

**Untersuchung
intrazellulärer Kalzium-Signale bei
zellmechanischen Prozessen**

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Kevin Küpper

aus
Remagen

Bonn 2012

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: 05.11.2012

Erscheinungsjahr: 2013

Zusammenfassung

Zellen stehen in ständiger mechanischer Kommunikation mit ihrer Umgebung. So können sie extrazelluläre Reize wahrnehmen und verarbeiten sowie selbst Kräfte generieren und auf ihre Umwelt übertragen. Hierzu müssen Zellen in der Lage sein biophysikalische und biochemische Signale ineinander umzuwandeln. Bei dieser, als Mechanotransduktion bezeichneten, Übersetzung spielt Kalzium als sekundärer Botenstoff eine essentielle Rolle.

Kalzium ist in der Zelle bei der Vermittlung einer Vielzahl verschiedener Informationen beteiligt, weshalb es einer komplexen räumlichen sowie zeitlichen Regulation seiner Signalgebung bedarf. Wie sich diese Koordination bei zellmechanischen Prozessen gestaltet ist derzeit jedoch kaum verstanden. In dieser Arbeit wurden daher intrazelluläre Kalzium-Signale bei verschiedenen mechanischen Prozessen hinsichtlich ihrer raumzeitlichen Aspekte analysiert. Hierbei handelte es sich im Speziellen um die quantitative Analyse zyklisch auftretender Kalzium-Signale bei der Erkennung der Substratsteifigkeit von Endothelzellen sowie um die räumlich und zeitliche hochaufgelöste, korrelative Analyse von Kalzium-Signal und Kontraktion embryonaler Herzmuskelzellen. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein mikroskopischer Aufbau realisiert, der eine simultane Zweikanalmessung mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichte. Ferner wurden verschiedene Bild- und Datenanalyseverfahren entwickelt.

Für humane Endothelzellen der Nabelschnurvene konnte hier ein klarer Zusammenhang zwischen der Häufigkeit, mit der Kalzium-Signale auftreten, und der Steifigkeit der Umgebung der Zellen nachgewiesen werden. Desweiteren deuten erste inhibitorische Versuche darauf hin, dass der krafterzeugende Apparat der Zellen einen Einfluss auf die Generierung dieser Kalzium-Signale haben kann.

Für pränatale, kardiale Myozyten konnten räumlich wie auch zeitlich heterogene Kalzium-Signalverläufe aufgezeigt werden. Zudem konnte durch die hierfür erstellten Bildanalyseverfahren das raumzeitliche Zusammenspiel zwischen Kalzium-Signal und Zellkontraktion während der elektromechanischen Kopplung analysiert werden. Hierdurch war es möglich eine Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs dieser Kopplung sowohl zur Kontraktionsfrequenz als auch der Zellmorphologie und Organisation der Myofibrillen nachzuweisen. Desweiteren belegen erste Experimente, dass mit den hier erstellten Verfahren auch hochaufgelöste, korrelative Untersuchungen von Zell-Zell-Interaktionen möglich sind.

Für meine Eltern Alfred und Annette

“After the publication of a paper in the Journal of Physiology, vol. III, No.5, I discovered that the saline which I had used had not been prepared with distilled water, but with pipe water supplied by the New River Water Company. As this water contains minute traces of various inorganic substances, I at once tested the action of saline solution made with distilled water and found that I did not get the effects described in the paper referred to...”

Sydney Ringer 1883

“...the Ca^{2+} signal is important in cells from their origin to their death. It controls the creation of cells at fertilization, masterfully guides them from infancy through adulthood to old age, and finally assists them at the time of their demise.”

Ernesto Carafoli 2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Zellmechanik.....	2
1.2	Kalzium als sekundärer Botenstoff	5
1.2.1	Generierung und Regulation von Kalzium-Signalen.....	6
1.2.2	Dekodierung von Kalzium-Signalen	10
1.3	Endothelzellen.....	13
1.3.1	Wahrnehmung mechanischer Reize in Endothelzellen	14
1.3.2	Kalzium-Signale in Endothelzellen	15
1.4	Kardiale Myozyten.....	17
1.4.1	Kontraktiler System kardialer Myozyten	18
1.4.2	Generierung von Kalzium-Signalen in Myozyten.....	20
1.5	Ziele dieser Arbeit.....	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Zellkultur.....	24
2.1.1	Primäre, humane Nabelschnur-Endothelzellen	24
2.1.2	Primäre, kardiale Myozyten aus der Ratte (pränatal).....	25
2.2	Herstellung von Analyse-Substraten.....	26
2.2.1	Glassubstrate.....	26
2.2.2	Elastische Substrate verschiedener Steifigkeiten.....	27
2.2.3	Strukturierte, elastische Substrate.....	29
2.2.4	Beschichtung der Substrate mit Fibronectin	32
2.3	Fluoreszenzmikroskopische Techniken und verwendete Farbstoffe	32
2.3.1	Immunhistochemische Färbung.....	32
2.3.2	Der verwendete Kalzium-Indikator <i>Fluo-4</i>	35
2.4	Mikroskopie	39
2.4.1	Automatisiertes Fluoreszenzmikroskop	39

2.4.2	Fluoreszenzmikroskop für simultane Zweikanalmessungen	40
2.5	Quantitative Bildanalyse	43
2.5.1	Analyse zyklisch auftretender Kalzium-Signale in HUVECs	44
2.5.2	Detektion der Substratdeformation während der Kontraktion kardialer Myozyten	50
2.5.3	Zeitliche Detektion von Signal-Ereignissen anhand ihrer ansteigenden Flanke	54
3	Ergebnisse	57
3.1	Untersuchung zum Einfluss zyklisch auftretender Kalzium-Signale bei der Erkennung der Substratsteifigkeit von Endothelzellen	57
3.1.1	Quantitative Analyse zyklisch auftretender Kalzium-Signale	57
3.1.2	Einfluss der Substratsteifigkeit auf die Frequenz der Kalzium-Oszillationen	60
3.1.3	Zeitliche Veränderung der Kalzium-Frequenz	61
3.1.4	Einfluss des Substratalters auf die Kalzium-Frequenz	66
3.1.5	Einfluss des Medienalters auf die Kalzium-Frequenz	67
3.1.6	Inhibitor-Experimente	68
3.2	Kalzium-Signale bei der Kontraktion pränataler, kardialer Myozyten	73
3.2.1	Einfluss des Kalzium-Indikators <i>Fluo-4</i> auf die Kontraktionshäufigkeit	74
3.2.2	Zeitlicher Verlauf der Kalzium-Signale in pränatalen, kardialen Myozyten	76
3.2.3	Raumzeitlicher Verlauf der gemessenen Kalzium-Signale	79
3.2.4	Quantifizierung der Substratdeformation	82
3.2.5	Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Kalzium- Signal und Zellkontraktion in pränatalen, kardialen Myozyten	86
3.2.6	Zeitlicher Versatz zwischen Kalzium-Signal und Substratdeformation in Abhängigkeit der Zellzahl	88

3.2.7	Zeitlicher Versatz zwischen Kalzium-Signal und Zellkontraktion in Abhängigkeit der Kontraktionshäufigkeit	90
3.2.8	Zellmorphologie und die Kalzium-Kontraktionskopplung	91
3.2.9	Zytoskelett-Organisation und lokale Substratdeformation	97
3.2.10	Synchronisation benachbarter Zellen ohne direkten Kontakt.....	100
4	Diskussion	105
4.1	Der verwendete Kalzium-Indikator <i>Fluo-4</i>	105
4.1.1	Quantitative Messungen	105
4.1.2	Toxizität und Bleichverhalten	106
4.1.3	Affinität und Puffer-Effekt	107
4.2	Zyklisch auftretende Kalzium-Signale bei der Erkennung der Substratsteifigkeit in Endothelzellen.....	108
4.2.1	Einfluss der Substratsteifigkeit auf die Kalzium-Frequenz.....	109
4.2.2	Entstehung der Kalzium-Signale	113
4.3	Raumzeitliche Analyse von Kalzium-Signal und Zellkontraktion in pränatalen, kardialen Myozyten.....	116
4.3.1	Zeitliche Variationen der Kalzium-Signale in pränatalen, kardialen Myozyten	116
4.3.2	Räumliche Variationen der Kalzium-Signale in pränatalen, kardialen Myozyten	117
4.3.3	Zeitlicher Versatz Δt zwischen Kalzium-Signal und Substratdeformation.....	118
4.3.4	Zusammenhang zwischen zeitlichem Versatz und der Kontraktionshäufigkeit pränataler, kardialer Myozyten.....	119
4.3.5	Einfluss der Signalbreite auf den Zusammenhang zwischen Δt und f_F	120
4.3.6	Einfluss der Zellmorphologie auf den Zusammenhang zwischen Δt und f_F	120
4.3.7	Synchronisierung benachbarter Zellen	123

4.4	Experimenteller Aufbau zur raumzeitlichen Analyse von Myozyten.....	124
4.4.1	Quantitative Messungen der Substratdeformation als Maß der Zellkontraktion	124
4.4.2	Indirekte Bestimmung der Zellkontraktion	125
4.4.3	Zeitliche Auflösung des Messsystems.....	126
4.4.4	Räumliche Auflösung des Messsystems.....	126
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	128
6	Anhang	130
6.1	Abkürzungsverzeichnis	130
6.2	Verwendete Software	132
6.3	Verwendete Geräte.....	133
6.4	Verbrauchsmaterial	134
6.5	Verwendete Chemikalien	135
6.6	Komplexe Medien.....	137
7	Literatur-Verzeichnis	139
8	Danksagung	148

1 Einleitung

Um ihr Überleben zu sichern, müssen Zellen sich beständig an extrazelluläre Bedingungen anpassen und auf deren stetige Veränderung hin reagieren. Besonders deutlich wird die Notwendigkeit dieser Interaktion mit der Umwelt bei grundlegenden Prozessen multizellulärer Organismen, wie beispielsweise Zellmigration, Wundheilung oder Ausbildung spezialisierter Gewebe und Organe. Innerhalb der hiermit verbundenen Abläufe muss jede einzelne Zelle ihr spezifisches Umfeld erkennen, um dementsprechend spezielle Funktionen übernehmen zu können. Hierzu müssen Zellen in der Lage sein aus einer Vielzahl äußerer Reize die für sie relevanten Informationen zu filtern und in intrazelluläre Signale umzuwandeln. Eine essentielle Rolle hierbei spielt der sekundäre Botenstoff Kalzium, welcher über die Generierung räumlicher und zeitlicher Signale verschiedene Informationen in einer Zelle vermittelt.

Neben dieser biochemischen Kommunikation zwischen Zellen sowie ihrer Umgebung konnte für eine weitere Gruppe von Signalen, der der mechanischen Reize, eine wichtige Rolle für die Regulation zellulärer Prozesse nachgewiesen werden. Durch die Verfügbarkeit neuer Methoden zur Messung mechanischer Prozesse auf Einzelzellebene und das verbesserte Verständnis mechanisch wirkender Strukturen, wie das dynamische Aktin-Zytoskelett oder die komplex aufgebauten Kontaktstellen zur Umgebung, hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten gezeigt, dass zellmechanische Signale einen Einfluss auf nahezu alle relevanten Prozesse einer Zelle haben. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über grundlegende Aspekte der Zellmechanik geben, die für die Kommunikation einer Zelle mit ihrer Umgebung von Bedeutung sind.

1.1 Zellmechanik

Zellen im tierischen Gewebe können sowohl mechanisch Reize aus ihrer Umgebung wahrnehmen also auch selbst Kräfte auf diese ausüben. Einer der deutlichsten, selbst von Zellen hervorgerufenen mechanischen Prozesse ist hierbei die Zellkontraktion, welche beispielsweise die Bewegung von Skelettmuskeln sowie den kontinuierlichen Schlag des Herzens ermöglicht. Für eine solche mechanische Interaktion müssen Zellen in direktem Kontakt mit ihrer Umwelt stehen. Eine zentrale Rolle spielen hierbei fokale Adhäsionen (FAen), welche das intrazelluläre Aktin-Zytoskelett über transmembrane Integrin-Rezeptoren direkt mit der extrazellulären Matrix verbinden (Abbildung 1-1) (Abercrombie & Dunn 1975; Hynes 2002). Aufgrund ihres dynamischen und komplexen Aufbaus ermöglichen FAen eine gezielte, bidirektionale mechanische Kommunikation zwischen einer Zelle und ihrer Umwelt (Zamir & Geiger 2001; Zaidel-Bar et al. 2004; Küpper et al. 2010; Bershadsky et al. 2003).

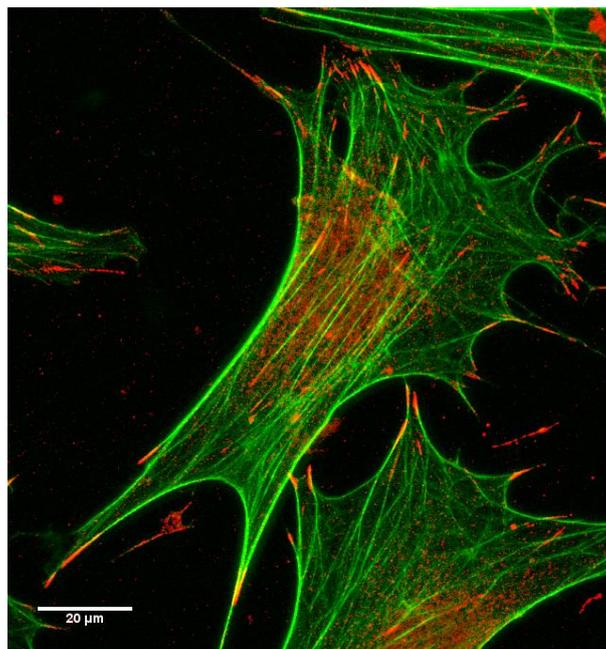


Abbildung 1-1: Fokale Adhäsionen (rot) koppeln das Aktin Zytoskelett (grün) mit der umgebenden extrazellulären Matrix. Dargestellt ist die immunhistochemische Färbung einer Fibroblastenzelle, welche auf einem zweidimensionalen Substrat kultiviert wurde. Zur Markierung der fokalen Adhäsionen wurden Antikörper gegen Vinculin verwendet. Die Färbung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte über fluoreszenz-markiertes Phalloidin.

Auch bei weniger offensichtlichen Vorgängen, wie der Migration von Zellen bei der Embryogenese oder Wundheilung, treten komplexe mechanische Prozesse auf. So finden in migrierenden Zellen ständige Reorganisationen des Zytoskeletts und der FAen statt, die es

Zellen ermöglicht gezielt Kräfte auf ihr Umfeld zu übertragen, welche in einer Bewegung der Zelle enden (Munevar et al. 2001; Möhl et al. 2009). Selbst immobile, nicht spontan kontraktile Zellen sind in der Lage mechanische Kräfte auf ihre Umgebung zu übertragen. Hier wird vermutet, dass diese Kräfte durch die innere Spannung der Zelle hervorgerufen werden, um Veränderungen der äußeren mechanischen Bedingungen wahrnehmen und auf sie reagieren zu können (Discher et al. 2005). So führen mechanische Reize, wie beispielsweise Dehnung oder Scherung von Zellen, zur Anpassung der fokalen Adhäsionsstrukturen bis hin zur kompletten Reorganisation des Zytoskeletts und zu Veränderungen des Zellverhaltens (Riveline et al. 2001; Faust et al. 2011). Eine weitere beachtliche Fähigkeit tierischer Zellen ist das Erkennen physikalischer Umgebungseigenschaften, wie Steifigkeit oder Topografie (Discher et al. 2005; a Wood 1988). Diese Wahrnehmung kann eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Zellen und somit der Entwicklung ganzer Organe mit spezifischer Funktion spielen (Engler et al. 2006). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass manche Zellen, geleitet durch Steifigkeitsunterschiede der Umgebung, eine gerichtete Migration aufweisen (Lo et al. 2000). Desweiteren ist bekannt, dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Substratsteifigkeiten für ihre optimale Entwicklung benötigen (Georges & Janmey 2005). So bilden Muskelzellen (Myozyten) auf Muskelgewebe-ähnlichen Substratsteifigkeiten (Elastizitätsmodul: ~ 18 kPa) deutlichere kontraktile Strukturen auf, als auf harten Glassubstraten (Elastizitätsmodul: $\gg 1$ GPa) oder auf weicheren, elastischen Substraten (Elastizitätsmodul: ≤ 10 kPa) (Jacot et al. 2008; Jacot, Kita-Matsuo, et al. 2010; Bajaj et al. 2010). Auch für andere Zelltypen, wie beispielsweise Zellen der Gefäß-Innenwände (Endothelzellen) ist bekannt, dass sie auf verschiedene Substratsteifigkeiten unterschiedlich reagieren können (Georges & Janmey 2005; J. A. Wood et al. 2011; Krishnan et al. 2011; Califano & Reinhart-King 2010). Es zeigt sich somit, dass die Erkennung mechanischer Signale einen essentiellen Einfluss auf lebenswichtige Prozesse wie der Entwicklung von Geweben und Organen sowie deren Funktion haben kann.

In der Zelle werden bioschemische Signale vermittelt. Wie jedoch die bidirektionale Übersetzung von biochemischen und mechanischen Signalen erfolgt, ist bisher kaum verstanden. Die Aufschlüsselung dieses, als Mechanotransduktion bezeichneten, Prozesses ist daher Bestandteil aktueller Forschung im Gebiet der Zellmechanik (Sen & Kumar 2010). Man vermutet, dass die Wahrnehmung mechanischer Reize durch einen so genannten Mechanosensor erfolgt, welcher daraufhin bestimmte Signalwege in der Zelle beeinflusst (Orr et al. 2006). Dieser Mechanosensor kann beispielsweise ein einzelnes mechanisch stimulierbares Molekül oder ein gesamter Proteinkomplex sein (Wu et al. 1999; Bershadsky et

al. 2003; Lin & Corey 2005; Vogel & Sheetz 2009). Auf lokaler Ebene kann die Signalvermittlung durch direkte Aktivierung regulatorischer Enzyme oder der Modifikation von Proteinkomplexen geschehen (Cohen et al. 2006; Küpper et al. 2010; Möhl et al. 2009). Um globale Veränderungen in einer Zelle hervorzurufen bedarf es jedoch weitreichendere Prozesse, wie den Einsatz sekundärer Botenstoffe, welche das Signal verstärken und weitere Signalkaskaden aktivieren (Kim et al. 2009). Einer der bedeutendsten sekundären Botenstoffe, sowohl für die Weiterleitung mechanischer als auch nicht-mechanischer Prozesse, ist das Kalzium-Kation (im Weiteren als Kalzium bezeichnet).

Der weitgreifende regulatorische Einfluss von Kalzium schließt auch die Signalvermittlung bei mechanischen Vorgängen ein. So war die Kontraktion von Herzmuskelzellen der erste Prozess, bei dem ein regulatorischer Einfluss von Kalzium beschrieben wurde (Ringer 1883; Bers 2002; Carafoli 2003). Kalzium spielt zudem aber auch bei anderen mechanischen Prozessen eine wichtige Rolle (Sen & Kumar 2010). Hierzu gehören zum Beispiel die Steuerung der Zellmigration, bei der Kalzium-Signale sowohl globale als auch lokale Signale vermittelt (Doyle & Lee 2005; Liu et al. 2009; Wei et al. 2009). Auch bei der Weiterleitung äußerer mechanischer Reize auf die Zelle ist Kalzium beteiligt. Für verschiedene Zelltypen ist beschrieben, dass bereits kleine lokal begrenzte Zugkräfte, die auf die Zelle wirken, zur reversiblen Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration führen können (Munevar et al. 2004; Matthews et al. 2010). Darüber hinaus sind Kalzium-Signale auch bei der Reaktion auf anhaltende mechanische Reize beteiligt. So kann Kalzium beispielsweise die Reorientierung von Zellen bei zyklischer Dehnung mit beeinflussen (Matthews et al. 2006; Thodeti et al. 2009). Zudem konnte gezeigt werden, dass wiederholt auftretende Kalzium-Signale selbst bei der Differenzierung von Zellen in Abhängigkeit der Steifigkeit der Umgebung beteiligt sind (Kim et al. 2009).

Die Analyse von Kalzium-Signalen bei der Vermittlung mechanischer Prozesse bildet den Hauptbestandteil der hier vorliegenden Arbeit. Die Funktionsmechanismen von Kalzium als sekundärer Botenstoff werden daher im nächsten Abschnitt näher beschrieben.

1.2 Kalzium als sekundärer Botenstoff

Im Jahr 1883 entdeckte Sydney Ringer durch einen Zufall, dass Kalzium-Ionen einen essentiellen Einfluss auf die Kontraktion von Herzmuskeln haben (Ringer 1883). Obwohl ihm die molekularen Prozesse, welche diesem Effekt zugrunde liegen, verborgen blieben, wurde durch diese Entdeckung doch erstmals deutlich, dass Kalzium-Ionen eine wichtige Rolle bei der Regulierung biologischer Prozesse spielen. Seither wurden unzählige weitere Beispiele beschrieben bei denen Kalzium-Ionen als sekundäre Botenstoffe wirken. So sind Kalzium-Ionen an Prozessen wie beispielsweise der Befruchtung von Eizellen, der Transmitter-Ausschüttung an chemischen Synapsen, der intrazellulären Verarbeitung von Hormon-vermittelten Reizen bis hin zur Regulation der Genexpression und dem programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt (Carafoli 2003; Berridge 2009; Lodish et al. 2007). Somit ist Kalzium einer der zentralen Botenstoffe in einer Zelle.

Heute weiß man, dass Kalzium Informationen in der Zelle durch schnelle, zeitlich begrenzte Erhöhungen der intrazellulären Konzentration vermittelt (Berridge 1997a; Bootman et al. 2001; Uhlén & Fritz 2010). Diese Konzentrationserhöhung wird im Folgenden als Kalzium-Signal bezeichnet. Durch die Aufschlüsselung verschiedener Signalwege und die Charakterisierung von Molekülen, welche bei der Generierung von Kalzium-Signalen beteiligt sind, hat man inzwischen ein wesentlich besseres Verständnis davon, wie Kalzium seine Funktion in der Zelle erfüllt. Dennoch sind viele regulatorische Prozesse immer noch nicht völlig verstanden. So stellt sich beispielsweise die Frage, wie ein einfaches zweiwertiges Ion so viele unterschiedliche Prozesse innerhalb einer Zelle maßgeblich mit regulieren kann (Berridge 1997b; Carafoli 2003; Clapham 2007). Die Aufklärung, wie verschiedene Informationen in der Zelle durch Kalzium-Signale vermittelt werden und wie die Zelle diese Signalvermittlung modifizieren kann, ist daher auch heute noch ein Schwerpunkt in der zellbiologischen Forschung.

Die Regulation von Kalzium-Signalen ist ein sehr komplexes Forschungsfeld, in dem nahezu täglich neue Erkenntnisse gewonnen werden. Im folgenden Abschnitt werden die Grundprinzipien und die wichtigsten molekularen Akteure, die bei der Generierung von Kalzium-Signalen beteiligt sind beschrieben.

1.2.1 Generierung und Regulation von Kalzium-Signalen

Kalzium vermittelt Informationen durch zeitlich begrenzte, intrazelluläre Konzentrationsveränderungen. Ermöglicht wird dies vor allem durch einen hohen Kalzium-Konzentrationsgradienten zwischen dem Zytosol ($\sim 10^{-7}$ M) und dem extrazellulären Raum ($\sim 10^{-3}$ M) (Clapham 2007; Lodish et al. 2007). Neben dem hohen Konzentrationsgefälle zwischen extrazellulärem Raum und dem Zytosol können auch bestimmte Zellkompartimente wie das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien¹, hohe Kalzium-Konzentrationen aufweisen (Kalzium-Speicher) und somit eine große Rolle bei der Generierung und Regulation von Kalzium-Signalen spielen (Carafoli 2003; Lodish et al. 2007).

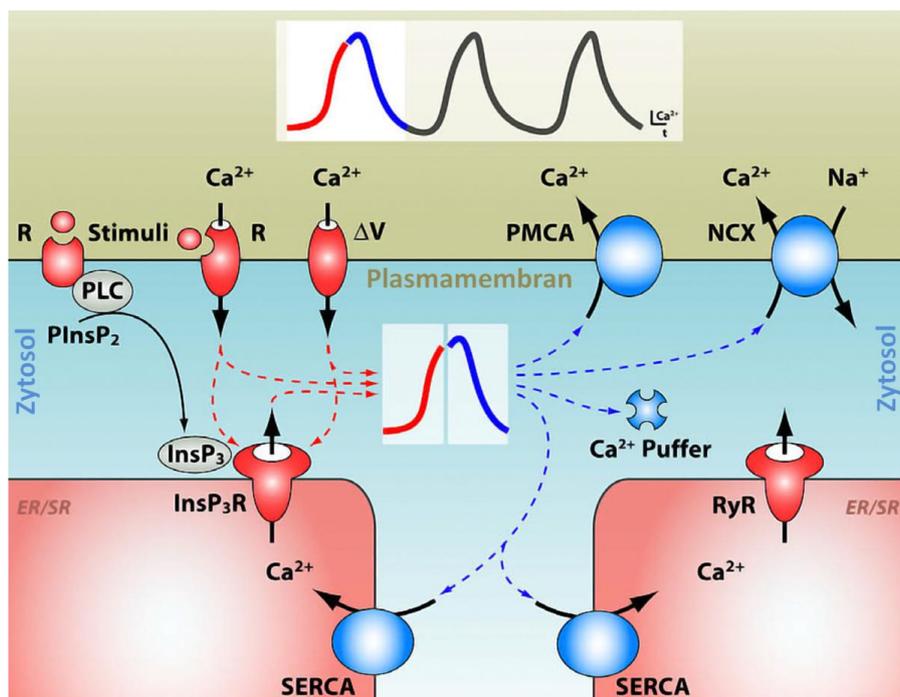


Abbildung 1-2: Generierung und Regulation von Kalzium-Signalen. Durch das hohe Konzentrationsgefälle kommt es zu einem schnellen Einstrom von Kalzium-Ionen (Ca^{2+}) aus dem extrazellulären Raum in das Zytosol durch beispielsweise Rezeptor-vermittelte (R) oder spannungsabhängige (ΔV) Kalzium-Kanäle. Zusätzlich können Kalzium-Kanäle des endoplasmatischen bzw. in Muskelzellen das sarkoplasmatischen Retikulums (ER/SR) vermittelt durch die Erhöhung der zytosolischen Kalzium-Konzentration sowie weiterer regulatorischer Faktoren wie Inositol(1,4,5)trisphosphat (InsP_3) weiteres Kalzium in das Zytosol ausschütten. Um die zytosolische Kalzium-Konzentration wieder zu senken, können Kalzium-Puffer das freie zytosolische Kalzium binden. Letztendlich wird das Kalzium durch Kalzium-ATPasen (PMCA bzw. SERCA) und Antiporter (NCX) aus dem Zytosol gepumpt. Verändert nach (Uhlén & Fritz 2010)

¹ Mitochondrien sind in der Lage Kalzium aus dem Zytosol aufzunehmen und dienen als Kalzium-Puffer (Funktion von Kalzium-Puffern siehe Text weiter unten). Auf mögliche weitere Einflüsse der Mitochondrien bei der Regulation von Kalzium-Signalen wird in diesem Abschnitt nicht näher eingegangen.

Durch das gezielte Öffnen von Kalzium-Kanälen kann eine Zelle schnell hohe zytosolische Kalzium-Konzentrationen erzeugen und hierdurch spezifische Effektor-Moleküle (Kalzium-Sensoren) aktivieren, welche weitere Prozesse steuern können (Bootman et al. 2001; Uhlén & Fritz 2010). Hält eine erhöhte Kalzium-Konzentration im Zytosol über einen längeren Zeitraum an, kann die Zelle keine weiteren Kalzium-Signale auslösen und geht in die Apoptose über (Orrenius et al. 2003). Aus diesem Grund, wird das Kalzium über ATP-verbrauchende Pumpen (Kalzium-ATPasen) sowie Ionen-Austausch-Kanäle (Antiporter) aus dem Zytosol in den extrazellulären Raum oder die intrazellulären Kalzium-Speicher befördert. Zusätzlich fangen Kalzium-bindende Proteine (Kalzium-Puffer) hohe Konzentrationen an freien Kalzium-Ionen ab, was sowohl die räumliche als auch die zeitliche Ausbreitung des Kalzium-Signals entscheidend verringert (Berridge et al. 2003). Es ist bekannt, dass Kalzium-vermittelte Prozesse sowohl durch die Stärke und Dauer, als auch durch die räumliche und zeitliche Abfolge von Kalzium-Signalen kodiert werden (Berridge 1997b; Berridge 1997a; Uhlén & Fritz 2010). Dies macht deutlich, dass die Generierung von Kalzium-Signalen eines komplexen Zusammenspiels zwischen Kalzium-Kanälen, -Pumpen, -Puffer und -Sensoren bedarf (Berridge et al. 2003). Auf diese molekularen Akteure wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

1.2.1.1 Erhöhung der zytosolischen Kalzium-Konzentration durch Kalzium-Kanäle

Eine Erhöhung der zytosolischen Kalzium-Konzentration erfolgt durch das gezielte Öffnen von Kalzium-Kanälen. Diese befinden sich sowohl in der Plasmamembran (PM) als auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), und können sich je nach Zelltyp und dem zu übermittelnden Signal stark unterscheiden.

Kalzium-Kanäle der Plasmamembran

Für die Plasmamembran ist eine Vielzahl unterschiedlicher Kalzium-Kanäle beschrieben, welche auf spezifische Reize reagieren. Je nach Art ihrer Aktivierung lassen sie sich in verschiedene Klassen unterteilen. So werden Kalzium-Kanäle der PM in „Rezeptor-vermittelte Kanäle“ (ROCs; englisch: „*receptor-operated channels*“) und „Spannungsabhängige Kalzium-Kanäle“ (VOCs; englisch: „*voltage-operated channels*“) eingeordnet. ROCs finden sich sowohl bei elektrisch erregbaren sowie nicht erregbaren Zellen und werden, ähnlich wie auch andere Rezeptoren, durch spezifische Liganden aktiviert. VOCs hingegen sind spezifisch für elektrisch erregbare Zellen, wie beispielsweise Neuronen oder Muskelzellen. Durch Veränderungen in der elektrischen Membranspannung, z.B. durch

Depolarisation, kann über VOCs ein schneller Kalzium-Einstrom über die gesamte Zelle erfolgen. (Bootman et al. 2001; Lodish et al. 2007)

Neben diesen beiden Aktivierungs-Methoden gibt es auch Hinweise darauf, dass Kalzium-Signale direkt über mechanische Reize ausgelöst werden können (Munevar et al. 2004; Matthews et al. 2010). Eine weitere, bisher nur wenig verstandene Klasse, bilden die „Speicher-abhängigen Kanäle“ (SOCs; englisch: „*store-operated channels*“). Diese Kanäle befinden sich zwar in der Plasmamembran, reagieren jedoch auf niedrige Kalzium-Konzentrationen innerhalb des ERs. Man geht davon aus, dass SOCs in einem Komplex mit Proteinen des ER interagieren, welche die Kalzium-Konzentration des ERs registrieren. Der durch SOCs hervorgerufene Kalzium-Einstrom aus dem extrazellulären Raum kann so dazu beitragen das ER nach einer Ausschüttung wieder mit Kalzium zu füllen (Putney 2009).

Kalzium-Kanäle des endoplasmatischen Retikulums

Die Erhöhung der zytosolischen Kalzium-Konzentration wird maßgeblich von der Ausschüttung von Kalzium-Ionen aus dem ER mitbestimmt (Bootman et al. 2001; Lodish et al. 2007). Hierzu befinden sich in der Membran des ERs zwei Klassen an Kalzium-Kanälen: Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptoren (IP₃Rs) und Ryanodin-Rezeptoren (RyRs). IP₃Rs finden sich in nahezu allen Säugetierzellen, während RyRs fast ausschließlich in elektrisch erregbaren Zellen vorkommen. Beiden Kanaltypen ist gemein, dass ihre Aktivität stark von der zytosolischen Kalzium-Konzentration abhängt (Berridge et al. 2003). Leicht erhöhte zytosolische Kalzium-Konzentration begünstigen die Aktivierung dieser Kanäle und somit eine zusätzliche Kalzium-Ausschüttung in das Zytosol. Hohe zytosolische Kalzium-Konzentrationen wirken hingegen inhibierend und verhindern eine übermäßige und andauernde Kalzium-Ausschüttung aus dem ER. Dieser selbstregulierende Prozess wurde erstmals 1970 von Endo et al. beschrieben und wird als Kalzium-induzierte Kalzium-Ausschüttung (CICR; englisch: „*calcium-induced calcium-release*“) bezeichnet (Endo et al. 1970). Neben Kalzium selbst wird die Aktivität dieser Kalzium-Kanäle noch durch viele weitere Faktoren beeinflusst. So wird die Aktivität der IP₃Rs neben der zytosolischen Kalzium-Konzentration zusätzlich durch IP₃-Moleküle (Inositol-1,4,5-trisphosphat), welche zum Beispiel bei der Signalverarbeitung über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen oder G-Proteingekoppelte Rezeptoren gebildet werden, reguliert (Streb et al. 1983). Durch diese komplexe Regulation ermöglichen Kalzium-Kanäle des ER, kleine zytosolische Kalzium-Konzentrationsanstiege durch CICR gezielt zu verstärken.

1.2.1.2 Kalzium-Pumpen und Antiporter

Erhöhte Kalzium-Konzentrationen im Zytoplasma müssen zügig reduziert werden, um die weitere Signalvermittlung und das Überleben der Zelle sicherzustellen (Orrenius et al. 2003). Um Kalzium aus dem Zytosol zu befördern, verfügt die Zelle über verschiedene Mechanismen. Durch die Verwendung von Antiportern ist die Zelle in der Lage Kalzium über die Plasmamembran in den extrazellulären Raum zu transportieren. Der bedeutendste Antiporter ist hier die $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe (*NCX*). Durch den Einstrom von drei Natrium-Ionen entlang ihres chemischen Gradienten wird jeweils ein Kalzium-Ion aus der Zelle heraus befördert. Hierbei handelt es sich um einen schnellen, jedoch wenig affinen Prozess. Um Kalzium auch bei geringeren Konzentrationen aus dem Zytosol zu befördern, verfügt die Zelle zudem über ATP-verbrauchende Kalzium-Pumpen. Diese Kalzium-ATPasen befinden sich sowohl in der Plasmamembran (*PMCA*; „Plasmamembran Ca^{2+} ATPase“) als auch in der Membran des ER (*SERCA*; „Sarkoplasmatische¹ / Endoplasmatische Ca^{2+} ATPase“). Die *PMCA* pumpt jeweils ein Kalzium-Ion pro hydrolysiertem ATP in den extrazellulären Raum, die *SERCA* pumpt dagegen jeweils 2 Kalzium-Ionen pro ATP in das ER. (Clapham 2007; Lodish et al. 2007)

Das zelltypspezifische Verhältnis aus *PMCA*, *SERCA* und Antiportern sowie die Kombination aus verschiedenen Subtypen dieser Pumpen, bestimmen maßgeblich den Konzentrationsverlauf und somit das Kalzium-Signal (Berridge et al. 2003).

1.2.1.3 Kalzium-bindende Proteine: Kalzium-Puffer und Kalzium-Sensoren

Die meisten Kalzium-bindenden Proteine besitzen so genannte EF-Hand-Motive. Erstmals beschrieben wurden diese Motive bei dem Kalzium-bindenden Protein *Parvalbumin*² (Kretsinger & Nockolds 1973). Solche EF-Hand-Motive sind in der Lage Kalzium-Ionen zu binden. Inzwischen ist eine Vielzahl an Kalzium-bindenden Proteinen bekannt, welche durch leichte Modifikationen der EF-Hand-Motive unterschiedliche Affinitäten zu Kalzium besitzen. Man unterscheidet generell zwei funktionelle Gruppen an Kalzium-bindenden Proteinen: Die Kalzium-Sensoren und die Kalzium-Puffer.

¹ Das sarkoplasmatische Retikulum ist eine spezialisierte Form des endoplasmatischen Retikulums in Muskelzellen und wird im Abschnitt 1.4 beschrieben

² Der Name EF-Hand lässt sich auf die erste Beschreibung in *Parvalbumin* zurückführen. In diesem Protein wird dieses Kalzium-bindende Motiv aus den E- und F-Domänen gebildet (Kretsinger & Nockolds 1973).

Kalzium-Sensoren

Der am besten charakterisierte Vertreter der Kalzium-Sensoren ist das Protein *Calmodulin*. *Calmodulin* besitzt insgesamt vier EF-Hand-Motive. Bindet Kalzium an diese Motive kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, wodurch zusätzliche Bindestellen für andere Proteine freigelegt werden (Lodish et al. 2007). Durch die spezifische Bindung an Proteine kann *Calmodulin* deren Aktivität beeinflussen. So hat *Calmodulin* beispielsweise einen aktivierenden Einfluss auf Kinasen, wie die *CaMKII* („Camodulin-abhängige Kinase 2“) oder *MLKK* („Myosin Leichte Kette Kinase“), welche wiederum weitere Prozesse steuern. Ein weiterer bedeutender Vertreter der Kalzium-Sensoren mit EF-Hand-Motiven ist das *Troponin C* welches in Muskelzellen die Bindung von Aktin und Myosin reguliert (siehe auch Abschnitt 1.4).

Kalzium-Puffer

Im Gegensatz zu Kalzium-Sensoren sind Kalzium-Puffer nicht direkt an der Regulierung von Protein-Aktivitäten beteiligt. Dennoch spielen sie eine sehr entscheidende Rolle bei der Kalzium-Signalvermittlung indem sie freie Kalzium-Ionen im Zytosol binden. Hierdurch werden zum einen länger anhaltende, hohe Kalzium-Konzentrationen im Zytosol vermieden und die Konzentration an freiem Kalzium im Ruhezustand weiter reduziert. Zum anderen können Kalzium-Puffer durch das Binden freier Kalzium-Ionen die räumliche Ausbreitung von Kalzium-Signalen regulieren. Zusätzlich konkurrieren Kalzium-Puffer affinitätsabhängig mit Kalzium-Sensoren um das freie Kalzium.(Berridge et al. 2003; Gilabert 2012)

1.2.2 Dekodierung von Kalzium-Signalen

Unterschiedliche Zelltypen exprimieren auch unterschiedliche Subtypen der im Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Kalzium-Kanäle, -Pumpen, -Puffer und -Sensoren. Die Kombination aus diesen Akteuren bestimmen welche Kalzium-Signale von der jeweiligen Zelle generiert werden können. Innerhalb ein und derselben Zelle werden jedoch verschiedene Informationen über Kalzium vermittelt. Um dies zu ermöglichen, werden Kalzium-Signale sowohl räumlich als auch zeitlich ver- und entschlüsselt. (Berridge et al. 2003; Clapham 2007)

1.2.2.1 Räumlich vermittelte Kalzium-Signale

Öffnet sich ein Kalzium-Kanal, kommt es zu einer schnellen, lokalen Erhöhung der Konzentration freier Kalzium-Ionen. Je länger der Kanal geöffnet bleibt, umso mehr Kalzium

gelangt ins Zytoplasma. Hierbei entscheiden vor allem die Kalzium-Puffer und umliegende Pumpen, inwiefern sich diese s.g. elementaren Kalzium-Signale räumlich und zeitlich ausbreiten. Durch die räumliche Nähe zwischen Kalzium-Kanälen und –Sensoren, können solche elementaren Kalzium-Signale lokalbegrenzte Reaktionen auslösen, ohne dabei andere Signal-Prozesse zu beeinflussen (Berridge 1997a; Berridge et al. 2003). Ein Beispiel für eine solche, lokal begrenzte Signalvermittlung ist die chemische Synapse von Nervenzellen. Hier liegen VOCs und Kalzium-Sensoren, wie beispielsweise *Synaptotagmin* in funktionellen Einheiten eng beieinander. Durch die Depolarisation der Plasmamembran kommt es in diesen funktionellen Einheiten zu einer lokalen Erhöhung der Kalzium-Konzentration, was im Folgenden über die Aktivierung von *Synaptotagmin*, die Transmitter-Ausschüttung aus intrazellulären Vesikeln in den synaptischen Spalt bewirkt (Lodish et al. 2007).

Bestimmte lokal begrenzte Reaktionen können durch lokale Kalzium-Signale vermittelt werden. Kalzium wirkt in Zellen jedoch auch auf globale Prozesse. Hierzu bedarf es in der Regel einer globalen Erhöhung der Kalzium-Konzentration. Solche globalen Kalzium-Signale setzen sich aus vielen elementaren Kalzium-Signalen zusammen (H. Cheng et al. 1993; Mark B. Cannell et al. 1994; Berridge 1997a; Berridge et al. 2003). So werden globale Signale beispielsweise durch das Öffnen vieler, über die gesamte Zelle verteilte, Kalzium-Kanäle der Plasmamembran generiert. Ein Beispiel, welches im Abschnitt 1.4 noch näher beschrieben wird, ist das gemeinsame Öffnen vieler VOCs bei der Depolarisation von Muskelzellen. Hierbei wirken die einzelnen VOCs in lokal begrenzten funktionellen Einheiten, vermitteln im Weiteren jedoch die Kontraktion der gesamten Zelle (H. Cheng et al. 1993; Bers 2002).

In nicht-elektrisch-erregbaren Zellen werden globale Kalzium-Signale oft durch CICR von Kalzium-Sensitiven Kanälen des ERs generiert (Berridge 2009). Beispielsweise kann durch Aktivierung eines IP₃R zunächst ein elementares Kalzium-Signal ausgelöst werden (Streb et al. 1983). Befinden sich weitere Kalzium-sensitive Kanäle in näherer Umgebung, können diese durch die lokale Konzentrationserhöhung des zytosolischen Kalziums ebenfalls aktiviert werden. Auf diese Weise kann sich ein elementares Kalzium-Signal durch eine wellenartige Fortpflanzung zu einem globalen Kalzium-Signal entwickeln.

1.2.2.2 Zeitlich vermittelte Kalzium-Signale

Kalzium vermittelt sowohl kurzfristige als auch länger anhaltende Reaktionen (Berridge et al. 2003; Clapham 2007). Kurze Reaktionen, wie die Ausschüttung von Neurotransmittern oder die Kontraktion von Muskelzellen, können direkt über die Stärke und Dauer einzelner Kalzium-Signale reguliert werden (Berridge et al. 2003; Alberts et al. 2008). Für länger

anhaltende Prozesse, wie die Aufrechterhaltung metabolischer Prozesse infolge anhaltender Stimulierung durch Hormone, ist eine Regulation auf Basis eines einzelnen, andauernden Kalzium-Signals jedoch nicht möglich, da eine langfristige Erhöhung der zytosolischen Kalzium-Konzentration zur Apoptose führt (Orrenius et al. 2003). Lang anhaltende Prozesse werden in Zellen daher durch zyklisch auftretende Kalzium-Signale (Kalzium-Oszillationen¹) vermittelt (Ferreira-Martins et al. 2009; Lewis 2003; Sun et al. 2007; Uhlén & Fritz 2010). Man geht derzeit davon aus, dass die Kalzium-Frequenz¹, d.h. die Rate mit der die Kalzium-Signale auftreten, die Aufrechterhaltung des jeweiligen Prozesses reguliert (Berridge 1997b; De Koninck & Schulman 1998; G Dupont & Goldbeter 1998; Uhlén & Fritz 2010).

1.2.2.3 Dekodierung von Kalzium-Oszillationen

Um auf Kalzium-Oszillationen reagieren zu können, benötigt die Zelle eine Möglichkeit die zeitliche Abfolge der einzelnen Kalzium-Signale zu dekodieren, d.h. sie benötigt eine Art „Gedächtnis“ für die vorangegangenen Signale. Erreicht werden kann dies beispielsweise durch Proteine, welche nach der Aktivierung eine gewisse Zeit aktiv bleiben. Erfolgt in geeigneten zeitlichen Abständen eine erneute Aktivierung, kann dieses Protein seine Funktion so lange wie die zyklischen Kalzium-Signale auftreten, aufrecht erhalten. Ein Beispiel eines solchen Sensors für die Kalzium-Frequenz ist die „*Calmodulin*-abhängige Kinase 2“ (*CaMKII*). Durch die Bindung von aktiviertem *Calmodulin* kommt es zur Autophosphorylierung der *CaMKII*. Diese Phosphorylierung hält die *CaMKII* für mehrere Minuten aktiv. Für *CaMKII* wurde eine Kalzium-Frequenz-abhängige Aktivierung durch *in vitro* Experimente bereits 1998 von De Koninck und Schulman nachgewiesen (De Koninck & Schulman 1998; G Dupont & Goldbeter 1998). Zudem deuten viele unabhängige Experimente darauf hin, dass Kalzium-Frequenzen eine Rolle bei der Vermittlung von Langzeitprozessen in der Zelle spielen (Hu et al. 2002; Kim et al. 2009; Sun et al. 2007; Zhu et al. 2008). Wie viele Prozesse in einer Zelle tatsächlich durch Kalzium-Frequenzen reguliert werden, und welche molekularen Vorgänge hierbei mitwirken ist derzeit noch ungeklärt (Uhlén & Fritz 2010; Geneviève Dupont et al. 2007).

¹ Bei den Begriffen Kalzium-Oszillation und –Frequenz handelt es sich um die in diesem Forschungsfeld etablierte Terminologie aus der englischsprachigen Primärliteratur. Es ist jedoch zu beachten, dass zyklisch auftretende Kalzium-Signale keine absolut konstanten, zeitlichen Abstände aufweisen (Skupin et al. 2008). Es handelt sich hierbei somit eher um eine Signal-Häufigkeit innerhalb eines Zeitraums. Zur Abgrenzung zu anderen in dieser Arbeit ermittelten Häufigkeitsverteilungen und um die Konsistenz zur Literatur zu wahren, wird die oben genannte Terminologie jedoch auch in dieser Arbeit verwendet.

1.3 Endothelzellen

Endothelzellen (EZ) finden sich im gesamten Gefäßsystem von Säugetieren. Hierzu gehören sowohl die Arterien, Venen und Kapillargefäße des Blut-Kreislaufes als auch die Gefäße des Lymphsystems. Durch eine Basallamina¹ vom äußeren Gewebe abgegrenzt, bilden EZ eine einlagige Zellschicht (Endothel), welche die Innenwand der Gefäße auskleidet (Abbildung 1-3). Endotheliale Vorläuferzellen sind während der Embryogenese bereits verantwortlich für die Ausbildung des Gefäßsystems (Vaskulogenese). Ermöglicht wird ihnen dies durch ihre Fähigkeit zur Proliferation und Migration. Auch in ausgereiften Gefäßen behalten EZ diese Fähigkeit bei, und spielen hierdurch eine wichtige Rolle bei der Reparatur geschädigter Gefäße sowie dem weiteren Wachstum neuer Gefäßverzweigungen (Angiogenese). (Alberts et al. 2008)

Neben ihrer Aufgabe als regulatorische Barriere für den Transport von Stoffen zwischen dem Blutkreislauf und dem Zellgewebe, regulieren EZ auch eine Reihe von Funktionen der Gefäße wie beispielsweise ihre Flüssigkeitszirkulation. So beeinflussen EZ beispielsweise die Kontraktion von Zellen der glatten Muskulatur, welche vor allem größere Gefäße, wie die Arterien umgibt (Lodish et al. 2007). Endothelzellen spielen zudem eine große Rolle bei der Immunantwort. So reagieren Sie auf inflammatorische Signale und ermöglichen infolgedessen Immunzellen das Anhaften an die Gefäßwand und das anschließende Durchqueren des Endothels (Paravasation) (Lodish et al. 2007; Janeway et al. 2005). Um solch vielseitige Funktionen zu erfüllen, müssen EZ Informationen aus ihrer Umgebung wahrnehmen und auf diese reagieren.

Aufgrund der zuvor beschriebenen großen Bedeutung bei so zentralen Prozessen wie der Aufrechterhaltung des Blutkreislaufs, der Vaskulogenese, Angiogenese bis hin zur Vermittlung der Paravasation bei der Immunantwort, ist die Aufklärung, über welche Mechanismen Endothelzellen ihre Umwelt wahrnehmen und auf sie reagieren ein aktuelles Thema in der zellbiologischen und medizinischen Forschung. Neben der Informationsvermittlung über biochemische Signale, wie Wachstumsfaktoren oder Hormone, spielen bei Endothelzellen vor allem mechanisch vermittelte Signale eine große Rolle. Der

¹ Die Basallamina ist eine spezialisierte extrazelluläre Matrix, welche vor allem in Epithelien aber auch bei anderen Geweben, wie dem Endothel zu finden ist. Sie bildet eine dünne Schicht, welche neben ihrer begrenzenden Funktion zu anderen Geweben, eine stützende und formgebende Rolle hat. Zusätzlich kann sie sowohl das Wachstum als auch die Differenzierung der Zellen, die auf ihr wachsen beeinflussen. Ihre molekulare Zusammensetzung unterscheidet sich je nach ihrer Funktion, in dem sie gebildet wird. (Lodish et al. 2007)

nächste Abschnitt gibt eine kurze Übersicht über die mechanischen Reize, welche von EZs wahrgenommen werden können.

1.3.1 Wahrnehmung mechanischer Reize in Endothelzellen

In ihrem natürlichen Umfeld sind EZ einer Vielzahl mechanischer Reize ausgesetzt (Abbildung 1-3). Gerade in Blutgefäßen hängen viele dieser Reize direkt mit dem Flüssigkeitsstrom innerhalb der Gefäße zusammen. Durch den Blutstrom erfahren EZ beispielsweise kontinuierliche Fließscherungen. Ferner ruft der pulsierende Blutstrom, gerade in arteriellen Gefäßen, starke Veränderungen des hydrostatischen Drucks hervor, der direkt auf die EZ wirkt und zudem zu zyklischen Dehnungen der Gefäßwände führt. Zusätzlich zu den mechanischen Reizen, welche durch den Blutstrom verursacht werden, erfahren EZ noch weitere mechanische Reize. Ein Beispiel ist die Kontraktion der glatten Muskulatur, welche zur Verengung der Gefäße (Vasokonstriktion) führt und bei der Regulation des Blutstroms eine wichtige Rolle spielt. Für alle diese mechanischen Reize ist bekannt, dass EZ gezielt auf sie reagieren können. So ändern EZ in Abhängigkeit dieser mechanischen Reize ihre Morphologie, Proliferationsrate und das Migrationsverhalten sowie ihre regulative Funktion auf andere Zellen, wie beispielsweise die glatte Muskulatur. (Califano & Reinhart-King 2010)

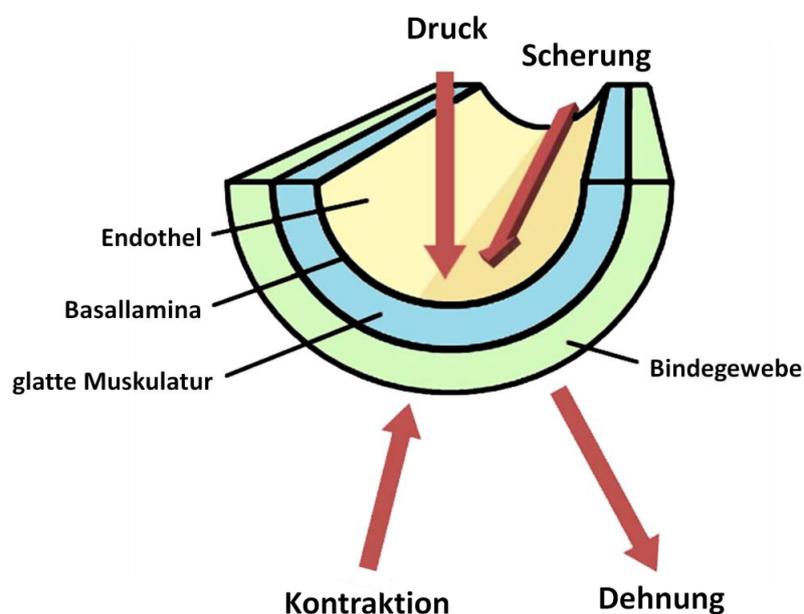


Abbildung 1-3: Mechanische Reize in einem arteriellen Blutgefäß (Schema). Das Blutgefäß wird von Endothelzellen ausgekleidet, welche auf einer Basallamina aufsitzen. Das Endothel wird von einer Schicht aus glatten Muskelzellen umgeben. Die äußere Schicht des Gefäßes besteht aus einem dichten Netzwerk aus Bindegewebszellen und extrazellulärer Matrix. Endothelzellen erfahren mechanische Reize durch den Blutstrom (Scherung, Druck und Dehnung) sowie durch äußere Einflüsse wie der Kontraktion der glatten Muskulatur. Verändert nach (Califano & Reinhart-King 2010).

Neben den bereits beschriebenen mechanischen Kräften, wie Scherung, Dehnung und Stauchung, hat darüber hinaus die Steifigkeit der Umgebung einen entscheidenden Einfluss auf das Verhalten von Endothelzellen. Es ist bekannt, dass sich Endothelzellen in Abhängigkeit der Steifigkeit des unterliegenden Substrates unterschiedlich entwickeln (Georges & Janmey 2005; Califano & Reinhart-King 2010). Untersuchungen in einer dreidimensionalen Umgebung haben gezeigt, dass EZ bei niedrigen Steifigkeiten (Elastizitätsmodul: <10 kPa) dazu tendieren netzwerkartige Verbindungen auszubilden (Sieminski et al. 2004). Aktuelle Untersuchungen von Wood et al. auf zweidimensionalen Substraten konnten eindeutig zeigen, dass Endothelzellen auf verschiedenen steifen Substraten (Elastizitätsmodul: 25-75 kPa) unterschiedlich gut adhäreren und zudem sowohl unterschiedliche morphologische Muster als auch Proliferationsraten ausbilden. Die von ihnen beobachteten Effekte variierten zudem für spezifische Endothelzelltypen (J. A. Wood et al. 2011). Weitere Experimente von Krishnan et al. deuten darauf hin, dass die Substratsteifigkeit einen Einfluss auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und somit auf die Bildung eines konfluenten Endothels hat (Krishnan et al. 2011). Daher wird vermutet, dass die Erkennung der Substratsteifigkeit durch EZ sowohl bei der Angiogenese als auch bei der Reparatur der Gefäße sowie bei der Entwicklung von Gefäßerkrankungen eine wichtige Rolle spielt (Califano & Reinhart-King 2010). Die zugrunde liegenden Mechanismen, die es EZ ermöglichen auf verschiedene Steifigkeiten zu reagieren, sind derzeit noch nicht verstanden.

1.3.2 Kalzium-Signale in Endothelzellen

Wie in anderen Zellen, spielen Kalzium-Signale auch in Endothelzellen eine wichtige Rolle (Tran & H. Watanabe 2006). So reagieren Endothelzellen beispielsweise auf bestimmte biochemische Faktoren, wie Histamin, mit der Ausbildung zyklisch auftretender Kalzium-Signale (Jacob et al. 1988). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Frequenz intrazellulärer Kalzium-Oszillationen einen direkten Einfluss auf die Genexpression von Endothelzellen haben können (Hu et al. 2002; Zhu et al. 2008). Viele Studien deuten darauf hin, dass Kalzium-Signale in Endothelzellen darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Vermittlung mechanischer Reize spielen. So konnte für EZ gezeigt werden, dass bestimmte mechanisch aktivierbare Ionen-Kanäle bei der Reorientierung von Endothelzellen in Abhängigkeit zyklisch auftretender Dehnungen beteiligt sind (Naruse et al. 2012; Thodeti et al. 2009). Zudem konnte belegt werden, dass bereits ein lokaler Verzug einer Endothelzelle zu einer direkten Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration in diesem Bereich führt

(Matthews et al. 2010). Weitere Experimente haben gezeigt, dass EZ zyklisch auftretende Kalzium-Signale ausbilden, wenn sie einem Scherfluss ausgesetzt werden (Hoyer et al. 1998). Man geht heute davon aus, dass bei vielen dieser Kalzium-vermittelten Prozesse TRP-Kanäle („transientes Rezeptor-Potential-Kanäle“) eine entscheidende Rolle spielen (Yin & Kuebler 2010; Folgering et al. 2008). Inwieweit weitere mechanische Prozesse, wie z.B. die Erkennung der Substratsteifigkeit in Endothelzellen, durch Kalzium-Signale reguliert werden, ist noch nicht völlig geklärt und eine zentrale Fragestellung in diesem Forschungsfeld.

1.4 Kardiale Myozyten

Das Herz ist ein Hohlmuskel. Im menschlichen Körper pumpt dieser Muskel mit einer durchschnittlichen Kontraktionshäufigkeit von 60 – 80 Schlägen die Minute etwa 7000 Liter Blut am Tag durch die Blutgefäße. Durch seine stetigen Kontraktionen sichert das Herz somit sowohl die Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff als auch den Abtransport schädlicher Abbauprodukte aus dem Gewebe heraus. (Alberts et al. 2008)

Der Herzmuskel setzt sich vor allem aus kardialen Myozyten und Bindegewebszellen (Fibroblasten) zusammen (Banerjee et al. 2007). Durch ihre Fähigkeit zur gezielten Kontraktion bilden die kardialen Myozyten hierbei den kraftgenerierenden Apparat des Herzens. In ihrem Aufbau weisen sie viele Gemeinsamkeiten aber auch gewisse Unterschiede zu skelettalen Muskelzellen auf. Während skelettale Muskelzellen lange Muskelfasern aus verschmolzenen Zellen (Synzytium) ausbilden, wird der Herzmuskel aus einem Verbund, meist länglich geformter, kardialer Myozyten gebildet, welche je nach Lage im Herzen unterschiedliche Aufgaben erfüllen (Abbildung 1-4). (Alberts et al. 2008)

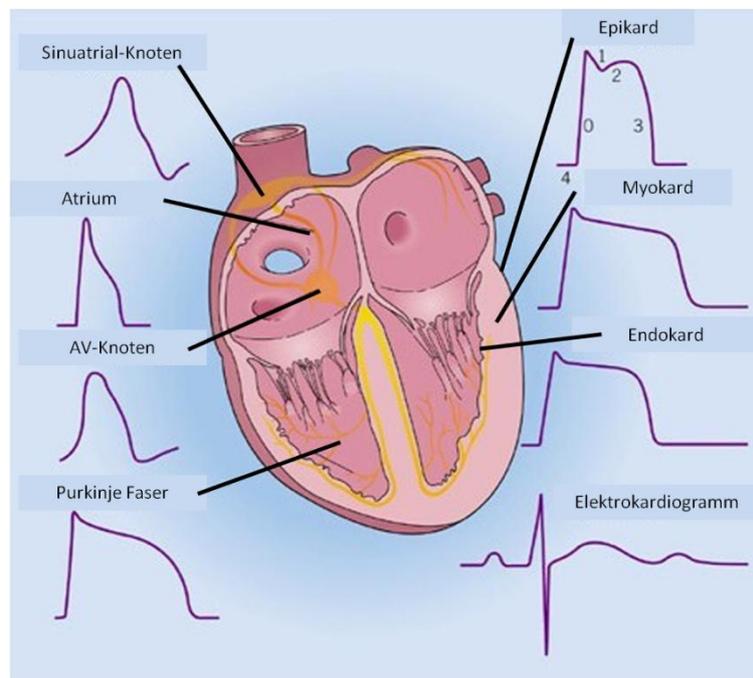


Abbildung 1-4: Aktionspotentiale von Myozyten je nach Lage und Funktion im Herzen. Verändert nach (Crawford & DiMarco 2003).

Um einen regulierten Schlag der Herzens zu gewährleisten, wird die Kontraktion einzelner Myozyten über Aktionspotentiale (APe) gesteuert. Dieser Prozess wird als elektromechanische Kopplung (EMK) bezeichnet (Bers 2002). APe werden von

spezialisierten Myozyten vor allem im Sinuatrial-Knoten des rechten Vorhofs generiert und über Zell-Zell-Verbindungen von Myozyte zu Myozyte weitergeleitet. (Walker 1999; Berne & Levy 2000)

1.4.1 Kontraktiler System kardialer Myozyten

Um eine hohe und gerichtete Kontraktionskraft zu generieren, verfügen die einzelnen Myozyten über ein hochorganisiertes Aktin-Myosin-System, welches lange, kontraktile Fasern (Myofibrillen) in der Zelle ausbildet. Diese Myofibrillen sind wiederum aus kontraktile Untereinheiten, den Sarkomeren aufgebaut (Abbildung 1-5).

Die einzelnen Sarkomere einer Myofibrille sind etwa 2 μm lang und werden durch die so genannten Z-Scheiben voneinander getrennt. An diese Z-Scheiben sind Aktin-Filamente über ihr (+)-Ende gebunden. Die Aktin-Filamente sind hierbei parallel zueinander ausgerichtet und ragen mit ihren (-)-Enden in das Zentrum des Sarkomers. Zwischen den Aktin-Filamenten gegenüberliegender Z-Scheiben befinden sich Bündel aus bipolar angeordnetem *Myosin II*.

Bei *Myosin II* handelt es sich um ein so genanntes Motorprotein, welches über seine Kopfreion an Aktin-Filamente binden kann und unter hydrolytischer Spaltung von ATP eine Konformationsänderung erfährt. Hierdurch kommt es zu einer Bewegung entlang des Aktin-Filaments. Durch seine bipolare Anordnung im Sarkomer, werden durch diese Bewegung die Aktin-Filamente zueinander hin verschoben und es kommt zur Verkürzung des Sarkomers. (H. Huxley & Hanson 1954; A. F. Huxley & Niedergerke 1954; Alberts et al. 2008)

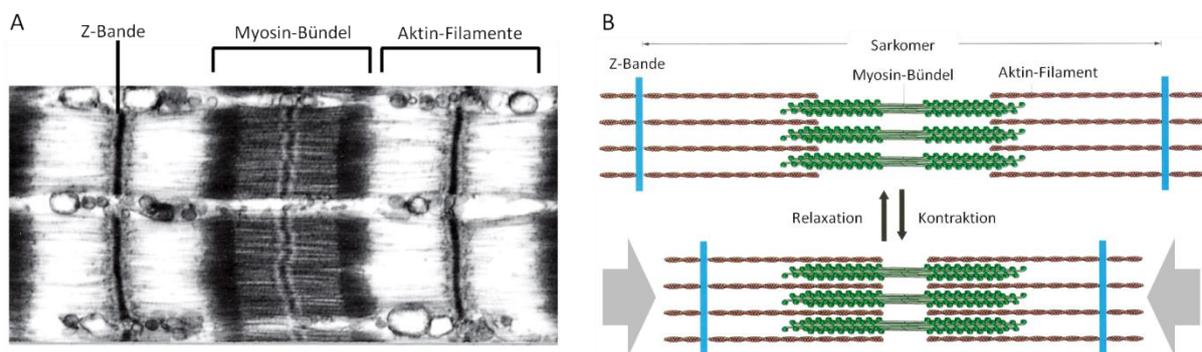


Abbildung 1-5: Aufbau des Sarkomers. (A) Elektronentransmissionsaufnahme der Sarkomere. Entnommen und verändert aus (Alberts et al. 2008). (B) Schematische Darstellung des Aktin-Myosin-Systems eines Sarkomers. Die Aktin-Filamente sind parallel zueinander angeordnet und jeweils mit einem Ende mit den Z-Scheiben des Sarkomers verbunden. Zwischen den gegenüberliegenden Aktin-Filamenten sind bipolar angeordnete Myosin-Bündel eingelagert. Durch die Bewegung des Myosins entlang der Aktin-Filamente kommt es zur Kontraktion des Sarkomers. Entnommen und verändert aus (Lodish et al. 2007).

Die für diese Kontraktion benötigte Energie in Form von ATP erhalten die Sarkomere von Mitochondrien welche entlang der Myofibrillen angeordnet sind. Um eine unkontrollierte oder anhaltende Kontraktion der Sarkomere durch die stetige Anwesenheit von ATP zu verhindern, werden die Bindestellen der Aktin-Filamente für Myosin im Ruhezustand einer Zelle durch das längliche Protein *Tropomyosin* verdeckt (Abbildung 1-6). *Tropomyosin* selbst steht zudem einem weiteren Protein-Komplex, dem *Troponin*, in Verbindung. Neben *Troponin I* und *Troponin T* befindet sich in diesem Komplex der Kalzium-Sensor *Troponin C*. Bindet Kalzium an *Troponin C*, kommt es zu einer Konformationsänderung im *Troponin*-Komplex, welche das *Tropomyosin* delokalisiert und hierdurch die Bindestellen des Aktin-Filaments für Myosin freigibt. Myosin kann nun an Aktin binden und es kommt zur Kontraktion des Sarkomers. Dissoziiert das Kalzium-Ion vom *Troponin C*, kehrt das *Tropomyosin* in seine ursprüngliche Position zurück und die Kontraktion wird gestoppt. Die Bindung von Kalzium an *Troponin C* stellt in Myozyten somit den direkten Vermittler der Zellkontraktion dar.

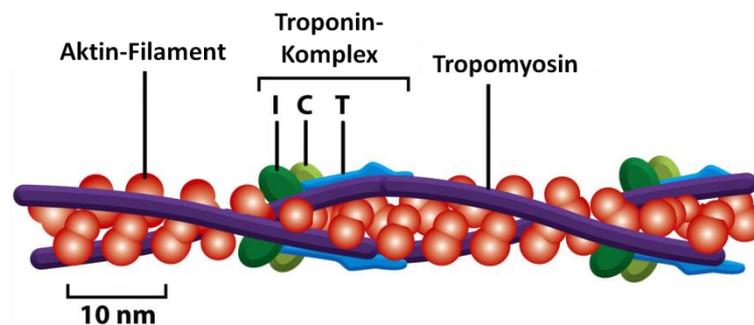


Abbildung 1-6: Kontraktionskontrolle durch Troponin (Schema). Die Maskierung der Bindestellen für Myosin wird durch den Troponin-Komplex reguliert. Bindet Kalzium an Troponin C kommt es zu einer Konformationsänderung des Komplexes welche das Tropomyosin. Hierdurch wird die durch Tropomyosin maskierte Bindestelle freigegeben und Myosin kann an sie binden.

Für eine effiziente Zellkontraktion müssen alle Sarkomere innerhalb kurzer Zeit zusammen zur Kontraktion gebracht werden. Es ist daher von entscheidender Bedeutung, dass Kalzium entlang der Myofibrillen räumlich und zeitlich präzise reguliert zur Verfügung gestellt werden kann. Ermöglicht wird dieses durch die komplexe elektromechanische Kopplung, welche im nächsten Abschnitt näher beschrieben wird.

1.4.2 Generierung von Kalzium-Signalen in Myozyten

In Myozyten bildet das sarkoplasmatische Retikulum (SR), eine spezielle Form des endoplasmatischen Retikulums, ein weitreichendes Netzwerk entlang der Sarkomere aus und ist die Hauptquelle des für die Kontraktion benötigten Kalziums (Abbildung 1-7 A).

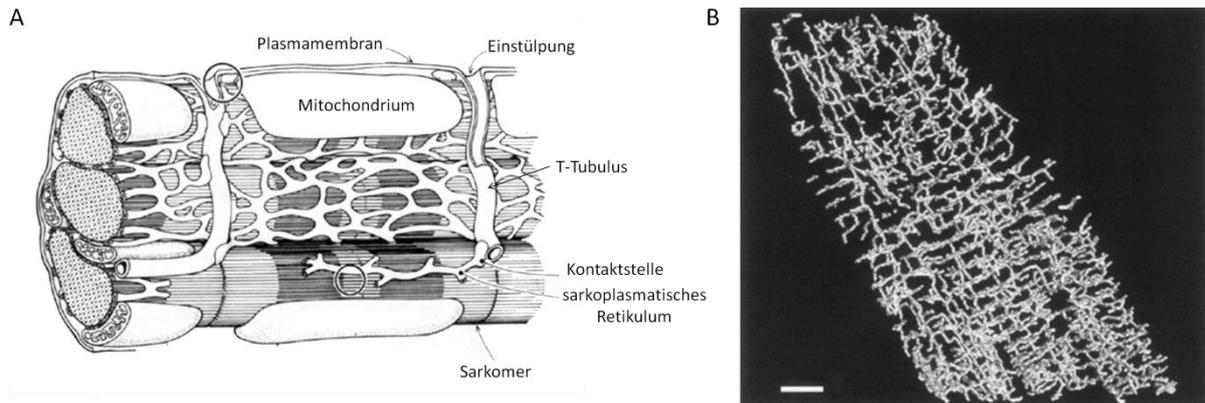


Abbildung 1-7: (A) Schematische Darstellung der intrazellulären Organisation von kardialen Myozyten. Verändert nach (Katz 2010). (B) Dreidimensionale Rekonstruktion des T-Tuben-Netzwerkes einer kardialen Myozyte. Maßstab = 5 µm. (Soeller & M B Cannell 1999)

Damit ein Aktionspotential eine Ausschüttung dieses Kalzium-Speichers bewirken kann, stehen in Myozyten spannungsabhängige Kalzium-Kanäle (VOCs) der Plasmamembran und Ryanodin-Rezeptoren (RyRs) des SRs in unmittelbarer Nähe zueinander und bilden zusammen eine räumliche, funktionelle Einheit (Abbildung 1-8). Durch die Depolarisation der Plasmamembran während eines APs werden die VOCs aktiviert und es kommt zu einem Einstrom von Kalzium in die Zelle. Dieser lokale Anstieg der Kalzium-Konzentration entlang der Plasmamembran führt wiederum zu einer Aktivierung benachbarter RyRs. Hierdurch kommt es zu einer zusätzlichen Kalzium-Ausschüttung aus dem SR und somit zu einer lokalen Signalverstärkung die schließlich zur Kontraktion naheliegender Sarkomere führt. Nach der Ausschüttung wird das Kalzium wiederum schnell von Kalzium-Puffern gebunden, was eine weitere Verbreitung durch Diffusion verringert. Zudem können auch die naheliegenden Mitochondrien größere Mengen an Kalzium temporär aufnehmen, was ebenfalls zu einer schnellen Reduzierung des Kalzium-Signals innerhalb der Zelle führt. Der Hauptanteil der freien Kalzium-Ionen wird im Weiteren über die SERCA-Pumpe in das SR zurückgeführt. Zusätzlich sorgen die Plasmamembran-ständigen Kalzium-Pumpen (PMCA) sowie der Natrium-Kalzium-Antiporter (NCX) für eine Regeneration der ursprünglichen zytosolischen Kalzium-Konzentration. (Bers 2002)

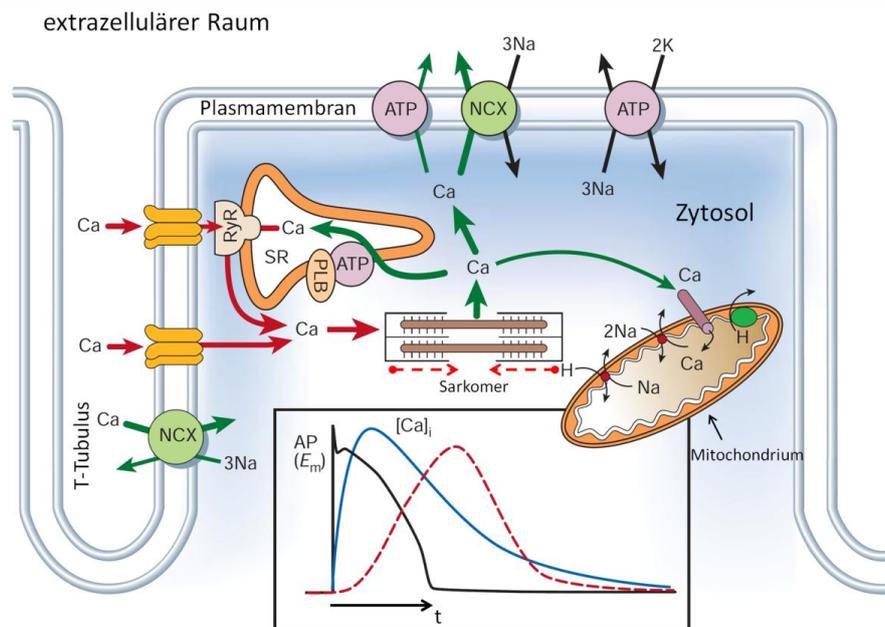


Abbildung 1-8: Grundprinzip der elektromechanischen Kopplung. Durch ein Aktionspotential (AP) kommt es zum Kalzium-Einstrom durch spannungabhängige Kanäle der Plasmamembran. Durch die Nähe zwischen spannungabhängigen Kalzium-Kanälen und Ryanodin-Rezeptoren (RyR) des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) wird die zytosolische Kalzium-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) weiter erhöht und nahe gelegene Sarkomere zur Kontraktion gebracht. Anschließend wird die ursprüngliche zytosolische Kalzium-Konzentration durch Kalzium-ATPasen und dem Natrium-Kalzium-Antiporter (NCX) wieder hergestellt. Zusätzlich dient das Mitochondrium neben Kalzium-bindenden Proteinen als temporärer Kalzium-Puffer. Verändert nach (Bers 2002).

Zwar ermöglicht die oben beschriebene räumliche Nähe zwischen VOCs, RyRs und dem kontraktile System eine schnelle und gezielte Signalübermittlung, für eine effiziente Kontraktion von Myozyten ist es jedoch von entscheidender Bedeutung, dass allen Sarkomeren einer Zelle gezielt und ohne größere, diffusionsbedingte zeitliche Verluste Kalzium zur Verfügung gestellt wird (Bers 2002; Brette & Orchard 2003; Louch et al. 2010). Durch die oben beschriebene räumliche Kopplung zwischen VOCs und RyRs erfolgt die Kalzium-Ausschüttung jedoch nur nahe der Plasmamembran der Zelle. Um dennoch auch tief in der Zelle liegende Sarkomere zu aktivieren, verfügen vor allem größere Myozyten, wie beispielsweise Muskelzellen der Herzkammerwand (ventrikuläre Myozyten), über ein zusätzliches, komplexes System aus Einstülpungen der Plasmamembran (Brette & Orchard 2003; Smyrniak et al. 2010). Diese, als T-Tuben bezeichnete, Einstülpungen bilden ein ähnlich komplexes Netzwerk wie das SR (Abbildung 1-7 B). Entlang der Z-Scheiben stehen T-Tuben und das SR zudem in engem Kontakt und ermöglichen somit die gezielte Ausschüttung von Kalzium und folglich die Sarkomer-Kontraktion tief in der Zelle.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Kalzium spielt als sekundärer Botenstoff eine essentielle Rolle bei der Regulation einer Vielzahl grundlegender Vorgänge in tierischen Zellen. Hierbei vermitteln Kalzium-Signale Informationen sowohl auf räumlicher als auch zeitlicher Ebene. Auch bei der Übersetzung zwischen mechanischen und biochemischen Prozessen sind Kalzium-Signale maßgeblich beteiligt, die genaue Signalgebung ist hierbei jedoch nur wenig verstanden. In dieser Arbeit wurde daher der Einfluss von Kalzium-Signalen auf mechanische Prozesse unterschiedlicher Zeitskalen detailliert betrachtet. Hierbei handelt es sich im Speziellen um die Analyse von Kalzium-Signalen bei der Erkennung der Substratsteifigkeit von Endothelzellen sowie um die räumlich und zeitliche hochaufgelöste, korrelative Analyse von Kalzium-Signal und Kontraktion pränataler, kardialer Myozyten.

Endothelzellen

Für Endothelzellen ist bekannt, dass sie auf unterschiedliche Steifigkeiten ihrer Umgebung reagieren. Zusätzlich weisen sie Kalzium-Oszillationen auf, welche Langzeitprozesse in Zellen mitregulieren können (J. A. Wood et al. 2011). Für humane mesenchymale Stammzellen konnte bereits gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen der Erkennung der Substratsteifigkeit und ihrer Kalzium-Frequenz besteht (Lo et al. 2000). Eine der zentralen Fragen dieser Arbeit war daher, ob auch bei enddifferenzierten Endothelzellen ein solcher Zusammenhang zwischen der Kalzium-Oszillationen und der Erkennung der Substratsteifigkeit existiert. Hierzu wurden in dieser Arbeit Endothelzellen aus der humanen Nabelschnurvene auf Substraten mit unterschiedlichen Steifigkeiten kultiviert und ihre Kalzium-Signale mittels mikroskopischer Techniken untersucht. Hauptaugenmerk galt hierbei der Analyse möglicher Veränderungen ihrer Kalzium-Frequenz in Abhängigkeit der Substratsteifigkeit während der ersten Tage nach der Aussaat der Zellen. Ferner galt es, für eine quantitative und automatisierte Erfassung der Kalzium-Frequenzen computergestützte Bild- und Daten-Auswertungsroutinen zu erstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zudem Experimente mit Inhibitoren durchgeführt. Ziel war es hierbei mögliche molekulare Interakteure zu ermitteln, die eine Rolle bei der Generierung zyklisch auftretender Kalzium-Signale haben.

Pränatale, kardiale Myozyten

Die Mechanismen der elektromechanischen Kopplung sowie die Rolle von Kalzium bei der Kontraktion kardialer Myozyten wurden über die letzten Jahrzehnte intensiv erforscht. Aufgrund unzureichender Messtechniken sind auf dem Gebiet der raumzeitlichen Analyse von Kalzium-Signalen und der Kontraktion der Zelle bisher eine Reihe grundlegender Fragen ungeklärt. Hinzu kommt, dass ein Großteil der Untersuchungen, die zum heutigen Verständnis der Kontraktion von Herzmuskelzellen beigetragen haben, an adulten ventrikulären Myozyten erfolgte. Kardiale Myozyten weisen jedoch, je nach ihrem Entwicklungsstand und ihrer Funktion im Herzen, klare Unterschiede in ihrer Morphologie und ihrem Kontraktionsverhalten auf (Sanger et al. 2010; Ziman et al. 2010). Wie in diesen Fällen die Kontraktion reguliert wird, ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht völlig geklärt. Ziel dieser Arbeit war es daher, das Zusammenspiel zwischen Kalzium-Signalen und der Zellkontraktion durch korrelative Analysen sowohl räumlich als auch zeitlich hochauflösend darzustellen und so mehr über die elektromechanische Kopplung pränataler, kardialer Myozyten der Ratte zu erfahren. Hierbei standen folgende Punkte im Fokus. Zum einen sollte geklärt werden, wie sich Kalzium-Signale in diesen Zellen raumzeitlich ausbreiten. Zum anderen sollte für diese Zellen der zeitliche Versatz zwischen Kalzium-Signal und der Zellkontraktion quantitativ bestimmt werden. Desweiteren sollte untersucht werden, inwiefern dieser zeitliche Versatz von anderen Faktoren, wie der Zellmorphologie, beeinflusst wird. Hierfür war es zunächst notwendig ein mikroskopisches System zu erstellen, welches die schnelle, simultane sowie hochauflösende Messung zweier Bildkanäle ermöglichte. Desweiteren mussten für die Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit quantitative Bild- und Datenanalyseverfahren entwickelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Primäre, humane Nabelschnur-Endothelzellen

In dieser Arbeit wurden zyklische Kalzium-Signale in humanen Endothelzellen der Nabelschnur (englisch: „*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*“; HUVEC) analysiert. Die Zellen wurden von der Firma *Lonza* bezogen¹. Diese Zellen erhielten die Passagen-Bezeichnung *P0* und wurden in einer T75-Flasche mit EGM-2 (englisch: „*Endothelial Growth Medium 2*“, Nährmedium für Endothelzellen; *Lonza*) bei einer Temperatur von 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt vermehrt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hatten, wurden diese passagiert. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit einer PBS-Lösung (englisch: „*Phosphate Buffered Saline*“, phosphatgepufferte physiologische Salzlösung; Zusammensetzung siehe Absatz 6.6) gewaschen. Dieser Schritt diente der Entfernung des proteinhaltigen Mediums sowie etwaiger Zelltrümmer. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (TE; 5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA; *Sigma-Aldrich*) für 3 Minuten bei 37°C vom Flaschenboden abgelöst. Der Verdau der Zellen wurde mit 3 ml EGM-2 inhibiert und die entstandene Zellsuspension für 3 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen (Passage 1) wurden entweder im flüssigen Stickstoff konserviert oder zur weiteren Vermehrung erneut ausgesät. Zur Konservierung wurden die Zellen in einem speziellen Einfriermedium („*Cryo-SFM*“; *PromoCell*) resuspendiert (200.000 Zellen in 0,2 ml) und in einen Tank mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden ausschließlich Zellen der 3. und 4. Passage verwendet. Für die Experimente wurden jeweils 12.000-15.000 Zellen in die entsprechenden Proben-Schalen ausgesät (Siehe Abschnitt 2.2). Als Kultur-Medium wurden 2 ml EGM-2 verwendet. Bis zur Untersuchung wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

¹ *Lonza* garantiert 15 weitere Teilungszyklen. Die Anzahl an bereits erfolgten Passagen/Teilungszyklen wurde nicht angegeben.

2.1.2 Primäre, kardiale Myozyten aus der Ratte (pränatal)

Die in dieser Arbeit verwendeten primären, kardialen Myozyten wurden in unserem Institut direkt aus Rattenembryonen (pränatal Tag 18-19) isoliert. Die im folgenden Abschnitt beschriebene Isolation dieser Zellen wurde von Nils Hersch¹ und Dr. Thorsten Jonas¹ durchgeführt.

Für die Isolation der primären, kardialen Myozyten aus Rattenembryonen wurde das Muttertier zunächst in einem Gefäß mit CO₂ betäubt und mit Hilfe einer Guillotine zügig dekapitiert. Hiernach wurde der Bauchraum mit einer Schere geöffnet, die Embryonen entnommen und diese auf Eis gelagert. Alle weiteren Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Zur Isolation der Herzen wurden die Embryonen mit einer feinen Schere dekapitiert. Anschließend wurde der Brustkorb vorsichtig mit einer Pinzette geöffnet, um Herz und Lunge zugänglich zu machen. Herz und Lungengewebe wurde mit einer feinen Pinzette entfernt. Unter einer Stereolupe wurde das Herz vom Lungengewebe befreit. Die so isolierten Herzen wurden in eisgekühlter HBSS (englisch: „*Hank's Balanced Salt Solution*“, gepufferte Salzlösung nach Hanks; *Sigma-Aldrich*) gesammelt und bis zum nächsten Präparationsschritt auf Eis gelagert. Nachdem alle Herzen isoliert waren, wurden diese in 14 ml frischer HBSS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden alle Embryonen-Hezen zusammen in 200 µl TE-Lösung (5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA; *Sigma-Aldrich*) auf eine Plastik-Petrischale gegeben und mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert. Die zerkleinerten Gewebestücke wurden hiernach in 8 ml vorgewärmter TE-Lösung überführt und für 8 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem Verdau mit Trypsin enthielt der Überstand hauptsächlich tote Zellen sowie Zelltrümmer aus den Schnittkanten der Gewebestücke. Dieser Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Die verbliebenden Gewebestücken wurden mit 100 µl DNase (*Sigma-Aldrich*) für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Schritt verhinderte, dass in der Suspension befindliche DNS- (Desoxyribonukleinsäure-) Moleküle aus den zerstörten Zellen zur Apoptose der übrigen Zellen führte. Anschließend wurden 6 ml TE-Lösung hinzu gegeben und die Gewebestücke erneut für 8 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Zellen hatten sich hiernach weitestgehend aus dem Gewebe gelöst und befanden sich im Überstand. Dieser Überstand wurde entnommen und der Verdau durch Zugabe von 8 ml einer Stopplösung bestehend aus 33% FBS (englisch: „*fetal bovine serum*“, Kälberserum; *Biochorm*) in Nährmedium (*F-10 Ham*, *Sigma-Aldrich*) gestoppt. Diese Zellsuspension wurde auf Eis

¹ ICS-7: Biomechanik (Forschungszentrum Jülich GmbH)

gelagert. Um die Zellausbeute zu erhöhen, wurden die verbliebenden Gewebestücke erneut mit 100 µl DNase inkubiert und anschließend für weitere 8 Minuten in 6 ml TE-Lösung verdaut. Die hieraus erhaltene Zellsuspension wurde ebenfalls mit 8 ml Stopplösung versetzt. Beide so erhaltenen Zellsuspensionen wurden im nächsten Schritt für 10 Minuten bei 200 g und 4°C zentrifugiert. Die Zell-Sedimente aus beiden Ansätzen wurden in Myozyten-Medium (Abkürzung: MM+; Zusammensetzung siehe Anhang 6.6) vereinigt und die Zellzahl bestimmt.

Für die Untersuchung einzelner Myozyten und kleinerer Zellverbände wurden jeweils 20.000-35.000 Zellen in 2 ml MM+ auf strukturierte, elastische Substrate ausgesät (Herstellung siehe Abschnitt 2.2.3). Kultiviert wurden die Zellen bei 37°C und einem CO₂-Gehalt der Atmosphäre von 5%.

2.2 Herstellung von Analyse-Substraten

Für die Messungen an lebenden Zellen wurden je nach Fragestellung spezielle Zellkulturschalen mit unterschiedlichen Substrat-Eigenschaften benötigt. Die Beschaffenheit und Herstellung dieser Schalen wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

2.2.1 Glassubstrate

Für alle Messungen in dieser Arbeit wurden inverse Mikroskope verwendet. Somit zählt der Boden der Schale mit zum optischen System und hat großen Einfluss auf die Qualität der Aufnahmen. Die hier verwendeten Objektive waren dafür ausgelegt durch Glas mit einer Schichtdicke von 170 µm zu mikroskopieren. Aus diesem Grund wurden für die Beobachtung lebender Zellen Petrischalen aus Plastik (Durchmesser 35 mm) verwendet, welche eine runde, 18 mm im Durchmesser betragende Aussparung im Boden aufwiesen. In diese Aussparung wurden Deckgläser mit einer Dicke von 160 – 190 µm (20x20mm Typ-Nr. 1,5; *Marienfeld*) eingeklebt (Abbildung 2-1). Als Klebstoff wurde der biokompatible Silikon-Kautschuk *Sylgard 184* (*Dow Corning*) in einem Masseverhältnis zwischen Grundsubstanz und Kreuzvernetzer von 10 zu 1 verwendet (für eine ausführlichere Beschreibung des Materials siehe Abschnitt 2.2.2). Nachdem der Silikon-Kautschuk für 30 Minuten bei 60°C aushärtete, konnten die Kulturschalen für die Versuche verwendet werden. Im weiteren Verlauf werden diese Probenschalen auch als Glassubstrate bezeichnet.

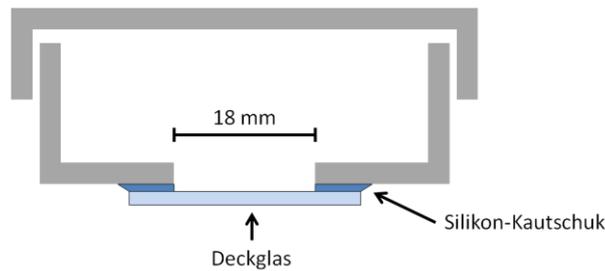


Abbildung 2-1: Glassubstrat (Schema). Zur Herstellung von Probenschalen mit Glasboden wurden Plastik-Petrischalen ($\varnothing = 35$ mm) mit einer runden Aussparung von 18 mm im Boden verwendet. Auf diese Aussparung wurden 160 - 190 μm dicke Deckgläser aufgeklebt. Als Klebstoff wurde der Silikon-Kautschuk „Sylgard 184“ verwendet.

2.2.2 Elastische Substrate verschiedener Steifigkeiten

In dieser Arbeit wurden Zellen auch auf Substraten mit verschiedenen Steifigkeiten untersucht. Hierzu wurde das bereits zuvor erwähnte Produkt *Sylgard 184* der Firma *Dow Corning* verwendet. Hierbei handelt es sich um einen transparenten Zweikomponenten-Silikon-Kautschuk, bestehend aus Grundsubstanz und Kreuzvernetzer. Die genaue Zusammensetzung der beiden Komponenten ist nicht bekannt. Im Prinzip besteht die Grundsubstanz aus einem modifizierten Polydimethylsiloxan welches für die Reaktion endständige Vinyl-Gruppen trägt sowie einen beigemischteten Platin als Katalysator. Die zweite Komponente ist der sogenannte Kreuzvernetzer (ein Copolymer, bestehend aus Methylhydrosilane-dimethylsiloxan). Mischt man beide Komponenten zusammen, so kommt es zur Platin-katalysierten kovalenten Kopplung beider Siloxane. Diese Reaktion kann durch Erhöhung der Temperatur beschleunigt werden. Durch Variation des Grundsubstanz/Kreuzvernetzer-Verhältnisses können mit diesem Material elastische Substrate mit unterschiedlichen Steifigkeiten hergestellt werden. Zu beachten ist, dass aufgrund der Toleranzbereiche bei der Synthese der Grundsubstanzen, beim Wechsel zu einer anderen Charge des Materials Schwankungen in den Materialeigenschaften auftreten können. Um dennoch reproduzierbare Substratsteifigkeiten zu garantieren, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chargen des Materials, wie von Cesa et al. beschrieben, von Niko Hampe¹ mechanisch kalibriert (Cesa et al. 2007). Neben der Variation in der Zusammensetzung des Materials, können jedoch auch Variationen bei der Herstellung der Substrate die Steifigkeit beeinflussen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Varianz in der Steifigkeit der hier verwendeten Substrate in einem Fehlerbereich unterhalb von $\pm 15\%$ liegen. Aus diesem Grund

¹ ICS-7: Biomechanik (Forschungszentrum Jülich GmbH)

soll an dieser Stelle nur ein Steifigkeitsbereich für die verwendeten Substrate angegeben werden (Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1

Massenverhältnis (Grundsubstanz / Kreuzvernetzer)	Chargen-Nummer	Steifigkeitsbereich
10 / 1 (m/m)	5948943	1,35 (1 ± 15%) MPa
50 / 1 (m/m)	5948943	15 (1 ± 15%) kPa

Zur Erstellung homogener, blasenfreier Substrate wurden die Komponenten zunächst für einige Minuten sorgfältig vermischt und anschließend für mehrere Minuten in einem Exsikkator unter Vakuum (2×10^{-3} mbar) entgast. Um eine Beobachtung durch das Substrat hindurch zu ermöglichen, wurden 55-80 μm dicke Deckgläser (20x20mm Typ-Nr. 00; *Menzel*) mittels eines Rotationsbeschichters mit einem ungefähr 100 μm dicken Film des Grundsubstanz/Kreuzvernetzer-Gemischs überzogen (*SpinCoater delta 10TT*; *SÜSS microtec*; 15 Sekunden bei 1800 Umdrehungen/Minute). Die so beschichteten Deckgläser wurden von unten auf die zuvor beschriebenen Petrischalen mit Aussparung geklebt (Abbildung 2-2). Diese Schalen wurden daraufhin für 16 Stunden bei 60°C inkubiert, so dass das Silikon-Substrat aushärtete.

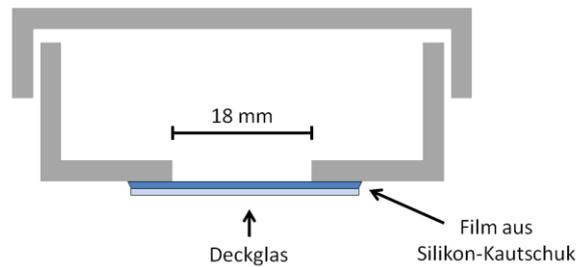


Abbildung 2-2: Elastische Substrate (Schema). Zur Herstellung elastischer Substrate wurden 55-80 μm dicke Deckgläser mit einem ca. 100 μm dicken Film aus einem Silikon-Gemisch überzogen. Um unterschiedliche Steifigkeiten des Substrates zu erreichen, wurden verschiedene Mischungsverhältnisse verwendet. Die überzogenen Deckgläser wurden von unten auf die Aussparung im Boden der Petrischale gesetzt und anschließend für 16 Stunden bei 60°C ausgehärtet.

2.2.3 Strukturierte, elastische Substrate

Für die Durchführung von Substratdeformationsanalysen wurden spezielle, strukturierte Elastomer-Substrate hergestellt.

Um eine strukturierte Oberfläche der Substrate zu erhalten, wurden mikrostrukturierte Silizium-Scheiben (Wafer) als Matrizen verwendet. Diese Wafer wurden von Nico Hampe¹ unter Verwendung lithografischer Methoden in einem Reinraum hergestellt und besitzen als Struktur ein regelmäßiges Gitter aus Quadraten. Die Quadrate haben eine Kantenlänge von 2,5 μm , eine Höhe 0,5 μm und liegen jeweils 1 μm voneinander entfernt. Mit diesen Wafers lassen sich topografische Oberflächenstrukturierungen von Silikonsubstraten herstellen, welche man bereits in Phasenkontrast-Aufnahmen detektieren kann (Gordan et al. 2008; Cesa et al. 2007). Diese Strukturierungen können jedoch im Experiment durch kontrastreiche Strukturen innerhalb der Zellen überlagert werden. Für die hier durchgeführten Substratdeformationsanalysen war jedoch auch eine detektierbare Strukturierung unterhalb der Zelle nötig. Um diese zu erhalten, wurden zusätzlich fluoreszierende Kugeln in die oberste Schicht der Substrate eingebracht. Diese konnten mittels der Fluoreszenzmikroskopie ohne optischen Einfluss der darüber liegenden Zellen detektiert werden.

Für die Herstellung dieser strukturierten Silikonsubstrate mussten die Oberflächen der Wafer zunächst vorbehandelt werden. Hierzu wurden die Wafer zusammen mit 100 μl 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorosilan (*Sigma-Aldrich*) in einen Exsikkator gegeben. Durch die Evakuierung des Exsikkators (2×10^{-3} mbar) wurde das 1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorosilan verdampft und konnte mit der Oberfläche der Wafer reagieren.

¹ ICS-7: Biomechanik (Forschungszentrum Jülich GmbH)

Diese Oberflächenfunktionalisierung machte die Wafer äußerst hydrophob, was das spätere Ablösen der Silikonsubstrate erleichterte.

Im nächsten Schritt wurde das gewünschte Massenverhältnis von 50:1 (entspricht 15 kPa \pm 15%; siehe Abschnitt 2.2.3) des Silikonkautschuks angemischt und für 10 Minuten entgast. Aus dem Gemisch beider Komponenten wurden 200 μ l entnommen und mit etwa 6 ng rot fluoreszierender Kugeln mit einem Durchmesser von 200 nm (carboxylierte *Fluospheres red*; *Life technologies*) versetzt. Hierzu wurden 30 μ l der Kugel-Suspension (Masseanteil der Kugeln: 2%) bei 13000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die sedimentierten Kugeln wurden mit einem Plastikspatel gründlich mit den zuvor entnommenen 200 μ l Silikongemisch verrührt. Hiervon wurden anschließend jeweils 10 μ l auf die strukturierte Seite eines Wafers gegeben und mit einem nicht fasernden Papiertuch („*Kimtech science*“; Kimberly-Clark) sorgfältig in die Mikrostruktur eingerieben. Dies führte zur mechanischen Vereinzelung der fluoreszenten Kugeln und Einlagerung als dünne Schicht in die Mikrostruktur.

Um eine spätere Schichtdicke des Silikons von 80 μ m zu erhalten, wurden an zwei gegenüberliegenden Seiten 80 μ m dicke, in Streifen geschnittene Deckgläser als Abstandhalter auf die Wafer gelegt. Anschließend wurden etwa 20 μ l des Silikongemischs ohne fluoreszierende Kugeln auf die Mitte des Wafers gegeben. Hierauf wurde ein 80 μ m dickes Deckglas gelegt. Als Schutz wurde noch ein dickeres Glas aufgelegt. Der entstandene Stapel aus Wafer, Silikon-Gemisch, Deckglas und Schutzglas wurde nun an zwei gegenüberliegenden Seiten mit Klammern fixiert. Hierdurch wurde das Deckglas gleichmäßig auf die Abstandhalter aufgedrückt, was eine konstante Schichtdicke des späteren Substrates garantierte. Die fertig zusammengebauten Stapel wurden anschließend für 16 Stunden bei 60°C inkubiert.

Nach dem Aushärten mussten die Silikonsubstrate vorsichtig vom Wafer gelöst werden. Um das Ablösen zu erleichtern, wurden die Stapel in Isopropanol getaucht. Anschließend wurden die Substrate vorsichtig mit einer scharfen Rasierklinge vom Wafer getrennt. Die so hergestellten Substrate hatten eine Gesamtdicke von etwa 160 μ m und wurden mit einer 10:1 Silikon-Mischung auf die zuvor beschriebenen Petrischalen mit Aussparung geklebt und nochmals für 30 Minuten bei 60°C ausgehärtet. Die einzelnen Schritte der Herstellung sind in Abbildung 2-3 schematisch dargestellt.

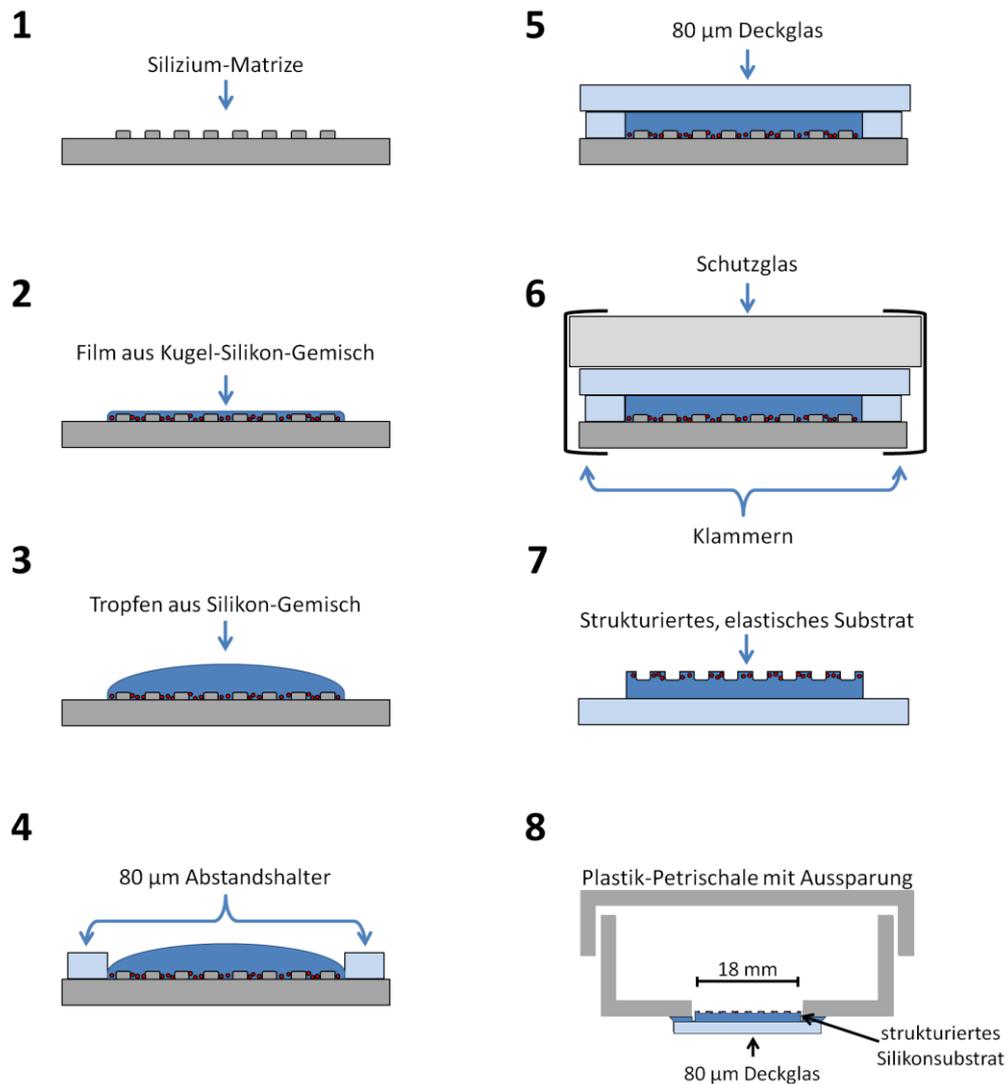


Abbildung 2-3: Herstellung strukturierter Silikonsubstrate mit eingebetteten fluoreszierenden Kugeln (Schema). (1) Eine mikrostrukturierte Silizium-Scheibe diente als Matrize für das Substrat. (2) Auf die Matrize wurde ein dünner Film eines Silikon-Gemischs mit beigefügten fluoreszenten Kugeln (Durchmesser 200 nm) aufgetragen. (3) Anschließend wurde ein Tropfen (ca. 20 µl) des Silikon-Gemischs ohne Kugeln auf die Matrize gegeben. (4) An zwei gegenüberliegenden Rändern der Matrize wurden 80 µm dicke Deckglas-Steifen als Abstandshalter gelegt. (5) Auf die Abstandshalter wurde ein 80 µm dickes Deckglas gesetzt. (6) Zusätzlich wurde ein dickeres Glas aufgelegt und der gesamte Stapel an zwei Seiten mit Klammern fixiert. (7) Nach dem Aushärten für 16 Stunden bei 60°C wurden die entstandenen, strukturierten Substrate vorsichtig von der Matrize abgelöst. (8) Die Substrate wurden anschließend von unten mit Silikon (Mischungsverhältnis 10 zu 1) auf die Aussparung der Petrischalen geklebt. Zum Aushärten des Klebstoffs wurden die Schalen nochmal für 30 Minuten bei 60°C inkubiert.

2.2.4 Beschichtung der Substrate mit Fibronektin

Alle hier verwendeten Substrate (Glas- sowie Silikonsubstrate) wurden mit humanem Fibronektin (FN) aus der Plazenta (BD bioscience) beschichtet. Fibronektin ist ein Protein der extrazellulären Matrix (Geiger et al. 2001; Wierzbicka-Patynowski & Schwarzbauer 2003). Durch die Beschichtung mit Fibronektin erhält man eine naturnähere Umgebung, welche die Adhäsion der Zellen an der Probenoberfläche erleichtert.

Alle Proben wurden mit $2,5 \mu\text{g FN/cm}^2$ beschichtet. Aus der kreisförmigen Aussparung der verwendeten Petrischalen von 18 mm im Durchmesser ergab sich für alle Proben eine zu beschichtende Fläche von ca. $2,6 \text{ cm}^2$. Für die Beschichtung der Glassubstrate wurden $6,5 \mu\text{g FN}$ in $200 \mu\text{l PBS}$ auf die Glasoberfläche gegeben. Die Silikonsubstrate waren wesentlich hydrophober als Glas. Um die Silikonsubstrate besser benetzen zu können, wurde daher für deren Beschichtung dieselbe Menge an FN ($6,5 \mu\text{g}$) in $500 \mu\text{l PBS}$ verwendet. Alle Proben wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit der FN-Lösung inkubiert, um eine vollständige Beschichtung der Oberfläche zu gewährleisten. Hiernach wurde die Fibronektin-Lösung abgenommen und die Probenschale nochmals mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einem geeigneten Medium ausgesät (siehe Abschnitt 2.1).

2.3 Fluoreszenzmikroskopische Techniken und verwendete Farbstoffe

2.3.1 Immunhistochemische Färbung

Zur Charakterisierung der Zytoskelett-Morphologie und zur Bestimmung der Anzahl an Zellen im untersuchten Bereich wurden die kardialen Myozyten nach den Messungen immunhistochemisch gefärbt. Hierzu wurden die Zellen direkt nach der Untersuchung ihres Kalzium-Signals (siehe Abschnitt 2.4.2) für 20 Minuten mit 3,7 Vol.-% Formaldehyd (*Merck*) in Zytoskelett-Puffer (Abkürzung: CB; englisch: „*Cytoskeleton-Buffer*“; Zusammensetzung siehe Abschnitt 6.6) bei 37°C fixiert. Hiernach wurden die Proben dreimal mit je 2 ml CB gewaschen und zum Perforieren der Plasmamembran für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit 0,2 Vol.-% TritonX100 (*Sigma-Aldrich*) in CB inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut mit CB gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 60 Minuten bei RT mit 5 Vol.-% Magermilchpulver (*Sigma-Aldrich*) in CB (Sättigungslösung) inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der primäre Antikörper gegen Myozyten-spezifisches α -Aktinin aus der Maus (Bezeichnung siehe Abschnitt 6.5; *Sigma-Aldrich*) auf die Probe gegeben. Die Verdünnungskonzentration betrug hierbei 0,5 Vol.-%

Antikörper-Stocklösung in 200 μ l Sättigungslösung. Die Proben mit der Antikörper-Lösung wurden für 45 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit je 2 ml Sättigungslösung gewaschen. Hiernach wurde der sekundäre Antikörper (Cy2 anti-Maus Antikörper aus der Ziege; *Dianova*) in einer Konzentration von 0,5 Vol.-% Antikörper-Stocklösung in 200 μ l Sättigungslösung auf die Probe gegeben. Zur indirekten Färbung des Aktin-Zytoskeletts wurde zusätzlich fluoreszenzmarkiertes Phalloidin („*Alexa Fluor 546-Phalloidin*“; *Life technologies*) zur Lösung hinzugegeben. Die Verdünnungskonzentration der Stocklösung betrug ebenfalls 0,5 Vol.-%. Die Proben wurden für weitere 45 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mehrmals gründlich mit CB gewaschen. Bis zur weiteren Untersuchung wurden die Proben in CB bei 4°C gelagert. Kurz vor der Untersuchung wurde der Zellkern mit 0,6 nMol DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, *Life technologies*) in 2 ml CB angefärbt (Inkubationszeit: 5 Minuten bei RT). Anschließend wurden die Proben nochmals mit CB gewaschen. Die Untersuchungen erfolgten in 2 ml CB an einem *Axiovert 200* (*Carl Zeiss*), ausgestattet mit einer Xenon-Hochdrucklampe und einer hochauflösenden sCMOS-Kamera (siehe auch Abschnitt 2.4.2). Für die Beobachtung wurde ein Objektiv mit 100-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1,46 (α *Plan-Apochromat 100x/1,46 Öl DIC*; *Carl Zeiss*) benutzt. Die Spektren der verwendeten Farbstoffe sind in Abbildung 2-4 dargestellt. Die verwendeten Filter sind der Tabelle 2-2 zu entnehmen.

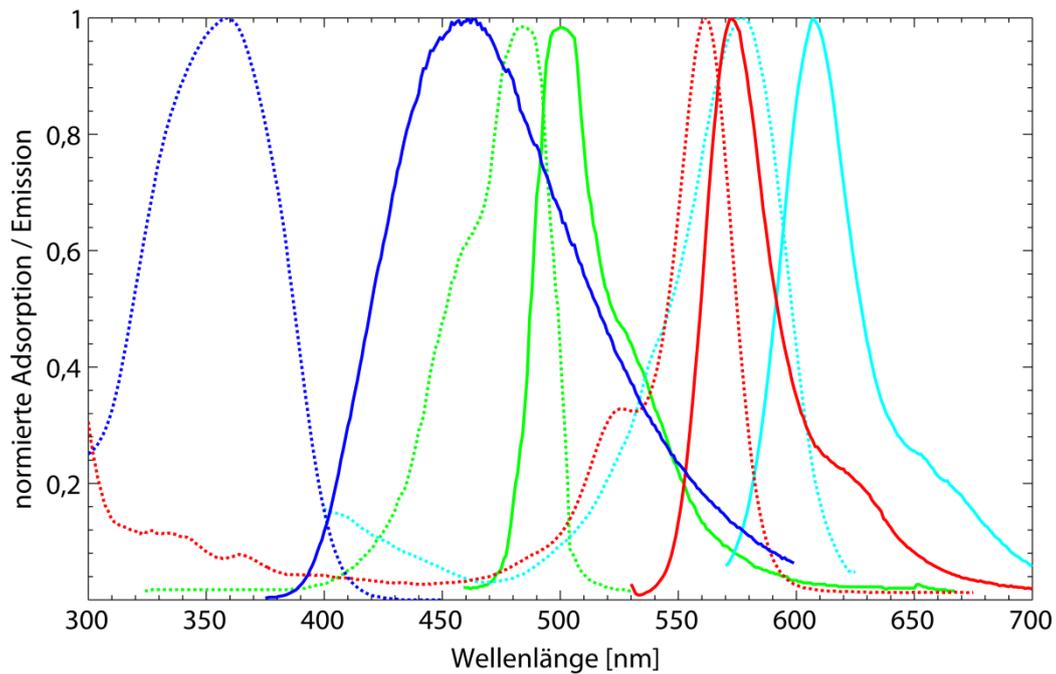


Abbildung 2-4: Spektren der in der immunhistochemischen Färbung verwendeten Farbstoffe. Die gepunkteten Linien zeigen die Stärke der Adsorption, die durchgezogenen Linien die Stärke der Emission als Funktion der Wellenlänge normiert auf ihren Maximalwert. Blau: *DAPI* (Zellkern); Grün: *Cy2* (α -Aktinin); Rot: *Alex Fluor 546* (Aktin-Zytoskelett); Hellblau: *Fluospheres Red* (fluoreszierende Kugeln). Die dargestellten Spektren wurden von *Semrock* (Hersteller von optischen Filtern) übernommen (www.semrock.com).

Tabelle 2-2

Farbstoff	Filtersatz	Firma	Filter-Transmissionsbereiche	
			Anregung:	Emission
<i>DAPI</i> (Zellkern)	F66-422	<i>AHF</i>	Anregung:	352-388 nm
			Emission	401-552 nm
<i>Cy2</i> (α -Aktinin)	38 HE	<i>Carl Zeiss</i>	Anregung:	450-490 nm
			Emission	500-550 nm
<i>Alexa Fluor 546</i> (Aktin-Zytoskelett)	43 HE	<i>Carl Zeiss</i>	Anregung:	537,5-562,5 nm
			Emission	570-635 nm
<i>Fluospheres Red</i> (fluoreszierende Kugeln)	F66-422	<i>AHF</i>	Anregung:	570,5-599,5 nm
			Emission	612-764 nm

2.3.2 Der verwendete Kalzium-Indikator *Fluo-4*

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde der Kalzium-Indikator *Fluo-4* verwendet. Bei diesem Indikator handelt es sich um eine Weiterentwicklung des 1989 beschriebenen *Fluo-3* (Minta et al. 1989; Gee et al. 2000). Er setzt sich zusammen aus einer Chelatgruppe gekoppelt mit einem Fluoreszein-ähnlichen Benzolring-System (Abbildung 2-5).

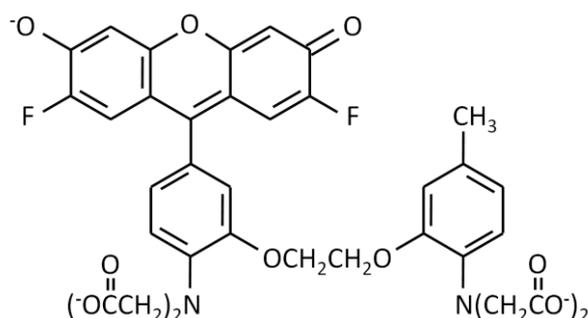


Abbildung 2-5: Strukturformel des Kalzium-Indikators *Fluo-4*. Nach Gee et al. 2000

Fluo-4 lässt sich im blauen Farbspektrum anregen und seine Emission im grünen Bereich detektieren (Abbildung 2-6). Bei der Bindung von Kalzium steigt die Emissionsintensität des Indikators, ohne dass sich das Emissionsspektrum stark verschiebt. *Fluo-4* zählt somit zu den nicht-ratiometrischen Kalzium-Indikatoren, mit denen sich lediglich relative Konzentrationsveränderungen bestimmen lassen.

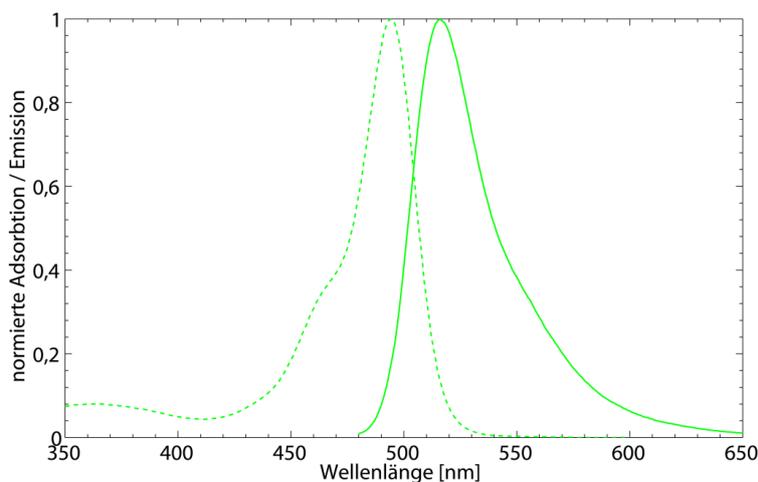


Abbildung 2-6: Absorptions- & Emissionsspektrum des Kalzium-Indikators *Fluo-4*. Die gepunktete Linie zeigt die Stärke der Absorption, die durchgezogene Linie die Stärke der Emission als Funktion der Wellenlänge normiert auf ihren Maximalwert. Die dargestellten Spektren wurden von *Semrock* (Hersteller von optischen Filtern) übernommen (www.semrock.com).

Fluo-4 besitzt einen k_d -Wert von 345 nM (*in vitro*) und gehört somit in die Klasse der hochaffinen Kalzium-Indikatoren. Verglichen mit anderen Indikatoren dieser Klasse, wie zum Beispiel *Calcium Green-1* (k_d :190 nM *in vitro*) oder *Fura-2* (k_d : 140 nM *in vitro*) besitzt *Fluo-4* jedoch eine niedrigere Affinität, und somit auch einen niedrigeren Puffer-Effekt. *In vivo* Experimente zeigten zudem, dass viele Kalzium-Indikatoren im Zytosol deutlich höhere k_d -Werte besitzen (Thomas et al. 2000), was den Puffer-Effekt nochmals reduziert.

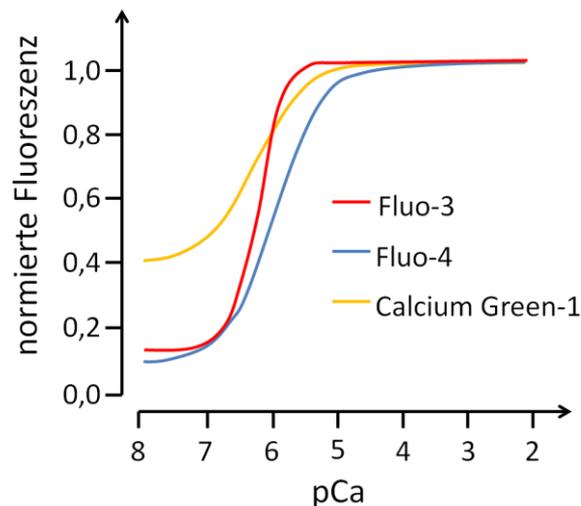


Abbildung 2-7: Vergleich des dynamischen Bereichs verschiedener Kalzium-Indikatoren. Zu sehen ist das Fluoreszenz-Verhalten der verschiedenen Indikatoren in Abhängigkeit der vorliegenden Kalzium-Konzentration (dargestellt als negativer dekadischer Logarithmus „pCa“). Die Graphen der Indikatoren entsprechen einer Sigmoidfunktion, welche an die *in vivo* gemessenen Daten angepasst wurden. Verändert nach Thomas et al. 2000.

Verglichen mit anderen Kalzium-Indikatoren besitzt *Fluo-4* einen großen dynamischen Bereich (Abbildung 2-7), welcher das gesamte Spektrum physiologisch relevanter Kalzium-Konzentrationen abdeckt (Zytosol: ~100 nM - ~1 μ M; vgl. Abschnitt 1.2), und einen guten Fluoreszenz-Kontrast zwischen gebundenem und ungebundenem Zustand. Auch sein Bleichverhalten ist verglichen mit anderen Kalzium-Indikatoren niedrig (Abbildung 2-8), wodurch es auch bei längerer Beobachtung nicht zu großen Einbußen in der Lichtausbeute oder zur starken Bildung toxischer Nebenprodukte kommt (Thomas et al. 2000).

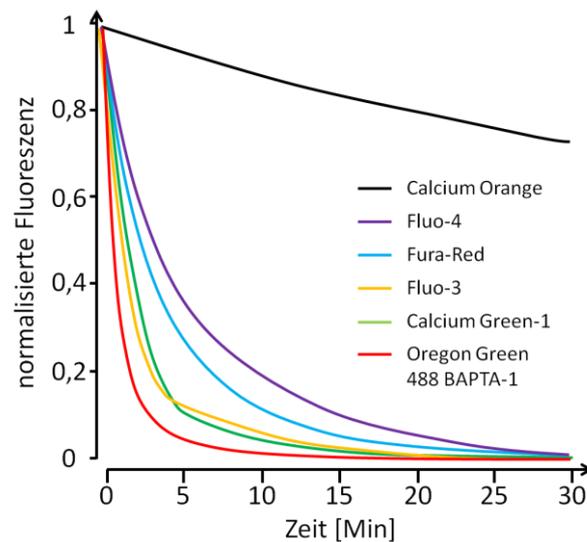


Abbildung 2-8: Bleichverhalten verschiedener Kalzium-Indikatoren (siehe Legende) bei gleicher Anregungsintensität. Die Kurven entsprechen einer Exponential-Funktion, die an die jeweiligen Messdaten angepasst wurde. Verändert nach Thomas et al. 2000.

Fluo-4 trägt mehrere delokalisierte, negative Teilladungen (Abbildung 2-5). Diese Teilladungen sorgen für eine Membran-Undurchlässigkeit des Indikators. Für die Untersuchung der Kalzium-Signale innerhalb der Zellen wurde *Fluo-4* daher in seiner Acetooxymethylester (AM-Ester)-Variante verwendet (*Fluo-4-AM*, *Life technologies*). Die AM-Ester-Gruppen sind kovalent an Sauerstoffatome des *Fluo-4*-Moleküls gebunden. Hierdurch werden die negativen Ladungen des Moleküls maskiert, was es dem Farbstoff ermöglicht die Plasmamembran der Zellen zu durchqueren. Im Zytosol werden die Am-Ester-Gruppen durch zelleigene Esterasen vom Molekül abgespalten. Hierdurch wird der Farbstoff in seine aktive, geladene Form überführt und kann die Plasmamembran nicht mehr durchdringen. Durch dieses Prinzip lässt sich der Indikator in der Zelle anreichern; die Zelle wird beladen. (R. Y. Tsien 1981)

Das Hersteller-Protokoll (*Life technologies*) für die Farbstoff-Beladung musste für die verschiedenen Experimente und die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen angepasst werden. Im Folgenden werden die spezifischen Protokolle zur Beladung der Zellen beschrieben.

Fluo-4-Beladung von HUVEC für die Analyse der Frequenz zyklischer Kalzium-Signale

Die HUVECs wurden wie zuvor beschrieben in entsprechenden Probenschalen kultiviert (Abschnitt 2.1.1 und 2.2). Für die Beladung der Zellen mit *Fluo-4* wurden diese zunächst zweimal mit je 2 ml HBSS+Ca (HBSS mit einer physiologischen Kalzium-Ionenkonzentration von 1,29 mM; *Sigma-Aldrich*; siehe auch Abschnitt 6.6) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 nMol *Fluo-4-AM* in 2 ml HBSS+Ca (entspricht einer *Fluo-4-AM*-Konzentration von 1 μ M) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden die Zellen zweimal mit je 2 ml HBSS+Ca und einmal mit 2 ml HBSS-HUVEC (HBSS+Ca mit 10% FBS der Firma *Sigma*) gewaschen. Die Zellen wurden direkt im Anschluss am Mikroskop untersucht. Für die Messungen wurden ebenfalls 2 ml HBSS-HUVEC als Medium verwendet. Alle verwendeten Medien wurden vor der Verwendung auf 37°C erwärmt.

Fluo-4-Beladung kardialer Myozyten für die raum-zeitliche Analyse von Kalzium-Signalen und Zell-Kontraktionen

Kardialen Myozyten wurden wie zuvor beschrieben auf strukturierten, elastischen Substraten kultiviert (siehe Abschnitt 2.1.2 und 2.2.3). Um den Einfluss des *Fluo-4* auf die Frequenz der Zell-Kontraktion zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst ohne *Fluo-4*-Beladung am Mikroskop untersucht. Die Beladung der Zellen erfolgte unmittelbar danach am Mikroskop. Hierbei war es wichtig alle Wasch-Schritte möglichst ohne Verschiebung der Probe durchzuführen, um die bereits untersuchten Zellen schnell wiederfinden zu können.

Im ersten Schritt wurden die Proben zweimal mit je 2 ml HBSS+Ca gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 nMol *Fluo-4-AM* in 2 ml HBSS+Ca (entspricht einer *Fluo-4*-Konzentration von 0,5 μ M) für 10 Minuten bei etwa 33°C inkubiert.¹ Hierzu wurde die HBSS+Ca-Lösung auf 33°C vorgewärmt und die Inkubations-Kammer des Mikroskops während der Beladung geöffnet. Nach der Beladung wurden die Proben zunächst zweimal mit je 2 ml HBSS+Ca gewaschen. Anschließend wurden die Proben nochmals mit 37°C warmer HBSS-Myo-Lösung (HBSS+Ca mit 10% FBS der Firma *Biochrom*) gewaschen. Die weiteren Messungen erfolgten direkt nach der Beladung in 2 ml HBSS-Myo.

¹ Die verwendeten pränatalen, kardialen Myozyten reagierten äußerst empfindlich auf höhere *Fluo-4*-Konzentrationen und die Beladung bei 37°C (vgl. siehe Abschnitt 2.3.2). Nach persönlicher Kommunikation mit Dr. Llewelyn Roderick (*Babraham Institute*; Cambridge – England) wurde daher das Beladungsprotokoll für diese Zellen wie beschrieben modifiziert.

2.4 Mikroskopie

2.4.1 Automatisiertes Fluoreszenzmikroskop

Mikroskopischer Aufbau:

Die Messungen von Kalzium-Oszillationen in HUVECs wurden an einem *Axio Observer Z.1* (*Carl Zeiss*) mit automatisiertem Probenstisch durchgeführt. Für die Analyse lebender Zellen war das Mikroskop mit einem Inkubationssystem (bestehend aus Inkubationseinheit *TempModul S1*, Inkubationskammer *XL S1*, beheizbarem Probenhalter *Heizeinsatz P1 S1* sowie CO₂-Begasungseinheit *CO₂-Modul S1*) der Firma *Carl Zeiss* ausgestattet. Alle Messungen erfolgten bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt. Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verfügte das Mikroskop über eine Quecksilber-Kurzbogen-Reflektor-Lampe (*HXP 120; Carl Zeiss*) sowie einen für die Detektion von *Fluo-4* geeigneten Filter-Satz (*Filter-Set 38 HE; Carl Zeiss*; Anregungsbereich: 450-490 nm; Emissionsbereich: 500-550 nm). Für die Aufnahme wurde eine monochrome 12-bit CCD-Kamera (*AxioCam MRm; Carl Zeiss*) mit einer Auflösung von 1388x1040 Bildpunkten (bei einer physikalischen Bildpunktgröße von (6,45 µm)²) und einem dynamischen Bereich von 2.200:1 verwendet. Für die Detektion der schwachen Kalzium-Signale wurde die Kamera mit internem, zweifachem Analog-Verstärker betrieben. Zusätzlich wurden auf Hardware-Ebene jeweils Quadrate aus 3x3 Bildpunkten zu einer Detektionsfläche zusammengefasst. Die Beobachtung erfolgte mit einem Objektiv mit 10-facher Vergrößerung (*10x EC Plan-Neofluar Ph1 NA 0.3; Carl Zeiss*). Durch den großen Sichtbereich auf der Probe (895 µm x 671 µm) war es möglich mehrere Zellen innerhalb einer Messung zu analysieren. Zudem konnten mit der verwendeten Software (*AxioVision Rev.: 4.8.3* mit *Mark & Find II* Plug-In, *Carl Zeiss*) mehrere Positionen des Probenstisches gespeichert werden. Dies ermöglichte es innerhalb einer Zeitreihen-Aufnahme automatisch mehrere Positionen innerhalb der Probenschale anzufahren.

Durchführung:

Für jedes Experiment wurden bis zu drei Positionen in der Probenschale innerhalb einer Zeitreihen-Aufnahme aufgenommen. Die Positionen wurden so gewählt, dass diese sich nicht überschneiden und möglichst vereinzelte Zellen aufwiesen. Für die Analyse der Kalzium-Signale erfolgten die Aufnahmen für 30 Minuten mit einer Aufnahmezeit von

15 Bildern pro Minute (0,25 Hz). Die Belichtungszeit für jede einzelne Aufnahme betrug bei allen Messungen 200 ms.

2.4.2 Fluoreszenzmikroskop für simultane Zweikanalmessungen

Mikroskopischer Aufbau:

Die Kontraktionen von kardialen Myozyten ist ein schneller Prozess. Für die Analyse von Kalzium-Signalen und Zellkontraktionen wurde daher ein Mikroskop mit Bildteiler für simultane Zweikanalmessungen verwendet. Hierdurch war es möglich zwei Kanäle mit hoher Geschwindigkeit, räumlich getrennt auf einen Kamerasensor zu analysieren. Der Etablierung und Optimierung dieses Mikroskops war Bestandteil dieser Arbeit. Der mikroskopische Aufbau wird nachfolgend näher beschrieben.

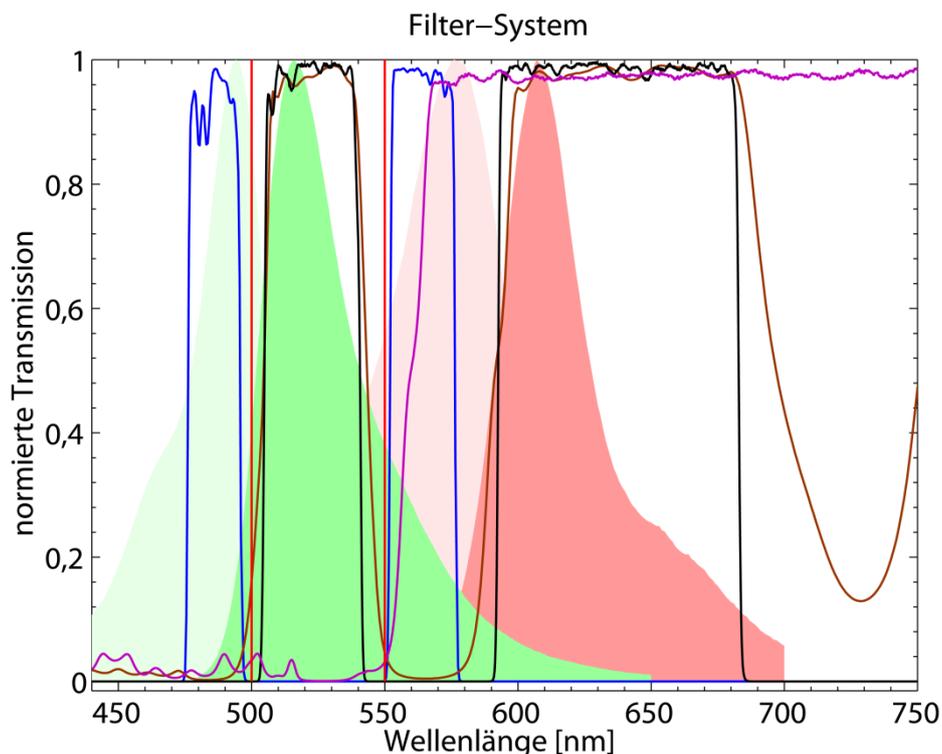


Abbildung 2-9: Transmissions-Spektren des verwendeten Filter-Systems. In blau dargestellt ist das Transmissionsspektrum des Dualband-Anregungsfilters. Das schwarze Profil gibt die Transmission des Dualband-Sperrfilters an. Die Transmission des Dualband-Stahlteilers und des Emissionsstrahlenteilers ist in braun bzw. lila dargestellt. Die roten, vertikalen Linien deuten den Transmissionsbereich des zusätzlichen Bandpass-Filters an. Zur Orientierung wurden zusätzlich die Farbspektren der verwendeten Farbstoffe als farbliche Schattierungen angedeutet (grün: *Fluo-4*; rot: *Fluospheres Red*), wobei jeweils die hellere Fläche das Absorptionsspektrum und die dunklere Fläche das Emissionsspektrum zeigt (zu beachten ist, dass sich die einzelnen Spektren überlappen und somit nicht komplett dargestellt sind).

Für die simultane Beleuchtung der Probe mit zwei Spektralbereichen wurde ein Dualband-Anregungsfilter verwendet (*F59-023, AHF Analysetechnik AG*). Als Lichtquelle für die Fluoreszenz-Aufnahmen kam eine Xenon-Hochdruck-Lampe (*Lambda DG-4, Sutter Instruments*) zum Einsatz. Die Strahlengänge des Anregungs- und Emissionslichts wurden mit einem Dualband-Strahlteiler (*F58-023, AHF*) voneinander getrennt. Hinter diesem Strahlenteiler befand sich ein Dualband-Sperrfilter (*F57-023, AHF*) welcher die beiden Emissionsspektren vom restlichen Anregungs- und Streulicht trennte.

Für die Beobachtung wurde ein Ölimmersions-Objektiv mit 40-facher Vergrößerung und einer numerischen Apertur von 1.3 verwendet (*40x EC Plan-Neofluar Ph3 NA 1.3, Carl Zeiss*). Um die beiden von der Probe emittierten Spektralbereiche nebeneinander auf einen Kamerasensor zu projizieren, wurde ein Bildteiler (*Optosplit II, Cairn research*) verwendet. Neben dem justierbaren Spiegel-System, welches die räumliche Trennung beider Kanäle ermöglichte, befand sich in diesem Bildteiler ein weiterer Strahlteiler (*F38-580, AHF*), welcher die emittierten Spektren bei 580 nm voneinander trennte. Über diesen Strahlteiler wurde jedoch keine komplette Trennung der Spektren erreicht (Herstellerangabe: 350 - 570 nm >95% Reflexion; 591 - 950 nm >93% Transmission; vgl. siehe Abbildung 2-9). Gerade das Streulicht der rot fluoreszierenden Kugeln (vgl. Abschnitt 2.2.4) im Kanal des grünen Lichts (*Fluo-4*) stellte ein Problem für die Detektion der niedrigen Emissionsintensitäten des *Fluo-4* dar. Aus diesem Grund wurde in den Strahlengang des grünen Lichts ein weiterer Sperrfilter (Sperrfilter aus Filter-Satz 38 HE; *Carl Zeiss*) eingesetzt. Umgekehrt bereitete das Streulicht des *Fluo-4* im Strahlengang der roten Lichts keine Problem für die Detektion der stark fluoreszierenden Kugeln dar. Für diesen Kanal war somit kein weiterer Sperrfilter nötig. Zur simultanen Aufnahme beider Kanäle kam eine monochrome 16-bit „scientific CMOS“-Kamera („sCMOS Neo“, *Andor technologies*) mit einer Auflösung von 2560 x 2160 Bildpunkten (bei einer physikalischen Bildpunktgröße von $(6,5 \mu\text{m})^2$) und einem dynamischen Bereich von 30.000:1 zum Einsatz. Da, bedingt durch den Bildteiler, nicht der gesamte Sensor ausgeleuchtet werden konnte, wurden für die Messungen nur die inneren 1920 x 1080 Bildpunkte ausgelesen. Zur Reduzierung der Rechen- und Speicherlast wurden durch die Software gleich nach dem Auslesen Quadrate aus jeweils 2 x 2 Bildpunkten zusammengefasst. Hieraus ergab sich eine Auflösung von 480 x 540 Bildpunkten pro Kanal. Dies entsprach einem Sichtbereich auf der Probe von $156 \mu\text{m} \times 175,5 \mu\text{m}$ und einer Auflösung von $(0,325 \mu\text{m})^2$ pro Bildpunkt. Der Aufbau ist in Abbildung 2-10 schematisch dargestellt; Abbildung 2-9 zeigt die Transmissionseigenschaften des verwendeten Filter-Systems sowie die Farbspektren der verwendeten Farbstoffe.

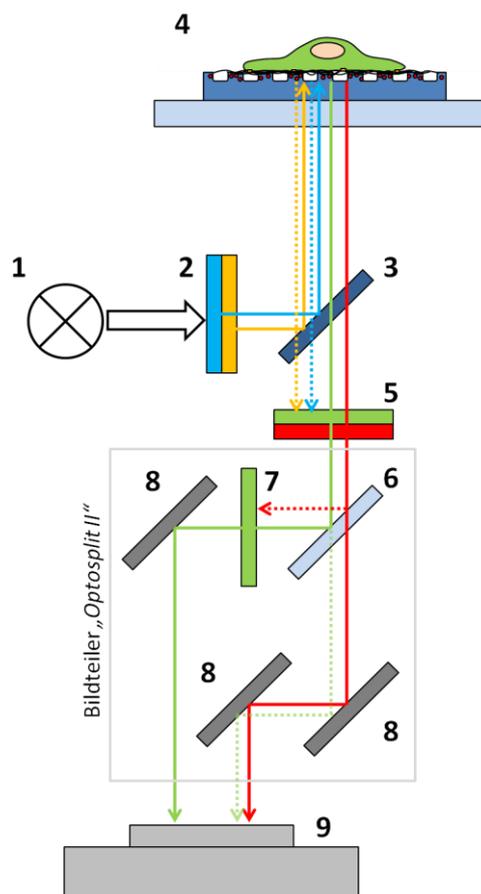


Abbildung 2-10: Mikroskopischer Aufbau für simultane Zweikanalmessungen (Schema). (1) Als Beleuchtung diente eine Xenon-Lampe. Diese Lampe lieferte über den sichtbaren Spektralbereich eine relativ konstante Intensität (weißer Pfeil). Ein Dualband-Anregungsfilter (2) ließ nur das Licht zweier Spektralbereiche durch (blauer und oranger Pfeil). Dieses Licht wurde über einen Dualband-Strahlteiler (3) auf die Probe reflektiert. Die von der Probe emittierten Spektralbereiche (grüner und roter Pfeil) konnten den Dualband-Strahlteiler durchqueren. Ein Dualband-Sperrfilter (5) hinter dem Dualband-Strahlteiler blockte restliches Anregungslicht (blau und orange gepunktete Pfeile). Um die beiden emittierten Spektralbereiche voneinander zu trennen, wurde ein weiterer Strahlteiler (6) verwendet. Dieser reflektierte dem Großteil des grünen Lichts auch einen geringen Teil des roten Emissionsbereichs. Dieser Anteil des roten Lichts (rote, gepunktete Linie), wurde mit einem zusätzlichen Bandpass-Filter herausgefiltert (7). Der Anteil an grünem Licht welcher den Strahlteiler passierte, war sehr gering, und musste daher nicht zusätzlich heraus gefiltert werden. Die Strahlen der beiden voneinander getrennten Lichtspektren wurden über ein justierbares Spiegel-System (8) nebeneinander auf einen sCMOS-Sensor projiziert. Hierdurch war eine schnelle, simultane Detektion beider Kanäle möglich. Das optische Linsen-System wurde zur besseren Visualisierung ausgelassen.

Für die Untersuchung lebender Zellen war das Mikroskop mit dem gleichen Inkubationssystem ausgestattet, wie das zuvor beschriebene automatisierte Mikroskop (Abschnitt 2.4.1). Alle Messungen erfolgten bei 37°C und einer Atmosphäre mit 5% CO₂-Gehalt. Ebenfalls verfügte dieses Mikroskop über einen automatisierten Probenstisch (*MS 2000, Applied Scientific Instrumentation*) und einen Positionsspeicher (*Mark & Find II*). Dies ermöglichte es mehrere Zellen in einer Probenschale zu untersuchen und in

nachfolgenden Experimenten wiederzufinden. Die Steuerung des Mikroskops (Objektiv, Filter, Probenstisch) erfolgte über die Software *Axiovision* (Version: 4.8.3; *Carl Zeiss*). Die Steuerung der Kamera sowie die Speicherung der Bilddaten erfolgte an einem separaten Computer mit der Software *Solis* (Version: 4.20.30003.0 (64-bit); *Andor technologies*).

Durchführung:

Für die Analysen wurden nur spontan kontrahierende, morphologisch unauffällige kardiale Myozyten verwendet. Alle Messungen wurden in 2 ml HBSS-Myo durchgeführt. Zur Bestimmung der ursprünglichen Kontraktionshäufigkeit der Zellen wurden vor ihrer Beladung mit *Fluo-4* Kontrollmessungen durchgeführt. Die Einstellungen waren hierbei dieselben wie bei den darauffolgenden Hauptmessungen, welche direkt nach der Beladung der Zellen mit *Fluo-4* stattfanden. Die Messungen erfolgten jeweils in einem Zeitraum von 13 Sekunden bei einer Aufnahmezeit von 50 Hz¹. Die Probe wurde hierbei permanent beleuchtet, was somit einer Belichtungszeit der Kamera von 20 ms pro Zeitschritt entsprach (Spektralbereich der Anregung siehe oben sowie Abbildung 2-9).

2.5 Quantitative Bildanalyse

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen Messungen kamen monochrome Kamerasensoren für wissenschaftliche Zwecke zum Einsatz. Diese Kameras weisen über einen weiten Messbereich ein nahezu lineares Detektionsverhalten auf; d.h. die auf einen Bildpunkt auftreffenden Photonen werden im Sensor annähernd proportional in ein elektrisches Signal umgewandelt. Innerhalb dieses Detektionsbereich lässt sich somit die eingestrahlte Lichtmenge in jedem Bildpunkt aus der Intensität des elektrischen Signals (im Weiteren auch als Grauwerte bezeichnet) ableiten². Unter der Verwendung solcher Kameras ist es also möglich orts aufgelöst Licht quantitativ zu detektieren. Für die Analyse der Kalzium-Signale von Zellen wurde der Kalzium-Indikator *Fluo-4* verwendet (siehe Abschnitt 2.3.2). Da es sich bei *Fluo-4* um einen nicht-ratiometrischen Kalzium-Indikator handelt, der zudem nur über einen gewissen Kalzium-Konzentrationsbereich ein lineares

¹ Eine längere Aufnahme war aufgrund des limitierten internen Kameraspeichers und Datentransferrate bei dieser Aufnahmezeit nicht möglich.

² Jede Kamera weist ein spezifisches Detektionsverhalten auf. Um absolute Lichtmengen aus einer Kameraaufnahme zu ermitteln, muss man dieses genau kennen. Da im Rahmen dieser Arbeit keine absoluten Lichtmengen sondern Intensitätsunterschiede ermittelt und verglichen wurden, wurde das genaue Detektionsverhalten der hier verwendeten Kameras nicht bestimmt. Jedoch ist von diesen Kameras davon auszugehen, dass sie im mittleren Detektionsbereich ein annähernd lineares Verhalten aufweisen (Herstellerangaben).

fluoreszenzverhalten aufweist, ließen sich aus den Messungen keine absoluten Kalzium-Konzentrationen bestimmen. Aus diesem Grund wurden in den Experimenten nur die ermittelten Intensitäten (im Folgenden auch als Kalzium-Intensitäten bezeichnet), sowie deren raumzeitlichen Veränderungen betrachtet.

Für die quantitative Auswertung der am Mikroskop durchgeführten Messungen wurde Computer-gestützte Bildverarbeitung verwendet. Neben den bereits genannten Mikroskopie- und Aufnahme-Programmen (*AxioVision*; *Solis*), welche eine erste Verarbeitung der Bild-Daten ermöglichten, wurden für die weitere Auswertung die Programme *ImageJ* (*National Institute of Health*) sowie *Matlab* (*The MathWorks*) in den jeweils aktuellen Versionen verwendet (Auflistung siehe 6.2). Die für diese Arbeit angefertigten Analyse-Methoden werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

2.5.1 Analyse zyklisch auftretender Kalzium-Signale in HUVECs

Für die Analyse der zyklisch auftretenden Kalzium-Signale in HUVECs wurden mikroskopische Aufnahmen von einem großen Probenbereich (895 μm x 671 μm) erstellt, um möglichst viele vereinzelte Zellen innerhalb einer Messung zu erfassen. Die Positionsbestimmung der Zellen innerhalb einer Aufnahme sowie die Ermittlung des zeitlichen Verlaufs ihrer Kalzium-Intensitäten erfolgten automatisch. Das hierzu in *ImageJ* erstellte Makro wird im Folgenden beschrieben.

Die Positionsbestimmung der Zellen innerhalb einer Aufnahme erfolgte über das Auffinden lokaler Maxima. Aufgrund des niedrigen Signal-Rauschverhältnisses in den Original-Aufnahmen, war dieses jedoch nicht direkt möglich. Aus diesem Grund wurden zunächst für jeden einzelnen Bildpunkt (Pixel) $p_{m,n}$ der m Zeilen und n Spalten alle in der Zeitreihe t_{1-N} ermittelten Grauwerte $g_{m,n}$ aufsummiert (Gl. 2-1). Hieraus ergab sich für das Bild der aussummierten Grauwerte $G_{m,n}$ ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis.

Gl. 2-1

$$G_{m,n} = \sum_{t=1}^N g_{m,n}(t_i)$$

Innerhalb dieses Bildes konnten die Zellen durch Ermittlung lokaler Maxima identifiziert werden. Um Artefakte in Form von Neben-Maxima innerhalb einer Zelle (z.B. verursacht durch Zellkompartimente) zu eliminieren, wurde das Bild mit einem Gauss-Filter (Sigma = 5 Pixel; entspricht 9,7 μm) geglättet. Durch die Bestimmung lokaler Maxima wurden nicht nur die Zellen sondern auch kleinere, kontrastreiche Verunreinigungen in der

Probe (z.B. Zellfragmente oder fluoreszierende Partikel) markiert. Die markierten Positionen der Verunreinigungen wurden manuell vom Nutzer ausgewählt. Die Positionen der verbleibenden lokalen Maxima wurden anschließend auf die ursprüngliche, unveränderte Zeitserie übertragen. Um jede gefundene Position wurde anschließend ein rundes Messfeld mit einem Durchmesser von 10 Pixeln (entspricht 19,4 μm) definiert. Innerhalb dieser einzelnen Messfelder wurde der mittlere Grauwert für jeden Zeitpunkt ermittelt und in einer Liste gespeichert. Zusätzlich zu diesen Werten wurde für jeden Zeitpunkt der mittlere Grauwert einer zellfreien Region als Hintergrund-Referenz bestimmt. Für Kontrollzwecke und mögliche Korrekturen wurden die ermittelten Positionen ebenfalls gespeichert. Die gesamte Prozedur ist in Abbildung 2-11 grafisch dargestellt. Für die Bestimmung der Anzahl von Kalzium-Signalen für jede Zelle wurden die Daten in *Matlab* weiter verarbeitet. Da es während der Aufnahmen vermehrt zu Intensitätsschwankungen¹ kam, wurden im ersten Schritt die über die Zeit ermittelten Intensitäten $I(t)$ jeder Position auf die ebenfalls ermittelten Intensität $I_H(t)$ des Hintergrunds normiert (Gl. 2-2)².

Gl. 2-2

$$I_n(t) = \frac{I(t)}{I_H(t)}$$

Zu beachten ist, dass der Wert für I_n nach dieser Korrektur nicht mehr der tatsächlichen Kalzium-Intensität entsprach. Für das Auffinden der einzelnen Kalzium-Signale für die einzelnen Zellen einer Messung war dies jedoch nicht von Bedeutung. Die Bestimmung der Kalzium-Signale wird im Folgenden näher beschrieben

Für die Bestimmung der Kalzium-Signale der einzelnen Zellen wurde das normierte Signal I_n zunächst über die Zeit mit einem Binomial-Filter (Filtergröße: 3 Zeitschritte; entspricht 12 Sekunden) geglättet. Anschließend wurden alle lokalen Minima und Maxima bestimmt (Abbildung 2-12 A). Für jedes lokale Maximum wurde geprüft, ob dieses in einem bestimmten zeitlichen Fenster von jeweils 10 Zeitschritten (entspricht 40 Sekunden) vor und nach dem Maximum das absolute Maximum darstellte. War dies nicht der Fall, wurde dieses Maximum zugunsten des Höheren verworfen (Abbildung 2-12 B). Befanden sich innerhalb des zeitlichen Fensters um ein lokales Maximum keine höheren Werte, so wurde dieses als

¹ Diese Schwankungen traten sowohl bei den ermittelten Intensitäten in den Zellen als auch in zellfreien Regionen auf und waren entweder auf leichte Schwankungen der Beleuchtung oder Belichtungszeit der Kamera zurückzuführen.

² Testweise wurde für die Intensitäten auch eine Hintergrund-Subtraktion durchgeführt. Die beschriebene Normierung (Gl. 2-2) erzielte hier jedoch bessere Resultate. Dies lässt darauf schließen, dass die Stärke der Schwankungen proportional zur ermittelten Intensität war.

Maximum beibehalten. Durch dieses rekursive Verfahren¹ erhielt man die Hauptmaxima in einem bestimmten Bereich (im Folgenden regionale Maxima genannt) (Abbildung 2-12 C).

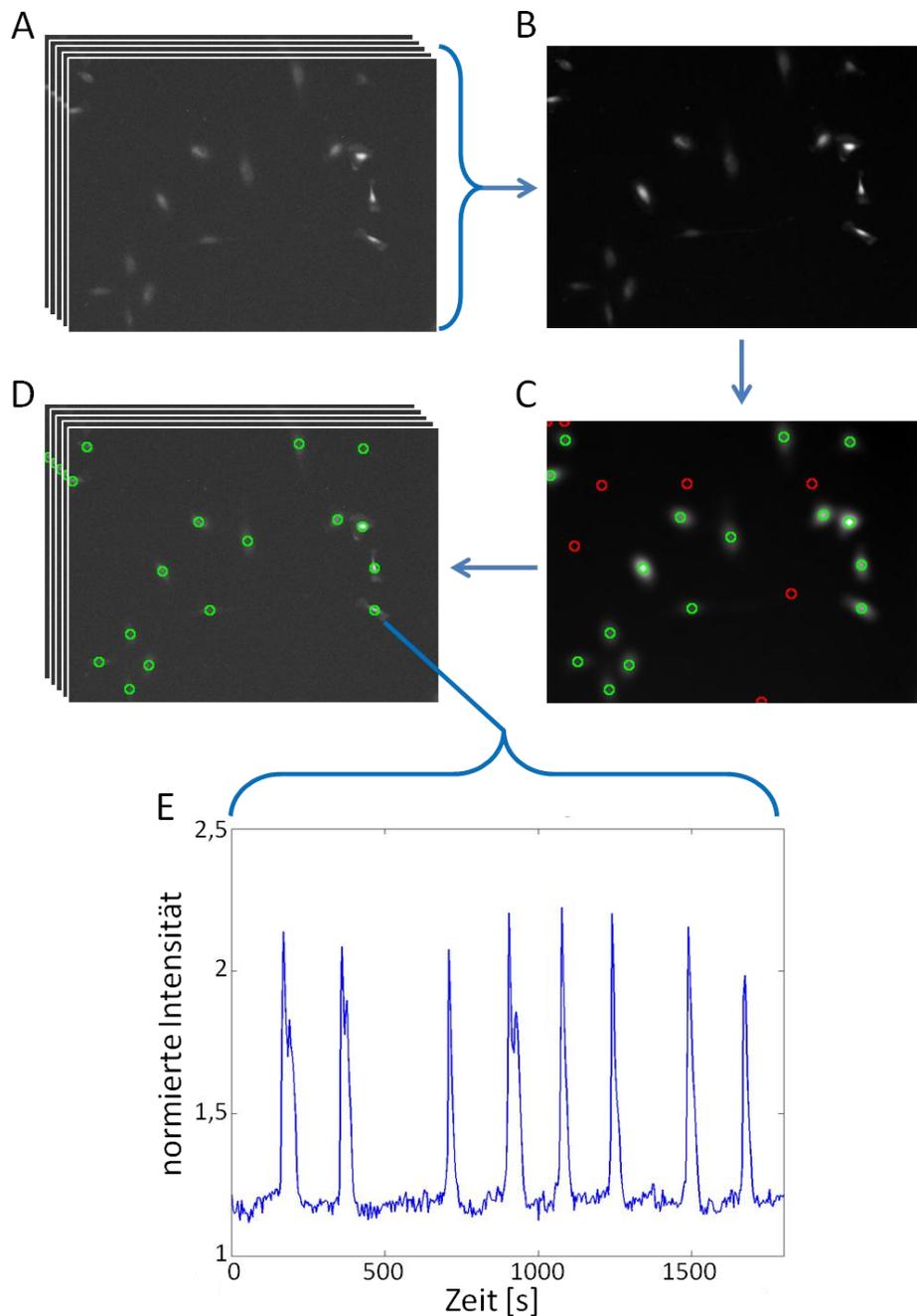


Abbildung 2-11: Positionsbestimmung von Zellen und Ermittlung der Intensität über die Zeit. (A) Original-Datensatz mit Signal-Rauschverhältnis. (B) Aufsummiertes Bild mit verbessertem Signal-Rauschverhältnis. (C) Geglättetes Bild mit den ermittelten lokalen Maxima (farbige Kreise). Falsch bestimmte Positionen wie fluoreszierende Schmutzpartikel (rote Kreise) wurden manuell entfernt. Die verbleibenden Positionen der Zellen (grüne Kreise) wurden auf die Original-Aufnahmen übertragen (D). (E) Zeitverlauf der normierten Intensität I_n einer Zelle (Gl. 2-2).

¹ Das Programm zur rekursiven Bestimmung von regionalen Maxima entstand in Zusammenarbeit mit Dr. Norbert Kirchgessner (früher ICS-7 (Forschungszentrum Jülich GmbH), jetzt Institut für Agrarwissenschaften (ETH Zürich))

Neben den tatsächlichen Kalzium-Signalen wurden auch immer Intensitätsspitzen des Hintergrundrauschens als Signal erkannt. Dies trat dann auf, wenn innerhalb des untersuchten Zeitfensters keine Kalzium-Signale auftraten. Um die tatsächlichen Kalzium-Signale von den lokalen Maxima des Rauschens unterscheiden, wurde ein parametrisierter Schwellenwert verwendet. Hierzu wurde zunächst für jedes regionale Maximum I_{Max} die Intensitäts-Differenz ΔI zum vorangegangenen regionalen Minimum I_{Min} bestimmt (Gl. 2-3). Die Standardabweichung σ aller N auf diese Weise ermittelten Intensitäts-Differenzen wurde als Schwellenwert verwendet (Gl. 2-4, Abbildung 2-12 D). Hierdurch wurden nur regionale Maxima als echtes Kalzium-Signal anerkannt, die mindestens einen Intensitäts-Anstieg von σ zum vorhergegangenen regionalen Minimum aufwiesen (Abbildung 2-12 E).

Gl. 2-3

$$\Delta I = I_{Max} - I_{Min}$$

Gl. 2-4

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (\Delta I_i - \langle \Delta I \rangle)^2}$$

$\langle \Delta I \rangle$ = Mittelwert aller Intensitäts-Differenzen

Durch die Verwendung der Standardabweichung als Schwellenwert, hatte dieses Verfahren folgende Limitierungen: (1) Die Standardabweichung lässt sich nicht aus zwei oder weniger Werten ermitteln, und es käme zum Abbruch des Programms. Dies stellte für die durchgeführten Messungen jedoch kein Problem dar, da aufgrund des Rauschens stets mehr als zwei lokale Maxima gefunden wurden aus denen sich ΔI bestimmen ließ. (2) Enthielt eine Aufnahme keine oder nur wenige Kalzium-Signale gegenüber der Anzahl lokaler Maxima des Hintergrundrauschens, sinkt Standardabweichung der bestimmten ΔI -Werte, was dazu führte, dass fälschlicherweise auch höhere Intensitäten des Rauschens als Kalzium-Signale akzeptiert. Um dieses zu verhindern, wurden die Messungen visuell begutachtet. Aufnahmen ohne sichtbare Kalzium-Signale wurden von der Auswertung ausgeschlossen; die entsprechende Zelle erhielt für die Anzahl der gefundenen Kalzium-Signale den Wert 0. Für Zellen bei denen die Kalzium-Signale falsch bestimmt wurden, konnten diese manuell korrigiert werden.

Für den Vergleich einzelner Experimente wurde die Anzahl der gefundenen Kalzium-Signale für alle Zellen innerhalb eines Experiments zusammengefasst (Abbildung 2-12 F). Aus der

hieraus resultierenden Verteilung wurden die mittlere Anzahl der Kalzium-Signale sowie deren Standardabweichung bestimmt. Zellen, die kein oder nur ein Kalzium-Signal aufwiesen flossen nicht in die statistische Auswertung ein, da bei diesen nicht auf ein zyklisches Kalzium-Signal geschlossen werden konnte.

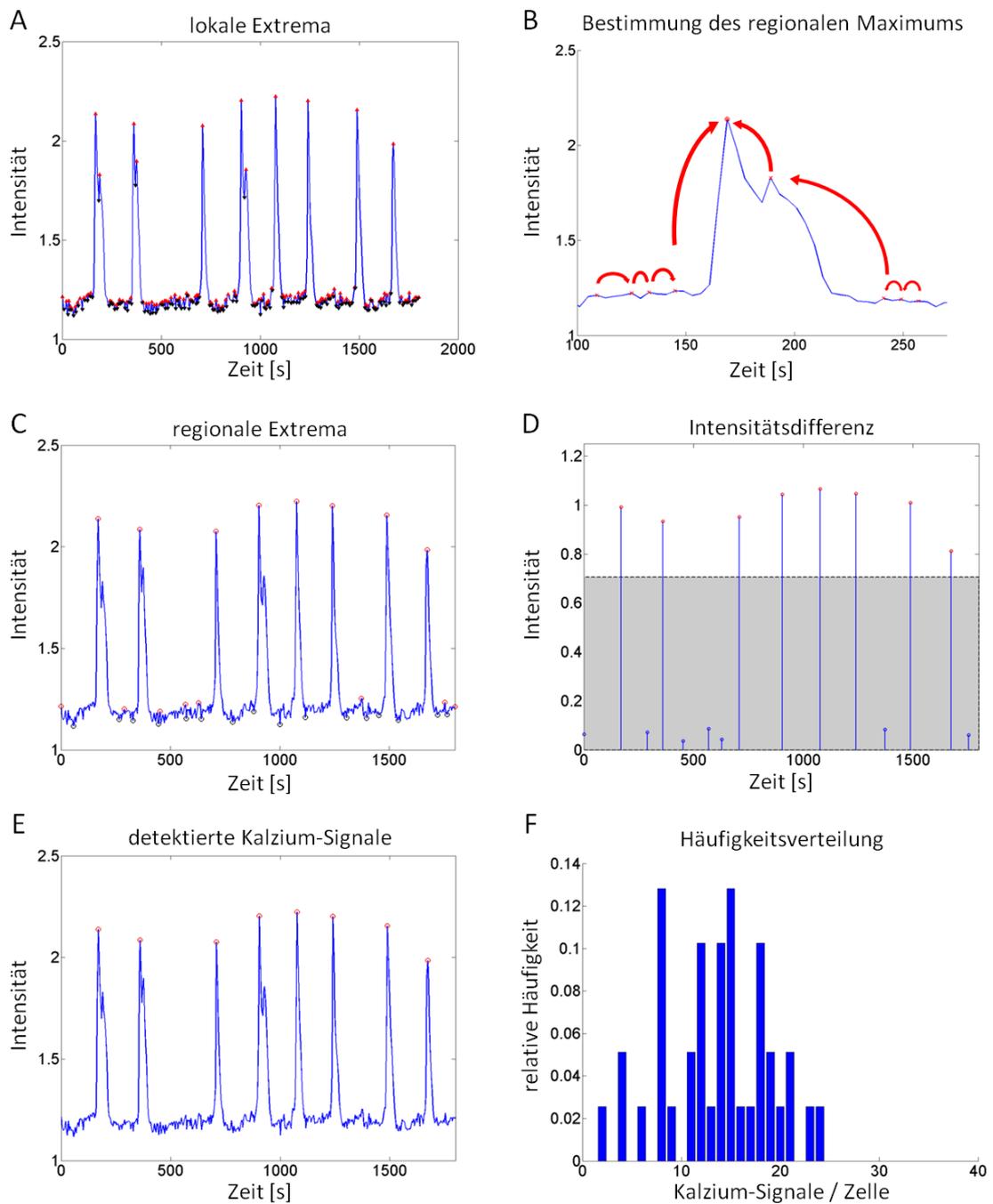


Abbildung 2-12: Bestimmung von Kalzium-Signalen und deren statistische Auswertung. (A) Ermittelte Intensität einer Zelle über die gesamte Aufnahmezeit (blaue Linie). In Rot sind die lokalen Maxima dargestellt, in Schwarz die lokalen Minima. (B) Einblick in einen kleineren zeitlichen Bereich. Die roten Pfeile geben an, in welcher Richtung das regionale Maximum gesucht wird. (C) Die ermittelten regionalen Maxima sind in rot dargestellt, die regionalen Minima sind schwarz. Neben den klar zu erkennenden echten Kalzium-Signalen wurden auch regionale Maxima zwischen den Signalen detektiert. (D) Die Intensitäts-Differenzen (vertikale, blaue Linien) zwischen den regionalen Maxima und den vorhergegangenen regionalen Minima wurden ermittelt. Die Standardabweichung dieser Werte wurde als Schwellenwert verwendet (angedeutet durch die schwarze, gepunktete Linie). Alle regionalen Maxima, die unterhalb dieses Schwellenwertes lagen (grau-schattierter Bereich), wurden verworfen. Die darüber liegenden Werte wurden als echte Kalzium-Signale akzeptiert (E). (F) Dargestellt ist die Häufigkeitsverteilung von Kalzium-Signalen aller Zellen innerhalb einer Aufnahme von 30 Minuten ($n = 40$ Zellen).

2.5.2 Detektion der Substratdeformation während der Kontraktion kardialer Myozyten

Für die Untersuchungen im zweiten Teil dieser Arbeit musste die Kontraktion pränataler, kardialer Myozyten detektiert werden. Als Maß der Kontraktion diente hierbei die durch die Zellen verursachte Deformation des unterliegenden, elastischen Substrates (Substratdeformation). Zur Visualisierung dieser Deformation wurden fluoreszierende Kugeln in das Substrat eingearbeitet (siehe Abschnitt 2.2.3), welche in den mikroskopischen Aufnahmen als kontrastreiche Strukturierung zu erkennen war. Eine Deformation des Substrates führt zu Verschiebungen der eingebetteten Kugeln. Zur Detektion dieser Verschiebungen wurde in *Matlab* das Programm *Struktur-Verschiebungenanalyse* erstellt. Dieses Programm entstand in Zusammenarbeit mit Georg Dreißen¹ und Dr. Ronald Springer¹ und basierte maßgeblich auf dem Algorithmus der subpixelgenauen Kreuzkorrelation von Bild-Ausschnitten (Schablonen). Dieser Algorithmus wurde im Institut bereits zuvor für die Analyse von Zellkräften (*Zellkraft-Analyse*) etabliert (Merkel et al. 2007; Cesa et al. 2007; Möhl et al. 2009)², und soll hier zunächst erläutert werden.

Subpixelgenaue Kreuzkorrelation

Bei der Kreuzkorrelation wird aus zwei Bildern R_{mn} (Referenz) und A_{mn} (Analyse) mit der gleichen Größe von $m \times n$ Pixeln der normierte Korrelationskoeffizient $nkor$ bestimmt (Gl. 2-5).

Gl. 2-5

$$nkor = \frac{\sum_1^m \sum_1^n (R_{mn} - \langle R \rangle)(A_{mn} - \langle A \rangle)}{\sqrt{(\sum_1^m \sum_1^n (R_{mn} - \langle R \rangle)^2)(\sum_1^m \sum_1^n (A_{mn} - \langle A \rangle)^2)}}$$

Dieser normierte Korrelationskoeffizient gibt Auskunft über die Ähnlichkeit der beiden verglichenen Bilder; je ähnlicher sie sind, umso näher liegt $nkor$ bei dem Wert 1. Um mittels dieser Kreuzkorrelation die Verschiebung einer Struktur zwischen zwei Bildern zu ermitteln, wird bei der subpixelgenauen Kreuzkorrelation eine Schablone $R_{mn}(x,y)$ mit den Maßen von $n \times m$ Pixeln um die Struktur gelegt, wobei x,y den Mittelpunkt der Schablone im Bild

¹ ICS-7: Biomechanik (Forschungszentrum Jülich GmbH)

darstellt. Anschließend wird im Analysebild ein Schatz an Schablonen $A_{mn}(x_\tau, y_\tau)$ gewählt, wobei x_τ im Bereich $[x - \tau, \dots, x + \tau]$ und y_τ im Bereich $[y - \tau, \dots, y + \tau]$ variiert werden. Der Wert τ gibt somit an, in welchem Bereich um $R_{mn}(x, y)$ die neue Position der Struktur im Analysebild gesucht wird. Im nächsten Schritt werden alle Schablonen $A_{mn}(x_\tau, y_\tau)$ mit $R_{mn}(x, y)$ einzeln kreuzkorreliert (Gl. 2-5). Hieraus erhält man die $(2\tau+1) \times (2\tau+1)$ groß Matrix M_{nkor} . Aus dem höchsten Wert in M_{nkor} ergibt sich in welcher Schablone $A_{mn}(x_\tau, y_\tau)$, und somit an welcher Position im Analysebild sich mit hoher Wahrscheinlichkeit die gesuchte Struktur befindet. Weil mit dieser Methode M_{nkor} jedoch selbst bei einem Vergleich völlig unterschiedlicher Bilder einen Maximalwert aufweisen muss, wird bei dem hier verwendeten Algorithmus ein Schwellenwert für $nkor$ festgelegt, der mindestens überschritten werden muss, damit die Position der zugehörigen Schablone $A_{mn}(x_\tau, y_\tau)$ als neue Position der gesuchten Struktur akzeptiert wird. Um bei der Positionsbestimmung eine höhere Genauigkeit als die eigentliche Bildauflösung zu erzielen, erfolgt bei der subpixelgenauen Kreuzkorrelation eine zusätzliche Interpolation der in M_{nkor} enthaltenen Werte. Hierzu wird an den höchsten Wert in M_{nkor} und seine direkt benachbarten Werte jeweils in x - und y -Richtung eine Parabelfunktion angepasst. Aus den Maxima der beiden Parabeln lässt sich die subpixelgenaue Position der in $R_{mn}(x, y)$ enthaltenen Struktur im Analysebild ermitteln.

Struktur-Verschiebungsanalyse

Für die Bestimmung der von einer Zelle ausgeübten Substratdeformation über eine Zeitserie wurde das Programm *Struktur-Verschiebungsanalyse* erstellt. Zur Unterdrückung Aufnahmebedingten Bildpunkt-Rauschens wurden in diesem Programm zunächst alle Bilder einer Zeitserie mit einem zweidimensionalen Gauss-Filter geglättet. Der Filter-Kern betrug hierbei 7×7 Pixel (entspricht $(2,275 \mu\text{m})^2$). Die Standardabweichung σ der Gauss-Verteilung betrug 1 Pixel (entspricht $0,325 \mu\text{m}$). Für die Detektion der Substratdeformation wurden im ersten Bild der Zeitserie mehrere Schablonen $R_{mn}(x_g, y_g)$ entlang eines quadratischen Gitters mit den Gitterpositionen x_g, y_g erstellt. Die Gitterweite betrug hierbei 20 Pixel (entspricht $6,5 \mu\text{m}$). Die Schablonen $R_{mn}(x_g, y_g)$ besaßen eine symmetrische Kantenlänge von 40 Pixeln ($13 \mu\text{m}$). Die Schablonen aus benachbarten Gitterpositionen überlagerten sich somit zur Hälfte. Anschließend wurde mit der zuvor beschriebenen subpixelgenauen Kreuzkorrelation für die einzelnen in $R_{mn}(x_g, y_g)$ enthaltenen Strukturen ihre neue Position in jedem Zeitschritt ermittelt. Hierbei wurden eine Mindestgröße des normierten Korrelationskoeffizienten von $nkor \geq 0,6$ und ein maximaler Suchbereich $\tau = 5$ Pixel ($1,625 \mu\text{m}$) festgelegt.

Aus Kreuzkorrelation erhielt man zu jedem einzelnen Zeitpunkt t der Aufnahme eine Matrix $M_g(t)$ mit den neu ermittelten x,y -Positionen der in $R_{mn}(x_g, y_g)$ enthaltenen Strukturen. Aus der Differenz zwischen der Position einer Struktur zu einem Referenz-Zeitpunkt t_{Ref} ($x(t_{Ref}), y(t_{Ref})$) und ihrer Position zu einem anderen Zeitpunkt t ($x(t), y(t)$) ließ sich der Vektor $\vec{u}(t)$ der erfolgten relativen Verschiebung berechnen (Gl. 2-6). Hierbei wurde t_{Ref} manuell so gewählt, dass die auf dem Substrat befindliche Zelle ihre geringste Kontraktion aufwies.

Gl. 2-6

$$\vec{u}(t) = \begin{pmatrix} \Delta x(t) \\ \Delta y(t) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x(t) \\ y(t) \end{pmatrix} - \begin{pmatrix} x(t_{Ref}) \\ y(t_{Ref}) \end{pmatrix}$$

Die Länge des so berechneten Vektors $\vec{u}(t)$ entsprach somit der Stärke der von der Zelle hervorgerufenen Verschiebung zu jedem Zeitpunkten t in Relation zu ihrem Ruhezustand¹. Die Verschiebungsamplituden innerhalb eines Zeitschrittes entsprachen der von der Zelle ausgeübten Substratdeformation.

Für die weiteren Analysen wurden aus den relativen Verschiebungsamplituden einer Zeitserie eine neue Bildserie B_{Def} generiert. Hierbei entsprachen die x,y -Werte der Bildserie den jeweiligen relativen Verschiebungsamplituden in den Gitterpunkten x_g, y_g des Original Datensatz. Die z-Koordinaten der Bildserie entsprachen den einzelnen Zeitschritten.

Für die späteren vergleichenden Analysen mit den Messungen für Kalzium, wurden die Bildserie B_{Def} auf die Größe der ursprünglichen Bildserie des Substrates von 480 x 540 Pixeln (entsprechend eines Proben-Ausschnitts von 156 μm x 175,5 μm) skaliert. Die Größe für jeden Pixel von B_{Def} entsprach somit dem Gitterabstand von 20 Pixeln im Originalbild (entspricht 6,5 μm in der Probe).

Um die durch eine Zelle verursachte Substratdeformation unabhängig von evtl. umliegenden Zellen ermitteln zu können, wurde im nächsten Schritt der Bereich der zu untersuchenden Zellen innerhalb der Aufnahmen für Kalzium manuell ausgewählt und anschließend auf die Bildserie B_{Def} übertragen. Aus diesem Bereich wurde für jeden Zeitschritt der Mittelwert der Verschiebungsamplituden als Maß der durch die Zelle verursachten Substratdeformation ermittelt.

¹ Es ist zu beachten, dass eine Myozyte selbst in ihrem Ruhezustand noch eine gewisse Spannung beibehält, mit der sie das unterliegende Substrat deformiert. Es wurde somit nicht die absolute Substratdeformation der Zelle bestimmt. Um solche absoluten Substratdeformationen zu bestimmen, bräuchte man ein Referenz-Bild des Substrates ohne Zelle.

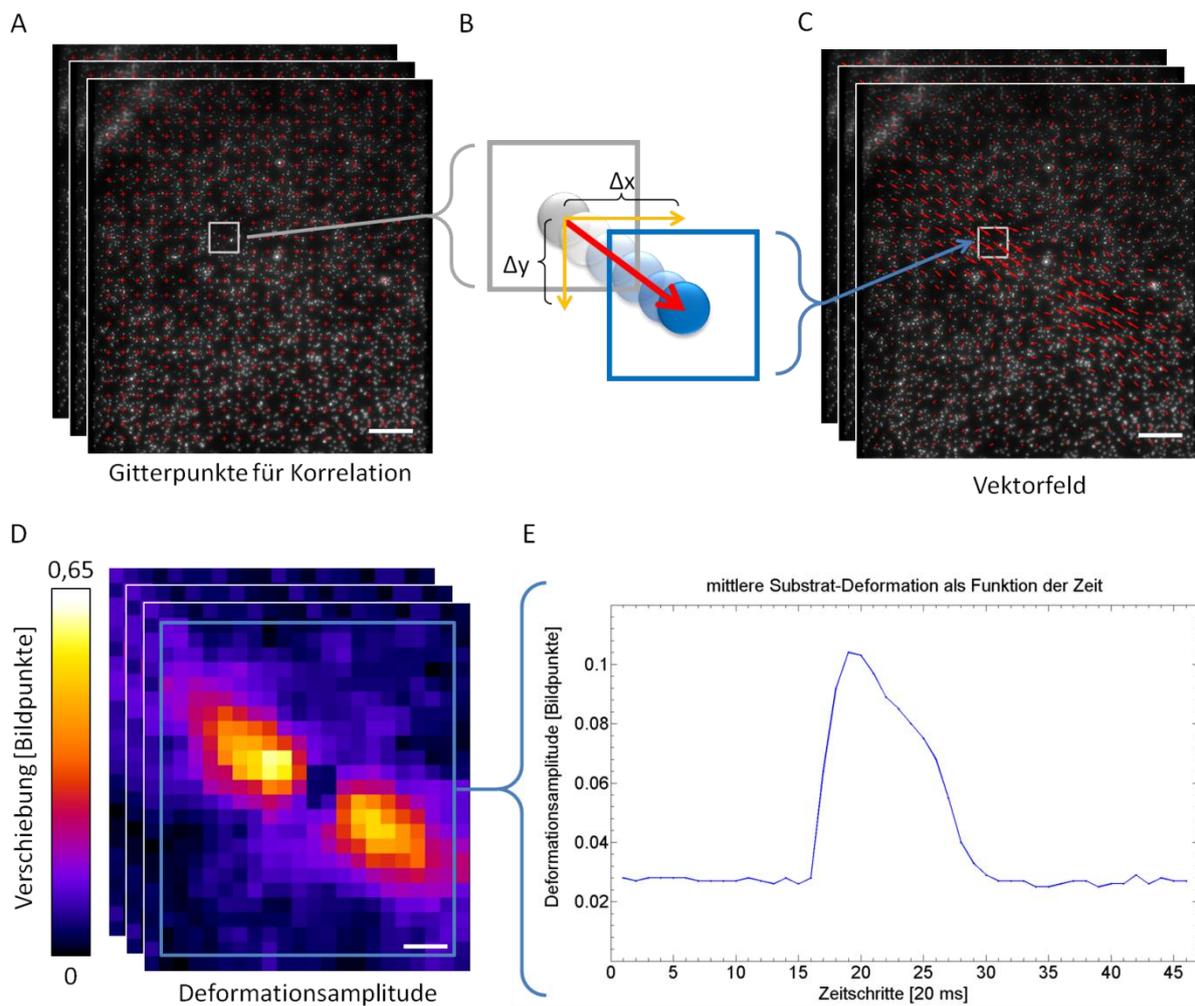


Abbildung 2-13: Struktur-Verschiebungsanalyse. (A) Auf die Zeit-Aufnahmen des strukturierten Substrats wurde ein regelmäßiges Gitter gelegt (rote Kreuze). An jeden Gitterpunkt wurde eine Maske für die folgende Kreuzkorrelation erstellt. (B) Schematische Darstellung der Kreuzkorrelation eines strukturierten Bildausschnitts. Die ausgewählte Struktur (grauer Kreis im grauen Rahmen) bewegt sich über die Zeit an eine andere Position (blauer Kreis im blauen Rahmen). Die neue Position wird mittels Kreuzkorrelation beider Bereiche (Rahmen) erkannt. Aus den Differenzen (Δx , Δy) der x,y -Koordinaten beider Positionen lässt sich der Verschiebungsvektor (roter Pfeil in (B)) bestimmen. (C) Die Verschiebungsvektoren der einzelnen Positionen zum Zeitpunkt einer Zellkontraktion sind als rote Pfeile (Vergrößerungsfaktor 30) dargestellt. Die Beträge der Vektoren entsprechen der Amplitude der Verschiebung in der jeweiligen Bild-Region. (D) Aus allen Verschiebungen einer Aufnahme, ergibt sich die Deformation des Substrates. Die Substratdeformationen aus allen Zeitschritten wurden als neue Bild-Matrizen gespeichert (Farbkodierung: schwarz-blau entspricht einer niedrigen, gelb-weiß einer hohen Deformationsamplitude). (E) Als Maß der Substratdeformation wurden die mittleren Verschiebungsamplituden eines Bereichs (blaues Quadrat) über die Zeit ermittelt.

2.5.3 Zeitliche Detektion von Signal-Ereignissen anhand ihrer ansteigenden Flanke

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zeitliche Abfolge zwischen dem Kalzium-Signal und der Substratdeformation (als Maß der Zellkontraktion) analysiert. Hierzu musste die zeitliche Abfolge dieser Signal-Ereignisse (Kalzium-Signal und Substratdeformation) zuverlässig ermittelt werden. Als eindeutig zu bestimmender Zeitpunkt wurde die ansteigende Flanke des jeweiligen Ereignisses gewählt. Dieser Zeitpunkt war definiert als der Zeitpunkt t_F , an dem die Intensität den 50%-Wert $I_{1/2}$ zwischen dem regionalen Minimum I_{Min} vor und dem Maximum I_{Max} während eines Signal-Ereignisses (Gl. 2-7) aufwies.

Gl. 2-7

$$I_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{2} \times (I_{Max} - I_{Min})$$

Um $I_{1/2}$ für jedes einzelne Ereignis zu bestimmen, mussten diese zunächst innerhalb der Aufnahme-Serie ermittelt werden. Hierzu wurde jeweils das erste vollständige Ereignis als Vorlage verwendet. Mittels Kreuzkorrelation der Aufnahme mit dieser Vorlage, konnten ähnliche Bereiche ermittelt werden. Bereiche mit einem Korrelationskoeffizienten von mindestens 0,9 wurden als echtes Ereignis akzeptiert. Mit dieser Methode konnte bereits ein Großteil der Signale-Ereignisse in der Zeitserie detektiert werden. Aufgrund leichter Varianzen zwischen den zeitlichen Verläufen dieser Ereignisse wurden Ereignisse, welche dem Ersten weniger ähnlich waren, nicht anerkannt. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt aus dem Mittelwert aller bereits detektierten Ereignisse eine neue Vorlage erstellt. Über eine weitere Kreuzkorrelation mit dieser Vorlage konnten nahezu alle echten Ereignisse innerhalb einer Aufnahme-Serie ermittelt werden. Zur Detektion wurde auch für diese ein Schwellenwert von 0,9 für den Korrelationskoeffizienten gewählt.

Im nächsten Schritt wurde für jedes erkannte Ereignis der 50%-Wert $I_{1/2}$ ermittelt (Gl. 2-7). Zu diesem Zweck für jedes Ereignis innerhalb eines zuvor festgelegten zeitlichen Fensters das absolute Intensitätsminimum I_{Min} vor jedem Ereignis sowie das absolute Intensitätsmaximum I_{Max} des während des Ereignisses bestimmt. Die Größe des zeitlichen Fensters wurde anhand der Überlagerung aller bestimmten Ereignisse aus der vorangegangenen Kreuzkorrelation manuell so gewählt, dass das Fenster nur die Dauer eines Signals umfasste. Hiernach wurde zunächst I_{Max} innerhalb des Fensters ermittelt. Zwischen dem zeitlichen Startpunkt des Fensters und dem Zeitpunkt von I_{Max} konnte anschließend das absolute Minimum I_{Min} bestimmt werden. Der genaue Zeitpunkt t_F , an dem die ansteigende Flanke den Wert $I_{1/2}$

erreichte, wurde anschließend durch lineare Interpolation der beiden Daten-Punkte $I(t_x)$ und $I(t_{x+1})$ um $I_{1/2}$ bestimmt.

Die einzelnen Schritte zur Bestimmung der Signalflanken ist in Abbildung 2-14 nochmals grafisch dargestellt.

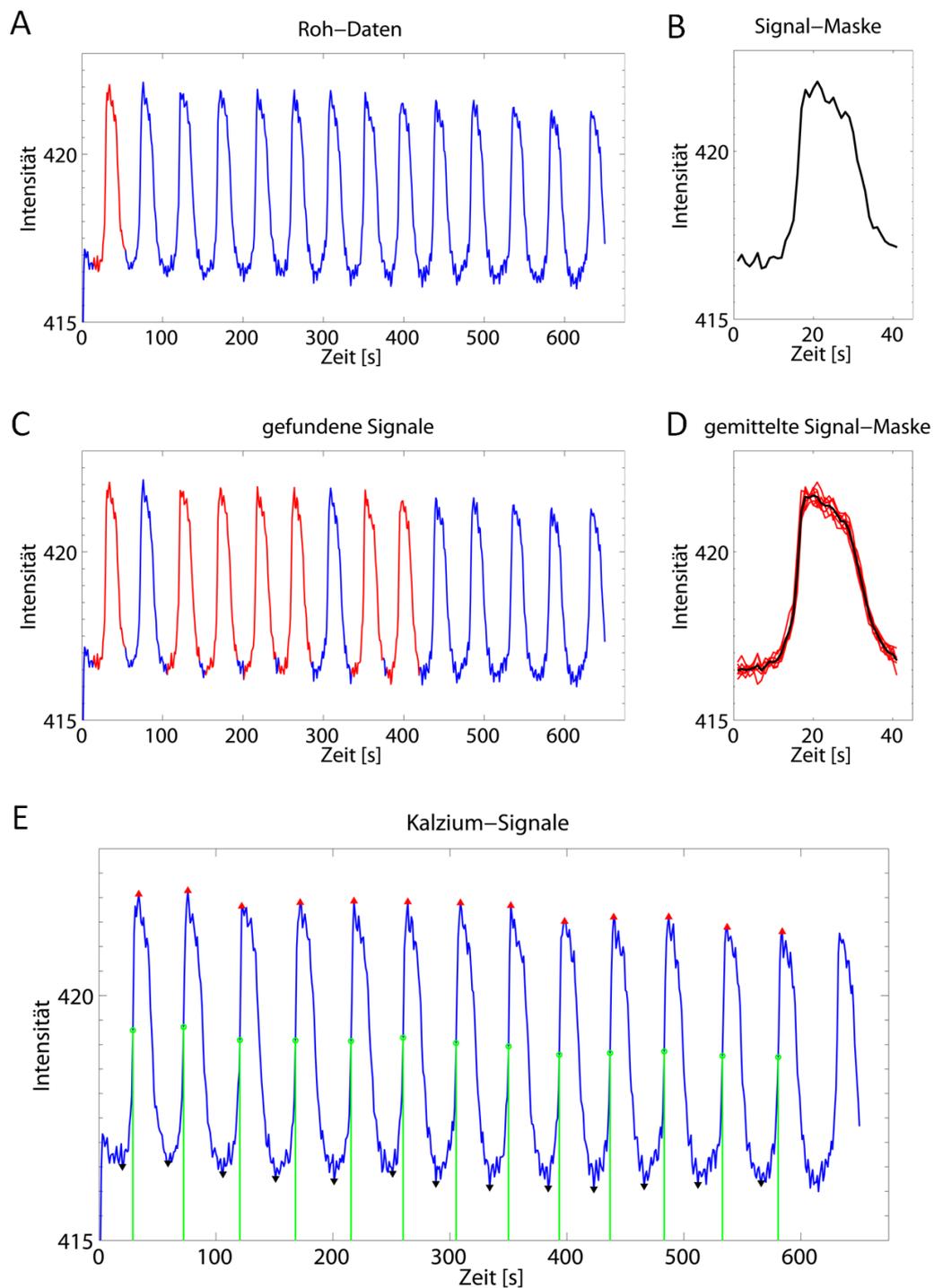


Abbildung 2-14: Detektion der ansteigenden Signalfanke. (A) Dargestellt ist die Kalzium-Intensität aus den Roh-Daten (blaue Kurve). Das erste Ereignis (roter Abschnitt) wurde als Vorlage für die anschließende Kreuzkorrelation verwendet (B). (C) In Rot dargestellt sind die Kalzium-Signale, die mittels Kreuzkorrelation mit dieser Schablone gefunden wurden. (D) Die gefundenen Ereignisse (rote Kurvenabschnitte) wurden zu einem mittleren Ereignis zusammengefasst (schwarze Kurve). Dieses wurde als Vorlage für eine erneute Kreuzkorrelation verwendet. (E) Mittels Korrelation mit dieser Schablone wurden nahezu alle Kalzium-Signale in der Aufnahme detektiert. Die roten Dreiecke geben das jeweilige Maximum des Signals an; die schwarzen Dreiecke symbolisieren die Minima vor jedem Signal. Aus diesen Werten konnte der 50%-Wert der ansteigenden Flanken (grüner Kreis) sowie dessen interpolierter Zeitpunkt (symbolisiert durch grüne vertikale Linien) bestimmt werden.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von intrazellulären Kalzium-Signalen auf unterschiedliche mechanische Prozesse analysiert. In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit erläutert. Hierbei werden im Abschnitt 3.1 die Ergebnisse der Untersuchung zyklisch auftretender Kalzium-Signale in Endothelzellen in Abhängigkeit der Substratsteifigkeit dargestellt. Abschnitt 3.2 zeigt die Ergebnisse zur hochauflösenden, korrelativen Untersuchung von Kalzium-Signalen und der Kontraktion von pränatalen, kardialen Myozyten. Die Diskussion der hier beschriebenen Ergebnisse erfolgt im Kapitel 4. Eine Zusammenfassung sowie der Ausblick auf weitere Untersuchungen findet sich im Kapitel 5.

3.1 Untersuchung zum Einfluss zyklisch auftretender Kalzium-Signale bei der Erkennung der Substratsteifigkeit von Endothelzellen

Ein Themenschwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung zyklisch auftretender Kalzium-Signale (Kalzium-Oszillationen¹) in Endothelzellen in Abhängigkeit verschiedener Substratsteifigkeiten. Die Untersuchungen erfolgten an primären, humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs, englisch: „*human umbilical vein endothelial cells*“, Abschnitt 2.1.1). Die in diesem Unterkapitel gezeigten Experimente an diesen Zellen sowie deren Ergebnisse entstanden zu einem Großteil in Zusammenarbeit mit Johannes Alexander Müller².

3.1.1 Quantitative Analyse zyklisch auftretender Kalzium-Signale

Hauptaugenmerk bei den hier durchgeführten Untersuchungen lag bei der Ermittlung der Häufigkeit mit der zyklische Kalzium-Signale (Kalzium-Frequenz¹) in einer Zelle auftreten. Der mikroskopische Aufbau und Versuchsablauf werden im Abschnitt 2.4.1 detailliert beschrieben und an dieser Stelle nur kurz dargestellt.

¹ Bei den Begriffen Kalzium-Oszillation und Kalzium-Frequenz handelt es sich um die in diesem Forschungsfeld etablierte Terminologie aus der englischsprachigen Primärliteratur. Es ist jedoch zu beachten, dass zyklisch auftretende Kalzium-Signale keine absolut konstanten, zeitlichen Abstände aufweisen (Skupin et al. 2008). Es handelt sich hierbei somit eher um eine Signal-Häufigkeit innerhalb eines Zeitraums. Zur Abgrenzung zu anderen in dieser Arbeit ermittelten Häufigkeitsverteilungen und um die Konsistenz zur Literatur zu wahren, wird die oben genannte Terminologie jedoch auch in dieser Arbeit verwendet.

² Johannes Alexander Müller fertigte im Zeitraum von Mai bis September 2011 seine Bachelor-Abschlussarbeit im ICS-7 an, welche von mir thematisch betreut wurde.

Die Bestimmung der Kalzium-Frequenzen sollte quantitativ erfolgen. Um eine hohe Anzahl an Zellen analysieren zu können, wurden große Probenbereiche aufgenommen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Zellen innerhalb des Probenbereichs möglichst vereinzelt vorlagen. Hierdurch sollte ein möglicher zusätzlicher Einfluss durch Zell-Zell-Kommunikation vermindert werden. Um intrazelluläres Kalzium in den Zellen zu visualisieren, wurden die Zellen mit dem Kalzium-Indikator *Fluo-4* beladen (Abschnitt 2.3.2). Die Aufnahmen erfolgten anschließend über einen Zeitraum von 30 Minuten mit einer Bildrate von 15 Bildern pro Minute.

Die Abbildung 3-1 zeigt an einem Beispiel die Veränderungen der Kalzium-Intensitäten der Zellen innerhalb eines Bildausschnittes über einen Zeitraum von 12 Minuten. Innerhalb einer Zellkulturschale wurden mehrere Probenbereiche innerhalb einer Zeitserie untersucht, welche im Folgenden als ein Experiment zusammengefasst werden.

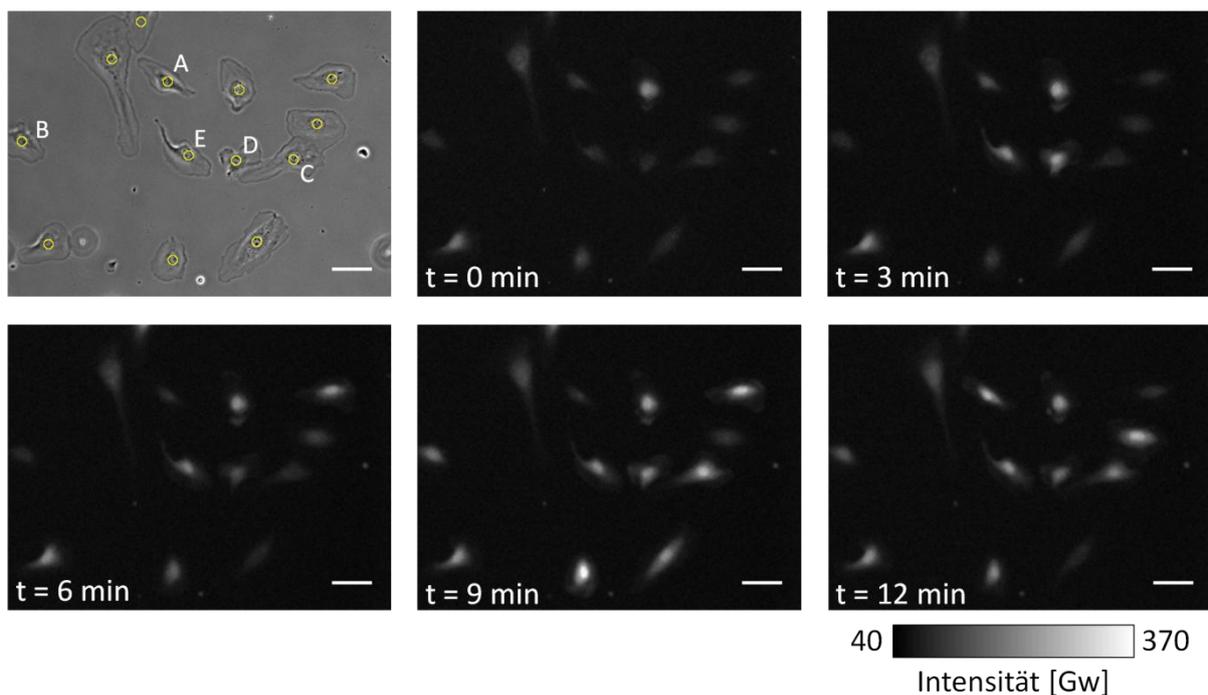


Abbildung 3-1: Zeitliche Veränderungen der Kalzium-Intensität in HUVECs. Das Bild oben links zeigt eine Phasenkontrast-Aufnahme des untersuchten Bildausschnittes. Die gelben Kreise markieren die gefundenen Positionen der im Bild befindlichen Zellen. Die restlichen Bilder zeigen die Veränderungen der Kalzium-Intensitäten über einen Zeitraum von 12 Minuten. Der Maßstab beträgt bei allen Bildern 60 µm. Die genauen zeitlichen Intensitätsverläufe der Zellen A-E (oben links) sind in Abbildung 3-2 aufgeführt.

Mit den im Abschnitt 2.5.1 beschriebenen Bild- und Datenanalyseverfahren konnte für jede Zelle eines Experiments die Anzahl an Kalzium-Signalen (Kalzium-Frequenz) ermittelt werden. Die Zellen innerhalb eines Experiments wiesen dabei sehr heterogene Signal-Formen

und Kalzium-Frequenzen auf (Abbildung 3-2). Neben den Zellen, die über den gesamten Zeitraum der Beobachtung zyklisch auftretende Kalzium-Signale aufwiesen, gab es immer auch wenige Zellen, die während der Aufnahme anfangen oder aufhören zyklische Signale zu generieren (Abbildung 3-2 C & D). Da dieser Effekt für alle weiteren Experimente gleichermaßen auftrat, wurden solche Zellen mit in die Auswertung aufgenommen. Zellen, welche zwar eine hohe Kalzium-Intensität aufwiesen, jedoch keine klaren zyklischen Signale zeigten, wurden dagegen von der weiteren Auswertung ausgeschlossen (Abbildung 3-2 E).

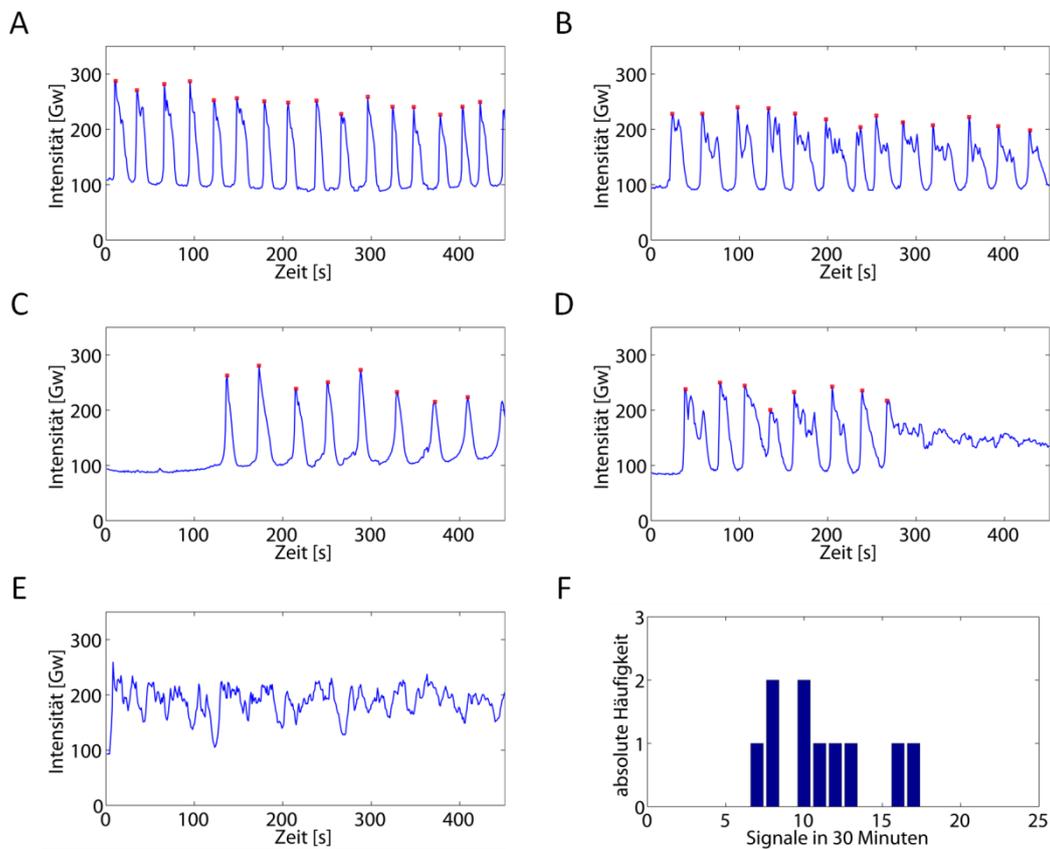


Abbildung 3-2: Heterogenität der ermittelten Kalzium-Signale innerhalb eines Experiments. A-E zeigen die zeitlichen Intensitätsverläufe der in Abbildung 3-1 dargestellten Zellen. Die roten Punkte markieren die detektierten Kalzium-Signale. Die Intensitätsverläufe der Zellen A und B unterscheiden sich stark voneinander. Dennoch weisen beide Zellen zyklisch auftretende Erhöhungen in ihrer Kalzium-Intensität (Kalzium-Signal) über den gesamten Zeitraum der Messung auf. Die Zelle C beginnt erst während der Messung mit der Generierung zyklisch auftretender Signale; bei Zelle D stoppt die Generierung der Kalzium-Signale während der Aufnahme. Zelle E zeigte kein klares zyklisch auftretendes Kalzium-Signal, und wurde daher aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen. In F sind die absoluten Häufigkeiten aller in Abbildung 3-1 dargestellten Zellen mit zyklisch auftretenden Kalzium-Signalen dargestellt.

Aus den ermittelten Kalzium-Frequenzen für alle Zellen eines Experiments ließ sich die relative Häufigkeitsverteilung berechnen. Die nachfolgenden Vergleiche verschiedener Messreihen erfolgen anhand der mittleren kumulativen Häufigkeitsverteilung (KHV) aller

Experimente einer Messreihe. Abbildung 3-3 zeigt die KHV der Kalzium-Frequenzen von 24 Experimenten (exp) mit insgesamt 1097 Zellen (n), die auf Glassubstraten kultiviert wurden. Die KHV zeigt einen sigmoidalen Verlauf.

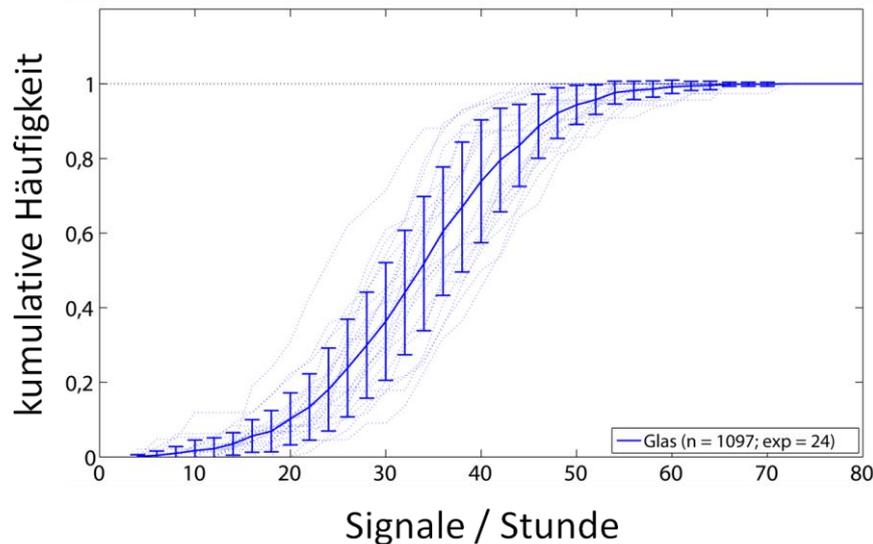


Abbildung 3-3: Kumulative Häufigkeitsverteilung der ermittelten Kalzium-Frequenzen für Zellen auf Glassubstraten. Analysiert wurden insgesamt 1097 Zellen in 24 unabhängigen Experimenten (blaue, gepunktete Linien). Die mittlere kumulative Häufigkeit (KHV; durchgehende, blaue Linie) für die gesamte Messreihe ergibt sich aus den Mittelwerten der einzelnen Experimente. Die Fehlerbalken ergeben sich aus der Standardabweichung σ über die Werte der einzelnen Experimente.

Ein weiterer Vergleich zwischen unterschiedlichen Messreihen erfolgte durch die mittlere Kalzium-Frequenz der untersuchten Zellen. Hierzu wurde für jedes einzelne Experiment der Median der ermittelten Kalzium-Frequenz bestimmt. Anschließend wurden der Mittelwert und die Standardabweichung σ (als Maß der Streuung) der einzelnen Mediane gebildet. Für die Zellen auf Glassubstraten betrug dieser mittlere Median der Frequenzverteilung $34,6 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 4,5 \text{ h}^{-1}$).

3.1.2 Einfluss der Substratsteifigkeit auf die Frequenz der Kalzium-Oszillationen

Die Frequenzen zyklisch auftretender Kalzium-Signale wurden in Abhängigkeit der Substratsteifigkeit bestimmt. Hierzu wurden die HUVECs auf elastischen Silikonsubstraten unterschiedlicher Steifigkeit untersucht. Die Steifigkeiten dieser Substrate betragen 15 kPa (weiches Substrat) und $1,35 \text{ MPa}$ (hartes Substrat) (siehe Abschnitt 2.2.2).

Auf weichem Substrat wurden insgesamt 2501 Zellen aus 33 unabhängigen Experimenten untersucht. Der Median der Kalzium-Frequenz betrug über alle Experimente gemittelt

25,1 h⁻¹ ($\sigma = 10,0$ h⁻¹). Der Median für die Kalzium-Frequenz der Zellen auf hartem Substrat betrug im Durchschnitt 19,5 h⁻¹ ($\sigma = 6,4$ h⁻¹). Die mittleren Kalzium-Frequenzen waren somit für die Zellen auf beiden Silikonsubstraten niedriger als für Zellen, die auf Glassubstraten kultiviert wurden (34,6 h⁻¹; $\sigma = 4,5$ h⁻¹). Zudem wiesen die Zellen auf Silikonsubstraten eine höhere Streuung des Medians auf.

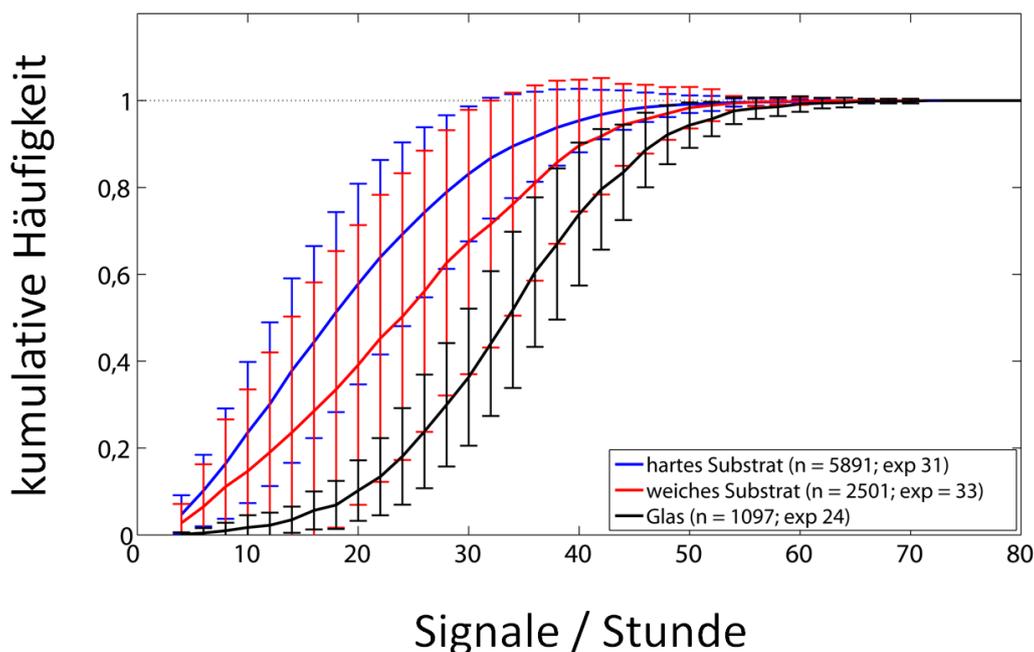


Abbildung 3-4: Vergleich der kumulativen Häufigkeitsverteilungen (KHV) der Kalzium-Frequenzen in Abhängigkeit der Substratsteifigkeit.

Betrachtet man die KHV für die Zellen auf den verschiedenen Substraten (Abbildung 3-4), so lässt sich für die Zellen auf beiden Silikonsubstraten ein steilerer Anstieg der Frequenz-Verteilung erkennen als bei Zellen auf Glas. Die Streuung der KHV für Zellen auf hartem Substrat überlappt nur geringfügig mit der von Zellen auf Glassubstraten. Dagegen überlappt die Streuung der KHV der Zellen auf weichen Substraten in großen Bereichen mit der von Zellen auf den anderen Substraten.

3.1.3 Zeitliche Veränderung der Kalzium-Frequenz

Die Messungen der Kalzium-Signale von HUVECs auf unterschiedlichen Substraten erfolgten verteilt über einen Zeitraum von drei Tagen. Im Folgenden wurden die Experimente an den einzelnen Substraten gemäß des Zeitraums seit der Aussaat der Zellen unterteilt. Experimente am *Tag 0* waren hierbei solche Messungen, die im Zeitraum von 3 bis 9 Stunden nach der

Aussaat der Zellen erfolgten. Experimente des *Tag 1* erfolgten etwa 20 bis 30 Stunden nach Aussaat der Zellen. Die Zellen in den Experimenten am *Tag 2* befanden sich etwa 45 bis 55 Stunden auf den jeweiligen Substraten. Im den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse für die Messreihen an verschiedenen Substratsteifigkeiten zunächst einzeln erläutert. Im Abschnitt 3.1.3.4 werden die mittleren Mediane der Kalzium-Frequenzen aus den einzelnen Messreihen nochmals vergleichend zusammengefasst (siehe Tabelle 3-1).

3.1.3.1 Glassubstrate

In Abbildung 3-5 sind die KHV's der ermittelten Kalzium-Frequenzen von Zellen auf Glassubstraten unterteilt nach Messtagen dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Verteilungen an allen drei Tagen einen sehr ähnlichen Verlauf sowie eine vergleichbar hohe Streuung aufweisen. Der Median der Kalzium-Frequenz liegt für Zellen am *Tag 0* bei $32,9 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 3,1 \text{ h}^{-1}$; $n = 320$; $\text{exp} = 7$). Für Zellen, die am *Tag 1* untersucht wurden, liegt der Median der Kalzium-Frequenz bei $33,8 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 4,9 \text{ h}^{-1}$; $n = 431$; $\text{exp} = 9$). Am *Tag 2* liegt der Median bei $37,0 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 3,4 \text{ h}^{-1}$; $n = 346$; $\text{exp} = 8$).

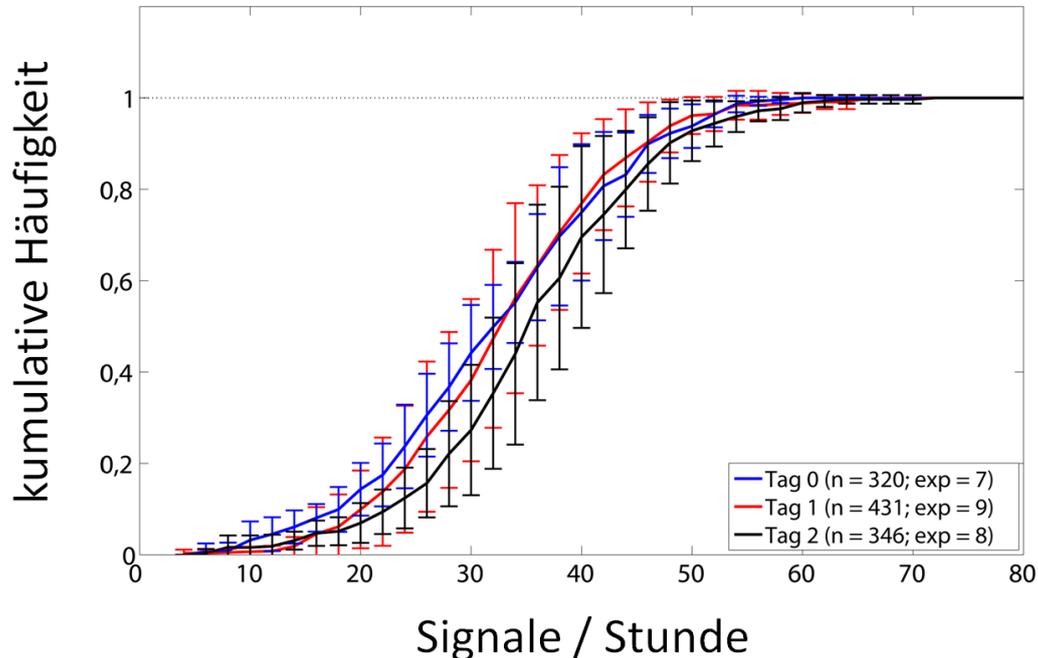


Abbildung 3-5: Kumulative Häufigkeitsverteilungen der Kalzium-Frequenzen von Zellen auf Glassubstraten in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Messung.

3.1.3.2 Weiches Silikonsubstrat ($E = 15 \text{ kPa}$)

Am *Tag 0* steigt die KHV der Kalzium-Frequenz von Zellen auf weichen Substraten deutlich steiler als an den anderen beiden Tagen. Zudem überlappt die Streuung der KHV am *Tag 0* nur geringfügig mit denen der anderen Tage. Der Median der Kalzium-Frequenz liegt mit $14,5 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 4,9 \text{ h}^{-1}$; $n = 820$; $\text{exp} = 11$) für die Zellen am *Tag 0* dementsprechend niedriger als an den anderen Tagen.

Am *Tag 1* beträgt der Median der Kalzium-Frequenz für die 721 Zellen aus 11 Experimenten $26,3 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 4,9 \text{ h}^{-1}$). Verglichen mit *Tag 0* ist die Kalzium-Frequenz der Zellen am *Tag 1* zu höheren Frequenzen hin verschoben. Die KHV weist hier nach einem langsamen Anstieg erst ab 15 h^{-1} einem steilen Verlauf auf. Insgesamt verläuft die KHV am *Tag 1* dennoch steiler als die KHV für Messungen am *Tag 2*, welche schließlich vergleichbar zu allen Messungen auf Glassubstraten ist. Der Median der Kalzium-Frequenzen für Zellen auf weichem Substrat beträgt am *Tag 2* $34,6 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 6,9 \text{ h}^{-1}$; $n = 960$; $\text{exp} = 11$).

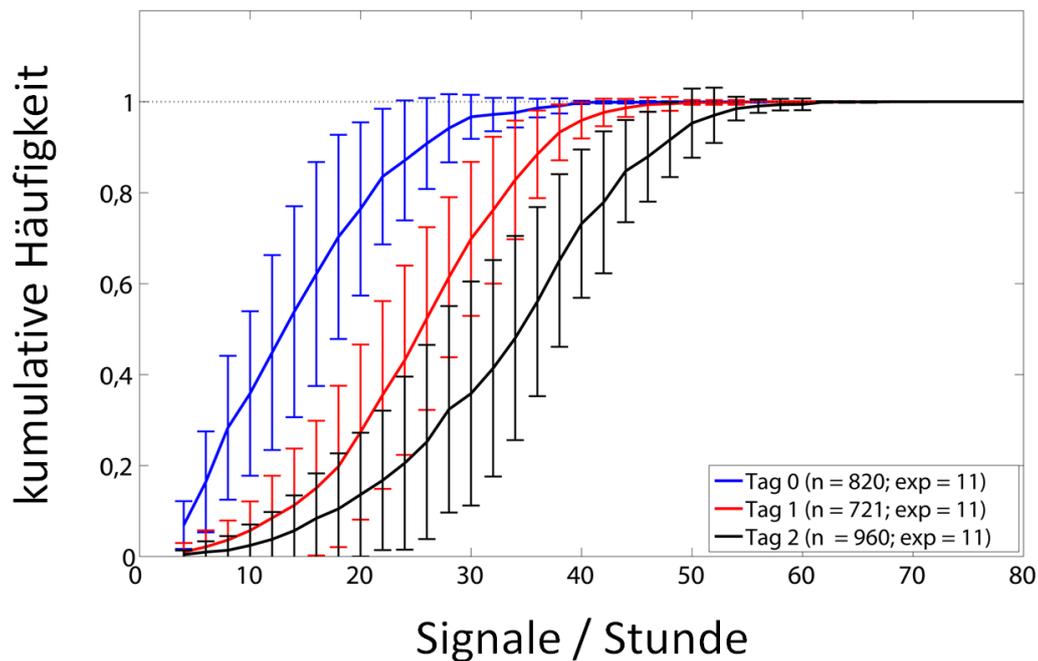


Abbildung 3-6: Kumulative Häufigkeitsverteilungen der Kalzium-Frequenzen von Zellen auf weichen Silikonsubstraten ($E = 15 \text{ kPa}$) in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Messung.

3.1.3.3 Hartes Silikonsubstrat ($E = 1,35 \text{ MPa}$)

Die in Abbildung 3-7 dargestellten KHV's der Kalzium-Frequenzen für Zellen auf harten Silikonsubstraten weisen ebenfalls eine Verschiebung über die drei Messtage auf. Die KHV's der einzelnen Messtage liegen hier jedoch näher beieinander als bei Zellen auf weichen Substraten (siehe Abbildung 3-6). Der Median der Kalzium-Frequenz der Zellen am *Tag 0* beträgt $13,2 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 2,5 \text{ h}^{-1}$; $n = 1715$; $\text{exp} = 10$). Der Verlauf der KHV steigt am *Tag 0* steil an. Auch am *Tag 1* weist die KHV für Zellen auf hartem Substrat einen steilen Verlauf auf. Mit einem Median von $18,8 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 2,5 \text{ h}^{-1}$; $n = 1802$; $\text{exp} = 12$) ist die mittlere Kalzium-Frequenz jedoch höher als am *Tag 0*. Am *Tag 2* liegt der Median der Kalzium-Frequenz mit $27,3 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 4,1 \text{ h}^{-1}$; $n = 2374$; $\text{exp} = 9$) nochmals höher als an den beiden Messtagen zuvor und die KHV steigt flacher an.

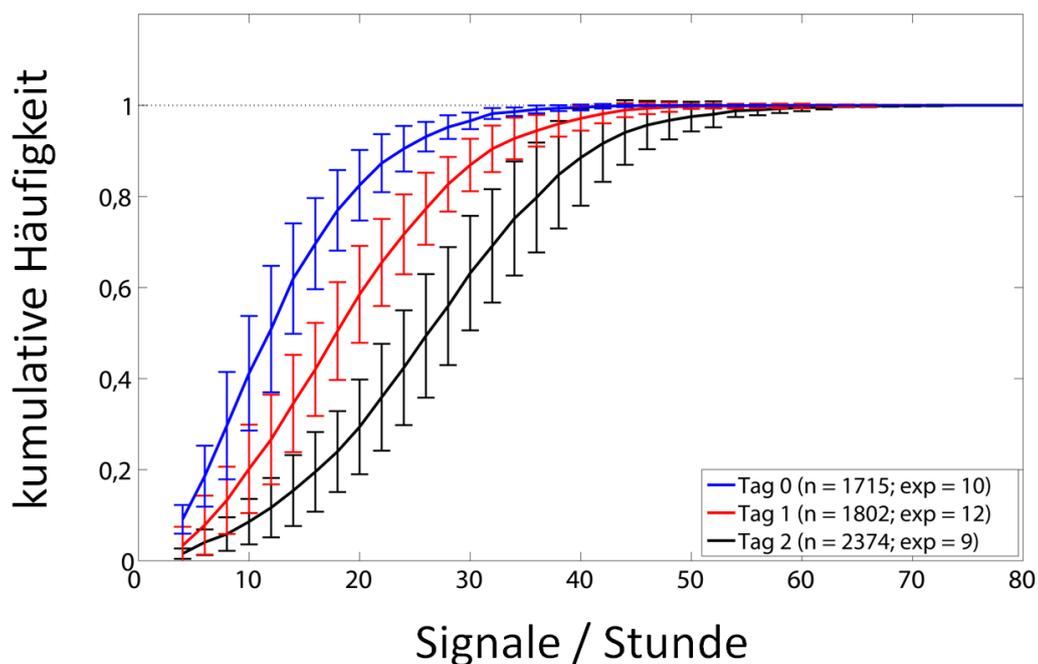


Abbildung 3-7: Kumulative Häufigkeitsverteilungen der Kalzium-Frequenzen von Zellen auf harten Silikonsubstraten ($E = 1,35 \text{ MPa}$) in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Messung.

3.1.3.4 Vergleich der zeitlichen Veränderungen der mittleren Kalzium-Frequenzen auf verschiedenen Substratsteifigkeiten

Zum besseren Vergleich zwischen den verschiedenen Messreihen sind in Tabelle 3-1 nochmals die Mediane der Kalzium-Frequenzen aus den einzelnen Messreihen zusammengefasst. Hier ist zu erkennen, dass die Kalzium-Frequenzen von Zellen auf beiden Silikonsubstraten am *Tag 0* ähnliche Werte aufweisen, die deutlich niedriger als die der Zellen auf Glas am *Tag 0* sind. Über den Zeitraum der Untersuchungen steigen die Kalzium-Frequenzen der Zellen auf Silikonsubstraten stark an, während die Kalzium-Frequenzen auf Glas nur minimale Veränderungen aufweisen. Desweiteren ist hierbei zu erkennen, dass die Kalzium-Frequenzen bei Zellen auf harten Silikonsubstraten über den beobachteten Zeitraum von drei Tagen langsamer ansteigen als die Kalzium-Frequenzen der Zellen auf weichen Silikonsubstraten.

Tabelle 3-1

	mittlere Kalzium-Frequenz [h⁻¹] (σ [h⁻¹]; exp= Anzahl der Experimente)		
Messzeitraum	Weiches Substrat (15 kPa)	Hartes Substrat (1,35 MPa)	Glassubstrat (> 1 GPa)
Alle Tage	25,1 ($\sigma = 10,0$; exp = 33)	19,5 ($\sigma = 6,4$; exp = 31)	34,6 ($\sigma = 4,5$; exp = 24)
Tag 0	14,5 ($\sigma = 4,9$; exp = 11)	13,2 ($\sigma = 2,5$; exp = 10)	32,9 ($\sigma = 3,1$; exp = 7)
Tag 1	26,3 ($\sigma = 4,9$; exp = 11)	18,8 ($\sigma = 2,5$; exp = 12)	33,8 ($\sigma = 4,9$; exp = 9)
Tag 2	34,6 ($\sigma = 6,9$; exp = 11)	27,3 ($\sigma = 4,1$; exp = 9)	37,0 ($\sigma = 3,4$; exp = 8)

Um Ursachen für die zeitlichen Veränderungen der Kalzium-Frequenzen näher einzugrenzen, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Kontrollen werden in den folgenden beiden Abschnitten beschrieben.

3.1.4 Einfluss des Substraltalters auf die Kalzium-Frequenz

Es konnte nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Silikonsubstrate über den Zeitraum von drei Tagen, in denen sie mit dem Medium in Kontakt standen, chemische oder physikalische Veränderungen erfahren (im Folgenden als Substratalterung bezeichnet). Um einen möglichen Einfluss der Substratalterung auf die Kalzium-Oszillationen in HUVECs zu quantifizieren, wurden Kontrollmessungen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst weiche Silikonsubstrate hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.2). Ein Teil dieser Substrate wurde, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, mit Fibronectin beschichtet und anschließend mit 2 ml Medium (EGM-2) für 2 Tage bei 37 °C und 5% CO₂-Begasung inkubiert. Die übrigen Substrate wurden trocken und dunkel bei Raumtemperatur gelagert. Nach 2 Tagen wurden auch diese Substrate mit Fibronectin beschichtet. Anschließend wurde sowohl auf die mit Medium inkubierten („gealterten“) Substrate als auch auf die unbehandelten Substrate Zellen in frischem Medium ausgesät. Die Untersuchungen erfolgten für beide Substratarten nur am Tag 0 (3 - 9 Stunden nach Aussaat der Zellen).

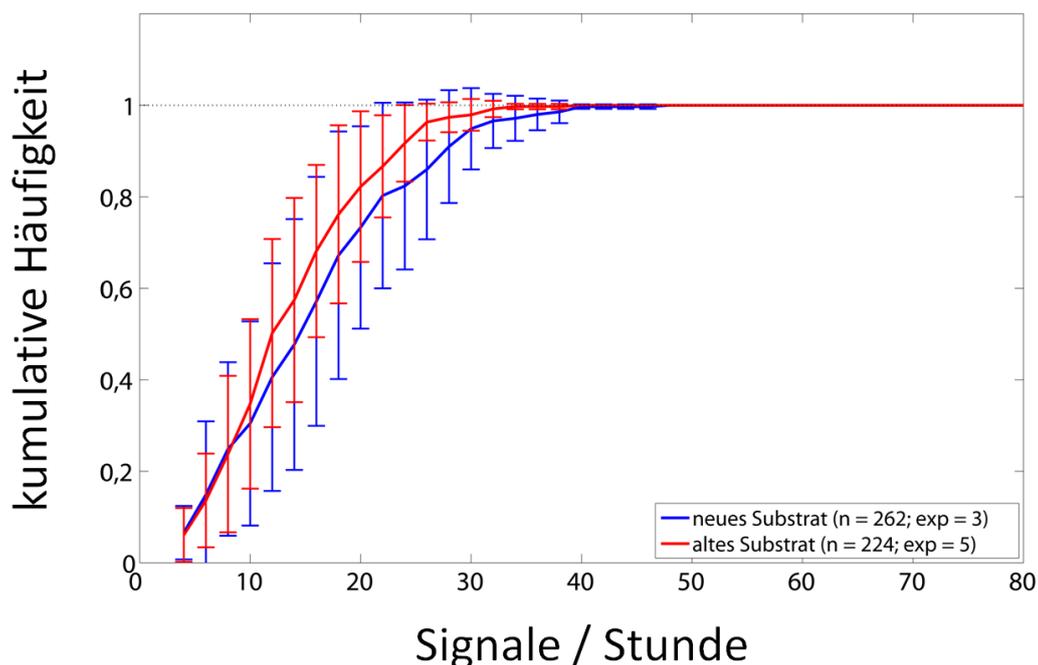


Abbildung 3-8: Einfluss des Substraltalters auf die kumulativen Häufigkeitsverteilungen der Kalzium-Frequenzen von Zellen auf weichen Silikonsubstraten ($E = 15$ kPa), gemessen am Tag 0.

Für die *gealterten* Substrate wurden insgesamt 224 Zellen in 5 unabhängigen Experimenten analysiert. Für die Kontrollen (unbehandelte Substrate) wurden 262 Zellen in 3 Experimenten analysiert. Die KHV der Kalzium-Frequenz beider Messungen weisen einen ähnlich steilen

Verlauf auf (siehe Abbildung 3-8). Der Median der Kalzium-Frequenzen von Zellen auf unbehandelten Substraten war mit $13,6 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 4,3 \text{ h}^{-1}$) mit dem zuvor beschriebenen Wert für Zellen auf weichem Silikonsubstrat am *Tag 0* vergleichbar (siehe Abschnitt 3.1.3.2 und Tabelle 3-1). Die mittlere Kalzium-Frequenz von Zellen auf *gealterten* Substraten lag mit $15,3 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 6,1 \text{ h}^{-1}$) nur wenig höher, war jedoch deutlich niedriger als die Werte für Zellen auf weichem Silikonsubstrat am *Tag 2* (siehe Abschnitt 3.1.3.2 und Tabelle 3-1).

3.1.5 Einfluss des Medienalters auf die Kalzium-Frequenz

Zellen setzen Inhaltsstoffe des verwendeten Nährmediums um und geben Abbauprodukte an ihre Umgebung ab. Zusätzlich besitzen manche essentielle Zusatzstoffe (z.B. Hormone und Vitamine) gerade bei einer Temperatur von 37°C nur eine begrenzte Haltbarkeit. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente erfolgten zwar immer in frisch zugegebenen HBSS-HUVEC (siehe Komplexe Medien: Abschnitt 6.6), das Nährmedium (EGM-2) wurde über den Zeitraum der drei Tage jedoch nicht gewechselt. Um einen möglichen Einfluss des Alters des Nährmediums (EGM-2) und der Umsetzung von Inhaltsstoffen auf die Frequenz von zyklisch auftretenden Kalzium-Signalen in HUVECs zu untersuchen, wurde das folgende Kontrollexperiment durchgeführt:

Um die Inhaltsstoffe des Nährmediums umzusetzen, wurden drei Tage vor den eigentlichen Messungen HUVECs in eine Zellkulturflasche ausgesät. Am Tag der Messungen wurde das alte, teilweise verstoffwechselte Nährmedium aus dieser Kulturflasche entnommen. Für die anschließenden Messungen wurden frisch aufgetaute Zellen in frischem Nährmedium sowie in diesem altem Nährmedium auf weiche Silikonsubstrate ausgesät. Die Messungen erfolgten direkt am *Tag 0* (3 - 9 Stunden nach Aussaat).

Abbildung 3-9 zeigt die KHV's der Kalzium-Frequenzen für Messungen in frischem sowie altem Medium am *Tag 0*. Die Verteilungen zeigen für beide Messungen einen ähnlichen Verlauf. Der Median der Kalzium-Frequenz für die Kontrollexperimente mit frischem Medium liegt mit $12,5 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 1,9 \text{ h}^{-1}$; $n = 178$; $\text{exp} = 4$) in einem vergleichbaren Bereich der zuvor beschriebenen Zellen auf weichen Substraten an *Tag 0* (siehe Abschnitt 3.1.3.2 und Tabelle 3-1). Mit einem Median von $15,2 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 2,3 \text{ h}^{-1}$; $n = 296$; $\text{exp} = 5$) liegt die Kalzium-Frequenz für Zellen, die in altem Medium kultiviert wurden, etwas höher als die der Kontrollmessungen in frischem Medium, jedoch deutlich niedriger als bei den Zellen auf weichem Silikonsubstrat am *Tag 2* (siehe Abschnitt 3.1.3.2 und Tabelle 3-1).

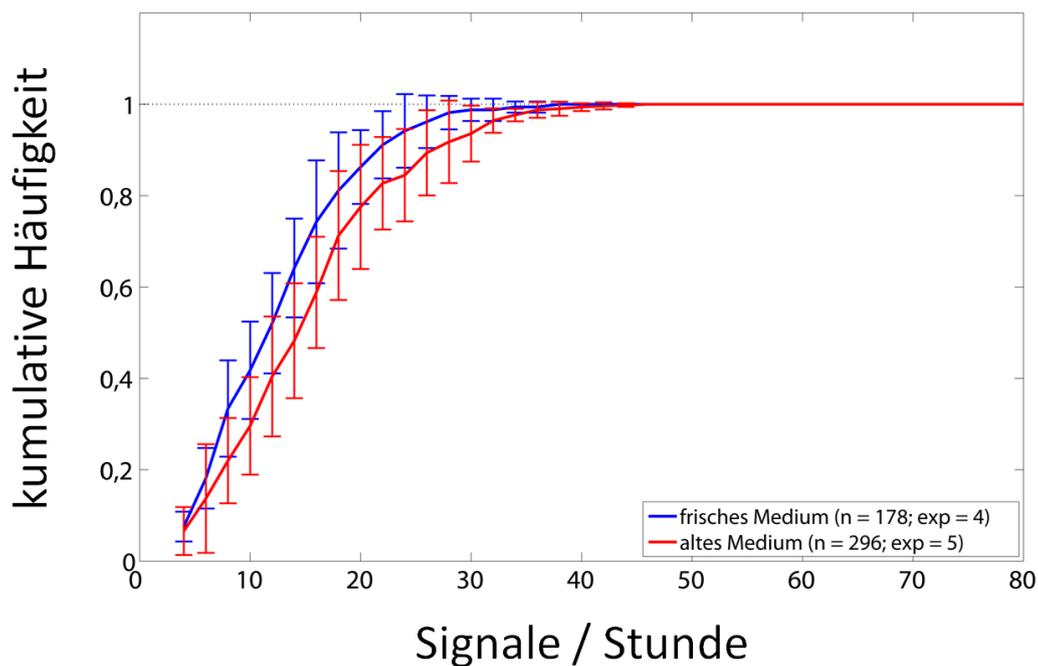


Abbildung 3-9: Einfluss des Medienalters auf die kumulativen Häufigkeitsverteilungen der Kalzium-Frequenzen von Zellen auf weichen Substraten ($E = 15$ kPa), gemessen am *Tag 0*.

3.1.6 Inhibitor-Experimente

Um weitere Hinweise auf die zugrundeliegenden molekularen Prozesse, die bei der Entstehung zyklischer Kalzium-Signale in HUVECs beteiligt sind, zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Untersuchungen mit etablierten Inhibitoren durchgeführt. Diese Experimente erfolgten an HUVECs auf Glassubstraten. In erster Näherung richteten sich die hier eingesetzten Inhibitor-Konzentrationen nach denen von Kim et al. angegebenen Werten für ähnliche Experimente in humanen mesenchymalen Stammzellen (Kim et al. 2009).

Für die Messungen wurden dieselben Protokolle wie bei den vorherigen Experimenten verwendet (siehe Abschnitte 2.3.2, 2.4.1 und 3.1.1). Allerdings wurden die Zellen vor der eigentlichen Messung von 30 Minuten zusätzlich für 10 Minuten vor der Inhibitor-Zugabe beobachtet. Für die Begutachtung wurden die Kalzium-Intensitäten der analysierten Zellen mit den Hintergrund-Intensitäten der Messung normiert (Gl. 2-2; Abschnitt 2.5.1).

Die folgenden Abbildungen zeigen jeweils die zeitlichen Kalzium-Intensitätsverläufe der untersuchten Zellen als Graustufen-kodierten zeitlichen Intensitätsverlauf. Hierbei wird für jede Zelle das zeitliche Intensitätsminimum schwarz und das zeitliche Intensitätsmaximum weiß dargestellt. Die Intensitäten wurden für jede Zelle auf ihre minimale und maximale Intensität normiert. Jede Zeile eines Bildes (y-Achse) entspricht dem zeitlichen Kalzium-Intensitätsverlauf einer Zelle. Die Spalten (x-Achse) entsprechen den einzelnen Zeitschritten

der Aufnahme (4 Sekunden pro Zeitschritt). In den Abbildungen sind nur die Intensitätsverläufe solcher Zellen dargestellt, die in den ersten 10 Minuten der Messung (vor Zugabe des Inhibitors) bereits zyklische Kalzium-Signale aufwiesen. Die Begutachtung der auftretenden Kalzium-Signale erfolgte rein qualitativ.

3.1.6.1 Kontrolle

Abbildung 3-10 zeigt das Ergebnis der Kontrollmessung ($n = 91$ Zellen). Bei dieser Messung wurde nach 10 Minuten 1 ml des Mediums mit einer Pipette entnommen und wieder hinzugegeben (Leer-Kontrolle). Innerhalb der ersten 10 Minuten zeigten die 91 Zellen deutliche, zyklisch auftretende Kalzium-Signale. Diese Signale setzten sich nach der Leer-Kontrolle fast unverändert fort. Die Intensitäten werden jedoch mit der Zeit schwächer. Dies ist wahrscheinlich auf das Ausbleichen sowie den aktiven Transport des Kalzium-Indikators aus der Zelle heraus zurückzuführen (Gee et al. 2000).

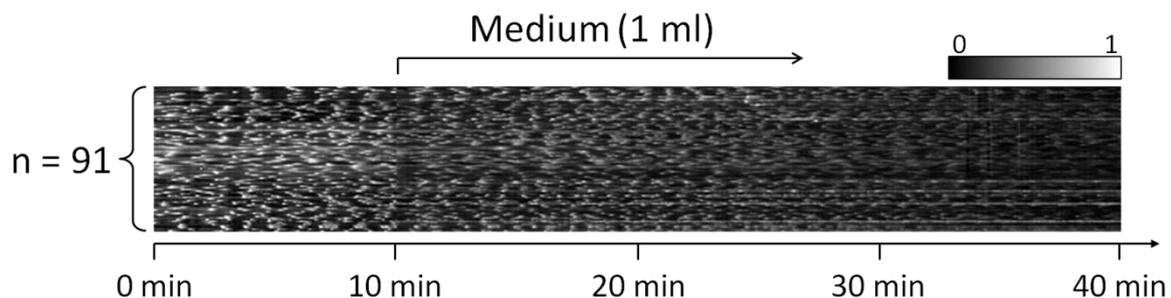


Abbildung 3-10: Kontrollmessung für Inhibitionsversuche. Dargestellt sind die normierten Kalzium-Intensitäten von einzelnen Zellen ($n = 91$) als zeitlicher Intensitätsverlauf. Jede Zeile entspricht dem Intensitätsverlauf einer Zelle über den Zeitraum der Beobachtung (40 Minuten). Nach 10 Minuten wurde mit einer Pipette 1 ml des Mediums entnommen und anschließend wieder hinzugegeben. Dargestellt sind nur solche Zellen, die bereits in den ersten 10 Minuten zyklisch auftretende Kalzium-Signale auswiesen.

3.1.6.2 Inhibitor der Kalzium-Kanäle der Plasmamembran

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob Kalzium-Kanäle der Plasmamembran an der Generierung zyklisch auftretender Kalzium-Signale beteiligt sind. Hierzu wurde in ersten Versuchen das Lanthan-Kation verwendet.

Lanthan:

Lanthan ist als unspezifischer Inhibitor von Kalzium-Kanälen der Plasmamembran beschrieben (Fricker 2006). Nach den ersten 10 Minuten der Aufnahme wurde Lanthanchlorid

(LaCl_3) in einer Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ zu den Zellen gegeben. Hiernach kam es bei den Zellen zunächst zu einer leichten Verminderung der Kalzium-Intensität, welche sich jedoch innerhalb der ersten Minuten nach der Zugabe wieder erholte (Abbildung 3-11). Die Zellen wiesen auch nach der Zugabe von Lanthan über den Zeitraum der Messung klare, zyklisch auftretende Kalzium-Signale auf.

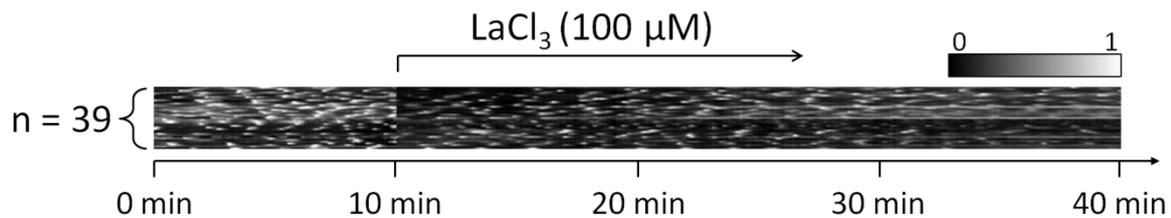


Abbildung 3-11: Einfluss von Lanthanchlorid (LaCl_3) auf die Kalzium-Signale in HUVECs. Nach 10 Minuten wurde LaCl_3 in einer Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ zu den Zellen ($n = 39$) gegeben. Darstellung wie in Abbildung 3-10.

3.1.6.3 Inhibitoren der intrazellulären Kalzium-Speicher

Im Folgenden wurden Inhibitoren eingesetzt, welche die Kalzium-Regulation über die Speicherkapazität des endoplasmatischen Retikulums beeinflussen können.

2-Aminoethyl-diphenyl-borat (2-APB)

Bei 2-APB (2-Aminoethyl-diphenyl-borat) handelt es sich um einen etablierten Inhibitor von IP_3 -Rezeptoren sowie speicherabhängigen Kalzium-Kanälen, jedoch werden in der Literatur auch weitere inhibitorische Effekte diskutiert (Bootman et al. 2002) (siehe auch Abschnitt 4.2.2). Abbildung 3-12 zeigt, dass die Zugabe von 2-APB in einer Endkonzentration von $100 \mu\text{M}$ zu einer drastischen Veränderung des Kalzium-Signals der Zellen ($n = 39$) führte. Direkt nach der Zugabe stieg die Kalzium-Konzentration in den Zellen stark an. In einem Teil der Zellen fiel diese innerhalb von 5 Minuten wieder ab. In den restlichen Zellen blieb die Kalzium-Konzentration über den Zeitraum der Messung erhöht. Nach der Zugabe von 2-APB kam es bei den untersuchten Zellen zum völligen Erliegen der zyklischen Kalzium-Signale.

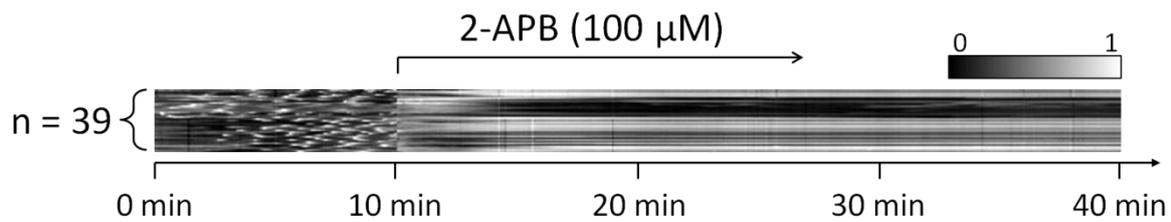


Abbildung 3-12: Einfluss von 2-APB (2-Aminoethyl-diphenyl-borat) auf die Kalzium-Signale in HUVECs. Nach 10 Minuten wurde 2-APB in einer finalen Konzentration von 100 µM zu den Zellen (n = 39) gegeben. Darstellung wie in Abbildung 3-10.

Thapsigargin

Bei *Thapsigargin* handelt es sich um einen etablierten Inhibitor der Kalziumpumpe *SERCA* („Sarkoplasmatische / Endoplasmatische Ca^{2+} ATPase“) (Treiman et al. 1998). Zu den Zellen (n = 46) wurde *Thapsigargin* in einer Endkonzentration von 10 µM gegeben. Nach der Zugabe kam es innerhalb der ersten Minuten bei nahezu allen Zellen zu einem starken Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Abbildung 3-13). Die Konzentration blieb über den gesamten Zeitraum der Aufnahme erhöht. Bei allen Zellen kam es zum Erliegen der detektierbaren, zyklischen Kalzium-Signale.

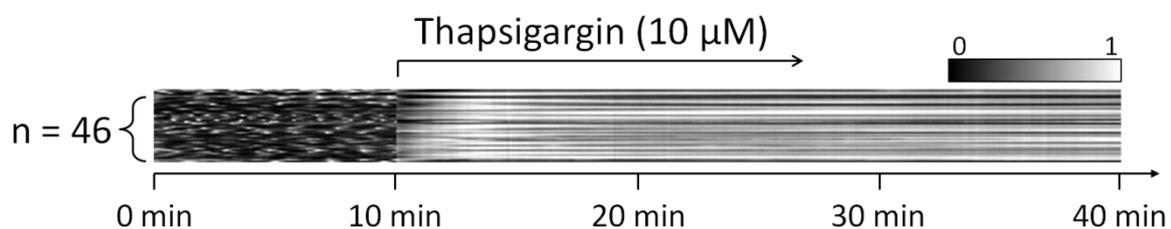


Abbildung 3-13: Einfluss von *Thapsigargin* auf die Kalzium-Signale in HUVECs. Nach 10 Minuten wurde *Thapsigargin* in einer Endkonzentration von 10 µM zu den Zellen (n = 46) gegeben. Darstellung wie in Abbildung 3-10.

3.1.6.4 Inhibitoren des Aktin-Zytoskelett und der Kraftgenerierung

ML-7

Neben den Inhibitoren von Kalzium-Kanälen und –Pumpen wurde auch der Inhibitor *ML-7* verwendet. Hierbei handelt es sich um einen etablierten Inhibitor der *Myosin Leichte Kette Kinase (MLKK)* und hat somit einen Einfluss auf den krafterzeugenden Apparat der Zelle

(Saitoh et al. 1987). *ML-7* wurde in einer Endkonzentration von 10 μM zu den Zellen ($n = 39$) gegeben. Abbildung 3-14 zeigt, dass es innerhalb der ersten 5 Minuten nach Zugabe in nahezu allen Zellen zu einem starken Anstieg der Kalzium-Konzentration kam. Die Kalzium-Konzentration sank nach kurzer Zeit wieder ab, blieb jedoch auf einem höheren Niveau als vor der Zugabe. Vereinzelt waren noch zyklisch auftretende Kalzium-Signale zu erkennen. Bei diesen Aufnahmen ist zu beachten, dass es bei den Zellen über den Zeitraum der Beobachtung auch zu morphologischen Veränderungen kam. So gingen die aufgespannten und meist länglich geformten Zellen über die Zeit zum Teil in eine rundere Morphologie über (Abbildung 3-15).

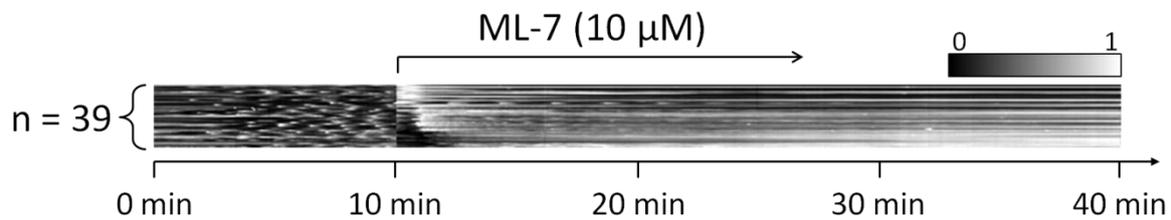


Abbildung 3-14: Einfluss von *ML-7* auf die Kalzium-Signale in HUVECs. Nach 10 Minuten wurde *ML-7* in einer finalen Konzentration von 10 μM zu den Zellen ($n = 39$) gegeben. Darstellung wie in Abbildung 3-10.

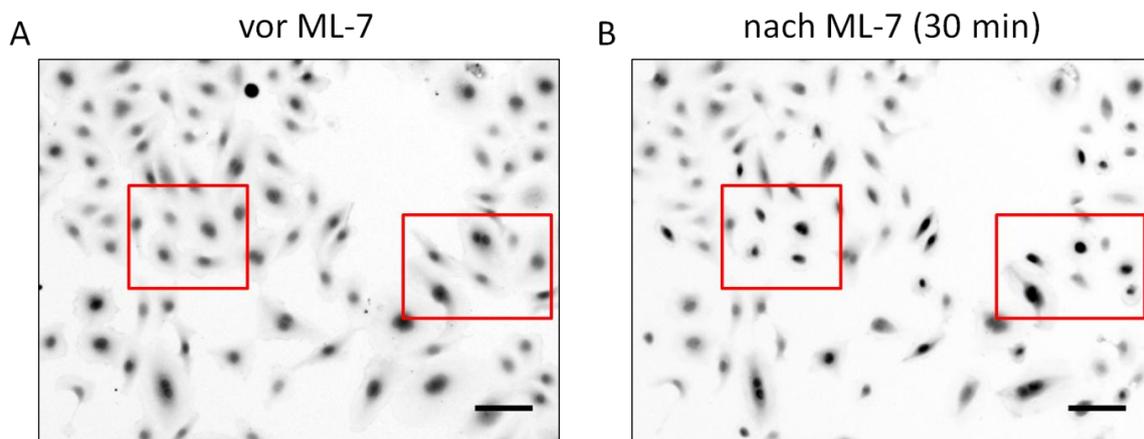


Abbildung 3-15: Morphologische Veränderungen nach der Zugabe von *ML-7*. A zeigt die Zellen vor der Zugabe von *ML-7*. In B sind dieselben Zellen 30 Minuten nach der Zugabe von 10 μM *ML-7* dargestellt. In den rot umrandeten Bereichen weisen die Zellen nach der Zugabe eine rundere Zellform auf. Die Bilder wurden für die Darstellung invertiert und Kontrastverstärkt. Der Maßstab entspricht 100 μm .

3.2 Kalzium-Signale bei der Kontraktion pränataler, kardialer Myozyten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das raumzeitliche Zusammenspiel zwischen intrazellulären Kalzium-Signalen und der daraus resultierenden Kontraktionen von kardialen Myozyten untersucht. Für die in den folgenden Abschnitten gezeigten Experimente wurden kardiale Myozyten aus Rattenembryonen verwendet. Diese primären Zellen wurden wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben in unserem Institut isoliert¹. Die Untersuchung der Kalzium-Signale sowie der Zellkontraktionen erfolgten simultan mittels eines hierfür aufgebauten Zweikanal-Mikroskops (mikroskopischer Aufbau und Versuchsablauf siehe Abschnitt 2.4.2). Zur Analyse der Kalzium-Signale wurden die Zellen mit dem Kalzium-Indikator *Fluo-4* beladen (siehe Abschnitt 2.3.2). Die Kalzium-Intensitäten konnten direkt aus den mikroskopischen Aufnahmen entnommen werden (siehe Abschnitt 2.5). Die Quantifizierung der Zellkontraktion erfolgte indirekt über die von der Zelle ausgeübte Deformation des unterliegenden Substrates. Hierzu wurden die Zellen auf strukturierten, elastischen Silikonsubstraten kultiviert (Elastizitätsmodul: 15 kPa; siehe Abschnitt 2.2.3). Für die Detektion der von der Zelle ausgeübten Substratdeformation sowie der anschließenden korrelativen Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Bild- und Datenanalyseverfahren entwickelt (siehe Abschnitt 2.5).

In diesem Kapitel werden sowohl Kontrollen zu den erstellten Verfahren als auch die erzielten Ergebnisse beschrieben. Die Diskussion der verwendeten Methode erfolgt in Abschnitt 4.4. Die erzielten Ergebnisse werden in Abschnitt 4.3 diskutiert.

¹ Die Isolation der Zellen erfolgte durch Nils Hersch und Dr. Thorsten Jonas (ICS-7: Biomechanik; Forschungszentrum Jülich GmbH)

3.2.1 Einfluss des Kalzium-Indikators *Fluo-4* auf die Kontraktionshäufigkeit

Für die Analyse der intrazellulären Kalzium-Signale in kardialen Myozyten wurde der Kalzium-Indikator *Fluo-4* verwendet. Erste Vorexperimente zeigten, dass eine Beladung der Zellen mit 1 μM *Fluo-4* für 30 Minuten bei 37 °C die Kontraktion der Myozyten nahezu vollständig zum Erliegen brachte. Das Beladungsprotokoll wurde daher dementsprechend angepasst (siehe Abschnitt 2.3.2). Dennoch war auch bei diesem Protokoll ein Einfluss des Indikators auf die Kontraktion der Zellen nicht völlig auszuschließen und sollte daher für die folgenden Experimente quantifiziert werden. Hierzu wurde für die Zellen zunächst deren Kontraktionshäufigkeit f_K ohne Beladung mit *Fluo-4* bestimmt. Die Aufnahmen hierfür erfolgten unter denselben Bedingungen wie die späteren Experimente mit *Fluo-4*-Beladung (Fluoreszenz-Anregung, Aufnahmeintervall sowie Aufnahmedauer; siehe Abschnitt 2.4.2). Anschließend wurden die Zellen direkt am Mikroskop beladen und die weiteren Messungen durchgeführt. Für jede dieser Messungen wurde ebenfalls die Kontraktionshäufigkeit f_F ermittelt.

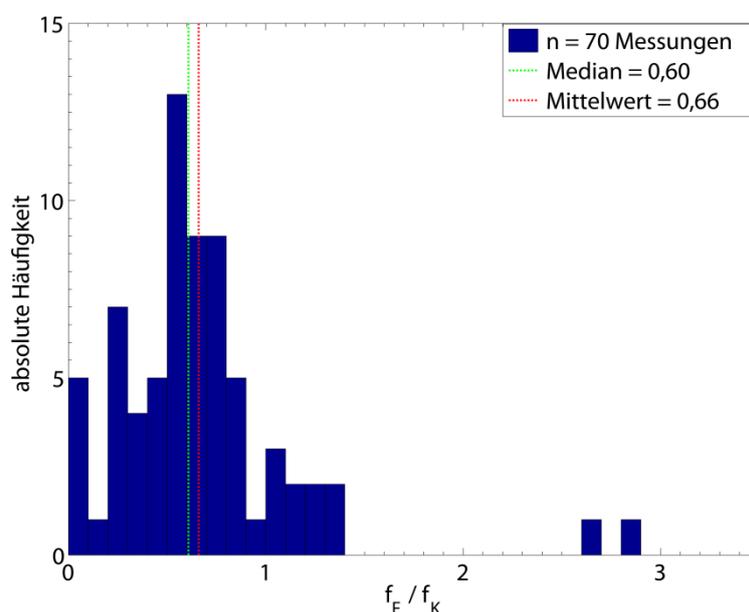


Abbildung 3-16: Einfluss der Beladung mit *Fluo-4* auf die Kontraktionshäufigkeit der Myozyten. Für jede einzelne Aufnahme ($n = 70$) wurde das Verhältnis zwischen der Kontraktionshäufigkeit f_K vor der Beladung sowie der Kontraktionshäufigkeit f_F nach der Beladung mit *Fluo-4* ermittelt. Dargestellt ist das Histogramm der absoluten Häufigkeiten dieser Verhältnisse. Die rote, gepunktete Linie gibt den Mittelwert der ermittelten Verhältnisse an, die grüne, gepunktete Linie entspricht dem Median.

Abbildung 3-16 zeigt das Verhältnis der Kontraktionshäufigkeit im beladenen Zustand f_F und unbeladenen Zustand f_K für alle Messungen. Im Durchschnitt reduzierte die Beladung mit

Fluo-4 die Kontraktionshäufigkeit der Zellen auf 66% (Median = 60%) der ursprünglichen Häufigkeit. Aus den insgesamt 70 Messungen stellten in 5 Messungen die Zellen ihre Kontraktion völlig ein. Jedoch gab es auch solche Zellen, die nach der Beladung mit *Fluo-4* eine höhere Kontraktionshäufigkeit als zuvor aufwiesen.

Zu beachten ist, dass in jeder Probenschale mehrere Positionen nacheinander untersucht wurden. Die Messungen erfolgten somit nicht zum selben Zeitpunkt nach der Beladung. Aufgrund der relativ langsamen Transferrate beim Speichern der großen Datensätze auf dem Computer (ca. 1 Minute pro Datensatz), konnten zwischen der ersten und letzten Messung innerhalb einer Schale bis zu 50 Minuten liegen. Dieser zeitliche Faktor wurde in der in Abbildung 3-16 dargestellten Verteilung nicht berücksichtigt. Die Bestimmung des Einflusses von *Fluo-4* auf die Kontraktionshäufigkeit diente als Kontrolle des Mess-Systems und sollte in dieser Arbeit nicht näher mit Eigenschaften der Zellen in Verbindung gebracht werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Verteilung nicht berücksichtigt, ob die jeweiligen Messungen an Einzelzellen oder Zellverbänden erfolgte.

3.2.2 Zeitlicher Verlauf der Kalzium-Signale in pränatalen, kardialen Myozyten

Für die späteren korrelativen Analysen zwischen Kalzium-Signalen und der Zellkontraktion (siehe Abschnitt 3.2.6) wurden die zeitlichen Intensitätsverläufe des Kalzium-Signals der Zellen ermittelt. Hierzu wurden in den Aufnahmen zunächst Messfelder um die zu beobachtenden Zellen gelegt, aus denen anschließend die mittlere Kalzium-Intensität bestimmt werden konnte (siehe Abbildung 3-17). Durch die Messfelder wurde verhindert, dass Kalzium-Signale anderer im Bildausschnitt befindlicher Zellen die Detektion beeinflussen konnten.

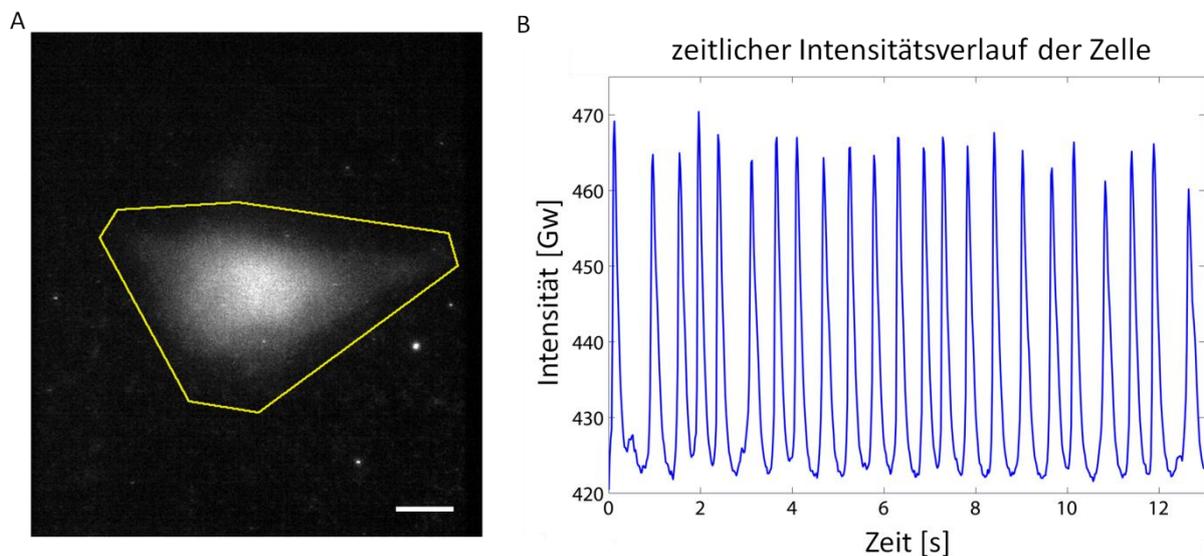


Abbildung 3-17: Ermittlung des zeitlichen Intensitätsverlauf einer Zelle. (A) Dargestellt ist die räumliche Kalzium-Intensität einer Zelle zum Zeitpunkt einer Kontraktion. Aus dem Messfeld (gelbe Umrandung) wurde die mittlere Intensität der Zelle in Grauwerten [Gw] ermittelt. Der Maßstab beträgt 20 μm . (B) Aus den mittleren Intensitäten zu jedem Zeitpunkt der Messung ergibt der zeitliche Intensitätsverlauf des Kalzium-Signals der Zelle.

Die hier untersuchten Zellen wiesen untereinander sehr heterogene Signalverläufe auf. So gab es sowohl Zellen mit sehr langsamen als auch sehr schnellen Kalzium-Signalen. Zudem war auch der Signalanstieg sowie Signalabfall zwischen den Zellen sehr unterschiedlich. Zur Verdeutlichung sind in Abbildung 3-18 einige Extrembeispiele exemplarisch dargestellt. Bei dem Großteil der untersuchten Zellen waren solche Signalverläufe zwar zu beobachten, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt. Zudem wiesen die Zellen oft eine Kombination der in Abbildung 3-18 dargestellten Signalverläufe auf, wodurch eine eindeutige Klassifizierung nicht möglich war.

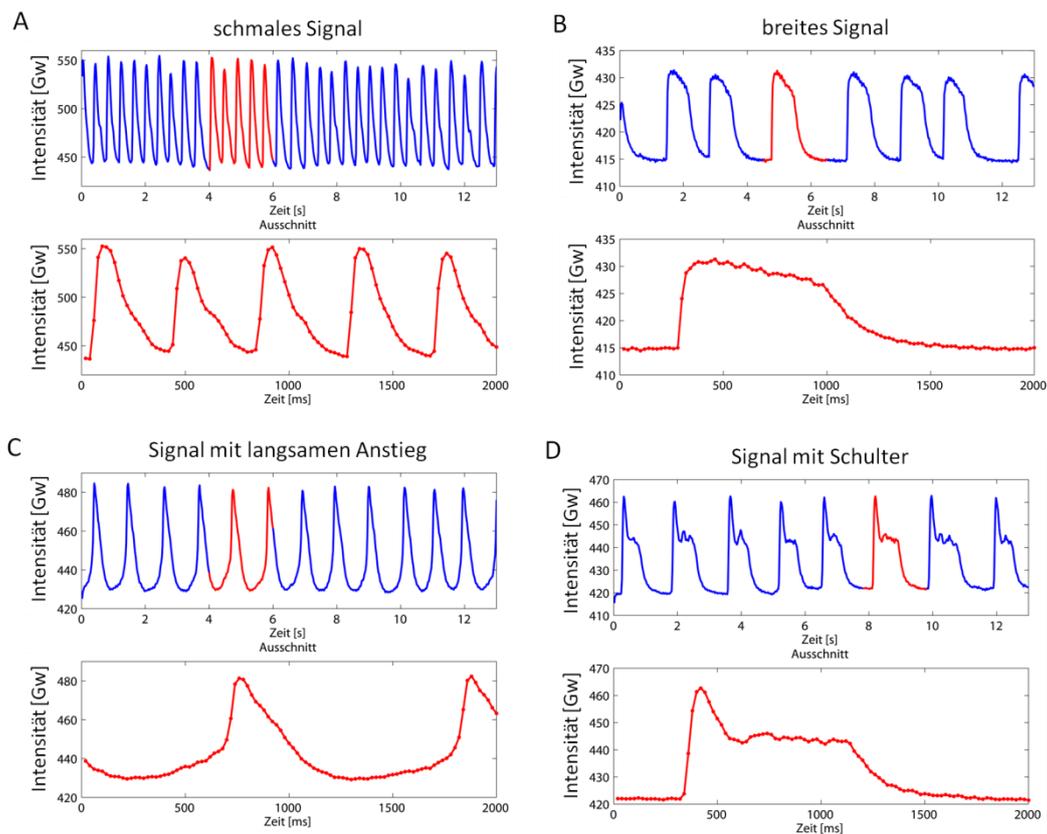


Abbildung 3-18: Extrembeispiele für unterschiedliche Signalverläufe in pränatalen, kardialen Myozyten. (A-D) Oben: Zeitlicher Verlauf der Kalzium-Intensität gemittelt über die gesamte Zelle (blau). Unten: 2 Sekunden Ausschnitt der Kalzium-Intensität (rotes Profil im oberen Graphen). Die Intensitäten entsprechen den mittleren Grauwerten [Gw] der Zelle im Original-Datensatz.

Die Abbildung 3-19 zeigt ein Beispiel für einen Kalzium-Signalverlauf, bei dem mehrere der obengenannten Eigenschaften auftraten. In der Regel zeigten die Kalzium-Signale einen raschen Signalanstieg innerhalb von 100 ms, wobei dieser während der Anfangsphase leicht verlangsamt sein konnte. Der Abfall der Kalzium-Intensität verlief bei allen Zellen deutlich langsamer als der Signal-Anstieg. Während dieser Regenerationsphase kam es zudem häufiger zur Ausbildung einer leichten Schulter bis hin zu einem zusätzlichen Nebenmaximum. Für die meisten untersuchten Zellen dauerte ein Kalzium-Signal nicht länger als 600 ms an.

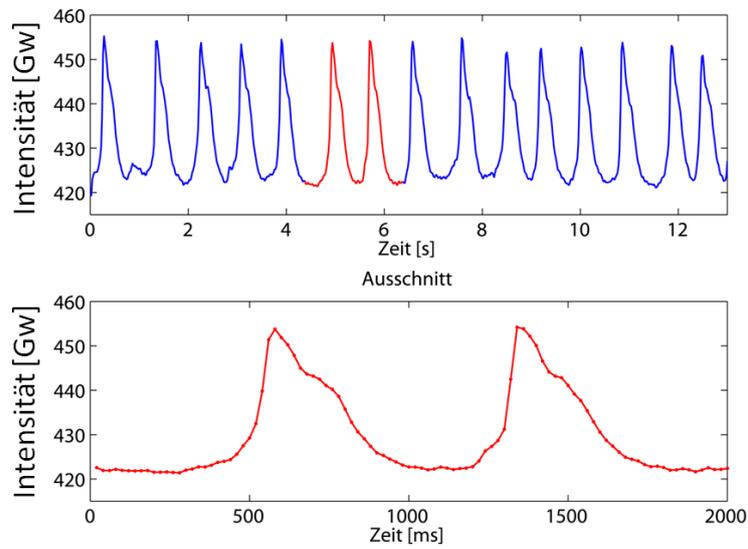


Abbildung 3-19: Beispiel für die Kombination mehrerer Signal-Eigenschaften in einem Kalzium-Signal. Oben: Zeitlicher Verlauf der Kalzium-Signale gemittelt über die gesamte Zelle (blau). Unten: 2 Sekunden Ausschnitt der Kalzium-Intensität (roter Bereich im oberen Graphen). Die Intensitäten entsprechen den mittleren Grauwerten [Gw] der Zelle im Original-Datensatz. Das Signal weist anfangs einen etwas verlangsamten Anstieg auf; in der abfallenden Flanke bildet es eine leichte Schulter aus. Die Dauer des Signals beträgt etwa 600 ms.

3.2.3 Raumzeitlicher Verlauf der gemessenen Kalzium-Signale

Wie zuvor beschrieben, zeigten die Kalzium-Signale der Zellen untereinander sehr heterogene zeitliche Signalverläufe (siehe Abschnitt 3.2.2). Um einen Eindruck zu erhalten, in wie fern diese zeitlichen Signal-Verläufe durch lokale Signal-Veränderungen innerhalb einer Zelle hervorgerufen wurden, wurden erste Untersuchungen zum raumzeitlichen Signalverhalten durchgeführt. Diese Untersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit jedoch nur exemplarisch an vereinzelt Zellen erfolgen. Dennoch deutet sich auch auf räumlicher Ebene ein heterogenes Signal-Verhalten der hier untersuchten pränatalen, kardialen Myozyten an.

Die Abbildungen auf den folgenden Seiten zeigen die raumzeitliche Ausbreitung des Kalzium-Signals zweier Zellen mit jeweils unterschiedlichen zeitlichen Kalzium-Signalen. Die Zelle in Abbildung 3-20 zeigt dabei einen raschen Anstieg der Kalzium-Intensität sowie einen langsameren, stetigen Abfall. Auch räumlich breitet sich das Kalzium-Signal schnell und homogen in der gesamten Zelle aus.

Das zeitliche Kalzium-Signal der in Abbildung 3-21 dargestellten Zelle zeigt hingegen einen verlangsamten Intensitätsanstieg sowie ein zusätzliches Nebenmaximum in der abfallenden Signalfanke. In dieser Zelle kommt es zunächst zu einem lokalen begrenzten Anstieg der Kalzium-Intensität. Diese pflanzt sich anschließend als Welle durch die Zelle fort, bis es schließlich zu einer zusätzlichen, globalen Kalzium-Intensitätserhöhung kommt. Solche wellenartigen Signalausbreitungen fanden sich bei etwa 47% der untersuchten Zellen.

Weitere Beispiele für unterschiedliche räumliche Signal-Ausbreitungen finden sich auch im Abschnitt 3.2.10 (Abbildung 3-36).

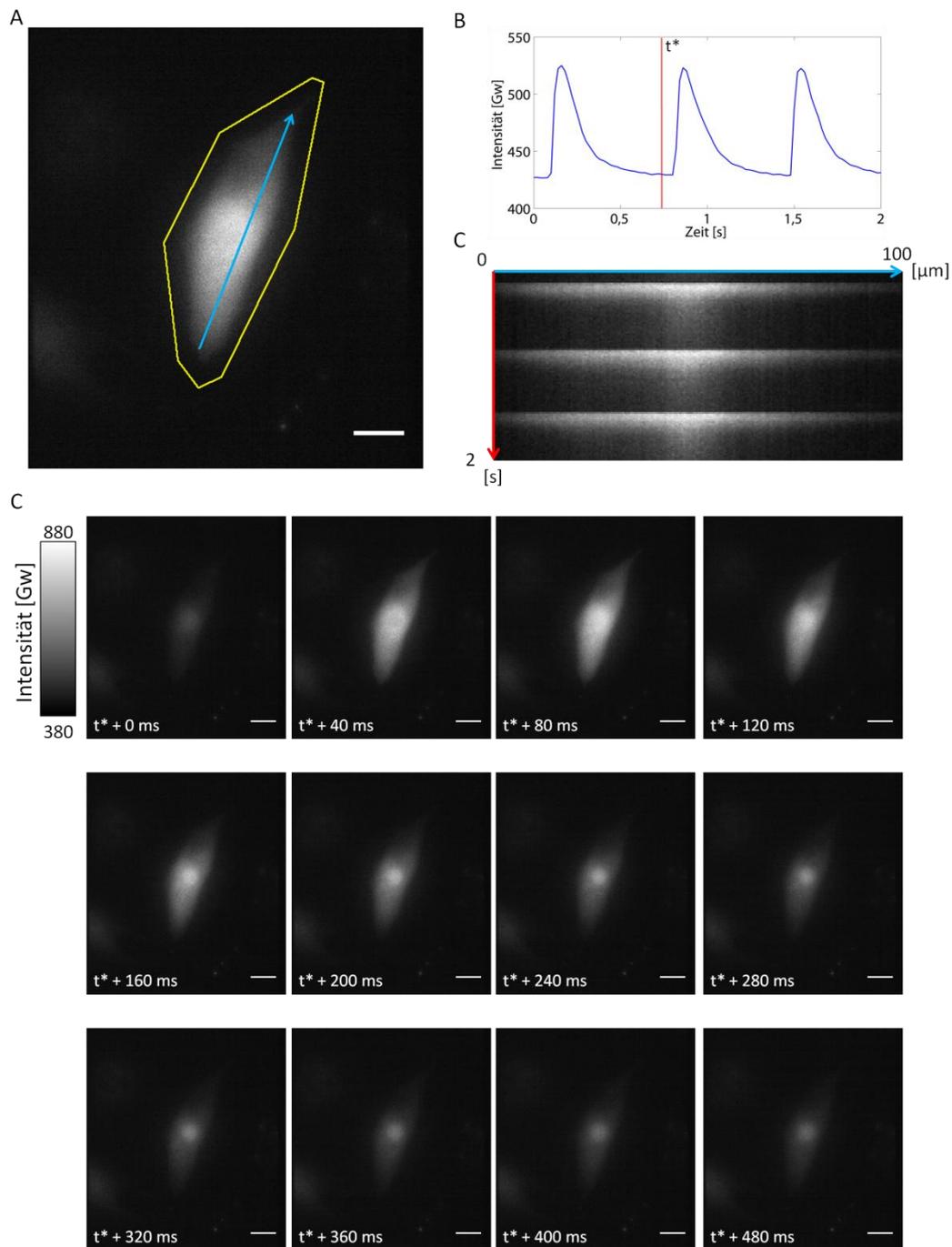


Abbildung 3-20: Homogenes raumzeitliches Kalzium-Signal. (A) Dargestellt ist die räumliche Kalzium-Intensität einer Zelle zum Zeitpunkt einer Kontraktion. Aus dem Messfeld (gelbe Umrandung) wurde die mittlere Kalzium-Intensität der Zelle bestimmt. (B) Zeitliches Kalzium-Signal der gesamten Zelle: Das Kalzium-Signal der Zelle zeigt einen schnellen Intensitätsanstieg sowie eine langsam abfallenden Flanke. (C) Linienintensitätsprofil über den in B dargestellten Zeitraum. Das Intensitätsprofil wurde entlang des blauen Pfeils in A ermittelt. (D) Ausgehend vom Zeitpunkt t^* ist das raumzeitlich aufgelöste Kalzium-Signal in Zeitschritten von 40 ms dargestellt. Die Intensitäten entsprechen den Grauwerten [Gw] der Original-Aufnahme. Der Maßstab beträgt für alle Bilder 20 μm .

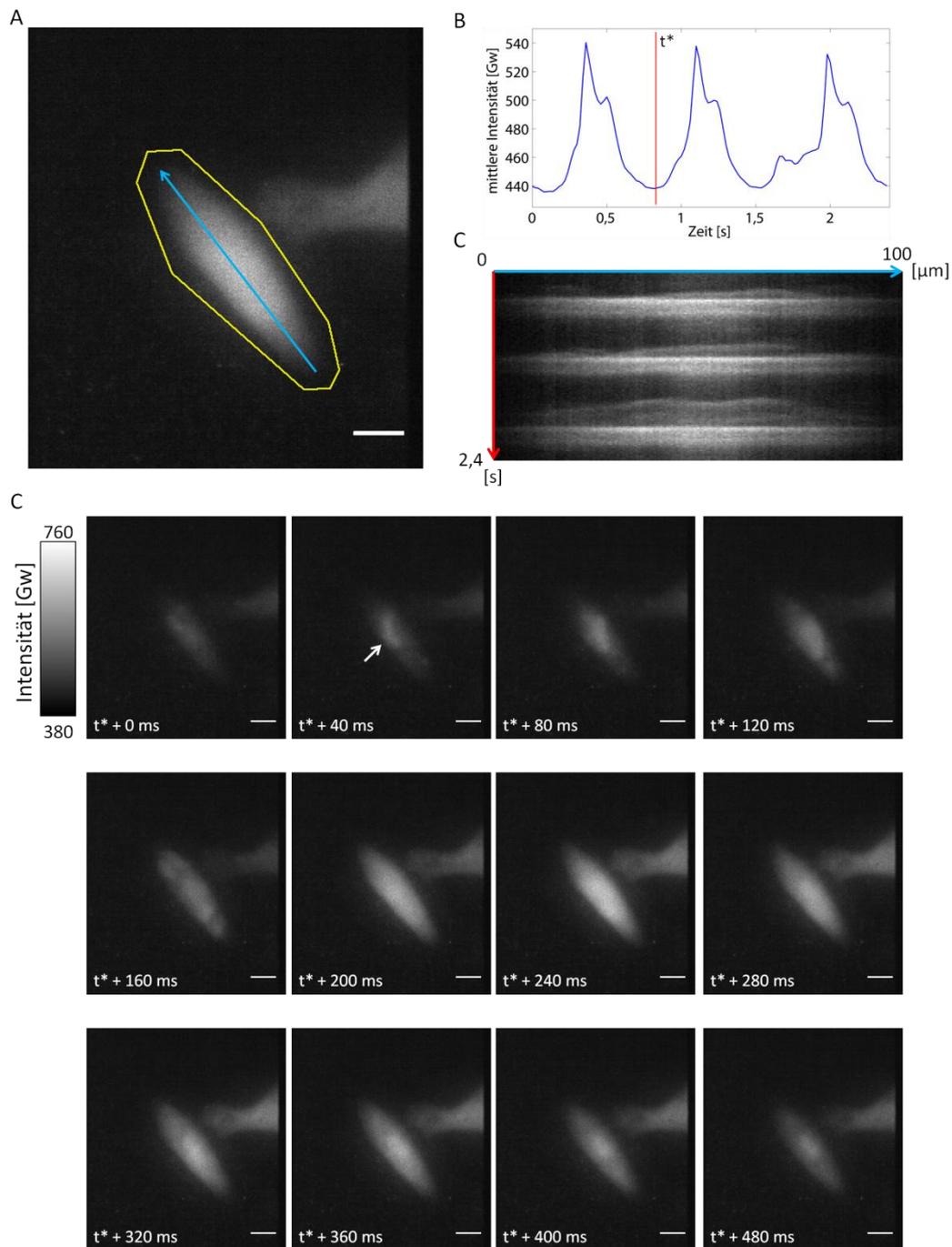


Abbildung 3-21: Heterogenes raumzeitliches Kalzium-Signal. (A) Dargestellt ist die räumliche Kalzium-Intensität einer Zelle zum Zeitpunkt einer Kontraktion. Aus dem Messfeld (gelbe Umrandung) wurde die mittlere Kalzium-Intensität der Zelle bestimmt. (B) Zeitliches Kalzium-Signal der gesamten Zelle: Das Kalzium-Signal der Zelle zeigt einen verlangsamten Intensitätsanstieg sowie Nebenmaxima in der abfallenden Flanke. (C) Linienintensitätsprofil über den in B dargestellten Zeitraum. Das Intensitätsprofil wurde entlang des blauen Pfeils in A ermittelt. (D) Ausgehend vom Zeitpunkt t^* ist das raumzeitlich aufgelöste Kalzium-Signal in Zeitschritten von 40 ms dargestellt. Der weiße Pfeil deutet einen lokalen Anstieg der Kalzium-Intensität an, welcher sich in den folgenden Zeitschritten räumlich ausbreitet. Die Intensitäten entsprechen den Grauwerten [Gw] der Original-Aufnahme. Der Maßstab beträgt für alle Bilder 20 μm .

3.2.4 Quantifizierung der Substratdeformation

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an pränatalen, kardialen Myozyten sollten die von den Zellen ausgeübten Substratdeformationen als Maß der Zellkontraktion bestimmt werden. In den hier durchgeführten Untersuchungen war die raumzeitliche Detektion der Substratdeformation von vorrangiger Bedeutung, nicht jedoch deren absolute Amplitude. Für die Bestimmung von Substratdeformationen existierte im Institut bereits das Programm *Zellkraft-Analyse* (Merkel et al. 2007; Cesa et al. 2007). Dieses Programm bestimmt Substratdeformationen mit hoher, räumlicher Genauigkeit und berechnet hieraus eine Abschätzung der aufgebrachten Kräfte. Aufgrund des hohen Rechenaufwandes für die Deformationsbestimmung und Kraftabschätzung war dieses Programm für die Auswertungen der in dieser Arbeit erzeugten, großen Datensätze jedoch nur bedingt geeignet. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit das Programm *Struktur-Verschiebungsanalyse* erstellt, welches den Rechenaufwand gegenüber der *Zellkraft-Analyse* verringern sollte (siehe Abschnitt 2.5.2)¹. Im Folgenden werden die beiden Programme sowie deren erzielbaren Ergebnisse für die Bestimmung von Substratdeformationen anhand eines repräsentativen Beispiels miteinander verglichen.

Die *Struktur-Verschiebungsanalyse* bedient sich desselben Algorithmus zur subpixelgenauen Kreuzkorrelation von Bildausschnitten (Schablonen) wie auch die *Zellkraft-Analyse* (siehe Abschnitt 2.5.2). Der Hauptunterschied der beiden Programme liegt hierbei in der Wahl der Größe und Position der für die Korrelation verwendeten Schablonen (Abbildung 3-22). Bei der *Zellkraft-Analyse* wird die Position jeder detektierbaren Kugel (1500 bis 5000 pro Messung) mit einer kleinen Schablone (hier Kantenlänge: $< 5 \mu\text{m}$) über die Zeit verfolgt. Die Verteilungsdichte der Kugeln in der Aufnahme bestimmt hierbei die räumliche Auflösung der später ermittelten lokalen Verschiebungen. Bei der *Struktur-Verschiebungsanalyse* werden dagegen große, überlappende Schablonen mit einem fest definierten und für alle Messungen konstant gehaltenen Abstand erstellt (Gitterkonstante: $6,5 \mu\text{m}$; Kantenlänge der Schablonen: $13 \mu\text{m}$; siehe Abschnitt 2.5.2). Bei der *Struktur-Verschiebungsanalyse* werden somit die Verschiebungen größerer Strukturen innerhalb einer Schablone ermittelt (Abbildung 3-22).

In beiden oben genannten Fällen lassen sich aus den Verschiebungen aller Schablonen eines Bildes (Vektorfelder), die orts aufgelösten Verschiebungsstärken bestimmen. Aus dem

¹ Dieses Programm entstand in Zusammenarbeit mit Georg Dreißen und Dr. Ronald Springer (ICS-7: Biomechanik; Forschungszentrum Jülich GmbH)

Mittelwert aller lokalen Verschiebungsstärken in einem Bereich ergibt sich die Substratdeformation für den jeweiligen Zeitpunkt einer Bildserie (Abbildung 3-23).

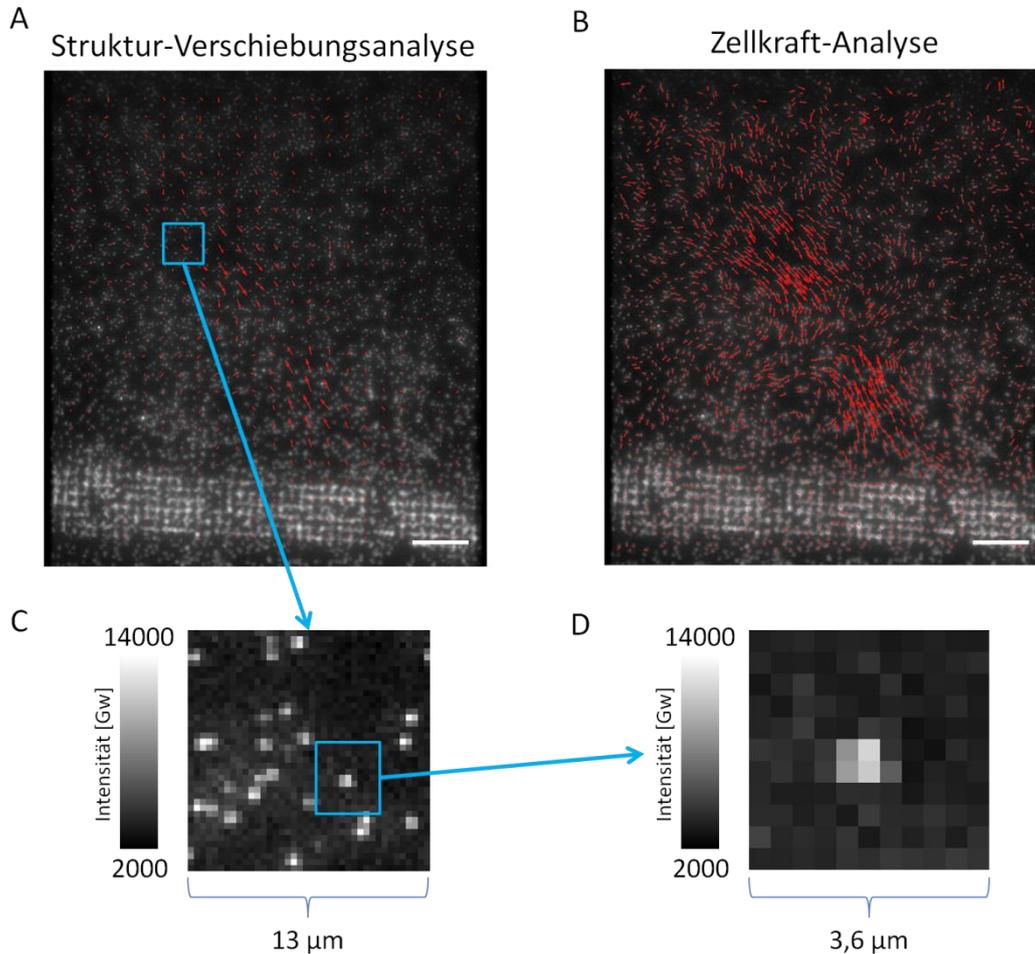


Abbildung 3-22: Vergleich der Vektorfeld-Generierung beider Methoden. (A-B) Dargestellt ist das strukturierte, elastische Substrat (Graustufen-Darstellung) und die mit beiden Methoden ermittelten Vektorfelder (rote Pfeile; Vergrößerungsfaktor 50). (A) Vektorfeld der *Struktur-Verschiebungsanalyse*, basierend auf Gitterpositionen. (B) Vektorfeld der *Zellkraft-Analyse*, basierend auf Kugelpositionen. Maßstab für A und B beträgt 20 μm . (C und D) Repräsentative Schablonen der beiden Methoden. Die Schablonen wurden vergrößert aus dem jeweiligen blauen Quadrat. Die Darstellung von C und D entspricht den Grauwerten [Gw] der Original-Aufnahme.

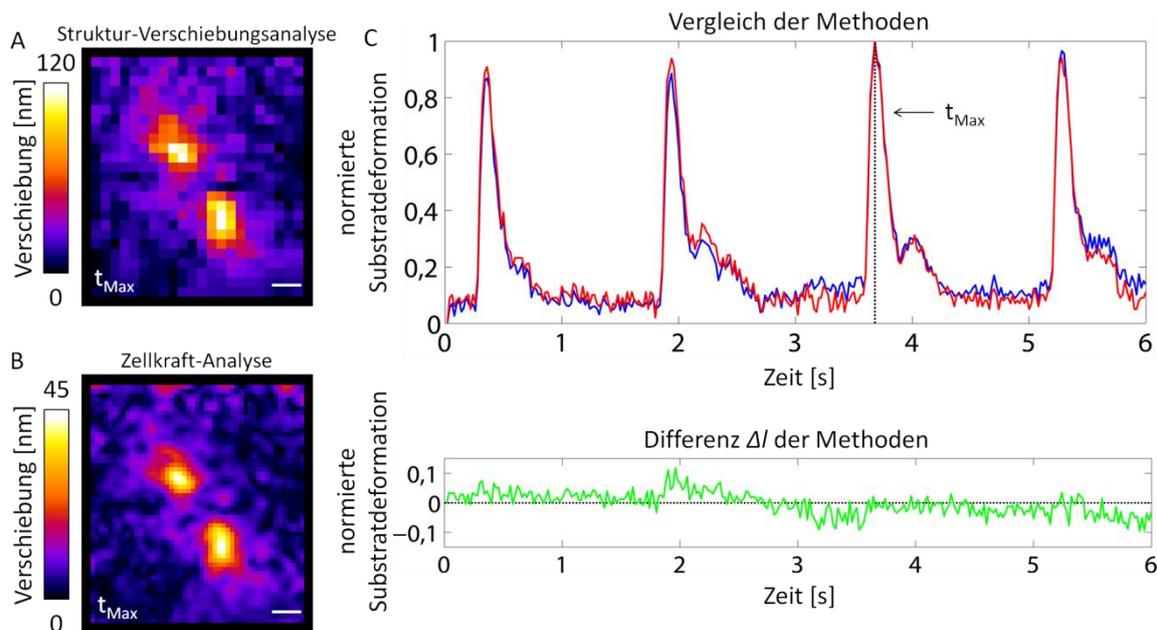


Abbildung 3-23: Vergleich der beiden Methoden zur Bestimmung der Substratdeformation. (A) zeigt die räumlich aufgelösten Verschiebungsstärken aus dem für diese Arbeit erstellten Programm *Struktur-Verschiebungsanalyse* zum Zeitpunkt der maximalen Zell-Kontraktion (t_{Max}). (B) zeigt das Resultat aus der, im Institut bereits etablierten, *Zellkraft-Analyse* zum selben Zeitpunkt. (C) zeigt den Vergleich der normierten¹ Substratdeformationen aus beiden Methoden über den Zeitraum der Messung (blau: *Struktur-Verschiebungsanalyse*; rot: *Zellkraft-Analyse*; grün: Differenz der normierten Deformationen zwischen beiden Methoden). Die Substratdeformation ergibt sich hierbei aus dem Mittelwert aller lokalen Verschiebungsamplituden. Der Maßstab für A und B entspricht 20 μm .

Die Abbildung 3-23 zeigt die ermittelten Substratdeformationen aus beiden Methoden im direkten Vergleich. Zum dargestellten Zeitpunkt t_{Max} erhält man mit beiden Methoden eine vergleichbare räumliche Substratdeformation (Abbildung 3-23 A-B). Im Gegensatz zur *Zellkraft-Analyse* ergibt sich aus der *Struktur-Verschiebungsanalyse* jedoch eine geringere räumliche Auflösung. So erhält man bei der *Struktur-Verschiebungsanalyse* immer eine Auflösung von 22 x 25 Gitterpunkten (entspricht 550 Schablonen); für die *Zellkraft-Analyse* ergeben sich für den hier verwendeten Datensatz 51 x 57 Gitterpunkte (errechnet aus 2608 Kugeln).

Neben den Unterschieden in der räumlichen Auflösung, liefern beide Methoden zudem unterschiedliche absolute Werte für die lokalen Verschiebungsstärken im Bild. So liegt der maximale Wert der Verschiebung bei der *Struktur-Verschiebungsanalyse* zum dargestellten Zeitpunkt t_{Max} bei etwa 120 nm, bei der *Zellkraft-Analyse* liegt er dagegen bei etwa 45 nm. Vergleicht man jedoch die normierten¹ Substratdeformationen (über das Bild gemittelte Verschiebungsstärken) über die Zeit, so ergeben sich für beide Verfahren nahezu identische

¹ Normiert auf den niedrigsten und höchsten Wert der Substratdeformation über den Zeitraum der Beobachtung.

relative Werte (Abbildung 3-23 C). Die Differenz Δl der normierten Substratdeformation zwischen beiden Methoden lag beim dargestellten Datensatz über die Zeitserie von 300 Bildern (entspricht 6 Sekunden) bei durchschnittlich -0,22% ($\sigma = 3.75\%$).

Die geringe Anzahl an Schablonen führte im Fall der *Struktur-Verschiebungsanalyse* bereits zu einer verkürzten Laufzeit des Programms. Zudem konnte hier die Berechnung mehrerer Schablonen parallel erfolgen (das Programm verwendete gleichzeitig mehrere Prozessorkerne). Zusätzlich wurde bei der *Struktur-Verschiebungsanalyse* auf die rechenaufwändigen Routinen zur Kraftabschätzung verzichtet, da sie für die Untersuchungen in dieser Arbeit nicht benötigt wurden. Hierdurch konnte der Zeitaufwand für die Bestimmung der Substratdeformation mit der *Struktur-Verschiebungsanalyse* deutlich reduziert werden. So lag die Laufzeit für die 300 Bilder der in Abbildung 3-23 dargestellten Auswertung beim Programm *Zellkraft-Analyse*^{1,2} bei etwa 270 Minuten, beim Programm *Struktur-Verschiebungsanalyse*² lag sie bei etwa 10 Minuten. Aufgrund der vergleichbaren relativen Substratdeformationen und der deutlich geringeren Programm-Laufzeit wurde für die weiteren Experimente in dieser Arbeit daher die *Struktur-Verschiebungsanalyse* für die Deformationsanalysen verwendet.

¹ Parameter für die *Zellkraft-Analyse*:

Korrelationskoeffizient = 0.8; Schablonen-Größe = $(3,6 \mu\text{m})^2$; Suchfenster = $1,6 \mu\text{m}$

² Beide Auswertungen erfolgten unter gleichen Hardware- und Software-Bedingungen.

3.2.5 Bestimmung des zeitlichen Versatzes zwischen Kalzium-Signal und Zellkontraktion in pränatalen, kardialen Myozyten

Einer der zentralen Themenschwerpunkte dieser Arbeit war die Analyse der zeitlichen Aufeinanderfolge von Kalzium-Signalen und der daraus resultierenden Substratdeformation (als Maß der Zellkontraktion). Hierzu musste der genaue Zeitpunkt der einzelnen Signale zuverlässig ermittelt werden. Für die spätere Detektion musste dieser Zeitpunkt jedoch zunächst definiert werden. Im Gegensatz zu anderen möglichen Definitionen, wie das Maximum oder die Mitte eines Signals, stellte die ansteigende Flanke des Signals für die hier untersuchten Daten ein zuverlässiges Maß für die zeitliche Detektion dar, da sie deutlich weniger durch Variationen der Signal-Form (3.2.2) oder durch das Signal-Rauschverhältnis der Aufnahmen beeinflusst wurde. Als Referenzpunkt für diese ansteigende Flanke wurde der Zeitpunkt gewählt, an dem das Signal 50% seines Maximalwertes erreichte. Dieser Zeitpunkt wurde für jedes Signal einer Aufnahme wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben über mehrere Schritte automatisch bestimmt. Mittels linearer Interpolation erfolgte die Bestimmung zudem mit einer Genauigkeit unterhalb der Aufnahmerate von 20 ms (vgl. siehe Abschnitt 2.5.3). Aus den Zeitpunkten der einzelnen Flanken konnte der zeitliche Versatz Δt zwischen Kalzium-Signalen und der resultierenden Substratdeformation berechnet werden. Im Folgenden wird der zeitliche Versatz als Mittelwert aus allen untersuchten Signalen einer Messung angegeben. Die Standardabweichung σ aus den Signalen dient zudem als Maß der Streuung.

Die Abbildung 3-24 A zeigt die Bestimmung des zeitlichen Versatzes Δt zwischen Kalzium-Signal (grün) und Substratdeformation (rot) an einem Beispiel. Das Signal-Rauschverhältnis der in dieser Messung ermittelten Substratdeformation war sehr gering (es wurden nur Messungen ausgewertet, die mindestens ein solches Signal-Rauschverhältnis aufwiesen). Neben den normierten Signalverläufen aus den Original-Daten zeigt die Abbildung 3-24 auch eine Überlagerung aller 15 Signale. Aus der Bestimmung für alle 15 Signale ergab sich für diese Messung ein durchschnittlicher zeitlicher Versatz von 37 ms ($\sigma = 5$ ms).

Zur Validierung der durch diese Methode ermittelten Werte wurde die Analyse auch an synthetisch generierten Datensätzen mit bekannten Δt durchgeführt. Die Abbildung 3-24 B zeigt die Auswertung eines solchen synthetisch generierten Datensatzes mit einem festgelegten zeitlichen Versatz von 35 ms. Das Signal-Rauschverhältnis wurde so gewählt, dass es etwa dem des zuvor beschriebenen Original-Datensatzes entsprach. Die Auswertung ergab für diesen synthetischen Datensatz ein Δt von 35 ms ($\sigma = 6$ ms). Bei einem

synthetischen Datensatz (nicht dargestellt) mit einem vorgegebenen Versatz von 150 ms ergab sich bei der Auswertung von 9 Signalen ein Δt von 151 ms ($\sigma = 4$ ms). Die Streuung von Δt beider synthetischer Datensätze liegt im selben Größenbereich. Sie ist somit unabhängig vom ermittelten Δt . Weitere Tests mit synthetischen Daten (nicht dargestellt) zeigten zudem, dass diese Streuung durch eine höhere Anzahl an analysierten Signalen, vor allem aber durch ein höheres Signal-Rauschverhältnis, verringert werden konnte. Somit handelt es sich hierbei um einen, von der Qualität des Signals abhängigen, statistischen Fehler, der dem gesamten Mess-System aufliegt.

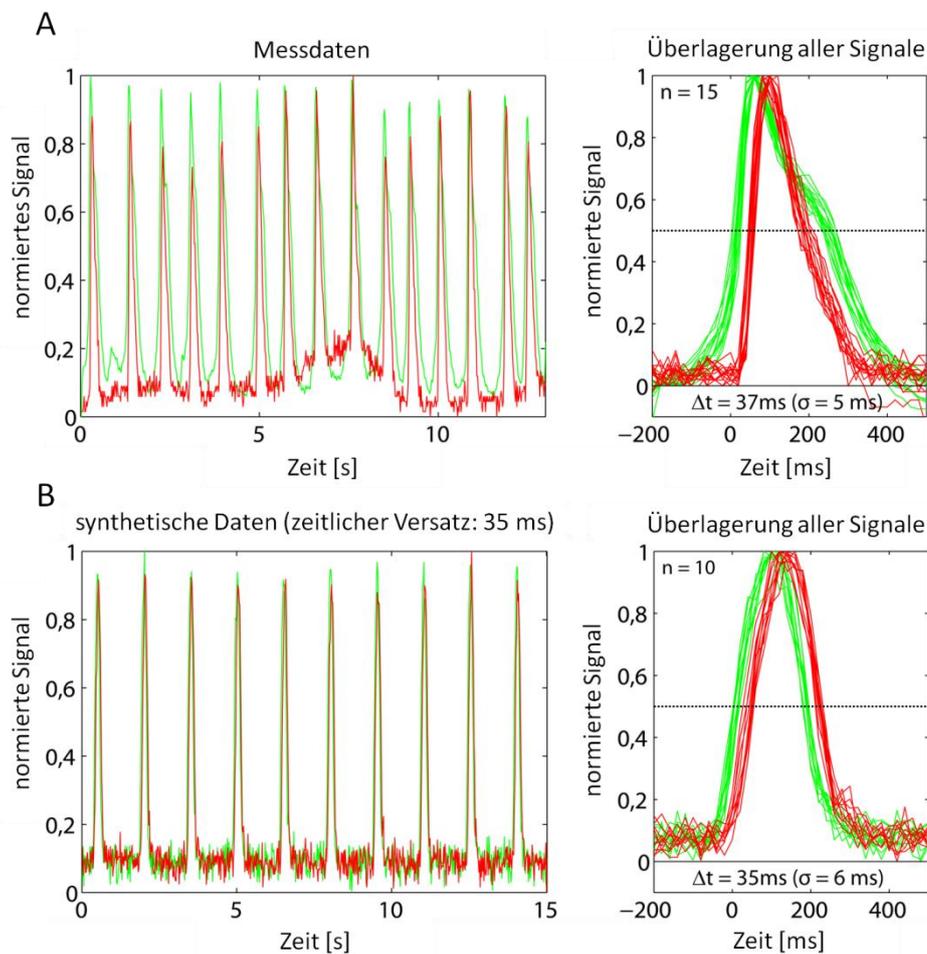


Abbildung 3-24: Automatische Bestimmung des zeitlichen Versatz Δt zwischen Kalzium-Signal und Substratdeformation aus Messdaten (A) sowie synthetisch erzeugten Daten mit vergleichbarem Signal-Rauschverhältnis (B). Die linken Graphen zeigen jeweils die Kalzium-Signale (grün) und Deformationsamplituden (rot) über den gesamten Beobachtungszeitraum. Die mittleren Graphen zeigen die zeitliche Überlagerung aller analysierten Signale (Original-Daten: $n = 15$; synthetische Daten: $n = 10$) sowie den mittleren zeitlichen Versatz.

3.2.6 Zeitlicher Versatz zwischen Kalzium-Signal und Substratdeformation in Abhängigkeit der Zellzahl

Mit der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Methode (siehe auch Abschnitt 2.5.3) wurde der zeitliche Versatz Δt aus insgesamt 46 Zeitserien (n) bestimmt. Hierbei wurden die Messungen in Einzelzellen ($n = 23$) sowie kleineren Zellverbänden von 2-3 Zellen ($n = 15$) bzw. 4-7 Zellen ($n = 8$) unterteilt. Die genaue Anzahl an Zellen innerhalb der Messung wurde anhand einer anschließenden Färbung des Zellkerns ermittelt (siehe Abschnitt 2.3.1). Die zeitlichen Versätze von Einzelzellen bzw. Zellverbänden sind in Abbildung 3-25 zusammengefasst.

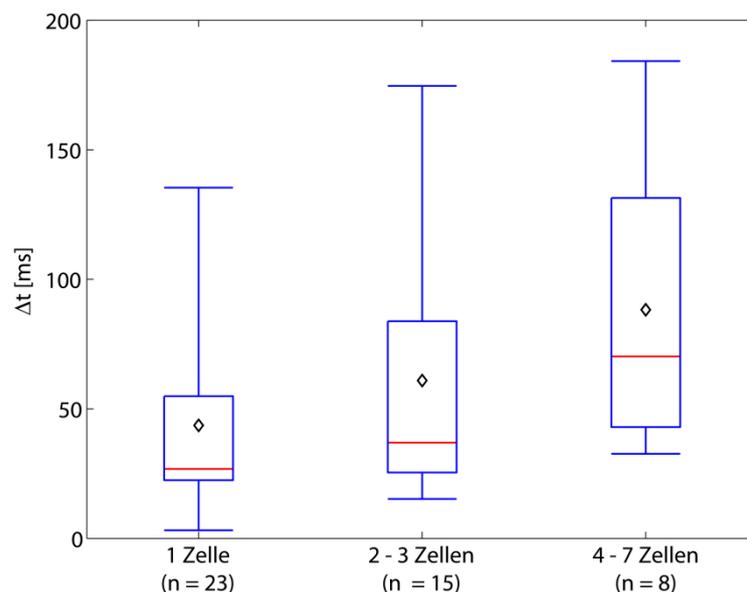


Abbildung 3-25: Zeitlicher Versatz zwischen Kalzium-Signalen und Substratdeformation in Abhängigkeit der Anzahl zusammenhängender Zellen, dargestellt als Boxplot-Diagramm. Die Messungen wurden unterteilt in Einzelzellen ($n = 23$), Zellverbänden von 2 bis 3 Zellen ($n = 15$) und Zellverbänden von 4 bis 7 Zellen ($n = 8$). Die blauen, horizontalen Linien entsprechen den Extremwerten sowie den 25%- bzw. 75%-Quartilen. Der Median der ermittelten Δt -Werte ist als rote Linie dargestellt, der Mittelwert als schwarze Raute.

Mit einem Median von 27 ms (Mittelwert: 44 ms; $\sigma = 27$ ms) liegt der zeitliche Versatz von Einzelzellen unterhalb dem der Zellverbände. Zellverbände aus 2-3 Zellen wiesen einen Median von 37 ms (Mittelwert: 61 ms; $\sigma = 52$ ms) auf. Der Median der Zellverbände aus 4-7 Zellen lag mit 70 ms (Mittelwert: 88 ms; $\sigma = 55$ ms) nochmals höher als die der anderen Klassen. Es zeichnet sich somit ein Trend zu höheren Δt -Werten bei höherer Anzahl an Zellen im Verband ab. Zu beachten ist jedoch, dass die Verteilung der Zellverbände aus 4-7 Zellen mit nur 8 Messungen eine deutlich geringere Statistik als die anderen Verteilungen aufweist.

Die beschriebenen Unterschiede können somit auch auf diese geringe Anzahl an Experimenten zurückzuführen sein.

Insgesamt weisen die Messungen aller drei Klassen eine sehr große Streuung auf. Zudem zeigen die Unterschiede zwischen Median und Mittelwert klar, dass dieser Streuung keine Normalverteilung zugrunde liegt, was einen statistischen Vergleich kleiner Δt -Unterschiede gerade bei einer so geringen Anzahl an Experimenten erschwert.

3.2.7 Zeitlicher Versatz zwischen Kalzium-Signal und Zellkontraktion in Abhängigkeit der Kontraktionshäufigkeit

Im Folgenden wird der Zusammenhang zwischen Kontraktionshäufigkeit f_F der Zelle und der jeweils ermittelten Werte des erreichten zeitlichen Versatzes untersucht. Die Abbildung 3-26 zeigt die ermittelten Werte für Δt aufgetragen in Abhängigkeit von f_F der jeweiligen Zelle (blau) bzw. des jeweiligen Zellverbandes (2-3 Zellen: grün; 4-7 Zellen: rot).

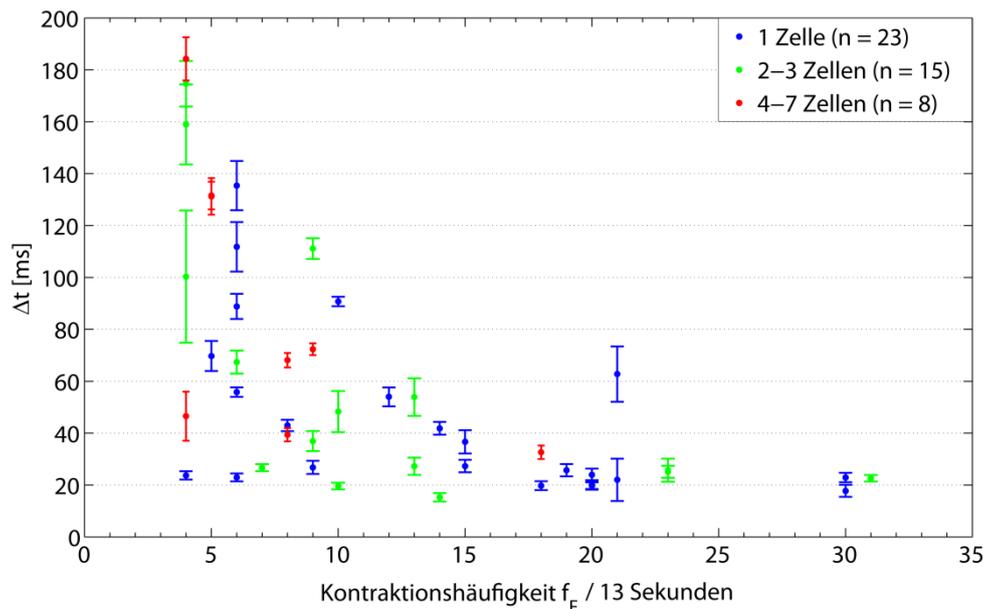


Abbildung 3-26: Zusammenhang zwischen der Kontraktionshäufigkeit und dem zeitlichen Versatz Δt zwischen Kalzium-Signalen und Substratdeformation. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der einzelnen Δt -Werte jeder Messung.

Fasst man alle Messungen zusammen, so liegt der Median aller Kontraktionshäufigkeiten bei 9,5 Kontraktionen innerhalb der 13 Sekunden Messzeit (entspricht 0,73 Hz)¹. Zudem liegen 50 % der ermittelten Δt -Werte zwischen 15 und 40 ms. Der zeitliche Versatz Δt der restlichen Messungen streut dagegen über einen Bereich von 40 bis 195 ms. Die hohen Δt -Werte werden fast ausschließlich von langsam kontrahierenden Einzelzellen bzw. Zellverbänden unterhalb von 10 Schlägen in 13 Sekunden (0,77 Hz) erreicht. Zellen und Zellverbände mit einer höheren Kontraktionshäufigkeit zeigen einen tendenziell niedrigeren zeitlichen Versatz mit einer geringeren Streuung. Es zeigt sich somit eine Abhängigkeit zwischen Δt und f_F . Eine Ausnahme stellen hier die beiden Messungen an Einzelzellen mit einer

¹ Für die Messungen wurden möglichst regelmäßig schlagende Myozyten ausgewählt, hierdurch kam es zu einer gewissen Selektion. Zellen mit weniger als 4 Schlägen innerhalb der 13 Sekunden wurden entweder von vornherein nicht untersucht oder ließen sich nicht auswerten.

Kontraktionshäufigkeit von 1,62 Hz (21 Schläge in 13 Sekunden) dar. Auf diese beiden Zellen wird im Abschnitt 3.2.10 näher eingegangen.

3.2.8 Zellmorphologie und die Kalzium-Kontraktionskopplung

In dieser Arbeit sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Zellmorphologie, Zytoskelett-Organisation und der zeitlichen Abfolge zwischen Kalzium-Signalen und Substratdeformationen bei der elektromechanischen Kopplung näher betrachtet werden. Die hier dargestellten Untersuchungen bezogen sich dabei ausschließlich auf Einzelzellen. Zur Analyse der Zellmorphologie sowie der Sarkomerstruktur wurden die Zellen im Anschluss an die Messungen, wie im Abschnitt 2.3.2 beschrieben, fixiert und angefärbt. Die Abbildungen in diesem Abschnitt zeigen zum einen die Zelle mit markierten Sarkomerstrukturen (angefärbt wurde α -Aktinin) und Zellkern (DAPI-Färbung). Zum anderen ist die Überlagerung aller detektierten Signale (Kalzium und Deformation) sowie der hieraus ermittelte zeitliche Versatz grafisch dargestellt. Basierend auf den vorangegangenen Analysen (siehe Abschnitt 3.2.7) wurden die im Folgenden dargestellten Zellen gemäß ihrer Kontraktionshäufigkeit f_F und den erreichten zeitlichen Versatz Δt unterteilt in:

- (1) Zellen mit gleicher Kontraktionshäufigkeit, jedoch unterschiedlichem zeitlichen Versatz ($f_F = 6$ Schläge in 13 Sekunden = 0,46 Hz; vgl. Abbildung 3-26).
- (2) Zellen mit einem ähnlich niedrigen zeitlichen Versatz ($\Delta t = 15 - 40$ ms), jedoch unterschiedlichen Kontraktionshäufigkeiten (vgl. Abbildung 3-26).

3.2.8.1 Zellen mit gleicher Kontraktionshäufigkeit ($f_F = 6$ Schläge in 13 Sekunden)

Die Abbildung 3-27 zeigt eine Zelle mit einem hohen zeitlichen Versatz ($\Delta t = 135$ ms; $\sigma = 10$ ms). Dies war der höchste gemessene Δt -Wert für Einzelzellen. Die Zelle ist relativ klein und zeigt eine gut ausgeprägte, regelmäßige Sarkomerstruktur. Die Grundform der Zelle ist oval, jedoch besitzt die Zelle einen deutlichen, seitlichen Ausläufer, in den auch die Myofibrillen ragen. Die Zelle ist somit dreieckig aufgespannt. Das Kalzium-Signal steigt rasch an, und bleibt über einen langen Zeitraum auf einem hohen Wert. Auch der Abfall des Signals verläuft langsam. Die Deformation steigt bereits kurz nach dem Kalzium-Signal an. Dieser Anstieg ist jedoch wesentlich flacher als der des Kalzium-Signals. Der Abfall der Deformation verläuft dagegen schneller als der des Kalzium-Signals.

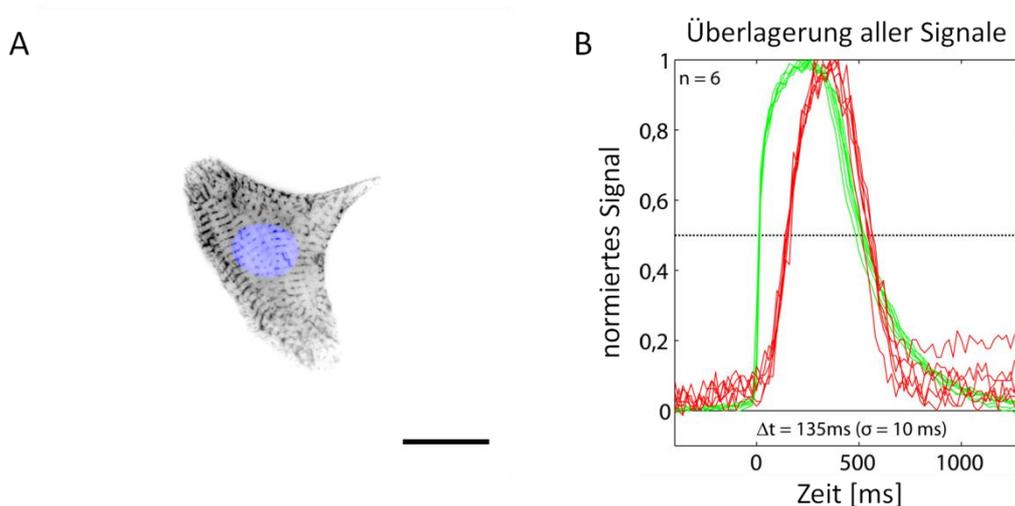


Abbildung 3-27: Zellmorphologie und Signal-Form bei gleicher Kontraktionshäufigkeit von 0,46 Hz. (A) Morphologie und Sarkomer-Organisation einer Einzelzelle. Anfärbt wurden die Sarkomere (α -Aktinin) sowie der Zellkern. Zur besseren Visualisierung sind die Sarkomere invers und kontrastverstärkt dargestellt (schwarz). Der Zellkern ist blau eingefärbt. Der Maßstab beträgt $20\ \mu\text{m}$. (B) Überlagerung der normierten Kalzium-Signale (grün) und Substratdeformationen (rot). Die schwarze, gepunktete Linie entspricht dem 50%-Wert des Signals. Der zeitliche Versatz zwischen Kalzium-Signal und Substratdeformation beträgt 135 ms ($\sigma = 10\text{ ms}$; $n = 6$).

Die Abbildung 3-28 zeigt ebenfalls eine Zelle mit einer Kontraktionshäufigkeit von 6 Schlägen in 13 Sekunden. Der zeitliche Versatz liegt mit 89 ms ($\sigma = 5$ ms) niedriger als bei der zuvor beschriebenen Zelle. Die Zelle besitzt eine dreieckig aufgespannte Form. Die Sarkomerstruktur ist zu erkennen, jedoch nicht so regelmäßig ausgeprägt wie bei der Zelle zuvor (Abbildung 3-27). Die Myofibrillen verlaufen ungefähr parallel zu den Zellrändern. In der Zelle sind zudem Regionen mit einer hohen Anreicherung an α -Aktinin zu erkennen. Unmittelbar neben diesen Regionen befinden sich schwach ausgeprägte, längliche Strukturen aus α -Aktinin. Bei den länglichen Strukturen kann es sich um Stressfasern handeln, jedoch kann eine Zerstörung der Zytoskelett-Struktur und somit eine Artefaktbildung durch die Färbung hier nicht komplett ausgeschlossen werden. Das Kalzium-Signal dieser Zelle ist dem der zuvor beschriebenen Zelle sehr ähnlich. Allerdings weist die Zelle zunächst einen langsamen Anstieg des Kalzium-Signals auf. Die Deformation steigt dagegen rasch an und ist insgesamt breiter als das Deformations-Signal der in Abbildung 3-27 dargestellten Zelle. Die Substratdeformation erreicht auch hier vor dem Kalzium-Signal ihren Grundzustand.

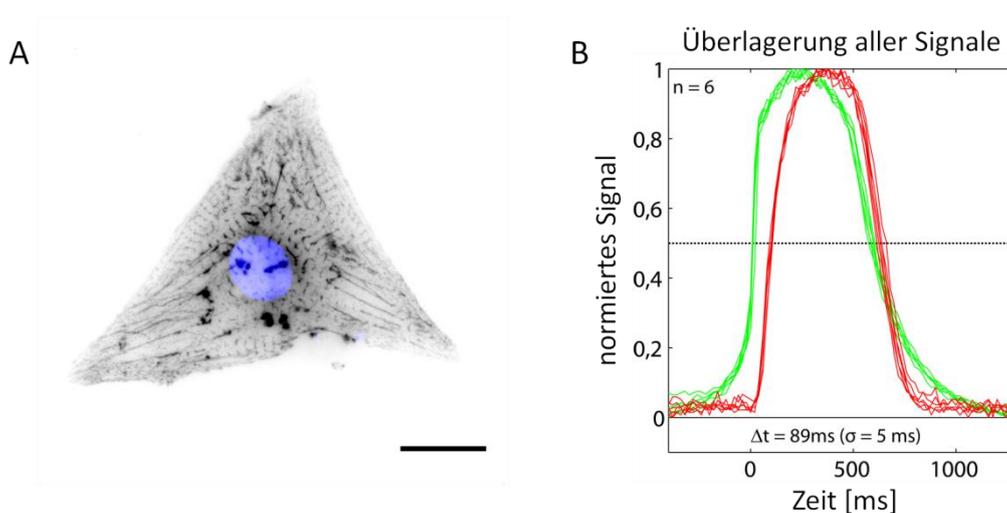


Abbildung 3-28: Zellmorphologie und Signal-Form bei gleicher Kontraktionshäufigkeit von 0,46 Hz. Darstellung wie in Abbildung 3-27.

Auch die Zelle in Abbildung 3-29 ist dreieckig aufgespannt und zeigt zudem eine sehr ausgeprägte, regelmäßige Sarkomerstruktur, parallel zu den Zellrändern. Der zeitliche Versatz dieser Zelle ist mit 56 ms ($\sigma = 2$ ms) deutlich niedriger als bei den beiden Zellen zuvor (Abbildung 3-27 und Abbildung 3-28). Auch diese Zelle besitzt ein breites Kalzium- und Deformations-Signal. Das Kalzium-Signal steigt zunächst langsam an und geht anschließend in einen raschen Anstieg über. Im Gegensatz zu den anderen beiden Zellen erreicht diese schnell ihr Maximum und fällt anschließend langsam aber stetig ab. Dennoch ähnelt die Deformation in ihrer Signalform der zuletzt beschriebenen Zelle (Abbildung 3-28).

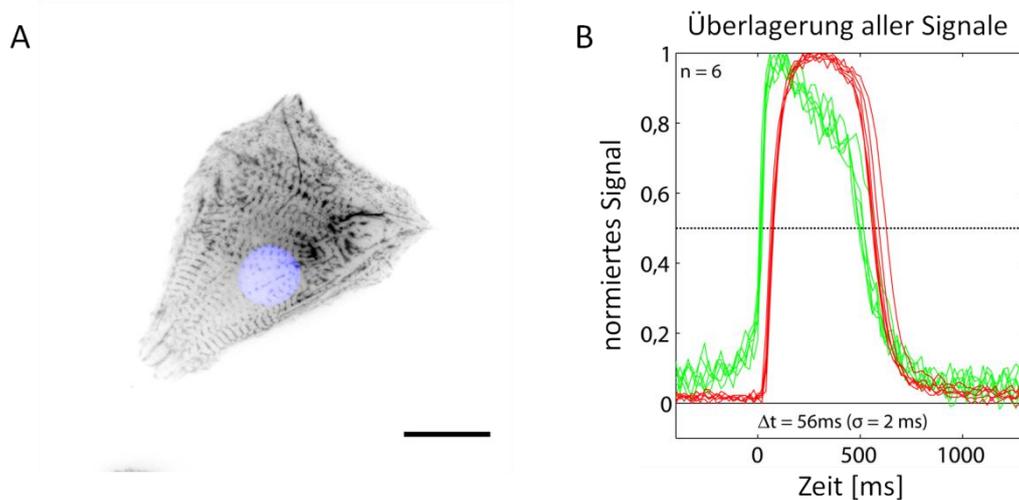


Abbildung 3-29: Zellmorphologie und Signal-Form bei gleicher Kontraktionshäufigkeit von 0,46 Hz. Darstellung wie in Abbildung 3-27.

Auffällig ist, dass die drei in diesem Abschnitt beschriebenen Zellen alle eine dreieckig aufgespannte Form aufweisen. Die Sarkomerstruktur ist bei allen Zellen regelmäßig und parallel zu den Zellrändern ausgerichtet, kann in ihrer Ausprägung jedoch variieren. Zusätzlich zeigen die Zellen mit etwa 600 ms tendenziell breite Kalzium- und Deformations-Signale.

3.2.8.2 Zellen mit einem zeitlichen Versatz im Bereich von 15 – 40 ms

Die Abbildung 3-30 zeigt eine kleine, leicht oval geformte Zelle. Die Sarkomerstruktur ist aufnahmebedingt nur schwach zu erkennen, jedoch regelmäßig geordnet. Auch hier verlaufen die kontraktile Bündel parallel entlang der Zellränder. Gegenüber den zuvor beschriebenen Zellen mit dreieckiger Form gibt es bei dieser Zelle jedoch nur eine Vorzugsrichtung der Bündel. Das Kalzium-Signal zeigt zunächst einen langsamen Anstieg sowie eine leicht ausgeprägte Schulter im abfallenden Bereich. Insgesamt ist das Signal jedoch schmäler als bei den zuvor beschriebenen Zellen.¹ Die Substratdeformation folgt dem Kalzium-Signal mit einem Versatz von 37 ms ($\sigma = 5$ ms). Sie zeigt einen steilen Anstieg und langsamen Abfall. Eine Schulter ist bei dem Deformations-Signal nicht vorhanden. Die Kontraktionshäufigkeit ist mit 15 Schlägen in 13 Sekunden (1,15 Hz) mehr als doppelt so hoch wie bei den zuvor beschriebenen Zellen und lag damit bereits über dem Durchschnitt aller gemessenen Zellen (Median = 9,5 Schläge in 13 Sekunden = 0,73 Hz).

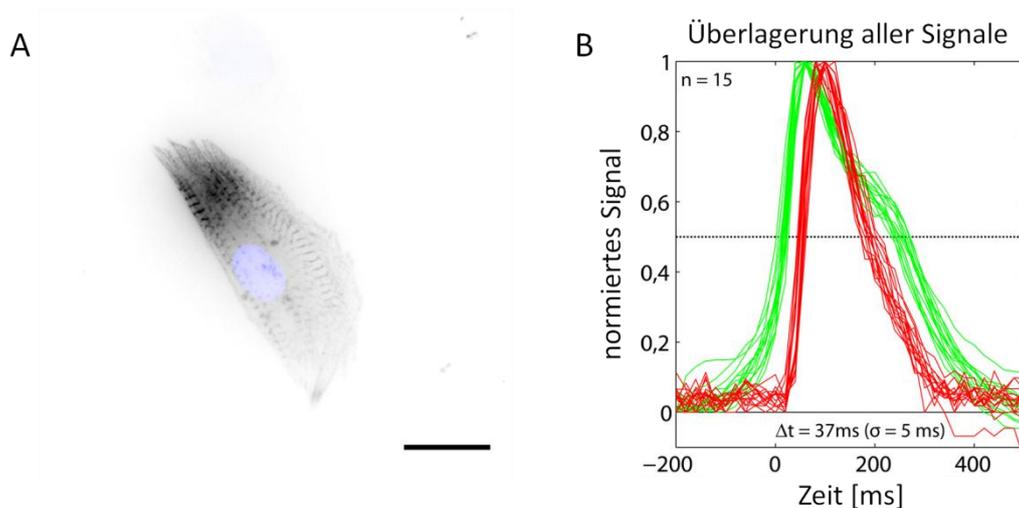


Abbildung 3-30: Zellmorphologie und Signal-Form bei einem zeitlichen Versatz von 15 – 40 ms. Darstellung wie in Abbildung 3-27.

Die Abbildung 3-31 zeigt eine große, längliche Zelle mit einer hoch-geordneten, parallelen Sarkomerstruktur. Die Kontraktionshäufigkeit lag mit 20 Schlägen in 13 Sekunden (1,54 Hz) ebenfalls deutlich über dem Durchschnitt. Alle 20 Kalzium-Signale besitzen eine sehr homogene, schmale Signalform. Das Kalzium-Signal zeigt einen steilen Anstieg und fällt langsam ab. Die Substratdeformation folgt mit einem Versatz von 20 ms ($\sigma = 2$ ms).

¹ Zu beachten ist die kleinere Achsen-Skalierung bei dieser und den folgenden Abbildungen

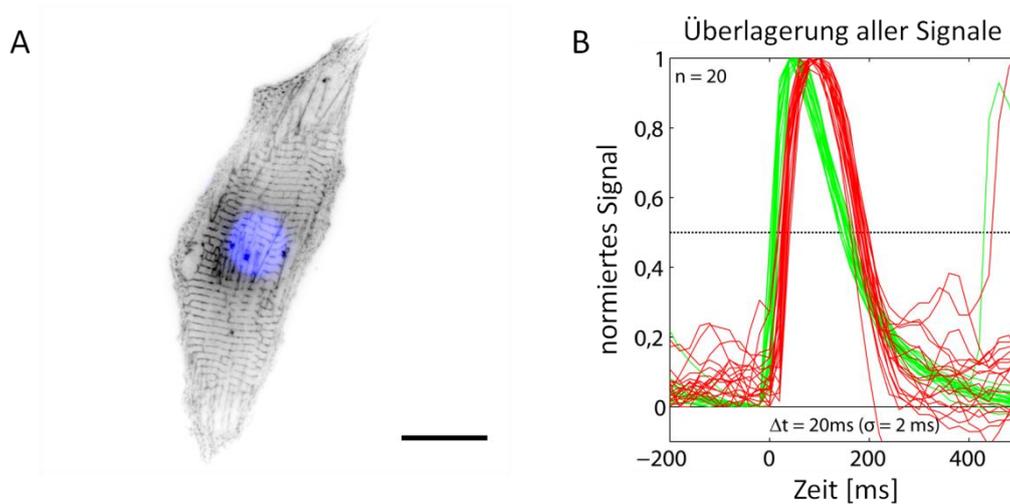


Abbildung 3-31: Zellmorphologie und Signal-Form bei einem zeitlichen Versatz von 15 – 40 ms. Darstellung wie in Abbildung 3-27.

Auch die in Abbildung 3-32 dargestellte Zelle zeigt eine längliche Form sowie eine sehr regelmäßige Sarkomerstruktur. Die gesamte Organisation ist hier zwar nicht so regelmäßig wie die bei der zuvor beschriebenen Zelle (Abbildung 3-31), dennoch sind die Myofibrillen parallel zueinander angeordnet. Mit 30 Schlägen in 13 Sekunden (2,31 Hz) erreicht diese Zelle eine der höchsten gemessenen Kontraktionshäufigkeiten. Sowohl das Kalzium-Signal als auch die Substratdeformation verlaufen über alle 30 Schläge sehr schnell und homogen. Im abfallenden Bereich weist das Kalzium-Signal jedoch eine schwache, variable Schulter auf.

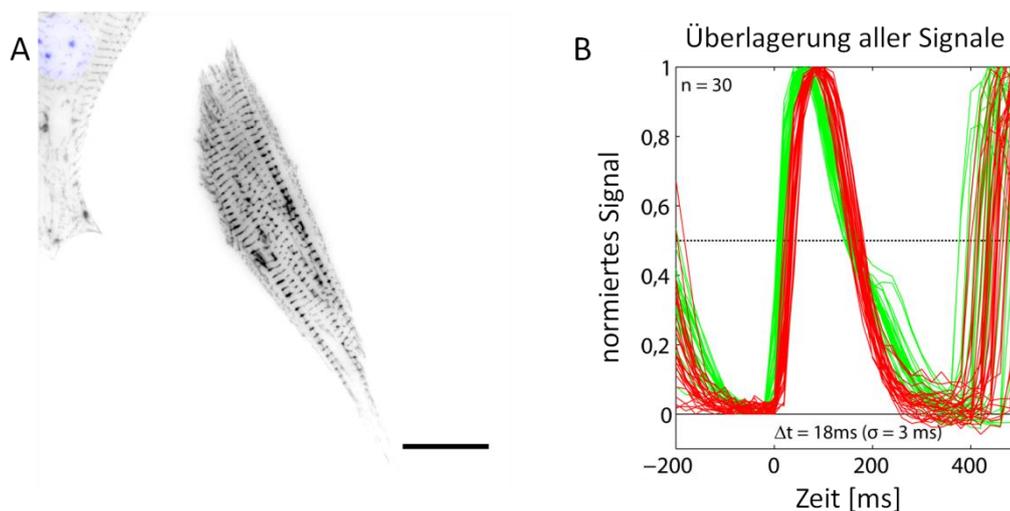


Abbildung 3-32: Zellmorphologie und Signal-Form bei einem zeitlichen Versatz von 15 – 40 ms. Darstellung wie in Abbildung 3-27. Der Zellkern der in der Mitte liegenden Myozyte ging bei der Präparation verloren.

Die drei in diesem Abschnitt beschriebenen Zellen besitzen alle eine eher oval bis längliche Form, eine sehr geordnete Sarkomerstruktur sowie parallel ausgerichtete Myofibrillen auf. Sie unterscheiden sich somit deutlich von den zuvor dargestellten Zellen mit eher dreieckiger Form. Zudem sind bei den hier beschriebenen Zellen sowohl die Kalzium-Signale als auch die Substratdeformation wesentlich schmaler (< 400 ms). Das Kalzium-Signal kann bei diesen Zellen untereinander leicht variieren (verlangsamter Anstieg, Ausprägung von Schultern), die Signalform der Substratdeformation ist bei allen drei Zellen jedoch sehr ähnlich.

3.2.9 Zytoskelett-Organisation und lokale Substratdeformation

In den vorherigen Abschnitten deutete sich ein Einfluss der Zellmorphologie auf die zeitliche Abfolge zwischen Kalzium-Signal und Substratdeformation an. Im folgenden Abschnitt wird daher an zwei Extrembeispielen näher auf den Einfluss der Zytoskelett-Organisation auf die räumliche Ausprägung der Substratdeformation eingegangen (Abbildung 3-33 und Abbildung 3-34).

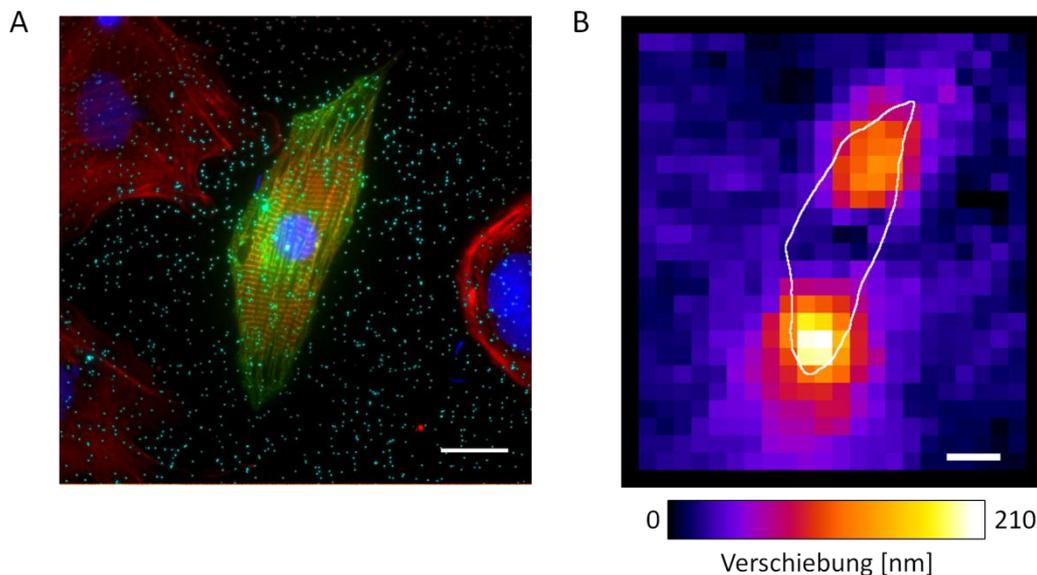


Abbildung 3-33: Zusammenhang zwischen Zytoskelett-Organisation und lokaler Substratdeformation. (A) Dargestellt ist eine Myozyte (mittlere Zelle) mit einem parallel ausgerichteten Aktin-Zytoskelett (rot) und regelmäßiger Sarkomerstruktur (α -Aktinin; grün). Der Zellkern wurde zusätzlich blau angefärbt. Bei den anderen Zellen im Bildausschnitt handelt es sich nicht um Myozyten (keine Sarkomerstruktur). Aufgrund der Überlappung der Emissionsbereiche der Farbstoffe wurde die Aufnahme des Aktins für die bessere Darstellung mit einer Aufnahme der fluoreszenten Kugeln (cyan) nicht-linear korrigiert. (B) Dargestellt ist räumlich aufgelöste Substratdeformation durch die in (A) dargestellte Myozyte zum Zeitpunkt einer Kontraktion. Die Zelle ist durch eine weiße Umrandung angedeutet. Die Substratdeformation erfolgt unterhalb der Faserenden an den Spitzen der Zelle. Der Maßstab entspricht für beide Abbildungen einer Länge von 20 μ m.

Abbildung 3-33 zeigt die bereits im Abschnitt 3.2.8 beschriebene Zelle (vgl. Abbildung 3-31). Diese große, längliche Zelle wies von allen beobachteten Zellen die höchste Sarkomer-Ordnung¹ auf. Das Aktin-Zytoskelett (rot) liegt parallel und dicht gepackt. Zudem sind die Sarkomere über die einzelnen Aktin-Fasern hinweg miteinander verbunden (zu erkennen an den grünen α -Aktinin-Banden). Wie bereits beschrieben, liegt der zeitliche Versatz dieser Zelle bei 20 ms ($\sigma = 2$ ms).

Abbildung 3-33 B zeigt die durch die Zelle hervorgerufene Substratdeformation zum Zeitpunkt einer Kontraktion. Die Form der Zelle ist als weiße Umrandung dargestellt. Die maximale Substratdeformation erfolgt unterhalb der spitzen Enden der Zelle. Die höchste Verschiebungsstärke liegt bei 208 nm.

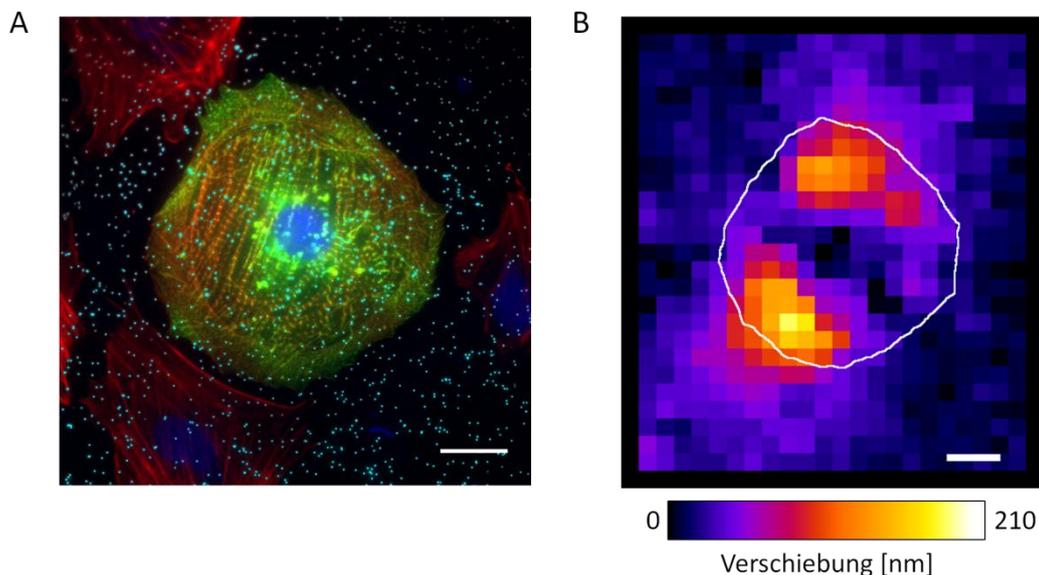


Abbildung 3-34: Zusammenhang zwischen Zytoskelett-Organisation und lokaler Substratdeformation. (A) Dargestellt ist eine Myozyte (mittlere Zelle) mit runder Form. In der linken Hälfte der Zelle sind die einzelnen Aktin-Fasern (rot) parallel ausgerichtet. In der rechten Hälfte zeigen die Aktin-Fasern keine Vorzugsrichtung. Die Sarkomerstruktur (α -Aktinin; grün) ist bei allen Fasern gut ausgeprägt. Der Zellkern wurde zusätzlich blau angefärbt. Bei den anderen Zellen im Bildausschnitt handelt es sich nicht um Myozyten (keine Sarkomerstruktur). Aufgrund der Überlappung der Emissionsbereiche der Farbstoffe wurde die Aufnahme des Aktins für die bessere Darstellung mit einer Aufnahme der fluoreszenten Kugeln (cyan) nicht-linear korrigiert. (B) Dargestellt ist räumlich aufgelöste Substratdeformation durch die in (A) dargestellte Myozyte zum Zeitpunkt einer Kontraktion. Die Zelle ist durch eine weiße Umrandung angedeutet. Der Maßstab entspricht für beide Abbildungen einer Länge von 20 μm .

Die Abbildung 3-34 zeigt eine runde Zelle. Diese weist ebenfalls ausgeprägte Sarkomer-Strukturen auf. Die einzelnen Aktin-Fasern liegen bei dieser Zelle jedoch nicht so dicht gepackt wie bei der Zelle zuvor. Das Aktin-Zytoskelett lässt sich bei dieser Zelle in zwei

¹ Die Sarkomer-Ordnung wurde auf qualitativer Ebene visuell verglichen. Es erfolgte keine quantitative Analyse der Sarkomer-Ordnung.

Regionen unterteilen. In der linken Hälfte der Zelle verlaufen die Aktin-Fasern parallel zueinander. In der rechten Hälfte verlaufen sie weniger geordnet.

Die Substratdeformation zum Zeitpunkt einer Kontraktion erfolgt hauptsächlich unterhalb der linken Hälfte der Zelle an den Enden der parallel liegenden Fasern. Die höchste Verschiebungsstärke liegt mit 185 nm etwas niedriger als bei der Zelle zuvor. Der zeitliche Versatz zwischen Kalzium und Substratdeformation liegt bei dieser Zelle bei 91 ms ($\sigma = 2$ ms) bei einer Kontraktionshäufigkeit von 9 Schlägen in 13 Sekunden (0,69 Hz).

3.2.10 Synchronisation benachbarter Zellen ohne direkten Kontakt

Wie bereits in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, wiesen unter allen untersuchten Zellen zwei Zellen eine Auffälligkeit in ihren zeitlichen Versatz Δt in Abhängigkeit ihrer Kontraktionshäufigkeit auf (Abbildung 3-26). Zum einen besaßen die Zellen eine höhere Streuung in ihren Δt -Werten als andere Zellen mit vergleichbarer Kontraktionshäufigkeit. Zudem lag Δt für eine der beiden Zellen deutlich über dem der anderen Zellen in diesem Kontraktionshäufigkeitsbereich. Diese beiden Zellen stammten aus derselben Aufnahme, bildeten jedoch keinen direkten Kontakt zueinander und wurden daher als Einzelzellen ausgewertet. In diesem Abschnitt sollen diese beiden Zellen nochmals genauer im Hinblick auf ihr raumzeitliches Signalverhalten sowie einer möglichen Kopplung zwischen ihnen beschrieben werden.

Die Abbildung 3-35 zeigt die immunhistochemische Färbung der beiden zuvor genannten Myozyten (zu erkennen an den grün gefärbten Sarkomerstrukturen). Zwischen ihnen liegt eine weitere Zelle mit fehlenden Sarkomerstrukturen, die mit beiden Myozyten in Kontakt steht. Die beiden Myozyten weisen eine vergleichbare, längliche Morphologie auf. Die untere Myozyte (*Zelle 1*) besitzt jedoch eine deutlicher ausgeprägte Sarkomerstruktur als die obere Myozyte (*Zelle 2*). Trotz der vergleichbaren Form, gleicher Kontraktionshäufigkeit ($f_F = 21$ Schläge in 13 Sekunden = 1,62 Hz) und den für beide Zellen gleichen Kulturbedingungen, besitzen die beiden Myozyten deutlich unterschiedliche Signalverläufe (Abbildung 3-36 C und D). Auffällig ist zudem, dass beide Zellen synchron kontrahieren, wobei das Kalzium-Signal der *Zelle 2* dem der *Zelle 1* im Abstand von 14 ms ($\sigma = 8$ ms) folgt (Abbildung 3-35 B).

Die Abbildung 3-36 geht nochmals näher auf die Kalzium-Signale der beiden Zellen ein. Aufgrund ihrer Nähe zueinander ist zu erwarten, dass die Zellen eine vergleichbare Beladung durch *Fluo-4* erfahren haben. Dies zeigt sich auch an der ähnlichen Kalzium-Intensität der Zellen im Ruhezustand. Somit können die Kalzium-Intensitäten der beiden Zellen in einer Näherung miteinander verglichen werden. Die *Zelle 1* besitzt während der Kontraktion eine höhere Kalzium-Intensität als die *Zelle 2*. Aus den in Abbildung 3-36 C und D dargestellten Linienintensitätsprofil über die Zeit lassen sich zudem raumzeitliche Unterschiede zwischen den Kalzium-Konzentrationen der beiden Zellen erkennen. Während das Kalzium-Signal der *Zelle 2* eine homogene Signalausbreitung in der Zelle aufweist, zeigt *Zelle 1* hingegen eine wellenartige Signalausbreitung. Der lokale Ursprung dieser Kalzium-Wellen variiert zudem zwischen den Kontraktionen.

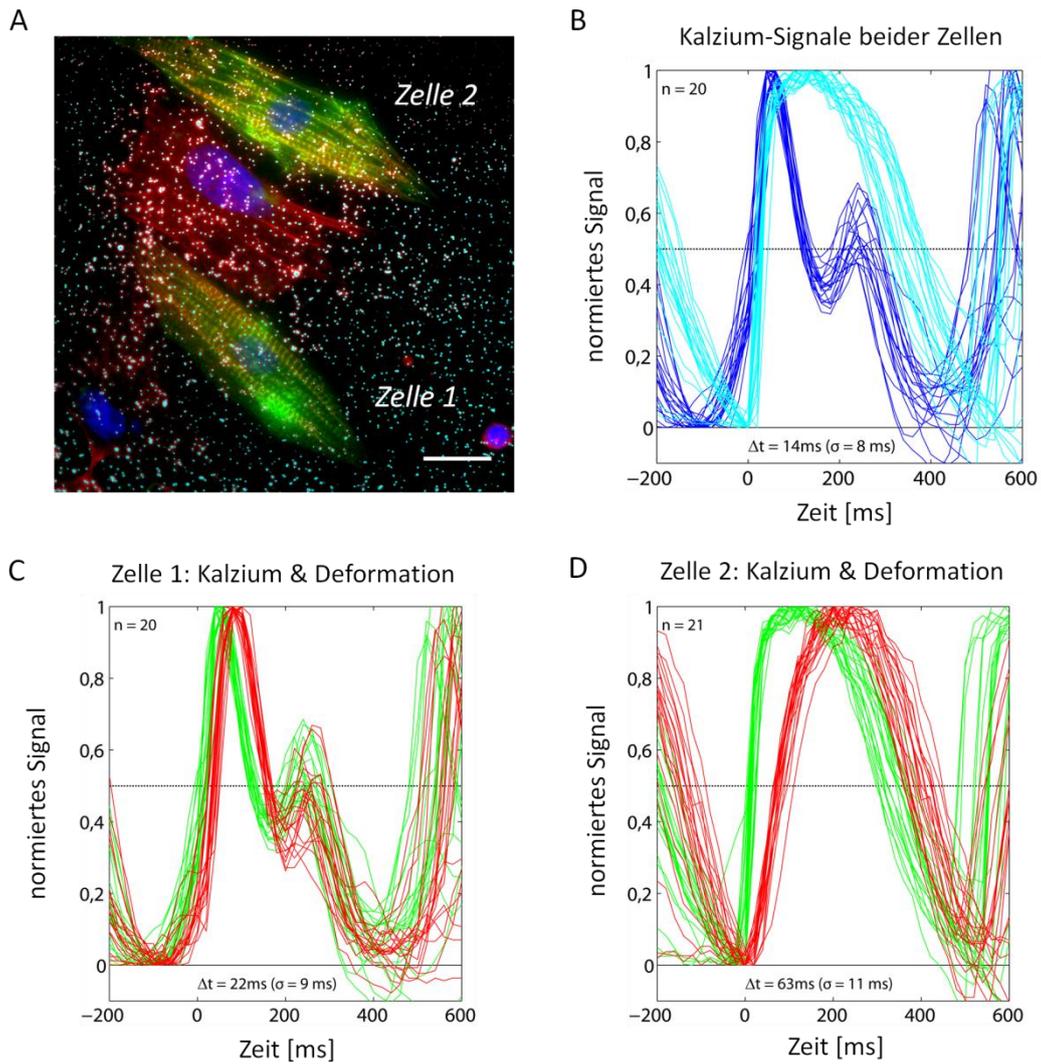


Abbildung 3-35: Zellmorphologie und Signalform zweier beieinander liegenden Myozyten. (A) Die Abbildung zeigt zwei Myozyten die durch eine weitere Zelle miteinander Verbunden sind. Darstellung wie in Abbildung 3-34 beschrieben. Der Maßstab beträgt 20 μm . (B) Überlagerung der Kalzium-Signale der beiden Zellen. Die Kalzium-Signale der unteren Myozyte (*Zelle 1*) sind blau dargestellt. Die Signale der oberen Myozyte (*Zelle 2*) sind cyan dargestellt. (C) Überlagerung der Kalzium-Signale (grün) und Substratdeformation (rot) der *Zelle 1*. (D) Überlagerung der Kalzium-Signale (grün) und Substratdeformation (rot) der *Zelle 2*. Die Zellen besitzen die gleiche Kontraktionshäufigkeit (1,62 Hz), jedoch konnte bei der Analyse des zeitlichen Versatzes ein Kalzium-Signal in *Zelle 1* nicht erfasst werden.

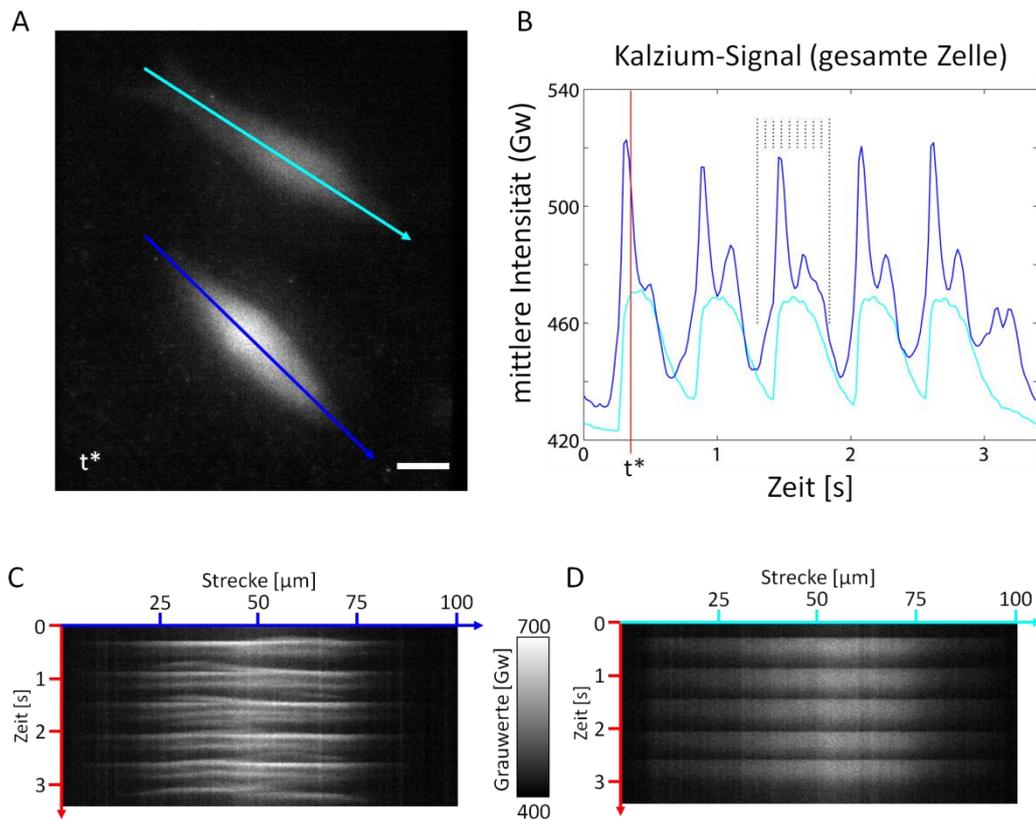


Abbildung 3-36: Vergleich des raumzeitlichen Kalzium-Signals. (A) Dargestellt ist absolute Kalzium-Intensität der in Abbildung 3-35 gezeigten Myozyten zum Zeitpunkt einer Kontraktion (t^* ; rote Linie in B). Die untere Myozyte ist *Zelle 1*, die obere *Zelle 2*. Die Pfeile markieren die Position der in (C) und (D) gezeigten Linienintensitätsprofile. Der Maßstab entspricht einer Länge von $20 \mu\text{m}$. (B) Dargestellt sind die über die gesamte Zelle gemittelten Kalzium-Intensitäten (in Grauwerten) über den Zeitraum von 5 Kontraktionen. Die Kalzium-Intensität der *Zelle 1* ist blau dargestellt, die Kalzium-Intensität der *Zelle 2* ist in cyan dargestellt. Die schwarzen, gepunkteten Linien markieren die in Abbildung 3-37 dargestellten Zeitpunkte. (C) und (D) zeigen die in (A) markierten Linienintensitätsprofile der jeweiligen Myozyte ((C) zeigt *Zelle 1*; (D) zeigt *Zelle 2*) in Grauwerten über die Zeit.

In Abbildung 3-37 sind die Kalzium-Signale sowie die Substratdeformationen der Zellen während einer Kontraktion raumzeitlich aufgelöst. Dargestellt ist die 3. Kontraktion des in Abbildung 3-36 B gezeigten Signalverlaufs. Zu beachten ist der zunächst deutlich verlangsamte Signalanstieg der *Zelle 1* während dieser Kontraktion (Abbildung 3-36 B: blaues Profil).

Zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ ms}$ haben beide Zellen eine niedrige Kalzium-Konzentration. Die *Zelle 2* zeigt noch eine schwache Substratdeformation aus der vorangegangenen Kontraktion. Nach 60 ms kommt es in der *Zelle 1* zu einem lokalen Anstieg am linken Ende der Zelle. Dieses lokale Kalzium-Signal „läuft“ anschließend als Kalzium-Welle in Richtung Zellmitte. Zum Zeitpunkt $t = 120 \text{ ms}$ ist bereits eine schwache Substratdeformation unterhalb des linken Zellendes und der Zellmitte detektierbar. Nach weiteren 60 ms ($t = 180 \text{ ms}$) weist die *Zelle 1* einen globalen Anstieg der Kalzium-Konzentration auf. Die Deformation erfolgt zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich unterhalb der Zellenden.

Ab dem Zeitpunkt $t = 180 \text{ ms}$ steigt auch die Kalzium-Konzentration in *Zelle 2* an, eine Substratdeformation wird hier jedoch noch nicht detektiert. Zum Zeitpunkt $t = 240 \text{ ms}$ klingt das Kalzium-Signal in *Zelle 1* bereits wieder ab, während die Substratdeformation unter dieser Zelle ihr Maximum erreicht. Auch unterhalb der *Zelle 2* lässt sich nun eine Deformation des Substrates detektieren. Diese erreicht etwa zum Zeitpunkt $t = 360 \text{ ms}$ ihr Maximum. Über die nächsten Zeitschritte klingen die Kalzium-Signale in den Zellen sowie Substratdeformation wieder ab.

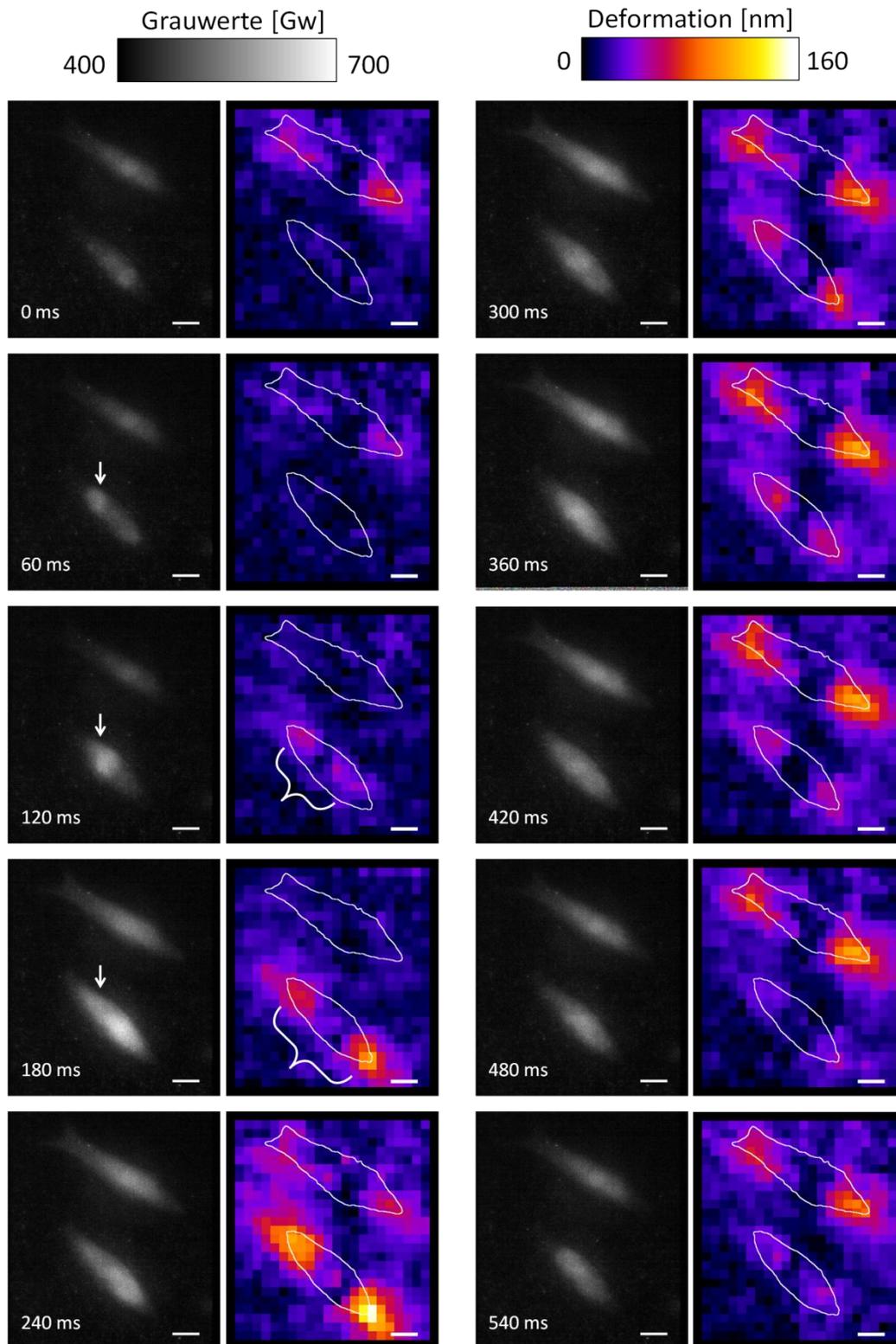


Abbildung 3-37: Raumzeitlicher Verlauf der Kalzium-Intensitäten und Substratdeformation während der Kontraktion der beiden in Abbildung 3-35 gezeigten Myozyten. Die dargestellten Zeitschritte sind in Abbildung 3-36 B markiert (dargestelltes Intervall: 60 ms). Die dargestellten Kalzium-Intensitäten entsprechen den Grauwerten [Gw] der Original-Daten. Die weißen Pfeile markieren die lokale Kalzium-Intensitätserhöhung zum Zeitpunkt $t = 60$ ms. Die weißen Klammern deuten eine räumliche Ausbreitung der Substratdeformation an. In den Abbildungen der Substratdeformation sind die Zellen als weiße Umrandungen markiert. Die lokalen Verschiebungsamplituden sind in Fehlfarben dargestellt. Der Maßstab entspricht für alle Abbildungen $20 \mu\text{m}$.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Arten von Kalzium-Signalen bei unterschiedlichen zellmechanischen Prozessen untersucht. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Auftreten zyklischer Kalzium-Signale in humanen Endothelzellen der Nabelschnur analysiert. Hier lag der Fokus auf der quantitativen Analyse der Kalzium-Signale in Abhängigkeit von der Steifigkeit der zellulären Umgebung. Im zweiten Teil wurde das Zusammenspiel von Kalzium-Signalen und Zellkontraktion in pränatalen, kardialen Myozyten raumzeitlich untersucht. Hierbei galt es vor allem die zeitliche Abfolge von Kalzium-Signal und Substratdeformation durch die Zelle genauer zu analysieren.

Die in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse beider Themenblöcke werden in diesem Kapitel diskutiert. Vorab soll zunächst jedoch der für die Untersuchungen beider Themen verwendete Kalzium-Indikator *Fluo-4* diskutiert werden. Eine abschließende Zusammenfassung sowie ein Ausblick zu den Untersuchungen erfolgt in Kapitel 4.4.

4.1 Der verwendete Kalzium-Indikator *Fluo-4*

Zur Analyse intrazellulärer Kalzium-Signale wurde der synthetische Kalzium-Indikator *Fluo-4* verwendet. Dieser Indikator hat Vor- und Nachteile gegenüber anderer Kalzium-Indikatoren, welche im Folgenden näher diskutiert werden.

4.1.1 Quantitative Messungen

Bindet *Fluo-4* Kalzium, so steigt seine Fluoreszenz-Intensität, ohne dass es zu einer relevanten Verschiebung des Anregungs- bzw. Emissionsspektrums kommt (Gee et al. 2000). Er zählt somit zu den nicht-ratiometrischen Indikatoren (Paredes et al. 2008). Dies bedeutet, dass man aus der Fluoreszenz-Intensität keine absoluten Kalzium-Konzentrationen bestimmen kann. Bei den hier durchgeführten Experimenten konnten daher nur Fluoreszenz-Intensitäten als relatives Maß der Kalzium-Konzentration ermittelt werden. Zudem hängt bei nicht-ratiometrischen Indikatoren die ermittelte Intensität stark von der Indikator-Konzentration und der Dicke der untersuchten Probe ab (Paredes et al. 2008). Aus diesem Grund ist ein Vergleich der Kalzium-Konzentration zwischen einzelnen Experimenten mit nicht-ratiometrischen Indikatoren nur bedingt möglich. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen stand zunächst die Analyse raumzeitlicher Veränderungen innerhalb einzelner

Messungen im Vordergrund, somit war die Vergleichbarkeit der Konzentrationen zwischen den Experimenten nicht erforderlich.

Ein weiterer Punkt der sich auf die Quantifizierung von Kalzium-Intensitäten auswirken kann, ist, dass *Fluo-4*, wie auch andere Kalzium-Indikatoren, nur in einem bestimmten Bereich ein annähernd lineares Fluoreszenz-Verhalten in Relation zur Kalzium-Konzentration besitzt (vgl. Abbildung 2-7) (Thomas et al. 2000). Um nicht-lineares Detektionsverhalten zu vermeiden, ist daher darauf zu achten, dass die zu detektierenden Kalzium-Konzentrationen innerhalb des linearen Detektionsbereichs des Indikators liegen. *Fluo-4* besitzt verglichen mit anderen Indikatoren einen relativ breiten Detektionsbereich, welcher nahezu den gesamten, physiologisch relevanten Kalzium-Konzentrationsbereichs abdeckt (Abbildung 2-7) (Gee et al. 2000; Thomas et al. 2000). Es ist daher davon auszugehen, dass der nicht-lineare Charakter des Indikators bei den hier durchgeführten Experimenten keinen gravierenden Einfluss auf die quantitative Auswertung hatte. Diese Vermutung wird auch dadurch untermauert, dass in Messungen an HUVECs die zyklisch auftretenden Kalzium-Signale die Sättigung des Indikators noch nicht erreicht hatten. Hierfür sprechen insbesondere die Ergebnisse aus den Experimenten mit dem Inhibitor *Thapsigargin*. Der Inhibitor führte hier zu einem messbaren Anstieg der Kalzium-Intensität, welcher nochmals über den Intensitäten der zyklischen Kalzium-Signale lag. Ob diese sehr hohen Fluoreszenzintensitäten jedoch auch weiterhin im linearen Sensitivitätsbereich des Indikators lagen, ist unbekannt.

4.1.2 Toxizität und Bleichverhalten

Bei der Anregung von Farbstoffen können diese zerstört werden und toxische Produkte bilden. *Fluo-4* besitzt ein vergleichsweise niedriges Bleichverhalten gegenüber anderer Kalzium-Indikatoren (Abbildung 2-8) (Thomas et al. 2000). Zusätzlich wurden die Anregungsintensitäten für die hier durchgeführten Messungen möglichst gering gehalten. Dennoch ist ein gewisses Ausbleichen des Indikators während der hier durchgeführten Messungen nicht auszuschließen, jedoch gab es weder bei den Experimenten an HUVECs noch bei denen an pränatalen Myozyten Anzeichen für Zellschädigungen oder apoptotisches Verhalten. Gerade bei den Messungen an HUVECs ist jedoch zu erkennen dass die ermittelte Kalzium-Intensität über den Zeitraum der Messung (30 Minuten) stetig abnimmt (Abbildung 3-10). Regionen, welche nicht untersucht und somit auch nicht stark belichtet wurden, wiesen nach den Messungen eine vergleichbar niedrige Fluoreszenzintensität auf. Es ist daher davon

auszugehen, dass der Abfall der Intensität hauptsächlich durch einen Transport aus der Zelle und nicht durch Ausbleichen des Indikators verursacht wurde (Gee et al. 2000).

4.1.3 Affinität und Puffer-Effekt

Kalzium-Indikatoren binden Kalzium mit einer spezifischen Affinität und verändern darauf hin ihre Fluoreszenz-Intensität (Thomas et al. 2000; Paredes et al. 2008). Bei der Analyse von Kalzium-Signalen mittels solcher Indikatoren werden somit freie Kalzium-Ionen aus dem eigentlichen Kalzium-System entzogen. Bei der Analyse von Kalzium-vermittelten Reaktionen ist daher zu beachten, dass Kalzium-Indikatoren als zusätzliche Kalzium-Puffer wirken und somit einen Einfluss auf das gesamte Kalzium-System haben können (siehe auch Abschnitt 3.2.1) (Paredes et al. 2008). Der Einfluss auf das System ist abhängig von der Stärke des nötigen Kalzium-Signals sowie der Affinität und Konzentration des verwendeten Indikators.

Für die Analyse zytoplasmatischer Kalzium-Signale verwendet man in der Regel hoch affine Kalzium-Indikatoren (Paredes et al. 2008). Innerhalb dieser Klasse besitzt *Fluo-4* mit einem k_d -Wert für Kalzium von 345 μM eine vergleichsweise niedrige Affinität (Gee et al. 2000; Thomas et al. 2000; Paredes et al. 2008). Bei diesem Wert handelt es sich zudem um die *in vitro* bestimmte Dissoziationskonstante. Experimente haben jedoch gezeigt, dass Kalzium-Indikatoren in der Zelle nochmals niedrigere Affinitäten aufweisen können. So wird für *Fluo-4* ein „zytoplasmatischer“ kd -Wert von $1000 \pm 130 \mu\text{M}$ angegeben (Thomas et al. 2000).

Trotz des vergleichsweise hohen kd -Wertes (und somit niedrige Affinität) von *Fluo-4*, reagierten die untersuchten pränatalen Myozyten sehr empfindlich auf die Beladung. So kam die Zellkontraktion bei einer Beladung mit 1 μM *Fluo-4* nahezu vollständig zum Erliegen. Selbst nach der in Abschnitt 2.3.2 beschriebenen Anpassung des Beladungsprotokolls war bei den Analysen noch eine Reduktion der Kontraktionshäufigkeit zu beobachten (vgl. Abschnitt 3.2.1).

Auch für die Messungen an HUVECs muss man von einem gewissen Einfluss des Indikators auf die Regulation des Kalzium-Signals ausgehen. Jedoch gab es bei diesen Messungen keine Möglichkeit diesen Einfluss näher zu quantifizieren. Da für die Messungen alle HUVECs gleichermaßen beladen wurden, sind die im Abschnitt 4.1 diskutierten relativen Unterschiede zwischen den Zellen jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf einen Einfluss des Indikators zurückzuführen.

4.2 Zyklisch auftretende Kalzium-Signale bei der Erkennung der Substratsteifigkeit in Endothelzellen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden zyklisch auftretende Kalzium-Signale von Endothelzellen quantitativ untersucht. Hierbei sollte geklärt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der Kalzium-Signale (Kalzium-Frequenz) und der Steifigkeit der Umgebung der Zellen besteht.

Auffällig bei allen hier durchgeführten Messungen an HUVECs, war die breite Streuung der Kalzium-Frequenz bereits für die einzelnen Zellen innerhalb einer Messung (siehe Abschnitt 3.1.3.1). Aufgrund dieser Varianz, war ein direkter Vergleich von Kalzium-Frequenzen in Abhängigkeit definierter äußerer Faktoren auf Einzelzellebene nicht möglich. Diese Streuung könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen weisen Zellen desselben Typs bereits eine gewisse Heterogenität in ihrem individuellen Verhalten auf. Da Kalzium-Signale in Zellen an einer Vielzahl von Prozessen mitverantwortlich sind (siehe Abschnitt 1.2), könnte ein solches individuelles Verhalten von Zellen bereits Auswirkungen auf die Kalzium-Signalgebung haben. Zudem handelt es sich bei den hier untersuchten HUVECs um kommerziell erhältliche primäre Zellen, welche zum einen aus der gesamten Nabelschnurvene isoliert wurden, und zum anderen aus einer Mischpopulation von mehreren Spendern stammen (das genaue Isolationsverfahren ist nicht bekannt). Es ist bekannt, dass verschiedene Typen von Endothelzellen unterschiedliches Verhalten aufweisen (Califano & Reinhart-King 2010; J. A. Wood et al. 2011). Somit ist davon auszugehen, dass die hier gemessene Varianz maßgeblich auf die Heterogenität der Zellpopulation zurückzuführen ist. Da sich diese systematische Varianz jedoch auf alle Experimente gleichermaßen ausgewirkt hat, waren vergleichende Untersuchungen zu verschiedenen Substratsteifigkeiten dennoch möglich. Eine zusätzliche Varianz durch weitere Faktoren wurde für die durchgeführten Messungen möglichst gering gehalten, indem die Grundparameter, wie die Beladung mit *Fluo-4* (siehe Abschnitt 2.3.2), die Aufnahmezeit und Belichtungszeit während der Messungen (siehe Abschnitt 2.4.1) sowie Kulturbedingungen und das Alter der verwendeten Zellen (siehe Abschnitt 2.1.1), bei allen Messreihen konstant gehalten wurden. Um trotz der hohen Grundvarianz Veränderungen von Kalzium-Frequenzen quantitativ erfassen zu können, wurde die in Abschnitt 2.5.1 beschriebene Auswertung etabliert, mit der es möglich war, die mittlere Kalzium-Frequenz aus einer hohen Anzahl an Zellen innerhalb einer Messung zu bestimmen. Bei den Kontrollmessungen an HUVECs, welche auf Glassubstraten kultiviert wurden, ergab

sich mit dieser Auswertung aus insgesamt 24 Experimenten eine mittlere Kalzium-Frequenz von $34,6 \text{ h}^{-1}$ ($\sigma = 4,5 \text{ h}^{-1}$) (siehe Abschnitt 3.1.1). Dieser Wert liegt in derselben Größenordnung wie die Kalzium-Frequenzen anderer nicht-erregbarer Zelltypen (Kim et al. 2009; Uhlén & Fritz 2010; Chen et al. 2010). Dies spricht dafür, dass es sich hierbei um physiologisch relevante und nicht artifiziell erzeugte Kalzium-Signale handelt.

4.2.1 Einfluss der Substratsteifigkeit auf die Kalzium-Frequenz

Um den Einfluss der Substratsteifigkeit auf die Kalzium-Signale von HUVECs unter möglichst naturnahen Bedingungen zu analysieren, wurden für das Substrat Elastizitäten gewählt, die denen im Gewebe ähneln. Die in der Literatur angegebenen Steifigkeiten für die Basalmembran, auf der Endothelzellen adhäreren, variieren je nach Gefäßtyp und der angewendeten Messmethode über einen Bereich von 2,5 kPa bis hin zu 7 MPa (J. A. Wood et al. 2011; Califano & Reinhart-King 2010). Für die hier durchgeführten Messungen wurden HUVECs daher neben Glassubstraten auch auf unterschiedlich steifen Silikonsubstraten mit einem Elastizitätsmodul von 15 kPa sowie 1,35 MPa kultiviert (siehe Abschnitt 2.2.2).

Bei den durchgeführten quantitativen Analysen zeigten sich klare Unterschiede der Kalzium-Frequenzen in Abhängigkeit des Substrates auf dem die Zellen kultiviert wurden. Fasst man alle Messungen zusammen, zeigten HUVECs, die auf Silikonsubstraten kultiviert wurden, eine deutlich niedrigere mittlere Kalzium-Frequenz, als Zellen auf Glassubstraten (Abbildung 3-4). Zellen auf harten Substraten wiesen eine nochmals niedrigere Frequenz auf, als Zellen auf den weichen Silikonsubstraten. Die für beide Silikonsubstrate unterschiedlichen mittleren Kalzium-Frequenzen der Zellen deuten bereits darauf hin, dass diese Veränderung weniger von materialspezifischen Eigenschaften, sondern maßgeblich durch die unterschiedlichen Steifigkeiten der Substrate hervorgerufen wurde. Dennoch ist an dieser Stelle zu beachten, dass die Kalzium-Frequenzen für Zellen auf Silikonsubstraten tendenziell eine höhere Streuung aufweisen, als die für Zellen auf Glas. Zudem überlappen die ermittelten Werte aus den einzelnen Experimenten für harte und weiche Silikonsubstrate erheblich. Diese hohe Streuung könnte auf einen zusätzlichen Effekt hindeuten und soll daher vorab diskutiert werden.

4.2.1.1 Zeitliche Veränderungen der Kalzium-Frequenz

Die im vorhergegangenen Abschnitt beschriebene Streuung lässt sich größtenteils darauf zurückführen, dass Zellen auf Silikonsubstraten bei längerer Kultivierung einen stetigen

Anstieg ihrer Kalzium-Frequenz aufwiesen (siehe Abschnitt 3.1.3), welche bei Zellen auf Glassubstraten nicht auftrat. Während Zellen auf Glas über den untersuchten Zeitraum von drei Tagen nach der Aussaat eine mittlere Kalzium-Frequenz von etwa 30 bis 40 Signalen pro Stunde beibehielten, besaßen Zellen, welche auf Silikonsubstraten kultiviert wurden, wenige Stunden nach der Aussaat eine deutlich niedrigere Kalzium-Frequenz von 10 bis 20 Signalen pro Stunde. Diese stieg über die nächsten zwei Tage stetig an. Ähnliche Veränderungen der Kalzium-Frequenz traten auch auf Silikonsubstraten eines anderen Herstellers auf.¹ Die Gründe für die zeitliche Veränderung der ermittelten Kalzium-Frequenzen wurden mit einer Reihe von Kontrollexperimenten untersucht.

Ein Parameter, welcher sich über die Zeit veränderte, war das Alter des Nährmediums. Es könnte sein, dass Nährstoffe des Mediums nach zwei Tagen bereits von den Zellen umgesetzt wurden. Die Nährstoffknappheit sowie eventuell schädliche Abbauprodukte könnten nachfolgend das Verhalten der Zellen beeinflusst haben. Diese Möglichkeit ist jedoch aus zweierlei Gründen unwahrscheinlich. Zum einen sollte ein solcher Alterungsprozess des Mediums auch die Zellen auf Glassubstraten beeinflussen (vgl. Abschnitt 3.1.3). Zum anderen kam es in den hier durchgeführten Kontrollexperimenten auf Silikonsubstraten zu keinen relevanten Unterschieden in der Kalzium-Frequenz, wenn Zellen am *Tag 0* in „verbrauchtem“ Nährmedium vorkultiviert wurden (vgl. Abschnitt 3.1.5). Zudem zeigten sich auch keine relevanten Veränderungen der Kalzium-Frequenz für Zellen am *Tag 2*, welche 3 - 9 Stunden vor der Messung mit frischem Nährmedium versorgt wurden.¹ Dass die unterschiedlichen Kalzium-Frequenzen auf weitere zeitliche Veränderungen des Mess-Systems zurückzuführen sind, ist ebenfalls unwahrscheinlich, da sich dieses auch in den Kalzium-Frequenzen von Zellen auf Glassubstraten hätten widerspiegeln müssen. Da sich die zeitlichen Veränderungen der Kalzium-Frequenzen jedoch auf Zellen, die auf Silikonsubstraten kultiviert wurden, beschränkten, könnte es sich hierbei schlicht um einen materialspezifischen Effekt handeln. Eine denkbare Möglichkeit wäre, dass sich die Materialeigenschaften des Silikonkautschuks durch den Kontakt mit dem Nährmedium über die Zeit verändert. Um den Einfluss eines solchen Effekts auf die ermittelten Kalzium-Frequenzen zu untersuchen, wurden Zellen auch auf Silikonsubstraten kultiviert, die zuvor für mehrere Tage mit Nährmedium inkubiert wurden (siehe Abschnitt 3.1.5). Trotz der niedrigen Anzahl an Messungen, deuten die hier durchgeführten Kontrollexperimente darauf hin, dass eventuell

¹ Ergebnis aus der, während dieser Arbeit betreuten, Bachelorarbeit von Johannes Alexander Müller für HUVECs auf einem Silikonkautschuk (*Med 6340*) der Firma *Nusil* mit einem Elastizitätsmodul von 15 kPa.

aufgetretene Substratveränderungen keinen relevanten Einfluss auf die Kalzium-Frequenzen der Zellen hatten.

Interessant ist, dass sich auf beiden Silikonsubstraten die Kalzium-Frequenz über die Zeit denen der auf Glassubstraten gemessenen Frequenzen annähert, was auf einen Anpassungsprozess der Zellen innerhalb der ersten Tage deuten könnte.

An dieser Stelle können nur Vermutungen aufgestellt werden, was eine solche Adaption hervorrufen könnte. Ein möglicher Einfluss könnte sich aus einer Eigenschaft des Materials ergeben haben. Die Silikonsubstrate waren deutlich hydrophober als Glassubstrate. Hierdurch könnte es zu einer veränderten Physisorption des Fibronektins an der Oberfläche gekommen sein. In der Tat zeigten erste Kontrollmessungen mit fluoreszenzmarkiertem Fibronektin eine teilweise heterogene Oberflächenbeschichtung auf Silikonsubstraten (nicht dargestellt). Wie groß hierbei die räumlichen Unterschiede in der Fibronektin-Konzentration waren, lässt sich aus diesen Aufnahmen jedoch nicht bestimmen. Zudem ist auch noch nicht klar, ob die Glassubstrate eine ähnlich heterogene Beschichtung aufweisen.

Fibronektin dient der Zelle als Substrat zur Ausbildung von fokalen Adhäsionen (Geiger et al. 2001; Berrier & Yamada 2007). Die Bindung von Fibronektin an Integrin-Rezeptoren kann zudem einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von Zellen haben (Danen & Yamada 2001). Zwar ist beschrieben, dass HUVECs unter Kulturbedingungen keine signifikanten Veränderungen des Proliferationsverhaltens in Abhängigkeit der Oberflächenbeschichtung aufweisen (Terramani et al. 2000), diese Untersuchungen erfolgten jedoch 5 Tage nach der Aussaat der Zellen. Inwiefern die Fibronektin-Beschichtung gerade während der ersten Tage einen Einfluss auf HUVECs hat, ist jedoch unklar.

4.2.1.2 Mögliche Bedeutung der unterschiedlichen Kalzium-Frequenzen am Tag 2

Auch wenn man an dieser Stelle noch keine klaren Aussagen über die verantwortlichen Faktoren für die unterschiedlichen Kalzium-Frequenzen an verschiedenen Tagen treffen kann, so ist dennoch zu beachten, dass HUVECs auf weichen Silikonsubstraten am Tag 2 nach ihrer Aussaat eine vergleichbare Kalzium-Frequenzen aufwiesen, wie HUVECs auf Glassubstraten. Zellen auf harten Silikonsubstraten besaßen an diesem Tag jedoch eine deutlich niedrigere Kalzium-Frequenz (Abschnitt 3.1.3). Dieser Unterschied zwischen Zellen der einzelnen Substrate kann mit großer Wahrscheinlichkeit als Reaktion auf die Substratsteifigkeit angesehen werden.

Veränderungen der Kalzium-Frequenz in Abhängigkeit der Substratsteifigkeit sind auch für andere Zellen beschrieben. Für humane mesenchymale Stammzellen (hMS) zeigten Kim et al,

dass diese auf weichen Polyacrylamid-Gelen eine deutlich niedrigere Kalzium-Frequenz aufwiesen als auf Glassubstraten. Hier lagen die größten Effekte bei Substratsteifigkeiten von etwa 1 – 5 kPa (Kim et al. 2009). Es ist bekannt, dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Substratsteifigkeiten für eine optimale Entwicklung benötigen (Discher et al. 2005; Georges & Janmey 2005). Die Tatsache, dass hMS sowie die in dieser Arbeit analysierten HUVECs ihre niedrigste Kalzium-Frequenz jeweils auf unterschiedlichen Substratsteifigkeiten erreichen, stellt ein Indiz dafür dar, dass Veränderungen der Kalzium-Oszillationen eine Rolle bei der zelltypspezifischen Erkennung der optimalen Substratsteifigkeit spielen könnten.

Die Möglichkeit, dass HUVECs nur in einem bestimmten Steifigkeitsbereich Veränderungen in ihrer Kalzium-Frequenzen aufweisen, spricht dafür, dass dies keine passive Reaktion auf die Steifigkeit, sondern eine aktive Regulation der HUVECs innerhalb dieses Steifigkeitsbereichs darstellt. Diese Ergebnisse passen zu den von Woods et al. beschriebenen Ergebnissen (J. A. Wood et al. 2011). Sie konnten in Experimenten zeigen, dass HUVECs sowohl auf weichen (25 kPa) Polyacrylamid-Gelen, als auch auf hartem Plastik eine vergleichbare längliche Zellmorphologie aufwiesen. HUVECs auf einer dazwischenliegenden Steifigkeit von 75 kPa¹ zeigten dagegen verstärkt rundere Zellformen. Desweiteren besaßen HUVECs auf 75 kPa steifen Substraten eine signifikant niedrigere Zellfläche sowie ein deutlich reduziertes Adhäsionsverhalten, gegenüber HUVECs auf sehr weichen oder sehr harten Substraten. Auch wenn die genannte Steifigkeit von 75 kPa um den Faktor 18 niedriger ist, als die im Rahmen dieser Arbeit analysierte Substratsteifigkeit von 1,35 MPa, so zeigt das Ergebnis von Wood et al. klar, dass sich das Verhalten von HUVECs in einem bestimmten Steifigkeitsbereich verändert, während es für die darüber und darunterliegenden Steifigkeiten identisch ist. Um die Veränderungen der Kalzium-Frequenz in diesem Kontext besser zu verstehen, sollten weiterführende Experimente mit unterschiedlichen Substratsteifigkeiten erfolgen. Gerade die Analyse des Steifigkeitsbereichs um 75 kPa scheint hierbei ein vielversprechender Ansatzpunkt für HUVECs zu sein.

¹ Hierbei handelte es sich um die höchste in dieser Veröffentlichung untersuchte Substratsteifigkeit für Polyacrylamid-Gele (J. A. Wood et al. 2011)

4.2.2 Entstehung der Kalzium-Signale

Um die molekularen Zusammenhänge bei der Entstehung zyklisch auftretender Kalzium-Signale besser zu verstehen, wurden im Rahmen dieser Arbeit erste Experimente mit etablierten Inhibitoren durchgeführt (Abschnitt 3.1.6). Die Begutachtung dieser Experimente erfolgte auf rein qualitativer Ebene.

Die Verwendung von Lanthan-Ionen, ein unspezifischer Blocker von Kalzium-Kanälen der Plasmamembran (Fricker 2006), führte zu keinen nennenswerten Veränderungen der Kalzium-Signale (siehe auch Abbildung 3-11). Einen Einfluss der Kalzium-Kanäle der Plasmamembran auf die zyklisch auftretenden Kalzium-Signale in HUVECs konnte somit zum jetzigen Zeitpunkt nicht bestätigt werden. Allerdings schließt die fehlende Reaktion durch einen einzigen Inhibitor einen Einfluss von Plasmamembran-Kanälen nicht zwingend aus.

Inhibitoren haben oft eine unterschiedlich effektive Wirkung auf verschiedene, zelltypspezifische Protein-Subtypen (Taylor 1998; Bootman et al. 2002; Wall & Banes 2005). Ferner konnte für andere Zelltypen gezeigt werden, dass ein Kalzium-Einstrom durch Kanäle der Plasmamembran nicht der direkte Auslöser für Kalzium-Signale sein muss, sondern einen subtileren Einfluss bei der Modulation der Signale haben kann. So ließen sich zyklisch auftretende Kalzium-Signale in Myofibroblasten durch die Inhibierung von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen der Plasmamembran zwar nicht stoppen, jedoch kam es hierdurch zu einer leichten Veränderung der Kalzium-Frequenz (Chen et al. 2010). Eine solch geringe Veränderung könnte in der hier durchgeführten, rein qualitativen Begutachtung nicht detektiert werden.

Im Gegensatz zu Lanthan, führte die Zugabe von *2-APB* (*2-Aminoethyl-diphenyl-borat*) zu auffälligen Veränderungen der Kalzium-Signale in den Zellen. Die Zugabe von 100 μM *2-APB* führte bei den HUVECs zu einem drastischen Anstieg der detektierbaren Kalzium-Intensität (Abbildung 3-12). In der Literatur wird die Wirkung von *2-APB* kontrovers diskutiert. Wurde *2-APB* zunächst als Inhibitor von IP_3 -Rezeptoren beschrieben, der die IP_3 -vermittelte Ausschüttung von Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) verhindern sollte (Maruyama et al. 1997), deuten weitere Studien darauf hin, dass *2-APB* gleichermaßen SOCs inhibieren kann (Gregory et al. 2001; Bootman et al. 2002). In beiden Fällen ist durch Zugabe von *2-APB* mit einer Reduzierung der zytoplasmatischen Kalzium-Signale zu rechnen. Wiederum andere Gruppen konnten, z.B. für kardiale Myozyten, einen Anstieg der Kalzium-Konzentration nach Zugabe von *2-APB* nachweisen (Bootman et al.

2002). Dies steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen an HUVECs. Man vermutet, dass *2-APB* bei hohen Konzentrationen ebenfalls inhibierend auf SERCA-Pumpen wirkt (Missiaen et al. 2001; Bootman et al. 2002). Bei der Inhibition dieser Pumpen könnte das ER, nach erfolgter Ausschüttung, das Kalzium nicht wieder aus dem Zytosol aufnehmen.

Aufgrund der breiten und heterogenen Wirkung von *2-APB* auf die Generierung von Kalzium-Signalen sind die Ergebnisse bezüglich dieses Inhibitors nur schwer zu interpretieren. Allerdings konnte der Einfluss von SERCA-Pumpen auf zyklisch auftretende Kalzium-Signale in HUVECs, durch die Experimente mit *Thapsigargin* als spezifischer Inhibitor für SERCA-Pumpen, bestätigt werden (Abbildung 3-13) (Treiman et al. 1998). Eine Zugabe von 10 μM dieses Inhibitors führte bei den HUVECs zu einer vergleichbaren Erhöhung der zytoplasmatischen Kalzium-Intensität, wie bei den Experimenten mit *2-APB*. Der beobachtete Intensitätsanstieg dürfte daher durch eine inhibierte Rückführung des Kalziums in das ER verursacht worden sein. Es ist somit wahrscheinlich, dass das im ER gespeicherte Kalzium eine Hauptquelle für die Generierung zyklischer Kalzium-Signale in HUVECs darstellt.

Ein ebenfalls vielversprechendes Ergebnis lieferten die Experimente mit *ML-7*. In den hier durchgeführten Experimenten kam es nach Zugabe von 10 μM *ML-7* zu einer starken Veränderung der Kalzium-Regulation (Abbildung 3-14). Zwar traten in HUVECs noch vereinzelte Kalzium-Signale auf, im Allgemeinen stieg die zytosolische Kalzium-Intensität jedoch stark an. Bei *ML-7* handelt es sich um einen beschriebenen Inhibitor der MLKK (*Myosin leichte Ketten Kinase*) (Saitoh et al. 1987). Aufgrund dieser Wirkung führt die Zugabe von *ML-7* zu einer Verringerung der intrazellulären, kontraktilen Kräfte und folglich zu einer reduzierten Zellspannung. Der in den HUVECs beobachtete Effekt deutet somit auf eine direkte Kopplung zwischen dem kontraktilen Apparat und der Generierung von Kalzium-Signalen hin. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass es bei den Zellen nach Zugabe von *ML-7* auch zu globalen, morphologischen Veränderungen kam. Die eher rundliche Morphologie der Zellen nach Zugabe könnte zum einen auf das Erschlaffen des Zytoskeletts zurückzuführen sein. Zum anderen ist aber auch nicht auszuschließen, dass die Zellen durch die Zugabe von *ML-7* in die Apoptose übergingen, welche ebenfalls von konstant hohen Kalzium-Intensitäten begleitet sein kann (Carafoli 2003).

Es wird vermutet, dass Zellen mit ihrem Zytoskelett eine innere Grundspannung aufrecht erhalten, welche es ihnen ermöglicht mechanische Eigenschaften der Umgebung, wie beispielsweise die Substratsteifigkeit, zu erkennen (Discher et al. 2005). Weitere Untersuchungen, die für einen Zusammenhang zwischen intrazellulärer Spannung und dem

Verhalten von Endothelzellen sprechen, stammen von Krishnan et. al. (Krishnan et al. 2011). Sie konnten für Endothelzellen zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der Substratsteifigkeit und der von den Zellen generierten Kräfte besteht. Desweiteren demonstrierten sie, dass eine erhöhte Zellkraft die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und somit die Bildung eines Endothels negativ beeinflussen kann (Krishnan et al. 2011).

4.3 Raumzeitliche Analyse von Kalzium-Signal und Zellkontraktion in pränatalen, kardialen Myozyten

In diesem Abschnitt wird das Zusammenspiel zwischen Kalzium-Signalen und der daraus resultierenden Zellkontraktionen in pränatalen, kardialen Myozyten diskutiert. Hierbei steht die Analyse des zeitlichen Versatzes zwischen Kalzium-Signal und Zellkontraktion sowie die raumzeitliche Auflösung dieses Prozesses im Vordergrund.

4.3.1 Zeitliche Variationen der Kalzium-Signale in pränatalen, kardialen Myozyten

Durch die Depolarisation der Plasmamembran während der Anstiegsphase eines Aktionspotentials werden spannungsabhängige Kalzium-Kanäle geöffnet und somit das Kalzium-Signal der Zelle ausgelöst (Berne & Levy 2000; Bers 2002; Santana et al. 2010). Der zeitliche Verlauf des Kalzium-Signals beeinflusst, neben anderen Faktoren, wiederum den späten zeitlichen Verlauf des Aktionspotentials (Bers 2002; Santana et al. 2010). Durch diesen engen Zusammenhang lässt sich zu einem gewissen Maß aus der Ausprägung eines Aktionspotentials auf den zeitlichen Verlauf eines Kalzium-Signals schließen und umgekehrt. Der Großteil der hier untersuchten pränatalen, kardialen Myozyten wies Kalzium-Signale mit einer Dauer unterhalb von 600 ms auf (siehe Abschnitt 3.2.2). Der Anstieg der Signale erfolgte generell schneller als der Abfall der Kalzium-Intensität. Dieses passt auch zu der Dauer und Ausprägung von Aktionspotentialen in kardialen Myozyten (Berne & Levy 2000; Bers 2002; Santana et al. 2010).

Trotz des vergleichbaren Zeitfensters (< 600 ms) für den Großteil der hier untersuchten Kalzium-Signale zeigten die pränatalen, kardialen Myozyten sehr unterschiedliche zeitliche Kalzium-Signalverläufe (siehe Abschnitt 3.2.2). Diese waren von Zelle zu Zelle sehr individuell ausgeprägt, weshalb eine genauere Klassifizierung unterschiedlicher Signaltypen nicht möglich war. Die Überlagerung der einzelnen Signale einer jeweiligen Zelle zeigte jedoch, dass die Signale in ihrer Ausprägung über den Zeitraum der Messung sehr konstant blieben (siehe Abbildungen in Abschnitt 3.2.8). Hieraus lässt sich schließen, dass es sich nicht um artifiziell erzeugte Kalzium-Signale handelte, sondern dass sie für die jeweilige Zelle reproduzierbar reguliert wurden.

Bei den hier verwendeten primären Zellen handelte es sich um eine Gesamtsolation aus mehreren Herzen der Embryonen eines Muttertiers. Auch wenn die Zellen zum Zeitpunkt der

Isolation (pränatal Tag 18-19) noch nicht völlig entwickelt sind, ist zu erwarten, dass sie bereits deutliche Unterschiede in der Regulation je nach ursprünglicher Lage im Herzen aufweisen. Hinzu kommt, dass die Zellen bis zur tatsächlichen Messung nochmals für zwei bis drei Tage auf elastischen Substraten ($E = 15 (1\pm 15\%)$ kPa; siehe Abschnitt 2.2.2) kultiviert wurden. Es ist beschrieben, dass sich Myozyten auf Substraten dieser Steifigkeit gut entwickeln können (Jacot, Martin, et al. 2010; Jacot et al. 2008; Bajaj et al. 2010). Bedenkt man die kurze Tragzeit einer Ratte von etwa 21-22 Tagen, so ist klar, dass die untersuchten Zellen bereits zwischen den Messtagen Unterschiede in ihrer Entwicklung und Funktion aufweisen können.

Im Herzen weisen Myozyten je nach ihrer Funktion unterschiedliche Aktionspotentiale auf (T. Watanabe et al. 1983; Berne & Levy 2000). So könne bereits die unterschiedliche Lage von adulten Myozyten innerhalb des Ventrikels zu Variationen ihres Aktionspotentials führen (Main & Bryant 1998). Da, wie zuvor beschrieben, die Form eines Aktionspotentials unter anderem durch die zeitlichen Veränderungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration mitbestimmt werden, könnten die hier ermittelten Variationen der Kalzium-Signale ebenfalls auf eine unterschiedliche Funktion und Regulation der einzelnen Zelle aus der untersuchten heterogenen Population zurückzuführen sein.

4.3.2 Räumliche Variationen der Kalzium-Signale in pränatalen, kardialen Myozyten

Neben den zuvor beschriebenen zeitlichen Variationen der Kalzium-Signale wiesen die hier untersuchten pränatalen Myozyten auch Unterschiede in der räumlichen Ausbreitung der Kalzium-Signale auf (siehe Abschnitt 3.2.3). So gab es neben Zellen mit einer schnellen, räumlich homogenen Ausbreitung ihres Kalzium-Signals auch Zellen mit räumlich heterogener Signal-Ausbreitung. Bei solchen Zellen kam es in der Regel zunächst zu einem lokalen Anstieg der intrazellulären Kalzium-Intensität, welche sich in der Zelle fortpflanzte und anschließend zu einem globalen Kalzium-Signal führte. Diese unterschiedlichen räumlichen Signalmuster traten nicht nur zwischen unterschiedlichen Messungen, sondern auch innerhalb derselben Messung für unterschiedliche Zellen auf (Abbildung 3-36). Variationen zwischen den Messungen, wie beispielsweise das Zellalter oder die Beladung mit *Fluo-4*, sind als Hauptursache an dieser Stelle daher unwahrscheinlich. Ein Teil der hier untersuchten Zellen wies eine zunächst langsam ansteigende Flanke im zeitlichen Kalzium-Signal auf. Diese ließ sich bei näherer räumlicher Betrachtung meist auf räumlich heterogene

Verteilungsmuster zurückführen. Eine quantitative Analyse dieses Zusammenhangs konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen. Dennoch passen diese ersten Ergebnisse gut zu bereits beschriebenen Untersuchungen an anderen kardialen Myozyten. So konnte mittels konfokalen Linienintensitätsanalysen für adulte atriale Myozyten (Herzmuskelzellen des Vorhofes) eine wellenartige Signalfortpflanzung festgehalten werden (Smyrniak et al. 2010). Desweiteren konnte für diese Zellen gezeigt werden, dass sie Gegensatz zu adulten, ventrikulären Myozyten nur ein schwaches oder gar kein T-Tubensystem (transversale Tuben) ausbilden (Smyrniak et al. 2010). Auch Zellen, bei denen das T-Tubensystem zerstört wurde (artifizial sowie pathologisch), weisen häufig eine wellenartige Ausbreitung ihres Kalzium-Signals auf (Louch et al. 2010; Smyrniak et al. 2010; Brette & Orchard 2003). Die Ausprägung des T-Tubensystems hat somit einen großen Einfluss auf die intrazelluläre Ausbreitung von Kalzium-Signalen (Song et al. 2005). Adulte, ventrikuläre Myozyten besitzen eine komplexe, hoch geordnete räumliche Kopplung zwischen Erregungssystem und krafterzeugendem Apparat (vgl. Abschnitt 1.4) (Song et al. 2005). Diese Organisation ist jedoch Bestandteil eines langwierigen Differenzierungsprozesses. So haben Untersuchungen an neonatalen Myozyten aus der Ratte gezeigt, dass das sarkoplasmatische Retikulum (SR) schon früh in der Entwicklung der Zellen mit Sarkomeren in Verbindung steht, jedoch bildet sich das T-Tubensystem erst nach der Geburt vollständig aus (Ziman et al. 2010). Es ist daher davon auszugehen, dass die hier analysierten pränatalen Myozyten ebenfalls noch kein oder nur ein sehr schwach ausgeprägtes T-Tuben-System aufweisen.

4.3.3 Zeitlicher Versatz Δt zwischen Kalzium-Signal und Substratdeformation

Während die elektromechanischen Kopplung (EMK) in adulten Myozyten bereits intensiv untersucht wurde (Bers 2002), ist bisher wenig bekannt über die zeitlichen Abläufe während der Zellkontraktion nicht vollständig ausdifferenzierter Myozyten (Ziman et al. 2010). Im weiteren wurde daher für pränatale, kardiale Myozyten untersucht, wie groß der zeitliche Versatz Δt zwischen der Einleitung des Kalzium-Signals und der daraus resultierenden Kontraktion ist (vgl. Abschnitt 3.2.6). Die Zellkontraktion wurde indirekt über die von der Zelle ausgeübte Deformation des elastischen Substrates ermittelt (Die Vor- und Nachteile dieser Methode werden im Abschnitt 4.4 näher diskutiert).

Für die Messungen an Einzelzellen ergab sich für Δt ein Wert von 44 ms ($\sigma = 27$ ms) (vgl. Abschnitt 3.2.6). Dieser Wert stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen zeitlichen

Versatz in adulten ventrikulären Myozyten aus der Ratte gut überein. Anhand konfokal gemessener Linienintensitätsprofile zeigten Cannell und Mitarbeiter bereits 1994 exemplarisch einen zeitlichen Versatz von etwa 58 ms (Mark B. Cannell et al. 1994). Trotz der unterschiedlichen mikroskopischen Methoden und Auswertungen lassen sich also vergleichbare Ergebnisse für den zeitlichen Versatz bei pränatalen Myozyten bestimmen.

Neben der Untersuchung von Einzelzellen wurde hier in ersten Experimenten auch für kleinere Zellverbände Δt ermittelt (siehe Abschnitt 3.2.6). Hierbei deutet sich an, dass mit steigender Anzahl an Zellen im Verband der zeitliche Versatz zunimmt. Dieses könnte darauf hinweisen dass die interzelluläre Kommunikation einen zusätzlichen Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der EMK hat. Aufgrund der geringen Anzahl an Experimenten können jedoch noch keine abgesicherten Aussagen hierzu getroffen werden, weshalb diese Ergebnisse hier nicht weiter diskutiert werden.

Auffällig ist, dass sowohl für Einzelzellen als auch für Zellverbände Δt eine hohe Streuung aufwies (siehe Abschnitt 3.2.6). Zusätzlich liegt der Median für Δt in beiden Fällen deutlich unterhalb des Mittelwerts für Δt . Den gemessenen Werten liegt somit keine Normalverteilung zugrunde. Auch dieses ist wahrscheinlich auf die heterogene Population der untersuchten Zellen und ihrer komplexen Regulation zurückzuführen. Um die Komplexität möglichst gering zu halten, beziehen sich daher alle folgenden Interpretationen, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, auf die Beobachtungen an Einzelzellen.

4.3.4 Zusammenhang zwischen zeitlichem Versatz und der Kontraktionshäufigkeit pränataler, kardialer Myozyten

Ein Parameter der einen klaren Zusammenhang zum jeweils ermittelten zeitlichen Versatz einer Zelle aufwies war die Kontraktionshäufigkeit f_F der Zelle (vgl. Abschnitt 3.2.7). Für Einzelzellen lag der Median der ermittelten Kontraktionshäufigkeit bei 13 Schlägen innerhalb der beobachteten 13 Sekunden (entspricht 1 Hz). Aus den in Abbildung 3-26 aufgeführten Ergebnissen lässt sich die Tendenz ableiten, dass Zellen mit einer höheren Kontraktionshäufigkeit auch einen niedrigeren zeitlichen Versatz zwischen Kalzium-Signal und Kontraktion aufweisen. Bis auf zwei Ausnahmen¹ lagen die ermittelten Δt -Werte für Zellen mit einer Kontraktionshäufigkeit > 1 Hz in einem Bereich von ungefähr 15 – 45 ms.

¹ Diese beiden Zellen wurden in Abschnitt 3.2.10 nochmals näher analysiert und werden im Abschnitt 4.3.7 separat diskutiert.

Zellen mit einer niedrigeren Frequenz (< 1 Hz) wiesen dagegen eine deutlich höhere Streuung ($\sim 20 - 140$ ms) auf. Diese Tendenz zeigte sich auch bei den untersuchten Zellverbänden.

An dieser Stelle kann keine klare Aussage darüber getroffen werden, warum es zu der oben beschriebenen Abhängigkeit zwischen Δt und f_F kommt. Um einen besseren Eindruck zu bekommen, warum es gerade bei niedrigeren Frequenzen (< 1 Hz) auch zu deutlich höheren zeitlichen Versätzen kommen konnte, wurden in den nächsten Schritten die Kalzium-Signale während der Kontraktion sowie die Morphologie einzelner Zellen in diesem Kontext näher untersucht (vgl. Abschnitt 3.2.8).

4.3.5 Einfluss der Signalbreite auf den Zusammenhang zwischen Δt und f_F

Bei der Untersuchung der Signalformen zeigt sich, dass Zellen mit niedrigen Kontraktionshäufigkeiten auch häufig eine lange Kontraktionsphase aufweisen (Dauer der Kalzium-/Deformationssignale > 600 ms; vgl. Abschnitt 3.2.8). Ob diese langsame Kontraktionsphase zu einer niedrigeren Frequenz führt, oder ob eine niedrige Kontraktionshäufigkeit überhaupt erst das Auftreten breiter Signale ermöglicht, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig aufgeklärt werden. Es scheint jedoch wahrscheinlicher, dass eine verlangsamte Kontraktionsphase die Kontraktionshäufigkeit beeinflusst, da eine Zelle zunächst in ihren Ruhezustand zurückkehren muss, um eine neue, effektive Kontraktion auszuführen zu können (Berne & Levy 2000). Ferner zeigt sich, dass bei vergleichbar langsamen Kontraktionsphasen sowohl kleine als auch große Werte für den zeitlichen Versatz auftreten können (vgl. Abbildung 3-27 bis Abbildung 3-29). Hierdurch erscheint die Signal-Breite als Hauptverursacher des hohen zeitlichen Versatzes bei niedrigen Kontraktionshäufigkeiten als unwahrscheinlich. Der zeitliche Versatz Δt zwischen Kalzium-Signal und Zellkontraktion sowie die Dauer und Häufigkeit der Kontraktionen könnten jedoch gemeinsam durch übergeordnete Faktoren bestimmt werden. Einen Einfluss könnte hierbei beispielsweise die Zellmorphologie haben, welche daher für die untersuchten Zellen im Einzelnen näher begutachtet wurde.

4.3.6 Einfluss der Zellmorphologie auf den Zusammenhang zwischen Δt und f_F

Beim visuellen, qualitativen Vergleich der Zellmorphologie zwischen Zellen mit niedriger Kontraktionshäufigkeit, aber unterschiedlichen zeitlichen Versätzen und Zellen mit ähnlich niedrigen zeitlichen Versätzen, jedoch unterschiedlichen Kontraktionshäufigkeiten deutet sich

eine Abhängigkeit an (vgl. Abschnitt 3.2.8). So weisen Zellen mit einer niedrigen Kontraktionshäufigkeit eher dreieckige Zellformen auf, während Zellen mit einem niedrigen zeitlichen Versatz eher eine längliche Form zeigen. Die einzelnen kontraktilen Fasern (Myofibrillen) lagen in länglichen Zellen tendenziell dichter beieinander und waren parallel zur Längsachse der Zelle ausgerichtet. In eckigen Zellen waren zwar meist mehrere Fasern parallel entlang der Zellränder ausgerichtet, eine klare Vorzugsrichtung aller Fasern einer Zelle gab es jedoch nicht. Der hier beobachtete Zusammenhang zwischen Form der Zelle und der Organisation ihrer Myofibrillen steht im Einklang mit den Ergebnissen von Geisse et al. (Geisse et al. 2009). In den von ihnen durchgeführten Untersuchungen waren sie mittels Mikrokontaktdruck¹ in der Lage, kardiale Myozyten in definierten Zellformen zu kultivieren. Hierbei zeigte sich, dass sich die Myofibrillen in Zellen mit einer rechteckigen Form (Aspekt-Verhältnis > 3:1) sehr gleichmäßig und parallel zueinander anordnen. In Zellen mit einer dreieckigen Morphologie verliefen die Myofibrillen parallel zu den Zellrändern und wiesen eine deutlich niedrigere Ordnung auf. Dies zeigt, dass die Zellform einen klaren Einfluss auf die Organisation des intrazellulären kontraktilen Apparats haben kann.

Da die Untersuchungen von Geisse et al. auf Glassubstraten erfolgten, konnte die Kontraktion der Zellen nicht analysiert werden. Auch das Kalzium-Signal wurde bei diesen Zellen nicht näher untersucht.

Durch parallel liegende Myofibrillen ist die Kraftübertragung einer Zelle deutlich effektiver, als wenn die einzelnen Fasern ohne Vorzugsrichtung in der Zelle verteilt vorliegen. Dies wird durch den in Abschnitt 3.2.9 aufgeführten Vergleich zwischen einer länglichen Zelle mit parallel ausgerichteten, dicht zusammenliegenden Fasern und einer rundlichen Zelle mit weniger geordneten Fasern nochmals verdeutlicht. Bei der länglichen Zelle ist die Deformation des Substrats vor allem längs der Zelle auf die Enden der Fasern konzentriert (Abbildung 3-33). Bei der rundlichen Zelle kommt es in den Bereichen mit ungeordneten Fasern dagegen kaum zu einer Substratdeformation (Abbildung 3-34). Zu beachten ist jedoch, dass bei einem Anstieg der Kalzium-Konzentration die kontraktilen Untereinheiten (Sarkomere), unabhängig von der Ausrichtung der Faser, stimuliert werden sollten (Bers 2002; Song et al. 2005). Die Ausrichtung von kontraktilen Fasern ist somit zwar ein kritischer Faktor für die Effektivität der Zellkontraktion, jedoch lassen sich hierdurch die Unterschiede des zeitlichen Versatzes nicht direkt erklären.

¹ Mit der Mikrokontaktdruck-Methode können im Mikrometermaßstab definierte Bereiche mit Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtet werden. Zellen adhären nur auf diesen „adhäsiven Inseln“ und passen sich der Form dieser an.

Der Aufbau und die Regulation des kontraktiven Apparates sind sehr komplex, und unterlaufen während der Entwicklung stetigen Veränderungen (Ferrari et al. 2006; Sanger et al. 2010; Ono 2010). Hierbei kommen mehrere Aspekte in Frage, die einen Einfluss auf den zeitlichen Versatz zwischen Kalzium-Signal und der Zellkontraktion haben können. Diese betreffen sowohl die Generierung der Kalzium-Signale als auch die Erregbarkeit des kontraktiven Apparats.

Zum einen ist beschrieben, dass sich das T-Tubensystem in neonatalen Myozyten der Ratte erst einige Tage nach der Geburt voll entwickeln (Ziman et al. 2010). Zudem sind sie normalerweise nahe der Z-Banden des Sarkomers lokalisiert (Soeller & M B Cannell 1999; Song et al. 2005; Louch et al. 2010). Es wird vermutet, dass bei Zellen mit schwach ausgeprägtem T-Tubensystem die intrazelluläre Signalfortpflanzung über Diffusion und Kalzium-abhängiger-Aktivierung benachbarter Ryanodin-Rezeptoren entlang des SRs eine größere Rolle spielen, was eine intrazelluläre Signalweiterleitung verlangsamen könnte (Song et al. 2005; Louch et al. 2010; Smyrnias et al. 2010). Durch die Organisation der Myofibrillen, könnte die Lokalisation sowohl für T-Tuben als auch für das SR negativ beeinflusst werden.

Zum anderen hat auch der Aufbau der Sarkomere und Myofibrillen einen Einfluss auf die Kontraktionsgeschwindigkeit. So konnten Iorga et al. für einzelne Myofibrillen aus den Skelett- und Herzmuskeln des Zebrafischs *in vitro* deutliche Unterschiede in ihrer Kontraktionsdynamik nachweisen (Iorga et al. 2011). Zudem zeigten sich hier auch Unterschiede in der Kontraktionsdynamik zwischen skelettalen Myozyten der Fischlarve und des adulten Fisches (kardiale Myozyten aus der Fischlarve wurden jedoch nicht analysiert). Es ist bekannt dass sich die Proteinzusammensetzung der Sarkomere über den Zeitraum ihrer Entwicklung verändern (Stehle et al. 2007; Sanger et al. 2010; Ono 2010). Eine hohe Ordnung der Myofibrillen, könnte hier für eine reifere und somit effektivere Zusammensetzung der Sarkomere sprechen.

Desweiteren können auch regulatorische Prozesse einen Einfluss auf die Kontraktionsdynamik von Myofibrillen haben. So konnte beispielsweise *in vitro* nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von *Troponin I* einen Einfluss auf die Gleitgeschwindigkeit von Myosin entlang der Aktin-Filamente hat (Messer et al. 2007; Layland et al. 2005). Die Sarkomere morphologisch unterschiedlicher Myozyten könnten somit auch unterschiedlichen Regulationen unterliegen.

Welche Prozesse die in dieser Arbeit dargestellten Veränderungen des zeitlichen Versatzes in Abhängigkeit der Zellmorphologie bewirkt haben, kann hier nicht abschließend beantwortet

werden. Es scheint jedoch sehr wahrscheinlich, dass eine unterschiedliche Zellmorphologie und Organisation der Myofibrillen auch eine komplexe Veränderung der Zusammensetzung und Regulation mit sich bringt. Die Unterschiede im Δt in Abhängigkeit der Zellmorphologie dürften sich somit aus dem Zusammenwirken mehrerer Faktoren ergeben.

4.3.7 Synchronisierung benachbarter Zellen

Bei der in Abschnitt 3.2.7 beschriebenen Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem zeitlichen Versatz und der Kontraktionshäufigkeit wiesen zwei Zellen eine Abweichung gegenüber anderen Zellen auf. Diese beiden Zellen stammten aus einer einzelnen Messung, wurden jedoch separat als Einzelzellen ausgewertet. Bei einer näheren Betrachtung zeigte sich, zum einen, dass beide Zellen mit einer weiteren nicht-Muskelzelle in Verbindung standen, und zum anderen, dass ihre Kontraktionen synchron zueinander verliefen (siehe Abschnitt 3.2.10). Es ist somit davon auszugehen, dass zwischen beiden Zellen eine Kommunikation erfolgt sein muss, was ihr abweichendes Verhalten erklären könnte.

Die Frage, wie Myozyten ohne einen direkten Kontakt zueinander miteinander kommunizieren, wird in der Fachliteratur derzeit diskutiert. Zum einen vermutet man, dass auch Fibroblasten, welche eigentlich als nicht-erregbare Zellen gelten, einen Einfluss bei der Kommunikation zwischen einzelnen kardialen Myozyten spielen können (Kohl et al. 2005). Es wäre daher möglich, dass die Zelle, welche mit beiden Myozyten in Kontakt stand, eine Signal-Kopplung zwischen ihnen ermöglicht hat. Zudem ist bekannt, dass kardiale Myozyten auch auf externe Kräfte reagieren können. Hier ist jedoch noch nicht klar, über welche Distanzen eine solche Kommunikation möglich ist (Tang et al. 2011).

Zwar handelt es sich hierbei nur um eine einzelne Beobachtung, weshalb sich der regulatorische Mechanismus, welcher der hier aufgezeigten Synchronisation zugrunde liegt, zum jetzigen Zeitpunkt nicht klären lässt. Dennoch zeigt diese Beobachtung, dass das hier entwickelte Messverfahren geeignet ist um den oben genannten Fragestellungen näher auf den Grund zu gehen. So lassen sich durch die hohe zeitliche Auflösung dieser Methode beispielsweise die zeitlichen Parameter, mit der eine Signalweiterleitung über weitere Zellen erfolgt, ermitteln. Desweiteren lassen sich aufgrund der räumlichen Auflösung aber auch extern auf die Zelle wirkende Kräfte bestimmen.

4.4 Experimenteller Aufbau zur raumzeitlichen Analyse von Myozyten

Für die im Abschnitt 3.2 beschriebenen Untersuchungen an pränatalen, kardialen Myozyten, welche im Abschnitt 4.3 diskutiert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein mikroskopischer Aufbau etabliert, der simultane Zweikanal-Aufnahmen in hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglichte. Zusätzlich wurden Programme zur Detektion der Substratdeformation über die Zeit sowie zum zeitlichen Vergleich einzelner Signale erstellt. Die hier verwendete Methode bietet klare Vorteile gegenüber anderen etablierten Methoden zur korrelativen Analyse von Kalzium-Signalen und Kontraktionen in Myozyten, weist jedoch auch gewisse Limitierungen auf. Die Vor- und Nachteile werden in diesem Abschnitt näher diskutiert.

4.4.1 Quantitative Messungen der Substratdeformation als Maß der Zellkontraktion

Für das hier entwickelte Programm zur *Struktur-Verschiebungsanalyse* (siehe Abschnitt 2.5.2) konnte gezeigt werden, dass es vergleichbare Ergebnisse für relative Veränderungen der Substratdeformation liefert, wie das bereits für quantitative Messungen etablierte Programm zur *Zellkraft-Analyse* (vgl. Abschnitt 3.2.4) (Merkel et al. 2007; Cesa et al. 2007). Jedoch ergaben sich, im Vergleich zu dieser *Zellkraft-Analyse* bei der hier verwendeten Methode Unterschiede in den absoluten Werten der lokalen Verschiebungen. Dies ist hauptsächlich auf die Verwendung größerer Bild-Schablonen zurückzuführen (vgl. Abschnitte 2.5.2 und 3.2.4). Die Größe der Schablonen wurde bei der *Struktur-Verschiebungsanalyse* so gewählt, dass sich in jeder Schablone mindestens eine fluoreszierende Kugel befand. Im Durchschnitt wurde die Struktur-Information einer Schablone jedoch durch mehrere Kugeln bestimmt.

Bei den verwendeten strukturierten Silikonsubstraten handelt es sich um ein elastisches Material (Campbell & Beckman 1999; Cesa et al. 2007). Von der Zelle ausgeübte Kräfte führen daher nicht nur zu einer starren Verschiebung, sondern auch zu einer elastischen Verformung des Substrates. Da bei der *Zellkraft-Analyse* kleine Schablonen um einzelne Kugeln erstellt werden, spielt die lokale Verformung des Substrates bei dieser Methode nur eine geringe Rolle. Bei der *Struktur-Verschiebungsanalyse* ist jedoch davon auszugehen, dass sich die in den Schablonen befindlichen Strukturen sowohl verschieben als auch verformen. Mittels Kreuzkorrelation von Bildausschnitten lassen sich jedoch nur mittlere Verschiebungen eines Musters bestimmen. Eine Verformung des Musters äußert sich hierbei in einem

niedrigeren normierten Korrelationskoeffizienten (siehe Abschnitt 2.5.2; Gl. 2-5). Die mit der *Struktur-Verschiebungsanalyse* berechneten Verschiebungsamplituden entsprechen somit nicht den tatsächlichen absoluten Verschiebungen in dieser Position. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hauptsächlich Vergleiche zwischen den Deformationsveränderungen, nicht jedoch der absoluten Kräfte der Zellen angestellt. Aufgrund des deutlich reduzierten Rechenaufwandes gegenüber dem Programm der *Zellkraft-Analyse* bot das hier erstellte Programm der *Struktur-Verschiebungsanalyse* daher klare Vorteile für diese Experimente.

4.4.2 Indirekte Bestimmung der Zellkontraktion

Eine Limitierung der hier verwendeten Methode ist, dass die Substratdeformation nur ein indirektes Maß für die Kontraktion einer Zelle darstellt. So findet eine Deformation da statt, wo die Zugkraft der Zelle auf das Substrat wirkt, nicht jedoch dort, wo diese Kraft in der Zelle generiert wird (Munevar et al. 2001; Cesa et al. 2007; Möhl et al. 2009). Im Fall der hier untersuchten Myozyten konnte somit lediglich die Substratdeformation aller aufsummierten kontraktilen Untereinheiten (Sarkomere) einer Myofibrille detektiert werden (vgl. Abbildung 3-33 und Abbildung 3-34). Zwar konnten mit dieser Methode auch räumliche Veränderungen dieser Substratdeformation über die Zeit detektiert werden (vgl. Abbildung 3-37), ein präziser räumlicher Vergleich zwischen Kalzium-Signal und Kontraktionsapparat ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich. Ein Ansatz zur direkteren räumlichen Analyse der Zellkontraktion ist die korrelative Analyse kontrastreicher Strukturen innerhalb der Zellen. Durch ähnliche Bildkorrelationsanalysen wie die hier verwendeten konnten Kamgoué et al. an Durchlicht-Aufnahmen sehr aussagekräftige Analysen zur lokalen Kontraktion adulter Myozyten durchführen (Kamgoué et al. 2009). Diese Aufnahmen waren jedoch nur möglich, da diese adulten, kardialen Myozyten eine sehr geordnete und im Durchlicht kontrastreich erscheinende Sarkomer-Struktur besaßen. Nicht voll entwickelte Myozyten zeigen jedoch eine geringere Ordnung und erscheinen daher im Durchlicht kontrastärmer (Ziman et al. 2010; Bootman et al. 2011; Kamgoué et al. 2009). So gibt es auch bei dieser Methode gewisse Limitierungen bei der Untersuchung pränataler Myozyten (Kamgoué et al. 2009)¹.

Eine weitere Option zur direkten Analyse lokaler Kontraktionen ist die gezielte Markierung der kontraktilen Sarkomer-Einheiten mittels fluoreszenter Proteine. Erste Tests an pränatalen Myozyten, welche mit GFP- α -Aktinin markiert wurden, lieferten bereits vielversprechende

¹ Erste selbst durchgeführte Testaufnahmen mit den hier erstellten Bildkorrelations-Analysen zeigen, dass kontrastarme Strukturen innerhalb der pränatalen Myozyten über den Zeitraum der Messungen nicht korrekt verfolgt werden.

Ergebnisse. Zu beachten ist jedoch, dass GFP-Fusionsproteine aufgrund der Überlagerung der Fluoreszenzspektren nicht für die gemeinsame Analyse mit *Fluo-4* geeignet sind, weshalb auf alternative fluoreszente Proteine ausgewichen werden muss.

4.4.3 Zeitliche Auflösung des Messsystems

Eine der Hauptlimitierungen bei den hier durchgeführten Untersuchungen war die zeitliche Auflösung. Zwar erreichen sCMOS-Kameras eine hohe Ausleserate, diese wird jedoch vor allem durch die für die experimentelle Fragestellung benötigte räumliche Auflösung und Belichtungszeit beschränkt. Für die hier durchgeführten Messungen der Substratdeformation war zwar eine räumliche Mindestauflösung¹ nötig, dennoch war der hauptsächlich limitierende Faktor hierbei die Lichtausbeute bei der Detektion von *Fluo-4*. Die Messungen konnten daher nur mit einer Aufnahmezeit von 50 Hz erfolgen. Bei der gewählten Bildauflösung wäre jedoch eine Bildrate von 100 Hz möglich gewesen.

Durch die verwendete Interpolation bei der Bestimmung der Signalfanken (Abschnitt 2.5.3) konnte die zeitliche Auflösung bei der Analyse des zeitlichen Versatzes gesteigert werden. Bedingt durch das Signalrauschverhältnis der Messungen ist die Genauigkeit der bestimmten Δt -Werte bei etwa ± 5 ms anzusiedeln ($1/4$ des Aufnahmeintervalls). Präzise Untersuchungen lokaler elementarer Kalzium-Signale (< 50 ms) sind jedoch nicht möglich, da sie mit der derzeitigen Belichtungszeit von 20 ms/Bild zeitlich nicht hinreichend abgetastet werden können (H. Cheng et al. 1993; Berridge 1997a). Längere lokale Ereignisse wie Kalzium-Wellen lassen sich jedoch bereits gut mit der hier verwendeten Methode detektieren (siehe Abschnitte 3.2.3 & 3.2.10).

4.4.4 Räumliche Auflösung des Messsystems

Eine der verbreitetsten Methoden zur Analyse von Kalzium-Signalen während der Zellkontraktion ist die Erstellung von Linienintensitätsprofilen mittels konfokaler Mikroskopie (H. Cheng et al. 1993). Durch diese Methode können Kalzium-Signalprozesse in der Zelle mit einer hohen Geschwindigkeit (< 2 ms pro Linie) analysiert werden, ihre räumliche Auflösung ist jedoch stark limitiert (H. Cheng et al. 1994; Smyrnias et al. 2010; Mark B. Cannell et al. 1994). Zwar lassen sich mit dieser Methode die Verkürzungen von

¹ Die untersuchten Zellen besaßen in etwa eine Größe von $100 \mu\text{m}$. Die verwendeten fluoreszierenden Kugeln waren 200 nm groß. Um die Kugeln noch ausreichend gut und getrennt voneinander detektieren zu können wurde eine Bildpunktauflösung von $(0,325 \mu\text{m})^2$ pro Pixel gewählt. Hieraus ergab sich eine Auflösung von 480×540 Pixel. Da für die Aufnahme jeweils 2×2 Bildpunkte zusammengefasst wurden, entsprach dies einer Auflösung von 960×1080 Pixeln auf dem Kamera-Sensor für jeden der beiden aufgenommenen Kanäle.

länglichen Zellen mit einer klaren Vorzugsrichtung der kontraktilen Fasern als Maß der Zellkontraktion bestimmen (Mark B. Cannell et al. 1994; Mackenzie et al. 2004), bei Zellen ohne Vorzugsrichtung ihres kontraktilen Apparats oder auch bei mehreren Zellen im Verband ist eine simultane Analyse von Kalzium-Signalen und Zellkontraktion jedoch nicht mehr möglich. Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen besaßen nicht immer eine längliche Zellmorphologie und wiesen häufig keine klaren Vorzugsrichtungen ihrer Myofibrillen auf (vgl. Abschnitt 3.2.8). Zudem zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse sowie Forschungsergebnisse anderer Arbeitsgruppen, dass räumliche Signalprozesse ebenfalls einen gravierenden Einfluss bei der elektromechanischen Kopplung haben (H. Cheng et al. 1994; Smyrnias et al. 2010; Ziman et al. 2010). Bei der Untersuchung mittels Linienintensitätsprofil-Messungen geht hier jedoch ein Großteil der räumlichen Information verloren. Eine vergleichende Analyse der elektromechanischen Kopplung von Zellen mit unterschiedlicher Morphologie, wie sie im Rahmen dieser Arbeit erfolgte, ist mit Linienintensitätsprofil-Messungen nicht möglich.

Durch die Verwendung einer hochauflösenden sCMOS-Kamera konnte im Rahmen dieser Arbeit, sowohl das Kalzium-Signal als auch die ausgeübte Substratdeformation simultan über die gesamte Zelle detektiert werden. Neben diesem deutlichen Zugewinn an räumlicher Information, war es durch die *Struktur-Verschiebungsanalyse* zudem möglich, die von einer Zelle ausgeübte Substratdeformation unabhängig von der Zellmorphologie quantitativ zu bestimmen.

Neben der Analyse von Einzelzellen konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits exemplarisch gezeigt werden, dass mit dieser Methode auch benachbarte Zellen oder kleinere Zellverbände in Hinblick auf ihr raumzeitliches Zusammenspiel von Kalzium-Signal und der ausgeübten Substratdeformation untersucht werden können (siehe Abschnitte 3.2.6 und 3.2.10). Die Ergebnisse der hierzu durchgeführten Messungen konnten aufgrund ihrer niedrigen Statistik jedoch nicht auf ihre biologische Bedeutung hin diskutiert werden. Dennoch verdeutlichen sie das große Potential dieser Methode für weiterführende Untersuchungen von Zell-Zell-Interaktionen in Zellverbänden (siehe Abschnitt 4.3.7).

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit wurden intrazelluläre Kalzium-Signale bei unterschiedlichen mechanischen Prozessen untersucht. Die hierbei gewonnenen zentralen Erkenntnisse sollen hier kurz zusammengefasst und ein Ausblick auf hierauf aufbauende Untersuchungen gegeben werden.

Endothelzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Frequenzen der Kalzium-Oszillationen in humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs) quantitativ bestimmt. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass HUVECs spezifische Kalzium-Frequenzen auf unterschiedlichen Substratsteifigkeiten aufweisen. Diese Erkenntnis spricht für einen Einfluss der Kalzium-Oszillationen bei der Wahrnehmung der Umgebungssteifigkeit bei diesen Zellen. Desweiteren zeigen erste Inhibitor-Versuche, dass die Kalzium-Signale in HUVECs durch die innere Spannung der Zellen beeinflusst werden können. In weiterführenden Experimenten sollte untersucht werden, ob HUVECs auch für weitere Steifigkeitsbereiche spezifische Kalzium-Frequenzen zeigen, und inwiefern diese mit Veränderungen des Zellverhaltens, wie beispielsweise Morphologie, Migration oder Proliferation, einhergehen. Zusätzlich sollte hierbei auch die jeweilige Ausprägung des krafterzeugenden Apparats der Zellen näher charakterisiert werden. Der Fokus sollte hierbei sowohl auf der strukturellen Analyse der Fokaladhäsionen und des Aktin-Zytoskeletts liegen als auch die quantitative Analyse der von den Zellen hervorgebrachten Kräfte umfassen. Zudem können mit der hier erstellten quantitativen Analyse auch die Kalzium-Frequenzen anderer Zelltypen bestimmt werden. Hieraus können Parallelen sowie Unterschiede im Signalverhalten unterschiedlicher Zelltypen abgeleitet werden.

Pränatale, kardiale Myozyten

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für pränatale, kardiale Myozyten sehr heterogene räumliche Ausbreitungsmuster ihrer Kalzium-Signale nachgewiesen werden. Durch die erstellten Bildanalyseverfahren konnte zudem der raumzeitliche Verlauf der Substratdeformation, als Maß der Zellkontraktion, unabhängig von der Zellform quantitativ bestimmt und somit der zeitliche Versatz zwischen Kalzium-Signal und Zellkontraktion untersucht werden. In Verbindung mit qualitativen Vergleichen der untersuchten Zellen konnte hierdurch gezeigt werden, dass die Morphologie der Zellen sowie die Ausprägung ihrer Myofibrillen einen

Einfluss auf den zeitlichen Verlauf der elektromechanischen Kopplung haben. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen ergibt sich eine Vielzahl neuer möglicher Experimente.

In erster Linie sollte in den nächsten Schritten der oben geschilderte Zusammenhang zwischen Zellmorphologie und dem zeitlichen Versatz bei der elektromechanischen Kopplung auf Einzelzellebene näher analysiert werden. Der Fokus sollte hier vor allem auf der Analyse des zeitlichen Versatzes bei unterschiedlichen Ausprägungen der intrazellulären Strukturen, wie beispielsweise der Myofibrillen oder des T-Tubensystems, liegen. Die Kombination mit der Mikrokontaktdruck-Technik könnte diesen Vergleich in reproduzierbaren Zellformen ermöglichen.

Durch den hohen räumlichen Informationsgewinn bei dem hier entwickelten Analyseverfahren gegenüber anderen etablierten Methoden, kann die elektromechanische Kopplung künftig auch auf multizellulärer Ebene analysiert werden. Die Analyse von Zell-Zell-Interaktionen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit bereits exemplarisch gezeigt wurde, bieten ein enormes Potential und können entscheidend zum Verständnis der Frage beitragen, wie die Zell-Zell-Kommunikation die Kontraktion im Herzen mitreguliert.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
2-APB	2-Aminoethyl-diphenyl-borat
AM	Acetooxymethylester
CaMKII	<i>Calmodulin</i> -abhängige Kinase 2
CB	Zytoskelett-Puffer (englisch: „ <i>Cytoskeleton-Buffer</i> “)
CCD	Kamera-Sensortyp (englisch: „ <i>charge-coupled Device</i> “)
CICR	Kalzium-induzierte Kalziumausschüttung (englisch: „ <i>calcium-induced calcium-release</i> “)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM-2	Nährmedium für Endothelzellen (englisch: „ <i>endothelial growth medium</i> “)
EMK	Elektormechanische Kopplung
ER	endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Rinderserum (englisch: „ <i>fetal bovine serum</i> “)
FN	Fibronectin
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
HBSS	Physiologische Salzlösung nach Hanks (englisch: „ <i>Hanks' balanced salt saline</i> “)

HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (englisch: „ <i>human umbilical vein endothelial cell</i> “)
KHV	Kumulative Häufigkeitsverteilung
MLKK	Myosin leichte Kette Kinase
MM+	Nährmedium für Myozyten
NCX	Natrium-/Kalzium-Antiporter (englisch: „ <i>Na²⁺/Ca²⁺ exchanger</i> “)
PBS	Phosphatgepufferte Physiologische Salzlösung (englisch: „ <i>Phosphate-buffered Saline</i> “)
PMCA	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
ROC	Rezeptor-vermittelter Kalzium-Kanal (englisch: „ <i>receptor-operated Channel</i> “)
RT	Raumtemperatur
RYR	Ryanodin-Rezeptor
s.g.	so genannt
sCMOS	Kamera-Sensortyp (englisch: „ <i>scientific complementary metal oxides Semiconductor</i> “)
SERCA	sarkoplasmatische / endoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SOC	Speicher-abhängiger Kalzium-Kanal
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TE	Trypsin-/EDTA-Lösung
TRP	transientes Rezeptor-Potential
vgl.	vergleich
VOC	Spannungsabhängiger Kalzium-Kanal (englisch: „ <i>voltage-operated channel</i> “)
z.B.	zum Beispiel

Δt	zeitlicher Versatz
σ	Standardabweichung

6.2 Verwendete Software

Name	Version	Herausgeber
MATLAB	R2010a (64-Bit) R2010b (32-Bit) R2011a (64-Bit)	The MathWorks, Massachusetts (USA)
ImageJ	Regelmäßige Updates: 1.43u - 1.46d (64-Bit)	Wayne Rasband National Institute of Health (Washington D.C., USA)
Axio Vision	4.8.3	Carl Zeiss, Jena
Solis	4.40.30003.3 (64-Bit)	Andor technologies, Connecticut (USA)

6.3 Verwendete Geräte

Name	Typenbezeichnung	Hersteller, Ort
Brutschrank	Steri-Cycle CO ₂	Thermo Scientific, Braunschweig
Laborwaage	JB1603-C/FACT	Mettler-Toledo, Gießen
Mikroskop - Beheizbarer Probenhalter	Heizeinsatz P1	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop - Bildteiler	Optosplit II	Crain research, Faversham (UK)
Mikroskop - CO ₂ -Begasungsgerät	CO ₂ -Modul S1	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop - Fluoreszenzbeleuchtung	HXP 120	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop - Fluoreszenzbeleuchtung	DG-4	Sutter Instruments, Novato (USA)
Mikroskop - Heizeinheit	TempModul S1	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop - Inkubator	XL S1	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop - Kamera	AxioCam HRm	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop - Kamera	Neo sCMOS	Andor technologies, Connecticut (USA)
Mikroskop (invers)	Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop (invers)	Axio Observer Z.1	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop (invers)	Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Jena
Rotationsbeschichter	Delta 10TT	SÜSS Microtec, Garching
Sicherheitswerkbank	HS 12	Heraeus, Osterode
Vakuum Exsikkator	Ø 200 mm	Duran Group, Wertheim
Vakuum-Pumpe	RC6	Vucuumbrand, Wertheim

Wärmeschrank	UE 400	Memmert, Schwabach
Wasserbad	WB22	Memmert, Schwabach
Zentrifuge	3-16K	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Zentrifuge	5415R	Eppendorf, Wesseling- Berzdorf
Objektiv	EC Plan-Neofluar 10x/0,3 Ph1 M27	Carl Zeiss, Jena
Objektiv	EC Plan-Neofluar 40x/1,3 Ph1 M27	Carl Zeiss, Jena
Objektiv	α Plan-Apochromat 100x/1,46 DIC M27	Carl Zeiss, Jena

6.4 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Deckgläser, 22x22 mm, Stärke 00 (55-80 μm)	Menzel, Braunschweig
Deckgläser, 22x22 mm, Stärke 1,5 (160-190 μm)	Marienfeld, Lauda-Königshof
Einweg-Pipettenspitzen; verschiedene Größen	VWR, Darmstadt
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße, 15 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen, \varnothing 35 mm; mit 18 mm Aussparung	Cell E&G, Houston (USA)
Zellkulturflaschen; verschiedene Größen	Nunc, Wiesbaden
Glas-Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Plastik-Pipetten; verschiedene Größen	VWR, Darmstadt
Kimtech science, nicht-fasernde Papiertücher	Kimberley Clark, UK

6.5 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller, Ort
1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyltrichlorosilan	Sigma-Aldrich, München
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich, München
2-Aminoethyl-diphenyl-borat (2-APB)	Sigma-Aldrich, München
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München
Antikörper (Cy2) gegen Maus (aus der Zeige)	Dianova, Hamburg
Antikörper gegen α -Aktinin (aus der Maus)	Sigma-Aldrich, München
Phalloidin (Alexa Fluor 546)	Sigma-Aldrich, München
Cryo-SFM (Einfriermedium)	Promocell, Heidelberg
Desoxyribonuklease II (DNase), 10000 Einheiten/ml	Sigma-Aldrich, München
D-Glukose	Sigma-Aldrich, München
EBM-2 (Basalmedium für Endothelzellen)	Lonza; Köln
EDTA (Ethlyendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, München
EGM-2 (Wachstumsmedium für Endothelzellen)	Lonza; Köln
EGTA (Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N ,N,N'N'-Tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, München
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt
F-10 Ham Nährmedium (N6635)	Sigma-Aldrich, München
Fetal Bovine Serum (FBS-Biochorm)	Biochrom, Berlin
Fetal Bovine Serum (FBS-Sigma)	Sigma-Aldrich, München
Fibronektin aus humaner Plazenta	BD Bioscience, Fernwald
Fluo-4, AM	Life Technologies, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt

HBSS (Physiologische Salzlösung nach Hanks)	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
ITS: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 mg/ml 136umans Insulin ▪ 0,55 mg/ml 136umans Transferrin ▪ 0,0 µm/ml Natriumselenit 	Sigma-Aldrich, München
Lanthanchlorid (LaCl ₃)	Sigma-Aldrich, München
Magermilch-Pulver	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (Mg ₂ Cl)	Sigma-Aldrich, München
Manganchlorid (Mn ₂ Cl)	Sigma-Aldrich, München
Myosin-Leichte-Kette-Kinase Inhibitor (ML-7)	Sigma-Aldrich, München
PenStrep-Lösung: <ul style="list-style-type: none"> ▪ 10000 Einheiten/ml Penizillin ▪ 10 mg/ml Streptomycin 	Sigma-Aldrich, München
Phalloidin (Alexa Fluor 546)	Life Technologies, Darmstadt
Rot fluoreszierende Kugeln (Fluorospheres red)	Life Technologies, Darmstadt
Silikonkautschuk (<i>Sylgard 184</i> Elastomer Kit)	Dow Corning, Wiesbaden
Thapsigargin	Sigma-Aldrich, München
TritonX-100	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA-Lösung: <ul style="list-style-type: none"> ▪ HBSS + 0,5 g/l Trypsin + 0,2 g/l EDTA 4Na 	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Sigma-Aldrich, München

6.6 Komplexe Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
HBSS: (Physiologische Salzlösung nach Hanks)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H₂O + 8 g/l NaCl + 1 g/l D-Glukose + 400 mg/l KCl + 350 mg/l NaHCO₃ + 60 mg/l KH₂PO₄ + 47,88 mg/l Na₂HPO₄
HBSS+Ca:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ HBSS + 185 mg/l CaCl₂ 2H₂O + 97,67 mg/l MgSO₄
HBSS-Myo:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ HBSS-Ca + 185 mg/l CaCl₂ 2H₂O + 97,67 mg/l MgSO₄ + 10% (v/v) FBS (Biochrom)
HBSS-HUVEC:	<ul style="list-style-type: none"> ▪ HBSS+Ca + 185 mg/l CaCl₂ 2H₂O + 97,67 mg/l MgSO₄ + 10% (v/v) FBS (Sigma)
MM+ (Myozyten Medium):	<ul style="list-style-type: none"> ▪ F-10 Ham Nährmedium + 10% (v/v) FBS (Biochrom) + 1% (v/v) PenStrep –Lösung + 0,5% (v/v) IST
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung):	<ul style="list-style-type: none"> ▪ H₂O + 8 g/l NaCl + 1 g/l D-Glukose + 400 mg/l KCl + 350 mg/l NaHCO₃ + 60 mg/l KH₂PO₄ + 47,88 mg/l Na₂HPO₄

Zytoskelett-Puffer:

- H₂O
- + 150 mM NaCl
- + 5 mM MgCl₂
- + 5 mM EGTA
- + 5 mM D-Glukose
- + 10 mM MES
- + 0,1% (v/v) Penstrep

7 Literatur-Verzeichnis

- Abercrombie, M. & Dunn, G. a, 1975. Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Experimental cell research*, 92(1), pp.57-62.
- Alberts, B. et al., 2008. *Molecular Biology of the Cell* 5th ed., New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Bajaj, P. et al., 2010. Stiffness of the substrate influences the phenotype of embryonic chicken cardiac myocytes. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 95(4), pp.1261-9.
- Banerjee, I. et al., 2007. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(3), pp.H1883-91.
- Berne, R. & Levy, M., 2000. *Principles of Physiology* 3rd ed., St. Louis: Mosby, Inc.
- Berridge, M.J., 1997a. Elementary and global aspects of calcium signalling. *The Journal of Physiology*, 499(Pt 2), p.291.
- Berridge, M.J., 2009. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(6), pp.933-40.
- Berridge, M.J., 1997b. The AM and FM of calcium signalling. *Nature*, 386(6627), pp.759-60.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D. & Roderick, H.L., 2003. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), pp.517-29.
- Berrier, A.L. & Yamada, K.M., 2007. Cell – Matrix Adhesion. , (June), pp.565-573.
- Bers, D.M., 2002. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature*, 415(6868), pp.198–205.
- Bershadsky, A.D., Balaban, N.Q. & Geiger, B., 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annual review of cell and developmental biology*, 19, pp.677-95.
- Bootman, M.D. et al., 2002. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(10), pp.1145-50.
- Bootman, M.D. et al., 2011. Atrial cardiomyocyte calcium signalling. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(5), pp.922-34.
- Bootman, M.D. et al., 2001. Calcium signalling--an overview. *Seminars in cell & developmental biology*, 12(1), pp.3-10.
- Brette, F. & Orchard, C., 2003. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circulation research*, 92(11), pp.1182-92.

-
- Califano, J.P. & Reinhart-King, C. a, 2010. Exogenous and endogenous force regulation of endothelial cell behavior. *Journal of biomechanics*, 43(1), pp.79-86.
- Campbell, D. & Beckman, K., 1999. Replication and Compression of Bulk and Surface: Structures with Polydimethylsiloxane Elastomer. *Journal of Chemical*, 7, pp.537-541.
- Cannell, Mark B., Cheng, H. & Lederer, W. J., 1994. Spatial non-uniformities in $[Ca^{2+}]_i$ during excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Biophysical journal*, 67(5), pp.1942-56.
- Carafoli, E., 2003. The calcium-signalling saga: tap water and protein crystals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(April), pp.326-332.
- Cesa, C.M. et al., 2007. Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns. *The Review of scientific instruments*, 78(3), p.034301.
- Chen, J.-B. et al., 2010. Multiple Ca^{2+} signaling pathways regulate intracellular Ca^{2+} activity in human cardiac fibroblasts. *Journal of cellular physiology*, 223(1), pp.68-75.
- Cheng, H., Cannell, Mark B. & Lederer, W. J., 1994. Propagation of excitation-contraction coupling into ventricular myocytes. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 428(3-4), pp.415-417.
- Cheng, H., Lederer, W J & Cannell, M B, 1993. Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5134), pp.740-4.
- Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell*, 131(6), pp.1047-58.
- Cohen, D.M. et al., 2006. A conformational switch in vinculin drives formation and dynamics of a talin-vinculin complex at focal adhesions. *The Journal of biological chemistry*, 281(23), pp.16006-15.
- Crawford, M.J. & DiMarco, J.P., 2003. *Cardiology* 2nd ed., St. Louis: Mosby, Inc.
- Danen, E.H. & Yamada, K.M., 2001. Fibronectin, integrins, and growth control. *Journal of cellular physiology*, 189(1), pp.1-13.
- Discher, D.E., Janmey, P. a & Wang, Y.-L., 2005. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5751), pp.1139-43.
- Doyle, A.D. & Lee, J., 2005. Cyclic changes in keratocyte speed and traction stress arise from Ca^{2+} -dependent regulation of cell adhesiveness. *Journal of cell science*, 118(Pt 2), pp.369-79.
- Dupont, G & Goldbeter, a, 1998. CaM kinase II as frequency decoder of Ca^{2+} oscillations. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 20(8), pp.607-10.

-
- Dupont, Geneviève, Combettes, L. & Leybaert, L., 2007. Calcium dynamics: spatio-temporal organization from the subcellular to the organ level. *International review of cytology*, 261(07), pp.193-245.
- Endo, M., Tanaka, M. & Ogawa, Y., 1970. Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres. *Nature*, 228(5266), pp.34-6.
- Engler, A.J. et al., 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), pp.677-89.
- Faust, U. et al., 2011. Cyclic stress at mHz frequencies aligns fibroblasts in direction of zero strain. *PloS one*, 6(12), p.e28963.
- Ferrari, M.B., Podugu, S. & Eskew, J.D., 2006. Assembling the Myofibril. , 45(28), pp.317-337.
- Ferreira-Martins, J. et al., 2009. Spontaneous Calcium Oscillations Regulate Human Cardiac Progenitor Cell Growth. *Circulation Research*, 105(8), pp.764-774.
- Folgering, J.H. a et al., 2008. Molecular basis of the mammalian pressure-sensitive ion channels: focus on vascular mechanotransduction. *Progress in biophysics and molecular biology*, 97(2-3), pp.180-95.
- Fricker, S.P., 2006. The therapeutic application of lanthanides. *Chemical Society reviews*, 35(6), pp.524-33.
- Gee, K.R. et al., 2000. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell calcium*, 27(2), pp.97-106.
- Geiger, B. et al., 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 cellular & developmental biology. Animal*, 45(7), pp.343-50.
- Georges, P.C. & Janmey, P. a, 2005. Cell type-specific response to growth on soft materials. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 98(4), pp.1547-53.
- Gilabert, J.A., 2012. Cytoplasmic calcium buffering. *Advances in experimental medicine and biology*, 740, pp.483-98.
- Gordan, O.D. et al., 2008. On pattern transfer in replica molding. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 24(13), pp.6636-9.
- Gregory, R.B., Rychkov, G. & Barritt, G.J., 2001. Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca²⁺ channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors. *The Biochemical journal*, 354(Pt 2), pp.285-90.

-
- Hoyer, J., Köhler, R. & Distler, a, 1998. Mechanosensitive Ca²⁺ oscillations and STOC activation in endothelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(3), pp.359-66.
- Hu, Q., Natarajan, V. & Ziegelstein, R.C., 2002. Phospholipase D regulates calcium oscillation frequency and nuclear factor-kappaB activity in histamine- stimulated human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 292(2), pp.325-32.
- Huxley, A.F. & Niedergerke, R., 1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*, 173(4412), pp.971-3.
- Huxley, H. & Hanson, J., 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, 173(4412), pp.973-6.
- Hynes, R.O., 2002. IntegrinsBidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110(6), pp.673-687.
- Iorga, B. et al., 2011. Micromechanical function of myofibrils isolated from skeletal and cardiac muscles of the zebrafish. *The Journal of general physiology*, 137(3), pp.255-70.
- Jacob, R. et al., 1988. Repetitive spikes in cytoplasmic calcium evoked by histamine in human endothelial cells. *Nature*, 335(6185), pp.40-5.
- Jacot, J.G., Kita-Matsuo, H., et al., 2010. Cardiac myocyte force development during differentiation and maturation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1188, pp.121-7.
- Jacot, J.G., Martin, J.C. & Hunt, D.L., 2010. Mechanobiology of cardiomyocyte development. *Journal of biomechanics*, 43(1), pp.93-8.
- Jacot, J.G., McCulloch, A.D. & Omens, J.H., 2008. Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes. *Biophysical journal*, 95(7), pp.3479-87.
- Janeway, C.A. et al., 2005. *Immunobiology* 6th ed., New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Kamgoué, a et al., 2009. Quantification of cardiomyocyte contraction based on image correlation analysis. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 75(4), pp.298-308.
- Katz, A.M., 2010. *Physiology of the Heart* 5th ed., Lippincott Raven & Wilkins.
- Kim, T.-J. et al., 2009. Substrate rigidity regulates Ca²⁺ oscillation via RhoA pathway in stem cells. *Journal of cellular physiology*, 218(2), pp.285-93.
- Kohl, P. et al., 2005. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *Journal of electrocardiology*, 38(4 Suppl), pp.45-50.

-
- De Koninck, P. & Schulman, H., 1998. Sensitivity of CaM kinase II to the frequency of Ca²⁺ oscillations. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5348), pp.227-30.
- Kretsinger, R.H. & Nockolds, C.E., 1973. Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *The Journal of biological chemistry*, 248(9), pp.3313-26.
- Krishnan, R. et al., 2011. Substrate stiffening promotes endothelial monolayer disruption through enhanced physical forces. *American journal of physiology. Cell physiology*, 300(1), pp.C146-54.
- Küpper, K. et al., 2010. Tyrosine phosphorylation of vinculin at position 1065 modifies focal adhesion dynamics and cell tractions. *Biochemical and biophysical research communications*, 399, pp.560-564.
- Layland, J., Solaro, R.J. & Shah, A.M., 2005. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovascular research*, 66(1), pp.12-21.
- Lewis, R.S., 2003. Calcium oscillations in T-cells: mechanisms and consequences for gene expression. *Biochemical Society transactions*, 31(Pt 5), pp.925-9.
- Lin, S.-Y. & Corey, D.P., 2005. TRP channels in mechanosensation. *Current opinion in neurobiology*, 15(3), pp.350-7.
- Liu, H.-W. et al., 2009. Locomotion guidance by extracellular matrix is adaptive and can be restored by a transient change in Ca²⁺ level. *PloS one*, 4(10), p.e7330.
- Lo, C.M. et al., 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophysical journal*, 79(1), pp.144-52.
- Lodish, H. et al., 2007. *Molecular Cell Biology* 6th ed., New York: W. H. Freeman and Company.
- Louch, W.E., Sejersted, O.M. & Swift, F., 2010. There goes the neighborhood: pathological alterations in T-tubule morphology and consequences for cardiomyocyte Ca²⁺ handling. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, p.503906.
- Mackenzie, L. et al., 2004. The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction. *Journal of cell science*, 117(Pt 26), pp.6327-37.
- Main, M. & Bryant, S., 1998. Regional differences in action potential characteristics and membrane currents of guinea-pig left ventricular myocytes. *Experimental physiology*, pp.747-761.
- Maruyama, T., Kanaji, T. & Nakade, S., 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins (1, 4, 5) P₃-induced Ca²⁺ release. *Journal of*, 505, pp.498-505.

- Matthews, B.D. et al., 2006. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *Journal of cell science*, 119(Pt 3), pp.508-18.
- Matthews, B.D. et al., 2010. Ultra-rapid activation of TRPV4 ion channels by mechanical forces applied to cell surface beta1 integrins. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*, 2(9), pp.435-42.
- Merkel, R. et al., 2007. Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness. *Biophysical journal*, 93(9), pp.3314-23.
- Messer, A.E., Jacques, A.M. & Marston, S.B., 2007. Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 42(1), pp.247-59.
- Minta, A., Kao, J.P. & Tsien, Roger Y, 1989. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *The Journal of biological chemistry*, 264(14), pp.8171-8.
- Missiaen, L. et al., 2001. 2-Aminoethoxydiphenyl borate affects the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, the intracellular Ca²⁺ pump and the non-specific Ca²⁺ leak from the non-mitochondrial Ca²⁺ stores in permeabilized A7r5 cells. *Cell calcium*, 29(2), pp.111-6.
- Munevar, S., Wang, Y. & Dembo, M., 2001. Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophysical journal*, 80(4), pp.1744-57.
- Munevar, S., Wang, Y.-L. & Dembo, M., 2004. Regulation of mechanical interactions between fibroblasts and the substratum by stretch-activated Ca²⁺ entry. *Journal of cell science*, 117(Pt 1), pp.85-92.
- Möhl, C. et al., 2009. Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell motility and the cytoskeleton*, 66(6), pp.350-64.
- Naruse, K. et al., 2012. Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch stretch Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch.
- Ono, S., 2010. Dynamic regulation of sarcomeric actin filaments in striated muscle. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 67(11), pp.677-92.
- Orr, a W. et al., 2006. Mechanisms of mechanotransduction. *Developmental cell*, 10(1), pp.11-20.
- Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P., 2003. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(7), pp.552-65.

-
- Paredes, R.M. et al., 2008. Chemical calcium indicators. *Methods (San Diego, Calif.)*, 46(3), pp.143-51.
- Putney, J.W., 2009. Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunological reviews*, 231(1), pp.10-22.
- Ringer, S., 1883. A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *The Journal of physiology*, 4(1), pp.29-42.3.
- Riveline, D. et al., 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *The Journal of cell biology*, 153(6), pp.1175-86.
- Saitoh, M., Ishikawa, T. & Matsushima, S., 1987. Selective inhibition of catalytic activity of smooth muscle myosin light chain kinase. *Journal of Biological*, 262(16), pp.7796-7801.
- Sanger, J.W. et al., 2010. Assembly and dynamics of myofibrils. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010(Figure 2), p.858606.
- Santana, L.F., Cheng, E.P. & Lederer, W Jonathan, 2010. How does the shape of the cardiac action potential control calcium signaling and contraction in the heart? *Journal of molecular and cellular cardiology*, 49(6), pp.901-3.
- Sen, S. & Kumar, S., 2010. Combining mechanical and optical approaches to dissect cellular mechanobiology. *Journal of biomechanics*, 43(1), pp.45-54.
- Sieminski, a L., Hebbel, R.P. & Gooch, K.J., 2004. The relative magnitudes of endothelial force generation and matrix stiffness modulate capillary morphogenesis in vitro. *Experimental cell research*, 297(2), pp.574-84.
- Skupin, A. et al., 2008. How does intracellular Ca²⁺ oscillate: by chance or by the clock? *Biophysical journal*, 94(6), pp.2404-11.
- Smyrniak, I. et al., 2010. Comparison of the T-tubule system in adult rat ventricular and atrial myocytes, and its role in excitation-contraction coupling and inotropic stimulation. *Cell calcium*, 47(3), pp.210-23.
- Soeller, C. & Cannell, M B, 1999. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circulation research*, 84(3), pp.266-75.
- Song, L.-S. et al., 2005. Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1047, pp.99-111.
- Stehle, R., Iorga, B. & Pfitzer, G., 2007. Calcium regulation of troponin and its role in the dynamics of contraction and relaxation. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 292(3), pp.R1125-8.

- Streb, H. et al., 1983. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 306(5938), pp.67-9.
- Sun, S. et al., 2007. Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(7), pp.1472-80.
- Tang, X. et al., 2011. How far cardiac cells can see each other mechanically. *Soft Matter*, 7(13), p.6151.
- Taylor, C., 1998. Pharmacological analysis of intracellular Ca²⁺ signalling: problems and pitfalls. *Trends in pharmacological sciences*, 19(9), pp.1-6.
- Terramani, T.T. et al., 2000. Human macrovascular endothelial cells: optimization of culture conditions. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 36(2), pp.125-32.
- Thodeti, C.K. et al., 2009. TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling. *Circulation research*, 104(9), pp.1123-30.
- Thomas, D. et al., 2000. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell calcium*, 28(4), pp.213-23.
- Tran, Q.K. & Watanabe, H., 2006. Calcium signalling in the endothelium. *Handbook of experimental pharmacology*, 2(176 Pt 1), pp.145-87.
- Treiman, M., Caspersen, C. & Brøgger, S., 1998. A tool coming of age : thapsigargin as an inhibitor of sarco- endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases. , 19(April), pp.131-135.
- Tsien, R. Y., 1981. A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 290(5806), pp.527-528.
- Uhlén, P. & Fritz, N., 2010. Biochemistry of calcium oscillations. *Biochemical and biophysical research communications*, 396(1), pp.28-32.
- Vogel, V. & Sheetz, M.P., 2009. Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways. *Current opinion in cell biology*, 21(1), pp.38-46.
- Walker, C., 1999. The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular*, pp.375-382.
- Wall, M.E. & Banes, a J., 2005. Early responses to mechanical load in tendon: role for calcium signaling, gap junctions and intercellular communication. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, 5(1), pp.70-84.
- Watanabe, T. et al., 1983. Heterogeneity of the Action Potential in Isolated Rat Ventricular Myocytes and Tissue. , pp.280-290.
- Wei, C. et al., 2009. Calcium flickers steer cell migration. *Nature*, 457(7231), pp.901-5.

-
- Wierzbicka-Patynowski, I. & Schwarzbauer, J.E., 2003. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *Journal of cell science*, 116(Pt 16), pp.3269-76.
- Wood, a, 1988. Contact guidance on microfabricated substrata: the response of teleost fin mesenchyme cells to repeating topographical patterns. *Journal of cell science*, 90 (Pt 4), pp.667-81.
- Wood, J.A. et al., 2011. The role of substratum compliance of hydrogels on vascular endothelial cell behavior. *Biomaterials*, 32(22), pp.5056-64.
- Wu, Z. et al., 1999. Regulation of stretch-activated intracellular calcium transients by actin filaments. *Biochemical and biophysical research communications*, 261(2), pp.419-25.
- Yin, J. & Kuebler, W.M., 2010. Mechanotransduction by TRP channels: general concepts and specific role in the vasculature. *Cell biochemistry and biophysics*, 56(1), pp.1-18.
- Zaidel-Bar, R. et al., 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt3), pp.416-20.
- Zamir, E. & Geiger, B., 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of cell science*, 114(Pt 20), pp.3583-90.
- Zhu, L. et al., 2008. Ca²⁺ oscillation frequency regulates agonist-stimulated gene expression in vascular endothelial cells. *Journal of cell science*, 121(Pt 15), pp.2511-8.
- Ziman, A.P. et al., 2010. Excitation-contraction coupling changes during postnatal cardiac development. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(2), pp.379-86.

8 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Rudolf Merkel sowie Dr. Bernd Hoffmann für die Betreuung meiner Doktorarbeit und dafür, dass ich mich in meinen Thema so breit austoben konnte.

Herrn Professor Dr. Ulrich Kubitscheck danke ich dafür, dass er sich bereit erklärt hat das Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen.

An dieser danke ich auch der „IHR5 Biosoft“ für Mitfinanzierung meiner Doktorarbeit, und die regelmäßige Möglichkeit mich mal mit etwas ganz anderem als meinem eigenen Thema zu befassen.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern Alfred und Annette dafür, dass sie es uns Kindern auch in schlechten Zeiten (außer an einem GAMEBOY!) nie wirklich an etwas haben fehlen lassen und dafür dass sie mich zu dem erzogen haben, was ich heute bin.

(Also bei Problemen an meine Eltern wenden)

An dieser Stelle danke ich natürlich auch meiner kleinen, großen Schwester, dafür dass unsere gemeinsame Kindheit, auch ohne GAMEBOY, überraschend harmonisch war.

Ich danke auch ganz herzlich allen KorrekturleserInnen, welche aus Immunitätsschutz hier nicht namentlich genannt werden sollen.

Mein Dank gilt zudem allen KollegenInnen mit denen ich die letzten 4 Jahre zusammen gearbeitet und auch außerhalb der Arbeit viel Spaß hatte.

Wolfgang danke ich besonders für den 64-bit Rechner und die zwei Monitore, die inzwischen dann doch bei jedem stehen... Danke auch für die Hilfe beim Tweezer, auch wenn er's nicht hier rein geschafft hat.

Ich danke zudem dem ICS-4 dafür, dass sie mir kurzerhand ihren Beamsplitter geliehen haben, ohne den die Untersuchungen an den Myos gar nicht erst möglich gewesen wären.

Bei Nils und Thorsten bedanke ich mich ganz doll für die Myos, die ich mir geschnorrt habe (die bekommt ihr natürlich alle wieder). Vor allem bedanke ich mich für DIE Myos dies es bis

in diese Arbeit geschafft haben. Aber noch mehr möchte ich mich bei euch für die guten Erinnerungen an die gemeinsamen Partys (Bad Taste, Ü30, Mönchengladbacher Altstadt, Weizmann Student-Party, Korn, Rock am Ring...) bedanken.

Ganz besonders danke ich Alex „Püppie“ Müller, dafür, dass er mir auch nach seiner Bachelorarbeit eine wahnsinnige Hilfe und guter Diskussionspartner bei der Untersuchung der > 10.000 HUVECs war!

Da ich es schon beim letzten Mal nicht mehr geschafft habe möchte ich hier auch noch mal Christoph Möhl dafür danken, dass er mir ein so guter Betreuer meiner Diplom-Arbeit war. (besser spät als nie)

Georg und Ronald danke ich für die große Hilfe bei der Erstellung der ganzen Programme. Danke auch dass ihr immer die Zeit für mich und alle meine erdenklichen *Matlab*-Fragen hatten (ob ihr wolltet oder nicht...). Vielen Dank auch für die Einführung der „I-Tea“.

David und Inka danke ich für die gemütlichen Abende mit guter Küche und schlechtem Rotwein und generell die gute Zeit mit euch. Vor allem Danke ich euch aber auch für die zyklisch auftretenden Arschritte welche einen direkten regulativen Einfluss auf meine Motivation hatten (Thorsten, da gehörst du auch zu!!!).

Danke auch für die netten Affen-Bildnisse, welche nicht unbedingt zu meiner Motivation beigetragen haben (ne David?).

Ich danke auch der Firma mit dem roten Bullen für die koffeinhaltige Unterstützung.