten wurden diese unterschiedlichen Facetten der Fokaladhäsionen intensiv unter Verwendung vieler verschiedener Methoden, wie z. B. Lebendzellmikroskopie, Immunfluoreszenz, Elektronenmikroskopie sowie biochemischer Analysenverfahren untersucht (Zamir & B Geiger, 2001b). Hierbei konnten viele Informationen über die molekulare Zusammensetzung von Fokaladhäsionen gesammelt werden. Allerdings ist über die ultrastrukturelle Architektur, die diesen dynamischen Prozessen zugrunde liegt, nur wenig bekannt.

Daher wurden in dieser Arbeit die konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie für die Erzeugung hochaufgelöster Bilddaten von Fokaladhäsionen miteinander kombiniert, um eine Aussage bezüglich der Ultrastruktur dieser Multiproteinaggregate und ihrer Anbindung an das Zytoskelett der Zelle treffen zu können.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit vorgestellten Ansatzes, konnten im Rasterelektronenmikroskop flache rundliche Strukturen in den Zellen aufgelöst werden, die sowohl entlang von Stressfasern, als auch an deren Enden lokalisiert sind und anhand dieser Strukturen direkt mit dem darunter liegenden Substrat in Verbindung stehen. Diese rundlichen Strukturen wurden in der rasterelektronenmikroskopischen Analyse in Bereichen vorgefunden, die anhand der Überlagerungsdaten aus LSM- und REM-Bildern ein signifikantes Fokaladhäsions-Signal aufzeigten.

4.1.1 Die Probenpräparation und ihre Effekte

Aufgrund der Lage der Fokaladhäsionen innerhalb der Zelle und der Verwendung der oben genannten unterschiedlichen Mikroskopietechniken erforderte auch die Probenpräparation besondere Aufmerksamkeit. Die Zellen wurden daher zunächst von ihrer Membran befreit und fixiert. Das kortikale Zytoskelett der Zelle, das die Sicht auf die darunter liegenden zellulären Strukturen behindert, wurde vor der Immunfluoreszenz-Markierung der Proteine über eine Ultraschallbehandlung der Zellen nahezu vollständig beseitigt. Nach der lichtmikroskopischen Analyse der Zellen, galt es die Proben sowohl über eine Dehydrierung, als auch über eine Trocknung und anschließender Beschichtung mit einem dünnen Metallfilm für die Elektronenmikroskopie vorzubereiten.

Dieser Weg der Probenpräparation beinhaltet viele einzelne Schritte, die alle auf ihre Weise die Probe beeinflussen, wobei Verluste von Strukturen oder Artefaktbildungen in den Proben nicht gänzlich ausgeschlossen werden können. Im Besonderen sind hier die Schritte der Dehydrierung und der Probentrocknung zu nennen, aber auch schon die Fixierung kann zu Veränderungen der Probe führen. Die Einflüsse der verschiedenen Präparationsschritte werden im Nachfolgenden diskutiert.

Während der Dehydrierung kann es zu Schrumpfungsartefakten (Reißen der Filamente), Aggregation, Desorientierung und Schädigung besonders der feinen Filamente im dichten Netzwerk des Lamellipodiums kommen (J.V. Small, 1981). Ähnliche und weitere Artefakte können zudem durch die Kritisch-Punkt-Trocknung entstehen. G. P. Resch und Kollegen verwendeten hohe Konzentrationen an reinem filamentösen-Aktin (F-Aktin), die die Bedingungen in dem dichten Netzwerk des Lamellipodiums simulieren sollten und behandelten diese mit der Kritisch-Punkt-Trocknung. Es konnte gezeigt werden, dass es bei der Anwendung der Kritisch-Punkt-Trocknung ebenfalls zu ähnlichen Artefakten wie in der Dehydrierung kommt, wie z. B. die Ausbildung von F-Aktin-Aggregaten, sowie zu starken Verzweigungen der Filamente selbst aufgrund von Filamentbrüchen (Resch, Goldie, Hoenger, & J Victor Small, 2002).

Artefakte können aber auch schon in einem früheren Schritt der Probenpräparation entstehen. So konnte ebenfalls an reinen F-Aktin-Lösungen gezeigt werden, dass Aktinfilamente sensibel auf die Behandlung mit verschiedenen Fixierungsmitteln reagieren (Lehrer, 1981; Maupin-szamier & Thomas D Pollard, 1978; J.V. Small, 1981). Hierbei kommt es zur Fragmentierung und Verkürzung der einzelnen Filamente. Interessanterweise konnten diese Artefakte bei dieser Art von Proben minimiert werden, indem die Konzentration des Fixans gering gehalten und dem verwendeten Puffer Chelatkomplexe hinzugefügt wurden. Ein weiterer Faktor für die Minimierung der durch die Fixierung hervorgerufenen Artefakte ist eine geringe Konzentration an Kalzium im verwendeten Puffer. Diese Schritte resultierten in einer Erhaltung der ursprünglichen Form der Aktinfilamente trotz Dehydrierung und der Kritisch-Punkt-Trocknung (Maupin-szamier & Thomas D Pollard, 1978).

Allerdings wurden oben beschriebenen Untersuchungen ausnahmslos an Proben durchgeführt, die nur aus reinen F-Aktin-Lösungen bestanden. Für die in diese Arbeit wichtigen Strukturen der Aktin-Stressfasern konnten hingegen solche Effekte nicht beobachtet werden (J.V. Small, 1981). Grund hierfür ist wahrscheinlich die dichte und hochorganierte Struktur der Stressfasern, bestehend aus Aktinfilamenten, kreuzvernetzenden Proteinen und dem Motorprotein Myosin II.

Um die Wahrscheinlichkeit der Bildung von Schrumpfungs- bzw. Trocknungsartefakten möglichst gering zu halten, wurde das Protokoll für die Präparation angepasst. Die Extrahierung der Zellmembranen, die Fixierung, die Ultraschallbehandlung sowie die Markierung der für diese Arbeit relevanten Strukturen, wurden alle ausnahmslos in dem unter Abschnitt 2.7 beschriebenen Zytoskelett stabilisierenden Puffer (Zytoskelett-Puffer, CB) durchgeführt. Die Schritte der Membranextrahierung und die Fixierung der Zellen sind Prozesse, die mehr oder weniger direkt auf die gesamte Zelle einwirken, so dass es in diesem Schritt unter Verwendung des Zytoskelett-stabilisierenden Puffers nicht zwangsläufig zu Artefakten kommen muss (J.V. Small, 1988).

Um ein Austrocknen der Proben während der Dehydrierung zu vermeiden, wurden die Proben in einer speziellen Probenkammer aufbewahrt und nach dem von Svitkina und Borisy erstellten Protokoll mit feuchtem Reinigungspapier für optische Gläser abgedeckt (T M Svitkina & Borisy, 1998). Die Proben wurden alle zeitnah (in der Regel innerhalb von zwei Tagen) präpariert und analysiert, um eventuelle Bildungen von Artefakten aufgrund einer längeren Lagerung auszuschließen.

Trotz der oben genannten Vorkehrung in der Probenpräparation, konnten in den REM-Aufnahmen Artefakte bestimmt werden, die zu Verlusten von Strukturen führten und der Dehydrierung bzw. der Kritisch-Punkt-Trocknung zuzuschreiben waren, da diese Effekte in den zuvor erstellten LSM-Aufnahmen (entstanden nach der Behandlung der Zellen mit Ultraschall) nicht beobachtet wurden. Dies ist exemplarisch in Abbildung 4.1 dargestellt. Die Abbildung zeigt eine LSM- und REM-Aufnahme, sowie einen Überlagerungsdatensatz eines primär isolierten kardialen Myozyten. Die gelben Boxen markieren den Bereich der Zelle, in dem es zu strukturellen Verlusten während der Präparation zwischen den LSM-Aufnahmen und den REM-Aufnahmen gekommen ist.

Eine Reihe der in dieser Arbeit vorgestellten rundlichen Strukturen zeigten keine Anbindungen an Aktinfilamente. Ein Grund hierfür könnten Trocknungsartefakte während der Präparation sein, die dafür sorgen, dass gerade feine Filamente abreißen bzw. zerreißen. Einige dieser rundlichen Strukturen ohne Filamentanbindung wurden teilweise auch außerhalb der Zellen gefunden. Diese Strukturen könnten möglicherweise auch durch die Migration der Zellen entstanden sein, wobei diese Strukturen auf dem Substrat zurück bleiben (Kirfel, Rigort, Borm, & Herzog, 2004; Rigort, Gr, Herzog, & Kirfel, 2004).

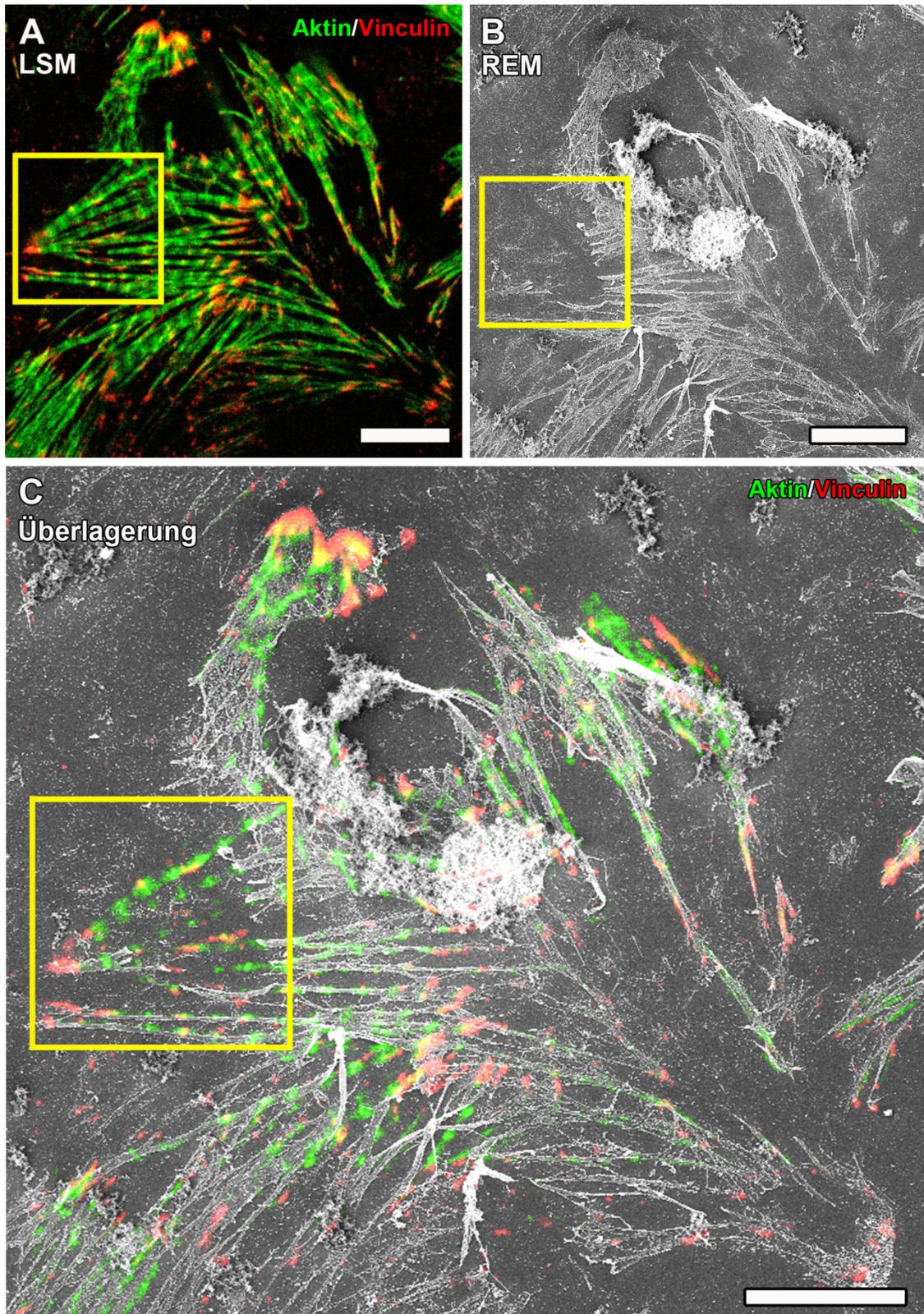


Abbildung 4.1 Strukturelle Verluste aufgrund von Dehydrierung und Kritisch-Punkt-Trocknung während der Probenpräparation. (A) zeigt eine LSM-Aufnahme eines kardialen Myozyten nach der Behandlung mit Ultraschall. Das Aktinzytoskelett ist über Alexa Fluor 488 Phalloidin grün markiert. Vinculin ist über einen sekundären Antikörper rot (Cy3) markiert. (B) REM-Aufnahme des kardialen FMyozyten aus (A) nach der Dehydrierung und Kritisch-Punkt-Trocknung. (C) Überlagerung der LSM- und REM-Bilddaten aus (A) und (B). Gelbe Boxen markieren den Bereich in der Zelle, in dem es zu strukturellen Verlusten nach den LSM-Aufnahmen gekommen ist. Maßstab: 10 μm .

4.1.2 Ultrastrukturelle Analyse von Fokaladhäsionen entlang von Stressfasern und an Stressfaserenden

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hier verwendete Methode zur Analyse der Ultrastruktur von Fokaladhäsionen trotz ihrer vielen Präparationsschritte und der Möglichkeiten zur Artefaktbildung, zu einer äußerst genauen Überlagerung von LSM- und REM-Daten führte. An dieser Stelle sei erwähnt, dass die starken Signale aus der Immunfluoreszenz die genaue Position der entsprechenden Filamente bzw. Adhäsionsbereiche in den REM-Daten allerdings erschwerte. Die untersuchten und durch die Überlagerung der beiden unterschiedlichen Bilddaten identifizierten und eingegrenzten Bereiche der Zellen zeigten zudem alle ausnahmslos die hier dargestellten rundlichen Strukturen, sowie ihre direkte Anbindung an das Aktinzytoskelett und das Substrat der Zellen.

Vieles spricht dafür, dass es sich bei den hier gezeigten rundlichen Strukturen um Fokaladhäsions-assoziierte Strukturen der Zelle handelt. Ihre Lokalisation in der Peripherie der Zelle sowie unterhalb von Stressfasern entspricht der generellen Lage von Fokaladhäsionen in Myofibroblasten und spricht gegen eine artifizielle Struktur. Alle hier dargestellten rundlichen Strukturen sind entweder mit Stressfasern und kleineren Filamenten verbunden, oder befinden sich in direkter Nähe zu ihnen. Die Anbindung an Stressfasern lässt hier auf eine sehr starke Verbindung zwischen den Strukturen und der Stressfaser vermuten. Dies wird deutlich in den Abbildungen 3.3 und 3.7. Bedenkt man, dass die Proben zuvor mit Ultraschall behandelt wurde, und die hier gezeigten Stressfasern dem Ultraschallimpuls ausgesetzt waren, kann man vermuten, dass sie zur Seite gedrückt wurden und ursprünglich über den runden Strukturen hinweg liefen. Dass es sich hier nicht beispielsweise auch um Trocknungsartefakte handelt, kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Allerdings konnte, wie schon zuvor erwähnt, gezeigt werden, dass Stressfasern durch die Dehydrierung und Kritisch-Punkt-Trocknung im Wesentlichen strukturell unbeeinflusst bleiben (J.V. Small, 1981). Alle drei Strukturen sind mit einem ca. 30 nm bzw. ca. 40 nm dicken Filamentbündel der Stressfaser verbunden, das deutlich in Höhe der Kontaktstelle aus dem Verbund der Stressfaser herausgerissen ist. Diese starke Bindung macht Sinn, wenn man bedenkt, dass gerade hier die generierte Kraft des Aktomyosinsystems auf das Substrat übertragen wird. Ein weiterer interessanter Aspekt, der aus diesen Daten gewonnen werden kann ist, dass die Stressfaser möglicherweise nur über dieses eine Filamentbündel mit der ursprünglich unter ihr lokalisierten Struktur verbunden ist.

Um eine noch genauere Aussagen darüber treffen zu können, ob es sich bei den hier beschriebenen Strukturen wirklich um Adhäsionsstrukturen handelt, wurde Vinculin als Marker für die Fokaladhäsion mit einem speziellen sekundären Antikörper markiert (Abschnitt 2.8.3). Dieser Antikörper ist sowohl kovalent an ein Fluorophor gebunden, als auch an ein Nanogold-Partikel. Mit Hilfe dieser Markierung des Adhäsionsproteins Vinculin, konnte eine rundliche Struktur identifiziert

werden, die ebenfalls an eine Stressfaser gebunden ist und in Abb. 3.3 und 3.7 sehr ähnelt. Diese vier Strukturen sind gemeinsam in der Abbildung 4.2 gezeigt.

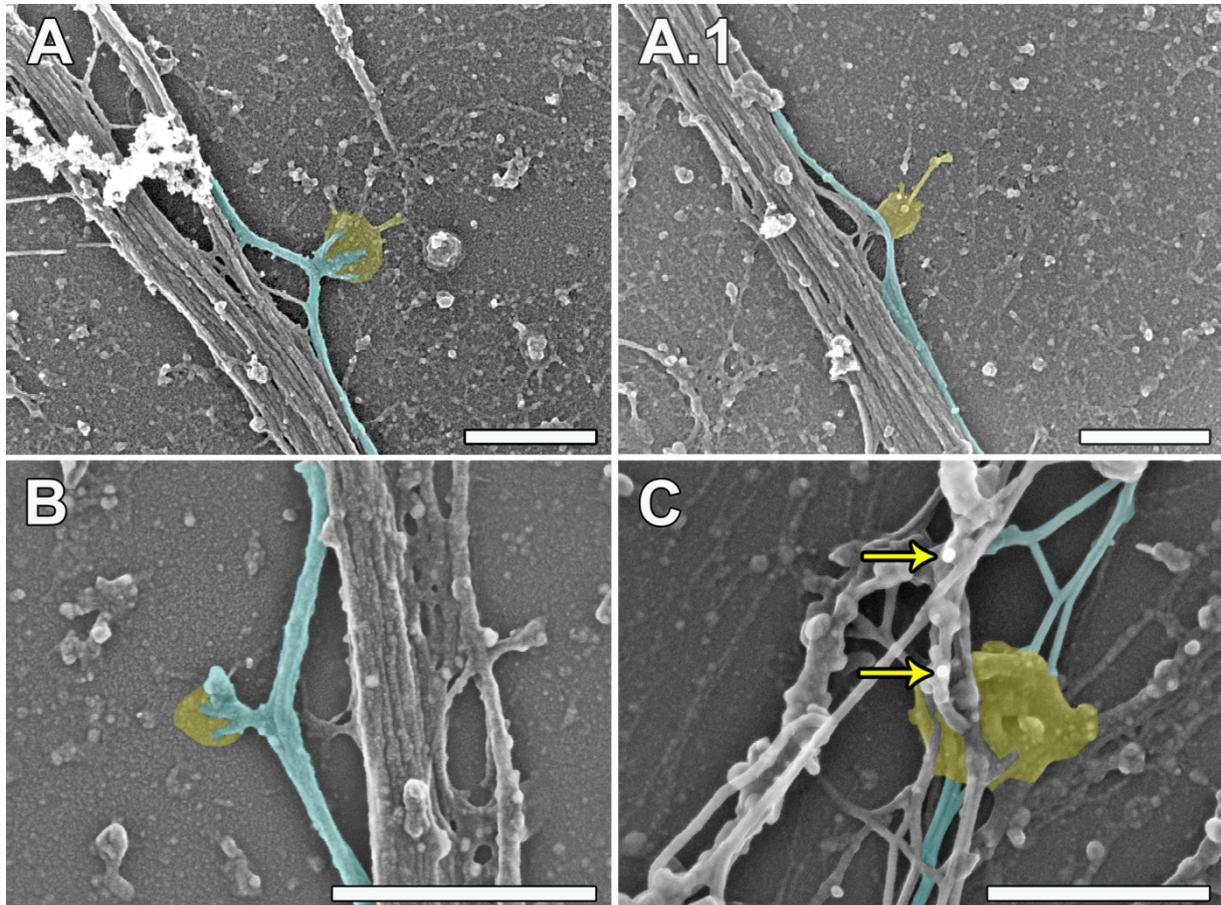


Abbildung 4.2 Überblick über Adhäsions Strukturen. Alle vier runden Strukturen sind gelb markiert. Filamentbündel der Stressfasern, die im direkten Kontakt mit den runden Strukturen stehen sind türkis unterlegt. Die Strukturen aus (A) und (A.1) sind an ein und derselben Stressfaser lokalisiert (s. auch Abb.3.3). Die Strukturen aus (B) und (C) wurden in weiteren Zellen gefunden. Die gelben Pfeile in (C) markieren die verstärkten Nanogoldpartikel.. Maßstab: 500 nm.

Die hier gezeigten Daten über die Ultrastruktur von Fokaladhäsionen stimmen in vielen Punkten mit der gegenwärtig aktuellen Literatur überein. Die Kopplung der hier gezeigten Stressfasern an die runden Strukturen wird nur über einen kleinen Anteil an Aktinfilamenten in der Stressfaser vermittelt (Patla et al., 2010). Dieser Teil scheint auch der flexibelste Bereich in der Stressfaser-Fokaladhäsion-Verbindung zu sein. Die fingerartigen filamentösen Strukturen, die in den Abbildungen 3.6 und 3.10 über einen roten Pfeil markiert sind, scheinen die eigentliche Kopplung zwischen dem einzelnen Aktinbündel der Stressfaser zu vermitteln. Auch die Lokalisation der Nanogoldpartikel in unmittelbarer Nähe zu den Adhäsionsstrukturen, weist darauf hin, dass Vinculin fest mit diesen Strukturen verbunden ist (Patla et al., 2010). Eine hochaufgelöste lichtmikroskopische Untersuchung der Fokaladhäsion, zeigte einen schichtweisen Aufbau (Kanchanawong et al., 2010), der sich auch auf

ultrastruktureller Ebene erahnen lässt. Die hier gezeigten rundlichen Strukturen sind auf der einen Seite mit dem Substrat der Zelle direkt verbunden und auf der anderen Seite über ein Verbindungsstruktur (rote Pfeile in Abb. 3.3 und 3.7) mit einem Aktinfilamentbündel der Stressfaser. In einer weiteren auf der Untersuchung der Topographie beruhenden Analyse von Fokaladhäsionen mittels Rasterkraftmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es innerhalb von Fokaladhäsionen, die an den Enden von Stressfasern lokalisiert sind, häufig zu Verzweigungen der Filamente kommt (Franz & Müller, 2005).

Die hier aufgezeigten Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 170-270 nm sind deutlich größer als die von Patla und Kollegen (Patla et al., 2010) gezeigten rundlichen „Doughnut“-ähnlichen Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 25 +/- 5 nm. Dies könnte zum einen an den verwendeten Zellen liegen, bzw. an der hier verwendeten Präparationsmethode. Für die Analyse der Ultrastruktur von Fokaladhäsionen wurden primär isolierte kardiale Fibroblasten verwendet, die zunächst für mindestens 5-7 Tage in Zellkulturschalen in Kultur gehalten wurden. Während dieser Zeit differenzierten die Fibroblasten zu Myofibroblasten. Hierbei kommt es zur Ausbildung von starken Stressfasern und großen Fokaladhäsionsstrukturen (Abschnitt 1.12.2).

Die hier untersuchten Zellen wurden vor der eigentlichen Untersuchung zunächst mit Detergenz behandelt, um die Zellmembranen zu beseitigen und somit freie Sicht auf das Zyotosklett zu erlangen. Im Bereich der Fokaladhäsionen steht die Plasmamembran der Zelle in sehr engen Kontakt zum Substrat von ca. 10-15 nm (Abercrombie et al., 1971). Hier könnte die Möglichkeit bestehen, dass aufgrund dieser Nähe der Plasmamembran zum Substrat das Detergenz die in diesem Bereich lokalisierten Lipide nicht ausreichend extrahieren kann und es somit in der anschließenden Fixierung auch diese nicht „gelösten“ Lipide an dieser Stelle mit fixiert werden. Dies könnte zu einer Vergrößerung der eigentlichen Struktur führen. Weiter vorstellbar wäre auch die Möglichkeit, dass die hier gezeigten rundlichen Adhäsionsstrukturen Aggregate der von Patla und Kollegen beschriebenen Strukturen darstellen.

4.2

4.3 Erzeugung definierter Mikrokolonien auf elastischen Silikonkautschuksubstraten – die nächste Ebene der Komplexität

Die Beschichtung von elastischen Silikonkautschuksubstraten mit Matrixproteinen in Form von definierten geometrischen Formen war ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit. Mit Hilfe des hier vorgestellten und etablierten Systems, bietet sich die Möglichkeit der reproduzierbaren Erstellung dieser definierten adhäsiven Flächen und der damit verbundenen Erzeugung kleiner definierter Mikrokolonien. Zudem ist man mit dieser Methode nun in der Lage, neben der Analyse von Einzelzellen auch die komplexeren Mikro-Zellkolonien unter naturnahen Bedingungen, bezogen auf die Substratelastizität hin zu untersuchen (Abschnitt 1.9).

4.3.1 Herkömmliches Verfahren der Mikrostrukturierung von Zells substraten

Die herkömmlich verwendete Standardmethode für die Erzeugung von definierten adhäsiven Bereichen auf einer Oberfläche, ist das unter Abschnitt 1.10 vorgestellte Verfahren bekannt unter der Bezeichnung Mikro-Kontaktdruck bzw. Mikro-Kontaktstempeln (engl: micro-contact printing (μ CP)). Für harte Oberflächen, wie Glas, Plastik (Elastizitäten im Mega- und Gigapaskalbereich) und sogar für steife Silikonkautschukoberflächen (bis ca. 600 kPa) liefert diese Methode gute, reproduzierbare Übertragungsergebnisse und findet reichlich Anwendung in verschiedenen Disziplinen der Biologie (Alom Ruiz & Christopher S. Chen, 2007; Qian & Yingxiao Wang, 2010; Truskett & Watts, 2006; Weibel, Diluzio, & George M Whitesides, 2007). Zwar sind diese Oberflächen leicht zu stempeln, sie stellen aber eine artifizielle Umgebung für die Zelle dar und beeinflussen somit das Zellverhalten sowie die Zellmorphologie. Allerdings sind es gerade die Zellkultur Substrate mit geringen Elastizitäten, die ein naturnahes Verhalten der Zelle im Labor ermöglichen und Einfluss auf viele zentrale Prozesse, wie z.B. Zellmorphologie, Phosphorylierung, Genexpression und Differenzierung nehmen können (Discher, Janmey, & Y.-L. Wang, 2005; Engler, Sen, Sweeney, & Discher, 2006b; Pelham & Y. L. Wang, 1997; Peyton & Putnam, 2005). Die Erzeugung definierter Mikrokolonien auf weichen elastischen Zells substraten könnte daher eine wichtige Vorstufe hin zu

komplexeren Zellverbänden darstellen. Über diese Stufe könnten viele wichtige Informationen gewonnen werden, die zu einem besseren Verständnis über die Abläufe in Geweben und Organen führen.

4.3.2 Mikrostrukturierung elastischer Zellsubstrate

Erste Ansätze in die Richtung der lokal begrenzten Beschichtung von elastischen Zellsubstraten wurden bereits unternommen, allerdings konnte dies bisher nur für das System der Hydrogele realisiert und gezeigt werden. Engler und Kollegen z. B. verwendeten einen mikrostrukturierten Glasstempel mit Mikro-Kanälen, um Streifen aus Kollagen I zum Einen auf Glasoberflächen und zum Anderen auf elastische Hydrogel-Substrate unterschiedlicher Elastizitäten aufzubringen. Myoblasten, die auf den verschiedenen Substraten kultiviert wurden, fusionierten zwar alle zu Myotuben, allerdings konnte das typische Myosin-Aktin-Muster nur auf Substraten beobachtet werden, mit einer Elastizität, die der natürlichen Umgebung im Organismus entspricht (Engler et al., 2004).

In Bezug auf die mikrostrukturierte Beschichtung von Hydrogelen, unter Verwendung eines Glasstempels- oder eines Stempels aus Silikonkautschuk, sei erwähnt, dass diese Substrate ohnehin modifiziert werden müssen, damit eine Beschichtung mit Matrixproteinen überhaupt erst möglich wird. Hydrogele können keine Proteine (Beschichtungsproteine) adsorbieren und müssen daher funktionalisiert werden. Typischerweise verwendet man hierbei einen heterobifunktionalen Protein-Kreuzvernetzer, der über eine kovalente Bindung Proteine an das Hydrogel koppelt. Die kovalente Bindung des Protein-Kreuzvernetzers an das Hydrogel erfolgt unter UV-Licht (bei 365 oder 320 nm). Die Beschichtung erfolgt über Nacht, wobei der N-Hydroxysuccinimid-Ester des Protein-Kreuzvernetzers hierbei mit den primären Aminen der Beschichtungsproteine reagiert (Pelham & Y. L. Wang, 1997; Tse & Engler, 2010). Die Funktionalisierung dieser Substrate ist verglichen zu den hier verwendeten Substraten aus Silikonkautschuk, bei denen keine Funktionalisierung erfolgt, aufwendig und zeitintensiv. Durch die Verwendung von UV-Licht (besonders bei Hydrogelen, die unter UV-Licht polymerisieren) können Elastizitäts-verändernde Effekte nicht komplett ausgeschlossen werden.

Die Erstellung, von geometrisch definierten adhäsiven Inseln aus Matrixproteinen durch das μ CP-Verfahren auf weichen nicht modifizierten PDMS-Oberflächen mit geringer Steifigkeit von $< 2 - 75$ kPa, hingegen, kann mit der Methode des Mikro-Kontaktstempels nicht zuverlässig und reproduzierbar realisiert werden, wie in Abbildung 4.3 gezeigt wird.

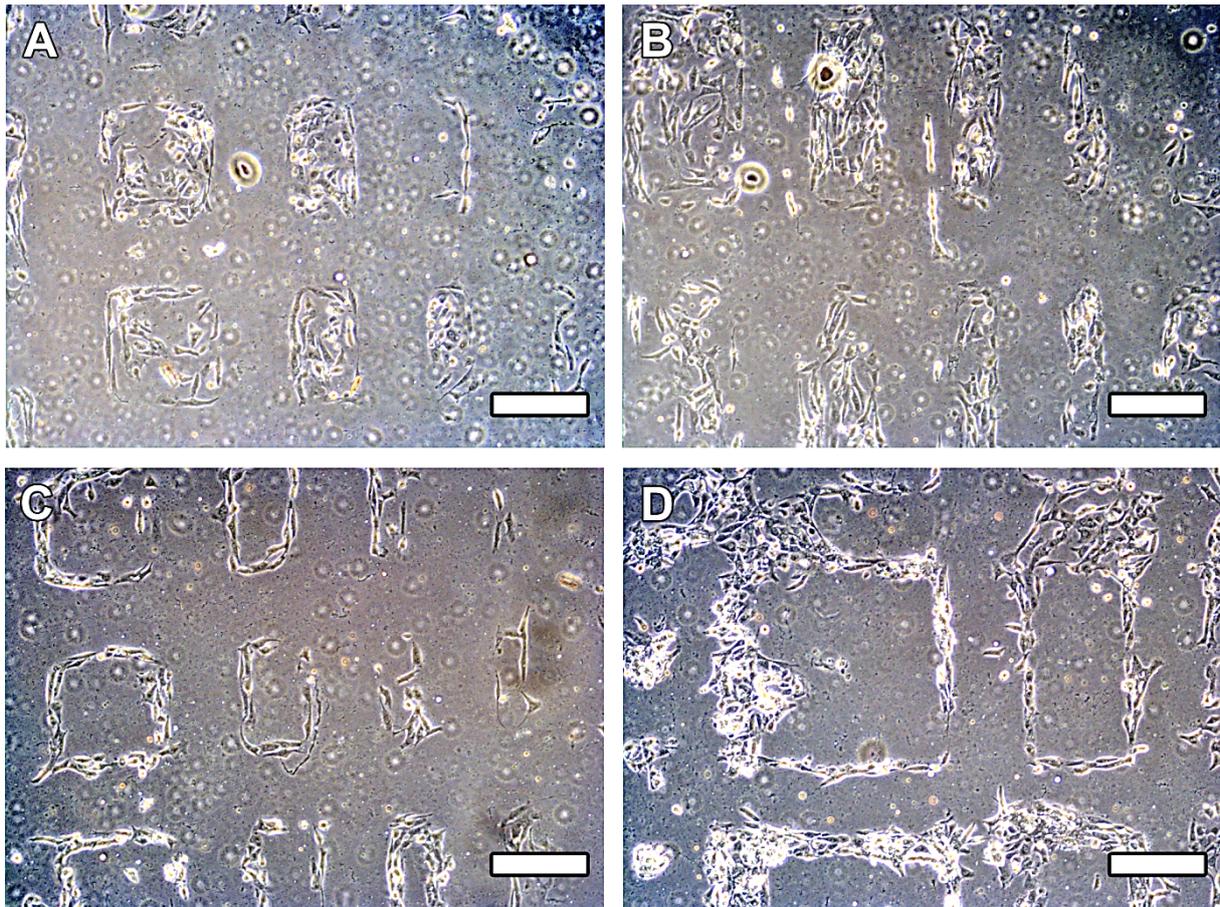


Abbildung 4.3 Erstellung von Mikro-Zellkolonien auf elastischen Silikonkautschuk-Substraten (Sylgard 184, 15 kPa) unter Verwendung der Methode Mikro-Kontaktstempeln. (A) bis (D) zeigen Bereiche einer Oberfläche des Silikonkautschuksubstrats mit einer Elastizität von 15 kPa, auf der mittels mikrostrukturierten Stempeln (Strukturmuster 1) Fibronektin aufgebracht und anschließend Zellen kultiviert wurden. Die Zellen adhäreren nur in den Randbereichen, die eine quadratische Form vermuten lassen. Maßstab: 100 μm

Die Abbildung 4.3 zeigt den Versuch die Oberfläche eines Silikonkautschuksubstrats über den Mikro-Kontaktdruck zu beschichten. Die Zellen adhäreren fast ausschließlich nur in Randbereichen, die eine quadratische Form vermuten lassen. In (A) und (B) sind Strukturen angedeutet, bei denen nicht nur Zellen im Randbereich adhäreren, sondern auch teilweise die vermeindlich „aufgedruckte innere Fläche der quadratischen Muster“ bedecken. Allerdings kommt es zu keiner Bildung von dichten scharfkantigen Mikro-Zellkolonien.

Diese ineffektive Übertragung der Beschichtungsproteine durch den Mikro-Kontaktdruck, ist vermutlich zwei Gründen geschuldet. Die Übertragung von Molekülen von einem Stempel aus PDMS auf ein PDMS-Substrat liefert keine guten Ergebnisse. Des Weiteren lassen sich die elastischen Silikonkautschuksubstrate schon unter minimaler Druckerwendung, wie sie beim Mikro-Kontaktdruck ausgeübt werden, verformen. Dies könnte dazu führen, dass nur die Randbereiche des Stempels eine gute Übertragungsfläche bieten, was dafür spricht, dass eben nur diese Bereiche in der Abbildung 4.3 mit Zellen bewachsen ist.

Aufgrund der hier aufgeführten Schwierigkeiten, wurde in dieser Arbeit eine mikrostrukturierte Folie hergestellt und etabliert, die es nun ermöglicht geometrisch definierte Mikro-Zellkolonien auf elastischen Silikonkautschuksubstraten zu erstellen.

4.3.3 Die mikrostrukturierte Folie und ihre Eigenschaften

Die Herstellung und Verwendung der hier vorgestellten Folie ist unkompliziert, schnell und effektiv und ist in Abbildung 4.4 schematisch dargestellt. Zu Beginn der Herstellung steht eine Siliziumscheibe, auf der eine Schicht aus Photolack aufgebracht wird. Über fotolithographische Methoden wird der Photolack mikrostrukturiert und dient nachfolgend als Matrize für die Silikonkautschukstempel. Die so gewonnenen Stempel dienen wiederum als Matrize für die Folie aus Epoxid-Kleber.

Die so hergestellten mikrostrukturierten Folien sind trotz ihrer Dicke von etwa 10-15 μm äußerst robust und verfügen über eine Starrheit, die für die Erhaltung der Form der Geometrie der mikrostrukturierten Löcher sorgt. Die Folien sind dennoch flexibel genug, so dass sie eine hohe Biegesteifigkeit aufweisen, ohne dabei zu zerreißen oder zu zerbrechen (s. Abb. 3.13 und 4.4). Diese Eigenschaft ist äußerst hilfreich, wenn die Folie nach der Beschichtung vom Substrate abgelöst werden muss. Das Aushärten der Folie dauert je nach verwendetem Material zwischen 40 min und 3 h. Die Folien können sofort nach dem Aushärteprozess auf die elastischen Silikonkautschuksubstrate gegeben werden.

Die Beschichtung verläuft, anders als bei den unter Abschnitt 4.2.2 beschriebenen Hydrogelen, gänzlich ohne jegliche Modifikationen der zu beschichtenden Substrate. Die Beschichtung durch die als Lochmaske fungierende mikrostrukturierte Folie erfolgt mindestens für 30 min³ bei 37°C und resultiert auf Silikonkautschuksubstraten mit einer Elastizität von 10-15 kPa in scharfkantigen adhäsiven Inseln aus Matrixprotein (s. Abb. 3.15 und 3.16), die zu definierten und scharfkantigen Mikro-Zellkolonien führen (s. Abb. 3.17-3.20 und Abb. 3.24).

³ Die meisten der hier gezeigten Abbildungen wurden von Zellen auf elastischen Oberflächen erstellt, die für eine Stunde mit Matrixprotein beschichtet wurden. Dies gilt im Besonderen für die sehr weichen Silikonkautschukoberflächen unter 2 kPa. In dieser Arbeit hat sich gezeigt, dass die längere Beschichtung dieser sehr weichen Substrate zu einem weitaus besseren Ergebnis bezüglich der Kultivierung der Zellen in definierten Mikrokolonien führt.

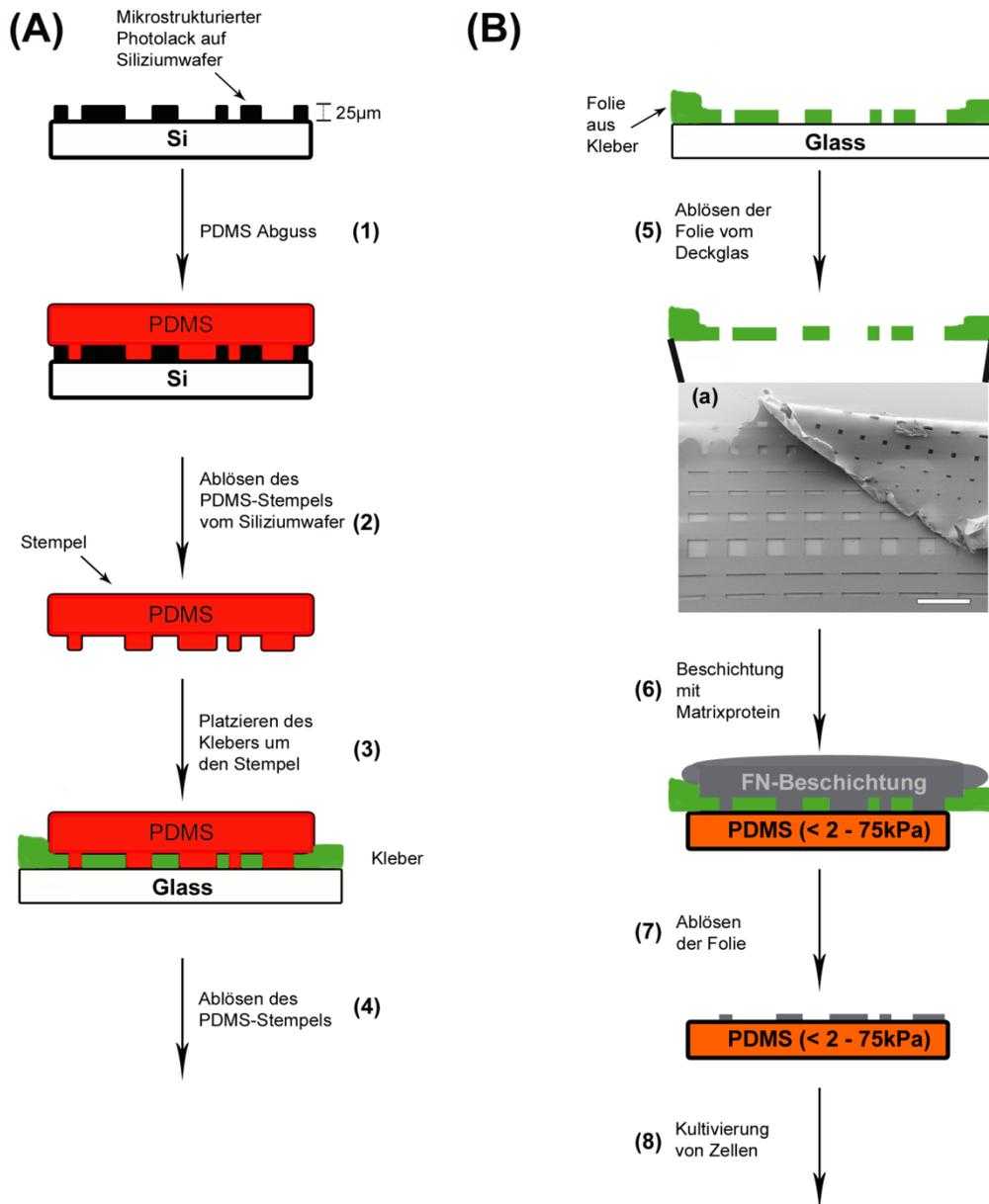


Abbildung 4.4 Schematische Darstellung der Folienherstellung und Anwendung. (A) zeigt die Herstellung der mikrostrukturierten Stempel, die für die Fertigung der Folie verwendet werden. (B) zeigt die fertige Folie und ihre Anwendung. Eine Siliziumscheibe mit mikrostrukturierter Photolack dient als Maske für die Stempelherstellung aus PDMS. Das PDMS wird auf den mikrostrukturierten Photolack gegeben und unter Wärmezufuhr vernetzt (1). Der Stempel wird von der Siliziumscheibe gelöst (2) und auf einem Objektträger abgestellt (3). Der Epoxid-Kleber wird um den Stempel herum verteilt und anschließend ausgehärtet (z. B. UV-Licht). Anschließend wird der Stempel entfernt (4) und zurück bleibt eine mikrostrukturierte Folie aus Epoxid-Kleber auf einem Objektträger. Die Folie wird vom Glasträger gelöst (5) und auf die zu beschichtenden elastischen Oberflächen platziert. Die Oberflächen werden dann mit Matrixprotein beschichtet (6). Hierbei dient die mikrostrukturierte Folie als Lochmaske. Nach der Beschichtung der elastischen Substrate wird die Folie entfernt (7). Die so beschichteten Substrate können nun mit Zellen kultiviert werden (8). Maßstab in (a): 100 µm.

Auch bestimmte Strukturmuster resultieren auf sehr weichen Silikonkautschukoberflächen in scharfkantigen Mikro-Zellkolonien. Besonders deutlich ist dies in Abb. 3.23 zu sehen. Diese Form der Mikrostruktur ließ sich am effizientesten auf das Silikonkautschuksubstrat übertragen. Auch das Strukturmuster 1 mit den größeren quadratischen Strukturen ließ sich auf den sehr weichen Substraten besser übertragen als das Strukturmuster 2 mit kleineren Strukturen. Grund hierfür könnte das Verhältnis von mikrostrukturierten Löchern zu auf dem Substrat aufliegenden Folienmaterial sein. Platziert man die Folie auf den elastischen Substraten zieht sie sich aufgrund von Adhäsionskräften flach auf das Substrat. Die hierbei wirkenden Kräfte zeigen den größten Effekt an den Kanten der Löcher. Hier kann es dazu kommen, dass sich die Kanten, besonders bei den sehr weichen Substraten, in das Substrat hinein drücken und somit eine stärkere Verbindung zwischen der Folie und dem darunter liegenden Substrat vorliegt, als bei dem aufliegenden geschlossenen Folienmaterial. Hier kann sich diese Kraft auf eine größere Fläche verteilen. Beim Ablösen der Folie von den sehr weichen Silikonkautschuksubstraten kommt es daher wahrscheinlich im Bereich der Kanten der Löcher zu einem Ausfransen und Zerreißen des Substratmaterials sowie der dort vorliegenden Beschichtung. Dieser Effekt könnte neben der extremen Elastizität der sehr weichen Silikonkautschuksubstrate ein Grund dafür sein, dass die von den Mikro-Zellkolonien gebildeten Ränder hier kaum scharfkantig abgebildet werden.

Die Beschichtung unterschiedlicher Substrate unter Verwendung einer Membran als Alternative zur Methode des Mikro-Kontaktgedrucks wurde erstmals 1999 von Jackman und Mitarbeitern vorgestellt (Jackman, Duffy, Cherniavskaya, & George M. Whitesides, 1999) Die Membran wurde aus Silikonkautschuk hergestellt und besaß Löcher mit einer Größe von 5-50 µm. Für die Herstellung wurde eine Siliziumscheibe verwendet mit Säulen, die in den Photolack eingebracht wurden. Die noch nicht kreuzvernetzte PDMS-Mischung wurde über die Rotationsbeschichtung auf der Matrize verteilt. Nach der Kreuzvernetzung wurde die Silikonkautschukmembran von der Matrize entfernt, und enthielt ein Muster aus Löchern, das der Anordnung der Säulen des Photolacks entsprach. Später wurde diese Membran von derselben Gruppe verwendet, um typische Substrate aus der Zellkultur (Glas, Plastik), aber auch harte Silikonkautschuksubstrate mit Hilfe dieser Lochmaske zu beschichten und so kleine definierte Zellverbände zu erzeugen (Emanuele Ostuni, Kane, Christopher S. Chen, Donald E. Ingber, & George M. Whitesides, 2000). Allerdings neigte diese Silikonkautschukmembran dazu, schon bei der Entfernung von sehr steifen Substraten leicht zu zerreißen (Jackman et al., 1999). Für die Erzeugung von Mikro-Zellkolonien auf weichen Silikonkautschuksubstraten, die zudem sehr „klebrig“ sind, würde diese Membran sehr viel leichter reißen und zudem sehr starke Adhäsionskräfte zum darunter liegenden weichen Substrat ausbilden, die es erschweren würde, die Membran zu entfernen, ohne dass das Substrat geschädigt wird.

Die Mikrostrukturierung von Substraten unter Verwendung eines sogenannten „dry-film-photoresist“, der in der Prozesstechnologie Anwendung findet und der über die Fotolithographie mikrostrukturiert wird wurde von Zhao und Kollegen vorgestellt (Zhao, A. Chen, Revzin, & Pan, 2011). Vom Prinzip her funktioniert dieser Ansatz ähnlich wie die in dieser Arbeit etablierte Mikrostrukturierung. Der mikrostrukturierte „dry-film-photoresist“ wird auf die zu beschichtende Oberfläche laminiert und anschließend beschichtet. Allerdings ist die Herstellung der Folie sehr aufwendig und kann nur unter großem technischen Aufwand betrieben und durchgeführt werden. Es wurden auch hier unterschiedliche Substrate wie Glas, Zellkultursubstrate aus Plastik, aber auch Silikonkautschuksubstrate mit Hilfe des „dry-resist-films“ beschichtet. Allerdings wurde keine Angaben über die Elastizität der verwendeten Silikonkautschuksubstrate gemacht.

5 Ausblick

Für die Analyse der Ultrastruktur von fokalen Adhäsionen wurde eine Kombination aus konfokaler Lichtmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie gewählt. Hierbei wurde über die spezifische Markierung des Fokaladhäsionsproteins Vinculin, sowie mit einer Bildüberlagerungstechnik der Bereich der Zelle bestimmt, der anschließend genauer im Rasterelektronenmikroskop untersucht wurde. Mit Hilfe dieser Technik konnten in kardialen Myofibroblasten, rundliche Zytoskelett assoziierte Strukturen aufgelöst werden.

Um die Frage beantworten zu können, ob es sich bei den hier dargestellten rundlichen Strukturen wirklich um fokale Adhäsionsstrukturen handelt, sollten im Anschluss an diese Arbeit weitere Untersuchungen zu den Strukturen mit dem bereits hier verwendeten Fluoronanogold-Antikörper fortgesetzt werden.

Neue hochauflösende lichtmikroskopischer Verfahren könnte in Kombination mit der Elektronenmikroskopie und unter Verwendung des Fluoronanogold-Antikörpers für eine viel genauere Lokalisation von markierte Fokaladhäsionsproteinen in den Überlagerungsdaten führen.

Durch die Verwendung von Gefriertrocknungstechniken könnten Schrumpfung- und Trocknungsartefakte extrem minimiert werden, was zu einer höheren Genauigkeit in den Überlagerungsdaten führen kann.

Die in dieser Arbeit etablierte und entwickelte Methode der Mikrostrukturierung von elastischen Silikonkautschuksubstraten führte zur Erstellung von definierten Mikro-Zellkolonien. Aufgrund der Tatsache, dass sich diese Methode erst zu Ende dieser Arbeit entwickelt hat, konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt erst wenige Versuche unternommen werden. Allerdings geben die hier gezeigten Daten bereits einen guten Einblick auf die Möglichkeiten. Die definierten Zellkolonien auf Substraten mit naturnahen Elastizitäten können jetzt auf ihre Kraft hin untersucht werden. Vorstellbar sind Experimente an Myozyten, die zunächst auf Gewebe simulierenden elastischen Substraten auf rechteckigen adhäsiven Inseln kultiviert werden. Für solche Strukturen konnte bereits auf harten Oberflächen gezeigt werden, dass es aufgrund des richtigen Aspektverhältnisses der adhäsiven Flächen, zu einer naturnahen Anordnung der Sarcomerstruktur kommt (Bray et al., 2008). Dies kann nun mit der gewebespezifischen Elastizität des Substrats im Experiment kombiniert werden. Dadurch, dass sich mit der Folie die Möglichkeit ergibt, auch bestimmte Strukturen auf extrem weiche Elastizitäten aufzubringen, können nun auch über Experimente nachgedacht werden, die an Krebszellen oder Stammzellen durchgeführt werden. Für diese Zellen konnte bereits gezeigt wurde, dass die Geometrie der adhäsiven Fläche als auch die Elastizität des Substrats eine wichtige Rolle spielt (Engler, Sen, Sweeney, & Discher, 2006b; Ruiz & Christopher S Chen, 2008).

6 Abkürzungsverzeichnis

MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
Abb.	Abbildung
Arp2/3	Actin-related protein complex
AK	Antikörper
<i>g</i>	Beschleunigung; 9,81 m/s ²
bzw.	beziehungsweise
Cy3	Carbocyanin 3, rot fluoreszierende Carbocyanin 3-Farbstoff
ca.	Circa
CB	Cytoskeleton buffer; Zytoskelettpuffer
d.h.	das heißt
MilliQ	deionisiertes, aufgereinigtes Wasser zur Analyse
DNAse	Desoxyribonuclease
DMSO	Dimethylsulfoxid
∅	Durchmesser
EM	elektronenmikroskopisch
eV	Elektronenvolt
engl.	englisch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	Fetal Bovine Serum
FN	Fibronectin
FA	Fokaladhäsion
GA	Glutaraldehyd
Au	Gold
g	Gramm
°C	Grad Celsius
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution Modified
Hz	Herz (1Hz = 1s ⁻¹)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
ITS	Insulin, Transferin, Sodiumselenit, ITS Liquid media supplement

KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
CO ₂	Kohlendioxid
KZ	kortikales Zytoskelett
KPT	Kritische-Punkt-Trocknung
LSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
L	Liter
MgCl	Magnesiumchlorid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mA	Milliampere
mbar	Millibar
ml	Milliliter
mM	Millimolar
min	Minute
nm	Nanometer
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
NA	Numerische Apertur
MM-	Nutrient Mixture F10 Häm Pulver
MM+	Nutrient Mixture F10 Häm Pulver mit FBS, ITS und Penicillin/Streptavidin
Pd	Palladium
PFA	Paraformaldehyd
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphat gepufferte Salzlösung
Pt	Platin
PDMS	Polydimethylsiloxan
mm ²	Quadratmillimeter
cm ²	Quadratcentimeter
RT	Raumtemperatur
REM	Rasterelektronenmikroskop
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Sekunde
sec	Sekunde

s.o.	siehe oben
SF	Stressfaser
h	Stunde
TE	Trypsin-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
VASP	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
ZK	Zellkern
cm	Zentimeter
CB	Zytoskelettpuffer (engl.: Cytoskeleton Buffer)

7 Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M., & Dunn, G a. (1975). Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Experimental cell research*, 92(1), 57-62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1169157>
- Abercrombie, M., Heaysman, J. E. M., & Pegrum, S. M. (1971). The locomotion of fibroblasts in culture: IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Experimental cell research*, 67(2), 359–367. Elsevier. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482771904204>
- Adams, J. C. (1995). Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *Journal of Cell Science*, 1990, 1977-1990.
- Agarkova, I., & Perriard, J.-C. (2005). The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends in cell biology*, 15(9), 477-85. doi:10.1016/j.tcb.2005.07.001
- Alom Ruiz, S., & Chen, Christopher S. (2007). Microcontact printing: A tool to pattern. *Soft Matter*, 3(2), 168. doi:10.1039/b613349e
- Amiji, M., & Park, K. (1992). P ~ ve ~ tion of protein adso ~ tion and platelet adhesion on surfaces by PEO / PPO ~ EO triblock copol ~ e ~ s. *Biomaterials*.
- Anderson, T. F. (1982). This T Week ' s Cftatlon C [assf ~. *Cancer Research*, 363-363.
- Bakolitsa, C., Cohen, D. M., Bankston, L. a, Bobkov, A. a, Cadwell, G. W., Jennings, L., Critchley, D. R., et al. (2004). Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature*, 430(6999), 583-6. doi:10.1038/nature02610
- Bershadsky, A. D., Balaban, N. Q., & Geiger, Benjamin. (2003). Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annual review of cell and developmental biology*, 19, 677-95. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111301.153011
- Bershadsky, A., Kozlov, M., & Geiger, Benjamin. (2006). Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize. *Current opinion in cell biology*, 18(5), 472-81. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.012
- Bohner, M., Ring, T. A., & Caldwell, K. D. (2002). Studies on the Effect of Particle Size and Copolymer Polydispersity on the Adsorption of a PEO / PPO / PEO Copolymer on PS Latex Particles. *Society*, 6724-6731.
- Bray, M.-anthony, Sheehy, S. P., & Parker, K. K. (2008). Sarcomere Alignment is Regulated by Myocyte Shape. *Cell*, 651, 641-651. doi:10.1002/cm.20290

- Brown, R. D., Ambler, S. K., Mitchell, M. D., & Long, C. S. (2005). The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 45(1), 657-87. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095802
- Burridge, K., & Connell, L. (1983). A new protein of adhesion plaques and ruffling membranes. *The Journal of cell biology*, 97(2), 359-67. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2112532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cesa, Claudia M, Kirchgessner, N., Mayer, D., Schwarz, U. S., Hoffmann, Bernd, & Merkel, Rudolf. (2007). Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns. *The Review of scientific instruments*, 78(3), 034301. doi:10.1063/1.2712870
- Chen, B., Li, A., Wang, D., Wang, M., Zheng, L., & Bartles, J. R. (1999). Espin Contains an Additional Actin-binding Site in Its N Terminus and Is a Major Actin-bundling Protein of the Sertoli Cell – Spermatid Ectoplasmic Specialization Junctional Plaque. *Molecular Biology of the Cell*, 10(December), 4327- 4339.
- Chen, C. S. (1997). Geometric Control of Cell Life and Death. *Science*, 276(5317), 1425-1428. doi:10.1126/science.276.5317.1425
- Coll, J. L., Ben-Ze'ev, a, Ezzell, R. M., Rodríguez Fernández, J. L., Baribault, H., Oshima, R. G., & Adamson, E. D. (1995). Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9161-5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40944&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Cramer, L. P., Siebert, M., & Mitchison, T. J. (1997). Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force. *Cell*, 136(6), 1287-1305.
- Cukierman, E., Pankov, Roumen, & Stevens, D. R. (2001). Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science*, 1708(2001). doi:10.1126/science.1064829
- DeMali, K. a. (2004). Vinculin--a dynamic regulator of cell adhesion. *Trends in biochemical sciences*, 29(11), 565-7. doi:10.1016/j.tibs.2004.09.001
- Dike, L. E., Chen, Christopher S, Mrksich, M., Tien, J. O. E., Whitesides, George M, & Ingber, Donald E. (1999). GEOMETRIC CONTROL OF SWITCHING BETWEEN GROWTH , APOPTOSIS , AND DIFFERENTIATION DURING ANGIOGENESIS USING MICROPATTERNED SUBSTRATES. *Cultures*, (September).
- Discher, D. E., Janmey, P., & Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5751), 1139-43. doi:10.1126/science.1116995
- Discher, D. E., Janmey, P., & Wang, Y.-li. (2005). Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science*, 310(NOVEMBER), 1139-1143.

- Engler, A. J., Griffin, M. a, Sen, S., Bönnemann, C. G., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2004). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *The Journal of cell biology*, *166*(6), 877-87. doi:10.1083/jcb.200405004
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006a). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, *677*-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006b). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, *677*-689. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044
- Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X., & Chen, Christopher S. (2011). A Hitchhiker's Guide to Mechanobiology. *Developmental cell*, *21*(1), 35-47. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.devcel.2011.06.015
- Franz, C. M., & Müller, D. J. (2005). Analyzing focal adhesion structure by atomic force microscopy. *Journal of cell science*, *118*(Pt 22), 5315-23. doi:10.1242/jcs.02653
- Fricke, R., Zentis, P. D., Rajappa, L. T., Hofmann, B., Banzet, M., Offenhäusser, A., & Meffert, S. H. (2011). Axon guidance of rat cortical neurons by microcontact printed gradients. *Biomaterials*, *32*(8), 2070-6. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.11.036
- Geiger, B. (1979a). A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*, *18*(1), 193-205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/574428>
- Geiger, B. (1979b). A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell*, *18*(1), 193-205. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/574428>
- Geiger, Benjamin, Bershadsky, A., Pankov, Roumen, Yamada, K. M., & G, C. B. (2001). Transmembrane extracellular matrix– cytoskeleton crosstalk, *2*(November).
- Geisse, N. A., Sheehy, S. P., & Parker, K. K. (2009). Control of myocyte remodeling in vitro with engineered substrates. *In Vitro*, *343*-350. doi:10.1007/s11626-009-9182-9
- Giancotti, F. G. (1999). Integrin Signaling. *Science*, *285*(5430), 1028-1033. doi:10.1126/science.285.5430.1028
- Goffin, J. M., Pittet, P., Csucs, G., Lussi, J. W., Meister, J.-J., & Hinz, Boris. (2006). Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers. *The Journal of cell biology*, *172*(2), 259-68. doi:10.1083/jcb.200506179
- Goldstein, A., Wilson, D. L., Sonstegard, D. A. and Matthews, L. S. (1983). THE MECHANICAL PROPERTIES OF HUMAN TIBIAL TRABECULAR BONE AS A FUNCTION OF METAPHYSEAL LOCATION. *Biomechanics*, *16*(12), 965-969.
- Heath, J. P., Dunn, G. A., & Causeway, W. (1978). CELL TO SUBSTRATUM CONTACTS OF CHICK FIBROBLASTS AND THEIR RELATION TO THE MICROFILAMENT SYSTEM . A CORRELATED INTERFERENCE-REFLEXION AND HIGH-

VOLTAGE ELECTRON-MICROSCOPE STUDY Electron-microscopical studies of cultured non-muscle cells have demonstrated. *Cell*, 212, 197-212.

Heuser, J. (2000). The Production of “ Cell Cortices ” for Light and. *Traffic*, (3), 545-552.

Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Galli, a, Bochaton-Piallat, M.-L., & Gabbiani, G. (2007). The Myofibroblast: One Function, Multiple Origins. *American Journal Of Pathology*, 170(6), 1807-1816. doi:10.2353/ajpath.2007.070112

Hinz, Boris. (2007). Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(May 2006). doi:10.1038/sj.jid.5700613

Hotulainen, P., & Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology*, 173(3), 383-94. doi:10.1083/jcb.200511093

Hynes, R. O. (2002). Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines In their roles as major adhesion receptors , integrins, 110(Table 1), 673-687.

Jackman, R. J., Duffy, D. C., Cherniavskaya, O., & Whitesides, George M. (1999). Using Elastomeric Membranes as Dry Resists and for Dry Lift-Off. *Langmuir*, 15(8), 2973-2984. doi:10.1021/la981591y

Kajzar, A., Cesa, C M, Kirchgeßner, N., Hoffmann, B, & Merkel, R. (2008). Toward Physiological Conditions for Cell Analyses : Forces of Heart Muscle Cells Suspended Between Elastic Micropillars. *Biophysical Journal*, 94(March), 1854-1866. doi:10.1529/biophysj.107.115766

Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A. M., Ramko, E. B., Davidson, M. W., Hess, H. F., & Waterman, C. M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323), 580-584. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nature09621

Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., & Herzog, V. (2004). Cell migration : mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *Cell*, 83, 717-724.

Kreis, Thomas E and Birchmeier, W. (1980). Stress Fiber Sarcomeres Are Contractile of Fibroblasts. *Cell*, 22(November), 555-561.

Kumar, A., & Whitesides, G.M. (1993). Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol “ ink ” followed by chemical etching. *Applied Physics Letters*, 63(14), 2002–2004. AIP. Retrieved from http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=4881509

Lazarides, E., & Burridge, K. (1975, November). Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells. *Cell*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/802682>

Lehnert, D., Wehrle-haller, B., David, C., Weiland, U., Ballestrem, C., Imhof, B. A., & Bastmeyer, M. (2004). Cell behaviour on micropatterned substrata : limits of

- extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *Journal of Cell Science*. doi:10.1242/jcs.00836
- Lehrer, S. S. (1981). Damage to Actin Filaments by Glutaraldehyde : Protection by Tropomyosin. *The Journal of Cell Biology*, 63(7).
- Lo, S. H. (2006). Focal adhesions: what's new inside. *Developmental biology*, 294(2), 280-91. doi:10.1016/j.ydbio.2006.03.029
- Malek, a M., & Izumo, S. (1996). Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress. *Journal of cell science*, 109 (Pt 4, 713-26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8718663>
- Maupin-szamier, P., & Pollard, Thomas D. (1978). Cell Culture Preparation of Samples for Electron Microscopy. *The Journal of Cell Biology*.
- Mazur, P. (1970). Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science (New York, N.Y.)*, 168(934), 939-49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5462399>
- Mould, A. P., Akiyama, S. K., & Humphries, M. J. (1995). Regulation of Integrin $\alpha 5$ $\beta 1$ -Fibronectin Interactions by, 270(44), 26270 -26277.
- Nishikawa, S.-ichi, Goldstein, R. A., & Nierras, C. R. (2008). and therapy, 9(September), 725-729.
- Ostuni, Emanuele, Kane, R., Chen, Christopher S., Ingber, Donald E., & Whitesides, George M. (2000). Patterning Mammalian Cells Using Elastomeric Membranes. *Langmuir*, 16(20), 7811-7819. doi:10.1021/la000382m
- O'Neill, C., Jordan, P., & Lane, D. (1986). Evidence for Two Distinct Mechanisms Stimulation in Freshly Explanted and 313 Swiss Mouse Fibroblasts of Anchorage. *Cell*, 44, 489-496.
- Parker, K. K., Brock, A. L., Brangwynne, C., Mannix, R. J., Wang, N., Ostuni, Emanuele, Geisse, N. a, et al. (2002). Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(10), 1195-204. doi:10.1096/fj.02-0038com
- Parker, K. K., Tan, J., Chen, Christopher S, & Tung, L. (2008). Myofibrillar architecture in engineered cardiac myocytes. *Circulation research*, 103(4), 340-2. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.182469
- Patla, I., Volberg, Tova, Elad, N., Hirschfeld-Warneken, V., Grashoff, C., Fässler, R., Spatz, J. P., et al. (2010, September). Dissecting the molecular architecture of integrin adhesion sites by cryo-electron tomography. *Nature cell biology*. doi:10.1038/ncb2095
- Pelham, R. J., & Wang, Y. L. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by the mechanical properties of the substrate. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences, 94, 13662-13665. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11536880>

- Pellegrin, S., & Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of cell science*, 120(Pt 20), 3491-9. doi:10.1242/jcs.018473
- Petit, V., & Thiery, J.-paul. (2000). Focal adhesions : structure and dynamics. *Biology of the Cell*, 92.
- Peyton, S. R., & Putnam, A. J. (2005). Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *Journal of cellular physiology*, 204(1), 198-209. doi:10.1002/jcp.20274
- Pollard, T D. (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical Evaluation of mechanisms and function. *Proteins*, 987-1035.
- Qian, T., & Wang, Yingxiao. (2010). Micro/nano-fabrication technologies for cell biology. *Medical & biological engineering & computing*, 48(10), 1023-32. doi:10.1007/s11517-010-0632-z
- Resch, G. P., Goldie, K. N., Hoenger, A., & Small, J Victor. (2002). Pure F-actin networks are distorted and branched by steps in the critical-point drying method. *Journal of structural biology*, 137(3), 305-12. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12096898>
- Rigort, A., Gr, J., Herzog, V., & Kirfel, G. (2004). Release of integrin macroaggregates as a mechanism of rear detachment during keratinocyte migration. *Cell*, 83, 725-733.
- Ruiz, S. A., & Chen, Christopher S. (2008). Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(11), 2921-7. doi:10.1634/stemcells.2008-0432
- Saunders, R. M., Holt, M. R., Jennings, L., Sutton, D. H., Barsukov, I. L., Bobkov, A., Liddington, R. C., et al. (2006). Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *European journal of cell biology*, 85(6), 487-500. doi:10.1016/j.ejcb.2006.01.014
- Schwarzbauer, J E, & Sechler, J. L. (1999). Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Current opinion in cell biology*, 11(5), 622-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10508649>
- Schütz, J., Skorokhod, A., Mu, I. M., & Mu, W. E. G. (2001). Molecular Evolution of the Metazoan Extracellular Matrix : Cloning and Expression of Structural Proteins from the Demosponges *Suberites domuncula* and *Geodia cydonium*. *Journal of Molecular Evolution*, 402-415. doi:10.1007/s002390010230
- Severs, N. J. (2000). The cardiac muscle cell. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(2), 188-99. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<188::AID-BIES10>3.0.CO;2-T

- Sharp, A. A., Restrepo, D., & Gall, K. (2009). In Vivo Penetration Mechanics and Mechanical Properties of Mouse Brain Tissue at Micrometer Scale. *Trans Biomed Eng*, 56(1), 45-53. doi:10.1109/TBME.2008.2003261.In
- Singer, I. I. (1982a). Association of fibronectin and vinculin with focal contacts and stress fibers in stationary hamster fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 92(2), 398-408. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2112091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Singer, I. I. (1982b). Association of fibronectin and vinculin with focal contacts and stress fibers in stationary hamster fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 92(2), 398-408. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2112091&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Small, J.V. (1981). Organization of Actin in the Leading Edge of Cultured Cells : Influence of Osmium Tetroxide and Dehydration on the Ultrastructure of Actin Meshworks Preparation of Triton X-100- Organization of the Leading Edge after Glutaraldehyde Fixation. *The Journal of Cell Biology*.
- Small, J. V. (1986). Localization of filamin in smooth muscle. *The Journal of Cell Biology*, 102(1), 210-220. doi:10.1083/jcb.102.1.210
- Small, J., Celis, J., & others. (1978). Filament arrangements in negatively stained cultured cells: the organization of actin. *Cytobiologie*, 16(2), 308. Retrieved from http://cellix.imba.oeaw.ac.at/fileadmin/conferences/Videotour_CellMotility/Small.Celis.78.pdf
- Small, J.V. (1988). The actin cytoskeleton. *Electron Microsc. Rev*, 155-174. Retrieved from http://cellix.imba.oeaw.ac.at/fileadmin/conferences/Videotour_CellMotility/Small.1988.pdf
- Smith, C. L. (2008). Basic Confocal Microscopy, (January), 1-18. doi:10.1002/0471142727.mb1411s81
- Svitkina, T M, & Borisy, G. G. (1998). Correlative light and electron microscopy of the cytoskeleton. *Methods in enzymology*, 298, 570-92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751908>
- Svitkina, Tatjana M, Surguchova, G., Verkhovsky, A. B., Gelfand, V. I., Moeremans, M., & Mey, J. D. (1989). Direct Visualization of Bipolar Myosin Filaments in Stress Fibers of Cultured Fibroblasts. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 156, 150-156.
- Tomasek, J. J., Gabbiani, Giulio, Hinz, Boris, Chaponnier, C., & Brown, R. a. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3(5), 349-63. doi:10.1038/nrm809
- Truskett, V. N., & Watts, M. P. C. (2006). Trends in imprint lithography for biological applications. *Trends in biotechnology*, 24(7), 312-7. doi:10.1016/j.tibtech.2006.05.005

- Tse, J. R., & Engler, A. J. (2010). Preparation of hydrogel substrates with tunable mechanical properties. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, Chapter 10(June), Unit 10.16. doi:10.1002/0471143030.cb1016s47
- Turner, C. E., Glenney, J. R., & Burridge, K. (1990). Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *The Journal of cell biology*, 111(3), 1059-68. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2116264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Vakonakis, I., & Campbell, I. D. (2007). Extracellular matrix : from atomic resolution to ultrastructure. *Current Opinion in Cell Biology*, 578-583. doi:10.1016/j.ceb.2007.09.005
- Volberg, T, Geiger, B, Kam, Z., Pankov, R, Simcha, I., Sabanay, H., Coll, J. L., et al. (1995). Focal adhesion formation by F9 embryonal carcinoma cells after vinculin gene disruption. *Journal of cell science*, 108 (Pt 6, 2253-60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7673345>
- Wang, K., Ash, J. F., & Singer, S. J. (1975). Filamin , a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells. *Biochemistry*, 72(11), 4483-4486.
- Wang, Y. (2003). Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1593(2-3), 115-120. doi:10.1016/S0167-4889(02)00349-X
- Weber, K. and Groeschel-Stewart, U. (1974). Antibody to Myosin : The Specific Visualization of Myosin-Containing Filaments in Nonmuscle Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(11), 4561-4564.
- Weibel, D. B., Diluzio, W. R., & Whitesides, George M. (2007). Microfabrication meets microbiology. *Nature reviews. Microbiology*, 5(3), 209-18. doi:10.1038/nrmicro1616
- Whitesides, G M, Ostuni, E, Takayama, S., Jiang, X., & Ingber, D E. (2001). Soft lithography in biology and biochemistry. *Annual review of biomedical engineering*, 3, 335-73. doi:10.1146/annurev.bioeng.3.1.335
- Wierzbicka-Patynowski, I., & Schwarzbauer, Jean E. (2003). The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of cell science*, 116(Pt 16), 3269-76. doi:10.1242/jcs.00670
- Winkler, J., Lünsdorf, H., & Jockusch, B. M. (1996). The ultrastructure of chicken gizzard vinculin as visualized by high-resolution electron microscopy. *Journal of structural biology*, 116(2), 270-7. doi:10.1006/jsbi.1996.0042
- Xu, W., Baribault, H., & Adamson, E. D. (1998). Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development. *Development (Cambridge, England)*, 125(2), 327-37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9486805>
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., & Geiger, Benjamin. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature cell biology*, 9(8), 858-67. doi:10.1038/ncb0807-858

- Zamir, E., & Geiger, B. (2001a). Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science*, 114(Pt 20), 3583-90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707510>
- Zamir, E., & Geiger, B. (2001b). Components of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science*, 114(Pt 20), 3577-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707509>
- Zhao, S., Chen, A., Revzin, A., & Pan, T. (2011). Stereomask lithography (SML): a universal multi-object micro-patterning technique for biological applications. *Lab on a chip*, 11(2), 224-30. doi:10.1039/c0lc00275e
- Ziegler, W. H., Gingras, A. R., Critchley, D. R., & Emsley, J. (2008). Biochemical Society Annual Symposium No . 75 Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin. *Society*, 235-239. doi:10.1042/BST0360235
- Ziegler, W. H., Liddington, R. C., & Critchley, D. R. (2006). The structure and regulation of vinculin. *Trends in cell biology*, 16(9), 453-60. doi:10.1016/j.tcb.2006.07.004