

**Mechanosensorische Prozesse  
zur Erkennung und Prozessierung  
zyklischer Dehnung während der  
epithelialen Differenzierung**

**Dissertation**

zur

**Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)**

der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät**

der

**Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

vorgelegt von

**Barbara Nöthel**

aus Bonn

**Bonn, 2018**



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

1. Gutachter: PD Dr. Bernd Hoffmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Jörg Höfeld

Tag der Promotion: 02.07.2018

Erscheinungsjahr: 2018



***Für meine Eltern***



## Zusammenfassung

Die Haut stellt die wichtigste Barriere des menschlichen Körpers gegen externe Einflüsse dar. Ihre äußerste Schicht, die Epidermis, steht im direkten Kontakt zur Umgebung und ist in der Lage auf einwirkende biologische, chemische und insbesondere mechanische Reize zu reagieren. Die Aufrechterhaltung dieser Funktion beruht auf der streng regulierten Differenzierung epidermaler Zellen, welche von der Ausbildung von Zell-Matrix- hin zu spezifischen Zell-Zell-Adhäsionen begleitet ist. Störungen dieser Adhäsionen setzen die mechanische Stabilität des Gewebes drastisch herab und führen zu unterschiedlichsten Krankheitsbildern. Daher ist es essentiell, den Mechanismus der zeitlichen Bildungsabfolge unterschiedlicher Adhäsionsstrukturen und deren Zusammenhang mit mechanischen Reizen detailliert zu verstehen.

Wie mechanische Reize in differenzierenden Geweben wahrgenommen werden und welche Adhäsionsstrukturen und zytoskelettalen Komponenten an der Weiterleitung beteiligt sind, ist bislang nur unzureichend aufgeklärt. Aus diesem Grund beschäftigte sich die vorliegende Arbeit mit der Analyse der Reaktion differenzierender Zellschichten auf zyklische uniaxiale Dehnung. Dazu wurde in epidermalen Keratinozyten durch Anpassung der extrazellulären Kalziumkonzentration die Ausbildung von Zell-Zell-Adhäsionen induziert und eine zyklische uniaxiale Dehnung angelegt. Die Ausbildung der interzellulären Adhäsionen führte dabei zu einer signifikanten Verstärkung der Reorientierung des Aktinzytoskeletts senkrecht zur angelegten Zugrichtung. Der Vergleich von Einzelzellen und konfluenten Zellschichten, welche in An- und Abwesenheit von Kalzium gedehnt wurden, konnte zeigen, dass dieses Verhalten auf die Ausbildung kalziumabhängiger Adherens Junctions zurückzuführen ist. Als zentraler Bestandteil dieses Adherens Junctions-vermittelten Signalweges konnte  $\alpha$ -Catenin identifiziert werden, dessen Abwesenheit zu einer verminderten Reorientierung auch in differenzierenden Zellschichten führte. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Bindung von Vinculin an  $\alpha$ -Catenin, welche durch kooperatives Verhalten notwendig für eine maximale Verstärkung des Reorientierungsprozesses ist.

Der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Adherens-Junctions-vermittelte Mechanismus zur Aktinfaserreorientierung stellt zudem nicht nur einen weiteren Mechanismus zur

Signalerkennung und Prozessierung dar, sondern ist während der Differenzierung hauptverantwortlich für die Zellreaktion auf zyklische Dehnung. Dies zeigten die durchgeführten Experimente an Zellen mit beeinträchtigten Fokaladhäsionen. Während diese Beeinträchtigung in nicht differenzierenden Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Reorientierung führte, erfolgte die Reorientierung nach Ausbildung von Adherens Junctions genauso effizient wie in Kontrollzellen. Diese Daten konnten erstmals zeigen, dass der mechanosensitive Mechanismus während der Differenzierung epidermaler Zellen von den Zell-Matrix-Kontakten auf Aktin-gekoppelte Adherens Junctions übertragen wird.

Darüber hinaus wurde durch Änderung der Dehnungsfrequenz und Dehnungsdauer die Abhängigkeit der Reorientierung von diesen Parametern untersucht. In nicht differenzierenden Zellen führte eine schnellere Dehnung zu einer beschleunigten Reorientierung, die dabei in Abhängigkeit der Dehnungsdauer stand. Im Gegensatz dazu war die Abhängigkeit der Reorientierung von beiden Parametern in differenzierenden Zellschichten deutlich geringer und führte unabhängig von der Dehnungsfrequenz zu einer deutlich verstärkten Reorientierung hin zu  $90^\circ$ . Damit führt die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und damit einhergehende Übertragung des mechanosensitiven Mechanismus auf Adherens Junctions nicht nur zu einer beschleunigten sondern auch zu einer stärkeren Reorientierung des Aktinzytoskeletts.

Zur genaueren Analyse der unterschiedlich starken Reorientierung wurde durch Erhöhung des Querkontraktionsverhältnisses des verwendeten Substrats der *angle of zero strain* hin zu geringeren Winkeln verschoben. Sowohl in Zellen mit ausgebildeten Adherens Junctions als auch ohne konnte unter Verwendung dieser Substrate nach zyklischer Dehnung eine Verschiebung der Aktinfaserorientierung hin zu geringeren Winkeln beobachtet werden. Die Verteilung der eingenommenen Winkel war dabei für nicht differenzierende Zellschichten deutlich breiter als für differenzierende. Dies weist auf ein kooperatives Zellverhalten nach Ausbildung interzellulärer Adhäsionen hin, sodass die Reorientierung der Aktinfasern während der Differenzierung nicht mehr individuell über Fokaladhäsionen, sondern zellübergreifend und Adherens Junctions-gekoppelt reguliert ist.



# Inhaltsverzeichnis

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Aufbau der Haut und epidermale Differenzierung                     | 2         |
| 1.2      | Das Aktinzytoskelett   | 5         |
| 1.3      | Zelluläre Adhäsionsstrukturen                                      | 8         |
| 1.3.1    | Fokaladhäsionen  | 9         |
| 1.3.2    | Adherens Junctions   | 11        |
| 1.4      | Mechanosensorik  | 14        |
| 1.5      | Zielsetzung der Arbeit.  | 17        |
| <b>2</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN.</b>                                      | <b>19</b> |
| 2.1      | Verwendete Materialien   | 19        |
| 2.1.1    | Verbrauchsmaterial   | 19        |
| 2.1.2    | Chemikalien  | 20        |
| 2.1.3    | Lösungen und Puffer  | 22        |
| 2.1.4    | Zellkulturmedien   | 23        |
| 2.1.5    | Geräte und Computerprogramme.                                      | 24        |
| 2.1.6    | Antikörper und Farbstoffe.   | 26        |
| 2.1.7    | siRNAs und Sonden  | 28        |
| 2.1.8    | Übersicht aller verwendeten Zelltypen                              | 29        |
| 2.2      | Zellkultursubstrate  | 30        |
| 2.2.1    | Kreuzvernetztes Polydimethylsiloxan (PDMS) als Zellkultursubstrat. | 31        |
| 2.2.2    | Herstellung elastischer Substrate                                  | 31        |
| 2.3      | Zellkultur und Präparation der Zellen                              | 33        |
| 2.3.1    | Generierung und Kultivierung der Zellen                            | 33        |
| 2.3.2    | Kryokonservierung der Zellen                                       | 35        |
| 2.3.3    | Einbringung von siRNA und Plasmiden                                | 35        |
| 2.3.4    | Western Blot Analyse.  | 36        |
| 2.3.5    | Immunzytochemische Färbung.  | 38        |
| 2.4      | Analyse von Adhäsionsstrukturen und dem Aktinzytoskelett           | 39        |
| 2.5      | Durchführung von Dehnungsexperimenten                              | 41        |
| 2.6      | Analyse der dehnungsinduzierten Aktinreorientierung                | 45        |

|          |   |            |
|----------|---|------------|
| 2.7      | Statistische Analysen . . . . .   | 46         |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE.</b> . . . . .  | <b>49</b>  |
| 3.1      | Einfluss von Kalzium auf Adhäsionsstrukturen und Zytoskelett . . . . .              | 49         |
| 3.2      | Adhäsionsstrukturen und Aktinzytoskelett unter Dehnung . . . . .                    | 55         |
| 3.3      | Einfluss von Vinculin auf die Aktinfaserreorientierung . . . . .                    | 60         |
| 3.4      | Einfluss von Fokaladhäsionen auf die Aktinfaserreorientierung . . . . .             | 61         |
| 3.5      | Einfluss der Zelldichte auf die Reorientierung . . . . .                            | 64         |
| 3.6      | Einfluss von Adherens Junctions auf die Aktinreorientierung . . . . .               | 66         |
| 3.6.1    | Reorientierungsverhalten in E-Cadherin-freien Zellen . . . . .                      | 66         |
| 3.6.2    | Cadherin-Expression in E-Cadherin-freien Zellen . . . . .                           | 68         |
| 3.6.3    | Reduktion von P-Cadherin in E-Cadherin-freien Zellen. . . . .                       | 71         |
| 3.7      | Einfluss von $\alpha$ -Catenin auf das Reorientierungsverhalten . . . . .           | 73         |
| 3.7.1    | Reduktion von $\alpha$ -Catenin in E-Cadherin-freien Zellen . . . . .               | 73         |
| 3.7.2    | Reduktion von $\alpha$ -Catenin in Vinculin-freien Zellen . . . . .                 | 75         |
| 3.7.3    | Einfluss der Vinculin-Bindedomäne in $\alpha$ -Catenin auf die Reorientierung       | 76         |
| 3.8      | Frequenzabhängigkeit des Reorientierungsprozesses . . . . .                         | 79         |
| 3.8.1    | Frequenzabhängigkeit in Vinc <sup>Ctrl</sup> -Zellen ohne Kalziumeinfluss . . . . . | 79         |
| 3.8.2    | Frequenzabhängigkeit unter Einfluss von Kalzium . . . . .                           | 81         |
| 3.8.3    | Frequenzabhängigkeit in Abwesenheit von Adherens Junctions . . . . .                | 84         |
| 3.9      | Einfluss des Reifegrades von Adherens Junction . . . . .                            | 90         |
| 3.10     | Analyse des bevorzugten Reorientierungswinkels. . . . .                             | 92         |
| <b>4</b> | <b>DISKUSSION.</b> . . . . .  | <b>97</b>  |
| 4.1      | Intrazelluläre Umstrukturierungsprozesse in Abhängigkeit von Kalzium. . . . .       | 97         |
| 4.2      | Mechanosensitive Mechanismen in differenzierenden Keratinozyten . . . . .           | 99         |
| 4.3      | Kalziumabhängige maximale Faserorientierung . . . . .                               | 107        |
| <b>5</b> | <b>AUSBLICK.</b> . . . . .  | <b>113</b> |
|          | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> . . . . .   | <b>115</b> |
|          | <b>APPENDIX.</b> . . . . .  | <b>129</b> |

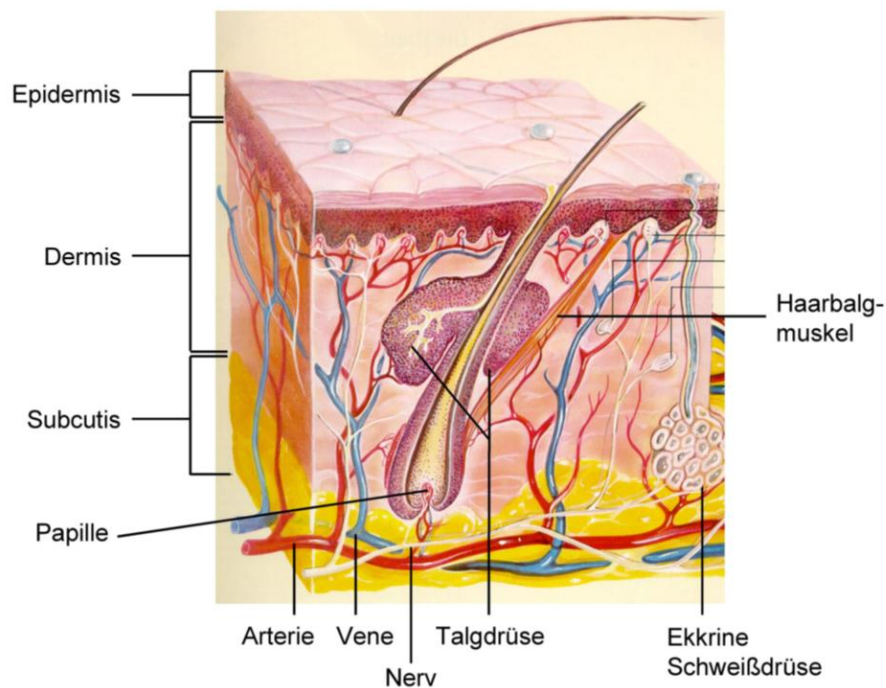
# 1 Einleitung

Die Haut ist das größte Organ des menschlichen Körpers und essentiell für die Abwehr externer Einflüsse. Sie schützt die innenliegenden Organe einer Vielzahl mechanischer, biologischer sowie chemischer Belastungen und reguliert den Wasser- und Temperaturhaushalt des Körpers. Ihre Anpassungsfähigkeit und Dynamik beruht dabei auf ihrem Aufbau aus verschiedenen Schichten. Insbesondere der äußersten Schicht, der Epidermis, kommt dabei eine wichtige Aufgabe als direkte Verbindung zur Umgebung zu. Der korrekte epidermale Aufbau aus Keratinozyten, den Hautzellen, ist dabei essentiell und zeichnet sich durch eine strenge Regulation des intrazellulären Zytoskeletts und der Adhäsionen zum Substrat sowie zu benachbarten Zellen aus.

Es ist bereits bekannt, dass Veränderungen dieser Adhäsionsstrukturen die Tumorbildung und Metastasierung begünstigen, den Schutz vor Wasserverlust herabsetzen sowie zu einer Reihe weiterer schwerwiegender Erkrankungen führen können. Das durch Mutationen und Störungen der Adhäsionen beeinträchtigte fragile Gewebe kann externe mechanische Reize häufig nur unzureichend verarbeiten. Solche mechanischen Belastungen treten häufig in Form von Dehnungsreizen auf. Die Reaktionen auf diese Form mechanischer Reize konnte für Einzelzellen bereits gezeigt werden. Hierbei findet eine Anpassung des Zytoskeletts hauptsächlich über die Zell-Matrix-Adhäsionen der Zellen an ein Substrat statt. Die Antwort differenzierender epithelialer Zellschichten auf solche Dehnungsreize ist hingegen nur unzureichend analysiert. Im Gegensatz zu Einzelzellen weisen sie interzelluläre Adhäsionen auf, welche ebenfalls mit dem Zytoskelett assoziiert sind. Es liegt nahe, dass zur Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität auch diese Adhäsionskomplexe ein mechanosensitives Verhalten aufweisen könnten. Daher stand in der vorliegenden Arbeit die vergleichende Analyse von differenzierenden und nicht differenzierenden Zellschichten unter zyklischer Dehnung im Fokus. Dies erlaubte die Annäherung der experimentellen Bedingungen an den *in vivo* vorliegenden Aufbau der basalen Schicht der Epidermis und die Analyse des Verhaltens von Zellschichten unter mechanischer Belastung.

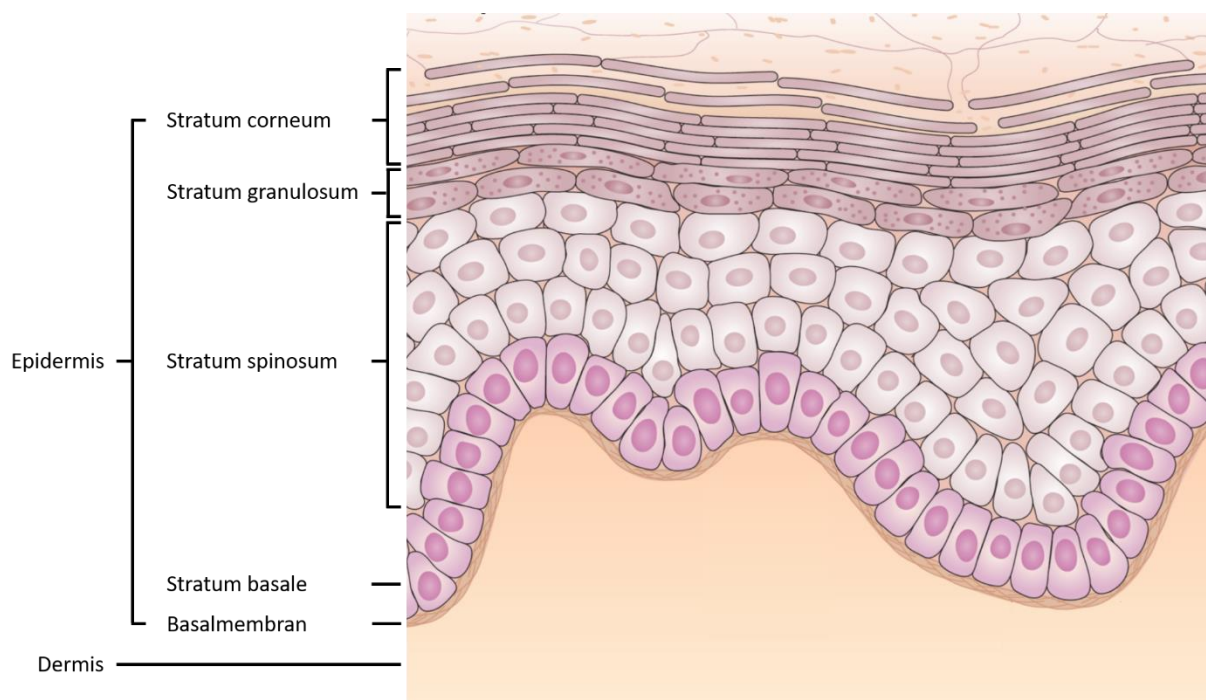
## 1.1 Aufbau der Haut und epidermale Differenzierung

Die Haut steht im ständigen Kontakt zu ihrer Umgebung und bildet die wichtigste Schutzschicht des Körpers vor externen Einflüssen. Durch ihren Aufbau und ihre Eigenschaften ist sie in der Lage auf biologische, mechanische, chemische und thermische Reize zu reagieren und die Integrität des Gewebes zu gewährleisten [1]. Dabei erfüllen die verschiedenen Schichten der Haut unterschiedliche Aufgaben. Die unterste Hautschicht, die Subcutis (Unterhaut), besteht überwiegend aus Fettzellen, wodurch sie als Fettspeicher dient und die Haut mit tiefer liegenden Geweben wie Muskeln und Knochen verbindet (Abbildung 1) [2]. In der darüber liegenden Schicht, der Dermis (Lederhaut), befinden sich Blutgefäße, Mechanorezeptoren, Haarfollikel sowie Schweiß- und Talgdrüsen. Sie versorgt die äußerste Hautschicht, die Epidermis (Oberhaut), da diese selbst keine Blutgefäße besitzt [2].



**Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Haut.** Dargestellt sind die drei Hautschichten Subcutis, Dermis und Epidermis sowie in diese Schichten eingelagerte Blutgefäße, Drüsen, Haarfollikel, Muskeln und Nerven. Verändert nach [3].

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel und als äußerste Schicht der Haut die wichtigste Barriere zum Schutz der darunter liegenden Gewebe. Sie ist in der Lage zur Selbsterneuerung und dadurch hoch dynamisch und anpassungsfähig [4]. Etwa 90-95% der Zellen der Epidermis sind Keratinozyten, welche während der Migration durch die Schichten der Epidermis kontinuierlich einen fortschreitenden Differenzierungsprozess durchlaufen [2]. Durch die Differenzierungsgrade der Keratinozyten kann die Epidermis selbst in mehrere Schichten unterteilt werden [2, 5] (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der epidermalen Hautschichten.** Die Epidermis liegt der Dermis auf und kann durch die Differenzierungsgrade der Keratinozyten in vier Schichten eingeteilt werden. Verändert nach [6].

Die unterste Schicht ist das Stratum basale (Basalschicht), in welchem die Keratinozyten durch Zellteilung epidermaler Stammzellen gebildet werden. Die Zellen dieser Schicht sind über Zell-Matrix-Kontakte an die unter ihnen liegende Basalmembran gebunden und bilden durch Proliferation die Grundlage zur Selbsterneuerung der Epidermis [7]. Die Migration der Zellen aus der Basalschicht durch die darüber liegenden Schichten hin zur Hautoberfläche ist begleitet vom Verlust der Teilungsfähigkeit der Keratinozyten und

einer voranschreitenden Differenzierung. Zunächst gelangen die Keratinozyten durch asymmetrische Zellteilung vom Stratum basale in das Stratum spinosum (Stachelzellschicht), in welchem die Zellen an Volumen zunehmen und stabile Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Im folgenden Stratum granulosum (Körnerzellschicht) zeichnen sich die Keratinozyten durch Anhäufungen von Keratingranular aus. Sie weisen eine flachere Morphologie als in den unteren Schichten auf und bilden eine wasserundurchlässige, keratinisierte Hülle aus. Dieser Verhornungsprozess setzt sich fort, indem lysosomale Enzyme freigesetzt werden, welche den Abbau der Zellorganellen induzieren. Die abgestorbenen und vollständig verhornten Zellen bilden die äußerste Schicht der Epidermis, das Stratum corneum (Hornschicht) (Abbildung 2).

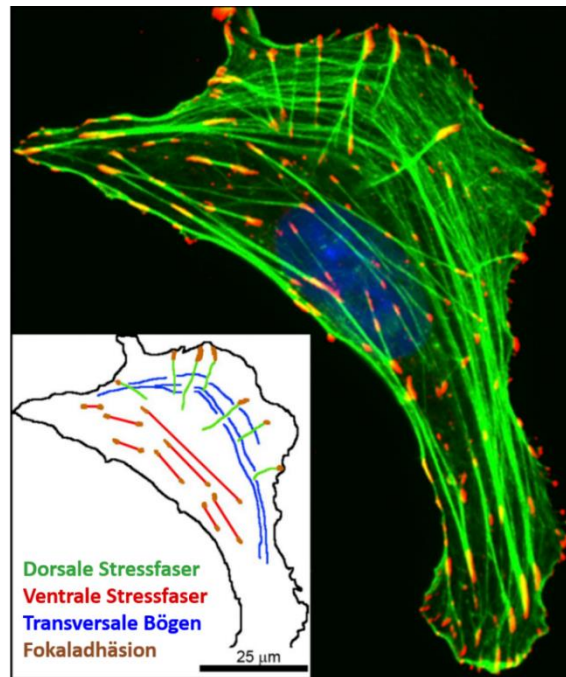
Die Proliferation der basalen Zellen ebenso wie der Prozess der Differenzierung von Keratinozyten ist streng reguliert. Die unterschiedlichen Stadien der Differenzierung zeichnen sich dabei durch charakteristische Expressionsmuster verschiedener Proteine sowie das Vorhandensein spezifischer Adhäsionsstrukturen aus [8]. Hauptverantwortlich dafür ist ein intrazellulärer Kalziumgradient, welcher vom mitotisch aktiven Stratum basale hin zu den oberen antimitotischen Schichten des Stratum granulosum ansteigt [9]. Eine fehlerhafte Expression oder Funktion der Proteine ebenso wie eine fehlerhafte Regulation des Kalziumgradienten hat die Ausbildung verschiedener Krankheitsbilder bis hin zu letalen Phänotypen zur Folge [9]. Zur Untersuchung solcher Einflüsse kann das System der kalziumabhängigen Differenzierung in eine *in vitro* Umgebung übertragen werden [10, 11]. Dazu wurden epidermale Keratinozyten in Zellkulturmedien mit unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen inkubiert. Dabei simuliert eine Konzentration von unter 0,05 mM die Umgebung im Stratum basale, in welcher die Zellen mitotisch aktiv sind, eine hohe Proliferationsrate vorliegt und kaum interzelluläre Kontakte ausgebildet werden [10, 12]. Durch Erhöhung der Konzentration auf über 1 mM begannen die Keratinozyten auch *in vitro* zu differenzieren. Sie zeichneten sich unter diesen Kulturbedingungen durch die Ausbildung interzellulärer Adhäsionen bei gleichzeitiger Reduktion von Zell-Matrix-Kontakten aus und wiesen eine stark verringerte Proliferationsrate auf.

## 1.2 Das Aktinzytoskelett

Die Differenzierung von Keratinozyten geht *in vivo* und *in vitro* mit einer Veränderung zellulärer Strukturen einher. Diese betreffen neben einer streng regulierten Proteinexpression sowohl die Ausbildung spezifischer Adhäsionsstrukturen als auch die Organisation des Zytoskeletts [10, 12-14]. Das Zytoskelett in eukaryotischen Zellen besteht aus den Systemen der Mikrofilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente, welche an Vorgängen wie Migration, Zellteilung oder intrazellulären Transportmechanismen beteiligt sind [15, 16]. Sie bilden ein komplexes und hochdynamisches Proteinnetzwerk innerhalb der Zellen und sind verantwortlich für die Formgebung und mechanischen Eigenschaften der Zellen. Durch kontinuierliche Auf- und Abbauprozesse sichern sie die Anpassungsfähigkeit der Zellen auf einwirkende Reize sowie die Aufrechterhaltung der mechanischen Homöostase.

In dieser Arbeit liegt das Augenmerk auf Analysen der Mikrofilamente bzw. des Aktinzytoskeletts. Dieses ist aus dem Protein Aktin aufgebaut und durchspannt als Netzwerk die gesamte Zelle, verleiht ihr Stabilität und ist hauptverantwortlich für die Kraftgenerierung von Zellen sowie migratorische und insbesondere mechanosensorische Prozesse [17, 18]. Aktin liegt in der Zelle zunächst in Form von globulären Monomeren (G-Aktin) vor, welche sich durch eine Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Polymerisation zu filamentösem Aktin (F-Aktin) anordnen. Durch weitere Bündelung von Aktinfasern durch verschiedene Kreuzvernetzer wie  $\alpha$ -Actinin, Fascin oder Filamin entstehen sogenannte Stressfasern, welche sich aus 10-30 Einzelfilamenten zusammensetzen [19-22]. Dieser Vorgang wird hauptsächlich durch RhoA, welches zu der Rho-Familie kleiner GTPasen gehört, induziert [23, 24]. Die Aktivierung der Rho Kinase I durch RhoA führt dabei zu Phosphorylierungsprozessen der Myosin leichten Kette, sodass Myosin aktiviert wird [25]. Myosin ist ein Motorprotein, welches zwischen die Aktinfasern eingelagert wird und so zur weiteren Bündelung der Filamente zu Stressfasern beiträgt [26, 27]. Weiterhin induziert die Einlagerung von Myosin die Kontraktion der Stressfasern durch Verschiebung der Filamente gegeneinander und erlaubt so die Generierung intrazellulärer Kräfte [22]. Durch die Lage innerhalb der Zelle sowie der Assoziation zu Fokaladhäsionen, Aktin-gekoppelten Zell-Matrix-Adhäsionen,

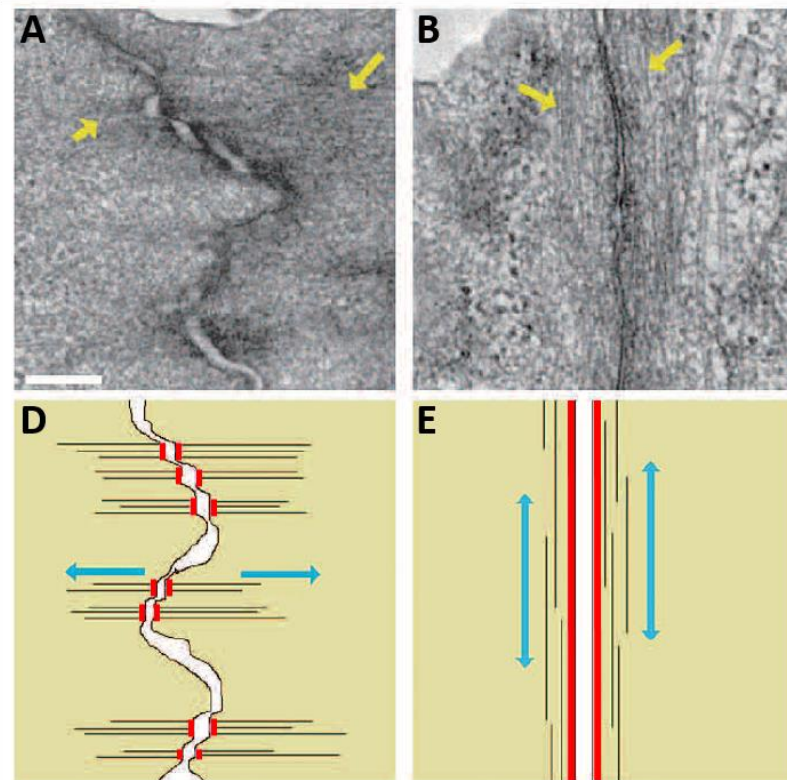
können verschiedene Typen von Stressfasern unterschieden werden (Abbildung 3) [22, 28, 29].



**Abbildung 3: Stressfasern in Einzelzellen.** Stressfasern werden entsprechend ihrer Lokalisation in Transversalbögen, ventrale und dorsale Stressfasern eingeteilt, welche zum Teil mit Fokaladhäsionen assoziiert sind. Die Immunfluoreszenzaufnahme zeigt das Aktinzytoskelett (grün) und die Fokaladhäsionen (rot) sowie der Nucleus (blau) einer U2OS-Einzelle. Das Schema zeigt die Lokalisation der unterschiedlichen Stressfasertypen innerhalb einer Zelle. Verändert nach [29].

So liegen speziell in migrierenden Zellen transversale Bögen vor, welche parallel zur Lamelle verlaufen und mit den freien Enden der dorsalen Fasern assoziiert sind. Die dorsalen ebenso wie die ventralen Stressfasern sind an ihren Enden hingegen mit mindestens einer Fokaladhäsion, Aktin-gekoppelten Zell-Matrix-Verbindungen, assoziiert [28, 30]. Ebenso wurde beschrieben, dass diese Stressfasern mit Adherens Junctions, Aktin-assoziierten Zell-Zell-Adhäsionen, verbunden sind und so eine indirekte zellübergreifende Kopplung von Stressfasern induzieren [31, 32]. Adherens Junctions unterliegen dabei selbst einem Reifungsprozess, welcher die Lokalisation der Aktinfasern beeinflusst (Abbildung 4).



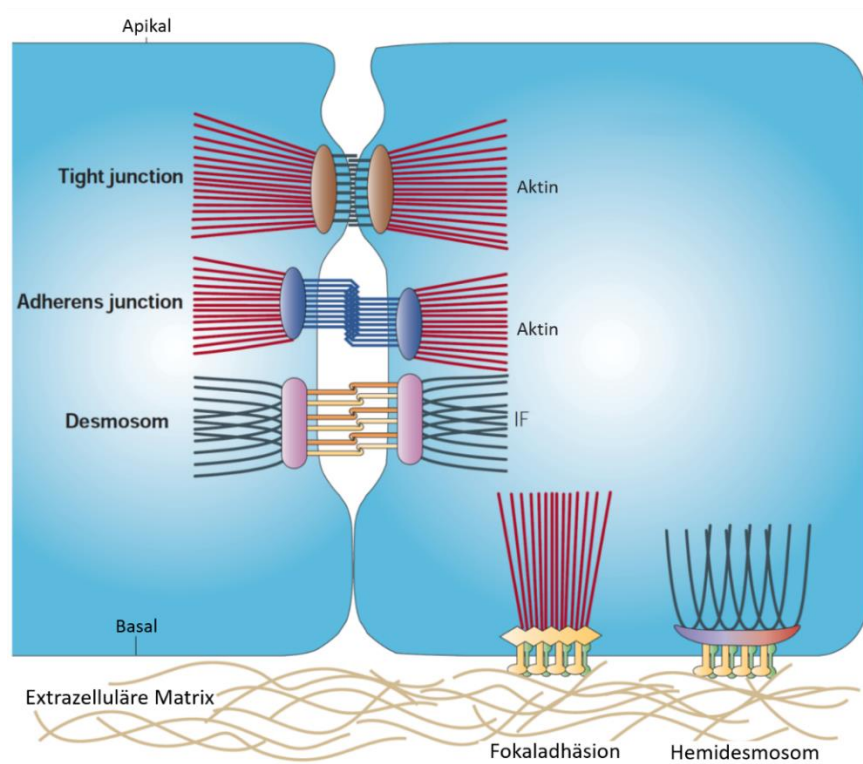


**Abbildung 4: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und schematische Darstellung der Assoziation von Aktinfasern und Adherens Junctions.** Gelbe Pfeile weisen auf Aktinfasern hin, blaue Pfeile geben die Orientierung der Aktinfasern wieder, rote Bereiche geben die Lokalisierung der Adherens Junctions an. **(A, B)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen mit interzellulären Kontakten. **(D, E)** Schematische Darstellung der Aktinfaserlokalisierung an Adherens Junctions. **(A, D)** Die Bildung der Adherens Junctions beginnt mit der Ausbildung punktförmiger Kontakte, an welche radiale Aktinfasern gebunden werden. **(B, E)** Die Reifung der Adherens Junctions führt zur Umlagerung paralleler Aktinfasern entlang der Zellmembran. Der Maßstab beträgt 200 nm. Verändert nach [33].

Der Adhäsionskomplex ist zunächst an radiale Actomyosin-Bündel gebunden, welche in einer senkrechten Anordnung relativ zur Zellmembran lokalisiert sind (Abbildung 4 A, D). Durch die Reifung des Komplexes werden Aktin-modulierende Proteine wie Vinculin, Zyxin, Formin oder Bestandteile des Arp2/3 Komplexes an diesen angelagert, wodurch eine Umorganisation der Aktinfasern hin zu einer parallelen Bündelung induziert wird (Abbildung 4 B, E). Die Bindung an das kontraktile Actomyosin-Netzwerk führt zur Stabilisierung des Adhäsionskomplexes und der Ausbildung eines kortikalen Aktinringürtels, welcher entlang der Zellmembranen in der apikalen Ebene der Zellen verläuft [33, 34].

### 1.3 Zelluläre Adhäsionsstrukturen

Für die Aufrechterhaltung ihrer Funktion ist es für Zellen essentiell, spezifische Adhäsionen sowohl zu ihrem Untergrund als auch zu anderen Zellen auszubilden. Dies ermöglicht die Ausbildung von mehrzelligen Geweben und Organen, die gezielte Migration von Zellen innerhalb solcher komplexen Strukturen und die Wahrnehmung ihrer Umgebung. Zudem können Zellen durch diese Anheftungen dynamisch auf die Eigenschaften des Substrats oder benachbarte Zellen reagieren [35-37]. Unterschieden werden verschiedene Adhäsionen entsprechend ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle und der Assoziation zu verschiedenen Teilen des Zytoskeletts. Zell-Matrix-Kontakte verbinden dabei die Zelle mit ihrem Substrat, während Zell-Zell-Kontakte benachbarte Zellen miteinander verbinden [37-39]. Die gebildeten Kontakte sind dabei häufig mit zytoskelettalen Systemen assoziiert, wie beispielsweise die Aktin-gekoppelten Fokaladhäsionen, Adherens Junctions und Tight Junctions und die Intermediärfilament (IF)-gekoppelten Hemidesmosomen und Desmosomen (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung von Adhäsionsstrukturen.** Zellen können sowohl zu ihrem Substrat als auch zu umgebenden Zellen Adhäsionen ausbilden. Diese unterscheiden sich in ihrer Proteinzusammensetzung und der Assoziation mit unterschiedlichen Systemen des Zytoskeletts. Verändert nach [40].

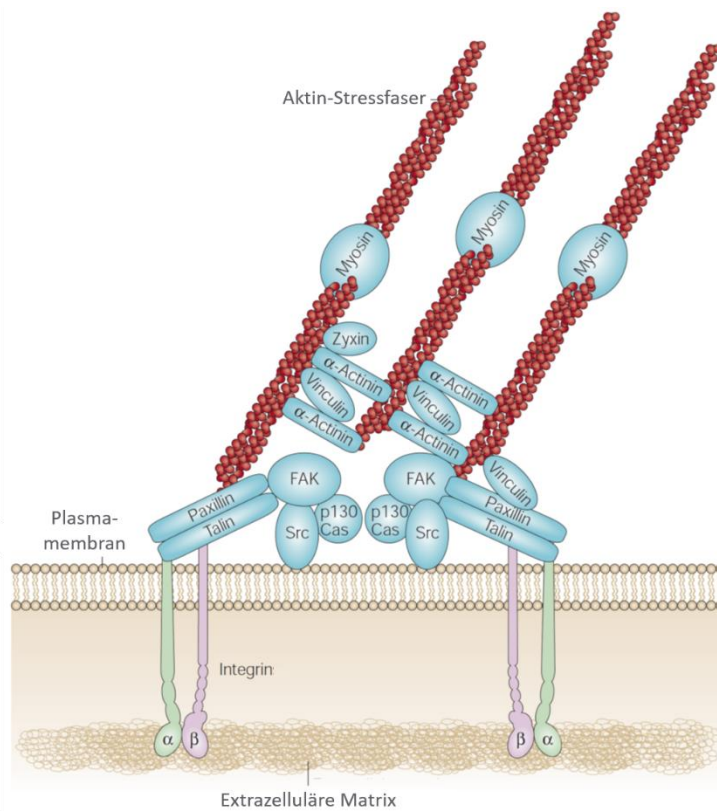
Die Ausbildung und Auflösung solcher Adhäsionen ist ein kontinuierlich ablaufender Prozess, der insbesondere während der Differenzierung von Keratinozyten in einem bestehenden Gewebe streng kontrolliert wird [36]. Änderungen innerhalb der Adhäsion oder Ausbildung neuer Adhäsionsstrukturen gehen dabei einher mit Änderungen im jeweils assoziierten zytoskelettalen Netzwerk [10, 12-14]. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der detaillierten Analyse von Aktin-assoziierten Fokaladhäsionen und Adherens Junctions.

### **1.3.1 Fokaladhäsionen**

Die Wahrnehmung und Interaktion mit der Umgebung ist essentiell für adhärenzte Zellen, um Zellfunktion und Integrität mehrzelliger Gewebe zu gewährleisten. Die Substrat-Adhäsion erfolgt dabei zu einer extrazellulären Matrix, in welcher verschiedenste Proteine eine Anheftung ermöglichen. Entsprechend der Liganden werden verschiedene Formen von Adhäsionen ausgebildet. So führt die Erkennung von Kollagenen oder Laminin zur Ausbildung von Intermediärfilament-gekoppelten Hemidesmosomen, während die Erkennung von Fibronektin zur Ausbildung von Aktin-assoziierten Fokaladhäsionen führt [41, 42].

Fokaladhäsionen stellen eine der bedeutendsten Adhäsionsformen für verschiedenste Zelltypen dar [43-45]. Grundlage für die Ausbildung von Fokaladhäsionen sind transmembrane Integrine, welche Liganden der extrazellulären Matrix mit dem intrazellulären Aktinzytoskelett verbinden. Integrine lagern sich zunächst zu nicht kovalent gebundenen Heterodimeren zusammen, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Durch die Kombination aus den 18  $\alpha$ - sowie 8  $\beta$ -Untereinheiten entstehen 24 bislang bekannte funktionale Kombinationen, welche substratspezifische Bindungseigenschaften aufweisen [46-49]. Die extrazelluläre Bindung an Substratliganden induziert eine lokale Anhäufung weiterer Integrine während intrazellulär der Aufbau eines Proteinkomplexes induziert wird. Dieser vermittelt die Kopplung an das Aktinzytoskelett, reguliert die weitere Reifung oder Umbauprozesse und ist für eine Vielzahl weitergehender Signalkaskaden verantwortlich. Bis zu 150

verschiedene Proteine sind an diesen Auf- und Umbauprozessen beteiligt, wobei sich die spezifische Proteinzusammensetzung entsprechend des Reifegrades der Fokaladhäsion und der mechanischen Einflüsse unterscheidet. Eines der ersten und zentralen Proteine bei der Bildung und Reifung von Fokaladhäsionen ist Talin (Abbildung 6) [50, 51].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung einiger am Aufbau von Fokaladhäsionen beteiligter Proteine.** Aktinfasern werden über einen Komplex aus Proteinen mit der extrazellulären Matrix verbunden. Dabei dienen die transmembranen Integrine der Vermittlung zwischen extrazellulären Liganden und dem intrazellulären Proteinkomplex. Verändert nach [52].

Es besitzt Bindestellen für  $\beta$ -Integrine sowie für Aktin, sodass es als direkte Verbindung zwischen Adhäsion und Zytoskelett fungieren kann. Darüber hinaus besitzt es neben Phosphorylierungsstellen und regulatorischen Domänen ebenfalls Bindestellen für weitere Proteine, insbesondere mehrere Domänen zur Anlagerung von Vinculin [53-56]. Diese sind zunächst für Vinculin nicht zugänglich und werden erst durch die Bindung von Talin an das kontraktile Actomyosin-Netzwerk geöffnet. Diese Konformationsänderung erlaubt die Anlagerung von Vinculin an Talin, wodurch der Komplex stabilisiert wird. Eine Bindung von Vinculin an die assoziierten Aktinfasern führt zur weiteren Reifung der

Fokaladhäsion sowie durch Konformationsänderung zu einer Freilegung verschiedener Bindedomänen für weitere Proteine wie beispielsweise Paxillin [57-60]. Dieses ist wiederum selbst durch Phosphorylierungen und Bindung weiterer Proteine in den Aufbau und die Reifung der Adhäsionen involviert [61, 62]. Während dieser Reifung unterliegt die Adhäsion einem kontinuierlichen Umbauprozess, in welchem einige Proteine wie Zyxin vermehrt angelagert werden und andere Proteine wie Vinculin nicht länger detektierbar sind. Ebenso erfolgen eine Reihe spezifischer Phosphorylierungen, welche der Rekrutierung weiterer Proteine, aber auch der Induktion von Signalwegen dienen [63].

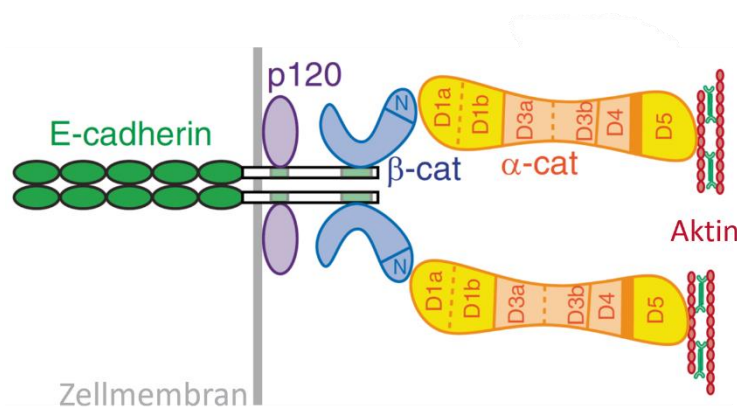
### **1.3.2 Adherens Junctions**

Für die Ausbildung mehrzelliger Gewebe ist die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten erforderlich. Sie gewährleisten in Epithelien die Ausbildung einer intakten Barriere, sind verantwortlich für die korrekte Positionierung der Zellen im Gewebe und erlauben es den Zellen, in direkter Verbindung zueinander zu stehen. Für Defekte in diesen Kontakten, insbesondere den Aktin-gekoppelten Adherens Junctions, konnten bereits Zusammenhänge zu verschiedenen Haut- und Haarkrankheiten, Krebserkrankungen und entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen werden [64-67].

Das zentrale Protein der Aktin-assoziierten Adherens Junctions ist E-Cadherin (epitheliales Cadherin). Es stammt aus der Familie der klassischen Cadherine, zu welcher neben N- (neuronales Cadherin) und VE-Cadherin (vaskulär-endotheliales Cadherin) auch P-Cadherin (plazentares Cadherin) gehört. Für letzteres wurde ebenfalls eine Expression in basalen Schichten von Epithelien und eine Hochregulation in Abwesenheit von E-Cadherin gezeigt [68]. Cadherine sind als Homodimere aufgebaut und besitzen einen dreigeteilten Aufbau aus einer intrazellulären, einer transmembranen und einer extrazellulären Domäne [34]. Die extrazelluläre Domäne besteht dabei aus fünf sich wiederholenden Sequenzen, welche Bindungsstellen für Kalziumionen aufweisen. In Abwesenheit von Kalziumionen unterliegen die extrazellulären Domänen proteolytischen Abbauprozessen, sodass es nicht zu einer Stabilisierung der Adherens Junctions kommt

[34, 69]. In Anwesenheit der Ionen werden diese hingegen an die extrazellulären Domänen angelagert, wodurch diese eine Konformationsänderung und Stabilisierung erfahren und eine homophile Bindung an Domänen benachbarter Zellen eingehen können.

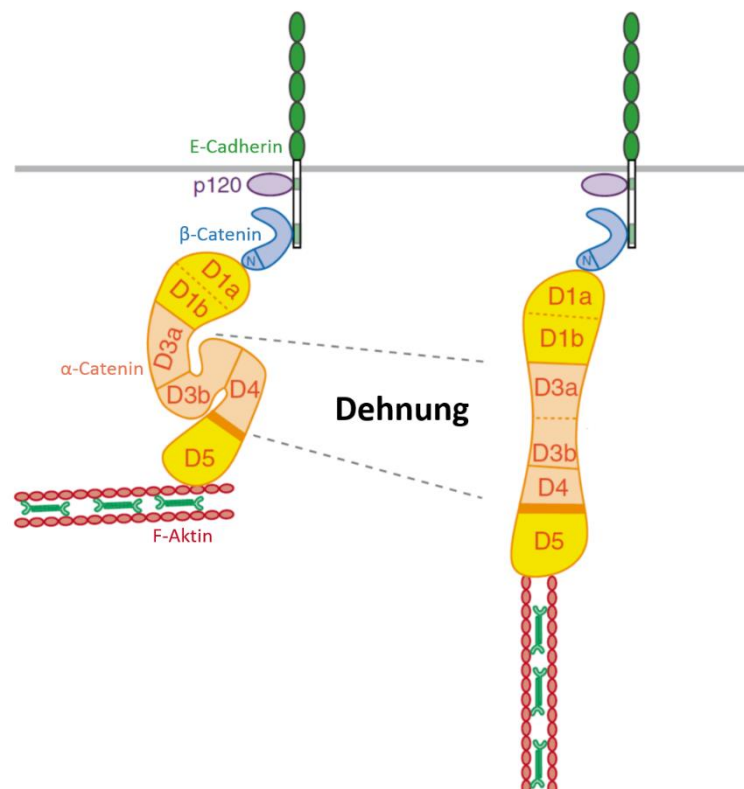
An der intrazellulären Domäne des E-Cadherins wird ein Komplex aus Proteinen der Catenin-Familie angelagert und so eine Assoziation zum Aktinzytoskelett hergestellt. An die juxtamembrane Region bindet dabei das Protein p120-Catenin, welches die Adhäsion an der Zelloberfläche stabilisiert und regulatorische Signalkaskaden induziert (Abbildung 7) [70-72].  $\beta$ -Catenin ist am C-terminalen Bereich der intrazellulären Domäne angelagert und essentiell für eine vollständige und stabile Adhäsion durch die Bindung des Aktin-assoziierten  $\alpha$ -Catenin [34].



**Abbildung 7: Schematische Darstellung von Adherens Junctions.** Das transmembrane E-Cadherin formt ein Dimer, wodurch die extrazellulären Domänen mit denen benachbarter Zellen interagieren können. Intrazellulär wird ein Proteinkomplex aus p120-Catenin,  $\beta$ -Catenin sowie  $\alpha$ -Catenin an E-Cadherin angelagert, welcher dieses mit dem Aktinzytoskelett assoziiert. Verändert nach [34].

Als zentraler Bestandteil von Adherens Junctions ist  $\alpha$ -Catenin aus verschiedenen Domänen aufgebaut, welche der Bindung weiterer Proteine dient. Die erste Domäne (D1a und D1b) bieten die Bindestellen für  $\beta$ -Catenin. Die zweite Domäne (D3a und D3b) erlaubt die Bindung von Vinculin und  $\alpha$ -Actinin, die dritte Domäne (D4) ist Bindestelle für Afadin und die vierte Domäne (D5) bindet Aktinfilamente. Die tatsächliche Assoziation von  $\alpha$ -Catenin zum Aktinzytoskelett ist dabei noch nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte

zunächst gezeigt werden, dass  $\alpha$ -Catenin *in vitro* sowohl Komplexe mit  $\beta$ -Catenin als auch mit F-Aktin bildeten, ein direkter Nachweis der simultanen Bindung aller Proteine konnte jedoch nicht gezeigt werden [73, 74]. Aktuelle Studien geben Hinweise auf eine direkte Kopplung des Adhäsionskomplexes mit dem Aktinzytoskelett. Die Gruppe um Buckley führte dazu Experimente unter Zuhilfenahme von Dipolfallen durch und zeigten, dass der minimale Cadherin-Catenin-Komplex stabile Verbindungen zum Aktinzytoskelett aufbaut, sofern diese unter Spannung stehen [75]. Die Erklärung liefert ein Catch-Bond Verhalten, was zu einer stabilen Bindung der Proteine unter Krafteinwirkung führt. Diese Krafteinwirkung führt zudem ebenfalls zu einer Änderung der Konformation von  $\alpha$ -Catenin. Während es zunächst in geschlossener Konformation vorliegt, führt die Dehnung durch das Actomyosin-System zur Auffaltung der zweiten und dritten Domäne, wodurch die Bindestellen für Vinculin und weitere Aktin-regulierende Proteine freigegeben werden.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Konformationsänderung von  $\alpha$ -Catenin.** Unter Dehnung wird das an den Cadherin-Catenin-Komplex gebundene  $\alpha$ -Catenin aufgefaltete, sodass es zur Freilegung weiterer Bindedomänen für verschiedene Aktin-modulierende Proteine kommt. Verändert nach [34].

Aufgrund der spannungsabhängigen Konformationsänderung fungiert  $\alpha$ -Catenin als mechanosensitives Protein in Adherens Junctions und bietet durch die Assoziation mit weiteren Aktin-modulierenden Proteinen die Möglichkeit, Kräfte zwischen den benachbarten Zellen zu übertragen [76-78]. Besonders relevant ist in diesem Zusammenhang das Protein Vinculin. Es wurde bereits als Bestandteil von Fokaladhäsionen beschrieben, wo es an Auf- und Umbau der Adhäsion beteiligt ist und durch spannungsabhängige Konformationsänderung die Bindung weiterer Proteine erlaubt [57-60]. Auch in Adherens Junctions ist es durch seine Anlagerung an aufgefaltetes  $\alpha$ -Catenin eine wichtige Verbindung zwischen dem Adhäsionskomplex und dem Aktin-Zytoskelett [79, 80]. Die Rekrutierung von Vinculin an die Zell-Zell-Kontakte beruht dabei auf Phosphorylierungen im Protein selbst sowie die Bindung an sowohl  $\alpha$ -Catenin als auch  $\beta$ -Catenin, da beide Proteine Bindestellen für Vinculin aufweisen [81, 82]. Zudem erfährt es durch die gleichzeitige Bindung an den Adhäsionskomplex und das Actomyosin-Netzwerk eine zur Öffnung der Struktur führende Dehnung, wodurch die Anlagerung weiterer Bindepartner erfolgt [34]. Diese können häufig ebenfalls an das Aktinnetzwerk binden, wodurch eine Verstärkung des gesamten Komplexes induziert wird.

### 1.4 Mechanosensorik

Die Zellen eines Gewebes sind permanent mechanischen Reizen insbesondere in Form von Dehnung ausgesetzt. Dabei variieren je nach Gewebe sowohl Frequenz als auch Amplitude der einwirkenden Dehnungsimpulse und rufen spezifische Zellantworten hervor. So führt eine statische Dehnung, wie sie bei Wachstumsvorgängen in Knochen vorliegen, zu einer Orientierung der Zellkörper entlang der Dehnungsrichtung. Zyklische Dehnung führt hingegen zu einer nahezu senkrechten Ausrichtung der Zellen relativ zur Zugrichtung.

Dieses Zellverhalten konnte ebenfalls unter *in vitro* Bedingungen an Einzelzellen mit Hilfe von elastischen Zellkultursubstraten gezeigt werden. Die wiederholte Dehnung oberhalb von Grenzwerten für Frequenz und Amplitude des Dehnungsreizes induzierte eine



Reorientierung des Zellkörpers sowie des Aktinzytoskeletts nahezu rechtwinklig zur Zugrichtung [83-87]. Erforderlich für diese Reaktion ist unabhängig vom analysierten Zelltyp eine Mindestdehnung der Zelle von 3-4% [84, 88, 89]. Dieses Zellverhalten dient dazu, der Deformation auszuweichen und den Zustand einer mechanischen Homöostase aufrechtzuerhalten [90]. Systematische Experimente von Faust et al. konnten dabei zeigen, dass eine Reorientierung des Aktinzytoskeletts hin zu einem Winkel mit geringster Dehnungsbelastung geschieht (engl. *angle of zero strain*) [83]. Der genaue Winkel hängt dabei von der Substratgeometrie und dem daraus resultierenden Querkontraktionsverhältnis ab. Ein solches Verhalten konnte insbesondere unter Verwendung niedriger Dehnungsfrequenzen unterhalb von 0,5 mHz beobachtet werden, während Frequenzen oberhalb von 0,5 Hz sowohl zu einer schnelleren Reorientierung als auch zu einer stärkeren Orientierung hin zu 90° führten [85, 87, 91]. Dies legt einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Reorientierungsstärke und angelegter Frequenz, sowie eine spezifische zeitliche Regulation des Reorientierungsprozesses nahe.

Der genaue zugrunde liegende Mechanismus des Reorientierungsverhaltens ist bislang nicht vollständig aufgeklärt, es werden jedoch verschiedene Möglichkeiten zur Wahrnehmung und Weiterleitung der Dehnungsreize diskutiert. Einen möglichen Mechanismus stellen dabei spannungsabhängige Kalziumkanäle dar, welche an das Aktinzytoskelett gekoppelt sind und durch Öffnung einen Kalziumeinstrom bewirken. Eine zentrale Beteiligung dieses Mechanismus für die Reorientierung des Aktinzytoskeletts konnte allerdings nicht gezeigt werden [87, 92]. Einen weiteren möglichen Mechanismus zur Reizweiterleitung stellen die Aktinfasern selbst dar, beziehungsweise die unterschiedliche Affinität stabilisierender und destabilisierender Proteine in Abhängigkeit der Spannung innerhalb der Fasern. Es konnte eine Abhängigkeit der Stabilität von Aktinfasern von der angelegten Dehnungsform gezeigt werden [93, 94], was wiederum die Anlagerung spezifischer Proteine beeinflusst. Während Myosin II bevorzugt unter Spannung stehende Filamente bindet, binden Faserabbauende Proteine wie Cofilin bevorzugt an nicht unter Spannung stehende Fasern [95, 96], sodass auf diese Weise Aktinfasern selbst als Spannungssensor fungieren können.

Besonders intensiv wurden in Bezug auf ein mechanosensorisches Verhalten Proteine der Fokaladhäsionen untersucht, da diese Komplexe das Substrat mit dem Aktinzytoskelett

verbinden. Insbesondere die Konformationsänderung durch Krafteinwirkung stellt dabei einen möglichen mechanosensorischen Mechanismus dar [97]. So konnte gezeigt werden, dass die Dehnung des Adapterproteins p130Cas zu seiner Auffaltung führt, wodurch Phosphorylierungsstellen zugänglich werden [98, 99]. Die Phosphorylierung des Proteins erfolgt in Abhängigkeit von Kinasen der c-Src Familie und beeinflusst die Bindungsaffinität verschiedener weiterer Proteine, sodass letztlich die Induktion von komplexen Signalkaskaden geschieht [98-100]. Wie genau diese reguliert sind, ist bisher nicht geklärt. Eine Deletion von p130Cas in Zellen unter zyklischer Dehnung resultiert auf Grund einer veränderten Signaltransduktion zu einer verminderten Reorientierung des Aktinzytoskeletts [101].

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Differenzierung von Keratinozyten ist ein kalziumabhängiger Prozess und induziert verschiedene Auf-, Ab- und Umbauprozesse des Aktinzytoskeletts sowie assoziierter Adhäsionskomplexe. Für die Analyse der für Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsionen relevanten Proteine sollte zunächst die experimentelle Umgebung an die *in vivo* Situation angepasst werden. Die vergleichende Analyse von Einzelzellen und Zellschichten wird dabei durch eine Anpassung der Kalziumkonzentration im Zellkulturmedium ermöglicht.

Die Analyse der Zellantwort auf zyklische Dehnungsreize wurde bislang vornehmlich an Einzelzellen durchgeführt. Es sollte daher insbesondere die Zellantwort differenzierender Zellschichten auf zyklische uniaxiale Dehnung untersucht werden, in welchen neben Zell-Matrix-Kontakten auch interzelluläre Verbindungen ausgebildet werden. Im Fokus der Analysen steht dabei die Ausrichtung des Aktinzytoskeletts in Abhängigkeit des Differenzierungsgrades der Zellen. Der systematische Vergleich von Einzelzellen und Zellverbänden erlaubt dabei die Identifikation des jeweils hauptverantwortlichen Adhäsionstyps sowie die Analyse der Geschwindigkeit und Effizienz des Prozesses.

Durch die Verwendung von Zellen mit durch Mutation veränderten Adhäsionskomplexen sollte schließlich der genaue Mechanismus der Reorientierung von Aktinfasern in Zellschichten untersucht werden. Die Verwendung von Zellen mit Mutationen in Zell-Matrix-Adhäsionen diene dazu, die Relevanz dieser Struktur nach Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten für die Reaktion des Aktinzytoskeletts auf die mechanische Belastung aufzuzeigen. Anschließend sollten Zellen mit veränderten interzellulären Adhäsionen dazu dienen, mechanosensitive Proteine in Zell-Zell-Adhäsionen zu identifizieren.

Durch die Verwendung unterschiedlicher Dehnungsfrequenzen und Verlängerung der Dehnungsdauer sollte die Frequenzabhängigkeit der Aktinfaserreorientierung, welche für Einzelzellen bereits beschrieben wurde, auch für Zellschichten detailliert untersucht werden. Von Interesse ist dabei, neben dem zeitlichen Verlauf der Reorientierung, insbesondere der Endpunkt des Reorientierungsprozesses sowie spezifische Änderungen in Abhängigkeit von interzellulären Adhäsionen und deren Proteinzusammensetzung. Darauf basierend sollte weitergehend untersucht werden, inwiefern die für Einzelzellen

beschriebene Aktinfaserorientierung hin zu einem Winkel ohne Längenänderung (engl. *angle of zero strain*) auch in differenzierenden Zellschichten zu beobachten ist. Hierzu sollte durch Anpassung der Substratgeometrie eine Erhöhung des Querkontraktionsverhältnisses des Substrats induziert werden und so der *angle of zero strain* zu niedrigeren Winkel verschoben werden. Die vergleichende Analyse von Zellen in An- und Abwesenheit von Zell-Zell-Kontakten auf den unterschiedlichen Substraten sollte anschließend zeigen, inwiefern die Adhäsionsstrukturen die Orientierung der Aktinfasern hin zum *angle of zero strain* beeinflussen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

| <b>Verbrauchsmaterial</b>               | <b>Firma</b>                           |
|---|--|
| Blotting-Membran, Nitrocellulose        | GE Healthcare, Solingen                |
| CellStar Schalen, 6-Loch/12-Loch        | Greiner Bio-One, Kremismünster, A      |
| Deckgläser (div. Größen)                | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Einfrierbox                             | Nalgene, Rochester, USA                |
| Filterpapier für Western Blots          | Bio-Rad, Hercules, USA                 |
| Fuse-It-siRNA                           | Ibidi, Martinsried                     |
| Glasbodenschalen                        | Ibidi, Martinsried                     |
| Immersionsöl (Immersol 518F)            | Carl Zeiss, Jena                       |
| Kimtech Science Präzisionstücher        | Kimberly-Clark Professional, Koblenz   |
| Kryoröhrchen                            | VWR, Radnor, USA                       |
| Latexhandschuhe Gentle Skin Grip        | Meditrade, Kiefersfelden               |
| Linsenreinigungstücher                  | Whatman, Maidstone, UK                 |
| Mini-Protean TGX Fertiggele             | Bio-Rad, Hercules, USA                 |
| Nitrilhandschuhe Pure G3                | Kimberly-Clark Professional, Koblenz   |
| Objektträger                            | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Parafilm                                | Bemis, Oshkosh, USA                    |
| Petrischalen                            | Greiner Bio-One, Kremismünster, A      |
| Pipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1250 µl | Starlab, Hamburg                       |

| <b>Verbrauchsmaterial</b>                                  | <b>Firma</b>                           |
|--|--|
| Plastikrührspatel  | VWR, Radnor, USA                       |
| QiaShredder Tubes  | Qiagen, Hilden                         |
| QuantiTect Kit Reverse Transkription                       | Qiagen, Hilden                         |
| Reaktionsgefäße 0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml                       | Eppendorf, Hamburg                     |
| Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml                               | Greiner Bio-One, Kremsmünster, A       |
| RNeasy RNA Isolation Kit                                   | Qiagen, Hilden                         |
| Stripetten 5 ml, 10 ml, 50 ml                              | VWR, Radnor, USA                       |
| TaqMan Gene Expression MasterMix                           | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Viromer Red Transfektion Kit                               | Lipocalyx, Halle (Saale)               |
| Wägeschiffchen (div. Größen)                               | VWR, Radnor, USA                       |
| Zellkulturschalen mit Loch (18 mm)                         | Cell E&G LLC, San Diego, USA           |
| Zellkulturflaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA     |
| Zellschaber  | Greiner Bio-One, Kremsmünster, A       |

### 2.1.2 Chemikalien

| <b>Chemikalie</b>                           | <b>Firma</b>          |
|---|-----------------------|
| 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)        | Sigma, St. Louis, USA |
| 2-(N-Morpholino)ethansulfonäure (MES)       | Sigma, St. Louis, USA |
| 5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat (BCIP/NBT) | Sigma, St. Louis, USA |
| β-Mercaptoethanol                           | Merck, Darmstadt      |
| Chelex 100                                  | Biorad, Hercules, USA |

| <b>Chemikalie</b>  | <b>Firma</b>           |
|--|------------------------|
| Dimethylsulfoxid (DMSO)  | Sigma, St. Louis, USA  |
| Ethanol absolut  | Merck, Darmstadt       |
| Ethanol vergällt (97%)   | Merck, Darmstadt       |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                                      | Sigma, St. Louis, USA  |
| Ethylenglykol-bis(aminoethyl-ether)-<br>N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) | Sigma, St. Louis, USA  |
| Fibronektin  | Sigma, St. Louis, USA  |
| Fluoromount  | Sigma, St. Louis, USA  |
| Fötale Kälberserum (FKS)   | Merck, Darmstadt       |
| Glukose  | Merck, Darmstadt       |
| Glycin   | Sigma, St. Louis, USA  |
| Laemmli Ladepuffer   | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Isopropanol Picograde  | Merck, Darmstadt       |
| Magermilchpulver   | Roth, Karlsruhe        |
| Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )                                    | Sigma, St. Louis, USA  |
| Natriumchlorid (NaCl)  | Sigma, St. Louis, USA  |
| Paraformaldehyd (PFA, 37%)   | Merck, Darmstadt       |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml, 10 mg/ml)                          | Sigma, St. Louis, USA  |
| Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)                                      | Sigma, St. Louis, USA  |
| Phosphataseinhibitor Cocktail 1, 2                                       | Sigma, St. Louis, USA  |
| Protein Standard (prestained)  | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Proteaseinhibitor Cocktail   | Sigma, St. Louis, USA  |
| RIPA-Puffer 2  | Sigma, St. Louis, USA  |

| <b>Chemikalie</b>                           | <b>Firma</b>              |
|---|---------------------------|
| Sylgard 184                                 | Dow Corning, Midland, USA |
| Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris Base) | Sigma, St. Louis, USA     |
| Triton X-100                                | Sigma, St. Louis, USA     |
| Trypsin-EDTA                                | Sigma, St. Louis, USA     |

### 2.1.3 Lösungen und Puffer

#### Zytoskelett-Puffer (engl. *cytoskeleton buffer (CB)*) pH 6,1

| <b>Chemikalie</b>       | <b>Menge</b> |
|-------------------------|--------------|
| EGTA                    | 5 mM         |
| Glukose                 | 5 mM         |
| MES                     | 10 mM        |
| MgCl <sub>2</sub>       | 5 mM         |
| NaCl                    | 150 mM       |
| Penicillin/Streptomycin | 1 ml/l       |

#### Lysepuffer zur Proteinisolation

| <b>Chemikalie</b> | <b>Menge</b> |
|-------------------|--------------|
| RIPA Puffer       | 970 µl       |
| Proteaseinhibitor | 10 µl        |



| Chemikalie                      | Menge |
|---------------------------------|-------|
| Phosphataseinhibitor Cocktail 1 | 10 µl |
| Phosphataseinhibitor Cocktail 2 | 10 µl |

### Transferpuffer Western Blot

| Chemikalie       | Menge    |
|------------------|----------|
| Ethanol          | 200 ml   |
| Tris Base        | 3,03 g/l |
| Glycin           | 14,4 g/l |
| H <sub>2</sub> O | ad. 1 l  |

### 2.1.4 Zellkulturmedien

Zur Herstellung des Zellkultur- und Einfriermediums wurde kalziumfreies fötales Kälberserum (FKS) verwendet. Zur Entfernung der Kalziumionen wurden 50 ml fötales Kälberserum mit 8 g Chelex 100 versetzt und für mindestens 16 h auf einem Drehrad inkubiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt, das Serum anschließend sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

### Zusätze für FAD+ (DMEM Ham's F12) Zellkulturmedium (Biochrom, Berlin)

| Chemikalie   | Hersteller | Menge   |
|--------------|------------|---------|
| Adenin       | Sigma      | 0,18 mM |
| Choleratoxin | Sigma      | 1 nM    |

| <b>Chemikalie</b> | <b>Hersteller</b> | <b>Menge</b> |
|-------------------|-------------------|--------------|
| EGF               | Sigma             | 10 ng/ml     |
| Kalziumfreies FKS | Merck/Biorad      | 10 %         |
| Hydrokortison     | Sigma             | 0,5 µg/ml    |
| Insulin           | Sigma             | 5 µg/ml      |
| L-Glutamin        | Biochrom          | 2 mM         |
| Penicillin        | Biochrom          | 100 U/ml     |
| Streptomycin      | Biochrom          | 0,2 µg/ml    |
| Vitamin C         | Sigma             | 0,2 mM       |

### **Einfriermedium**

| <b>Chemikalie</b>                | <b>Menge</b> |
|----------------------------------|--------------|
| Kalziumfreies Fötale Kälberserum | 90 %         |
| DMSO                             | 10 %         |

## **2.1.5 Geräte und Computerprogramme**

### **Geräte**

| <b>Gerät</b>             | <b>Hersteller</b>           |
|--------------------------|-----------------------------|
| Analog Vortex Mixer      | VWR, Radnor, USA            |
| EM-CCD Kamera (C9100-02) | Hamamatsu, Hamamatsu, Japan |

| <b>Gerät</b>   | <b>Hersteller</b>                      |
|--|--|
| Exsikkator   | Duran, Wertheim                        |
| Feinwaage  | Sartorius, Göttingen                   |
| Heizblock  | Stuart Equipment, Staffordshire, UK    |
| Inkubator  | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Konfokales Laser Scanning<br>Mikroskop (LSM 710)             | Carl Zeiss, Jena                       |
| Mastercycler   | Eppendorf, Hamburg                     |
| Mikroskop Axio Observer Z.1                                  | Carl Zeiss, Jena                       |
| Mikroskop Axio Vert.A1                                       | Carl Zeiss, Jena                       |
| Mini-Protean Elektrophorese System                           | Bio-Rad, Hercules, USA                 |
| pH-Meter   | Knick, Berlin                          |
| Plan Neo-Fluar Objektiv<br>40x / 1,3 NA / Ph3 / Öl-Immersion | Carl Zeiss, Jena                       |
| Plan Neo-Fluar Objektiv<br>40x / 1,3 NA / DIC / Öl-Immersion | Carl Zeiss, Jena                       |
| Gel Doc Gel-Dokumentationssystem                             | Bio-Rad, Hercules, USA                 |
| Real Time PCR System   | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Rotationsbeschichter   | SÜSS MicroTec, Garching                |
| Schüttler 2D, digital  | VWR, Radnor, USA                       |
| Spectrophotometer Nano Drop 1000                             | Nano Drop Products, Wilmington, USA    |
| Sterilbank HeraSafe  | Heraeus, Osterode                      |
| Vakuum-Pumpe RC6   | Vacuumbrand, Wertheim                  |
| Wärmeschrank E400  | Memmert, Schwabach                     |

| <b>Gerät</b>                        | <b>Hersteller</b>                      |
|-------------------------------------|--|
| Wasserbad WNB22                     | Memmert, Schwabach                     |
| Western Blot System Mini Trans-Blot | Bio-Rad, Hercules, USA                 |
| Zentrifuge 400 R                    | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Zentrifuge 5415-R                   | Eppendorf, Hamburg                     |

---

## Programme

| <b>Name</b>                 | <b>Firma</b>                                |
|-----------------------------|---|
| Axio Vision (Version 4.8.3) | Carl Zeiss, Jena                            |
| Image J (Version 1.50)      | National Institute of Health, Maryland, USA |
| Matlab (R2015b und höher)   | MathWorks, Massachusetts, USA               |
| Origin (Version 9.0.0G)     | Origin Lab Corporation, Northampton, USA    |
| R Studio (Version 1.0.136)  | RStudio, Boston, USA                        |
| Zen (Version 8.0.0.273)     | Carl Zeiss, Jena                            |

---

### 2.1.6 Antikörper und Farbstoffe

#### Primäre Antikörper

| <b>Name</b>                          | <b>Artikelnummer</b> | <b>Firma</b>          |
|--------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| Anti $\alpha$ -Catenin aus Kaninchen | C2081                | Sigma, St. Louis, USA |

---

| <b>Name</b>                 | <b>Artikelnummer</b> | <b>Firma</b>                           |
|-----------------------------|----------------------|--|
| Anti c-Myc aus Maus         | M5546                | Sigma, St. Louis, USA                  |
| Anti E-Cadherin aus Maus    | 610182               | BD Bioscience, Franklin Lakes, USA     |
| Anti Paxillin aus Maus      | AH00942              | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Anti Talin aus Kaninchen    | Sc-15336             | SantaCruz, Dallas, USA                 |
| Anti Tubulin aus Ratte      | MAB1864              | Merck, Darmstadt                       |
| Anti Vinculin aus Kaninchen | 700062               | Invitrogen, Carlsbad, USA              |
| Anti Vinculin aus Maus      | V9131                | Sigma, St. Louis, USA                  |

### Sekundäre Antikörper

| <b>Name</b>              | <b>Farbstoff</b>               | <b>Artikelnummer</b> | <b>Firma</b>                           |
|--------------------------|--------------------------------|----------------------|--|
| Anti Kaninchen aus Huhn  | Alexa Fluor 488                | A21441               | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Anti Kaninchen aus Ziege | Alexa Fluor 633                | A21071               | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Anti Maus aus Huhn       | Alexa Fluor 488                | A21200               | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Anti Maus aus Ziege      | Alexa Fluor 633                | A21052               | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Anti Kaninchen aus Ziege | Alkaline Phosphatase gekoppelt | A3812                | Sigma, St. Louis, USA                  |

| Name                    | Farbstoff                         | Artikel-<br>nummer | Firma                 |
|-------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Anti Maus aus<br>Ziege  | Alkaline Phosphatase<br>gekoppelt | A3562              | Sigma, St. Louis, USA |
| Anti Ratte aus<br>Ziege | Alkaline Phosphatase<br>gekoppelt | A8438              | Sigma, St. Louis, USA |

### Farbstoffe

| Name                       | Firma                                  |
|----------------------------|--|
| 488-I Phalloidin           | Abnova, Taipei City, Taiwan            |
| Alexa Fluor 546 Phalloidin | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Alexa Fluor 633 Phalloidin | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

### 2.1.7 siRNAs und Sonden

#### siRNAs

| Name                    | Artikel-<br>Nummer | Firma                        |
|-------------------------|--------------------|------------------------------|
| $\alpha$ -Catenin murin | 12385              | siTools Biotech, Martinsried |
| $\alpha$ -Catenin       | SI00187852         | Qiagen, Hilden               |
|                         | SI02669569         |                              |
|                         | SI02711688         |                              |
|                         | SI02736027         |                              |
| Paxillin                | SI02671151         | Qiagen, Hilden               |
|                         | SI00199087         |                              |

| <b>Name</b> | <b>Artikel-Nummer</b> | <b>Firma</b>                |
|-------------|-----------------------|-----------------------------|
| Talin 1     | n404772               | Thermo Fisher, Waltham, USA |
| Talin 2     | s206311               | Thermo Fisher, Waltham, USA |

### Sonden

| <b>Name</b>       | <b>Artikel-Nummer</b> | <b>Firma</b>                           |
|-------------------|-----------------------|--|
| $\alpha$ -Catenin | Mm01158259_m1         | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| GAPDH             | Mm99999915_g1         | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Paxillin          | Mm00448533_m1         | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Talin 1           | Mm00456997_m1         | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Talin 2           | Mm00659397_m1         | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |

### 2.1.8 Übersicht aller verwendeten Zelltypen

| <b>Zelltyp</b>                                | <b>Eigenschaft</b>  |
|---|---|
| Vinc <sup>Ctrl</sup>                          | Kontrollkeratinozyten   |
| Vinc <sup>KO</sup>                            | Vinculin-freie Keratinozyten  |
| Vinc <sup>KO</sup> $\alpha$ Cat <sup>KD</sup> | Vinculin-freie Keratinozyten mit reduzierter $\alpha$ -Catenin-Expression |
| Pax <sup>KD</sup>                             | Keratinozyten mit reduzierter Paxillin-Expression                         |
| Tln <sub>1/2</sub> <sup>KD</sup>              | Keratinozyten mit reduzierter Talin 1- und 2- Expression                  |
| ECad <sup>Ctrl</sup>                          | Kontrollkeratinozyten   |

| Zelltyp                               | Eigenschaft  |
|---------------------------------------|--|
| ECad <sup>KO</sup>                    | E-Cadherin-freie Keratinozyten   |
| $\alpha$ Cat <sup>KD</sup>            | Keratinozyten mit reduzierter $\alpha$ -Catenin-Expression   |
| $\alpha$ Cat $\Delta$ VBD             | Keratinozyten mit reduzierter muriner $\alpha$ -Catenin-Expression, welche humanes $\alpha$ -Catenin ohne Vinculin-Bindedomäne exprimieren |
| h $\alpha$ Cat                        | Keratinozyten mit reduzierter muriner $\alpha$ -Catenin-Expression, welche humanes Volllängen- $\alpha$ -Catenin exprimieren               |
| ECad <sup>KO</sup> Pcad <sup>KD</sup> | E-Cadherin-freie Keratinozyten mit reduzierter P-Cadherin-Expression   |

Die Generierung von Zellen mit herunterregulierten Proteinen sowie Zellen, welche veränderte Proteine exprimieren, ist näher unter 2.3.3 beschrieben und wurde in Kooperation mit M. Hoffmann (ICS-7) durchgeführt. Weitere Teile der Experimente wurden in Zusammenarbeit mit L. Jungen (ICS-7) durchgeführt.

## 2.2 Zellkultursubstrate

Neben Polystyrolsubstraten, wie sie beispielsweise in Form von speziellen Flaschen für die Kultivierung von Zellen *in vitro* genutzt werden, bietet auch Glas die Möglichkeit zur Zelladhäsion. Durch Beschichtung mit Proteinen der extrazellulären Matrix kann die Adhäsion zusätzlich verbessert und eine Annäherung der Zellumgebung an die *in vivo* Bedingungen erreicht werden. Zudem können Glassubstrate mit sehr geringer Schichtdicke hergestellt werden und bieten eine hohe Transparenz. Daher wurden für Experimente zur detaillierten mikroskopischen Analyse einzelner Proteine mittels immunzytochemischer Färbung Glassubstrate zur Kultivierung der Zellen genutzt.

Die mechanischen Eigenschaften, ebenso wie das Adhäsionsverhalten der Zellen, hängen zudem von der Elastizität ihrer Umgebung ab. Diese kann *in vivo* abhängig vom Ursprung der Zellen über einen großen Bereich schwanken. Für Analysen der mechanischen



Eigenschaften von Zellen ist es daher notwendig, die Elastizität des Substrats *in vitro* an die *in vivo* Umgebung der Zellen anzupassen. Um eine optimale Anpassung zu erreichen, wurden in dieser Arbeit elastische Zellkultursubstrate aus Silikonkautschuk verwendet, welche sich durch ihre Eigenschaften für die Analyse des Zellverhaltens als Antwort auf mechanische Stimulation eignen.

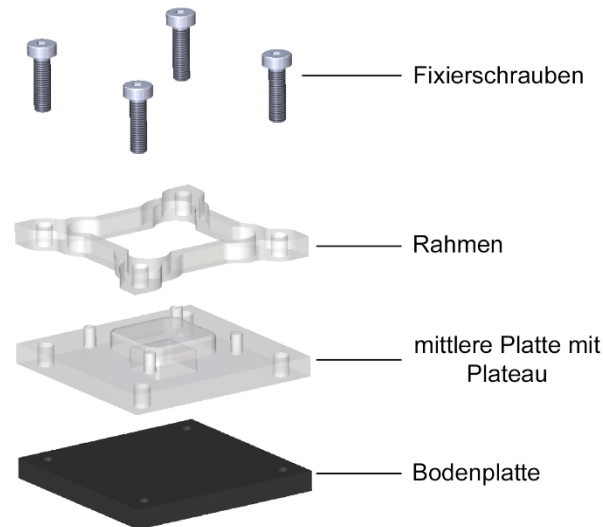
### **2.2.1 Kreuzvernetztes Polydimethylsiloxan (PDMS) als Zellkultursubstrat**

Die verwendeten Zellkultursubstrate aus Silikonkautschuk wurden aus dem Zweikomponentensystem Sylgard 184 hergestellt. Die erste Komponente ist ein vinylterminiertes Dimethylsiloxan (PDMS-Polymer-Gemisch), welches mit der Kreuzvernetzersubstanz, einem Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan-Copolymer vermischt wird. Die Vinylgruppen des Basisöls reagieren unter Wärmezufuhr mit dem Copolymer in einer katalysierten Hydrolyse und ein elastischer Silikonkautschuk wird gebildet. Die Elastizität des so entstehenden Silikonkautschuks wird über das Mischungsverhältnis von Basisöl und Kreuzvernetzer bestimmt. Abhängig davon können Substratsteifigkeiten in einem Bereich von mehreren hundert Pascal bis hin zu Megapascal erzielt werden, wobei sich der Silikonkautschuk dabei im in dieser Arbeit verwendeten Bereich linear-elastisch verhält. Das hergestellte Elastomer ist biokompatibel und gasdurchlässig, wodurch es für die Kultivierung von Zellen geeignet ist. Zudem ist es farblos und optisch transparent und kann somit auch für mikroskopische Analysen verwendet werden.

### **2.2.2 Herstellung elastischer Substrate**

Um Dehnungsexperimente an adhärenenten Zellen durchzuführen, wurden elastische Silikonkautschukammern hergestellt. Eine detaillierte Beschreibung der dafür genutzten Gussformen und der Herstellung ist in [83] zu finden. Die zur Abformung verwendete Gussform besteht aus einer quadratischen Bodenplatte aus eloxiertem

Aluminium und zwei Polystyrolplatten, welche die Form der späteren Zugkammer vorgeben (siehe Abbildung 9).

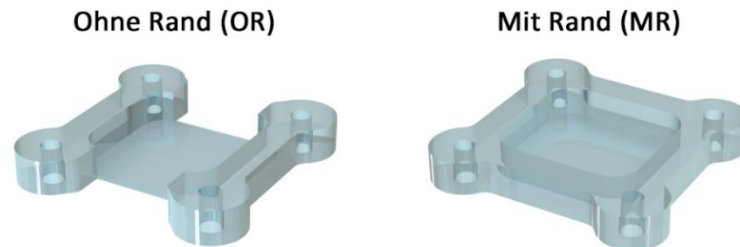


**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Kammergussform.** Die Gussform besteht von unten nach oben aus der Bodenplatte aus Aluminium, der mittleren Platte, welche ein Plateau zur Abformung einer Vertiefung zur Kultivierung der Zellen aufweist und dem Rahmen. Dieser kann zur Generierung einer Kammer mit umlaufenden Rand (hier abgebildet) oder ohne umlaufenden Rand gewählt werden. Die Platten werden mit 4 Schrauben aneinander fixiert. Abbildung von J. Konrad (ICS-7).

Die mittlere Platte, welche auf der Bodenplatte aufliegt, weist eine planare Erhebung auf. Diese führt zu einer etwa 2 cm x 2 cm großen Vertiefung in der hergestellten Zugkammer, in welcher die Zellen kultiviert werden. An den Ecken der Platte sind vier zylinderförmige Acrylglasstifte eingelassen, welche bei der Abformung der Kammer Löcher hinterlassen, die zum Einbau der Zugkammer in eine Haltevorrichtung dienen. Die dritte Platte bildet den Rahmen der Gussform. Die Differenz zwischen der Höhe der Erhebung in der mittleren Platte und der Höhe des Rahmens beträgt etwa 400  $\mu\text{m}$ , sodass dies die Dicke des späteren Kammerbodens ergibt. Alle Teile der Gussform sind durch vier Schrauben in den Ecken aneinander befestigt.

Mit Hilfe eines zweiten Systems aus zwei Polyvinylchlorid (PVC) Platten können zudem Kammern ohne umlaufenden Rand hergestellt werden (siehe Abbildung 10). Das Fehlen des Randes führt zu einer Änderung im Querkontraktionsverhältnis des Kammerbodens

unter Dehnung. Bei gleicher Dehnung in x-Richtung erfährt der Kammerboden ohne umlaufenden Rand eine höhere Stauchung in y-Richtung. Daraus ergibt sich ein abweichender Winkel auf dem Kammerboden, unter dem die Aktinfasern in darauf adhärenen Zellen bei Dehnung keine Längenänderung erfahren.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung von Zugkammern.** Die Modelle zeigen eine Kammer ohne umlaufenden Rand (**links**) und eine Kammer mit Rand (**rechts**) nach Ausbau aus den Gussformen. Die mittlere Vertiefung dient zur Kultivierung der Zellen, mit Hilfe der Löcher an den Ecken können die Kammern in Haltevorrichtungen befestigt werden. Abbildung von J. Konrad (ICS-7).

Zur Herstellung der Elastomere für Zugexperimente wurden Basisöl und Kreuzvernetzer in einem Verhältnis von 1:40 (w/w) zusammengegeben und anschließend für mehrere Minuten gründlich mit Hilfe eines Plastikspatels vermischt. Das Gemisch wurde unter Vakuum entgast, um Luftblasen zu entfernen. Die Kammergussformen wurden exakt bis zum Rand mit nicht kreuzvernetztem Elastomer befüllt. Die Kreuzvernetzung erfolgte bei 60 °C für 16 h und resultiert in einer Elastomersteifigkeit von 50 kPa. Durch Auseinanderbauen der Gussform konnte die ausgehärtete Zugkammer aus der Form genommen werden (siehe Abbildung 10).

## 2.3 Zellkultur und Präparation der Zellen

### 2.3.1 Generierung und Kultivierung der Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Niessen (Department of Dermatology, CECAD, Universität Köln) zur Verfügung gestellt. Zur Generierung von Zellen, welche epidermal die Proteine E-Cadherin oder Vinculin nicht

exprimieren, wurde das Cre/loxP-System verwendet [102, 103]. Hierbei wird die DNA-Sequenz, welche deletiert werden soll, mit zwei loxP-Erkennungssequenzen markiert. Die Rekombinase Cre erkennt diese Sequenzen und katalysiert die Spaltung und Neuverknüpfung des DNA-Strangs. Dabei wird die zwischen den loxP-Sequenzen befindliche DNA als zirkuläres Produkt ausgeschnitten und abgebaut. Die hier verwendete Cre Rekombinase wurde unter der Kontrolle des Keratin 14 Promoters exprimiert. Zur Herunterregulierung des Proteins P-Cadherin in Zellen ohne E-Cadherin-Expression wurde eine C14 shRNA gegen P-Cadherin mittels lentiviraler Transduktion in die Zellen eingebracht [104].

Die Keratinozyten wurden bei 32 °C, einem konstanten CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die geringe Kultivierungstemperatur und das Fehlen von Kalziumionen im verwendeten Zellkulturmedium dienten dazu, eine spontane Differenzierung der Zellen zu verhindern. Alle Zellkulturarbeiten sowie die Beschichtung von Substraten wurden mit sterilen Lösungen an einer Sterilbank durchgeführt.

Bei Erreichen einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden alle verwendeten Lösungen auf 37 °C in einem Wasserbad vorgewärmt. Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS ohne Kalzium- und Magnesiumionen gewaschen, um Zellreste und Proteinrückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für 12 min mit einer Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C vom Substrat abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellen in Suspension wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 3 min bei 180 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet in frischem Zellkulturmedium gelöst. Die Zellzahl wurde anschließend mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden entweder mit einer Konfluenz von 40% auf neue Zellkulturflaschen oder für Experimente in der benötigten Anzahl auf beschichtete Substrate ausgesät.

### **2.3.2 Kryokonservierung der Zellen**

Für die Kryokonservierung der Zellen wurden diese nach Zentrifugation in einer Lösung aus 90% kalziumfreiem FKS und 10% DMSO aufgenommen. Dabei wurde die Verdünnung der Zellen auf 600.000 Zellen pro ml Einfriermedium eingestellt und 0,5 ml der Suspension in Kryoröhrchen überführt. Um ein möglichst schonendes Einfrieren der Zellen zu gewährleisten, wurden die Röhrchen in einer mit Isopropanol befüllten Einfrierbox platziert und diese über Nacht bei -80 °C gelagert. Hierbei wird ein Temperaturabfall von 1 °C/min erreicht. Im Anschluss daran wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.3.3 Einbringung von siRNA und Plasmiden**

Um die Funktion einzelner Adhärenzproteine bei der Antwort von Zellen auf zyklische Dehnung zu analysieren, wurden diese für Dehnungsexperimente herunterreguliert. Um die Menge eines Proteins von Interesse zu reduzieren, wurde siRNA mittels fusogener Liposomen in die Zellen übertragen. Die siRNA dient dazu, durch Bindung an die für das Zielprotein kodierende mRNA deren Abbau zu induzieren. Die für die Fusion genutzten siRNAs richteten sich gegen Paxillin, Talin 1 und 2 sowie  $\alpha$ -Catenin.

Für die Fusion wurden 16.700 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 12-Loch Zellkultursubstrate ausgesät, um zum Zeitpunkt der Durchführung eine etwa 70%ige Konfluenz aufzuweisen. Die erste Fusion erfolgte 18 h nach Aussaat der Zellen entsprechend der Herstellerangaben. Eine zweite Fusion zur Steigerung der Effizienz erfolgte 24 h nach der ersten Fusion. Weitere 3 h später wurden die Zellen vom Zellkultursubstrat gelöst und auf Zugkammern überführt. Zur Überprüfung der Effizienz der Fusion wurde zum Zeitpunkt des Zugexperiments der mRNA-Gehalt der fusionierten Zellen durch eine quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion kontrolliert sowie die Menge des noch vorhandenen Proteins mit Hilfe von Western Blots bestimmt (siehe Abschnitt 2.3.4). Hierfür verblieben behandelte und Kontrollzellen auf dem 12-Loch Zellkultursubstrat.

Zur detaillierten Analyse des Einflusses der Vinculin-Bindedomäne im Protein  $\alpha$ -Catenin wurden zusätzlich Experimente durchgeführt, in welchen zunächst mit einer Organismus-spezifischen siRNA die Neubildung von  $\alpha$ -Catenin herunterreguliert wurde. Diese siRNA bindet ausschließlich an die  $\alpha$ -Catenin-codierende mRNA aus der Maus. Anschließend wurden mit Hilfe des Transfektionsreagenz Viromer Red mutierte Formen von  $\alpha$ -Catenin mit humanem Ursprung wieder in die Zellen eingebracht. Aufgrund des humanen Hintergrundes wurde die gebildete mRNA nicht von der siRNA gebunden, wodurch die Expression des veränderten  $\alpha$ -Catenins ermöglicht wurde. Die eingebrachten Plasmide kodierten zum einen für eine Form von  $\alpha$ -Catenin, in welcher die Bindedomäne für Vinculin fehlt und zum anderen für ein Kontrollprotein in voller Länge von  $\alpha$ -Catenin. Die gebildeten Proteine trugen zudem eine Myc-Markierung.

Die Einbringung der Plasmide erfolgte jeweils 4 h nach den Fusionen mit siRNA entsprechend der Herstellerangaben. Die Zellen wurden 4 h nach der zweiten Einbringung vom Substrat gelöst, um auf Streckkammern ausgesät zu werden. Die Kontrollzellen verblieben bis zum Dehnungsexperiment auf dem Substrat für eine anschließende Effizienzanalyse.

### **2.3.4 Western Blot Analyse**

Für die Bestimmung des Gehalts spezifischer Proteine in Zellen wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen auf Eis gestellt und nach Abnehmen des Mediums mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde der Lysepuffer für Western Blot Analysen auf die Zellen gegeben und diese mit Hilfe eines Zellschabers vom Substrat gelöst. Nach Überführen der Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde diese kräftig auf- und abpipettiert und anschließend gevortext, um die Zellmembranen aufzubrechen und die Freisetzung der Proteine in Lösung zu bewirken. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei 4 °C auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 16.000 g für 10 min, um Zellreste zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 4-fach Laemmli Ladepuffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die Menge des verwendeten

Ladepuffers richtete sich dabei nach dem Volumen des Überstandes und wurde auf eine einfache Konzentration verdünnt. Im Anschluss an die Isolation der Proteine wurden diese unmittelbar für die Auftrennung über eine SDS-Gelelektrophorese genutzt oder bei -20 °C gelagert.

Die gelagerten Proteine wurden vor der weiteren Verwendung erneut auf 65 °C erhitzt, einige Sekunden gevortext und anschließend für einige Sekunden zentrifugiert. Vorgegossene 4-20% Gradienten-Polyacrylamid-Gele wurden in entsprechenden Halterungen befestigt und in Laemmli Puffer platziert. Anschließend wurden die Proteinproben sowie 10 µl eines Protein-Standards in die Probentaschen der Gele geladen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 80 V für 2 h.

Der Zusammenbau des Blots zur Übertragung der Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte unter Western Transfer Puffer, um Luft einschließen zu vermeiden. Hierfür wurden in einer Halterungskassette ein Schwamm, ein Filterpapier, das Gel, die Membran, ein weiteres Filterpapier und ein weiterer Schwamm aufeinander platziert und in das Blotsystem gestellt. Der Proteintransfer aus dem Gel auf die Membran erfolgte für 16 h bei 4 °C nach Anlegen einer Stromstärke von 300 mA. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem 2D-Schüttler durchgeführt. Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für 30 min in eine Blockierlösung aus 5% Magermilchpulver in PBS gelegt. Die anschließende Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:1.000 in PBS mit 1% Magermilchpulver. Nach 60 min wurde die Membran mit PBS gewaschen und anschließend mit dem zweiten Antikörper in einer 1:10.000 Verdünnung in PBS für 1 h inkubiert. Nach Herunterwaschen des sekundären Antikörpers folgte die Entwicklung der Membran durch Verwendung eines BCIP/NBT Substrates, wodurch mithilfe der Antikörpergekoppelten alkalinen Phosphatase eine Farbreaktion induziert wurde. Die entstandenen Banden wurden nach Trocknen der Membran mit einem Gel-Dokumentationssystem dokumentiert.

### 2.3.5 Immunzytochemische Färbung

Immunzytochemische Färbungen wurden dazu genutzt, einzelne Proteine von Interesse mit einem fluoreszierenden Farbstoff zu markieren und so deren mikroskopische Detektion innerhalb der Zelle zu ermöglichen. Alle Schritte der Färbung wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das eingesetzte Volumen der Antikörperlösungen betrug 300 µl, alle anderen Lösungen wurden in einem Volumen von 500 µl pro Substrat eingesetzt.

Die Zellen wurden zunächst unmittelbar nach Durchführung eines Experiments fixiert. Hierfür wurde das Medium abgenommen und eine 3,7%ige Paraformaldehydlösung (PFA) in CB auf die Zellen gegeben. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Waschen mit 30 mM Glycin in CB gestoppt und überschüssiges PFA entfernt. Es folgte die fünfminütige Permeabilisierung der Zellmembranen mittels 0,5% Triton X-100 in CB-Puffer. Dies ermöglichte das spätere Eindringen der Antikörper in die Zelle. Rückstände der Lösung wurden durch mehrfaches Waschen mit CB entfernt. Anschließend wurden freie Antikörperbindestellen durch die Inkubation mit einer Blockierlösung aus 5% Magermilchpulver in CB für 30 min abgesättigt. Die Blockierlösung wurde abgenommen und unmittelbar durch die primäre Antikörperlösung ersetzt. Hierfür wurden die Antikörper in einer 1:200 Verdünnung in eine Lösung aus 1% Magermilchpulver in CB gegeben und für 1 h inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen der Zellen mit CB entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten sekundären Antikörpern analog zu den primären Antikörpern. Ungebundene und unspezifisch gebundene Antikörper wurden ebenfalls durch Waschen mit CB entfernt.

Für Proben auf Glassubstraten wurden pro Substrat 2 ml des CB Puffers auf den Proben belassen und diese bei 4 °C gelagert. Für die langfristige Konservierung der Zugkammer-Proben wurden die Zellen zunächst mit destilliertem Wasser gewaschen, um Salzreste aus dem verwendeten Puffer von der Probe zu entfernen. Anschließend wurden 15 µl Eindeckelmedium auf die Mitte der Probe gegeben und ein Deckglas (Durchmesser 12 mm, #1) luftblasenfrei abgelegt. Nach Trocknung des Eindeckelmediums wurde der Kammerboden mit Hilfe eines Skalpell ausgeschnitten und dunkel gelagert. Alle in der



Arbeit dargestellten mikroskopischen Aufnahmen von immunzytochemischen Färbungen wurden zur besseren Visualisierung der Strukturen in ihrer Helligkeit und im Kontrast angepasst.

## **2.4 Analyse von Adhäsionsstrukturen und dem Aktinzytoskelett**

Für die detaillierte Analyse der Lokalisation und eine Quantifizierung von Adhäsionsproteinen und dem assoziierten Aktinzytoskelett wurden Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen auf Glassubstraten kultiviert und immunzytochemisch gefärbt. Hierfür wurden 23.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und nach Adhäsion mit kalziumhaltigem Medium inkubiert. Die Dauer der Inkubation der Zellen mit Kalzium betrug 0, 2, 6 und 24 Stunden und wird im Folgenden auch als *Kalziuminkubation* bezeichnet. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Proteine Vinculin, Paxillin und Aktin immunzytochemisch angefärbt. Die Proben wurden an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 710, Carl Zeiss, Jena) aufgenommen. Hierfür wurde ein EC-Plan Neofluar Objektiv mit 40-facher Vergrößerung und Öl-Immersion (Ph3, NA 1,3) genutzt. Die Anregung des Farbstoffs Alexa Fluor 488 erfolgte mittels eines Argon-Ionen-Lasers, die Detektion des Fluoreszenzsignals mithilfe eines Bandpassfilters im Wellenlängenbereich von 493 nm bis 557 nm. Für die Anregung der Farbstoffe Alexa Fluor 546 und 633 wurden Helium-Neon-Laser mit den Wellenlängen 543 nm und 633 nm verwendet. Die Detektion erfolgte über den Bandpassfilter 570-630 nm für Alexa Fluor 546 sowie einen Langpassfilter ab 640 nm für Alexa Fluor 633. Weiterhin wurde ein Hauptfarbteiler (488/543/633) genutzt. Die im Folgenden beschriebenen Algorithmen zur Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen wurden von G. Dreissen (ICS-7) programmiert.

Zunächst wurde die Kolo-kalisation der Fokaladhäsionsproteine Paxillin und Vinculin in den Zellen analysiert. Hierfür wurden die basalen und apikalen Ebenen der Zellen mikroskopiert. Die Pixelgröße betrug 0,094 µm x 0,094 µm. Die beiden Kanäle der Doppelfärbung wurden für die Auswertung getrennt und separat mit dem beschriebenen Algorithmus prozessiert. Die Aufnahmen wurden zunächst mit einem Gaussfilter mit einer Standardabweichung von 0,5 Pixeln geglättet. Anschließend wurden basierend auf

der Methode aus Hersch et al. die Fokaladhäsionen detektiert [105]. Zunächst wurden alle Grauwerte in den Bildern mittels z-Transformation (*engl. z-score*) standardisiert. Dazu wurden der lokale Mittelwert sowie die lokale Standardabweichung im Bild mit einer Filterkerngröße von jeweils 45 x 45 Pixeln bestimmt. Danach wurde der lokale Mittelwert vom Originalbild abgezogen und das Ergebnis durch die Standardabweichung geteilt. Alle Pixel mit einem Standardwert über 1 wurden als Teil einer Fokaladhäsion markiert. Alle zusammenhängenden Fokaladhäsionsstrukturen größer als 45 Pixel und kleiner als 1000 Pixel wurden als eigenständige Fokaladhäsion betrachtet. Im Unterschied zu Hersch et al. wurden nun auch noch die Bereiche verworfen, die einen zu geringen Kontrast zu ihrem Hintergrund aufwiesen. Um den Kontrast einer Fokaladhäsion zum Hintergrund zu bestimmen, wurde zunächst der mittlere Grauwert jeder Fokaladhäsion bestimmt. Dann wurde die Maske der Fokaladhäsionen so lange mittels morphologischer Dilatation vergrößert, bis sie mindestens doppelt so groß war wie die ursprüngliche Maske. Von der neu erzeugten, vergrößerten Maske wurde dann ebenfalls der mittlere Grauwert in den Bereichen bestimmt, die außerhalb der Ursprungsmaske lagen. Für Bereiche, in denen das Verhältnis der Grauwerte von Fokaladhäsion zu ihrer Umgebung unter 1,8 lag, wurde die markierte Struktur verworfen und nicht als Fokaladhäsion analysiert. Nachdem dies für beide Kanäle durchgeführt wurde, erfolgte die Bestimmung der Überlappungsbereiche der detektierten Strukturen sowohl in der apikalen als auch in der basalen Ebene.

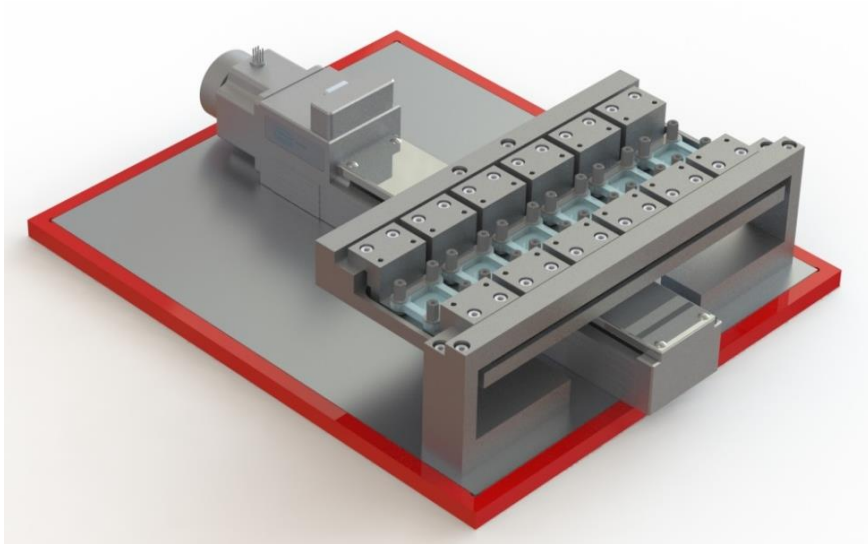
Der im vorigen Abschnitt beschriebene Algorithmus wurde ebenfalls dazu verwendet, den Bedeckungsgrad der Zellen mit Fokaladhäsionen bei unterschiedlicher Kalziuminkubationszeit zu bestimmen. Hierzu wurde ausschließlich das fokaladhäsionsspezifische Paxillin-Signal in der basalen Ebene der Zellen genutzt. Die Prozessierung der Aufnahmen erfolgte wie bereits beschrieben, allerdings wurde das Signal nicht bildspezifisch, sondern zellspezifisch ausgewertet. Dazu wurden die Zellgrenzen händisch markiert und nur Signale innerhalb dieser Grenzen berücksichtigt. Nach Bestimmung der Zellfläche wurde die Gesamtfläche des detektierten Paxillinsignals, der Bedeckungsgrad der Zellfläche mit Fokaladhäsionen sowie die Anzahl und Größe der Fokaladhäsionen bestimmt.

Nach Auswertung der Fokaladhäsionen wurden auch die Veränderungen des Aktinzytoskeletts unter Kalziumeinfluss analysiert. Zur Quantifizierung der Organisation

von Aktinfasern innerhalb der Zellen wurde der Aktin-Anordnungs-Parameter eingeführt. Für die Bestimmung des Parameters wurden die Zellen händisch umrandet, um die Zellgrenzen vorzugeben. Von der erzeugten Maske wurden die Randpixel bestimmt und die Zellmaske mit Hilfe des Algorithmus aus Möhl et al. auf eine Einheitszelle übertragen [106]. Diese hatte einen Radius von 200 Pixeln. Im Anschluss daran wurde die Einheitszelle in Ringe mit einer Breite von 5 Pixeln unterteilt und der mittlere Grauwert jedes Rings bestimmt. An die Verteilung der Ringgrauwerte wurde eine Gerade angenähert. Die Steigung dieser Geraden entspricht dem Aktin-Anordnungs-Parameter. Bei einem zentral konzentrierten Aktinnetzwerk fallen die Grauwerte einer Zelle von innen nach außen ab, was einer negativen Steigung entspricht. Bei einer peripheren Lokalisation des Aktinsignals ergibt sich eine positive Steigung. Da durch Ungenauigkeiten in der manuellen Zellumrandung sowie ein schwächeres Aktinsignal an den Zellrändern die Grauwerte in den äußeren Ringen unabhängig von der gesamten Aktinlokalisierung abfallen, wurden die äußeren drei Ringe von der Auswertung ausgeschlossen.

## **2.5 Durchführung von Dehnungsexperimenten**

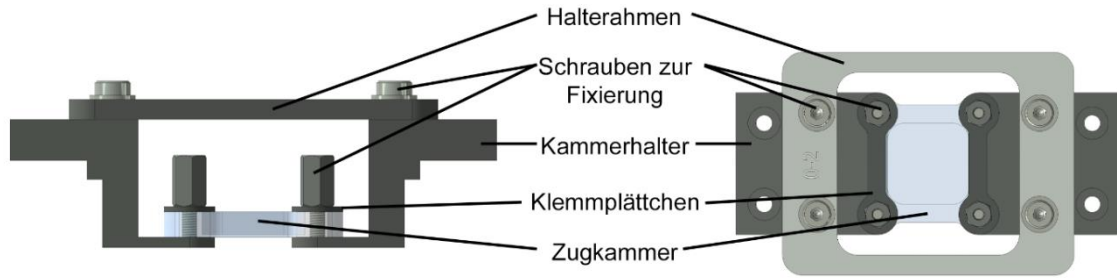
Zur zyklischen uniaxialen Dehnung der Zellen wurde eine computergesteuerte Apparatur verwendet, die von W. Rubner (ICS-7) entwickelt und von J. Konrad (ICS-7) angepasst wurde. Hierbei handelt es sich um eine Linear-Verschiebeeinheit, welche über einen Schrittmotor angetrieben wird. Die Zugvorrichtung ist so gestaltet, dass bis zu sechs Zugkammern gleichzeitig und mit identischen Parametern gedehnt werden können (siehe Abbildung 11). So ist es möglich, vergleichende Experimente in großer Anzahl parallel durchzuführen. Die Apparatur kann im Inkubator betrieben werden, wodurch die Kultivierung der Zellen nicht beeinflusst wird.



**Abbildung 11: Schematische Darstellung der Zugapparatur.** Die Zugapparatur ist mit sechs Zugkammern in Kammerhaltern beladen. Abbildung von J. Konrad (ICS-7).

Die verwendete Software wurde von W. Hürttlen (ICS-TA) auf Basis des grafischen Programmiersystems LabVIEW entwickelt. Es ist möglich, den Verfahrensweg, die Geschwindigkeit, die Pausenzeiten sowie die Zyklenanzahl zu definieren. So können präzise Dehnungsstimuli programmiert werden und an physiologische Parameter angepasst werden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden die Parameter stets so gewählt, dass eine Annäherung an sinusoidale Dehnungsverläufe erreicht wurde.

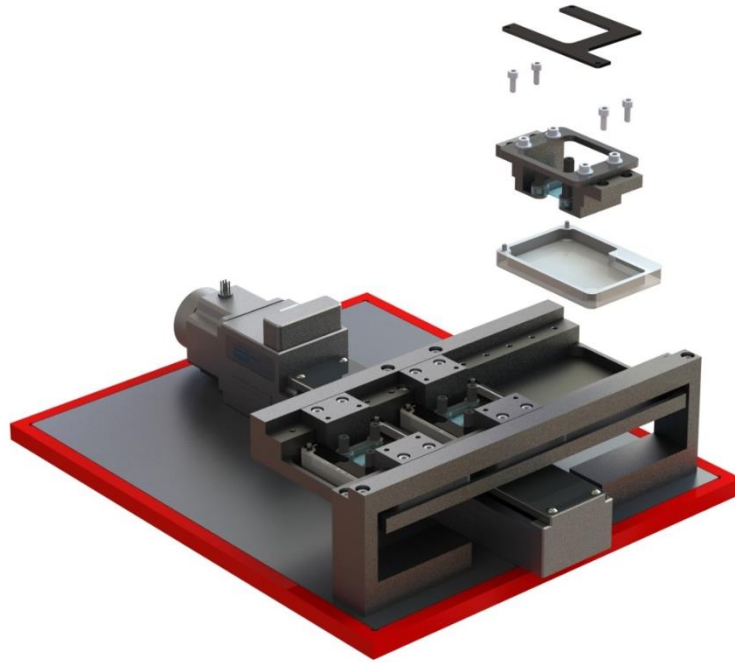
Die Zugkammer wurde zunächst in der Grundposition in eine Haltevorrichtung eingebaut. Dabei erfährt der Kammerboden keine Verformung. Die Seitenränder der Kammer wurden an den beiden der Haltevorrichtung aufliegenden Seiten mit Klemmplättchen und Schrauben fixiert, um ein Verrutschen der Kammer bei Dehnung zu verhindern (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zugkammer in der Haltevorrichtung.** Abgebildet sind eine schematische Seitenansicht (**links**) und eine Aufsicht (**rechts**) der Zugkammer in der Haltevorrichtung. Abbildung von J. Konrad (ICS-7).

Anschließend wurde die Kammer um 1,5 mm uniaxial vorgedehnt, um ein späteres Durchhängen des Kammerbodens durch Zugabe von Beschichtungslösung und Zellkulturmedium zu verhindern. Der Kammerboden wurde in dieser Position mit 500  $\mu\text{l}$  einer Fibronectinlösung (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 1 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  beschichtet. Im Anschluss daran wurden die vom Zellkultursubstrat gelösten Zellen in 550  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium ausgesät. Die Aussaatdichte für vinculin-freie Zellen (Vinc<sup>KO</sup>) sowie vinculin-freie Zellen mit herunterregulierter  $\alpha$ -Catenin-Expression (Vinc<sup>KO</sup> $\alpha$ Cat<sup>KD</sup>) betrug für Einzelzellen 2.500 Zellen/ $\text{cm}^2$ , für konfluente Zellschichten 27.500 Zellen/ $\text{cm}^2$ . Alle weiteren Zelltypen wurden für Experimente an Einzelzellen in einer Dichte von 2.125 Zellen/ $\text{cm}^2$  ausgesät, für Experimente an konfluenten Zellschichten in einer Dichte von 21.250 Zellen/ $\text{cm}^2$ .

Zum Schutz vor Kontaminationen und Verdunstung des Mediums wurden die Zugkammern nach Aussaat der Zellen mit einem Glasdeckel und Parafilm abgedichtet. Zur Adhäsion wurden die Zellen für 16 h bei 37  $^{\circ}\text{C}$  kultiviert. Für Experimente mit Kammern ohne umlaufenden Seitenrand, wurde eine Kunststoffwanne unter die Haltevorrichtung in der Zugapparatur platziert. Ein aufgelegter Kunststoffdeckel diente als Schutz vor Verdunstung. Die Wanne wurde anschließend mit 40 ml vorgewärmtem Medium befüllt (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Zugapparatur.** Aufbau zur Dehnung von Kammern ohne umlaufenden Rand. Eine Plastikwanne wird als Mediumreservoir in die Zugapparatur gestellt. Die Kammer wird in die Wanne platziert und befestigt. Ein Kunststoffdeckel wird über dem Kammerboden auf den Haltevorrichtungen abgelegt. Abbildung von J. Konrad (ICS-7).

Die Zugexperimente wurden 18 h nach Aussaat der Zellen durchgeführt. Für Experimente an Zellen unter Kalziumeinfluss wurde vor Anlegen des Dehnungsreizes das Medium gegen eines mit einer Kalziumkonzentration von 1,8 mM ausgetauscht. Dies erfolgte für Experimente zum Einfluss des Reifegrades der Zell-Zell-Kontakte direkt, 2 h oder 12 h vor Beginn der zyklischen Dehnung. Die Kammern für alle anderen Experimente wurden 2 h vor Beginn der zyklischen Dehnung mit kalziumhaltigem Medium inkubiert. Alle Zellen unter Kalziumeinfluss wurden auch während des Dehnungsexperiments mit kalziumhaltigem Medium inkubiert. Die Kammern wurden im Anschluss mit einer Amplitude von 3 mm gedehnt. Dies entspricht einer Dehnung von 14% unterhalb der Zellen. Die Frequenzen mit entsprechenden Geschwindigkeiten und Pausenzeiten wurden je nach durchgeführtem Experiment eingestellt.

| <b>Amplitude<br/>[%]</b> | <b>Frequenz<br/>[mHz]</b> | <b>Geschwindigkeit<br/>[mm/s]</b> | <b>Pause<br/>[s]</b> |
|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------|
| 14                       | 100                       | 0,8                               | 1,25                 |
| 14                       | 300                       | 2,4                               | 0,417                |
| 14                       | 600                       | 4,8                               | 0,208                |

Unmittelbar nach Beendigung der zyklischen Dehnung wurden die Zellen fixiert (siehe Abschnitt 2.3.6). Nach Zugabe der Formaldehydlösung wurde ein Rahmen auf die Kammerhalter aufgeschraubt, sodass die Halter aus der Streckapparatur entnommen werden konnten. Um eine weitere Deformation des Kammerbodens zu verhindern, wurde ein zugeschnittener Objektträger unter den Kammerboden angebracht. Im Anschluss an die Fixierung der Zellen wurden Proteine von Interesse immunzytochemisch angefärbt (siehe Abschnitt 2.3.6).

## **2.6 Analyse der dehnungsinduzierten Aktinreorientierung**

Die Immunfluoreszenzfärbungen des Aktinzytoskeletts wurden an einem Inversmikroskop (Axio Observer Z.1, Carl Zeiss) aufgenommen. Hierfür wurde ein 40 x EC-Plan Neofluar Objektiv mit Öl-Immersion (Ph3, NA 1,3) genutzt. Eine Xenon-Hochdrucklampe (300 W, 300-700 nm, Lambda DG-4, Sutter Instruments, Novato, USA) wurde als Lichtquelle verwendet. Für die Visualisierung des verwendeten Farbstoffs Alexa Fluor 488 wurde ein Bandpassfilter zwischen 450 und 490 nm zur Anregung und ein Bandpassfilter zwischen 500 und 550 nm zur Detektion genutzt. Für den Farbstoff Alexa Fluor 546 wurde für die Anregung ein Bandpassfilter im Bereich 538-563 nm und für die Detektion ein Bandpassfilter im Bereich 570-640 nm genutzt. Die Aufnahmen wurden mit einer EM-CCD-Kamera gemacht. Für die Auswertung der Faserorientierung wurde ein Algorithmus von G. Dreissen (ICS-7) entwickelt und wird im Folgenden beschrieben.

Für die Auswertung der Aktinfaserorientierung wurde zunächst von der gesamten Immunfluoreszenzaufnahme der 2D Strukturtenor nach Bigun et al. bestimmt [107]. Dabei wurde jedem Pixel im Bild basierend auf dem umliegenden Grauwertgradienten in X- und Y-Richtung ein Orientierungsvektor zugeordnet. Da aber nicht alle Pixel im gesamten Bild ausgewertet werden sollten, sondern nur solche, die eine Aktinfaser repräsentieren, wurden als nächstes die Aktinfasern detektiert. Hierzu wurden die Aufnahmen mit einer 7 x 7 Pixel großen Binomialmaske geglättet. Das Resultat wurde vom Originalbild subtrahiert und der extrazelluläre Hintergrund minimiert. Dann wurde das entstandene Bild erneut mit einem 7 x 7 Pixel großen Binomialfilter geglättet. Als zytoskelettale Strukturen wurden solche Bereiche angenommen, deren Grauwerte heller waren als die Summe des mittleren Grauwertes des prozessierten Bildes plus einer halben Standardabweichung. Zudem wurden Bereiche ausgeschlossen, deren Fläche kleiner als 200  $\mu\text{m}^2$  war. Um die Fasern zellspezifisch auszuwerten und eine Hauptorientierung pro Zelle zu bestimmen, wurden die Zellen im Originalbild manuell umrandet. Diese Maske wurde mit der Stressfasermaske logisch verknüpft, sodass nur Orientierungsvektoren innerhalb der Maske als zytoskelettale Struktur galten. Die resultierenden Winkelhäufigkeiten wurden in kumulierten Häufigkeitsdiagrammen dargestellt.

### 2.7 Statistische Analysen

Für die Bestimmung der 95% Konfidenzintervalle (CI95) der kumulierten Häufigkeiten wurde die Methode der *bias-corrected and accelerated (BCa) bootstrap intervals* nach Efron genutzt [108]. Hierfür wurden aus den erhobenen Daten 5000 neue Stichproben generiert und das entsprechende Konfidenzintervall bestimmt. Die Ergebnisse der Konfidenzintervall-Abschätzung für die einzelnen Experimente befinden sich im Appendix. Alle weiteren Fehlerabschätzungen sowie Angaben über die Anzahl ausgewerteter Zellen befinden sich in Kapitel 3 an entsprechender Stelle.



Zur Prüfung der Signifikanz von Unterschieden im Zellverhalten wurde der nicht parametrische Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die resultierenden Signifikanzniveaus wurden wie folgt definiert:

|             |     |
|-------------|-----|
| $p < 0,05$  | *   |
| $p < 0,01$  | **  |
| $p < 0,001$ | *** |



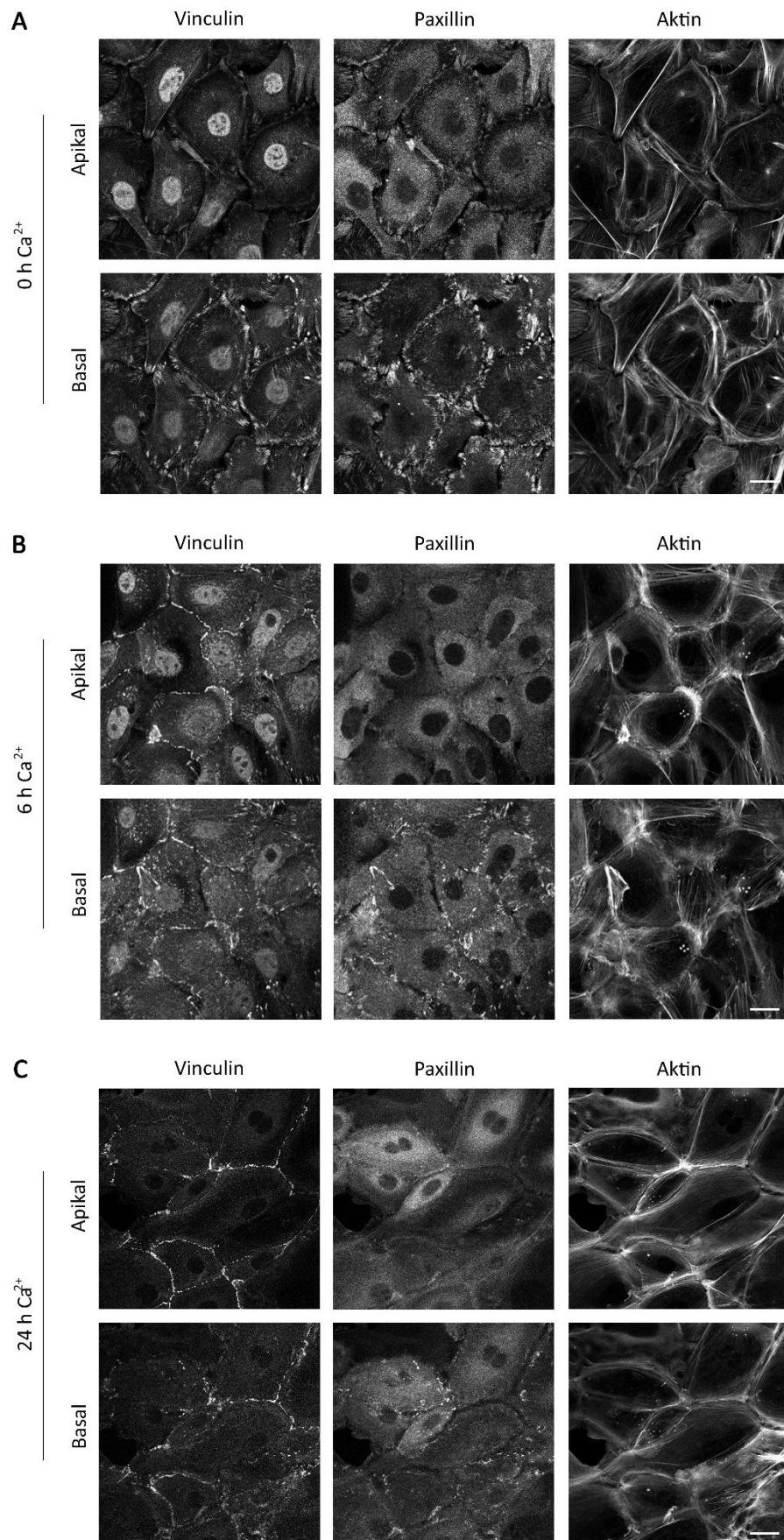
### 3 Ergebnisse

Das Aktinnetzwerk und an dieses assoziierte Adhärenzverbindungen sind für die Funktionalität von Zellen und die Integrität eines multizellulären Gewebes von enormer Bedeutung. Dabei beeinflussen sowohl Zell-Matrix-Kontakte als auch Zell-Zell-Kontakte das Zellverhalten und den Zusammenhalt von Zellverbänden. Um ihre Funktion aufrecht erhalten zu können, muss die Widerstandsfähigkeit von Zellen und Geweben gegen mechanische Reize gewährleistet sein, die in verschiedensten Formen auf diese einwirken können. Es ist anzunehmen, dass die Ausbildung von kalzium-induzierten Zell-Zell-Kontakten das Verhalten auf solche Reize beeinflusst. Daher wurden in dieser Arbeit vergleichende Analysen an Einzelzellen und Zellschichten in Abhängigkeit von Kalzium durchgeführt. Hierbei lag der Fokus auf der detaillierten Untersuchung der Zellantwort auf zyklische Dehnung, für die eine deutliche Reaktion des Aktinzytoskeletts insbesondere an Einzelzellen bereits gezeigt werden konnte.

#### 3.1 Einfluss von Kalzium auf Adhäsionsstrukturen und Zytoskelett

Zunächst wurde der Einfluss von Kalzium auf Adhärenz- und Zytoskelettproteine analysiert. Dazu wurden epidermale Keratinozyten auf Fibronectin-beschichteten Glassubstraten kultiviert und für 0, 6 und 24 h mit einer erhöhten Kalziumkonzentration im Zellkulturmedium inkubiert. Nach Fixierung der Zellen wurden die Proteine Aktin, Paxillin und Vinculin immunzytochemisch gefärbt und die Lokalisation der einzelnen Proteine nach unterschiedlicher Inkubationsdauer mit Kalzium in der basalen und apikalen Ebene der Zellen untersucht.

In Abwesenheit von Kalzium waren die Signale für Paxillin und Vinculin in der Zellperipherie lokalisiert und markierten längliche elliptische Strukturen (siehe Abbildung 14 A). Diese waren nur in der basalen Ebene erkennbar, während das Signal für beide Proteine in der apikalen Ebene unspezifisch war. Die Aktinfasern waren vermehrt in der basalen Ebene und zentral in der Zelle lokalisiert und verliefen von dort in die Zellperipherie. Dabei wiesen sie keine Vorzugsorientierung auf.

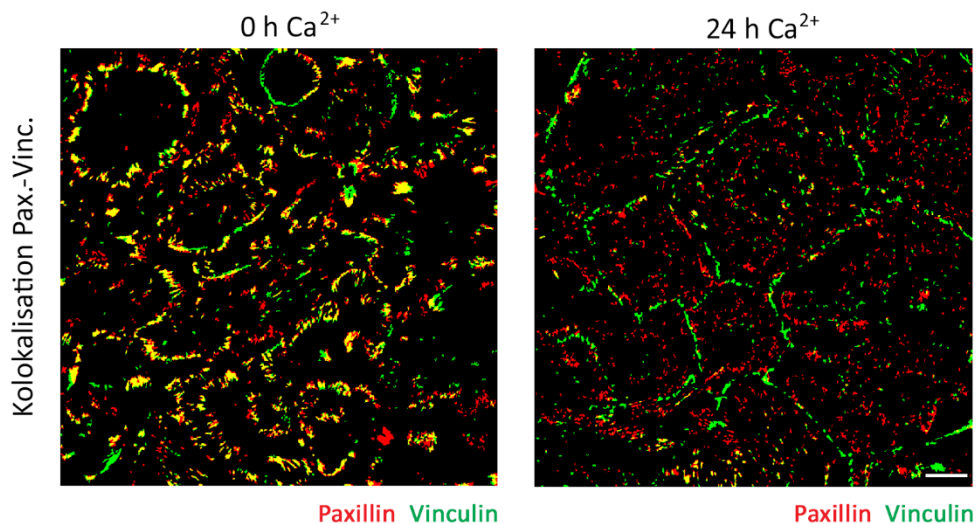


**Abbildung 14: Analyse von Adhäsionsproteinen und Aktinnetzwerk in Abhängigkeit von Kalzium.** (A) Immunfluoreszenzfärbung der Proteine Vinculin, Paxillin und Aktin in Kontrollkeratinozyten ohne Einfluss von Kalzium. In der basalen Ebene sind die Proteine Vinculin und Paxillin kolokalisiert und markieren Zell-Matrix-Adhäsionen an den Zellrändern. Eine spezifische Färbung ist in der apikalen Ebene nicht erkennbar. Das Aktinnetzwerk ist ohne Vorzugsrichtung orientiert. (B) Kontrollzellen nach sechsständiger Kalziuminkubation weisen eine verringerte Anzahl an Paxillin- und Vinculin-positiven Strukturen in der basalen Ebene auf. Das Vinculinsignal ist ebenfalls in der apikalen Ebene an den Zellgrenzen lokalisiert. Das Aktinnetzwerk liegt vermehrt gebündelt im peripheren Bereich der Zellen vor. (C) Keratinozyten nach 24 h andauernder Kalziuminkubation. Das Paxillinsignal ist gegenüber Kontrollzellen deutlich reduziert, das Vinculinsignal markiert die Zellgrenzen. Die Aktinfasern liegen als kortikaler Ring ohne spezifische Vorzugsorientierung vor. Maßstab 10 µm.

Nach sechsständiger Kalziuminkubation reicherte sich das Paxillinsignal überwiegend an den Zellgrenzen an und war nur in der basalen Ebene detektierbar (siehe Abbildung 14 B). Das Vinculinsignal war in der basalen Ebene ebenfalls an den Zellgrenzen als elliptische Struktur lokalisiert. Zusätzlich war ein linienförmiges Vinculinsignal an den Zellgrenzen in der apikalen Ebene erkennbar, welches nicht mit dem Paxillinsignal kolokalisiert war. Die Aktinfasern waren nach sechsständiger Kalziuminkubation parallel zueinander und in der Zellperipherie angeordnet, während die Anzahl zentraler Aktinfasern deutlich verringert war.

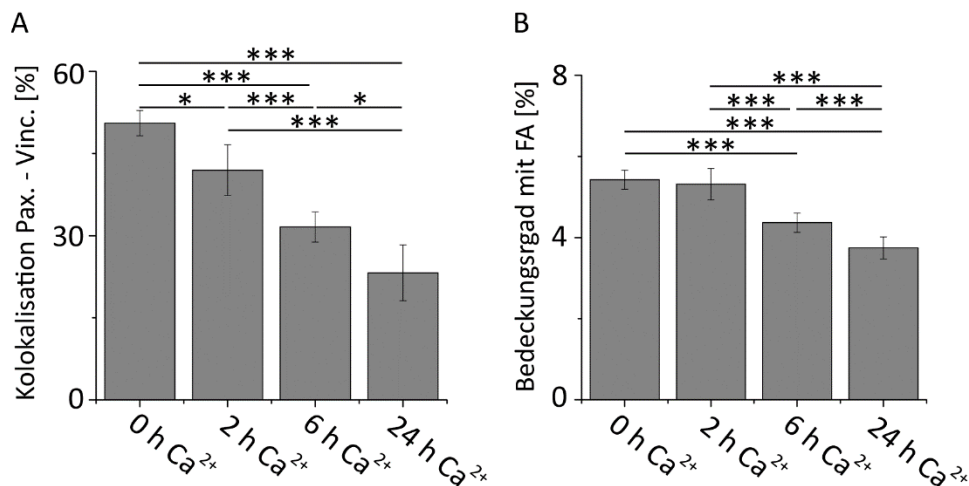
Nach einer Kalziuminkubation der Zellen für 24 h war eine verringerte Anzahl an Paxillin-positiven Strukturen im Vergleich zu Zellen ohne Kalziumeinfluss erkennbar (Abbildung 14 C). Die Aktinfasern waren parallel zueinander angeordnet und wurden kaum im zentralen Bereich der Zellen detektiert, sondern bildeten eine ringartige Struktur entlang der Zellränder. Der Bedeckungsgrad der Zellgrenzen mit Vinculin stieg bei verlängerter Inkubationsdauer mit Kalzium weiter an, während die Kolokalisation von Vinculin und Paxillin reduziert war.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten eine Kolokalisation der Signale für Vinculin und Paxillin, welche mit zunehmender Kalziuminkubation abnahm. Diese Kolokalisation sollte durch eine quantitative Analyse näher untersucht werden. Dafür wurden bildweise die Signale der Proteine in den mikroskopischen Aufnahmen der basalen Ebene ohne Einbeziehung der Signalintensität detektiert und der Überlappungsbereich bestimmt (siehe Abschnitt 2.4 und Abbildung 15).



**Abbildung 15: Analyse der Kokalisation von Paxillin und Vinculin in Abhängigkeit der Kalziuminkubationsdauer.** Beispielabbildungen der automatisierten Bestimmung der Kokalisation von Paxillin und Vinculin. Ohne Einfluss von Kalzium **(A)** ist der überwiegende Anteil von Paxillin- und Vinculinsignalen kokalisiert (gelbe Bereiche). Die Kalziuminkubation **(B)** führt dazu, dass beide Signale auch nach Auswertung klar voneinander abgrenzbar sind und die Kokalisation beider Signale niedriger ist. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ .

Ohne Einfluss von Kalzium waren 50,6% des Paxillinsignals mit dem von Vinculin kokalisiert ( $CI_{95} = 2,4\%$ ,  $n = 67$ ), nach zweistündiger Inkubation mit Kalzium waren es noch 42,0% ( $CI_{95} = 4,7\%$ ,  $n = 57$ ) (siehe Abbildung 16). Wurden die Zellen für 6 h mit Kalzium inkubiert, betrug die Kokalisation noch 31,6% ( $CI_{95} = 2,8\%$ ,  $n = 41$ ), nach 24 h war diese weiter auf 23,2% ( $CI_{95} = 5,2\%$ ,  $n = 13$ ) reduziert. Die Kokalisation von Paxillin und Vinculin unterschied sich für alle Zeitpunkte signifikant voneinander und sank mit steigender Kalziuminkubationsdauer.



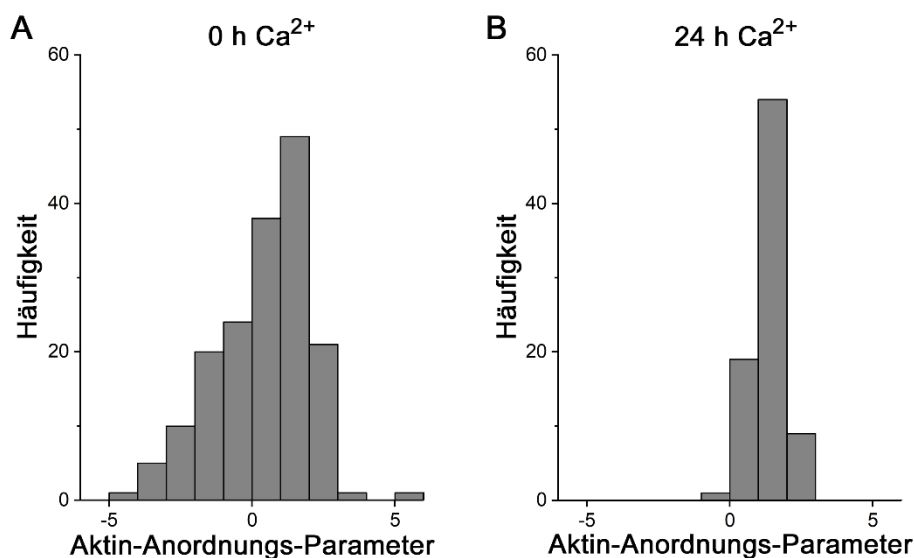
**Abbildung 16: Analyse der Kolo-kalisation von Paxillin und Vinculin sowie des Bedeckungsgrades der Zelle mit Paxillin in Abhängigkeit der Kalziuminkubationszeit. (A)** Die Kolo-kalisation von Paxillin und Vinculin in der basalen Ebene sinkt bei steigender Inkubationsdauer mit Kalzium ( $n \geq 13$ ). **(B)** Der Bedeckungsgrad der ausgewerteten Zellen mit Fokaladhäsionen, basierend auf dem Paxillinsignal, nimmt bei steigender Inkubationsdauer mit Kalzium ab ( $n \geq 83$ ).

Um eine Veränderung im Bedeckungsgrad der Zellen mit Fokaladhäsionen näher zu untersuchen, wurde in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen zellweise der Bedeckungsgrad mit Paxillin bestimmt. Zellen ohne Kalziumeinfluss und nach zweistündiger Inkubation unterschieden sich nicht signifikant. Während die Kontrollzellen im Mittel zu 5,4% (CI<sub>95</sub> = 0,3%,  $n = 159$ ) mit Fokaladhäsionen bedeckt waren, lag der Bedeckungsgrad nach zweistündiger Inkubation mit Kalzium bei 5,3% (CI<sub>95</sub> = 0,4%,  $n = 83$ ). Der Bedeckungsgrad sank nach sechsstündiger Inkubation auf 4,4% (CI<sub>95</sub> = 0,3%,  $n = 167$ ) ab und unterschied sich signifikant von den beiden anderen Inkubationszeiten. Eine 24-stündige Inkubation mit Kalzium verringerte die Bedeckung mit Fokaladhäsionen auf 3,8% (CI<sub>95</sub> = 0,3%,  $n = 119$ ) und war signifikant geringer als nach einer Kalziuminkubation für 0 h, 2 h und 6 h. Somit sank bei zunehmender Kalziuminkubationsdauer sowohl der Bedeckungsgrad der Zellen mit Paxillin-haltigen Fokaladhäsionen als auch die Menge des dort kolo-kalisiertes Vinculins.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten zudem, dass die Aktinfasern in Zellen mit Kalziumeinfluss stärker peripher angeordnet waren, als ohne Einfluss von Kalzium. Daher wurde im Anschluss an die Analyse der Fokaladhäsionen auch die Lokalisation der Aktinfasern innerhalb der Zellen detaillierter analysiert. Der Aktin-Anordnungs-

Parameter gab dabei an, ob die Fasern vermehrt zentral oder peripher in der Zelle angeordnet waren. Er ergibt sich aus der Steigung einer Geraden, welche an die Grauwertverteilung innerhalb der Zelle angepasst wurde (für eine detaillierte Beschreibung siehe Abschnitt 2.4). Dabei bedeutet ein positiver Wert eine periphere Lokalisation der Fasern, ein negativer Wert eine zentrale Anordnung.

In Abwesenheit von Kalzium lagen die Werte des Aktin-Anordnungsparameters sowohl im positiven als auch negativen Bereich und wiesen dadurch auf das Vorhandensein von Fasern im zentralen als auch peripheren Bereich der Zellen hin (Abbildung 17 A). Nach Inkubation der Zellen mit Kalzium war die Verteilung der Werte deutlich schmäler als in Zellen ohne Kalziumeinfluss und fast ausschließlich im positiven Bereich (Abbildung 17 B). Während ohne Kalziuminkubation 64% der Zellen einen positiven Wert aufwiesen, waren es nach 24 h Kalziuminkubation 99% der Zellen (Abbildung 17). Dies legt nahe, dass die Inkubation der Zellen mit Kalzium dazu führte, dass die Aktinfasern überwiegend peripher in den Zellen angeordnet wurden.



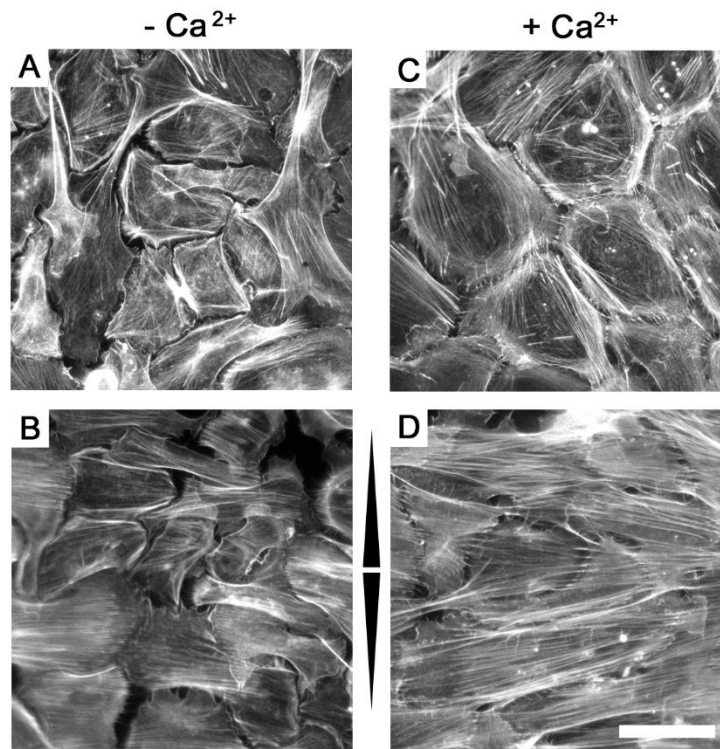
**Abbildung 17: Lokalisation des Aktinnetzwerks in Abhängigkeit von Kalzium. (A)** Der Aktin-Anordnungs-Parameter weist für Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen ohne Kalziumzugabe eine breite Verteilung über positive und negative Werte auf (n = 170). **(B)** Für Zellen unter Kalziumeinfluss ist die Verteilung der Werte deutlich schmäler und fast ausschließlich im positiven Bereich, was für eine periphere Lokalisation der Aktinfasern innerhalb der Zellen spricht (n = 83).



### 3.2 Adhäsionsstrukturen und Aktinzytoskelett unter Dehnung

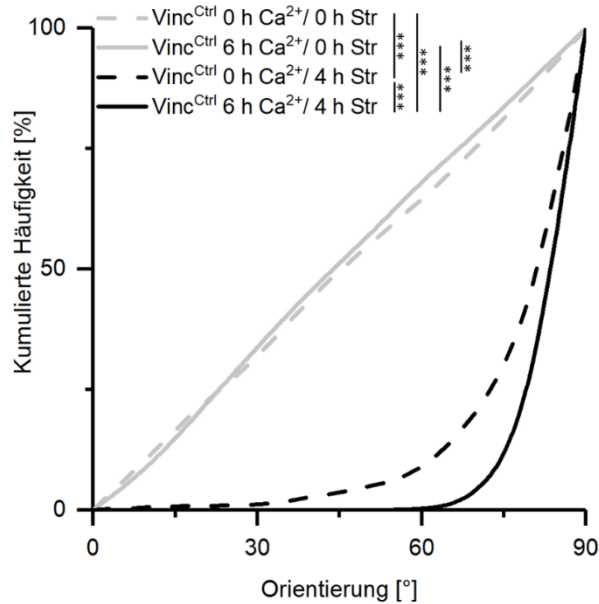
Die Inkubation der Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen mit Kalzium führte zu einer Umstrukturierung des Aktinnetzwerkes von einer zentralen Organisation hin zu einer ringförmigen Anordnung im peripheren Bereich der Zelle. Die dabei beobachtete Lokalisation von Vinculin an den Zell-Zell-Grenzen weist auf die Entstehung von interzellulären Adhäsionen hin. Diese stellen einen wichtigen Mechanismus dar, um die Integrität eines Gewebes *in vivo* zu gewährleisten. Daher wurde nachfolgend die Antwort differenzierender Zellen auf zyklische Dehnung untersucht. Dazu wurden Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen in Abwesenheit oder Gegenwart von Kalzium über einen Zeitraum von 4 h zyklisch gedehnt. Die Aktinfaserorientierung innerhalb der Zellen wurde mit Hilfe digitaler Bildverarbeitung bestimmt und für alle Zellen als kumulierte Häufigkeit angegeben. Dabei entsprach ein Wert von 0° einer Orientierung entlang der angelegten Zugrichtung und 90° einer senkrechten Orientierung relativ zur Zugrichtung.

Das Anlegen einer zyklischen Dehnung über 4 h führte in Zellen ohne Einfluss von Kalzium zu einer Umorientierung des Aktinnetzwerkes senkrecht zur angelegten Zugrichtung (Abbildung 18 A und B). Die Fasern waren nach Dehnung parallel zueinander angeordnet und zeigten gegenüber den ungedehnten Zellen eine einheitliche Vorzugsorientierung. Sowohl in ungedehnten als auch gedehnten Zellen waren interzelluläre Zwischenräume erkennbar und die Zellen konnten voneinander abgegrenzt werden. Die Inkubation der ungedehnten Kontrollzellen mit 1,8 mM Ca<sup>2+</sup> führte, wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, zu einer Umorientierung des Aktinnetzwerkes zu einer vorwiegend peripheren und parallelen Anordnung innerhalb der Zellen (Abbildung 18 A und C). Das Anlegen einer zyklischen Dehnung über 4 h in Anwesenheit von Kalzium führte ebenfalls zu einer Reorientierung der Aktinfasern (Abbildung 18 C und D). Diese schien gegenüber Zellen ohne Einfluss von Kalzium verstärkt zu sein (Abbildung 18 B und D). Nach Kalziuminkubation waren sowohl in gedehnten als auch ungedehnten Zellen kaum Zellzwischenräume erkennbar. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten zudem, dass die Fasern in benachbarten Zellen nach Dehnung unter Kalziumeinfluss häufig in einem ähnlichen Winkel orientiert waren, was auf die Ausbildung von Aktin-assoziierten Zell-Zell-Kontakten hinwies.



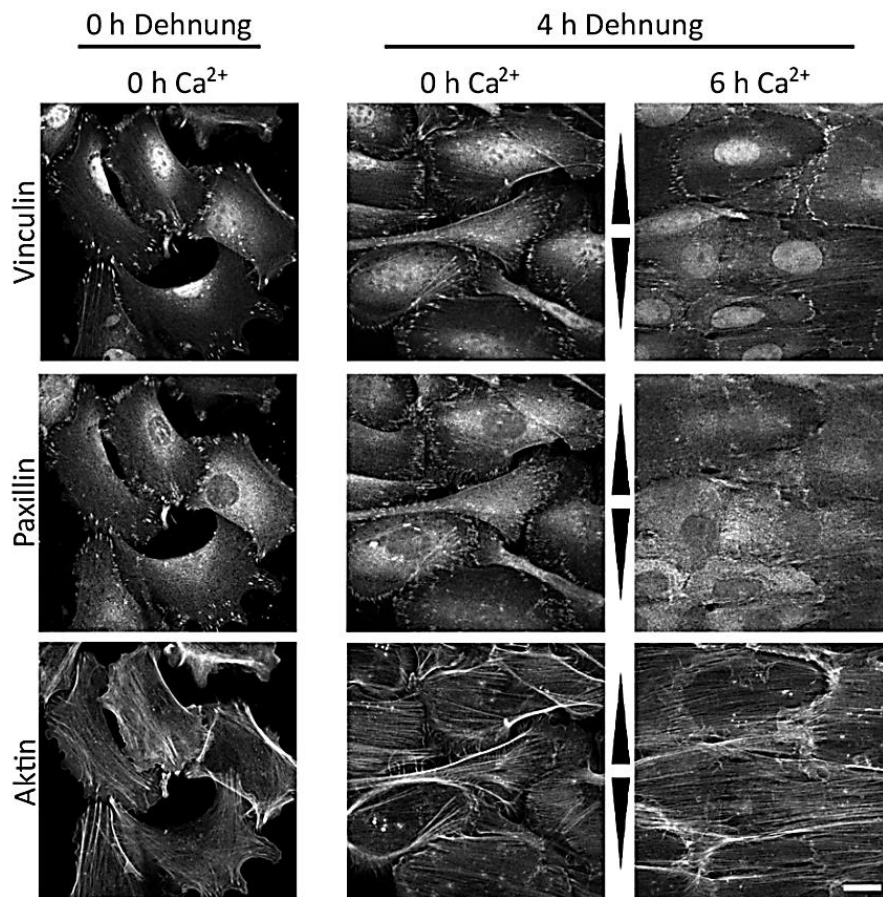
**Abbildung 18: Immunfluoreszenzaufnahmen von Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen vor und nach zyklischer Dehnung und Kalziuminkubation.** In ungedehnten Zellen sind die Aktinfasern unabhängig von der Kalziuminkubation ohne Vorzugsrichtung orientiert (**A, C**). Dehnung induziert eine verstärkt rechtwinklige Orientierung in Anwesenheit von Kalzium (**D**) im Vergleich zu gedehnten Zellen ohne Kalziumeinwirkung (**B**). Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 50  $\mu\text{m}$ .

Die quantitative Auswertung der Aktinfaserorientierung bestätigte die subjektiven Beobachtungen aus den Immunfluoreszenzaufnahmen. Die Kontrollzellen mit und ohne vorheriger Kalziuminkubation wiesen eine Gleichverteilung der Aktinfaserorientierung über alle Winkel von  $0^\circ$  bis  $90^\circ$  auf. Dabei unterschieden sich die Verteilungen nicht signifikant voneinander. Die Verteilung der Aktinfasern in gedehnten Zellen in Abwesenheit von Kalzium wich signifikant von der Gleichverteilung ab und wies auf eine Reorientierung des Aktinnetzwerks hin. Die Verteilung der Aktinfasern in Zellen, welche in Anwesenheit von Kalzium gedehnt wurden, wich stärker von der Gleichverteilung ab, als Zellen ohne Kalziumeinfluss. Während die Fasern in Zellen ohne Kalzium Winkel zwischen  $30^\circ$  und  $90^\circ$  einnahmen, wiesen die Fasern in Zellen mit Kalziumeinfluss Winkel in einem Bereich von nur  $60^\circ$  bis  $90^\circ$  auf. Sie orientierten somit signifikant stärker hin zu  $90^\circ$  als Zellen ohne Kalziumeinfluss.



**Abbildung 19: Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit von Kalzium sowie für gedehnte und ungedehnte Zellen.** Ungedehnte Kontrollzellen zeigen keine Vorzugsorientierung der Aktinfasern. Gedehnte Zellen in Anwesenheit von Kalzium weichen signifikant stärker von der Gleichverteilung ab, als Zellen ohne Einfluss von Kalzium.  $n_{0h/0h} = 157$ ,  $n_{6h/0h} = 284$ ,  $n_{0h/4h} = 416$ ,  $n_{6h/4h} = 402$ .

Nachdem in Abschnitt 3.1 bereits gezeigt wurde, dass die Adhäsionsproteine Vinculin und Paxillin durch Kalziuminkubation umgelagert werden, sollte der Einfluss von Dehnung auf diese Proteine in An- und Abwesenheit von Kalzium ebenfalls untersucht werden. Dazu wurden die Proteine Paxillin, Vinculin und Aktin in gedehnten Zellen mit und ohne Einfluss von Kalzium immunzytochemisch gefärbt. Die resultierende Färbung wurde anschließend mikroskopisch analysiert (siehe Abbildung 20).

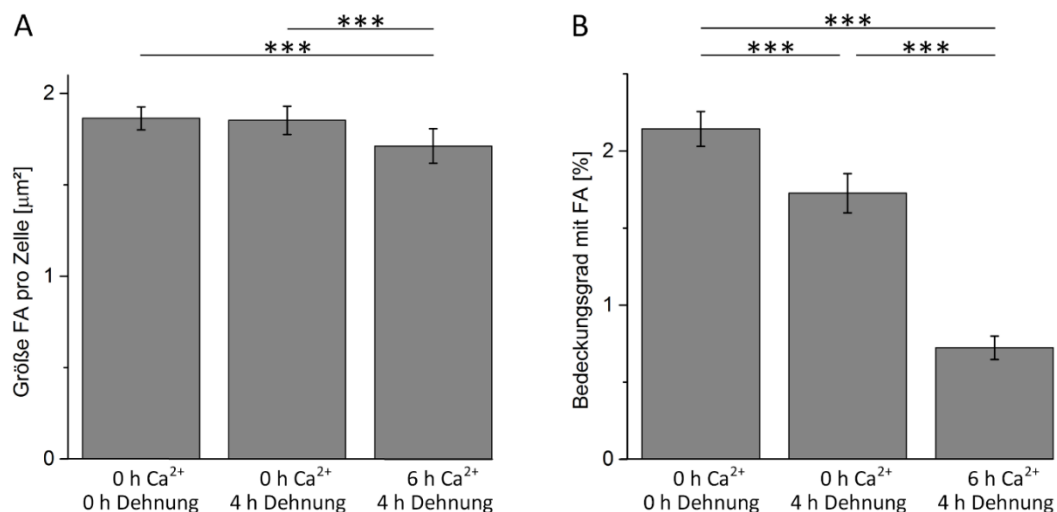


**Abbildung 20: Immunfluoreszenzaufnahmen von Adhäsionsproteinen und dem Aktinnetzwerk vor und nach Kalziuminkubation und zyklischer Dehnung.** Die linke Spalte zeigt Vinc<sup>Ctrl</sup> Zellen in Abwesenheit von Dehnung und Kalzium. Die mittlere Spalte zeigt Zellen, welche in Abwesenheit von Kalzium gedehnt wurden, die in der rechten Spalte gezeigten Zellen wurden unter Kalziumeinfluss gedehnt. Die Dehnung induziert eine Umorientierung der Aktinfasern senkrecht zur Zugrichtung, welche durch Kalziumzugabe verstärkt wird. Das Paxillinsignal befindet sich an den Enden von Aktinfasern. Das Vinculinsignal ist ohne Kalzium mit Paxillin kolokalisiert und ist nach Dehnung in Anwesenheit von Kalzium auch an Zell-Zell-Grenzen detektierbar. Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 20 µm.

Die Fokaladhäsionen in ungedehnten Zellen ohne Kalziumeinfluss waren an den Zellrändern lokalisiert (Abbildung 20 links). Dabei war das Signal für Vinculin und Paxillin kolokalisiert. Die Dehnung der Zellen in Abwesenheit von Kalzium führte zu einer Umorientierung der Aktinfasern senkrecht zur Zugrichtung (Abbildung 20 Mitte). Die Vinculin- und Paxillinsignale waren an den Zellrändern kolokalisiert und vermehrt dort detektierbar, wo die Aktinfasern endeten. Die Inkubation mit Kalzium vor und während der Dehnung führte dazu, dass die Aktinfasern deutlich stärker entgegengesetzt zur Zugrichtung angeordnet waren, wobei die Aktinfasern benachbarter Zellen häufig eine

identische Orientierung aufwiesen (Abbildung 20 rechts). Das Vinculinsignal war nicht mehr vollständig mit dem Paxillinsignal kolokalisiert, sondern ebenfalls an den Zellgrenzen als linienförmige Struktur an den Enden der umorientierten Fasern detektierbar.

Die Auswertung des Bedeckungsgrades und der Größe von Fokaladhäsionen zeigte, dass die Bedeckung der Zellen mit Fokaladhäsionen durch eine Inkubation mit Kalzium im Mittel von 2,1% ( $CI_{95} = 0,2\%$ ) auf 1,7% ( $CI_{95} = 0,2\%$ ) sank (Abbildung 21 B). Die Größe der Fokaladhäsionen blieb dabei nahezu identisch (Abbildung 21 A). Sie unterschied sich bei ungedehnten Zellen, wo sie eine Größe von durchschnittlich 1,8% ( $CI_{95} = 0,1\%$ ) aufwiesen, nicht signifikant von gedehnten Zellen unter Kalziumeinfluss mit gleicher Größe. Durch Zugabe von Kalzium vor der Dehnung wurde die Größe der Fokaladhäsionen auf 1,7% ( $CI_{95} = 0,1\%$ ) reduziert. Der Bedeckungsgrad der Zellen sank auf 0,7% ( $CI_{95} = 0,1\%$ ). Beide Parameter waren im Vergleich zu ungedehnten und gedehnten Zellen ohne Kalziumeinfluss signifikant geringer. Neben der Reorientierung der Aktinfasern führte die angelegte Dehnung zu einer verringerten Größe und Anzahl an Fokaladhäsionen. Dieser Effekt wurde durch die Inkubation mit Kalzium verstärkt.

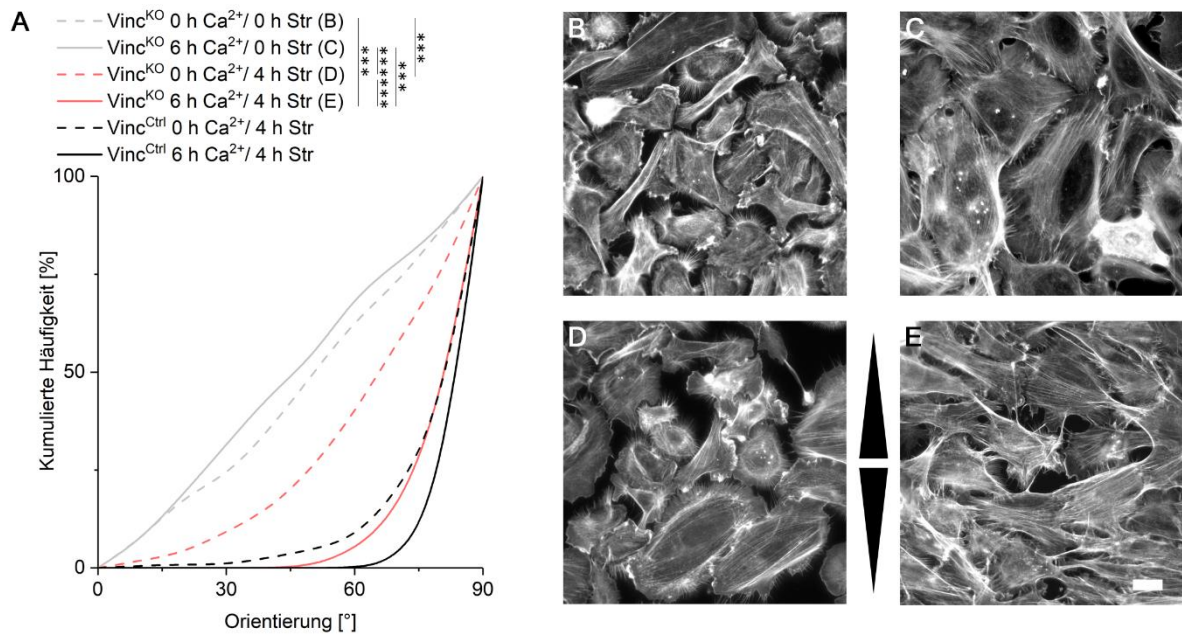


**Abbildung 21: Analyse von Fokaladhäsionen unter Dehnung.** (A) Die Größe der Fokaladhäsionen pro Zelle verringert sich durch Dehnung unter Kalziumeinfluss signifikant ( $n_{0h/0h} = 253$ ,  $n_{0h/4h} = 234$ ,  $n_{6h/4h} = 208$ ). (B) Der Bedeckungsgrad der Zellen mit Fokaladhäsionen sinkt durch Anlegung zyklischer Dehnung signifikant ( $n_{0h/0h} = 253$ ,  $n_{0h/4h} = 238$ ,  $n_{6h/4h} = 230$ ). Die Abnahme wurde durch Kalziuminkubation verstärkt.

### 3.3 Einfluss von Vinculin auf die Aktinfaserreorientierung

Es konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Zellen mit Kalzium zu einer verstärkten Reorientierung von Aktinfasern als Antwort auf zyklische Dehnung und einer Umlagerung des Proteins Vinculin führt. Vinculin ist bereits als Protein in Fokaladhäsionen bekannt und eine Lokalisation in Adherens Junction konnte ebenfalls bereits gezeigt werden [109]. Da beide Strukturen Aktin-assoziiert sind und somit Einfluss auf das Reorientierungsverhalten haben können, sollte der Einfluss von Vinculin auf die verstärkte Reorientierung in Zellen unter Kalziumeinfluss untersucht werden. Dazu wurden vinculin-freie Zellen ( $Vinc^{KO}$ ) und Kontrollzellen ( $Vinc^{Ctrl}$ , siehe Kapitel 3.2) mit und ohne Einfluss von Kalzium für 4 h gedehnt und anschließend die Aktinfaserorientierung bestimmt.

In Abwesenheit einer zyklischen Dehnung war in  $Vinc^{KO}$ -Zellen unabhängig von der Zugabe von Kalzium eine gleichmäßige Verteilung der Fasern ohne Vorzugsrichtung zu erkennen (Abbildung 22 B, C). Im Vergleich zu den Kontrollzellen führte die Zugabe von Kalzium hier nicht zu einer ausgeprägten parallelen peripheren Anordnung der Aktinfasern, sondern zu einer weiterhin zentralen Lokalisation (Abbildung 22 C). Nach vierstündiger Dehnung war im Vergleich zu den Kontrollzellen nur eine geringe Reorientierung der Aktinfasern erkennbar (Abbildung 22 C). Innerhalb der  $Vinc^{KO}$ -Zellen waren die Aktinfasern weniger parallel angeordnet und wiesen eine breitere Winkelverteilung als in  $Vinc^{Ctrl}$ -Zellen auf. Dies bestätigte sich auch in der Auswertung der Aktinfaserorientierung. Hier wich die Verteilung der gedehnten Zellen ohne Kalzium zwar signifikant von der Gleichverteilung ab, aber deutlich weniger stark als die für die  $Vinc^{Ctrl}$ -Zellen, welche mit den gleichen Parametern gedehnt wurden (Abbildung 22 A).



**Abbildung 22: Aktinfaserausrichtung in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen.** (A) Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen in Anwesenheit und Abwesenheit von Kalzium sowie für gedehnte und ungedehnte Zellen ( $n_{0h/0h} = 368$ ,  $n_{6h/0h} = 127$ ,  $n_{0h/4h} = 345$  und  $n_{6h/4h} = 224$ ). (B-E) Immunfluoreszenzaufnahmen der Vinc<sup>KO</sup>-Zellen in Abhängigkeit von Dehnung und Kalziumeinfluss. Der Pfeil gibt die Zugrichtung an. Maßstab 20 µm.

Nach Kalziumzugabe wuchsen die Zellen häufig übereinander, während Zellen in Abwesenheit von Kalzium nebeneinander angeordnet waren (Abbildung 22 E). Nach anschließender Dehnung wiesen Vinc<sup>KO</sup>-Zellen eine signifikant stärkere Reorientierung des Aktinnetzwerkes im Vergleich zu Zellen ohne Kalziumeinfluss auf (Abbildung 22 A und E). Weiterhin waren insgesamt mehr Stressfasern zu erkennen als in ungedehnten Zellen, deren Orientierung setzte sich jedoch im Gegensatz zu Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen weniger oft in den Nachbarzellen fort. Insgesamt waren die Fasern in den Vinc<sup>KO</sup>-Zellen nach Dehnung sowohl mit als auch ohne Kalziumzugabe weniger stark hin zu 90° orientiert als die Aktinfasern in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen.

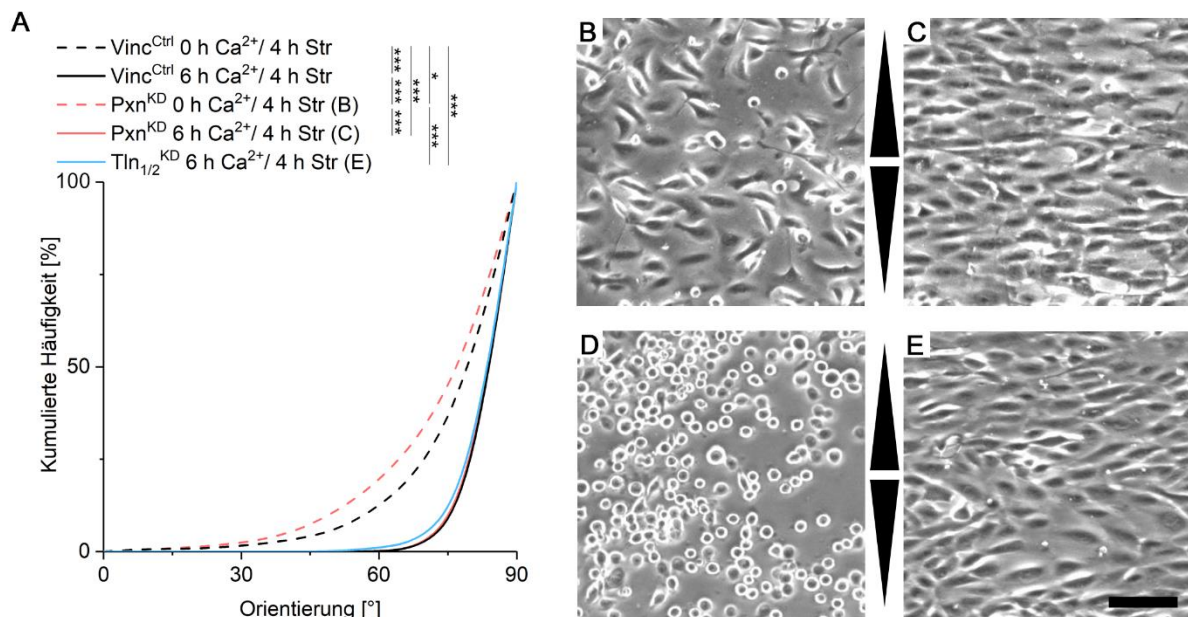
### 3.4 Einfluss von Fokaladhäsionen auf die Aktinfaserreorientierung

Da das Protein Vinculin sowohl in Fokaladhäsionen als auch in Adherens Junctions lokalisiert ist, konnte kein eindeutiger Rückschluss auf den ursächlichen Funktionsort

von Vinculin auf das Reorientierungsverhalten in Zellen unter Kalziueinfluss gemacht werden. Daher sollte zunächst der Einfluss der Fokaladhäsionen auf die Reorientierung nach Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten spezifischer analysiert werden. Hierfür wurde das Fokaladhäsionsprotein Paxillin, welches kein Bestandteil von Adherens Junctions ist, mit Hilfe von in die Zellen eingebrachter siRNA herunterreguliert (Pax<sup>KD</sup>). Die generierten Zellen wurden bei einer Frequenz von 300 mHz für 4 h um 14% gedehnt und die Aktinfaserausrichtung analysiert. In einem weiteren vergleichenden Experiment wurde zudem das zentrale Fokaladhäsionsprotein Talin (Isoform 1 und 2) ebenfalls mittels Einbringung spezifischer siRNA herunterreguliert und die generierten Zellen für vergleichende Zugexperimente verwendet (Tln<sub>1/2</sub><sup>KD</sup>). Zum Vergleich der Stärke der Reorientierung der Aktinfasern wurden die Winkelhäufigkeiten von gedehnten Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen mit und ohne Einfluss von Kalzium ebenfalls aufgetragen (Vergleich Kapitel 3.2).

Die Dehnung von Pax<sup>KD</sup>-Zellen in Abwesenheit von Kalzium und damit vorherrschenden Zell-Matrix-Adhäsionen führte zu einer Reorientierung der Aktinfasern (Abbildung 23 A). Die Häufigkeitsverteilung wich signifikant von der Gleichverteilung ab. Ebenfalls erkennbar war ein signifikanter Unterschied zu der Winkelverteilung der Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen. Die Zellen mit herunterreguliertem Paxillingehalt reorientierten ihr Aktinzytoskelett weniger stark in Reaktion auf die angelegte Dehnung als die Kontrollzellen. Die Inkubation der Pax<sup>KD</sup>-Zellen mit Kalzium zur Induktion von Zell-Zell-Kontakten und die anschließende Dehnung der Zellen führten zu einer gesteigerten Reorientierung der Aktinfasern. Die Winkelverteilung der Aktinfasern war deutlich schmaler als die der Zellen ohne Kalziueinfluss und unterschied sich signifikant von dieser. In Anwesenheit von Kalzium unterschied sich die Verteilung weiterhin nicht mehr signifikant von der Verteilung der Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen. Dieser Unterschied ist ebenfalls in den Phasenkontrastaufnahmen der Pax<sup>KD</sup>-Zellen erkennbar (Abbildung 23 B und C). Die Zellen ohne Kalziuminkubation zeigten nach Dehnung nur selten eine elliptische Morphologie, während die Zellen, welche mit Kalzium inkubiert und gedehnt wurden, ihren Zellkörper ebenfalls rechtwinklig zur Zugrichtung ausrichteten.





**Abbildung 23: Aktinfaserausrichtung in Pax<sup>KD</sup>- und Tln<sub>1/2</sub><sup>KD</sup>-Zellen.** (A) Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserausrichtung ( $n_{\text{Pax}/0\text{h}/4\text{h}} = 1133$ ,  $n_{\text{Pax}/6\text{h}/4\text{h}} = 516$ ,  $n_{\text{Tln}/6\text{h}/4\text{h}} = 594$ ). Eine Häufigkeitsverteilung für Zellen mit reduzierter Talinexpression konnte aufgrund der Ablösung der Zellen nach Dehnung ohne Kalzium (D) nicht bestimmt werden. Zusätzlich dargestellt sind die kumulierten Häufigkeiten der in An- und Abwesenheit von Kalzium gedehnten Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen. Zu beachten ist, dass die rote und schwarze Kurve vollständig übereinander liegen. (B-E) Phasenkontrastaufnahmen der Pax<sup>KD</sup>-Zellen (B und C) und Tln<sub>1/2</sub><sup>KD</sup>-Zellen (D und E) in Abhängigkeit von Dehnung und Kalziumeinfluss. Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 100  $\mu\text{m}$ .

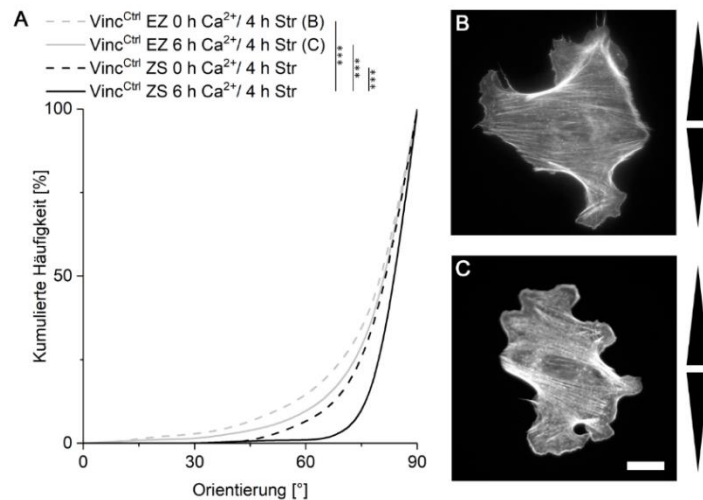
Im Anschluss an die Experimente an Zellen mit verminderter Paxillin-Expression wurden Zellen mit herunterregulierter Talin-Expression für Zugexperimente genutzt. Die zyklische Dehnung der Tln<sub>1/2</sub><sup>KD</sup>-Zellen in Abwesenheit von Kalzium führte dazu, dass die Zellen, welche zuvor aufgespannt auf dem Substrat adhärent waren, abgekugelt und teilweise vollständig vom Substrat abgelöst waren (Abbildung 23 D). Folglich konnte für diese Zellen keine Analyse der Aktinfaserausrichtung durchgeführt werden. Die Zugabe von Kalzium zu den Tln<sub>1/2</sub><sup>KD</sup>-Zellen vor und während der Dehnung führte im Gegensatz zu den Zellen ohne Kalzium dazu, dass die Zellen adhärent blieben und eine gleichmäßige Zellschicht ausbildeten (Abbildung 23 E). Die Zellen wiesen vergleichbar mit Pax<sup>KD</sup>-Zellen unter Kalziumeinfluss eine elliptische Morphologie auf und die Zellkörper waren senkrecht zur Zugrichtung orientiert. Die Analyse der Aktinfaserausrichtung zeigte, dass sich die Winkelverteilung in Zellen unter Kalziumeinfluss nicht signifikant von der Verteilung in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen oder Pax<sup>KD</sup>-Zellen unterschied. Die Ergebnisse der

Zugexperimente ließen darauf schließen, dass die Beeinträchtigung von Fokaladhäsionen zu einer verminderten Reorientierung unter Bedingungen führte, unter denen die Zelladhäsion hauptsächlich durch Zell-Matrix-Adhäsionen bestimmt ist. Die Inkubation mit Kalzium zur Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten rief hingegen in allen Zelltypen ein vergleichbares Reorientierungsverhalten mit Kontrollzellen hervor.

### **3.5 Einfluss der Zelldichte auf die Reorientierung**

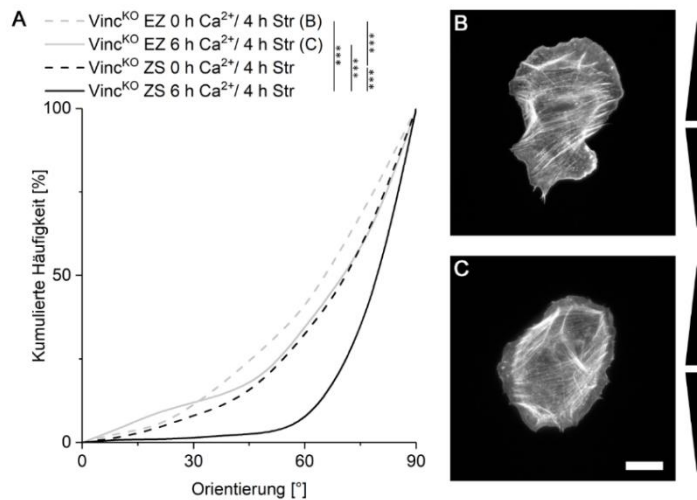
Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die Zugabe von Kalzium zu einer verstärkten Reorientierung des Aktinnetzwerkes als Antwort auf zyklische Dehnung führte. Allerdings konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, dass ein rein kalziumabhängiger Signalweg für die Reaktion verantwortlich ist und die erhöhte Aktinreorientierung nicht von der Ausbildung interzellulärer Kontakte abhängt. Um dies zu überprüfen wurden Zugexperimente an Einzelzellen (EZ) und Zellschichten (ZS) in An- und Abwesenheit von Kalzium durchgeführt, um herauszufinden, ob die Zugabe von Kalzium allein zu einer Verstärkung führen kann oder die unmittelbare Nähe zu anderen Zellen erforderlich ist. Es wurden sowohl Vinc<sup>Ctrl</sup>- als auch Vinc<sup>KO</sup>-Zellen mit 300 mHz für 4 h um 14% gedehnt und im Anschluss die Aktinfaserorientierung ausgewertet.

Die Dehnung von Vinc<sup>Ctrl</sup>-Einzelzellen führte mit und ohne Einfluss von Kalzium zu einer Reorientierung der Aktinfasern nahezu senkrecht zur Zugrichtung (Abbildung 24). Die Fasern waren innerhalb der Zellen parallel angeordnet und die Verteilungen der Winkel unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Dehnung von Zellschichten in Abwesenheit von Kalzium resultierte ebenfalls in einer Reorientierung der Aktinfasern, wie sie auch in den vorigen Experimenten beobachtet wurde. Das Ergebnis war vergleichbar mit der Orientierung der Fasern in Einzelzellen und unterschied sich daher nicht signifikant von deren Winkelverteilungen. Die Dehnung von Zellschichten unter Kalziumeinfluss hingegen führte zu einer signifikant verstärkten Reorientierung, die deutlich stärker von einer Gleichverteilung abwich, als die von Einzelzellen und Zellschichten ohne Kalziumzugabe.



**Abbildung 24: Aktinfaserorientierung in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Einzelzellen und -Zellschichten. (A)** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung in Einzelzellen ( $n_{0h\ Ca^{2+}} = 214$ ,  $n_{6h\ Ca^{2+}} = 243$ ), und Zellschichten ( $n_{0h\ Ca^{2+}} = 201$ ,  $n_{6h\ Ca^{2+}} = 178$ ). **(B und C)** Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfasern in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Einzelzellen ohne **(B)** und mit **(C)** Einfluss von Kalzium. Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 20  $\mu$ m.

Die Dehnung von Vinc<sup>KO</sup>-Einzelzellen führte wie in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen zu einer Reorientierung der Aktinfasern, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden (Abbildung 25). Die Aktinfasern in Vinc<sup>KO</sup>-Zellschichten reorientierten geringfügig stärker hin zu 90° als Einzelzellen, unterschieden sich aber deutlich von Zellschichten, welche in Anwesenheit von Kalzium gedehnt wurden. Diese wiesen eine deutlich stärkere Reorientierung auf als Einzelzellen mit und ohne Kalziumeinfluss sowie Zellschichten ohne Kalziumeinfluss. Zu allen anderen Verteilungen unterschied sich diese signifikant. So konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von Kalzium nur in Zellschichten in Vinc<sup>Ctrl</sup>- und Vinc<sup>KO</sup>-Zellen zu einer verstärkten Reorientierung senkrecht zur Zugrichtung führte.



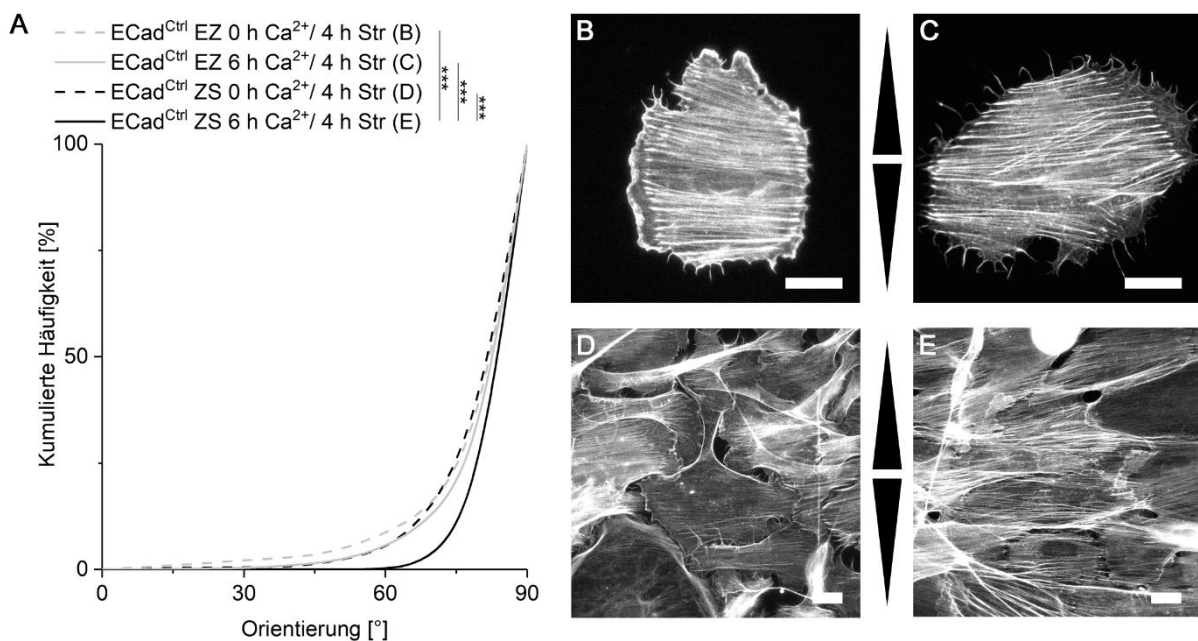
**Abbildung 25: Aktinfaserorientierung in Vinc<sup>KO</sup>-Einzelzellen und -Zellschichten. (A)** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung in Einzelzellen ( $n_{0h\ Ca^{2+}} = 229$ ,  $n_{6h\ Ca^{2+}} = 162$ ) und Zellschichten ( $n_{0h\ Ca^{2+}} = 225$ ,  $n_{6h\ Ca^{2+}} = 185$ ). **(B und C)** Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfasern in Vinc<sup>KO</sup>- Einzelzellen ohne **(B)** und mit **(C)** Einfluss von Kalzium. Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 20  $\mu$ m.

### 3.6 Einfluss von Adherens Junctions auf die Aktinreorientierung

#### 3.6.1 Reorientierungsverhalten in E-Cadherin-freien Zellen

Die Zugexperimente an Einzelzellen und Zellschichten in An- und Abwesenheit von Kalzium haben gezeigt, dass eine verstärkte Reorientierung der Aktinfasern nur durch Zugabe von Kalzium in Zellschichten hervorgerufen wird. Weder die Zugabe von Kalzium zu Einzelzellen noch die unmittelbare Nähe der Zellen zueinander ohne Kalziumeinfluss reichte für eine vergleichbar starke Reorientierung aus. Es ist daher anzunehmen, dass für dieses Verhalten kein kalziumabhängiger Signalweg sondern kalziumabhängig ausgebildete interzelluläre Adhäsionen verantwortlich sind. Um diese Annahme zu prüfen, wurden Zellen, welche das Adherens Junction Protein E-Cadherin nicht exprimieren (ECad<sup>KO</sup>), für vergleichende Zugexperimente an Einzelzellen (EZ) und Zellschichten (ZS) genutzt. Die Zellen wurden in An- und Abwesenheit von Kalzium für 4 h mit einer Frequenz von 300 mHz um 14% gedehnt und die resultierende Orientierung der Aktinfasern ausgewertet. Als Kontrollzellen dienten Keratinozyten, die E-Cadherin exprimierten (ECad<sup>Ctrl</sup>).

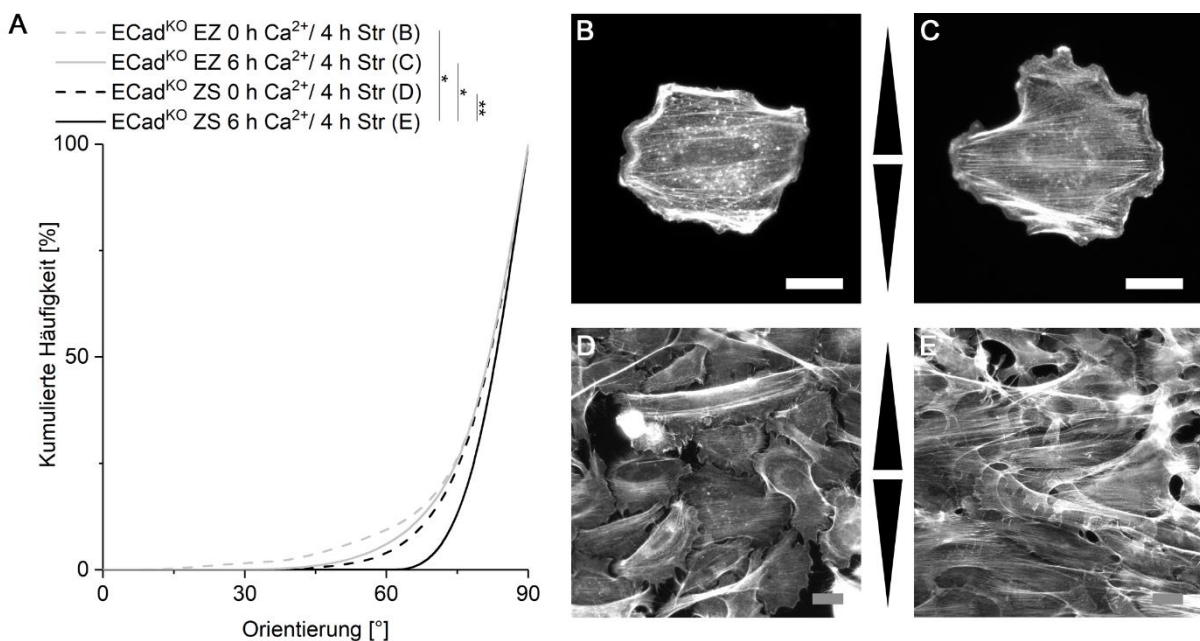
Die für diese Experimente genutzten  $\text{ECad}^{\text{Ctrl}}$ -Zellen zeigten ein vergleichbares Verhalten zu den im vorherigen Experiment genutzten  $\text{Vinc}^{\text{Ctrl}}$ -Zellen. Die Aktinfaserorientierung in Zellschichten ohne Kalziumeinfluss war nahezu identisch zu der Winkelverteilung in Einzelzellen mit und ohne Kalziuminkubation und unterschied sich nicht signifikant (Abbildung 26). Erst die Zugabe von Kalzium zu konfluenten Zellschichten resultierte in einer verstärkten Reorientierung der Aktinfasern. Diese unterschied sich signifikant von den Verteilungen aller anderen Bedingungen.



**Abbildung 26: Aktinfaserorientierung in  $\text{ECad}^{\text{Ctrl}}$ -Einzelzellen und -Zellschichten.** (A) Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung in Einzelzellen ( $n_{0\text{h Ca}^{2+}} = 400$ ,  $n_{6\text{h Ca}^{2+}} = 409$ ) und Zellschichten ( $n_{0\text{h Ca}^{2+}} = 528$ ,  $n_{6\text{h Ca}^{2+}} = 501$ ). (B-E) Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfasern in  $\text{ECad}^{\text{Ctrl}}$ -Einzelzellen und Zellschichten. Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 20 µm.

Die Experimente an  $\text{ECad}^{\text{KO}}$ -Zellen zeigten, dass Aktinfasern in Einzelzellen in An- und Abwesenheit von Kalzium vergleichbar stark reorientiert waren und sich die Verteilungen nicht signifikant voneinander unterschieden (Abbildung 27). Die Winkelverteilung von Fasern in Zellschichten ohne Kalziumeinfluss unterschied sich ebenfalls nicht signifikant von Einzelzellen. Die Immunfluoreszenzen zeigten, dass die Zellen in Zellschichten ohne Kalzium voneinander abgrenzbar waren und keine durch mehrere Zellen verlaufende einheitliche Orientierung der Fasern nachweisbar war. Die Zugabe von Kalzium führte unerwarteterweise jedoch auch in den  $\text{ECad}^{\text{KO}}$ -Zellen zu einer

verstärkten Reorientierung der Aktinfasern. Die Winkelverteilung unterschied sich signifikant von der Verteilung in Einzelzellen und Zellschichten ohne Kalziuminkubation und die Immunfluoreszenzen zeigten eine ähnliche Morphologie der Zellen, wie sie in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen beobachtet wurde. Es waren keine Zellzwischenräume erkennbar und die Aktinfasern benachbarter Zellen schienen häufig eine gleiche Orientierung aufzuweisen. Das Zellverhalten ähnelte damit dem Verhalten von ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen, obwohl E-Cadherin als zentrales Protein der Aktin-assoziierten Adherens Junctions nicht exprimiert wurde.

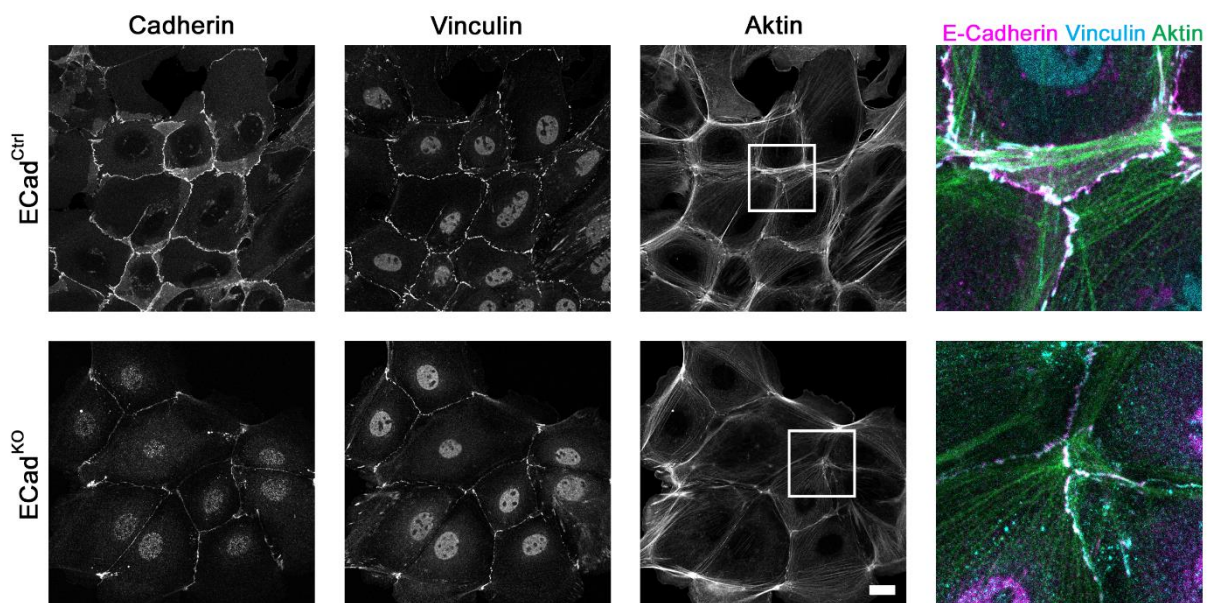


**Abbildung 27: Aktin视角orientierung in ECad<sup>KO</sup>-Einzelzellen und -Zellschichten.** (A) Kumulierte Häufigkeiten der Aktin视角orientierung in Einzelzellen ( $n_{0h\ Ca^{2+}} = 201$ ,  $n_{6h\ Ca^{2+}} = 217$ ) und Zellschichten ( $n_{0h\ Ca^{2+}} = 212$ ,  $n_{6h\ Ca^{2+}} = 154$ ). (B-E) Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktin视角fasern in ECad<sup>KO</sup>-Einzelzellen ohne (B) und mit (C) Einfluss von Kalzium sowie Zellschichten ohne (D) und mit (E) Einfluss von Kalzium. Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 20  $\mu$ m.

### 3.6.2 Cadherin-Expression in E-Cadherin-freien Zellen

Zur Familie der Cadherine gehören neben dem hauptsächlich in epithelialen Geweben exprimierten E-Cadherin auch weitere Cadherine, welche vermehrt in anderen Gewebe exprimiert sind. Da gezeigt werden konnte, dass nur die Inkubation von Zellschichten mit Kalzium zu einer verstärkten Reorientierung führte, dieser Effekt aber auch in ECad<sup>KO</sup>-Zellen zu sehen war, wurden ECad<sup>Ctrl</sup>- und ECad<sup>KO</sup>-Zellschichten für 24 h mit

Kalzium inkubiert und anschließend immunzytochemisch gefärbt und mikroskopisch analysiert. Neben den Proteinen Aktin und Vinculin wurden auch Cadherine angefärbt. Hierzu wurde ein Antikörper genutzt, der neben einer E-Cadherin-Spezifität auch eine Kreuzreaktivität für das nahe verwandte P-Cadherin aufwies. Die immunzytochemische Färbung zeigte in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen eine deutliche Lokalisation des Cadherinsignals entlang der Zellgrenzen (Abbildung 28). Dieses war mit dem Vinculinsignal kolokalisiert und wies auf das Vorhandensein von Zell-Zell-Kontakten hin. Die Aktinfasern waren in der Peripherie der Zellen in parallelen Bündeln angeordnet. Die Enden der Fasern liefen häufig an Stellen mit positivem Cadherin- und Vinculinsignal zusammen.

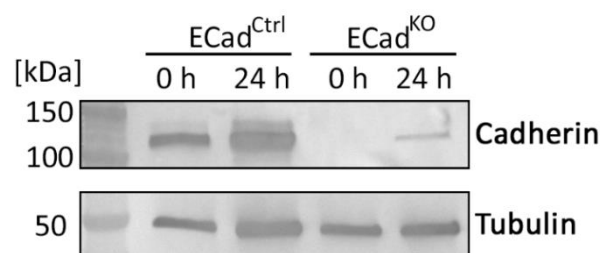


**Abbildung 28: Immunfluoreszenzaufnahmen von ECad<sup>Ctrl</sup>- und ECad<sup>KO</sup>-Zellschichten.** Die Proteine Aktin, Vinculin und Cadherin wurden in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen und ECad<sup>KO</sup>-Zellen nach einer Kalziuminkubation von 24 h immunzytochemisch gefärbt. Ein Cadherinsignal, welches mit dem Vinculinsignal kolokalisiert ist, konnte durch Anpassen der mikroskopischen Einstellungen in beiden Zelltypen detektiert werden. Der weiße Rahmen in der Abbildung des Aktin-Signals gibt den Bereich an, welcher in der rechten Spalte vergrößert dargestellt wurde. Maßstab 20 µm.

Die vergleichende Mikroskopie von ECad<sup>Ctrl</sup>- und ECad<sup>KO</sup>-Zellschichten mit gleichen mikroskopischen Einstellungen zeigte zunächst kein Cadherinsignal. Die Aktinfasern waren jedoch auch in diesen Zellschichten in parallelen Bündeln angeordnet, die in der Peripherie der Zellen lokalisiert waren. Das Vinculinsignal war an den Zellgrenzen lokalisiert und lief an den Zellgrenzen häufig mit Aktinfasern zusammen. Eine Anpassung der Helligkeit führte dazu, dass ein Cadherinsignal nun auch in den ECad<sup>KO</sup>-Zellen

detektiert werden konnte. Dieses war wie in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen entlang der Zellgrenze lokalisiert und häufig mit dem Vinculinsignal kolokalisiert. Insgesamt war das Signal in ECad<sup>KO</sup>-Zellen deutlich schwächer ausgeprägt als in Kontrollzellen, markierte aber spezifisch die Zellgrenzen.

Eine Bindung des Antikörpers an andere Cadherine konnte auf Grund der angegebenen Kreuzreaktivität nicht ausgeschlossen werden. Diese legte die Vermutung nahe, dass der Antikörper in ECad<sup>KO</sup>-Zellen an vermehrt exprimiertes P-Cadherin gebunden haben könnte. Dies würde einen kompensatorischen Effekt der Zellen für das Fehlen von E-Cadherin darstellen und konnte bereits in anderen Experimenten beschrieben werden [110]. Um das Vorhandensein von Cadherinen auf Ebene der Proteinexpression unabhängig von den mikroskopischen Analysen nachzuweisen, wurden ECad<sup>Ctrl</sup>- und ECad<sup>KO</sup>-Zellen als Zellschicht kultiviert, je eine Probe für 24 h mit kalziumhaltigem Medium inkubiert und nach Gesamtproteinisolation ein Western Blot durchgeführt. Hierfür wurde der bereits in den Immunfluoreszenzfärbungen verwendete Antikörper gegen E-Cadherin genutzt. Die Western Blot Analyse zeigte ein deutliches Signal für Cadherine in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen (Abbildung 29). Dieses war für Zellen, die mit Kalzium inkubiert wurden stärker, als für Zellschichten ohne Kalziuminkubation. In ECad<sup>KO</sup>-Zellen ohne Kalziumeinfluss konnte kein Signal für eine Färbung von Cadherinen detektiert werden. Die Inkubation mit Kalzium für 24 h führte jedoch auch in ECad<sup>KO</sup>-Zellen zu einer Bande, die spezifisch für Cadherine war, aber deutlich schwächer ausfiel, als in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen.



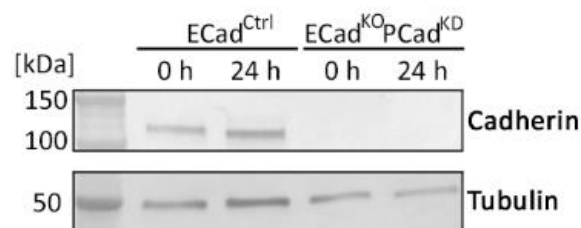
**Abbildung 29: Analyse des Cadheringehalts in ECad<sup>Ctrl</sup>- und ECad<sup>KO</sup>-Zellen.** Die verschiedenen Zelltypen wurden als Zellschicht mit und ohne Kalzium inkubiert. Die Färbung des Western Blots zeigt das Vorhandensein von Cadherinen in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen mit und ohne Kalziumeinfluss. Cadherine können in ECad<sup>KO</sup>-Zellen ohne Kalziuminkubation nicht nachgewiesen werden, sind in geringer Menge aber nach einer Kalziuminkubation von 24 h detektierbar.



### 3.6.3 Reduktion von P-Cadherin in E-Cadherin-freien Zellen

Die Ergebnisse der im vorigen Abschnitt beschriebenen Experimente legen nahe, dass die Deletion von E-Cadherin durch die Expression von P-Cadherin kompensiert wird. Daher wurde für die folgenden Experimente in ECad<sup>KO</sup>-Zellen zusätzlich das Protein P-Cadherin mittels siRNA herunterreguliert. Mit Hilfe dieser Zellen wurde anschließend der Einfluss von Adherens Junctions auf die Aktinreorientierung durch zyklische Dehnung untersucht.

Um eine ausreichende Herunterregulierung von Cadherinen sicherzustellen, wurde die Menge des verbliebenen P-Cadherins überprüft. Hierfür wurde nach 24-stündiger Kalziuminkubation eine Western Blot Analyse durchgeführt, um sicherzustellen, dass keine detektierbare Menge an Cadherinen mehr exprimiert wurde. Dieser zeigte ein deutliches Signal für ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen, welche ohne und mit Kalzium inkubiert wurden (Abbildung 30). Die Deletion von E-Cadherin und zusätzliche Herunterregulierung von P-Cadherin führte zum Verlust detektierbarer Mengen von Cadherinen in Proteinextrakten aus ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellen sowohl in Ab- als auch Anwesenheit von Kalzium.

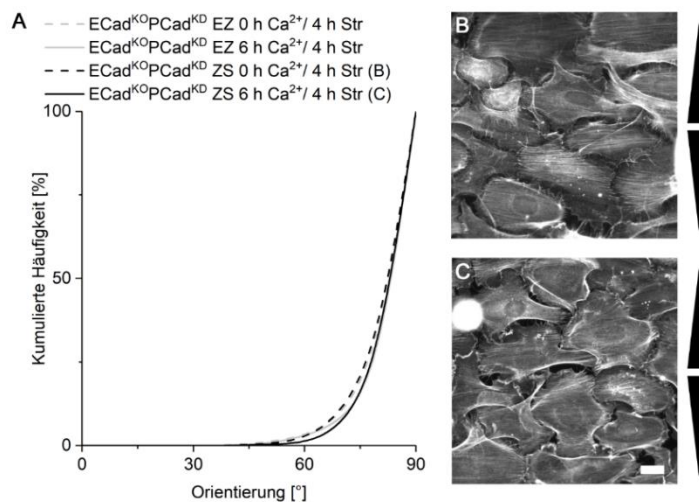


**Abbildung 30: Analyse des Cadheringehalts in ECad<sup>Ctrl</sup>- und ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellen.** Die Zellen wurden als Zellschicht mit und ohne Kalzium inkubiert. Die Färbung des Western Blots zeigt das Vorhandensein von Cadherinen in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen mit und ohne Kalziumeinfluss. Cadherine können im Gegensatz dazu in ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellen sowohl ohne als auch mit Kalziuminkubation nicht mehr nachgewiesen werden.

Das vollständige Fehlen eines Signals für Cadherine im Western Blot legt nahe, dass ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellen nun als System zur Analyse fehlender Cadherin-vermittelter Adherens Junctions eingesetzt werden konnten. Daher wurden diese Zellen für Dehnungsexperimente an Einzelzellen und Zellschichten genutzt. Die Zellen wurden in

An- und Abwesenheit von Kalzium für 4 h mit einer Frequenz von 300 mHz um 14% gedehnt.

Die anschließende Auswertung der Aktinfaserorientierung zeigte, dass die Winkelverteilung der Aktinfasern in ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Einzelzellen mit und ohne Einfluss von Kalzium ähnlich war (Abbildung 31 A). Beide Verteilungen unterschieden sich nicht signifikant. Die Dehnung von Zellschichten in Abwesenheit von Kalzium führte ebenfalls zu einer Reorientierung der Aktinfasern weg von der Zugrichtung (Abbildung 31). Sie überlagerte die Verteilungen der Einzelzellen nahezu vollständig und unterschied sich von diesen nicht signifikant. Die Winkelverteilung für ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellschichten unter Kalziumeinfluss unterschied sich jedoch nicht mehr signifikant von Einzelzellen und Zellschichten ohne Kalziumeinfluss. In diesen Zellen führte die Inkubation mit Kalzium damit nicht zu der zuvor beobachteten Steigerung im Reorientierungsverhalten der Aktinfasern.



**Abbildung 31: Aktinfaserorientierung in ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Einzelzellen und Zellschichten. (A)** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung in Einzelzellen ( $n_{0h\ Ca^{2+}} = 277$ ,  $n_{6h\ Ca^{2+}} = 270$ ) und Zellschichten ( $n_{0h\ Ca^{2+}} = 432$ ,  $n_{6h\ Ca^{2+}} = 421$ ). **(B und C)** Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfasern in gedehnten ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellschichten ohne **(B)** und mit **(C)** Einfluss von Kalzium. Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 20 µm.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen der gedehnten Zellschichten zeigten, dass die ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellen auch unter Kalziumeinfluss weiterhin eine geringe Distanz zwischen den einzelnen Zellen aufwiesen (Abbildung 31 B und C). Die Aktinfasern

durchspannten die Zellen, eine durch mehrere Zellen verlaufende Orientierung in benachbarten Zellen war nicht zu erkennen. Die Parallelität und Ausrichtung der Aktinfasern war für Zellen mit und ohne Kalziuminkubation vergleichbar. Dies lässt vermuten, dass in ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellschichten keine Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten durch Kalziumeinfluss stattgefunden hat.

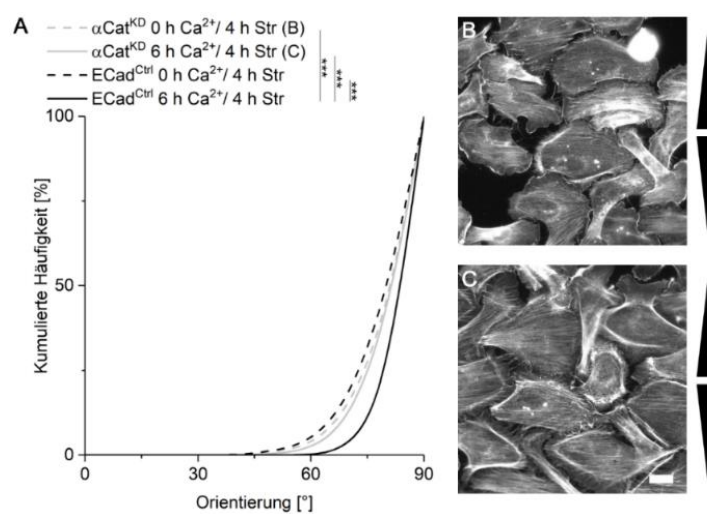
### **3.7 Einfluss von $\alpha$ -Catenin auf das Reorientierungsverhalten**

#### **3.7.1 Reduktion von $\alpha$ -Catenin in E-Cadherin-freien Zellen**

Die Experimente an ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellen zeigten, dass die Inkubation von Zellschichten mit Kalzium zu einer verstärkten Aktinfaserreorientierung als Antwort auf zyklische Dehnung führt, welche in Abwesenheit von Adherens Junctions nicht mehr beobachtet werden kann. Da Cadherine als extrazelluläre Proteine zwar die Zellen miteinander verbinden, die Bindung an das Aktinzytoskelett aber über eine Reihe weiterer intrazellulärer Proteine geschieht, sollte mithilfe vergleichender Zugexperimente ein mögliches mechanosensorisches Protein identifiziert werden. Das Adherens Junctions Protein  $\alpha$ -Catenin bindet intrazellulär direkt an Aktin und ist über weitere Catenine an E-Cadherin gekoppelt [111]. Ein mechanosensitives Verhalten konnte für  $\alpha$ -Catenin bereits gezeigt werden [80], sodass im Folgenden analysiert werden sollte, in welchem Maße  $\alpha$ -Catenin für die Aktinfaserreorientierung als Folge von zyklischer Dehnung mitverantwortlich ist.

Zur Untersuchung des Einflusses von  $\alpha$ -Catenin auf die Aktinfaserorientierung wurde in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen das Protein  $\alpha$ -Catenin mittels siRNA herunterreguliert. Anschließend wurden die generierten Zellen für Zugexperimente für 4 h mit 300 mHz um 14% gedehnt. Dazu wurden sie als Zellschichten in An- und Abwesenheit von Kalzium kultiviert. Im Anschluss an die zyklische Dehnung wurde das Aktinnetzwerk gefärbt und die Winkelverteilung der Aktinfasern nach zyklischer Dehnung ausgewertet. Zum Vergleich der Stärke der Reorientierung wurden die Häufigkeiten von ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellschichten ebenfalls aufgetragen (Vergleich Kapitel 3.6.1).

Die Immunfluoreszenzaufnahmen der gedehnten  $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellen zeigen, dass ohne Kalziuminkubation eine Reorientierung der Fasern rechtwinklig zur Zugrichtung erkennbar war (Abbildung 32 B). Die Zellen lagen dicht beieinander und Zwischenräume zwischen den Zellen waren erkennbar. Die Färbung der gedehnten Zellen unter Kalziumeinfluss zeigt, dass auch hier eine Reorientierung der Fasern vorlag, welche sich augenscheinlich nicht von der in Zellen ohne Kalziumeinfluss unterschied (Abbildung 32 C). Auch in diesen Zellschichten waren Zwischenräume zwischen den Zellen erkennbar, was unter Einfluss von Kalzium für nicht oder nur unzureichend ausgebildete Adherens Junctions spricht.



**Abbildung 32: Aktinfaserorientierung in  $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellschichten.** (A) Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung in  $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellen mit ( $n = 244$ ) und ohne ( $n = 257$ ) Kalziumeinfluss im Vergleich zu  $\text{Ecad}^{\text{Ctrl}}$ -Zellen. (B und C) Immunfluoreszenzaufnahmen der Aktinfasern in gedehnten  $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellen mit (C) und ohne (B) Kalziumeinfluss. Die Pfeile geben die Zugrichtung an. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ .

Die kumulierten Häufigkeiten zeigten vergleichbare Winkelverteilungen für  $\text{Ecad}^{\text{Ctrl}}$ -Zellen und  $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellen ohne Kalziuminkubation (Abbildung 32 A). Die Aktinfasern in beiden Zelltypen waren ohne Einfluss von Kalzium vergleichbar stark reorientiert und unterschieden sich nicht signifikant. Wie bereits zuvor beschrieben, resultierte die Dehnung von Kontrollzellen in Anwesenheit von Kalzium in einer verstärkten Reorientierung rechtwinklig zur Zugrichtung und unterschied sich signifikant von  $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellschichten ohne Kalziumeinfluss. Die Winkelverteilung von  $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellschichten nach Kalziuminkubation ähnelte der Verteilung von  $\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellen

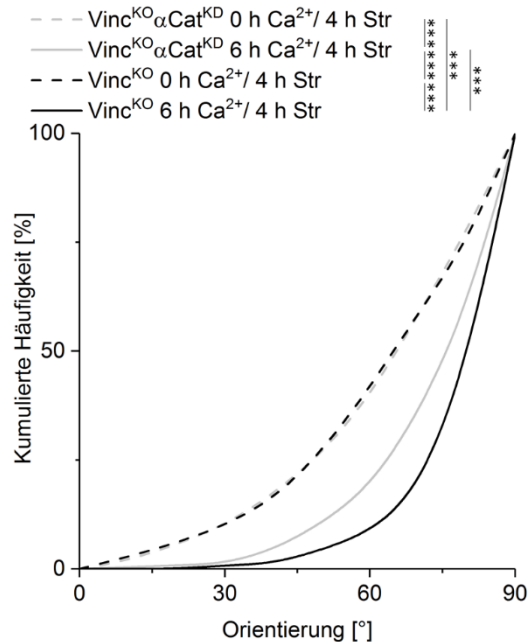
ohne den Einfluss von Kalzium. Sie unterschieden sich nicht signifikant voneinander, während es einen signifikanten Unterschied zur Verteilung von Kontrollzellen mit Kalziuminkubation gab.

### 3.7.2 Reduktion von $\alpha$ -Catenin in Vinculin-freien Zellen

Die Experimente an E $\text{Cad}^{\text{Ctrl}}$ -Zellen mit verminderter  $\alpha$ -Catenin-Expression konnten zeigen, dass die Reorientierung von Aktinfasern infolge zyklischer Dehnung auch in Zellschichten mit Kalziumeinfluss reduziert war. Diese war vergleichbar mit der Reorientierung von Einzelzellen bzw. Zellschichten ohne Kalziumeinfluss, was darauf hinweist, dass  $\alpha$ -Catenin eine zentrale Rolle in der Aktinfaserreorientierung in Zellschichten unter Kalziumeinfluss spielt. Da Vinculin durch  $\alpha$ -Catenin gebunden wird und Vinc $^{\text{KO}}$ -Zellen sowohl in An- als auch Abwesenheit von Kalzium eine verminderte Reorientierung zeigten, wurde durch Reduktion von  $\alpha$ -Catenin in Vinc $^{\text{KO}}$ -Zellen ein möglicher additiver Effekt näher analysiert.

Für die Experimente wurden Vinc $^{\text{KO}}\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellschichten und Vinc $^{\text{KO}}$ -Zellschichten als Kontrollzellen für 4 h mit einer Frequenz von 300 mHz um 14% zyklisch gedehnt und im Anschluss daran die Aktinfaserorientierung ausgewertet. Die Dehnung der Vinc $^{\text{KO}}\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellschichten ohne Kalziuminkubation resultierte in einer leichten Reorientierung der Aktinfasern in senkrechte Richtung relativ zur Zugrichtung (Abbildung 33). Die Winkelverteilung wich hierbei von einer Gleichverteilung in einem vergleichbaren Maß wie in den Vinc $^{\text{KO}}$ -Zellschichten ab. Beide Kurven überlagerten sich und unterschieden sich nicht signifikant. Beide waren damit weniger stark reorientiert als in Vinc $^{\text{KO}}$ -Zellen, welche vor und während der zyklischen Dehnung mit Kalzium inkubiert wurden. Die Inkubation von Vinc $^{\text{KO}}\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellen mit Kalzium und anschließender zyklischer Dehnung führte zu einer Winkelverteilung, die sich signifikant sowohl von der Verteilung in Vinc $^{\text{KO}}\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}$ -Zellen ohne Kalzium als auch von Vinc $^{\text{KO}}$ -Zellen mit Kalziumeinfluss unterschied. Es war somit eine verminderte Reorientierung der Aktinfasern auch in Anwesenheit von Kalzium zu beobachten. Dies zeigte, dass das verminderte Vorhandensein von  $\alpha$ -Catenin auch hier zu einer

Verringerung der verstärkten Aktinfaserreorientierung führte, während  $\alpha$ -Catenin in Abwesenheit von Kalzium und damit Adherens Junctions keinen Einfluss auf die Reorientierung zeigte.



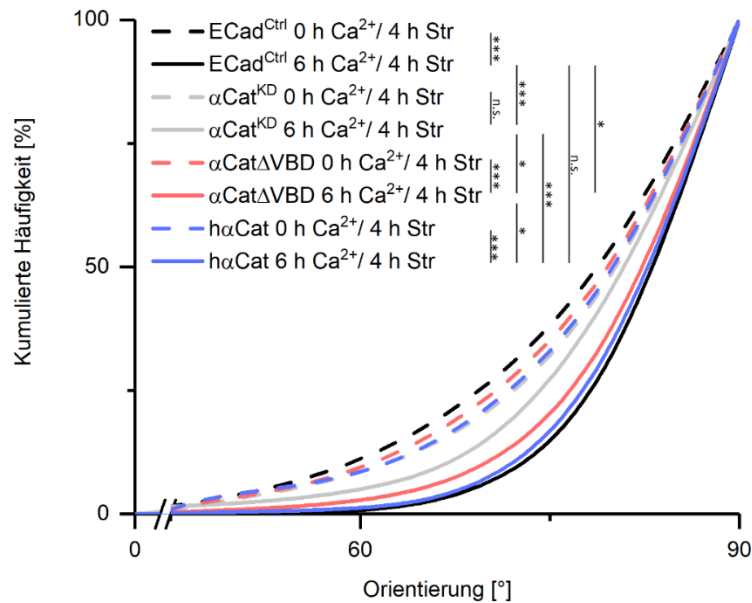
**Abbildung 33: Aktinfaserorientierung in Vinc<sup>KO</sup>αCat<sup>KD</sup>-Zellen.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung in Vinc<sup>KO</sup>αCat<sup>KD</sup>-Zellen mit und ohne Kalziumeinfluss im Vergleich zu Vinc<sup>KO</sup>-Zellen (n=250).

### 3.7.3 Einfluss der Vinculin-Bindedomäne in $\alpha$ -Catenin auf die Reorientierung

Bei der Ausbildung von Aktin-assoziierten Adherens Junctions wird Vinculin an aufgefaltetes  $\alpha$ -Catenin rekrutiert und bindet dort an die Vinculin-Bindedomäne. Am Zell-Zell-Kontakt vermitteln beide Proteine die Verbindung von Cadherinen an das Aktinzytoskelett [109, 112]. Die Experimente an Vinc<sup>KO</sup>-Zellen haben gezeigt, dass eine Inkubation mit Kalzium zu einer gesteigerten Aktinfaserreorientierung senkrecht zur Zugrichtung führt, diese sich aber signifikant von der Verteilung in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellschichten unter Kalziumeinfluss unterscheidet (siehe Kapitel 3.3). Der dadurch vermutete additive Effekt von Vinculin auf die verstärkte Reorientierung wurde daher näher untersucht. Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Schritt  $\alpha$ -Catenin mit einer mausspezifischen siRNA herunterreguliert. Im Anschluss daran wurde ein Plasmid, welches für humanes

$\alpha$ -Catenin ohne Vinculin-Bindedomäne ( $\alpha$ Cat $\Delta$ VBD) kodiert, in die Zellen eingebracht. Zusätzlich wurden Kontrollexperimente durchgeführt, in welchen ein Plasmid in die Zellen eingebracht wurde, welches für das vollständige humane  $\alpha$ -Catenin kodierte ( $h\alpha$ Cat) (für eine detaillierte Beschreibung, siehe Kapitel 2.3.3). Zur Darstellung eines möglichen Unterschieds im Grad der Reorientierung wurde die Winkelverteilung der Aktinfasern in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen sowie von mit der mausspezifischen siRNA behandelten  $\alpha$ Cat<sup>KD</sup>-Zellen ebenfalls aufgetragen.

Die unterschiedlichen Zelltypen wurden als Zellschicht kultiviert und mit und ohne Kalzium für Zugexperimente genutzt und für 4 h mit einer Frequenz von 300 mHz um 14% gedehnt. Die Auswertung der Aktinfaserorientierung zeigte, dass die Fasern in allen Zelltypen in Richtung 90° zur Zugrichtung orientierten (Abbildung 34). Hierbei unterschieden sich die Verteilungen der Aktinfaserorientierungen in allen Zelltypen ohne Einfluss von Kalzium nicht signifikant voneinander. Wie zuvor konnten jedoch Unterschiede im Maß der Reorientierung zwischen Zellen mit und ohne Kalziuminkubation beobachtet werden. Während die Aktinfasern sowohl in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen als auch in  $\alpha$ Cat $\Delta$ VBD-Zellen und  $h\alpha$ Cat-Zellen signifikant stärker in Richtung rechtwinklig zur Zugrichtung orientiert waren wenn sie unter Kalziumeinfluss gedehnt wurden, unterschieden sich die Orientierungen in  $\alpha$ Cat<sup>KD</sup>-Zellen mit und ohne Kalziumeinfluss nicht signifikant voneinander. Dies entsprach den Beobachtungen aus dem in Kapitel 3.7.1 beschriebenen Experiment und wies auf eine effiziente Reduktion von  $\alpha$ -Catenin in ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen hin.



**Abbildung 34: Einfluss der Bindung von Vinculin an  $\alpha$ -Catenin auf die Reorientierung.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen in Kontrollzellen, Zellen mit reduzierter  $\alpha$ -Catenin-Expression, Zellen, welche  $\alpha$ -Catenin ohne Vinculin-Bindedomäne exprimieren und Zellen, welche vollständiges  $\alpha$ -Catenin re-exprimieren.  $n_{\text{Ctrl } 0\text{h Ca}^{2+}} = 416$ ;  $n_{\text{Ctrl } 6\text{h Ca}^{2+}} = 305$ ;  $n_{\alpha\text{CatKD } 0\text{h Ca}^{2+}} = 325$ ;  $n_{\alpha\text{CatKD } 6\text{h Ca}^{2+}} = 451$ ;  $n_{\Delta\text{VBD } 0\text{h Ca}^{2+}} = 372$ ;  $n_{\Delta\text{VBD } 6\text{h Ca}^{2+}} = 763$ ;  $n_{\text{h}\alpha\text{Cat } 0\text{h Ca}^{2+}} = 325$ ;  $n_{\text{h}\alpha\text{Cat } 6\text{h Ca}^{2+}} = 662$ .

Die Expression von h $\alpha$ Cat, also dem intakten und vollständigen  $\alpha$ -Catenin, führte zu einem Reorientierungsverhalten in An- und Abwesenheit von Kalzium, welches sich nicht signifikant von dem der ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen unterschied. Basierend auf einer effizienten Herunterregulierung des murinen  $\alpha$ -Catenins spricht dies für eine Re-Expression und Komplementation durch das humane  $\alpha$ -Catenin in den  $\alpha$ Cat<sup>KD</sup>-Zellen. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Verteilungen der Aktinfaserorientierungen von  $\alpha$ Cat $\Delta$ VBD-Zellen und ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen unter Kalziumeinfluss signifikant voneinander. Die Winkelverteilung der  $\alpha$ Cat $\Delta$ VBD-Zellen war dabei weniger stark reorientiert als die der ECad<sup>Ctrl</sup>-Zellen. Ebenfalls unterschied sie sich signifikant von der Verteilung der h $\alpha$ Cat-Zellen und  $\alpha$ Cat<sup>KD</sup>-Zellen unter Kalziumeinfluss. Während die  $\alpha$ Cat $\Delta$ VBD-Zellen weniger stark reorientiert waren, als die h $\alpha$ cat-Zellen, waren die  $\alpha$ Cat $\Delta$ VBD-Zellen signifikant stärker rechtwinklig zur Zugrichtung orientiert als die  $\alpha$ Cat<sup>KD</sup>-Zellen. Der signifikante Unterschied zu den Zellen, welche  $\alpha$ -Catenin in Volllänge exprimierten, wies darauf hin, dass  $\alpha$ -Catenin zusammen mit Vinculin für das Reorientierungsverhalten von Aktinfasern nach Ausbildung von Adherens Junctions verantwortlich ist.

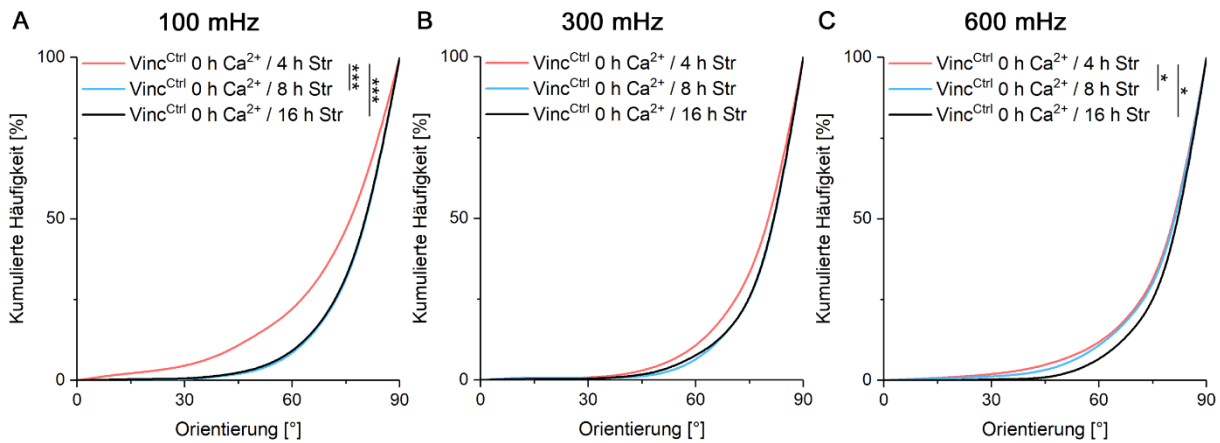


## 3.8 Frequenzabhängigkeit des Reorientierungsprozesses

### 3.8.1 Frequenzabhängigkeit in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen ohne Kalziumeinfluss

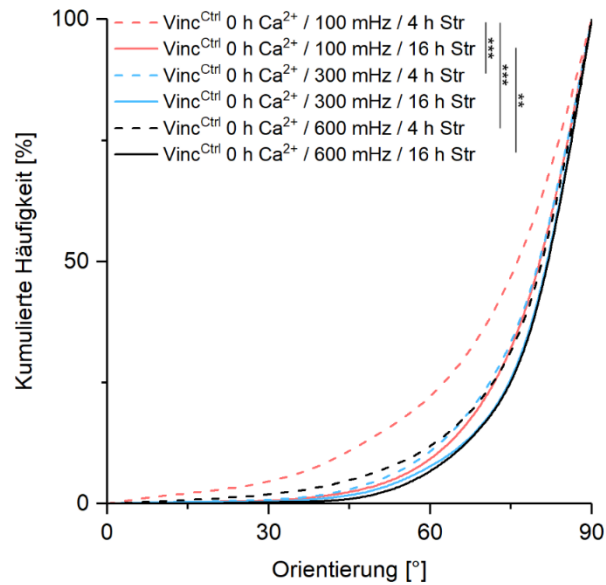
Es konnte mit Hilfe der durchgeführten Dehnungsexperimente gezeigt werden, dass die Inkubation von Zellschichten mit Kalzium nicht nur zur Ausbildung interzellulärer Kontakte führt, sondern die Antwort auf zyklische Dehnung gleichzeitig verändert wird. Die bisherigen Experimente wurden für eine optimale Vergleichbarkeit der Ergebnisse stets mit identischen Parametern durchgeführt. Es konnte daher nicht betrachtet werden, ob die gesteigerte Reorientierung der Aktinfasern in Zellen unter Kalziumeinfluss auf einer unterschiedlichen Reaktionskinetik beruht oder durch die Ausbildung von Aktin-assoziierten Zell-Zell-Kontakten eine Veränderung in der maximalen Orientierung induziert wird. Um diese Optionen genauer zu analysieren, wurden Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellschichten mit unterschiedlichen Frequenzen von 100, 300 beziehungsweise 600 mHz um je 14% zyklisch gedehnt. Die Dauer der Experimente wurde außerdem neben 4 h um die Zeitpunkte 8 h und 16 h erweitert, um eine Veränderung der Zellantwort und den Endpunkt der Reorientierung zu analysieren.

Zunächst wurde für die jeweiligen Frequenzen der zeitliche Verlauf der Reorientierung in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen ohne Einfluss von Kalzium betrachtet. Die Auswertung der Aktinfasern zeigte, dass bei ansteigender Dehnungsdauer eine stärkere Reorientierung rechtwinklig zur Zugrichtung vorlag (Abbildung 35). Dieses zeitabhängige Verhalten konnte gleichermaßen für alle angelegten Frequenzen beobachtet werden. Die Erhöhung der Frequenz führte jedoch zu einer Veränderung der Reorientierungsgeschwindigkeit. Während es bei geringen Frequenzen einen deutlichen Unterschied zwischen kurzen und längeren Dehnungsdauern gab, überlagerten sich die kumulierten Häufigkeiten bei hohen Frequenzen bereits nach 4 h andauernder zyklischer Dehnung. Für alle Frequenzen zeigte sich, dass sich die kumulierten Häufigkeiten für eine Dehnungsdauer von 8 und 16 h in keinem der Experimente signifikant voneinander unterschieden. Dies ließ darauf schließen, dass nach achtstündiger Dehnung eine maximale Ausrichtung in erreicht war.



**Abbildung 35: Zeitabhängige Reorientierung der Aktinfasern in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen bei ansteigenden Dehnungsfrequenzen.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung nach zyklischer Dehnung für 4, 8 und 16 h bei einer Frequenz von 100 mHz (A), 300 mHz (B) und 600 mHz (C).  $n_{A\ 4h} = 752$ ,  $n_{A\ 8h} = 623$ ,  $n_{A\ 16h} = 435$ ,  $n_{B\ 4h} = 646$ ,  $n_{B\ 8h} = 274$ ,  $n_{B\ 16h} = 247$ ,  $n_{C\ 4h} = 794$ ,  $n_{C\ 8h} = 354$ ,  $n_{C\ 16h} = 262$ .

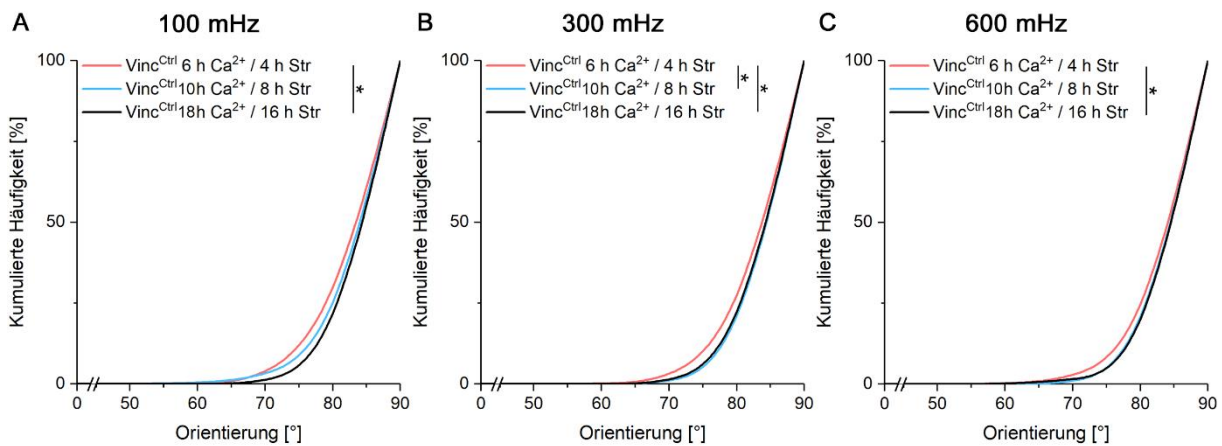
Durch Anordnung der kumulierten Häufigkeiten nach ansteigender Frequenz für die Dehnungsdauern von 4 und 16 h wird die Zeit- und Frequenzabhängigkeit der Reorientierung sichtbar (Abbildung 36). Durch Erhöhung der Dehnungsfrequenz steigt die Stärke der Reorientierung bei gleicher Dehnungsdauer. Nach vierstündiger Dehnung waren die Aktinfasern in Zellen, welche mit 100 mHz gedehnt wurden signifikant weniger stark hin zu 90° orientiert als Aktinfasern in Zellen, welche mit 300 und 600 mHz gedehnt wurden. Dies konnte gleichermaßen für die Aktinreorientierung nach vier- und sechzehnständiger Dehnung beobachtet werden, was für eine Frequenzabhängigkeit insbesondere für geringe Dehnungsdauern spricht. Da bereits gezeigt wurde, dass nach achtstündiger Dehnung eine maximale Faserorientierung erreicht wurde, scheint nicht nur der Verlauf der Reorientierung frequenzabhängig zu sein, sondern auch der Endpunkt. Die Experimente haben somit gezeigt, dass in Abwesenheit von Kalzium eine Steigerung der Reorientierungsgeschwindigkeit und Stärke durch Erhöhung der Frequenz induziert werden kann.



**Abbildung 36: Frequenzabhängige Reorientierung der Aktinfasern in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen bei ansteigenden Dehnungsdauer.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung nach zyklischer Dehnung mit 100, 300 und 600 mHz für 4 h und 16 h.

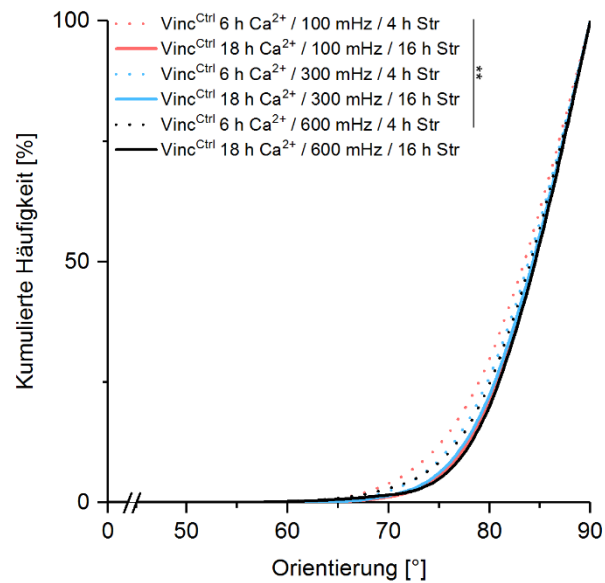
### 3.8.2 Frequenzabhängigkeit unter Einfluss von Kalzium

Nachdem in Abwesenheit von Kalzium eine Frequenzabhängigkeit für die Reorientierung in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen erkennbar war, wurden die Zellen im Anschluss auch in Anwesenheit von Kalzium mit den unterschiedlichen Dehnungsparametern in Experimenten eingesetzt. Dies sollte Aufschluss darüber geben, inwiefern die Ausbildung von Adherens Junctions den zeitlichen Verlauf und die maximale Reorientierung der Aktinfasern beeinflusst. Dazu wurden die Zellen 2 h vor Beginn und während der Dehnung mit einer erhöhten Kalziumkonzentration inkubiert. Die Auswertung der Aktinfaserorientierung zeigte, dass die Fasern für alle Frequenzen vergleichbar stark von einer Gleichverteilung abwichen und nahezu rechtwinklig zur Zugrichtung orientiert waren (Abbildung 37). Die Verteilungen der Zellen, welche für 8 und 16 h gedehnt wurden, unterschieden sich bei keiner Frequenz signifikant voneinander und gaben somit das Maximum der Reorientierung wieder. Gleichzeitig konnte weiterhin ein zeitabhängiges Reorientierungsverhalten beobachtet werden, da sich die Häufigkeiten für eine vierstündige Dehnung für alle Frequenzen signifikant von den Häufigkeiten der sechzehnständigen Dehnung unterschieden.



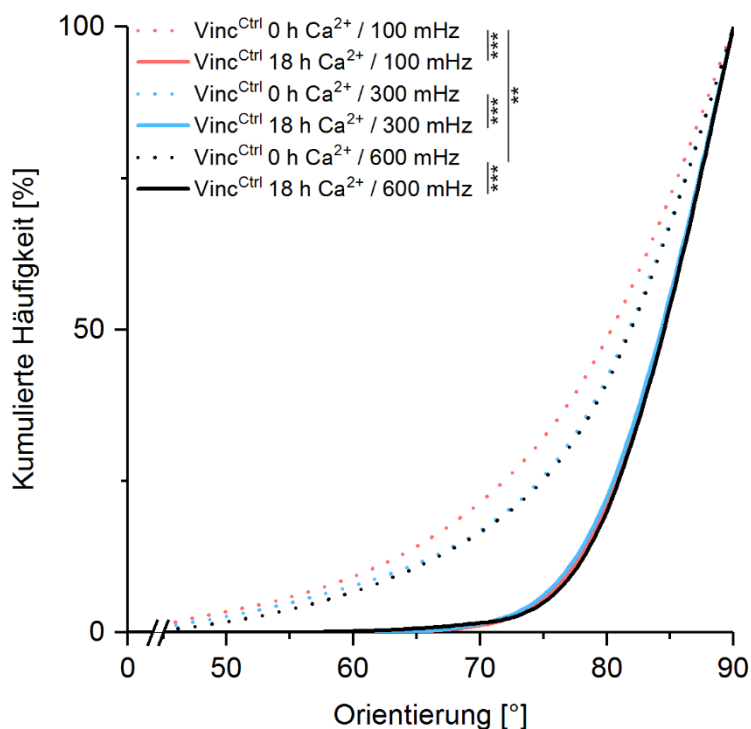
**Abbildung 37: Zeitabhängige Reorientierung der Aktinfasern in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen bei ansteigenden Dehnungsfrequenzen unter Kalziumeinfluss.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung nach zyklischer Dehnung für 4, 8 und 16 h bei einer Frequenz von 100 mHz (A), 300 mHz (B) und 600 mHz (C).  $n_{A\ 4h} = 171$ ,  $n_{A\ 8h} = 201$ ,  $n_{A\ 16h} = 127$ ,  $n_{B\ 4h} = 176$ ,  $n_{B\ 8h} = 181$ ,  $n_{B\ 16h} = 163$ ,  $n_{C\ 4h} = 264$ ,  $n_{C\ 8h} = 282$ ,  $n_{C\ 16h} = 103$ . Vor Beginn der Dehnung wurden die Zellen bereits für 2 h mit Kalzium vorinkubiert und während der Dehnung in erhöhter Kalziumkonzentration belassen.

Die Betrachtung der Häufigkeiten nach ansteigender Frequenz für Dehnungsdauern von 4 h und 16 h zeigte, dass für Zellen unter Kalziumeinfluss auch für die kurze Dehnungsdauer von 4 h nur eine sehr geringe Frequenzabhängigkeit in der Reorientierung zu beobachten war (Abbildung 38). Bereits hier überlagerten sich die kumulierten Häufigkeiten für alle Frequenzen und unterschieden sich nur für 100 und 600 mHz signifikant voneinander. Weiterhin bestätigten die zu deutlich höheren Winkeln reorientierten Fasern unter Kalziumeinfluss unter allen angelegten Frequenzen das zuvor in Abschnitt 3.8.1 aufgezeigte Verhalten (Vergleich Abbildung 36). Nach sechzehnständiger Dehnung wiesen die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Frequenzen keinen signifikanten Unterschied mehr zueinander auf. Dies spricht dafür, dass die Ausbildung von Adherens Junctions zu einer Beschleunigung der Reorientierung führte und eine deutlich reduzierte Frequenzabhängigkeit vorlag, welche nur für kurze Dehnungsdauern zu beobachten war.



**Abbildung 38: Frequenzabhängige Reorientierung der Aktinfasern in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen bei ansteigender Dehnungsdauer und Einfluss von Kalzium.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung nach zyklischer Dehnung mit 100, 300 und 600 mHz für 4 h und 16 h. Zu beachten ist, dass die rote, blaue und schwarze Kurve übereinander liegen.

Die bisherigen Experimente gaben Hinweis darauf, dass in Zellen unter Kalziumeinfluss eine beschleunigte Reorientierung der Aktinfasern bei gleichzeitiger Reduktion der Frequenzabhängigkeit induziert wurde. Dabei ist es möglich, dass es auch in der maximalen Faserausrichtung einen kalziumabhängigen Unterschied gibt. Um eine mögliche Verstärkung der Reorientierung im Endpunkt zu betrachten, wurden die kumulierten Häufigkeiten nach 16 h zyklischer Dehnung in An- und Abwesenheit von Kalzium für alle Frequenzen gemeinsam aufgetragen (Abbildung 39). Da sich die einzelnen Häufigkeiten zwischen einer acht- und sechzehnständigen Dehnung in den durchgeführten Experimenten nicht mehr signifikant unterschieden, konnten so die Endpunkte der Orientierung miteinander verglichen und auf die Darstellung der Werte für eine achtstündige Dehnung verzichtet werden. Der Vergleich zeigte, dass sich die Aktinfaserorientierungen für alle Frequenzen signifikant zwischen Zellen mit und ohne Einfluss von Kalzium unterschieden. Dieses Verhalten weist darauf hin, dass die Reorientierung durch die kalziumabhängige Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten nicht nur beschleunigt wird, sondern auch zu einer unterschiedlichen maximalen Orientierung weg von der Zugrichtung und somit zur Verstärkung der Reorientierung führt.



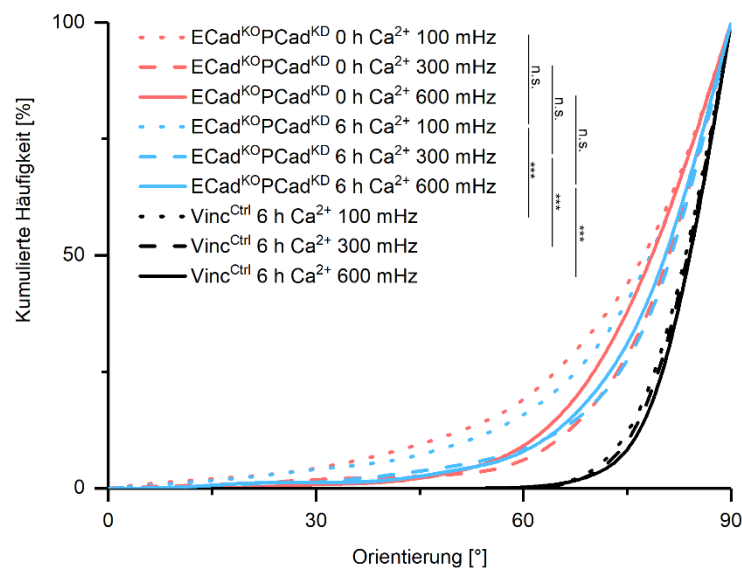
**Abbildung 39: Unterschied der maximalen Aktinfaserorientierung in An- und Abwesenheit von Kalzium.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung nach zyklischer Dehnung mit für 16 h mit 100, 300 und 600 mHz. Zu beachten ist, dass sich die schwarze, blaue und rote Linie überlagern.

### 3.8.3 Frequenzabhängigkeit in Abwesenheit von Adherens Junctions

Die Frequenzabhängigkeit des Reorientierungsverhaltens und insbesondere die Unterschiede der maximalen Aktinfaserreorientierung konnten an Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen gezeigt werden. Dabei führte die Inkubation der Zellen mit Kalzium und vermutlich die damit einhergehende Ausbildung von Adherens Junctions zur Beschleunigung und Verstärkung der Reorientierung. Um zu prüfen, ob diese Unterschiede in den durchgeführten Experimenten auf den Einfluss der Zell-Zell-Adhäsion zurückzuführen sind, wurden zunächst ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellen mit den zuvor beschriebenen Frequenzen für 4 h gedehnt. Dies diente der Überprüfung des Zellverhaltens in Abwesenheit von Adherens Junctions.

Die zyklische Dehnung der ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellen unter Einfluss von Kalzium führte zu einem Reorientierungsverhalten der Aktinfasern, welches sich deutlich von dem in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen unterschied (Vergleich Kapitel 3.8.2). Die Aktinfasern in ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-

Zellen, welche mit Kalzium inkubiert wurden, wiesen für alle Frequenzen eine geringfügig stärkere Reorientierung auf als Zellen ohne Kalziuminkubation (Abbildung 40). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Aktin角度reorientierung in ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup>-Zellen unter Einfluss von Kalzium wich für alle Frequenzen signifikant weniger stark von einer Gleichverteilung ab, als in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen, welche mit Kalzium inkubiert wurden. Dies wies darauf hin, dass in Zellen, welche keine funktionalen Adherens Junctions ausbilden, die Zugabe von Kalzium nicht zu einer Beschleunigung und Verstärkung der Reorientierung führte und sich deren Häufigkeitsverteilungen weniger stark von dem in Zellen ohne Kalziumeinfluss unterschieden, als es für Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen der Fall war.

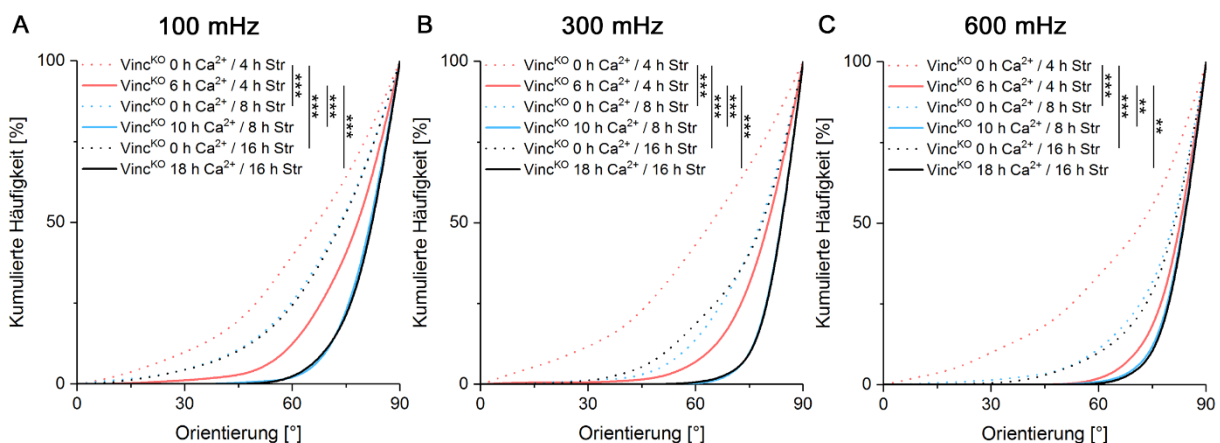


**Abbildung 40: Frequenzabhängige Reorientierung der Aktin角度 in Abwesenheit von Adherens Junctions.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktin角度verteilungen für ECad<sup>KO</sup>-PCad<sup>KD</sup>-Zellen im Vergleich zu Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen in An- und Abwesenheit von Kalzium.  $n_{0h/100mHz} = 681$ ,  $n_{0h/300mHz} = 354$ ,  $n_{0h/600mHz} = 242$ ,  $n_{6h/100mHz} = 484$ ,  $n_{6h/300mHz} = 470$ ,  $n_{6h/600mHz} = 78$ .

Die vorangegangenen Analysen haben gezeigt, dass ein frequenzabhängiges Reorientierungsverhalten sowie eine weniger starke maximale Reorientierung speziell bei Verlust oder in Abwesenheit von Adherens Junctions auftraten. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass das Fehlen von Vinculin sowohl in der Zell-Matrix- als auch Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Reorientierung zu einer Beeinträchtigung führte. Um zu identifizieren, inwiefern Vinculin Einfluss auf die Abhängigkeit der Reorientierung von

Dauer und Frequenz der Dehnung sowie auf die maximale Ausrichtung der Aktinfasern hat, wurden identische Experimente auch in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen durchgeführt.

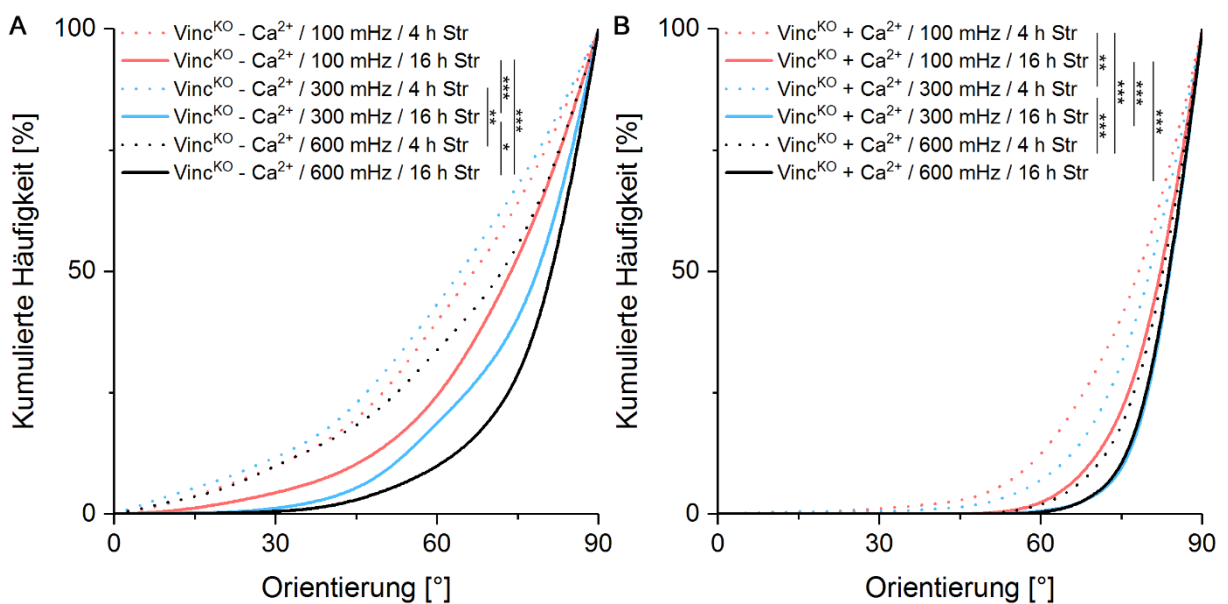
Zunächst wurden die Winkelverteilungen der Vinc<sup>KO</sup>-Zellen in An- und Abwesenheit von Kalzium nach ansteigender Dehnungsdauer betrachtet. Die Winkelverteilungen zeigten, dass die Aktinfasern in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen mit steigender Dehnungsdauer stärker hin zu 90° relativ zur Zugrichtung orientiert waren (Abbildung 41). Dabei unterschied sich für alle angelegten Frequenzen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Kalzium die Häufigkeitsverteilung der für 4 h gedehnten Zellen signifikant von denen, die für 8 h und 16 h gedehnt wurden. Dies legt nahe, dass es unabhängig von der Inkubation der Zellen mit Kalzium zu einer zeitabhängigen Reorientierung kam. Der Unterschied zwischen 8 h und 16 h zyklischer Dehnung war hingegen nicht signifikant. Dies legte nahe, dass auch für Vinc<sup>KO</sup>-Zellen eine maximale Reorientierung nach 8 bis 16 h erreicht wurde, da eine länger andauernde Dehnung nicht mehr zu einer stärkeren Reorientierung führte. Weiterhin zeigten die Analysen, dass die Inkubation mit Kalzium auch in Abwesenheit von Vinculin zu einer deutlich verstärkten Reorientierung nach sechzehnständiger Dehnung führte.



**Abbildung 41: Bestimmung der maximalen Faserorientierung in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaseroorientierung in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen in An- und Abwesenheit von Kalzium. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 100 MHz **(A)**, 300 MHz **(B)** und 600 MHz **(C)** für 4, 8 und 16 h zyklisch gedehnt.  $n_{A\ 0h/4h} = 248$ ,  $n_{A\ 6h/4h} = 330$ ,  $n_{A\ 0h/8h} = 660$ ,  $n_{A\ 10h/8h} = 363$ ,  $n_{A\ 0h/16h} = 546$ ,  $n_{A\ 18h/16h} = 327$ ,  $n_{B\ 0h/4h} = 523$ ,  $n_{B\ 6h/4h} = 289$ ,  $n_{B\ 0h/8h} = 306$ ,  $n_{B\ 10h/8h} = 261$ ,  $n_{B\ 0h/16h} = 271$ ,  $n_{B\ 18h/16h} = 213$ ,  $n_{C\ 0h/4h} = 387$ ,  $n_{C\ 6h/4h} = 307$ ,  $n_{C\ 0h/8h} = 262$ ,  $n_{C\ 10h/8h} = 411$ ,  $n_{C\ 0h/16h} = 289$ ,  $n_{C\ 18h/16h} = 298$ .



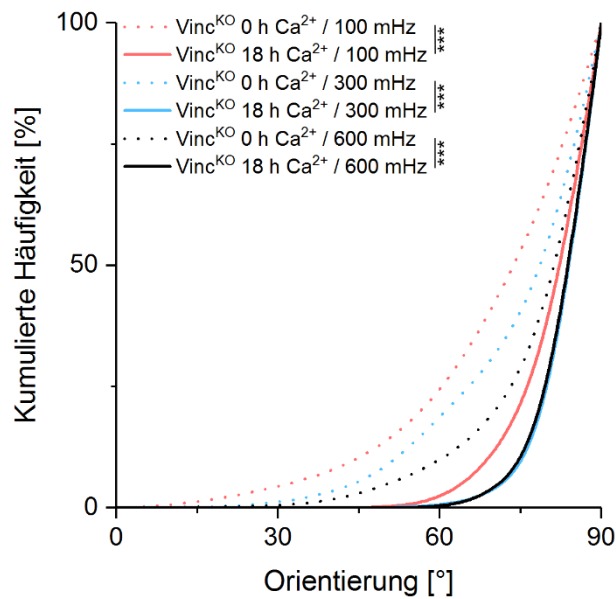
Nachdem ein zeitabhängiges Reorientierungsverhalten auch für Vinc<sup>KO</sup>-Zellen zu beobachten war, wurden die Daten zur Visualisierung der Frequenzabhängigkeit entsprechend der ansteigenden Frequenzen in Abhängigkeit von Kalzium aufgetragen (Abbildung 42). Die Betrachtung der Zellen ohne Einfluss von Kalzium zeigte, dass eine Frequenzabhängigkeit in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen für kurze Dehnungsdauern in Abwesenheit von Kalzium kaum ausgeprägt ist und sich nur die Winkelverteilungen für 300 und 600 mHz signifikant unterschieden (Abbildung 42 A). Die Unterschiede zwischen Zellen, welche für 16 h gedehnt wurden, waren deutlich ausgeprägter und im Endpunkt der Reorientierung unterschieden sich die Häufigkeiten für alle Frequenzen signifikant voneinander. Dies lässt vermuten, dass im Gegensatz zu Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen nur eine sehr geringe Frequenzabhängigkeit während des Prozesses der Reorientierung vorliegt, die gesteigerte Dehnungsfrequenz aber für die maximale Orientierung der Aktinfasern entscheidend ist. Im Gegensatz dazu konnte in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen eine Frequenzabhängigkeit zwar für kurze Dehnungsdauern beobachtet werden, diese war aber im Endpunkt der Reorientierung deutlich weniger stark ausgeprägt.



**Abbildung 42: Bestimmung der frequenzabhängigen Aktin角度orientierung in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktin角度orientierung in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen in An- (A) und Abwesenheit (B) von Kalzium. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 100, 300 und 600 mHz für 4 und 16 h zyklisch gedehnt.

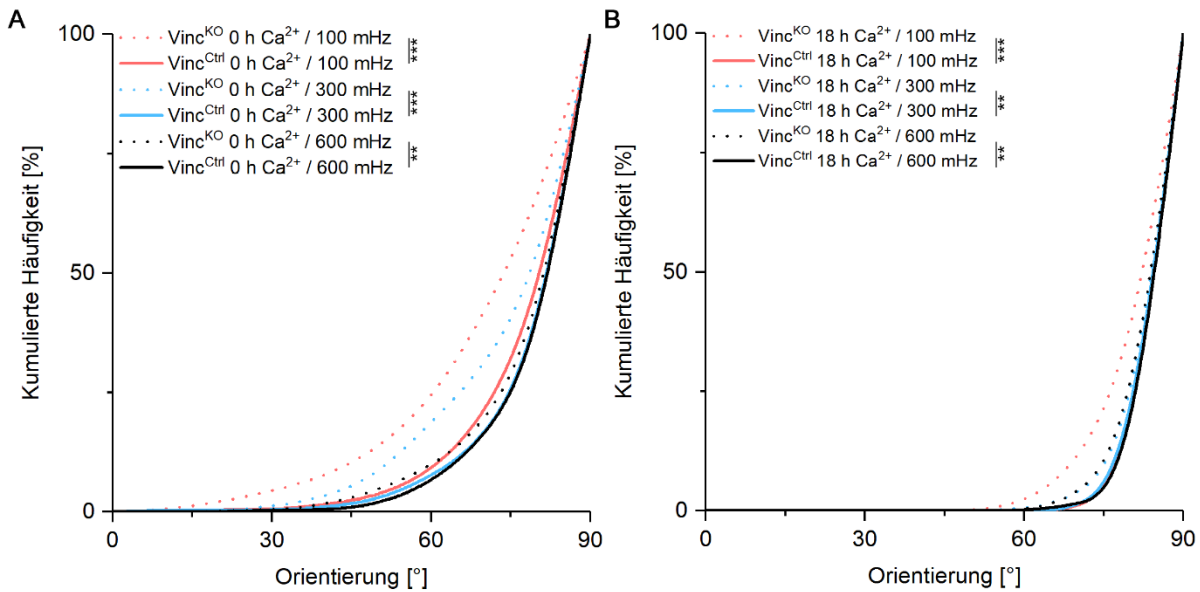
Die Inkubation der Vinc<sup>KO</sup>-Zellen mit Kalzium führte für kurze Dehnungszeiten von 4 h zu einer deutlich stärkeren Frequenzabhängigkeit als in Abwesenheit von Kalzium (Abbildung 42 B). Für diese Dehnungsdauer unterschieden sich die Verteilungen für alle Frequenzen signifikant voneinander. Im Endpunkt der Reorientierung nach 16 h war hingegen kein signifikanter Unterschied für Dehnungen mit 300 und 600 mHz mehr vorhanden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der Einfluss von Kalzium und damit einhergehende Ausbildung von Adherens Junctions einen deutlichen Effekt auf die Frequenzabhängigkeit der Reorientierung hat, während sowohl mit als auch ohne Einfluss von Kalzium eine Abhängigkeit von der Dehnungsdauer vorlag.

Die Betrachtung der kumulierten Häufigkeiten für eine sechzehnstündige Dehnung in An- und Abwesenheit von Kalzium sollte anschließend Aufschluss über die Stärke der Reorientierung in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen geben. In Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen konnte in vorherigen Experimenten ein deutlicher Unterschied der maximalen Ausrichtung der Aktinfasern in Abhängigkeit der Kalziuminkubation gezeigt werden. Ebenso führte in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen die Inkubation mit Kalzium zu einer Verstärkung der Reorientierung hin zu höheren Winkeln relativ zur Zugrichtung. (Abbildung 43). Für alle Frequenzen unterschieden sich die Häufigkeiten für Zellen ohne Kalzium signifikant von den Häufigkeiten für Zellen mit Kalziueinfluss. Die Inkubation mit Kalzium schien damit in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen nicht nur zu einer Beschleunigung der Reorientierung geführt zu haben, sondern auch eine unterschiedliche maximale Faserorientierung zu induzieren, die dabei aber insbesondere für Zellen ohne Kalziueinfluss eine deutliche Frequenzabhängigkeit aufweist.



**Abbildung 43: Unterschied der maximalen Aktinfaserorientierung in An- und Abwesenheit von Kalzium.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung nach zyklischer Dehnung von Vinc<sup>KO</sup>-Zellen für 16 h mit 100, 300 und 600 mHz.

Für die Analyse der Unterschiede von Vinc<sup>Ctrl</sup>- und Vinc<sup>KO</sup>-Zellen hinsichtlich der maximalen Aktinfaserorientierung wurden die Daten aller Frequenzen nach sechzehnständiger Dehnung vergleichend aufgetragen. Dabei wurden die Verteilungen der Aktinfasern sowohl in Abwesenheit (Abbildung 43 A) als auch in Anwesenheit von Kalzium (Abbildung 43 B) betrachtet. In beiden Fällen waren die Unterschiede zwischen Vinc<sup>Ctrl</sup>- und Vinc<sup>KO</sup>-Zellen für alle Frequenzen signifikant. Dabei waren diese bei geringerer Dehnungsfrequenz deutlich größer und nahmen bei ansteigender Frequenz ab. Die Verteilung der Faserorientierungen in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen blieb im Vergleich zu Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen aber selbst unter Kalziumeinfluss und damit Ausbildung von Adherens Junctions reduziert und überlagerte die Verteilungen der Kontrolle. Dieser Effekt könnte daher durch das Fehlen von Vinculin in den Adherens Junctions hervorgerufen worden sein.



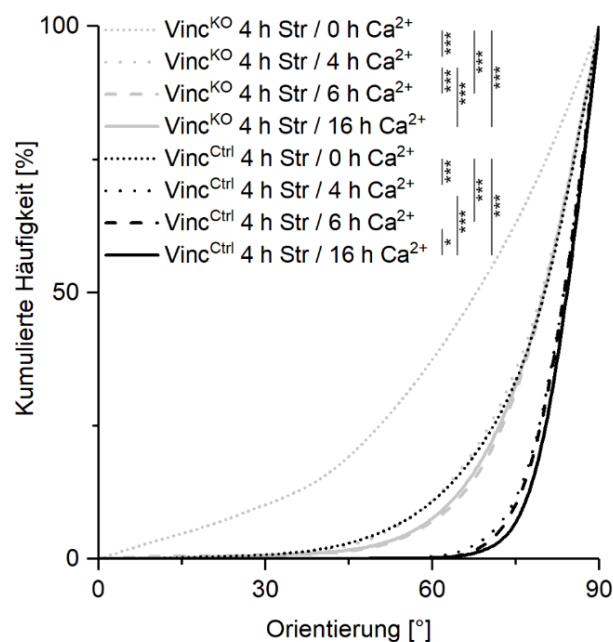
**Abbildung 44: Vergleich der maximalen Aktinfaserreorientierung in Vinc<sup>KO</sup>- und Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen in Abhängigkeit von Kalzium.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung nach zyklischer Dehnung von Vinc<sup>KO</sup>- und Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen für 16 h mit 100, 300 und 600 mHz ohne Einfluss von Kalzium (A) und mit Einfluss von Kalzium (B).

### 3.9 Einfluss des Reifegrades von Adherens Junction

In den vorangegangenen Experimenten wurde durch Variation von Dehnungsdauer und Dehnungsfrequenz der Verlauf der Reorientierung sowie das Verhalten von Vinc<sup>Ctrl</sup>- und Vinc<sup>KO</sup>-Zellen bezüglich ihrer maximalen Faserreorientierung als Antwort auf zyklische Dehnung untersucht. Dabei wurden Zellen entweder ohne Kalzium, oder 2 h vor Anlegen der zyklischen Dehnung mit kalziumhaltigem Medium inkubiert. Dies führte zu einem spezifischen Reifegrad der kalziuminduzierten Adherens Junctions zum Zeitpunkt des Beginns der zyklischen Dehnung. Da vorherige Experimente gezeigt haben, dass durch die Ausbildung von Adherens Junctions die Zellantwort auf Dehnung deutlich verändert wird, sollte im Folgenden der Einfluss des Reifegrades der Adherens Junctions auf die Geschwindigkeit der Aktinreorientierung als Antwort auf zyklische Dehnung untersucht werden. Dazu wurden Vinc<sup>Ctrl</sup>- und Vinc<sup>KO</sup>-Zellen als Zellschichten kultiviert und für 4 h mit einer Frequenz von 300 mHz und einer Amplitude von 14% gedehnt. Zur Modifizierung des Reifegrades der Adherens Junctions wurden die Zellen entweder komplett ohne Kalzium gedehnt, beziehungsweise wurde direkt zu Beginn der zyklischen

Dehnung Kalzium zugegeben. Außerdem erfolgte in weiteren Ansätzen eine Vorinkubation der Zellen für 2 h beziehungsweise 12 h mit kalziumhaltigem Medium. Zellen, welche Kalzium erhielten, wurden auch während der Dehnung in kalziumhaltigem Medium kultiviert.

Die kumulierten Häufigkeiten für Vinc<sup>KO</sup>-Zellen, welche ohne Kalzium zyklisch gedehnt wurden, zeigten nur eine geringe Reorientierung des Aktinzytoskeletts (Abbildung 45). Alle Verteilungen der unter Einfluss von Kalzium gedehnten Zellen unterschieden sich signifikant von Zellen ohne Kalzium und waren stärker rechtwinklig zur Zugrichtung orientiert. Dabei gab es ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen Zellen, welche direkt zu Beginn der Dehnung Kalzium erhielten und Zellen, welche bereits 2 h oder 12 h vor Beginn der Dehnung mit Kalzium inkubiert wurden. Im Gegensatz dazu war zwischen Vinc<sup>KO</sup>-Zellen, welche bereits vor Beginn der Dehnung für 2 oder 12 h mit Kalzium inkubiert worden waren, kein signifikanter Unterschied mehr feststellbar.



**Abbildung 45: Einfluss der Vorinkubation mit Kalzium auf die Geschwindigkeit der Reorientierung.** Kumulierte Häufigkeiten der Aktinfaserverteilungen in Vinc<sup>KO</sup>- und Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen nach 4 h zyklischer Dehnung mit einer Frequenz von 300 mHz. Die Inkubation der Zellschichten mit Kalzium betrug 0, 4, 6 und 16 h.  $n_{Ctrl\ 4h/0h} = 646$ ,  $n_{Ctrl\ 4h/4h} = 800$ ,  $n_{Ctrl\ 4h/6h} = 290$ ,  $n_{Ctrl\ 4h/16h} = 623$ ,  $n_{KO\ 4h/0h} = 523$ ,  $n_{KO\ 4h/4h} = 572$ ,  $n_{KO\ 4h/6h} = 289$ ,  $n_{KO\ 4h/16h} = 837$ .

Die Ergebnisse für Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen ähnelten den Verteilungen für Vinc<sup>KO</sup>-Zellen. Auch hier unterschieden sich alle Zellen, welche mit Kalzium inkubiert wurden, signifikant von Zellen, welche ohne Einfluss von Kalzium gedehnt wurden. Im Gegensatz zu Vinc<sup>KO</sup>-Zellen unterschieden sich jedoch die Winkelverteilungen für Zellen, welche direkt zu Beginn der Dehnung Kalzium erhielten, nicht signifikant von Zellen, welche für 2 h vorinkubiert wurden. Die langandauernde Kalzium-Vorinkubation von 12 h konnte das Reorientierungsverhalten noch einmal geringfügig verstärken und führte zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zu Zellen mit zweistündiger Vorinkubation und Zellen, welche direkt zu Beginn der Dehnung Kalzium erhielten.

Diese beobachteten Unterschiede in den Winkelverteilungen wiesen darauf hin, dass die Reorientierung von Aktinfilamenten durch Zugabe von Kalzium auch dann beschleunigt war, wenn die Zugabe von Kalzium erst unmittelbar zu Beginn der zyklischen Dehnung geschieht. Bereits frühe Stadien gebildeter Adherens Junctions scheinen damit zur effizienten Erkennung mechanischer Dehnung in der Lage zu sein.

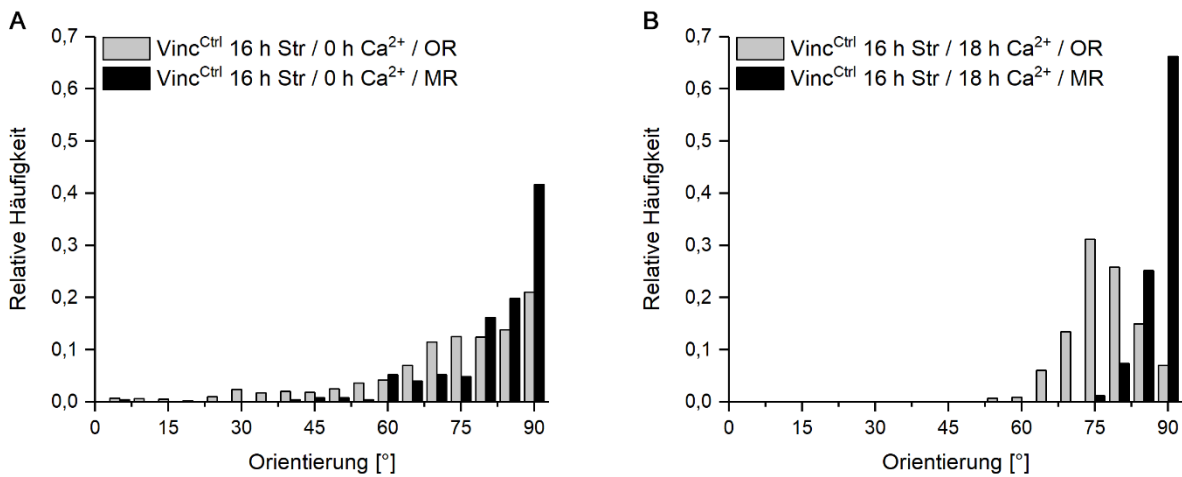
### **3.10 Analyse des bevorzugten Reorientierungswinkels**

Wie bereits in der Literatur beschrieben wurde, geschieht die Reorientierung der Aktinfasern zur Minimierung der einwirkenden mechanischen Belastung durch Dehnung sowohl auf zellulärer als auch zytoskelettaler Ebene [83]. Dabei wird die Orientierung hin zu einem neutralen Winkel (engl. *angle of zero strain*) angestrebt, bei welchem die Zellen und Filamente keine Längenänderung durch Substratdehnung erfahren. Die bisher durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass Adherens Junctions zur Erkennung zyklischer Dehnung in der Lage sind und eine Reorientierung der Aktinfasern induzieren, die im Vergleich zu Zellschichten ohne ausgebildete Zell-Zell-Kontakte verstärkt ist. Dies legt die Frage nahe, ob die durch Fokaladhäsionen und Adherens Junctions induzierten Signalkaskaden infolge zyklischer Dehnung gleichermaßen zur Reorientierung hin zum *angle of zero strain* führen.

Faust et al. konnten zeigen, dass sich der *angle of zero strain* und damit auch der angestrebte Winkel der Aktinfasern unter Dehnung abhängig von der Geometrie des

verwendeten Substrats ändert. Um das Reorientierungsverhalten hin zu diesem Winkel in Zellen mit und ohne Einfluss von Kalzium und somit in An- und Abwesenheit von Adherens Junctions zu untersuchen, wurden vergleichende Experimente unter Verwendung von Zugkammern mit und ohne umlaufenden Rand durchgeführt. Letztere weisen ein höheres Querkontraktionsverhältnis auf und führen dadurch zu einem niedrigeren *angle of zero strain*, der von  $69^\circ$  auf  $62^\circ$  gesenkt wird (für eine detaillierte Beschreibung siehe [83]). Dadurch sollte das Maximum der Reorientierung für Zellen mit und ohne Kalziuminkubation zu niedrigeren Winkeln verschoben und die Reorientierung der Aktinfasern hin zu diesem Winkel untersucht werden. Für die Experimente wurden Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen auf Kammern mit (MR) und ohne (OR) umlaufendem Rand kultiviert und in An- und Abwesenheit von Kalzium für 16 h mit einer Frequenz von 300 mHz um 14% gedehnt. Die Vorinkubation mit Kalzium vor Anlegung der zyklischen Dehnung erfolgte dabei für 2 h. Aufgetragen wurden in den gezeigten Diagrammen die relativen Häufigkeiten der Aktinfaserorientierungen.

Der Vergleich der Winkelverteilungen für Zellen, welche ohne Kalzium auf Kammern mit und ohne Rand gedehnt wurden zeigte, dass die Breite der Verteilung für Kammern mit Rand von der Klasse ab  $40^\circ$  bis hin zu  $90^\circ$  reichte, während die geringsten auftretenden Winkel in Zellen auf Kammern ohne Rand bereits in der Klasse ab  $5^\circ$  detektiert wurden (Abbildung 46 A). Die Verteilung der Winkel in Zellen auf Kammern ohne Rand war somit deutlich breiter als die in Zellen auf Kammern mit Rand. Das Maximum der Winkelverteilung lag in beiden Experimenten in der Klasse von  $85^\circ$ - $90^\circ$ , war jedoch deutlich geringer für Zellen auf Kammern ohne Rand und dem damit einhergehenden geringeren *angle of zero strain*. Während in Zellen auf Kammern mit Rand etwa 42% der Fasern eine Orientierung von  $85^\circ$ - $90^\circ$  aufwiesen, waren es für Zellen auf Kammern ohne Rand nur noch etwa 21%. Gleichzeitig konnte ein Anstieg der Häufigkeiten im Bereich von  $65^\circ$ - $75^\circ$  für Fasern in Zellen auf Kammern ohne Rand gegenüber Kammern mit Rand beobachtet werden. Dies spricht für eine Erhöhung der Aktinfaserorientierung in Richtung des *angle of zero strain* für Zellen auf Kammern mit höherem Querkontraktionsverhältnis.



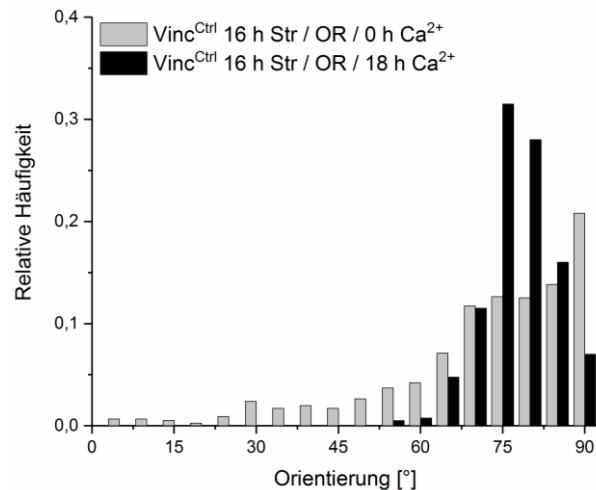
**Abbildung 46: Relative Häufigkeiten der Aktinfaserorientierung.** Relative Häufigkeiten der Orientierung von Aktinfasern in Zellen auf Kammern ohne umlaufenden Rand (OR) und mit umlaufenden Rand (MR) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von Kalzium.  $n_{OR\ 0h\ Ca^{2+}} = 759$ ,  $n_{MR\ 0h\ Ca^{2+}} = 247$ ,  $n_{OR\ 18h\ Ca^{2+}} = 400$ ,  $n_{MR\ 18h\ Ca^{2+}} = 163$ ,

Die Auswertung der Orientierung von Aktinfasern in Zellen unter Kalziumeinfluss zeigte, dass die Breite der Häufigkeitsverteilung für Zellen auf Kammern ohne Rand breiter ist, als in Zellen auf Kammern mit umlaufendem Rand (Abbildung 46 B). Während die Häufigkeitsverteilung für Zellen ohne Rand im Bereich von 55°-90° relativ zur Zugrichtung lag, wurden in Zellen auf Kammern mit Rand Hauptorientierungen im Bereich von 75°-90° detektiert. Während das Maximum der Verteilung für Zellen mit Rand bei sehr hohen Winkeln im Bereich von 85°-90° lag, wiesen die Zellen auf Kammern ohne Rand ein Maximum bei deutlich geringeren Winkeln von 75°-80° auf. Dabei sank die Winkelhäufigkeit im Bereich von 85°-90° von etwa 66% der Hauptorientierungen in Zellen auf Kammern mit Rand auf etwa 7% ab, während die Häufigkeit im Bereich von 75°-80° von etwa 1% auf 31% der Hauptorientierungen anstieg.

Der Vergleich von Zellen mit und ohne Kalziuminkubation konnte somit zeigen, dass durch Erhöhung des Querkontraktionsverhältnisses des Substrats unter beiden Bedingungen eine Abnahme der Häufigkeiten im Bereich hoher Winkel bei gleichzeitigem Anstieg der Häufigkeiten im Bereich niedrigerer Winkel erfolgte. Dies weist auf eine Reorientierung der Aktinfasern hin zum *angle of zero strain* sowohl für die Fokaladhäsions- als auch Adherens Junctions-vermittelte Reorientierung hin. Auffällig ist dabei aber die deutlich unterschiedliche Breite der Winkelverteilungen. Der direkte



Vergleich von Zellen auf Kammern ohne umlaufenden Rand mit und ohne Einfluss von Kalzium zeigt, dass sich die Breite der Verteilungen für Zellen ohne Einfluss von Kalzium deutlich von Zellen unter Kalziumeinfluss unterscheidet (Abbildung 47).



**Abbildung 47:** Relative Häufigkeiten der Orientierung von Aktinfasern in Zellen auf Kammern ohne umlaufenden Rand (OR) in Abwesenheit und Anwesenheit von Kalzium.

Dieses Verhalten konnte auch für Zellen auf Kammern mit Rand beobachtet werden, wobei die Verteilungen dort im Bereich höherer Winkel lagen. Eine mögliche Erklärung für die deutlich geringere Streuung der Hauptorientierungen in Zellen unter Kalziumeinfluss könnte auf ein kollektives Verhalten der Zellen zurückzuführen sein. Dieses könnte bedingen, dass die Aktinfasern in der Adherens Junctions-vermittelten Reorientierung nur bestimmte von den umgebenden Zellen abhängige Orientierungen einnehmen können, während in Zellen ohne ausgebildete Zell-Zell-Kontakte die Fokaladhäsions-basierte Reorientierung erlaubt, Fasern individuell auch in geringen Winkeln relativ zur Zugrichtung aufrechtzuerhalten.



## 4 Diskussion

Die zytoskelettale Reorientierung und damit einhergehende mechanosensorische Prozesse als Antwort auf zyklische Dehnung wurden bislang vornehmlich an Einzelzellen untersucht. Wie sich dieses Verhalten durch Differenzierungsprozesse in multizellulären Geweben verändert, ist hingegen nur unzureichend beschrieben. Die epidermale Differenzierung geht mit zytoskelettalen Umstrukturierungen und der Ausbildung von interzellulären Kontakten einher. Eine deregulierte Differenzierung sowie das Fehlen beteiligter Proteine können hierbei zu einer Vielzahl unterschiedlicher Krankheitsbilder führen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Reaktion differenzierender Keratinozyten auf zyklische Dehnung zu untersuchen. Dabei wurden unter Verwendung von Zellen mit veränderter Expression von Adhäsionsproteinen am Reorientierungsprozess beteiligte mechanosensitive Proteine identifiziert. Die Ergebnisse wurden im Anschluss dafür genutzt, ein detailliertes Verständnis für das veränderte Zellverhalten in differenzierenden multizellulären Geweben sowie für die Abhängigkeit der zellulären Reaktion von unterschiedlichen Dehnungsparametern zu erhalten.

### 4.1 Intrazelluläre Umstrukturierungsprozesse in Abhängigkeit von Kalzium

In der Epidermis liegt *in vivo* ein Gradient der Kalziumionenkonzentration vor, welcher die Differenzierung der Keratinozyten induziert und reguliert [113]. Dieser kann durch Veränderung der Kalziumkonzentration auch *in vitro* imitiert werden [10]. In dieser Arbeit wurden daher epidermale Keratinozyten als Zellschichten in Zellkulturmedium mit hoher und geringer Kalziumkonzentration kultiviert und die Anordnung des Aktinzytoskeletts sowie die Lokalisation der Proteine Vinculin und Paxillin analysiert. In Zellen ohne Kalziumeinfluss lagen beide Proteine kolokalisiert in der basalen Zellebene an den Enden von Aktinfasern vor. Diese Lokalisation wies auf das Vorhandensein in Fokaladhäsionen hin, als dessen Bestandteile die beiden Proteine bereits beschrieben wurden [62].

Die Inkubation mit Kalzium führte zu einer Umlagerung des Vinculinsignals. Bereits nach 6 h konnte es in der apikalen Ebene als punktförmiges Signal detektiert werden. Dieses veränderte sich durch verlängerte Inkubation hin zu einem linienförmigen Signal entlang der Zellgrenzen. Diese kalziuminduzierte Umlagerung spricht für die Ausbildung von interzellulären Adherens Junctions, für welche sowohl eine kalziuminduzierte Bildung als auch die Beteiligung von Vinculin am Komplex bereits gezeigt werden konnte [14]. Zudem sind Adherens Junctions in der apikalen Ebene der Zellen lokalisiert, wodurch sich die Lokalisation von Vinculin nach Kalziuminkubation in dieser Ebene erklärt [114]. Die Kalziuminkubation induzierte weiterhin eine Reduktion von Fokaladhäsionen sowie eine verringerte Kolo-kalisation von Vinculin und Paxillin in der basalen Ebene. Eine reduzierte Integrin-Expression sowie der Abbau von Fokaladhäsionen unterhalb der Adherens Junctions durch Induktion der Differenzierung konnte bereits gezeigt werden [115, 116]. Die Auflösung der Fokaladhäsionen könnte dabei zur Freisetzung von Vinculin führen, welches infolgedessen an Adherens Junctions rekrutiert wird. Es wurde ebenfalls bereits beschrieben, dass der Phosphorylierungszustand von Vinculin entscheidend für die Lokalisation in Adherens Junctions ist. Die Krafteinwirkung auf E-Cadherin, aber nicht auf Integrine, führt dabei zu einer spezifischen Tyrosin-Phosphorylierung (Y822), welche die Bindung von Vinculin an  $\beta$ -Catenin ermöglicht [82]. Folglich wäre es ebenfalls möglich, dass nach Ausbildung von Adherens Junctions und der Bindung des kontraktiven Aktomyosin-Netzwerks die Rekrutierung von Vinculin an Adherens Junctions gegenüber der Bindung an Fokaladhäsionen bevorzugt stattfindet und dadurch die Lokalisation in Fokaladhäsionen abnimmt.

Das Aktinnetzwerk, welches zunächst in geringer Kalziumkonzentration die Zellen durchspannte und eine sowohl zentrale als auch periphere Lokalisation innerhalb der Zellen aufwies, konnte nach Erhöhung der Kalziumkonzentration vermehrt in den peripheren Zellbereichen detektiert werden. Diese Umorganisation der Aktinfasern wurde in der Literatur bereits als Vorgang während der Bildung von Adherens Junctions gezeigt [14]. Dieser Vorgang geht einher mit der Kopplung von Adhäsionskomplexen an das Aktinnetzwerk über verschiedene Proteine, sodass zunächst radiale Aktinfasern gebunden werden, diese aber schließlich zu parallelen Bündeln umgelagert werden und so entlang der Zellmembran verlaufen [33].

## 4.2 Mechanosensitive Mechanismen in differenzierenden Keratinozyten

Zyklische uniaxiale Dehnung oberhalb bestimmter Schwellwerte für Frequenz und Amplitude führt zu einer nahezu rechtwinkligen Ausrichtung der Aktinfasern relativ zur angelegten Zugrichtung [84, 85, 87, 88, 117]. Die durchgeführten Dehnungsexperimente an Keratinozyten in Abhängigkeit von Kalzium haben gezeigt, dass die Anwesenheit von Kalzium den Reorientierungsprozess verstärkt. Dies äußerte sich in einer schmaleren Winkelverteilung die im Bereich um  $90^\circ$  lag. Diese Beobachtung beschränkte sich ausschließlich auf Zellschichten, welche mit erhöhter Kalziumkonzentration inkubiert wurden. In Experimenten an Einzelzellen konnte ein vergleichbares Verhalten durch eine Erhöhung der Kalziumkonzentration nicht beobachtet werden. Somit ist für die gesteigerte Reorientierung der Aktinfasern sowohl die Anwesenheit benachbarter Zellen als auch das Vorhandensein von Kalzium notwendig. Dass nur in Kombination beider Aspekte eine verstärkte Reorientierung erkennbar ist, schließt kalziuminduzierte Signalwege als Hauptgrund aus und weist auf andere verantwortliche Prozesse hin. Die Ausbildung von Adherens Junctions ist als kalziumabhängiger Prozess beschrieben, bei dem die interzellulären Kontakte ebenfalls an das Aktinzytoskelett assoziiert sind. Diese Eigenschaften machen Adherens Junctions damit zu einem möglichen Kandidaten für die Erkennung mechanischer Reize.

Für die detaillierte Untersuchung, ob Adherens Junctions als Aktin-assoziierte interzelluläre Adhäsionen für die verstärkte Reorientierung verantwortlich sind, wurden Keratinozyten, welche kein E-Cadherin exprimieren mit identischen Parametern zyklisch gedehnt. Die resultierende Aktinreorientierung widersprach zunächst der Annahme, dass die Abwesenheit von E-Cadherin auch zur Abwesenheit von Adherens Junctions führt. Sowohl das Zellverhalten, welches identisch zu Kontrollzellen war, als auch die Detektion von Aktin-gekoppelten Zell-Zell-Kontakten legten nahe, dass es weiterhin zur Ausbildung von interzellulären Kontakten kam. Es wurde bereits beschrieben, dass in der basalen Schicht der Epidermis neben dem hauptsächlich exprimierten E-Cadherin auch das nahe verwandte P-Cadherin exprimiert [68]. Ebenfalls gezeigt wurde, dass es zu einer Hochregulierung von P-Cadherin in Abwesenheit von E-Cadherin kommt, was die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente ebenfalls gezeigt haben. Ein Signal für

Cadherine konnte hier auch in E-Cadherin-freien Zellen beobachtet werden. Durch den sehr ähnlichen Aufbau und das Vorhandensein von Bindestellen für Catenine kommt es somit auch in E-Cadherin-freien Zellen zur Ausbildung von Adherens Junctions [104, 110, 118]. In diesen Arbeiten wurden daher Zellen ohne E-Cadherin-Expression bei gleichzeitig reduzierter P-Cadherin-Expression verwendet, um die Bildung von Adherens Junctions effizient zu verhindern. Diese Zellen wurden daher auch in Experimenten dieser Arbeit genutzt. Die Herunterregulierung von P-Cadherin in den in dieser Arbeit genutzten ECad<sup>KO</sup>-Zellen führte zu den beschriebenen Effekten. Die Ausbildung von Adherens Junctions konnte nicht länger beobachtet werden und das Reorientierungsverhalten unter Einfluss von Kalzium unterschied sich nicht länger von dem in Zellen ohne Kalziumeinfluss. Dies legt nahe, dass die zuvor beobachtete Reorientierung in ECad<sup>KO</sup>-Zellen unter Kalziumeinfluss auf der Hochregulierung von P-Cadherin in diesen Zellen beruhte. Diese Experimente zeigen damit, dass die Hochregulierung von P-Cadherin in E-Cadherin-defizienten Zellen ausreichte, um eine gleichwertige mechanosensorische Kopplung in Bezug auf zyklische Dehnung herzustellen, wie sie für Kontrollzellen beobachtet wurde. Weiterhin zeigt die verringerte Reorientierung in Zellen ohne E-Cadherin und mit reduzierter P-Cadherin-Expression, dass die gesteigerte Reorientierung auf der mechanosensorischen Aktivität der Adherens Junctions beruht, welche einen weiteren Mechanismus neben Fokaladhäsionen darstellen, der zur Reorientierung von Aktinfasern führt.

Es sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob Adherens Junctions dabei nur einen weiteren zusätzlichen Mechanismus für die Reorientierung darstellen oder ob diese die Funktion der Fokaladhäsionen in differenzierenden Zellen übernehmen. Dazu wurden zunächst Keratinozyten ohne Vinculin-Expression näher untersucht. Die kortikale Anordnung der Aktinfasern war in Anwesenheit von Kalzium nicht so stark ausgeprägt, wie sie in Kontrollzellen beobachtet wurde [119]. Vinculin besitzt neben Bindestellen für Proteine der Adherens Junctions ebenfalls Bindestellen für Aktinfasern und ist damit an der Kopplung dieser beiden Strukturen beteiligt [120]. Zudem induziert Vinculin die Rekrutierung weiterer Aktin-modulierender Proteine wie Arp2/3 oder VASP, welche die kortikale Bündelung der Fasern ebenfalls beeinflussen könnten [60]. Das Fehlen von Vinculin könnte somit zur unzureichenden Bindung des Aktinnetzwerkes an die Adherens

Junctions führen, sodass die Fasen weniger strikt gebündelt und somit weiterhin auch in den zentralen Bereichen der Zellen vorliegen [121].

Die zyklische Dehnung von Keratinozyten ohne Vinculin-Expression und ohne Einfluss von Kalzium führte zu einer weniger starken Ausrichtung der Aktinfasern hin zu  $90^\circ$  als in Kontrollzellen. Dies könnte auf das Fehlen von Vinculin als mechanosensorisches Element in den Fokaladhäsionen zurückzuführen zu sein. Es wurde bereits gezeigt, dass Vinculin für die Mechanosensitivität und Stabilisierung der Fokaladhäsionen unter mechanischer Belastung mitverantwortlich ist [122-124]. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die Reorientierung von Zellen, welche kein Vinculin exprimieren, deutlich beeinträchtigt ist und geringere Winkel relativ zur Zugrichtung eingenommen werden [57, 125]. Dieses Verhalten konnte auch in den Experimenten dieser Arbeit für das Aktinzyttoskelett in Vinc<sup>KO</sup>-Zellen beobachtet werden. Durch das Fehlen von Vinculin könnte die Bindung der Aktinfasern an die Fokaladhäsionen so stark beeinträchtigt sein, dass eine effiziente Reorientierung nicht möglich ist. Carisey et al. konnten zeigen, dass insbesondere das Vorhandensein der Aktin-Bindedomäne in Vinculin verantwortlich für eine vollständige Reorientierung ist, was diese Annahme unterstützt [57]. Zudem können weitere Aktin-modulierende Proteine wie beispielsweise Arp2/3, welches zur Nukleation neuer Aktinfilamente beiträgt nicht gebunden werden [60].

Die Zugabe von Kalzium führte auch in den Keratinozyten ohne Vinculin-Expression zu einer Verstärkung der Reorientierung der Aktinfasern. Dabei war jedoch weiterhin ein Unterschied zwischen den Winkelverteilungen in Kontrollzellen und Zellen ohne Vinculin-Expression erkennbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Ausbildung von Adherens Junctions auch in Zellen mit beeinträchtigten Fokaladhäsionen zu einer gesteigerten Reorientierung führte und diese somit einen zweiten Mechanismus zur Aktinfaserreorientierung darstellen. Interessanterweise konnte die Reorientierung gesteigert werden, obwohl Vinculin auch in den Adherens Junctions fehlt. Hier scheint das Fehlen aber weniger Einfluss auf die Reorientierung zu haben, als in Fokaladhäsionen. Da Vinculin in beiden Adhäsionsstrukturen lokalisiert ist, konnte mit Hilfe dieser Experimente somit nicht abschließend geklärt werden, ob die Differenz im Maß der Reorientierung zu den Kontrollzellen nach Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten auf der Abwesenheit von Vinculin in Fokaladhäsionen oder Adherens Junctions zurückzuführen

ist. Daher wurde in einem weiteren Teil der Arbeit der Einfluss der Fokaladhäsion auf die Reorientierung in Anwesenheit von Adherens Junctions durch Beeinträchtigung des mechanosensitiven Komplexes untersucht.

Die Analyse des Einflusses der Fokaladhäsionen auf die Reorientierung in Anwesenheit von Adherens Junctions wurde mittels Herunterregulierung von Paxillin und Talin durchgeführt. Beide Proteine sind zentrale Bestandteile von Fokaladhäsionen aber nicht von Adherens Junctions [50, 51, 62]. Die Ergebnisse beider Experimente zeigten, dass die Reorientierung in Anwesenheit von Kalzium vergleichbar mit der in Kontrollzellen war, die Fokaladhäsionen sowie diese Proteine also vernachlässigbar für die Umlagerung der Aktinfasern waren. Besonders deutlich wurde dies in Experimenten an Zellen mit verminderter Talin-Expression. Es wurde bereits beschrieben, dass die Isoformen von Talin einander komplementieren können, die Verhinderung einer Expression beider jedoch zu abgerundeten Zellen führt, welche nicht länger auf dem Substrat aufspreiten können [126, 127]. Für die hier durchgeführten Experimente wurden beide Isoformen herunterreguliert, die Expression aber nicht völlig verhindert. Hierdurch konnten nicht maturaerte Fokaladhäsionen ausgebildet werden, sodass die Zellen adhären und aufgespannt vorlagen. Die mechanische Belastung in Abwesenheit von Kalzium führte jedoch zum Ablösen der Zellen vom Substrat. Die verminderte Menge Talin in den Fokaladhäsionen beeinträchtigte hierbei die mechanische Belastbarkeit der Fokaladhäsionen vermutlich so stark, dass eine Adhäsion bei anhaltender Dehnung nicht möglich war. Die kalziuminduzierte Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten vor Anlegung des Dehnungsreizes hingegen führte zu aufgespannten Zellen, welche als Zellschicht vorlagen und eine Aktinorientierung vergleichbar mit Kontrollzellen aufwiesen. Unter Kalziumeinfluss hatte die starke Reduktion und Beeinträchtigung der Fokaladhäsionen keinen Einfluss auf das Reorientierungsverhalten. Damit stellen Adherens Junctions nicht nur einen zusätzlichen Mechanismus zur Signalweiterleitung unter zyklischer Dehnung dar, sondern können auch bei starker Reduktion reifer Fokaladhäsionen die Reorientierung der Aktinfasern aufrechterhalten. Dabei induzieren Adherens Junctions eine Aktinorientierung, die nicht nur vergleichbar mit der von Fokaladhäsionen ist, sondern auch stärker hin zu 90° relativ zur Zugrichtung erfolgt.



Nachdem Adherens Junctions als hauptverantwortlicher Komplex für die Aktinfaserreorientierung in differenzierenden epithelialen Geweben identifiziert wurden, sollte im Folgenden das mechanosensorische Protein innerhalb der Adhäsion bestimmt werden. Die Aktin-gekoppelten Adherens Junctions bestehen intrazellulär aus einem Komplex aus  $\alpha$ -Catenin und  $\beta$ -Catenin, welche Bindestellen für Vinculin bieten und so das transmembrane E-Cadherin mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung bringen [81, 112, 119, 120, 128]. Die Ergebnisse der Experimente an Keratinozyten mit verminderter  $\alpha$ -Catenin-Expression legten nahe, dass insbesondere dieses Protein zentral für die Reorientierung in Zellschichten verantwortlich ist. Ein mechanosensitives Verhalten konnte für  $\alpha$ -Catenin bereits beschrieben werden, da es unter Krafteinwirkung zu einer Konformationsänderung und damit zur Freilegung von Bindestellen für Vinculin kommt [80, 129]. Die Experimente dieser Arbeit konnten bereits zeigen, dass das Fehlen von Vinculin auch nach Inkubation der Keratinozyten in hoher Kalziumkonzentration zu einer Differenz der Reorientierung im Vergleich zu Kontrollzellen führte. Da gezeigt werden konnte, dass eine Beeinträchtigung der Fokaladhäsionen keinen Einfluss auf die verstärkte Reorientierung hat, fällt die Differenz in der Winkelverteilung von Kontrollzellen und Zellen ohne Vinculin-Expression vermutlich auf die Abwesenheit von Vinculin in Adherens Junctions zurück.

Um diese Hypothese zu testen, wurden Experimente an Zellen, welche  $\alpha$ -Catenin ohne Vinculin-Bindedomäne exprimieren durchgeführt. Diese zeigten eine Reorientierung, welche unter Kalziumeinfluss verstärkt war, aber signifikant geringer, als in Zellen, welche  $\alpha$ -Catenin in Volllänge exprimierten. Die verstärkte Reorientierung in Zellen mit herunterregulierter muriner  $\alpha$ -Catenin-Expression unter Kalziumeinfluss könnte dabei darauf zurückzuführen sein, dass keine vollständige Deletion des Proteins erfolgte, sondern die Menge des murinen Proteins verringert wurde. Dies zeigte sich auch in den Experimenten, in denen nur das murine  $\alpha$ -Catenin herunterreguliert wurde. Hier führte eine Inkubation mit Kalzium ebenfalls zu einer leicht verstärkten Reorientierung des Aktinzytoskeletts. Dass das Protein nicht vollständig entfernt wurde führte vermutlich dazu, dass weiterhin Zell-Zell-Kontakte, wenn auch vermindert, gebildet werden, welche zu einer leichten Steigerung der Aktinfaserreorientierung führten.

Das Reorientierungsverhalten von Zellen, welche  $\alpha$ -Catenin ohne Vinculin-Bindedomäne exprimieren unterschied sich signifikant von Zellen, welche  $\alpha$ -Catenin in Volllänge exprimierten. Dies erklärt sich vermutlich durch die erfolgreiche Bindung von  $\alpha$ -Catenin an das Aktinzytoskelett und den Adherens Junctions-Komplex, wodurch eine verstärkte Reorientierung durch Kalziuminkubation zu beobachten war. Da die Bindestelle für Vinculin jedoch nicht vorlag, konnte eine vollständige Reorientierung auf Basis der Adherens Junctions aber nicht erfolgen. Die fehlende Verstärkung durch die Bindung von Vinculin an den Komplex führte zu einer signifikant unterschiedlichen Verteilung der Faserwinkel. Folglich stellt auch die dehnungsabhängige Konformationsänderung in  $\alpha$ -Catenin, welche die Bindung von Vinculin erlaubt, einen zentralen Mechanismus im Ablauf der Aktinfaserorientierung dar. Dies deckt sich ebenfalls mit der Beobachtung, dass das Vinculinsignal in gedehnten Zellen unter Kalziumeinfluss hauptsächlich an Aktinfaserenden im Bereich der Zellgrenzen detektiert wurde. Die Lokalisation von Vinculin in unter Spannung stehenden Stressfasern konnte bereits gezeigt werden [130]. Für Vinculin wurde ebenfalls gezeigt, dass es an  $\beta$ -Catenin binden kann [81]. Diese Bindung kann das Fehlen der  $\alpha$ -Catenin-Bindestelle für Vinculin aber offenbar nicht kompensieren. Der Verlust der Mechanosensitivität von Adherens Junctions durch das Fehlen der Vinculin-Bindedomäne konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden [34, 131]. Offenbar führt erst die positive Rückkopplung durch eine Myosin-abhängige Bindung von Vinculin an  $\alpha$ -Catenin sowie beider Proteine an das Aktinzytoskelett zur vollständigen Reorientierung der Aktinfasern [132]. Zudem bietet Vinculin selbst durch dehnungsinduzierte Konformationsänderungen weitere Bindestellen für Aktin-modulierende Proteine wie VASP, Arp2/3 oder Vinexin [58, 60, 133, 134]. Diese beeinflussen ebenfalls die Organisation und Stabilität des Zytoskeletts, sodass das Fehlen eines Bindungspartners im zentralen Komplex nicht kompensiert werden kann und zu einer Beeinträchtigung des mechanischen Verhaltens führt [121, 135].

Interessanterweise haben die Experimente mit unterschiedlich langer Vorinkubation der Zellen mit Kalzium gezeigt, dass der Reifegrad der Adherens Junctions für die verstärkte Reorientierung ebenfalls nur eine untergeordnete Rolle spielt. Sofern die Zellen vor oder unmittelbar bei Anlegung der zyklischen Dehnung in Medium mit erhöhter Kalziumkonzentration inkubiert wurden, resultierte dies in einer vergleichbaren gesteigerten Reorientierung der Aktinfasern. Es wurde bereits beschrieben, dass 15 min

nach Erhöhung der Kalziumkonzentration bereits Änderungen in der Lokalisation von Vinculin und Aktin innerhalb der Zellen beobachtet werden konnten und nach einer Stunde alle an Adherens Junctions beteiligten Proteine an den Zell-Zell-Grenzen detektiert werden konnten [14, 136]. Dieser Mechanismus scheint auch unter Dehnung vergleichbar effizient zu sein. Innerhalb der Dehnungsdauer von 4 h war es somit möglich, dass auch bei Zugabe von Kalzium unmittelbar zu Beginn der Dehnung ein funktionsfähiger Adherens Junctions Komplex aufgebaut wurde.

Die durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass die kalziuminduzierten Adherens Junctions einen zweiten mechanosensitiven Mechanismus neben Fokaladhäsionen darstellen, welcher die Reorientierung von Aktinfasern unter zyklischer Dehnung induziert. Wie genau die Reorientierung der Aktinfasern basierend auf Adherens Junctions dabei erfolgt, insbesondere aus welchem Grund die Adherens Junctions-vermittelte Reorientierung zu einer verstärkten Reorientierung führt, ist bislang nicht geklärt. Während das Aktinnetzwerk durch Inkubation mit Kalzium zu einem kortikalen Ring angeordnet wird, welcher über radiale Fasern mit den Adherens Junctions verbunden ist, könnte die angelegte Dehnung zur Ablösung des Aktinrings in den Bereichen führen, wo die radialen Fasern entlang der Zugrichtung orientiert sind. Dabei könnte die Dehnung in den Bereichen des Aktinrings, welche parallel zur Zugrichtung verlaufen, ebenfalls zu einem Zerreißen der Fasern im Ring selbst führen. Für durch Dehnung beschädigte Fasern wurden bereits Reparaturmechanismen beschrieben. So wird beispielsweise Zyxin in solche Bruchstellen eingelagert [137, 138]. Infolgedessen kommt es durch Rekrutierung weiterer Proteine wie VASP, welches die Elongation von Aktinfasern reguliert und  $\alpha$ -Actinin, welches die Bündelung der Aktinfasern bewirkt, zu einem komplexen Mechanismus zur Stabilisierung und Reparatur der Aktinfasern. Diese Reparatur könnte in den gedehnten Zellen dazu führen, dass die Aktinfasern bevorzugt weg von der Zugrichtung aufgebaut und gebündelt werden. Weiterhin ist denkbar, dass die zuvor als Ring angeordneten Fasern durch Ablösung an den entlang der Zugrichtung liegenden Seiten der Zelle parallel zueinander angeordnet werden, da sie nicht länger an der gesamten Zellmembran fixiert sind. Da sie in diesem Fall durch eine Ausrichtung weg von der Zugrichtung weniger Dehnung erfahren würden, käme es dabei ebenfalls zu einer Stabilisierung der bestehenden Fasern nahezu rechtwinklig zur Zugrichtung.

Hinzu kommt, dass die Ablösung der Aktinfasern von den Adherens Junctions zu einer gleichzeitigen Destabilisierung des Komplexes auch in der benachbarten Zelle führt. Durch dieses kollektive Verhalten werden möglicherweise nahezu simultan die Aktinfasern, welche entlang der Zurichtung orientiert sind, destabilisiert. Gleichzeitig führt in diesem Fall die Erhöhung der Spannung auf die verbleibenden Adherens Junctions zu deren Verstärkung, wodurch der Komplex sowie die Bindung an das Aktinzytoskelett selbst verstärkt werden. Auch dabei würde die Aufrechterhaltung und Stabilisierung in einer Zelle zu einem ähnlichen Verhalten in der benachbarten Zelle führen.

Dieser Mechanismus könnte dabei deutlich schneller ablaufen, als der für eine Fokaladhäsions-basierte Reorientierung. Ein von Hsu et al. entwickeltes Modell legt nahe, dass es in Abhängigkeit der Dehnungsfrequenz in der Fokaladhäsions-basierten Reorientierung entweder zu einer Umlagerung der Aktinfasern kommt, oder aber die entlang der Dehnungsrichtung liegenden Fasern abgebaut und in entsprechender Richtung neu aufgebaut werden [91]. Beide Mechanismen könnten deutlich zeitintensiver sein, als eine Umlagerung bestehender Fasern von einer Ringstruktur hin zu parallel angeordneten Fasern bei gleichzeitiger zellübergreifender Stabilisierung der Fasern in geeigneter Orientierung. Weiterhin ist die Dichte entlang der Adherens Junctions entlang der Zellmembran deutlich höher, als die Dichte der Fokaladhäsionen unterhalb der Zellen. Eine dynamische Umlagerung der Aktinfasern entlang dieser Kontakte in eine Ausrichtung weg von der Zugrichtung könnte somit schneller induziert werden, als für Fokaladhäsionen. Dies würde erklären, weshalb in den durchgeführten Experimenten für kurze Dehnungsdauern eine verstärkte Reorientierung für Zellen mit ausgebildeten Adherens Junctions beobachtet wurde.

Ebenfalls gezeigt wurde, dass die Proteine der Adherens Junctions essentiell an der mechanosensitiven Funktion der Komplexe beteiligt sind. Dabei führte der Verlust von  $\alpha$ -Catenin zu einer deutlich verringerten Reorientierung auch unter Einfluss von Kalzium. Dies spricht dafür, dass die Mechanosensitivität von  $\alpha$ -Catenin entscheidend für den Prozess der Reorientierung ist. Insbesondere die Bindung von Vinculin an  $\alpha$ -Catenin konnte durch die Experimente als elementar für die vollständige Funktionalität der Adherens Junctions-vermittelten Reorientierung herausgestellt werden. Die

Rekrutierung von Vinculin an dehnungsabhängig aufgefaltetes  $\alpha$ -Catenin konnte bereits gezeigt werden [80, 130]. Obwohl beschrieben wurde, dass Vinculin auch an  $\beta$ -Catenin binden kann, konnte eine Rekrutierung von Vinculin an Adherens Junctions in Abwesenheit von  $\alpha$ -Catenin nicht gezeigt werden [119, 139]. Denkbar ist in diesem Zusammenhang ein mehrstufiger Prozess, bei welchem Vinculin entweder nach der initialen Bindung an  $\beta$ -Catenin von diesem zu  $\alpha$ -Catenin weitergegeben wird, oder aber Vinculin an  $\beta$ -Catenin rekrutiert wird, während  $\alpha$ -Catenin diese Bindung stabilisiert [82]. Zwingend erforderlich für beide Prozesse ist dabei aber das Vorhandensein von  $\alpha$ -Catenin, welches durch die Rekrutierung von Vinculin in seiner aufgefalteten Konformation stabilisiert wird [79]. Durch die Rekrutierung von Vinculin würden infolgedessen bevorzugt in unter Spannung stehenden Adherens Junctions vermehrte Bindestellen für Aktinfasern vorliegen, welche entweder in einer Orientierung nahezu senkrecht zur Zugrichtung aufgebaut werden, oder zu den entsprechend orientierten Adherens Junctions umgelagert werden. Zusätzlich induziert Vinculin die Rekrutierung weiterer Aktin-modulierender Proteine, welche die Bindung der Aktinfasern an Komplexe in geeigneter Orientierung stabilisieren könnten. Zudem wurde bereits beschrieben, dass die Krafteinwirkung auf Adherens Junctions zu deren Stabilisierung und Wachstum in einem RhoA-abhängigen Mechanismus führt [140]. RhoA ist an der Bildung von Stressfasern beteiligt [24] und die Inhibierung von Rho oder der Rho-Kinase führt zu einem Verlust der Aktinfaserreorientierung infolge zyklischer Dehnung [141]. Die Aktivierung von Rho könnte somit durch die einwirkende Dehnung zur gleichzeitigen Stabilisierung der Adherens Junctions und Aktinfasern beitragen und durch eine positive Rückkopplung die Bindung der Fasern in nahezu senkrechter Orientierung zur Zugrichtung begünstigen.

### **4.3 Kalziumabhängige maximale Faserorientierung**

Eine längere zyklische Dehnung der Keratinozyten zeigte, dass nach 16 h andauernder Dehnung der Endpunkt der Reorientierung erreicht wurde. Dabei zeigte sich ein Unterschied in der maximalen Faserorientierung in Abhängigkeit der Kalziuminkubation. Während Zellen, welche die Reorientierung über Fokaladhäsionen regulierten, eine

deutlich breitere Winkelverteilung aufwiesen, führte die Adherens Junctions-vermittelte Reorientierung dazu, dass die Winkelverteilung deutlich schmaler war und ihr Maximum bei höheren Winkeln lag. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt die Verbindung des Aktinzytoskeletts zwischen benachbarten Zellen dar, sobald kalziumabhängige Adherens Junctions gebildet wurden. Die Orientierung kann durch interzelluläre Kopplung der Fasern möglicherweise nicht länger unabhängig voneinander erfolgen, wodurch ein kooperatives Verhalten induziert wird. Unterschiedliche Winkel können bedingt durch die Konformation der Zell-Zell-Kontakte auf beiden Seiten der Zelle nicht aufrechterhalten werden, da sie Spannungen innerhalb des Kontaktes führen würden.

Um weitere Hinweise auf eine mögliche kooperative Reorientierung zu erhalten, wurden Dehnungsexperimente mit Kammern durchgeführt, welche ein abweichendes Querkontraktionsverhältnis aufweisen. Die Abhängigkeit des *angle of zero strain*, das heißt die Lage des dehnungsfreien Zustands, wurde für die hier verwendeten Kammergeometrien bereits untersucht [83]. Dabei führte eine Änderung der Substratgeometrie zur Erhöhung des Querkontraktionsverhältnisses und damit einer Verlagerung des *angle of zero strain* hin zu einem geringeren Winkel relativ zur Dehnungsrichtung. Die Experimente von Faust et al. konnten auf Ebene von Einzelzellen bereits zeigen, dass die Reorientierung der Aktinfasern hin zum *angle of zero strain* erfolgt [83]. Die Reorientierung hin zu diesem Winkel dient dabei als Mechanismus einzelner Zellen, der Substratdehnung zu entgehen und keiner weiteren Längenänderung ausgesetzt zu sein. Die Verteilung der eingenommenen Aktinfaserwinkel schwankte dabei um diesen Winkel, eine Reorientierung zu höheren Winkeln konnte aber ebenfalls beobachtet werden. Dieses Verhalten könnte dabei sowohl von den angelegten Dehnungsparametern sowie der Stauchung in senkrechter Richtung zur angelegten Dehnungsrichtung abhängig sein. Eine Erhöhung des Querkontraktionsverhältnisses führte auch in den Experimenten dieser Arbeit zu einer Verschiebung des Maximums der Winkelverteilung hin zu geringeren Werten. Diese Verschiebung konnte für Aktinfasern in Zellen sowohl mit und ohne Einfluss von Kalzium beobachtet werden. Der Effekt war für Zellen, welche Adherens Junctions ausgebildet haben, aber deutlich stärker. Hier wurde das Maximum der Winkelverteilung im Bereich von nahezu 90° hin zu 70° verschoben, was basierend auf der Substratgeometrie dem *angle of zero strain* entspricht. Die relativen Häufigkeiten stiegen in diesem Bereich auch für Zellen ohne Adherens

Junctions an, wiesen aber weiterhin ein Maximum im Bereich um  $90^\circ$  auf. Die Verteilung der Aktinfaserwinkel in Zellen unter Kalziumeinfluss war zudem deutlich schmaler als für Zellen ohne Kalzium. Dies stützt die zuvor gemachte Hypothese, dass die Kopplung der Aktinfasern dazu führt, dass die Orientierung der Fasern voneinander abhängt und nur in einem kleinen Bereich schwankt. Dies spricht für ein kollektives Verhalten, in welchem ein individuelles Verhalten, wie es auf Basis von Fokaladhäsionen möglich ist, nicht länger realisiert werden kann.

Die Abhängigkeit der maximalen Faserorientierung von der Kalziuminkubation konnte auch für Zellen ohne Vinculin-Expression gezeigt werden. Auch in diesen Zellen war eine deutlich schwächere Reorientierung in Zellen ohne Kalziumeinfluss zu erkennen als in Kontrollzellen. Wie bereits zuvor beschrieben wurde, könnte dies von der mechanosensitiven Funktion von Vinculin in den Adhäsionen abhängig sein. Da Vinculin in Abhängigkeit von Spannung aufgefaltet wird und weitere Bindestellen für Aktin-modulierende Proteine bereitstellt [57-60], ist die Bindung an Fokaladhäsionen und Adherens Junctions essentiell für eine vollständige Funktionalität der Mechanotransduktion als Antwort auf zyklische Dehnung. Das Fehlen von Vinculin führte im Vergleich zu den Kontrollzellen jedoch in Fokaladhäsionen und Adherens Junctions zu einer unterschiedlich stark veränderten Reaktion auf zyklische Dehnung. Durch die Variation der Dehnungsfrequenz konnte gezeigt werden, dass insbesondere auf Ebene der Fokaladhäsions-vermittelten Reorientierung eine Beeinträchtigung vorlag. Eine Abhängigkeit der Reorientierung von der Dehnungsfrequenz wurde bereits beschrieben [83, 85]. Hierbei führte eine schnellere Dehnung oberhalb von 0,5 Hz zu einer schnelleren Reorientierung der Aktinfasern. Gleichzeitig führte die Erhöhung der Dehnungsfrequenz ebenfalls zu einer gesteigerten Reorientierung hin zu  $90^\circ$  [85, 87, 91]. Dieses Verhalten war in Kontrollzellen, welche in Abwesenheit von Kalzium gedehnt wurden, insbesondere für kurze Dehnungsdauern von 4 h ebenfalls nachweisbar. Eine schnellere Dehnung führte hier zu einer stärkeren Reorientierung der Aktinfasern. Diese war in Anwesenheit von Kalzium ebenfalls erkennbar, aber deutlich weniger stark ausgeprägt, was sich in den sehr ähnlichen Häufigkeitsverteilungen zeigte. Dies zeigte, dass die Inkubation mit Kalzium bereits für kurze Dehnungsdauern zu einer Beschleunigung der Reorientierung führte.

Das Fehlen von Vinculin führte dazu, dass eine Frequenzabhängigkeit in Abwesenheit von Kalzium fast nicht mehr erkennbar war, diese aber durch Zugabe vom Kalzium bei kurzen Dehnungsdauern wiedererlangt wurde. Dies legt nahe, dass das Fehlen von Vinculin in den Fokaladhäsionen einen deutlich größeren Einfluss hat als in den Adherens Junctions. Zu vermuten ist, dass Vinculin in der Fokaladhäsion eine deutlich wichtigere Rolle bei der Signaltransduktion spielt als in Adherens Junctions, wo es als Verstärker der Bindung der Adhäsion an das Zytoskelett zu agieren scheint. Der genaue Mechanismus der Reorientierung ist für beide Adhäsionstypen aber bisher nicht vollständig aufgeklärt. Die große strukturelle Ähnlichkeit von Fokaladhäsionen und Adherens Junctions weist auf einen vergleichbaren Mechanismus hin, welcher die Aktivierung von Rho-Proteinen und dadurch Regulation des Aktinnetzwerkes bewirkt [142, 143]. Die genaue Beteiligung von Vinculin in beiden Strukturen scheint dabei unterschiedlich, aber für eine vollständige Funktionalität erforderlich zu sein. Möglich wäre, dass durch die zentrale Einlagerung von Vinculin in den Fokaladhäsionen eine Deletion zu einem massiven Einfluss auf die Stabilität und mechanischen Eigenschaften der Fokaladhäsion führt. Die Rekrutierung von Vinculin an Talin stabilisiert die Adhäsionsstruktur und induziert eine weitergehende Anhäufung von Integrinen an Kontaktpunkten (38, 39). Ebenso wurde gezeigt, dass die Bindung von Paxillin an Vinculin insbesondere unter Krafteinwirkung zu einer verbesserten Einbindung in Fokaladhäsionen führt (45). Weiterhin fungiert Vinculin selbst als direkte Verbindung zum Aktinzytoskelett und durch Anlagerung weiterer Proteine wie  $\alpha$ -Actinin zur Bündelung der Fasern. Während Vinculin in Fokaladhäsionen als zentrales mechanosensitives Protein zu agieren scheint, kann ein Fehlen in den Adherens Junctions scheinbar kompensiert werden. Möglich ist dabei, dass die Bindung von  $\alpha$ -Catenin an das Aktinzytoskelett auch ohne Vinculin stabil erfolgt. Durch die große strukturelle Ähnlichkeit beider Proteine werden auch zu großen Teilen identische Proteine bei Auffaltung rekrutiert. Dies könnte dazu führen, dass sowohl die Bindung an das Zytoskelett als auch die Aktin-modulierenden Einflüsse bereits ohne Bindung von Vinculin erfolgen. Vinculin dient in diesem Fall als Verstärker, ist aber nicht essentiell für den Prozess der Adherens Junctions-basierten Reorientierung verantwortlich.

Durch die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente war es möglich, einen weiteren mechanosensitiven Mechanismus aufzudecken, welcher für die Reorientierung der Aktinfasern als Antwort auf zyklische Dehnung verantwortlich ist.



Dabei wurde nicht nur gezeigt, dass andere als bisher erwartete Strukturen und Proteine einbezogen werden, sondern dass die Adherens Junctions-basierte Zellantwort auch in Abwesenheit von Fokaladhäsionen in mindestens gleicher Effizienz funktioniert. Damit wurde ein grundlegender Mechanismus zur Antwort auf zyklische Dehnung beschrieben, der auch in Zellen der suprabasalen epidermalen Schichten bedeutsam sein könnte. Die Epidermis selbst ist sicherlich weitaus komplexer als das in dieser Arbeit genutzte *in vitro* Modell einschichtiger differenzierender Keratinozyten, in beiden Systemen ist jedoch der Verlust von Zell-Matrix-Adhäsionen durch die fortschreitende Differenzierung zu beobachten. Die Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass in einem Modell der Basalschicht der Einfluss der Fokaladhäsionen auf die Reorientierung des Aktinzytoskeletts nur noch sehr gering ist. Da die Zellen der suprabasalen Schichten keine Fokaladhäsionen mehr aufweisen und die Integrität des Gewebes über Zell-Zell-Adhäsionen gewährleistet wird, ist zu vermuten, dass der hier aufgezeigte Adherens Junctions-basierte Mechanismus zur Reorientierung daher auch in diesen epidermalen Schichten relevant ist. Weitere Analysen mehrschichtiger Systeme sind dabei notwendig, um die Relevanz dieses mechanosensitiven Komplexes in den oberen epidermalen Schichten näher zu bestimmen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Arbeit verdeutlichen, von welcher enormen Bedeutung die Untersuchung zellulärer Vorgänge in einer möglichst physiologischen Umgebung ist. Da viele Zelltypen in einem Organismus nicht isoliert als Einzelzellen vorliegen, ist die Verwendung von Systemen, welche aus einem Verbund von Zellen bestehen, unerlässlich für das Verständnis der *in vivo* ablaufenden Anpassungsprozesse. Gleichzeitig konnte die Verwendung von Keratinozyten mit verschiedenen Defekten in der Expression von Adhäsionsproteinen zeigen, welche Proteine an der Signalerkennung und Transduktion in differenzierenden epithelialen Geweben beteiligt sind. Eine Weiterführung dieser Experimente kann so Aufschluss über den Einfluss verschiedener Mutationen in assoziierten Fragestellungen geben.



## 5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ausbildung von kalziumabhängigen Adherens Junctions dazu führt, dass die Reaktion auf zyklische Dehnung nicht länger auf der Basis von Fokaladhäsionen geschieht, sondern von Adherens Junctions übernommen wird. Es konnte bisher nicht gezeigt werden, wie die genaue Proteinlokalisierung der am Komplex beteiligten Proteine unter Dehnung aussieht. Die immunzytochemische Analyse der Adherens Junctions Proteinen E-Cadherin sowie  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin für unterschiedliche Stadien der Aktin角度reorientierung könnte zum Verständnis der unterschiedlichen Reorientierung von Aktin角度fasern beitragen.

Ebenso sind in diesem Zusammenhang das Vorhandensein und der Einfluss weiterer Bindungspartner von Vinculin von Interesse. Da die Abwesenheit von Vinculin zwar einen Effekt auf die Reorientierung hatte, die gesteigerte Reorientierung aber trotzdem zu beobachten war, scheint die durch Konformationsänderung von Vinculin induzierte Bindung weiterer Proteine von Bedeutung zu sein. Welche Proteine im Detail dort relevant sind, kann durch Verwendung von Zellen mit veränderter Protein-Expression und immunzytochemischen Analysen geklärt werden.

Weiterhin konnte die Frequenzabhängigkeit in Vinc<sup>Ctrl</sup>-Zellen sowohl für Fokaladhäsionsbasierte als auch Adherens Junctions-basierte Reorientierung gezeigt werden. In Anwesenheit der Adherens Junctions war diese jedoch innerhalb der analysierten Dehnungsdauer deutlich weniger ausgeprägt. Die genauere Analyse kann durch Experimente mit einer kürzeren Dehnungsdauer ermöglicht werden sodass insbesondere zu Beginn der Reorientierung ein Effekt analysiert werden kann.

Die durchgeführten Experimente haben gezeigt, dass die Induktion der Differenzierung zur Verschiebung des mechanosensitiven Systems hin zu Adherens Junctions erfolgt. Dabei spielte die Dauer der Ausbildung von Adherens Junctions vor Anlegung der zyklischen Dehnung nur eine untergeordnete Rolle. Von Interesse ist daher, wie die relevanten Proteine auch unter Dehnung an die Zell-Zell-Grenzen rekrutiert werden und die Umlagerung des Aktinnetzwerks an die Adherens Junctions erfolgt. Hierfür ist ebenfalls die Verkürzung der Dehnungsdauer erforderlich, da ein Unterschied nach

vierstündiger Dehnung nicht mehr beobachtet werden konnte. Weiterhin bietet die Methode der Lebendzell-Mikroskopie eine Möglichkeit zur detaillierten Analyse der Prozesse während der kalziuminduzierten Umstrukturierung verschiedener Proteine sowie dehnungsinduzierten Umlagerung der Aktinfasern.

Die Durchführung von Lebendzell-Mikroskopie ist ebenfalls für ein genaueres Verständnis des kollektiven Verhaltens durch Ausbildung von Adherens Junctions erforderlich. Es konnte beobachtet werden, dass die Breite der Winkelverteilung von Aktinfasern nach zyklischer Dehnung in An- und Abwesenheit von Adherens Junctions deutlich unterschiedlich war. Dieses Verhalten konnte für unterschiedliche *zero strain* Winkel gezeigt werden. Es sind daher Experimente erforderlich, in welchen untersucht wird, über wie viele Zellen einer Zellschicht eine einheitliche Aktinfaseroorientierung beobachtet werden kann. Im Anschluss daran könnte durch Manipulation einzelner Zellen untersucht werden, wie sich die Aktinfasern und Adherens Junctions Komplexe verhalten, wenn ein abweichender Winkel erzwungen wird.

Letztlich wäre für ein weiter gesteigertes Verständnis der Mechanotransduktion *in vivo* von Interesse, das *in vitro* System weiterhin an diese Umgebung anzupassen. In dieser Arbeit wurde die Umgebung der Basalschicht imitiert und somit der Beginn der Differenzierung analysiert. Im Folgenden ist es von Interesse, nicht nur eine einzelne Zellschicht zu untersuchen, sondern ein Gewebe aus mehreren Zellschichten. Da sich mit Migration der Keratinozyten aus der Basalschicht die Adhäsionsstrukturen und zytoskelettalen Strukturen deutlich verändern, ist eine Analyse des mechanosensitiven Verhaltens in diesen Zellschichten von Interesse.

---

## Literaturverzeichnis

- [1] Chuong, C.M., et al., *What is the 'true' function of skin?* Exp Dermatol, 2002. **11**(2): p. 159-87.
- [2] Kanitakis, J., *Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin.* Eur J Dermatol, 2002. **12**(4): p. 390-401.
- [3] Auwärter, V., *Fettsäureethylester als Marker exzessiven Alkoholkonsums.* 2006, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- [4] Fuchs, E. and Raghavan, S., *Getting under the skin of epidermal morphogenesis.* Nat Rev Genet, 2002. **3**(3): p. 199-209.
- [5] Losquadro, W.D., *Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer.* Facial Plast Surg Clin North Am, 2017. **25**(3): p. 283-89.
- [6] Solanas, G. and Benitah, S.A., *Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(11): p. 737-48.
- [7] Watt, F.M., *Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1998. **353**(1370): p. 831-7.
- [8] Eckert, R.L., *Structure, function, and differentiation of the keratinocyte.* Physiol Rev, 1989. **69**(4): p. 1316-46.
- [9] Elsholz, F., et al., *Calcium - a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease.* Eur J Dermatol, 2014. **24**(6): p. 650-61.
- [10] Hennings, H., et al., *Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture.* Cell, 1980. **19**(1): p. 245-54.
- [11] Pillai, S., et al., *Biochemical and morphological characterization of growth and differentiation of normal human neonatal keratinocytes in a serum-free medium.* J Cell Physiol, 1988. **134**(2): p. 229-37.

- [12] Hennings, H. and Holbrook, K.A., *Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study.* Exp Cell Res, 1983. **143**(1): p. 127-42.
- [13] Gumbiner, B.M., *Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.* Cell, 1996. **84**(3): p. 345-57.
- [14] O'Keefe, E.J., et al., *Calcium-induced assembly of adherens junctions in keratinocytes.* J Cell Biol, 1987. **105**(2): p. 807-17.
- [15] Forgacs, G., et al., *Role of the cytoskeleton in signaling networks.* J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 13): p. 2769-75.
- [16] Jaeken, L., *A new list of functions of the cytoskeleton.* IUBMB Life, 2007. **59**(3): p. 127-33.
- [17] Schoenenberger, C.A., et al., *Actin: from structural plasticity to functional diversity.* Eur J Cell Biol, 2011. **90**(10): p. 797-804.
- [18] Bunnell, T.M. and Ervasti, J.M., *Structural and functional properties of the actin gene family.* Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2011. **21**(3): p. 255-66.
- [19] Cramer, L.P., et al., *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.
- [20] Lazarides, E. and Burridge, K., *Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells.* Cell, 1975. **6**(3): p. 289-98.
- [21] Elkhatib, N., et al., *Fascin plays a role in stress fiber organization and focal adhesion disassembly.* Curr Biol, 2014. **24**(13): p. 1492-9.
- [22] Tojkander, S., et al., *Actin stress fibers-assembly, dynamics and biological roles.* J Cell Sci, 2012. **125**(8): p. 1855-64.
- [23] Paterson, H.F., et al., *Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology.* J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1001-7.

- [24] 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.
- [25] Amano, M., et al., *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20246-9.
- [26] Weber, K. and Groeschel-Stewart, U., *Antibody to Myosin: The Specific Visualization of Myosin-Containing Filaments in Nonmuscle Cells*. Proc Nat Acad Sci USA, 1974. **71**(11): p. 4561-4.
- [27] Langanger, G., et al., *The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells*. J Cell Biol, 1986. **102**(1): p. 200-9.
- [28] Small, J.V., et al., *Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1404**(3): p. 271-81.
- [29] Burridge, K. and Wittchen, E.S., *The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers*. J Cell Biol, 2013. **200**(1): p. 9-19.
- [30] Hotulainen, P. and Lappalainen, P., *Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells*. J Cell Biol, 2006. **173**(3): p. 383-94.
- [31] Millan, J., et al., *Adherens junctions connect stress fibres between adjacent endothelial cells*. BMC Biol, 2010. **8**(1): p. 11.
- [32] Ratheesh, A. and Yap, A.S., *A bigger picture: classical cadherins and the dynamic actin cytoskeleton*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2012. **13**: p. 673.
- [33] Yonemura, S., *Actin filament association at adherens junctions*. J Med Invest, 2017. **64**(1.2): p. 14-9.
- [34] Twiss, F. and de Rooij, J., *Cadherin mechanotransduction in tissue remodeling*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(21): p. 4101-16.
- [35] McKeown, S.J., et al., *Expression and function of cell adhesion molecules during neural crest migration*. Dev Biol, 2013. **373**(2): p. 244-57.

- [36] Simpson, C.L., et al., *Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(9): p. 565-80.
- [37] Geiger, B. and Yamada, K.M., *Molecular architecture and function of matrix adhesions*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(5).
- [38] Berrier, A.L. and Yamada, K.M., *Cell-matrix adhesion*. J Cell Physiol, 2007. **213**(3): p. 565-73.
- [39] Giepmans, B.N. and van Ijzendoorn, S.C., *Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(4): p. 820-31.
- [40] Jefferson, J.J., et al., *Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(7): p. 542-53.
- [41] Hopkinson, S.B., et al., *Focal Contact and Hemidesmosomal Proteins in Keratinocyte Migration and Wound Repair*. Adv Wound Care (New Rochelle), 2014. **3**(3): p. 247-63.
- [42] Lodish H, et al., *Cell-Matrix Adhesion*, in *Molecular Cell Biology*. 2000, Freeman, W. H.: New York.
- [43] Abercrombie, M., et al., *The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella*. Exp Cell Res, 1971. **67**(2): p. 359-67.
- [44] Zamir, E. and Geiger, B., *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 20): p. 3583-90.
- [45] Zaidel-Bar, R., et al., *Functional atlas of the integrin adhesome*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(8): p. 858-67.
- [46] de Melker, A.A. and Sonnenberg, A., *Integrins: alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events*. Bioessays, 1999. **21**(6): p. 499-509.
- [47] von der Mark, H., et al., *Alternative splice variants of alpha 7 beta 1 integrin selectively recognize different laminin isoforms*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 6012-6.



- [48] Hynes, R.O., *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 2002. **110**(6): p. 673-87.
- [49] Shattil, S.J., et al., *The final steps of integrin activation: the end game*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(4): p. 288-300.
- [50] Critchley, D.R., *Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 5): p. 831-6.
- [51] Nayal, A., et al., *Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(1): p. 94-8.
- [52] Mitra, S.K., et al., *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 56-68.
- [53] Papagrigoriou, E., et al., *Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle*. EMBO J, 2004. **23**(15): p. 2942-51.
- [54] Critchley, D.R. and Gingras, A.R., *Talin at a glance*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 9): p. 1345-7.
- [55] Moes, M., et al., *The integrin binding site 2 (IBS2) in the talin rod domain is essential for linking integrin beta subunits to the cytoskeleton*. J Biol Chem, 2007. **282**(23): p. 17280-8.
- [56] Humphries, J.D., et al., *Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin*. J Cell Biol, 2007. **179**(5): p. 1043-57.
- [57] Carisey, A., et al., *Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner*. Curr Biol, 2013. **23**(4): p. 271-81.
- [58] Carisey, A. and Ballestrem, C., *Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(2-3): p. 157-63.
- [59] Bakolitsa, C., et al., *Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion*. Nature, 2004. **430**(6999): p. 583-6.

- [60] DeMali, K.A., et al., *Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion*. J Cell Biol, 2002. **159**(5): p. 881-91.
- [61] Shortrede, J.E., et al., *Paxillin, a novel controller in the signaling of estrogen to FAK/N-WASP/Arp2/3 complex in breast cancer cells*. Mol Cell Endocrinol, 2016. **430**: p. 56-67.
- [62] Turner, C.E., et al., *Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1059-68.
- [63] Geiger, B. and Bershadsky, A., *Assembly and mechanosensory function of focal contacts*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 584-92.
- [64] Getsios, S., et al., *Junctions in human health and inherited disease*. Cell Tissue Res, 2015. **360**(3): p. 435-8.
- [65] Mehta, S., et al., *Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ beta-catenin) in inflammatory bowel disease*. Cell Tissue Res, 2015. **360**(3): p. 749-60.
- [66] Samuelov, L., et al., *The role of P-cadherin in skin biology and skin pathology: lessons from the hair follicle*. Cell Tissue Res, 2015. **360**(3): p. 761-71.
- [67] Vite, A., et al., *New functions for alpha-catenins in health and disease: from cancer to heart regeneration*. Cell Tissue Res, 2015. **360**(3): p. 773-83.
- [68] Furukawa, F., et al., *Roles of E- and P-Cadherin in the human skin*. Microsc Res Tech, 1997. **38**(4): p. 343-52.
- [69] Wheelock, M.J. and Jensen, P.J., *Regulation of keratinocyte intercellular junction organization and epidermal morphogenesis by E-cadherin*. J Cell Biol, 1992. **117**(2): p. 415-25.
- [70] Anastasiadis, P.Z., *p120-ctn: A nexus for contextual signaling via Rho GTPases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(1): p. 34-46.
- [71] Keil, R., et al., *Beyond Regulation of Cell Adhesion: Local Control of RhoA at the Cleavage Furrow by the p0071 Catenin*. Cell Cycle, 2007. **6**(2): p. 122-127.

- [72] Reynolds, A.B., *p120-catenin: Past and present*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(1): p. 2-7.
- [73] Yamada, S., et al., *Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex*. Cell, 2005. **123**(5): p. 889-901.
- [74] Drees, F., et al., *Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly*. Cell, 2005. **123**(5): p. 903-15.
- [75] Buckley, C.D., et al., *Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force*. Science, 2014. **346**(6209): p. 1254211.
- [76] Rangarajan, E.S. and Izard, T., *The cytoskeletal protein alpha-catenin unfurls upon binding to vinculin*. J Biol Chem, 2012. **287**(22): p. 18492-9.
- [77] Rimm, D.L., et al., *Alpha 1(E)-catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(19): p. 8813-8817.
- [78] Pokutta, S., et al., *Biochemical and structural definition of the I-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin*. J Biol Chem, 2002. **277**(21): p. 18868-74.
- [79] Yao, M., et al., *Force-dependent conformational switch of alpha-catenin controls vinculin binding*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4525.
- [80] Yonemura, S., et al., *alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(6): p. 533-42.
- [81] Hazan, R.B., et al., *Vinculin Is Associated with the E-cadherin Adhesion Complex*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32448-53.
- [82] Bays, J.L. and DeMali, K.A., *Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(16): p. 2999-3009.
- [83] Faust, U., et al., *Cyclic stress at mHz frequencies aligns fibroblasts in direction of zero strain*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28963.

- [84] Neidlinger-Wilke, C., et al., *Fibroblast orientation to stretch begins within three hours*. J Orthop Res, 2002. **20**(5): p. 953-6.
- [85] Jungbauer, S., et al., *Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates*. Biophys J, 2008. **95**(7): p. 3470-8.
- [86] Hayakawa, K., et al., *Orientation of Smooth Muscle-Derived A10 Cells in Culture by Cyclic Stretching: Relationship between Stress Fiber Rearrangement and Cell Reorientation*. Zoolog Sci, 2000. **17**(5): p. 617-24.
- [87] Hayakawa, K., et al., *Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching*. Exp Cell Res, 2001. **268**(1): p. 104-14.
- [88] Dartsch, P.C., et al., *Orientation of cultured arterial smooth muscle cells growing on cyclically stretched substrates*. Acta Anat (Basel), 1986. **125**(2): p. 108-13.
- [89] Chien, S., *Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007. **292**(3): p. H1209-24.
- [90] Buck, R.C., *Reorientation response of cells to repeated stretch and recoil of the substratum*. Exp Cell Res, 1980. **127**(2): p. 470-4.
- [91] Hsu, H.J., et al., *A dynamic stochastic model of frequency-dependent stress fiber alignment induced by cyclic stretch*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4853.
- [92] Kanzaki, M., et al., *Molecular identification of a eukaryotic, stretch-activated nonselective cation channel*. Science, 1999. **285**(5429): p. 882-6.
- [93] Tondon, A., et al., *Dependence of cyclic stretch-induced stress fiber reorientation on stretch waveform*. J Biomech, 2012. **45**(5): p. 728-35.
- [94] Costa, K.D., et al., *Buckling of actin stress fibers: a new wrinkle in the cytoskeletal tapestry*. Cell Motil Cytoskeleton, 2002. **52**(4): p. 266-74.
- [95] Hayakawa, K., et al., *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.

- [96] Uyeda, T.Q., et al., *Stretching actin filaments within cells enhances their affinity for the myosin II motor domain*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26200.
- [97] Vogel, V. and Sheetz, M., *Local force and geometry sensing regulate cell functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(4): p. 265-75.
- [98] Sawada, Y., et al., *Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas*. Cell, 2006. **127**(5): p. 1015-26.
- [99] Tamada, M., et al., *Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch*. Dev Cell, 2004. **7**(5): p. 709-18.
- [100] Harte, M.T., et al., *p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase*. J Biol Chem, 1996. **271**(23): p. 13649-55.
- [101] Niediek, V., et al., *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.
- [102] Boussadia, O., et al., *E-cadherin is a survival factor for the lactating mouse mammary gland*. Mech Dev, 2002. **115**(1-2): p. 53-62.
- [103] Hafner, M., et al., *Keratin 14 Cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein*. Genesis, 2004. **38**(4): p. 176-81.
- [104] Michels, C., et al., *Classical cadherins regulate desmosome formation*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(8): p. 2072-5.
- [105] Hersch, N., et al., *The constant beat: cardiomyocytes adapt their forces by equal contraction upon environmental stiffening*. Biol Open, 2013. **2**(3): p. 351-61.
- [106] Mohl, C., et al., *Quantitative mapping of averaged focal adhesion dynamics in migrating cells by shape normalization*. J Cell Sci, 2012. **125**(1): p. 155-65.
- [107] Bigun, J., et al., *Recognition by symmetry derivatives and the generalized structure tensor*. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell, 2004. **26**(12): p. 1590-605.

- [108] Efron, B. and Tibshirani, R.J., *An Introduction to the Bootstrap*. 1994: Taylor & Francis.
- [109] Ziegler, W.H., et al., *The structure and regulation of vinculin*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(9): p. 453-60.
- [110] Tinkle, C.L., et al., *New insights into cadherin function in epidermal sheet formation and maintenance of tissue integrity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(40): p. 15405-10.
- [111] Valenta, T., et al., *The many faces and functions of beta-catenin*. EMBO J, 2012. **31**(12): p. 2714-36.
- [112] Rudiger, M., *Vinculin and alpha-catenin: shared and unique functions in adherens junctions*. Bioessays, 1998. **20**(9): p. 733-40.
- [113] Menon, G.K., et al., *Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry*. J Invest Dermatol, 1985. **84**(6): p. 508-12.
- [114] Farquhar, M.G., *Junctional Complexes in Various Epithelia*. J Cell Biol, 1963. **17**(2): p. 375-412.
- [115] Yamada, S. and Nelson, W.J., *Localized zones of Rho and Rac activities drive initiation and expansion of epithelial cell-cell adhesion*. J Cell Biol, 2007. **178**(3): p. 517-27.
- [116] Hodivala, K.J. and Watt, F.M., *Evidence that cadherins play a role in the downregulation of integrin expression that occurs during keratinocyte terminal differentiation*. J Cell Biol, 1994. **124**(4): p. 589-600.
- [117] Wang, J.H., et al., *Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching*. J Biomech, 2001. **34**(12): p. 1563-72.
- [118] Tunggal, J.A., et al., *E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions*. EMBO J, 2005. **24**(6): p. 1146-56.
- [119] Watabe-Uchida, M., et al., *alpha-Catenin-vinculin interaction functions to organize the apical junctional complex in epithelial cells*. J Cell Biol, 1998. **142**(3): p. 847-57.

- [120] Weiss, E.E., et al., *Vinculin Is Part of the Cadherin–Catenin Junctional Complex: Complex Formation between  $\alpha$ -Catenin and Vinculin*. J Cell Biol, 1998. **141**(3): p. 755-64.
- [121] Wen, K.K., et al., *Vinculin nucleates actin polymerization and modifies actin filament structure*. J Biol Chem, 2009. **284**(44): p. 30463-73.
- [122] Grashoff, C., et al., *Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics*. Nature, 2010. **466**(7303): p. 263-6.
- [123] Mierke, C.T., et al., *Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain*. Biophys J, 2008. **94**(2): p. 661-70.
- [124] Galbraith, C.G., et al., *The relationship between force and focal complex development*. J Cell Biol, 2002. **159**(4): p. 695-705.
- [125] Lausecker, F., et al., *Vinculin is required to maintain glomerular barrier integrity*. Kidney Int, 2018. **93**(3): p. 643-55.
- [126] Zhang, X., et al., *Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(9): p. 1062-8.
- [127] Priddle, H., et al., *Disruption of the Talin Gene Compromises Focal Adhesion Assembly in Undifferentiated but Not Differentiated Embryonic Stem Cells*. J Cell Biol, 1998. **142**(4): p. 1121-33.
- [128] Vasioukhin, V., et al., *Directed Actin Polymerization Is the Driving Force for Epithelial Cell–Cell Adhesion*. Cell, 2000. **100**(2): p. 209-19.
- [129] Huveneers, S. and de Rooij, J., *Mechanosensitive systems at the cadherin-F-actin interface*. J Cell Sci, 2013. **126**(2): p. 403-13.
- [130] le Duc, Q., et al., *Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner*. J Cell Biol, 2010. **189**(7): p. 1107-15.
- [131] Twiss, F., et al., *Vinculin-dependent Cadherin mechanosensing regulates efficient epithelial barrier formation*. Biol Open, 2012. **1**(11): p. 1128-40.

- [132] Sumida, G.M., et al., *Myosin II activity dependent and independent vinculin recruitment to the sites of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion*. BMC Cell Biol, 2011. **12**: p. 48.
- [133] Kioka, N., et al., *Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization*. J Cell Biol, 1999. **144**(1): p. 59-69.
- [134] Brindle, N.P., et al., *The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin*. Biochem J, 1996. **318**(3): p. 753-7.
- [135] Isenberg, G., et al., *Structural aspects of vinculin-actin interactions*. J Mol Biol, 1982. **158**(2): p. 231-49.
- [136] Braga, V.M.M., et al., *Calcium-Induced Changes in Distribution and Solubility of Cadherins, Integrins and Their Associated Cytoplasmic Proteins in Human Keratinocytes*. Cell Commun Adhes, 2009. **3**(3): p. 201-15.
- [137] Smith, M.A., et al., *A zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair*. Dev Cell, 2010. **19**(3): p. 365-76.
- [138] Hoffman, L.M., et al., *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.
- [139] Ray, S., et al., *beta-Catenin protects the epidermis from mechanical stresses*. J Cell Biol, 2013. **202**(1): p. 45-52.
- [140] Liu, Z., et al., *Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(22): p. 9944-9.
- [141] Birukov, K.G., et al., *Magnitude-dependent regulation of pulmonary endothelial cell barrier function by cyclic stretch*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(4): p. L785-97.



- [142] 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.
- [143] Goldyn, A.M., et al., *Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding*. J Cell Sci, 2009. **122**(20): p. 3644-51.



## Appendix

**Tabelle 1: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 19.**

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> / 0h Stretch (n=157)</b> |                 |                    |                | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> / 4h Stretch (n=416)</b> |                 |                    |                |
|--|-----------------|--------------------|----------------|--|-----------------|--------------------|----------------|
| Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 | Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
| 10   | 0,064           | 0,11               | 0,17           | 10   | 0               | 0,0053             | 0,016          |
| 20   | 0,15            | 0,22               | 0,30           | 20   | 0               | 0,0088             | 0,021          |
| 30   | 0,24            | 0,31               | 0,39           | 30   | 0               | 0,0088             | 0,021          |
| 40   | 0,36            | 0,45               | 0,53           | 40   | 0,010           | 0,026              | 0,046          |
| 50   | 0,46            | 0,55               | 0,63           | 50   | 0,026           | 0,046              | 0,071          |
| 60   | 0,56            | 0,64               | 0,72           | 60   | 0,049           | 0,076              | 0,11           |
| 70   | 0,68            | 0,75               | 0,82           | 70   | 0,15            | 0,19               | 0,24           |
| 80   | 0,81            | 0,87               | 0,92           | 80   | 0,34            | 0,39               | 0,44           |
| 90   | 1               | 1                  | 1              | 90   | 1               | 1                  | 1              |

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> / 0h Stretch (n=284)</b> |                 |                    |                | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> / 0h Stretch (n=402)</b> |                 |                    |                |
|--|-----------------|--------------------|----------------|--|-----------------|--------------------|----------------|
| Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 | Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
| 10   | 0,055           | 0,084              | 0,12           | 10   | 0               | 0                  | 0              |
| 20   | 0,16            | 0,21               | 0,27           | 20   | 0               | 0                  | 0              |
| 30   | 0,28            | 0,34               | 0,40           | 30   | 0               | 0                  | 0              |
| 40   | 0,40            | 0,46               | 0,53           | 40   | 0               | 0                  | 0              |
| 50   | 0,50            | 0,56               | 0,63           | 50   | 0               | 0                  | 0              |
| 60   | 0,62            | 0,68               | 0,74           | 60   | 0               | 0                  | 0              |
| 70   | 0,73            | 0,78               | 0,84           | 70   | 0,0071          | 0,017              | 0,032          |
| 80   | 0,85            | 0,89               | 0,93           | 80   | 0,15            | 0,19               | 0,23           |
| 90   | 1               | 1                  | 1              | 90   | 1               | 1                  | 1              |

**Tabelle 2: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 22.**

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> / 0h Stretch (n=368)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>KO</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> / 4h Stretch (n=345)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0,049        | 0,074           | 0,11        | 10   | 0,0059       | 0,018           | 0,036       |
| 20   | 0,14         | 0,18            | 0,23        | 20   | 0,020        | 0,039           | 0,063       |
| 30   | 0,19         | 0,23            | 0,28        | 30   | 0,063        | 0,092           | 0,13        |
| 40   | 0,30         | 0,35            | 0,40        | 40   | 0,11         | 0,15            | 0,19        |
| 50   | 0,44         | 0,49            | 0,55        | 50   | 0,20         | 0,25            | 0,30        |
| 60   | 0,58         | 0,63            | 0,69        | 60   | 0,34         | 0,40            | 0,45        |
| 70   | 0,68         | 0,73            | 0,78        | 70   | 0,52         | 0,58            | 0,63        |
| 80   | 0,82         | 0,86            | 0,90        | 80   | 0,69         | 0,74            | 0,79        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> / 0h Stretch (n=127)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>KO</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> / 4h Stretch (n=224)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0,031        | 0,07            | 0,13        | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0,12         | 0,19            | 0,27        | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0,23         | 0,31            | 0,41        | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0,35         | 0,44            | 0,53        | 40   | 0            | 0               | 0           |
| 50   | 0,44         | 0,54            | 0,62        | 50   | 0            | 0,0049          | 0,019       |
| 60   | 0,60         | 0,69            | 0,77        | 60   | 0,022        | 0,045           | 0,076       |
| 70   | 0,69         | 0,78            | 0,85        | 70   | 0,10         | 0,14            | 0,20        |
| 80   | 0,79         | 0,87            | 0,92        | 80   | 0,34         | 0,41            | 0,48        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

**Tabelle 3: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 23.**

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> (n=135)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=412)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0,0074          | 0,030       | 10  | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0            | 0,0074          | 0,030       | 20  | 0            | 0               | 0           |
| 30  | 0            | 0,015           | 0,038       | 30  | 0            | 0               | 0           |
| 40  | 0,0074       | 0,030           | 0,067       | 40  | 0            | 0               | 0           |
| 50  | 0,022        | 0,052           | 0,10        | 50  | 0            | 0               | 0           |
| 60  | 0,074        | 0,12            | 0,18        | 60  | 0            | 0               | 0           |
| 70  | 0,16         | 0,23            | 0,31        | 70  | 0,0024       | 0,0097          | 0,022       |
| 80  | 0,4          | 0,49            | 0,58        | 80  | 0,11         | 0,14            | 0,18        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b>Pxn<sup>KD</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> (n=1133)</b> |              |                 |             | <b>Pxn<sup>KD</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=516)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0,0026       | 0,0071          | 0,013       | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0,0070       | 0,012           | 0,021       | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30  | 0,015        | 0,024           | 0,034       | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40  | 0,035        | 0,046           | 0,060       | 40   | 0            | 0               | 0           |
| 50  | 0,083        | 0,10            | 0,12        | 50   | 0            | 0               | 0           |
| 60  | 0,16         | 0,19            | 0,22        | 60   | 0            | 0               | 0           |
| 70  | 0,30         | 0,33            | 0,36        | 70   | 0,0058       | 0,014           | 0,026       |
| 80  | 0,54         | 0,57            | 0,60        | 80   | 0,12         | 0,16            | 0,19        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

| <b>Tln<sup>KD</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=594)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0            | 0               | 0           |
| 50   | 0            | 0               | 0           |
| 60   | 0,0016       | 0,0084          | 0,017       |
| 70   | 0,013        | 0,024           | 0,038       |
| 80   | 0,14         | 0,17            | 0,21        |
| 90   | 1            | 1               | 1           |

**Tabelle 4: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 24.**

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=214)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=243)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0            | 0,0071          | 0,029       | 10   | 0            | 0,0037          | 0,015       |
| 20   | 0,0034       | 0,018           | 0,043       | 20   | 0            | 0,012           | 0,030       |
| 30   | 0,0069       | 0,025           | 0,050       | 30   | 0            | 0,012           | 0,030       |
| 40   | 0,017        | 0,040           | 0,071       | 40   | 0,0079       | 0,024           | 0,047       |
| 50   | 0,042        | 0,076           | 0,12        | 50   | 0,020        | 0,045           | 0,075       |
| 60   | 0,079        | 0,12            | 0,17        | 60   | 0,043        | 0,075           | 0,12        |
| 70   | 0,15         | 0,20            | 0,26        | 70   | 0,10         | 0,15            | 0,20        |
| 80   | 0,33         | 0,41            | 0,48        | 80   | 0,28         | 0,34            | 0,41        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=201)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=178)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0            | 0               | 0           | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0            | 0               | 0           | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0            | 0               | 0           | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0            | 0               | 0           | 40   | 0            | 0,0045          | 0,019       |
| 50   | 0            | 0,018           | 0,045       | 50   | 0            | 0,090           | 0,028       |
| 60   | 0,029        | 0,063           | 0,11        | 60   | 0            | 0,090           | 0,028       |
| 70   | 0,081        | 0,13            | 0,19        | 70   | 0            | 0,016           | 0,041       |
| 80   | 0,29         | 0,36            | 0,44        | 80   | 0,095        | 0,15            | 0,21        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

**Tabelle 5: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 25.**

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=229)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>KO</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=162)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0,011        | 0,029           | 0,055       | 10   | 0,016        | 0,042           | 0,077       |
| 20   | 0,021        | 0,046           | 0,077       | 20   | 0,05         | 0,090           | 0,14        |
| 30   | 0,072        | 0,11            | 0,16        | 30   | 0,073        | 0,12            | 0,18        |
| 40   | 0,14         | 0,20            | 0,25        | 40   | 0,098        | 0,15            | 0,21        |
| 50   | 0,23         | 0,29            | 0,36        | 50   | 0,14         | 0,21            | 0,27        |
| 60   | 0,33         | 0,40            | 0,47        | 60   | 0,27         | 0,34            | 0,42        |
| 70   | 0,51         | 0,58            | 0,65        | 70   | 0,41         | 0,49            | 0,57        |
| 80   | 0,72         | 0,78            | 0,83        | 80   | 0,59         | 0,67            | 0,75        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=225)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>KO</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=185)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0            | 0,014           | 0,037       | 10   | 0            | 0,0090          | 0,028       |
| 20   | 0,014        | 0,041           | 0,079       | 20   | 0            | 0,0090          | 0,028       |
| 30   | 0,041        | 0,081           | 0,13        | 30   | 0            | 0,014           | 0,032       |
| 40   | 0,069        | 0,12            | 0,17        | 40   | 0,0045       | 0,023           | 0,046       |
| 50   | 0,14         | 0,19            | 0,26        | 50   | 0,0090       | 0,027           | 0,050       |
| 60   | 0,25         | 0,32            | 0,40        | 60   | 0,031        | 0,059           | 0,091       |
| 70   | 0,39         | 0,47            | 0,54        | 70   | 0,15         | 0,20            | 0,27        |
| 80   | 0,63         | 0,70            | 0,77        | 80   | 0,40         | 0,48            | 0,55        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

**Tabelle 6: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 26.**

| <b>ECad<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=400)</b> |                 |                    |                | <b>ECad<sup>Ctrl</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=409)</b> |                 |                    |                |
|--|-----------------|--------------------|----------------|--|-----------------|--------------------|----------------|
| Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 | Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
| 10   | 0               | 0,0075             | 0,018          | 10   | 0               | 0                  | 0              |
| 20   | 0,0025          | 0,013              | 0,025          | 20   | 0               | 0,0024             | 0,0098         |
| 30   | 0,01            | 0,023              | 0,04           | 30   | 0               | 0,0024             | 0,0098         |
| 40   | 0,012           | 0,028              | 0,045          | 40   | 0,0024          | 0,0098             | 0,023          |
| 50   | 0,025           | 0,043              | 0,063          | 50   | 0,0073          | 0,020              | 0,035          |
| 60   | 0,057           | 0,085              | 0,12           | 60   | 0,031           | 0,051              | 0,074          |
| 70   | 0,10            | 0,14               | 0,18           | 70   | 0,088           | 0,12               | 0,16           |
| 80   | 0,27            | 0,32               | 0,37           | 80   | 0,23            | 0,28               | 0,33           |
| 90   | 1               | 1                  | 1              | 90   | 1               | 1                  | 1              |

| <b>ECad<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=528)</b> |                 |                    |                | <b>ECad<sup>Ctrl</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=501)</b> |                 |                    |                |
|--|-----------------|--------------------|----------------|--|-----------------|--------------------|----------------|
| Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 | Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
| 10   | 0               | 0,0038             | 0,012          | 10   | 0               | 0                  | 0              |
| 20   | 0               | 0,0038             | 0,012          | 20   | 0               | 0                  | 0              |
| 30   | 0               | 0,0057             | 0,014          | 30   | 0               | 0                  | 0              |
| 40   | 0               | 0,0057             | 0,014          | 40   | 0               | 0                  | 0              |
| 50   | 0,0094          | 0,019              | 0,033          | 50   | 0               | 0                  | 0              |
| 60   | 0,028           | 0,045              | 0,065          | 60   | 0               | 0                  | 0              |
| 70   | 0,10            | 0,13               | 0,17           | 70   | 0,0079          | 0,020              | 0,032          |
| 80   | 0,32            | 0,36               | 0,41           | 80   | 0,13            | 0,17               | 0,21           |
| 90   | 1               | 1                  | 1              | 90   | 1               | 1                  | 1              |



**Tabelle 7: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 27.**

| <b>ECad<sup>KO</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=201)</b> |              |                 |             | <b>ECad<sup>KO</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=217)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0            | 0               | 0           | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0            | 0,0068          | 0,028       | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0            | 0,017           | 0,042       | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0,0035       | 0,021           | 0,045       | 40   | 0            | 0,0032          | 0,013       |
| 50   | 0,026        | 0,054           | 0,092       | 50   | 0            | 0,015           | 0,040       |
| 60   | 0,053        | 0,091           | 0,14        | 60   | 0,024        | 0,053           | 0,088       |
| 70   | 0,11         | 0,15            | 0,21        | 70   | 0,091        | 0,14            | 0,19        |
| 80   | 0,29         | 0,35            | 0,43        | 80   | 0,28         | 0,35            | 0,43        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

| <b>ECad<sup>KO</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=212)</b> |              |                 |             | <b>ECad<sup>KO</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=154)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0            | 0               | 0           | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0            | 0               | 0           | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0            | 0               | 0           | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0            | 0               | 0           | 40   | 0            | 0               | 0           |
| 50   | 0            | 0,01            | 0,029       | 50   | 0            | 0               | 0           |
| 60   | 0,01         | 0,029           | 0,054       | 60   | 0            | 0               | 0           |
| 70   | 0,073        | 0,11            | 0,16        | 70   | 0            | 0               | 0           |
| 80   | 0,27         | 0,34            | 0,41        | 80   | 0,16         | 0,23            | 0,31        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

**Tabelle 8: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 31.**

| <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=277)</b> |              |                 |             | <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> EZ (n=270)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0               | 0           | 10  | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0            | 0               | 0           | 20  | 0            | 0               | 0           |
| 30  | 0            | 0               | 0           | 30  | 0            | 0               | 0           |
| 40  | 0            | 0               | 0           | 40  | 0            | 0               | 0           |
| 50  | 0            | 0,0072          | 0,019       | 50  | 0            | 0,0035          | 0,015       |
| 60  | 0,0036       | 0,018           | 0,037       | 60  | 0,0036       | 0,018           | 0,036       |
| 70  | 0,036        | 0,062           | 0,93        | 70  | 0,036        | 0,062           | 0,10        |
| 80  | 0,22         | 0,27            | 0,33        | 80  | 0,18         | 0,23            | 0,29        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=432)</b> |              |                 |             | <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> ZS (n=421)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0               | 0           | 10  | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0            | 0               | 0           | 20  | 0            | 0               | 0           |
| 30  | 0            | 0               | 0           | 30  | 0            | 0               | 0           |
| 40  | 0            | 0               | 0           | 40  | 0            | 0               | 0           |
| 50  | 0            | 0,0040          | 0,017       | 50  | 0            | 0,0023          | 0,0091      |
| 60  | 0,0046       | 0,014           | 0,028       | 60  | 0            | 0,0046          | 0,012       |
| 70  | 0,055        | 0,081           | 0,11        | 70  | 0,028        | 0,047           | 0,070       |
| 80  | 0,22         | 0,27            | 0,32        | 80  | 0,21         | 0,26            | 0,31        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

**Tabelle 9: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 32.**

| <b><math>\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}</math> 0h <math>\text{Ca}^{2+}</math> ZS (n=257)</b> |                 |                    |                | <b><math>\alpha\text{Cat}^{\text{KD}}</math> 6h <math>\text{Ca}^{2+}</math> ZS (n=244)</b> |                 |                    |                |
|--|-----------------|--------------------|----------------|--|-----------------|--------------------|----------------|
| Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 | Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
| 10   | 0               | 0                  | 0              | 10   | 0               | 0                  | 0              |
| 20   | 0               | 0                  | 0              | 20   | 0               | 0                  | 0              |
| 30   | 0               | 0                  | 0              | 30   | 0               | 0                  | 0              |
| 40   | 0               | 0                  | 0              | 40   | 0               | 0                  | 0              |
| 50   | 0               | 0,0086             | 0,027          | 50   | 0               | 0,0051             | 0,021          |
| 60   | 0,0058          | 0,023              | 0,048          | 60   | 0,0051          | 0,021              | 0,042          |
| 70   | 0,10            | 0,14               | 0,19           | 70   | 0,070           | 0,11               | 0,15           |
| 80   | 0,35            | 0,41               | 0,48           | 80   | 0,34            | 0,41               | 0,48           |
| 90   | 1               | 1                  | 1              | 90   | 1               | 1                  | 1              |

**Tabelle 10: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 33.**

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> (n=250)</b> |                 |                    |                | <b>Vinc<sup>KO</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=250)</b> |                 |                    |                |
|---|-----------------|--------------------|----------------|---|-----------------|--------------------|----------------|
| Klasse  | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 | Klasse  | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
| 10  | 0,012           | 0,028              | 0,052          | 10  | 0               | 0                  | 0              |
| 20  | 0,032           | 0,06               | 0,092          | 20  | 0               | 0                  | 0              |
| 30  | 0,068           | 0,1                | 0,14           | 30  | 0               | 0,008              | 0,024          |
| 40  | 0,12            | 0,16               | 0,22           | 40  | 0               | 0,012              | 0,028          |
| 50  | 0,21            | 0,27               | 0,33           | 50  | 0,02            | 0,044              | 0,072          |
| 60  | 0,35            | 0,42               | 0,48           | 60  | 0,052           | 0,084              | 0,12           |
| 70  | 0,52            | 0,59               | 0,65           | 70  | 0,13            | 0,18               | 0,23           |
| 80  | 0,69            | 0,75               | 0,81           | 80  | 0,4             | 0,46               | 0,53           |
| 90  | 1               | 1                  | 1              | 90  | 1               | 1                  | 1              |

| <b>Vinc<sup>KO</sup>αCat<sup>KD</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> (n=250)</b> |                 |                    |                | <b>Vinc<sup>KO</sup>αCat<sup>KD</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=250)</b> |                 |                    |                |
|--|-----------------|--------------------|----------------|--|-----------------|--------------------|----------------|
| Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 | Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
| 10   | 0,008           | 0,02               | 0,04           | 10   | 0               | 0,004              | 0,016          |
| 20   | 0,028           | 0,056              | 0,084          | 20   | 0               | 0,008              | 0,02           |
| 30   | 0,064           | 0,1                | 0,14           | 30   | 0               | 0,012              | 0,028          |
| 40   | 0,12            | 0,17               | 0,22           | 40   | 0,024           | 0,044              | 0,072          |
| 50   | 0,20            | 0,26               | 0,32           | 50   | 0,068           | 0,10               | 0,14           |
| 60   | 0,33            | 0,40               | 0,46           | 60   | 0,14            | 0,19               | 0,24           |
| 70   | 0,52            | 0,58               | 0,65           | 70   | 0,29            | 0,36               | 0,42           |
| 80   | 0,72            | 0,78               | 0,83           | 80   | 0,53            | 0,60               | 0,66           |
| 90   | 1               | 1                  | 1              | 90   | 1               | 1                  | 1              |

**Tabelle 11: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 34.**

| <b>ECad<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> (n=416)</b> |              |                 |             | <b>ECad<sup>Ctrl</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=305)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0,0026          | 0,011       | 10  | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0            | 0,0026          | 0,011       | 20  | 0            | 0               | 0           |
| 30  | 0,0026       | 0,012           | 0,026       | 30  | 0            | 0               | 0           |
| 40  | 0,0048       | 0,015           | 0,030       | 40  | 0            | 0               | 0           |
| 50  | 0,018        | 0,033           | 0,053       | 50  | 0            | 0               | 0           |
| 60  | 0,070        | 0,098           | 0,13        | 60  | 0            | 0,002           | 0,011       |
| 70  | 0,20         | 0,24            | 0,29        | 70  | 0,019        | 0,037           | 0,060       |
| 80  | 0,45         | 0,51            | 0,56        | 80  | 0,18         | 0,23            | 0,28        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b><math>\alpha</math>Cat<sup>KD</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> (n=325)</b> |              |                 |             | <b><math>\alpha</math>Cat<sup>KD</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=451)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0               | 0           | 10  | 0            | 0,0049          | 0,015       |
| 20  | 0            | 0               | 0           | 20  | 0,0024       | 0,011           | 0,023       |
| 30  | 0            | 0,0048          | 0,013       | 30  | 0,0024       | 0,011           | 0,023       |
| 40  | 0            | 0,0048          | 0,013       | 40  | 0,0061       | 0,016           | 0,030       |
| 50  | 0,010        | 0,030           | 0,054       | 50  | 0,0089       | 0,020           | 0,035       |
| 60  | 0,045        | 0,074           | 0,11        | 60  | 0,025        | 0,043           | 0,064       |
| 70  | 0,13         | 0,18            | 0,23        | 70  | 0,086        | 0,11            | 0,15        |
| 80  | 0,38         | 0,44            | 0,50        | 80  | 0,36         | 0,41            | 0,46        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b><math>\Delta</math>VBD 0h Ca<sup>2+</sup> (n=372)</b> |              |                 |             | <b><math>\Delta</math>VBD 6h Ca<sup>2+</sup> (n=763)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0            | 0               | 0           | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0            | 0,0033          | 0,014       | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0            | 0,0056          | 0,016       | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0,0022       | 0,011           | 0,025       | 40   | 0            | 0,0036          | 0,0086      |
| 50   | 0,015        | 0,032           | 0,055       | 50   | 0,0027       | 0,0080          | 0,16        |
| 60   | 0,052        | 0,079           | 0,11        | 60   | 0,011        | 0,021           | 0,033       |
| 70   | 0,17         | 0,22            | 0,26        | 70   | 0,058        | 0,076           | 0,96        |
| 80   | 0,41         | 0,47            | 0,52        | 80   | 0,27         | 0,30            | 0,34        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

**h $\alpha$ Cat<sup>KD</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> (n=325)**

| Klasse | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
|--------|-----------------|--------------------|----------------|
| 10     | 0               | 0                  | 0              |
| 20     | 0               | 0                  | 0              |
| 30     | 0               | 0                  | 0              |
| 40     | 0               | 0,0090             | 0,022          |
| 50     | 0,024           | 0,045              | 0,070          |
| 60     | 0,044           | 0,069              | 0,10           |
| 70     | 0,15            | 0,19               | 0,24           |
| 80     | 0,39            | 0,45               | 0,51           |
| 90     | 1               | 1                  | 1              |

**h $\alpha$ Cat<sup>KD</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=662)**

| Klasse | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
|--------|-----------------|--------------------|----------------|
| 10     | 0               | 0                  | 0              |
| 20     | 0               | 0                  | 0              |
| 30     | 0               | 0                  | 0              |
| 40     | 0               | 0                  | 0              |
| 50     | 0               | 0,0049             | 0,014          |
| 60     | 0,0019          | 0,0074             | 0,017          |
| 70     | 0,026           | 0,041              | 0,059          |
| 80     | 0,23            | 0,27               | 0,31           |
| 90     | 1               | 1                  | 1              |

**Tabelle 12: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abb. 35-39.**

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 100 mHz 4h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=752)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 100 mHz 4h Stretch 6h Ca<sup>2+</sup> (n=171)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0,0093       | 0,017           | 0,028       | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0,015        | 0,027           | 0,039       | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0,029        | 0,043           | 0,059       | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0,058        | 0,076           | 0,98        | 40   | 0            | 0               | 0           |
| 50   | 0,11         | 0,14            | 0,17        | 50   | 0            | 0               | 0           |
| 60   | 0,18         | 0,21            | 0,24        | 60   | 0            | 0               | 0           |
| 70   | 0,31         | 0,34            | 0,39        | 70   | 0            | 0,012           | 0,036       |
| 80   | 0,54         | 0,58            | 0,62        | 80   | 0,14         | 0,20            | 0,27        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 100 mHz 8h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=623)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 100 mHz 8h Stretch 10h Ca<sup>2+</sup> (n=201)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0            | 0,0016          | 0,065       | 10  | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0            | 0,0016          | 0,065       | 20  | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0            | 0,0032          | 0,081       | 30  | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0,0064       | 0,014           | 0,026       | 40  | 0            | 0               | 0           |
| 50   | 0,019        | 0,032           | 0,047       | 50  | 0            | 0               | 0           |
| 60   | 0,060        | 0,082           | 0,11        | 60  | 0            | 0,0050          | 0,020       |
| 70   | 0,17         | 0,20            | 0,24        | 70  | 0            | 0,015           | 0,035       |
| 80   | 0,40         | 0,45            | 0,49        | 80  | 0,074        | 0,12            | 0,16        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 100 mHz 16h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=435)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 100 mHz 16h Stretch 18h Ca<sup>2+</sup> (n=127)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0,0023          | 0,0092      | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0            | 0,0046          | 0,012       | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30  | 0            | 0,0050          | 0,012       | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40  | 0,0045       | 0,014           | 0,028       | 40   | 0            | 0               | 0           |
| 50  | 0,016        | 0,032           | 0,051       | 50   | 0            | 0               | 0           |
| 60  | 0,057        | 0,080           | 0,11        | 60   | 0            | 0               | 0           |
| 70  | 0,15         | 0,19            | 0,23        | 70   | 0            | 0               | 0           |
| 80  | 0,37         | 0,42            | 0,47        | 80   | 0,031        | 0,071           | 0,12        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 300 mHz 4h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=646)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0,0015          | 0,0062      |
| 20     | 0            | 0,0046          | 0,011       |
| 30     | 0,0015       | 0,0062          | 0,014       |
| 40     | 0,0046       | 0,012           | 0,022       |
| 50     | 0,023        | 0,037           | 0,055       |
| 60     | 0,063        | 0,084           | 0,11        |
| 70     | 0,16         | 0,19            | 0,23        |
| 80     | 0,36         | 0,41            | 0,45        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 300 mHz 4h Stretch 6h Ca<sup>2+</sup> (n=176)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0               | 0           |
| 70     | 0            | 0               | 0           |
| 80     | 0,090        | 0,14            | 0,20        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 300 mHz 8h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=274)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0,0036          | 0,015       |
| 20     | 0            | 0,0036          | 0,015       |
| 30     | 0            | 0,0036          | 0,015       |
| 40     | 0            | 0,0036          | 0,015       |
| 50     | 0,0036       | 0,015           | 0,033       |
| 60     | 0,032        | 0,058           | 0,92        |
| 70     | 0,12         | 0,17            | 0,22        |
| 80     | 0,30         | 0,36            | 0,43        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 300 mHz 8h Stretch 10h Ca<sup>2+</sup> (n=181)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0               | 0           |
| 70     | 0            | 0               | 0           |
| 80     | 0,044        | 0,077           | 0,13        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 300 mHz 16h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=247)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0,0040          | 0,017       |
| 20     | 0            | 0,0040          | 0,017       |
| 30     | 0            | 0,0040          | 0,017       |
| 40     | 0            | 0,0081          | 0,025       |
| 50     | 0,0080       | 0,024           | 0,045       |
| 60     | 0,052        | 0,081           | 0,12        |
| 70     | 0,12         | 0,17            | 0,23        |
| 80     | 0,32         | 0,39            | 0,45        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 300 mHz 16h Stretch 18h Ca<sup>2+</sup> (n=163)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0               | 0           |
| 70     | 0            | 0               | 0           |
| 80     | 0,049        | 0,086           | 0,14        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |



**Vinc<sup>Ctrl</sup> 600 mHz 4h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=794)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0,0012       | 0,0050          | 0,012       |
| 20     | 0,0050       | 0,011           | 0,021       |
| 30     | 0,011        | 0,020           | 0,032       |
| 40     | 0,023        | 0,035           | 0,050       |
| 50     | 0,050        | 0,068           | 0,086       |
| 60     | 0,094        | 0,12            | 0,14        |
| 70     | 0,18         | 0,21            | 0,24        |
| 80     | 0,37         | 0,41            | 0,45        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 600 mHz 4h Stretch 6h Ca<sup>2+</sup> (n=264)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0               | 0           |
| 70     | 0,0037       | 0,015           | 0,035       |
| 80     | 0,087        | 0,13            | 0,17        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 600 mHz 8h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=354)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0,0028          | 0,012       |
| 30     | 0            | 0,0028          | 0,012       |
| 40     | 0            | 0,0028          | 0,012       |
| 50     | 0            | 0,0056          | 0,015       |
| 60     | 0,031        | 0,051           | 0,077       |
| 70     | 0,11         | 0,15            | 0,19        |
| 80     | 0,27         | 0,32            | 0,38        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 600 mHz 8h Stretch 10 h Ca<sup>2+</sup> (n=282)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0               | 0           |
| 70     | 0            | 0               | 0           |
| 80     | 0,042        | 0,067           | 0,10        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 600 mHz 16h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=262)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0,0038          | 0,016       |
| 40     | 0            | 0,0038          | 0,016       |
| 50     | 0,0038       | 0,015           | 0,031       |
| 60     | 0,038        | 0,065           | 0,10        |
| 70     | 0,11         | 0,16            | 0,21        |
| 80     | 0,25         | 0,32            | 0,38        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>Ctrl</sup> 600 mHz 16h Stretch 18h Ca<sup>2+</sup> (n=103)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0               | 0           |
| 70     | 0            | 0,010           | 0,039       |
| 80     | 0,0097       | 0,049           | 0,088       |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Tabelle 13: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 40.**

| <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 100 mHz 4h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup><br/>(n=681)</b> |              |                 |             | <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 100 mHz 4h Stretch 6h Ca<sup>2+</sup><br/>(n=484)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0,0029       | 0,0088          | 0,018       | 10  | 0,0020       | 0,010           | 0,021       |
| 20  | 0,0073       | 0,013           | 0,024       | 20  | 0,010        | 0,021           | 0,036       |
| 30  | 0,16         | 0,026           | 0,040       | 30  | 0,022        | 0,039           | 0,058       |
| 40  | 0,030        | 0,044           | 0,062       | 40  | 0,030        | 0,050           | 0,071       |
| 50  | 0,060        | 0,078           | 0,10        | 50  | 0,059        | 0,085           | 0,11        |
| 60  | 0,10         | 0,13            | 0,16        | 60  | 0,11         | 0,14            | 0,18        |
| 70  | 0,24         | 0,28            | 0,32        | 70  | 0,22         | 0,27            | 0,31        |
| 80  | 0,49         | 0,53            | 0,57        | 80  | 0,47         | 0,52            | 0,57        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 300 mHz 4h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup><br/>(n=354)</b> |              |                 |             | <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 300 mHz 4h Stretch 6h Ca<sup>2+</sup><br/>(n=470)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0,0056          | 0,017       | 10  | 0            | 0,0021          | 0,0086      |
| 20  | 0            | 0,0085          | 0,020       | 20  | 0,0021       | 0,0063          | 0,015       |
| 30  | 0,0084       | 0,020           | 0,037       | 30  | 0,0042       | 0,011           | 0,024       |
| 40  | 0,0084       | 0,023           | 0,040       | 40  | 0,012        | 0,026           | 0,043       |
| 50  | 0,014        | 0,028           | 0,049       | 50  | 0,025        | 0,040           | 0,060       |
| 60  | 0,025        | 0,045           | 0,068       | 60  | 0,046        | 0,068           | 0,10        |
| 70  | 0,11         | 0,16            | 0,20        | 70  | 0,11         | 0,14            | 0,18        |
| 80  | 0,34         | 0,40            | 0,45        | 80  | 0,31         | 0,36            | 0,41        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 600 mHz 4h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup><br/>(n=242)</b> |              |                 |             | <b>ECad<sup>KO</sup>PCad<sup>KD</sup> 600 mHz 4h Stretch 6h Ca<sup>2+</sup><br/>(n=78)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0,0083          | 0,021       | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0,0041       | 0,021           | 0,042       | 20   | 0            | 0,013           | 0,052       |
| 30  | 0,016        | 0,037           | 0,062       | 30   | 0            | 0,013           | 0,052       |
| 40  | 0,041        | 0,070           | 0,11        | 40   | 0            | 0,013           | 0,052       |
| 50  | 0,078        | 0,12            | 0,16        | 50   | 0            | 0,038           | 0,090       |
| 60  | 0,14         | 0,19            | 0,24        | 60   | 0,012        | 0,064           | 0,13        |
| 70  | 0,26         | 0,32            | 0,38        | 70   | 0,10         | 0,18            | 0,29        |
| 80  | 0,43         | 0,50            | 0,57        | 80   | 0,30         | 0,42            | 0,54        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

**Tabelle 14: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abb. 41-44.**

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 100 mHz 4h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=348)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>KO</sup> 100 mHz 4h Stretch 6h Ca<sup>2+</sup> (n=330)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0            | 0,0058          | 0,018       | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0,025        | 0,046           | 0,069       | 20   | 0            | 0,0061          | 0,019       |
| 30   | 0,057        | 0,086           | 0,12        | 30   | 0,0030       | 0,012           | 0,028       |
| 40   | 0,10         | 0,14            | 0,18        | 40   | 0,0060       | 0,021           | 0,037       |
| 50   | 0,17         | 0,22            | 0,26        | 50   | 0,18         | 0,036           | 0,058       |
| 60   | 0,32         | 0,38            | 0,43        | 60   | 0,078        | 0,11            | 0,15        |
| 70   | 0,47         | 0,53            | 0,59        | 70   | 0,23         | 0,28            | 0,33        |
| 80   | 0,68         | 0,73            | 0,78        | 80   | 0,47         | 0,52            | 0,58        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 100 mHz 8h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=546)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>KO</sup> 100 mHz 8h Stretch 10h Ca<sup>2+</sup> (n=327)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10   | 0,0045       | 0,012           | 0,022       | 10  | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0,0090       | 0,018           | 0,029       | 20  | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0,027        | 0,041           | 0,058       | 30  | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0,053        | 0,073           | 0,10        | 40  | 0            | 0               | 0           |
| 50   | 0,10         | 0,13            | 0,16        | 50  | 0            | 0,0056          | 0,017       |
| 60   | 0,20         | 0,24            | 0,28        | 60  | 0            | 0,0082          | 0,020       |
| 70   | 0,38         | 0,42            | 0,46        | 70  | 0,046        | 0,072           | 0,10        |
| 80   | 0,59         | 0,64            | 0,68        | 80  | 0,31         | 0,37            | 0,42        |
| 90   | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 100 mHz 16h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=435)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>KO</sup> 100 mHz 16h Stretch 18h Ca<sup>2+</sup> (n=195)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0,0037          | 0,0092      | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0,0091       | 0,018           | 0,032       | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30  | 0,025        | 0,040           | 0,061       | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40  | 0,049        | 0,070           | 0,94        | 40   | 0            | 0               | 0           |
| 50  | 0,098        | 0,13            | 0,16        | 50   | 0            | 0               | 0           |
| 60  | 0,19         | 0,23            | 0,27        | 60   | 0,0030       | 0,012           | 0,028       |
| 70  | 0,36         | 0,41            | 0,45        | 70   | 0,067        | 0,098           | 0,14        |
| 80  | 0,59         | 0,64            | 0,68        | 80   | 0,27         | 0,33            | 0,38        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 300 mHz 4h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=523)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0,017        | 0,033           | 0,050       |
| 20     | 0,040        | 0,059           | 0,081       |
| 30     | 0,076        | 0,10            | 0,13        |
| 40     | 0,11         | 0,14            | 0,18        |
| 50     | 0,20         | 0,25            | 0,29        |
| 60     | 0,34         | 0,38            | 0,43        |
| 70     | 0,50         | 0,55            | 0,60        |
| 80     | 0,69         | 0,73            | 0,78        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 300 mHz 4h Stretch 6h Ca<sup>2+</sup> (n=289)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0,0034          | 0,014       |
| 20     | 0            | 0,0034          | 0,014       |
| 30     | 0            | 0,0034          | 0,014       |
| 40     | 0            | 0,0070          | 0,018       |
| 50     | 0,0034       | 0,014           | 0,032       |
| 60     | 0,031        | 0,055           | 0,087       |
| 70     | 0,11         | 0,16            | 0,21        |
| 80     | 0,38         | 0,44            | 0,50        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 300 mHz 8h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=306)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0,0033          | 0,014       |
| 30     | 0            | 0,010           | 0,023       |
| 40     | 0,0032       | 0,013           | 0,030       |
| 50     | 0,016        | 0,036           | 0,59        |
| 60     | 0,088        | 0,12            | 0,17        |
| 70     | 0,22         | 0,27            | 0,33        |
| 80     | 0,45         | 0,51            | 0,57        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 300 mHz 8h Stretch 10h Ca<sup>2+</sup> (n=261)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0               | 0           |
| 70     | 0,0038       | 0,015           | 0,035       |
| 80     | 0,099        | 0,14            | 0,19        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 300 mHz 16h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=271)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0,0037          | 0,015       |
| 20     | 0            | 0,0037          | 0,015       |
| 30     | 0            | 0,0074          | 0,023       |
| 40     | 0,0036       | 0,018           | 0,037       |
| 50     | 0,022        | 0,044           | 0,074       |
| 60     | 0,10         | 0,14            | 0,19        |
| 70     | 0,22         | 0,28            | 0,34        |
| 80     | 0,43         | 0,49            | 0,56        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 300 mHz 16h Stretch 18h Ca<sup>2+</sup> (n=213)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0,0050          | 0,019       |
| 70     | 0,0093       | 0,028           | 0,052       |
| 80     | 0,098        | 0,14            | 0,20        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 600 mHz 4h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=387)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0,012        | 0,026           | 0,044       |
| 20     | 0,028        | 0,047           | 0,070       |
| 30     | 0,069        | 0,098           | 0,13        |
| 40     | 0,11         | 0,15            | 0,19        |
| 50     | 0,17         | 0,21            | 0,26        |
| 60     | 0,28         | 0,34            | 0,39        |
| 70     | 0,40         | 0,46            | 0,51        |
| 80     | 0,59         | 0,65            | 0,70        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 600 mHz 4h Stretch 6h Ca<sup>2+</sup> (n=307)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0,0032       | 0,013           | 0,030       |
| 70     | 0,042        | 0,068           | 0,098       |
| 80     | 0,21         | 0,26            | 0,31        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 600 mHz 8h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=262)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0,0038          | 0,016       |
| 20     | 0            | 0,0076          | 0,023       |
| 30     | 0            | 0,011           | 0,027       |
| 40     | 0,0038       | 0,019           | 0,039       |
| 50     | 0,015        | 0,031           | 0,058       |
| 60     | 0,06         | 0,095           | 0,14        |
| 70     | 0,15         | 0,20            | 0,26        |
| 80     | 0,32         | 0,39            | 0,46        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 600 mHz 8h Stretch 10 h Ca<sup>2+</sup> (n=411)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0,0024          | 0,010       |
| 70     | 0,012        | 0,024           | 0,042       |
| 80     | 0,13         | 0,17            | 0,21        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 600 mHz 16h Stretch 0h Ca<sup>2+</sup> (n=289)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0,0035          | 0,014       |
| 30     | 0            | 0,0070          | 0,021       |
| 40     | 0,010        | 0,024           | 0,049       |
| 50     | 0,34         | 0,059           | 0,090       |
| 60     | 0,086        | 0,12            | 0,17        |
| 70     | 0,18         | 0,23            | 0,29        |
| 80     | 0,36         | 0,43            | 0,49        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Vinc<sup>KO</sup> 600 mHz 16h Stretch 18h Ca<sup>2+</sup> (n=298)**

| Klasse | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
|--------|--------------|-----------------|-------------|
| 10     | 0            | 0               | 0           |
| 20     | 0            | 0               | 0           |
| 30     | 0            | 0               | 0           |
| 40     | 0            | 0               | 0           |
| 50     | 0            | 0               | 0           |
| 60     | 0            | 0               | 0           |
| 70     | 0,013        | 0,030           | 0,054       |
| 80     | 0,10         | 0,14            | 0,19        |
| 90     | 1            | 1               | 1           |

**Tabelle 15: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 45.**

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> (n=646)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 4h Ca<sup>2+</sup> (n=800)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0,0015          | 0,0062      | 10  | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0            | 0,0046          | 0,011       | 20  | 0            | 0               | 0           |
| 30  | 0,0015       | 0,0062          | 0,014       | 30  | 0            | 0               | 0           |
| 40  | 0,0046       | 0,012           | 0,022       | 40  | 0            | 0               | 0           |
| 50  | 0,023        | 0,037           | 0,053       | 50  | 0            | 0               | 0           |
| 60  | 0,063        | 0,084           | 0,11        | 60  | 0            | 0,0025          | 0,0074      |
| 70  | 0,16         | 0,19            | 0,23        | 70  | 0,016        | 0,028           | 0,04        |
| 80  | 0,36         | 0,41            | 0,45        | 80  | 0,17         | 0,21            | 0,24        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=290)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 18h Ca<sup>2+</sup> (n=623)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0            | 0               | 0           | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 20  | 0            | 0               | 0           | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 30  | 0            | 0               | 0           | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 40  | 0            | 0               | 0           | 40   | 0            | 0               | 0           |
| 50  | 0            | 0               | 0           | 50   | 0            | 0,0016          | 0,0065      |
| 60  | 0            | 0               | 0           | 60   | 0            | 0,0016          | 0,0065      |
| 70  | 0            | 0,0070          | 0,021       | 70   | 0,0016       | 0,0080          | 0,017       |
| 80  | 0,11         | 0,15            | 0,19        | 80   | 0,078        | 0,10            | 0,13        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90   | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> (n=523)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>KO</sup> 4h Ca<sup>2+</sup> (n=572)</b> |              |                 |             |
|---|--------------|-----------------|-------------|---|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse  | unteres CI95 | Kum. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 10  | 0,019        | 0,033           | 0,048       | 10  | 0,0017       | 0,0070          | 0,016       |
| 20  | 0,040        | 0,059           | 0,083       | 20  | 0,0034       | 0,010           | 0,021       |
| 30  | 0,078        | 0,10            | 0,14        | 30  | 0,010        | 0,021           | 0,035       |
| 40  | 0,11         | 0,14            | 0,18        | 40  | 0,017        | 0,030           | 0,046       |
| 50  | 0,20         | 0,25            | 0,29        | 50  | 0,059        | 0,080           | 0,11        |
| 60  | 0,34         | 0,38            | 0,43        | 60  | 0,14         | 0,18            | 0,21        |
| 70  | 0,50         | 0,55            | 0,60        | 70  | 0,31         | 0,35            | 0,40        |
| 80  | 0,69         | 0,73            | 0,78        | 80  | 0,53         | 0,57            | 0,62        |
| 90  | 1            | 1               | 1           | 90  | 1            | 1               | 1           |

| <b>Vinc<sup>KO</sup> 6h Ca<sup>2+</sup> (n=289)</b> |                 |                    |                | <b>Vinc<sup>KO</sup> 18h Ca<sup>2+</sup> (n=837)</b> |                 |                    |                |
|---|-----------------|--------------------|----------------|--|-----------------|--------------------|----------------|
| Klasse  | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 | Klasse   | unteres<br>CI95 | Kum.<br>Häufigkeit | oberes<br>CI95 |
| 10  | 0               | 0,0035             | 0,014          | 10   | 0               | 0,0024             | 0,0072         |
| 20  | 0               | 0,0035             | 0,014          | 20   | 0,0023          | 0,0060             | 0,014          |
| 30  | 0               | 0,0035             | 0,014          | 30   | 0,0071          | 0,014              | 0,023          |
| 40  | 0               | 0,0070             | 0,018          | 40   | 0,013           | 0,023              | 0,034          |
| 50  | 0,0034          | 0,014              | 0,032          | 50   | 0,032           | 0,045              | 0,061          |
| 60  | 0,031           | 0,055              | 0,084          | 60   | 0,10            | 0,12               | 0,15           |
| 70  | 0,11            | 0,16               | 0,21           | 70   | 0,21            | 0,24               | 0,28           |
| 80  | 0,38            | 0,44               | 0,50           | 80   | 0,44            | 0,48               | 0,51           |
| 90  | 1               | 1                  | 1              | 90   | 1               | 1                  | 1              |

**Tabelle 15: 95% Konfidenzintervalle für kumulierte Häufigkeiten in Abbildung 46**

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> OR (n=759)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> OR (n=400)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Rel. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Rel. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 5  | 0,0013       | 0,0066          | 0,014       | 5  | 0            | 0               | 0           |
| 10   | 0,0013       | 0,0066          | 0,014       | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 15   | 0,0013       | 0,0053          | 0,012       | 15   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0            | 0,0026          | 0,0066      | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 25   | 0,0039       | 0,0092          | 0,018       | 25   | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0,014        | 0,024           | 0,036       | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 35   | 0,0092       | 0,017           | 0,028       | 35   | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0,010        | 0,020           | 0,031       | 40   | 0            | 0               | 0           |
| 45   | 0,0092       | 0,017           | 0,028       | 45   | 0            | 0               | 0           |
| 50   | 0,015        | 0,026           | 0,039       | 50   | 0            | 0               | 0           |
| 55   | 0,025        | 0,037           | 0,051       | 55   | 0            | 0,005           | 0,015       |
| 60   | 0,028        | 0,042           | 0,057       | 60   | 0            | 0,0075          | 0,018       |
| 65   | 0,054        | 0,071           | 0,091       | 65   | 0,03         | 0,048           | 0,07        |
| 70   | 0,096        | 0,12            | 0,15        | 70   | 0,085        | 0,12            | 0,15        |
| 75   | 0,10         | 0,13            | 0,16        | 75   | 0,27         | 0,32            | 0,36        |
| 80   | 0,10         | 0,13            | 0,15        | 80   | 0,23         | 0,28            | 0,33        |
| 85   | 0,11         | 0,14            | 0,17        | 85   | 0,12         | 0,16            | 0,2         |
| 90   | 0,17         | 0,21            | 0,24        | 90   | 0,27         | 0,07            | 0,098       |

| <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> MR (n=247)</b> |              |                 |             | <b>Vinc<sup>Ctrl</sup> 0h Ca<sup>2+</sup> MR (n=163)</b> |              |                 |             |
|--|--------------|-----------------|-------------|--|--------------|-----------------|-------------|
| Klasse   | unteres CI95 | Rel. Häufigkeit | oberes CI95 | Klasse   | unteres CI95 | Rel. Häufigkeit | oberes CI95 |
| 5  | 0            | 0,0040          | 0,017       | 5  | 0            | 0               | 0           |
| 10   | 0            | 0               | 0           | 10   | 0            | 0               | 0           |
| 15   | 0            | 0               | 0           | 15   | 0            | 0               | 0           |
| 20   | 0            | 0               | 0           | 20   | 0            | 0               | 0           |
| 25   | 0            | 0               | 0           | 25   | 0            | 0               | 0           |
| 30   | 0            | 0               | 0           | 30   | 0            | 0               | 0           |
| 35   | 0            | 0               | 0           | 35   | 0            | 0               | 0           |
| 40   | 0            | 0,0040          | 0,017       | 40   | 0            | 0               | 0           |
| 45   | 0            | 0,0081          | 0,025       | 45   | 0            | 0               | 0           |
| 50   | 0            | 0,0081          | 0,021       | 50   | 0            | 0               | 0           |
| 55   | 0            | 0,0040          | 0,017       | 55   | 0            | 0               | 0           |
| 60   | 0,028        | 0,053           | 0,081       | 60   | 0            | 0               | 0           |
| 65   | 0,020        | 0,040           | 0,069       | 65   | 0            | 0               | 0           |
| 70   | 0,028        | 0,052           | 0,081       | 70   | 0            | 0               | 0           |
| 75   | 0,024        | 0,049           | 0,077       | 75   | 0            | 0,0081          | 0,021       |
| 80   | 0,11         | 0,16            | 0,22        | 80   | 0,024        | 0,049           | 0,077       |
| 85   | 0,14         | 0,20            | 0,26        | 85   | 0,12         | 0,17            | 0,22        |
| 90   | 0,35         | 0,42            | 0,48        | 90   | 0,37         | 0,44            | 0,50        |



## **Danksagung**

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Rudolf Merkel dafür danken, dass ich an seinem Institut meine Doktorarbeit anfertigen durfte. Vielen Dank für Ihre Unterstützung, Ihr Vertrauen und die vielen hilfreichen Diskussionen und Ratschläge.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater PD Dr. Bernd Hoffmann. Ich danke Dir für die großartige Betreuung meiner Arbeit, die Möglichkeiten, die Du mir gegeben hast und wie sehr Du mich gefördert hast. Danke, dass deine Türe stets offen ist und für die wissenschaftlichen Gespräche und persönlichen Ratschläge. Sie haben mir stets geholfen mich weiterzuentwickeln und ich weiß sie sehr zu schätzen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Jörg Höhfeld für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Ich möchte mich ebenfalls ganz herzlich bei meinen Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe Niessen in Köln für die gute Zusammenarbeit und den hilfreichen Austausch bedanken.

Dr. Lena Jungen möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken, die wie von selbst funktioniert hat. Danke für die großartige gemeinsame Zeit, ich konnte mich immer auf dich verlassen. Egal ob als Kollegin oder Freundin, du hast immer die richtigen Worte für mich.

Ganz besonders möchte ich auch Georg Dreissen und Dr. Ronald Springer danken. Seit so vielen Jahren steht eure Türe stets für mich offen, egal ob ich eine Auswertung, eine zweite und dritte Meinung zu Daten oder einen persönlichen Rat brauche. Ronald, ich kann dir nicht genug danken für die ganze Zeit und Mühe, die du dir wie selbstverständlich für mich gegeben hast. Danke für deine wertvollen Ratschläge und die Hilfe, sowohl für mich persönlich, als auch für diese Arbeit.

Ein großer Dank geht ebenfalls an Aljona Gaiko-Shcherbak, Lisann Esser, Dr. Tobias Braun, Britta Steimel und Simone Stiefel, denn ihr seid mehr als nur Kollegen für mich. Danke für die schöne Zeit, eure Hilfe in so vielen Situationen und den riesigen Spaß, den wir gemeinsam hatten.

Ich möchte allen Kolleginnen und Kollegen im ICS-7 für die tolle Zeit in Jülich danken, jeder hat einen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die gute Zusammenarbeit und die tolle Atmosphäre.

Mein größter Dank gilt meinen wundervollen Eltern, meiner Schwester, meiner Oma und natürlich Finn. Ihr habt mich jeden einzelnen Tag unterstützt, motiviert, aufgefangen und dafür gesorgt, dass ich an mich glaube. Finn, du erträgst mich jeden Tag, egal wie gut oder schlecht er war und sorgst unermüdlich dafür, dass ich glücklich bin. Ich danke dir so sehr für deine Unterstützung und die Kraft, die du mir gibst. Ich verdanke euch wer ich bin und was ich erreicht habe und dafür bin ich euch unendlich dankbar. Ich liebe euch!