

Untersuchung der Antwort humaner Endothelzellen auf Substratdeformation

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Alexander Zielinski

aus Siegen

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: 20.02.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Zellen im Gewebe werden permanent mit mechanischen Reizen konfrontiert. Die Wahrnehmung dieser Reize wird unter dem Begriff der Mechanorezeption zusammengefasst und stellt einen Prozess dar, der sich auf verschiedenste Weise auf das Zellverhalten auswirken kann. Zellen des vaskulären Endothels sind neben dem durch den Blutstrom verursachten Scherfluss einer ständigen zyklischen Deformation ausgesetzt, die durch das Wechselspiel des nach außen wirkenden Blutdrucks auf der einen Seite und der Kontraktion der Gefäßwand durch die glatte Muskulatur auf der anderen Seite entsteht. Eine strukturelle Adaptation an diese Bedingungen ist für die Zellen essentiell und Störungen in der Zellantwort werden mit Krankheitsbildern wie der Atherosklerose in Verbindung gebracht.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die strukturellen Anpassungen humaner vaskulärer Endothelzellen auf uniaxiale Deformation betrachtet. Hierfür wurden zwei verschiedene mechanische Reize genauer analysiert. Der erste Teil dieser Arbeit widmete sich der Adaptation der Zellen an eine zyklische Dehnung durch Ausrichtung von Zellkörper und Cytoskelett als Langzeitanpassung an mechanische Reize. Im zweiten Teil der Dissertation wurde die Anlagerung des Proteins Zyxin und assoziierter Proteine an Aktinstressfasern untersucht, welche einer sofortigen Zellantwort auf eine einzelne Deformation entspricht. Beide Reizarten wurden jeweils in Lebendzell-Experimenten und in fixierten Zellen untersucht. So konnten die Prozesse sowohl in ihrer vollen Dynamik als auch mit einer guten Statistik durch Untersuchung großen Zellzahlen analysiert werden.

In den Lebendzell-Analysen der Reorientierung des Zellkörpers und des Aktin-Cytoskeletts zeigte sich dabei ein zeitlich deutlicher Versatz zwischen den sich schnell ausrichtenden Aktinfasern, die bereits nach einstündiger zyklischer Dehnung senkrecht zur Zugrichtung orientiert waren, und dem langsam reagierenden Zellkörper, der sich durch Retraktion und Protrusion von Ausläufern umlagert. Zur Verbesserung der Statistik wurden weiterhin fixierte Zellen nach unterschiedlich langer Deformationsdauer untersucht. Als weiterer Cytoskelett-Typ ging in diese Analysen auch die Ausrichtung der Mikrotubuli mit ein. Die Versuche zeigten, dass sich Aktinfasern und Mikrotubuli mit einer ähnlichen Dynamik senkrecht zur

Deformationsrichtung ausrichten und eine klare Koorientierung aufweisen, sich innerhalb einer Zelle aber durchaus stark voneinander unterscheiden können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Mikrotubuli etwas schneller umlagern, die Aktinfasern im zeitlichen Verlauf jedoch stärker reorientiert sind.

Für die Untersuchungen der Kurzzeitantwort auf einfache Dehnung konnte ein neues System zur Substratdeformation etabliert werden. In immuocytochemischen Analysen konnten Zyxin, VASP und α -Actinin als Bestandteile des angelagerten Komplexes nachgewiesen werden. Außerdem konnte durch eine quantitative Orientierungsanalyse der Anlagerungen ein Schwellwert der Faserdehnung ermittelt werden, oberhalb dessen die Anlagerung induziert wurde. In Lebendzell-Experimenten konnte zudem die Dynamik von Zyxin und VASP in der Auflösung der angelagerten Protein-Komplexe bestimmt werden.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Inhaltsverzeichnis	9
1 Einleitung	11
1.1 Zellantwort auf mechanische Reize.....	11
1.2 Mechanosensitivität von Endothelzellen.....	15
1.3 Aktin-Stressfasern.....	17
1.4 Mikrotubuli	18
1.5 Zyxin	19
2 Material und Methoden	23
2.1 Verwendete Materialien	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Puffer und Medien	24
2.1.3 Verbrauchsmaterial	25
2.1.4 Geräte und Computerprogramme	25
2.2 Herstellung elastischer Substrate	27
2.2.1 Kreuzvernetztes PDMS als elastisches Substrat	27
2.2.2 Herstellung elastischer Kulturkammern aus Silikonkautschuk	29
2.2.3 Rotationsbeschichtung von Glasbodenschalen	30
2.2.4 Beschichtung der Silikonsubstrate mit Fibronectin	30
2.3 Kultivierung und Präparation der Zellen	31
2.3.1 Zellkultur.....	31
2.3.2 Transfektion der Zellen	32
2.3.3 Immunohistochemische Färbung.....	35
2.4 Deformation der elastischen Substrate	37
2.4.1 Deformation durch Dehnung der Elastomerkammern	37
2.4.2 Substratdeformation mit dem Mikromanipulator	40
2.5 Ablauf der Experimente und Mikroskopie	41
2.5.1 Experimente zur Analyse der Umorientierung des Cytoskeletts	41
2.5.2 Experimente zur Analyse von Proteinanlagerungen an Aktinfasern	44
2.6 Digitale Bildverarbeitung.....	46
2.6.1 Orientierungsanalyse cytoskelettaler Strukturen.....	46
2.6.2 Orientierungsanalyse von Zyxin-Einlagerungen	49

2.6.3	Dynamikanalyse von Proteineinlagerungen	52
3	Ergebnisse	55
3.1	Reorientierung in Folge zyklischer Dehnung	56
3.1.1	Ergebnisse der Lebendzell-Analysen	56
3.1.2	Immunocytochemische Analyse.....	72
3.2	Anlagerung von Zyxin und assoziierten Proteinen an gedehnte Aktinfaserbündel	94
3.2.1	Qualitative Analyse der Proteinanlagerungen.....	96
3.2.2	Bestimmung des durch die Mikroklinge erzeugten Deformationsfeldes..	103
3.2.3	Dynamik der Protein-Anlagerungen in Lebendzellanalysen	104
3.2.4	Bestimmung der Anlagerungsorientierung als Maß der minimal benötigten Dehnung.....	114
4	Diskussion	119
4.1	Reorientierung der humanen Endothelzellen	120
4.1.1	Orientierungsbestimmung von Cytoskelett und Zellkörper	120
4.1.2	Zellantwort auf uniaxiale zyklische Dehnung.....	121
4.1.3	Vergleich von Lebendzellanalysen und Immunocytochemie	122
4.1.4	Vergleich der Ergebnisse des Aktin-Cytoskeletts und der Mikrotubuli	123
4.2	Protein-Anlagerungen an gedehnte Stressfasern	125
4.2.1	Zusammensetzung der dehnungsinduzierten Anlagerungen.....	126
4.2.2	Dynamik der Proteine in der Faser-Anlagerung.....	127
4.2.3	Schwellenwertbestimmung der minimal benötigten Deformation	128
4.2.4	Modell der Zyxin vermittelten Aktinfaser-Rekonstitution	128
5	Ausblick	133
6	Abkürzungsverzeichnis	135
7	Literaturverzeichnis	137
8	Danksagung.....	151
	Lebenslauf.....	153

1 Einleitung

Jede Zelle eines Gewebes ist dem ständigen Einfluss von mechanischen Kräften ausgesetzt. So sind neben den Muskelzellen des Bewegungsapparates und des Herzens auch Zellen der Blutgefäße und Lungengewebe einem permanenten Zyklus von Dehnung und Stauchung unterworfen. Wundheilung und Gewebeausbildung erfordern die Einwanderung und die Ausübung kontraktile Kräfte von Bindegewebs- und Epithelzellen. Ebenso ist für neuronale Zellen und Zellen des Immunsystems die Wahrnehmung der mechanischen Eigenschaften ihrer Umgebung ein wichtiger Reiz [1-5]. Eine Anpassung an die mechanischen Einflüsse ist für die Integrität und Funktion der Gewebe essentiell und stellt einen Prozess dar, dessen Regulierung bereits auf der Ebene einzelner Zellen beginnt [6]. So stellt neben biochemischen Signalen die mechanische Beeinflussung, die unter dem Begriff der Mechanosensitivität zusammengefasst ist, den wichtigsten Regulationsmechanismus der Zellaktivität dar [7, 8]. Welche Bestandteile der Zelle als direkte Mechanosensoren fungieren, ist dabei jedoch noch weitestgehend unklar.

Im Folgenden sollen die Zellantwort und die Anpassung struktureller Elemente genauer dargestellt werden.

1.1 Zellantwort auf mechanische Reize

Der grundlegendste mechanische Reiz für eine Zelle ist die Wahrnehmung der Eigenschaften des Untergrundes, auf dem sie adhären. Zellen sind in der Lage die Topographie des Substrates zu erkennen und werden durch sie in ihrer Ausrichtung beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass sich corneale Endothelzelle auf einer Mikrostruktur von Rinnen und Stegen je nach Breite der Strukturen senkrecht oder parallel zu diesen ausrichten [9]. Auch durch die Symmetrie der Untergrundstruktur kann die Differenzierung von Stammzellen beeinflusst werden [10]. Abbildung 1.1 zeigt ein Beispiel der Topographie-vermittelten Zellorientierung in einer pluripotenten Stammzelllinie.

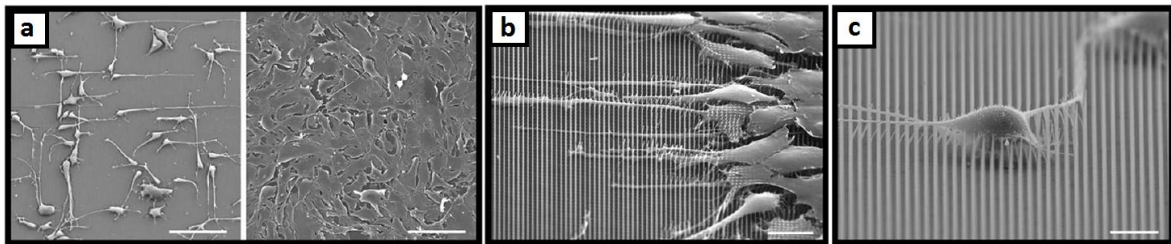


Abbildung 1.1: Einfluss der Substrat-Topographie – Die Abbildung zeigt das gerichtete Wachstum und die Polarisierung von C3H10T1/2 Zellen auf nanostrukturierten Oberflächen. In *a* ist vergleichend das Wachstum auf strukturierten und glatten Oberflächen gezeigt, die Zellen zeigen eine Ausrichtung entlang der Struktur. In *b* und *c* ist die gerichtete Ausbildung von Zellauskläufeln gezeigt. Maßstab = 100 μm (*a*), 20 μm (*b*) u. 10 μm (*c*). (Abbildung verändert nach Bucaro *et al.* [11])

Auch die Steifigkeit des Substrats zeigt deutliche Auswirkungen auf den Phänotyp der Zelle. Sie wirkt sich deutlich auf die Zellmorphologie aus und spielt wahrscheinlich in der Ausdifferenzierung von Stammzellen zu verschiedenen Gewebetypen eine entscheidende Rolle [7, 12, 13].

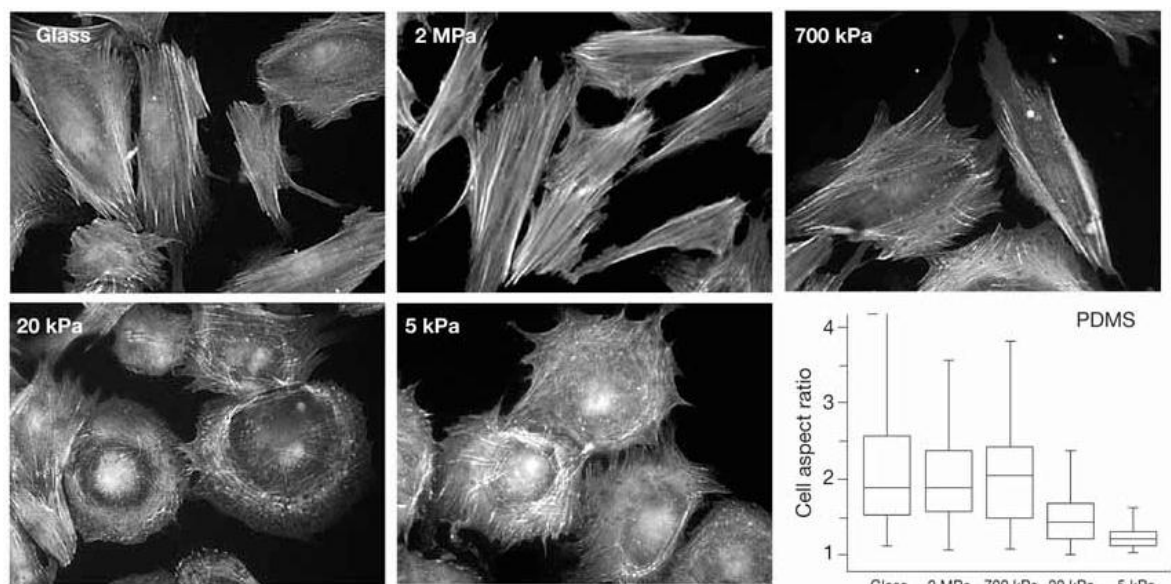


Abbildung 1.2: Einfluss der Substratsteifigkeit – Die hier gezeigten humanen Fibroblasten wurden auf Glas und Silikonsubstraten verschiedener Steifigkeiten kultiviert. Zellen auf harten Substraten zeigen dabei eine langgestreckte Zellform mit stark ausgebildeten Stressfasern auf, während auf weichen Substraten die Zellen eine eher flächige runde Form aufweisen. (Abbildung verändert nach Prager-Khoutorsky *et al.* [13])

Eine wichtige Struktur, die die Zellen mit dem Substrat verbindet, bilden die Fokaladhäsionen. Es handelt sich hierbei um Multi-Protein-Komplexe aus ca. 192 verschiedenen Proteinen, die eine Verbindung zwischen Zellinnerem und dem

Proteinnetzwerk der außerhalb liegenden extrazellulären Matrix herstellen [14-16]. Verantwortlich für die Verbindung ist insbesondere die Familie der transmembranen Matrixrezeptoren der Integrine. Diese binden an spezifische Sequenzen der Matrix-Proteine und verbinden so die Zelle mit dem Untergrund. Intrazellulär sind die Integrine über Adapterproteine mit dem Aktin-Cytoskelett verbunden [17]. Diese Verknüpfung ermöglicht es der Zelle, zum einen über die Kontraktion des Aktomyosin-Apparates Kraft auf die extrazelluläre Matrix auszuüben, zum anderen auf umgekehrtem Wege eine Deformation des Substrates als mechanisches Signal ins Zellinnere zu übertragen [17, 18]. Die Kraft, die auf die Fokaladhäsion ausgeübt wird, ist ein wichtiger Regulator der Dynamik dieser Strukturen. So ist die über Aktin aufgebaute Spannung essentiell für das Wachstum initial ausgebildeter fokaler Kontakte und ihrer Reifung zu Fokaladhäsionen [19-21]. Ein Wegfallen der über die Aktinfasern ausgeübte Kraft führt zur Auflösung der Fokaladhäsionen [19, 22].

Sessile Zellen sind bestrebt ein Gleichgewichtszustand zwischen der von ihr generierten Kraft und dem Widerstand des Substrates aufrechtzuerhalten. Dieser Zustand wird allgemein als mechanische Homöostase bezeichnet [7] und ist gekennzeichnet durch einen dynamischen Auf- und Abbau der Adhäsionen und Cytoskelett-Strukturen. Eine Störung des Gleichgewichts durch externe Deformation des Substrates zwingt die Zelle zu einer strukturellen Reorganisation. In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich Zellen durch eine zyklische, uniaxiale Deformation senkrecht zur Zugrichtung ausrichten und somit der ständigen Deformation ausweichen [23-26]. In welchem Maße die Reorientierung erfolgt ist dabei stark von den Parametern der Deformation, wie Frequenz, Amplitude aber auch von der Wellenform, abhängig [24, 25, 27, 28]. Ein Beispiel der Ausrichtung von Zellkörper und Aktinfasern humaner Fibroblasten durch zyklische, uniaxiale Deformation ist in Abbildung 1.3 gezeigt. Einzelne Untersuchungen deuten darauf hin, dass im Gegensatz zur zyklischen Deformation eine einfache andauernde Deformation zu einer parallelen Anordnung der Zellen führen kann [29, 30].

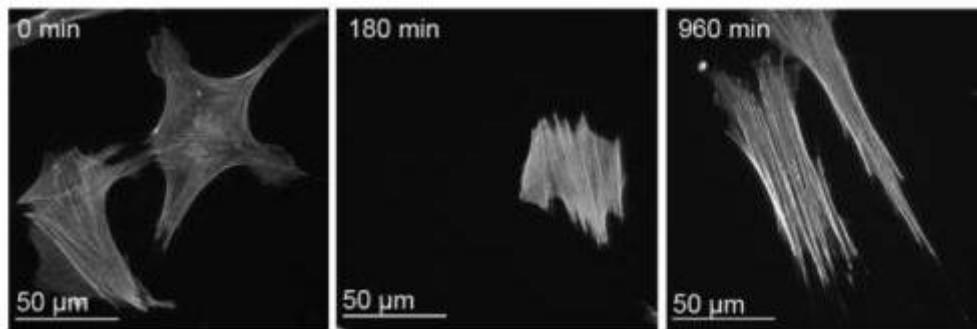


Abbildung 1.3: Einfluss von zyklischer Deformation – Die Abbildung zeigt Aktinfärbungen in humanen Fibroblasten die ohne Deformation (links) oder unter zyklischer Dehnung um 11,8% mit einer Frequenz von 9 mHz kultiviert wurden. Die Zellen und die Stressfasern zeigen nach 16 h eine klare Ausrichtung senkrecht zur applizierten Dehnung auf (horizontale Richtung). (Verändert nach *Faust et al.* [25])

Wie die Wahrnehmung der Deformation und die Signalweiterleitung genau abläuft, ist bisher nicht genau bekannt. Es werden jedoch drei grundlegende Mechanismen diskutiert. Zum einen konnten mechanisch an das Aktin-Cytoskelett gekoppelte Ca^{2+} -Kanäle nachgewiesen werden, die durch Deformation geöffnet werden und somit zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle führen. Sie scheinen jedoch nicht essentiell für die Reorientierung des Aktins zu sein [31, 32]. Als weiterer möglicher Mechanorezeptor gilt das Fokaladhäsions-Adapterprotein p130^{Cas} (*Crk associated substrate*). Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugkräfte die Tertiärstruktur des Proteins aufgefaltet und somit Phosphorylierungsstellen freigelegt werden können [33, 34]. Es könnte also durch die Deformation zu einer gesteigerten Aktivität von p130^{Cas} in der angeschlossenen Signalkaskade der Familie der Src-Kinasen kommen. Der Verlust von p130^{Cas} führt in jedem Fall zu einer deutlich verminderten Zell-Reorientierung im zyklischen Verzug [35]. Einen dritten Mechanismus stellt die Affinitätsänderung bestimmter Proteine in Abhängigkeit des Spannungszustands der Aktinfaserbündel dar. So konnten Untersuchungen zeigen, dass die Motordomäne des Myosin II vermehrt an unter Spannung stehende Aktinfasern bindet, während z.B. das am Filament-Abbau beteiligte Protein Cofilin eine höhere Affinität für entspannte Fasern aufweist [36, 37]. Auf diese Weise könnten also die Aktinfasern selber als Spannungssensoren fungieren.

1.2 Mechanosensitivität von Endothelzellen

Das sogenannte Endothel stellt die zum Lumen gewandte Zellschicht aller Blut- und Lymphgefäße dar. Es besteht aus einer einzelligen Lage aus Endothelzellen, die an die Basallamina, einer spezialisierten extrazellulären Matrix gebunden sind. Eine Hauptaufgabe der Endothelzellen liegt in der Ausübung einer regulierbaren Barrierefunktion [38, 39]. Aber auch an der Blutgerinnung [40] sowie an inflammatorischen Prozessen sind die Endothelzellen beteiligt. Weiterhin spielen die Endothelzellen eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutflusses, indem sie die sie umgebenden Zellen der glatte Muskulatur beeinflussen und so zur Vasodilatation [41] oder Vasokonstriktion [42] beitragen. Ebenso sind sie an der Ausbildung neuer Blutgefäße, der Angiogenese, beteiligt [43].

Vaskuläre Endothelzellen sind *in vivo* zwei wesentlichen mechanischen Reizen ausgesetzt (s. Abb 1.4). Dies sind zum einen die Scherung durch das vorbeiströmende Blut und zum anderen eine zyklische Dehnung, die durch das Wechselspiel von nach außen drückenden Blutdruck und der entgegenwirkenden Kontraktion der Gefäßmuskulatur entsteht. Die Zellen reagieren auf diese Reize durch Änderungen der Gen-Expression, der Proliferation und mit strukturellen Anpassungen [44].

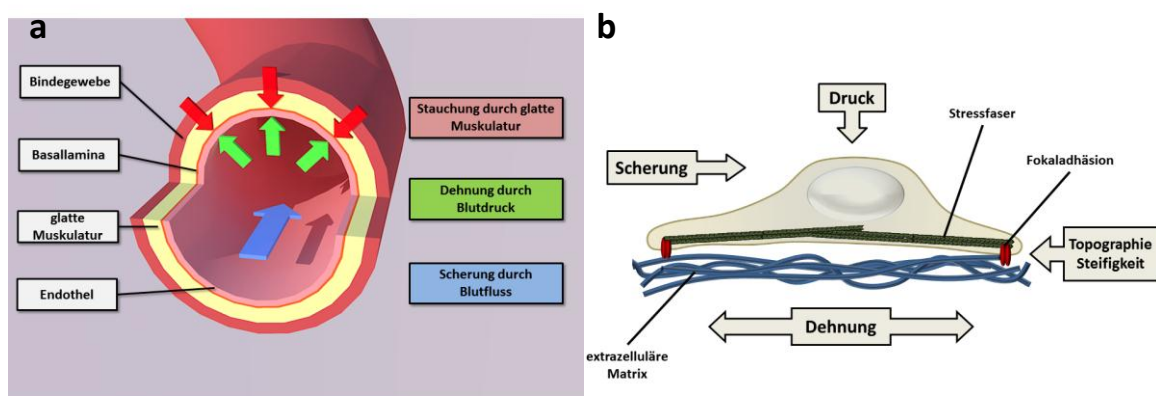


Abbildung 1.4: Mechanische Reize im vaskulären Gewebe – Die Abbildung zeigt in *a* schematisch die mechanischen Kräfte, die auf die Zellen der Gefäßwand einwirken. Der Blutstrom wirkt zum einen durch Scherkräfte und zum anderen durch nach außen gerichteten Druck auf die Zellen ein. Dieser führt zu einer Dehnung des Gewebes. Durch Kontraktion der glatten Muskulatur kommt es zur Stauchung des Gewebes. In *b* gezeigt sind die mechanischen Reize, welche das Verhalten der Endothelzellen beeinflussen.

Ein laminarer Scherfluss führt in Endothelzellen zu einem sogenannten atheroprotektiven Verhalten, das durch einen ruhenden Zell-Phänotyp und anti-inflammatorischen Eigenschaften gekennzeichnet ist [45, 46]. Gleichzeitig richten sich die Zellen so aus, dass sie dem Fluss möglichst wenig Widerstandsfläche bieten und auch das Aktin-Cytoskelett ordnet sich parallel zur Flussrichtung um [47, 48]. Ein turbulenter Fluss hingegen führt zu einer vermehrten Proliferation und pro-inflammatorischem Verhalten, die Zellen zeigen außerdem keine klare Ausrichtung [49].

Auch die zyklische Deformation zeigt einen deutlichen Effekt auf das Verhalten von Endothelzellen. Sie bewirkt generell eine gesteigerte Proliferationsrate und führt zu einer deutlichen Ausrichtung des Zellkörpers sowie des Aktinzytoskeletts in senkrechter Richtung zu Dehnung [23, 24, 26]. Ebenso zeigen die Cytoskelett-Systeme der Intermediärfilamente und Mikrotubuli eine von der Deformationsrichtung weg gerichtete Orientierung auf [50]. *In vivo* beeinflussen Scherung und Dehnung der Endothelzellen gleichermaßen die Ausrichtung von Zellkörper und Cytoskelett und führen zu einer parallel zum Blutstrom liegenden Orientierung [51].

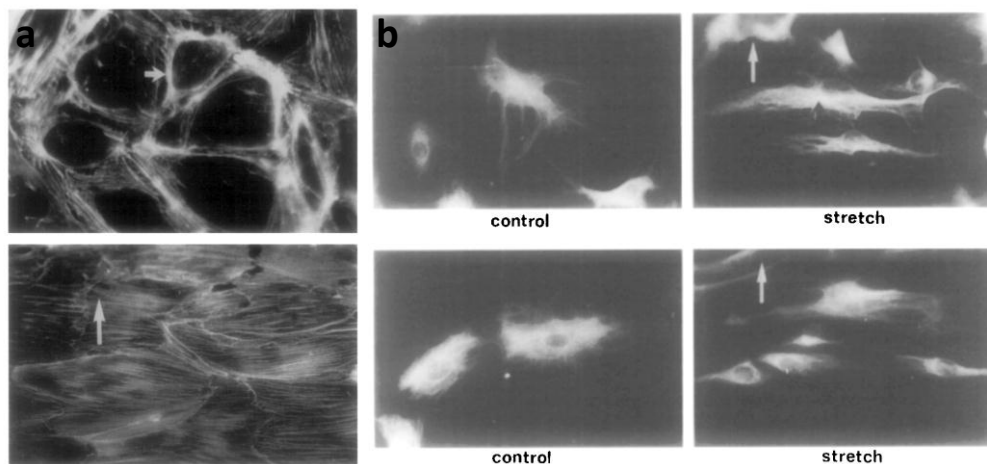


Abbildung 1.5: Reorientierung endothelialer Zellen – Die Abbildung zeigt die Ausrichtung der drei Cytoskelett-Typen in humanen Endothel-Zellen der *Vena saphena magna* (große Rosenvene) in ungedehnten (in *a* oben, in *b* links) und zyklisch deformierten Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 1 Hz um 24% gedehnt. Sowohl die gefärbten Aktinfasern (*a*) als auch die Mikrotubuli (oben in *b*) und das Intermediärfilament Vimentin (unten in *b*) zeigten eine Orientierung in senkrechter Richtung zur Deformation (Pfeil). Abbildung aus *Iba et al.* [50], genauer Maßstab unbekannt.

Nicht zuletzt haben auch die mechanischen Eigenschaften des Zellsubstrats eine deutliche Auswirkung auf Endothelzellen. So wirkt sich beispielsweise die Steifigkeit

des Substrats deutlich auf die Morphologie und Proliferationsrate von Endothelzellen aus [52].

Wegen ihrer ausgeprägten Mechanosensitivität wurden im Rahmen dieser Dissertation HUVECs (*human umbilical vein endothelial cell*) als typischer Vertreter der Endothelzellen verwendet.

1.3 Aktin-Stressfasern

Das Aktomyosin-Cytoskelett ist der Hauptregulator der mechanischen Eigenschaften einer Zelle. In nicht-muskulären Zellen bilden die Aktinfilamente kontraktile Bündel, bestehend aus etwa 10-30 Einzelfilamenten, die unter anderem durch den Aktin-Kreuzvernetzer α -Actinin zusammengehalten werden [53, 54]. α -Actinin bildet zusammen mit dem Motorprotein Myosin II häufig ein sich regelmäßig abwechselndes Muster aus, das teilweise dem Sarkomer-Aufbau der Muskelzellen ähnelt [54-56]. Die Bildung von Stressfasern wird vor allem durch RhoA, einem Mitglied der Rho-Familie kleiner GTPasen, initiiert [57, 58]. Die Regulation der Stressfaserbildung erfolgt dabei insbesondere durch die Beteiligung zweier wichtiger Effektoren: die Rho Kinase I (ROCK I) und das Formin mDia1. ROCK I, das auch unabhängig von der RhoA-Aktivität zur Stressfaserbildung führen kann [59], wirkt gleichzeitig über die Phosphorylierung der Myosin regulatorischen leichten Kette (MLC) und Inaktivierung der MLC Phosphatase [60, 61]. Die Aktivität des Myosin führt zunächst zur Bündelung der Filamente zu einer Stressfaser und im Folgenden zu deren Kontraktion. Der zweite Effektor mDia fördert die Nukleation von Aktinfilamenten [62]. Durch das Zusammenspiel der beiden Effektoren kommt es in Abhängigkeit der jeweiligen Aktivität zur Ausbildung von Faserbündeln verschiedener Dicke und Dichte [63].

Die Kontraktilität der Stressfasern beruht auf der durch Myosin II bewirkten Verschiebung der Filamente gegeneinander. Da die Aktinfilamente eine Polarität aufweisen und auch die Bewegung des Myosin II polar gerichtet ist, setzt die Kontraktilität der Stressfasern eine zumindest teilweise antiparallele Anordnung der Filamente im Bündel voraus. Trotzdem lassen sich auch gestaffelte oder parallele Anordnungen finden [64]. Über die Stressfasern und deren Anknüpfung an die

Fokaladhäsionen ist es der Zelle zum einen möglich, Kräfte auf die extrazelluläre Matrix auszuüben, zum anderen bewirkt die Kontraktion auch eine intrazelluläre Spannung. *In vivo* zeigen sich Stressfasern vor allem in mechanisch beanspruchten Zellen, wie z.B. in Fibroblasten in granulierendem Wundgewebe. Dort werden die Kollagenfasern der extrazellulären Matrix durch die über die Stressfasern generierten Kräfte zu parallelen Bündeln geordnet und unterstützen so den Wundverschluss [65, 66]. In Endothelzellen stimuliert der Scherfluss die Bildung von Stressfasern. Die Kontraktilität der Stressfasern ermöglicht es der Zelle flach auf der Basallamina aufzusitzen und die Scherung zu minimieren [64, 67, 68].

1.4 Mikrotubuli

Mikrotubuli (MT) sind Bestandteile des Cytoskeletts und spielen eine wichtige Rolle für die strukturelle Integrität der Zelle, den Transport der Organellen und besonders auch der Chromosomen während der Zellteilung. Die Grundeinheit der MT bildet ein Heterodimer aus α - und β -Tubulin, das sich durch Bindung von GTP zunächst zu Protofilamenten zusammenlagert. Durch laterale Bindung zwischen mehreren Protofilamenten bilden sich schließlich Röhrenstrukturen aus [69, 70]. Mikrotubuli im Zellkörper bestehen typischerweise aus 13 Protofilamenten, die eine Röhre mit einem Außendurchmesser von 25 nm bilden. Aufgrund ihrer Struktur weisen Mikrotubuli eine deutlich größere Steifigkeit auf als Aktin- und Intermediärfilamente und sind z.B. für die Stabilität von neuronalen Axonen essentiell.

Für die Polymerisation der α - β -Dimere zu ganzen Mikrotubuli müssen sich diese zunächst zu energetisch relativ ungünstigen kurzen Einheiten zusammenlagern. Die Nukleation der Mikrotubuli wird in Zellen durch γ -Tubulin beschleunigt und reguliert [71]. γ -Tubulin bildet dabei sogenannte γ TuRCs (*γ -Tubulin ring complex*) aus, die sich wiederum zu MTOCs (*Microtubule-organizing center*) zusammenlagern [72, 73]. Das wichtigste MTOC des Zellkörpers ist das in Kernnähe gelegene Zentrosom [74]. Bedingt durch den heteromeren Charakter der Grundbausteine, zeigen Mikrotubuli eine deutliche Polarität auf. Das langsam wachsende Minus-Ende ist dabei mit den

γ TuRCs assoziiert, während das dynamischere Plus-Ende zu Zellperipherie hin wächst.

Obwohl Mikrotubuli eine große mechanische Stabilität aufweisen und maßgeblich an der Formgebung der Zelle beteiligt sind, weisen sie eine sogenannte dynamische Instabilität auf. Diese ist gekennzeichnet von einer langsamen Elongation und raschem Abbau der Mikrotubuli in einer sogenannten Katastrophe [75]. Die Phasen von Elongation und Katastrophe liegen dabei in einem Gleichgewicht vor. Reguliert wird dieser Gleichgewichtszustand durch eine Reihe von Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAP) [76, 77]. Diese MAPs können dabei stabilisierend wirken, wie z.B. das Protein Tau oder aber auch die Depolymerisation fördern wie die Proteine der Kinesin-13-Familie [77, 78].

Die Rolle der Mikrotubuli in der Zellantwort auf mechanische Reize ist zu großen Teilen noch völlig unbekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Abbau von Mikrotubuli eine RhoA-vermittelte Bildung von Aktin-Stressfasern bewirkt [79, 80]. Weiterhin führt die einfache Dehnung von Zellen der glatten Muskulatur zu einem vermehrten Aufbau von Mikrotubuli [81]. Das Verhalten von Mikrotubuli unter zyklischen Dehnung stellt sich als teils widersprüchlich dar. So beschreiben *Goldyn et al.* [82, 83] für Fibroblasten, dass sich Mikrotubuli zusammen mit Aktin und der Zelle reorientieren, die Ausrichtung von Stressfasern und Zellen jedoch unabhängig von den Mikrotubuli erfolgt und diese vielmehr nur die Geschwindigkeit beeinflussen. Untersuchungen an Zellen der glatten Muskulatur der Atemwege deuten hingegen darauf hin, dass Mikrotubuli für die Reorientierung notwendig sind [84].

1.5 Zyxin

Zyxin (abgeleitet von griech. *zeuxis* = Verbindung) ist ein Protein mit einer molekularen Masse von 82 kDa, dessen Lokalisation ursprünglich vor allem im Bereich der Adhäsionsstrukturen beschrieben wurde [85]. Homologe des Proteins finden sich sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten [86-88]. Innerhalb des menschlichen Genoms finden sich weitere Proteine, die deutliche Homologien zu Zyxin aufweisen und in der Unterfamilie der Zyxin-ähnlichen Proteine zusammengefasst sind [89].

Typisch für die Struktur dieser Proteinfamilie sind eine N-terminal gelegene, Prolin-reiche Sequenz mit einer Länge von 146 Aminosäuren, eine Kernexport-Sequenz sowie drei LIM-Domänen am C-Terminus. Diese sind wiederum aus jeweils zwei Zink-Finger-Motiven aufgebaut [89]. Die Prolin-reiche Domäne bietet eine Bindestelle für Ena/VASP (*Enabled vasodilator-stimulated phosphoprotein*) - oder auch nur VASP genannt. Weiterhin liegt N-terminal eine Bindungsstelle für den Aktin-Kreuzvernetzer α -Actinin vor [90]. Die LIM-Domänen bieten Bindestellen für eine Vielzahl von Proteinen, von denen als wichtige Vertreter vor allem das Stressfaser-assoziierte CRP1 (*cysteine-rich protein 1*) und das als Mechanorezeptor der Fokaladhäsion diskutierte p130^{Cas} zu nennen sind [89, 91]. Eine schematische Darstellung der Proteinstruktur ist in Abbildung 1.6 gezeigt.

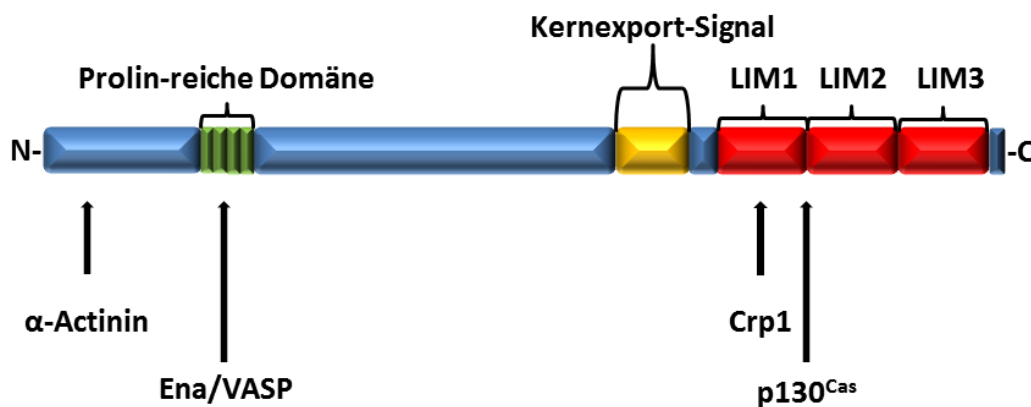


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Zyxin-Proteinstruktur – Die Abbildung zeigt schematisch die wichtigen Interaktionsdomänen (geschweifte Klammern) und Bindestellen von einigen Zyxin assoziierten Proteinen (verändert nach Ermolina et al. [89]).

Das cytoskelettale Protein Zyxin nimmt in der Zellantwort auf mechanische Reize eine zentrale Rolle ein. So konnten zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass Zyxin an vielen Orten innerhalb der Zelle aktiv ist. Zyxin wird in sessilen und migrierenden Zellen an Fokaladhäsionen rekrutiert, die über die Aktin-Stressfasern Kraft auf das Substrat ausüben [92]. Verlust der Spannung führt zu einer Dissoziation des Zyxins von der Adhäsionsstruktur. Obwohl α -Actinin ein wichtiger Bindungspartner für Zyxin in den Fokaladhäsionen ist, scheinen für die Rekrutierung aber die LIM-

Domänen verantwortlich zu sein [93, 94]. Auch eine regulatorische Rolle des Proteins in der dehnungsinduzierten Genexpression wird diskutiert, da gezeigt werden konnte, dass Zyxin durch zyklische Dehnung auch in den Zellkern transloziert [95, 96]. Des Weiteren bindet Zyxin in der Antwort auf zyklische Dehnung an Aktinstressfasern, wo es an der Verstärkung der Faserbündel beteiligt ist [97, 98]. *Smith et al.* [99] konnten in Verzugsexperimenten an Fibroblasten zeigen, dass Zyxin in Folge der Dehnung in distinkten Bereichen der Stressfasern zusammen mit VASP und α -Actinin kolokalisiert und dort an einem möglichen Reparaturmechanismus zur Rekonstitution der Fasern beteiligt ist. VASP fördert die Aktin-Polymerisation wahrscheinlich durch Inhibierung der Aktin bindenden „Capping“-Proteine und eine Rekrutierung von Profilin, welches die Anlagerung von monomerem Aktin beschleunigt [100, 101]. Ein mögliches Modell des Ablaufs der Zyxin-vermittelten Aktin-Polymerisation ist ebenfalls in Abschnitt 4.2.4 gezeigt. Dieser Mechanismus wurde im Rahmen dieser Dissertation genauer untersucht und wird in Abschnitt 4.2.4 noch einmal detailliert erläutert. Die grundlegende Funktion von Zyxin in der Zelle, sowohl in den Fokaladhäsionen, als auch bei Zell-Zell-Kontakten oder den Stressfasern, liegt in jedem Fall in der Regulation der Aktin-Polymerisation über die Rekrutierung von VASP und gleichzeitiger Ausübung einer Adapterfunktion durch die Bindung an α -Actinin [97, 102, 103].

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma, Taufkirchen
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma, Taufkirchen
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Ethanol, p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylenglykol-bis(aminoethyl-ether)-N,N,N',N'-tetra-essigsäure (EGTA)	Sigma, Taufkirchen
Fötales Kälberserum (<i>Fetal Bovine Serum</i> , FBS)	Sigma, Taufkirchen
Fibronectin aus humaner Placenta	BD Bioscience, Fernwald
FluoMount	Sigma, Taufkirchen
FluoSpheres, Carboxylat-modifiziert (0,2 µm, tiefrot)	Invitrogen, Karlsruhe
Glucose	Sigma, Taufkirchen
Glycerin	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Sigma, Taufkirchen
JetPEI Transfektionsreagenz	Peqlab, Erlangen
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma, Taufkirchen
Kanamycin-Sulfat	Sigma, Taufkirchen
LB-Pulver (<i>Lysogeny Broth</i>)	Sigma, Taufkirchen
Magermilch-Pulver	Sigma, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma, Taufkirchen
Midi-Prep Kit	Sigma, Taufkirchen
2-(N-Morpholino)ethan-sulfonsäure (MES)	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma, Taufkirchen
Para-Formaldehyd-Lösung (37%)	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Sigma, Taufkirchen
Phalloidin Alexa 488	Invitrogen, Karlsruhe

Phalloidin Alexa 546	Invitrogen, Karlsruhe
Phalloidin Alexa 633	Invitrogen, Karlsruhe
Reduziertes Triton X-100	Qiagen, Hilden
Sylgard 184 Silicone Elastomere Kit	Dow Corning, Wiesbaden
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (0,5% / 0,2%)	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen

2.1.2 Puffer und Medien

Zellkultur-Medium

EBM-2 (<i>Endothelial Basal Medium</i>)	Lonza, Köln
EGM-2 (<i>Endothelial Growth Medium</i>)	Lonza, Köln
Cryo-SFM	PromoCell, Heidelberg

Cytoskelett-Puffer (*Cytoskeleton Buffer, CB*)

150 mM NaCl
 5 mM MgCl₂
 5 mM Glucose
 5 mM EGTA
 10 mM MES
 pH = 6,1

Phosphatgepufferte Salzlösung (*Phosphate Buffered Saline, PBS*)

137 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 1,47 mM KH₂PO₄
 8,1 mM Na₂HPO₄
 pH = 7,4

Alle Lösungen wurden mit aufbereitetem Wasser angesetzt. Dafür wurde die Aufbereitungsanlage MilliQ Gradient A10 (*Millipore, Billerica, USA*) verwendet (spezifischer Widerstand: 18,2 MΩ, Summe organischen Kohlenstoffs: 3 ppm).

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Deckgläser Ø 15 mm #0	Menzel, Braunschweig
Deckgläser 22*22 mm #00	Menzel, Braunschweig
Objektträger	VWR, Darmstadt
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Pipettenspitzen (div. Größen)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Reaktionsgefäße 15 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Cellstar-Schalen, 6-Loch	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25 cm ²	BD Bioscience, Fernwald
Zellkulturflaschen 75 cm ²	BD Bioscience, Fernwald
Kimtech Science Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional, Irving, TX, USA

2.1.4 Geräte und Computerprogramme

Mikroskope

Axio Observer Z.1	Carl Zeiss, Jena
Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss, Jena
Konfokales Mikroskop (LSM) 510 Meta	Carl Zeiss, Jena

Kameras

Orca ER CCD	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
EM CCD 9100-02	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan

Objektive

LD-Achroplan 40x/0,60 NA Korr Ph2	Carl Zeiss, Jena
LD-Achrostigmat 20x/0,3 NA Ph1	Carl Zeiss, Jena
Plan Neo-Fluar 40x/1,3 NA Öl-Immersion Ph3	Carl Zeiss, Jena

Zellkultur- und Laborgeräte

Mikroinjektor InjectMan NI2	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Osterode
Thermo Forma Stery-Cycle CO ₂ -Incubator	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Wärmeschrank E400	Memmert, Schwabach
Wasserbad WB22	Memmert, Schwabach
Zentrifuge 3-16K	Sigma Laborzentrifugen, Osterode
Zentrifuge 5415-R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Rotationsbeschichter Delta 10TT	SÜSS Microtec, Garching
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Software

Mikroskopsteuerung:

LSM Software 4.2	Carl Zeiss, Jena
AxioVision Rev. 4.8.3	Carl Zeiss, Jena

Bildaufnahme:

OpenBox 1.77	Informationssysteme Schilling, München
--------------	--

Bildverarbeitung:

MATLAB R2011a	The MathWorks, Natick, MA, USA
Fiji (basierend auf ImageJ)	National Institute of Health, Washington D.C., USA

Mathematische Datenanalyse:

OriginPro 8.5.1	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
-----------------	---

2.2 Herstellung elastischer Substrate

Die Analyse des Zellverhaltens bei Dehnung stellt in einem *in-vitro*-System viele Anforderungen an das Material, auf dem die Zellen kultiviert werden. Neben der Biokompatibilität sind dies vor allem benötigte mechanische Eigenschaften. Das Material sollte von seiner Steifigkeit dem natürlichen Milieu der zu untersuchenden Zellen möglichst nahekommen und dabei für zyklische Dehnungsexperimente elastisch deformierbar sein. Für die Experimente dieser Arbeit wurde kreuzvernetztes Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet.

2.2.1 Kreuzvernetztes PDMS als elastisches Substrat

PDMS ist ein Polymer aus der Gruppe der siliciumorganischen Verbindungen mit der Summenformel $(\text{H}_3\text{C})_3\text{SiO}[\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{O}]_n\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Es findet im medizinischen Bereich als Dimeticon und als Lebensmittelzusatz E900 Verwendung. Es kann außerdem auch zur Erzeugung eines Elastomers verwendet werden. Für die Experimente wurde zur Herstellung das Zweikomponenten-System Sylgard 184 (*Dow Corning, Wiesbaden*) verwendet, das zum einen aus einem vinylterminierten PDMS-Polymer-Gemisch als Grundsubstanz und zum anderen aus einem Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan-Copolymer mit Katalysator besteht. Die Reaktion erfolgt durch katalysierte Hydrolyse des Polymer-Gemisches, wobei die Vinylgruppen mit dem Copolymer unter Wärmezufuhr reagieren.

Über das Mengenverhältnis von Grundsubstanz zu Kreuzvernetzer kann die Steifigkeit des Materials beeinflusst werden und so ein Elastizitätsbereich von ca. 1 kPa bis hin zu 2 MPa abgedeckt werden. Der Silikonkautschuk bleibt dabei über einen großen Elastizitätsbereich linear-elastisch deformierbar.

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Silikon-Substrate wurden in einem Gewichtsverhältnis von einem Teil Kreuzvernetzer zu 40 Teilen Grundsubstanz hergestellt. Dieses Verhältnis resultiert in einer Steifigkeit von 50 kPa. Die genaue Bestimmung der mechanischen Eigenschaften der Mischungsverhältnisse wurde von Nico Hampe nach *Cesa et al.* [104] durchgeführt. Dafür wurden Zylinder aus Silikonkautschuk der jeweiligen Mischungsverhältnisse hergestellt. Diese wurden in eine Messapparatur eingespannt und um eine definierte Länge gezogen. Die

Längenänderung (Δl) des Zylinders wurde über adhärierte Agarose-Partikel bestimmt und gleichzeitig die Änderung des Durchmessers (Δd) ermittelt. Durch eine eingekoppelte Waage wurde die jeweils für die Verlängerung benötigte Kraft gemessen. Aus dieser Messung ließen sich die Parameter der Poissonzahl und der sogenannte Young-Modul bestimmen. Die Poissonzahl (ν) ist als negatives Verhältnis der relativen Dickenänderung zur relativen Längenänderung unter Krafteinwirkung definiert durch:

$$\nu = -\frac{\Delta d/d_0}{\Delta l/l_0}$$

Dabei sind d_0 und l_0 der Ursprungsdurchmesser und die Ursprungslänge des Zylinders. Der Silikonkautschuk hat ein Poissonverhältnis von 0,5. Das bedeutet, dass das Material inkompressibel und somit bei Deformation volumenstabil ist. Der Young-Modul (E) ist ein Maß für die Steifigkeit eines Materials und errechnet sich aus:

$$E = \frac{F * l_0}{A * \Delta l}$$

F ist hier die gemessene Kraft und A die Querschnittsfläche des Zylinders. Der Young-Modul für die in dieser Dissertation verwendeten Silikonkautschuk-Oberflächen betrug stets 50 kPa.

Außer der guten mechanischen Charakterisierung bietet das Material weitere Vorteile. Zum einen ermöglicht es durch seine Biokompatibilität eine Verwendung als Substrat für die Kultivierung von Zellen, zum andern ist das Material optisch transparent und besitzt einen Brechungsindex von 1,4. Dies ermöglicht eine Verwendung für lichtmikroskopische Proben. Des Weiteren kann der Silikonkautschuk genutzt werden, um Abformungen auf großer und kleiner Längenskala anzufertigen. Somit bietet sich u.a. die Möglichkeit eine Mikrostrukturierung auf der Substratoberfläche abzuformen, die auch bei wässrigen Lösungen als angrenzendem Medium sichtbar ist [104].

2.2.2 Herstellung elastischer Kulturkammern aus Silikonkautschuk

Zur Herstellung der Silikonkautschuk-Kammern wurde das in *Faust et al.* [25] beschriebene Gussverfahren eingesetzt. Die Gussformen dafür bestehen aus drei miteinander verschraubbaren PVC-Platten (s. Abb. 2.1). Die mittlere Platte trägt eine Erhebung mit einem eingelassenen Siliziumplättchen. Dieses ermöglicht zum einen, dass der Boden der resultierenden Kammer planar ist und zum anderen kann darüber auch zusätzlich eine Mikrostrukturierung des Substrates erfolgen (s. Abb. 2.3). Die Mikrostrukturierung wurde im photolithographischen Verfahren nach *Cesa et al.* [104] durch Nico Hampe in das Silizium eingebracht.

Zur Herstellung wurden zunächst je Kammer insgesamt 4 g des Gemisches aus Grundsubstanz und Kreuzvernetzer im Gewichtsverhältnis von 40:1 hergestellt und mit einem Spatel gründlich durchmischt. Dabei entstandene Blasen wurden durch Anlegen eines Vakuums für wenige Minuten im Exsikkator aus dem Gemisch entfernt, um Lufteinschlüsse im ausgehärteten Material zu vermeiden.

Die Kammerformen wurden mit dem noch zähflüssigen Material bis zum oberen Rand befüllt. Mit einem Objektträger wurde durch Rakeln überschüssiges Material entfernt. Die Kreuzvernetzung des PDMS erfolgte bei 60°C für 16 h in einem Wärmeschrank (*UE 400, Memmert, Schwabach*). Nach dieser Zeit wurde die ausgehärtete Kammer durch Zerlegen der Form und Spülen mit Isopropanol (*Merck, Darmstadt*) freipräpariert.

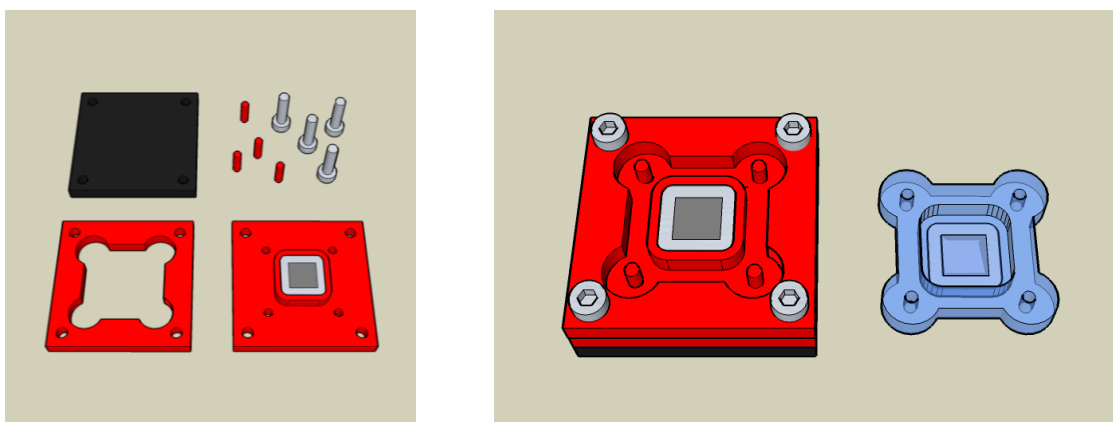


Abbildung 2.1: Gussform zur Kammerherstellung – Links dargestellt sind die Einzelteile der Gussform aus gefrästem PVC und einer Grundplatte aus eloxiertem Aluminium. Auf der rechten Seite sind die verschraubte Form und die im Gussverfahren hergestellte Silikonkautschuk-Kammer gezeigt. Abmessung der Gussform = 50x50x15 mm.

2.2.3 Rotationsbeschichtung von Glasbodenschalen

Als weiteres deformierbares Substrat wurden selbst hergestellte Glasbodenschalen mit einer Beschichtung aus Silikonkautschuk verwendet. Dafür wurden Deckgläschen mit einer Dicke von 55-80 μm und einer Fläche von 22x22 mm (Menzel, Braunschweig) auf einem Rotationsbeschichter (*Delta 10TT, SÜSS Microtec, Garching*) mit einer dünnen Lage aus noch nicht ausgehärtetem Silikonkautschuk (Endsteifigkeit 50 kPa) versehen. Das Deckgläschen wurde dabei mit Unterdruck auf einem rotierenden Teller fixiert. Ein kleiner Tropfen des Silikonkautschuks wurde aufgetragen und für 15 s bei 2400 rpm gleichmäßig über die gesamte Fläche zu einer dünnen Schicht verteilt (s. Abb. 2.2). Das beschichtete Deckgläschen wurde nun unter eine Plastikschele mit rundem Loch im Boden geklebt, wo es von selbst haftete. Anschließend wurde das PDMS für 16 h bei 60°C kreuzvernetzt. Die Schichtdicke des glatt ausgehärteten Films wurde mikroskopisch vermessen und betrug ca. 100 μm .

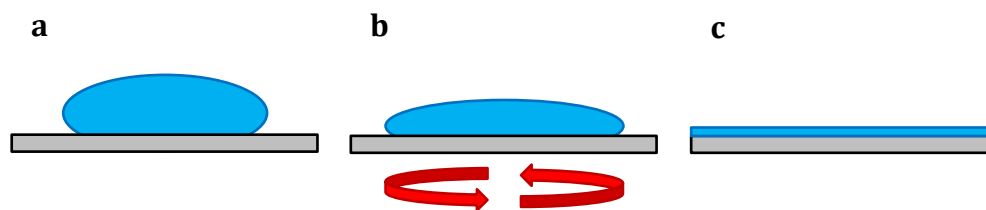


Abbildung 2.2: Prinzip der Rotationsbeschichtung – (a) ein Tropfen des noch flüssigen PDMS-Polymer-Copolymer-Gemisches wird auf ein Deckgläschen aufgebracht, das über ein angelegtes Vakuum auf dem Rotationsbeschichter fixiert ist. Durch Rotation des Deckgläschens (b) wird der Tropfen flächig verteilt, sodass sich schließlich eine dünne, gleichmäßige Schicht ausbildet (c).

2.2.4 Beschichtung der Silikonsubstrate mit Fibronectin

Damit die Zellen auf den Elastomersubstraten adhäreren können, müssen ihnen dort Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronectin [105] präsentiert werden. Für die Experimente dieser Arbeit wurden die Silikonsubstrate mit Fibronectin (*BD bioscience, Heidelberg*) verwendet, das in PBS (*phosphate buffered saline, s. Abschnitt 2.1.3*) gelöst zu 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ eingesetzt wurde. Die Oberflächen wurden für 30 min bei 37°C mit der Lösung inkubiert, so dass das Fibronectin physisorbieren konnte. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Oberflächen mit PBS überschichtet.

2.3 Kultivierung und Präparation der Zellen

2.3.1 Zellkultur

Für die Experimente wurden primäre humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (*HUVEC Best-Nr. C2519A, Lonza, Köln*) und die korrespondierende Zelllinie HUV-EC-C (*ATCC/LGC Standards GmbH, Wesel*) verwendet. Die Primärzellen stammen dabei aus einem Pool verschiedener Spender. Die Kulturbedingungen für beide Zelltypen wurden identisch gehalten. Die Kultivierung erfolgte bei einer Temperatur von 37°C und einem konstanten CO₂-Gehalt von 5% bei gesättigter Luftfeuchtigkeit. Als Nährmedium diente EBM-2 (*Lonza, Köln*), das durch folgende Zusätze zum als EGM-2 bezeichneten Wachstumsmedium für Endothelzellen wird:

- humaner endothelialer Wachstumsfaktor (hEGF)
- Hydrocortison
- GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin-B)
- 2% fötales Rinderserum (FBS)
- vaskular-endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF)
- humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor (hFGF-B)
- insulinähnlicher Wachstumsfaktor (R³-IGF-1)
- Ascorbinsäure
- Heparin

Die Zusätze sind Teil eines speziellen Wachstumsfaktor-Kits und die genauen Konzentrationen der Zusätze werden vom Hersteller nicht angegeben. Zur Vermehrung wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 2.500-5.000 Zellen/cm² in T75-Flaschen (*Greiner Bio-One, Frickenhausen*) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Dabei erfolgte alle 2-3 Tage ein Mediumwechsel. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen entweder für eine spätere Verwendung kryokonserviert oder für eine weitere Vermehrung bzw. die Experimentvorbereitung passagiert.

Zum Ablösen der Zellen aus den Kulturgefäßen wurden diese zunächst mit auf 37° Celsius vorgewärmtem PBS gewaschen, um tote Zellen und freie Proteine zu entfernen. Mit 3 ml einer vorgewärmten Lösung von 0,025% Trypsin und 0,02% EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) in HBSS (*Hank's balanced salt solution*) (*Sigma*,

Taufkirchen) wurden die Zellen im Inkubator bei 37° vom Boden der Kulturflaschen gelöst. Die Inkubationsdauer betrug dabei zwischen 3 min und 5 min. Durch Zugabe von 6 ml vorgewärmtem EGM-2 wurde das Trypsin inhibiert. Die Zellsuspension wurde nun bei 200 *g* für 3 min zentrifugiert (*Zentrifuge 3-16K, Sigma Laborzentrifugen, Osterode*) und gleichzeitig von einer zuvor genommenen Probe mittels Neubauer-Kammer (*LO-Laboroptik, Lancing, UK*) die Zellzahl bestimmt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand von den pelletierten Zellen abgenommen und diese in gewünschter Konzentration in EGM-2 resuspendiert und erneut in Kulturgefäßen ausgesät. Grundsätzlich wurden für alle Experimente mit den primären HUVEC nur Zellen der Passagen 1-5 verwendet.

Für die Kryokonservierung erfolgte die Resuspension in CryoSFM (*PromoCell, Heidelberg*), einem speziellen Einfriermedium. Die Zellen wurden dafür in Plastikröhrchen zu Zellzahlen von 100.000 oder 500.000 aliquotiert und zunächst in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrier-Box (*Thermo Fischer Scientific, Rochester, USA*) bei -80°C eingefroren. Nach 24 h wurden sie für die längerfristige Aufbewahrung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

2.3.2 Transfektion der Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle. Durch Expression eines fluoreszent markierten Fusionsproteins kann dessen Lokalisation mikroskopisch analysiert werden. Dafür wird der dem Protein von Interesse zugrundeliegenden DNA-Sequenz die Sequenz einer fluoreszierenden Domäne wie z.B. GFP (*green fluorescent protein*) angefügt. Diese Fusionssequenz steht typischerweise unter Kontrolle eines viralen Promotors, der eine kontinuierliche Transkription bewirkt. Dies gilt für alle hier eingesetzten Fusionskonstrukte. Durch geeignete Anregung (s. Abschnitt 2.4) lässt sich das Protein lichtmikroskopisch in der Zelle detektieren.

Plasmidgewinnung

In dieser Arbeit wurden verschiedenen Plasmide für die Transfektion verwendet, die in der folgenden Übersicht zusammengefasst sind:

Protein	Stammnr.	Resistenz	Vektor	Quelle
EGFP-Lifeact	BH 427	Kanamycin	pEGFP-N1	R. Wedlich-Soeldner (Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried)
EGFP-Zyxin	BH 113	Kanamycin	pEGFP-N1	S. Born (ICS-7)
mCherry-VASP	BH 464	Kanamycin	pmCherry-C1	S. Born (ICS-7)
EGFP- α -Actinin	BH 31	Kanamycin	pEGFP-N1	S. Born (ICS-7)
DsRed- α -Actinin	BH 328	Kanamycin	pDsRed-Monomer-N1	S. Born (ICS-7)

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmide

Alle verwendeten Plasmide wurden von Simone Born (ICS-7) über Transformation in den *E. coli*-Stamm DH5 α eingebracht. Durch Anlegen einer Bakterienkultur ist es möglich, das Plasmid in großer Menge zu vervielfältigen. Die Vermehrung der Bakterien erfolgte in 50-100 ml autoklaviertem LB-Medium (*Lysogeny Broth*, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator über Nacht. Da auf den Plasmiden zusätzlich zum Protein von Interesse ein Antibiotikum-Resistenzgen codiert war, konnte durch Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (Kanamycin) in einer Verdünnung von 1:1000 zum LB-Medium gewährleistet werden, dass sich nur Bakterienzellen vermehren können, die das Plasmid inkorporiert haben.

Mit einem Isolations-Kit (*Midi Plasmid Purification Kit*, Qiagen, Hilden) wurde am folgenden Tag nach Herstellerangaben das Plasmid aus der Bakterienkultur aufgereinigt. Das Plasmid wurde anschließend in autoklaviertem MilliQ-Wasser aufgenommen und die Konzentration über Photometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm (*Photometer NanoDrop*, Peqlab, Erlangen) ermittelt. Die in Wasser gelösten Plasmide wurden bei einer Temperatur von -20°C gelagert.

Transfektion mittels Endocytose von DNA-Polyethylenimin-Komplexen

Für die Transfektion wurden 48 h zuvor für jeden Ansatz 33.000 HUVECs in einer Vertiefung einer 6-Loch-Kulturplatte mit einer Fläche von 9,6 cm² ausgesät, sodass für die Transfektion 50.000-100.000 Zellen zur Verfügung standen. Die Transfektion mit dem Polyethylenimin basierten Reagenz JetPEI (*peqlab*, Erlangen) wurde nach

einem von den Herstellerangaben abweichenden Protokoll durchgeführt, um die cytotoxischen Effekte des Reagenzes zu minimieren. Dafür wurden zunächst 3 µg Plasmid und 6 µl JetPEI in jeweils 100 µl 150 mM NaCl-Lösung angesetzt, über ein Schüttelgerät (*Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA*) gemischt und kurz herunterzentrifugiert, um entstandene Tropfen von der Gefäßwand abzulösen. Nachfolgend wurde der JetPEI-Ansatz zur DNA gegeben und beides erneut im Schüttelgerät vermischt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation des Reaktionsgefäßes für 25 min bei Raumtemperatur, damit sich die Komplexe aus DNA und Polyethylenimin ausbilden konnten. In der Zwischenzeit wurde das Medium auf den Zellen gegen EBM-2 mit 2% FBS und 0,1% Penicillin/Streptomycin getauscht. Der Transfektionsansatz wurde tropfenweise zu den Zellen pipettiert, um eine großflächige Verteilung zu bewirken. Die Zellen wurden nun 2 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss für die nachfolgenden Experimente auf die Silikonsubstrate passagiert. Die Experimente erfolgten 24 h nach der Transfektion.

Elektroporation

Die Transfektionseffizienz bei HUVECs ist im Allgemeinen sehr schlecht [106] und stark vom verwendeten Transfektionsreagenz abhängig. Mit JetPEI konnten Effizienzen von etwa 15-20% erzielt werden. Besonders für die Doppeltransfektion mit zwei verschiedenen DNA-Konstrukten zeigte sich der DNA-Transfer via Elektroporation als effizientere Methode, die jedoch gleichzeitig mit einer deutlich größeren Mortalität der Zellen während der Prozedur einherging. Dementsprechend mussten für die gleiche Endzahl wesentlich mehr Zellen eingesetzt werden. Pro Versuchsansatz wurden 48 h vor der Transfektion 300.000 Zellen in einer T-75 Flasche ausgesät, sodass zum Zeitpunkt der Transfektion ca. 1 Mio. Zellen zur Verfügung standen. Für die Elektroporation wurde ein spezielles Kit (*HUVEC Nucleofector-Kit, Lonza, Köln*) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die Elektroporations-Puffer-Lösung wurde dabei jedes Mal aus 82 µl Nucleofector-Lösung und 18 µl Supplement, das ebenfalls Bestandteil des Kits war, frisch angesetzt und pro Ansatz 5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Für die Elektroporation wurde am Nucleofector-Gerät das Programm A-034 verwendet. Um cytotoxische Effekte zu minimieren, wurde streng darauf geachtet, dass die Zellen so kurz wie möglich im reinen Nucleofector-Puffer suspendiert waren und nach der Elektroporation rasch in

EGM-2 aufgenommen wurden. Für Experimente in rotationsbeschichteten Glasbodenschalen wurden die HUVECs in insgesamt 12 ml EGM-2 resuspendiert und auf 4 Schalen verteilt. Für die Zugkammern wurden sie in 2,5 ml EGM-2 aufgenommen und auf ebenfalls 4 Kammern verteilt. Sobald die Zellen nach etwa 3-4 h deutlich sichtbar auf dem Boden adhäriert waren, wurden sie mehrfach mit PBS gewaschen, um tote Zellen und vor allem Reste des Elektroporations-Puffers zu entfernen. Mit frischem Medium wurden sie dann für 24 h bis zum Beginn der Experimente im Inkubator belassen.

2.3.3 Immunohistochemische Färbung

Für die Untersuchung des Cytoskeletts und assoziierter Proteine in großen Zellzahlen wurden die Zellen immunocytochemisch angefärbt. Dabei wurde in fixierten Zellen zunächst über einen primären Antikörper das Protein von Interesse markiert. Ein sekundärer, fluorophormarkierter Antikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet war, ermöglichte es, die zellulären Strukturen mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar zu machen.

Um die HUVECs immunohistochemisch anzufärben, wurden die Zellen unmittelbar nach Durchführung des jeweiligen Experiments in den Verzugskammern mit einer Lösung von 3,7% Paraformaldehyd (PFA, *Merck, Darmstadt*) in Cytoskelett-Puffer (CB, *cytoskeleton buffer*, s. Abschnitt 2.1.3) für 30 min bei 37°C fixiert. Das eingesetzte Volumen betrug für alle Schritte während der Immunfärbung 500 µl pro Kammer. Durch das anschließende Waschen für 10 min 30 mM Glycin (*Sigma, Taufkirchen*) in CB wurde überschüssiges PFA entfernt und freie Bindungsstellen abgesättigt. Die Permeabilisierung der Zellmembran, die das Eindringen der Antikörper in den Intrazellularraum ermöglicht, geschah durch 10-minütige Inkubation der Zellen mit 0,2% Triton-X (*Sigma, Taufkirchen*) in CB. Anschließend wurden durch dreimaliges Waschen mit CB das Triton von der Probe entfernt. Zur Absättigung aller unspezifischen Bindungsstellen wurden die Zellen für 30 min mit einer Block-Lösung inkubiert. Diese bestand je nach Antikörper aus 5% Milchpulver, 10% Ziegen Serum oder 5% bovines Serumalbumin in CB. Nach erneutem Waschen mit CB erfolgte die Inkubation der Proben mit dem Primärantikörper. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:100 in 1% Milchpulver, 2% Ziegen Serum oder 1% bovines Serumalbumin in CB

eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Die verwendeten Antikörper sind in Abschnitt 6.1.2 aufgelistet. Um ungebundene bzw. unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde im Anschluss mehrfach mit 1% Milchpulver, 2% Ziegen Serum oder 1% bovines Serumalbumin in CB und Zusatz von 0,2% Tween-20 (*Sigma, Taufkirchen*) gewaschen. Anschließend wurden die Proben analog zum Primärantikörper mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Zur Färbung des Aktin-Cytoskeletts wurde dem sekundären Antikörper fluoreszent markiertes Phalloidin (*Alexa 488- u. Alexa 633-Phalloidin, Invitrogen*) in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben. Danach wurden ungebundene Antikörper durch erneutes Waschen mit dem zuvor verwendeten Waschpuffer entfernt. Durch Spülen mit destilliertem Wasser wurden Salze und Proteinreste der verwendeten Lösungen von den Proben entfernt. Nach vollständiger Abnahme der Flüssigkeit von den Proben wurden diese mit 20 µl Fluomount (*Sigma, Taufkirchen*) mit Zusatz von 0,1% DABCO (*Sigma, Taufkirchen*) eingedeckelt.

Um die Proben mit einem inversen Mikroskop analysieren zu können, wurde von unten ein Objektträger gegen den Kammerboden geklebt. Nachdem der Fluomount über Nacht geliert war, wurden die Proben mit einem Skalpell um das Deckglas herum ausgeschnitten und bis zur Mikroskopie dunkel gelagert.

Primäre Antikörper

Epitop	hergestellt in	Block-Lösung	Hersteller
α-Actinin Klon BM-75.2 (A5044)	Maus	Ziegen Serum	Sigma, Taufkirchen
Tubulin Klon YL1/2 (MAB1864)	Ratte	BSA	Millipore, Billerica, MA, USA
VASP Klon IE273 (0016-05)	Maus	Ziegen Serum	immunoGlobe, Himmelstadt
Vinculin Klon hVin-1 (V9131)	Maus	Milchpulver	Sigma, Taufkirchen
Vimentin Klon VIM-13.2 (V5255)	Maus	BSA	Sigma, Taufkirchen
Zyxin (Z4751)	Kaninchen	Ziegen Serum	Sigma, Taufkirchen

Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen (A11008)	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 647 anti-Ratte (A21472)	Invitrogen, Karlsruhe
Cy3 anti-Maus (115-166-062)	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Cy3 anti-Ratte (112-166-003)	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA

Tabelle 2.2: Verwendete Antikörper

2.4 Deformation der elastischen Substrate

Um das Verhalten der HUVECs auf eine Dehnung des Substrates zu beobachten, wurden zwei verschiedene Systeme verwendet. Zum einen war dies ein automatisiertes System zum Verzug der Kulturkammern aus Silikonkautschuk, zum anderen wurde ein manueller Substratverzug mittels eines Mikromanipulators durchgeführt.

2.4.1 Deformation durch Dehnung der Elastomerkammern

Die Apparatur zur Dehnung der Silikonkautschuk-Kammern beruht auf einer Linear-Verschiebeeinheit, die von einem Computer-gesteuerten Schrittmotor angetrieben wird. Sie wurde von Wolfgang Rubner im Institut entwickelt. Diese Apparatur zieht an einer Seite der in einer Halterung fixierten Elastomerkammern. Auf diese Weise erfährt der Kammerboden eine uniaxiale Dehnung. Das Format des Geräts ermöglicht sowohl den Betrieb im Inkubator als auch montiert auf einen Mikroskoptisch. Die Ansteuerung des Geräts erfolgt über eine externe Kontrolleinheit, die über einen Computer gesteuert werden kann. Die entsprechende Software wurde von Werner Hürttlen (ICS-TA) auf Basis einer LabVIEW-Umgebung programmiert. Sie ermöglicht das genaue Einstellen des Verfahrwegs des Motors und seiner Geschwindigkeit, sowie Pausenzeiten und Anzahl der Wiederholungen eines Zyklus. Die Kulturkammern selbst sind so gestaltet, dass in ihnen Zellen auf einer Fläche von ca. 2 cm^2 mit $500 \mu\text{l}$ Medium kultiviert werden können. Die Analysen beschränkten sich jedoch stets auf die mittlere Fläche von 1 cm^2 . Diese war mit einer Mikrostrukturierung aus zwei sich kreuzenden Linien versehen, die wiederum aus 3 parallelen Reihen von Quadraten mit einer Gitterkonstante von $3,5 \mu\text{m}$ bestanden. Diese Strukturierung ermöglichte es u.a. die immunhistochemisch angefärbten Proben auf dem Mikroskoptisch zu justieren bzw. aus Aufnahmen der horizontalen und vertikalen Linien die Orientierung der Proben für die Bildanalyse zu korrigieren. Die Dicke des Bodens betrug nur etwa $300 \mu\text{m}$. Durch die Verwendung eines gleichzeitig im Verhältnis sehr massiven Kammerrands (s. Abbildung 2.3) war es daher möglich, die transversale Schrumpfung während des uniaxialen Verzugs zu minimieren. Diese betrug bei 14%

Amplitude nur -1,4%, bei 35% entsprechend etwa 3,5%. Die Deformation der Kammern ist in *Faust et al.* [25] genau charakterisiert.

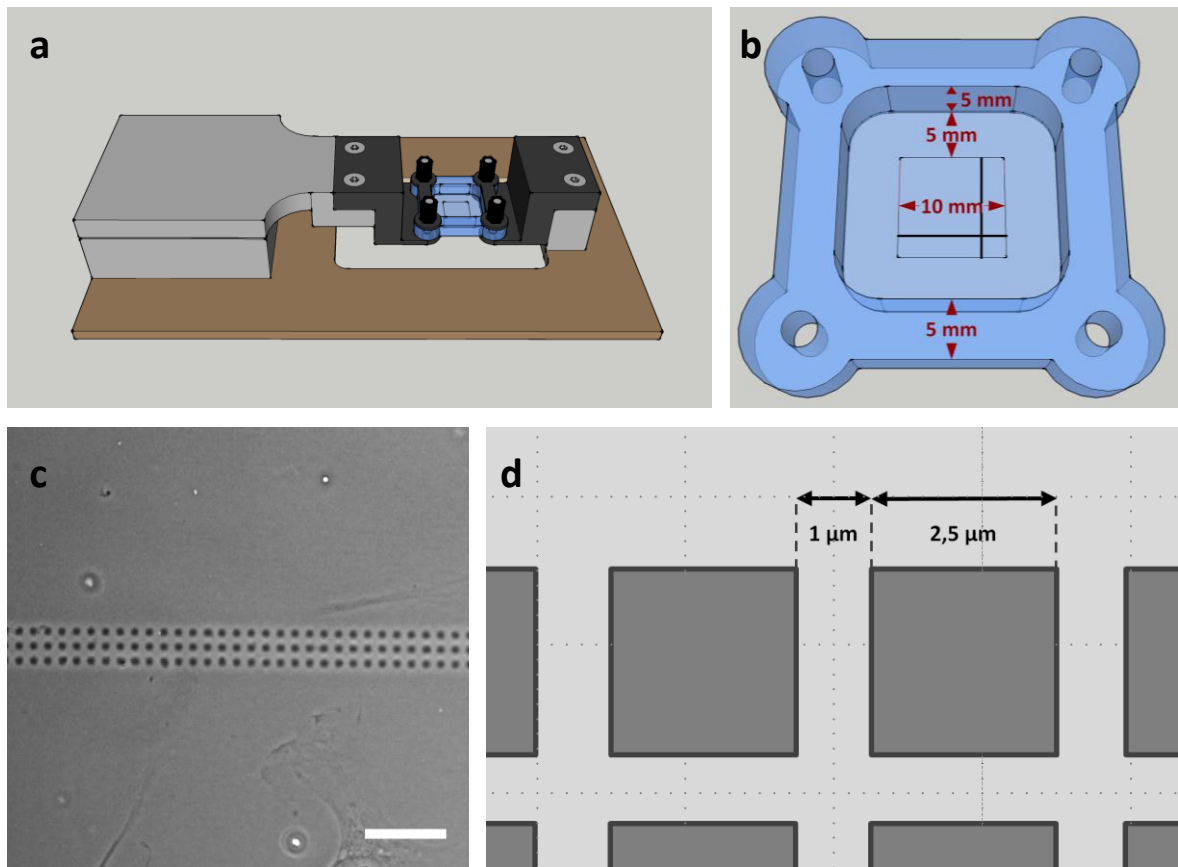


Abbildung 2.3: Design der Dehnungsapparatur für die Zugkammern – Die Kulturkammern aus Silikonkautschuk wurden in eine Apparatur bestehend aus einer linearen Verschiebeeinheit (grauer Kasten) eingespannt (a). Die Kammern selbst bestanden aus einem 4 cm² großen und ca. 300 µm dünnen Film, der von einem 5 mm dicken Rahmen umgeben war (b). Die innere Fläche von 1 cm² war mit einer Mikrostruktur versehen. Diese bestand aus zwei gekreuzten Linien aus regelmäßig angeordneten Quadraten mit einer Gitterkonstante von 3,5 µm (c/d). Maßstabsbalken = 10 µm.

Für die Experimente wurden die Kammern in der Grundposition des Motors spannungsfrei in spezielle Halterungen eingehängt und mit Klemmplättchen und Muttern fixiert. Um ein Durchhängen des Kammerbodens nach Befüllung mit Medium zu reduzieren, wurden die Kammern um 1,5 mm vorgedehnt. Für die Versuche wurden pro Kammer ca. 15.000 Zellen in 500 µl EGM-2 kultiviert. Um die Evaporation des Mediums im Inkubator und den damit verbundenen osmotischen Stress für die Zellen zu verhindern, wurde die Kammer in Zugrichtung mit einem zurecht geschnittenen Objektträger abgedeckt, der auf den Klemmplättchen auflag. Ein darüber gelegter Streifen Parafilm deckte auch die Seiten ab. Durch Herausschneiden

eines „Fensters“ aus dem Parafilm über dem Glas, konnte diese Abdeckung auch für die Lebzell- Experimente am Mikroskop verwendet werden. Grundsätzlich wurde mit diesem System die Zellantwort auf zwei verschiedene mechanische Reize untersucht. Zum einen wurde die cytoskelettale Reorientierung durch zyklische uniaxiale Dehnung der Kammern über einen Zeitraum von bis zu 8 h gemessen, zum anderen die direkte Zellantwort in Form von Proteinanlagerungen an belastete Stressfasern untersucht, indem die Kammern einmalig gedehnt und die Zellen anschließend direkt fixiert wurden. Die beiden Verzugvarianten sind in Abbildung 2.4 schematisch dargestellt.

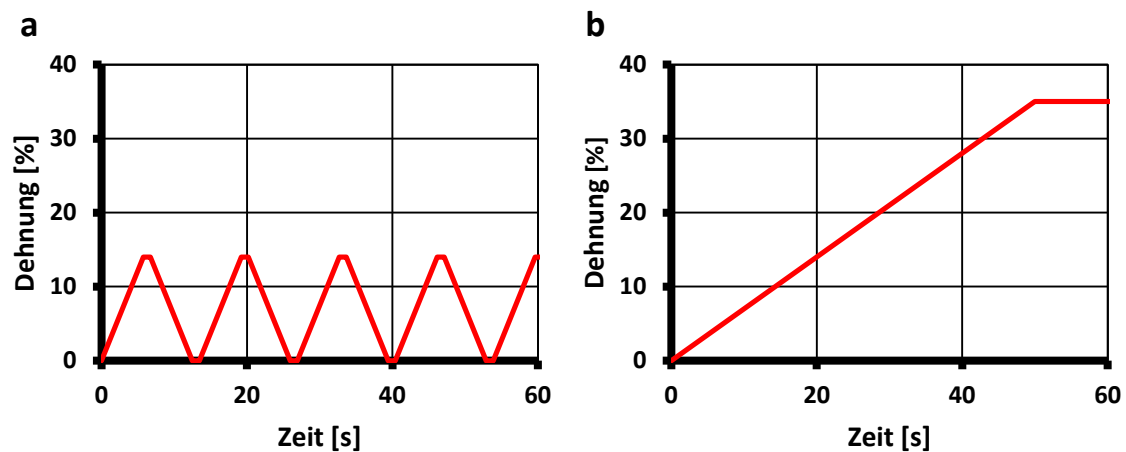


Abbildung 2.4: Verfahrweg des linearen Schrittmotors – In (a) ist der Verfahrweg des Linearmotors für die Experimente mit zyklischer Dehnung dargestellt. Die Frequenz beträgt dabei 130 MHz, die Amplitude 14%. (b) zeigt den einfachen Verzug der Verzugskammern mit einer Geschwindigkeit von 0,15 mm/s und einer Substratdehnung von 35%. Die Dehnung wurde für die Färbung und Präparation der Proben aufrechterhalten.

Die zyklische Dehnung erfolgte bei einer Motorgeschwindigkeit von 1,04 mm/s und einer Amplitude von 3 mm. Dies entsprach einer effektiven Dehnung des Substrates unter den Zellen von 14%. An der maximalen und minimalen Motorposition wurden Pausen von 0,962 s eingelegt, sodass sich eine Frequenz von 130 MHz ergab. Die Amplitude für die einfache Dehnung betrug 7,5 mm respektive 35% Substratdehnung bei einer Motorgeschwindigkeit von 0,15 mm/s.

2.4.2 Substratdeformation mit dem Mikromanipulator

Das zweite verwendete System zur Substratdeformation beruht auf Experimenten aus *Kirchenbüchler et. al* [107], bei denen lokal Deformationsfelder in das Elastomersubstrat im Bereich von Zellen eingebracht wurden. Anders als dort beschrieben wurde jedoch ein motorisierter Mikromanipulator (*InjectMan, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf*) verwendet. Auch erfolgte die Einleitung des Deformationsfeldes nicht über eine Nadel, sondern über ein selbstgefertigtes, im Folgenden als Mikroklinge bezeichnetes Werkzeug. Dies bestand aus einem trapezoiden Blättchen aus Siliziumdioxid, dessen untere, schmale Kante in einem Winkel von ca. 45° angeschliffen wurde. Die Mikroklinge wurde mit Epoxidkleber an einer Pipettenspitze fixiert und konnte so auf einen Metallstab gesteckt und am Mikromanipulator montiert werden. Der Vorteil der Klinge gegenüber einer Nadel war, dass die gesamte Zelle und somit deutlich mehr Aktinfasern über einen viel breiteren Bereich in einem homogenen Deformationsfeld gedehnt werden konnte. Zur Deformation des Substrats wurde die Mikroklinge vorsichtig auf dem Substrat aus Silikonkautschuk etwa $20\text{-}30\ \mu\text{m}$ neben der zu untersuchenden Zelle abgesetzt und das Substrat etwa $5\ \mu\text{m}$ eingedrückt. Durch eine horizontale Bewegung von ebenfalls ca. $20\text{-}30\ \mu\text{m}$ von der Zelle weg, wurde nun das Substrat und damit auch die Zelle selber gedehnt.

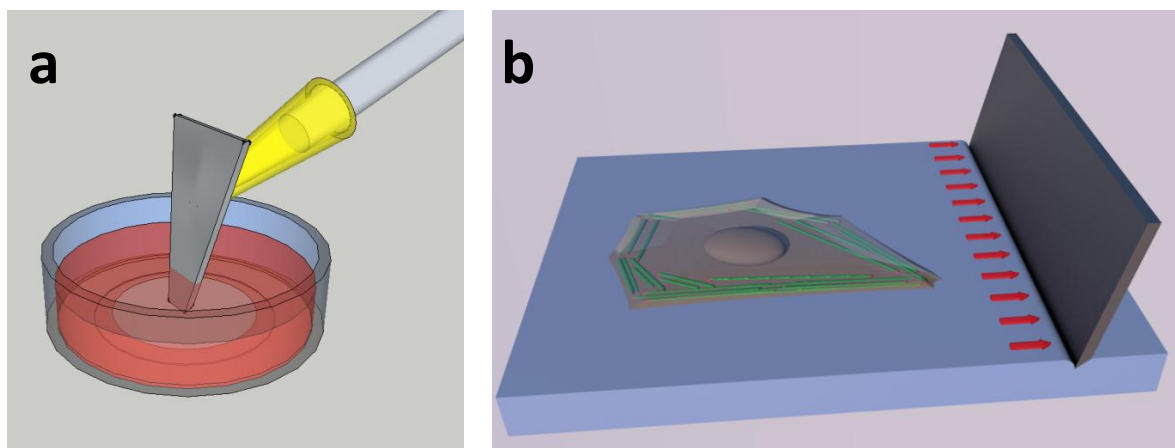


Abbildung 2.5: Substratdeformation mit der Mikroklinge – a zeigt die selbst hergestellte Klinge zur Deformation und ihre Positionierung in einer Probenschale. Das Werkzeug wird unmittelbar neben der zu untersuchenden Zelle auf dem Substrat abgesetzt und die Zelle durch eine horizontale Bewegung der Klinge gedehnt (b).

Das entstehende Deformationsfeld wurde exemplarisch in einem getrennten Versuch bestimmt. Dafür wurden auf die Oberfläche aus Silikonkautschuk rot fluoreszierende Kugeln (*FluoSpheres carboxylate modified, Invitrogen, Karlsruhe*) mit einem Durchmesser von 200 nm physisorbiert. Die fest anhaftenden Kugeln wurden ohne und mit angelegtem Deformationsfeld mikroskopisch aufgenommen und mit einer von Norbert Kirchgeßner geschriebenen MATLAB-Routine [108] die Verschiebung der einzelnen Kugeln bestimmt. Dazu wurde anhand einer markierten Kugel eine synthetische Schablone erstellt, über die die Kugeln im Bild erkannt wurden. Über normierte Kreuzkorrelation wurden die Positionen der einzelnen Kugeln vor und nach dem Verzug errechnet und aus diesen Positionen die Verschiebung an der jeweiligen Stelle bestimmt.

Der Vorteil dieser Methode zur Substratdeformation gegenüber der Dehnung in Kulturkammern lag vor allem darin, dass die analysierte Zelle während der Deformation im Sichtfeld des Mikroskops blieb, während sie beim Verzug in Elastomerkammern aus dem Sichtfeld heraus bewegt wurde.

2.5 Ablauf der Experimente und Mikroskopie

Die Experimente dieser Arbeit dienten der Analyse zweier unterschiedlicher Zellreaktionen auf Dehnung des Substrats. Der eine Teil befasste sich mit der Umorientierung des Cytoskeletts auf zyklische Deformation über einen längeren Zeitraum, der andere mit einem möglichen Reparaturmechanismus der Aktinbündel als Kurzzeitantwort der untersuchten Endothelzellen auf eine einfache Dehnung. Beide Phänomene wurden immunohistochemisch und in Lebendzell-Experimenten untersucht.

2.5.1 Experimente zur Analyse der Umorientierung des Cytoskeletts

Lebendzell-Untersuchung

Die Lebendzell-Analysen der Aktin-Reorientierung wurden sowohl an primären HUVECs als auch an HUV-EC-C durchgeführt. Für die quantitative Analyse wurden

jedoch nur die Primärzellen verwendet. Für die Experimente wurden die Endothelzellen mit GFP-Lifeact transfiziert. Lifeact ist ein künstliches, 17 Aminosäuren großes Peptid, das der Aktin bindenden Domäne von Abp-140 (*Actin binding protein*) aus *Saccharomyces cerevisiae* entspricht. Im Gegensatz zum sonst verwendeten fluoreszent markierten Aktin, wird Lifeact nicht in die Aktinfasern eingebaut, sondern bindet von außen an diese, ohne dabei jedoch deren Dynamik zu stören [109]. Die transfizierten Zellen wurden für 24 h in den Elastomerkammern kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurde das Medium der Zellen gegen EGM-2 mit 20 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) als Puffersubstanz ausgetauscht, da während der Zellanalyse keine CO₂-Versorgung zur Stabilisierung des pH-Wertes möglich war.

Die Untersuchungen wurden an einem inversen Weitfeldmikroskop (*Axiinvert 200, Carl Zeiss*) durchgeführt. Dazu wurde ein Luft-Objektiv mit 40facher Vergrößerung, Phasenkontrast 2 und großem Arbeitsabstand (*LD-Achroplan 40x/0,60 NA Korr Ph2, Carl Zeiss*) verwendet. Für die Aufnahmen des GFP-Lifeact wurde das Licht einer Quecksilberdampflampe mit einem spezifischen Filtersatz (*Filtersatz 09, Carl Zeiss*) gefiltert. Für die Anregung wurde ein Bandpassfilter (450-490 nm) verwendet, für das vom Fluorophor emittierte Licht ein Langpass (515 nm). Als Kamera wurde eine ORCA ER CCD (*Hamamatsu Photonics*) eingesetzt, die über die Software OpenBox 1.77 (*Informationssysteme Schilling*) angesteuert wurde. Durch einen Inkubatoraufsatz (*Carl Zeiss*) mit Heizeinheit (*Pecon*) wurde die Temperatur während des Versuchs auf 37°C gehalten.

Vor Beginn des zyklischen Verzugs wurden drei bis vier Bildausschnitte mit transfizierten Zellen ausgewählt, die nach Möglichkeit eine Hauptausrichtung parallel zur Zugrichtung aufwiesen. Diese wurden als Zeitpunkt 0 aufgenommen. Anschließend wurde der Versuch mit einer Dehnungsamplitude von 14% und einer Wiederholungsfrequenz von 130 mHz gestartet. Alle 20 min wurde der Verzugsapparat in der ungedehnten Position angehalten, manuell die ausgewählten Bereiche mit dem Mikroskoptisch angefahren und die Zellen aufgenommen. Insgesamt wurde so über eine Gesamtversuchsdauer von 4 h verfahren, wobei nach 2 h zusätzlich noch ein Mediumwechsel stattfand, um den osmotischen Stress durch Verdunstung des Mediums zu minimieren.

Immunohistochemische Untersuchung

Bei der immunohistochemischen Untersuchung wurden 16 h vor Versuchsbeginn 15.000 primäre HUVECs in jeder Dehnungskammer ausgesät. Die Kammern wurden in die Apparatur eingesetzt und für die Dauer des eigentlichen Experiments im Inkubator belassen. Gedeht wurden die Zellen mit denselben Parametern wie im Lebendzellversuch (14% Amplitude bei 130 mHz). Um den zeitlichen Verlauf der cytoskelettalen Reorientierung genauer zu betrachten, wurden verschiedene Versuchsdauern gewählt. Diese betragen 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Zellen direkt mit PFA fixiert und wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben immunhistochemisch angefärbt. Markiert wurden dabei sowohl das Aktin-Cytoskelett (*Alexa Fluor 488* oder *Alexa Fluor 633-Phalloidin*, *Invitrogen*) als auch die Microtubuli (primärer Antikörper: *Tubulin Klon YL1/2*, *Millipore*; sekundärer Antikörper: *Cy3 anti-Ratte*, *Jackson immunoresearch* o. *Alexa Fluor 647 anti-Ratte*, *Invitrogen*).

Die fertigen Proben wurden an einem konfokalen Laserraster-Mikroskop (*LSM 510 Meta*, *Carl Zeiss*) aufgenommen. Verwendet wurde dafür ein 40-fach vergrößerndes Öl-Immersionsobjektiv mit Phasenkontrast 3 (*Plan Neo-Fluar 40x/1,3 NA Öl-Immersion Ph3*, *Carl Zeiss*). Zur Anregung von *Alexa Fluor 488* wurde ein Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet, *Cy3*, sowie *Alexa Fluor 633* und *647* wurden mit zwei Helium-Neon-Lasern der Wellenlänge 543 nm bzw. 633 nm angeregt. Die emittierte Fluoreszenz wurde für *Alexa Fluor 488* und *Cy3* mit einem jeweils geeigneten Bandpass (505-530 nm und 560-615 nm) analysiert, für *Alexa Fluor 633* und *647* wurde ein Langpassfilter (650 nm) verwendet, weiterhin wurde ein passender Hauptfarbteiler (UV/488/543/633) eingesetzt.

Ein Teil der Proben wurde an einem automatisierten Weitfeldmikroskop (*Axio Observer Z.1*, *Carl Zeiss*) untersucht. Die verwendeten Filtersätze dort waren Filtersatz 35HE (*Carl Zeiss*) für *Alexa Fluor 488* und Filtersatz 56HE (*Carl Zeiss*) für *Alexa Fluor 647*.

Bei der Aufnahme wurde nur der zentral liegende Bereich der Proben von 1 cm² aufgenommen, da dieser Bereich durch eine sehr ähnliche Querkontraktionszahl charakterisiert war und damit alle analysierten Zellen fast gleiche Dehnung erfahren hatten [25]. Dabei wurde die Probe in jeweils drei senkrechten und waagerechten Bahnen abgefahren und die Zellen nach manueller Fokussierung aufgenommen (s.

Abb. 2.6). Es wurde darauf geachtet, keine Bereiche doppelt aufzunehmen. Weiterhin wurde für jede Probe eine Aufnahme der Mikrostruktur gemacht, um eine eventuelle Rotation der Probe korrigieren zu können.

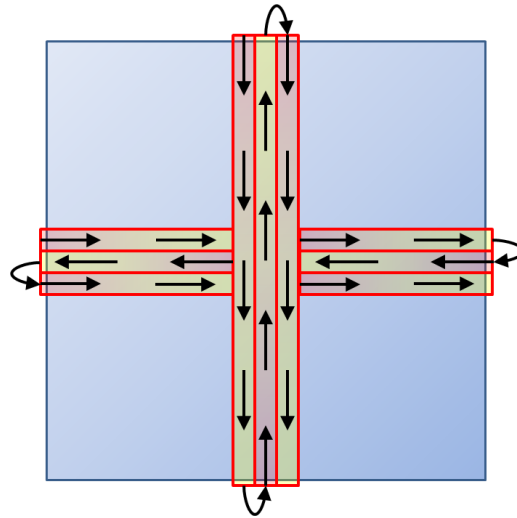


Abbildung 2.6: Schema des Verfahrenswegs zur Probenaufnahme – Die Aufnahmen der immunohistochemisch angefärbten Proben erfolgten nach einem stets gleichen Muster. Es wurden drei senkrecht und drei waagerechte Bahnen aufgenommen, die im zentralen Bereich der Probe mit einer Fläche von 1 cm² lagen.

2.5.2 Experimente zur Analyse von Proteinanlagerungen an Aktinfasern

Lebendzell-Untersuchungen

Für die Analyse der Dynamik von Zyxin und VASP in Einlagerungen an Aktin-Stressfasern wurden primäre HUVECs 24 h vor Versuchsbeginn mit GFP-Zyxin und mCherry-VASP cotransfiziert. Die Experimente wurden ebenfalls am konfokalen Mikroskop durchgeführt (s. Abschnitt 2.4.1). Für die Anregung des GFP wurde der Argon-Ionen-Laser (488 nm) und der entsprechende Bandpassfilter (505-530 nm) verwendet. Für mCherry wurde ein He-Ne-Laser (543 nm) und ein Bandpassfilter (560-615 nm) eingesetzt. Für beide Kanäle wurde der gleiche Hauptfarbteiler (488/543) verwendet. Zur Dehnung des Substrates wurde die in Abschnitt 2.3.2 beschriebene Mikroklinge benutzt. Dem Nährmedium wurde für die Experimente HEPES (20 mM Endkonzentration) hinzugefügt und die Temperatur bei konstant 37°C gehalten.

Zunächst wurde die Mikroklinge unter Verwendung eines Objektivs mit 20-facher Vergrößerung (*LD-Achrostigmat 20x, Carl Zeiss*) in Position gebracht, ohne jedoch auf dem Substrat aufzusetzen. Für das eigentliche Experiment wurde dann das Plan Neo-Fluar 40x Öl-Immersions-Objektiv verwendet. Dabei wurde eine geeignete Zelle, die beide Proteine exprimiert, zunächst im ungedehnten Zustand aufgenommen. Anschließend wurde unter visueller Kontrolle durch die Okulare die Deformation induziert und für den weiteren Ablauf aufrechterhalten. Danach wurde unverzüglich auf die Zelle mit den entstandenen Einlagerungen refokussiert und die Aufnahme einer Zeitserie gestartet. Das Aufnahmeintervall betrug dabei stets 20 s.

Zusätzlich wurde untersucht wie sich die Dynamik ändert, wenn die Zelle deformiert, die Dehnung aber nicht gehalten wird. Der Versuchsablauf selbst war sonst identisch.

Immunohistochemische Untersuchung

Da für diese Arbeit kein Antikörper gefunden werden konnte, der hochspezifisch zelluläres Zyxin markiert, wurden die HUVECs für diesen Versuchsteil zunächst mit GFP-Zyxin transfiziert und im Anschluss für 24 h in Silikonkautschukammern kultiviert. Für die Versuche wurden sowohl primäre HUVECs als auch HUV-EC-C verwendet.

Das Experiment wurde mit den in Abbildung 2.4 b dargestellten Dehnungsparametern mit einer Amplitude von 35% Substratdehnung über eine Dauer von 50 s durchgeführt. Unmittelbar nach Erreichen der Maximaldehnung wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese mit PFA fixiert. Für die Untersuchungen wurden, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Die Markierung des Aktins erfolgte stets mit Alexa Fluor 633-Phalloidin. Die verschiedenen verwendeten primären Antikörper sind genauer in Abschnitt 6.1.2 aufgelistet, die sekundären Antikörper waren Cy3-gekoppelt und gegen die entsprechende Wirtsspezies des Primärantikörpers gerichtet.

Die Aufnahmen zur Bestimmung der allgemeinen Proteinzusammensetzung in den Einlagerungen wurden am konfokalen Mikroskop, die zur Analyse der Einlagerungs-Orientierung am automatisierten Weitfeld-Mikroskop angefertigt. Dabei wurden die bereits in Abschnitt 2.4.1 erwähnten Filtersätze verwendet. Da die Transfektionsrate der Endothelzellen stets sehr ineffizient war, wurde für diese Analysen der gesamte zentrale Bereich der Kammern mäanderförmig nach transfizierten Zellen abgesucht und diese aufgenommen.

2.6 Digitale Bildverarbeitung

2.6.1 Orientierungsanalyse cytoskelettaler Strukturen

Die Orientierungsanalyse der cytoskelettalen Strukturen beruht auf einer von Dr. Norbert Kirchgeßner entwickelten MATLAB-Programm-Routine [25], die von Dr. Ronald Springer und Georg Dreissen weiter angepasst worden ist. Das Programm gliedert sich in die Strukturerkennung und Strukturanalyse (*structens4cell8-weighted_pyramidchoice*) sowie in ein Modul zur interaktiven Kennzeichnung nicht erkannter Zellgrenzen und Entfernung fälschlich oder unzureichend detektierter Bereiche (*cellori_manualmark3*) auf.

Der Ablauf des Algorithmus ist wie folgt: Zur Bandpassfilterung wurden die Mikroskopiebilder des fluoreszierend Cytoskeletts zunächst mit einer 7x7 Binominalmaske geglättet (Pixelgröße 0,16 µm) und das Resultat vom Originalbild subtrahiert. Zur Minimierung des extrazellulären Hintergrunds wurde nun das Bandpass-gefilterte Bild erneut mit einem 7x7 Binominalfilter geglättet. Als cytoskelettale Strukturen wurden all jene Bereiche angenommen, deren Grauwerte über der Summe des mittleren Grauwertes des prozessierten Bildes und dessen halber Standardabweichung lagen. Ausgenommen davon waren überstrahlte Bereiche mit einer lokale Varianz von 0. Da in diesen Bereichen alle benachbarten Pixel den gleichen, maximalen Grauwert haben, konnte auch keine Gradientenbestimmung erfolgen. Um Zelltrümmer und Artefakte der Färbung auszuschließen, wurden ebenso Bereiche mit einer Fläche kleiner als 200 µm² nicht mit berücksichtigt. Die Bestimmung der Strukturorientierung erfolgte durch einen 2D Strukturtensor nach *Bigun et al.* [110] und eines mittels optimierten Sobel-Operators (Scharr-Operator) berechneten Grauwertgradienten [111], definiert durch:

$$S = \begin{pmatrix} \left(\frac{\partial I}{\partial x}\right)^2 & \frac{\partial I}{\partial x} * \frac{\partial I}{\partial y} \\ \frac{\partial I}{\partial x} * \frac{\partial I}{\partial y} & \left(\frac{\partial I}{\partial y}\right)^2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{pmatrix}$$

Dabei steht I für die Intensität an der Position ij , wobei für die eine Bildgröße $M \times N$ gilt: $1 \leq i \leq M$ und $1 \leq j \leq N$. B bezeichnet den verwendeten Glättungsoperator. Der Winkel ϑ zwischen der Richtung des Grauwertgradienten und der x-Achse ergibt sich aus:

$$\vartheta(i, j) = \frac{1}{2} \arctan \left(\frac{2S_{12}(i, j)}{S_{22}(i, j) - S_{11}(i, j)} \right)$$

Damit ausschließlich cytoskelettale Strukturen mit einer klaren Ausrichtung in die Analyse einfließen, wurden die Orientierungsvektoren, also die Einheitsvektoren, die senkrecht auf der Richtung des Grauwertgradienten stehen, mit einer 7×7 Binominalmaske (B_7) als Wichtungsfunktion gemittelt. Obwohl der Algorithmus immer eine Richtung des Strukturtenors liefert, ergibt sich in unklar orientierten Bereichen durch die Mittelung stets ein kleiner Wert. Alle Orientierungsvektoren mit einem Kohärenzmaß größer als 0,5 [112] wurden als orientierte Strukturen für die weitere Analyse berücksichtigt. Das Kohärenzmaß (k) ergibt sich dabei aus:

$$k(i, j) = \sqrt{c_1(i, j)^2 + c_2(i, j)^2} \quad \text{mit} \quad \begin{pmatrix} c_1(i, j) \\ c_2(i, j) \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} B_7(\cos(\vartheta(i, j))) \\ B_7(\sin(\vartheta(i, j))) \end{pmatrix}$$

Schließlich wurde die geglättete Orientierung α bestimmt:

$$\alpha(i, j) = \frac{1}{2} \arctan \left(\frac{c_2(i, j)}{c_1(i, j)} \right)$$

Für alle auf diese Weise gemessenen Orientierungen wurde anschließend für jede Zelle ein separates Histogramm erstellt (s. Abb. 2.7).

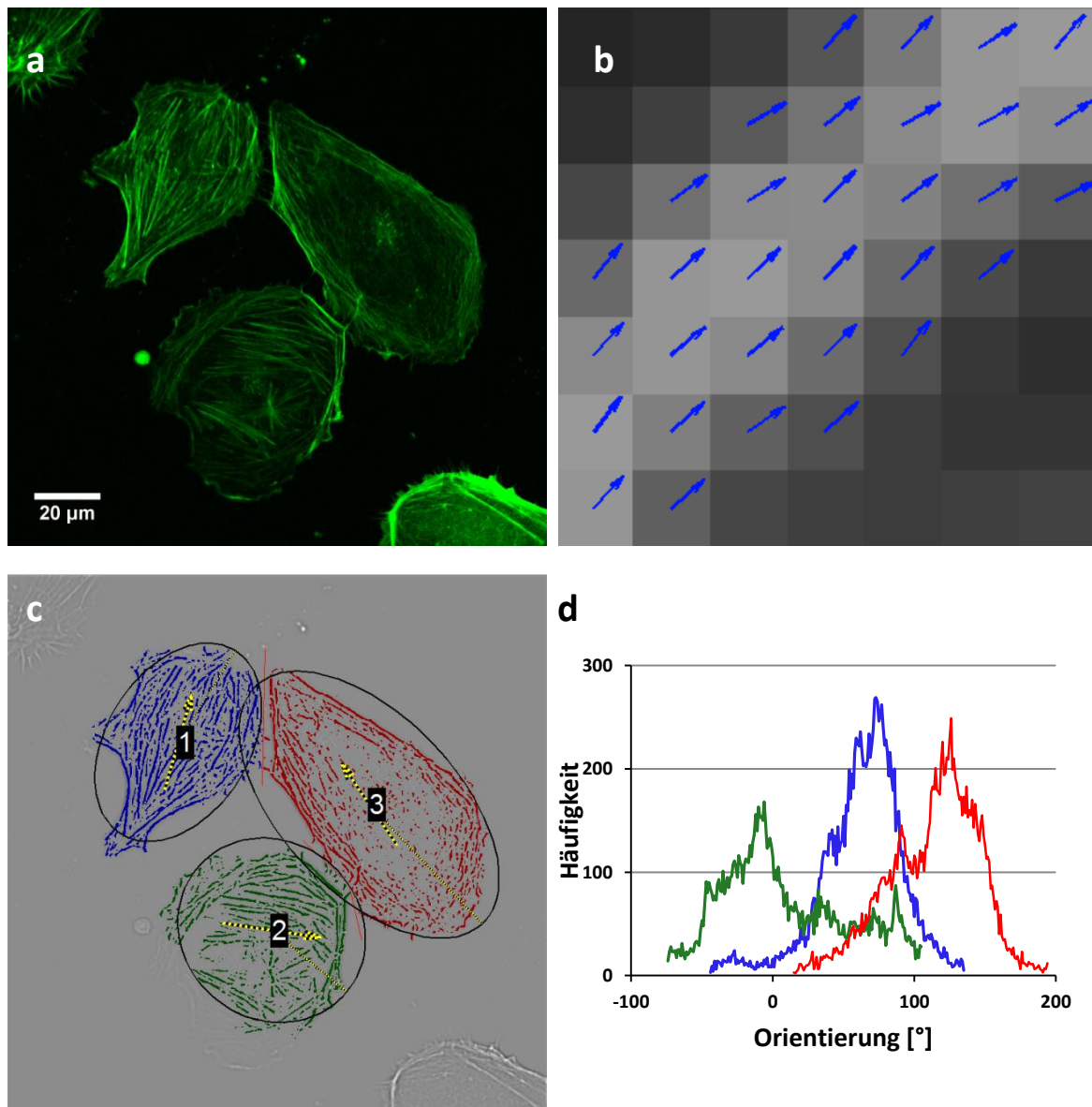


Abbildung 2.7: Orientierungsanalyse des Aktin-Cytoskeletts – In (a) gezeigt sind die Mikroskop-Aufnahmen primärer HUVECs mit angefärbten Aktinfasern (Alexa 488-Phalloidin). Auf Basis von lokalen Grauwertgradienten wird die Orientierung für jedes Pixel (blaue Pfeile) berechnet (b), Pixelgröße = 0,16 μm . Der verwendete MATLAB-Algorithmus erkennt in diesem Bild die cytoskelettalen Strukturen (blau, rot und grüne Markierungen) und nähert die Gesamtzellform mit einer Ellipse an (b). Aus den gemessenen Orientierungen wird für jede Zelle ein eigenes Histogramm erstellt (d).

Da aneinandergrenzende Zellen vom Algorithmus nicht als getrennt detektiert werden konnten, mussten diese Bereiche manuell mit *cellori_manualmark3* voneinander separiert werden. Ebenfalls wurden mit diesem Programmteil detektierte Zellreste und tote Zellen aus der Analyse ausgeschlossen. Neben der Bestimmung der gesamten cytoskelettalen Orientierung wurde für jede Zelle noch eine Hauptorientierung bestimmt. Dazu wurde das Orientierungshistogramm mit

einer Klassengröße von 1° mit einem 59×1 Binominalkern geglättet und das Maximum dieser geglätteten Verteilung verwendet. Für die in Abschnitt 3.1.2 näher erläuterten Ergebnisse der Analyse der Cytoskelett-Ausrichtungen wurden sowohl die Hauptorientierung als auch die relativen Häufigkeiten aller gemessenen Orientierungen pro Zelle berücksichtigt.

Zusätzlich zur Analyse des Cytoskeletts wurde die Ausrichtung des Zellkörpers betrachtet. Um diese zu bestimmen, wurde eine Ellipse berechnet, die das gleiche normalisierte zweite zentrale Moment besitzt, wie die als cytoskelettale Strukturen erkannten Flächen. Als Orientierung der Zelle wurde der Winkel zwischen der Hauptachse der angenäherten Ellipse und der x-Achse des Bezugssystems verwendet. Weiterhin wurden aus dieser äquivalenten Ellipse das Aspektverhältnis und die Fläche der Zelle ermittelt.

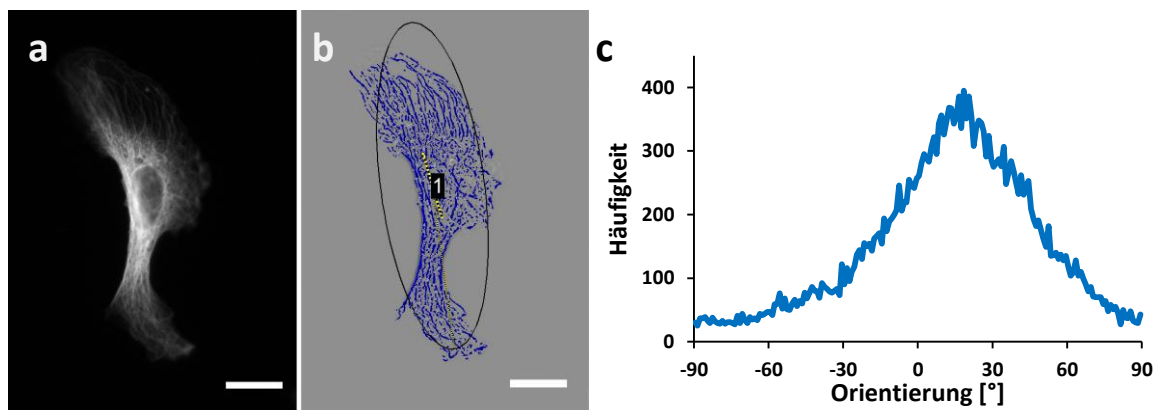


Abbildung 2.8: Orientierungsanalyse der Mikrotubuli – Die Abbildung zeigt das Resultat, das auf die Mikrotubuli-Aufnahmen angewandten Algorithmus. In *a* zu sehen ist eine Aufnahme von immunocytochemisch angefärbten Mikrotubuli, *b* zeigt die vom Algorithmus erkannten Strukturen, sowie die für die Zelle äquivalente Ellipse. Das Histogramm der gemessenen Orientierungshäufigkeiten ist in *c* dargestellt. Maßstab = 20 μm

2.6.2 Orientierungsanalyse von Zyxin-Einlagerungen

Als Teil dieser Arbeit wurden die Orientierungen der Zyxin-Anlagerungen an die Stressfasern der Endothelzellen untersucht. Für die eigentliche Analyse mussten die Bereiche isoliert werden, die wirklich den spezifischen Protein-Akkumulationen entsprachen. Zyxin ist in der Zelle jedoch sowohl entlang der Stressfaser als auch in

den FA lokalisiert. Die durch mechanische Belastung entstehenden Anlagerungen an der Stressfaser lassen sich von dieser durch eine höhere Intensität im Zyxin-Signal unterscheiden. Das Zyxin-Signal in den FA ist ebenfalls von hoher Intensität. Daher wurde zusätzlich Vinculin, ein Strukturprotein der FA das nicht an Stressfasern lokalisiert, angefärbt.

Beide Aufnahmekanäle wurden für die digitale Bildanalyse verwendet, die Algorithmen wurden ursprünglich von Dr. Norbert Kirchgeßner programmiert und von Dr. Ronald Springer für meine Anwendung angepasst.

Im ersten Schritt wurden zunächst manuell alle Zellflächen definiert. Hierfür wurden die Zellen auf Basis des aufgenommenen, angefärbten Aktin-Cytoskeletts umrandet. Durch das MATLAB-Modul *extractfocals5_batchmode* wurden Bereiche von akkumuliertem Zyxin bzw. Vinculin in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen identifiziert. Dazu wurden die Bilder erst mit einem 9x9 Binominalfilter geglättet und anschließend mit einem 57x57 Binominalfilter hochpassgefiltert. Zur Maskierung der Bereiche von Einlagerungen und Fokaladhäsionen wurden diese nun segmentiert. Dazu wurde zur Standardisierung im Hochpass-Bild der lokale Z-Wert der Grauwerte (G) bestimmt:

$$G = \frac{g - \mu}{\sigma}$$

Dabei sind g der lokale Grauwert und μ und σ Mittelwert und Standardabweichung desselben in einem 45x45 Pixel großen Fenster. Um die endgültige Maske zu erhalten, wurde das Z-Wert-Bild nun mit einer Segmentierungsschwelle von 0,9 binärisiert. Ausgeschlossen aus der Maske wurden die Bereiche, die entweder unter einer Mindestgröße von 10 Pixeln lagen oder sich außerhalb des als Zellfläche markierten Polygons befanden.

Im Programmteil *maskSubstraction* wurden die erzeugten Binärmasken von Zyxin und Vinculin pixelweise logisch miteinander verknüpft. Alle Bereiche der Zyxinmaske, die nicht von der Vinculinmaske abgedeckt waren, wurden somit als Einlagerung angesehen. In Operatorschreibweise der booleschen Algebra (\wedge -UND, \neg -NICHT) ausgedrückt ergibt sich:

$$\text{Einlagerung} = \text{Zyxinmaske} \wedge (\neg \text{Vinculinmaske})$$

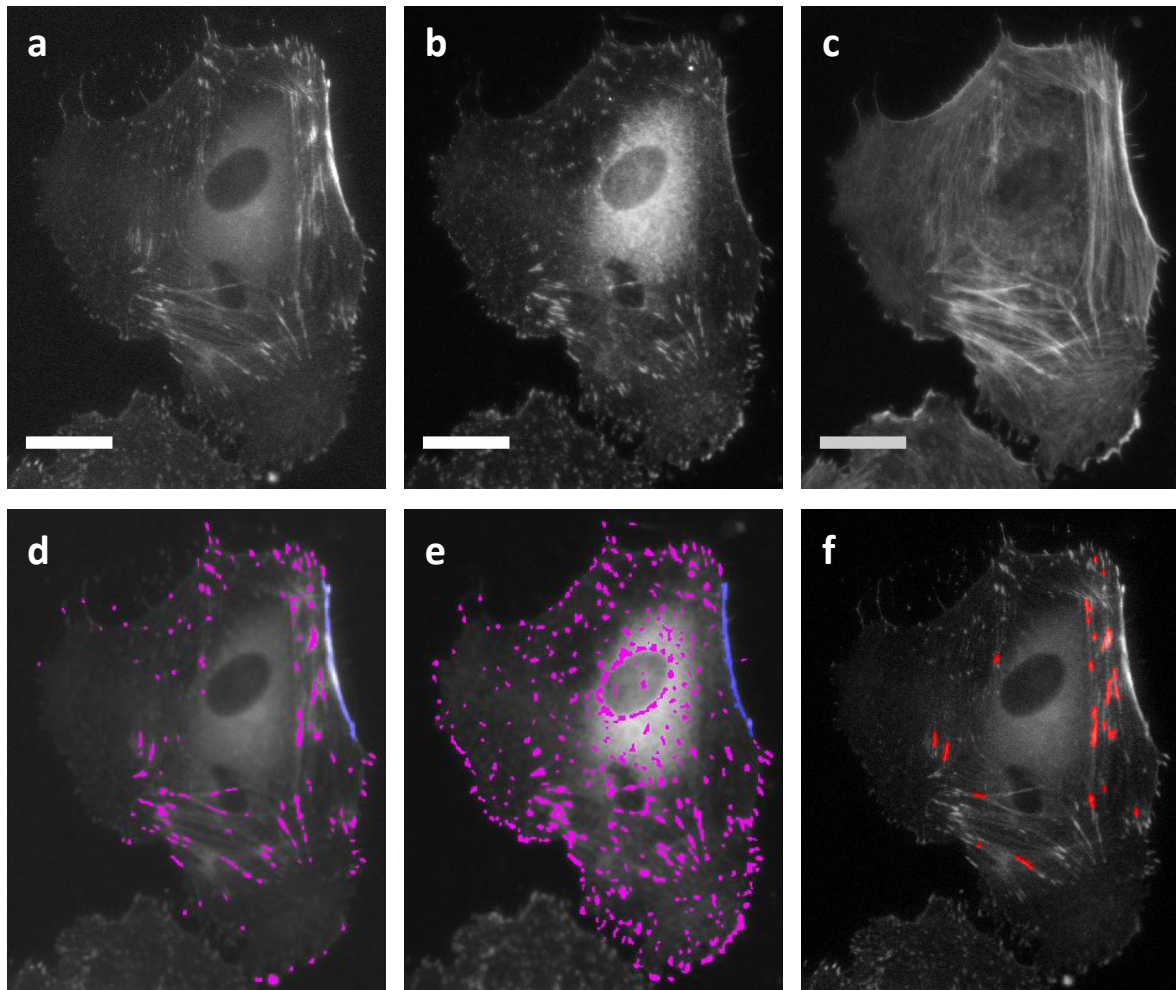


Abbildung 2.9: Maskierung von Zyxin Einlagerungen – Gezeigt sind Fluoreszenz-Mikroskopie-Bilder einer primären HUVEC-Zelle, transfiziert mit GFP-Zyxin (a), immunohistochemisch angefärbtem Vinculin (b) und über Alexa 633-Phalloidin markierten Aktinfasern (c). Proteineinlagerung an Stressfasern und den Adhäsionen wurden für Zyxin (d) und Vinculin (e) maskiert (magenta), große zusammenhängende Strukturen (blau) wurden als mögliche Artefakte ausgeschlossen. Durch logische Verknüpfung beider Masken entsteht die Maskierung der als Proteinanlagerung definierten Bereiche (f). Maßstab = 20 μm .

Neben den eigentlichen Zyxin-Einlagerungen an den Stressfasern blieben nach dieser Operation teilweise jedoch auch andere Strukturen übrig. Dies waren im Besonderen vesikuläre Kompartimente vor allem im kernnahen Bereich sowie Membrankräuselungen und nicht vollständig überlappende Adhäsionsstrukturen im Randbereich der Zelle. Diese wurden im Anschluss manuell aus der Einlagerungsmaske entfernt. Zuletzt erfolgte die Orientierungsbestimmung der maskierten Bereiche über denselben Strukturtensor-Algorithmus, der auch zur Bestimmung der Cytoskelett-Orientierung verwendet wurde (s. Abschnitt 2.5.1).

2.6.3 Dynamikanalyse von Proteineinlagerungen

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand in der zeitlichen Analyse der Proteineinlagerungen an Aktin-Stressfasern. Dabei wurden HUVECs, die GFP-Zyxin und mCherry-VASP exprimierten, einer mechanischen Dehnung ausgesetzt und die Dynamik der entstehenden Einlagerungen anhand der Fluoreszenz-Intensitäten in einer Bildserie (s. Abschnitt 2.4.2) beobachtet. Für die Bestimmung der Intensitäten über die Zeit wurde ein MATLAB-Algorithmus von Georg Dreissen verwendet. Dieser diente zum einen der Wiedererkennung definierter Bereiche von Bild zu Bild der Zeitserie, zum anderen der Analyse der Proteindynamik anhand der Grauwerte der Fluoreszenzaufnahmen. Zunächst wurden im ersten Bild der GFP-Zyxin-Aufnahmen die Bereiche von Interesse (ROI, *region of interest*) gewählt, die über die Zeit verfolgt werden sollten. Dazu wurden stets in gleicher Zahl Anlagerungen von Zyxin an den Stressfasern und Fokaladhäsionen manuell ausgewählt. Als Referenzen zur Bleichkorrektur dienten Stressfaserbereiche neben den Einlagerungen, ein großer Bereich außerhalb der Zelle als Gesamthintergrund. Alle gewählten ROIs wurden automatisch auch auf die korrespondierenden mCherry-VASP-Aufnahmen angewandt.

Für die Verfolgung der Bereiche wurden die Bilder zuvor mit einem Binominalfilter mit einer Kerngröße von 3x3 (Pixelgröße: 0,1-0,22 μm) geglättet. Die Wiedererkennung der ausgewählten ROIs erfolgte mittels Kreuzkorrelation. Als Referenz fungierte das erste Bild der Zeitserie. Für jeden weiteren Zeitschritt wurde nun das ursprüngliche ROI um 5 Pixel in jede Richtung erweitert und mit dem Referenzbereich kreuzkorreliert. Die Position mit dem größten Korrelationskoeffizienten wurde als neue Position des ursprünglichen Bereichs angenommen. Die Verfolgung der Bereiche über die Zeit erfolgte nur an den Aufnahmen des GFP-Zyxins. Die entsprechenden Positionen wurden dann für die korrespondierenden Aufnahmen des mCherry-VASP übernommen.

Zur Bestimmung des Intensitätsverlaufs der eingelagerten Proteine wurden im Anschluss die mittleren Grauwerte für jedes ROI über die Zeit erfasst. Für jede Zelle wurde der Intensitätsverlauf des Fluoreszenzsignals über die Zeit ermittelt. Dies wurde getrennt für die Bereiche der Anlagerung und die fokalen Bereiche berechnet. Die Gesamtintensität (I_{Protein}) errechnete sich aus dem Verhältnis der mittleren Intensität der entsprechenden ROIs (I_{ROI}) zur Intensität des gemessenen mittleren

Intensitätssignals im Bereich der Stressfasern (I_{SF}), abzüglich des extrazellulären Hintergrunds ($I_{Hintergrund}$) mit:

$$I_{Protein}(t) = \frac{\bar{I}_{ROI}(t) - I_{Hintergrund}(t)}{\bar{I}_{SF}(t) - I_{Hintergrund}(t)}$$

Dies wurde für beide Aufnahmekanäle für alle Zeitschritte getrennt voneinander berechnet.

3 *Ergebnisse*

Die Experimente, die in dieser Dissertation durchgeführt wurden, dienten der Untersuchung zweier grundsätzlicher Zellantworten auf eine uniaxiale Deformation. Zum einen war dies die Reaktion der analysierten HUVECs auf andauernde, zyklische Deformation, zum anderen die auf eine einmalige Dehnung der Zelle.

Die Antwort von Endothelzellen auf eine uniaxiale zyklische Dehnung des Substrats zeigt sich in Form einer Reorientierung der Zelle in annähernd senkrechter Richtung zur applizierten Deformation [23, 24]. Diese Umlagerung umfasst dabei sowohl den Zellkörper, als auch die cytoskelettalen Elemente der Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente [50]. Die treibende Kraft des Prozesses ist dabei vor allem das Bestreben der Zelle den Zustand einer Homöostase in der Grundspannung ihres Aktincytoskeletts aufrechtzuerhalten und somit den Einfluss der externen Deformation zu minimieren [113]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollten dazu dienen den zeitlichen Ablauf der Zell-Reorientierung und die Unterschiede in der Ausrichtung von Zellkörper und cytoskelettalen Elementen zu analysieren, um Aufschluss über den grundlegenden Mechanismus der Reorientierungsreaktion zu erhalten.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde die cytoskelettale Reaktion auf eine einmalige Dehnung untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf den molekularen Umlagerungsprozessen der Cytoskelett-assoziierten Proteine Zyxin, VASP und α -Actinin. Zyxin ist sowohl in den Fokaladhäsionen als auch an Stressfasern lokalisiert. Bei mechanischer Belastung der Stressfasern in Form von zyklischer Dehnung lagert sich vermehrt Zyxin an diesen an [98]. Bei einfacher Dehnung bilden sich Bereiche mit besonders starken Akkumulationen entlang der Aktinfasern aus, in welchen auch VASP und α -Actinin zu finden sind und gemeinsam dort an der Rekonstitution der Aktinfasern beteiligt sind [99]. Diese Anlagerungen wurden bisher jedoch nur an einzelnen, gedehnten Fasern gezeigt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Akkumulation von Zyxin, VASP und α -Actinin an Stressfasern in Folge der Deformation der ganzen Zelle untersucht. Dabei wurde insbesondere die Dynamik der Proteinanlagerungen betrachtet. Weiterhin sollte die Orientierung der Einlagerungen zur Deformationsrichtung analysiert werden, da sie als Maß der

minimal aufzuwendenden Dehnung dienen kann, welche benötigt wird um die Entstehung der Proteinkomplexe hervorzurufen.

3.1 Reorientierung in Folge zyklischer Dehnung

Die Zellreaktion auf eine uniaxiale zyklische Deformation des Substrats wurde wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben sowohl mit Lebendzell-Experimenten als auch mit Analysen von immunohistochemisch angefärbten Präparaten untersucht. Dabei wurden in beiden Versuchsteilen die gleichen Parameter für die Deformation der Kulturkammern aus Silikonkautschuk verwendet, um Vergleiche zwischen den Ergebnissen beider Methoden anstellen zu können. Die Amplitude der Deformation betrug dabei stets 14%, die Frequenz der Dehnung 130 mHz.

3.1.1 Ergebnisse der Lebendzell-Analysen

Die Analysen wurden hauptsächlich an primären HUVECs durchgeführt, die mit GFP-Lifeact als Aktin-Marker transfiziert waren. Außerdem wurden auch Experimente an HUV-EC-C durchgeführt, diese jedoch nicht in die zusammenfassende statistische Analyse mit einbezogen. Grundsätzlich wies die Zelllinie aber dasselbe Zellverhalten auf.

Die Antwort der untersuchten Zellen auf zyklische Dehnung erfolgte immer in Form einer Ausrichtung des Aktin-Cytoskeletts und des Zellkörpers senkrechter Richtung zur applizierten Deformation (s. Abbildung 3.1 u. 3.2). Die Reorientierung der Zellen erfolgte dabei nicht durch Ablösen und erneuter Adhäsion, sondern in Form einer aktiven Reorientierung des Cytoskeletts durch Rückbildung der parallel zur Dehnungsrichtung liegenden Strukturen und Neubildung senkrecht zum Zug liegender Fasern. Die Auswirkungen der zyklischen Deformation auf die Aktinfaser-Orientierung waren zumeist schon nach dem ersten Deformations-Intervall von 20 min sichtbar. Die Neuausrichtung des Zellkörpers zeigte hingegen teilweise einen zeitlichen Versatz bis hin zu einer Erhaltung der ursprünglichen Hauptorientierung.

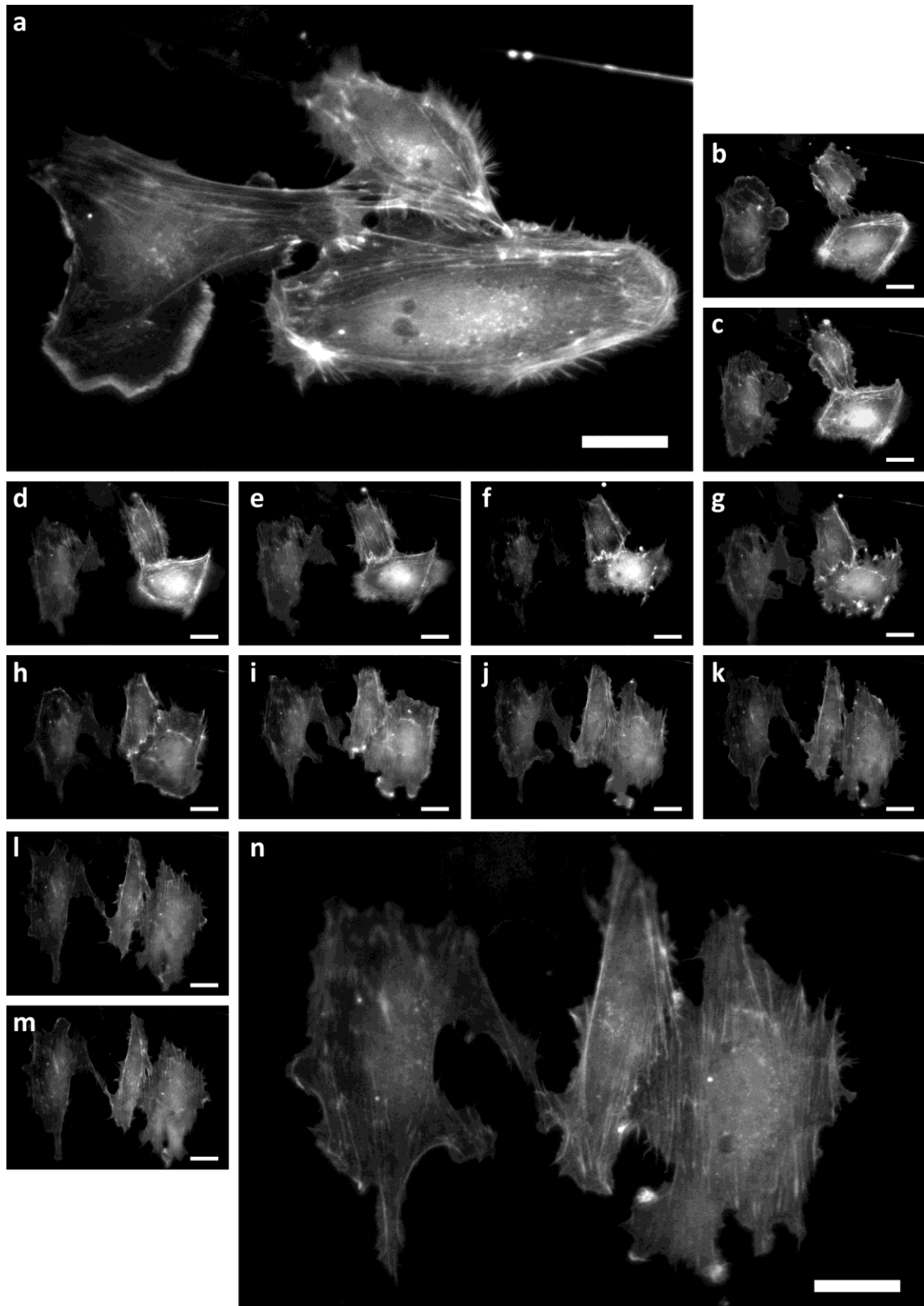


Abbildung 3.1: Reorientierungsreaktion von primären HUVECs - Gezeigt ist von *a-n* der zeitliche Verlauf der Reorientierung von Aktin-Cytoskelett und Zellkörper. Die Zellen wurden mit GFP-Lifeact transfiziert und für insgesamt 280 min mit einer Frequenz von 130 mHz um 14% zyklisch gedehnt (Zugrichtung horizontal). In *a* sind die Zellen ungedehnt, zwischen den weiteren Einzelbildern liegen Intervalle von je 20 min. Zu erkennen ist, wie sich Zellkörper und Cytoskelett über die Dauer des Versuchs annähernd senkrecht zur Dehnungsrichtung orientieren. Maßstab = 20 µm.

Die in Abbildung 3.1 gezeigten primären HUVECs dienen als Beispiel für die typischen Zellantworten auf die zyklische Dehnung mit einer Gesamtdauer von hier 280 min. Die im Bildausschnitt links liegende Zelle bildete den parallel zur Deformation liegenden Zellausläufer zurück und streckte den Zellkörper in senkrechter Richtung aus. Damit verbunden war die Ausbildung von Aktinfasern in eben dieser Richtung. Auch bei den beiden anderen Zellen zeigte sich eine Reorientierungsreaktion, gekennzeichnet durch eine Rotation bzw. Ausdehnung des Zellkörpers und entsprechender Aktin-Umstrukturierung in senkrechter Richtung zur Dehnung. Auffällig ist, dass die Reorientierung der Zelle unten rechts im Bild verzögert erfolgte. Nach spätestens 160 min waren jedoch alle drei Zellen deutlich erkennbar senkrecht zum Zug ausgerichtet.

Abbildung 3.2 zeigt die Ergebnisse der automatisierten Orientierungsanalyse der zuvor gezeigten Zellen für die Hauptorientierung der Aktinfasern in jeder Zelle und der Ausrichtung der Hauptachse der an den Zellkörper angenäherten Ellipse (s. Abschnitt 2.5.1). Die visuellen Beobachtungen wurden durch die Quantifizierung der Orientierung bestätigt. So ist in der links liegenden Zelle bereits nach 45 min zyklischer Dehnung fast das Maximum der Aktin-Orientierungsverteilung erreicht, während der Prozess bei der mittleren Zelle langsamer bzw. bei der im Bild rechten Zelle mit einem zeitlichen Versatz von ca. 100 min abläuft. Auch bei der Zellorientierung zeigen sich die sofortigen Umlagerung der linken und mittleren Zelle und die langsamere Reaktion der rechten.

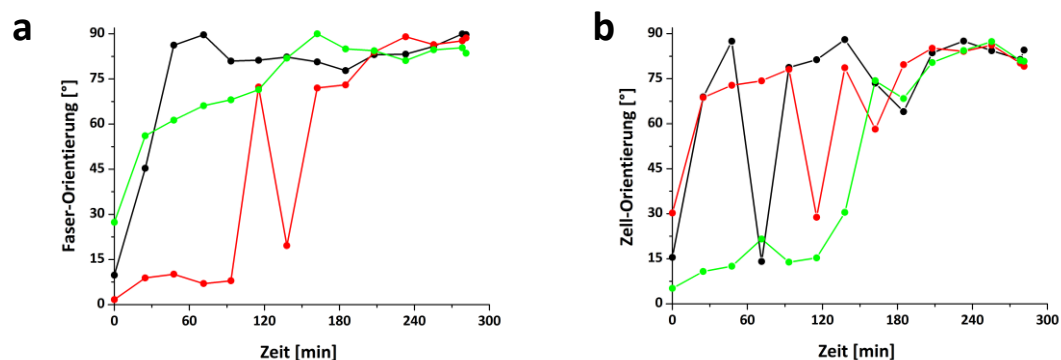


Abbildung 3.2: Aktinfaser- und Zellorientierung über die Zeit – Die beiden Graphen zeigen die gemessenen Orientierungen von Maximum der Aktin-Messung (a) und der an die ermittelten äquivalenten Ellipsen (b) der in Abb. 3.1 gezeigten HUVECs (linke Zelle – schwarz, mittlere Zelle – rot, rechte Zelle – grün). Obwohl es durch teilweise nicht erkannte Zellbereiche zu einzelnen Ausreißern kommt, ist zu erkennen, wie sowohl Aktinfasern als auch die Zellkörper während des Versuchs von einer zunächst parallel zur Zugrichtung liegenden Ausrichtung zu einer dazu senkrechten übergehen (Dehnungsrichtung = 0°).

Im Verlauf der Orientierungsbestimmung ist zu sehen, dass starke Ausreißer auftreten können (s. Abb. 3.2 a). Solche Schwankungen sind jedoch durch den experimentellen Aufbau bedingt. Da die Zellen mit einem Luftobjektiv von unten durch den 300 µm Kammerboden hindurch beobachtet werden mussten, ging ein beträchtlicher Teil des Fluoreszenzsignals verloren, was sich in teils kontrastarmen Aufnahmen bemerkbar machte. Weiterhin konnten durch ein leichtes Durchhängen des Kammerbodens Zellbereiche leicht außerhalb der Fokusebene liegen. Beides führte dazu, dass in der Auswertung nicht alle Strukturen des Aktin-Cytoskeletts detektiert wurden, was wiederum in einer Verschiebung des Orientierungsmaximums und einer Ellipsenbestimmung, die nicht den ganzen Zellkörper umfasst, resultieren konnte. Diese Ausreißer bildeten trotz allem jedoch eine Ausnahme und wurden deshalb auch nicht aus den späteren Zusammenfassungen der Daten entfernt, solange der größte Teil der Zelle in der Auswertung erfasst wurde. Wurde in mehr als zwei aufeinander folgenden Zeitschritten große Teile der Zellen nicht erkannt, wurden diese insgesamt nicht in der Auswertung berücksichtigt.

In Abbildung 3.3 sind Beispiele auffälligen Zellverhaltens dargestellt. In Einzelfällen konnte die vollständige Abtrennung einzelner Zellausläufer während der Reorientierung der HUVECs beobachtet werden. Im hier gezeigten Fall ist genau zu erkennen, wie in der betroffenen Zelle zunächst ein Bereich mit dicht gebündeltem Aktin entstand, von dem ein parallel zur Zugrichtung liegender Zellausläufer abgeschnürt wurde. Die Zelle selber richtete sich und die Aktinfasern dabei senkrecht zur Dehnung aus. Ebenfalls in dieser Abbildung ist das vollständige Ablösen einer Zelle vom Substrat zu sehen. Die Endothelzelle begann zunächst mit der zu erwartenden Reorientierung, war nach 160 min jedoch plötzlich nicht mehr adhäriert und löste sich im weiteren Verlauf weiter ab.

Trotz der physischen Belastung der Zellen durch die anhaltende zyklische Dehnung konnte in zwei Fällen eine Zellteilung einer primären HUVEC beobachtet werden. Einer dieser Vorgänge ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Die Zelle löste sich dabei zunächst ebenfalls vom Kammerboden ab, begann dann aber mit dem Teilungsprozess. Während sich eine der beiden entstandenen Tochterzellen im Anschluss an die Zellteilung direkt senkrecht zur Dehnungsrichtung orientiert, breitet sich die andere Zelle zunächst parallel zum Zug aus und ordnet sich nachfolgend um. In beiden beobachteten Fällen der Zellteilung konnte keine genauere

Orientierungsanalyse durchgeführt werden, da das GFP-Lifeact-Signal sehr schwach war.

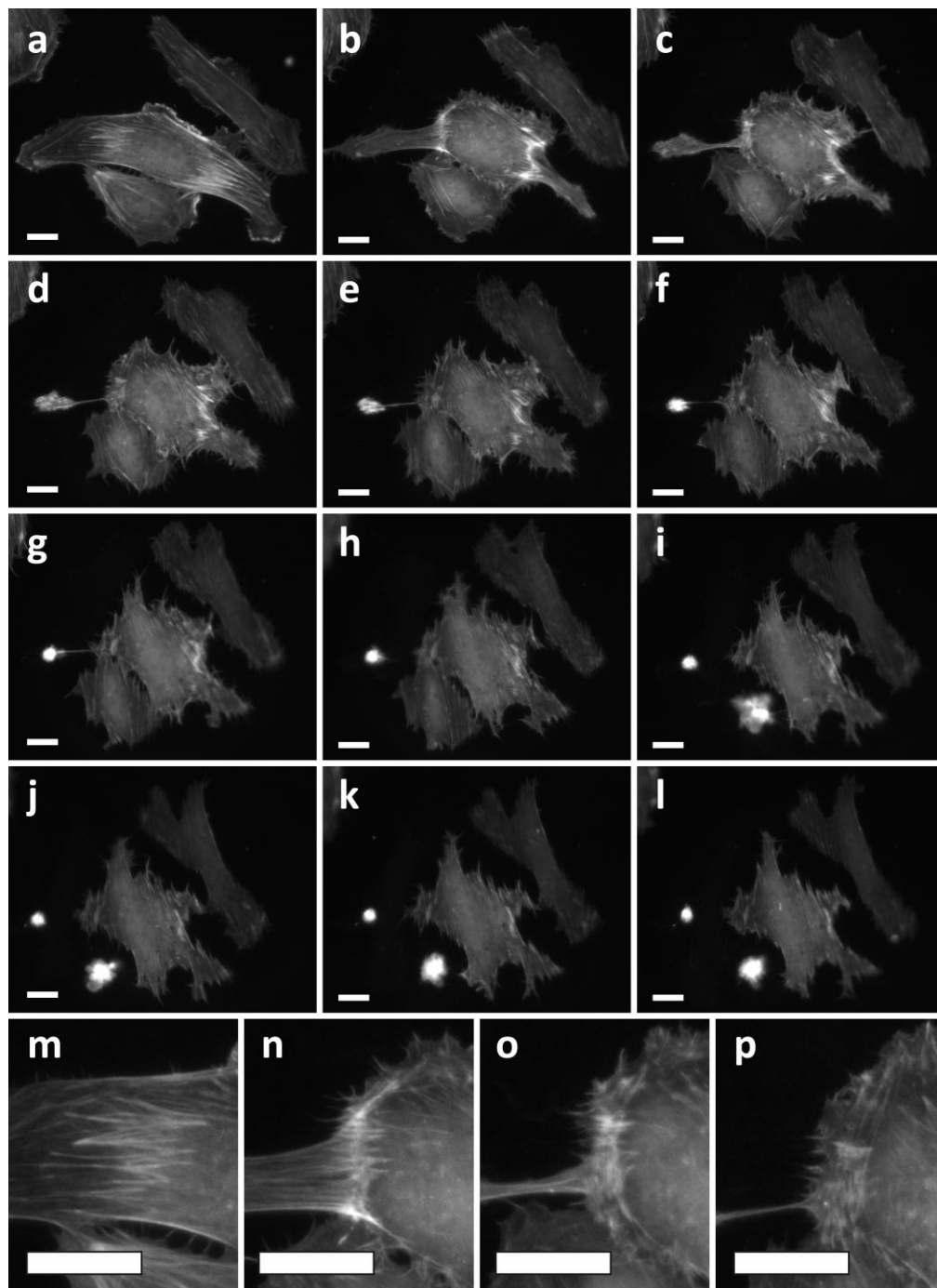


Abbildung 3.3: Diversität der Zellreaktionen auf zyklische Dehnung – Die hier beispielhaft gezeigten primären HUVEC zeigten ein sehr unterschiedliches Verhalten als Reaktion auf die zyklische Dehnung. Die Zellen wurden über insgesamt 4 h gedehnt (130 mHz bei 14%), wobei zwischen jedem Bild ein Intervall von 20 min liegt. Die im Bild mittlere Zelle bildet bei der Reorientierung dicke Bündel cortikaler Aktinfasern aus und schnürt dabei einen Zellausläufer komplett ab (b-h und m-p). Eine der Zellen (links unten) beginnt zunächst mit einer Reorientierung von Aktinfasern und Zellkörper (a-h), löst sich in der Folge aber vollständig vom Substrat (j-l). Maßstab = 20 µm.

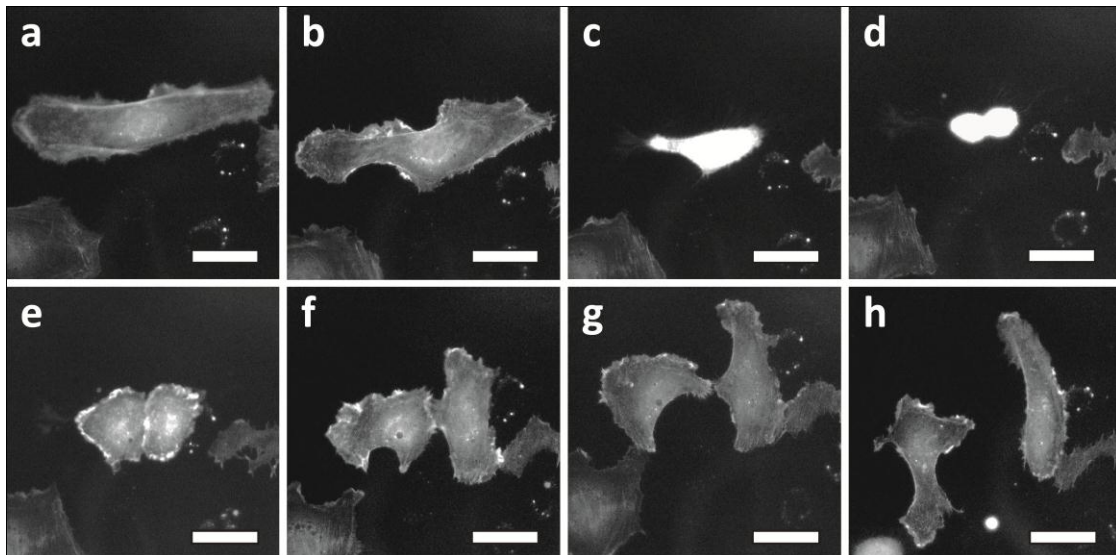


Abbildung 3.4: Zellproliferation unter zyklischer Dehnung – Die hier gezeigte primäre HUVEC führt trotz mechanischer Belastung durch die angelegte zyklische Dehnung eine Zellteilung durch (b-g). Die dabei entstandenen Tochterzellen richten sich senkrecht zur angelegten Substratdeformation aus. Das Aufnahmeintervall liegt bei ca. 20 min. Maßstab = 20 μm .

Im Folgenden sind die Ergebnisse der statistischen Analyse der Lebendzell-Experimente von insgesamt 40 primären HUVECs dargestellt. Dabei wurden vier Parameter betrachtet: die Hauptorientierung der Aktinfasern, die Orientierung der an den Zellkörper angenäherten äquivalenten Ellipse ebenso wie deren Aspektverhältnis und schließlich die Gesamtfläche der einzelnen Zellen.

Die Zellen dieser Versuche wurden, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben, aufgenommen. Die zyklische Dehnung erfolgte bei 130 mHz und 14% Amplitude. In der Kammer wurden vorher einzelne Zellen ausgewählt, die annähernd parallel zur Zugrichtung lagen und ein deutlich ausgeprägtes Aktin-Cytoskelett zeigten. Die zyklische Dehnung wurde nach jeweils ca. 20 min angehalten. Die Zellen wurden manuell angefahren, fokussiert und aufgenommen. Da sich die Intervalle in ihrer Dauer in verschiedenen Messungen leicht unterschieden, wurden die Zeiten für die zusammenfassende Analyse auf Intervalle von 20 min gerundet. Weiterhin wurden Zellen, die sich im Verlauf des Experiments ablösten, nur solange berücksichtigt, wie sie keine atypische Zellmorphologie aufwiesen.

Für einen Teil der Zellen ($n=7$) wurden die Experimente über einen Zeitraum von insgesamt 8 h durchgeführt, für den Großteil jedoch, um Effekte wie osmotischen Stress oder Phototoxizität durch das HEPES gepufferte Medium zu minimieren [114],

wurde die Untersuchungsdauer auf 4 h beschränkt. Die Zusammenfassung der Daten erfolgte ebenfalls für diesen Zeitraum.

Abbildung 3.5 zeigt die ermittelten Hauptorientierungen der Aktinfasern in den Einzelmessungen und in zusammengefassten Boxplots, die Mediane und Mittelwerte sind gesondert in Tabelle 3.1 aufgeführt. Da für die Aufnahmen vor allem Zellen ausgewählt wurden, die ein deutlich in Zugrichtung ausgeprägtes Aktin-Cytoskelett aufwiesen, liegt die Verteilung vor Beginn der zyklischen Dehnung in eben diese Richtung verschoben vor. Bereits nach den ersten 20 min zeigt sich ein Anstieg in der mittleren Hauptorientierung um etwa 17° . Die Verteilungen verschieben sich im weiteren Verlauf der ersten 120 min immer mehr in Richtung 90° , wobei die Differenz von Intervall zu Intervall stetig kleiner wird. Im Bereich zwischen 120 min und 240 min stellt sich schließlich ein Plateau der Verteilungen mit einem Median zwischen 79° (120 min) und 84° (240 min) ein. Der Unterschied der entsprechenden Mittelwerte ist mit 74° und 82° größer, was aber auf Ausreißer in der Verteilung zurückgeführt werden kann.

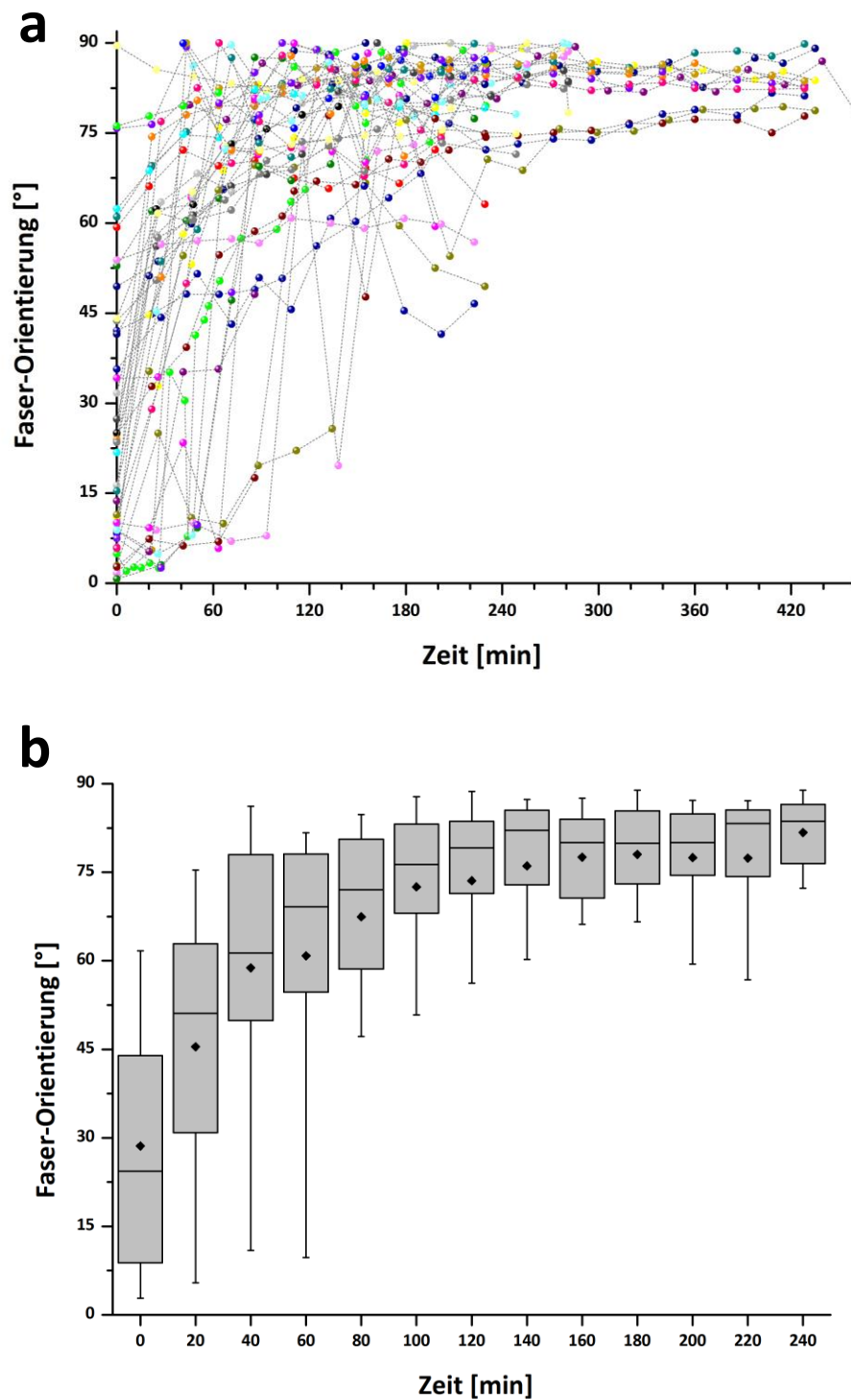


Abbildung 3.5: Orientierung der Aktinfasern über die Zeit – In *a* sind die errechneten Maxima der Aktinfaser-Orientierung aller analysierter primären HUVECs ($n=40$) gezeigt, wobei der größte Teil über eine Dauer von 4 h beobachtet wurde, einige Zellen ($n=8$) über insgesamt 8 h. Die Einzelwerte sind in *b* in 20 min-Intervalle zusammengefasst. Die Antennen der Boxplots entsprechen den 10%- und 90%-Quantilen, die weiteren Kenngrößen sind Mittelwert (Raute) und Median (Linie). Zu sehen ist, dass die Faserorientierung im zeitlichen Verlauf vorwiegend senkrecht zur Richtung der applizierten Deformation (0°) reorientiert wird. Die größten Änderungen in der Aktinfaserorientierung finden innerhalb der ersten zwei Stunden statt, danach erreicht die Verteilung ein gewisses Plateau.

Zeit [min]	Median [°]	Mittelwert [°]	SD	n
0	24	29	24	40
20	51	45	24	40
40	61	59	25	33
60	69	61	25	34
80	72	68	19	46
100	76	72	17	26
120	79	74	19	29
140	82	76	15	38
160	80	78	9	37
180	80	78	10	35
200	80	78	11	36
220	83	77	13	22
240	84	82	6	20

Tabelle 3.1: Median und Mittelwerte der Aktin-faser-Hauptorientierungen

Betrachtet man den Verlauf weiter für die 8-stündigen Experimente (s. Abb. 3.5 a) so ist erkennbar, dass die Hauptorientierungen weiterhin auf dem Niveau bleiben, welches bereits nach 4 h erreicht wurde.

Die Verteilung der ermittelten Ellipsenorientierungen ist in ihrer Gesamtheit breiter und weniger stark durch die zyklische Dehnung beeinflusst. Zwar zeigte ein Großteil der Zellen eine Umorientierung ihres Zellkörpers weg von der Deformationsrichtung, einige Zellen blieben in ihrer Ausrichtung davon jedoch unbeeinflusst (s. Abb. 3.6). Hierdurch zeigten die Einzelerperimente eine starke Streuung, die über den gesamten Experimentzeitraum erhalten blieb. Im Median und im Mittelwert ist jedoch ein Anstieg der Verteilung im zeitlichen Verlauf zu erkennen. Der Mittelwert steigt innerhalb der 4 h von 31° auf 59° an, der Median im Vergleich von 27° auf 74°. Betrachtet man die Ergebnisse der HUVECs, die über einen Zeitraum von insgesamt 8 h gedehnt wurden, zeigen auch diese noch eine breite Verteilung der Orientierung auf.

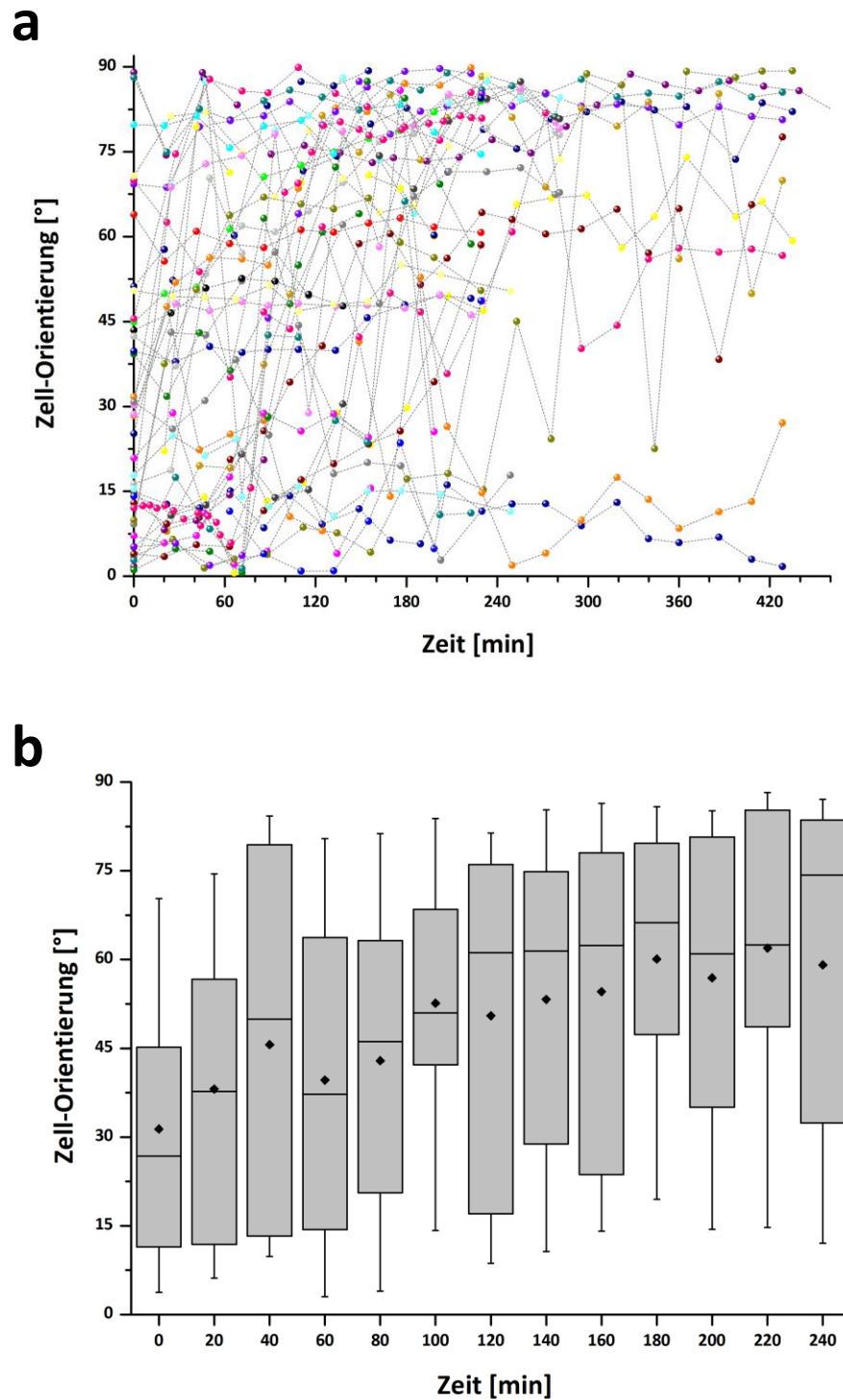


Abbildung 3.6: Orientierung des Zellkörpers über die Zeit – Gezeigt sind die gemessenen Orientierungen der Ellipsen für die analysierten Einzelzellen (a) und die Zusammenfassung in 20 min-Intervalle (b) analog zu Abbildung 3.5. Auch hier zeigt sich, dass es insgesamt zu einer Umorientierung des Zellkörpers weg von der Hauptdehnungsrichtung kommt. Die Streuung der Daten ist jedoch im Vergleich zur Aktinorientierung größer und bei einem Teil der Zellen zeigt sich keine deutliche Reorientierung des Zellkörpers.

Zeit [min]	Median [°]	Mittelwert [°]	SD	n
0	27	31	25	40
20	50	37	25	40
40	46	46	30	32
60	37	40	29	34
80	46	43	27	46
100	51	53	23	26
120	61	51	29	29
140	61	53	27	38
160	62	55	28	37
180	66	60	24	35
200	61	57	27	36
220	62	62	25	22
240	74	59	30	20

Tabelle 3.2: Median und Mittelwerte der Ellipsenorientierung

In Abbildung 3.7 sind die Aspektverhältnisse der äquivalenten Ellipsen der im vorigen Abschnitt besprochenen Zellen dargestellt. Die Verteilungen zeigten keine großen Änderung über die Dauer der zyklischen Dehnung. Zwar wurden die Mediane und Mittelwerte der Verteilung geringfügig kleiner (s. Tabelle 3.3), zeigten im Verlauf dabei aber Schwankungen und auch die Breite der Verteilungen nahm zu. Insgesamt bleiben die Werte von Mittelwert und Median stets im Bereich zwischen 1,5 und 2.

Die ermittelten Zellflächen der zyklisch gedehnten Zellen sind in Abbildung 3.7 und Tabelle 3.4 zusammengefasst. Mittelwert und Median fallen über die Zeit gesehen leicht ab. Sie betragen vor der Dehnung im Mittel $3000 \mu\text{m}^2$ und im Median $2900 \mu\text{m}^2$. Nach 220 min erreichen sie ihr Minimum von $2300 \mu\text{m}^2$ bzw. $2400 \mu\text{m}^2$. Zum Intervall von 240 min springen die Werte jedoch auf über $3000 \mu\text{m}^2$. Die Flächen der Zellen zeigten insgesamt eine große Varianz auf und zeigten Größen von minimal $600 \mu\text{m}^2$ bis maximal $8300 \mu\text{m}^2$ auf.

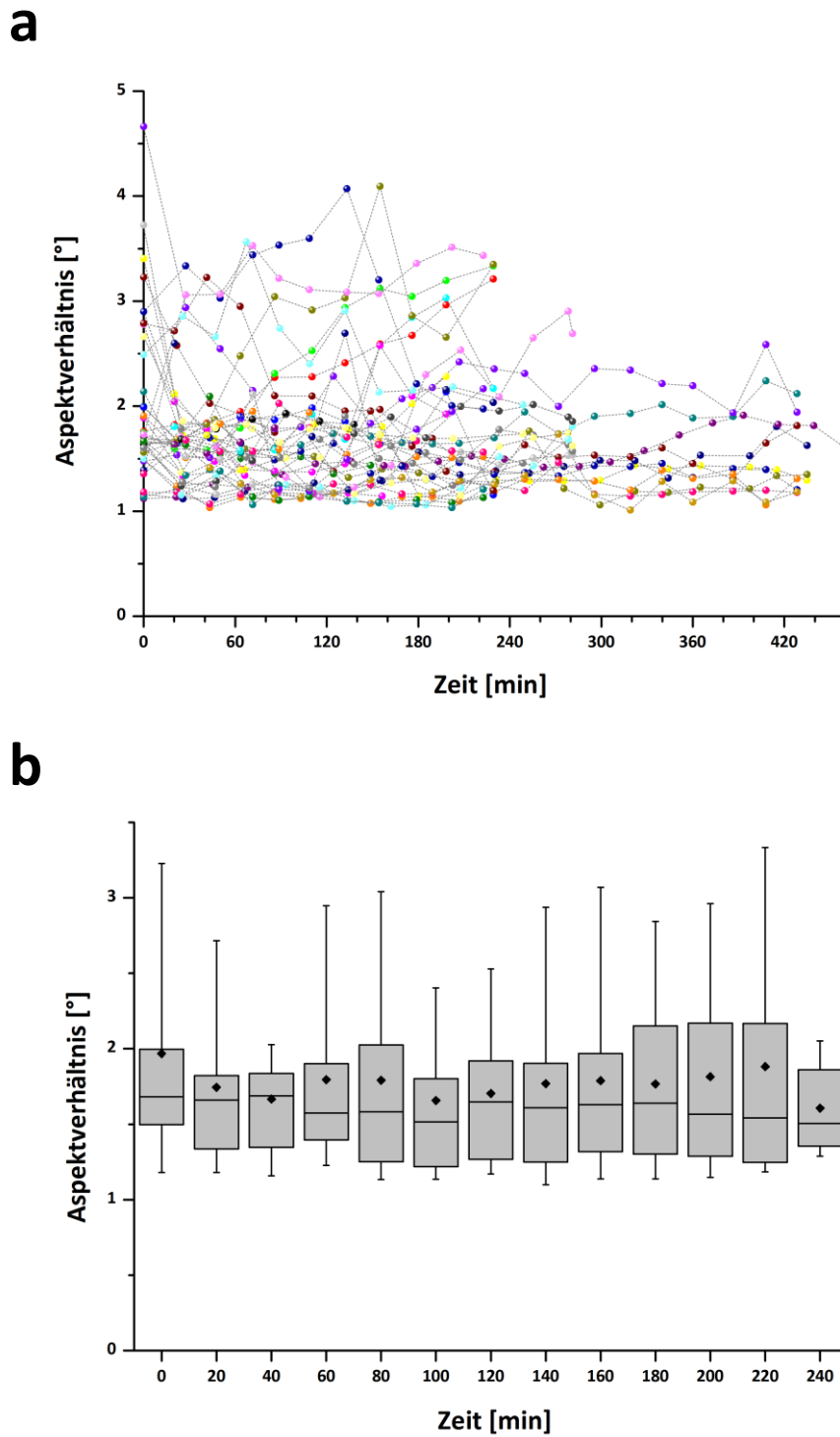


Abbildung 3.7: Aspektverhältnis des Zellkörpers über die Zeit - Gezeigt sind die Aspektverhältnisse der äquivalenten Ellipsen für die analysierten Einzelzellen (a) und die Zusammenfassung in 20 min-Intervalle (b). Die Boxplot-Darstellung ist analog zu Abb. 3.5.

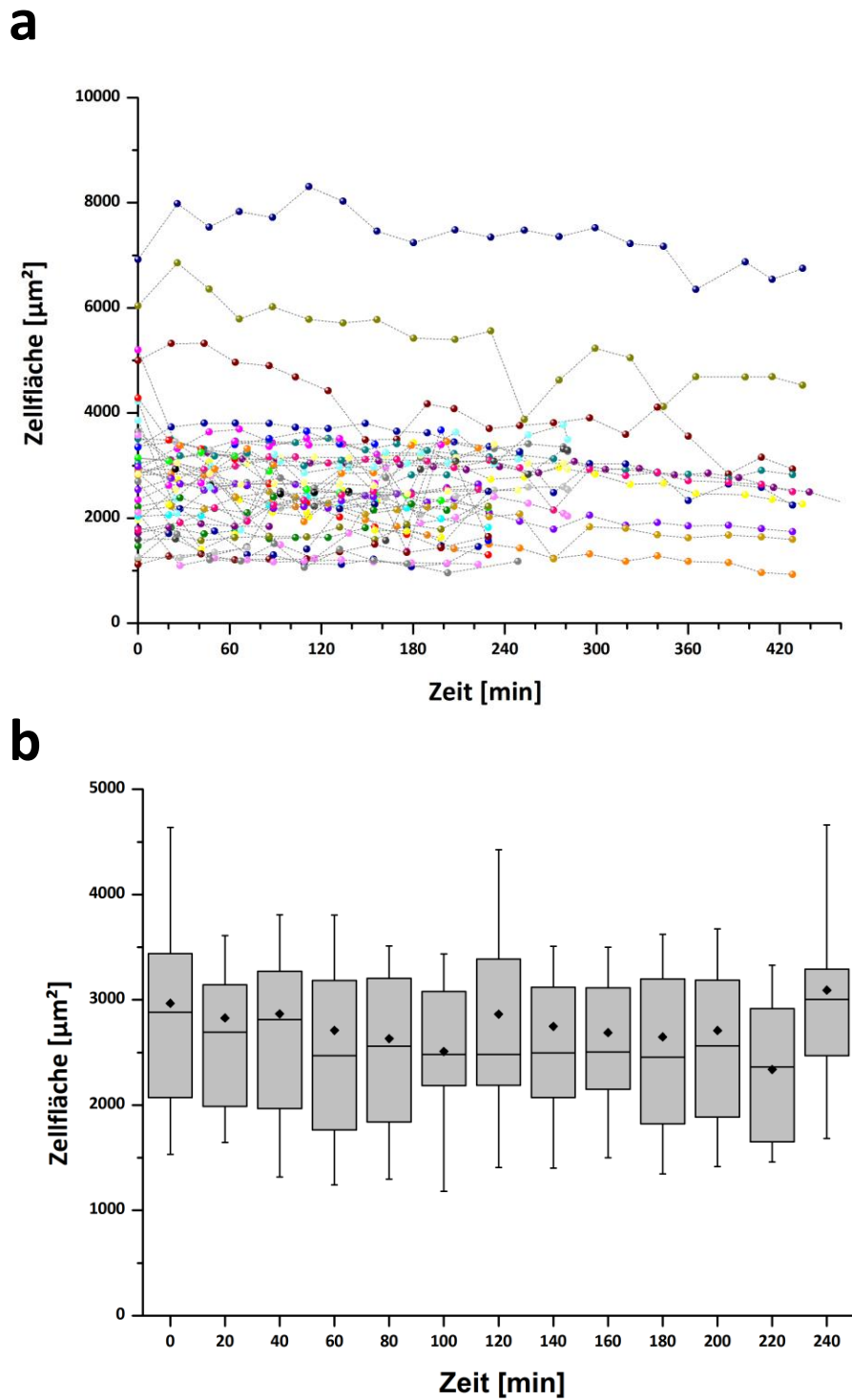


Abbildung 3.8: Zellfläche über die Zeit – Gezeigt sind die ermittelten Ellipsenflächen in Einzelmessungen [a] und der Zusammenfassung in Klassen mit 20 min Breite (b). Die Betrachtung der Zellfläche über den Versuchszeitraum zeigt keine klaren Änderungen. Die Variationen der Fläche von Zelle zu Zelle sind dabei teils recht groß (bis zum 8-fachen).

Zeit [min]	Median	Mittelwert	SD	n
0	1,7	2,0	0,8	38
20	1,7	1,7	0,5	38
40	1,7	1,7	0,5	31
60	1,6	1,8	0,6	33
80	1,6	1,8	0,7	45
100	1,5	1,7	0,6	26
120	1,7	1,7	0,5	29
140	1,6	1,8	0,7	38
160	1,6	1,8	0,7	37
180	1,6	1,8	0,6	35
200	1,6	1,8	0,7	36
220	1,5	1,9	0,8	22
240	1,5	1,6	0,3	20

Tabelle 3.3: Median und Mittelwerte der Aspektverhältnisse

Zeit [min]	Median [μm^2]	Mittelwert [μm^2]	SD	n
0	2900	3000	1600	38
20	2700	2900	1300	38
40	2800	2900	1400	31
60	2500	2700	1400	33
80	2600	2600	1200	45
100	2500	2500	800	26
120	2500	2900	1400	29
140	2500	2700	1200	38
160	2500	2700	1200	37
180	2500	2700	1200	35
200	2600	2700	1300	36
220	2400	2300	700	22
240	3000	3100	1400	20

Tabelle 3.4: Median und Mittelwerte der Zellfläche

Neben der Orientierungsbestimmung anhand des Aktin-Cytoskeletts oder der Zellform konnte in einem im Folgenden gezeigten Einzelfall eine zusätzliche Unterscheidung in der Orientierung verschiedener Zellbereiche erfolgen. Bei HUVECS ist das sogenannte Soma, also der Bereich, der Zellkern und Organellen umfasst, meist

spindelförmig ausgeprägt und von einer breiten, sehr flachen Lamelle umgeben. Abbildung 3.9 zeigt eine mit GFP-Lifeact transfizierte HUV-EC-C, bei der aufgrund eines starken cytosolischen Fluoreszenzhintergrunds zwischen dem erhabenen Soma und der peripheren, von Stressfasern durchzogenen Lamelle differenziert werden konnte. Die Abbildung zeigt, dass der innere Teil der Zelle sich im zeitlichen Verlauf zusammen mit dem Aktin-Cytoskelett früher senkrecht zur angelegten Deformation ausrichtet als die gesamte Zellform. Der Verlauf der jeweiligen Orientierungen ist in Abbildung 3.10 zu sehen. Die Orientierung des Somas wurde anhand einer manuell gezeichneten, den Bereich longitudinal teilenden Symmetrie-Achse bestimmt. Da teilweise nicht das vollständige Aktin-Cytoskelett vom Algorithmus erkannt werden konnte, gibt es Schwankungen besonders bei den für die äquivalente Ellipse bestimmten Werten. Eine deutliche Reorientierung zeigt sich im Aktin-Cytoskelett nach ca. 30 min, die nach etwa 2 h ein Maximum erreicht.

Die Ellipsenbestimmung war in diesem Beispiel ungenau, da der Algorithmus die Zellform aufgrund des ungünstigen Kontrasts nicht vollständig detektieren konnte. In den Fluoreszenzaufnahmen ist jedoch zu erkennen, dass der Zellkörper nach 229 min zyklischer Dehnung noch nicht senkrecht zur Dehnungsrichtung orientiert ist. Anders verhält es sich beim zentralen Bereich der Zelle. Bei diesem kommt es nach 77 min zu einem Umbruch in der parallel zur Deformationsrichtung liegenden Struktur, wobei der Kernbereich senkrecht orientiert wird. Dieser Prozess konnte nur in der hier gezeigten Zelle in dieser Form sichtbar gemacht werden, da der Kontrast zwischen Soma und Lamelle in keiner anderen der analysierten Zellen deutlich genug war.

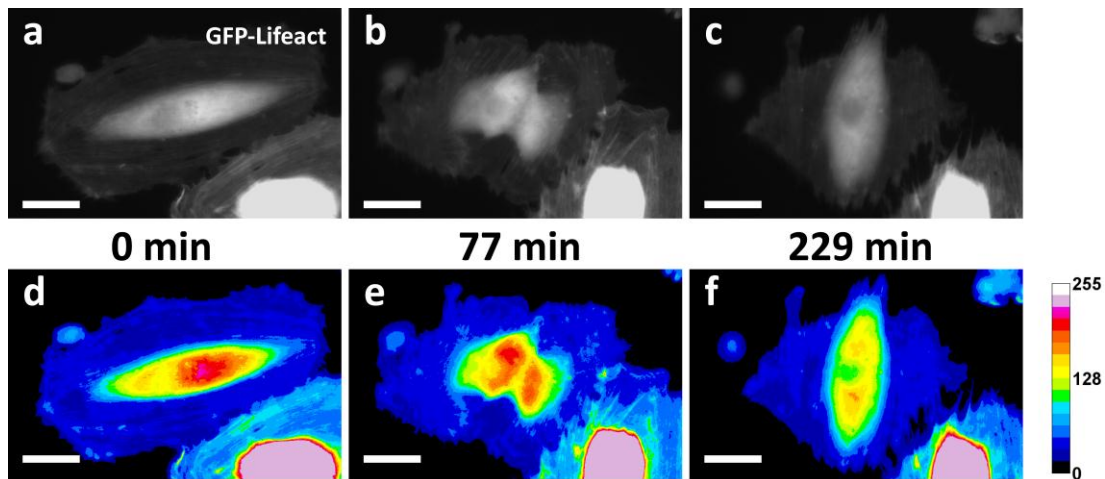


Abbildung 3.9: Reorientierung im zentralen und peripheren Bereich der Zelle – Die abgebildete HUV-EC-C-Zelle wurde mit GFP-Lifect transfiziert und zyklisch gedehnt (14% Amplitude bei 130 mHz, Deformationsrichtung horizontal). Die Fluoreszenzaufnahmen sind in Graustufen (a-c) und Falschfarben (d-f) gezeigt. Der zentrale Bereich der Zelle (Soma) ist hier deutlich durch ein starkes diffuses Fluoreszenzsignal (grün bis rot in Falschfarben) vom flachen, peripheren Bereich der Zelle (Lamelle) abgegrenzt. Im Verlauf erkennt man, dass sich dieser kernnahe Zellteil senkrecht zur Zugrichtung ausrichtet, während sich der Gesamtzellkörper langsamer reorientiert. Maßstab = 20 μm .

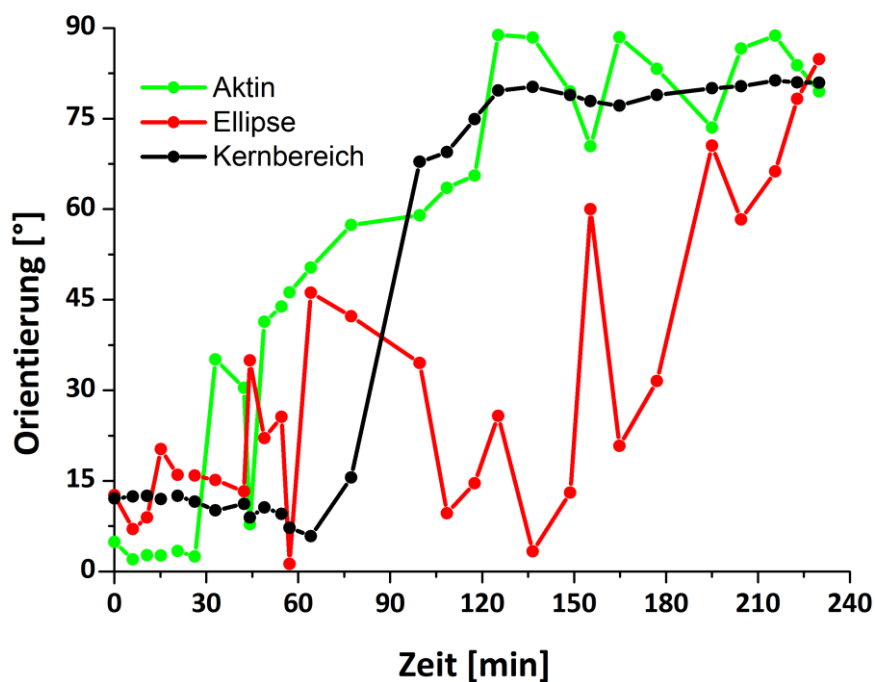


Abbildung 3.10: Verlauf der Reorientierung der verschiedenen Zellbereiche – Das Diagramm zeigt den Verlauf der Orientierung von Aktinfasern, Zellkörper und dem zentralen Soma der in Abb. 3.9 gezeigten Zelle. Der Kernbereich wurde dabei vor dem gesamten Zellkörper senkrecht zur Deformationsrichtung ausgerichtet.

3.1.2 Immunocytochemische Analyse

Die in dieser Arbeit durchgeführten immunohistochemischen Analysen dienten der Quantifizierung des in den Lebendzell-Experimenten beobachteten Reorientierungsprozesses im zeitlichen Verlauf mit großen Zellzahlen. Durch die Fixierung der Zellen nach einer bestimmten Dauer der zyklischen Deformation, konnte zwar stets nur der Ist-Zustand zum jeweiligen Zeitpunkt betrachtet werden, allerdings war es so möglich pro Kulturkammer bis zu einige hundert HUVECs auf einmal zu analysieren.

Neben der Aktinfaser-Orientierung wurde auch die Ausrichtung der Mikrotubuli untersucht. Auf eine ursprünglich geplante Analyse von Vimentin als Vertreter der Intermediärfilamente und somit drittem Element des Cytoskeletts musste verzichtet werden, da die entsprechenden sekundären Antikörper mit dem primären Antikörper gegen Tubulin kreuzreagierten.

Zellmorphologien

Die Analysen wurden wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben an primären HUVECs durchgeführt. Wie schon in den Lebendzell-Experimenten konnte auch hier eine deutliche Reaktion der Zellen auf die zyklische Deformation in Form einer Ausrichtung von Cytoskelett und Zellkörper senkrecht zur Deformation beobachtet werden. Exemplarisch ist diese Zellantwort in Abbildung 3.11 gezeigt. Beim Vergleich von über 8 h zyklisch gedehnten Zellen mit der undeformierten Kontrolle ist kein Unterschied in der Morphologie der einzelnen Zellen zu erkennen. Während jedoch bei den Kontrollzellen keine bevorzugte Zellorientierung vorliegt, führt die zyklische Deformation zur Reorientierung von Zelle und Cytoskelett in annähernd senkrechter Richtung zur Deformation.

Sowohl in gedehnten als auch in ungedehnten Zellen sind die Aktinfasern besonders im cortikalen Bereich der Zelle stark ausgeprägt. Im Zentrum des Zellkörpers liegen dünnere Filamentbündel vor. Die Mikrotubuli breiten sich vom Zentrosom ausgehend strahlenförmig aus und passen sich in ihrem weiteren Verlauf der Zellform an.

Zellen, die nur für einen relativ kurzen Zeitraum von 30 min zyklisch deformiert wurden, weisen eine deutlich andere Zellmorphologie auf. Ein Beispiel dafür ist in Abbildung 3.12 gezeigt. Die Zellen wichen häufig von der typischen elliptischen Zellform ab und wiesen zahlreiche Ausläufer auf. Diese entsprachen den bereits in den

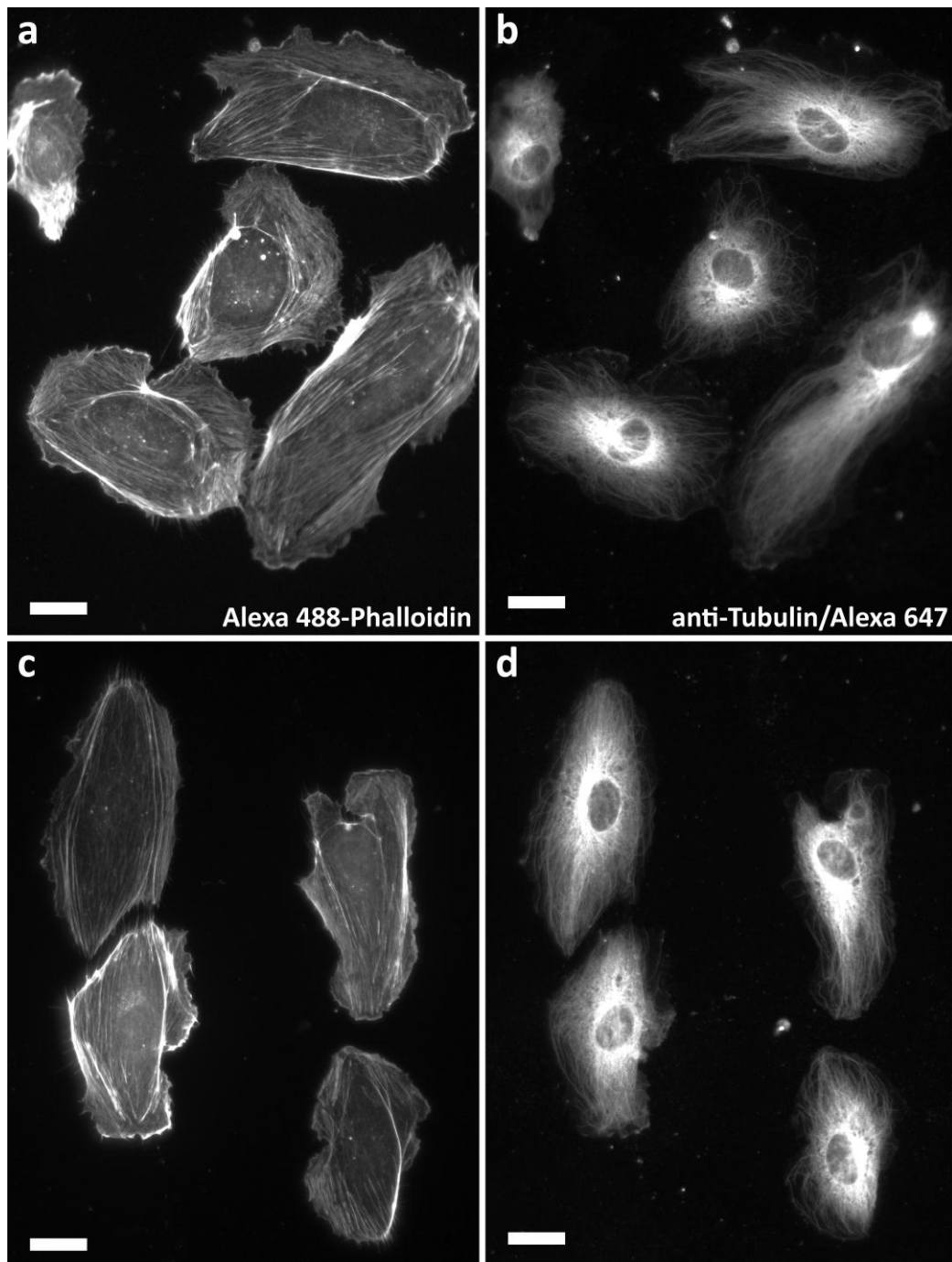


Abbildung 3.11: Vergleich von undeformierten und zyklisch gedehnten Zellen – Dargestellt sind Färbungen des Aktin-Cytoskeletts (a u. c) und der Microtubuli (b u. d) primärer HUVECs, die entweder ohne Deformation in Silikonkautschuk-Kammern kultiviert wurden (a u. b) oder für 8 h einer zyklischen Dehnung (14% Amplitude, 130 mHz) ausgesetzt wurden (c u. d). Während sich die einzelnen Zellen morphologisch wenig voneinander unterscheiden, ist in undeformierten Zellen keine Ausrichtung ihrer Orientierung zu sehen, während zyklisch gedehnte Zellen sich senkrecht zur Dehnungsrichtung ausrichten. Maßstab = 20 μm , Deformationsrichtung horizontal.

Lebendzellanalysen beobachteten Protrusionen und Retraktionen des Zellkörpers in Folge der Reorientierung. Das Aktin-Cytoskelett war dabei häufig geprägt von dicken,

oft verhältnismäßig kurzen Bündeln von Stressfasern. Die Mikrotubuli zeigten keine morphologischen Besonderheiten auf und folgten von Zentrosom ausgehend der Zellform entlang bis in die Spitzen der Zellausläufer.

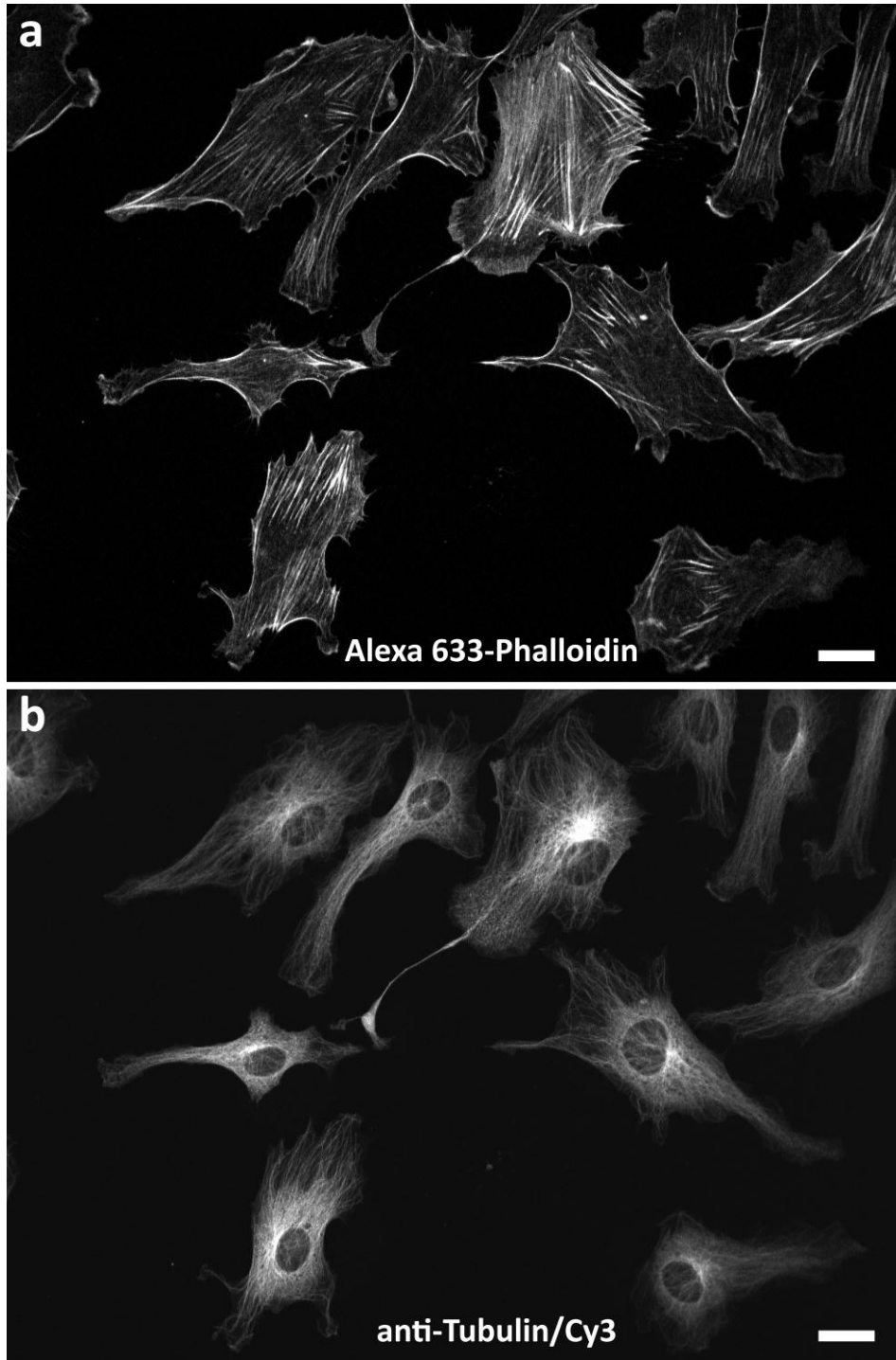


Abbildung 3.12: Zellmorphologie nach 30 min zyklischer Dehnung – Dargestellt sind primäre HUVECs, die für 30 min mit 130 mHz um 14% zyklisch gedehnt wurden. Angefärbt wurden sowohl Aktinfasern (a) als auch Mikrotubuli (b). Die Zellen weichen von der sonst eher elliptischen Zellform ab und weisen ebenfalls Unterschiede im Aktin-Cytoskelett auf. Vorherrschend sind hier kurze dicke Bündel. Maßstab = 20 µm, Deformationsrichtung horizontal.

Abweichungen von einer Gleichverteilung in den Kontrollen

Für Kontrollzellen, die keine Dehnung erfahren haben, wurde eine Gleichverteilung in der Orientierung erwartet, da jede Ausrichtung der Zelle mit gleicher Wahrscheinlichkeit auftreten kann. Bei der Betrachtung der Zellkörper-Orientierung sowie der Verteilung der Mikrotubuli ergab sich auch ebendieses Bild mit mittleren Orientierungen von im Bereich um 45° (s. Abbildung 3.13 u. Tabelle 3.5). Die Hauptorientierung der Aktinfasern in denselben untersuchten Zellen lag mit einem Mittelwert von 50° und einem Median von 52° jedoch über dem Erwartungswert.

Zum Vergleich der Ergebnisse der Kontrollexperimente mit einer putativen Gleichverteilung der Daten wurde ein zweiseitiger Kolmogorov-Smirnov-Test (KS-Test) durchgeführt. Dabei wurde ermittelt, ob die jeweilige Probe bei einem Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ gleichverteilt war (Nullhypothese: $F(x)=G(x)$), oder signifikant davon abwich (Alternativhypothese: $F(x)\neq G(x)$). Für die Orientierung der Aktinfasern zeigte sich hierbei ein signifikanter Unterschied.

In Abb. 3.14 a ist zum Vergleich die Verteilung der Aktinorientierung aus Kontrollexperimenten dargestellt, die zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt worden waren. Diese Verteilung zeigt im KS-Test keinen Unterschied zur Gleichverteilung. Jedoch sind diese Zellen aus einer anderen Zell-Charge und wurden ausschließlich gegen Aktin gefärbt, sodass sie für die weiteren in dieser Arbeit vorgestellten Experimente nicht berücksichtigt wurden. Betrachtet man die Ergebnisse der zugrundeliegenden Einzelexperimente ($n=3$), zeigt sich, dass die Mittelwerte mit Werten von 37° , 49° und 53° (s. Abb. 3.14 b) selbst eine starke Streuung aufweisen, die Mikrotubuli-Messung an denselben Zellen zeigt dagegen keine signifikante Abweichung von einer Gleichverteilung. Gleichzeitig variiert die Anzahl der Zellen zwischen den einzelnen Messungen sehr stark. Da für die Zusammenfassung der Daten über alle Zellen gemittelt wurde, beeinflusst die Probe mit Mittelwert von 53° , die gleichzeitig auch die meisten Zellen beinhaltet ($n=562$), die Gesamtverteilung deutlich stärker als die Probe mit einer mittleren Faser-Orientierung von 37° ($n=108$). Bei gleicher Probengröße wäre der Mittelwert der Kontrolle nicht signifikant verschoben.

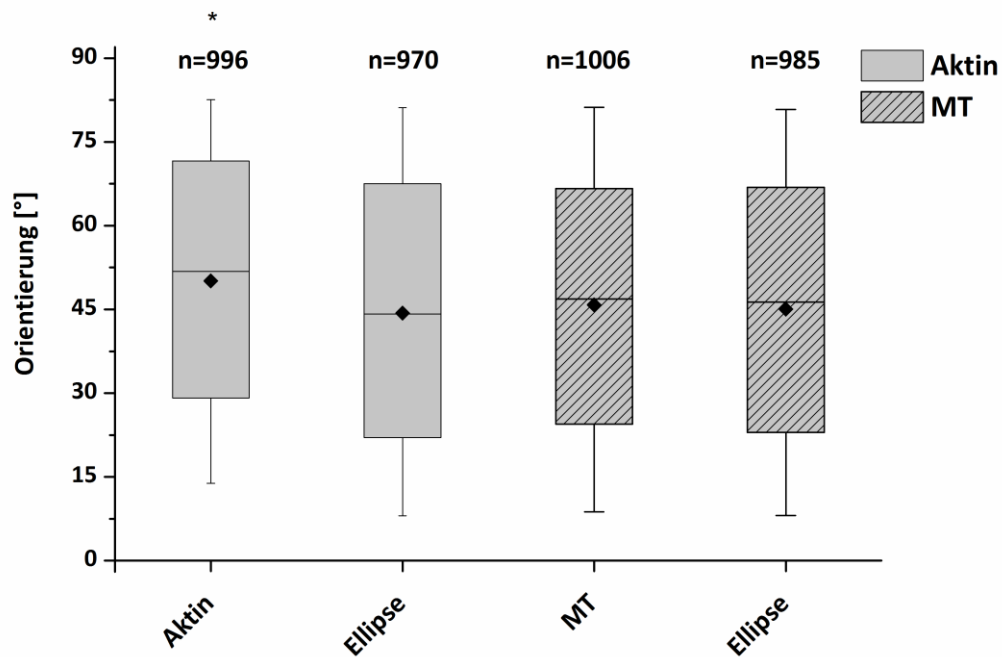


Abbildung 3.13: Vergleich der Orientierungsparameter der ungedehnten Kontrollzellen – Die Boxplots zeigen die gemessenen Maxima der Aktin- und Microtubuli-Orientierungen aus denselben Experimenten ($n=3$) sowie die zugehörigen Ellipsenorientierungen. Die Verteilung der Aktinfaser-Orientierung unterscheidet sich in einem zweiseitigen KS-Test mit $\alpha=0,05$ signifikant (*) von einer Gleichverteilung. Die Orientierungen der Mikrotubuli und beider Ellipsen hingegen sind gleichverteilt. Die zusätzlich zu den Quartilen gezeigten Kenngrößen sind Mittelwert (Raute) und Median (Linie), die Antennen entsprechen den 10%- und 90%-Quartilen.

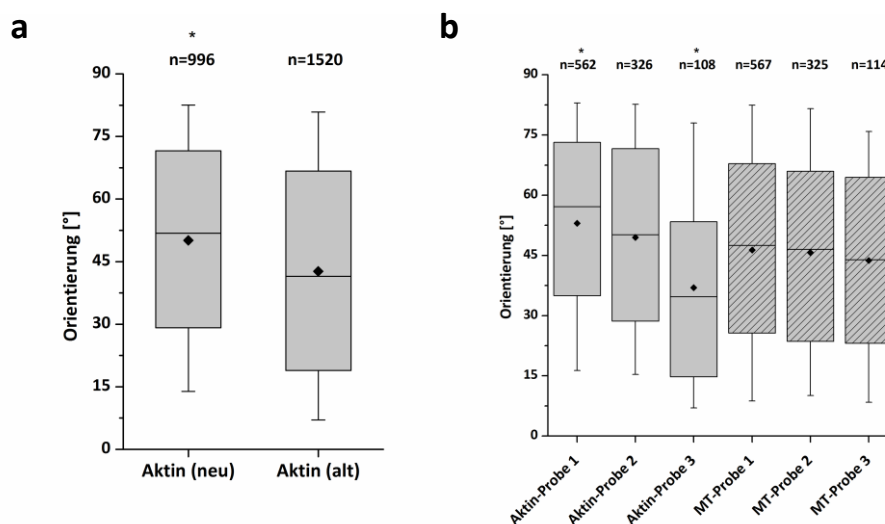


Abbildung 3.14: Vergleich von Kontrollen verschiedener Messungen – Beim Vergleich der Kontrollproben mit Proben einer älteren Charge (a), zeigt sich, dass letztere im Vergleich der einzelnen Proben homogener in der Aktinorientierung sind, sich aber auch zwei Proben signifikant ($\alpha=0,05$, markiert mit *) von einer Gleichverteilung unterscheiden. Betrachtet man die Einzelmessungen der Kontrollen (b), zeigt sich, dass zum einen die Mikrotubuli in denselben Zellen gleichverteilt sind und zum anderen die Verschiebung der Aktinfasern durch große Unterschiede der Zellzahl in den Einzelmessungen bedingt ist.

Änderung der Hauptorientierung des Cytoskeletts durch zyklische Substratdehnung

In den Verteilungen der Hauptorientierung der beiden Cytoskelett-Typen zeigt sich bereits nach 30-minütiger zyklischer Deformation eine Verschiebung zu einer zur Zugrichtung senkrechten Ausrichtung der Strukturen (s. Abbildung 3.15).

Die mittlere Orientierung beträgt nach 30 min 75° für die Aktinfasern und 77° für die Mikrotubuli, die Mediane der Verteilungen liegen mit 78° (Aktin) und 81° (MT) noch etwas höher. Nach einer Deformationsperiode von 1 h ist bei den Aktinfaser-Orientierungen keine signifikanter Unterschied zur Verteilung nach 30 min festzustellen (KS-Test, $\alpha=0,05$), die Verteilung der Mikrotubuli-Orientierungen wird jedoch breiter und Median (77°) und Mittelwert (71°) der Verteilung sinken leicht. Nach zweistündiger Dehnung verschiebt sich die Verteilung für die Aktin-Messung weiter zu höheren Werten (Median 82°), was in den folgenden beiden Zeitschritten von 4 h (82°) und 8 h (81°) erhalten bleibt. Die Verteilung der MT-Orientierung stieg nach 2 h wieder in Richtung der Verteilung von 30 min an.

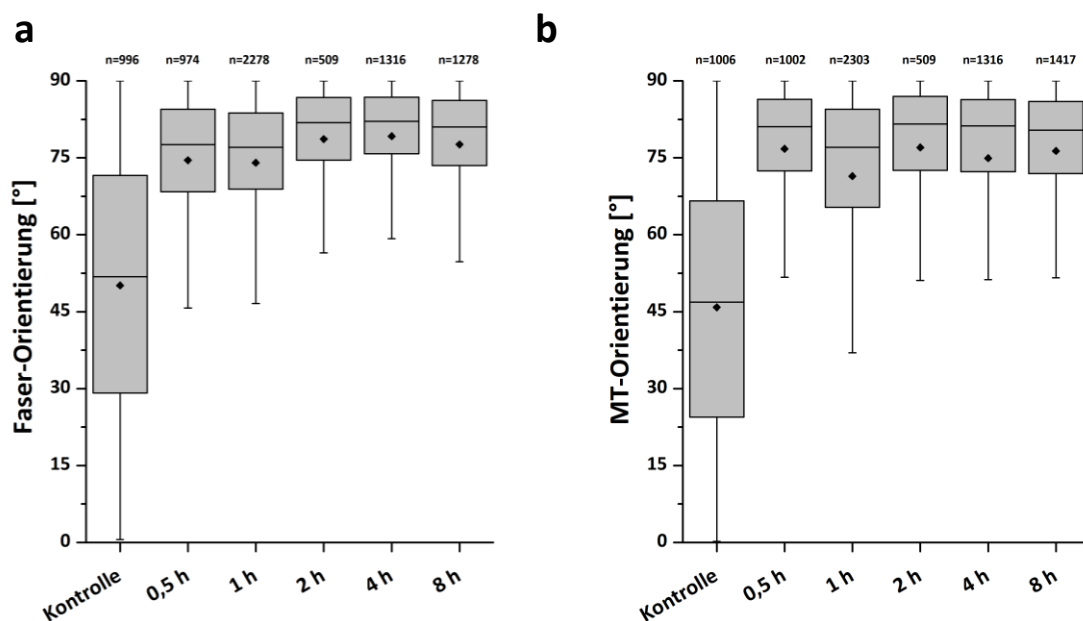


Abbildung 3.15: Hauptorientierungen von Aktinfasern und Mikrotubuli im zeitlichen Verlauf – Dargestellt sind die Verteilungen der ermittelten Hauptorientierungen der Aktinfasern (a) und Mikrotubuli (b) nach unterschiedlich langer Dehnung um 14% bei 130 mHz. Dabei ist zu sehen, dass die Reorientierung bereits nach 30 min stark zu Winkeln senkrecht zur Zugrichtung verschoben ist und sich im weiteren Verlauf nur noch geringfügig ändert.

Im Vergleich ihrer Hauptorientierungen sind die Unterschiede zwischen Aktinfasern und Mikrotubuli teils gering. In den Immunfärbungen war jedoch ersichtlich, dass vor allem die Mikrotubuli selbst in ausgerichteten Zellen eine breite, strahlenförmige Verteilung in der Zelle aufweisen (s. Abb. 3.24). Aus diesem Grund wurde neben der Hauptorientierung auch die Verteilung aller gemessenen Orientierungen pro Zelle analysiert. Im Folgenden sollen die Unterschiede in diesen beiden Verteilungsarten genauer aufgezeigt werden. Dazu wurden die Werte in Histogramme mit einer Klassenbreite von 5° aufgetragen (s. Abb. 3.16 a und Abb. 3.17 a).

Wiederum ist bei den Kontrollen zu erkennen, dass die Aktin-Orientierungen wie bereits für die Maxima auch in ihrer Gesamtverteilung leicht von einer Gleichverteilung abweichen, während bei den Mikrotubuli eine zufällige Verteilung der Werte sichtbar ist. Nach einer zyklischen Dehnung von 0,5 h sind in den Hauptorientierungen der Mikrotubuli (s. Abb. 3.16 b) deutlich mehr Zellen im Bereich von $85-90^\circ$ zu finden, als es für die Aktinfasern der Fall ist. Bei der Gesamtverteilung (s. Abb. 3.17 b) zeigen die Histogramme für beide Cytoskelett-Typen eine ähnliche Verschiebung der Häufigkeiten von der Richtung der angelegten Dehnung weg.

Nach einstündigem Verzug der Kammern sind die Hauptorientierungen beider Cytoskelett-Typen zu 90° hin verschoben, bei den Mikrotubuli in diesem Fall etwas stärker. Während in den Histogrammen der 2 h-Experimente die beiden Klassen von $80-90^\circ$ die gleichen Häufigkeiten aufzeigen, ist für 4 h und 8 h die Aktin-Verteilung stärker zu 90° hin verschoben. Für beide Fälle zeigte sich die größte Verschiebung nach 4 h. Zur besseren Übersicht wurde die Verteilung außerdem in 1° großen Klassen kumulativ aufgetragen (s. Abb. 3.16 b u. Abb. 3.17 b).

In den Histogrammen aller gemessenen Orientierungen ist ab einer Dauer von 1 h stets die Verteilung der Aktinfaser-Orientierungen etwas stärker zu 90° hin verschoben, als die der Mikrotubuli. Die Unterschied zwischen beiden Cytoskelett-Typen wird dabei mit Dauer des Verzugs deutlicher.

Besonders in der Betrachtung der kumulativen Häufigkeiten ist zu sehen, dass sich bei Aktin ein sprunghafter Anstieg in der Reorientierung zwischen 2 h und 4 h zeigt, während bei den Mikrotubuli der 0,5 h-Wert eine deutlich stärkere Reorientierung zeigt als der 1 h-Wert.

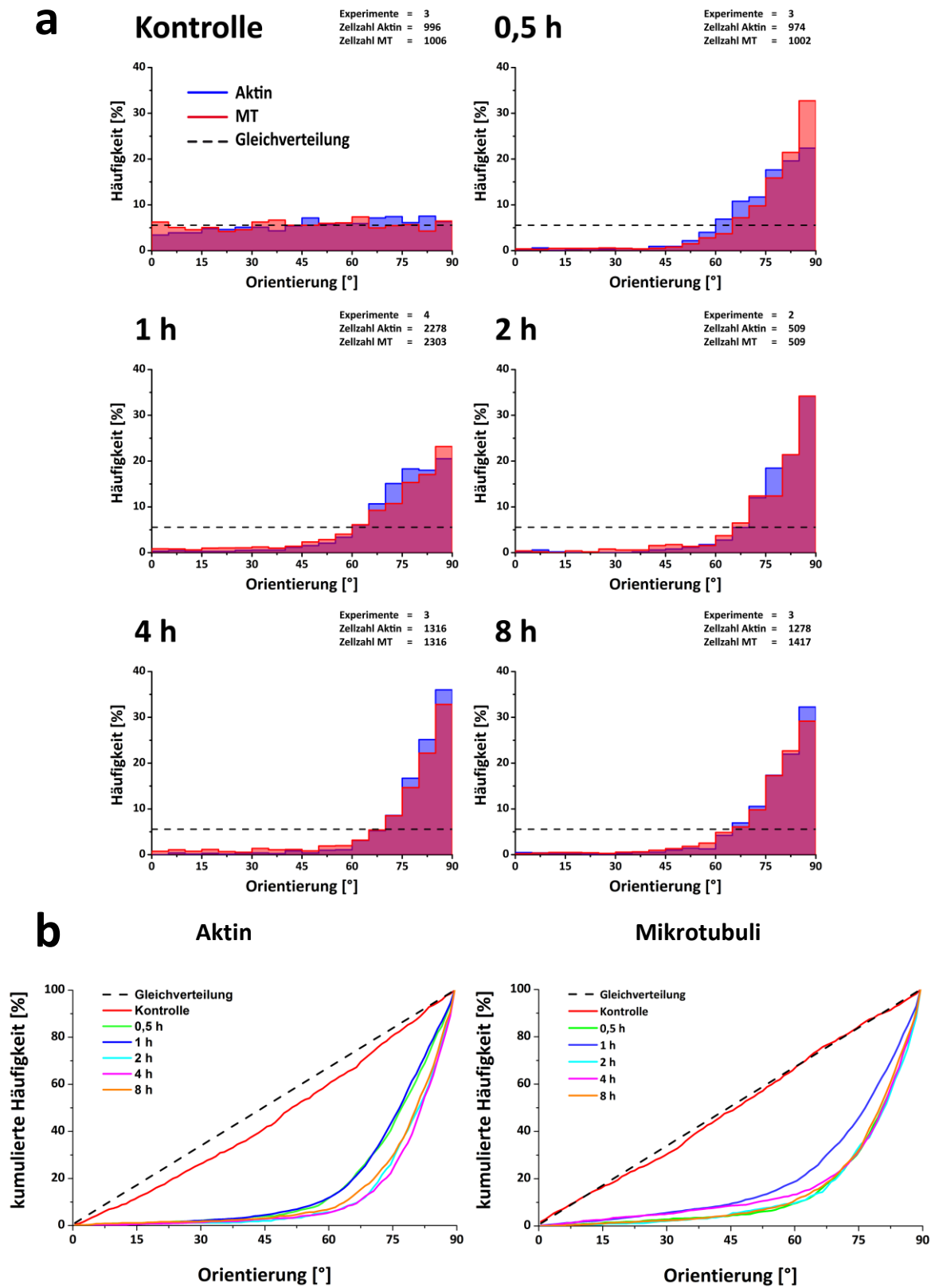


Abbildung 3.16: Histogramme der ermittelten Hauptorientierungen – In *a* gezeigt sind die Histogramme der für jede Zelle bestimmten Maxima der Aktinfaser- und Mikrotubuli-Orientierung nach verschieden langer zyklischer Dehnung in 5°-Intervallen. In grün eingezeichnet ist eine putative Gleichverteilung. Weiterhin sind die kumulativen Häufigkeiten der Aktin- und Mikrotubuli-Verteilungen in 1°-Klassen dargestellt.

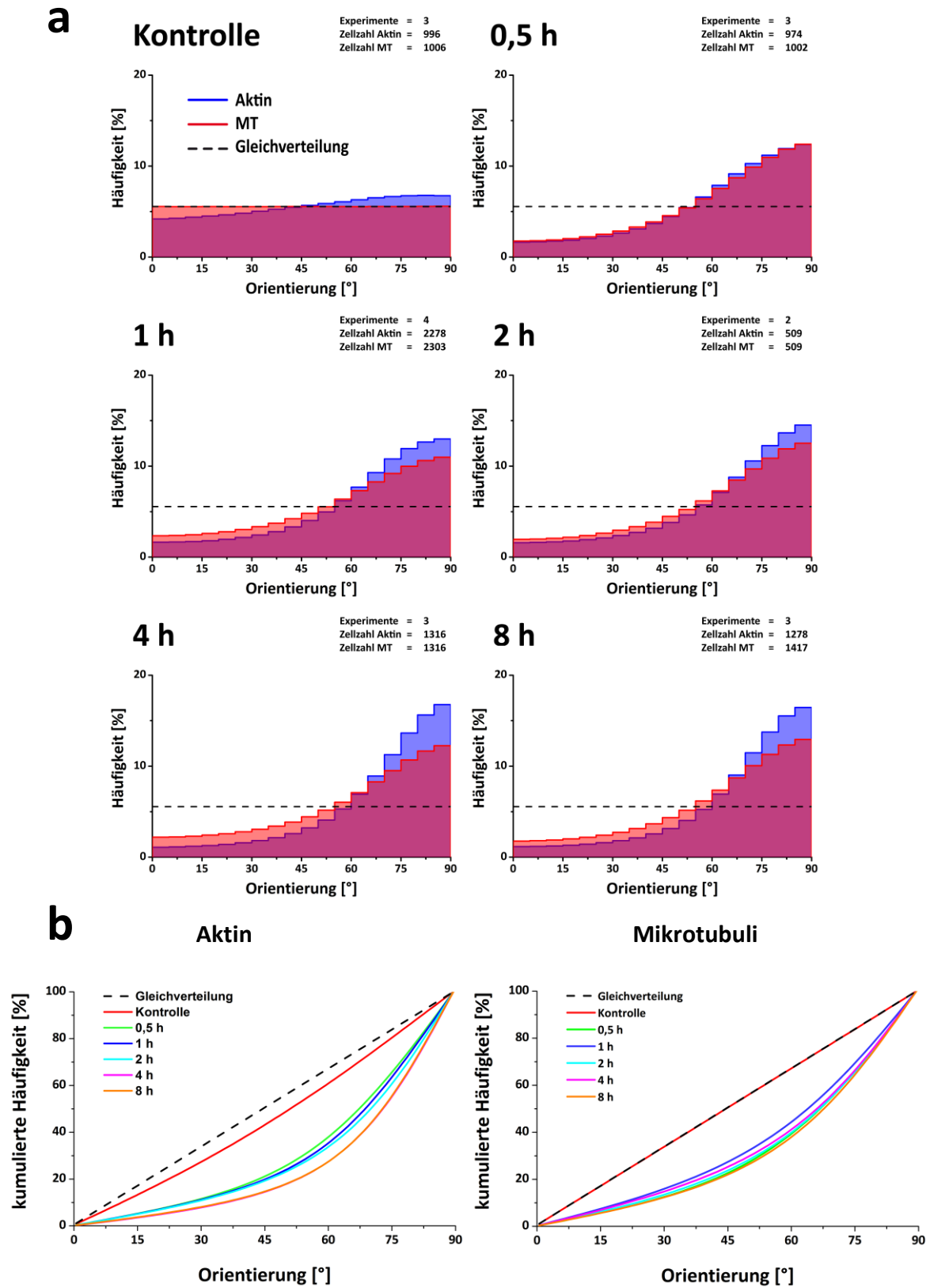


Abbildung 3.17: Histogramme aller gemessenen Orientierungen – Entsprechend Abbildung 3.16 sind hier in *a* die Histogramme aller ermittelten Aktinfaser- und Mikrotubuli-Orientierung dargestellt. Die Klassenbreite der Histogramme ist 5°. In *b* sind die kumulativen Häufigkeiten der Aktin- und Mikrotubuli-Verteilungen in 1°-Klassen zu sehen.

Bei der Betrachtung der kumulativen Häufigkeiten fällt auf, dass für Aktin-Orientierung die entsprechenden Kurven von 4 h und 8 h nahezu deckungsgleich übereinander liegen. Bei den Mikrotubuli ist zwischen 4 h und 8 h hingegen ein klarer Unterschied auszumachen. Außerdem ist die Verteilung für 2 h noch stärker verschoben als die für 4 h.

Reorientierung des Zellkörpers

In der Analyse der Zellkörper-Orientierungen zeigte sich ebenfalls das Bild einer größer werdenden Verlagerung der Ausrichtung über die Zeit. Die äquivalenten Ellipsen wurden sowohl anhand der detektierten Aktin-Fasern als auch anhand der Mikrotubuli bestimmt. Die Ergebnisse der auf Basis der detektierten Aktinfasern ermittelten Ellipsen unterschieden sich dabei für keinen Zeitpunkt signifikant ($\alpha=0,05$) von den entsprechenden Verteilungen, die aus den Auswertungen der Mikrotubuli-Aufnahmen stammten.

Die Reorientierung des Zellkörpers findet dabei langsamer statt als die Reorientierung des Cytoskeletts. Weiterhin war die Reorientierung des Cytoskeletts nach etwa 2 h vollständig abgeschlossen, während die Zellausrichtung zwischen 4 h und 8 h noch einen Anstieg in der mittleren und medianen Orientierung zeigt. Die Mittelwerte und Mediane der Verteilungen der Ellipsen-Orientierung bleiben dabei auch stets kleiner als die zugehörigen Werte des Cytoskeletts.

So liegen nach 8 h Mittelwert und Median der aus den Aktin-Aufnahmen bestimmten Ellipsen bei 68° und 74° , die entsprechenden Werte für die Aktinfasern bei 78° (Mittelwert) und 81° (Median).

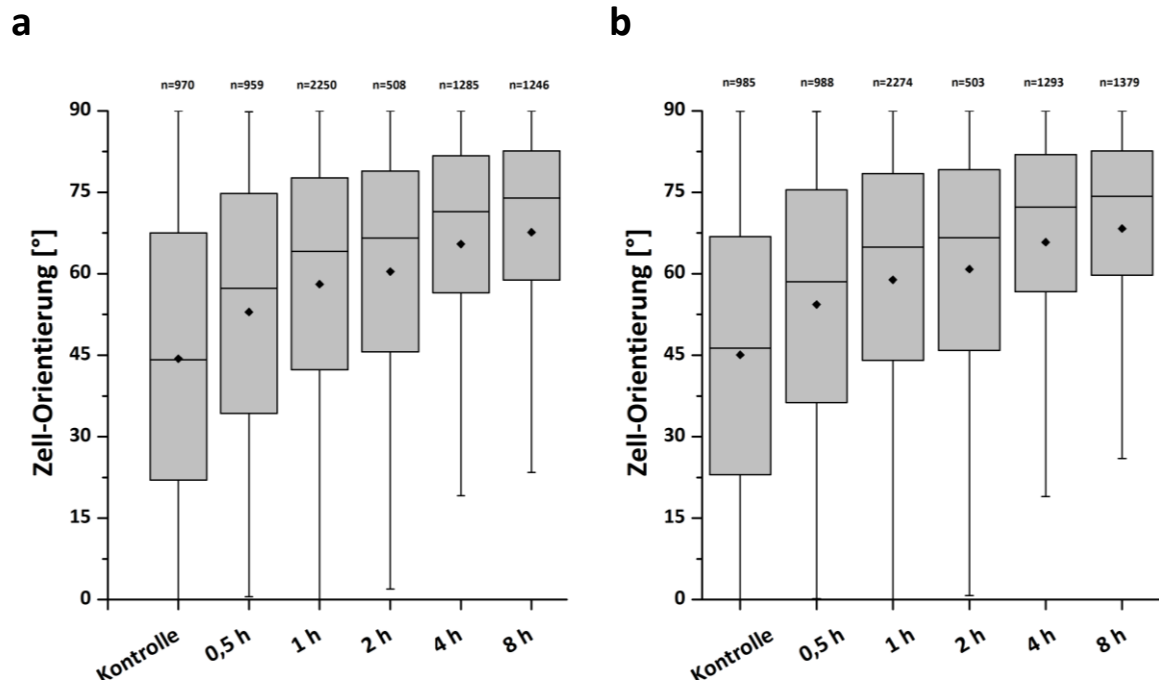


Abbildung 3.18: Reorientierung des Zellkörpers – Die Verteilungen zeigen die zusammengefassten Ellipsenorientierungen, als angenäherte Zellform. Die Ellipsen wurden sowohl auf Basis der Aktin- (a) als auch der Microtubuli-Färbungen (b) berechnet. Die Verteilung der Zellorientierungen verschiebt sich ebenso wie die des Cytoskeletts von der Richtung des applizierten zyklischen Verzugs weg. Anders als bei Aktinfasern und Microtubuli fand die Verschiebung der Verteilung langsamer statt und erreichte erst nach 8 h die maximale Abweichung von der undeformierten Kontrolle.

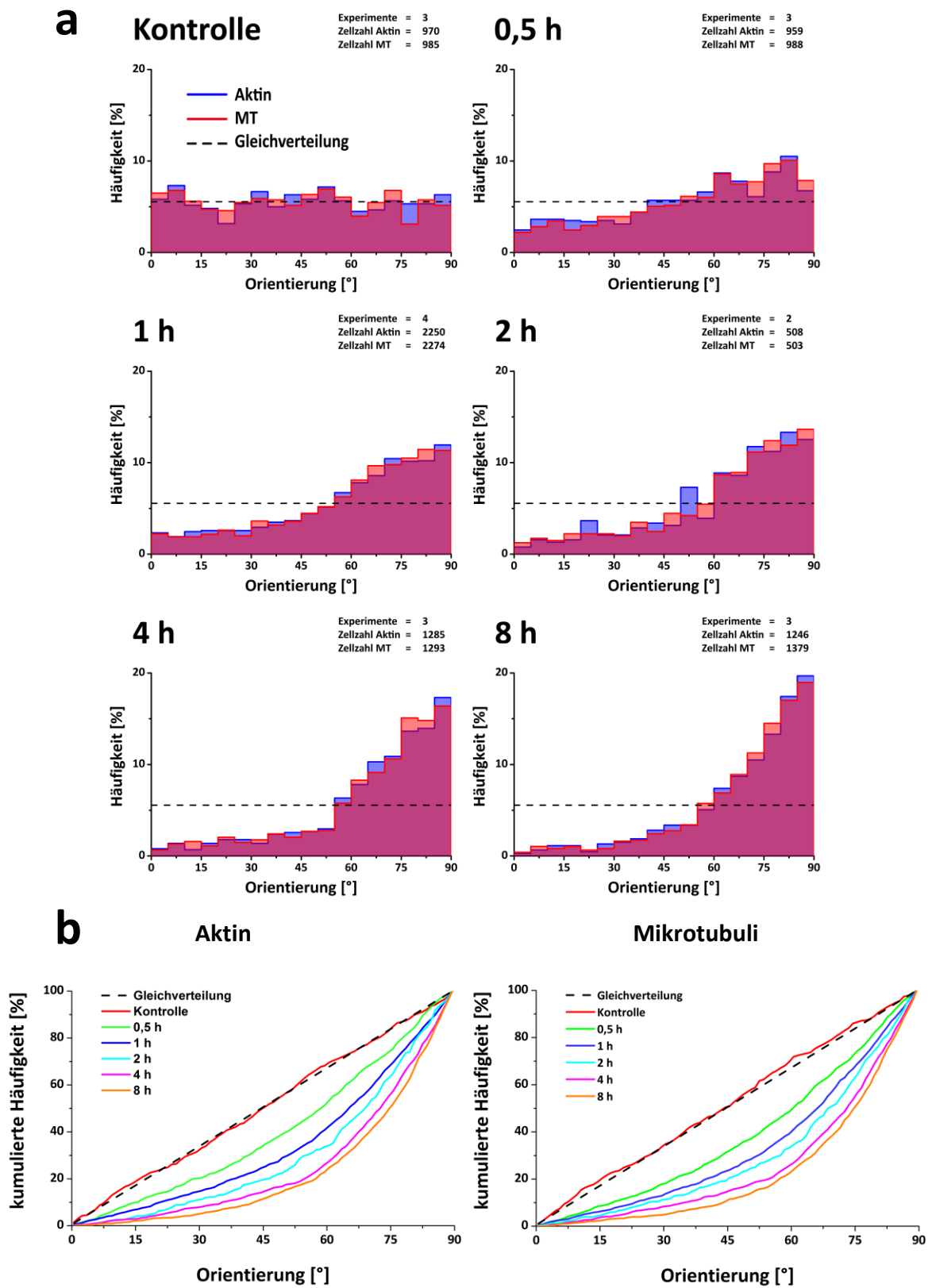


Abbildung 3.19: Histogramme der Zellorientierungen – Gezeigt sind die Histogramme (a-f) und kumulierten Häufigkeiten der Ellipsen-Orientierungen. Die Ergebnisse der Aktin- und MT-Daten unterscheiden sich für die einzelnen Verzugsdauern nicht signifikant voneinander. Erkennbar ist, dass die Verteilung schrittweise stärker in Richtung 90° verschoben wird.

Der Unterschied der Hauptorientierung des Cytoskeletts und der Ellipsenausrichtung ist in Abbildung 3.20 noch einmal genauer dargestellt. Zum Vergleich wurden für jede Zelle die Differenzen von Cytoskelett- und Ellipsenwerten gebildet. Dabei ist zu erkennen, dass die Differenzen sowohl für Aktin, als auch für die Mikrotubuli nach 0,5 h am größten sind und im Mittel bei über 20° (Median ca. 15°) liegen. Tendenziell nehmen die Differenzen über die Zeit ab. So liegt der Unterschied zwischen Zellorientierung und Hauptorientierung des Aktins nach 8 h nur noch bei 10° (Mittelwert) bzw. 5° (Median). Weiterhin ist die Abweichung der Hauptausrichtung des Cytoskeletts zur Zellorientierung beim Aktin stets signifikant größer als bei den Mikrotubuli.

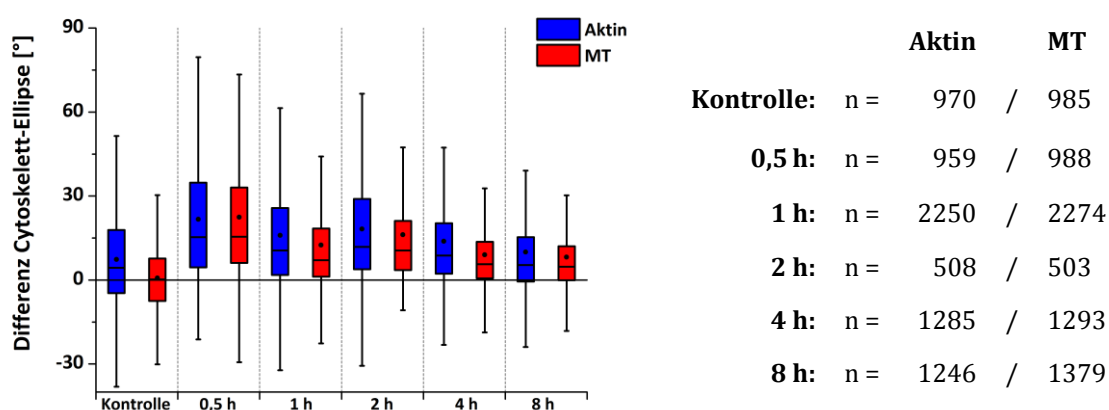


Abbildung 3.20: Abweichung der Cytoskelett-Orientierung von der Zellausrichtung - Dargestellt sind die Unterschiede in der Orientierung des Cytoskeletts und der Zelle als Differenz aus Hauptorientierung der Aktinfasern bzw. Mikrotubuli und der entsprechenden Ellipsen für jede Zelle. Die Abweichung ist nach Dauer von 0,5 h am größten, nimmt aber mit zunehmender Länge der zyklischen Dehnung wieder ab.

Änderungen in Fläche und Aspektverhältnis der Zelle

Bei den auf Basis der an die Zellform angenäherten Ellipsen errechneten Zellflächen fallen die auf dem Aktin-Cytoskelett beruhenden Werte stets größer aus als die entsprechenden Werte aus den Mikrotubuli-Daten. Die Erklärung dafür ist jedoch ohne weiteres aus den Immunfärbungen ersichtlich. Da die Aktinfasern in den primären HUVECs in Ausläufern und im Randbereich der Zelle stärker ausgebildet

sind als die Mikrotubuli, wird von den Aktinfasern effektiv die größere Fläche umschlossen. Folglich fallen auch die Flächen der Ellipsen, die als Annäherung der Zellfläche verwendet wurden, hier größer aus. Die Änderungen in den bestimmten Flächen im zeitlichen Verlauf sind trotzdem für beide Gruppen sehr ähnlich.

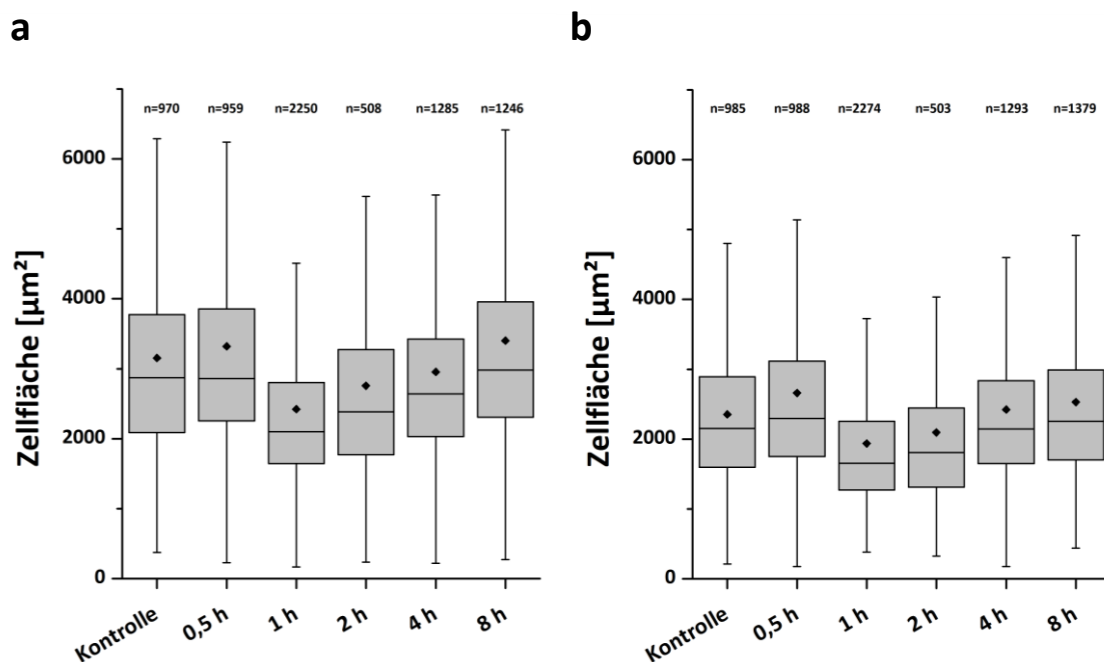


Abbildung 3.21: Änderung der Zellfläche – Hier gezeigt sind die Verteilungen der ermittelten Zellflächen aus Aktin- und Microtubuli-Färbungen. Während sich die Verteilungen nach 0,5 h und 8 h nicht von der Kontrolle unterscheiden, sind die Zellen nach 1 h zyklischer Dehnung kleiner und die Größe steigt über 2 h und 4 h wieder an. Im Vergleich sind die auf Basis der Microtubuli ermittelten Zellflächen kleiner als die des Aktins, der zeitliche Verlauf der Verteilungsänderung ist aber identisch.

Die Zellflächen nach zyklischer Dehnung für 0,5 h unterscheiden sich für die Aktin-Werte bei einem Median der Verteilung von $2860 \mu\text{m}^2$ nicht signifikant von den undeformierten Kontrollen (Median= $2870 \mu\text{m}^2$), bei den Microtubuli-Daten steigt die Fläche geringfügig an. Nach 1 h zeigt sich die Zellfläche mit einem Median von $2100 \mu\text{m}^2$ (Aktin) und $1660 \mu\text{m}^2$ (MT) bedeutend kleiner. Mit der Dauer des Verzuges nimmt die Fläche dann aber stetig zu und ist schließlich bei 8 h Versuchsdauer mit Medianen von $2980 \mu\text{m}^2$ und $2250 \mu\text{m}^2$ wieder etwas größer als in den Kontrollen.

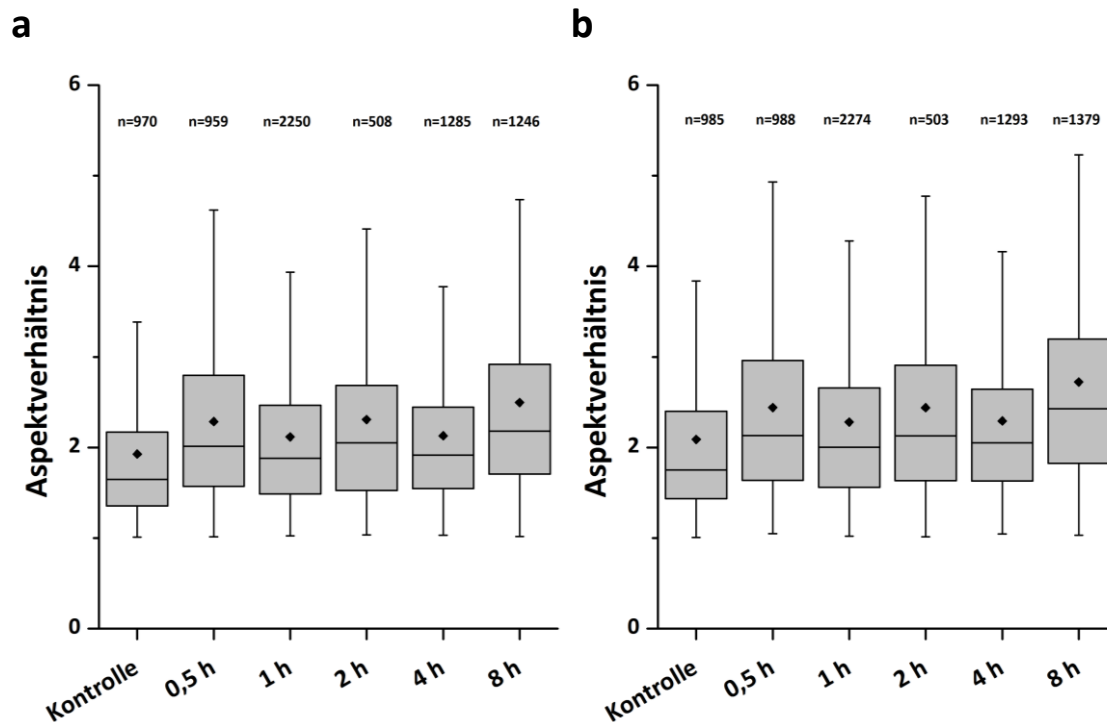


Abbildung 3.22: Änderung des Aspektverhältnisses des Zellkörpers - Die Änderungen des Aspektverhältnisses der Zellkörper sind weniger ausgeprägt als die Orientierungsänderungen. Es ist jedoch auch hier zu erkennen, dass die Zellen im Vergleich zur Kontrolle nach zyklischem Verzug ein größeres Aspektverhältnis aufweisen.

Das Aspektverhältnis, also der Quotient von großer Hauptachse und kleiner Hauptachse der an die Zellform angenäherten Ellipse, ist bei zyklisch deformierten Zellen im Mittel signifikant größer. Somit sind die gedehnten Zellen langgestreckter in der Form, als die entsprechenden Kontrollen. Die insgesamt größten Werte treten nach 8 h Deformation mit Medianen von 2,2 (Aktin) und 2,4 (MT) auf. Bei den dazwischenliegenden Zeitintervallen ist kein klarer Trend erkennbar. Die Mediane liegen auf einem ähnlichen Niveau (s. Tabelle 3.5).

		Aktin				MT			
		n	Median	Mittelwert	SD	n	Median	Mittelwert	SD
Haupt-orientierung	Kontrolle	996	52	50	25	1006	47	46	26
	0,5 h	974	78	75	14	1002	81	77	15
	1 h	2278	77	74	14	2303	77	71	19
	2 h	509	82	79	12	509	82	77	15
	4 h	1316	82	79	12	1316	81	75	18
	8 h	1278	81	78	13	1417	80	76	15
Gesamt-orientierung	Kontrolle	996	52	49	26	1006	46	45	26
	0,5 h	974	68	62	28	1002	68	61	27
	1 h	2278	70	63	29	2303	65	59	28
	2 h	509	71	64	29	509	68	61	28
	4 h	1316	74	67	30	1316	67	60	28
	8 h	1278	74	67	30	1417	69	62	28
Ellipsen-Orientierung	Kontrolle	970	44	44	26	985	46	45	26
	0,5 h	959	57	53	25	988	59	54	25
	1 h	2250	64	58	24	2274	65	59	24
	2 h	508	67	60	23	503	67	61	23
	4 h	1285	71	65	21	1293	72	66	21
	8 h	1246	74	68	20	1379	74	68	20
Zell-fläche	Kontrolle	970	2870	3150	1600	985	2150	2350	1180
	0,5 h	959	2860	3320	1710	988	2300	2660	1400
	1 h	2250	2100	2420	1290	2274	1660	1940	1080
	2 h	508	2380	2760	1560	503	1810	2100	1240
	4 h	508	2380	2760	1560	503	1810	2100	1240
	8 h	1285	2640	2950	1500	1293	2140	2400	1270
Aspekt-verhältnis	Kontrolle	970	1,7	1,9	0,9	985	1,8	2,1	1,0
	0,5 h	959	2,0	2,3	1,0	988	2,1	2,4	1,1
	1 h	2250	2,0	2,3	1,0	2274	2,0	2,3	1,0
	2 h	508	2,1	2,3	1,1	503	2,1	2,4	1,3
	4 h	1285	1,9	2,1	0,9	1293	2,1	2,3	1,0
	8 h	1246	2,2	2,5	1,2	1379	2,4	2,7	1,3

Tabelle 3.5: Mediane und Mittelwerte der analysierten Zellparameter

In Abbildung 3.23 sind die verschiedenen Orientierungsparameter noch einmal in einer alternativen Darstellung zusammengefasst. Dabei sind die Gesamtverteilungen der Aktinfasern und Mikrotubuli in 5°-Klassen in einem Polardiagramm aufgetragen. Die eingezeichnete Ellipse repräsentiert die mittlere Orientierung der Zelle aus den Aktin-Analysen mit dem entsprechenden Aspektverhältnis. Die Striche am Rand der Ellipse zeigen die auf das Maximum der Häufigkeiten normierte Verteilung der Ellipsen.

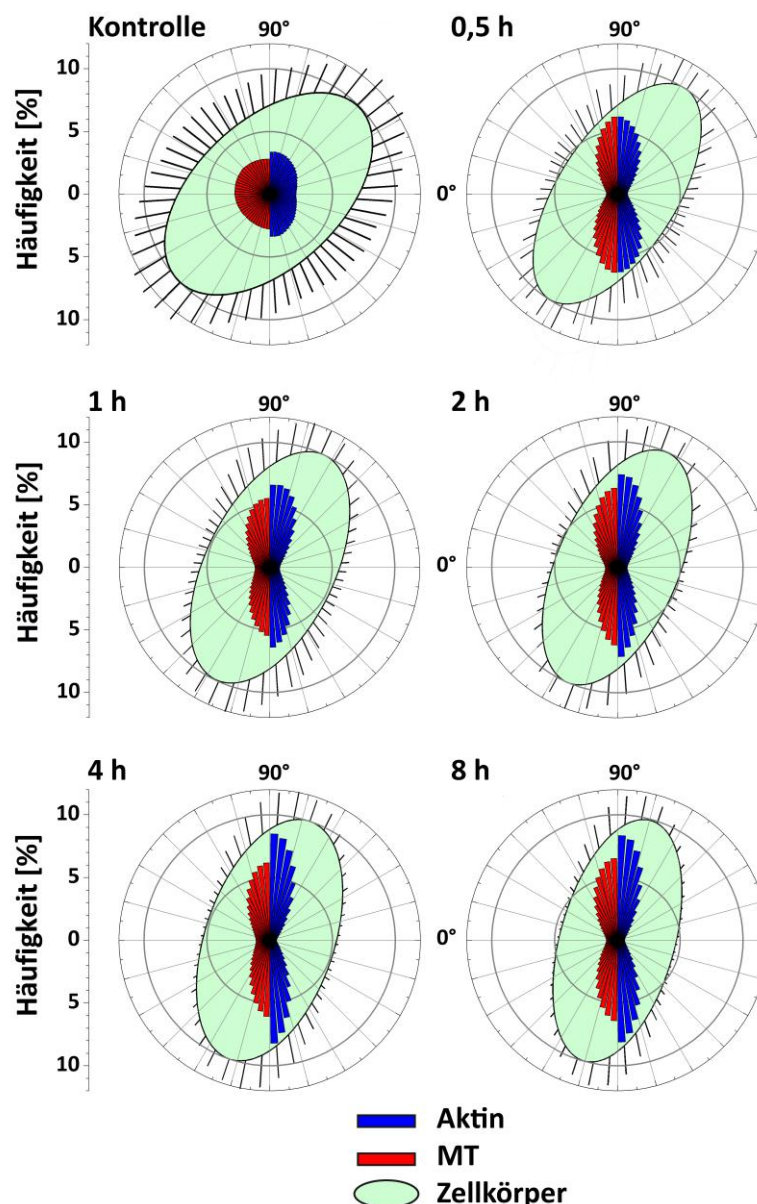


Abbildung 3.23: Zusammenfassung der Cytoskelett- und Zellorientierungen – Gezeigt sind die Verteilung aller gemessener Orientierungen der Aktinfasern (blau) und Mikrotubuli (rot) in Klassen zu 5° für jedes Zeitintervall. Die grüne Ellipse zeigt die Werte der mittleren Zell-Orientierung mit dem Mittelwert der Aspektverhältnisse an. Als schwarze Striche auf der Ellipse ist das Histogramm der Ellipsenorientierung in 5°-Klassen und auf das Maximum normiert angedeutet.

In der in Abbildung 3.23 gezeigten Darstellung lässt sich noch einmal erkennen, dass durch die zyklische Dehnung die Verteilung der Aktinfasern und der Mikrotubuli über alle Zellen gemittelt eine gemeinsame Ausrichtung beider Cytoskelett-Typen senkrecht zur Deformationsrichtung aufzeigt. Dementsprechend ist auch die Zelle im Mittel bereits ab einem Intervall von 0,5 h deutlich reorientiert. In den meisten ausgerichteten Zellen zeigen Aktinfasern und Mikrotubuli eine klare Koorientierung (s.a. Abb. 3.11). Dass auf Einzelzell-Ebene teilweise auch ein anderes Bild entstehen kann, soll in den folgenden Abbildungen exemplarisch gezeigt werden.

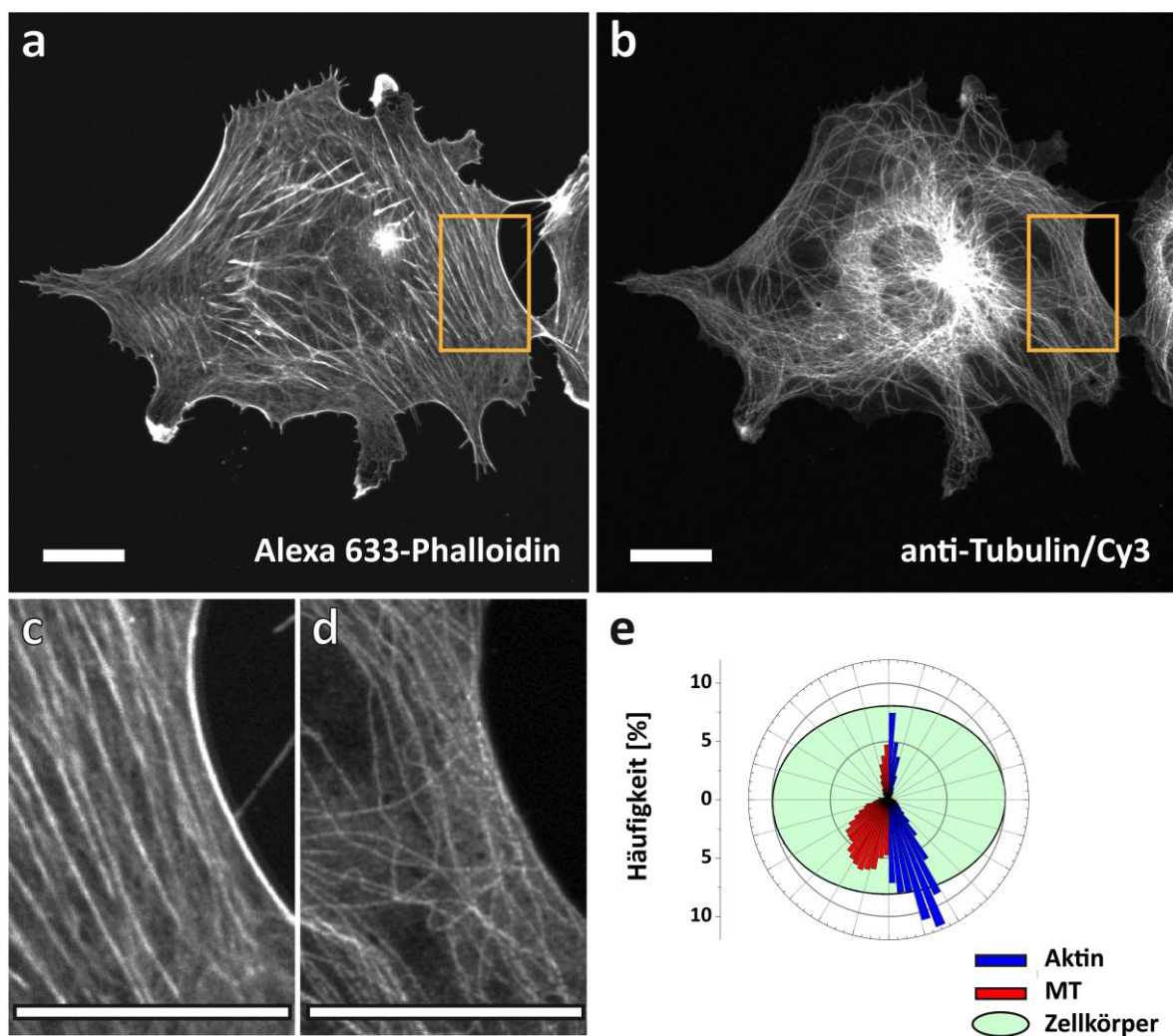


Abbildung 3.24: Koordination von Stressfasern und Mikrotubuli – Die gezeigte Endothelzelle wurde über eine Dauer von 1 h zyklisch gedehnt. Aktinfasern (a) und Mikrotubuli (b) zeigen in ihrer Orientierungsverteilung (e) eine klare Übereinstimmung. Vor allem im Randbereich (c u. d) liegen Stressfasern und Mikrotubuli parallel zueinander. Maßstab=20 μm .

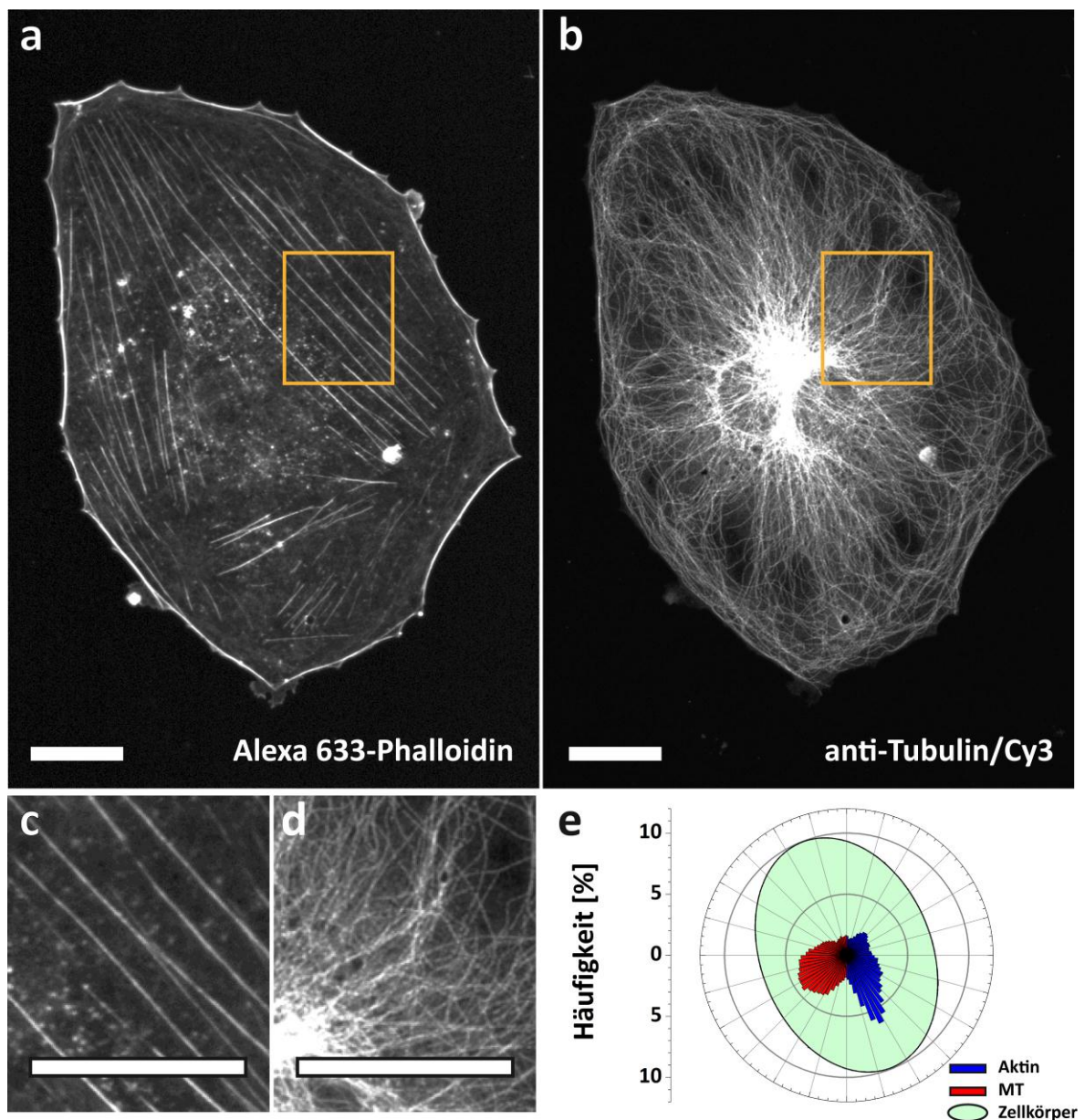


Abbildung 3.25: Unterschiede in Aktin- und Mikrotubuli-Orientierung auf Zellebene – Gezeigt ist eine primäre HUVEC nach zyklischer Dehnung über 1 h, die Zugrichtung liegt horizontal. Die Aktinfasern (a) sind hauptsächlich in senkrechter Richtung angeordnet, die Mikrotubuli hingegen zeigen eine breitere Verteilung und liegen dabei teilweise senkrecht zu den Stressfasern (c/d). Maßstab=20 μm .

Die in Abbildung 3.25 und Abbildung 3.26 gezeigten primären HUVECs zeigen jeweils deutliche Unterschiede in den Orientierungen der Aktin-Stressfasern und den Mikrotubuli. Die Aktinfasern sind in beiden Fällen in senkrechter Richtung zur angelegten Deformation orientiert, während die Mikrotubuli zum einen breiter in der Verteilung sind, zum anderen ihre Ausrichtung stärker durch die Zellform bestimmt wird, was besonders am Zellrand und in Ausläufern einen Einfluss hat. Dies sind die

Bereiche, in denen die Mikrotubuli eine gerichtete Orientierung besitzen (s.a. Abbildung 3.26). Im mittleren Teil der Zelle hingegen lässt sich keine genaue Vorzugsrichtung erkennen.

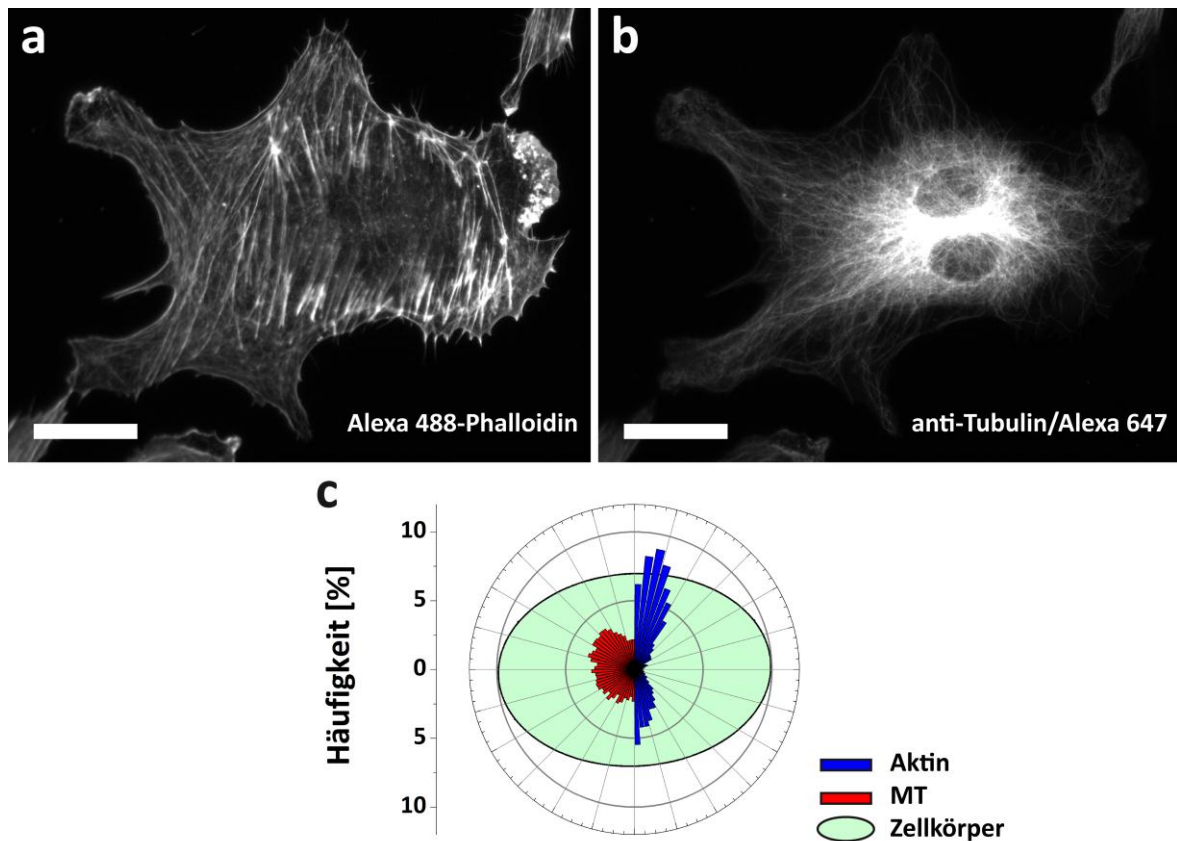


Abbildung 3.26: Unterschiede in Aktinfaser- und Mikrotubuli-Orientierung auf Zellebene – In diesem Bild ist eine für 4 h zyklisch gedehnte primäre HUVEC zu sehen. Der Zellkörper liegt in Richtung des Zuges, die Stressfasern (a) sind jedoch senkrecht dazu ausgebildet. Die Mikrotubuli (b) sind in ihrer Ausrichtung breit verteilt (c). Maßstab=20 μm .

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Aktinfaser- und Mikrotubuli-Orientierung in Zellen, die selber eine deutliche Ausrichtung zeigten, eine klare zueinander parallele Ausrichtung aufwiesen. In Zellen, die sich noch nicht vollständig reorientiert hatten, konnten die Cytoskelett-Ausrichtungen in einzelnen Bereichen teils stark voneinander abweichen.

Zur abschließenden Betrachtung der Orientierungsanalysen sind in Abbildung 3.27 nun die Ergebnisse der Lebendzellanalysen mit denen der immunocytochemischen Analysen zusammengeführt. Die Graphen zeigen die Ergebnisse der Einzelmessung

aus den Lebendzellanalysen für Stressfaser- und Zellorientierung. Als Vergleich dazu sind oberes und unteres Quartil sowie der Median der Resultate aus der Immunfluoreszenz gezeigt. Es zeigt sich, dass für die Aktinfasern ein Großteil der Einzelmessungen innerhalb der Quartilsgrenzen liegt. Lediglich 18% der Messwerte liegen unterhalb, 1% oberhalb der Grenzen. Bei der Verteilung der Zellorientierung liegt ein gewisser Anteil von Zellen außerhalb der Quartilsgrenzen, wobei hierfür jedoch die generell breite Streuung der Werte ausschlaggebend ist. So liegen 30% der Messwerte unterhalb, 9% oberhalb der Interquartilsgrenzen. Dazu ist noch zu berücksichtigen, dass für die Lebendzell-Analysen überwiegend parallel zur Deformationsrichtung liegende Zellen ausgewählt wurden und somit die ursprüngliche Verteilung verzerrt war. Bei den immunocytochemischen Analysen hingegen wurden große Flächen aufgenommen, sodass eine zufällige Auswahl der Zellen erfolgte.

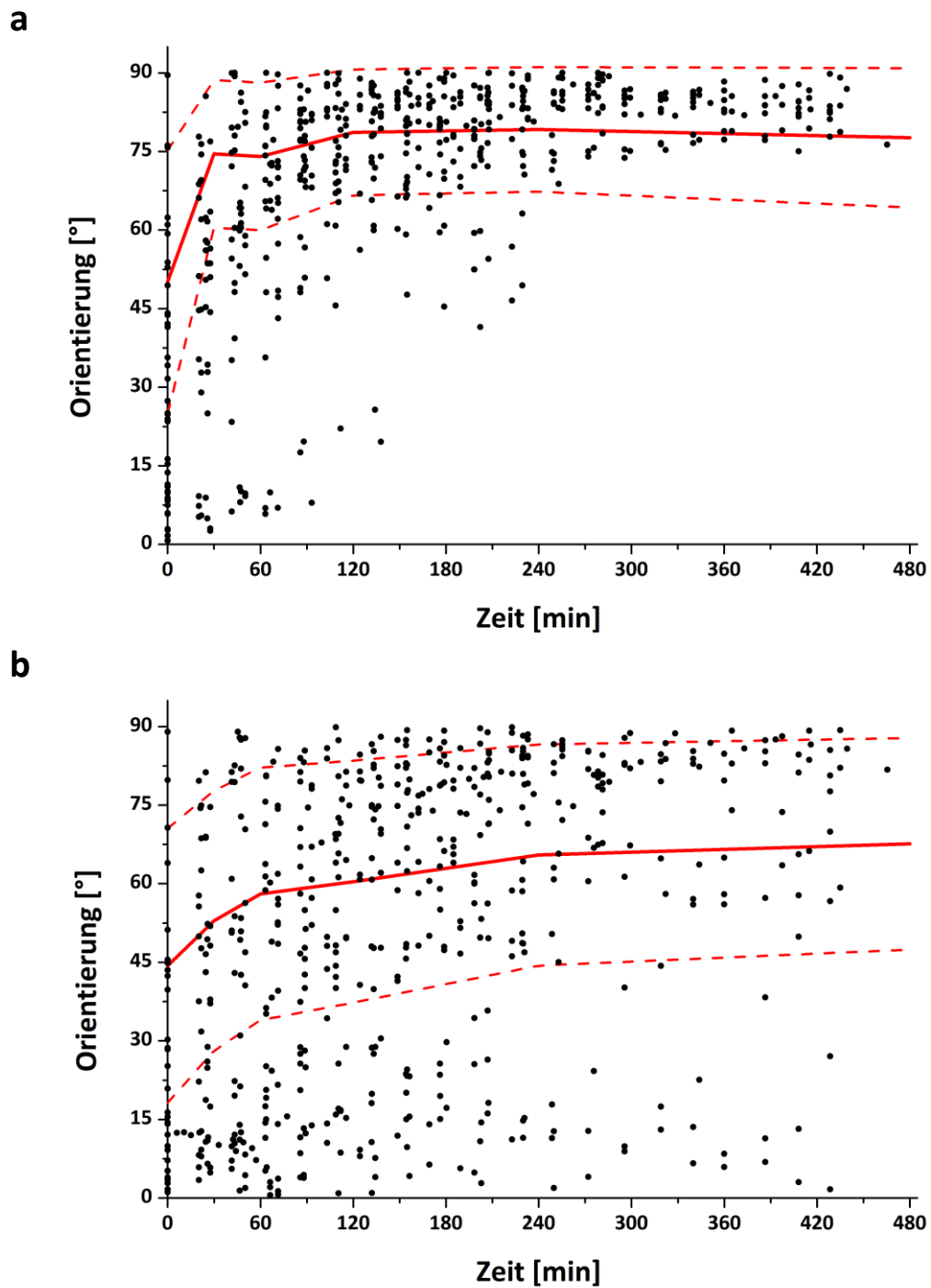


Abbildung 3.27: Vergleich der Lebenszellanalysen mit den Immunfluoreszenz-Proben – Gezeigt sind die zusammengeführten Daten der Einzelmessungen der Lebenszellanalysen (schwarze Punkte) und oberes und unteres Quartil (rot-gestrichelte Linie), sowie der Median (rote Linie) aus den Verteilungen der untersuchten Immunfluoreszenzproben. Graph *a* zeigt die Hauptorientierungen der Aktinfasern, *b* die Ellipsenorientierung.

3.2 Anlagerung von Zyxin und assoziierten Proteinen an gedehnte Aktinfaserbündel

Als zweiter Teil dieser Arbeit wurde die Dynamik verschiedener Cytoskelett assoziierter Proteine in der Zellantwort auf eine einmalige uniaxiale Dehnung in HUVECs betrachtet. Dabei zeigte sich, dass in mit GFP-Zyxin transfizierten Zellen bereits durch einmalige Dehnung des Substrates eine Akkumulation von Zyxin in bestimmten Bereichen entlang der Stressfasern hervorgerufen werden konnte. Zyxin ist in den untersuchten Endothelzellen neben den Fokaladhäsionen auch als Punktemuster entlang der Stressfasern zu finden. Durch Dehnung der Zelle zeigten sich neben dem Grundmuster des Zyxins entlang der Stressfasern Bereiche mit einer besonders hohen Intensität in den Fluoreszenzaufnahmen (s. Abb. 3.28). Wiederholte Durchführungen des Experiments ergaben, dass es sich hierbei um ein reproduzierbares zelluläres Verhalten handelte. Weiterhin zeigten sowohl die Primärzellen als auch die korrespondierende HUVEC-Zelllinie dasselbe Verhalten. Die Untersuchung der Zyxin-Anlagerung an gedehnte Aktin-Stressfasern gliederte sich in drei grundsätzliche Teilexperimente auf. Dies waren zunächst die allgemeine qualitative Analyse der Zyxin-Akkumulationen und die Beteiligung der beiden Bindungspartner VASP und α -Actinin in diesen Anlagerungen in deformierten Zellen. Im zweiten Schritt wurde in Lebenszellanalysen die Dynamik im Abbau der Strukturen über die Zeit genauer analysiert. Weiterhin wurden als dritter Aspekt die Orientierungen der Zyxin-Anlagerungen zur Richtung der angelegten Deformation bestimmt, aus der sich die minimal benötigte Stressfaser-Dehnung errechnen lässt.

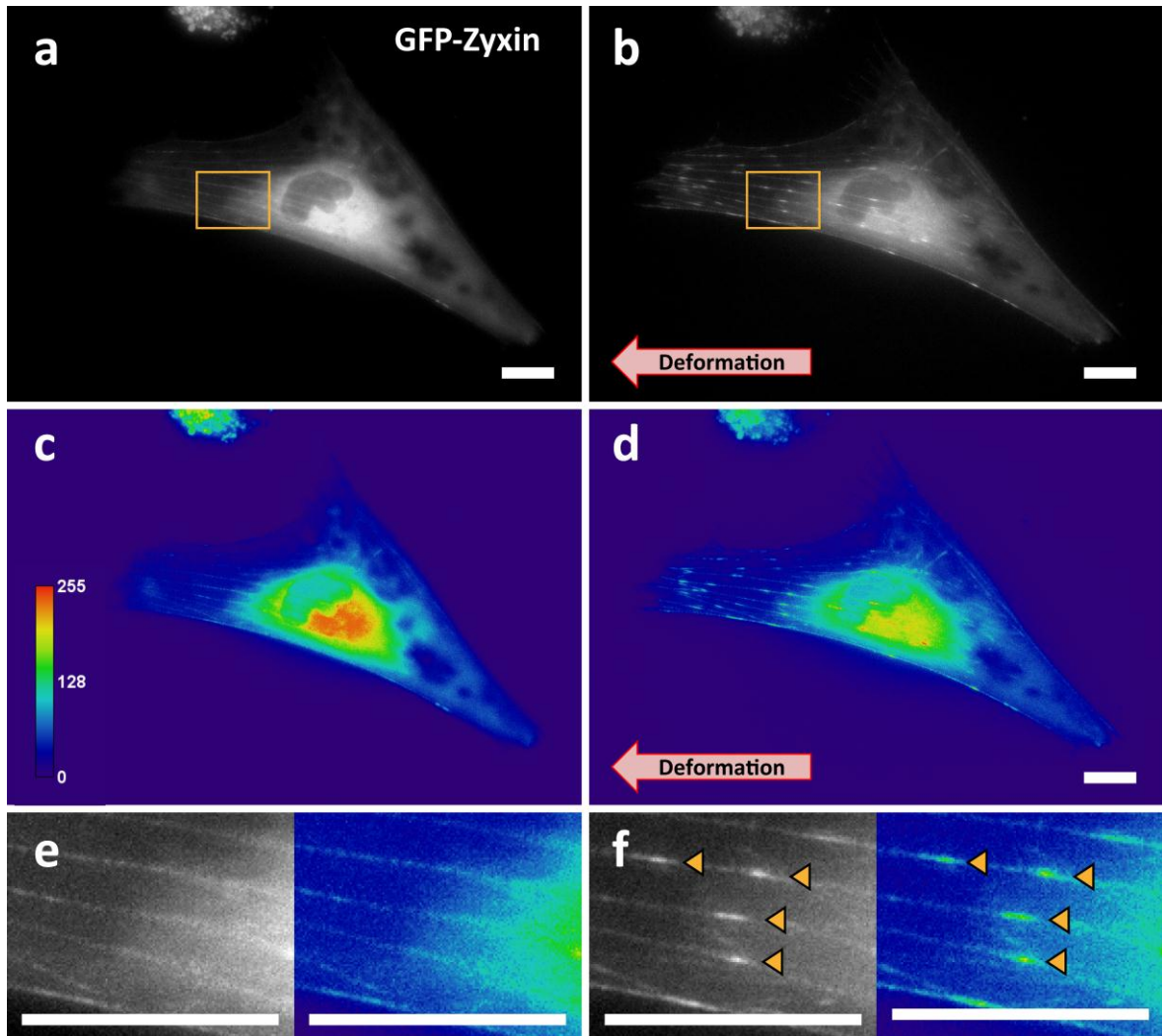


Abbildung 3.28: Anlagerung von Zyxin an gedehnte Stressfasern – Die Abbildung zeigt eine mit GFP-Zyxin transfizierte HUV-EC-C in Graustufen und der entsprechenden Falschfarbendarstellung. Im Ursprungszustand zeigt sich Zyxin nur als schwaches Punktemuster entlang der Stressfasern (a, c und e). Durch Dehnung um 12% sind nach 30 s deutliche Anlagerungen des Proteins (orange Pfeilspitzen) an den Stressfasern zu erkennen (b, d und f). Maßstab = 20 µm.

3.2.1 Qualitative Analyse der Proteinanlagerungen

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Anlagerung des Zyxins um eine generelle Zellreaktion handelt, wurden die Endothelzellen in Silikonkautschuk-Kammern gedehnt und mit immunohistochemischen Methoden (s. Abschnitt 2.2.3) angefärbt. Die Fixierung der Zellen erfolgte dabei unmittelbar nach Erreichen der maximalen Dehnungsamplitude, welche für die Färbungen aufrechterhalten wurde. Die Anlagerungen von Zyxin an den Aktinfaserbündeln konnten im Großteil der gedehnten Zellen beobachtet werden. Beispiele dafür sind in Abbildung 3.29 gezeigt. Die Länge der Protein-Akkumulationen entlang der Fasern lag typischerweise in einem Bereich von 2-5 μm , konnte, insbesondere an dicken Faserbündeln, aber auch größer ausfallen (s. Abb. 3.29 m-r).

In parallel zueinander liegenden Aktinfasern zeigten sich die Anlagerung häufig auf gleicher Höhe, sodass sich ein charakteristisches, breites Bandenmuster innerhalb der Zelle ergab (s. u.a. Abb. 3.29 a-f). Die Anlagerungen waren weiterhin nicht in senkrecht zur Deformationsrichtung liegenden Fasern zu finden. Es handelt sich also bei dem beobachteten Prozess nicht um eine globale Zellantwort. Vielmehr ist die lokale Dehnung einzelner Faserbündel entscheidend für das Auftreten der Anlagerungen.

Damit ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei den entstehenden Protein-Anlagerungen nicht um Adhäsionsstrukturen der Zelle handelt, wurde zusätzlich die Lokalisation von Vinculin als Marker der Fokaladhäsionen betrachtet. Wie in Abbildung 3.30 zu sehen ist, lagert sich Zyxin zwar auch mit Vinculin in der Fokaladhäsion an, die Anlagerungen an den Stressfasern sind jedoch frei von Vinculin.

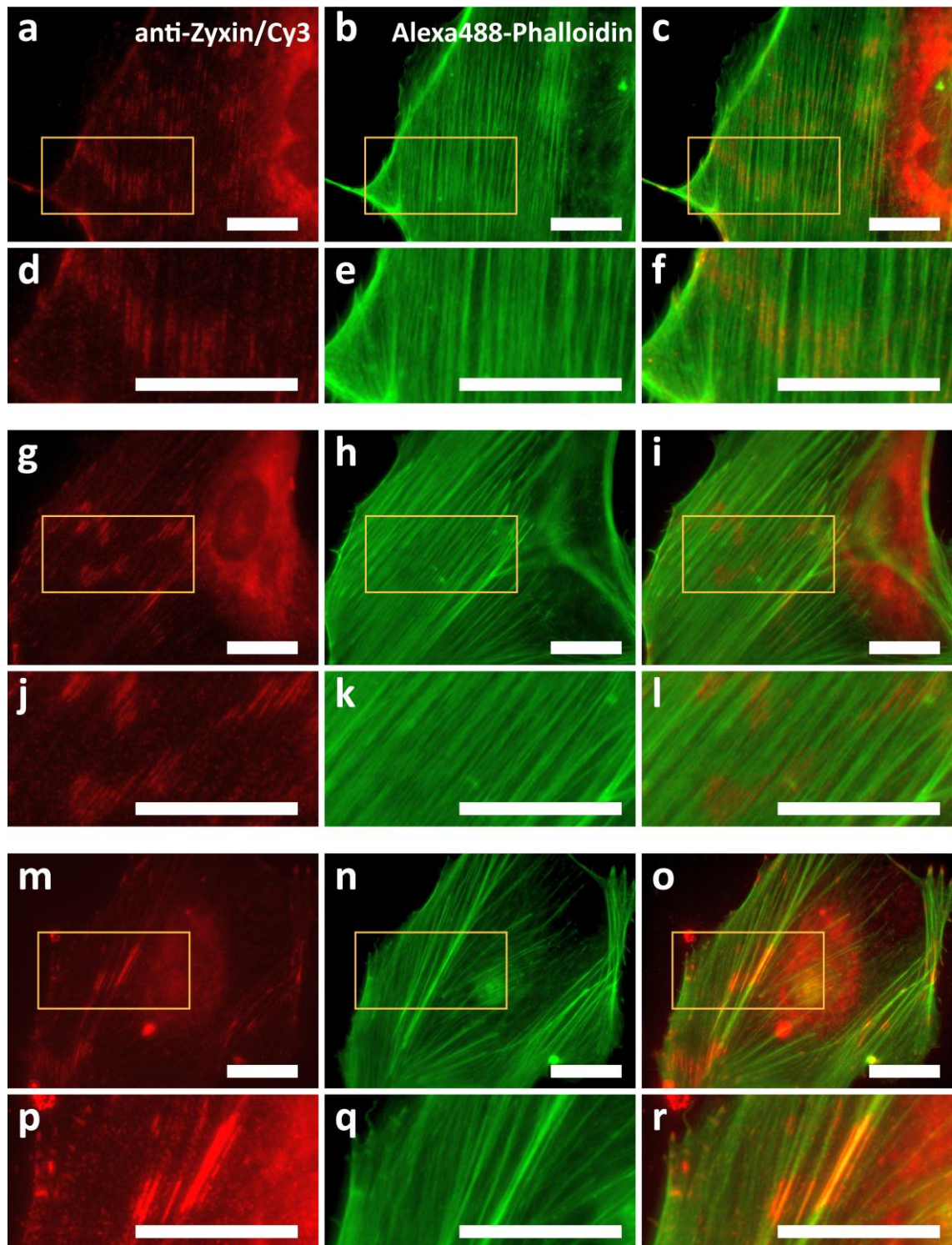


Abbildung 3.29: Anlagerungen von Zyxin an Aktin-Stressfasern nach uniaxialer Dehnung - Die hier gezeigten HUV-EC-C wurden in Silikonkautschuk-Kammern in senkrechter Richtung um 35% gedehnt und anschließend Zyxin (rot) und Aktin (grün) immunocytochemisch angefärbt. In den Aufnahmen und den jeweils daraus vergrößerten Bereichen (Zeile 2,4 u. 6) sind die Zyxin-Anlagerungen an Aktin-Stressfasern zu erkennen. Diese stellten sich häufig in Form von Banden entlang paralleler Stressfasern dar. Maßstab = 20 μm .

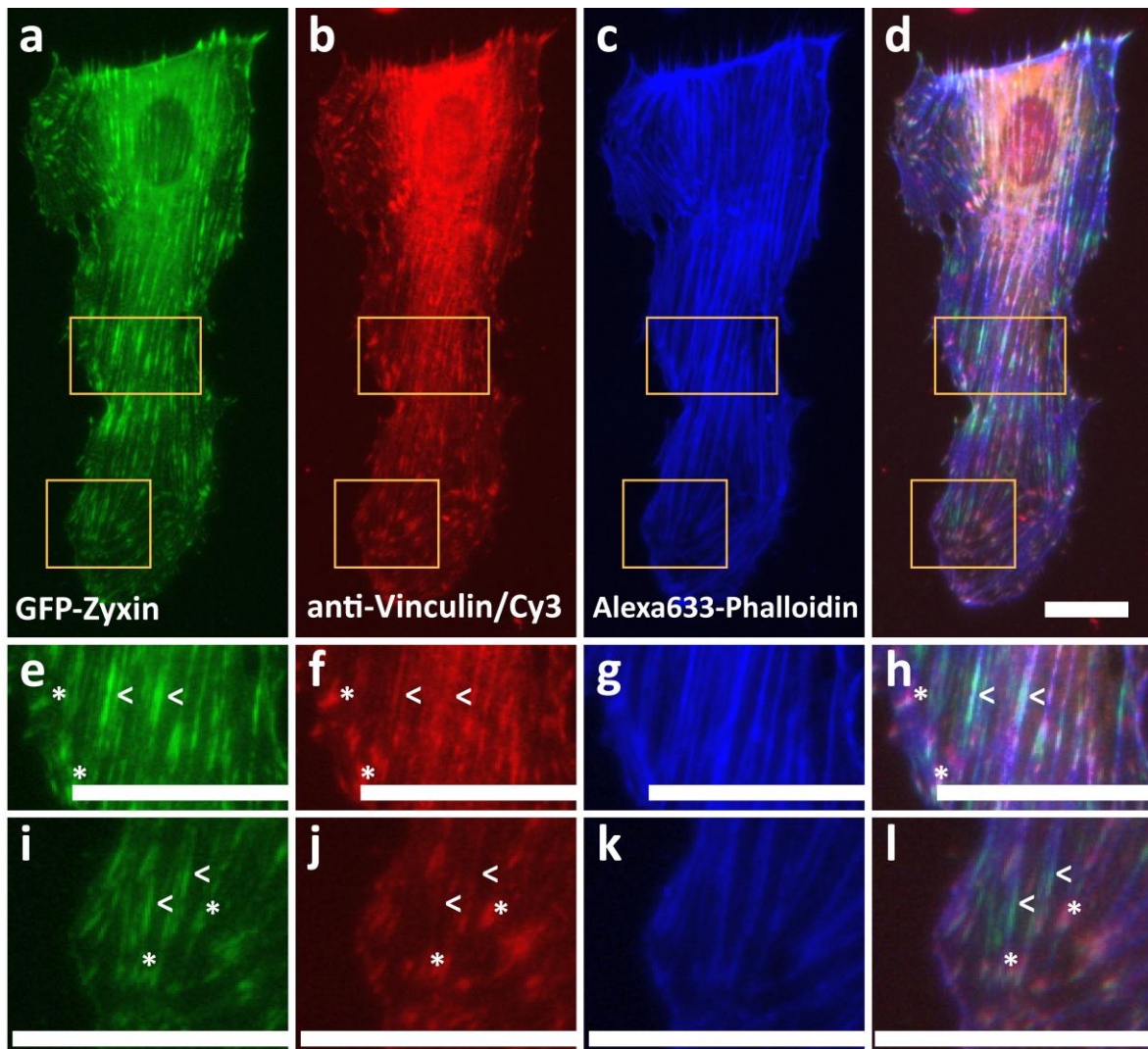


Abbildung 3.30: Lokalisation von Zyxin und Vinculin in deformierten Endothelzellen – Zu sehen ist die Aufnahme einer GFP-Zyxin-transfizierten primären HUVEC (a), zusätzlich wurden Vinculin (b) und Aktin (c) angefärbt. Rechts gezeigt ist jeweils eine Überlagerung der Kanäle. In den Vergrößerungen (e-l) ist zu erkennen, dass Zyxin und Vinculin gemeinsam im Bereich der Fokaladhäsionen (*) lokalisiert sind, in den Anlagerungen an den Stressfasern (<) jedoch kein Vinculin zu finden ist. Maßstab = 20 μ m, Deformationsrichtung senkrecht.

Zwei wichtige Bindungspartner von Zyxin sind VASP [103] und α -Actinin [115]. Ihre Lokalisation nach Dehnung der Zellen wurde deshalb ebenfalls untersucht. Wie in den Abbildungen 3.31 bis 3.33 zu sehen ist, konnte eine Kollokalisierung von Zyxin und VASP in den Proteinanlagerungen beobachtet werden. VASP zeigt dabei ein dem Zyxin ähnliches punktförmiges Grundmuster auf, das in den Anlagerungen zu einem durchgängigen Bereich mit hoher Fluoreszenz-Intensität wird. Die Aktinfasern selber zeigen, wie in Abbildung 3.32 g und 3.33 d zu sehen ist, währenddessen im Bereich der Anlagerungen keine erkennbaren Unterschiede zu den außerhalb liegenden Regionen auf.

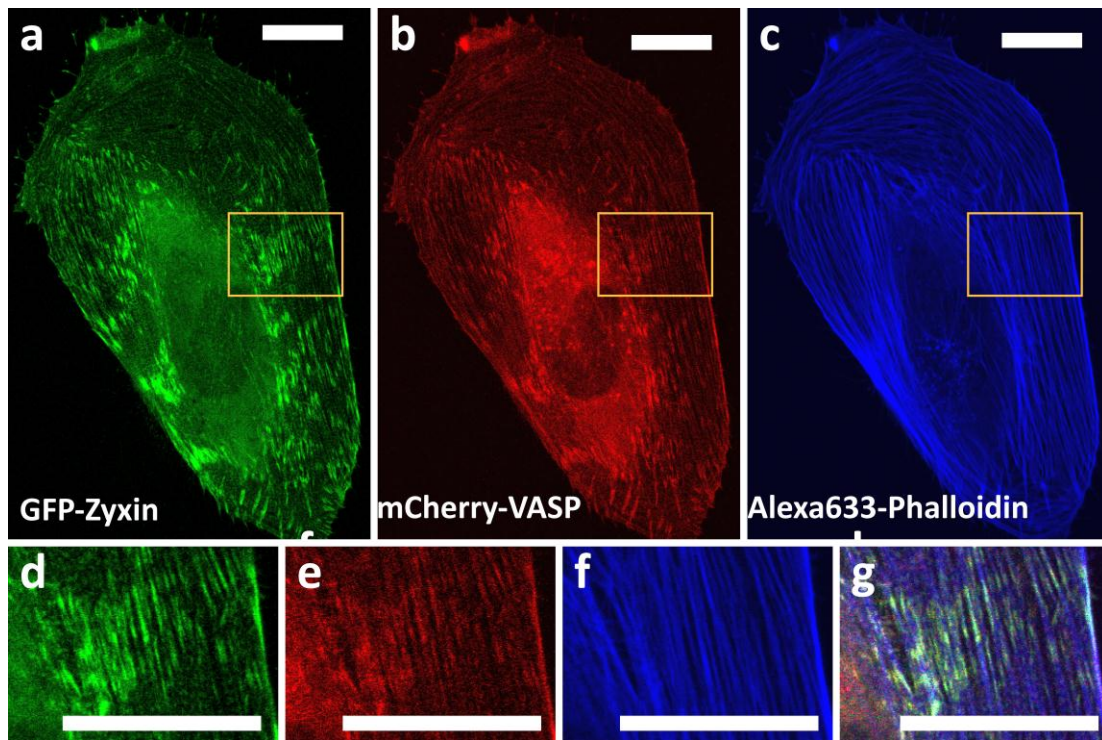


Abbildung 3.31: Kolokalisation von Zyxin und VASP – In der hier gezeigten Endothelzelle (HUV-EC-C) ist eine Kolokalisation von Zyxin (a) und VASP (b) in den nach Deformation um 35% entstehenden Strukturen erkennbar. In der Vergrößerung (d-g) zeigt sich im VASP-Kanal eine dem Zyxin ähnliche punktförmige Verteilung entlang der Aktinfasern und unterbrochen von durchgehenden Bereichen. Maßstab = 20 μm , Dehnungsrichtung senkrecht.

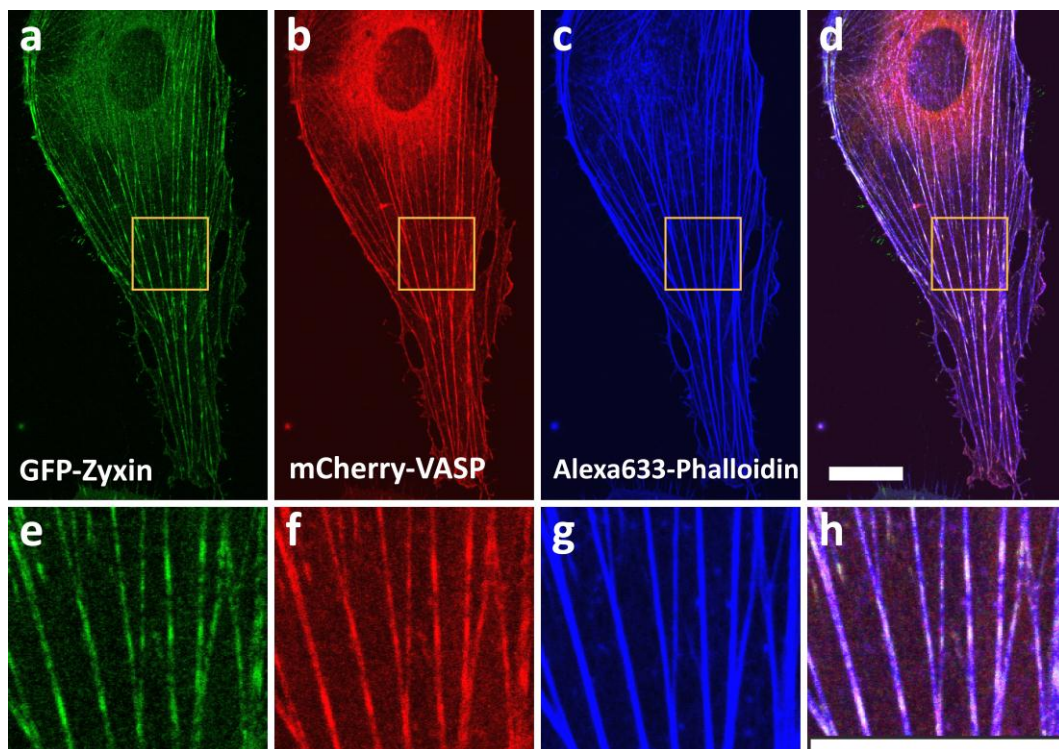


Abbildung 3.32: Kolokalisation von Zyxin und VASP – Analog zur vorhergehenden Abbildung sind auch in dieser HUVEC-Zelle Zyxin und VASP in den Einlagerungen kolokalisiert. Die Zelle wurde wie zuvor um 35% gedehnt. Die Aktinfasern weichen in den entsprechenden Bereichen nicht in ihrem Durchmesser von anderen Regionen ab (g). Maßstab = 20 μm , Deformationsrichtung senkrecht.

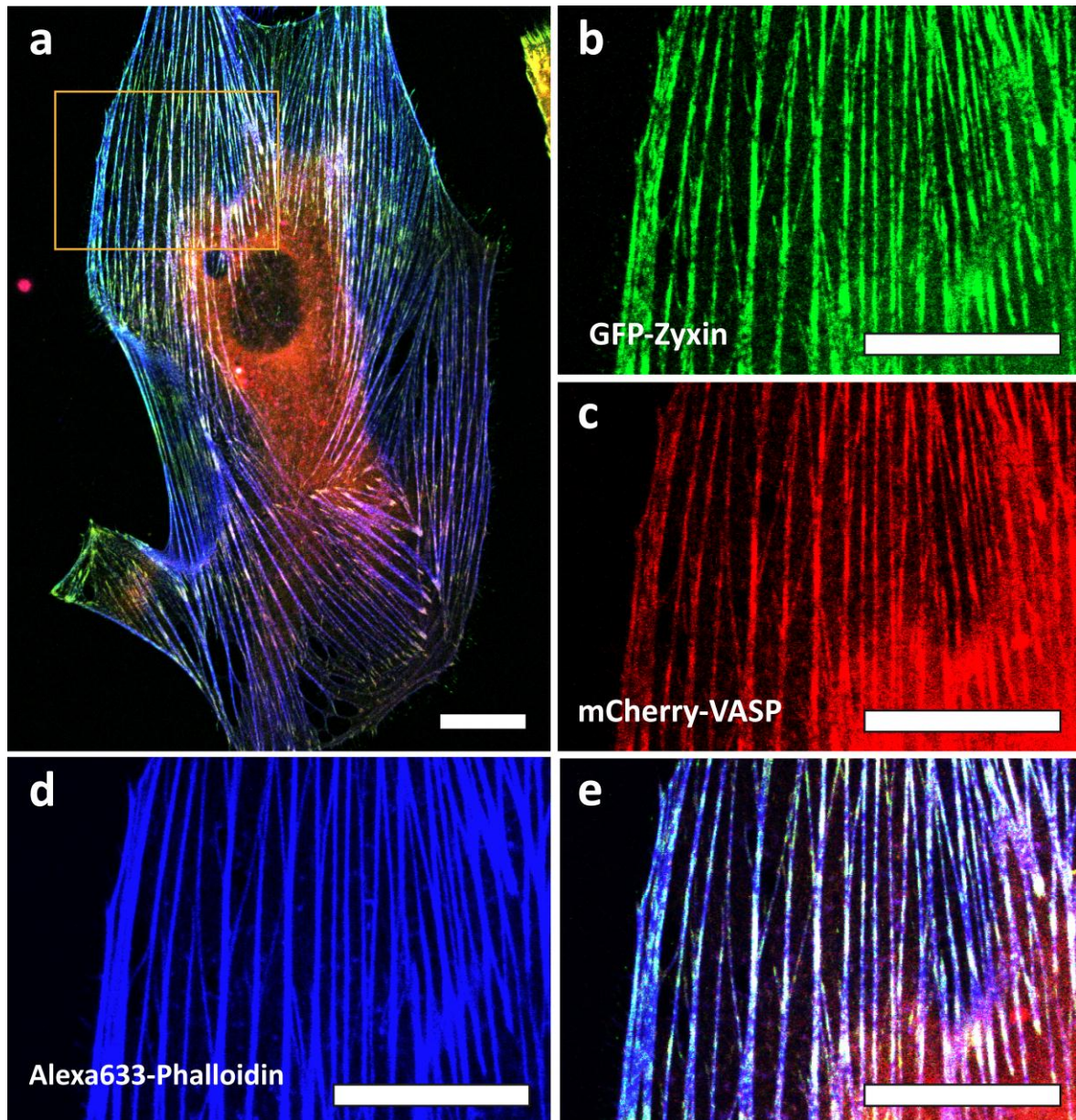


Abbildung 3.33: Kolokalisation von Zyxin und VASP – In diesem dritten Beispiel ist nach einer Dehnung um 35% über die Länge ebenfalls keine Veränderung in den Aktinfasern zu erkennen (d), Zyxin und VASP sind in den länglichen Anlagerungen kolokalisiert. Bei der Betrachtung der ganzen Zelle in der Überlagerung der Kanäle (a) fällt auf, dass die eher waagrecht liegenden Aktinfasern im unteren Teil der Zelle keine Anlagerungen zeigen. Maßstab = 20 μm , Deformationsrichtung, senkrecht.

Bei der Analyse der α -Actinin-Lokalisation konnte nur die Kolokalisation mit VASP direkt nachgewiesen werden. Bei Kotransfektion mit GFP-Zyxin zeigte das DsRed- α -Actinin eine sehr schwache Expression und das proteintypische Signal wurde von einem starken Hintergrundsignal überlagert. Ebenso konnte keine geeignete Antikörper-Kombination für einen immunohistochemischen Nachweis gefunden werden. Über eine Kotransfektion der Endothelzellen mit GFP- α -Actinin

und mCherry-VASP konnte aber eine eindeutige Kolo­kalisierung der Proteine in durch Deformation entstehenden Anlagerungen entlang der Faserbündel festgestellt werden, wie in Abbildung 3.34 und 3.35 zu sehen ist. α -Actinin zeigte sowohl im ungedehnten als auch im gedehnten Zustand ein für diesen Aktin-Kreuzvernetzer typisches Punktemuster entlang der Stressfasern auf, das wesentlich ausgeprägter war als bei Zyxin. Durch die Dehnung der Stressfasern bildeten sich auch bei α -Actinin Brüche in dieser regelmäßigen Struktur in Form durchgehender Proteinanlagerungen entlang der Aktinfasern aus. Diese durchgehenden Bereiche des Fluoreszenzsignals sind aber im Gegensatz zum Zyxin nicht wesentlich stärker in der Intensität, als das Signal des Punktemusters entlang der Faser.

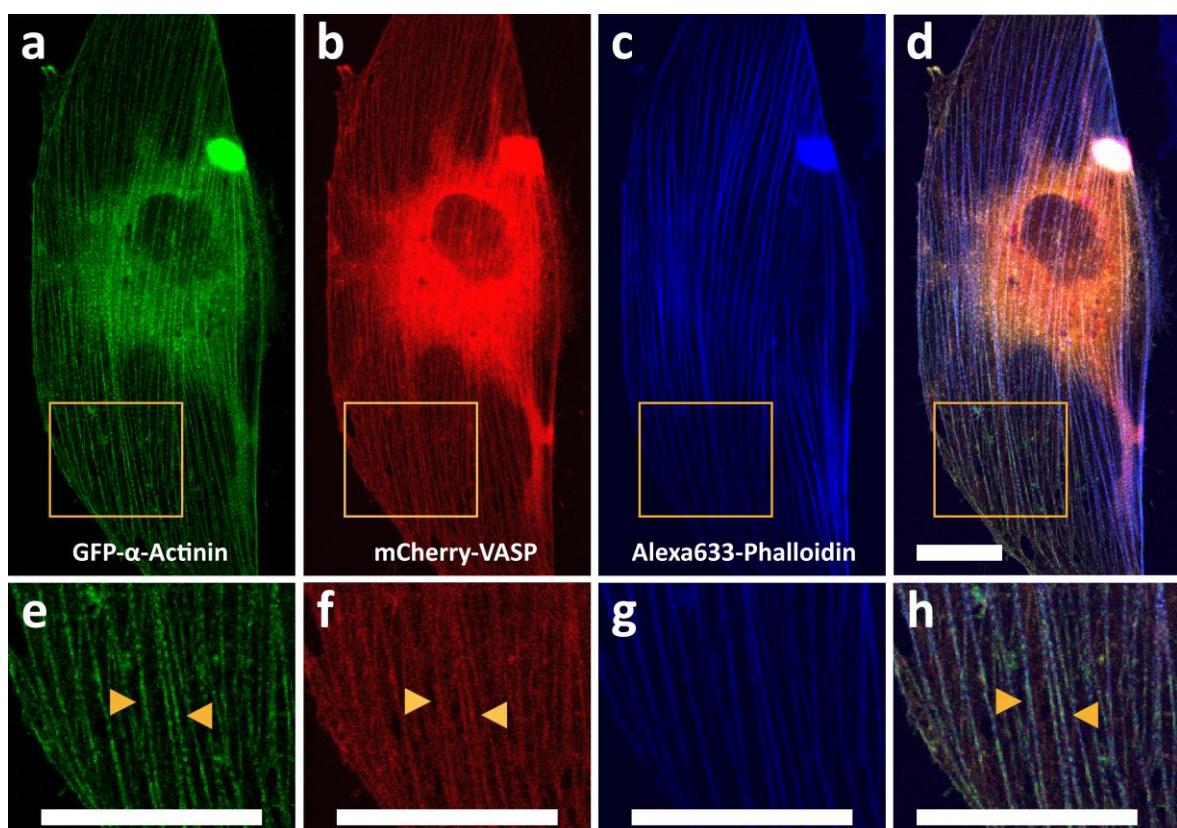


Abbildung 3.34: Lokalisation von α -Actinin nach Dehnung der Stressfasern – Wie in der hier gezeigten, mit GFP- α -Actinin (a) und mCherry-VASP (b) kotransfizierten HUV-EC-C erkennbar ist, zeigt auch das Muster des α -Actinins eine Änderung in gedehnten Stressfasern (orange Pfeilspitzen). Im Vergleich zu Zyxin zeigt sich in den Aufnahmen eine weniger verstärkte Anlagerung von α -Actinin an die Fasern, vielmehr ließen sich die entsprechenden Bereiche vor allem als Bruch in der regelmäßigen gepunkteten Strukturierung des Kreuzvernetzers entlang der Aktinfasern erkennen. Maßstab = 20 μ m, Dehnungsrichtung senkrecht.

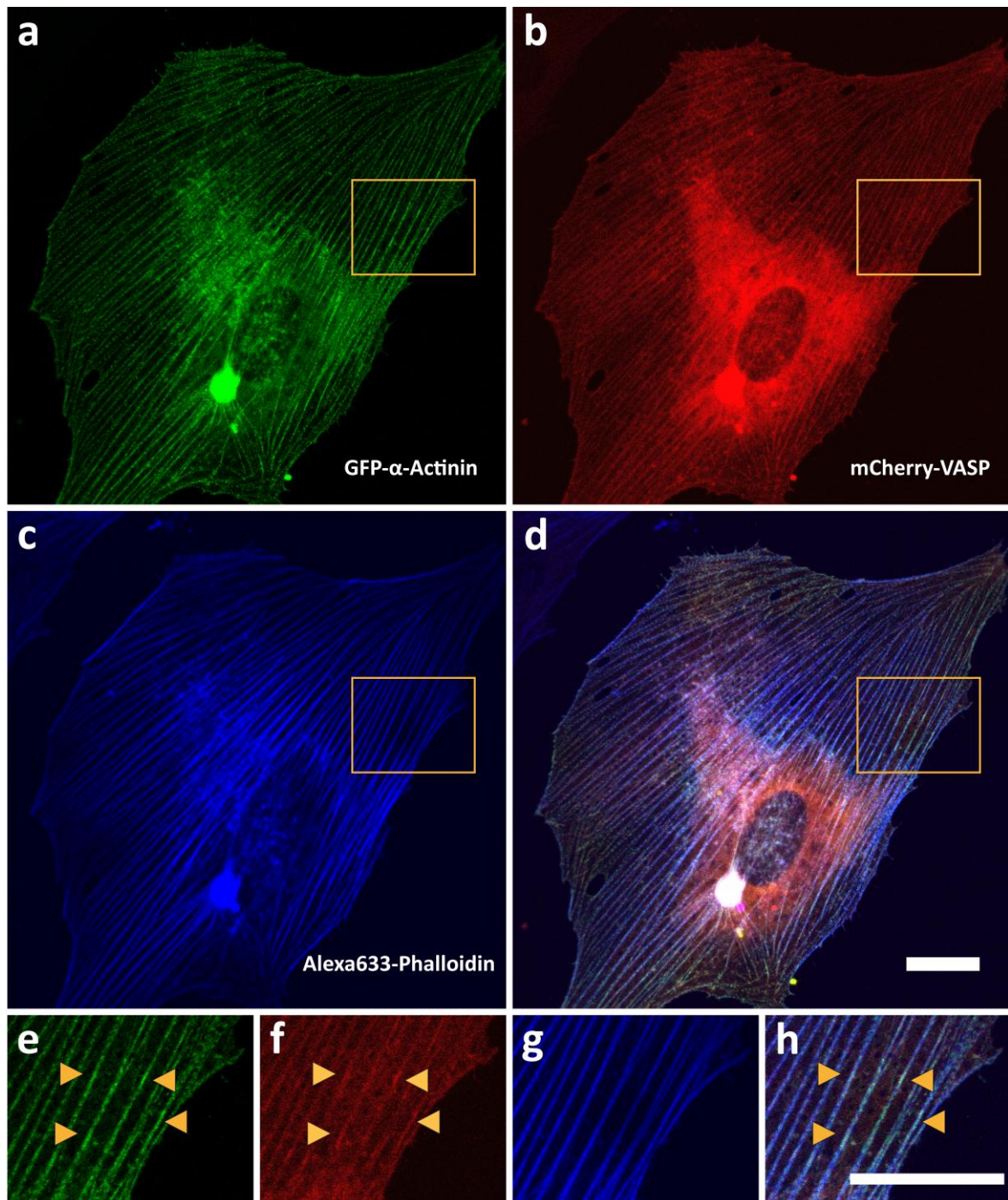


Abbildung 3.35: Lokalisation von α -Actinin nach Dehnung der Stressfasern – Analog zu Abbildung 3.34 ist hier eine weitere transfizierte und nach Dehnung fixierte HUV-EC-C gezeigt. Wie in den vergrößerten Ausschnitten (e-h) und vor allem in der Überlagerung der Kanäle (h) zu erkennen ist, sind α -Actinin und VASP in den Bereichen entlang der Stressfaser kolokalisiert (orange Pfeilspitzen), wo das regelmäßige Muster von α -Actinin von durchgängigen stärker fluoreszenten Strukturen unterbrochen ist. Maßstab = 20 μ m, Dehnungsrichtung senkrecht.

3.2.2 Bestimmung des durch die Mikroklinge erzeugten Deformationsfeldes

Für die Analysen der Protein-Dynamik innerhalb der Anlagerungen wurde mit der Mikroklinge ein neues System zur Substratdeformation etabliert. Das mit dieser Methode induzierte Deformationsfeld wurde wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben über die Verschiebung auf dem Substrat haftender, fluoreszierender Kugeln bestimmt. Das Ergebnis der Auswertung ist in Abbildung 3.36 dargestellt. Auf der analysierten Fläche von $300 \times 300 \mu\text{m}$ konnte mit der Mikroklinge ein homogenes, abfallendes Deformationsfeld erzeugt werden. Die Verschiebung betrug dabei im Auflagebereich der Klinge ca. $25\text{-}30 \mu\text{m}$ und fiel über die Fläche auf $0\text{-}5 \mu\text{m}$ ab.

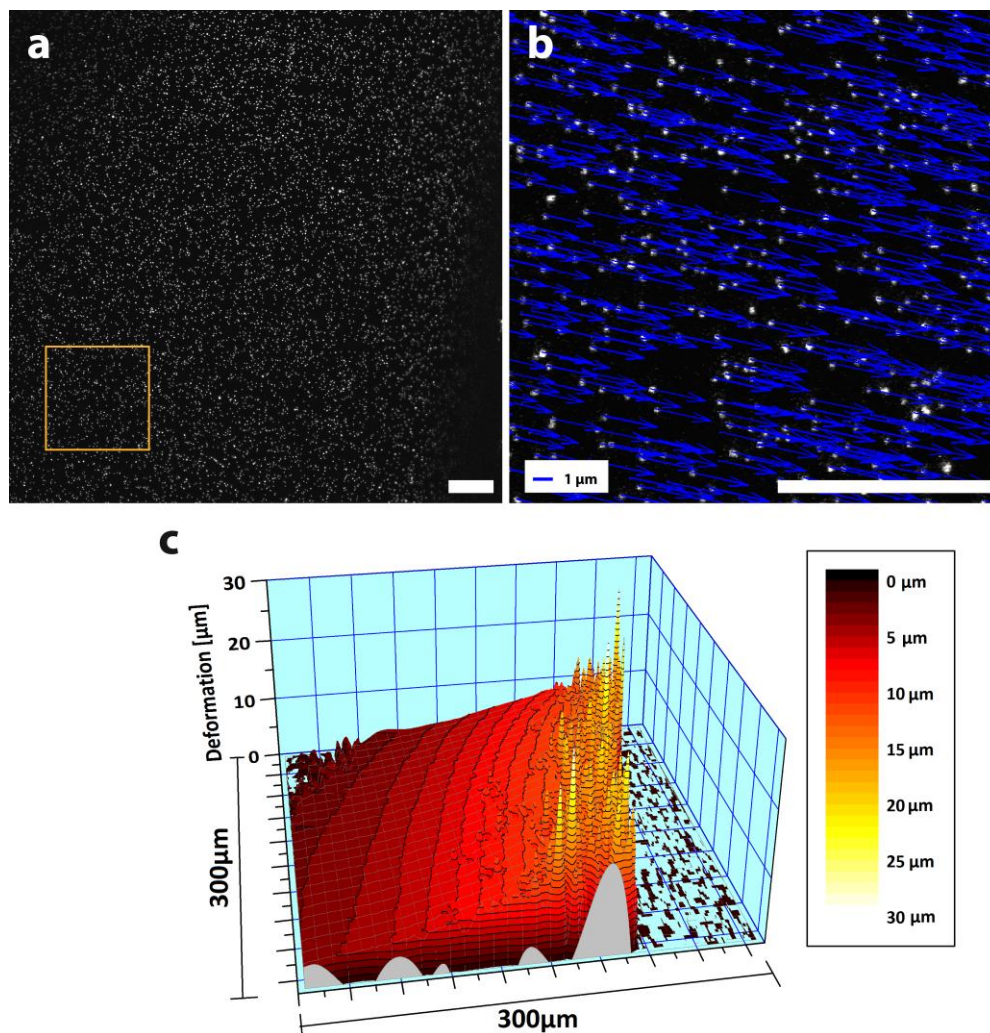


Abbildung 3.36: Deformationsfeld der Mikroklinge – Die Abbildung zeigt das Ergebnis der Deformationsfeldbestimmung. In *a* zu sehen ist die Aufnahme der fluoreszierenden Kugeln vor der Deformation, *b* zeigt einen Ausschnitt mit dem entsprechenden Verschiebungsvektorfeld, das durch Dehnung mit der Mikroklinge induziert wird. In *c* das Verschiebungsvektorfeld als 3D-Oberfläche dargestellt. Die z-Achse entspricht dabei der an der jeweiligen Position induzierten Substratverschiebung. Das Deformationsfeld ist parallel zur Kante der Klinge (Position der Klinge rechts) gleichförmig und fällt über den analysierten Bereich ab.

3.2.3 Dynamik der Protein-Anlagerungen in Lebendzellanalysen

Für diesen Teil der Dissertation wurde die Lebensdauer der Stressfaser-Anlagerungen von GFP-Zyxin und mCherry-VASP nach Deformation mit der Mikroklinge untersucht (s. Abschnitt 2.4.2). Dieselben Experimente wurden auch mit GFP- α -Actinin durchgeführt, jedoch gelang es dabei kaum, die in fixierten Zellen zu erkennenden Brüche in der regelmäßigen Struktur des Kreuzvernetzers zu sehen, obwohl die Experimente unter gleichen Bedingungen wie die Zyxin-analysen durchgeführt wurden. Ob die Deformation in den meisten Fällen trotz dessen nicht ausreichend war oder das Signal im vom intrazellulären Hintergrund überdeckt wurde, konnte nicht geklärt werden.

Der einzige Versuch, in dem ein erkennbarer Effekt der Dehnung auf die Proteinlokalisierung zu beobachten war, ist in Abbildung 3.37 gezeigt. In der dort gezeigten Zelle war nach einer Dehnung um ca. 13% eine Verlängerung des α -Actinin-Signals in den Adhäsionsbereichen um etwa das Dreifache der Ausgangsgröße zu sehen. Die Elongation scheint dabei entlang der Stressfasern zu verlaufen und betrifft nur die Adhäsionen, die in Richtung der Deformation liegen.

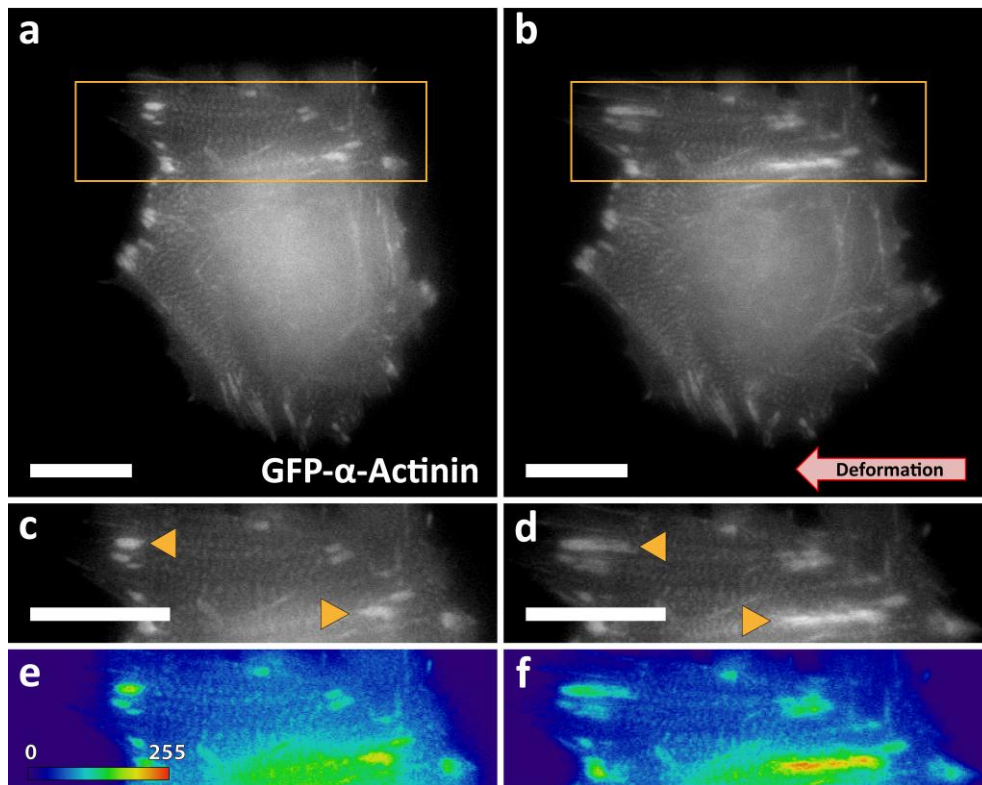


Abbildung 3.37: Elongation der fokalen α -Actinin-Signale durch Deformation – Die hier gezeigte mit GFP- α -Actinin transfizierte HUVE-C zeigte nach Deformation des Substrates (b) eine Verlängerung der fokalen Bereiche (d, f). Besonders die im Bildausschnitt unten rechts liegende Adhäsion zeigte eine starke Elongation des Signals entlang der Stressfaser auf. Maßstab = 20 μ m.

Für die Analyse der Verweildauer der Proteine in den Komplexen wurden im Weiteren nur Zyxin und VASP berücksichtigt. Der genaue Ablauf der Experimente ist in Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Abbildung 3.38 zeigt exemplarisch den zeitlichen Intensitätsverlauf der Fluoreszenzsignale einer Anlagerung. Beginn der Zeitreihe ist das erste Bild der deformierten Zelle. Die mittleren Grauwerte der Strukturen im Zeitverlauf sind in Abbildung 3.38 gezeigt. In den Aufnahmen des GFP-Zyxins und dem zugehörigen Graph der gemessenen Intensitäten ist deutlich zu erkennen, wie das Signal über die Zeit abfällt und nach ca. 12 min eine Basislinie erreicht.

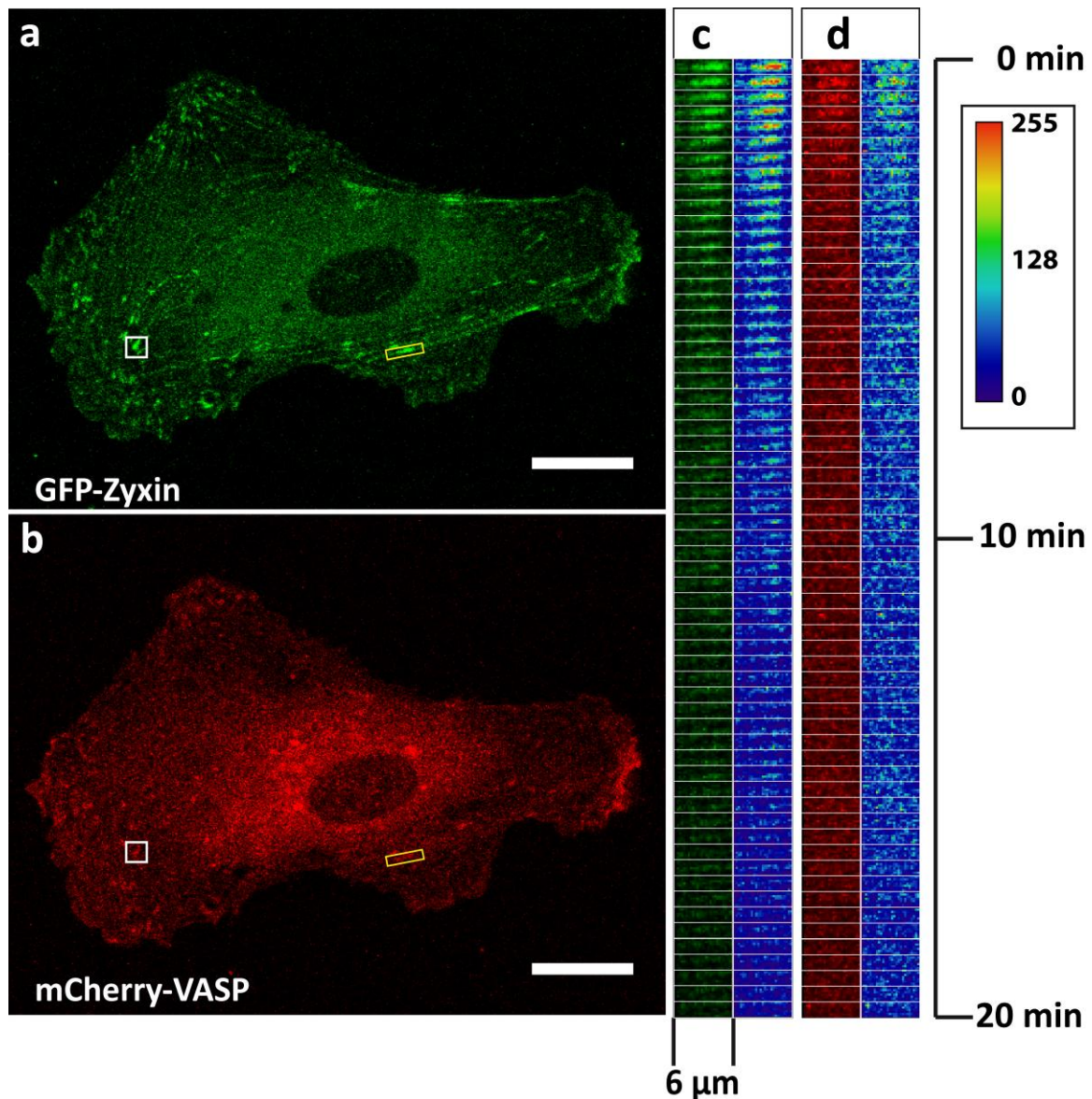


Abbildung 3.38: Fluoreszenzintensität einer Faser-Anlagerung im zeitlichen Verlauf – Gezeigt ist eine primäre HUVEC, transfiziert mit GFP-Zyxin (a) und mCherry-VASP (b), unmittelbar nach Induzieren des Deformationsfelds. Die Zelle wurde durch Substratdeformation mit der Mikroklinge um etwa 6% in horizontaler Richtung gedehnt. In c und d ist eine einzelne Anlagerungsstruktur (gelber Kasten in a/b) von Zyxin und VASP über eine Dauer von 20 min gezeigt. Mit dem weißen Kasten markiert ist eine stabile Fokaladhäsion, die in der Auswertung als Vergleich diente (s. Abb. 3.39 b).

Der Abfall der mittleren Intensität von Intervall zu Intervall ist dabei zu Beginn viel größer und nimmt im Verlauf stetig ab. Das Signal von mCherry-VASP war in allen Experimenten viel schwächer in der Intensität und hatte stets einen hohen intrazellulären Hintergrund. Trotzdem ließ sich auch hier ein zum Zyxin analoger Verlauf feststellen, auch wenn die Gesamtdifferenz von Ausgangs- und Endwert der mittleren Grauwerte niedriger war.

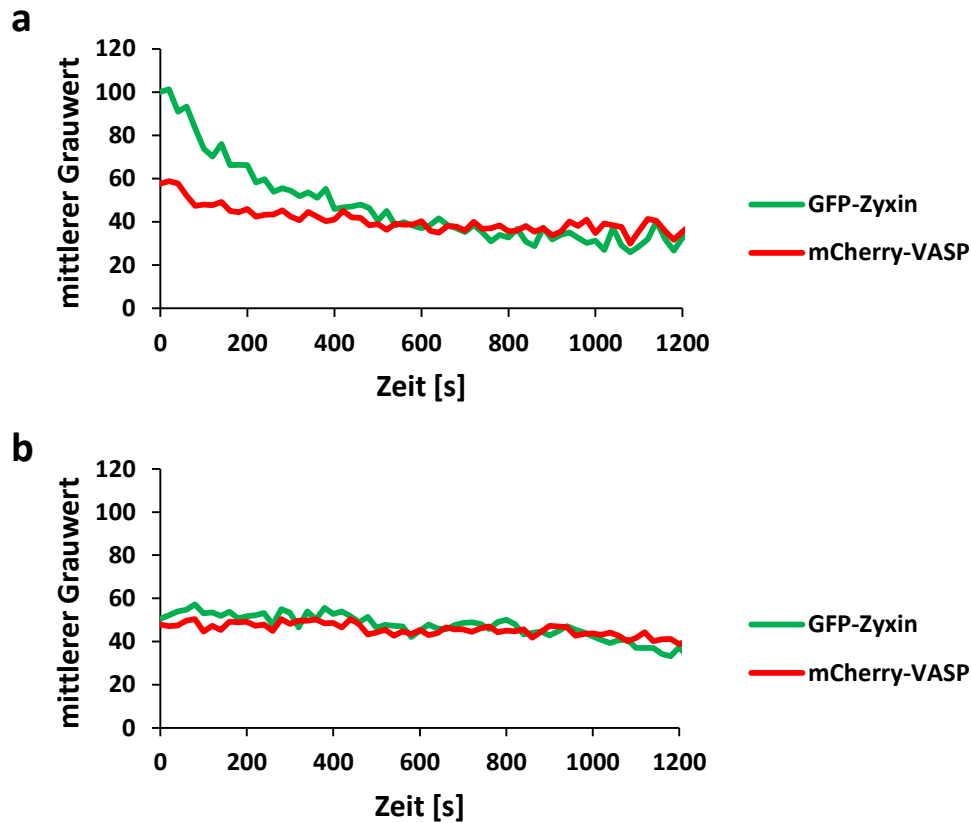


Abbildung 3.39: Diagramm der Fluoreszenzintensität im zeitlichen Verlauf – Der Graph zeigt Intensitätsänderung im Fluoreszenzsignal der Protein-Anlagerungen (a) aus Abbildung 3.37 anhand der mittleren Grauwerte der markierten Bereiche (Abb. 3.37 gelbe Kästen). Beide Signale fallen zunächst ab und erreichen nach über 10 min eine Basislinie. Im Vergleich dazu zeigt das Signal an einer Fokaladhäsion (s. a. Abb. 3.38) über die Dauer nur ein geringes Abfallen in der Intensität auf.

Zwei generelle Probleme bei den Analysen waren eine systembedingte Schiefelage und Drift der Fokusebene. Bei der Deformation des Substrates mit der Mikroklinge konnte es vorkommen, dass nicht mehr die ganze Zelle in der Fokusebene lag bzw. sich durch eine Substratbewegung während der Aufnahme die beobachteten Bereiche aus dem Fokus bewegten. Für die statistische Analyse wurden im Folgenden deshalb nur Anlagerungen berücksichtigt, die während der gesamten Aufnahmedauer in Bereich der Fokusebene lagen.

Für einen genauen Vergleich der Verweildauer von Zyxin und VASP in den Anlagerungen mit der Dynamik der Proteine in Adhäsionen wurde, wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben, die Intensität des jeweiligen Proteins als Verhältnis von Mittelwert der Intensität in der Anlagerung bzw. FA zur Intensität in den Stressfasern berechnet. Die Resultate der Berechnung sind in Abbildung 3.40 als Mittelwerte aller Zellen (n=33 für Zyxin, n=29 für VASP) zusammengefasst.

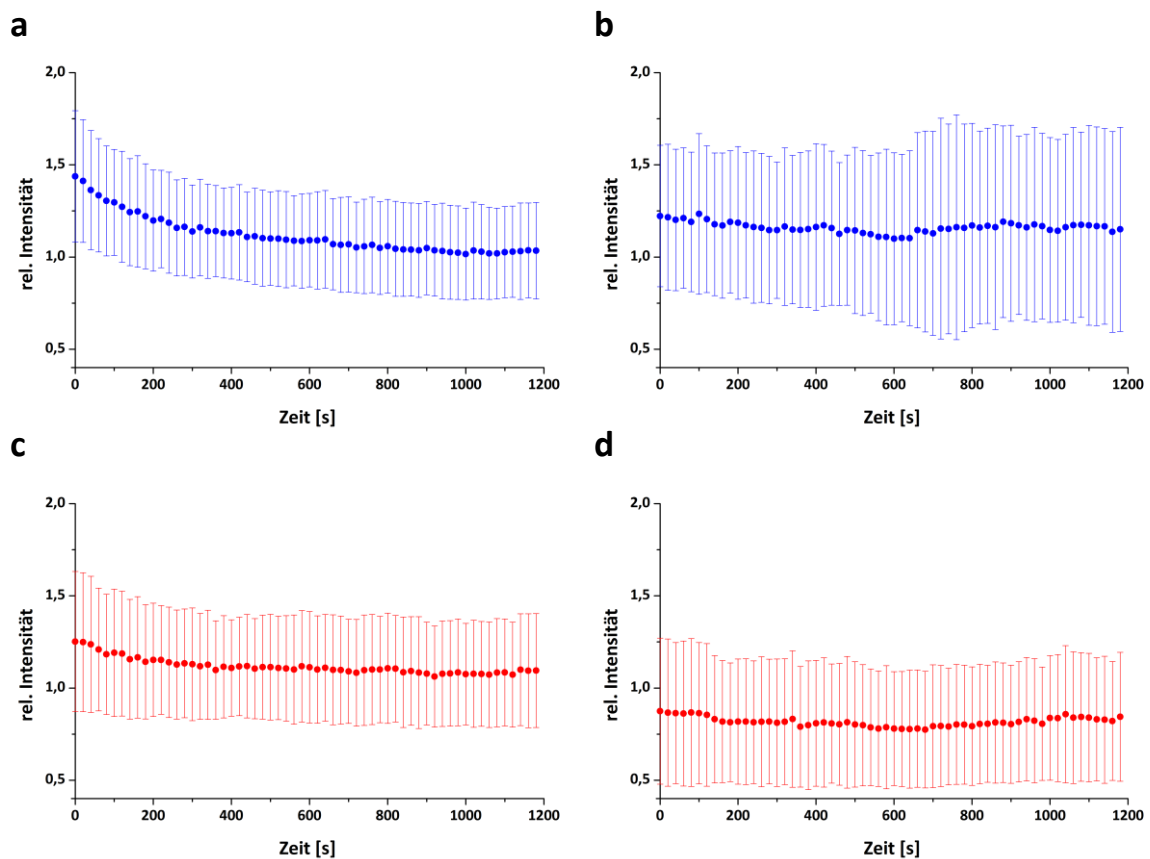


Abbildung 3.40: Intensität von Zyxin und VASP im Zeitverlauf – Die Abbildung zeigt die Graphen der Mittelwerte (Punkte) und Standardabweichungen (Balken) von Zyxin- (a, b) und VASP-Signalen (c, d) aus insgesamt 33 Zellen für Zyxin und 29 für VASP. Auf der linken Seite sind dabei die Verläufe in den Anlagerungen zu sehen, rechts die der Signale in den Fokaladhäsionen. Zu erkennen ist, dass die Intensität in den Anlagerungen zunächst größer ist als das Hintergrundsignal der Stressfasern (=1) und vor allem in den ersten Minuten stark abfällt. Währenddessen ist das Signal in den Fokaladhäsionen über die Versuchsdauer konstant.

Bei der Betrachtung des Zyxin-Signals in den Anlagerungen und in den Fokaladhäsionen lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen beiden erkennen. Während die Intensität der Fluoreszenz im Adhäsionsbereich über die ganze Zeit relativ konstant bleibt, kann bei der Intensität der Anlagerungen besonders in den

ersten 10 min nach Deformation der Zelle ein starker Abfall des Signals verzeichnet werden. Im weiteren Verlauf nähert sich der Mittelwert immer mehr einem Wert von 1 an, die Intensität von Anlagerung und Hintergrundsignal an der Stressfaser unterscheiden sich also kaum mehr. Bei VASP kann zwar auch ein klarer Abfall in der Intensität an der Stressfaser erkannt werden und die Intensität ist ebenfalls höher als der Hintergrund der Stressfaser, jedoch ist der Unterschied des Kurvenverlaufs zur Fokaladhäsion weniger ausgeprägt. Dies wird besonders deutlich, wenn man die Intensitäts-Verläufe auf ihr jeweiliges Minimum normiert aufträgt (s. Abb. 3.41). Während sich das Signal von Zyxin an den Stressfasern in seinem Verlauf von den Signalen an den Adhäsionen abhebt, unterscheidet sich das entsprechende VASP-Signal in der ersten Hälfte kaum von den Schwankungen in den FAs. Das Ansteigen des FA-Signals gegen Ende ist wahrscheinlich durch eine allgemeine Fokusdrift im Zuge einer Relaxation des Substrats bedingt.

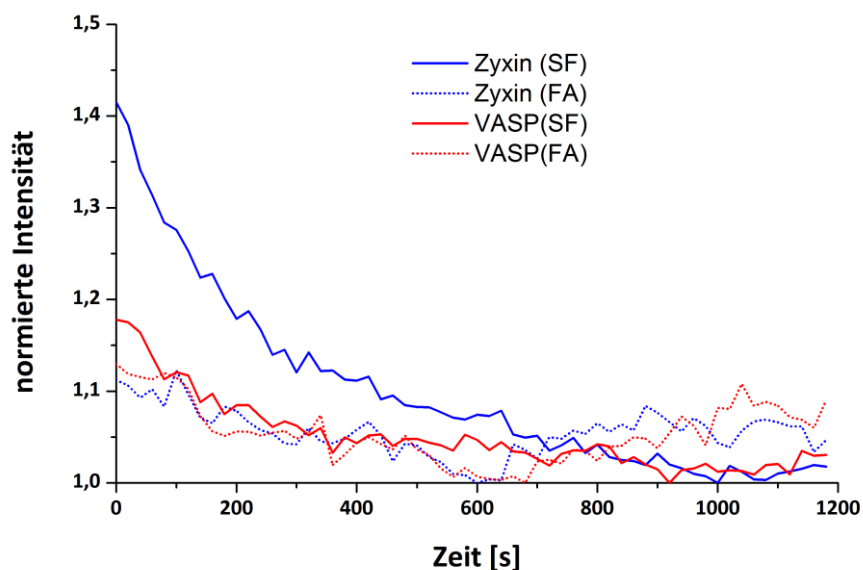


Abbildung 3.41: Graph der normierten Intensitäten – In dieser Darstellung sind die entsprechenden mittleren Intensitäten auf das jeweilige Minimum des zeitlichen Verlaufs normiert. Deutlich erkennbar ist der Verlaufsunterschied für Zyxin in Stressfaser-Anlagerungen im Vergleich zu den Signalen im Bereich der FAs. Für VASP ist der Unterschied in der ersten Hälfte der Versuchszeit nicht klar von den Schwankungen in den Adhäsionen zu trennen, das Signal zeigt aber insgesamt einen klaren Abfall der Intensität, während es in der FA zu Ende hin wieder zunimmt.

In weiteren Experimenten wurden primäre HUVECs (n=17) wie zuvor mit der Mikroklinge gedehnt, die Deformation des Substrates aber unmittelbar nach Erreichen der Maximalamplitude zurückgenommen und nach Refokussieren sofort die Aufnahme gestartet. Da in dieser Versuchsreihe das kotransfizierte mCherry-VASP nicht stark genug exprimiert wurde, musste auf dessen Analyse verzichtet werden. Im Folgenden sind also nur die Ergebnisse der ermittelten GFP-Zyxin-Intensität analog zu den vorhergehenden Versuchen gezeigt. Wie im Graph der mittleren Intensitäten (s. Abb. 3.42) erkennbar ist, zeigte sich das Zyxin-Signal in den Anlagerungen auch hier zunächst stärker als im Hintergrund der Stressfasern, näherte sich diesem aber im zeitlichen Verlauf mehr und mehr an. Das Signal im Bereich der Fokaladhäsion blieb im Vergleich dazu eher konstant. Betrachtet man nun wieder die auf das Minimum normierten Kurven im Vergleich (s. Abb. 3.43), lässt sich erkennen, dass der Verlauf im wesentlichen identisch ist, die Ausgangsintensität unter gehaltener Dehnung aber größer ist. Ebenso fällt die Intensität unter konstanter Deformation etwas schneller ab.

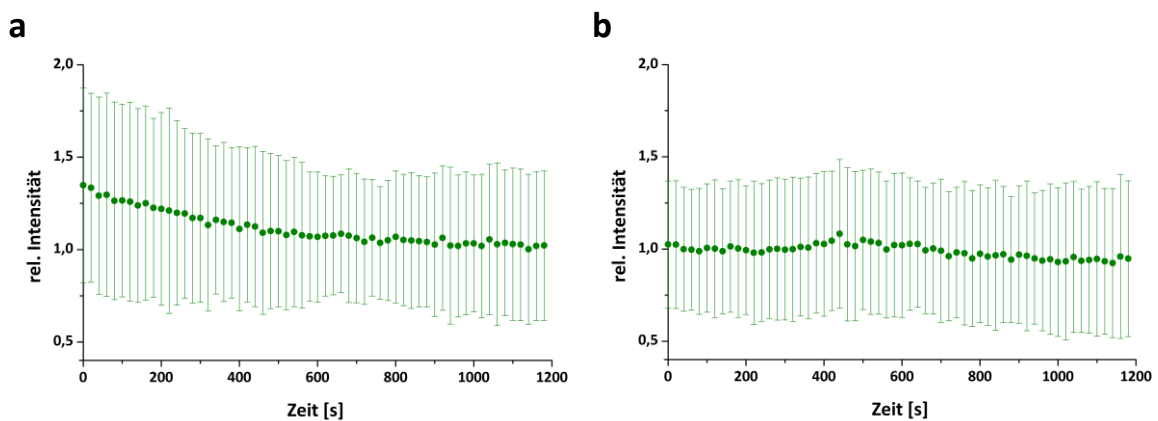


Abbildung 3.42: Intensitätsverlauf nach kurzfristiger Dehnung – In den hier aufgetragenen mittleren Intensitäten und der Standardabweichung des Zyxin-Signals (aus 17 Zellen) nach kurzzeitig angelegter Deformation zeigt sich ein grundsätzlich ähnlicher Verlauf wie bei gehaltener Dehnung. Der Abfall in der Intensität der Anlagerungen (a) verläuft aber insgesamt langsamer. Allerdings ist hier auch in den ersten 10 min die Standardabweichung größer. Das Signal an den FAs bleibt bis auf leichte Schwankungen konstant (b).

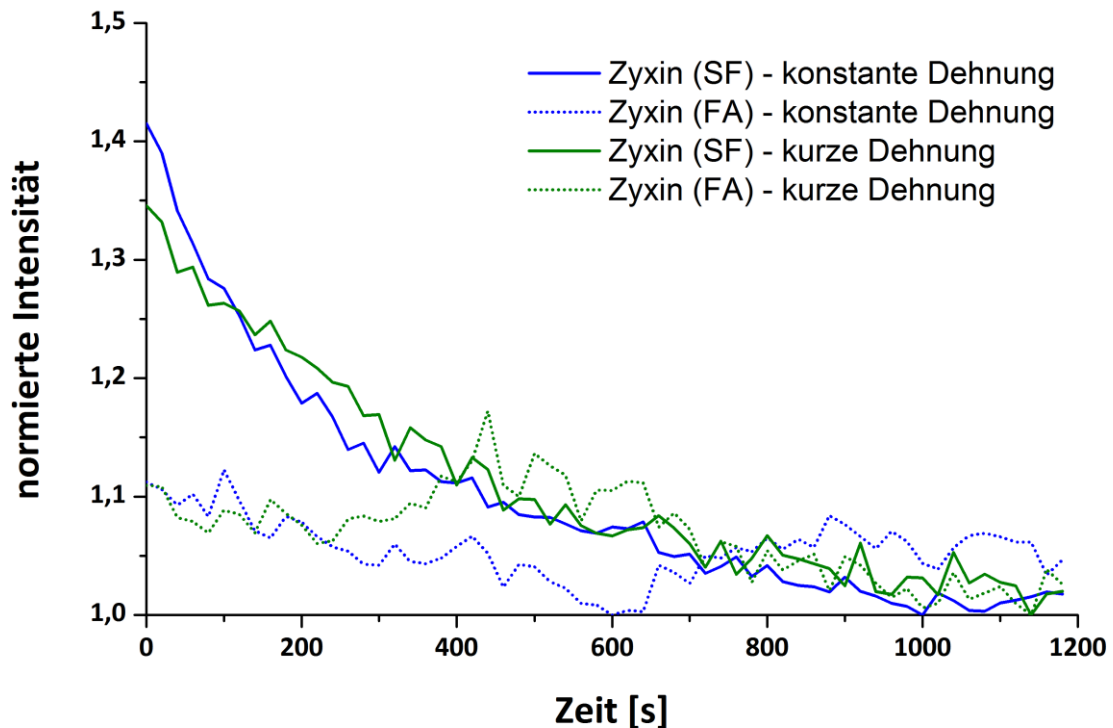


Abbildung 3.43: Vergleich der Zyxin-Intensitäten nach kurzzeitiger und andauernder Zell-Dehnung – Im Vergleich der auf das Minimum normierten mittleren Intensitäten ist noch einmal zu erkennen, dass der Abfall des Zyxin-Signals in den Anlagerung bei konstanter Dehnung (blau) besonders zu Beginn stärker ist als der entsprechende Abfall nach kurzer Dehnung (grün), gleichzeitig aber auch die Ausgangsintensität für die konstante Dehnung höher liegt. Das Signal an den FAs (gestrichelte Linien) zeigt im Verlauf in beiden Fällen nur unregelmäßige Schwankungen auf.

Bei genauer Betrachtung lassen die Kurven der Intensitäten von Zyxin und VASP in den Anlagerungen annähernd den Verlauf einer Exponentialfunktion erkennen. Um eine genauere Aussage über die Unterschiede der Dynamik treffen zu können, wurden die Verläufe der mittleren Intensitäten auf einen Bereich von 0-1 normiert und diese mittels OriginPro (*OriginLab*) mit einer exponentielle Zerfallsfunktion erster Ordnung angenähert. Die Funktion wurde dabei beschrieben durch:

$$I(t) = y_0 + I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Dabei ist $I(t)$ die Intensität zum Zeitpunkt t mit I_0 als Ausgangsintensität und einem Versatz y_0 . Die Lebensdauer τ entspricht dabei dem Zeitraum, bis zum Abfall auf $1/e$

des Ausgangswertes, also annähernd 36,8%. Die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der Zerfallsfunktion ergibt sich aus:

$$I_0 e^{-\frac{t_{1/2}}{\tau}} = \frac{1}{2} * I_0 \quad \Rightarrow \quad t_{1/2} = \tau * \ln 2$$

Die angenäherten Zerfallsfunktionen sind in Abbildung 3.44 gezeigt. Im Vergleich der Funktionen zeigt VASP mit einer Lebensdauer von etwa 220 s die schnellste Zerfallsrate. Der Zerfall von Zyxin unter gehaltener Deformation ist mit einer Zeitkonstante τ von 285 s insgesamt etwas langsamer, die Halbwertszeiten liegen aber mit 152 s (VASP) und 197 s (Zyxin) eng beieinander. Die Lebensdauer von Zyxin nach einer kurzen Dehnung der Stressfasern ist mit 405 s deutlich länger, die Halbwertszeit beträgt hier 280 s.

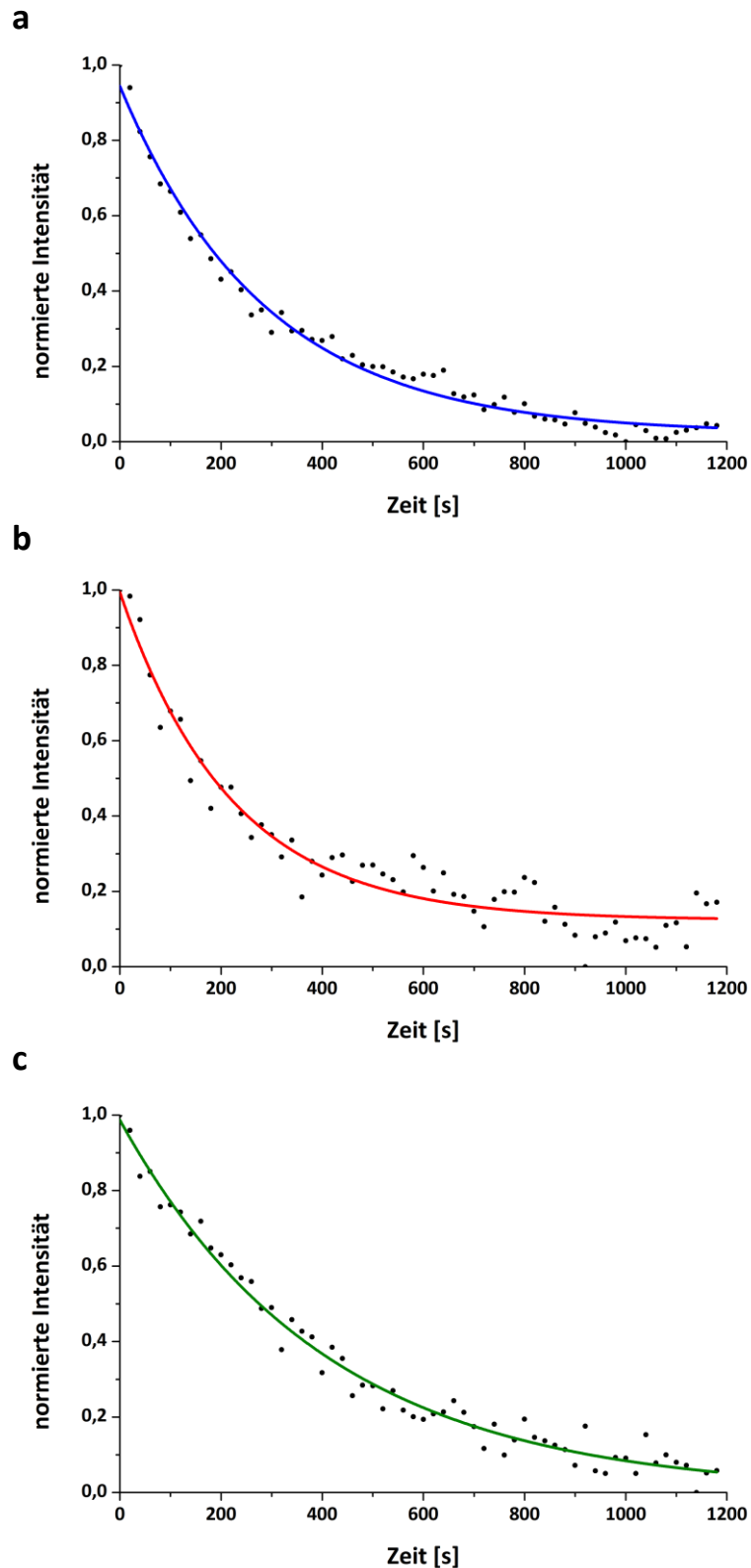


Abbildung 3.44: Approximation der Intensitätsverläufe mit exponentiellen Zerfallskurven – Die Ergebnisse der mittleren Intensitäten des Signals in den Anlagerungen von Zyxin (a) und VASP (b) unter konstanter Dehnung sowie Zyxin nach kurzzeitiger Dehnung (c) wurden jeweils auf einen Bereich von 0-1 normiert (schwarze Punkte). Die an die Daten angenäherten Zerfallskurven (blau, rot und grüne Linie) zeigen für Zyxin ($\tau=285$ s) und VASP ($\tau=220$ s) unter konstanter Dehnung eine ähnliche Lebensdauer (rot-gestrichelte Linie), der Zerfall für Zyxin nach kurzzeitiger Dehnung ist langsamer ($\tau=405$ s).

3.2.4 Bestimmung der Anlagerungsorientierung als Maß der minimal benötigten Dehnung

Im letzten Teil der Dissertation sollte der Schwellenwert der minimal benötigten Stressfaserdehnung bestimmt werden, die zu einer Anlagerung von Zyxin führt. Dafür wurden, wie im Abschnitt 2.4.2 beschrieben, primäre HUVECs nach Dehnung in einer Silikonkautschuk-Kammer fixiert und immunocytochemisch angefärbt. Die Bestimmung der Zyxin-Anlagerungen erfolgte mittels des in Abschnitt 2.5.2 dargestellten Ausschlussprinzips von Adhäsionsbereichen, die Orientierungsanalyse über lokale Grauwertgradienten.

Abbildung 3.45 zeigt exemplarisch die Resultate einer Orientierungsbestimmung für Zyxin-Anlagerungen und Aktinfasern. Wie im Histogramm der gemessenen lokalen Orientierungen erkennbar wird, zeigen die Zyxin-Anlagerungen eine Vorzugsrichtung zwischen 0° und 30° , also in Richtung der Dehnung. Die Aktinfasern sind im Vergleich wesentlich breiter in der Orientierungsverteilung, haben aber im Endeffekt die gleiche Vorzugsrichtung.

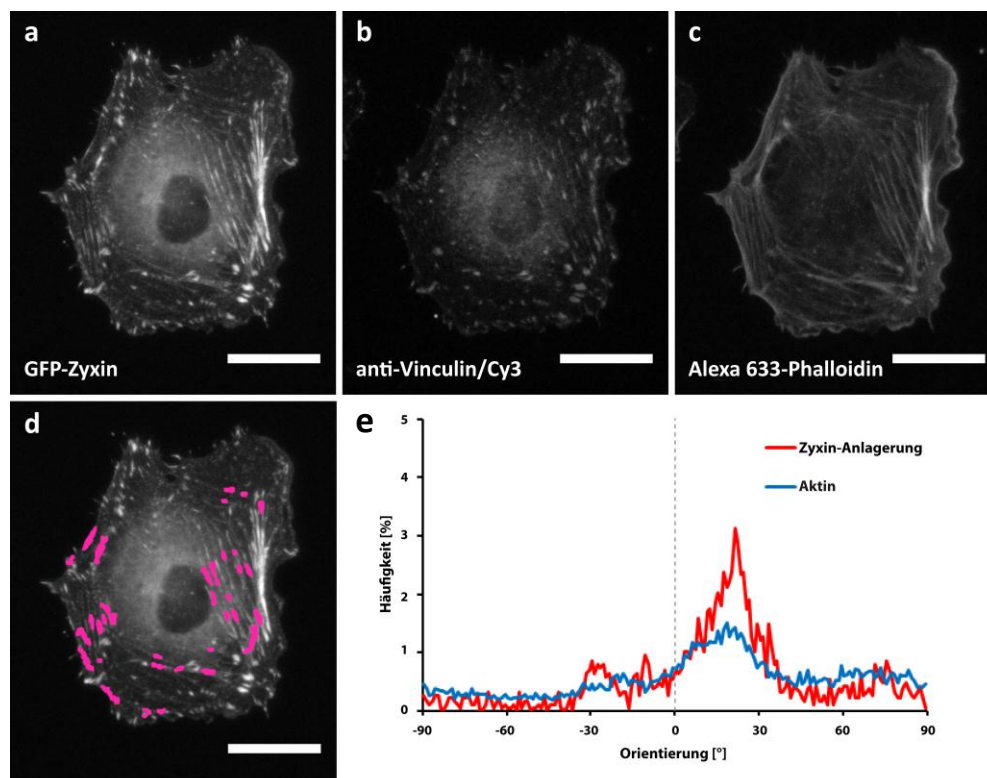


Abbildung 3.45: Vergleich von Anlagerungs- und Aktinfaser-Orientierung – Hier gezeigt ist eine primäre HUVEC und das zugehörige Histogramm der gemessenen Orientierungen (1° -Klassen) von Zyxin-Anlagerung und Aktinfasern (d). Bei Zyxin zeigt sich eine Vorzugsrichtung zwischen 0° und 30° , aber auch die Aktinfasern sind leicht in diese Richtung verschoben. Maßstab = 20 μm , Dehnungsrichtung senkrecht, Amplitude 35%.

Das Bild, das sich hier zunächst nur auf Einzelzell-Ebene zeigt, galt letzten Endes aber auch für die gesamten, analysierten Zellen. In der Zusammenfassung aller gemessenen Orientierungen aus insgesamt 693 Zellen aus 6 verschiedenen Proben (s. Abb. 3.47) zeigte sich ebenfalls eine bevorzugte Orientierung des Aktins in Richtung der Dehnung.

Diese Ausrichtung in der Aktinfaser-Orientierung lässt sich jedoch dadurch erklären, dass durch die Dehnung die ursprüngliche Winkelverteilung in Richtung der Deformation verschoben wird, wie im Folgenden näher gezeigt wird. Die Herleitung der Berechnung erfolgte durch Prof. Dr. Rudolf Merkel.

Eine Stressfaser der Länge a und einem Winkel θ zur Deformationsrichtung erfährt durch die Dehnung eine Verlängerung in parallel zum Zug und abhängig von der Querkontraktion des Substrats eine Stauchung in senkrechter Richtung zur Deformation (s. Abb. 3.46). Dies führt weiterhin zu einer Änderung des Winkels. Die x- und y-Komponente der gedehnten Stressfaser (a'_x und a'_y) in einem Koordinatensystem mit Dehnungsrichtung parallel zur x-Achse ergeben sich durch:

$$a'_x = (1 + \varepsilon) * a_x \quad \text{u.} \quad a'_y = (1 - \kappa\varepsilon) * a_y$$

Dabei ist ε die Dehnung des Substrats und κ die spezifische Querkontraktionszahl die sich aus dem negativen Verhältnis von Längen- zu Breitenänderung der verwendeten Kammern ergibt.

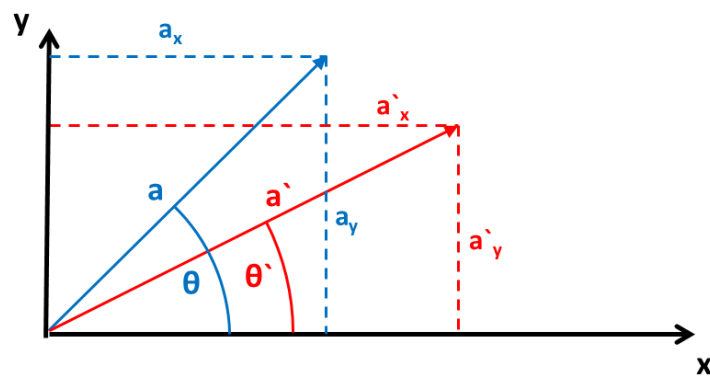


Abbildung 3.46: Winkeländerung durch Dehnung – Die Abbildung zeigt schematisch, wie sich durch Dehnung einer Faser der Länge a deren Winkel θ zur Dehnungsrichtung ändert.

Der Winkel der gedehnten Stressfaser ergibt sich aus:

$$\tan\theta' = \frac{a'_x}{a'_y} = \frac{1-\kappa\varepsilon}{1+\varepsilon} \quad \text{und somit} \quad \theta' = \arctan\left[\left(\frac{1-\kappa\varepsilon}{1+\varepsilon}\right) * \tan\theta\right]$$

Eine ursprüngliche Gleichverteilung $\frac{dN}{d\theta} = \frac{1}{\pi}$ wird durch die Dehnung zu:

$$\frac{dN}{d\theta'} = \frac{1}{\pi} * \frac{\frac{1-\kappa\varepsilon}{1+\varepsilon}}{1 - \cos^2\theta' + \left(\frac{1-\kappa\varepsilon}{1+\varepsilon}\right)^2 * \cos^2\theta'}$$

Eine entsprechend der Dehnungsparameter transformierte Gleichverteilung ist in Abbildung 3.47 gezeigt. Wie sich erkennen lässt, unterscheidet sich die Verteilung der Aktinfaser-Orientierungen kaum von dieser. Dies spricht dafür, dass die Verschiebung der Verteilung der Aktinfasern vollständig auf die dehnungsbedingte Winkeländerung zurückzuführen ist.

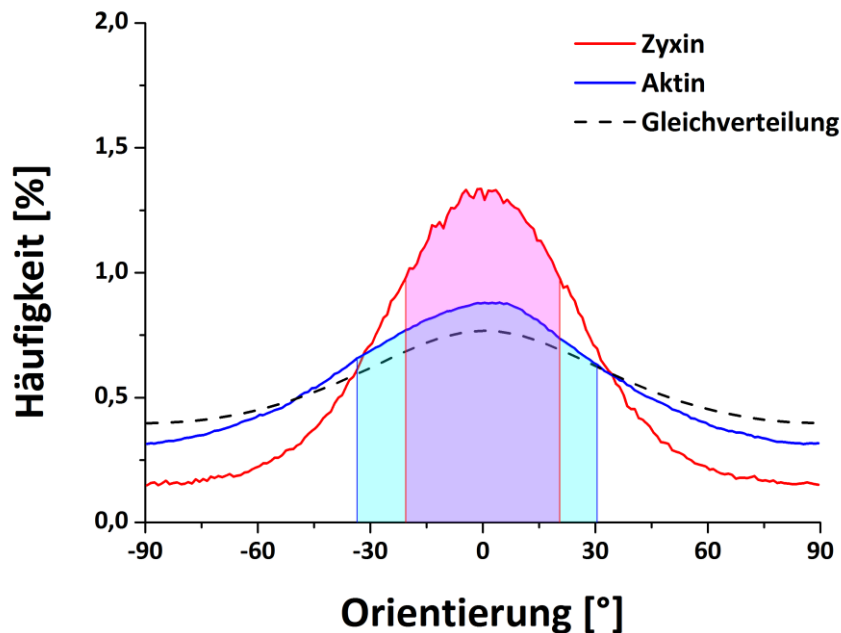


Abbildung 3.47 Zusammenfassung aller gemessener Orientierungen – Gezeigt sind die Histogramme aller gemessener Orientierungen der Zyxin-Anlagerungen (rot) und der Aktinfasern (blau) mit $n = 693$ Zellen. Die markierten Flächen zeigen den Bereich zwischen unterem und oberem Quartil an. Sowohl bei Zyxin als auch bei Aktin sind die Verteilungen zur Deformationsrichtung (0°) hin verschoben. Die entsprechend der Dehnungsparameter transformierte Gleichverteilung (schwarz) zeigt, dass die Verschiebung der Aktinfaser-Orientierungen auf die dehnungsbedingte Winkeländerung zurückzuführen ist. Die Verteilungsbreite der Zyxin-Anlagerungen ist hingegen wesentlich schmaler.

Die Verteilung der gemessenen Orientierungen für die Zyxin-Anlagerungen ist hingegen deutlich schmäler. So liegt, wie in Abbildung 3.47 zu sehen, die Hälfte aller Messwerte im Bereich zwischen -20° und 20° . Für Aktin liegen diese Quartile mit -33° und 30° deutlich weiter auseinander. Es kann also ein klarer Orientierungsbereich abgegrenzt werden, innerhalb dessen die Zyxin-Anlagerungen auftraten.

Schaut man auf die Verteilung aller gemessenen Orientierungen der Einlagerungen, so lagen 90% der Daten innerhalb der Grenzen von -60° und 60° zur Dehnungsrichtung. Nimmt man diesen Winkel als Maximalwinkel einer Stressfaser an, bei dem noch eine Zyxin-anlagerung induziert werden kann, lässt sich daraus ein Schwellenwert für die benötigte relative Dehnung errechnen.

Die Rückrechnung der ursprünglichen Orientierung der Faserbündel vor der Dehnung erfolgt mit:

$$\theta = \arctan \frac{\tan \theta'}{\frac{1 - \kappa \varepsilon}{1 + \varepsilon}}$$

Bei einer Dehnung ε von 35% und einer Querkontraktionszahl $\kappa = 0,1$ ergibt sich für die gemessenen 60° -Winkel der Anlagerungen eine ursprüngliche Orientierung von etwa 68° , d.h. an Aktinfaserbündeln mit einer Orientierung von 68° oder weniger zur Dehnungsrichtung, werden durch die Deformation der Kammer um 35% soweit gedehnt, dass eine Anlagerung von Zyxin erfolgt.

Das Verhältnis der gedehnten Länge a' zur Ursprungslänge a der Fasern mit einer Orientierung von 68° ergibt sich aus:

$$\frac{a'}{a} = \sqrt{(1 + \varepsilon)^2 * \cos^2 \theta + (1 - \kappa \varepsilon)^2 * \sin^2 \theta}$$

Durch Einsetzen der entsprechenden Parameter erhält man ein Verhältnis von 1,03. Dies bedeutet, dass bereits eine Faserdehnung um 3% ausreicht, um eine Anlagerung von Zyxin hervorzurufen.

4 *Diskussion*

Für Zellen in stark mechanisch beanspruchten Geweben, wie z.B. in vaskulären Endothelien, ist eine Anpassungsfähigkeit an die jeweiligen Bedingungen essentiell. Um die Integrität des Zellverbands zu gewährleisten, muss eine Adaptation bereits auf Einzelzellebene erfolgen. Eine dieser Anpassungen liegt in der Ausrichtung der Zelle und der cytoskelettalen Strukturen, um die mechanische Belastung über die Zeit zu minimieren. Die Reorientierung von Aktinfasern als Zellantwort auf zyklische Dehnung konnte bereits in verschiedenen Zelltypen als gemeinsames Verhalten gezeigt werden [24, 116]. Der genaue Ablauf der Umstrukturierung ist aber zu großen Teilen noch unbekannt. Auch die Rolle der verschiedenen cytoskelettalen Elemente während dieser Zellantwort ist noch nicht vollständig geklärt. Um die zeitliche Abfolge in der Reorientierung humaner Endothelzellen genauer zu analysieren, wurden in dieser Dissertation Lebendzell-Analysen und immunocytochemische Untersuchungen miteinander verknüpft. Dadurch konnten zum einen das Verhalten der Zellen in höherer zeitlicher Auflösung, zum anderen aber auch das Zusammenspiel zweier Cytoskelett-Typen mit hoher statistischer Signifikanz betrachtet werden.

Neben einer allgemeinen strukturellen Anpassung über längere Zeit müssen Zellen auch in der Lage sein, direkt auf mechanische Reize zu reagieren. In diesem Rahmen wurden als Teil der Dissertation Protein-Anlagerungen an Aktin-Stressfasern untersucht, die als Bestandteil eines Komplexes zur Rekonstitution gedehnter Stressfasern angesehen werden. Auch für diese Untersuchung wurden Lebendzell- mit Immunohistochemie-Experimenten kombiniert. Im Fokus dieser Untersuchungen standen dabei insbesondere die Dynamik im Abbau der Komplexe und die Abschätzung einer benötigten Mindestdehnung, um dieses Zellverhalten hervorzurufen.

Die Ergebnisse dieser Experimente wurden in Kapitel 3 dargelegt und sollen nun im Folgenden genauer diskutiert werden.

4.1 Reorientierung der humanen Endothelzellen

Die Anpassung von Zellform und Cytoskelett der untersuchten humanen Endothelzellen an eine uniaxiale zyklische Deformation beruhen auf dem Bestreben der Zelle die Änderungen in der intrazellulären mechanischen Beanspruchung zu minimieren und einen Zustand der mechanischen Homöostase aufrechtzuerhalten [44]. Die durchgeführten Experimente zeigen, dass die Reorientierung der HUVECs als Zellantwort auf die Deformation sehr schnell erfolgt und schon nach 30 min eine deutliche Ausrichtungsänderung der cytoskelettalen Strukturen erfolgt. In vergleichbaren Untersuchungen an Fibroblasten zeigte sich erst nach mehreren Stunden eine klare Reorientierung [25, 117]. Dies zeigt, dass die Antwort auf mechanische Reize stark Zelltyp-abhängig ist.

4.1.1 Orientierungsbestimmung von Cytoskelett und Zellkörper

Die Ausrichtung des Cytoskeletts wurde wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben aus den Histogrammen der Orientierung lokaler Grauwertgradienten bestimmt. Die Maxima dieser für jede Zelle gemessenen Verteilungen wurden, wie bereits beschrieben, als Hauptorientierung des Cytoskeletts angesehen. Was in dieser Bestimmung allerdings nicht mit in Betracht gezogen wird, ist die Breite der Orientierungsverteilung innerhalb einer Zelle. Wie in den Aufnahmen der immunocytochemisch angefärbten Zellen (vgl. Abschnitt 3.1.2) erkennbar ist, weisen die Mikrotubuli auch in hochgradig orientierten Zellen besonders im kernnahen Bereich eine breite Auffächerung auf, was zu einer größeren Breite der Verteilung führt.

Da sich die Zellen in der Hauptorientierung der beiden Cytoskelett-Typen so gut wie nicht unterschieden, wurden für die Betrachtung zusätzlich die Werte aller in den Zellen gemessenen Orientierungen mit einbezogen. Auf diese Weise konnte die Verteilungsbreite innerhalb einer Zelle berücksichtigt werden.

Bei der Orientierungsbestimmung in den Lebendzelleexperimenten wurde hingegen nur die Hauptorientierung betrachtet. Bei der Mikroskopie durch den Kammerboden lag eines der Hauptprobleme darin, dass nicht in jeder Aufnahme die Zellen vollständig in der Fokusebene lagen bzw. das Kontrastverhältnis zwischen

Aktinfasern und cytosolischem Hintergrund zu gering für eine Detektion war. In der Analyse zeigte sich, dass die Hauptorientierung als Parameter auf Einzelzell-Ebene wesentlich weniger störungsanfällig war.

Bei der Betrachtung der Zellkörper-Parameter muss mit berücksichtigt werden, dass es sich um eine elliptische Annäherungen der Zellen handelt. Während die Zellorientierung selber sehr gut dadurch beschrieben werden kann, können Zellfläche und Aspektverhältnis bei besonders ausgeprägten Ausläufern einzelner Zellen stark beeinflusst sein.

4.1.2 Zellantwort auf uniaxiale zyklische Dehnung

Sowohl in den Lebendzellanalysen, als auch in den immunocytochemischen Untersuchungen zeigten die HUVECs eine stark ausgeprägte Antwort auf die zyklische Deformation. Der Zellkörper und das Aktin-Cytoskelett reagierten mit einer Umorientierung in senkrechter Richtung zum Zug, um der permanenten Deformation auszuweichen. Vor allem in den Lebendzell-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Dynamik der Reorientierung von Zellkörper und Aktin-Faser stark voneinander abweicht und die Reaktion der Stressfasern dabei um ein Vielfaches schneller ablief. So konnte hier bereits nach etwa 2 h eine fast vollständige Ausrichtung beobachtet werden, während der Prozess für die Zellkörper wesentlich langsamer voranschritt. Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Ausrichtung des Zellkörpers von der Aktivität dehnungsaktivierter Ionenkanäle abhängig ist, während sich die Aktinfasern unabhängig von diesem Signalweg ausrichten können [23, 118, 119]. Es wird vielmehr vermutet, dass sich der für die Ausrichtung der Stressfasern verantwortliche Mechanosensor im Bereich der Fokaladhäsionen oder in den Faserbündeln selbst befindet [33, 97] (s.a. Abschnitt 1.7). Unabhängig von der Art des grundlegenden Mechanosensors liegt der Unterschied in der Geschwindigkeit der Umlagerung sicher aber auch darin, dass die Form und Ausrichtung der Zelle nicht zuletzt auch von der Umstrukturierung von Mikrotubuli, Intermediärfilamenten und Adhäsionsstrukturen abhängt [120].

Die in Abbildung 3.9 gezeigte HUV-EC-C deutet außerdem darauf hin, dass die Reorientierungsreaktion des Zellkörpers in einem mehrstufigen Prozess mit einer Trennung von somalem und lamellarem Bereich der Zelle erfolgt. Die Stressfasern der

Endothelzellen liegen vor allem in der Lamelle. Es ist daher wahrscheinlich, dass der zentrale Bereich der Zelle, der Kern und Organellen umfasst, durch die Kontraktionsspannung senkrecht zum Zug aufgebauter Stressfasern rotiert wird. Diese Vermutung erfordert jedoch einen experimentellen Nachweis (s. Abschnitt 5). Es konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass der Zellkern durch Aktomyosin generierte Kräfte deformiert wird [121] und es außerdem auch Hinweise darauf gibt, dass eine mechanische Verknüpfung von Aktinfasern und Nucleus Voraussetzung für die Zellreorientierung im zyklischen Verzug ist [122].

4.1.3 Vergleich von Lebendzellanalysen und Immunocytochemie

Untersuchungen der Aktin-Reorganisation in lebenden Zellen wurden bereits an anderen Zelltypen durchgeführt [23, 123] und zeigen einen ähnlichen Verlauf in der Änderung der Morphologien über die Zeit auf. Im Rahmen dieser Dissertation konnten die Analysen aber über deutlich längere Zeiträume durchgeführt werden und zeigen vor allem detailliert die Änderung der Orientierungsverteilung der Aktinstressfasern über den zeitlichen Verlauf.

Die Ergebnisse aus den Lebendzellanalysen sind dabei im Großen und Ganzen sehr gut mit den quantitativen Untersuchungen an fixierten Proben in Einklang zu bringen (s. Abb. 3.27) und geben einen Einblick in den Ablauf der Zell-Reorientierung. So lassen die Aufnahmen erkennen, dass es sich bei dem Prozess um eine hauptsächlich aktive Umlagerung der Aktinfasern handelt, teilweise jedoch Strukturen durch die mechanische Belastung abreißen. Der Prozess der strukturellen Umlagerung zeigte sich in den Immunfärbungen besonders deutlich nach 30 min und 1 h Deformation in Form einer häufig von Ausläufern geprägten Zellmorphologie.

Vergleichende Analysen von *Deibler et al.* [124] zeigten, dass die Reorientierungsreaktion von embryonalen Fibroblasten der Ratte durch Expression von Fluorophor-markiertem Aktin deutlich in seiner Dynamik beeinflusst ist, während Zellen unter Expression von Lifeact eine typische Ausrichtung zeigten. Die gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus Lebendzellanalysen und Immunocytochemie-Proben liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass die Aktindynamik nicht durch die Bindung von GFP-Lifeact beeinflusst war.

Die Lebendzellanalysen stellten nicht nur in mechanischer Hinsicht eine Belastung für die Endothelzellen dar. Manche Zellen zeigten im Verlauf des Versuchs fädige Strukturen bei gleichzeitiger Retraktion des Zellkörpers auf. Dies ist zum einen sicherlich auf osmotischen Stress, verursacht durch Evaporation des Wassers aus dem Nährmedium, zurückzuführen, könnte aber auch durch Phototoxizität begründet sein. Zeigten Zellen in der Analyse der Aufnahmen stressbedingte Anzeichen, wurden sie entsprechend aus der statistischen Auswertung ausgenommen.

Dass die Experimente im Allgemeinen aber unter physiologischen Bedingungen durchgeführt wurden, zeigte sich vor allem in der beobachteten Proliferation einzelner Zellen (s. Abschnitt 3.1.1). Die Zellteilungsrichtung lag in beiden beobachteten Fällen senkrecht zur Dehnungsrichtung. Dieses Verhalten wird auch von *Zhao et al.* [125] beschrieben und ist darauf zurückzuführen, dass die Mitose-Richtung durch die Stressfaser-Orientierung bestimmt wird.

4.1.4 Vergleich der Ergebnisse des Aktin-Cytoskeletts und der Mikrotubuli

Sowohl in der Ausrichtung der Aktinfasern als auch in der der Mikrotubuli konnte bereits nach 30-minütiger zyklischer Dehnung der HUVECs eine stark ausgeprägte Reorientierung festgestellt werden. Die Unterschiede in der Hauptorientierung sind insbesondere bei der Betrachtung der Mediane, die robuster gegen Ausreißer sind, marginal. Nur nach 30 min zeigte sich eine stärkere Ausrichtung der Mikrotubuli. Aufgrund der dynamischen Instabilität [126], die Mikrotubuli auszeichnet, wäre es denkbar, dass sie im Vergleich mit Aktinfilamenten eine schnellere Adaptation an die zyklische Dehnung durchführen können. In der Gesamtverteilung der gemessenen Orientierungen sind die beiden Cytoskelett-Elemente zu diesem Zeitpunkt aber identisch. Die Verteilung aller gemessenen Orientierungen scheint für einen Vergleich der beiden Systeme besser geeignet, da sie die Breite der Verteilungen stärker mit einbezieht. So zeigen die Aktinfasern dort ab einer Deformationsdauer von 1 h stets eine stärkere Orientierungsverschiebung in senkrechter Richtung als die Mikrotubuli. Über den zeitlichen Verlauf gesehen zeigte sich bei den Mikrotubuli zwischen den Intervallen von 30 min und 1 h ein Abfall im Grad der Reorientierung. Dies ist wahrscheinlich durch strukturelle Umlagerungsprozesse innerhalb der Zelle bedingt.

Genauere Aussagen können aber ohne entsprechende Lebendzellanalysen nicht getroffen werden.

Auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass auch die Zellflächen nach 1 h wesentlich kleiner waren als nach 30 min. Die Zellflächen von ungedehnten Zellen und durch 8 h zyklische Deformation vollständig ausgerichteteten Zellen unterschieden sich bei den untersuchten HUVECs nicht. Unter Berücksichtigung der Lebendzell-Experimente ist die Verkleinerung der Zellfläche auf die Rückbildung parallel zur Dehnungsrichtung liegender Zellausläufer zurückzuführen. Durch erneute Ausdehnung in vertikaler Richtung nimmt dann die Fläche wieder zu. Dass die untersuchten HUVECs in der Größe innerhalb einer Gruppe eine breite Streuung aufwiesen, liegt daran, dass dieser Zelltyp häufig zur Polyploidie neigt. Die meist zwei- bis dreikernigen Zellen sind dementsprechend größer als Zellen mit nur einem Nucleus.

Die aus Aktinaufnahmen ermittelten Ellipsenparameter unterschieden sich nur in der Fläche deutlich von den entsprechenden Werten aus den Mikrotubuli-Aufnahmen. Dies ist, wie in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, durch ein ausgeprägtes cortikales Aktinnetzwerk der HUVECs bedingt. Die Mikrotubuli hingegen zeigen einen deutlichen Abfall in ihrer Dichte vom Zentrosom zum Zellrand hin auf. Dadurch, dass die Mikrotubuli vor allem im zentralen, spindelförmigen Bereich ausgebildet sind, ist auch das Aspektverhältnis der ermittelten Ellipsen jeweils etwas größer als es beim Aktin der Fall ist. Die Aspektverhältnisse zeigen, dass die Zellkörper der HUVECs in Folge der zyklischen Dehnung insgesamt etwas länglicher werden. Im zeitlichen Verlauf gesehen kommt es aber, wohl durch die Umlagerung des Zellkörpers bedingt, zum Wechsel von Anstieg und Abfall des mittleren Aspektverhältnisses.

Im Vergleich der Cytoskelett- mit der Zell-Orientierung zeigt sich, dass beide Cytoskelett-Typen nach 30 min zyklischer Dehnung die größte Abweichung von der Zell-Ausrichtung aufzeigten, die Differenz mit Länge der Dehnung wieder abnahm. Im direkten Vergleich scheinen die Mikrotubuli in ihrer Ausrichtung stets mehr der Zell-Orientierung zu entsprechen als das Aktin, was darauf zurückzuführen ist, dass die Mikrotubuli als strukturelle Elemente stärker an die Form der Zelle angepasst sind. Grundsätzlich zeigten die beiden Cytoskelett-Verteilungen auf die Gesamtpopulation gesehen eine deutliche Koorientierung. Wie im Einzelnen gezeigt wurde (s. Abb. 3.24-3.26), ist das Bild auf Einzelzellebene durchaus variabel.

Über das genaue Zusammenspiel von Aktin und Mikrotubuli in der Zell-Reorientierung ist bisher wenig bekannt. In Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass

eine Zell- und Aktinfaser-Reorientierung auch stattfindet, wenn die Mikrotubuli durch Nocodazol vollständig depolymerisiert oder durch Taxol stabilisiert sind [83]. Zusätzlich wird die Aktin-Reorientierung durch MT-Depolymerisation beschleunigt und durch Stabilisierung verlangsamt [82], dabei ist jedoch nicht klar, ob eine rein räumliche Hinderung, oder eine echte Interaktion zwischen den Cytoskelett-Typen für den Effekt verantwortlich ist. Allerdings wurde gezeigt, dass eine durch Nocodazol verursachte Depolymerisation zur Aktivierung der GTPase Rho A führt, welche für die Bildung von Stressfasern verantwortlich ist [79].

Für eine umfassende Analyse des Zusammenspiels von Cytoskelett und Zellform, müssen aber sicherlich die Intermediärfilamente mit einbezogen werden. Vimentin als wichtiger Bestandteil des IF-Cytoskeletts in HUVECs [127] zeigt in Scherfluss-Experimenten eine deutliche Antwort auf mechanische Reizung in Form einer posttranlastionalen Modifizierung durch Nitrosylierung [128]. Weiterhin ist Vimentin direkt an Fokalkontakte gebunden [129] und dort an der Regulierung deren Größe und Stabilität unter Scherfluss beteiligt [130]. Es scheint also ähnlich wie Aktin an der Weiterleitung externer mechanischer Reize ins Zellinnere beteiligt zu sein und könnte somit ebenfalls ein wichtiger Regulator in der Zell-Reorientierung unter zyklischer Dehnung sein.

4.2 Protein-Anlagerungen an gedehnte Stressfasern

Die beobachteten Anlagerungen von Zyxin und assoziierter Proteine an gedehnte Aktin-Stressfasern gelten als möglicher, zelleigener Mechanismus zur Reparatur gerissener Filamente innerhalb eines Faserbündels [99]. Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass diese Anlagerungen in Folge einer Zelldeformation nicht nur vereinzelte Ereignisse darstellen, sondern großflächig in den untersuchten Endothelzellen zu finden sind. Auffällig war dabei, dass die Anlagerungen in parallelen Stressfasern häufig auf gleicher Höhe innerhalb der Zelle lagen (s. Abb. 3.31). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass durch die strukturellen Schäden einer Faser ihr Kontraktionsvermögen und somit die von ihr aufgebaute Spannung verlorenght. Die mechanische Belastung der benachbarten Fasern nimmt

so an entsprechender Stelle zu und die Schädigung könnte sich über die Stressfasern hinweg fortpflanzen.

4.2.1 Zusammensetzung der dehnungsinduzierten Anlagerungen

In den immunocytochemischen Färbungen bzw. fixierten Transfektions-Proben konnten Zyxin, VASP und α -Actinin eindeutig als Bestandteile der Protein-Anlagerungen an gedehnte Stressfasern identifiziert werden. Dabei zeigte Zyxin jeweils das stärkste Signal mit einer wesentlich gesteigerten Fluoreszenzintensität gegenüber dem Grundsignal des Proteins entlang der Fasern. Für VASP und α -Actinin war dieser Unterschied schwächer. Teilweise ließ sich besonders für das α -Actinin nur anhand der Unterbrechung des regelmäßigen Bandenmusters ein Effekt feststellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Zyxin in höherem Maße aus dem Cytosol inkorporiert wird als die beiden anderen Proteine.

Widererwartend konnte die Faser-Anlagerung von α -Actinin in Lebendzellanalysen nicht im zentralen Bereich von Stressfasern beobachtet werden. Stattdessen zeigte sich im Bereich der Fokaladhäsionen eine Steigerung der Intensität entlang der Aktinfasern und eine Elongation der Adhäsionsbereiche. Ob es sich bei dem beobachteten Verhalten in den Fokaladhäsionen grundsätzlich um den gleichen Mechanismus mit Beteiligung von Zyxin und VASP handelt, bleibt experimentell zu klären. Warum α -Actinin nicht im zentralen Bereich der gedehnten Stressfasern analog zu den Experimenten in den Silikonkautschuk-Kammern zu finden war, bleibt unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die angelegte Deformation in den Zellen nicht groß genug war. Allerdings wurden die Experimente entsprechend den Versuchen für Zyxin und VASP durchgeführt. Letztlich können hier nur Lebendzellanalysen mit Kotransfektion von fluorophormarkiertem Zyxin und VASP eindeutige Klärung bringen. Da die verfügbaren Konstrukte jeweils nur in der GFP-Form eine klare Cytoskelett assoziierte Lokalisation in der Zelle zeigten, werden für weitere Untersuchungen entsprechende Plasmide benötigt.

4.2.2 Dynamik der Proteine in der Faser-Anlagerung

Zyxin und VASP zeigten in den Halbwertszeiten der Intensität innerhalb der Anlagerungen eine Differenz von 45 s auf. Wobei VASP mit einer Halbwertszeit von 152 s schneller im Abbau der Anlagerungen als Zyxin (197 s) war. Die von *Smith et al.* [99] beschriebene Halbwertszeit von 120 s ist kürzer, und wurde außerdem für beide Proteine als identisch beschrieben. Die Differenz könnte zum einen daran liegen, dass dort mit Fibroblasten ein ganz anderer Zelltyp untersucht wurde, zum anderen ging in die Auswertung für diese Dissertation die dreifache Anzahl an Experimenten ein.

Da in der erwähnten Veröffentlichung nur einzelne Fasern mittels Mikropipette gezogen wurden, konnte dort auch die Anlagerung der Proteine beobachtet werden. Dafür wird eine Halbwertszeit von 28,6 s für Zyxin und VASP angegeben, α -Actinin folgte in seiner Anlagerung den beiden mit zeitlichem Versatz. Die angegebene Halbwertszeit entspricht in etwa der maximalen Totzeit der Experimente dieser Dissertation, die zwischen Anlegen der Deformation und Starten der Aufnahme lag. Es konnte jedoch kein Anstieg in der Intensität innerhalb der ersten Aufnahmeintervalle festgestellt werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Anlagerungsdynamik in untersuchten Endothelzellen schneller ist. Genaue Aussagen können aber in dieser Hinsicht ohne experimentellen Nachweis nicht erfolgen.

Bei der Anlagerung von Zyxin wurden zwei verschiedene Reizarten untersucht, zum einen eine konstant gehaltene Deformation des Substrats unter der Zelle, zum anderen eine nur kurz andauernde Dehnung der Zelle von wenigen Sekunden. Wie sich zeigte, fällt die Halbwertszeit der Anlagerungen bei nur kurz andauernder Deformation mit 280 s deutlich größer aus. Die Auflösung der Proteinkomplexe ist also im Umkehrschluss wesentlich schneller, wenn die Spannung der Stressfasern aufrechterhalten wird. Eine genaue Erklärung kann dafür nicht erbracht werden. Untersuchungen von *Colombelli et al.* [97] zeigten jedoch, dass Zyxin in Fokaladhäsionen eine Reduktion in seiner Austauschdynamik aufweist, wenn die verbundenen Stressfasern mittels Laser durchtrennt werden und somit die Spannung weggenommen wird.

4.2.3 Schwellenwertbestimmung der minimal benötigten Deformation

Durch die Orientierungsanalyse der Zyxin-Anlagerung wurde der Maximalwinkel zur Deformationsrichtung bestimmt, unter dem noch Anlagerungen an den Stressfasern zu finden sind (s. Abschnitt 3.2.3). In den Messungen traten vereinzelt auch Winkel im Bereich von 90° zur Dehnung auf. Da Fasern dieser Ausrichtung aber effektiv keine Dehnung erfahren, kann man davon ausgehen, dass es sich hierbei um Artefakte handelt, die als falsch positive Bereiche nicht aus der Analyse ausgeschlossen wurden (s.a. Abschnitt 2.5.2). Grundsätzlich wurden eindeutige Artefakte wie vesikuläre Kompartimente o.ä., die fälschlicherweise als Zyxinanlagerung detektiert worden waren, manuell aus der Auswertung entfernt. War eine Struktur nicht eindeutig zuzuordnen, verblieb sie jedoch in der Auswertung. Diese Strukturen sind wahrscheinlich für die gemessenen Orientierungen im Bereich von 90° verantwortlich. Aus diesem Grund wurde für die Berechnung der Schwellenwerte nur das 90%-Quantil verwendet. Es ergibt sich ein Maximalwinkel von 60° . Dieser Wert ist als durchaus realistisch zu betrachten und deckt sich mit manuellen Winkelbestimmungen aus den Lebendexperimenten, die bei Winkeln bis zu 50° noch deutliche Zyxin-Anlagerungen zeigten. Wie in Abschnitt 3.2.3 gezeigt, würde mit diesem Resultat eine Dehnung der Aktinfaser im Bereich von 3% ausreichen, um die Stressfaser so zu schädigen, dass die Zyxin vermittelte Zellantwort erfolgt.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass mit der hier verwendeten Methode eine gute Abschätzung der Mindestdeformation abgegeben werden konnte, sich für die exakte Bestimmung aber eine direkte Messung empfiehlt (s.a. Abschnitt 5).

4.2.4 Modell der Zyxin vermittelten Aktinfaser-Rekonstitution

Smith et al. [99] postulierten einen möglichen Ablauf der Zyxin vermittelten Rekonstitution von durch Dehnung beschädigter Aktinfasern, dieser wurde in *Hoffman et al.* erweitert [102]. Dabei entstehen durch Zerreißen einzelne Filamente freie Plus-Enden in der Faser. Dadurch werden Bindestellen für den Reparaturkomplex freigelegt, Zyxin bindet und rekrutiert VASP und α -Actinin. Während VASP die Elongation der Aktinfasern stabilisiert, hilft α -Actinin die Aktin-

Struktur zu stabilisieren. Ein weiterer möglicher Mitspieler in diesem Prozess könnte CRP1 (*Cysteine-rich protein 1*) sein. Dieses Protein kolokalisiert mit α -Actinin in Stressfasern und unterstützt die Bündelung der Filamente [131], es besitzt außerdem Zyxin bindende LIM-Domänen [132]. Die genaue Funktion des Proteins ist im Wesentlichen aber noch unbekannt.

Ob die Rolle von α -Actinin in der Kreuzvernetzung der Filament in Folge einer Rekrutierung durch Zyxin liegt, oder das Protein bereits an der Initiation des Reparaturprozesses beteiligt ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Zyxin besitzt jedoch selber keine direkte Bindestelle für Aktin, wohl aber für α -Actinin. Zyxin bindet an die zentrale Region des dimeren α -Actinins, bestehend aus zwei Spectrin-Domänen [133], auch eine Bindung an N-terminale CH-Domäne, welche an der Bindung an die Aktinfilamente beteiligt ist, wurde beschrieben [115]. Die Anlagerung von Zyxin an die gedehnten Stressfasern könnte sich somit eventuell damit erklären lassen, dass durch Reißen einzelner Filamente im Aktinbündel die Bindung von Zyxin an gebundenes α -Actinin räumlich erleichtert wird oder aber zusätzliche Bindedomänen freigelegt werden. *Colombelli et al.* [97] schlagen α -Actinin als „mechanischen Schalter“ für die Rekrutierung von Zyxin, VASP und G-Aktin vor, wie er schon zuvor von *Hirata et al.* [134] beschrieben wurde. Maßgeblich für diese Funktion könnten die flexiblen Spectrin-Domänen sein, die durch mechanische Belastung der Aktinfasern diese Domänen aufgezogen werden und zusätzliche Bindestellen für Zyxin freilegen. Was für die Möglichkeit von α -Actinin als Auslöser spricht, ist, dass der Kreuzvernetzer sowohl in Fokaladhäsion als auch in Stressfasern sowie in Adhärenz-Verbindungen lokalisiert ist. An allen drei Stellen ist eine Zyxin-Rekrutierung durch mechanische Spannung belegt. Die in dieser Dissertation beobachtete Bildung durchgehender Banden im regelmäßigen Muster des α -Actinins lässt sich durch zusätzliche Einlagerung des Kreuzvernetzers erklären, könnte aber auch durch eine Verschiebung der Proteine entlang der Filamente entstehen. Die Beobachtungen in der in Abbildung 3.37 gezeigten Endothelzellen deuten auf jeden Fall auf eine verstärkte Einlagerung in diesem Bereich hin. Außerdem konnten *Smith et al.* [99] einen zeitlich versetzten Einbau von α -Actinin beobachten. Die nachträgliche Rekrutierung des Proteins schließt aber auch seine Rolle als Initiator der Reaktion nicht aus. Allerdings scheint Zyxin auch mit einer Deletion der α -Actinin-bindende Domäne im Bereich der Faserrisse zu akkumulieren, was für eine unabhängige Rekrutierung sprechen würde [99]. Letztendlich kann aber auch nicht

ausgeschlossen werden, dass Zyxin über eine andere Domäne an die zuvor beschriebenen aufgezogenen Spectrin-Domänen des α -Actinins binden könnte.

Unabhängig vom Initiator der Anlagerungs-Reaktion, liegt die Rolle des Zyxins im Weiteren vor allem in der Rekrutierung von VASP. Die Funktion von VASP ist die Polymerisation von Aktin am Plus-Ende des Filaments. Dies geschieht zum einen durch die Inhibierung der Bindung von „Capping“-Proteinen, zum anderen durch die Rekrutierung von Profilin, welches wiederum die Anlagerung monomeren Aktins beschleunigt [101].

Abbildung 4.1 schematisch zeigt einen möglichen Ablauf der Anlagerung an Stressfasern, der die möglichen Theorien zusammenführt.

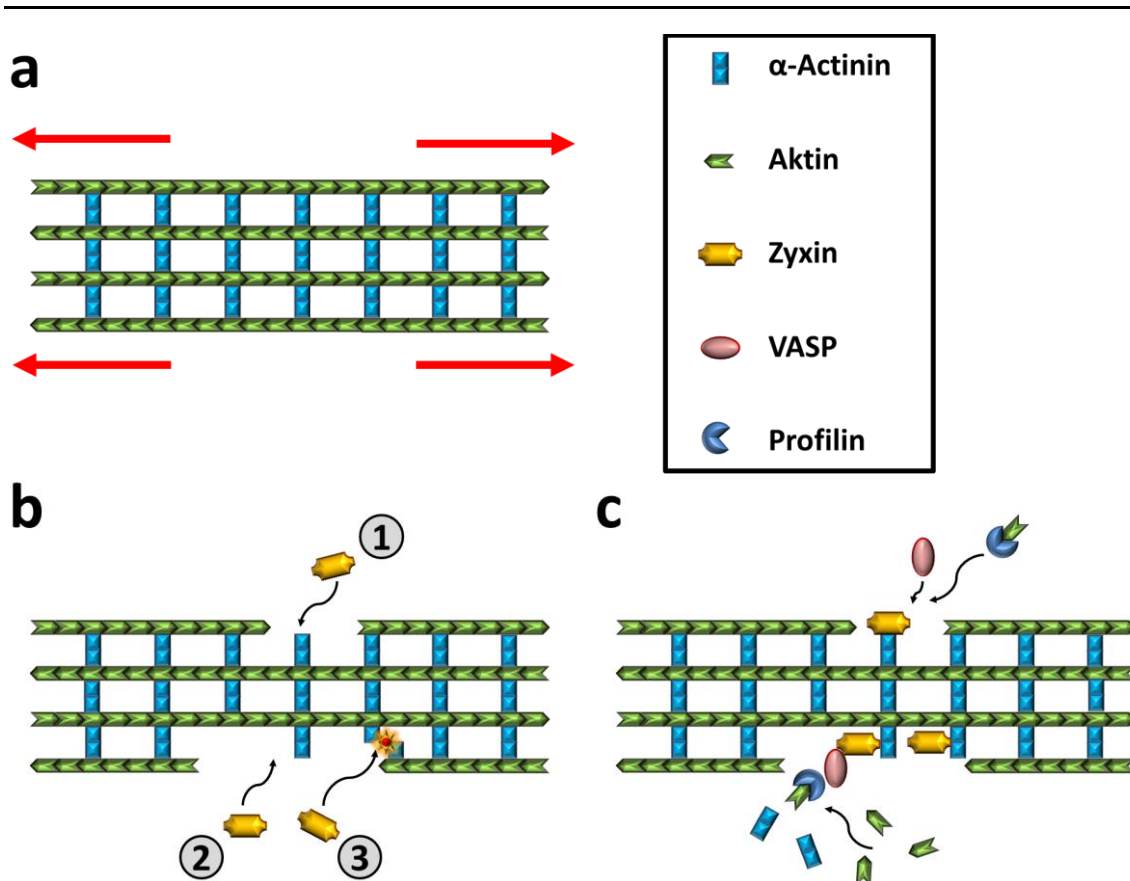


Abbildung 4.1: Modell einer Zyxin vermittelten Stressfaser-Rekonstitution – In ungedehnten Stressfasern liegt α -Actinin als Kreuzvernetzer in einem regelmäßigen Bandenmuster entlang der Stressfasern vor (a). Nicht gezeigt ist, dass auch Zyxin in diesem Muster gebunden ist. Durch Dehnung reißen einzelne Filamente. Dabei werden an α -Actinin zusätzliche Bindungsstellen für Zyxin freigelegt. Diese könnten N-terminal an der Aktin bindenden Domäne liegen (1), durch einfachere Zugänglichkeit freigelegt sein (2) oder durch Dehnung der Spectrin-Domänen des α -Actinins entstehen (3).

Auch wenn die genauen Zusammenhänge im Ablauf der Zyxin-vermittelten Stressfaser-Rekonstitution weiterhin unklar bleiben, so konnten die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Analysen dazu dienen, die bisher nur an einzelnen gedehnten Aktinfaserbündeln untersuchten Zyxin-Anlagerung als eine die gesamte Zelle betreffende Reaktion zu bestätigen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass sich der mögliche Reparatur-Komplex ab einer Faserdehnung von ca. 3% ausbildet. Die Ergebnisse des zeitlichen Verlaufs deuten außerdem darauf hin, dass die Dynamik in der Auflösung des Komplexes durch die Spannung der Faser beeinflusst wird. Im Gegensatz zur Reorientierung der Stressfasern im zyklischen Verzug, stellt der Reparaturmechanismus eine Möglichkeit dar, unmittelbar auf mechanische Belastung zu reagieren und bestehende Strukturen zu verstärken. Dabei ist anzunehmen, dass die Neuausrichtung von Aktinfasern unter zyklischer Deformation auch dadurch bedingt ist, dass permanent gedehnte Fasern nicht mehr erfolgreich rekonstituiert werden können und in Folge dessen von der Zelle abgebaut werden.

5 *Ausblick*

Die Analyse der Proteinanlagerungen an die Stressfasern konnte mit der manuellen Deformation des Zellsubstrates bisher nur nach bereits erfolgter Bildung der Komplexe beobachtet werden. Gegenwärtig wird in unserer Arbeitsgruppe als Weiterentwicklung des im Rahmen dieser Dissertation etablierten Mikroklingensystems ein automatisierter Aufbau auf Basis eines Piezomotors getestet. Durch diesen könnte es möglich gemacht werden, den kritischen Moment während der Stressfaserdehnung zu beobachten und somit genaue Aussagen über die Einbau-Dynamik der verschiedenen Komponenten zu treffen.

Für die Bestimmung einer minimal benötigten Faserdehnung konnten in dieser Dissertation nur ungefähre Abschätzungen getroffen werden, da die Verteilung der Orientierungen sehr breit war, was zum Teil auch durch verbleibende Artefakte, die nicht als Anlagerung anzusehen sind, hervorgerufen sein könnte. Daher empfiehlt es sich, diese Bestimmung aus Lebendzellanalysen unter Kotransfektion von Zyxin und Lifeact durchzuführen. So können zum einen Anlagerungen eindeutig identifiziert werden und zum anderen die Aktinfaserlänge im Grundzustand und nach der Dehnung direkt gemessen werden.

Eine weitere Möglichkeit, die sich durch die automatisierte Deformation ergibt, ist außerdem, die Untersuchungen der Zell-Reorientierung unter zyklischer Dehnung tiefergehend zu betrachten. Das Hauptproblem des bisherigen Systems der Silikonkautschuk-Kammern lag besonders im hohen Verlust des Fluoreszenzsignals bei der inversen Mikroskopie mittels Luft-Objektiv. Der Verzug in einer Glasbodenschale bietet hier den Vorteil der Verwendung von Ölimmersions-Objektiven. Somit wäre es auch möglich, schwächer exprimierte Proteine oder aber auch Mikrotubuli oder Intermediärfilamente in transfizierten Zellen zu betrachten. Auch für die Aktinfasern lassen sich durch ein besseres Kontrastverhältnis detailliertere Analysen des Auf-, Ab- und Umbaus während der zyklischen Deformation durchführen. Eine weitere logische Analyse wäre aber vor allem auch die Lokalisation von Zyxin im Verlauf zyklischer Dehnung. Die beobachteten Anlagerungen stellen mit großer Wahrscheinlichkeit einen Reparaturmechanismus für überdehnte Aktinfaserbündel dar und Zyxin wurde ebenfalls nach zyklischer

Dehnung vermehrt an Stressfasern gefunden [97, 99]. Zusätzlich zur Analyse der Aktinfasern alleine ließe sich somit auch erkennen, welcher Anteil der Fasern durch zelluläre Mechanismen rekonstituiert werden kann und welcher in Folge der permanenten Belastung durch die Deformation abgebaut wird.

Im Einzelexperiment konnte eine Trennung der Zellkörperorientierung in Soma und Lamelle beobachtet werden. Vermutlich wird das Soma bereits durch die Ausbildung senkrechter Stressfasern ausgerichtet, der lamellare Bereich ist davon unabhängig. Eine genauere Untersuchung ließe sich z.B. durch eine Markierung des zentralen Zellbereichs etwa über das endoplasmatische Retikulum möglich machen. Eine simultane Untersuchung der Stressfaser-Orientierung gekoppelt mit Zugkraft-Analysen könnte so ein vollständiges Bild ergeben.

In der Ausrichtung zeigten die Endothelzellen eine klare Entkopplung von Zellform und Cytoskelett-Orientierung, wobei sich das Cytoskelett natürlich zu einem gewissen Grad der Form der Zelle anpasste. Durch Vorgabe einer definierten Zellform könnten Lebendzellanalysen der Cytoskelett-Reorientierung mit einer höheren Vergleichbarkeit der Einzelmessungen untereinander durchgeführt werden. Ein ähnlicher Ansatz wurde in unserem Institut für die Kulturkammern bereits getestet. Dabei wurden in einem Siebdruck-ähnlichen Verfahren Fibronectin-Beschichtungen in definierten geometrischen Formen auf das Substrat aufgebracht. Das Verfahren ist problemlos in den Glasbodenschalen durchführbar und könnte neben einzelnen Zellen definierter Form auch zur Untersuchung kleinerer Zellverbände in Lebendzell-Experimenten herangezogen werden. Zuletzt bleibt als wichtiger Faktor der Zellantwort auf mechanische Reize, gerade für vaskuläre Endothelzellen, auch die Auswirkungen von Scherfluss auf die Zellausrichtung zu untersuchen. Im Blutgefäß liegen die Richtungen des Blutflusses und der Gefäßwanddehnung senkrecht zueinander (s. Abb. 1.1) und sind als Antagonisten in der Zellausrichtung zu sehen. Für die Untersuchung des Einflusses auf die Zellausrichtung wäre eine Kombination aus dem System der Mikroklinge mit z.B. einer frei positionierbaren Düse zur Erzeugung einer Strömung über der Zelle denkbar.

6 **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CB	<i>Cytoskeleton buffer</i> , Cytoskelett-Puffer
cm ²	Quadratcentimeter
CRP1	<i>Cysteine-rich protein1</i>
d. h.	das heißt
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM-2	<i>Endothelial growth medium-2</i> , Wachstumsmedium für Endothelzellen
FA	Fokaladhäsion
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
γ TURC	<i>γ-Tubulin ring complex</i>
h	Stunden
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> , humane Endothelzellen der Nabelschnurvene
HUV-EC-C	<i>HUVEC cell line</i>
Hz	Hertz
kDa	Kilo Dalton
kPa	Kilopascal
KS-Test	Kolmogorov-Smirnov-Test
mHz	Millihertz
min	Minuten
MLC	<i>Myosin light chain</i>
mm	Millimeter

µm	Mikrometer
MPa	Megapascal
MT	Mikrotubuli
MTOC	<i>Microtubule-organizing center</i>
MΩ	Megaohm
p130 ^{Cas}	<i>Crk associated substrate</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFA	Para-Formaldehyd
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-Puffer
ppb	Parts per billion, Teile pro Milliarde
ROCK I	<i>Rho-associated protein kinase I</i>
s	Sekunde
s.	siehe
s.a.	siehe auch
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
u.	und
u.a.	unter anderem
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
z.B.	zum Beispiel

7 *Literaturverzeichnis*

1. Judokusumo, E., Tabdanov, E., Kumari, S., Dustin, M.L., and Kam, L.C., *Mechanosensing in T lymphocyte activation*. Biophys J, 2012. **102**(2): p. L5-7.
2. Flanagan, L.A., Ju, Y.E., Marg, B., Osterfield, M., and Janmey, P.A., *Neurite branching on deformable substrates*. Neuroreport, 2002. **13**(18): p. 2411-5.
3. Georges, P.C., Miller, W.J., Meaney, D.F., Sawyer, E.S., and Janmey, P.A., *Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures*. Biophys J, 2006. **90**(8): p. 3012-8.
4. Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A., *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(5): p. 349-63.
5. Raja, Sivamani, K., Garcia, M.S., and Isseroff, R.R., *Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 2849-68.
6. Janmey, P.A. and Miller, R.T., *Mechanisms of mechanical signaling in development and disease*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 1): p. 9-18.
7. Discher, D.E., Janmey, P., and Wang, Y.L., *Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate*. Science, 2005. **310**(5751): p. 1139-43.
8. Vogel, V. and Sheetz, M., *Local force and geometry sensing regulate cell functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(4): p. 265-75.
9. Teixeira, A.I., McKie, G.A., Foley, J.D., Bertics, P.J., Nealey, P.F., and Murphy, C.J., *The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography*. Biomaterials, 2006. **27**(21): p. 3945-54.

10. Dalby, M.J., Gadegaard, N., Tare, R., Andar, A., Riehle, M.O., Herzyk, P., Wilkinson, C.D., and Oreffo, R.O., *The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder*. Nat Mater, 2007. **6**(12): p. 997-1003.
11. Bucaro, M.A., Vasquez, Y., Hatton, B.D., and Aizenberg, J., *Fine-tuning the degree of stem cell polarization and alignment on ordered arrays of high-aspect-ratio nanopillars*. ACS Nano, 2012. **6**(7): p. 6222-30.
12. Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E., *Matrix elasticity directs stem cell lineage specification*. Cell, 2006. **126**(4): p. 677-89.
13. Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D., *Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(12): p. 1457-65.
14. Zamir, E. and Geiger, B., *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 20): p. 3583-90.
15. Zaidel-Bar, R., *Evolution of complexity in the integrin adhesome*. J Cell Biol, 2009. **186**(3): p. 317-21.
16. Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., and Geiger, B., *Functional atlas of the integrin adhesome*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(8): p. 858-67.
17. Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
18. Schwartz, M.A., *Integrin signaling revisited*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(12): p. 466-70.
19. Rivelino, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D., *Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism*. J Cell Biol, 2001. **153**(6): p. 1175-86.

20. Choi, C.K., Margraves, C.H., English, A.E., and Kihm, K.D., *Multicontrast microscopy technique to dynamically fingerprint live-cell focal contacts during exposure and replacement of a cytotoxic medium*. J Biomed Opt, 2008. **13**(5): p. 054069.
21. Stricker, J., Aratyn-Schaus, Y., Oakes, P.W., and Gardel, M.L., *Spatiotemporal constraints on the force-dependent growth of focal adhesions*. Biophys J, 2011. **100**(12): p. 2883-93.
22. Chrzanowska-Wodnicka, M. and Burridge, K., *Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions*. J Cell Biol, 1996. **133**(6): p. 1403-15.
23. Hayakawa, K., Sato, N., and Obinata, T., *Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching*. Exp Cell Res, 2001. **268**(1): p. 104-14.
24. Wang, J.H., Goldschmidt-Clermont, P., Wille, J., and Yin, F.C., *Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching*. J Biomech, 2001. **34**(12): p. 1563-72.
25. Faust, U., Hampe, N., Rubner, W., Kirchgessner, N., Safran, S., Hoffmann, B., and Merkel, R., *Cyclic stress at mHz frequencies aligns fibroblasts in direction of zero strain*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28963.
26. Shirinsky, V.P., Antonov, A.S., Birukov, K.G., Sobolevsky, A.V., Romanov, Y.A., Kabaeva, N.V., Antonova, G.N., and Smirnov, V.N., *Mechano-chemical control of human endothelium orientation and size*. J Cell Biol, 1989. **109**(1): p. 331-9.
27. Jungbauer, S., Gao, H., Spatz, J.P., and Kemkemer, R., *Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates*. Biophys J, 2008. **95**(7): p. 3470-8.
28. Tondon, A., Hsu, H.J., and Kaunas, R., *Dependence of cyclic stretch-induced stress fiber reorientation on stretch waveform*. J Biomech, 2012. **45**(5): p. 728-35.

29. Eastwood, M., Mudera, V.C., McGrouther, D.A., and Brown, R.A., *Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices: morphological changes*. Cell Motil Cytoskeleton, 1998. **40**(1): p. 13-21.
30. Collinsworth, A.M., Torgan, C.E., Nagda, S.N., Rajalingam, R.J., Kraus, W.E., and Truskey, G.A., *Orientation and length of mammalian skeletal myocytes in response to a unidirectional stretch*. Cell Tissue Res, 2000. **302**(2): p. 243-51.
31. Kanzaki, M., Nagasawa, M., Kojima, I., Sato, C., Naruse, K., Sokabe, M., and Iida, H., *Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated nonselective cation channel*. Science, 1999. **285**(5429): p. 882-6.
32. Hayakawa, K., Tatsumi, H., and Sokabe, M., *Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 4): p. 496-503.
33. Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M.P., *Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas*. Cell, 2006. **127**(5): p. 1015-26.
34. Tamada, M., Sheetz, M.P., and Sawada, Y., *Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch*. Dev Cell, 2004. **7**(5): p. 709-18.
35. Niediek, V., Born, S., Hampe, N., Kirchgessner, N., Merkel, R., and Hoffmann, B., *Cyclic stretch induces reorientation of cells in a Src family kinase- and p130Cas-dependent manner*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(2): p. 118-28.
36. Uyeda, T.Q., Iwadate, Y., Umeki, N., Nagasaki, A., and Yumura, S., *Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin II motor domain*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26200.
37. Hayakawa, K., Tatsumi, H., and Sokabe, M., *Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament*. J Cell Biol, 2011. **195**(5): p. 721-7.
38. Lum, H. and Malik, A.B., *Regulation of vascular endothelial barrier function*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 1): p. L223-41.

39. Stevens, T., Garcia, J.G., Shasby, D.M., Bhattacharya, J., and Malik, A.B., *Mechanisms regulating endothelial cell barrier function*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L419-22.
40. Montgomery, R.R. and Shi, Q., *Platelet and endothelial expression of clotting factors for the treatment of hemophilia*. Thromb Res, 2012. **129 Suppl 2**: p. S46-8.
41. Sandow, S.L., Senadheera, S., Grayson, T.H., Welsh, D.G., and Murphy, T.V., *Calcium and endothelium-mediated vasodilator signaling*. Adv Exp Med Biol, 2012. **740**: p. 811-31.
42. Lüscher, T.F., Richard, V., Tschudi, M., Yang, Z.H., and Boulanger, C., *Endothelial control of vascular tone in large and small coronary arteries*. J Am Coll Cardiol, 1990. **15**(3): p. 519-27.
43. Tobelem, G., *Endothelial cell growth: biology and pharmacology in relation to angiogenesis*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1990. **1**(6): p. 703-5.
44. Chien, S., *Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1209-24.
45. Traub, O. and Berk, B.C., *Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(5): p. 677-85.
46. Berk, B.C., *Atheroprotective signaling mechanisms activated by steady laminar flow in endothelial cells*. Circulation, 2008. **117**(8): p. 1082-9.
47. Sumagin, R., Brown, C.W., 3rd, Sarelius, I.H., and King, M.R., *Microvascular endothelial cells exhibit optimal aspect ratio for minimizing flow resistance*. Ann Biomed Eng, 2008. **36**(4): p. 580-5.
48. Kataoka, N., Ujita, S., and Sato, M., *Effect of flow direction on the morphological responses of cultured bovine aortic endothelial cells*. Med Biol Eng Comput, 1998. **36**(1): p. 122-8.

49. Califano, J.P. and Reinhart-King, C.A., *Exogenous and endogenous force regulation of endothelial cell behavior*. J Biomech, 2010. **43**(1): p. 79-86.
50. Iba, T. and Sumpio, B.E., *Morphological response of human endothelial cells subjected to cyclic strain in vitro*. Microvasc Res, 1991. **42**(3): p. 245-54.
51. Zhao, S., Suciu, A., Ziegler, T., Moore, J.E., Jr., Burki, E., Meister, J.J., and Brunner, H.R., *Synergistic effects of fluid shear stress and cyclic circumferential stretch on vascular endothelial cell morphology and cytoskeleton*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(10): p. 1781-6.
52. Wood, J.A., Shah, N.M., McKee, C.T., Hughbanks, M.L., Liliensiek, S.J., Russell, P., and Murphy, C.J., *The role of substratum compliance of hydrogels on vascular endothelial cell behavior*. Biomaterials, 2011. **32**(22): p. 5056-64.
53. Cramer, L.P., Siebert, M., and Mitchison, T.J., *Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force*. J Cell Biol, 1997. **136**(6): p. 1287-305.
54. Lazarides, E. and Burridge, K., *Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells*. Cell, 1975. **6**(3): p. 289-98.
55. Weber, K. and Groeschel-Stewart, U., *Antibody to myosin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(11): p. 4561-4.
56. Langanger, G., Moeremans, M., Daneels, G., Sobieszek, A., De Brabander, M., and De Mey, J., *The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells*. J Cell Biol, 1986. **102**(1): p. 200-9.
57. Paterson, H.F., Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K., and Hall, A., *Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1001-7.
58. Ridley, A.J. and Hall, A., *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell, 1992. **70**(3): p. 389-99.

59. Leung, T., Chen, X.Q., Manser, E., and Lim, L., *The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(10): p. 5313-27.
60. Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K., *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20246-9.
61. Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K., *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. Science, 1996. **273**(5272): p. 245-8.
62. Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., and Watanabe, N., *Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells*. Science, 2004. **303**(5666): p. 2007-10.
63. Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., and Narumiya, S., *Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. 136-43.
64. Pellegrin, S. and Mellor, H., *Actin stress fibres*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 20): p. 3491-9.
65. Gabbiani, G., Ryan, G.B., and Majne, G., *Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction*. Experientia, 1971. **27**(5): p. 549-50.
66. Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C.E., Chaponnier, C., and Gabbiani, G., *Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation*. Am J Pathol, 2001. **159**(3): p. 1009-20.
67. Byers, H.R., White, G.E., and Fujiwara, K., *Organization and function of stress fibers in cells in vitro and in situ. A review*. Cell Muscle Motil, 1984. **5**: p. 83-137.
68. Franke, R.P., Grafe, M., Schnittler, H., Seiffge, D., Mittermayer, C., and Drenckhahn, D., *Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress*. Nature, 1984. **307**(5952): p. 648-9.

69. Meurer-Grob, P., Kasparian, J., and Wade, R.H., *Microtubule structure at improved resolution*. *Biochemistry*, 2001. **40**(27): p. 8000-8.
70. Wade, R.H., Meurer-Grob, P., Metoz, F., and Arnal, I., *Organisation and structure of microtubules and microtubule-motor protein complexes*. *Eur Biophys J*, 1998. **27**(5): p. 446-54.
71. Joshi, H.C., Palacios, M.J., McNamara, L., and Cleveland, D.W., *Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation*. *Nature*, 1992. **356**(6364): p. 80-3.
72. Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., and Agard, D.A., *Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(11): p. 709-21.
73. Schiebel, E., *gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation*. *Curr Opin Cell Biol*, 2000. **12**(1): p. 113-8.
74. Karsenti, E., Kobayashi, S., Mitchison, T., and Kirschner, M., *Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes*. *J Cell Biol*, 1984. **98**(5): p. 1763-76.
75. Mitchison, T. and Kirschner, M., *Dynamic instability of microtubule growth*. *Nature*, 1984. **312**(5991): p. 237-42.
76. Cassimeris, L., *Regulation of microtubule dynamic instability*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1993. **26**(4): p. 275-81.
77. van der Vaart, B., Akhmanova, A., and Straube, A., *Regulation of microtubule dynamic instability*. *Biochem Soc Trans*, 2009. **37**(Pt 5): p. 1007-13.
78. Kiris, E., Ventimiglia, D., and Feinstein, S.C., *Quantitative analysis of MAP-mediated regulation of microtubule dynamic instability in vitro focus on Tau*. *Methods Cell Biol*, 2010. **95**: p. 481-503.
79. Liu, B.P., Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K., *Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP-binding protein Rho*. *Cell Adhes Commun*, 1998. **5**(4): p. 249-55.

80. Heck, J.N., Ponik, S.M., Garcia-Mendoza, M.G., Pehlke, C.A., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., and Keely, P.J., *Microtubules regulate GEF-H1 in response to extracellular matrix stiffness*. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(13): p. 2583-92.
81. Putnam, A.J., Cunningham, J.J., Dennis, R.G., Linderman, J.J., and Mooney, D.J., *Microtubule assembly is regulated by externally applied strain in cultured smooth muscle cells*. *J Cell Sci*, 1998. **111 (Pt 22)**: p. 3379-87.
82. Goldyn, A.M., Kaiser, P., Spatz, J.P., Ballestrem, C., and Kemkemer, R., *The kinetics of force-induced cell reorganization depend on microtubules and actin*. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 2010. **67**(4): p. 241-50.
83. Goldyn, A.M., Rioja, B.A., Spatz, J.P., Ballestrem, C., and Kemkemer, R., *Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 20): p. 3644-51.
84. Morioka, M., Parameswaran, H., Naruse, K., Kondo, M., Sokabe, M., Hasegawa, Y., Suki, B., and Ito, S., *Microtubule dynamics regulate cyclic stretch-induced cell alignment in human airway smooth muscle cells*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e26384.
85. Crawford, A.W. and Beckerle, M.C., *Purification and characterization of zyxin, an 82,000-dalton component of adherens junctions*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(9): p. 5847-53.
86. Martynova, N.Y., Eroshkin, F.M., Ermolina, L.V., Ermakova, G.V., Korotaeva, A.L., Smurova, K.M., Gyoeva, F.K., and Zarausky, A.G., *The LIM-domain protein Zyxin binds the homeodomain factor Xanf1/Hesx1 and modulates its activity in the anterior neural plate of Xenopus laevis embryo*. *Dev Dyn*, 2008. **237**(3): p. 736-49.
87. Macalma, T., Otte, J., Hensler, M.E., Bockholt, S.M., Louis, H.A., Kalff-Suske, M., Grzeschik, K.H., von der Ahe, D., and Beckerle, M.C., *Molecular characterization of human zyxin*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(49): p. 31470-8.
88. Renfranz, P.J., Siegrist, S.E., Stronach, B.E., Macalma, T., and Beckerle, M.C., *Molecular and phylogenetic characterization of Zyx102, a Drosophila orthologue*

- of the zyxin family that interacts with Drosophila Enabled*. *Gene*, 2003. **305**(1): p. 13-26.
89. Ermolina, L.V., Martynova, N., and Zaraiskii, A.G., [*The cytoskeletal protein zyxin--a universal regulator of cell adhesion and gene expression*]. *Bioorg Khim*, 2010. **36**(1): p. 29-37.
90. Reinhard, M., Zumbunn, J., Jaquemar, D., Kuhn, M., Walter, U., and Trueb, B., *An alpha-actinin binding site of zyxin is essential for subcellular zyxin localization and alpha-actinin recruitment*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(19): p. 13410-8.
91. Yi, J., Kloeker, S., Jensen, C.C., Bockholt, S., Honda, H., Hirai, H., and Beckerle, M.C., *Members of the Zyxin family of LIM proteins interact with members of the p130Cas family of signal transducers*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(11): p. 9580-9.
92. Uemura, A., Nguyen, T.N., Steele, A.N., and Yamada, S., *The LIM domain of zyxin is sufficient for force-induced accumulation of zyxin during cell migration*. *Biophys J*, 2011. **101**(5): p. 1069-75.
93. Hirata, H., Tatsumi, H., and Sokabe, M., *Mechanical forces facilitate actin polymerization at focal adhesions in a zyxin-dependent manner*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 17): p. 2795-804.
94. Lele, T.P., Pendse, J., Kumar, S., Salanga, M., Karavitis, J., and Ingber, D.E., *Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells*. *J Cell Physiol*, 2006. **207**(1): p. 187-94.
95. Nix, D.A., Fradelizi, J., Bockholt, S., Menichi, B., Louvard, D., Friederich, E., and Beckerle, M.C., *Targeting of zyxin to sites of actin membrane interaction and to the nucleus*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(37): p. 34759-67.
96. Wojtowicz, A., Babu, S.S., Li, L., Gretz, N., Hecker, M., and Cattaruzza, M., *Zyxin mediation of stretch-induced gene expression in human endothelial cells*. *Circ Res*, 2010. **107**(7): p. 898-902.
97. Colombelli, J., Besser, A., Kress, H., Reynaud, E.G., Girard, P., Caussinus, E., Haselmann, U., Small, J.V., Schwarz, U.S., and Stelzer, E.H., *Mechanosensing in*

- actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 10): p. 1665-79.
98. Yoshigi, M., Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Yost, H.J., and Beckerle, M.C., *Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement.* J Cell Biol, 2005. **171**(2): p. 209-15.
 99. Smith, M.A., Blankman, E., Gardel, M.L., Luetjohann, L., Waterman, C.M., and Beckerle, M.C., *A zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair.* Dev Cell, 2010. **19**(3): p. 365-76.
 100. Bear, J.E. and Gertler, F.B., *Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end.* J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 12): p. 1947-53.
 101. Hansen, S.D. and Mullins, R.D., *VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association.* J Cell Biol, 2010. **191**(3): p. 571-84.
 102. Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Chaturvedi, A., Yoshigi, M., and Beckerle, M.C., *Stretch-induced actin remodeling requires targeting of zyxin to stress fibers and recruitment of actin regulators.* Mol Biol Cell, 2012. **23**(10): p. 1846-59.
 103. Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Kloeker, S., Wang, C.L., Yoshigi, M., and Beckerle, M.C., *Genetic ablation of zyxin causes Mena/VASP mislocalization, increased motility, and deficits in actin remodeling.* J Cell Biol, 2006. **172**(5): p. 771-82.
 104. Cesa, C.M., Kirchgessner, N., Mayer, D., Schwarz, U.S., Hoffmann, B., and Merkel, R., *Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns.* Rev Sci Instrum, 2007. **78**(3): p. 034301.
 105. Seeger, J.M. and Klingman, N., *Improved endothelial cell seeding with cultured cells and fibronectin-coated grafts.* J Surg Res, 1985. **38**(6): p. 641-7.
 106. Hunt, M.A., Currie, M.J., Robinson, B.A., and Dachs, G.U., *Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents.* J Biomol Tech, 2010. **21**(2): p. 66-72.

107. Kirchenbüchler, D., Born, S., Kirchgessner, N., Houben, S., Hoffmann, B., and Merkel, R., *Substrate, focal adhesions, and actin filaments: a mechanical unit with a weak spot for mechanosensitive proteins*. J Phys Condens Matter, 2010. **22**(19): p. 194109.
108. Merkel, R., Kirchgessner, N., Cesa, C.M., and Hoffmann, B., *Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness*. Biophys J, 2007. **93**(9): p. 3314-23.
109. Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., and Wedlich-Soldner, R., *Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin*. Nat Methods, 2008. **5**(7): p. 605-7.
110. Bigun, J. and Granlund, G.H., *Optimal Orientation Detection of Linear Symmetry*, in *Proceedings of the IEEE First International Conference on Computer Vision : London, Great Britain 1987*. p. 433-438.
111. Scharr, H., *Optimale Operatoren in der Digitalen Bildverarbeitung (Dissertation)*, 2000, Universitätsbibliothek der Universität Heidelberg: Heidelberg.
112. Jähne, B., *Digitale Bildverarbeitung. CD-ROM, Digital image processing : concepts, algorithms, and scientific applications*, 1997, Springer: Berlin [u.a.].
113. Mizutani, T., Haga, H., and Kawabata, K., *Cellular stiffness response to external deformation: tensional homeostasis in a single fibroblast*. Cell Motil Cytoskeleton, 2004. **59**(4): p. 242-8.
114. Zigler, J.S., Jr., Lepe-Zuniga, J.L., Vistica, B., and Gery, I., *Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium*. In Vitro Cell Dev Biol, 1985. **21**(5): p. 282-7.
115. Crawford, A.W., Michelsen, J.W., and Beckerle, M.C., *An interaction between zyxin and alpha-actinin*. J Cell Biol, 1992. **116**(6): p. 1381-93.
116. Wang, J.H., Yang, G., Li, Z., and Shen, W., *Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction*. J Biomech, 2004. **37**(4): p. 573-6.

117. Neidlinger-Wilke, C., Grood, E., Claes, L., and Brand, R., *Fibroblast orientation to stretch begins within three hours*. J Orthop Res, 2002. **20**(5): p. 953-6.
118. Thodeti, C.K., Matthews, B., Ravi, A., Mammoto, A., Ghosh, K., Bracha, A.L., and Ingber, D.E., *TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling*. Circ Res, 2009. **104**(9): p. 1123-30.
119. Naruse, K., Yamada, T., and Sokabe, M., *Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 2): p. H1532-8.
120. Fuchs, E. and Cleveland, D.W., *A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease*. Science, 1998. **279**(5350): p. 514-9.
121. Versaevel, M., Grevesse, T., and Gabriele, S., *Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 671.
122. Chancellor, T.J., Lee, J., Thodeti, C.K., and Lele, T., *Actomyosin tension exerted on the nucleus through nesprin-1 connections influences endothelial cell adhesion, migration, and cyclic strain-induced reorientation*. Biophys J, 2010. **99**(1): p. 115-23.
123. Lee, C.F., Haase, C., Deguchi, S., and Kaunas, R., *Cyclic stretch-induced stress fiber dynamics - dependence on strain rate, Rho-kinase and MLCK*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **401**(3): p. 344-9.
124. Deibler, M., Spatz, J.P., and Kemkemer, R., *Actin fusion proteins alter the dynamics of mechanically induced cytoskeleton rearrangement*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e22941.
125. Zhao, L., Sang, C., Yang, C., and Zhuang, F., *Effects of stress fiber contractility on uniaxial stretch guiding mitosis orientation and stress fiber alignment*. J Biomech, 2011. **44**(13): p. 2388-94.
126. Gardner, M.K., Zanic, M., and Howard, J., *Microtubule catastrophe and rescue*. Curr Opin Cell Biol, 2012.

127. Bruneel, A., Labas, V., Mailloux, A., Sharma, S., Vinh, J., Vaubourdolle, M., and Baudin, B., *Proteomic study of human umbilical vein endothelial cells in culture*. *Proteomics*, 2003. **3**(5): p. 714-23.
128. Huang, B., Chen, S.C., and Wang, D.L., *Shear flow increases S-nitrosylation of proteins in endothelial cells*. *Cardiovasc Res*, 2009. **83**(3): p. 536-46.
129. Bershadsky, A.D., Tint, I.S., and Svitkina, T.M., *Association of intermediate filaments with vinculin-containing adhesion plaques of fibroblasts*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1987. **8**(3): p. 274-83.
130. Tsuruta, D. and Jones, J.C., *The vimentin cytoskeleton regulates focal contact size and adhesion of endothelial cells subjected to shear stress*. *J Cell Sci*, 2003. **116**(Pt 24): p. 4977-84.
131. Tran, T.C., Singleton, C., Fraley, T.S., and Greenwood, J.A., *Cysteine-rich protein 1 (CRP1) regulates actin filament bundling*. *BMC Cell Biol*, 2005. **6**: p. 45.
132. Schmeichel, K.L. and Beckerle, M.C., *LIM domains of cysteine-rich protein 1 (CRP1) are essential for its zyxin-binding function*. *Biochem J*, 1998. **331** (Pt 3): p. 885-92.
133. Li, B. and Trueb, B., *Analysis of the alpha-actinin/zyxin interaction*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33328-35.
134. Hirata, H., Tatsumi, H., and Sokabe, M., *Zyxin emerges as a key player in the mechanotransduction at cell adhesive structures*. *Commun Integr Biol*, 2008. **1**(2): p. 192-5.

8 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Rudolf Merkel dafür danken, dass ich meine Doktorarbeit im ICS-7 anfertigen konnte.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Dr. Bernd Hoffmann danke ich für die Betreuung und die vielen Ratschläge während meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt der iTea-Abteilung um Dr. Ronald Springer und Georg Dreissen für die vielen tollen Programme und die stete Hilfe bei allen mathematischen Problemen.

Simone Born danke ich für die schönen Plasmide.

Allen Kolleginnen und Kollegen im ICS-7 möchte ich für die Unterstützung während der Arbeit und die Unterhaltung zwischen der Arbeit danken. Insbesondere danke Verena Niediek und Christian Kleusch für das Korrekturlesen am Ende, die lustige Zeit im Büro und im Auto, die wissenschaftlichen Nebenprojekte, die gemeinsame musikalische Aufarbeitung des vergangenen Jahrhunderts und den Kampf um die Luftherrschaft.

Vor allem aber danke ich meinen Eltern, meiner Familie und Freunden und besonders meiner Freundin Roxana Schmidt Espinoza für die ständige Unterstützung während dieser Zeit.