

Struktur-Funktion-Wechselwirkungen in lateral eingeschränkten Zellen

Von der Fakultät für Physik und Geowissenschaften
der Universität Leipzig
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
Dr. rer. nat.,

vorgelegt

von Dipl.-Phys. Andreas Müller
geboren am 5. 4. 1985 in Leipzig

Gutachter: Prof. Dr. Tilo Pompe (Universität Leipzig)
Prof. Dr. Ralf Kemkemer (Hochschule Reutlingen)

Tag der Verleihung: 19. Oktober 2020

Bibliographische Beschreibung

Müller, Andreas

Struktur-Funktion-Wechselwirkungen in lateral eingeschränkten Zellen

Universität Leipzig, Dissertation

157 Seiten, 246 Literaturangaben, 44 Abbildungen, 2 Tabellen, 1 Anhang

Referat

Die Zellform ist wichtig für die Ausübung der Zellfunktion und spielt darüberhinaus eine essenzielle Rolle bei der Entwicklung eines Zellhaufens zu einem mehrzelligen Organismus. Dabei wird die Zellform neben biochemischen auch von biophysikalischen Prozessen beeinflusst: Zellkräfte sind ebenso beteiligt wie räumliche Einschränkung. Der Umfang der Wechselwirkung zwischen Umgebung, Zellform und Zellfunktion ist jedoch im Detail oft unverstanden. Ziel dieser Arbeit war daher, eine umfassende Charakterisierung von Zellen in räumlicher Einschränkung durchzuführen, um Aussagen zur Beeinflussung von Zellmorphologie und der Kraftentwicklung zu gewinnen.

In dieser Arbeit wurde die Reaktion humaner Primärzellen (HUVECs) auf laterale Einschränkung untersucht. Die Zellen wurden dafür sowohl auf Glas- als auch auf Hydrogel-Substraten kultiviert, die mittels Mikrokontaktdruck von Fibronectin mit Streifenmustern im Breitenbereich von 5 μm bis 80 μm strukturiert worden waren. Die Zellen wurden nach der Phase der initialen Adhäsion (> 1 h) hinsichtlich ihrer allgemeinen Morphologie, des Erscheinungsbildes ihres Aktinskeletts und ihres Zellzugkraftverhaltens quantitativ beschrieben. Zusätzlich erfolgten Lebendzellmessungen, um die Dynamik des Aktinskeletts und der Zellzugkräfte zu charakterisieren.

Die laterale Einschränkung führte zur strukturellen und funktionellen Adaption der Zellen. Da die Zelllänge nur geringfügig von der Streifenbreite abhing, kam es durch die seitliche Einschränkung zu einer Flächenabnahme bei gleichzeitiger Erhöhung des Zellseitenverhältnisses, wovon auch der Zellkern betroffen war. Die Ausrichtung der Aktinfasern korrelierte stark mit der Zellelongation und Zellen auf schmalen Streifen zeigten ein geringer vernetztes Aktinskelett. Messungen der Aktindynamik ergaben einen einwärts gerichteten Transport von Stressfasern. Weiterhin wurde eine Abnahme der Zugkräfte mit zunehmender Einschränkung gemessen, während gleichzeitig eine Polarisierung der Zugkräfte stattfand. Das beobachtete Verhalten der struktur- und funktionsbezogenen Zellparameter konnte gut durch die laterale Einschränkung erklärt werden, sodass die vorliegende Arbeit zu einem besseren Verständnis der Zellanpassung an räumliche Einschränkung beitragen konnte.

Abstract

Proper cell shape is a precondition for the proper performance of specialized cells and changes of cell shape are paramount for the development from a cell cluster to an adult organism. Cell shape can be regulated biochemically and also biophysically, e. g., by involvement of cellular force generation and spatial confinement. However, the understanding of the interaction between exterior space, cellular form, and function is incomplete. Therefore, the aim of this thesis was to thoroughly characterize cells in spatial confinement in order to better understand how cell morphology and force generation can be linked.

During the course of this work, the adaptation of human primary cells (HUVECs) to lateral constraints was investigated. Cells were seeded on both glass and hydrogel substrates which had been micropatterned with fibronectin by microcontact printing. The structures were composed of stripes with varying width (5–80 μm). After initial adhesion had taken place (> 1 h), cell morphology, actin cytoskeleton architecture, and cell traction forces were quantified. In addition, measurements were performed on live cells in order to better understand the dynamics of the actin cytoskeleton and the cell traction forces.

Laterally confined cells showed both structural and functional changes. Because cell length was only weakly dependent on stripe width, cells in strong lateral confinement were highly elongated and had decreased spread areas, which also affected the nucleus. The orientation of actin fibers was strongly linked to cell elongation. In cells on narrow stripes, a reduced actin cytoskeleton was observed, i.e., with a lower degree of interconnectivity. Time resolved analysis revealed an inward transport of actin fibers. Furthermore, cell force generation was shown to be impaired on narrow stripes, most likely due to decreased cell spread area. At the same time, force polarization strongly increased in cells in strong lateral confinement. This study demonstrated how various cellular parameters, both linked to cell structure and function, are influenced by lateral confinement and by each other, thereby contributing to a better understanding of cell adaptation to spatial constraint.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	5
2.1	Zelladhäsion und Mechanotransduktion	5
2.1.1	Abgrenzung und Kontakt der Zelle zu ihrer Umgebung	5
2.1.2	Adhäsionskomplexe	7
2.1.3	Rolle des Aktinskeletts bei der Zelladhäsion	8
2.1.4	Rolle des Aktinskeletts bei der Mechanotransduktion	9
2.2	Der Aufbau des Aktinzytoskeletts	10
2.2.1	Entstehung von Aktinfilamenten auf molekularer Ebene	10
2.2.2	Klassifizierung verschiedener Aktin-Strukturen	12
2.2.3	Methoden zur Untersuchung des Aktinskeletts	16
2.3	Zusammenhang zwischen Zellmorphologie und Zellbiologie	18
2.3.1	Beispiele f. d. Zusammenhang v. Zellform und -funktion in vivo	19
2.3.2	Beispiele f. d. Zusammenhang von Zellform und -funktion in vitro . .	20
2.3.3	Einfluss d. Umgebungsgeometrie auf intrazelluläre Organisation . .	22
2.3.4	Zellzugkräfte	25
2.4	Biophysikalische Beschreibung der Zelladhäsion	28
2.4.1	Modellierung auf Zellebene	28
2.4.2	Modellierung intrazellulärer Strukturen	30
2.4.3	Modellierung der Zellzugkräfte	32
2.5	Zielstellung dieser Arbeit	33
3	Materialien und Methoden	35
3.1	Substratpräparation	35
3.1.1	Deckglasfunktionalisierung	35
3.1.2	Hydrogelpräparation	37
3.1.3	Oberflächenstrukturierung	39
3.2	Zellkultur	41
3.2.1	Isolierung und Lagerung von HUVECs	41
3.2.2	Passagieren von HUVECs	41
3.3	Zellfärbung	42
3.3.1	Färbung fixierter Proben	42

3.3.2	Lebendzellfärbung mit SiR-Actin	43
3.4	Mikroskopie	43
3.4.1	Fixierte Proben	43
3.4.2	Lebendzellmessung	44
3.5	Morphologieanalyse	45
3.5.1	Charakterisierung der Zellmorphologie	45
3.5.2	Charakterisierung der Zellkernmorphologie	47
3.5.3	Charakterisierung der Aktinskelettmorphologie	47
3.5.4	Charakterisierung der Aktinskelettdynamik	49
3.6	Zellzugkraftmessung	51
3.6.1	Substratpräparation	51
3.6.2	Messung	52
3.6.3	Auswertung	52
4	Ergebnisse und Diskussion	57
4.1	HUVECs als Modell für mechanosensitive Zellen	57
4.2	Einfluss der lateralen Einschränkung auf die Zellmorphologie	60
4.2.1	Zellform in Abhängigkeit der Streifenbreite	62
4.2.2	Die Zellkernmorphologie korreliert mit der Zellmorphologie	65
4.2.3	Diskussion der Zell- und Zellkernmorphologie	68
4.3	Das Aktinskelett in Abhängigkeit der Streifenbreite	71
4.3.1	Qualitative Beschreibung	71
4.3.2	Quantitative Beschreibung	72
4.3.3	Kopplung des Aktinskeletts an das Substrat	77
4.3.4	Diskussion der Aktinstruktur in lateral eingeschränkten Zellen	78
4.4	Dynamik des Aktinskeletts in Abhängigkeit der Streifenbreite	79
4.4.1	Verwendbarkeit von SiR-Actin	80
4.4.2	Diskussion der SiR-Actin-Färbung	82
4.4.3	Beschreibung der Stressfaserdynamik	83
4.4.4	Diskussion der Aktinskelettdynamik	87
4.5	Einfluss der lateralen Einschränkung auf die Zellzugkräfte	90
4.5.1	Gesamtkraft u. Dehnungsenergie in Abh. d. lateralen Einschränkung	91
4.5.2	Die Polarisierung der Zellzugkräfte steigt mit der Zellelongation	93
4.5.3	Diskussion der Zellzugkräfte in lateral eingeschränkten Zellen	94
4.5.4	Zeitaufgelöste Messungen	97
4.5.5	Diskussion der zeitaufgelösten Messungen	99
5	Zusammenfassung	101
	Literatur	105

Tabellenverzeichnis	123
Abbildungsverzeichnis	125
A Anhang	129
A.1 Weitere Abbildungen	129
A.1.1 Zellkernmorphologie	129
A.1.2 Aktinskelett	130
A.1.3 Zugkräfte	133
A.2 Makros und Skripte	134
A.2.1 Fiji/ImageJ	134
A.2.2 Python	139
A.2.3 Berechnung des Aktin-Flussfelds	142

1 Einleitung

Betrachtet man Gewebeproben unter dem Mikroskop, fällt die Vielzahl an verschiedenen Zellformen auf. Die Formenvielfalt reicht von rundlich, wie im Beispiel von Fettzellen, über länglich-gestreckt, wie bei Muskelzellen, bis hin zu stark verzweigt, wie bei Nervenzellen. Diese Anpassung der Zellgestalt an die Gewebsart hat einen tieferen Ursprung: Die Form ist ein bedeutender Faktor bei der Erfüllung der jeweiligen Funktion der Zelle.¹⁻³ Die Fettzelle muss Nährstoffe speichern und als Isolation beziehungsweise Polster dienen. Dafür genügt eine abgerundete Form, die insgesamt zu einer dichten Kugelpackung von Fettzellen führt. Die Muskelzelle muss Kontraktionen durchführen können, wofür eine gestreckte Form in Richtung der Kontraktionsachse nützlich ist. Die Nervenzelle ist über ihre Ausläufer mit anderen Zellen vernetzt und kann Signale durch den Körper übertragen. Zellform und Zellfunktion sind also untrennbar miteinander verknüpft.

Gleichzeitig ermöglichte eine immer ausgeprägtere Spezialisierung von Zelltypen die Entwicklung höheren, mehrzelligen Lebens (Metazoa). Für die Entstehung mehrzelliger Organismen ist es wichtig, dass eine Abgrenzung zwischen funktionellen Untereinheiten des Organismus existiert, um so eine Spezialisierung von Geweben zu ermöglichen. Dieser Prozess der Kompartimentierung findet während der Entwicklung vieler mehrzelliger Organismen aus einer einzigen befruchteten Eizelle hin zum adulten Lebewesen statt und ist auch durch die Entstehung verschiedener Zellformen gekennzeichnet. Dabei kommt es zu räumlich und zeitlich koordinierten morphologischen und mechanischen Veränderungen ganzer Zellverbände beziehungsweise Gewebsschichten.

Die Entwicklung funktionell spezialisierter Zellen mit initial gleichem genetischen Bauplan wirft auch im Hinblick auf die Entwicklung der Zellform interessante Fragen auf: Welches sind die zugrunde liegenden Mechanismen bei der Entstehung spezieller Zellformen? Findet die Formfindung jeder einzelnen Zelle isoliert statt oder existiert eine Koordination mit den umgebenden Zellen oder der extrazellulären Matrix? Eine pauschale Antwort auf diese Fragen gibt es nicht; trotzdem bietet das jetzige Wissen um die extrinsische und intrinsische Regulation der Zellform ein reiches Portfolio an Erklärungsansätzen. Versuche mit Zellen *in vitro* (in der Petrischale) konnten zeigen, dass auch isolierte Zellen zu bestimmten Formen neigen.⁴ Gleichzeitig ist bei der Betrachtung von Muskelgewebe offensichtlich, dass es eine Koordination zwischen benachbarten Zellen geben muss, um deren gleichmäßige Ausrichtung zu erreichen.

Die Mechanismen, die bei der Ausprägung der Zellform beteiligt sein können, sind vielfältig und reichen von biochemischen und zellbiologischen Prozessen bis hin zu phy-

sikalischen Prinzipien. Einerseits kann eine Ausbildung der Zellmorphologie durch die spezifische Genexpression geprägt sein. Die Neigung eines Zelltyps, eine bestimmte Größe einzunehmen, oder der Grad der Polarisierung, also der Ausbildung einer Asymmetrie der Form und inneren Struktur, lassen sich gut *in vitro* an einzelnen, isolierten Zellen beobachten.^{5,6} Andererseits konnte in Laborversuchen gezeigt werden, dass sich diese Charakteristika mittels mechanischer Reize, zum Beispiel der Härte der Zellumgebung oder deren Topographie modulieren lassen und sogar die Ausbildung eines spezifischen Zelltyps aus einer Stammzelle sich durch diese Umgebungsparameter einstellen lässt.^{7,8} Weiterhin konnte auch eine Beeinflussung der Funktion beziehungsweise des Differenzierungsverhaltens durch die Vorgabe des Zellumrisses über entsprechend strukturierte Zellkultursubstrate demonstriert werden.⁹⁻¹¹ Zudem ist auch eine direkte Kommunikation benachbarter Zellen über sogenannte Zell-Zell-Kontakte belegt, welche bei der koordinierten Veränderung von Zellverbänden während der Morphogenese eine Rolle spielt.¹²⁻¹⁴ Schließlich ist bekannt, dass eine Regulation der Zellfunktion und der Zellform durch biochemische Botenstoffe erfolgen kann.¹⁵⁻¹⁷ Dieser Mechanismus kann durch die Beschreibung mit Diffusions-Reaktions-Modellen eine gute Erklärung für die langreichweitige Organisation von Geweben und sogar ganzen Organismen liefern.^{1,18}

Trotz der Vielzahl an Befunden zur wechselseitigen Beeinflussung von Zelle und Zellumgebung beziehungsweise zur Kopplung zwischen Zellmechanik und Umgebungsmechanik ist die genaue Regulation der obengenannten Prozesse weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Bekannt ist, dass das Zellskelett einerseits bei der Formgebung der Zelle und andererseits bei der Erzeugung von Kräften, welche auf die Umgebung wirken, eine zentrale Rolle einnimmt. Durch die Weiterleitung mechanischer Reize und seiner Fähigkeit zur Kontraktion hilft das Zellskelett sowohl bei der Erkennung als auch der Umgestaltung der Umgebung.¹⁹⁻²¹ Da es zudem im Kontakt mit dem Zellkern steht, kann eine Stimulation der Zelle durch mechanische Reize und Geometrie auch Einfluss auf die Genexpression der Zelle nehmen.^{22,23}

Zum Thema der zellulären Anpassung an äußere mechanische Randbedingungen wurden bereits viele Experimente durchgeführt, die Beschreibungen verschiedenster Phänomene geliefert haben, vom Zelltod unter zu starker Einschränkung zur gesteuerten Differenzierung bei Vorgabe unterschiedlicher Flächen.^{9,11} Eine große Rolle bei der Vermittlung extrazellulärer Reize ins Zellinnere und der Übertragung mechanischer Reize in biochemische Signale, der sogenannten Mechanotransduktion, kommt dabei dem Aktinzytoskelett zu. Dieses kann Kräfte über lange Distanzen übermitteln und seinerseits Kräfte generieren. Folglich ist eine genaue und präzise Analyse der Reaktion des Aktinskeletts und der Zellkräfte von immenser Wichtigkeit. Im Kontext der Kraftentstehung und Morphologieanpassung von Zellen an externe Adhäsionsgeometrien sind gerade Details oft unverstanden, sodass sich verschiedene Fragestellungen definieren lassen, die in dieser Arbeit aufgegriffen werden sollen. In der Literatur findet sich eine Vielzahl von Studien, bei denen Zellen unterschiedlichen geometrischen Einschränkungen un-

terworfen werden. Dabei werden teilweise gegensätzliche Zellreaktionen, von der Differenzierung bis zur Apoptose, beobachtet. Oft werden Adhäsionsflächen vorgegeben, die den untersuchten Zellen keine Freiheitsgrade der Ausbreitung lassen, während Gewebe zur Beibehaltung ihrer Funktionalität die Fähigkeit zur inneren Umordnung besitzen. Außerdem wird der Fokus oftmals entweder auf die reine Morphologie, also beispielsweise das Erscheinungsbild des Zellskeletts, oder auf das Zellzugkraftverhalten, als einer relevanten Zellfunktion, gelegt.

Diese Arbeit verfolgte einen kombinierten Ansatz, um mehr über die Wechselwirkung von Struktur und Funktion in mechanosensitiven Zellen in Erfahrung zu bringen. Zu diesem Zweck wurden menschliche Primärzellen in seitlicher Einschränkung, die ein prinzipielles Ausweichen der Zelle gestattet, untersucht. Der Fokus lag auf der Anpassung des Aktinzytoskeletts und dessen Dynamik, da diesem eine herausragende Rolle bei der Wechselwirkung zwischen Zelle und Umgebung zukommt. Zudem wurden Zellzugkraftmessungen durchgeführt, um zusätzlich eine Korrelation zwischen der morphologischen Anpassung der Zelle und den Zellkräften, die auf die Umgebung wirken, herstellen zu können. Ziel der Dissertation war es, zu einem besseren Verständnis der Aufrechterhaltung von zellübergreifender Ordnung durch räumliche Einschränkung beizutragen.

2 Grundlagen

Im Folgenden soll auf die an der Zelladhäsion beteiligten Zellkomponenten eingegangen werden. Weiter unten wird anhand einiger Beispiele dargestellt, wie Zellform und -funktion zusammenhängen. Schließlich erfolgt eine Übersicht über Modelle, die sich mit der Beschreibung der Zellform und deren Wechselwirkung mit der Umgebung befassen.

2.1 Zelladhäsion und Mechanotransduktion

Durch das Anwachsen an einer Matrix tritt eine Zelle in mechanische Wechselwirkung mit dieser. Dadurch ist ein Austausch mechanischer Reize zwischen der Umgebung und der Zelle möglich, was eine Anpassung zellbiologischer Prozesse bewirken kann. Die an diesem Prozess, der Mechanotransduktion, beteiligten Zellkomponenten sollen hier kurz dargestellt werden.

2.1.1 Allgemeine Beschreibung der Zelladhäsion: Abgrenzung und Kontakt der Zelle zu ihrer Umgebung

Als kleinste Einheit des Lebens wird die Zelle definiert.⁵ Sie ist gegenüber ihrer Umwelt abgegrenzt. Diese Abgrenzung kann, je nach Zellart, unterschiedliche Formen annehmen: Eine Zellwand findet man bei Pflanzen, Pilzen und einigen Bakterienarten, während bei tierischen Zellen nur eine Doppellipidmembran die Grenze zwischen Innen- und Außenraum bildet. Die Zellmembran tierischer Zellen enthält weitere funktionale Unterheiten, wie zum Beispiel Rezeptoren, Ionenkanäle und Bestandteile der Glykokalix, die der Wechselwirkung mit der Umgebung dienen. Die Abgrenzung der Zelle von der Umgebung ist nicht nur passiv, sondern wird durch Zellbestandteile aktiv gestaltet. In vielen tierischen Zellen ist die Membran im Inneren von einem Aktinkortex ausgekleidet, der an der Formgebung der Zelle mitwirkt und die Membran mit weiteren intrazellulären Komponenten, wie zum Beispiel dem Zellkern und dem Zytoskelett, verknüpft. Hierbei ist als Bestandteil des Zellskeletts, neben den Mikrotubuli und Intermediärfilamenten, speziell das Aktinskelett zu beachten, welches aktiv Kräfte generieren kann und dadurch wieder auf die Abgrenzung, und damit auf die Form der Zelle, einwirkt.²⁴

Spezifische Kontakte zur Umgebung können über membranständige Rezeptoren und extrazelluläre Liganden hergestellt werden. Man unterscheidet speziell zwischen Zell-Matrix-Kontakten, die zum Beispiel über Integrine als Rezeptoren und Fibronectin oder

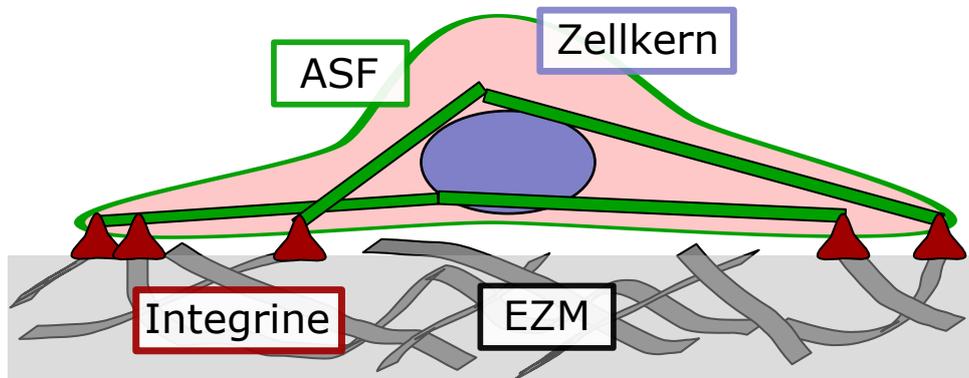


Abbildung 2.1: Schema einer adhärenzhaften Zelle. Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist über Integri-
ne mit den Aktinstressfasern (ASF) verbunden, die den Zellkern kontaktieren. Es besteht eine
Verbindung zwischen dem Extrazellulärraum und dem Zellkern, verschiedene Bereiche der Zelle
werden mit ASF verbunden.

Kollagen als Bestandteil der extrazellulären Matrix herbeigeführt werden können, und Zell-Zell-Kontakten, die über Cadherine zwischen benachbarten Zellen vermittelt werden.²⁵ Die Rezeptoren können in der Membran diffundieren und so Cluster, zum Beispiel als Grundlage für Fokale Adhäsionen, bilden. An diesen Clustern wird das Binden weiterer Proteine erleichtert, die schließlich eine Verbindung zum Zytoskelett der Zelle herstellen und Signalkaskaden in Gang setzen (siehe Abbildungen 2.1 und 2.2). Über die Fasern des Zytoskeletts können langreichweitige Verknüpfungen zwischen verschiedenen Bereichen und Organellen der Zelle erstellt werden. Beispielsweise kann das Aktinskelett auch an den Zellkern koppeln – dadurch ist eine mechanische Verbindung von der extrazellulären Matrix über die Fokalen Adhäsionen und das Zytoskelett bis hin zum Zellkern möglich.²⁶

Somit führt die Vorgabe einer extrazellulären Struktur zur Prägung der Zellform, wodurch eine komplexe Anpassung der intrazellulären Organisation bewirkt wird. Andererseits kann durch die kontraktile und expansiven Elemente des Zytoskeletts die Zellform angepasst werden. Hierdurch kann es auch zu einer Rückkopplung auf die Umgebung kommen. Diese beiden Richtungen der Mechanotransduktion, also die Umwandlung mechanischer Reize in biochemische Signale und umgekehrt, werden auch als "Outside-In"- und "Inside-Out-Signaling" bezeichnet.²⁷ Die Anpassung der Zellform an eine gegebene äußere Struktur wird auch als Kontaktführung (engl. *contact guidance*) bezeichnet und findet bereits vor der Ausbildung von Aktinstressfasern statt.²⁸ Durch Kontaktführung kann bereits die Grenzfläche zwischen einem adhäsiven und nichtadhäsiven Bereich zu einer Ausrichtung einer Zelle an der Grenzfläche führen und eine Migrationsrichtung vorgeben.²⁹ Auf Zellbestandteile, die bei der Erkennung der Umgebung eine bedeutende Rolle spielen, soll in den folgenden Abschnitten eingegangen werden.

2.1.2 Adhäsionskomplexe

Eine direkte Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix und den kraftübertragenden Elementen der Zelle, den Stressfasern, erfolgt primär über spezielle Rezeptoren, die Integrine. Diese können an bestimmte Aminosäuresequenzen der Zielproteine wie Fibronectin oder Kollagen binden. Beispielsweise kann eine hochspezifische Bindung zwischen der β -Untereinheit des $\alpha_5\beta_1$ -Integrins und dem RGD-Motiv (Arginin-Glycin-Asparagin) als Teil der Fibronectin-Aminosäuresequenz gebildet werden.³⁰ Durch die Assoziation benachbarter Integrine kommt es zu einer Clusterbildung der Rezeptoren, welche über verschiedene Adapterproteine an das Aktinzytoskelett gebunden werden. Die Anzahl der nachweislich mit den Adhäsionsstellen assoziierten Proteine nimmt stetig zu, inzwischen sind über einhundert bekannt.³¹ Weiterhin können die Adhäsionsstellen eine Reifung durchlaufen, wobei die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Adhäsionsstellen einerseits durch die Anzahl von Integrinrezeptoren und die Art und Menge an angedockten Proteinen sowie andererseits durch deren Aktivierungsgrade und die Komplexität der Proteinwechselwirkung differenziert werden können.^{32,33}

Essenziell für die Kopplung der Integrine an das Aktinzytoskelett sind die Proteine Paxilin, Talin und Fokale Adhäsionskinase (FAK), wobei bei ausgereifteren Adhäsionskomplexen, sogenannten Fokalen Adhäsionen, eine Verstärkung der Verknüpfung durch Vinkulin erreicht wird.³⁴ Es ist bekannt, dass die Affinität der Bindung zwischen dem extrazellulären Liganden Fibronectin und Integrin eine sogenannte "Catch-Bond"-Charakteristik aufweist. Das heißt, dass mechanische Belastung zu einer Konformationsänderung führt, wodurch die Bindung verstärkt wird, während unter geringerer Belastung die Bindungsstärke abnimmt.³⁵ Gleichzeitig gibt es Hinweise auf das umgekehrte Verhalten bei der Bindung zwischen Talin als Teil des Adhäsionskomplexes und dem Aktinskelett.³⁶ Die Verknüpfung des Substrats mit dem Aktinskelett ist auf diese Weise abhängig von den Lebenszeiten der Bindungen der beteiligten Proteine und deren Aktivierungsgrad, zu einer insgesamt transienten Kopplung führt. Das Aktinskelett bewegt sich relativ zu den Adhäsionsproteinen, wodurch die Bindungen zwischen Aktinfasern und Adhäsionsproteinen mechanisch belastet werden. Es kommt zu einer wiederholten, vorübergehenden Bindung des Aktinskeletts an das Substrat an den einzelnen Adhäsionsstellen. Diese Form der Kopplung wird als *Molecular Clutch* (Molekulare Kupplung) oder auch als viskose Kopplung bezeichnet, da sich diese Verknüpfung als effektive Reibung zwischen Aktinskelett und Anbindungsstellen modellieren lässt. Die entsprechende Form der Bewegung wird mitunter als *Stick-Slip*-Bewegung (Ruckgleiten) beschrieben.³⁷⁻⁴⁰

Der Auf- und Abbau der Fokalen Adhäsionen ist unter anderem von deren Spannungszustand abhängig. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Zugspannung zu einer Orientierung der an dem Aufbau beteiligten Proteine kommt und Fokale Adhäsionen oftmals elongiert in Richtung der ausgeübten Spannung sind.⁴¹ Eine Änderung der Spannungsrichtung kann zu einem Um- beziehungsweise Abbau der Fokalen Adhäsionen führen,

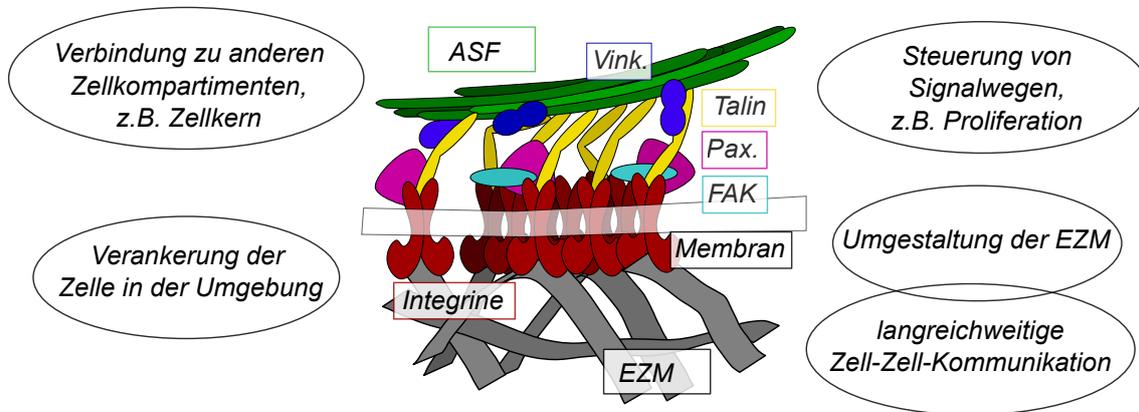


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau und Bedeutung einer Fokalen Adhäsion. Die extrazelluläre Matrix (EZM) wird über Integrine und verschiedene Adaptorproteine (Talin, Paxillin, Vinkulin) an die Aktinstressfasern (ASF) gebunden, die mit weiteren Zellkompartimenten verknüpft sind. Die Fokale Adhäsionskinase (FAK) greift in den Zellzyklus und die Proliferation der Zelle ein. Dadurch ist die Fokale Adhäsion wichtiger Überträger intra- und extrazellulärer Signale.

wenn die Ausrichtung der Fokalen Adhäsion nicht mehr mit der Spannungsrichtung übereinstimmt. Durch diesen Prozess ist die Zelle in der Lage, auf Zugbelastungen im Substrat zu reagieren.⁴²

2.1.3 Rolle des Aktinskeletts bei der Zelladhäsion

Die Relativbewegung des Aktinskeletts zu den Fokalen Adhäsionen bewirkt eine mechanische Belastung der Bindungsstellen, was zu Konformationsänderungen der dort lokalisierten Proteine führt. Hieraus resultiert, je nach nötigem Schwellwert, ein unterschiedlicher Aktivierungsgrad der verschiedenen, an den Adhäsionskomplexen vorhandenen Signalproteine. Der Fluss des Aktinskeletts wird wesentlich durch zwei Beiträge verursacht. Zum einen kommt es am Zellrand zur Aktinpolymerisation, welche zusätzlich durch das Vorhandensein von Initiatorproteinen, wie zum Beispiel dem Arp2/3-Komplex, befördert wird.⁴³ Das am abgeflachten Rand der Zelle, im sogenannten Lamellipodium, befindliche Netzwerk wird, je nach Widerstand durch die Zellmembran und die Stärke der Kopplung an das Substrat, durch das ständige Wachstum der Aktinfilamente in Richtung des Zellinneren geschoben. An der Grenze zwischen Lamellipodium und Lamellum, der sich daran anschließenden, innenliegenden Zellregion, verändert sich die Architektur des Aktinzytoskeletts, da ein Abbau des verzweigten Netzwerks und ein Aufbau von Stressfasern aus Aktinfilamenten erfolgt.⁴⁴ Die Filamente können bei antiparalleler Anordnung durch Motorproteine der Myosin-Familie gegeneinander verschoben werden, wodurch die

Stressfasern kontrahieren. Die Stressfasern können ihrerseits durch Kopplung an Adhäsionsstellen Kräfte auf das Substrat ausüben.^{43–45} Hierauf wird in Abschnitt 2.2 nochmals genauer eingegangen. Der ins Zellinnere gerichtete Aktin-Fluss, der sowohl durch Polymerisation am Zellrand als auch durch Myosin-Aktivität verursacht wird, wird als retrograder Fluss (engl. *retrograde flow*) bezeichnet.^{45,46}

Durch den Auf- und Abbau des Aktinzytoskeletts kommt es einerseits zur Ausbreitung der Zelle in Migrationsrichtung, andererseits erfolgt so auch das Einziehen und Nachführen des Zellendes. Weiterhin ist die Kontraktilität des Aktomyosin-Apparats wichtig für die Regulation verschiedener Signalwege. Dies kann durch die Aufrechterhaltung mechanischer Spannung an den Fokalen Adhäsionen geschehen, wodurch diese gefestigt werden. Als Resultat werden adhäsionsabhängige Regulatorproteine, wie zum Beispiel die Fokale Adhäsionskinase, die Einfluss auf Zellwachstum und Proliferation hat, in einem aktivierten Zustand stabilisiert.^{3,47,48} Weiterhin kann die Kontraktion eine Umordnung der extrazellulären Matrix bewirken, was zum Beispiel bei der Wundheilung von großer Bedeutung ist.^{49,50}

2.1.4 Rolle des Aktinskeletts bei der Mechanotransduktion

Aktinstressfasern nehmen eine zentrale Rolle bei der Mechanotransduktion ein. Dies wird bedingt durch ihre hohen mechanischen Belastbarkeit (Persistenzlänge Aktinfilament: $L_p \approx 15 \mu\text{m}$),⁵¹ die Möglichkeit ihres dynamischen Auf- und Abbaus und die Vielzahl ihrer Wechselwirkungen und Verknüpfungen mit verschiedenen Zellkomponenten.^{52,53} Gleichzeitig unterliegt der Auf- und Abbau von Stressfasern der Steuerung durch diverse Signalwege. Eine große Bedeutung beim Umbau von Aktinstressfasern kommt Signalmolekülen aus der Klasse der kleinen GTPasen zu (kleine G-Proteine).⁵⁴ Bekannte Vertreter sind RhoA, Rac1 und Cdc42. Ein übergeordneter Signalweg ist der ROCK-Signalweg (*Rho-associated protein kinase*, ROCK), eine Proteinkinase, die über RhoA angesteuert werden kann und Einfluss auf die Myosinaktivität hat sowie über verschiedene Signalkaskaden die Aktivität verschiedener aktinbindender Proteine reguliert und dadurch Einfluss auf Aktinpolymerisation nimmt. Damit ist dieser Signalweg beteiligt an der Kontrolle über Zellmigration, -kontraktilität und -zyklus.^{47,55} An den Fokalen Adhäsionen ist die Fokale Adhäsionskinase lokalisiert, die ihrerseits auf die Stabilität der Adhäsionsstellen, aber auch auf die Zellproliferation Einfluss nehmen kann.⁴⁸

Aktinstressfasern sind ein integraler Bestandteil des Aktinzytoskeletts. Sie können den Zellkörper durchspannen und verschiedene Zellregionen und -kompartimente miteinander verknüpfen. Stressfasern können einerseits über Fokale Adhäsionen mit der extrazellulären Matrix und über den Aktinkortex mit der Zellmembran verbunden sein. Andererseits ist bekannt, dass eine Kopplung des Aktinnetzwerks an andere Zellskelettkomponenten, zum Beispiel Mikrotubuli⁵⁶ oder Intermediärfilamente,⁵⁷ möglich ist. Als (indirekter) Bindungspartner von Aktin innerhalb der Intermediärfilamente sei besonders die

Klasse der Lamine hervorgehoben, da diese eng mit der Doppelmembran des Zellkerns assoziiert sind. Über ein Proteinaggregat, den sogenannten LINC-Komplex, ist somit eine mechanische Kopplung zwischen Zellkern und Zellskelett, darunter den Aktinstressfasern, möglich.⁵⁸ Durch die Kopplung der Aktinstressfasern an den Zellkern können mechanische Signale der extrazellulären Matrix auf diesen übertragen werden. Aufgrund der mechanischen Belastung kann eine Translokation von Signalmolekülen über mechanosensitive Poren der Zellkernmembran erfolgen.²³ Weiterhin ist eine Deformation des Zellkerns bei der Migration durch Engstellen der extrazellulären Matrix nötig, dies spielt während der Wundheilung und der Metastasierung eine wichtige Rolle.^{58–60} Dabei erfolgt die Deformation des Zellkerns über perinukleäre Stressfasern und andere Zellskelettkomponenten und kann außerdem durch eine Änderung der mechanischen Eigenschaften des Zellkerns beeinflusst werden. Diese Anpassung kann mit einem veränderten Kondensationsgrad des Chromatins einhergehen, wodurch sich die Zugänglichkeit von Genloci und damit die Genexpression verändern kann.²³

Somit kann mittels Stressfasern eine Reizweiterleitung von den Fokalen Adhäsionen hin zu anderen Zellkompartimenten stattfinden. Umgedreht kann über die Kontraktion der Stressfasern Spannung auf die extrazelluläre Matrix ausgeübt werden, welche auch von benachbarten Zellen wahrgenommen werden kann.⁶¹ Somit ist die Möglichkeit des sogenannten "Inside-Out"-Signalings gegeben.⁶²

2.2 Der Aufbau des Aktinzytoskeletts

Das Aktinzytoskelett spielt bei der Verbindung der Zelle zu ihrer Umgebung eine herausragende Rolle – einerseits aufgrund der Verknüpfung zwischen entfernten Zellbestandteilen durch das Aktinskelett und andererseits aufgrund der Kraftentwicklung durch eingelagertes Myosin. Daher soll der Aufbau des Aktinskeletts hier detaillierter beschrieben werden.

2.2.1 Die Entstehung von Aktinfilamenten auf molekularer Ebene

Grundbaustein der verschiedenen Aktinstrukturen innerhalb des Zellskeletts sind Aktinfilamente (F-Aktin), welche ihrerseits aus Aktinmonomeren (G-Aktin) zusammengesetzt sind. Der Entstehungsmechanismus wird im Folgenden beschrieben.

2.2.1.1 Aktinpolymerisation und -depolymerisation, Treadmilling

Aktin ist ein ca. 42 kDa großes Protein, welches in sechs Isoformen im Menschen vorkommt und über viele Domänen des Lebens hochkonserviert ist.⁵ Es kann bis zu 20% des Proteingehalts einer Zelle ausmachen⁶³ und liegt in Nichtmuskelzellen mit einer Konzentration in der Größenordnung von 10–100 μM vor.⁶⁴ Das Strukturprotein kann als

ATPase klassifiziert werden, da es in der Lage ist, Adenosintriphosphat (ATP) zu binden und zu Adenosindiphosphat (ADP) zu hydrolysieren. Ein ATP-beladenes Aktin-Monomer ist in der Lage, an weitere ATP-beladene Aktin-Monomere zu binden. Der Keim für die Bildung eines Aktinfilaments (Aktin-Polymer) wird durch ein Aggregat aus drei verbundenen Aktin-Monomeren gebildet. An diesen Keim können weitere Aktinmonomere binden, wodurch es zur Ausbildung eines helikal gewundenen Doppelstrangs aus polymerisiertem Aktin kommt. Ein kompletter Umlauf wird ca. alle 72 nm erreicht und pro Mikrometer sind ca. 370 Untereinheiten enthalten. Der Filamentdurchmesser beträgt ca. 7 nm und kann mehrere Mikrometer Länge erreichen.^{65–67}

Mit der Zeit wird das gebundene ATP zu ADP hydrolysiert, wodurch eine Konformationsänderung des Polymers ausgelöst wird und damit die Bindungsaffinität zwischen den benachbarten Aktinmonomeren herabgesetzt wird. Durch die unterschiedlichen Bindungskonstanten von Aktin, welches ADP beziehungsweise ATP gebunden hat, kommt es am ADP-reichen Ende der Aktinhelix leichter zu einer Freisetzung der Monomere. Beim Prozess der Polymerisation am ATP-reichen und Depolymerisation am ADP-reichen Ende handelt es sich um Reaktionen, die von den jeweiligen Reaktionsraten und ebenso von der Konzentration an verfügbarem G-Aktin (Aktin-Monomere) abhängen. Innerhalb eines bestimmten Konzentrationsbereichs ist es so möglich, Aktinfilamente mit konstanter Länge zu erhalten, die aber gleichzeitig einem kontinuierlichen Aufbau am sogenannten "Plus-Ende" und einem mit gleicher Rate ablaufenden Abbau am "Minus-Ende" unterliegen. Dieser Zustand wird auch als "Treadmilling" bezeichnet (siehe Abb. 2.3 A). In vitro wurde hierfür eine Konzentration im Bereich von 0,1 μM gefunden, die allerdings auch von der Konzentration anderer gelöster Stoffe, insbesondere Salze, abhängt. Da die intrazelluläre Aktinkonzentration deutlich über der kritischen Konzentration liegt (ca. Faktor 1000), liegt es nahe, dass die Polymerisierung von Aktin in vivo durch weitere Proteine reguliert wird.^{5,68,69}

2.2.1.2 Rolle aktinbindender Proteine beim Auf- und Abbau von Aktinfilamenten und Aktinstressfasern

Das Zusammenkommen von drei Aktinmonomeren zur Bildung eines Filaments lässt eine spontane Entstehung unwahrscheinlich erscheinen und impliziert die Anwesenheit anderer Nukleationskeime.⁶⁵ Der Auf- und Abbau von Aktinfilamenten ist durch die Gegenwart verschiedener aktinbindender Proteine steuerbar. Am Aufbau beteiligt sind Proteine, die eine einem Aktin-Trimer ähnliche Struktur aufweisen, um eine Keimung eines Aktinfilaments zu befördern. Erwähnenswert ist hierbei der Arp2/3-Komplex, welcher an bestehende Aktinfilamente binden kann und als Knospungspunkt für Verzweigungen mit einem Winkel von 70° dient, insbesondere im verzweigten Netzwerk des Lamellipodiums in der Nähe der Zellmembran am Zellrand. Weitere Beispiele für der Aktinkondensation

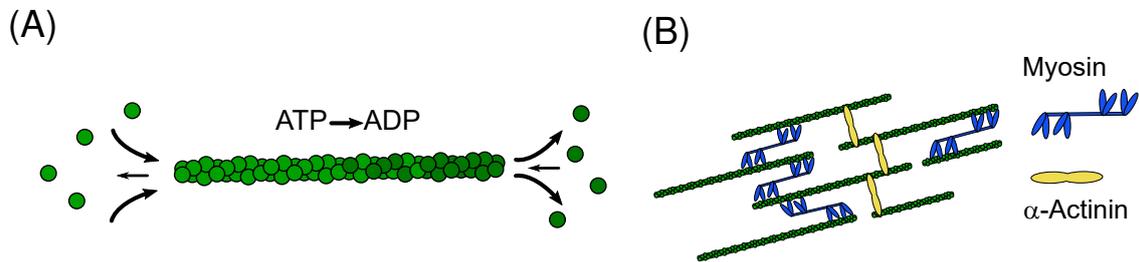


Abbildung 2.3: Entstehung von Aktinfilamenten und Stressfasern. (A) Bildung von Aktinfilamenten aus Aktinmonomeren. Die Gleichgewichtskonstante der Aktin-Aktin-Bindung hängt von der Beladung mit ATP ab. Dadurch ergeben sich bei einer gegebenen Monomer-Konzentration verschiedene Polymerisationsraten an den ATP-reichen und ATP-armen Enden eines Aktinfilaments. Durch kontinuierlichen Aufbau am Plusende und Abbau am Minusende kommt es zum Treadmilling, bei dem das Filament in einem Fließgleichgewicht seine Länge beibehält. (B) Aktinfilamente können über Crosslinker-Proteine, wie z. B. α -Actinin verbunden werden. Ebenso kann eine Querverbindung durch Myosine geschehen, wodurch eine kontraktile Stressfaser aufgebaut wird.

(Keimung und Polymerisation) dienliche Proteine finden sich in der Klasse der Formine, zum Beispiel mDia1.^{54,55,70}

Einzelne Aktinfilamente können ihrerseits hierarchisch in größere Aggregate organisiert werden, eine Quervernetzung kann über Crosslinking-Proteine erfolgen. Eine solche Zusammenlagerung zu sogenannten Mikrofilamenten kann zum Beispiel über Motorproteine aus der Klasse der Myosine erfolgen, die einerseits über aktinbindende Domänen verfügen und gleichzeitig ihrerseits Aggregate bilden können.⁷¹ Daneben spielt auch α -Actinin eine herausragende Rolle bei der antiparallelen Verbindung von Aktinfilamenten und trägt ebenfalls zur Entstehung von Stressfasern bei.⁶⁶

Der Abbau von Aktinfilamenten kann einerseits durch sogenannte "Capping"-Proteine geschehen, die sich am Plus-Ende des Aktinfilaments anlagern und durch sterische Wechselwirkung ein weiteres Polymerwachstum durch Anlagerung von ATP-Aktin verhindern. Weiterhin gibt es Proteine, zum Beispiel Cofilin, die durch Bindung an die Doppelhelix deren Torsionswinkel ändern und so die Bindungsaffinität benachbarter Aktinmoleküle herabsetzen und auf diese Weise zu einem Bruch des Filaments führen. Cofilin bindet vorwiegend an flexible Filamente, die nicht unter Spannung stehen und damit nicht zur Aufrechterhaltung des mechanischen Zustands der Zelle benötigt werden. Somit kann die Dynamik des Aktinskeletttumbaus beschleunigt werden. Eine Regulierung von Cofilin geschieht beispielsweise über Rac1, ein Vertreter der Rho-GTPasen.^{72,73}

2.2.2 Klassifizierung verschiedener Aktin-Strukturen

In der Zelle liegt Aktin einerseits im gelösten Zustand als Monomer (G-Aktin) vor. Andererseits gibt es verschiedene Aggregationsformen von F-Aktin (filamentösem Aktin), die

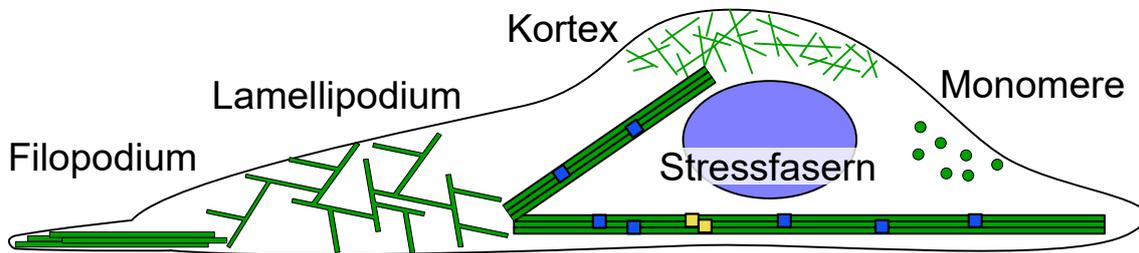


Abbildung 2.4: Übersicht über verschiedene Aktinstrukturen in einer Zelle. Filopodien erzeugen Ausstülpungen aus der Membran, aus dem verzweigten Netzwerk des Lamellipodiums gehen Stressfasern hervor. Der Kortex kleidet die Innenseite der Zellmembran aus. Neben der filamentösen Form (F-Aktin) kommt Aktin auch als Monomer in der Zelle vor (G-Aktin).

entweder aufgrund ihres unterschiedlichen Aufbaus, ihrer unterschiedlichen Lokalisation innerhalb der Zelle oder ihrer unterschiedlichen Funktion klassifiziert werden können (siehe Abb. 2.4).

2.2.2.1 Aktinkortex

Der Kortex ist eine zellumspannende Aktinstruktur. Diese besteht aus einem feinen Netzwerk aus Aktinfilamenten, welches mit Hilfe von Verbindungsproteinen (z. B. Ezrin, Radixin und Moesin, die zur ERM-Proteinfamilie zusammengefasst werden) an der Innenseite der Zellmembran anhaftet.⁷⁴ Die Dicke dieses Netzwerks beträgt beispielsweise in HUVECs ca. 300 nm,⁷⁵ kann aber auch einige wenige Mikrometer erreichen.⁷⁴ Die Maschenweite liegt typischerweise im Bereich 50 nm – 200 nm.⁷⁴

Der Aktinkortex ist reich an Myosinmotoren und wirkt unterstützend zur Membranspannung und spielt daher eine Rolle bei der Erhaltung der Zellform, da der Kortex auch dem Zellinnendruck entgegenwirkt. Beim Verlust der kortikalen Spannung oder der Verbindung zwischen Membran und Kortex kann es zum sogenannten Blebbing kommen, bei dem sich bläschen- oder tubusförmige Ausstülpungen aus der Membran bilden.⁷⁶ Der Aktinkortex spielt weiterhin bei Zellformänderung während der initialen Adhäsion eine Rolle, da zu diesem Zeitpunkt andere Aktinstrukturen noch nicht ausgebildet sind.⁷⁷

2.2.2.2 Verzweigtes Aktinnetzwerk im Lamellipodium

Insbesondere in flächig adhärennten Zellen auf zweidimensionalen Substraten kommt es im Randbereich der Zelle, im sogenannten Lamellipodium, zum dynamischen Auf- und Abbau eines verzweigten Aktinnetzwerkes, das durch einen hohen Gehalt von Arp2/3-Komplexen und aktinbindenden Proteinen, zum Beispiel Cofilin, gekennzeichnet ist. Dieses Netzwerk ist an der Ausbildung initialer Adhäsionsstellen, sogenannten Fokalen

Komplexen, beteiligt.^{54,70,78} Durch die Polymerisation von Aktin an den Netzwerkenden (Plus-Enden) entsteht ein Polymerisationsdruck, der zu einem Vorschub der Membran beziehungsweise zu einer Einwärtsbewegung des verzweigten Netzwerks führt, dem sogenannten retrograden Fluss. Durch ein Verschieben der Membran kommt es zur Ausbreitung beziehungsweise Vorwärtsbewegung der Zelle.^{70,79,80} Im Grenzbereich zwischen Lamellipodium und Zellinnerem erfolgt ein Abbau des verzweigten Netzwerks und ein Aufbau gebündelter Filamentstrukturen, der sogenannten Aktinstressfasern.^{43,81,82}

2.2.2.3 Filopodien

Filopodien sind lineare Aktinstrukturen, die aus dem Lamellipodium in Richtung des Zellaußeren ragen.⁸³ Filopodien entstehen durch verstärkte Polymerisation und Quervernetzung aus dem verzweigten Netzwerk des Lamellipodiums, initiiert durch Proteine aus der VASP- und Formin-Familie.⁸⁴ An Filopodien können erste fokale Kontakte mit der Umgebung hergestellt werden. Sie dienen daher der Migration und der Chemotaxis.^{70,82} Wie auch andere Teile des Aktinnetzwerks kann der Auf- und Abbau der Filopodien über RhoGTPasen, zum Beispiel Cdc42, gesteuert werden.⁸⁵

2.2.2.4 Aktinstressfasern

Am Aufbau der Aktinstressfasern sind in der Regel die Integrine beteiligt, welche an die extrazelluläre Matrix binden und intrazellulär zu Clustern assembliert werden, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben. Bei diesem Prozess kommt es zur Aktivierung weiterer Bindestellen und zur Rekrutierung von Adapterproteinen, insbesondere Paxilin, Vinkulin und Talin. Somit findet eine Kopplung der extrazellulären Matrix an das Aktinnetzwerk statt.⁸⁶

Aktinstressfasern werden nach verschiedenen Merkmalen ihrer Architektur und ihrer Funktion in unterschiedliche Kategorien unterteilt. In der Literatur findet man häufig eine Einteilung in drei bis vier verschiedene Klassen: dorsale Stressfasern, die an einem Ende mit einem Adhäsionskomplex verknüpft sind; ventrale Stressfasern, die an zwei Adhäsionskomplexen angebunden sind, und transversale Bögen, die zwischen den beiden anderen Typen aufgespannt sind.^{44,70} Zusätzlich werden Stressfasern mitunter auch als perinukleäre Stressfasern bezeichnet, wenn sie den Zellkern überspannen oder einschränken.⁸⁷ Hierbei ist anzumerken, dass die Unterteilung in verschiedene Stressfasertypen in der Praxis nicht immer eindeutig möglich ist, sehr beschreibend erfolgt und die Stärke der Ausprägung auch zelltypabhängig sein kann.⁸⁸

Bei Stressfasern handelt es sich um lineare Strukturen aus 10–30 Aktinfilamenten,⁶⁷ die über Motorproteine der Myosinfamilie und andere Proteine, wie zum Beispiel α -Actinin, quervernetzt sein können.^{66,89} Stressfasern zeichnen sich durch einen hohen internen Organisationsgrad aus und unterliegen einem dynamischen Auf- und Abbau. Die Reorganisation erfolgt dabei auf einer Zeitskala von wenigen Minuten.^{70,90} An Fokalen Adhäsio-

nen beträgt der Abstand zwischen benachbarten Aktinfilamenten ca. 8 nm und nimmt mit zunehmendem Abstand zu, vermutlich durch die Inkorporation von α -Actinin und Myosin, die über einen Durchmesser von ca. 35 nm verfügen.⁴⁴ Stressfasern bestehen aus Aktinfilamenten, deren Anordnung entlang der Stressfaser von parallel zu antiparallel variieren kann.^{67,66,89} Durch ATP-getriebene Aktivität der Motorproteine können die Aktinfilamente gegeneinander verschoben werden. In Zellen der quergestreiften Muskulatur sind die Aktinfilamente und Myosine zusammen mit Titin und α -Actinin in periodischen Strukturen, den sogenannten Sarkomeren, angeordnet, wobei die Verankerung der Aktinfilamente in sogenannten Z-Scheiben mit einem typischen Abstand von 2 μ m erfolgt.⁹¹ Durch die periodische Struktur, die auch im Mikroskop sichtbar gemacht werden kann, erklärt sich auch der Name der "quergestreiften" Muskulatur. Diese Aktin-Myosin-Strukturen werden in ihrer Gesamtheit auch als Myofibrille bezeichnet.⁹² In Nichtmuskelzellen und Zellen der glatten Muskulatur besitzen Stressfasern keine solch hohe innere Ordnung. In Nichtmuskelzellen erfolgt die Kontraktion durch Myosine aus der Unterfamilie Nichtmuskel-Myosin II, welches wiederum in weitere Typen (A, B, C) unterteilt wird.⁹³

Der Einbau von Filamenten findet vor allem an Fokalen Adhäsionen statt, wo Filamente aus dem Lamellipodium in Stressfasern integriert werden. Ein Wachstum der Stressfasern ist weiterhin durch Polymerisation der einzelnen Filamente oder durch eine laterale Anlagerung von Filamenten möglich.^{45,94} Ein Abbau kann wiederum durch Depolymerisation oder das Einwirken spezialisierter Proteine auf die Filamente, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, erfolgen. Besonders hervorzuheben ist zusätzlich der Abbau von Stressfasern aufgrund einer Stressrelaxation, beispielsweise durch eine Veränderung der Umgebungsgeometrie oder eine Abnahme der Myosin-Aktivität. Beim Abbau von Stressfasern durch ein Nachlassen der externen Spannung kommt es zu einer Verringerung der Bindungsaffinität des Myosins an Aktin und die entsprechenden Querverbindungen können leichter abgebaut werden.⁷¹ Dieses Verhalten wird auch als "Catch-Bond" (im Gegensatz zum "Slip-Bond") bezeichnet und findet sich auch in der Kopplung der Stressfasern an die Adhäsionskomplexe wieder.⁷³ Ebenso kann eine reduzierte Myosin-Aktivität (z. B. durch ROCK-Inhibierung) einen Stressfaserabbau induzieren.

2.2.2.5 Gleichgewicht der Aktinstrukturen

Da die Gesamtmenge an Aktin in der Regel nahezu konstant ist – Vertreter der Aktinfamilie werden auch als sogenanntes Haushaltsgen zur Normierung bei der Bestimmung relativer Proteinmengen bei der Western-Blot-Analyse verwendet,⁹⁵ treten die unterschiedlichen Reservoirs für Aktin (G-Aktin-Pool, Stressfasern, Kortex, Aktin im Lamellipodium) zueinander in Konkurrenz.⁹⁶ Entsprechend konnte beobachtet werden, dass in unterschiedlichen Zellen ein Strukturelement auf Kosten der anderen Erscheinungsformen besonders dominant vorhanden sein kann, beziehungsweise dass ein induzierter Abbau

einer Aktinskelettkomponente zu einem nachfolgenden Aufbau einer anderen Erscheinungsform des Aktins führt.^{73,97}

2.2.3 Methoden zur Untersuchung des Aktinskeletts

Zur Sichtbarmachung von Aktinstrukturen können verschiedene Strategien zum Einsatz kommen. In diesem Abschnitt soll vor allem auf Methoden zur Visualisierung des Aktinnetzwerks mittels optischer Mikroskopie eingegangen werden. Die Darstellung konzentriert sich ausschließlich auf die Visualisierung von Aktinstrukturen in Zellen, eine Betrachtung von in-vitro-Aktinnetzwerken soll ausgeklammert werden.

2.2.3.1 Färbung fixierter Proben

Eine gängige Methode ist die Fixierung der Zellen zur Konservierung und die anschließende Färbung der Aktinstrukturen. Dabei hat sich die Phalloidinfärbung (mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin) zum Goldstandard entwickelt, da sie eine hohe Spezifität aufweist und sich mit geringem Aufwand durchführen lässt.^{98–100} Phalloidin, ein Phallotoxin, ist ein Cyclopeptid, welches hochselektiv F-Aktin bindet, wofür ein Ensemble aus sieben Aktinmonomeren als Bindestelle zur Verfügung stehen muss.⁹⁸ In seiner Eigenschaft als Pilzgift führt es durch Stabilisierung des aktin gebundenen ATPs zur Verstärkung der Bindung benachbarter Aktine in einem Filament, was die Reaktionsrate der Depolymerisation herabsetzt und dadurch zellschädigend wirkt, da die Zellbeweglichkeit eingeschränkt wird.¹⁰¹ Prinzipiell kann diese Methode auch zur Lebendzellfärbung verwendet werden, hat aber gravierende Nachteile. Einerseits kann bei einer Färbung lebender Zellen aufgrund der Giftwirkung durch Fixierung die Dynamik des Aktinskeletts beeinflusst werden. Andererseits muss zum Einbringen des Markers eine Permeabilisierung der Zellmembran, zum Beispiel durch mechanische Einwirkung, erfolgen.^{98,102}

2.2.3.2 Methoden der Lebendzellfärbung

Für die Beobachtung der Reorganisation des Aktinzytoskeletts in lebenden Zellen haben sich verschiedene andere Verfahren etabliert. Zum einen besteht die Möglichkeit, Zellen transient oder dauerhaft mit einem alternativen Aktin-Gen zu transfizieren. Dabei wird bei der Expression des modifizierten Aktins ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Aktinmonomer und einem fluoreszenten Protein, erzeugt.^{98,103} Hierbei sind die Hürden der gentechnischen Modifikation der Zielzelle zu überwinden, ebenso wie eine Erhöhung des Hintergrundsignals durch eine unspezifische Markierung aller Aktine (sowohl G-Aktin als auch F-Aktin).¹⁰⁴ Vorteil dieser Methode ist, dass bei der Erzeugung einer stabilen Zelllinie mit konstitutiv exprimiertem Fusionsprotein eine einmalige Behandlung der Zellen ausreicht. Allerdings muss kritisch angemerkt werden, dass direkte Schlussfolgerungen aufgrund der unphysiologischen Form des Aktins schwierig sind.^{105,106} Weiterhin ist zu

beachten, dass die Größe eines fluoreszierenden Proteins in der Größenordnung des Aktinmonomers liegt (z. B. GFP: $M_W = 27$ kDa) und es dadurch zu einer Einschränkung der Wechselwirkung mit anderen Proteinen kommen kann.¹⁰⁷

Ein ähnlicher Ansatz stellt das Einbringen bereits markierter Aktinmonomere in die Zelle dar. Auch hier bestehen Herausforderungen darin, zur Einbringung der Fluoreszenzproben eine Verletzung der Zellintegrität zu verantworten und einen Anstieg des Hintergrundsignals zu kompensieren.¹⁰⁶ Vorteilhaft bei dieser Methode ist die Möglichkeit des zeitlich gestaffelten Einbringens verschieden gelabelter Aktinvarianten, was eine farb-codierte Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Aufbaus von Aktinstrukturen in situ gestattet. Nachteilhaft ist ein möglicherweise verminderter Einbau in bestimmte Zytoskelett-Strukturen, wenn hierfür eine Wechselwirkung mit einem Initiatorprotein, wie zum Beispiel Arp2/3 oder mDia, nötig ist.¹⁰³

Diesem Ansatz verwandt ist das Einbringen von fluorophormarkierten, aktinbindenden Molekülen. Diese sind in der Regel kleine, mit fluoreszenten Proteinen oder anderen Fluorophoren gelabelte Marker und können deshalb mit weniger Aufwand in die Zelle gebracht werden. Kritisch betrachtet werden muss dabei aber wiederum die Einflussnahme des aktinbindenden Moleküls auf die Polymerisierungskinetik des Aktins und dessen Interaktion mit anderen Proteinen. Ein weiterer möglicher Schwachpunkt dieser indirekten Markierung ist, dass die Kinetik der Anbindung ein Färben besonders dynamischer Strukturen beziehungsweise die Entstehung von Aktinfilamenten nicht gestattet.^{103,108} Beispiele sind LifeAct (welches oft mit einem GFP-Derivat markiert ist)¹⁰⁶ oder SiR-Actin, ein Marker auf Jasplakinolid-Basis, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Ein zusätzlicher Vorteil von SiR-Actin ist, dass der Marker im freien Zustand eine geringere Fluoreszenz aufweist als im gebundenen Zustand.^{109,110}

2.2.3.3 Modulation der Aktinzytoskelettarchitektur durch biochemische Beeinflussung

Entsprechend seiner großen Bedeutung für das Gleichgewicht zwischen verschiedenen Aktinstrukturen stellt der ROCK-Signalweg auch ein häufiges Ziel biochemischer Modulation der Mechanotransduktion dar. Versuche mit biochemischen Inhibitoren oder Aktivatoren, wie zum Beispiel Y-27632¹¹¹⁻¹¹³ oder Lysophosphatidsäure,^{114,115} offerieren die Möglichkeit, an verschiedenen Stellen der Regelkette bei der Entstehung von Aktinstrukturen einzugreifen. Aus den resultierenden Beobachtungen lassen sich dann Rückschlüsse auf die zugrunde liegenden Regelungsnetzwerke beziehungsweise Signalwege und direkte Bindungspartner ziehen.^{111,116} Durch die starke Vernetzung, die teilweise Redundanz und den Crosstalk zwischen verschiedenen Signalnetzwerken führen Eingriffe in intrazelluläre Signalwege oft zu einer nur mittelbaren beziehungsweise indirekten, aber phänotypisch vielfältigen Veränderung des Zellverhaltens. Der ROCK-Signalweg übernimmt beispielsweise neben der Beeinflussung der Zellkontraktilität auch Steuerungs-

funktion bei der Proliferation und der Zellzyklusregulation.¹¹⁷ Dadurch wird ein direktes mechanistisches Verständnis isolierter Zellprozesse erschwert.

Deshalb ist auch eine direkte Manipulation der betrachteten Aktinstrukturen eine weitere Strategie zur Untersuchung der Aktinskelettarchitektur. Beispielsweise können Proteine eingesetzt werden, von denen bekannt ist, dass sie direkt mit Aktinstrukturen interagieren und so deren Stabilität beeinflussen. Dabei kann es sich um auch im nativen Zellzustand vorkommende Proteine handeln, die in nichtphysiologischen Konzentrationen eingesetzt werden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass das Protein Cofilin durch Änderung der Bindungsgeometrie zwischen benachbarten Aktinmonomeren innerhalb eines Filaments zu einem wahrscheinlichen Bruch des Filaments führt, wodurch allerdings mehr freie Enden für eine weitere Polymerisierung zur Verfügung stehen und dadurch die Menge an F-Aktin insgesamt erhöht werden kann.^{54,72} Ein weiteres aktinbindendes Protein ist Profilin, welches direkt an globuläres Aktin bindet und dieses einerseits aus dem Pool der für die Aktinpolymerisation vorhandenen Aktinmonomere entfernt. Allerdings kann Profilin mit weiteren aktinbindenden Proteinen wechselwirken und so in Gegenwart der entsprechenden Bindungspartner die Dynamik der Aktinpolymerisation modulieren.^{118,119}

Andererseits können auch Inhibitoren auf Basis kleiner Moleküle eingesetzt werden, die ein ähnliches Bindeverhalten aufweisen. Oftmals kommen auch Naturstoffe zum Einsatz, deren Interaktion mit dem Aktinskelett zwar bekannt, aber im nativen Zustand nicht erwünscht ist. Herausragendes Beispiel ist dafür das Peptid Phalloidin, ein Pilzgift, welches durch seine hohe Bindungsaffinität zu F-Aktin dessen Abbau durch Depolymerisation verhindert und dadurch zu einer Fixierung beziehungsweise Lähmung der F-Aktinstruktur führt.⁹⁸ Ähnlich verhält es sich bei Jasplakinolid, welches aus einem Meeresschwamm isoliert werden kann und ebenfalls eine hohe Affinität zu F-Aktin aufweist.¹²⁰ Weitere Beispiele für Stoffe, die einen Abbau von F-Aktin in einer Zelle bewirken, sind Latrunculin, Cytochalasin und Blebbistatin. Der Wirkmechanismus kann auf einer Blockierung der Polymerisation durch Bindung der gelösten Aktinmonomere (Latrunculin),¹²¹ auf einer Änderung der F-Aktin-Struktur (Cytochalasin)¹⁰¹ oder auf einer indirekten Hemmung der Bildung von Stressfasern durch eine Blockade der Aktivität Myosin-Motoren (Blebbistatin)⁷¹ beruhen.

2.3 Zusammenhang zwischen Zellmorphologie und Zellbiologie

Zellen nehmen ein breites Spektrum an Formen ein, um im Organismus ihre Aufgaben zu erfüllen. In diesem Abschnitt sollen Beispiele aus der Natur und aus dem Labor kurz präsentiert werden. Anschließend erfolgt eine detailliertere Darstellung des Wechselspiels zwischen der Zellform und Zellbestandteilen, mit Fokus auf dem Aktinzytoskelett, wel-

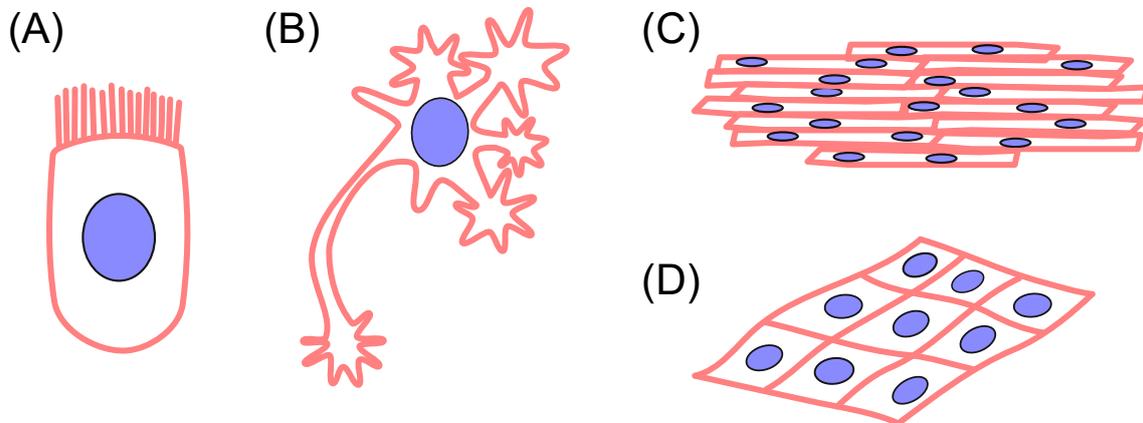


Abbildung 2.5: Beispiele für die Formen von spezialisierten Zellen. (A) Enterozyt aus dem Darmepithel mit Bürstensaum zur Oberflächenvergrößerung. (B) Neuron mit Dendriten und Axon zur besseren Vernetzung mit anderen Zellen. (C) Langgestreckte Zellen der Skelettmuskulatur ermöglichen gerichtete Kontraktion. (D) Spindelförmige Zellen der glatten Muskulatur für gleichmäßigere Kontraktion.

ches aktiv am Prozess der Formgebung beteiligt sein kann. Abschließend wird die Anpassung der Zellzugkräfte an die Zellgeometrie diskutiert, um auf die Rückkopplung der Zelle auf ihre Umgebung einzugehen.

2.3.1 Beispiele für den Zusammenhang von Zellform und Zellfunktion in vivo

Bei Betrachtung von Zellen aus unterschiedlichen Geweben fallen die unterschiedlichen Formen ins Auge (siehe Abb. 2.5). Beispielhaft seien die Enterozyten, Zellen des Darmepithels der Darmzotten, genannt. Diese Zellen weisen auf ihrer dem Darmlumen zugewandten Seite einen sogenannten Bürstensaum, bestehend aus Mikrovilli, auf. Dabei handelt es sich um faserförmige Ausstülpungen, die zu einer starken Vergrößerung der Zelloberfläche beitragen und damit eine erhöhte Austauschrate von Stoffen erlauben.¹²² Neuronen verfügen ebenfalls über zahlreiche Fortsätze, sogenannte Dendriten, um einen hohen Vernetzungsgrad mit anderen Zellen zu erreichen. Zusätzlich verfügen sie über ein ausgestrecktes Axon, um Signale mittels der saltatorischen Erregungsleitung besonders schnell übermitteln zu können.⁹¹ Muskelzellen der Skelettmuskulatur und Herzmuskelzellen haben eine langgestreckte Zellform, deren Achse mit der Hauptkontraktionsrichtung der Muskeln korrespondiert.^{123,124} Im Gegensatz dazu sind die Zellen der glatten Muskulatur spindelförmig, was eine gleichförmigere Kontraktion ermöglicht. Dies korreliert mit dem Auftreten der glatten Muskulatur in umhüllenden Strukturen, wie zum Beispiel in den Wänden der Blutgefäße, deren Spannungszustand über die Kontraktion der Muskelzellen reguliert werden kann.¹²⁵

Abgrenzung spielt nicht nur auf zellulärer Ebene eine Rolle, sondern auch auf Gewebeebene. Unterschiedliche Gewebe beinhalten unterschiedlich spezialisierte Zellgruppen. Diese Kompartimentierung wird während der Embryonalentwicklung und der Morphogenese gesteuert. Während der Embryogenese entsteht aus einer Zelle durch Zellteilung ein mehrzelliger Organismus, der sich in verschiedene Gewebe gliedert, wie zum Beispiel Nerven-, Muskel-, Epithel- und Bindegewebe. Während der Entwicklung spielen aber besonders koordinierte Formänderungen benachbarter Zellen eine herausragende Rolle. Durch Formänderungen der Zellen entstehen in einem Zellhaufen Einstülpungen und komplexere Formen.^{12,13,126} Beispielsweise durchlaufen die Zellen der Neuralplatte während der Neurulation eine apikal-basale Verlängerung, gefolgt von einer apikalen Verjüngung, was zu einer Ausbildung von Wülsten und anschließender Einschnürung des Gewebes und damit zur Bildung des Neuralrohrs führt.¹²⁷

So wie eine planmäßige, koordinierte Zellformänderung zur Gewebeentstehung und die Beibehaltung bestimmter Zellmuster zur Gewebshomöostase beiträgt, kann eine fehlgeleitete Änderung der Zellform eine Begleiterscheinung von Krankheiten und pathologischen Situationen sein. Exemplarisch hierfür ist die Metastasierung, bei der einzelne Zellen aus einem Tumor ausbrechen, die Gewebsgrenzen überwinden und in andere Gewebe eindringen. Beispielsweise ist bei der epithelial-mesenchymalen Transformation, dem Übergang einer Zelle aus einer geschlossenen Zellschicht zu einer vereinzelter, mobilen Zelle, eine Veränderung der Morphologie beobachtbar. Dieser Prozess findet sowohl während der Embryogenese statt als auch bei der Metastasierung von Tumoren.^{128–130}

Eine Veränderung der Zellform, die schließlich zu einer veränderten Zellmigration führt, kann abstrakter auch als sogenannter Unjamming-Übergang beschrieben werden, also von einem Zustand der gegenseitigen Blockade benachbarter Teilchen hin zu einem Zustand, welcher durch die Beweglichkeit der Teilchen charakterisiert wird. Neben der Metastasierung wurde auch in humanen Bronchial-Epithelzellen gezeigt, dass ein solcher Übergang bei Asthma eine Rolle spielt und sich anhand einer kritischen Veränderung der Zellform beschreiben lässt.¹³¹ Außerdem kann eine veränderte Zellform auch ein direkter Hinweis auf eine Erkrankung sein, so wie zum Beispiel die Sichelzellenanämie an sichelartig verformten Erythrozyten erkannt werden kann.

2.3.2 Beispiele für den Zusammenhang von Zellform und Zellfunktion in vitro

Da eine zeitaufgelöste Einzelzellverfolgung zur Aufklärung der Bedeutung der Formänderung von Zellen bisher nur in einfachen Modellorganismen, wie zum Beispiel dem Nematodenwurm *Caenorhabditis elegans* sinnvoll möglich ist,^{132–134} bleibt man auf In-vitro-Studien an isolierten Zelltypen oder sogar Einzelzellen angewiesen. Die Form wird dabei entweder durch ein dreidimensionales Relief oder durch eine zweidimensionale Musterung mit Adhäsionsprotein vorgegeben. Durch Aussaat von Zellen auf diese spe-

ziell strukturierten Oberflächen können Einflüsse der Form der adhäsiven Fläche auf die Zellvitalität ermittelt werden (siehe Schema 2.6).¹⁰ Im drastischsten Fall führt eine zu geringe Adhäsionsfläche zu einer unzureichenden Rezeptoraktivierung und dadurch zum Tod der Zelle durch Apoptose (spezieller: "Anoikis").¹³⁵ Zum Beispiel wurde für bovine Kapillar-Endothelzellen eine Zellfläche von $500\ \mu\text{m}^2$ ermittelt, unterhalb derer Apoptose auftrat, während ein ungestörter Zellzyklus erst oberhalb von $1500\ \mu\text{m}^2$ beobachtet wurde.¹⁰ Ebenso konnte in humanen mikrovaskularen Endothelzellen eine zehnfache Erhöhung der Proliferationsrate bei einer Vergrößerung der Adhäsionsfläche von $300\ \mu\text{m}^2$ auf $2500\ \mu\text{m}^2$ festgestellt werden.¹³⁶

Andererseits konnte beobachtet werden, dass es zu einer Einschränkung der Zellfunktion bei "unnatürlicher" Strukturierung der Adhäsionsfläche kommen kann. So wurde ein Arrest des Zellzyklus bei einer Reduktion der zur Adhäsion zur Verfügung stehenden Fläche festgestellt.⁵² Zusätzlich kann auch die Adhäsionsfläche konstant gehalten werden, während sie aus kleineren adhäsiven Flächen zusammengesetzt wird, deren Abstand vergrößert wird. Im vorangegangenen Beispiel betrug der Durchmesser der kleinen Flächen, die auf einem Substrat zu einem Muster zusammengesetzt waren, $5\ \mu\text{m}^2$ und ihr Abstand wurde ebenfalls im Mikrometerbereich variiert. Durch die unterschiedliche Strukturierung wurde eine Vergrößerung der Zellfläche und dadurch eine Erhöhung der Synthesetätigkeit beziehungsweise ein weiteres Fortschreiten im Zellzyklus verursacht.^{10,52}

Im umgekehrten Fall einer homogenen, ausgedehnten Adhäsionsfläche konnte ebenfalls abnormes Zellverhalten, nämlich Zellwachstum ohne das Erreichen eines physiologischen Zustands, beobachtet werden – Endothelzellen nahmen eine spiegeleiförmige Morphologie an, anstatt physiologisch relevante kapillarähnliche Formen auszubilden.¹¹ Für eine optimale Nachahmung der Morphologie im nativen Zustand ist tatsächlich eine Anpassung der Struktur an die gewünschte Form hilfreich. Mittels In-vitro-Versuchen konnten auch Nachweise darüber erbracht werden, dass die Vorgabe einer Zellform auch auf die Differenzierung von Stammzellen Einfluss nehmen kann. Im Beispiel wurden mesenchymale Stammzellen durch Vorgabe einer rundlichen, eingeschränkten oder einer ausgedehnten Adhäsionsfläche zur Differenzierung in Adipozyten oder Osteoblasten stimuliert.⁹ Ebenfalls für mesenchymale Stammzellen wurde eine flächenabhängige beziehungsweise formabhängige Differenzierung hin zu Chondrozyten (unvollständig ausgebreitet, $1000\ \mu\text{m}^2$) oder Myozyten (flächig adhärent, $10\ 000\ \mu\text{m}^2$) beobachtet.¹³⁷

Zusätzlich zur Form oder Fläche kann auch die Dimensionalität des Kultursubstrats Einfluss auf das Zellverhalten und die Zellmorphologie nehmen. Um Zellen eine dem physiologischen Zustand ähnliche, dreidimensionale Matrix zu präsentieren, werden oftmals fibrilläre Netzwerke aus natürlichen EZM-Bestandteilen, wie Kollagen, Fibrin oder anderen fibrillenbildenden Proteinen, hergestellt.^{138–140} Ebenfalls gebräuchlich sind Biohybridmaterialien aus synthetischen Crosslinkern (z. B. verzweigtes Polyethylenglykol) und Peptid-Verbindungen, die ein spezifisches Anwachsen der Zelle beziehungsweise einen Abbau der Matrix gestatten.^{141,142} Andererseits kommen strukturierte synthetische Ma-

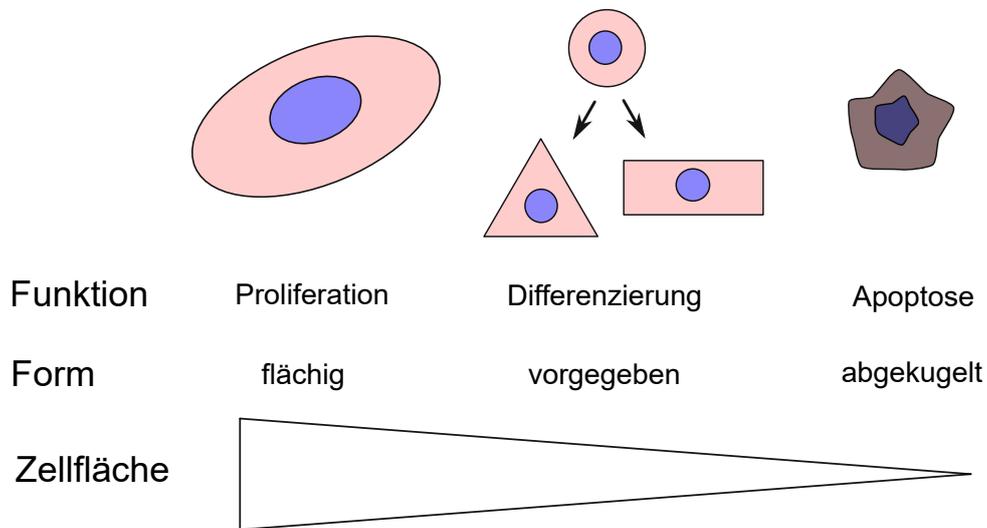


Abbildung 2.6: Einfluss der Zellfläche auf die Zellfunktion. Bei ausreichender zur Verfügung stehender Fläche können Zellen ungebremst wachsen. Bei Vorgabe einer eingeschränkten Fläche kann es zur Differenzierung bzw. einer funktionellen Anpassung kommen. Bei ungenügender Adhäsionsfläche kann es zum Zelltod kommen (Anoikis).

trices, beispielsweise Polyacrylamid- oder PDMS-Substrate, mit einer Ligandenbeschichtung zum Einsatz.^{143,144} In einer solchen Umgebung weisen Zellen mitunter eine deutlich andere Morphologie auf als auf klassischerweise verwendeten zweidimensionalen, harten Zellkulturträgern, was wiederum Einfluss auf die intrazelluläre Signalgebung nehmen kann, beispielsweise über ein geändertes Phosphorylierungsmuster an der Fokalen Adhäsionskinase.¹⁴⁵ Beispiele für die Anpassung der Zellstruktur an unterschiedliche Adhäsionsgeometrien umfassen unter anderem die Ausprägung von Adhäsionskontakten, den sogenannten Fokalen Adhäsionen, sowie den Ausbildungsgrad von Aktinstressfasern und die Zellform an sich.^{116,146,147} Weiterhin kann über die Dimensionalität und Geometrie auch die Art der Migration der Zelle gesteuert werden, da Zellen in starker räumlicher Einschränkung zu einer amöboiden Fortbewegung neigen.^{148,149} Die in dreidimensionalen fibrillären Netzwerken beobachtete Zellmorphologie und entsprechendes Zellverhalten lässt sich wiederum auch auf mikrostrukturierten Substraten hervorrufen, wenn quasi-eindimensionale Adhäsionsflächen (Streifen mit einer sehr geringen Breite) vorgegeben werden.^{150,151}

2.3.3 Einfluss der Umgebungsgeometrie auf die intrazelluläre Organisation

Die Umgebungsgeometrie kann einerseits die Zellkontur und damit maßgebliche Zellparameter, wie Zellfläche, -elongation und Krümmung des Zellrandes vorgeben. Andererseits erfolgt auch auf intrazellulärer Ebene eine Anpassung an die äußere Form. Ver-

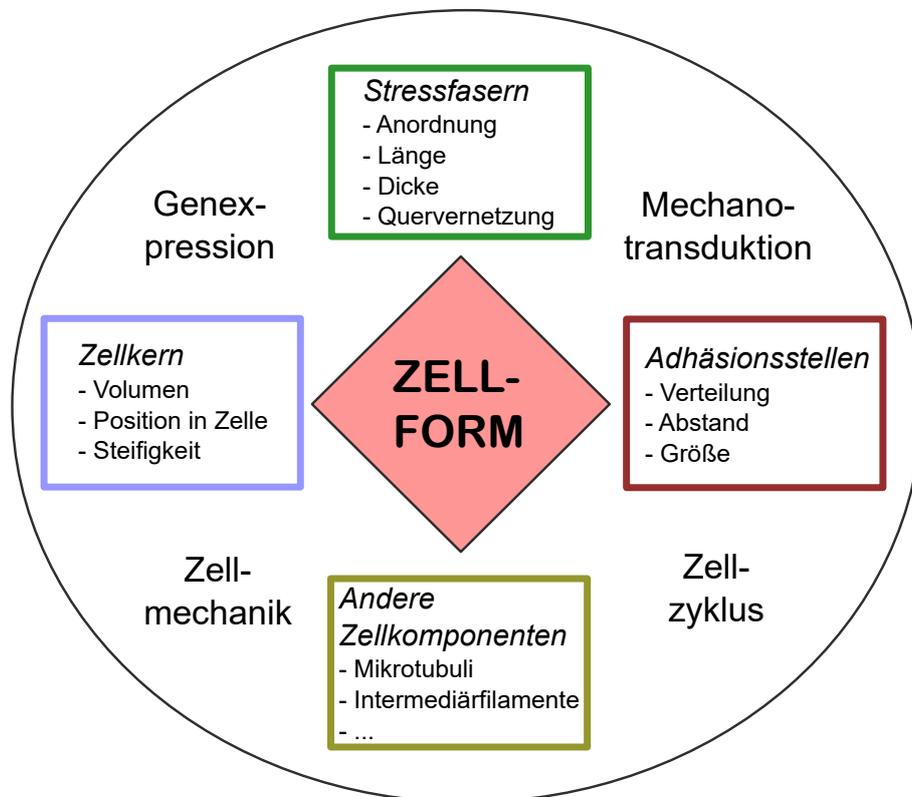


Abbildung 2.7: Die Zellform wechselwirkt mit funktionell und strukturell wichtigen Untereinheiten der Zelle. Diese Wechselspiel führt zur Beeinflussung relevanter Zellfunktionen, wie z. B. der Kraftübertragung, der Proliferation, der Genexpression und Differenzierung.

schiedene Zellbestandteile sind dabei verschieden betroffen und sollen im Folgenden kurz präsentiert werden (siehe Abb. 2.7 für eine Übersicht).

2.3.3.1 Aktinskelett

Das Aktinskelett ist bekannt als ein maßgebliches Zellelement zur Steuerung der Zellform und Zellmechanik. Dementsprechend viel Aufmerksamkeit wird dem Aktinskelett bei Untersuchungen zur Formanpassung von Zellen gewidmet. Das Aktinskelett kann durch verschiedene Parameter charakterisiert werden, unter anderem durch die Polarisierung (Grad der gleichmäßigen Ausrichtung), den Vernetzungsgrad und die Dicke der einzelnen Stressfasern.^{152–154} Bei all diesen Parameter konnte eine Beeinflussung durch die Zellform nachgewiesen werden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Elongation der Zelle zu einer ebenfalls verstärkten Polarisierung der Aktinstressfasern führt.^{22,136,155} Weiterhin wurde eine Verstärkung (Zunahme des Durchmessers) bei Stressfasern am Zellrand, speziell entlang

konkaver Abschnitte, beobachtet (bei Vorgabe von konkaven Adhäsionsflächen).^{19,156} Weiterhin wurde bei seitlich stark eingeschränkten Zellen sowie bei Zellen mit einer hohen Elongation eine geringere Ausprägung der zentralen Stressfasern beobachtet sowie eine Abnahme der Quervernetzung zwischen parallel zur langen Zellachse laufenden Stressfasern.^{151,153,157} Diese Beschreibung von Zellen auf mikrostrukturierten Oberflächen korreliert mit der Form von Muskelzellen im Gewebe, die länglich gestreckt sind. Dort sind die Stressfasern parallel angeordnet und zusammen mit anderen Proteinen in regelmäßigen Strukturen, den sogenannten Sarkomeren, zusammengefasst (siehe Abb. 2.5 und Abschnitt 2.2.2.4). Eine verstärkte Ausrichtung von Sarkomeren und Anpassung der z-Band-Strukturen von benachbarten Myofibrillen konnte auch *in vitro* in eingeschränkten Geometrien beobachtet werden.^{123,124}

In dreidimensionalen fibrillären Netzwerken wachsende Zellen zeigen oftmals ein weniger stark ausgebildetes Aktinskelett, was auf die reduzierte Adhäsion in Abhängigkeit der Viskoelastizität der Netzwerke sowie deren Mikrostruktur zurückgeführt wird.^{116,158,159} Dies unterstreicht die Wichtigkeit von Zellversuchen außerhalb der klassischen zweidimensionalen Versuchsumgebung.

2.3.3.2 Zellkern

Da das (Aktin-)Zytoskelett über Adapterproteinkomplexe mit dem Zellkern gekoppelt ist, wird auch die Struktur des Zellkerns durch die Umgebungsgeometrie beeinflusst.¹⁶⁰ In Migrationsexperimenten, in denen Zellen durch enge Kanäle oder Poren migrieren müssen, konnte eine starke Deformation und dadurch erhöhte Anpassungsfähigkeit des Zellkerns beobachtet werden.^{161,162} Ebenso kann es bei der Einengung von Zellen auf mikrostrukturierten zweidimensionalen beziehungsweise quasi-eindimensionalen Substraten zu einer auffälligen Elongation des Zellkerns kommen.^{22,163} Ein wichtiger Faktor für die Deformation und Positionierung des Zellkerns ist wiederum das Aktinskelett, spezieller die apikalen beziehungsweise perinukleären Aktinstressfasernt. Somit kann die Deformation des Zellkerns auch als ein Indikator für die Rigidität beziehungsweise Kontraktilität des Aktinzytoskeletts benutzt werden.¹⁶⁴ Ebenso ist die Positionierung des Zellkerns ein gelegentlich für die Kontraktilität der Zelle herangezogenes Maß.¹⁶⁵ Zum Beispiel konnte eine Wechselbeziehung zwischen der Orientierung des Zellkerns und der Ausrichtung der perinukleären Stressfasern nachgewiesen werden.⁵⁹

Aufgrund der veränderten Struktur des Zellkerns kann auch die Genexpression verändert werden, zum Beispiel kann die Variation des Kernvolumens ein verändertes Gleichgewicht zwischen Euchromatin und Heterochromatin durch Histonmodifikation mit sich bringen.¹⁶⁶ Dass die Änderung der Zellmorphologie eine Auswirkung auf die Genexpression und die Proliferation hat, konnte bereits gezeigt werden. Hierbei war die Adhäsionsfläche ausschlaggebend für das Zellkernvolumen, was wiederum Einfluss auf die Proliferation und das Fortschreiten des Zellzyklus hatte.^{136,167}

2.3.3.3 Andere Zellkomponenten

Neben den Aktinstressfasern werden auch andere Komponenten des Zytoskeletts durch externe Formgebung der Zelle in ihrer eigenen Anordnung beeinflusst. Beispielsweise kann über die Kopplung zwischen Aktinfasern und Mikrotubuli über Verbindungsproteine ebenfalls eine Ausrichtung der Mikrotubuli erfolgen.¹⁶⁸ Gleichzeitig sind Mikrotubuli ein lasttragender Bestandteil des Zytoskeletts und beeinflussen ihrerseits die Formgebung einer Zelle, beispielsweise im Axon einer Nervenzelle.¹⁶⁹ Ebenfalls durch die Zellform beeinflusst wird die Anordnung der Intermediärfilamente, die die dritte große Klasse der Strukturproteine bilden.¹⁵⁶

Die in Abschnitt 2.3.2 beschriebene Unterteilung der adhäsiven Substratfläche in Unterabschnitte, die deutlich kleiner als die Zellfläche sind, lässt sich noch weiter miniaturisieren, zum Beispiel in Größenordnungen unterhalb der Ausdehnung einer Fokalen Adhäsion (1–5 μm).³³ Für Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass Integrinclustering nur einsetzen kann, wenn die individuellen Bindestellen nicht mehr als 70 nm voneinander entfernt sind, und dass bei Abständen der adhäsiven Flächen von weniger als 500 nm eine Kopplung durch eine durchgängige Aktinfaser stattfindet.¹⁷⁰ Durch eine Beeinflussung der Substratstruktur auf der Nanometerebene ist es möglich, Adhäsionsliganden lokal zu konzentrieren und auch bei geringerer globaler Ligandendichte eine stärkere Zelladhäsion zu erreichen.¹⁷¹ Darüber hinaus konnte in murinen Fibroblasten gezeigt werden, dass es unterhalb einer Fläche von 0,1 μm^2 der adhäsiven Stellen zu keiner stabilen Ausbildung von Integrin-Fibronectin-Clustern und auch keiner Übertragung von Zellkräften auf das Substrat kommt.¹⁷² Folglich lässt sich durch eine Variation der Umgebungsgeometrie, inklusive der Anordnung der Adhäsionsliganden, nicht nur die generelle Zellform, sondern auch die intrazelluläre Struktur und dadurch das Zellverhalten beeinflussen.

2.3.4 Zellzugkräfte

Da durch die Vorgabe einer externen Struktur offensichtlich eine Beeinflussung der Zellform stattfindet, ebenso wie eine Anpassung des Zytoskeletts und speziell eine Modulation der Aktinstressfaseranordnung, und da es sich bei der Zelladhäsion um einen aktiven Prozess handelt, der von einer Kraftentwicklung durch die Zelle begleitet ist, ist es evident, dass auch die Wechselwirkung mit der Umgebung über die Generation von Zellzugkräften durch die Zellform beeinflusst wird. Deshalb sollen aktuelle Ergebnisse zur Abhängigkeit der Zellzugkräfte von der Zellgeometrie kurz rekapituliert werden. In der Literatur findet man dabei verschiedene, teilweise inkohärente Ergebnisse, was sich oft durch die Verschiedenheit der verwendeten Zelltypen, Substratgeometrien und unterschiedlichen Messmethoden erklären lässt.

2.3.4.1 Abhängigkeit der Zellzugkräfte von der Zellgröße

Allgemein und unabhängig von der Zellgeometrie lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Zellgröße und der Größe der gemessenen Zellzugkräfte herstellen. Der generelle Konsens ist, dass eine positive Korrelation zwischen der Zellgröße und der Größe der Zellzugkräfte existiert. Allerdings gibt es hierzu verschiedene funktionale Zusammenhänge, wobei einerseits eine Proportionalität zwischen Zellumfang und Gesamtmaß der Zellzugkräfte ($F \propto R$, F : Zellkraft, R : Zellradius)¹⁷³ und andererseits eine direkte Korrelation zwischen Zellfläche und Zellzugkräften ($F \propto R^2$)^{174,175} konstatiert wurde. Weiterhin wurden Beobachtungen gemacht, nach denen die Zellzugkraft mit dem Abstand zum Zellmittelpunkt zunimmt, wobei es widersprüchliche Angaben gibt, ob sich dies indirekt durch eine größere Fläche erklären lässt oder alleinig durch den Abstand.^{176,177} In der Regel wird eine Übertragung der Zellzugkräfte auf das Substrat am Zellrand festgestellt.¹⁷⁸

2.3.4.2 Abhängigkeit der Zellzugkräfte von der Zellelongation

Eine zunehmende Zellelongation ist durch ein zunehmendes Verhältnis aus Zelllänge zu Zellbreite charakterisiert, was ebenfalls von einer zunehmenden Polarisierung des Aktinskeletts gekennzeichnet sein kann.¹⁷⁹ Entsprechend kommt es bei einer stärkeren Elongation der Zelle zu einer ungleicheren Verteilung der Zellkräfte entlang der beiden Hauptachsen.¹⁸⁰ Bei Versuchen zum Einfluss der Zellelongation werden oftmals rechteckige Adhäsionsmuster oder anderweitig asymmetrisch beschränkte Muster zum Einsatz, die Einflüsse durch Zellgröße einerseits und Elongationsgrad andererseits nicht immer sauber voneinander trennen können. Einerseits gibt es Befunde, die eine Zunahme der Zellzugkräfte mit der Zunahme des Abstands der Adhäsionsstellen zum Zellmittelpunkt postulieren.¹⁷⁶ Andererseits dokumentieren andere Arbeiten, dass die Gesamtkraft unabhängig von der Zellgeometrie ist, die Dynamik der Zellzugkräfte (moduliert durch Inhibitoren und Aktivatoren der Zellkontraktilität) aber sehr wohl mit dem Elongationsgrad zunimmt.¹⁶³

2.3.4.3 Abhängigkeit der Zellzugkräfte von der Zellkontur

Neben den Maßen für die Zellgesamtläche und dem Längenverhältnis der Hauptrichtungskomponenten als Indikatoren für die Größe der Zellzugkräfte sind auch der Zusammenhang zwischen der Form der Zellkontur und der Lokalisierung der Hauptübertragungspunkte der Zellkräfte, also den am stärksten beanspruchten Fokalen Adhäsionen, Gegenstand der Forschung. Hierzu konnte gezeigt werden, dass Zellkräfte verstärkt an Positionen der Zellkontur mit erhöhtem Krümmungsradius auf das Substrat übertragen werden.¹⁸¹ Teilweise wird sogar eine Entkopplung der Zellzugkraft von den Maßen der Zelldimensionen, wie Fläche und Elongation, nahegelegt und stattdessen der lokale Krümmungsradius der Zellkontur als Hauptfaktor vorgeschlagen.¹⁸¹ Mögliche Erklä-

rungsansätze hierfür sind ein erhöhtes Membran-zu-Zytosol-Verhältnis beziehungsweise die Lokalisation von krümmungssensitiven Proteinen, die sich bevorzugt an gekrümmten Membranbereichen anlagern und dort zu einer verstärkten Lokalisierung von Adhäsionsproteinen führen.³

Weiterhin wurden in dreidimensional aufgelösten Zellzugkraftfeldern von Zellen auf zweidimensionalen elastischen Substraten in der Nähe des Zellkerns auch nichtvernachlässigbare Kraftkomponenten in z -Richtung beobachtet. Dies wurde auf Aktinstressfasern zurückgeführt, die durch den Zellkern aus der x - y -Ebene gebogen wurden. Eine Übertragung dieses Mechanismus auf Adhäsionsstellen am Zellrand hätte allerdings zur Folge, dass bei der üblicherweise stattfindenden Betrachtung von Kräften in der x - y -Ebene die Kraftkomponente entlang der z -Achse nicht berücksichtigt wird und es deshalb zu einer Unterschätzung der Zellzugkräfte kommt an Stellen, an denen die apikale Zellmembran (mit apikalen Stressfasern) in einem nicht vernachlässigbaren Winkel auf die Zellfläche trifft.¹⁸² Weiterhin wurde beobachtet, dass es bei der Zellausbreitung auf einem Substrat erst unterhalb eines Kontaktwinkels von ca. 90° zur Ausbildung von Fokalen Adhäsionen und zur Erhöhung der Kontraktilität kommt.¹⁸³

2.3.4.4 Abhängigkeit der Zellzugkräfte vom Aktinzytoskelett

Eine Abhängigkeit der Zellzugkräfte vom Aktinzytoskelett ist insofern zweifelsfrei belegt, als dass die Verknüpfungspunkte zwischen Zelle und Substrat, die Fokalen Adhäsionen, ebenso dem Aktinskelett als Anknüpfungspunkt dienen. Einerseits konnte eine entsprechende Kolo-kalisation von Punkten der Zellzugkraftapplikation und der Aktinstressfasern belegt werden, mit einem Verhältnis der Kraft zur Fläche von etwa $5,5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$.¹⁸⁴ Andererseits wurde in verschiedenen Studien eine Korrelation zwischen der Fließgeschwindigkeit der Aktinstressfasern beziehungsweise des Retrograden Flusses und der auf das Substrat übertragenen Kraft postuliert, wobei sowohl eine negative Korrelation¹⁸⁵ als auch ein biphasisches Verhalten mit einer "optimalen Fließgeschwindigkeit" vorgeschlagen wurden.¹⁸⁶ Neben einem Zusammenhang zwischen der Fließgeschwindigkeit des Aktinskeletts und der an einer Fokalen Adhäsion übertragenen Kraft wird auch ein Einfluss der Dicke der anliegenden Aktinstressfaser auf die Kraftübertragung beobachtet.¹⁸⁵

Weiterhin wurde bei der Betrachtung der initialen Zelladhäsion, während derer die Zelle eine ständige Formänderung durchmacht, ein wesentlicher Beitrag des sich mit der Zeit verstärkenden Aktinskeletts zur Entwicklung der Zellzugkräfte diskutiert.¹⁸⁷

Allerdings hat es sich als schwierig erwiesen, einen direkten Zusammenhang zwischen der lokalen Beschaffenheit und Dynamik des Aktinskeletts und der Kraftentfaltung an ausgewählten Fokalen Adhäsionen zu konstruieren. Ein Grund hierfür ist die hohe Komplexität des Aktinnetzwerks, in dem es zahlreiche Quervernetzungen zwischen benachbarten Stressfasern und Kreuzungspunkte gibt. Es konnte gezeigt werden, dass bei Ablation einzelner Stressfasern es zu einem globalen Umbau des gesamten Aktinnetzwerks einer

Zelle kommen kann.¹⁵³ Insofern erscheint es fraglich, ob die direkte Korrelation von lokaler Aktinnetzwerkarchitektur und punktueller Kraftübertragung möglich ist. Zweifelsohne konnte aber in Inhibitorversuchen nachgewiesen werden, dass es einen Zusammenhang zwischen globaler F-Aktinmenge und der Größe der Zellzugkräfte gibt. Gleichzeitig ist allerdings bekannt, dass eine Zelle auch in Abwesenheit kontraktiver Aktinstressfasern Kräfte auf ein Substrat übertragen kann beziehungsweise zur Migration fähig ist.¹⁸⁵

2.4 Biophysikalische Beschreibung und Modellierung der Zelladhäsion in räumlicher Einschränkung

Zur Beschreibung der zeitlichen Entwicklung der initialen Zelladhäsion und der Anpassung von Zellen an anisotrope Adhäsionsgeometrien existieren verschiedene biophysikalische Modelle, auf die in diesem Abschnitt kurz eingegangen werden soll. Die Modelle unterscheiden sich zum einen hinsichtlich ihres Abstraktionsgrades. Es gibt sowohl Modelle, die die gesamte Zelle als homogenes Medium annehmen und beispielsweise die zeitliche Entwicklung der Zellfläche beschreiben. Andererseits gibt es auch Modelle, die die Strukturentstehung innerhalb der Zelle ausgehend von einem repräsentativen Zellausschnitt erklären. In diesen Modellen kann zum Beispiel Bezug auf Komponenten des Zellskeletts oder die Fokalen Adhäsionen genommen werden und womit auch biochemische Prozesse berücksichtigt werden können. Insbesondere existieren Modelle, die lokal die Entstehung von Stressfasern, die dazugehörige Kinetik und Abhängigkeit von Umgebungsparametern beschreiben. Weiterhin variieren die Modelle im Grad der Beschreibung von Dynamik und ihrer Determiniertheit. Ebenso lässt sich eine Unterscheidung der Modelle anhand einer Kontinuumsbeschreibung oder einer Teilchenbeschreibung der Zellkomponenten vornehmen. Ausgehend von detaillierteren Modellen zur Beschreibung der Stressfaserarchitektur wird auch die Vorhersage der Zellzugkräfte angestrebt. Im Folgenden werden mögliche Modellierungsansätze, grob geordnet nach dem Grad der Abstraktion, kurz dargestellt.

2.4.1 Modellierung auf Zellebene

2.4.1.1 Passives Medium

Eine einfache Beschreibung der Zelladhäsion ist deren Darstellung als Benetzungsvorgang. Hierbei wird der komplexe Aufbau einer Zelle ebenso vernachlässigt wie die Tatsache, dass es sich um einen aktiven, dissipativen Prozess eines Systems außerhalb des thermodynamischen Gleichgewichts handelt. Die Zelladhäsion wird stattdessen allein durch Grenzflächenenergien und Oberflächenspannungen erklärt¹⁸⁸. Dies lässt sich über eine attraktive Wechselwirkung zwischen Zellrezeptoren und Adhäsionsliganden ei-

nerseits und den mechanischen Eigenschaften der Zellmembran in Kombination mit denen des Zellkortex' andererseits motivieren.⁷⁷

Weiterhin wurde ausgehend von diesem Ansatz die sogenannte Differential-Adhesion-Hypothese abgeleitet, die eine Sortierung von Zellen in innere und äußere Schichten eines Zellhaufens als Resultat der verschiedenen gegenseitigen Adhäsionsenergien erklärt und so einen einfachen Erklärungsansatz für die Organisation heterogener mehrzelliger Strukturen liefert.¹⁸⁹

Dieser einfache Ansatz zur Modellierung der Zelladhäsion als Benetzungsvorgang erbringt ebenfalls brauchbare Ergebnisse bei der Beschreibung von Zellen auf begrenzten adhäsiven Flächen, die ein Abkugeln eines Flüssigkeitstropfens bewirken würden, was als Analogie zu einer Änderung der Zellmorphologie oder des Zellverhaltens betrachtet werden kann.^{190,191} Für Details der Zelladhäsion auf Proteinebene und lokale Struktursteherung kann dieser Modellansatz allerdings keine Beschreibung liefern.

2.4.1.2 Aktives Medium

Der Begriff "aktives Medium" erweitert den Begriff des passiven Mediums um den Energieumsatz, da durch ATP-Verbrauch in biologischen Systemen chemische Energie in Bewegungsenergie umgewandelt werden kann und es so zur Ausbildung von Konzentrationsgradienten und mechanischen Spannungen kommen kann. Diese Beschreibung wird gewählt, um besonders das Zusammenspiel aktinbindender Proteine und gegebenenfalls Myosin-Motorproteinen sowie des Aktinkortex abzubilden und davon ausgehend eine Erklärung zur Beschreibung der Zelladhäsion zu finden, auch unter Einbezug von Analogien zur Hydrodynamik und Benetzungsprozessen.^{192,193} Zusätzlich lässt sich dieses System auch gut experimentell darstellen und untersuchen.¹⁹⁴

Um den zellulären Regulationsmechanismen während der Zelladhäsion besser Rechnung zu tragen, wurden Modelle entwickelt, die eine zeitlich veränderliche Kontraktilität und Grenzflächenenergie der Zelle unterstellen. Dies soll eine bessere Anpassung an die Zunahme von Aktinstressfasern während der initialen Zelladhäsion sowie eine zeitlich unterschiedliche Aktivierung der Adhäsionsliganden sein. Auf diese Weise kann die Flächenzunahme während der initialen Zelladhäsion, auch im Zusammenhang mit dem Anstieg der Zellzugkräfte, besser beschrieben werden. Hierbei können auch dissipative Prozesse während der Zellausbreitung berücksichtigt werden.¹⁸⁷

Einerseits kann die Zelle als Ganzes als aktives Medium mit gewissen Eigenschaften, wie zum Beispiel Elastizität, Viskosität oder Kontraktilität modelliert werden.^{152,195} Andererseits kann das Zellinnere auch detaillierter als kontraktiles Netzwerk modelliert werden, welches an ausgewählten Stellen mit dem Untergrund verknüpft ist. Bei einer Angleichung der Netzwerkarchitektur und Zellform an experimentell bestimmte Vorbilder ist dabei der Übergang zu einer Modellierung der intrazellulären Architektur und deren Einfluss auf die Verteilung der Zellzugkräfte gegeben.^{196,197}

2.4.2 Modellierung intrazellulärer Strukturen

2.4.2.1 Berücksichtigung kontraktile Elemente

Ein einfaches Modell zur Einbeziehung von Zellkomponenten stellt das Active-Cable-Network-Modell dar. Dabei werden Verknüpfungen innerhalb der Zelle und am Zellrand als kontraktile Elemente modelliert, die einen Widerstand gegen Expansion, nicht aber gegen Kompression aufweisen. Hierdurch kann auch eine lokale Modellierung einer gegebenen Zellstruktur durchgeführt werden.¹⁹⁸ Weiterhin besteht die Möglichkeit, aus einer gegebenen Konfiguration von Verknüpfungspunkten (z. B. Fokale Adhäsionen) mit dem Substrat und deren Verbindung über ein solches Netzwerk, das heißt einer gegebenen Stressfaserkonfiguration, Rückschlüsse auf mögliche Zellzugkräfte zu ziehen.^{196,197}

So wie die Wechselwirkung zwischen Adhäsionsrezeptoren und -liganden als Grenzflächenenergie modelliert wird, kann die durch das Aktinnetzwerk gegebene Kontraktilität als Oberflächenspannung beschrieben werden. Diese kann noch ergänzt werden durch eine Linienspannung entlang des Zellrandes. Diese ergibt sich aus der Kontraktilität von randständigen Aktinfasern. Somit konnte eine Anpassung der Zellform (Zellkontur) und der Dicke (Kontraktilität) von Stressfasern am Zellrand erreicht werden.¹⁹⁹ Neben der Berücksichtigung des Aktinnetzwerkes als kontraktiles, der Zellausdehnung entgegenwirkendes Element, existiert der Ansatz, zusätzlich den Einfluss von Mikrotubuli auf die Ausbreitung und Geometrieangepassung von Zellen zu modellieren.²⁰⁰

2.4.2.2 Musterbildung

Die obengenannten Modelle genügen in der Regel, um die zeitliche Entwicklung der Zellform und eventuell der Zellzugkräfte während der initialen Zelladhäsion vorherzusagen. Großes Interesse besteht allerdings auch am Modellieren intrazellulärer Strukturen und deren Muster, wie speziell des Aktinzytoskeletts und dessen charakteristischer Erscheinung, wie zum Beispiel der mittleren Ausrichtung (bzw. Anisotropie) der Stressfasern. In diesem Kontext ist die während der Zelladhäsion stattfindende Polarisierung der Zelle (Symmetriebrechung) von besonderem Interesse.^{152,201,202}

Zur Modellierung der Musterbildung wird oftmals ein Zellausschnitt als Struktureinheit beziehungsweise als repräsentativer Bereich der Zelle gewählt. Um die intrazelluläre Organisation zu modellieren, kommen unter anderem Reaktions-Diffusions Modelle zum Einsatz. Hierbei werden durch die Substrateigenschaften, wie Geometrie, Topographie oder Spannung Randbedingungen vorgegeben, die entsprechende Konzentrationsprofile von Signalmolekülen nach sich ziehen, die zu einer lokalen Modulation der Entstehungswahrscheinlichkeit von Stressfasern führen. Ebenso kann die Wechselwirkung regulatorischer Proteine in einer gegebenen Geometrie zu einer Variation des Fläche-Volumen-Verhältnisses führen und so Musterbildung erklärt werden.²⁰³ Eine Abwandlung dieses Prinzips zur Erklärung von Musterentstehung stellt der Einbezug eines aktiven Trans-

ports durch kontraktile Elemente, angelehnt an Myosinmotoren im Aktinkortex, dar. Auf diese Weise kann es auch zu einer lokalen Aggregation beziehungsweise Verarmung von Teilchen beziehungsweise Keimbildung für Stressfasern kommen.

Daneben werden thermodynamische Modelle eingesetzt, die von den enthalpischen und entropischen Parametern der Teilchen von Interesse ausgehen, um eine Musterbildung durch Reaktionsraten zwischen den beteiligten Molekülen (Myosine, Aktinmonomere und -Filamente) zu modellieren.²⁰⁴ Zwar ist durch diesen Ansatz ein Einbezug biochemischer Signalwege möglich, allerdings ist die Auswahl entsprechender Signalmoleküle in der Regel stark begrenzt, um die Komplexität des Modells gering zu halten. Nichtsdestotrotz lässt sich so eine Aktivierung beziehungsweise Inhibierung der Bildung von Stressfasern modellieren.²⁰⁵ Es ist also eine Verknüpfung mit biochemischen Signalkaskaden innerhalb der Zelle möglich, die bei anderen Modellen in der Regel ausgeklammert wird.

In einige Modelle fließt zudem noch die Kopplungsstärke an das Substrat beziehungsweise die Matrixhärte ein, da bekannt ist, dass zur Erhaltung von Stressfasern zum einen Myosinkontraktilität und zum anderen ein Mindestwiderstand durch das Substrat gegeben sein muss. Zusätzlich können noch weitere mechanische Parameter, wie die mittlere Fließgeschwindigkeit des Aktinnetzwerks im Lamellipodium oder dessen gemittelte mechanische Eigenschaften, berücksichtigt werden.⁸¹

Da diese Modelle oftmals von einer Wiederholeinheit eines ausgedehnten Musters ausgehen, ist ein Zusammenhang zwischen dem lokal erzeugten Muster und der globalen Zellform nicht unmittelbar gegeben. Allerdings lassen sich mit Hilfe solcher Modelle verschiedene Musterentstehungsprozesse hinsichtlich ihrer Plausibilität überprüfen und verschiedene Regime beziehungsweise kritische Zustände der Musterbildung, zum Beispiel der Übergang zur Zellausbreitung oder die Entstehung einer Lamellipodium-/Lamellum-Grenzfläche, analysieren.³⁹

2.4.2.3 Simulationen

Ausgehend von Modellen der an der Musterbildung des Zytoskeletts beteiligten Komponenten (Substrat, Rezeptoren, Aktinfilamente etc.) und deren Wechselwirkungen können neben analytisch lösbaren Modellen auch Computersimulationen durchgeführt werden. Damit lässt sich besser der Variabilität und dem "Rauschen" sowie der Komplexität biologischer Systeme Rechnung tragen. Für die Modellierung intrazellulärer Komponenten werden dafür oftmals diskrete Elemente verwendet, die miteinander in Wechselwirkung treten können. Untersuchungsgegenstände solcher Simulation können wiederum die Entstehung von Stressfasern in Abhängigkeit der Substratparameter oder der Auf- und Abbau von Fokalen Adhäsionen sein. Daraus folgt, dass auch die Dynamik der Zelladhäsion modellierbar ist.⁸¹ Daneben existieren auch Finite-Element-Methoden zur Modellierung der gesamten Zelle. Beispielsweise kann so das Tropfenmodell mit einer

Kortex-Innenhülle auf den Rechner übertragen werden.²⁰⁶ Zur Modellierung der Entwicklung der Zellform haben neben der *Wetting Transition* auch andere physikalische Modelle Verwendung gefunden, so zum Beispiel das Potts-Modell, bei welchem ein inkrementeller stochastischer Auf- und Abbau der Zellfläche am Rand stattfindet.¹⁷³ Ebenso kann das Zellskelett als Netzwerk kontraktile Elemente modelliert beziehungsweise simuliert werden (siehe Abschnitt 2.4.2.1).

2.4.3 Modellierung der Zellzugkräfte

Wie oben bereits angeführt (Abschnitt 2.4.1.2), ist es ansatzweise möglich, aus der Verteilung kontraktile Elemente innerhalb der Zelle beziehungsweise ausgehend von den Adhäsionspunkten auf die Kraftübertragung der Zelle auf das Substrat Rückschlüsse zu ziehen.¹⁹⁶ Bei solchen Ansätzen können auch Flächenspannungen und Linienspannungen, motiviert durch kontraktile periphere Stressfasern, benutzt werden, um ausgehend von der Zellform die Verteilung der Zugkräfte zu modellieren.¹¹² Neben einer solchen, auf konkrete Zellbilder und Zellkomponentenkonfigurationen angepassten Vorhersage der Zellzugkräfte gibt es auch allgemeinere Ansätze, um generellere Zusammenhänge zwischen Zellmorphologie und der Verteilung von Zellzugkräften aufzuzeigen. Zum Beispiel wird eine näherungsweise Abschätzung der Zellkraft an einem Punkt der Zellkontur mittels des Flächenträgheitsmoments über diesen Punkt vorgeschlagen. Dies bedeutet, dass die Kraft mit zunehmendem Abstand zum Zellmittelpunkt zunimmt und dass die Summe der Kraftvektoren entlang einer Raumrichtung direkt proportional zur Ausdehnung der Zelle entlang dieser Richtung ist.²⁰⁷ Zudem lässt sich auch aus der Form der Zelle eine relative Abschätzung der wirkenden Kräfte durchführen.²⁰⁸ So ergibt die Anwendung des Potts-Modells eine direkte Abhängigkeit der Gesamtkraft vom Zellumfang.¹⁷³

Ein gängiger Ansatz, um die Kraftverteilung von Zellen näherungsweise zu beschreiben, ist deren Darstellung als Kraftdipol. Dies ist besonders bei polarisierten Zellen beziehungsweise Zellen in anisotropen Adhäsionsgeometrien sinnvoll. Hierbei werden die Kraftvektoren in die Komponenten entlang zweier orthogonaler Hauptrichtungen aufgeteilt, die entweder durch die Zell- oder Substratgeometrie vorgegeben sind.^{195,209}

Weitere Arbeiten beschäftigen sich mit der Kraftentwicklung innerhalb von Zellverbänden und Kopplungen der Kraftentwicklung benachbarter Zellen über die Adhäsionsmatrix. Es wurde sowohl durch theoretische wie auch experimentelle Arbeiten gezeigt, dass sich so benachbarte Zellen hinsichtlich ihrer Ausrichtung beziehungsweise Polarisierung beeinflussen und mittels ihrer Zugkräfte miteinander kommunizieren können.^{62,210}

Zusätzlich kann besonders die komplexe Kopplung des Aktinzytoskeletts an das Substrat berücksichtigt werden. Diese wird vielfach als effektive Reibung beschrieben, um das transiente Binden der Rezeptoren am Substrat beziehungsweise der Stressfasern an den Adhäsionskomplexen zu berücksichtigen.^{37,187}

2.5 Zielstellung dieser Arbeit

Wie im vorangegangenen Text beschrieben wurde, existieren viele Beobachtungen zum Verhalten von Zellen in räumlicher Einschränkung, die teilweise zu widersprüchlichen Schlussfolgerungen führen, wie zum Beispiel unterschiedlichem Zellverhalten bei einer gegebenen Adhäsionsfläche und der Gesamtfläche der Zelle.

In experimentellen Arbeiten wird oftmals der Fokus auf die initiale Zelladhäsion gelegt und deren Dynamik untersucht, während die spätere Zelladhäsion eine untergeordnete Rolle spielt. Im Gegensatz dazu muss im Gewebe eine übergreifende Zellordnung bewahrt bleiben, während gleichzeitig die Möglichkeit zur Umordnung gegeben ist. Ebenso steuern Modelle zur Zelladhäsion in der Regel auf ein makroskopisches Äquilibrium zu, gegeben durch die Minimierung eines Energiefunktional – eine kontinuierliche Dynamik wird selten berücksichtigt. Zellen befinden sich allerdings in einem Fließgleichgewicht, in dem sie permanent chemische Energie verbrauchen; zusätzlich kann auch die räumliche Einschränkung durch das umliegende Gewebe zeitlichen Veränderungen unterliegen, wodurch eine dynamische Anpassung erfolgen muss. Folglich stellt sich die Frage, ob eine einmal entstandene Polarisierung und Anpassung der Zelle aufrechterhalten wird, wenn die Zelle nicht vollumfänglich eingeschränkt ist, und ob eine konstante Rückkopplung der Zelle auf die räumliche Einschränkung vorliegt.

Ziel dieser Arbeit ist es, zur Beantwortung dieser Fragen beizutragen. Hierfür nötig ist eine quantitative und zeitaufgelöste Charakterisierung der Zellmorphologie (generelle Zellform und intrazelluläre Struktur) und der Zellzugkraftentwicklung als einer wichtigen Zellfunktion bei der Strukturierung von Gewebe. Als Geometrie, die adhärenente Zellen einerseits räumlich einschränkt, gleichzeitig aber auch einen Freiheitsgrad der Ausbreitung bietet, werden Streifen unterschiedlicher Breite benutzt, auf denen Zellen anwachsen können. Das experimentelle Vorgehen wird im nächsten Kapitel beschrieben.

Konkret sollen die folgenden drei Fragen als Motivation für diese Arbeit dienen:

- (1) Wie passen sich Zellen morphologisch an laterale Einschränkung an?
Dies soll sowohl auf die allgemeine Zellform bezogen werden als auch auf die intrazelluläre Struktur. Im Fokus steht das Aktinskelett, da dieses eine zentrale Rolle bei der Mechanotransduktion einnimmt.
- (2) Ist die Dynamik des Aktinskeletts durch die laterale Einschränkung beeinflusst?
Hierbei soll untersucht werden, inwieweit die Dynamik der intrazellulären Strukturbildung durch laterale Einschränkung beeinflusst wird.
- (3) Wie wird die Zellkraftentwicklung durch laterale Einschränkung beeinflusst?
Zusätzlich soll untersucht werden, welche morphologischen Parameter mit der Zellkraftentwicklung korrelieren.

3 Materialien und Methoden

3.1 Substratpräparation

Die Versuche wurden auf speziell präparierten und eigens strukturierten Zellkulturträgern durchgeführt, deren Herstellung im Folgenden beschrieben wird. Eine schematische Gesamtübersicht der Substratpräparation ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

3.1.1 Deckglasfunktionalisierung

3.1.1.1 Reinigung

Bevor die Deckgläser funktionalisiert werden konnten, war eine gründliche Reinigung erforderlich. Zu diesem Zweck wurden die Deckgläser (i.d.R. Stärke 1,5, VWR, Darmstadt) in Teflon-Karusselle einsortiert und in Batteriegläsern für eine halbe Stunde in Reinstwasser ($18,2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$, Milli-Q, Merck Millipore, Darmstadt) im Ultraschallbad behandelt. Anschließend erfolgte eine zweimalige Spülung mit Reinstwasser, worauf sich wiederum eine halbstündige Ultraschallbehandlung in Ethanol 99 %, vergällt mit Methylethylketon (Brüggemann, Wittenberg), anschloss. Nach erneutem zweimaligen Spülen mit Reinstwasser folgte die Überführung der Deckgläser in eine unter dem Abzug auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmte RCA-Lösung¹ aus fünf Teilen Reinstwasser, einem Teil 35%igem Wasserstoffperoxid (medizinisch reinst, Merck) und einem Teil Ammoniaklösung (25 %, reinst, Grüssing, Filsum). Hierdurch erfährt die Oberfläche neben der Reinigung auch eine Aktivierung. Nach zehn Minuten Inkubation in dieser Lösung wurden die Deckgläser entnommen, wiederum zweimal mit Reinstwasser gespült und schließlich im Stickstoffstrom getrocknet. Direkt im Anschluss erfolgte die weitere Funktionalisierung entweder mit Amin-Gruppen (Abschnitt 3.1.1.2) oder mit Acryl-Gruppen (Abschnitt 3.1.1.3).

3.1.1.2 Aminfunktionalisierung und Kopolymerbeschichtung

Um einerseits ein unkontrolliertes Anwachsen von Zellen auf den Deckgläsern zu vermeiden, andererseits aber eine gezielte Aufbringung von Adhäsionsprotein zu ermöglichen, wurden die gereinigten Deckgläser mit einem Kopolymer beschichtet. Für dessen kovalente Anbindung wurden die Glasoberflächen zuerst mit einer Aminosilanschicht

¹nach *Radio Corporation of America* benannt

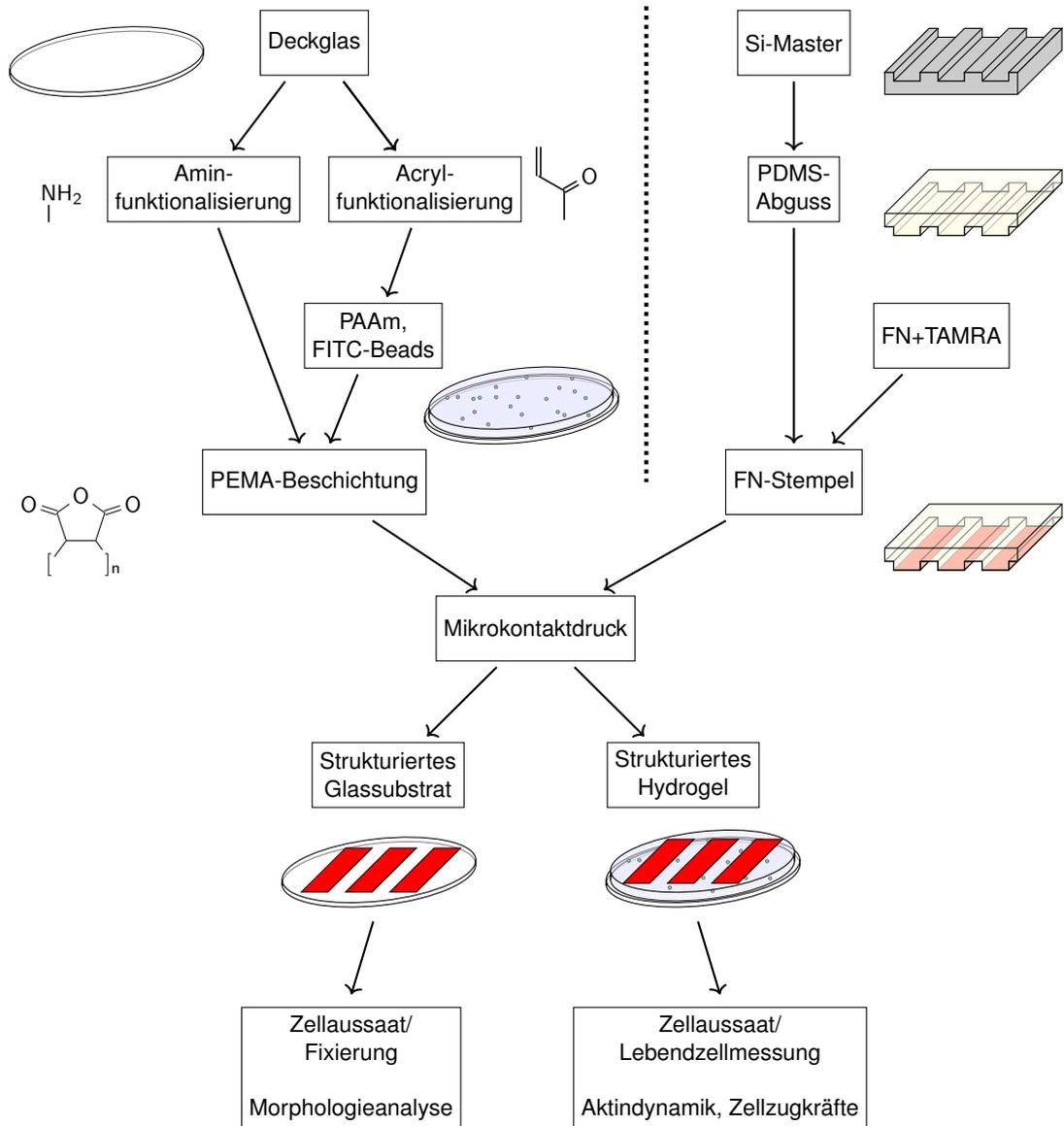


Abbildung 3.1: Schema der Substratpräparation. Glasträger werden funktionalisiert und gegebenenfalls mit einem Polyacrylamid-Hydrogel beschichtet (PAAm, mit FITC-Beads, fluoreszenten Mikrokügelchen). Die Beschichtung der Substrate mit einem Kopolymer (PEMA) führt zu einer Passivierung im hydrolysierten Zustand, d. h. die Zelladhäsion wird verhindert. Um ein Anwachsen von Zellen zu ermöglichen, werden die Substrate mit fluoreszenzmarkiertem Fibronectin (FN-TAMRA) strukturiert. Die Strukturierung wird durch Mikrokontaktdruck erreicht. Die Herstellung der Stempel erfolgt durch einen Silikon-Abguss (PDMS) von einem strukturierten Silizium-Wafer (Si-Master).

funktionalisiert. Hierzu wurden die Deckgläser aus Abschnitt 3.1.1.1 in eine Lösung aus Reinstwasser und 2-Propanol (p.a., Carl Roth) im Volumenverhältnis 9:1 und 20 mM 3-Aminopropyltriethoxysilan (98 %, Alfa Aesar, Ward Hill, USA) überführt und zwei Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen mit 2-Propanol, Trocknung mit Stickstoff und ein einstündiges Tempern bei 120 °C. Daraufhin wurde das Kopolymer Poly(ethen-alt-maleinsäureanhydrid) (PEMA, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) angebunden. Über die Anhydridgruppen kann eine kovalente Kopplung an Amingruppen erfolgen, andererseits kommt es bei der Hydrolyse der Anhydride (in wässriger Umgebung) zu einer Steigerung der Hydrophilie des Kopolymers, wodurch Zelladhäsion behindert wird.

Zur Aufbringung des Kopolymers wurde dieses in einem Gemisch aus einem Teil Aceton (p.a., Applichem) und zwei Teilen Tetrahydrofuran (p.a., Grüssing) zu einer Konzentration von 0,14 % (Gew.) gelöst und die Lösung mittels eines Spritzenfilters (PTFE, 0,2 µm, VWR) von Verunreinigungen gesäubert. Anschließend wurde die Lösung per Rotationsbeschichtung auf die Deckgläser aufgebracht (20 s bei 4000 rpm und 1500 rpm/s). Dabei kamen 50 µl Lösung für Deckgläser mit einem Durchmesser von 13 mm und 120 µl für Substrate mit einem Durchmesser von 22 mm zum Einsatz. Anschließend wurden die Deckgläser für zwei Stunden bei 120 °C getempert, um ein kovalentes Anbinden des Kopolymers zu gewährleisten. Die Deckgläser wurden schließlich für 15 Minuten in Aceton inkubiert und bei Entnahme nochmals mit Aceton gespült, um ungebundenes Polymer zu entfernen. Die Lagerung der Deckgläser erfolgte bei Raumtemperatur in einer mit Parafilm versiegelten Petrischale für bis zu drei Monate, innerhalb derer die Beschichtung laut Protokoll (AG Pompe) stabil bleibt.

3.1.1.3 Acrylsilanisierung

Um eine kovalente Anbindung von Polyacrylamidhydrogelen auf den Deckgläsern zu ermöglichen, wurden die gereinigten Deckgläser aus Abschnitt 3.1.1.1 mit Acrylgruppen funktionalisiert. Die Deckgläser wurden dazu für zwei Stunden in einer Lösung aus Wasser und Ethanol (p.a.) im Volumenverhältnis 20:1 und 20 mM 3-Acryloxypropyltriethoxysilan (≥ 94 %, Alfa Aesar) inkubiert. Nach zweimaliger Spülung mit Ethanol (99%, vergällt) wurden die Deckgläser im Stickstoffstrom getrocknet und für eine Stunde bei 120 °C getempert. Die Deckgläser wurden schließlich für bis zu drei Monate in einer mit Parafilm versiegelten Petrischale bei 4 °C gelagert.

3.1.2 Hydrogelpräparation

Um einerseits den untersuchten Zellen ein Substrat mit einer Härte im physiologischen Bereich anzubieten und andererseits eine Messung der Zellzugkräfte zu ermöglichen, fand eine Beschichtung der Deckgläser mit Polyacrylamidgelen statt. Dazu wurde eine Polymerisationslösung mit 4,5 Gew.-% Acrylamid (Carl Roth), 0,3 Gew.-% Bis-Acrylamid

3 Materialien und Methoden

Bestandteil/ Ausgangs- konzentration	$E = 9 \text{ kPa}$		$E = 5 \text{ kPa}$	
	Ziel- konzentration	Volumen	Ziel- konzentration	Volumen
Bis-Acrylamid 2 Gew.-%	0,3 Gew.-%	60 μl	0,1 Gew.-%	20 μl
Acrylamid 30 Gew.-%	4,5 Gew.-%	60 μl	4,5 Gew.-%	60 μl
TEMED 1,2 Gew.-%	0,06 Gew.-%	20 μl	0,06 Gew.-%	20 μl
FITC-Beads	5 Vol.-%	20 μl	—	—
ddH ₂ O	—	236 μl	—	296 μl
APS 5 Gew.-%	0,05 Gew.-%	4 μl	0,05 Gew.-%	4 μl

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Polymerisationslösungen für die Hydrogelherstellung. Die Ansätze ergeben jeweils 400 μl . Das Gel mit $E = 9 \text{ kPa}$ wurde für Zellzugkraftmessungen eingesetzt und enthält deshalb fluoreszente Kügelchen (FITC-Beads). Das Gel mit $E = 5 \text{ kPa}$ wurde für die Morphologieanalyse verwendet.

(Carl Roth), 0,075 Vol.-% N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED; Applichem, Darmstadt) und 0,05 Gew.-% Ammoniumperoxodisulfat (APS; Carl Roth) hergestellt (siehe Tabelle 3.1). Für Substrate zur Zellzugkraftmessung wurden zusätzlich fluoreszente Mikrokügelchen (FITC-markiert, Polysciences, Warrington, USA) mit einem Durchmesser von 500 nm eingebracht. Die Suspension wurde zu einem Anteil von 5 Vol.-% der Polymerisationslösung hinzugefügt. Der Ansatz erfolgte mit entgastem Reinstwasser. Jeweils 25 μl der Polymerisationslösung wurden auf ein mit Sigmacote (hydrophobe Beschichtung; Sigma, Deisenhofen) beschichtetes Deckglas mit 32 mm Durchmesser gegeben und mit einem acrylsilanisierten Deckglas (22 mm Durchmesser) aus Abschnitt 3.1.1.3 abgedeckt.

Nach der Polymerisation (Dauer ca. 20 min) wurden die Gele mit Reinstwasser überschichtet und die Sigmacote-Deckgläser mit einer Pinzette abgenommen. Es erfolgte eine weitere Inkubation der an die acrylsilanisierten Deckgläser gebundenen Gele im Wasser, um diese zu spülen und von Rückständen der Polymerisationslösung zu reinigen. Daran schloss sich eine Trocknung der Gele im Vakuumtrockenschrank bei Raumtemperatur und einem eingestellten Druck von 14 mbar für ca. 45 min an. Die getrockneten Gele wurden schließlich mit dem Kopolymer PEMA (Details siehe Abschnitt 3.1.1.2) via Rotationsbeschichtung funktionalisiert, wobei danach kein Tempern erfolgte. Die Gele

wurden für maximal drei Tage im getrockneten Zustand in einer mit Parafilm versiegelten Petrischale bei 4 °C gelagert. Die so hergestellten Gele hatten ein Elastizitätsmodul von $E = 9 \text{ kPa}$ und eine Querkontraktionszahl von $\nu = 0,48^{211}$ und kamen für Zellzugkraftmessungen und Untersuchungen der Aktindynamik zum Einsatz.

Die Herstellung von Gelen mit einem E -Modul von 5 kPa zur Morphologiemessung erfolgte nach dem gleichen Vorgehen wie oben beschrieben, jedoch mit anderen Konzentrationen der Gelbestandteile, welche aus der Tabelle 3.1 entnommen werden können.

3.1.3 Oberflächenstrukturierung

3.1.3.1 Fluoreszenzmarkierung von Fibronectin

Zur Erstellung adhäsiver Muster für die Zellkultur auf den Substraten wurde Fibronectin verwendet, das mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde, um die Muster für die Mikroskopie sichtbar zu machen. Das Fibronectin wurde entweder im Handel erworben (Roche, Basel, Schweiz) oder in der Arbeitsgruppe für Biophysikalische Chemie durch technische Angestellte selbst isoliert. Zur Fluoreszenzmarkierung wurde der aktivierte Farbstoff 5-6-Tetramethylrhodamin-NHS-Ester (VWR) verwendet. Dieser wurde in Dimethylformamid (VWR) oder Dimethylsulfoxid (Carl Roth) gelöst (0,2 mg/10 μl). Hiervon wurden ca. 5 μl zu 2 ml Fibronectinlösung (Konzentration bis zu 1 mg/ml) in Tris (VWR) gegeben und zusätzlich 0,2 ml einer 1 M NaHCO_3 (VWR) Lösung hinzugefügt. Die fertige Lösung wurde im Dunkeln für eine Stunde sanft geschwenkt. Die Auftrennung des ungebundenen Farbstoffs und des gelabelten Fibronectins erfolgte über eine PD-10 (GE Healthcare) Säule durch Größenausschlussverfahren. Dafür wurde die Säule zuerst mit 25 ml Elutionspuffer äquilibriert (15 mM Glycin, Carl Roth, 1 mM NaCl, reinst, Applichem, 0,02 % Natriumazid, Applichem). Die Fibronectin-Farbstoff-Lösung wurde dann auf die Säule gegeben und mit Puffer eluiert. Dabei wurden Fraktionen zu ca. 750 μl gesammelt (ca. 15 Tropfen). Für jede Fraktion fand über Absorptionsmessungen (UV/vis BioSpectrometer basic, Eppendorf) eine Bestimmung der Proteinkonzentration und des Labelgrads statt (Messungen bei 280 nm und 555 nm). Fraktionen mit einer Proteinkonzentration über 50 $\mu\text{g/ml}$ und einem Labelgrad unter 10 wurden schließlich gepoolt und abermals die Proteinkonzentration und der Labelgrad der fertigen Lösung bestimmt. Die Lösung wurde unter Lichtabschluss für maximal ein Jahr bei 4 °C gelagert.

3.1.3.2 Herstellung der PDMS-Stempel

Ausgangspunkt für die Mikrostrukturierung der Zellkultursubstrate waren mikrostrukturierte Siliziumwafer (GeSiM, Großberkmannsdorf) mit Streifenmustern mit einer Breite von 5 μm –80 μm und einer Reliefhöhe von 10 μm und einer Gesamtfläche pro Wafer von 1 cm^2 . Diese wurden zuerst gründlich gereinigt (Ultraschall und RCA-Reinigung, siehe 3.1.1.1) und anschließend für eine Stunde in einer 0,25%igen Lösung von Chlorotrimethyl-

thylsilan (99 %, Fluka, Buchs, Schweiz) in Hexan, p.a. (Sigma-Aldrich, Darmstadt) inkubiert. Die Hydrophobisierung erfolgte, um die optimale Benetzung der Wafer mit Polymerisierungslösung zu gewährleisten. Die so behandelten Wafer wurden in Hexan gespült, im Stickstoffstrom getrocknet, mittels Eukitt (O. Kindler, Freiburg) in Petrischalen eingeklebt und konnten nun als Vorlage (Master) für wiederholte Abformungen von Silikon-Stempeln benutzt werden.

Zur Herstellung der Polymerisierungslösung wurde ein Gemisch bestehend aus zehn Teilen Sylgard-184-Basis und einem Teil Sylgard-184-Vernetzer (Dow Corning, Midland, USA) hergestellt, mit einem Glasrührstab gründlich vermischt und bis zur Entfernung sämtlicher Blasen im Exsikkator mit einer Wasserstrahlpumpe entgast (ca. 30– 60 min). Die gebrauchsfertige Silikonlösung wurde nun auf die Wafer gegeben (ca. 3 g Lösung pro 35 mm Petrischale). Die Aushärtung des Polydimethylsulfoxids (PDMS) erfolgte für mindestens vier Stunden bei 65 °C. Die fertigen PDMS-Abgüsse wurden schließlich abgezogen und die einzelnen Stempel aus der PDMS-Scheibe ausgeschnitten. Die Stempel wurden in einem verschlossenen Gefäß bei Raumtemperatur gelagert.

3.1.3.3 Mikrokontaktdruck

Zur Erzeugung von mikrostrukturierten Zellkultursubstraten kam die Technik des Mikrokontaktdrucks zur Anwendung. Fertige PDMS-Stempel (siehe 3.1.3.2) wurden vor dem Gebrauch für jeweils zehn Sekunden mit Reinstwasser und Ethanol (99 %, vergällt) gespült, anschließend im Stickstoffstrom getrocknet und schließlich auf ein mit Wasser angefeuchtetes fusselfreies Tuch in eine Petrischale gelegt, um ein Austrocknen während der Inkubation zu verhindern. Auf die abgelegten Stempel (Fläche jeweils 1 cm²) wurden jeweils 120 µl einer 10 µg/ml-Lösung von fluoreszenzmarkiertem Fibronectin (siehe 3.1.3.1) in PBS (Biochrom, Berlin) gegeben und so für mindestens 30 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Tropfen abgenommen, die Stempel zum Entfernen überschüssiger Lösung mit einer Pinzette für eine Sekunde in Reinstwasser getaucht und dann mit Stickstoff vorsichtig trocken gepustet. Die Stempel wurden dann mit leichtem Druck mit der Fibronectin-beschichteten Seite mit den Substraten in Kontakt gebracht. Die Substrate, zusammen mit den darauf befindlichen Stempeln, wurden in einer Petrischale, gemeinsam mit einem daneben abgelegten, angefeuchteten Tuch, für mindestens 30 Minuten im Zellkulturschrank bei 37 °C und 95 % Luftfeuchte inkubiert. Anschließend wurden mit einer Pinzette die Stempel, ebenso wie das Tuch, entfernt und die Substrate zur Desinfektion für 15 Minuten unter die UV-Lampe einer Sterilwerkbank gelegt. Daraufhin wurden die Substrate zweimal mit sterilem PBS gespült und abschließend mit PBS überschichtet. Die Lagerung der Substrate erfolgte über einen Zeitraum von maximal einer Nacht bei 4 °C in einem mit Parafilm versiegelten Behältnis.

3.2 Zellkultur

Für die Versuche wurden humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*, HUVECs) verwendet, deren Behandlung in diesem Abschnitt beschrieben wird.

3.2.1 Isolierung und Lagerung von HUVECs

Die Isolierung von HUVECs führten technische Angestellte der Arbeitsgruppe für Biophysikalische Chemie durch. Die Reinheit der isolierten Zellchargen wurde über eine Färbung des von-Willebrand-Faktors kontrolliert. Die Lagerung der Zellen erfolgte in Kryogefäßen in Aliquoten mit einem Volumen von 1 ml und einer Zellzahl von 1 Million in flüsigem Stickstoff bei -196°C . Das Auftauen geschah im Wärmebad bei 37°C , woraufhin die Zellen in einer 75 cm^2 -Flasche mit 12 ml Endothelzellmedium mit Supplementmix (Promocell, Heidelberg) und 2% fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom) ausgesät wurden. Nach vier Stunden erfolgte ein Medienaustausch. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte kultiviert. Ein Austausch des Zellkulturmediums erfolgte weiterhin alle zwei bis drei Tage.

3.2.2 Passagieren von HUVECs

Spätestens bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Vor dem Passagieren der HUVECs wurden alle verwendeten Lösungen im Wasserbad auf 37°C temperiert. Zuerst wurde der Zellkulturflasche das Medium entnommen und diese zweimal mit PBS gespült. Daraufhin folgte die Zugabe von Trypsin/EDTA (Biochrom) in PBS (2 ml für 75 cm^2 -Flaschen, 1 ml für 25 cm^2 -Flaschen) und Inkubation im Zellkulturschrank für drei Minuten. Nach einer Sichtkontrolle des Ablösens aller Zellen wurde die Zellsuspension in 10 ml FCS (5 ml für kleine Flaschen) aufgenommen. Die Lösung wurde dann für fünf Minuten bei 362 g zentrifugiert und anschließend der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Teile der Zellsuspension wurden nach Bedarf wieder in Zellkulturflaschen passagiert oder auf Proben ausgesät. Bei der Aussaat auf Proben wurden, je nach bisherigem Wachstum der Zellen, 2–5 μl der Zellsuspension auf 0,5 ml Medium verdünnt, was einer Zelldichte von ca. 1×10^4 – $2,5 \times 10^4$ entspricht.² Für Untersuchungen fanden ausschließlich Zellen aus der zweiten bis zur fünften Passage Verwendung. Die Zellen wurden in allen Ver-

²Beispielrechnung: Für ein Well einer 24-Well-Platte mit einem Füllstand von 0,5 ml und einer Fläche von $1,9\text{ cm}^2$ sowie einer initialen Zellzahl von 1×10^7 (10×10^6 Zellen aus einer konfluent gewachsenen 75 cm^2 -Zellkulturflasche), die in 1 ml resuspendiert werden, ergibt sich folglich eine Zelldichte von: $\frac{1 \times 10^7 \text{ Zellen}}{1000 \mu\text{l}} \times 2 \mu\text{l} / 1,9 \text{ cm}^2 \approx 1 \text{ Zelle} / 10\,000 \mu\text{m}^2$ (1 Zelle/4 000 μm^2 , bei 5 μl). Angestrebt wurde eine Zelldichte, bei der der Großteil der Zellen vereinzelt auf der Probe anwachsen konnte.

suchen nach der Aussaat auf die Proben mindestens eine Stunde kultiviert, bevor eine Weiterbehandlung erfolgte.

3.3 Zellfärbung

Zur Untersuchung der Anpassung der Zellstruktur an laterale Einschränkung wurden verschiedene Zellbestandteile (F-Aktin, Zellkern, Fokale Adhäsionen) in fixierten beziehungsweise lebenden Zellen angefärbt.

3.3.1 Färbung fixierter Proben

3.3.1.1 Fixierung

Proben für die Morphologie-Analyse wurden vor der Weiterbehandlung (Färbung) zur Haltbarmachung fixiert. Dazu wurden die Substrate mit den adhärennten Zellen zuerst dreimal mit 37 °C warmem PBS gespült. Anschließend erfolgte die Fixierung durch Inkubation mit einer 37 °C warmen 4%igen Paraformaldehydlösung (Carl Roth) in PBS für zehn Minuten. Die Fixierungslösung wurde abgenommen und die Proben dreimal jeweils fünf Minuten in PBS inkubiert.

3.3.1.2 Färbung von F-Aktin und Zellkern

Zur Untersuchung der Anpassung des Aktinskeletts und des Zellkerns an die Umgebungsgeometrie wurden Zellen auf entsprechenden Substraten ausgesät und nach frühestens einer Stunde wie in Abschnitt 3.3.1.1 fixiert. Zur Färbung von F-Aktin (filamentöses Aktin) sowie des Zellkerns wurden die benötigten Farbstoffe zu einer 2%igen Lösung von bovinem Serumalbumin (BSA, Sigma Aldrich) in PBS zugegeben. Zur Färbung von F-Aktin diente eine Lösung (Konzentration 1 U/ml) von entweder Alexa Fluor 488 Phalloidin oder Phalloidin-Rhodamin (Invitrogen, Carlsbad, USA) in Methanol, p.a., wobei 1,25 µl der Farbstofflösung pro 200 µl der Arbeitslösung zum Einsatz kamen. Zur Färbung des Zellkerns wurde eine 1:100 vorverdünnte Lösung des Farbstoffs 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma Aldrich) in PBS zu einer Endverdünnung von 1:10 000 zur Gesamtarbeitslösung hinzugegeben. Die Proben wurden für mindestens 45 Minuten mit der Gesamtarbeitslösung inkubiert. Nach Abnahme der Färbelösung erfolgte eine dreimalige Inkubation der Proben mit PBS für jeweils fünf Minuten.

Um die Proben lagern zu können, wurden diese in Mowiol (Carl Roth) auf Objektträgern eingebettet und mit Eukitt versiegelt.

3.3.1.3 Antikörperfärbung der Fokalen Adhäsionen

Bei der Antikörperfärbung wurden die Zellen wie in 3.3.1.1 beschrieben fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran fand nach dem Auswaschen des Paraformaldehyds mittels PBS eine Zwischenbehandlung mit 1%iger Triton X 100-Lösung (Carl Roth) in PBS statt, womit die Proben für zehn Minuten inkubiert wurden. Anschließend erfolgte eine dreimalige, jeweils fünfminütige Inkubation mit einer 2%igen BSA-Lösung, woran sich die Inkubation mit Antikörper anschloss. Zur Färbung der Fokalen Adhäsionen wurde ein Primärantikörper gegen Vinkulin benutzt (monoklonaler anti-Vinkulin Antikörper, Ursprung: Maus, V9131, Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Dieser wurde in einer 2%igen BSA-Lösung 1:2500 verdünnt und so für 45 Minuten mit den Proben inkubiert. Daran schlossen sich drei fünfminütige Spülschritte mit PBS an. Schließlich erfolgte die Inkubation mit 1:500 verdünntem Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG-CFL 647, Ursprung: Esel, sc-362288, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) und weiteren Farbstoffen wie in 3.3.1.2 beschrieben.

3.3.2 Lebendzellfärbung mit SiR-Actin

SiR-Actin (Prof. Hans-Dieter Arndt, Friedrich-Schiller-Universität Jena) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO, Carl Roth) zu einer Konzentration von 100 μM gelöst und bei -20°C gelagert. Für die Lebendzellfärbung mit SiR-Actin wurden Zellen auf Substrate ausgesät und eine Stunde im normalen Endothelzellmedium bei Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Spülen der Proben mit PBS, um Zelltrümmer und nichtadhärente Zellen zu beseitigen. Schließlich wurde neues Endothelzellmedium, versetzt mit SiR-Actin, auf die Proben gegeben. Hierfür wurde eine Konzentration von 500 nM SiR-Actin verwendet. Die Zellen wurden für mindestens eine weitere Stunde inkubiert und dann, bei guter Sichtbarkeit des Aktinskeletts, mikroskopiert.

3.4 Mikroskopie

Es wurden sowohl fixierte Zellen mikroskopiert, um die Zellmorphologie zu charakterisieren, als auch lebende Zellen, um Zellzugkraftmessungen durchzuführen und um die Aktinskelettdynamik zu beobachten.

3.4.1 Fixierte Proben

3.4.1.1 Epifluoreszenzmikroskopie

Eingebettete bzw. fixierte Proben wurden entweder mit einem 40 \times /0,75 EC-Plan Neofluar Trockenobjektiv (Carl-Zeiss, Oberkochen) oder mit einem 63 \times /1,4 Plan-Apochromaten (Carl-Zeiss) mit Ölimmersion (Immersionöl 518F, Carl Zeiss) mikroskopiert. Bei Bedarf kam

ein 1,6×Optovar zum Einsatz. Als Leuchtquelle diente eine HXP 120 Beleuchtungseinheit (Leistungselektronik Jena GmbH). Das Anregungs- bzw. Beobachtungsspektrum wurde durch die Auswahl entsprechender Filterwürfel (AHF Analysetechnik) festgelegt. Die Bilder wurden mit einer Zeiss AxioCam 506 mono Kamera (Carl Zeiss) aufgenommen und als 16 bit-CZI-Dateien abgespeichert (ZEN blue edition, Carl Zeiss).

3.4.1.2 Konfokalmikroskopie

Proben wurden mit einem 63×/1,4 Plan-Apochromat-Objektiv mit Ölimmersion mikroskopiert. Die Anregung erfolgte mit Laserstrahlen mit den Wellenlängen 405 nm, 488 nm, 555 nm und 639 nm. Die Beobachtungsspektren wurden durch einen Strahlteiler und entsprechende Passfilter den jeweils vertretenen Farbstoffen angepasst. Die Optimierung der Öffnungsgröße der Lochblende (Pinhole) und der Bildgröße (in Pixeln) wurde durch die Software vorgenommen (ZEN black edition, Zeiss).

3.4.2 Lebendzellmessung

3.4.2.1 Zellzugkraftmessung

Zur Messung der Zellzugkräfte wurde entweder ein 40×/0,75 EC-Plan Neofluar Trockenobjektiv oder ein 20×/0,5 EC-Plan Neofluar Trockenobjektiv mit 1,6×Optovar verwendet. Die Messung erfolgte an einem mit einer Inkubationsbox ausgestatteten Mikroskop (Axio Observer Z1, Carl Zeiss) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Als Leuchtquelle diente eine Colibri-Beleuchtungseinheit (Carl Zeiss) mit LED-Modulen mit den Anregungswellenlängen 365 nm, 470 nm, 555 nm und 625 nm. Das Beobachtungsspektrum wurde durch einen Mehrfachpassfilter festgelegt. Neben Aufnahmen des emittierten Fluoreszenzlichts wurden auch Aufnahmen im Phasenkontrastkanal erstellt. Bei zeitaufgelösten Messungen wurden über einen Zeitraum von einer Stunde alle drei Minuten Bilder an vorher festgelegten Positionen aufgenommen. Die Steuerung erfolgte über die Software Zen blue edition (Carl Zeiss). Für weitere Details siehe Abschnitt 3.6.2.

3.4.2.2 Visualisierung von Aktin

Die Visualisierung von SiR-Aktin-gefärbten Zellen erfolgte unter den Bedingungen wie in 3.4.2.1 beschrieben. Die Intensität des Anregungslichts und die Belichtungszeit wurden so gewählt, dass die Belastung für die Zellen minimiert, während die Bildqualität maximiert wurde.

3.5 Morphologieanalyse

Um die Anpassung der Zellen an laterale Einschränkung beschreiben zu können, wurden sowohl die allgemeine Zellform als auch die Struktur intrazellulärer Bestandteile (Aktinskelett, Zellkern) quantitativ erfasst. Für die Auswertung wurden die Zellbilder so beschnitten, dass nur noch eine Zelle pro Bild enthalten war. Die weitere Auswertung erfolgte automatisch mittels selbst erstellter Makros in Fiji (<https://imagej.net/Fiji>)²¹² bzw. selbst geschriebener Skripte in Python (www.python.org).²¹³ Nach der automatischen Bestimmung der relevanten Parameter erfolgte für jede Zelle eine visuelle Kontrolle, um fehlerhafte Ergebnisse aus den Daten zu entfernen. Ein schematischer Überblick über die Auswertung ist in Abbildung 3.2 gegeben. Die Makros beziehungsweise Skripte finden sich im Anhang A.2.

3.5.1 Charakterisierung der Zellmorphologie

Die Charakterisierung der Zellmorphologie erfolgte anhand der Parameter Zellfläche, Zelllänge und Zellbreite (entspricht der Streifenbreite) sowie dem Zellseitenverhältnis (AR, *Aspect Ratio*). Zur Bestimmung der Größen wurden die CZI-Dateien in das Bearbeitungs- und Auswerteprogramm Fiji/ImageJ²¹² geladen und so beschnitten, dass nur noch eine Zelle pro Aufnahmestapel sichtbar war. Dabei wurde beachtet, nur Zellen zur Auswertung zuzulassen, die beidseitig durch den Streifen eingeschränkt waren, die Streifenränder nicht überwachsen und keinen Kontakt zu anderen Zellen hatten. Dieser Bilderstapel wurde als TIF-Datei abgespeichert und mittels eines Makros weiter prozessiert.

Anhand der Bilder der Mikrostrukturen (Streifen) wurde die Streifenrichtung ermittelt und die Bilder anschließend gedreht, um das Zellbild an den Bildkanten auszurichten. Als nächster Schritt erfolgte eine Schwellwertbildung mit dem Verfahren "Huang" im Aktin-Kanal, um die Zellfläche zu ermitteln. Die ausgewählten Flächen des binärisierten Zellbildes wurden durch die Morphologieoperation "Dilate" vergrößert, um eventuelle Lücken innerhalb der Zelle zu schließen und die Zellkontur zu glätten. Um die ursprüngliche Zellfläche beizubehalten, erfolgte eine weitere Bearbeitung mittels der Funktion "Erode". Über die Funktion "Analyze Particles..." konnte die Zellfläche ermittelt werden, während aus den Ausgabeparametern der Analysefunktion "Bounding Rectangle..." die Lage der Zelle bzw. deren Länge und Breite ermittelt wurden und das Bild so beschnitten werden konnte, dass die Zelle zentriert wurde. Die Auswertungsroutine wurde in einem Makro (Anhang, Makro A.1) zusammengefasst und erfolgte automatisiert. Bei einer abschließenden Sichtkontrolle wurden Zellbilder aussortiert, bei denen deutliche Abweichungen zwischen detektierter und sichtbarer Zellform zu erkennen waren (geschätzt: ab 5% fehlerhafter Zuordnung der Zellfläche zum Hintergrund und umgekehrt). Ebenso wurden Zellbilder nicht berücksichtigt, wenn die Ausrichtung des Streifenmusters an den Bildkanten nicht hinreichend genau vorgenommen worden war (Toleranz $\pm 1^\circ$).

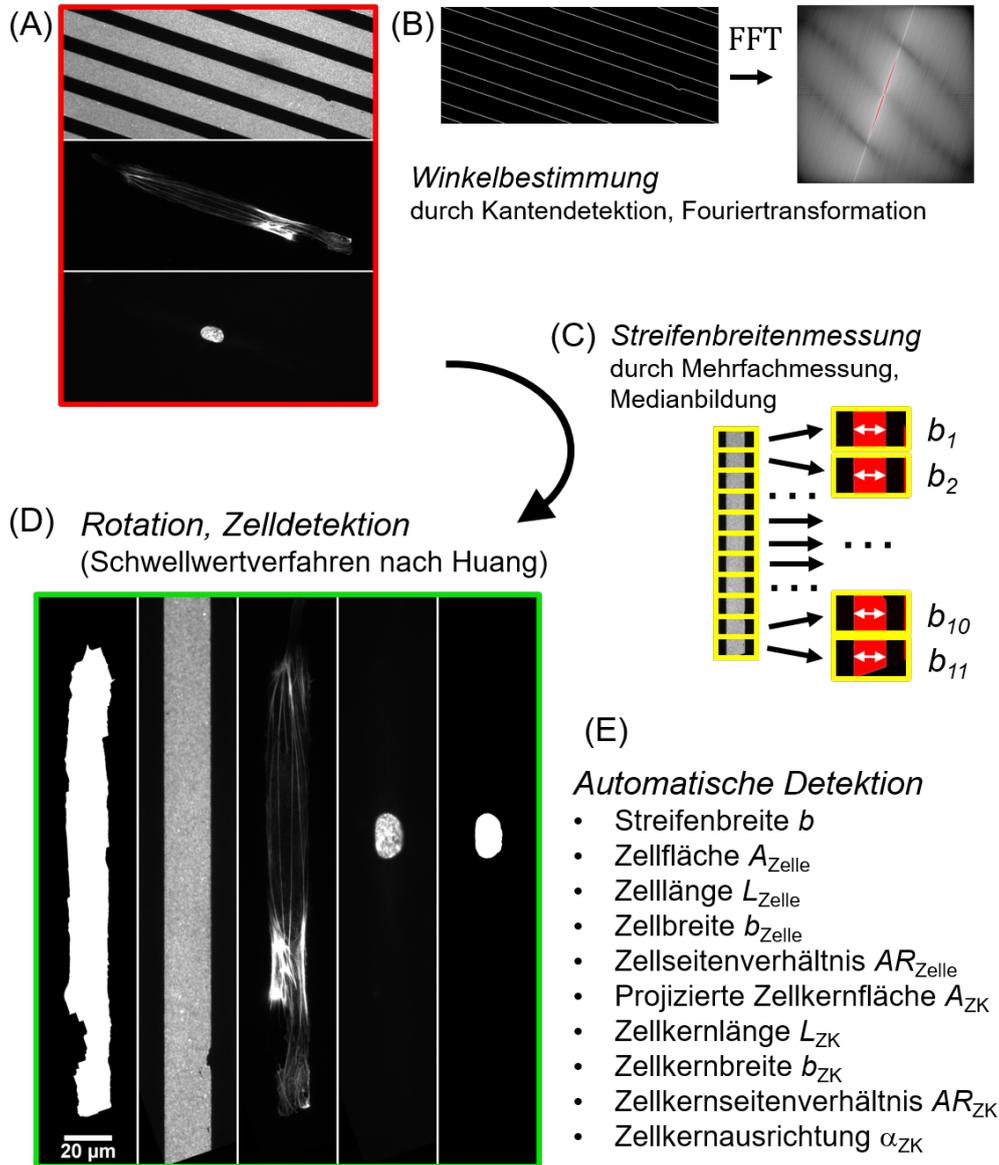


Abbildung 3.2: Charakterisierung der Zellmorphologie in Fiji. (A) Fluoreszenzaufnahme einer einzelnen Zelle auf streifenförmigem Muster. Von oben nach unten: Fibronectinstreifen, mit TAMRA gefärbt; Aktinskelett, mit Alexa Fluor 488 Phalloidin gefärbt; Zellkern, mit DAPI gefärbt. (B) Bestimmung der Streifenausrichtung durch Binärisierung, Kantendetektion und Fouriertransformation des Streifenbildes (C) Automatische Messung der Streifenbreite. Mehrfachmessungen helfen, Fehler durch Störstellen zu vermeiden. (D) Rotation der Ausgangsbilder und Detektion der Zellfläche durch Schwellwertbildung nach Huang. (E) Quantifizierung der Morphologie der Zelle und des Zellkerns durch Partikelanalysefunktion.

3.5.2 Charakterisierung der Zellkernmorphologie

In den wie in 3.5.1 beschriebenen rotierten Bildern wurde ebenso die Kontur des Zellkerns bestimmt. Es wurden zusätzlich zur Fläche, Breite und Länge des Zellkerns auch dessen Position und relativer Winkel zur Streifenausrichtung ermittelt.

3.5.3 Charakterisierung der Aktinskelettmorphologie

Die in 3.5.1 beschriebenen prozessierten Bilder wurden weiter benutzt, um Binärbilder des Aktinskeletts zu erzeugen. Dafür wurden die Bilder des Aktinskeletts einer Filterung nach der *Difference-of-Gaussians*-Methode unterzogen, um eine Hintergrundkorrektur durchzuführen. Die Breiten der jeweiligen Gaußfunktionen betragen dabei $0,1\ \mu\text{m}$ und $0,99\ \mu\text{m}$ (bei einer Auflösung von $13,9\ \text{Pixel}/\mu\text{m}$). Die Binärisierung erfolgte danach wiederum mit dem Schwellwertverfahren nach Li. Die binärisierten Bilder wurden wiederum den Morphologieoperationen Dilatation und Erosion unterzogen, um noch vorhandenes Rauschen zu unterdrücken und zusammenhängende Bereiche deutlicher werden zu lassen. Die bearbeiteten Bilder wurden als TIF-Dateien abgespeichert. Eine schematische Übersicht der Arbeitsschritte ist in Abbildung 3.3, gegeben und das entsprechende Makro findet sich im Anhang (Makro A.2).

Die eigentliche Analyse der Aktinskelettmorphologie erfolgte in Python mittels eines selbst geschriebenen Skripts (siehe Anhang, Skript A.3). Dabei wurde das jeweils größte Element aus dem binärisierten Bild ausgewählt und einer Hough-Transformation unterzogen, um Geraden zu detektieren. Entlang der dominantesten Gerade wurde ein Profil durch das Binärbild gelegt und bei der Überlappung mit Objekten ein Liniensegment konstruiert, dessen Endkoordinaten abgespeichert wurden. Dann wurden in einem Korridor entlang des Liniensegments Objektpunkte in Hintergrundpunkte umgewandelt, um das detektierte Faserobjekt aus dem Pool an Objekten zu entfernen. Dieser Prozess wurde wiederholt, bis die Größe des größten verbliebenen Objekts unter einen Schwellwert fiel (200 Pixel). Die Liniendetektion wurde dann mit den verbliebenen Objekten so lange fortgesetzt, bis die Summe der Längen der letzten drei detektierten Segmente unter einen vorgegebenen Wert fiel.

Um die unerwünschte Detektion von Proteinaggregaten zu unterdrücken, wurde eine Mindestlänge von $5\ \mu\text{m}$ pro Geradensegment festgelegt. Da die Auswertung mittels eines Skripts automatisch ablief, erfolgte für jedes bearbeitete Zellbild eine Sichtkontrolle, bei der die detektierten Geradensegmente mit dem sichtbaren Aktinskelett abgeglichen wurden. Aussortiert wurden Zellbilder, bei denen eine deutliche Fehldetektion stattgefunden hatte (geschätzt: ca. über 10% falsch zugeordnete/nicht detektierte Geradensegmente, z. B. aufgrund von punktförmigen Farbstoffaggregaten oder flächig eingefärbten bzw. überbelichteten Zellbereichen).

Anhand der so detektierten Geradensegmente wurde für jede Zelle einerseits L_{ASF} , die Gesamtlänge der Segmente, als Maß für die Gesamtlänge an Stressfasern und an-

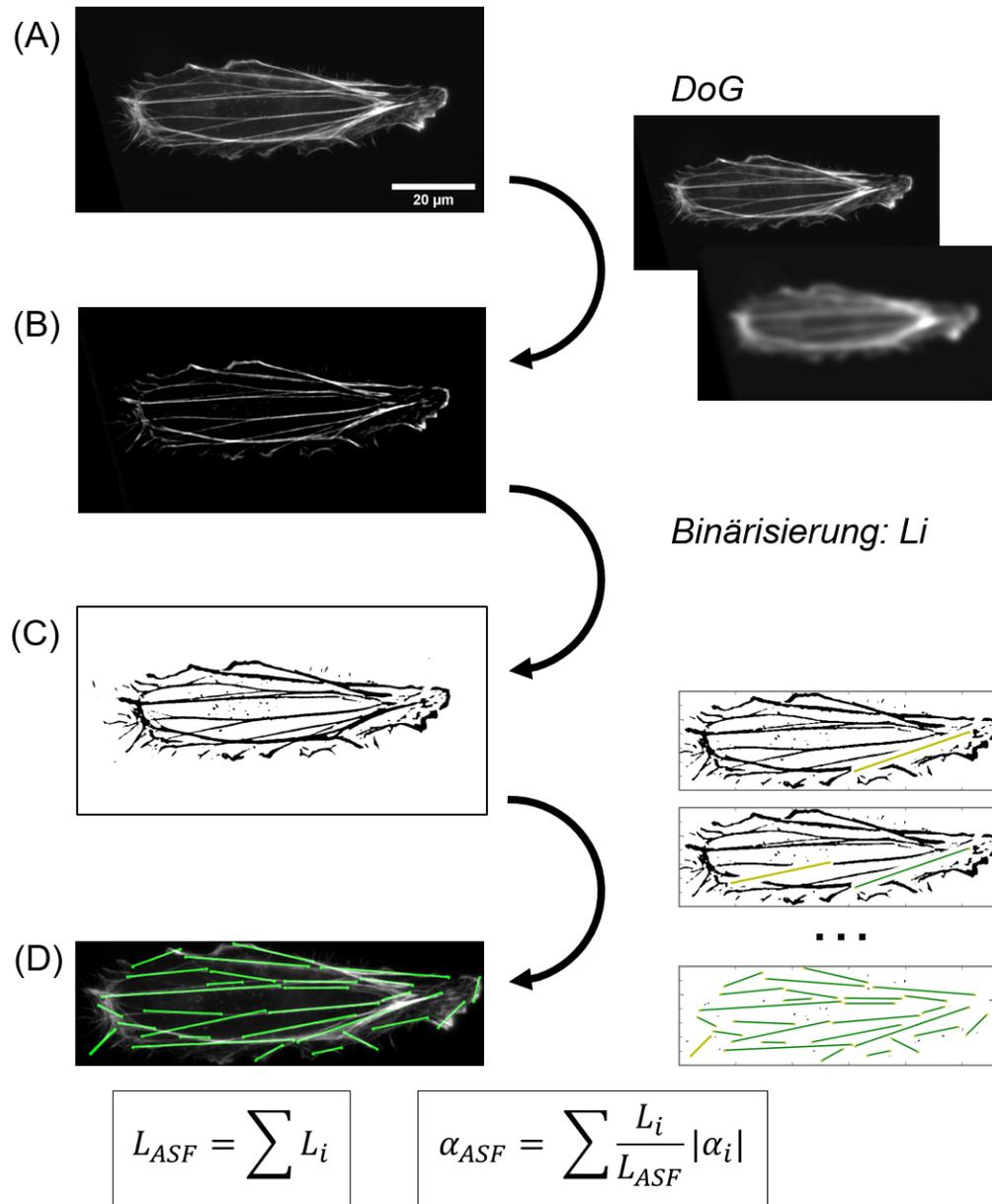


Abbildung 3.3: Charakterisierung der Aktinskelettmorphologie in Fiji und Python. (A) Das Bild des Aktinskeletts wird nach der *Difference of Gaussians*-Methode gefiltert. (B) Aus dem gefilterten Bild wird nach dem Schwellwertverfahren nach L_i ein Binärbild erstellt. (C) Durch Hough-Transformation werden im Binärbild iterativ Geradensegmente detektiert. (D) Anhand der detektierten Geradensegmente wird die Gesamtlänge der Aktinfasern, L_{ASF} , sowie der mittlere Winkel, α_{ASF} , bestimmt. Die Schritte (A) und (B) wurden in Fiji ausgeführt, (C) und (D) in Python.

dererseits der mittlere Winkel der Segmente, relativ zur Streifenausrichtung, als Maß für die Polarisierung der Zelle berechnet:

$$L_{ASF,gesamt} = \sum_i L_i \quad (3.1)$$

$$\alpha_{ASF,1} = \sum_i \frac{L_i}{L_{ASF}} \alpha_i \quad (3.2)$$

$$\alpha_{ASF,2} = \sum_i \frac{L_i}{L_{ASF}} |\alpha_i| \quad (3.3)$$

3.5.4 Charakterisierung der Aktinskelettdynamik

3.5.4.1 Manuelle Auswertung der Aktinstressfaserbewegung

Zur Bestimmung der Dynamik der Aktinstressfasern wurden zeitaufgelöste Bilderserien des Aktinskeletts von Zellen auf Streifen benutzt. Es wurden Zellen ausgewählt, die sich im Beobachtungszeitraum von einer Stunde komplett innerhalb des Beobachtungsfensters aufhielten und den Streifen nicht verlassen hatten. Im mittleren Teil der Zelle wurde ein 30 μm langer rechteckiger Bereich (entlang der Streifenrichtung) ausgewählt, der die Zellseiten an den Streifenrändern beinhaltete. Um Objekte mit Ausdehnung entlang der Streifenrichtung hervorzuheben, wurde das Profil rechtwinklig zur Streifenrichtung und gemittelt entlang der Streifenrichtung erstellt. Aus den für jeden Zeitpunkt des Beobachtungszeitraums erstellten Profilen wurde ein Kymograph zusammengesetzt. In den so konstruierten Kymographen wurde manuell die Position der jeweiligen Stressfasern bestimmt und so deren Trajektorien entlang der Richtung rechtwinklig zur Streifenrichtung ermittelt (siehe Abb. 3.4). Aus den Trajektorien konnte die Instantangeschwindigkeit der Stressfasern zwischen zwei Beobachtungszeitpunkten berechnet werden. Es wurde beobachtet, dass viele Stressfasern am Zellrand entstanden, sich Richtung Zellzentrum bewegten und sich schließlich auflösten. Deshalb wurden die Trajektorien zur besseren Auswertung in drei Abschnitte unterteilt: eine Ruhephase, eine Phase gleichförmiger Bewegung und eine weitere Ruhephase. Die Anpassung dieses Verlaufs an die Trajektorien geschah mittels eines selbst geschriebenen Skripts in Python. Ein Fit wurde aus drei Geradensegmenten konstruiert.

$$y_0(t) = c, \quad t < t_1 \quad (\text{Initiale Ruhephase}) \quad (3.4)$$

$$y_1(t) = a + vt, \quad t_1 < t < t_2 \quad (\text{Bewegungsphase}) \quad (3.5)$$

$$y_2(t) = c', \quad t_2 < t \quad (\text{Finale Ruhephase}) \quad (3.6)$$

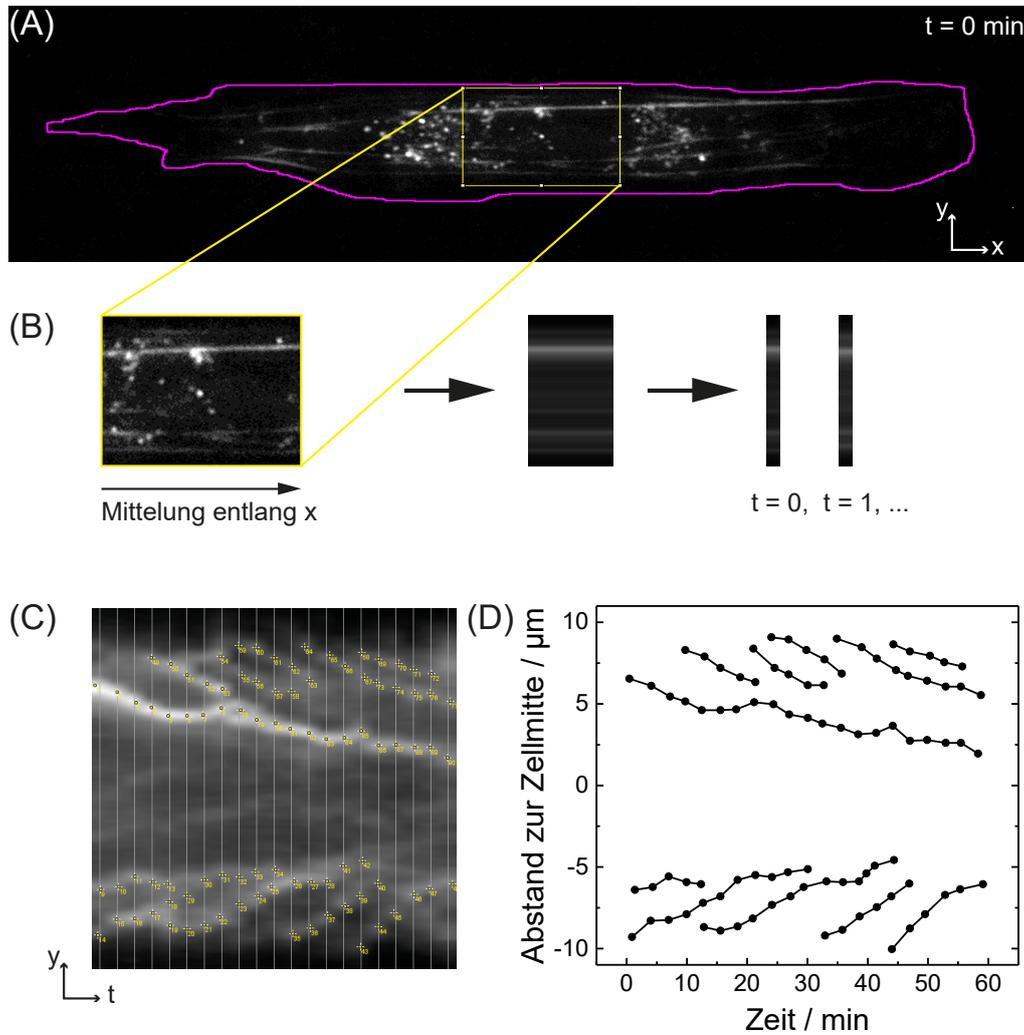


Abbildung 3.4: Charakterisierung der Aktinskelettdynamik I. (A) Einzelaufnahme aus zeitaufgelöster Messung einer SiR-gefärbten Zelle (weiß, mit magentafarbener Kontur). Die Messung erfolgte im Bereich des gelben Rechtecks. ($30 \mu\text{m} \times 23 \mu\text{m}$). (B) Die Bildausschnitte wurden entlang der x -Richtung gemittelt, um lineare Strukturen hervorzuheben. Dies geschah für jeden Zeitpunkt. (C) Aus der Aneinanderreihung der Profile entstand ein Kymograph, in welchem die Stressfasertrajektorien händisch markiert wurden. (D) Die Stressfasertrajektorien wurden für weitere Auswertungen benutzt. (Abbildung nach Müller et al.²¹⁴)

Aus den Steigungen der angepassten Geraden während der Bewegungsphase konnte die mittlere Geschwindigkeit v der Fasern während dieses Zeitraums ermittelt werden. Je nach mittlerer Lage eines solchen Segments, relativ zur Zellmitte, wurde das Vorzeichen der Geschwindigkeit berechnet.

3.5.4.2 Automatisierte Auswertung des Aktinflusses

Für die automatisierte Auswertung des Aktinflusses wurden die nichtbinärisierten Bilder des Aktinskeletts benutzt. Hierfür wurden jeweils zwei zeitlich aufeinanderfolgende Bilder in kleinere Bildausschnitte unterteilt und deren räumliche Verschiebung von einem Zeitpunkt zum nächsten mittels Kreuzkorrelationsanalyse ermittelt (siehe Abb. 3.5). Die Berechnung erfolgte ebenfalls mittels eines selbst geschriebenen Python-Skripts (siehe Anhang, Makro A.4). Die ermittelten Flussfelder wurden zusätzlich mit den Binärbildern der Zellkontur maskiert, um nur Flüsse innerhalb der Zellkontur anzuzeigen.

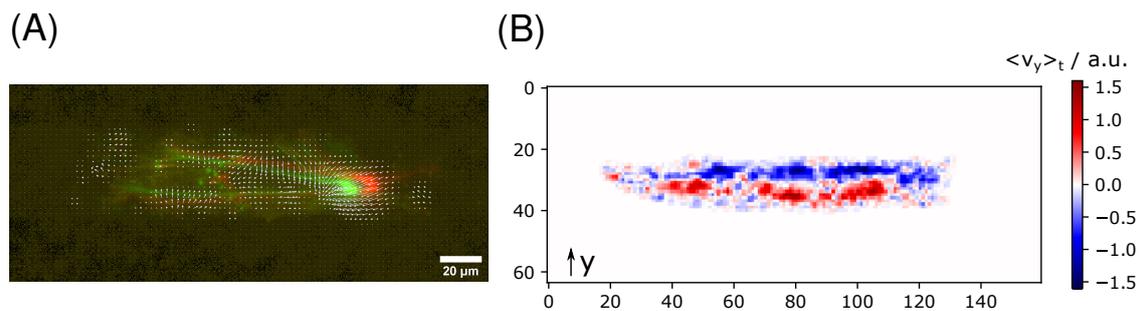


Abbildung 3.5: Charakterisierung der Aktinskelettdynamik II. (A) Überlagerung zweier aufeinanderfolgender Einzelaufnahmen aus zeitaufgelöster Messung einer SiR-gefärbten Zelle (Abstand zwischen roter und grüner Aufnahme: 3 min). Zusätzlich ist das Vektorfeld der Bewegung abgebildet. (B) Darstellung der zeitlich gemittelten y -Komponenten (senkrecht zur Streifenrichtung) des Bewegungsfelds.

3.6 Zellzugkraftmessung

Um ein Maß für eine funktionelle Reaktion der Zelle auf laterale Einschränkung zu erhalten, wurden Zellzugkraftmessungen durchgeführt (siehe Abb. 3.7).

3.6.1 Substratpräparation

Für die Zellzugkraftmessung wurden Gele auf Deckgläsern mit 22 mm Durchmesser, wie in 3.1.2 beschrieben, hergestellt. Die Deckgläser mit den angebundenen Gelen wurden mit Silikonkleber in Petrischalen (Durchmesser 35 mm) eingeklebt, in deren Mitte ein ca.

19 mm großes Loch gebohrt worden war. Zur besseren Fixierung in die vorhandenen Tischeinsätze des Mikroskops wurden diese Petrischalen in größere Petrischalen, abermals mit Loch im Boden, eingeklebt. Die Gele wurden weiterhin wie in 3.1.3 strukturiert und gelagert.

3.6.2 Messung

Zellen wurden, wie in 3.2.2 beschrieben, auf die Proben ausgesät und gegebenenfalls, wie in 3.3.2 beschrieben, mit SiR-Actin angefärbt. Pro Probe wurden bis zu 20 Zellen ausgewählt und deren Positionen in der Software des Mikroskops gespeichert. Zu Beginn der Messung wurden einmalig Bilder der Streifen an den Zellpositionen aufgenommen. Weiterhin wurden an den jeweiligen Positionen Aufnahmen der fluoreszenten Kügelchen im GFP-Fluoreszenzkanal an der Oberkante des Gels sowie Bilder der Zellen im Phasenkontrastkanal gemacht. Für die Aufnahme-Ebenen der beiden Kanäle wurden unterschiedlichen z -Positionen definiert (typischerweise $\Delta z < 3 \mu\text{m}$), da sich die Geloberkante und die Zelle nicht auf derselben Höhe befinden. Die Mikroskopie (siehe 3.4.2.1) erfolgte in der Regel über einen Zeitraum von einer Stunde, mit Aufnahmen in dreiminütigen Intervallen. Nach Ablauf des Beobachtungszeitraums wurde das Medium abgenommen und die Zellen durch 1 ml Trypsin/EDTA in PBS abgelöst und durch die Zugabe von weiterem PBS in Suspension gebracht. Anschließend wurden die markierten Positionen durch die Mikroskopsoftware angefahren und Bilderstapel in z -Richtung mit einer Höhe von $10 \mu\text{m}$ und einem Ebenenabstand von $0,5 \mu\text{m}$ erstellt, um eine eventuelle Verschiebung der Geloberkante in z -Richtung zu kompensieren.

3.6.3 Auswertung

3.6.3.1 Vorprozessierung in Fiji/ImageJ

Vor der eigentlichen Auswertung erfolgte eine Vorprozessierung der Bilder mittels eines selbst geschriebenen Makros im Programm Fiji. Ziel der Vorprozessierung war die Eliminierung von Verschiebungen in x -, y - und z -Richtung über den Beobachtungszeitraum sowie eine separate Speicherung der Gel- und Zellbilder. Zur Korrektur von lateralen Verschiebungen wurde das Fiji-Plugin "StackReg" verwendet. Um aus dem Z-Stapel, aufgenommen nach dem Ablösen der Zellen, dasjenige Bild zu ermitteln, das zu dem Ausgangsbild mit Zelle am besten passt, wurde die Differenz eines jeden Bildes des Z-Stapels zum Ausgangsbild errechnet. Das Bild mit dem geringsten Differenzwert wurde ausgewählt. Weiterhin erfolgte anhand der Phasenkontrastbilder der Zelle eine manuelle Markierung der Zellkontur, um die weitere Auswertung zu verfeinern und um die Zellmorphologie quantifizieren zu können.

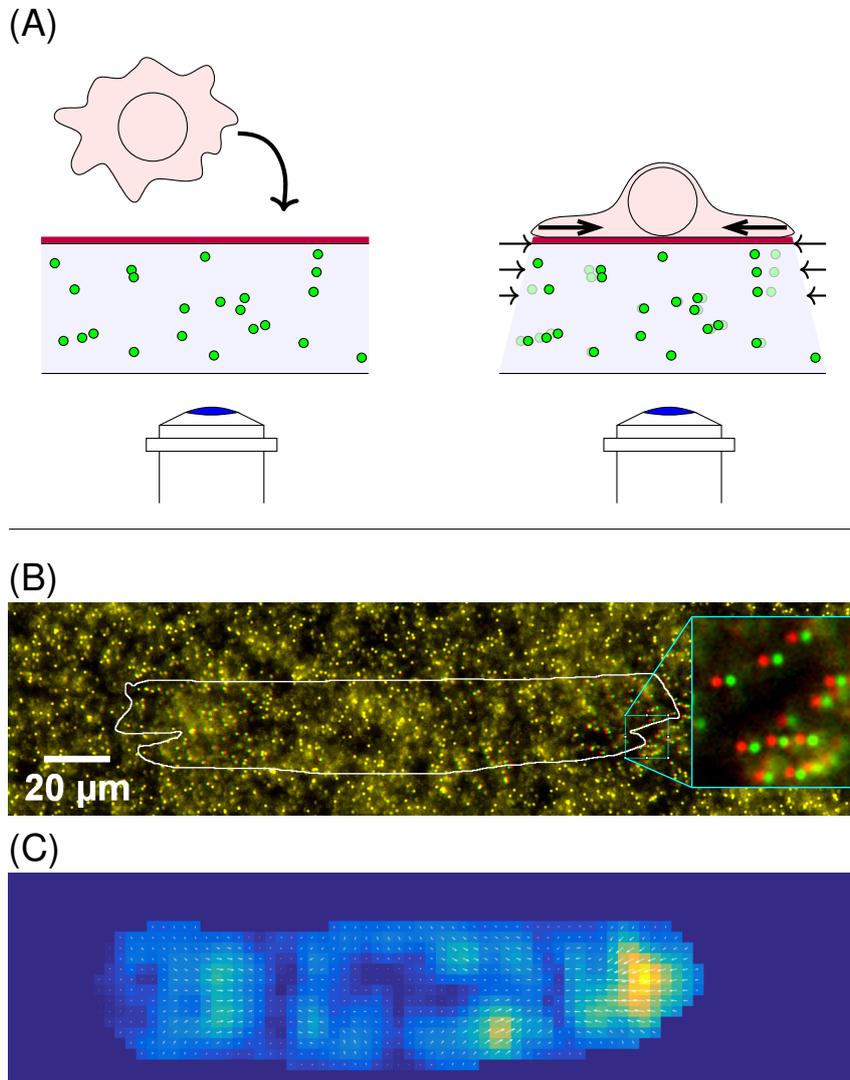


Abbildung 3.7: Prinzip der Zellzugkraftmessung. (A) Prinzip der Messung. Die Zelle wird auf einem flexiblen Substrat (Polyacrylamidgel) ausgesät, in welches fluoreszente Marker (Kugeln) eingebracht sind. Durch die Zugkräfte wird das Substrat deformiert und die Fluoreszenzmarker verschieben sich. (B) Überlagerung zweier Mikroskopaufnahmen eines flexiblen Gels ohne Zelle und mit Zelle (Zellkontur weiß). Zu erkennen ist die relative Verschiebung der Fluoreszenzkugeln. Rot: Gel im deformierten Zustand (mit Zelle), grün: entspannter Zustand (ohne Zelle). (C) Darstellung des zu (B) gehörigen Zellzugkraftfeldes. Helle Bereiche kennzeichnen Stellen mit hoher Kräfteinkopplung. Die Berechnung der wirkenden Kräfte ist unter Berücksichtigung der Materialparameter (Elastizitätsmodul, Querkontraktionszahl) des flexiblen Substrats möglich. Relevante Ergebnisse der Berechnung sind die Gesamtkraft F_{tot} und die Dehnungsenergie U .

3.6.3.2 Prinzip der Auswertung

Aus der Deformation des Hydrogels kann bei Kenntnis der entsprechenden Materialparameter die angewandte Kraft berechnet werden. Das Gel wird dabei als ideal-elastischer isotroper Halbraum angenommen, der von Punktkräften deformiert wird. Die Kräfte greifen dabei ausschließlich an der Oberfläche (x - y -Ebene) an und wirken nur parallel zu dieser. Die mathematische Beschreibung eines von einer Punktkraft verursachten Deformationsfeldes auf einem elastischen Halbraum wurde von Boussinesq vorgestellt. Der Zusammenhang zwischen den applizierten Kräften bzw. Spannungen $\vec{t}(x, y)$ und den resultierenden Deformationen $\vec{u}(x, y)$ wird dabei über den Elastizitätstensor G hergestellt.

$$\vec{u}(x, y) = G\vec{t}(x, y) \quad (3.7)$$

Zur effizienteren Berechnung wird die Rückrechnung von Deformationen in Kräfte im Fourier-Raum durchgeführt. Die Methode wird daher auch als "Fouriertransformierte Zellzugkraftmikroskopie" (*Fourier transform traction cytometry*, FTTC) bezeichnet.^{215,216}

3.6.3.3 Auswertung in MATLAB

Zur Berechnung der angewandten Kräfte muss die Deformation des Hydrogels ortsauflösend bestimmt werden. Für die Konstruktion des Verschiebungsfeldes wurden jeweils Bilder des deformierten und des relaxierten Gels ausschnittsweise verglichen. Hierfür wurde die Kreuzkorrelation eines Ausschnitts des Referenzbildes mit dem an der gleichen Stelle liegenden Bildausschnitt des deformierten Gels berechnet und anhand der Position des Maximums der Kreuzkorrelation die Verschiebung zwischen den Bildausschnitten berechnet. Diese Rechnung wurde iterativ verfeinert, das heißt mit kleiner werdenden Bildausschnitten durchgeführt, wobei bereits berechnete Verschiebungen in fortgeschrittenen Iterationsstufen zur passenden Auswahl der Lage beider Bildausschnitte benutzt wurden. Leerstellen im Verschiebungsfeld, die durch einen zu geringen Korrelationswert an der entsprechenden Position entstehen konnten, wurden über Mittelung der Umgebung interpoliert. Weiterhin erfolgte eine Glättung des Verschiebungsfeldes mit einem Gaußkern, um fehlerhaft berechnete Vektoren besser auszugleichen. Schließlich erfolgte über Invertierung der Gleichung 3.7 im Fourierraum die Berechnung des dazugehörigen Spannungsfeldes. Das so errechnete Spannungsfeld wurde schließlich mit der Zellkontur maskiert, um außerhalb der Zelle detektierte Spannungen auszuschließen. Aus dem Spannungsfeld wurden charakteristische Größen abgeleitet, unter anderem die Gesamtkraft F_{tot} , die Maximalkraft F_{max} , die Dehnungsenergie U sowie die Summe der Kräfte in x - bzw. in y -Richtung (parallel und rechtwinklig zur Streifenrichtung) F_x und F_y .

Bei der Zellzugkraftmessung wird aus dem Verschiebungsfeld $\vec{u}(x, y)$, welches die Deformation des Gels beschreibt, ein Zellzugspannungsfeld berechnet, bei dem die Ge-
loberfläche in ein Raster unterteilt wird, wobei jedem Ausschnitt des Rasters die loka-

Parameter	Eingabewert
initiale Größe der Bildausschnitte	(256 Pixel) ²
Anzahl der Iterationen zur Verschiebungsfeldberechnung	5 (finale Ausschnittgröße: (16 Pixel) ²)
Schwellwert minimale Bildintensität	255
Schwellwert maximale Bildintensität	0
minimaler Wert der Kreuzkorrelation	i.d.R. 0,7, mindestens 0,5
Größe der Umgebung zur Berechnung fehlender Verschiebungsvektoren	3×3 (größere Werte bei Bedarf)
Glättung des Verschiebungsfeldes mit	Gaußblockfilter

Tabelle 3.2: Eingabeparameter für die MATLAB-Zellzugkraftauswertungsroutine

le einwirkende Zugspannung $\vec{t}(x, y)$ zugeschrieben wird. Bei Kenntnis der Rastergröße an den Rasterpunkten können lokal die Kräfte $\vec{F}(x, y)$ bestimmt werden. Insgesamt können die Beträge der Kräfte aufsummiert werden, um eine Aussage zur Gesamtkraft $F_{\text{tot}} = \sum_{x,y \in \text{Zelle}} |\vec{F}(x, y)|$ zu erhalten. Da zusätzlich die Verschiebungen des Gels an den einzelnen Rasterpunkten bekannt sind, kann auch die lokal gespeicherte Deformationsenergie berechnet werden, die wiederum über den Bereich der Zelle aufsummiert werden kann: $U = \frac{1}{2} \sum_{x,y} |\vec{F}(x, y)| \cdot \vec{u}(x, y)$. Da durch die Strukturierung der Substrate zwei Richtungen ausgezeichnet waren – parallel zum Streifen und senkrecht dazu – wurden die Zellkräfte zudem in die entsprechenden Komponenten zerlegt; $F_x = \sum_{x,y} |\vec{F}(x, y) \cdot \hat{e}_x|$ als parallele Komponente und $F_y = \sum_{x,y} |\vec{F}(x, y) \cdot \hat{e}_y|$ als senkrechte Komponente. Ein Vergleich dieser beiden Kraftkomponenten wurde benutzt, um eine Aussage zur Polarisierung der Kräfteverteilung zu geben.

Die Auswertung erfolgte in MATLAB²¹⁷ mittels eines in der Arbeitsgruppe für Biophysikalische Chemie erstellten Programms. Als Eingabeparameter kamen die in Tabelle 3.2 aufgeführten Werte zur Anwendung.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die während der Arbeit gefundenen Ergebnisse werden im Folgenden präsentiert und diskutiert. Ein Teil der Ergebnisse aus Abschnitt 4.4 ist bereits veröffentlicht worden.²¹⁴ Teile der in den Abschnitten 4.4.1.1 und 4.4.1.3 gezeigten Daten wurden während einer Masterarbeit,²¹⁸ deren Betreuung Bestandteil dieser Arbeit war, erhoben und aufgrund ihrer Relevanz für die hier stattfindende Diskussion einbezogen.

Zuerst erfolgt eine kurze Beschreibung der verwendeten Zellen und des experimentellen Vorgehens. Daran schließt sich eine Darstellung der Maße für die allgemeine Zellmorphologie an, gefolgt von einer genaueren Charakterisierung des Aktinskeletts sowie dessen Dynamik. Darauffolgend werden die Resultate der Zellzugkraftmessungen präsentiert. Ein Überblick über die verschiedenen Versuche ist in Abbildung 4.1 gegeben.

4.1 HUVECs als Modell für mechanosensitive Zellen

Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs, *human umbilical vein endothelial cells*) sind in der Zellbiologie und Biophysik häufig eingesetzte Modellzellen. Dies basiert sowohl auf ihrer guten Verfügbarkeit als auch ihren spezifischen Eigenschaften. HUVECs bilden in der Nabelschnurvene die innerste Zellschicht zur Abgrenzung des Gefäßlumens. Daraus resultiert *in vivo* eine apikal-basale Polarisierung der Zellen, wodurch eine Kultivierung der Zellen auf zweidimensionalen Kultursubstraten dem nativen Zustand immer noch nahekommt. Auf ihrer basalen Seite sind die Zellen *in vivo* durch ihre Integrin-Rezeptoren mit den Strukturproteinen der Basalmembran, wie Kollagen und Fibronectin, verknüpft. Folglich lassen sich HUVECs über eine Beschichtung von Oberflächen mit beispielsweise Fibronectin oder Kollagen kultivieren. Ihre Morphologie *in vitro* entspricht in etwa dem Aussehen eines Plattenepithels, isolierte Zellen bilden eine "Spiegelei"-förmige Struktur, während in konfluenten Lagen eine polygonale Form angenommen wird.²¹⁹

Zusätzlich sind HUVECs mechanosensitiv, das heißt, dass sie auf mechanische Reize aus der Umgebung, wie zum Beispiel durch Blutfluss verursachte Scherkräfte, reagieren, und ihrerseits durch Formänderung beziehungsweise Krafteinkopplung in die Umgebung reagieren können. Entsprechend ihrer physiologischen Bedeutung werden HUVECs in der Erforschung des Transports in Blutgefäßen und deren Bildung (Angiogenese) eingesetzt, ebenso bei Wirkstoffstudien sowie bei Kokulturrexperimenten, um die Vaskularisierung von Tumoren zu untersuchen.^{139,220,221} Aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit und Mechanosensitivität sind HUVECs zudem ein häufig eingesetztes Modellsystem in Un-

4 Ergebnisse und Diskussion

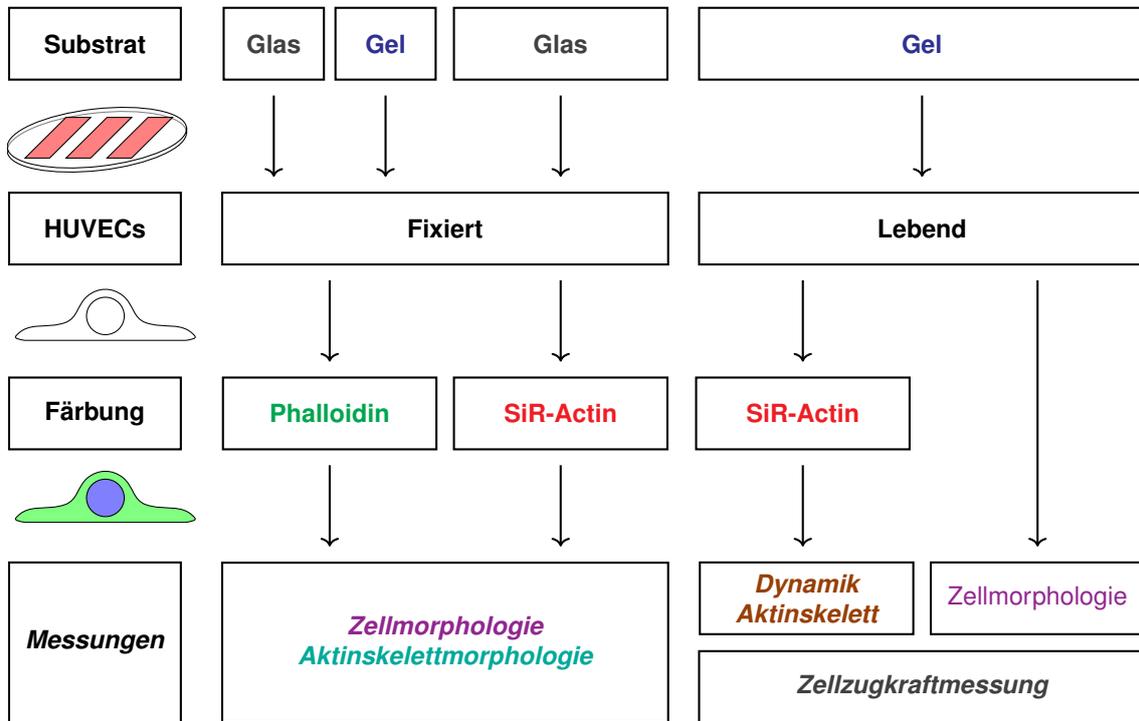


Abbildung 4.1: Schematische Übersicht über die durchgeführten Versuche. HUVECs wurden auf mikrostrukturierten Substraten ausgesät. Einerseits wurden Glassubstrate benutzt und eine Zellfixierung durchgeführt, um bessere Mikroskopiebedingungen zu haben. Andererseits wurden für eine größere Ähnlichkeit zum physiologischen Zustand flexible Gelsubstrate eingesetzt und ein Lebendzellfarbstoff (SiR-Actin) benutzt, um dynamische Messungen zu ermöglichen. Es wurden Messungen der Zellmorphologie, der Morphologie des Aktinskeletts, der Dynamik des Aktinskeletts und der Zellzugkräfte durchgeführt.

tersuchungen zur Mechanotransduktion und Zelladhäsion.^{143,222,223} Zudem handelt es sich um humane Primärzellen, sodass sich für Erkenntnisse, die an HUVECs gewonnen werden, eine besondere medizinische Relevanz ergibt.

In der vorliegenden Arbeit wurden HUVECs als Modellzellen für primäre humane mechanosensitive Zellen benutzt, da sie sich auf einer mithilfe des Adhäsionsproteins Fibronectin mikrostrukturierten Oberfläche gut an eine vorgegebene Form anpassen (siehe Abb. 4.2 für Beispielbilder). Die Zellen wurden auf Substraten, die mit Streifen unterschiedlicher Breite mikrostrukturiert waren, ausgesät und, je nach Versuch, für ein bis zwei Stunden anhaften gelassen. Es wurde bereits demonstriert, dass nach diesem Zeitraum die Zellkräfte ein Plateau erreichen und die Zellflächen ihre maximale Größe einnehmen.²¹¹ Es konnte beobachtet werden, dass die Zellen auf den benutzten Streifen anwuchsen und sich in der Regel der Form der Streifen anpassten.

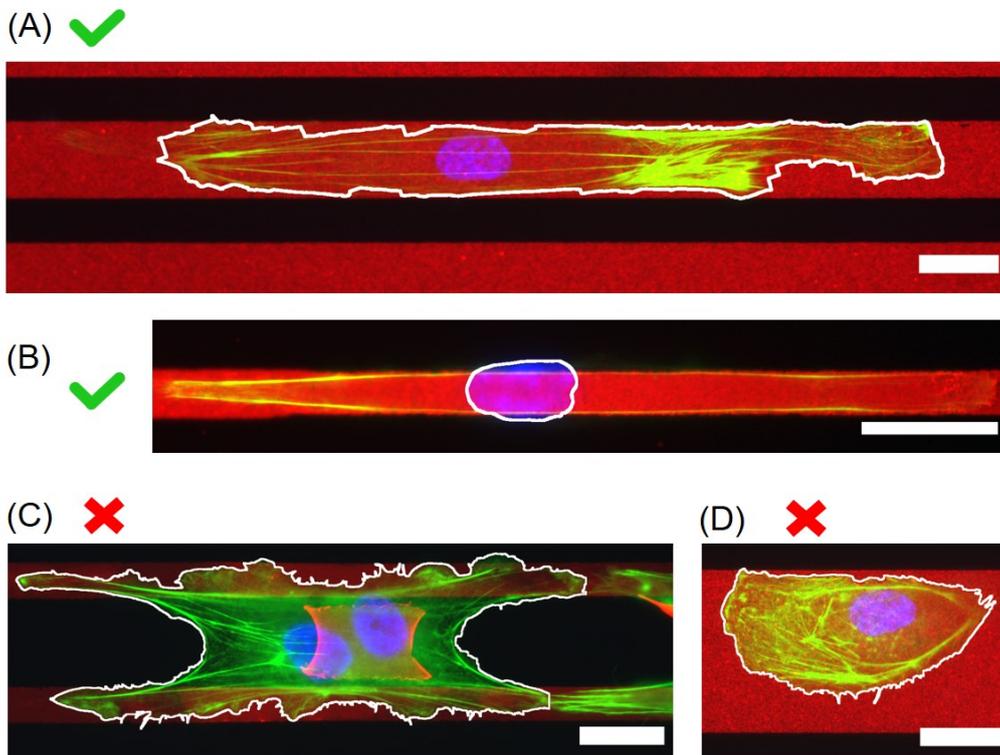


Abbildung 4.2: Beispielhafte Zellen, die für die Auswertung geeignet (A-B) oder ungeeignet (C-D) waren (Zell- bzw. Zellkernkontur: weiß, Fibronektinstreifen: rot, Aktinskelett: grün, Zellkern: blau; Maßstabsbalken in allen Bildern: 20 μm). (A) Die Zelle folgt mit ihren langen Rändern klar den Streifenkanten und wurde bei der Auswertung benutzt. (B) Die Zelle überragt im Bereich des Zellkerns (weiße Kontur) den Streifenrand, adhärert aber nur auf dem Streifen und wurde bei der Auswertung berücksichtigt. (C) Die Zelle zeigt mehrere Gründe für einen Ausschluss: (i) Überwachsen des Streifenrandes, (ii) Zell-Zellkontakt (rechts), (iii) mehr als ein Zellkern und (iv) inhomogener Streifen. (D) Ein weiterer Ausschlussgrund ist (v) mangelnde laterale Einschränkung (mangelnder Kontakt mit den Streifenrändern).

Die adhärennten Zellen wurden quantitativ charakterisiert, um den Einfluss der lateralen Einschränkung auf die Zellstruktur und Zellfunktion zu ermitteln. Ein besonderer Fokus wurde dabei auf die Struktur des Aktinskeletts und die Fähigkeit zur Kontraktion gelegt, da beide in engem Zusammenhang stehen und eine wichtige Rolle während der Morphogenese und der Formgebung der Zelle spielen. Die Charakterisierung geschah entweder über die Mikroskopie von fixierten Zellen, in denen das Aktinskelett und der Zellkern gefärbt worden waren, oder durch eine Lebendzellmessung zur Bestimmung der Zellzugkräfte, gegebenenfalls mit zusätzlicher Inkubation mit dem Lebendzell-Aktinmarker SiR-Actin. Die Wahl der vorgegebenen Form von Streifen unterschiedlicher Breite wurde getroffen, um nur den Effekt einer lateralen Einschränkung zu untersuchen und keine weiteren Freiheitsgrade der Zellausbreitung einzuschränken. Insbesondere sollte so keine

Fläche beziehungsweise Länge vorgegeben werden, wie es bei geschlossenen Flächen, wie zum Beispiel bei Rechtecken, der Fall wäre.

In fixierten Zellen erfolgte eine Ermittlung der Zellfläche und der Zelllänge anhand der Aktinfärbung. Weiterhin wurden die Dimensionen und Ausrichtung des Zellkerns ermittelt. Das Aktinskelett wurde in einer separaten Analyse ebenso quantitativ charakterisiert. Es erfolgte einerseits eine Bestimmung der Gesamtmenge an Aktinfasern (Gesamtlänge) sowie andererseits die Bestimmung der Orientierung der Fasern (für eine Übersicht zur Morphologieanalyse: siehe Abb. 4.3). Versuche mit lebenden Zellen dienten zur Ermittlung der Zellzugkräfte und deren Abhängigkeit von der Streifenbreite. In einigen dieser Versuche erfolgte zusätzlich eine Färbung mit SiR-Actin, um zusätzlich Informationen über die Dynamik des Aktinskeletts in Abhängigkeit der lateralen Einschränkung zu gewinnen und gegebenenfalls zeitaufgelöste Korrelationen zwischen der Organisation des Aktinskeletts und den Zellzugkräften zu erhalten. Ein Überblick über die durchgeführten Untersuchungen ist in Abbildung 4.1 gegeben. Ziel der Auswertung war es, sowohl strukturelle als auch funktionelle Anpassungen der Zellen an laterale Einschränkung zu erfassen.

4.2 Einfluss der lateralen Einschränkung auf die Zellmorphologie

Durch die Vorgabe der Adhäsionsflächen wurden auf den Substraten zwei Raumrichtungen ausgezeichnet, zum einen die Richtung entlang des Streifens (im Weiteren als x -Richtung bezeichnet) und die Richtung senkrecht dazu (im Weiteren als y -Richtung bezeichnet). Diese beiden Raumrichtungen dienen in den folgenden Messungen als Referenzen. Um die Ausdehnung der Zelle auf den Streifen zu quantifizieren, wurden die Länge, Breite und Fläche der Zellen bestimmt. Da die Zellen in ihrer Adhäsion entlang der y -Richtung eingeschränkt waren, wird diese als Zellbreite bezeichnet, wohingegen die Ausdehnung der Zelle entlang der freien Richtung (x -Richtung) als Länge bezeichnet wird. Da für die Untersuchungen nur solche Zellen berücksichtigt wurden, die tatsächlich lateral eingeschränkt waren, wird im Folgenden die Zellbreite der Streifenbreite gleichgesetzt. Abweichungen von diesem Zusammenhang ergaben sich beispielsweise durch Streifen mit variabler Dicke (z. B. keilförmige Form) oder das Überwachsen der Streifenränder durch die Zelle. Diese Zellen fanden in der Auswertung keine Berücksichtigung.

Zur Analyse wurden isolierte Zellen selektiert, die keine Kontakte mit anderen Zellen aufwiesen (siehe Abb. 4.2). Zudem mussten die Zellen idealerweise Kontakt mit beiden Streifenrändern aufweisen oder zumindest deutlich in ihrer Ausrichtung und Ausbreitung durch den Streifen beschränkt sein. Das bedeutet, dass auch Zellen, deren Zellrand über eine Länge von mehr als einer Zellbreite parallel in der Nähe zum Streifenrand verlief und punktuell mit diesem Kontakt hatte, in die Auswertung einbezogen wurden. Zellen,

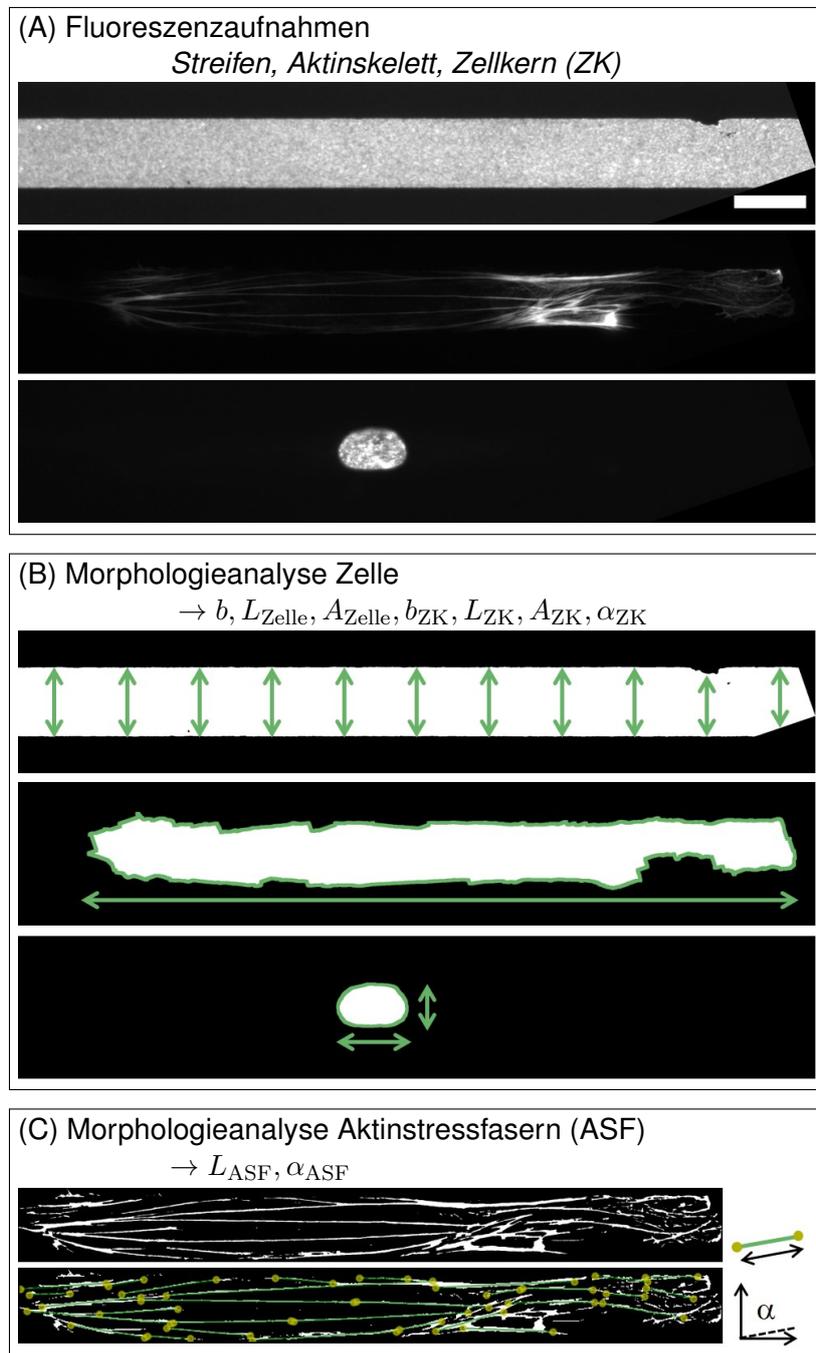


Abbildung 4.3: Morphologieanalyse. (A) Die Bilder der einzelnen Fluoreszenzkanäle (Fibronectinstreifen, Aktinskelett, Zellkern) werden umgewandelt in (B) Binärbilder. Aus diesen werden die Streifenbreite b (Mehrfachmessung), die Zelllänge L_{Zelle} und die Zellfläche A_{Zelle} sowie die Dimensionen und die Ausrichtung des Zellkerns ermittelt. (C) Das Aktinskelett wird ebenfalls als Binärbild dargestellt. Dieses wird zur Detektion von Geradensegmenten benutzt, aus denen die Länge der Aktinfasern und deren Ausrichtung bestimmt wird. (Maßstabsbalken: 20 μm)

die über den Streifenrand hinaus adhärerten, wurden nicht in die Auswertung aufgenommen. Auf schmalen Streifen waren Zellen zu beobachten, die im Bereich des Zellkerns über den Streifenrand hinausragten, aber nur auf dem Streifen angewachsen waren, was durch Fokussieren auf verschiedene z -Ebenen überprüft werden konnte (siehe Abb. 4.2 (B) und Abb. 4.7). Diese Zellen wurden für die Auswertung verwendet. Zudem wurden nur Zellen berücksichtigt, die über einen einzigen Zellkern verfügten. In einer separaten Auswertung zeigte sich, dass Zellen mit mehreren Zellkernen (ca. 10% aller Zellen) länger und flächenmäßig größer waren (siehe Anhang, Abb. A.1). Die Zahl der Zellkerne wurde allerdings nur bei der Morphologie-Analyse als Auswahlkriterium angewandt, da bei der Messung der Zellzugkräfte keine Färbung des Zellkerns erfolgte.

4.2.1 Zellform in Abhängigkeit der Streifenbreite

Durch Binärisierung der Fluoreszenzaufnahmen des Aktinskeletts, des Zellkerns und des Streifenmusters wurden Parameter der Zellmorphologie sowie die Streifenbreite bestimmt, deren Zusammenhang im Folgenden beschrieben und diskutiert wird.

4.2.1.1 Die Zelllänge wird nur wenig von der Zellbreite beeinflusst

Die Zelllänge streute relativ stark um einen Mittelwert von rund $100\ \mu\text{m}$, mit Maximalwerten bei ca. $250\ \mu\text{m}$ und Minimalwerten um die $50\ \mu\text{m}$, mit einem geringfügigen Einfluss der Streifenbreite (siehe Abb. 4.4). Zellen auf schmalen Streifen ($b < 20\ \mu\text{m}$) unterschieden sich in ihrer Länge geringfügig von Zellen auf breiteren Streifen ($L = 109 \pm 37\ \mu\text{m}$ beziehungsweise $L = 95 \pm 30\ \mu\text{m}$, jeweils Mittelwert mit Standardabweichung). Demnach ist es nicht so, dass die Zellen bestrebt sind, ihre Adhäsionsfläche konstant zu halten, sondern ihre End-zu-End-Ausdehnung (vgl. den gestrichelten Fit für eine konstante Zellfläche und den linearen Fit, der auf eine schwache Streifenbreitenabhängigkeit hinweist, beide Abb. 4.4, siehe auch Abb. 4.6).

Aus der Zelllänge und Zellbreite abgeleitet ergibt sich das Seitenverhältnis der Zelle (*Aspect Ratio*, AR), welches als Maß für die Elongation beziehungsweise Asymmetrie einer Zelle dienen kann. Unter der vereinfachten Annahme einer konstanten Länge und einem Seitenverhältnis von $AR = 1$ in Abwesenheit einer Einschränkung (Streifenbreite im Bereich der maximalen Zellausdehnung), lässt sich die Abhängigkeit des Seitenverhältnisses von der Streifenbreite gut mit einer Funktion der Form $AR = L/b$ modellieren, mit L als Fitparameter (siehe Abb. 4.5).

Um zu überprüfen, ob sich die Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie auf Glas- und Gelsubstraten unterscheiden, wurden neben den Messungen auf Glas auch Messungen auf Polyacrylamid-Hydrogelen mit einem E -Modul von $5\ \text{kPa}$ durchgeführt. Die Mittelwerte der Zelllängen für Zellen auf Hydrogelsubstraten auf schmalen Streifen ($b < 20\ \mu\text{m}$) und auf breiteren Streifen befanden sich im Bereich der Standardabweichungen der Zellen auf

4.2 Einfluss der lateralen Einschränkung auf die Zellmorphologie

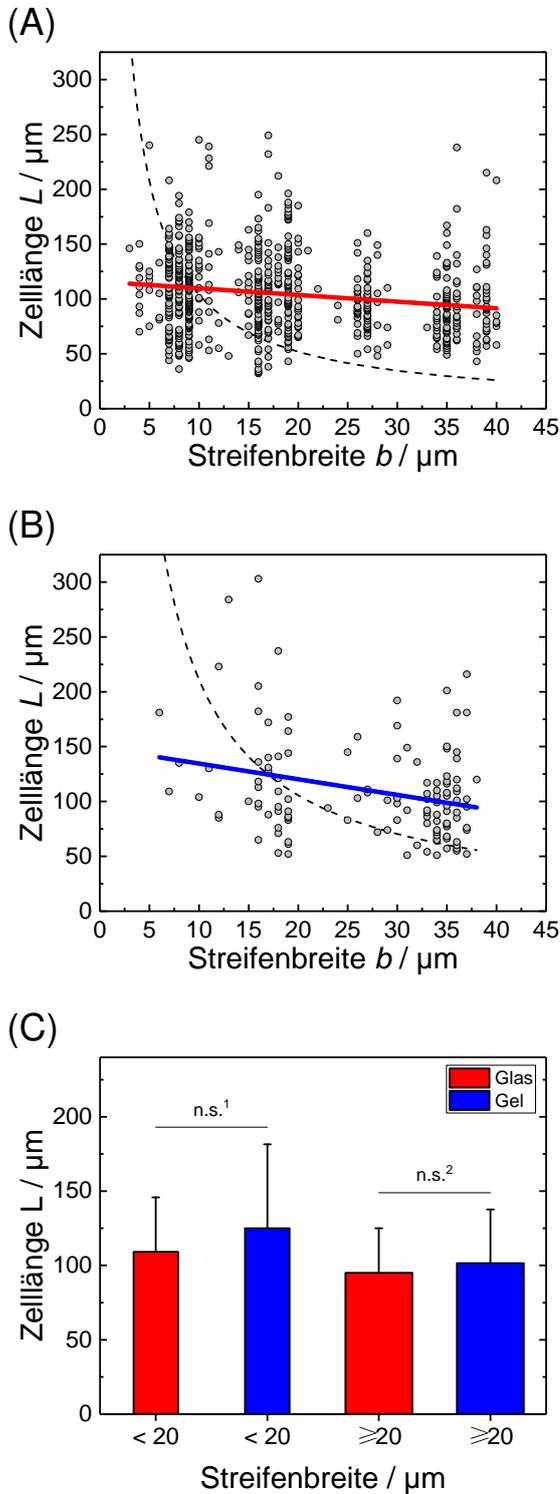


Abbildung 4.4: Die Zelllänge wird durch die laterale Einschränkung wenig beeinflusst.

(A) Zelllänge in Abhängigkeit der Streifenbreite (auf Glassubstraten). Jeder Punkt repräsentiert eine Zelle. Die Zelllänge variiert stark von Zelle zu Zelle, die Abhängigkeit von der Streifenbreite ist gering. Die rote Linie ist ein linearer Fit ($L = 116 \mu\text{m} - 0,61b$). Die gepunktete Linie stellt einen Fit der Form $L = A/b$ dar, mit einer konstanten Fläche A (Fitparameter) von $1039 \mu\text{m}^2$.

(B) Zelllänge in Abhängigkeit der Streifenbreite auf Polyacrylamidhydrogelen ($E = 5 \text{kPa}$). Zellen auf Gelsubstraten zeigen ähnliche Längen wie Zellen auf Glassubstraten. Blau: linearer Fit $L = 149 \mu\text{m} - 1,4b$. Die schwarze gestrichelte Linie ist die Funktion $L = A/b$ mit der Fläche (Fitparameter) $A = 2110 \mu\text{m}^2$.

(C) Vergleich der mittleren Zelllängen auf Glas- und Gelsubstraten sowie unterteilt nach schmalen ($b < 20 \mu\text{m}$) und breiten Streifen ($b \geq 20 \mu\text{m}$). Zellen auf schmalen Streifen sind geringfügig länger als auf breiten Streifen.

Aufgetragen ist das arithmetische Mittel mit Std.abw. ($n_{\text{Zellen}} = 537, 247, 46, 83$). n.s.¹: nicht signifikant, zweiseitiger t -Test mit Welch-Korrektur, $p > 0,05$ bei Annahme ungleicher Varianzen (Levene-Test, $p < 0,05$); n.s.²: nicht signifikant, zweiseitiger t -Test, $p > 0,05$; Auswertung in Origin Pro 2017.

Glassubstraten und zeigen keinen signifikanten Unterschied. Zellen auf schmalen Streifen auf Gelsubstraten hatten eine mittlere Länge von $125 \pm 56 \mu\text{m}$ und Zellen auf breiten Streifen wiesen eine mittlere Länge von $102 \pm 36 \mu\text{m}$ auf. Die Größenähnlichkeit der Zellen auf Glas- und Gelsubstraten zeigte sich auch bei der Zellelongation, die durch das Zellseitenverhältnis (AR) beschrieben werden kann. Hier ergab sich eine starke Übereinstimmung der verwendeten Fit-Funktionen, mit einer Zelllänge von $110 \mu\text{m}$ auf Glas und $125 \mu\text{m}$ auf dem Gelsubstrat (vgl. die blaue und rote Fitkurve in Abb. 4.5).

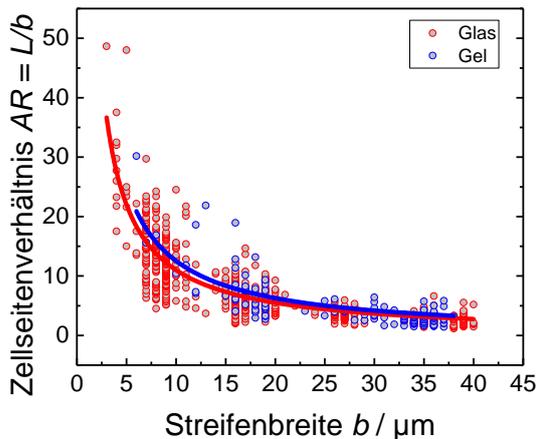


Abbildung 4.5: Die Elongation wird durch die laterale Einschränkung beeinflusst. Zellseitenverhältnis (Quotient aus Zelllänge und Zellbreite, *Aspect Ratio* $AR = L/b$) als Maß für den Elongationsgrad der Zellen in Abhängigkeit der Streifenbreite. Rot: Zellen auf Glas, blau: Zellen auf Gel, mit Fitkurven der Form $AR = L/b$ und L als Fitparameter, mit $L_{\text{Glas}} = 110 \mu\text{m}$, $L_{\text{Gel}} = 125 \mu\text{m}$.

4.2.1.2 Die Adhäsionsfläche steigt mit der Streifenbreite

Neben der Zelllänge ist auch die Zellfläche ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Zelladhäsion und der Adaption der Zelle an die laterale Einschränkung. Da nur solche Zellen zur Auswertung herangezogen wurden, die Kontakt mit beiden Streifenrändern hatten, und die Zelllänge wenig abhängig von der Einschränkung war, ist ein nahezu linearer Zusammenhang zwischen der Streifenbreite und der Zellfläche zu erkennen (Fläche \propto Breite \times Länge, mit konstanter Länge), wie in Abbildung 4.6 dargestellt.

Die geringsten Zellflächen im Bereich $100 \mu\text{m}^2 - 500 \mu\text{m}^2$ waren besonders auf den schmalsten Streifen ($b < 10 \mu\text{m}$) zu beobachten, während auf Streifenbreiten von $35 \mu\text{m} - 40 \mu\text{m}$ Flächen bis zu $7000 \mu\text{m}^2$, bei zunehmender Variation der Flächenwerte, gefunden wurden. Die Flächenzunahme konnte sowohl für Glas- als auch für Gelsubstrate durch lineare Fits mit ähnlichen Parametern approximiert werden. Hierbei ist anzumerken, dass dieser Trend nur im Bereich der benutzten Streifenbreiten gilt, da eine maximal erreichbare Zellfläche vorausgesetzt werden kann. Dementsprechend wurden auf breiten Streifen auch nur wenige Zellen gefunden, die tatsächlich mit beiden Streifenrändern Kontakt hatten. In anderen Worten: Durch die Endlichkeit der Zellfläche wird es auf breiten Streifen immer unwahrscheinlicher, Zellen zu finden, die mit beiden Streifenrändern Kontakt ha-

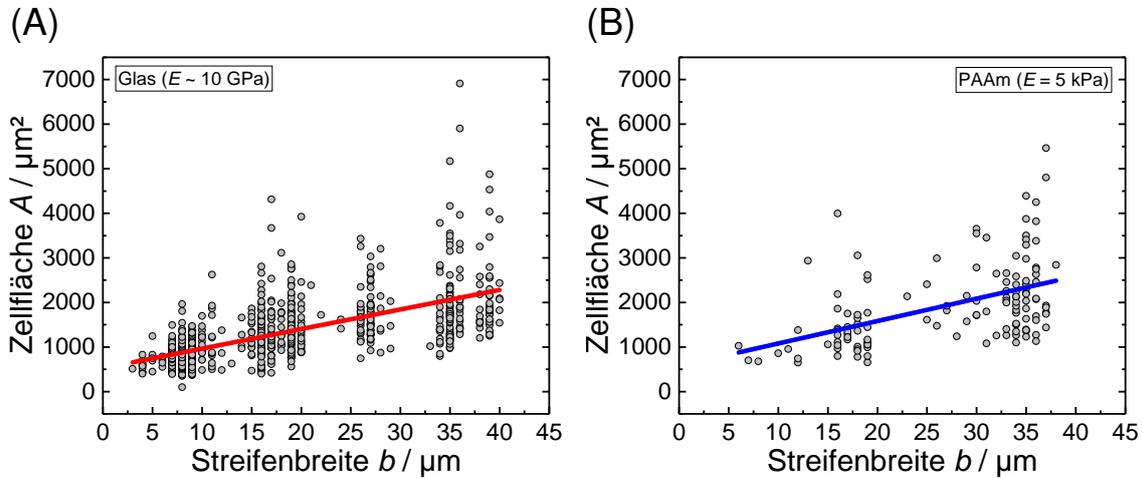


Abbildung 4.6: Die Zellfläche in Abhängigkeit der Streifenbreite auf Glas und Hydrogelsubstraten. (A) Die Zellfläche nimmt mit der Streifenbreite zu. Die rote Linie ist ein linearer Fit ($A = 525 \mu\text{m}^2 + 44 \mu\text{m} \cdot b$) zur Verdeutlichung. (B) Zellen auf Polyacrylamidhydrogelen ($E = 5 \text{ kPa}$) zeigen ebenso einen Anstieg der Fläche mit der Streifenbreite ($A = 576 \mu\text{m}^2 + 50 \mu\text{m} \cdot b$).

ben, also solche Zellen, die lateral eingeschränkt sind. Viele der Zellen auf breiten Streifen befinden sich im Kontakt mit nur einem Streifenrand oder haben gar keinen Kontakt mehr zum Rand der adhäsiven Fläche. Diese Zellen wurden aber nicht mit in die Auswertung einbezogen (vergleiche Abb. 4.2). Gleichfalls kann auch von einer minimalen Zellfläche ausgegangen werden. Hierbei ist anzumerken, dass die projizierte Zellfläche gemessen wurde. Bei Zellen auf sehr schmalen Streifen ($b < 10 \mu\text{m}$) wurden mitunter Zellen beobachtet, die einzig auf der vorgegebenen Fläche adhärten, aber im Bereich des Zellkerns über den Streifenrand hinausragten. Der y -Versatz (von Null verschiedene Fläche, ca. $550 \mu\text{m}^2$ bei verschwindender Streifenbreite) der Fit-Funktionen in Abb. 4.6 kann als Abschätzung für die projizierte Fläche einer nichtadhärenten Zelle betrachtet werden.

4.2.2 Die Zellkernmorphologie korreliert mit der Zellmorphologie

Die Analyse der Zellmorphologie wurde auf intrazellulärer Ebene fortgesetzt. Hierbei wurde die Morphologie des Zellkerns untersucht. Generell war eine Anpassung des Zellkerns an die Zell- beziehungsweise Streifenform zu beobachten, so wiesen Zellkerne in langgestreckten Zellen auf schmalen Streifen ihrerseits eine deutlich elongierte Form auf. Teilweise war ein Hinausragen des Zellkerns über den Streifenrand zu erkennen (siehe Abb. 4.7).

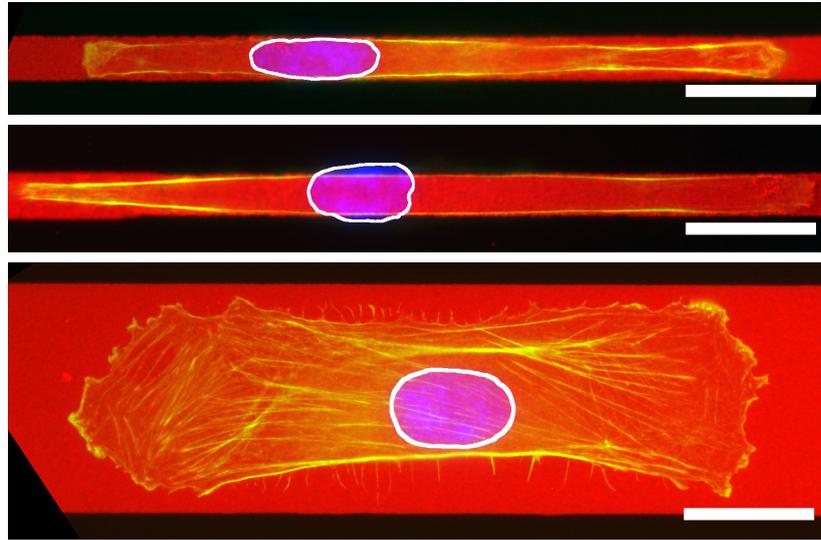


Abbildung 4.7: Exemplarische Zellkerne (weiße Konturen). Zellkerne schmaler Zellen sind ebenfalls schmal, insbesondere ist die Breite der Zellkerne verringert. Ebenso ist in einigen besonders schmalen Zellen ein Herausragen des Zellkerns über den Streifenrand zu erkennen. Kerne in breiten Zellen haben immer noch eine ovale Gestalt, sind aber breiter. Die Ausrichtung des Zellkerns stimmte überwiegend mit der Zellausrichtung in Streifenrichtung überein. (rot: Fibronektinstreifen, grün: Aktinskelett, blau: Zellkern, Maßstabsbalken: 20 μm)

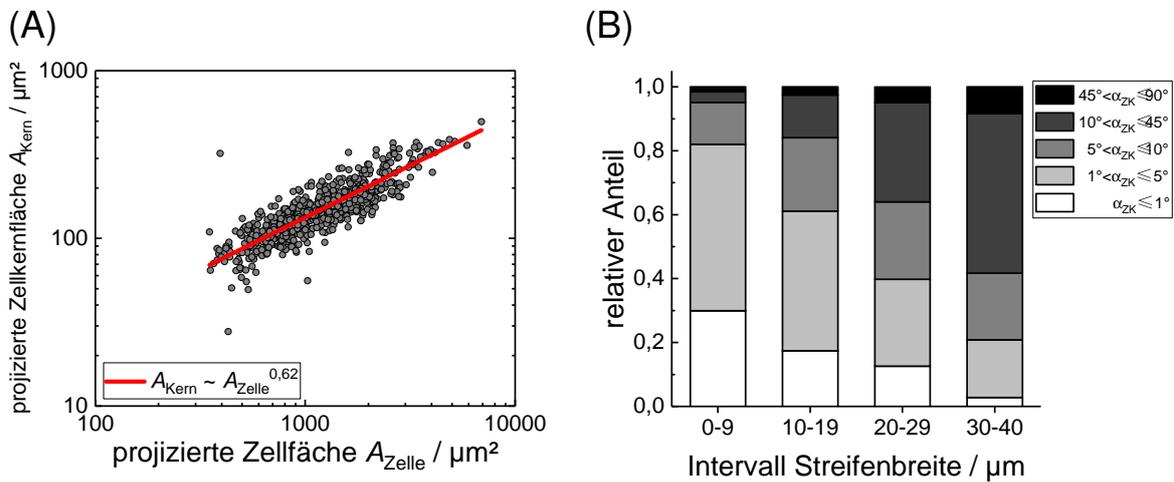


Abbildung 4.8: Kerngröße und -ausrichtung. (A) Es besteht eine starke Korrelation zwischen der projizierten Zellfläche und der projizierten Zellkernfläche. Der Zusammenhang lässt sich gut durch ein Power-Law modellieren. (B) Die Kernausrichtung relativ zur Streifenrichtung ist von der Streifenbreite abhängig. Auf schmalen Streifen ($b < 20 \mu\text{m}$) sind rund 80% aller Kerne in einem Winkel von weniger als 10° zum Streifen ausgerichtet. (Die Zellzahl pro Intervall, von niedrigstem zum höchsten, beträgt: 267, 270, 103, 144.)

4.2 Einfluss der lateralen Einschränkung auf die Zellmorphologie

Eine quantitative Beschreibung des Zellkerns findet auf Basis der projizierten Fläche und des Seitenverhältnisses AR sowie der Ausrichtung des Zellkerns relativ zur Streifenrichtung statt. Ähnlich der Veränderung der Zellform ergab sich auch eine Anpassung der Zellkernmorphologie in Anpassung an die Streifenbreite. Die projizierte Fläche der Zellkerne nahm mit zunehmender Einschränkung ab, während das Seitenverhältnis zunahm. Die Zunahme des Seitenverhältnisses war allerdings geringer als die der dazugehörigen Zelle (siehe Abb. 4.9). Für das Verhältnis der Volumina des Zellkerns und des Zytoplasmas ("karyoplasmisches Verhältnis") wird ein linearer Zusammenhang ($V_{\text{Kern}} \propto V_{\text{Zelle}}^1$) beschrieben (Power-Law mit Exponent 1), während für die Abhängigkeiten anderer Organell-Größen von der Zellgröße oftmals Power-Laws mit anderen Exponenten verwendet werden.²²⁴ Dementsprechend wurden auch in dieser Arbeit Power-Laws verwendet, um die Korrelation zwischen der Länge und Breite des Zellkerns und der Ausdehnung der Zelle zu beschreiben. Die Begriffe "Breite" und "Länge" zur Bezeichnung der Kerndimensionen beziehen sich dabei immer auf die Ausdehnung des Kerns in Richtung des Streifens beziehungsweise senkrecht dazu. Dies stimmt in der Regel mit der tatsächlichen Breite und Länge überein, da die Kerne überwiegend entlang der Streifenrichtung orientiert waren, insbesondere auf schmalen Streifen, wie in Abb. 4.8 ersichtlich ist. Selbst auf breiteren Streifen ($30 \mu\text{m} \leq b \leq 40 \mu\text{m}$) wichen immer noch 40% aller Zellkerne weniger als 10° von der Streifenrichtung ab.

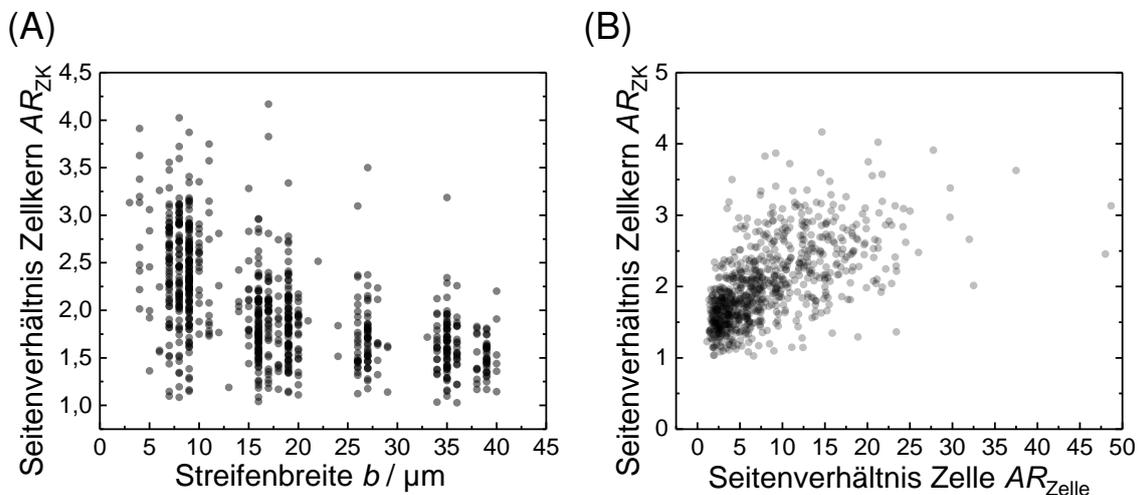


Abbildung 4.9: Veränderung der Zellkernmorphologie in Anpassung an laterale Einschränkung. (A) Das Seitenverhältnis des Zellkerns erreicht in lateraler Einschränkung höhere Werte (kleine Streifenbreiten). (B) Das Seitenverhältnis der Zellkerne korreliert leicht mit dem Seitenverhältnis der Zelle, erreicht aber niedrigere Werte.

Bemerkenswert ist weiterhin die Abhängigkeit der Zellkernbreite von der Zellbreite beziehungsweise die Abhängigkeit der Kernlänge von der Zelllänge. Die Kernbreite steigt

mit der Streifenbreite, während die Kernlänge keine Abhängigkeit von der Streifenbreite zeigt. Analog dazu war die Länge des Zellkerns abhängig von der Zelllänge, nicht aber von der Zellbreite (siehe Abb. 4.10). Zur Beschreibung der Korrelation wurde wiederum ein Power-Law verwendet, wobei sich Exponenten von 0,35 und 0,37 fanden. Dies weist auf eine starke Kopplung zwischen der Ausdehnung des Zellkerns (in diesem Fall die projizierte Fläche) und der Ausdehnung der Zelle hin (projizierte Fläche). Interessant ist, dass beide Abhängigkeiten mit Power-Laws mit sehr ähnlichen Parametern beschrieben werden können. Dies deutet darauf hin, dass die Dimensionen des Zellkerns stark durch die Zellform vorgegeben werden und dies durch einen gemeinsamen Mechanismus geschieht, da die Ausdehnung des Zellkerns in Richtung der vorgegebenen Zellbreite und in Richtung der freien Zelllänge die gleiche Abhängigkeit zeigt.

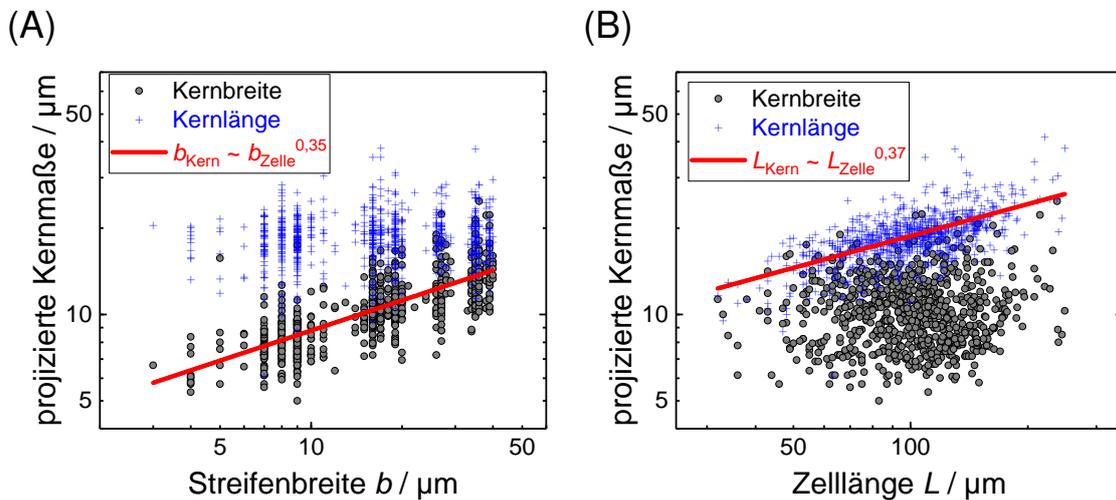


Abbildung 4.10: Kernausdehnung in Anpassung an laterale Einschränkung. (A) Die Breite der Zellkerne nimmt mit zunehmender seitlicher Einschränkung ab ($b_{\text{Kern}} = 3,9 \mu\text{m} \times (b_{\text{Zelle}}/\mu\text{m})^{0,35}$). Die Zellkernlänge ist nahezu unabhängig von der Streifenbreite. (B) Die Länge des Zellkerns korreliert mit der Zelllänge ($L_{\text{Kern}} = 3,4 \mu\text{m} \times (L_{\text{Zelle}}/\mu\text{m})^{0,37}$), die Kernbreite hingegen nicht. Die Breiten- beziehungsweise Längenabhängigkeit lassen sich mit ähnlichen Power-Laws beschreiben.

4.2.3 Diskussion der Zell- und Zellkernmorphologie

Der Vergleich der äußeren Morphologie von eingeschränkten Zellen auf Glassubstraten und auf Hydrogelsubstraten legt nahe, dass sich Rückschlüsse aus Messungen der Zellmorphologie auf Glassubstraten näherungsweise auch auf Zellen auf Gelsubstraten verallgemeinern lassen. Es wurde gezeigt, dass sowohl die Zelllängen in einem Bereich von ca. $100 \mu\text{m}$ liegen und nur eine schwache Beeinflussung durch die laterale Einschränkung erfahren (vergleiche Abb. 4.4), während sich die Zellflächen im genutzten Streifen-

breitenbereich von ca. $1000 \mu\text{m}^2$ auf schmalen Streifen bis auf ca. $5000 \mu\text{m}^2$ auf breiten Streifen verfünffachen. Dies entspricht relativ genau der Zunahme der Streifenbreite um einen ähnlichen Faktor (siehe Abb. 4.6). Sowohl auf Glas ($[E] \sim \text{GPa}$) als auch auf Hydrogelen ($E = 5 \text{ kPa}$) liegt die Fläche auf schmalen Streifen ($b \approx 10 \mu\text{m}$) bei ca. $1000 \mu\text{m}^2$ und steigt auf Maximalwerte von ca. $7000 \mu\text{m}^2$ auf breiteren Streifen ($b \approx 40 \mu\text{m}^2$). Die Werte der linearen Fits für $A(b = 0)$ im Bereich von $500 \mu\text{m}^2$ sind mit Hinsicht auf Angaben aus der Literatur plausibel, ebenso die Flächenwerte der stärker ausgebreiteten Zellen. Auf flächigen Substraten (im Gegensatz zu Substratoberflächen mit einer Micropillar-Architektur) wurde die Unabhängigkeit der Zellfläche von der Substrathärte im Bereich von $E = 2,5 \text{ kPa} - 9 \text{ kPa}$ bereits beschrieben.²¹¹ In der Literatur findet man Werte von $100 \mu\text{m}^2$ bis $500 \mu\text{m}^2$ für die Fläche von initial adhärennten HUVECs²²² und Angaben von $1000 \mu\text{m}^2$ bis $5000 \mu\text{m}^2$ für die mittlere Adhäsionsfläche konfluenter beziehungsweise vereinzelter HUVECs.^{143,225,226} Ebenso wurde eine Zunahme der Adhäsionsfläche in Korrelation mit abnehmender seitlicher Einschränkung für HUVECs bereits beschrieben.¹⁵¹ Auch wenn in der vorliegenden Arbeit keine nichtadhärennten Zellen beobachtet wurden, legen die geringen Flächen im Bereich von $100 \mu\text{m}^2 - 500 \mu\text{m}^2$ bei Zellen auf schmalen Streifen ($b < 10 \mu\text{m}$) einen Zustand der unvollständigen Adhäsion nahe. Die Abschätzung von $500 \mu\text{m}$ für eine Zellfläche bei einer verschwindenden Streifenbreite (siehe lineare Fits, Abb. 4.6) stimmt annähernd mit Werten für nichtadhärennte HUVECs überein.²²²

Die Zunahme der Fläche mit der Streifenbreite ergibt sich einerseits aus der geringen Änderung der mittleren Länge für verschiedene Streifenbreiten, kann aber auch dahingehend interpretiert werden, dass Zellen auf schmalen Streifen in einem Zustand der unvollständigen, eingeschränkten Adhäsion sind und erst auf breiteren Streifen vollständig adhären können. Durch die Längenkonstanz ergibt sich bei schmalen Streifenbreiten eine starke relative Elongation des Zellkörpers, mit AR -Werten über 20, was deutlich über den Werten liegt, welche uneingeschränkte HUVECs aufweisen, deren Seitenverhältnis in der Regel bei $AR \approx 1,5 - 2$ liegt.¹⁵ Somit konnte gezeigt werden, dass HUVECs in der Lage sind, auch auf quasi-eindimensionalen Substraten ($b_{\text{Streifen}} \ll L_{\text{Zelle}}$) anzuwachsen, dabei aber eine deutlich reduzierte Fläche aufweisen.

Die gefundenen Längen sind vergleichbar zu Zelllängen von Endothelzellen in vivo, wobei die Angaben zu mittleren Längen zwischen $30 \mu\text{m}$ und $130 \mu\text{m}$ schwanken.^{227,228} Geht man davon aus, dass das Zellvolumen von der Streifenbreite unabhängig ist, können sich bei der Ausbreitung auf schmalen Streifen im Vergleich zu breiten Streifen nur noch die Zelllänge oder die Zellhöhe ändern. Tatsächlich wurde nur eine geringe Änderung der Zelllänge beobachtet. Der geringe Einfluss der Streifenbreite auf die Zelllänge lässt sich auf einen zellinternen Mechanismus zur Größendetektion zurückführen. Eine Möglichkeit ist, dass Mikrotubuli als zellulärer Größenmaßstab dienen. Dies kann einerseits über Signaltransport von den jeweiligen Enden erfolgen oder durch Kraftübertragung entlang der Mikrotubuli,¹ unter anderem im Gleichgewicht mit der Spannung des Aktomyosinkortex. Ein solcher Mechanismus wurde zur Erklärung der Längenkonstanz von

lateral eingeschränkten Fibroblasten benutzt.²²⁹ Dort konnte auch gezeigt werden, dass die maximale Ausdehnung eingeschränkter Fibroblasten in etwa der uneingeschränkter Zellen entspricht. Dieselbe Beobachtung wurde in dieser Arbeit bei HUVECs gemacht, was ebenfalls auf eine robuste, zelltypenspezifische Regulierung hindeutet.

Neben der Zellform wurden die projizierten Flächen der Zelle A_{Zelle} und des Zellkerns A_{Kern} miteinander verglichen. Eine Skalierung der Form $A_{\text{Zelle}} \propto A_{\text{Kern}}$ ist dabei nicht unbedingt zu erwarten, stattdessen erscheint ein nichtlinearer Zusammenhang wahrscheinlicher.²³⁰ Es kann davon ausgegangen werden, dass die Zelle flächig in Scheibenform auf dem Substrat aufliegt, während der Zellkern zwar abgeplattet ist, aber immer noch eine deutliche Ausdehnung in z -Richtung aufweist. Dies würde bedeuten, dass die Zellfläche in erster Näherung proportional zum Volumen der Zelle ist, da sich die Höhen ausgebreiteter Zellen nicht wesentlich ändern (die Höhe des Zellkerns variierte zwischen $3\ \mu\text{m}$ und $6\ \mu\text{m}$, mit kleineren Höhen auf breiteren Streifen, siehe Anhang, Abb. A.2), während die projizierte Fläche des Zellkerns eine Abhängigkeit der Form $A_{\text{Zellkern}} \propto V_{\text{Zellkern}}^{2/3}$ aufweist, womit $A_{\text{Zellkern}} \propto V_{\text{Zelle}}^{2/3}$ skaliert. Die gefundene Skalierung mit $A_{\text{Zellkern}} \propto A_{\text{Zelle}}^{0,61}$ entspricht dieser Abschätzung (siehe Abb. 4.8). Hierbei ist einzuschränken, dass diese Abschätzung vor allem für Zellen auf breiteren Streifen gilt, da auf besonders dünnen Streifen ($b < 10\ \mu\text{m}$) eine deutliche, durch den Zellkern hervorgerufene Deformation beobachtet wurde, sodass die Zellen nicht mehr als überwiegend flächig zu charakterisieren sind. In der Literatur wird eine geringere Beeinflussung der Zellkernmorphologie als der Zellform aufgrund externer Einschränkungen beschrieben.^{58,230} Weiterhin ist bekannt, dass das Elastizitätsmodul des Zellkerns in der Regel um einen Faktor zwei bis zehn größer ist als das der ganzen Zelle; dadurch ist erklärbar, weshalb die Deformation des Zellkerns weniger stark ausgeprägt ist als die der Zelle.⁵⁸ Umgekehrt kann eine Deformation des Zellkerns auch als Hinweis auf die mechanische Spannung innerhalb der Zelle interpretiert werden. Die Beobachtung, dass in besonders schmalen Zellen ($b < 10\ \mu\text{m}$) die Zellkerne einzelner Zellen über den Streifenrand herausragten, legt den Schluss nahe, dass dies in einer konfluenten Zelllage zu einer starken sterischen Wechselwirkung zwischen benachbarten Zellen führen würde.

Die in der Literatur beschriebene Kopplung der jeweiligen Volumina wird mit metabolischer Aktivität und vorhandenem Platz in der Zelle begründet. Dass zusätzlich eine Abhängigkeit der Kernaushen von den Zelldimensionen vorliegt, könnte ein Hinweis auf weitere, lokale Mechanismen sein. Dies könnten zum einen biochemische Gradienten sein oder auch mechanische Rückkopplung. Dabei erscheint eine alleinige Kopplung an Aktinstressfasern allerdings unwahrscheinlich, da die Umgebung des Zellkerns in ausgebreiteten und stark eingeschränkten Zellen unterschiedlich von Stressfasern ausgefüllt wird (siehe Abbildungen 4.7 und 4.11). In schmalen Zellen besteht oftmals nur an den Zellrändern Kontakt zwischen Stressfasern und Zellkern, während in Zellen auf breiteren Streifen die Umgebung des Zellkerns gleichmäßiger mit Stressfasern ausgestattet ist.

Auch die starke Kopplung zwischen der Ausrichtung des Zellkerns und der Ausrichtung der Zelle, die durch die äußere Struktur vorgegeben wird, trat ebenfalls auf breiten Streifen noch auf und deutet darauf hin, dass während verschiedener Ausbreitungszustände der Zelle die mechanische Kopplung zwischen Zellkern und Zellform gegeben ist. Dies kann zum Teil mit der Wechselwirkung zwischen perinukleären Stressfasern und dem Zellkern erklärt werden. Daneben sind aber auch noch Mikrotubuli und Intermediärfilamente an der Positionierung und Formgebung des Zellkerns beteiligt,^{230,231} die allerdings in dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

Da ein deutlicher Einfluss der Breite der lateralen Einschränkung auf die Zellfläche (A_{Zelle}) und die Elongation (AR) festgestellt wurde, werden diese Größen im Folgenden als Referenzparameter für die Zellform benutzt. Das heißt, dass weitere Zellparameter (Stressfaserausrichtung, Gesamtkraft etc.) in Abhängigkeit der Fläche und des Seitenverhältnisses betrachtet werden, um einen Einfluss der Zellform zu beschreiben.

4.3 Das Aktinskelett in Abhängigkeit der Streifenbreite

Da dem Aktinskelett eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellkontraktilität und Formgebung zukommt, wurde auch dessen Aussehen in Abhängigkeit von der vorgegebenen Umgebungsgeometrie untersucht.

4.3.1 Qualitative Beschreibung

In Zellen auf schmalen Streifen ($b < 20 \mu\text{m}$) befanden sich die äußersten, in Streifenrichtung zeigenden Stressfasern auf dem Streifenrand. Zudem wurden viele Zellen beobachtet, die nur noch über diese zwei am Streifenrand verlaufende Stressfasern verfügten. Dass es sich dabei tatsächlich um Stressfasern handelte, wurde anhand einer Myosin-Färbung nachgewiesen, (siehe Abb. A.5 im Anhang). Zellen auf breiten Streifen besaßen ein stärker verzweigtes und weniger parallel ausgerichtetes Aktinnetzwerk. Diese Zellen wiesen meist eine Vielzahl von Aktinfasern auf, wobei deren Ausrichtung auch vom Grad der Zellelongation abhing. Kürzere, in radialer Richtung verlaufende Fasersegmente waren oftmals am Rand der Zellen zu sehen. Zudem verliefen in Zellen auf breiten Streifen die äußersten, zum Streifenrand parallel ausgerichteten Fasern nicht koinzident mit diesem, sondern waren um wenige Mikrometer in Richtung des Zellinneren eingerückt; die Zellfläche am Rand des Streifens war oft nur durch eine diffuse Färbung des Aktinkortex sichtbar. In Abbildung 4.11 sind Beispielzellen auf schmalen und breiten Streifen zu sehen. Ebenso dargestellt sind die überlagerten Bilder mehrerer Zellen ähnlicher Länge auf gleich breiten Streifen, um die allgemeine Struktur auf schmalen und breiten Streifen zu verdeutlichen. Deutlich zu erkennen ist die Reduktion des Aktinskeletts auf zwei Stressfasern am Zellrand in schmalen Zellen (A, C) sowie die homogenere Verteilung der Aktinfasern in breiteren Zellen (B, D).

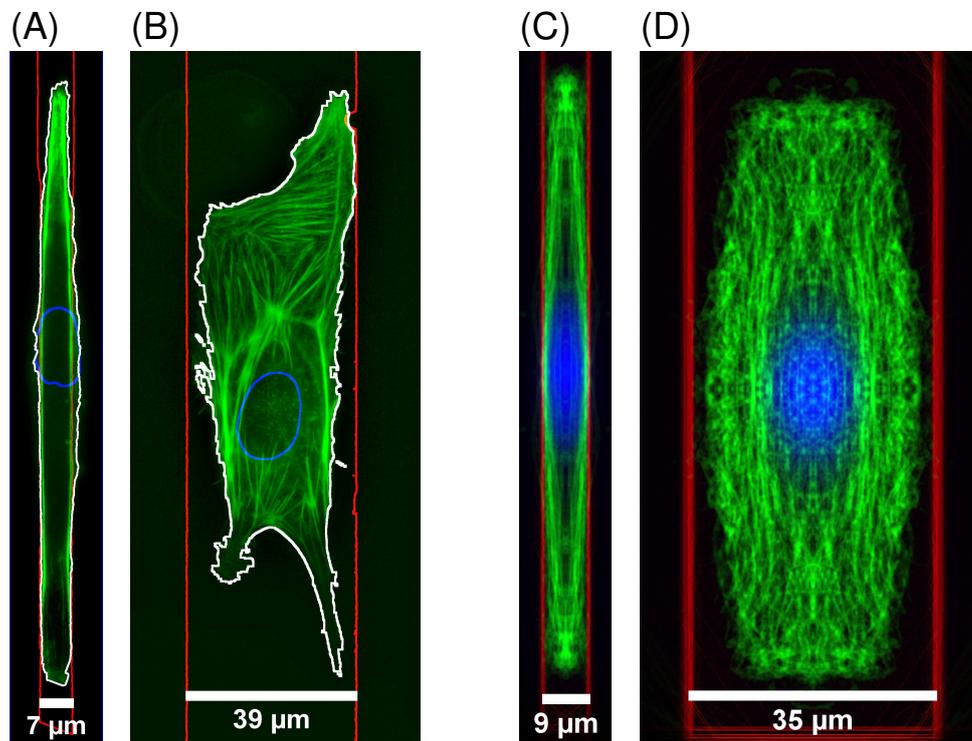


Abbildung 4.11: Das Aktinskelett in lateral eingeschränkten Zellen (Aktinskelett: grün, Zellkern: blaue Kontur, FN-Streifen: rote Kontur, Zellkontur: weiß) (A) Beispielbild einer Zelle auf einem schmalen Streifen mit nur zwei Stressfasern. (B) Beispielbild einer Zelle auf einem breiten Streifen, mit einer breiten Verteilung von Aktinfasern. (C) Überlagerung der Bilder von 18 Zellen mit ähnlicher Länge ($114 \mu\text{m} \pm 3,5 \mu\text{m}$) auf $9 \mu\text{m}$ breiten Streifen. Für die Überlagerung wurden zusätzlich die um 180° rotierten und die jeweils gespiegelten Bilder benutzt. Zu erkennen ist die Lokalisierung der Stressfasern am Zellrand. (D) Überlagerung der Bilder von 11 Zellen mit ähnlicher Länge ($82 \mu\text{m} \pm 2,5 \mu\text{m}$) auf $35\text{--}36 \mu\text{m}$ breiten Streifen. Das Aktinskelett ist im Mittel gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt, lediglich in der Zellmitte, an der mittleren Zellkernposition, ist die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von Aktinfasern geringer.

Der Bereich um den Zellkern war oft frei von Aktinfasern, dies war insbesondere in schmalen Zellen ersichtlich, in denen sich der Bereich ohne Stressfasern vom Zellkern weit in Richtung der distalen Zellenden erstreckte. Sogenannte perinukleäre, den Zellkern überspannende Stressfasern waren selten zu beobachten. Der Zellkern war in der Regel stattdessen von einem feinen kortikalen Netzwerk überdeckt.

4.3.2 Quantitative Beschreibung

Zur quantitativen Beschreibung wurde anhand von binärisierten Bildern des Aktinskeletts eine Detektion von linearen Objekten mittels Hough-Transformation durchgeführt. Aus den Parametern dieser Objekte wurden charakteristische Größen abgeleitet, so zum

einen die Gesamtlänge zur Beschreibung der Stressfasermenge in der Zelle und zum anderen die mittlere Orientierung relativ zur Streifenrichtung, als Beschreibung der Polarisierung beziehungsweise Anisotropie des Aktinskeletts.

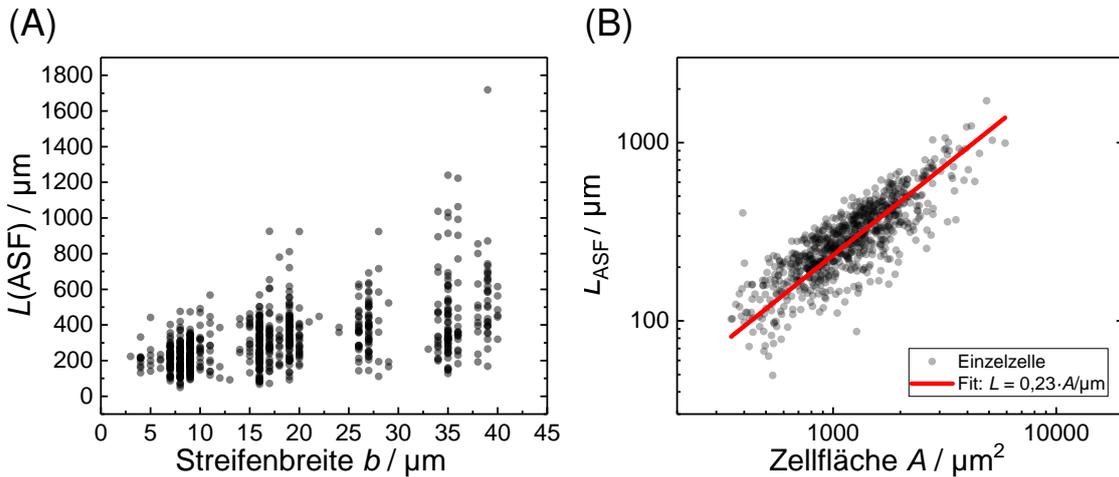


Abbildung 4.12: Gesamtlänge der Aktinfasern pro Zelle. (A) Gesamtfaserlänge pro Zelle vs. Streifenbreite und (B) Gesamtfaserlänge pro Zelle vs. Zellfläche. Die Gesamtfaserlänge nimmt sowohl mit der Streifenbreite als auch mit der Zellfläche zu. Die Korrelation mit der Zellfläche lässt sich gut mit einer direkten Proportionalität beschreiben (rote Gerade).

4.3.2.1 Die Gesamtlänge der Aktinfasern steigt mit der Zellfläche

Erwartungsgemäß wiesen Zellen auf breiteren Streifen eine größere Menge an Aktinfasern auf (Abb. 4.12). Ebenso existiert ein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen der Zellfläche und der Gesamtlänge der detektierten Aktinsegmente, wie anhand des Fits in Abbildung 4.12 in der doppelt-logarithmischen Auftragung zu sehen ist. Geht man von einer strikt parallelen Ausrichtung der Aktinfasern aus, lässt sich die Proportionalitätskonstante von $0,23/\mu\text{m}$ mit dem mittleren Abstand zwischen den Stressfasern assoziieren. Dieser beträgt $(0,23/\mu\text{m})^{-1} \approx 4,3 \mu\text{m}$. Bei einer rechtwinkligen Anordnung der Stressfasern (gitterförmig) würde dies einer Maschenweite von $8,6 \mu\text{m}$ entsprechen.

Zusätzlich wurde die Längenverteilung der detektierten Segmente betrachtet, in Abhängigkeit der Zelllänge, Streifenbreite (Zellbreite) und der Zellfläche (Abb. 4.13). Eine Gemeinsamkeit aller Kategorien war, dass kürzere Segmente häufiger vorkamen als längere Segmente. Da für die Detektion der Segmente eine Mindestlänge von $5 \mu\text{m}$ festgelegt war, ist allerdings nicht klar zu erkennen, ob dieser Trend auch für noch kleinere Aktinfasern anhält. Insbesondere unterschieden sich die Längenverteilungen in der Sortierung nach der Zelllänge nur hinsichtlich der maximalen Segmentlänge, die durch die Länge der betrachteten Zellen vorgegeben war. Im Gegensatz dazu zeigten die Verteilungen

4 Ergebnisse und Diskussion

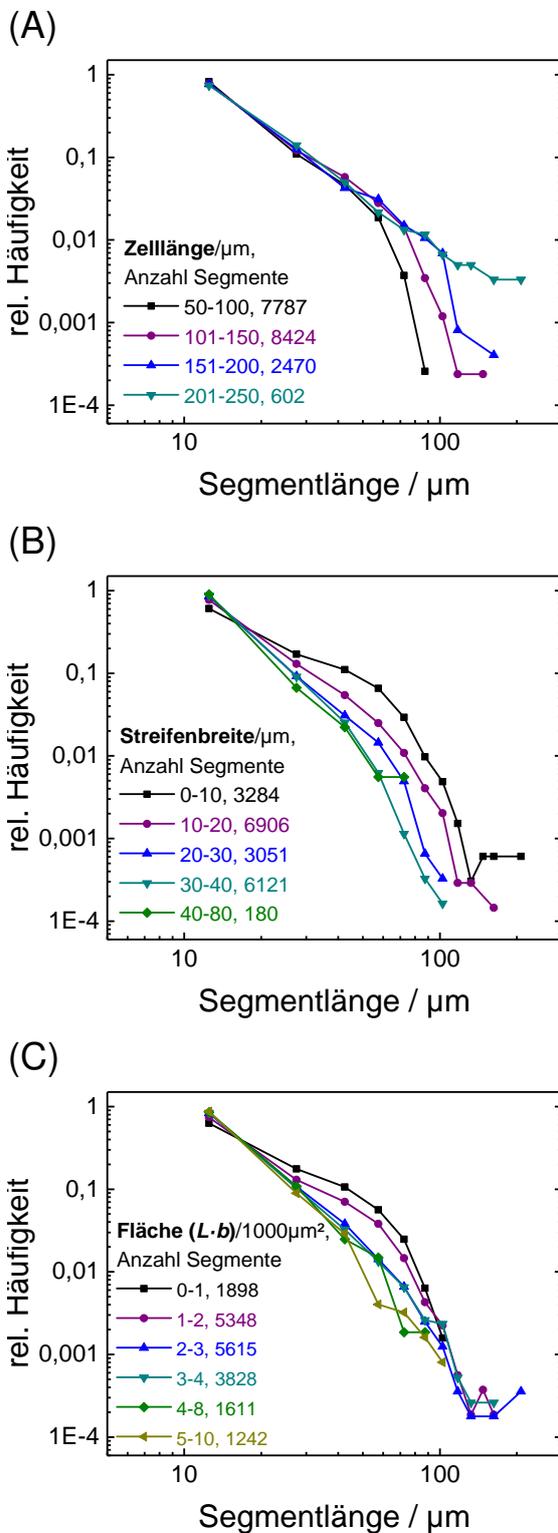


Abbildung 4.13: Längenverteilung der detektierten ASF-Segmente.

(A) Auftragung für verschiedene Zelllängen. Die Längenverteilung der detektierten Segmente kleiner als die Zelllänge ist unabhängig von der Zelllänge (Länge kleiner $100\ \mu\text{m}$).

(B) Längenverteilung in Abhängigkeit der Streifenbreite und

(C) in Abhängigkeit der projizierten Zellfläche.

Schmale Zellen ($b < 20\ \mu\text{m}$) bzw. kleine Zellen ($A < 2000\ \mu\text{m}^2$) enthalten weniger kurze und dafür verhältnismäßig mehr längere Segmente als breitere beziehungsweise größere Zellen. Dies ist ein deutliches Indiz für eine geringere Anzahl von Verknüpfungen zwischen Aktfasern. Aufgrund der Werteverteilung über mehrere Größenordnungen wurde eine Log-Log-Darstellung gewählt. Die Maximallänge ist durch die beschränkte Zellgröße (Länge, Breite, Fläche) gegeben, was zu einem stärkeren Abfall der Verteilungskurven bei großen Segmentlängen führt. Für kleine Segmentlängen folgen die Verteilungen annähernd einem Power-Law, insbesondere für lange und flächige Zellen in (A) und (C). (Segmentlängen im Bereich $5\text{--}215\ \mu\text{m}$, Bingröße: $15\ \mu\text{m}$)

lungen kategorisiert nach der Streifenbreite und Zellfläche deutlich Unterschiede (Abb. 4.13 B, C). Bei Zellen auf schmalen Streifen ($b < 20 \mu\text{m}$) beziehungsweise flächenmäßig kleinen Zellen ($A < 2000 \mu\text{m}^2$) konnte eine relative Häufung längerer Segmente beobachtet werden, mit einer charakteristischen Länge von 40–50 μm . Dies lässt sich damit erklären, dass in schmalen Zellen, welche in der Regel auch über eine geringe Adhäsionsfläche verfügen, das Aktinskelett in einer reduzierteren Form vorliegt als in stärker ausgebreiteten Zellen. Insbesondere finden sich in der Gruppe der schmalen Zellen viele Zellen mit nur zwei Stressfasern entlang des Zellrandes, wie in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte.¹⁹⁰ In breiteren Zellen liegt ein stärker verzweigtes Netzwerk vor. Durch die Auswerteroutine zur Detektion der Aktinfasern, die auf einer Geradendetektion mit anschließender Entfernung der detektierten Segmente beruhte, konnte es zu einer abschnitthaften Detektion gekreuzter oder gekrümmter Segmente kommen. Diese Zerlegung langer Aktinfasern in kürzere Teilstücke war in verzweigten Aktinnetzwerken wahrscheinlicher als in weniger verzweigten. Somit lässt sich die scheinbare Zunahme der Häufigkeit längerer Segmente in schmalen Zellen eher als ein Anzeichen für mangelnde Verzweigung des Aktinnetzwerks verstehen, siehe hierzu nochmals Abbildung 4.11. Eine charakteristische Segmentlänge war in den nach Zelllänge sortierten Auftragungen nicht zu erkennen, da die Zelllänge kein geeigneter Indikator für den Grad der Adhäsion lieferte (d. h. kaum mit der Streifenbreite variierte).

4.3.2.2 Die Ausrichtung der Aktinfasern hängt von der Streifenbreite ab

Weiterhin wurde für jede Zelle die mittlere Ausrichtung der Segmente relativ zur Streifenrichtung untersucht, wobei die Winkel einzelner Segmente gemessen und entsprechend der Segmentlänge gewichtet wurden. Bei Berechnung der mittleren Ausrichtung zeigte sich, dass diese gut mit der Streifenrichtung zusammenfiel (siehe Anhang Abb. A.3), da sich die verschiedenen Winkel (aus dem Intervall $[-90^\circ, 90^\circ]$) zu Null mittelten. Daraus lässt sich ableiten, dass Stressfasern im Durchschnitt entlang der Streifenrichtung orientiert sind und dies die bevorzugte Richtung der Polarisierung des Aktinskeletts ist. Dies war zu erwarten, da bereits eine Elongation der Zellen entlang dieser Richtung beobachtet wurde.

Um den Grad der Polarisierung in Abhängigkeit der Zellform beziehungsweise den Grad der gleichmäßigen Ausrichtung entlang der Streifenrichtung besser darstellbar zu machen, wurde eine Auftragung des nematischen Ordnungsparameters gegenüber dem inversen Zellseitenverhältnis gewählt. Der nematische Ordnungsparameter ist ein gängiger Wert, um das Maß der gleichförmigen Orientierung von Zytoskelettfilamenten oder ganzen Zellen zu beschreiben.^{201,232} Dieser kann Werte zwischen Eins (hohe Anisotropie, Orientierung entlang Vorzugsrichtung) und minus Eins annehmen (Orientierung senkrecht zur Vorzugsrichtung), wobei ein Wert von Null bei zufälliger Anordnung auftritt. Als Vorzugsrichtung wurde die mittlere Ausrichtung aller detektierten Stressfasersegmente

te in einer Zelle gewählt (die in der Regel der Streifenrichtung glich), um die allgemeine Polarisierung der Zelle zu beschreiben. Stark elongierte Zellen ($1/AR < 0,2$) zeigten eine hohe Ordnung (gleichmäßige Ausrichtung) ihrer Aktinfasern, was in gleichmäßiger geformten Zellen ($1/AR \rightarrow 1$) weniger stark zu beobachten war (Abb. 4.14). Tatsächlich ließ sich der Grad der Ausrichtung gut durch die Zellgeometrie vorhersagen, da sich eine genäherte Kurve für den Ordnungsparameter S anhand des Zellseitenverhältnisses berechnen ließ (rote Kurve in Abb. 4.14).

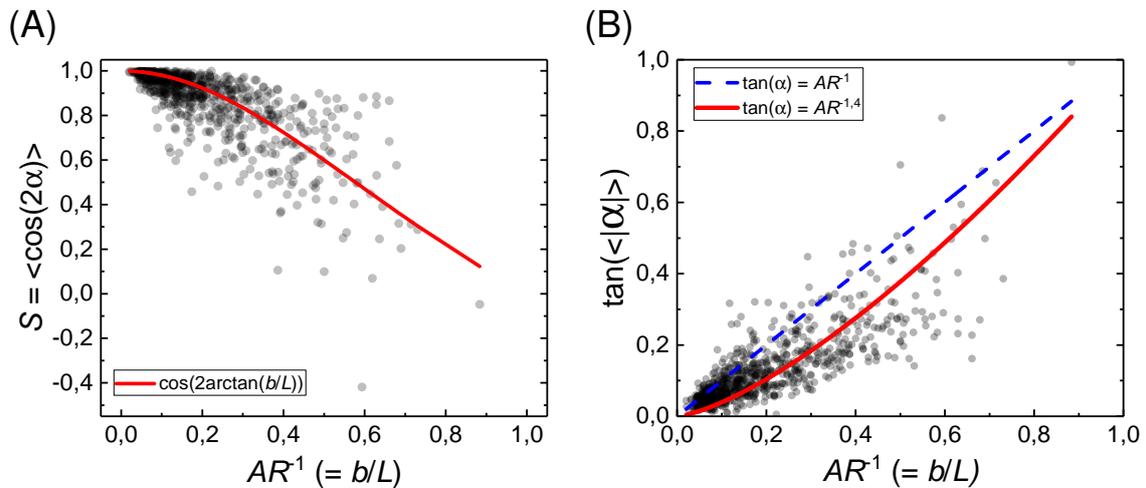


Abbildung 4.14: Ausrichtung der Stressfasern in Abhängigkeit der Zellform. (A) Der nematische Ordnungsparameter, aufgetragen über das Seitenverhältnis (AR). Der rote Fit ergibt sich durch die Berechnung eines Winkels aus dem Zellseitenverhältnis. (B) Der Tangens des mittleren Winkels der Stressfasern mit der Streifenrichtung, aufgetragen über das reziproke Seitenverhältnis. Die blaue Kurve beschreibt einen einfachen Zusammenhang mit dem Zellseitenverhältnis, die rote Kurve hat den Exponenten als Fitparameter.

Um weiterhin ein Maß für die Abweichung der Stressfaserorientierung von der Streifenrichtung zu erhalten, wurde zusätzlich das Mittel der Beträge der Winkelabweichung betrachtet. Hierdurch wird ein gegenseitiger Ausgleich der verschiedenen Orientierungen zu verschiedenen Seiten des Streifens verhindert. Gemessen wurde nun die Abweichung der Segmentorientierung gegenüber der Streifenrichtung in einem Intervall von $[0^\circ, 90^\circ]$. Da ein Zusammenhang mit der Zellform plausibel erscheint, wurden die Winkel mittels der Tangensfunktion in eine dimensionslose Größe überführt, mit der Erwartung, dass schmale Zellen hierbei Werte nahe Null aufweisen und Zellen mit quadratischer Grundfläche Werte nahe Eins, entsprechend einem Tangens von 45° , was einer zufälligen Polarisierung entsprechen würde. Der Tangens lässt sich außerdem als Verhältnis der Summe der Projektionen der Stressfasersegmente auf y - und x -Achse interpretieren. Diese Werte wurden dann gegenüber dem reziproken Seitenverhältnis, welches Werte zwischen Null (Breite \ll Länge) und Eins (Breite = Länge) annimmt, aufgetragen, siehe Abb. 4.14.

Zur Charakterisierung wurden Funktionen der Form $\tan \alpha = AR^{-p}$ benutzt, zum einen mit $p = 1$ (blaue Kurve), um einen direkten Bezug zur Zellform herzustellen sowie zum anderen mit p als freiem Fitparameter, was einen Wert von $p = 1,4$ lieferte (rote Kurve), benutzt.

4.3.3 Kopplung des Aktinskeletts an das Substrat

Weiterhin wurde eine Immunfluoreszenzfärbung der Fokalen Adhäsionen durchgeführt, da diese für die Verankerung der Zelle am Substrat verantwortlich sind und als Verankerungs- beziehungsweise Entstehungspunkte für die Aktinstressfasern dienen. Vinkulin diente als typischer Marker für Fokale Adhäsionen (Abb. 4.15).

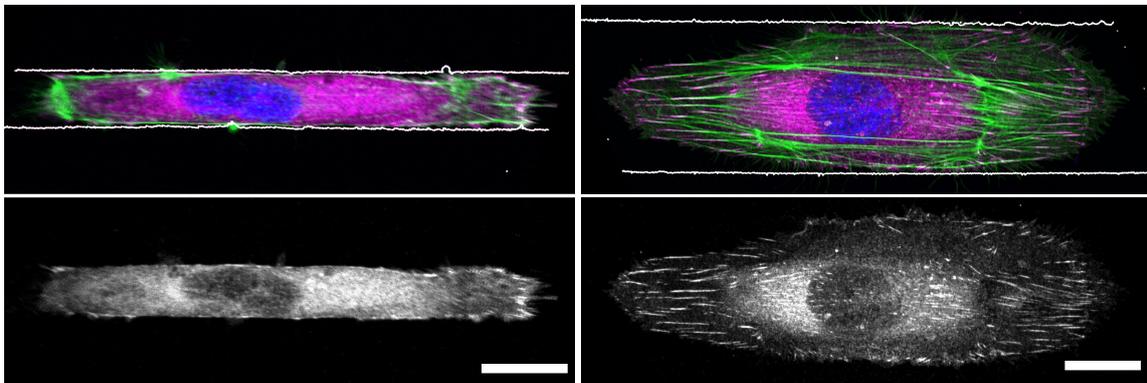


Abbildung 4.15: Antikörperfärbung Fokaler Adhäsionen über Vinkulin. Links: In schmalen Zellen ist nur eine diffuse Färbung zu beobachten, Fokale Adhäsionen sind kaum ausgeprägt. Rechts: In Zellen auf breiten Streifen sind Fokale Adhäsionen, mehrheitlich entlang der Streifenrichtung ausgerichtet, zu beobachten. Obere Reihe: magenta - Vinkulin, grün - Aktin, blau - Zellkern, weiß - Streifenrand (Kontur aus Fibronektinaufnahmen erzeugt). Untere Reihe: Vinkulinfärbung. Maßstabsbalken jeweils 20 μm .

Es zeigte sich, dass in Zellen auf Streifen mit einer Breite von weniger als 20 μm kaum Fokale Adhäsionen sichtbar waren, wohingegen eine diffuse Färbung des Zellkörpers auftrat. Dieser Befund deckt sich mit der Beobachtung, dass Zellen auf solchen schmalen Streifen oft nur über zwei Stressfasern am Rand verfügten beziehungsweise ein wenig verzweigtes, reduziertes Aktinskelett aufwiesen, wie auch anhand der Längenverteilung der detektierten Segmente gezeigt wurde (vgl. Abb. 4.13). In Zellen auf breiteren Streifen stimmte die generelle Ausrichtung mit der Ausrichtung der Stressfasern überein (siehe Abb. 4.15), wobei auf eine quantitative Auswertung verzichtet wurde, da für schmale Zellen nicht genügend Daten vorlagen. Weitere exemplarische Beispielbilder finden sich im Anhang, Abbildung A.4. Die Häufung der Fokalen Adhäsionen am Zellrand auf der Streifenfläche war wenig stark ausgeprägt.

4.3.4 Diskussion der Aktinstruktur in lateral eingeschränkten Zellen

Die ermittelte Aktinfaser-Dichte von $0,23 \mu\text{m}^{-1}$ korrespondiert mit früheren Messungen, bei denen der Stressfaserabstand in HUVECs ausschnittsweise bestimmt wurde und Werte zwischen $1 \mu\text{m}$ und $2 \mu\text{m}$ in dichten Netzwerken und Abstände bis zu $18 \mu\text{m}$ in Zellen mit reduziertem Aktinskelett auf schmalen Streifen gefunden wurden.¹⁹⁰ Ebenso wurde ein ähnlicher Wert der Aktindichte von $0,5/\mu\text{m}$ in humanen Osteosarkomzellen ermittelt, die ebenfalls für Untersuchungen zur Mechanotransduktion eingesetzt werden.¹⁸⁵ Die Analyse der Längenverteilungen der Aktinfasern ergab in schmalen Zellen eine relative Häufung von Segmentlängen von $40\text{--}50 \mu\text{m}$, was annähernd der Hälfte der mittleren Zelllänge von ca. $100 \mu\text{m}$ entspricht. Es ist also wahrscheinlich, dass es durch eine Krümmung der lateralen Stressfasern in schmalen Zellen, mitverursacht durch den Zellkern, durch den Detektionsalgorithmus zu einer Halbierung der Fasern gekommen ist. In diesen Zellen fand allerdings keine weitere Unterteilung der Fasern statt, da es keine weiteren Unterbrechungen, zum Beispiel durch Verzweigungen oder Kreuzungen mit anderen Stressfasern, gibt. Deshalb kann die relative Häufung der längeren Stressfasersegmente in schmalen (bzw. flächenmäßig kleinen Zellen) als ein Indiz für ein nicht vollständig ausgebildetes Aktinnetzwerk gedeutet werden. Diese Anomalie ist in Zellen mit einer Breite bis ca. $20 \mu\text{m}$ beziehungsweise in Zellen mit einer Fläche bis ca. $2000 \mu\text{m}^2$ zu beobachten, also in verhältnismäßig schwach ausgebreiteten Zellen. Bei Polymerisationsversuchen mit isoliertem Aktin in Gegenwart verschiedener Pufferbedingungen wird in der Regel eine exponentielle Längenverteilung der Filamentlängen beobachtet, was charakteristisch für eine passive Polymerisation ist.²³³ Demgegenüber wurde in der vorliegenden Arbeit eine einem Power-Law folgende Längenverteilung der F-Aktinstrukturen beobachtet. Dies lässt sich gut durch die aktive Remodellierung des Aktinskeletts durch aktinbindende Proteine und eine Regulierung der Myosin-Aktivität innerhalb der Zelle erklären.

Interessanterweise wird bei in vitro Versuchen eine charakteristische Länge von $5 \mu\text{m}$ bis $15 \mu\text{m}$ der Aktinfilamente gefunden,^{233,234} was gut mit in vivo Daten korreliert.²²⁶ Dementsprechend wurde bei Polymerisationsexperimenten in starker räumlicher Einschränkung ein Einfluss der Umgebungsgeometrie auf die Aktinnetzwerkstruktur festgestellt, wenn die Dimension des Reaktionsvolumens entlang einer Raumrichtung im Größenbereich der charakteristischen Filamentlänge variiert wurde. Die Einschränkung führt dann in Verbindung mit einer Asymmetrie der Reaktionskammer (Seitenverhältnis $AR > 1,5$) zu einer bevorzugten Ausrichtung der Filamente entlang der Gefäßwand und einer nematischen Ordnung.²³⁴ Diese kann in Gegenwart von Crosslinker-Proteinen abnehmen, da es zu zahlreicheren Vernetzungen und höheren Querkräften zwischen den Filamenten kommt.²³² Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Abhängigkeit der Aktinfaserausrichtung von der Zellform und eine hohe nematische Ordnung in stark elongierten Zellen beobachtet.

Durch eine Gegenüberstellung des Tangens des mittleren Winkels der Stressfasern zur Streifenrichtung und dem Zellseitenverhältnis sollte überprüft werden, wie der Zusammenhang zwischen der Polarisierung des Aktinskeletts und der Zellform beschrieben werden kann. Dabei zeigte sich, dass ein Modell, welches einen einfachen Zusammenhang zwischen der Zellform und der Ausrichtung der Stressfasern unterstellt, den Grad der Ausrichtung unterschätzt (blaue Kurve im Diagramm, entspricht dem Winkel der Diagonale eines Rechtecks mit dem gleichen Seitenverhältnis). Stattdessen ist eine stärkere Ausrichtung der Segmente entlang der Streifenrichtung zu beobachten (rote Kurve, Power-Law-Fit mit der Randbedingungen ($\tan(\alpha = 0^\circ) \Leftrightarrow AR^{-1} = 0$) und ($\tan(\alpha = 45^\circ) \Leftrightarrow AR^{-1} = 1$). Dies spricht für eine Verstärkung der Polarisierung des Aktinskeletts. Eine Ausrichtung von 0° wird auch bei stark elongierten Zellen ($AR^{-1} < 0,1$) nicht erreicht, was damit erklärt werden kann, dass auch in schmalen Zellen der Zellkern eine Barriere für Stressfasern darstellt und zu einer Ablenkung derselben führt.

Der Befund, dass die Anknüpfungspunkte des Aktinskeletts an den Untergrund, die Fokalen Adhäsionen, keine starke Häufung am freien Zellrand aufwiesen, steht im starken Gegensatz zur Beobachtung einer deutlichen Akkumulation von Fokalen Adhäsionen in eingeschränkten und gestreckten Zellen in anderen Arbeiten.^{19,168,235} Diese abweichenden Ergebnisse in anderen Arbeiten lassen sich mit der völligen Beschränkung der adhäsiven Flächen auf Formen wie beispielsweise Rechtecke oder Ovale erklären, auf denen es nach Erreichen der maximalen Ausdehnung zu einer Verstärkung der Adhäsionskontakte am Zellrand kommt. Im Gegensatz dazu war in der vorliegenden Arbeit der Zellrand nur in einer Raumrichtung lateral eingeschränkt und in der anderen Richtung frei, was eine dynamische Reorganisation der Adhäsionsstrukturen an den freien Zellenenden gestattete. Dies ist insofern besonders, als dass dadurch auch eine Beeinflussung des Zellzugkraftverhaltens sowie der Dynamik des Aktinskeletttumbaus zu erwarten war.

Insgesamt konnte eine deutliche Beeinflussung der Aktinskelettstruktur durch die räumliche Einschränkung beobachtet werden. Die Anpassung des Aktinskeletts ließ sich einerseits direkt mit der Zellform korrelieren, andererseits ergab sich in besonders eingeschränkten Zellen auch ein Einfluss des Zellkerns aufgrund sterischer Wechselwirkung.

4.4 Dynamik des Aktinskeletts in Abhängigkeit der Streifenbreite

Die Analyse der gefärbten Zellkomponenten in fixierten Zellen erlaubte eine schnelle Sammlung von Daten zur Morphologie der Zellen und Zellkomponenten in lateral eingeschränkten Zellen. Speziell auf breiteren Streifen ($b > 20 \mu\text{m}$) war eine Streuung der verschiedenen charakteristischen Werte offensichtlich. Hieraus ergab sich die Frage, ob diese Vielfalt an Zellzuständen auf eine interzelluläre oder bereits eine intrazelluläre zeitliche Variation zurückzuführen ist, das heißt ob und in welchem Maße Zellen auf einer

bestimmten Zeitskala ihr Aussehen verändern. Um dieser Frage nachzugehen, erfolgten zeitaufgelöste Messungen der Zell- und Aktinskelettmorphologie. Hierzu wurde der Stressfasermarker SiR-Actin eingesetzt. Zuerst wurde untersucht, inwieweit dieser zur Lebendzellfärbung von HUVECs geeignet ist. Diese Ergebnisse sind zum Teil bereits publiziert.²¹⁴

4.4.1 Verwendbarkeit von SiR-Actin hinsichtlich Färbung, Zellfunktion und Vitalität

Um die Eignung des aktinbindenden Markers SiR-Actin für die verwendeten HUVECs zu testen, wurden Doppelfärbungen mit SiR-Actin und Alexa Fluor 488 Phalloidin durchgeführt. Um eine mögliche Beeinträchtigung der Mechanotransduktion zu erkennen, wurden Zellzugkraftmessungen durchgeführt, und um die generelle Verträglichkeit zu überprüfen, fand ein Proliferationsnachweis ("EdU-Assay") statt. Dieser und Teile der Kontrollfärbungen erfolgten während einer im Rahmen dieser Promotionsarbeit betreuten Masterarbeit (Sandra Müller: "Zelladhäsion unter lateraler Beschränkung", 2015).²¹⁸ Aufgrund der Relevanz dieser Befunde für die weitere Diskussion werden diese hier kurz dargestellt.

4.4.1.1 Die Morphologie SiR-Actin-gefärbter und ungefärbter Zellen gleicht sich

Es erwies sich, dass sich durch die Färbung mit SiR-Actin keine qualitativen Änderungen des Aktinskeletts ergaben. Zudem konnte die gute Färbung des Aktinskeletts durch Doppelfärbungen mit SiR-Actin und Alexa Fluor 488 Phalloidin bestätigt werden (Abb. 4.16).

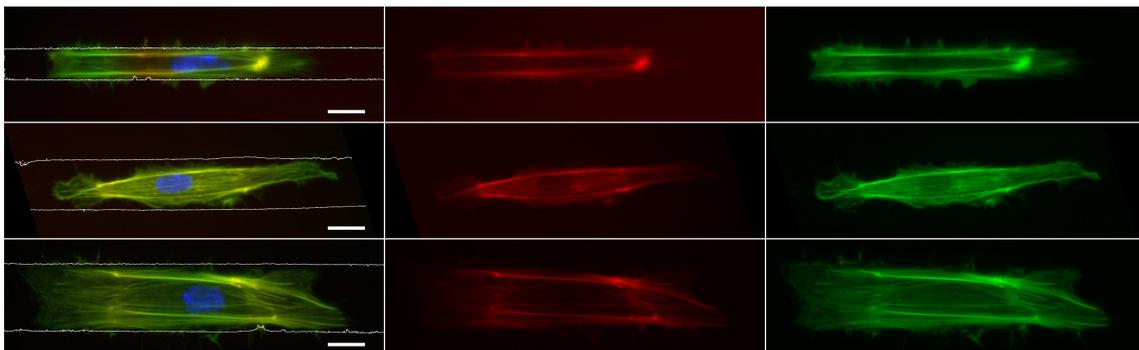


Abbildung 4.16: Kontrollfärbung SiR-Actin. Lebende Zellen wurden mit SiR-Actin gefärbt (rot), dann fixiert und nochmals mit Alexa Fluor 488 Phalloidin (grün) gefärbt. Die Zellen befinden sich auf 17 µm, 26 µm und 36 µm breiten Streifen (Maßstabsbalken: 20 µm, Streifenkontur in weiß).

Zudem wurden SiR-Actin-behandelte Zellen zeitaufgelöst mikroskopiert und die Dichte der Stressfasern als Quotient der Gesamtlänge und Zellfläche berechnet und der Dichte in nachträglich gefärbten Zellen gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass die Zellen

ähnliche Werte hinsichtlich ihrer Dichte aufwiesen. Weiterhin wurde die mittlere Stressfaserausrichtung bestimmt. Diese war ebenfalls gut mit der Ausrichtung von Stressfasern in nachträglich gefärbten Zellen vergleichbar (siehe Abb. 4.17).

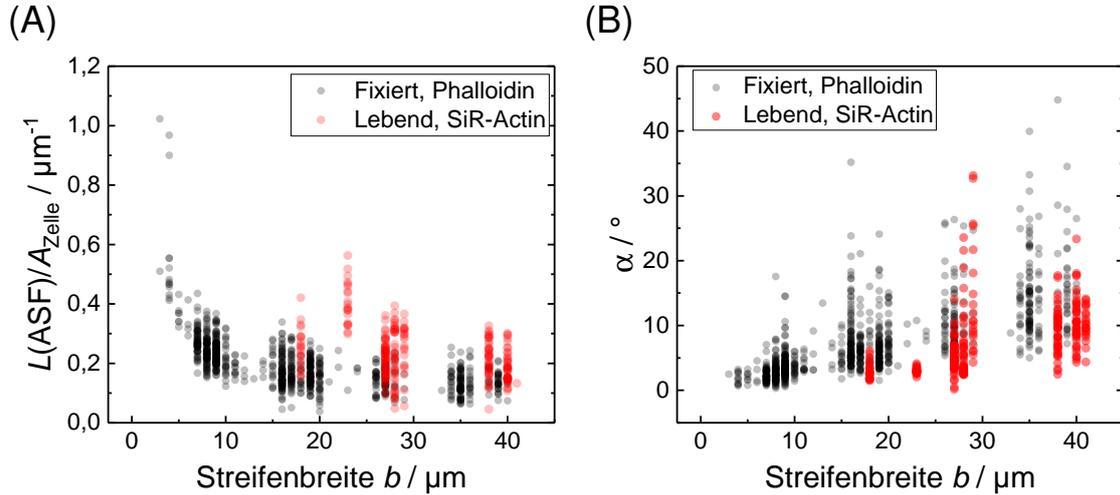


Abbildung 4.17: Das Aktinskelett SiR-Actin-behandelter Zellen ist mit dem unbehandelten Zellen vergleichbar. (A) Die Dichte der Aktinstressfasern (Gesamtlänge $L(\text{ASF})$) geteilt durch Zellfläche A_{Zelle} hängt leicht von der Streifenbreite ab, ist aber vergleichbar zwischen unbehandelten Zellen und solchen, die mit SiR-Actin behandelt wurden. (B) Die Komplexität der Aktinskelette nimmt sowohl für unbehandelte als auch für SiR-Actin-behandelte Zellen mit der Streifenbreite zu, was durch eine größere Abweichung der Faserorientierung von der Streifenrichtung angezeigt wird. (Die Daten der SiR-behandelten Zellen stammen von zeitaufgelösten Messungen.)

4.4.1.2 Das Zellzugkraftverhalten wird nicht durch SiR-Actin beeinträchtigt

Da die Mechanotransduktion und die mechanische Wechselwirkung, vermittelt durch die strukturelle Anpassung des Aktinskeletts, im Fokus dieser Arbeit stand, wurden weiterhin Zellzugkraftmessungen mit unbehandelten und SiR-Actin-gefärbten Zellen auf homogenen (unstrukturierten) Substraten durchgeführt. Als relevante Vergleichsgrößen wurden die Dehnungsenergie U und die Gesamtkraft F_{tot} gewählt. Die Dehnungsenergie bezeichnet die Energie, die in der Deformation des Substrats gespeichert ist; die Größe ergibt sich aus der gesamten, durch die Zelle verursachten Deformation. Aus dem Deformationsfeld ergibt sich ein Spannungsfeld, welches in ein Kraftfeld umgerechnet werden kann. Die Summe der Beträge der Kraftvektoren entspricht der Gesamtkraft.

Der Vergleich dieser beiden Größen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen zeigte, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen diesen Zellen gibt (siehe Abb. 4.18). Die Mediane der Dehnungsenergien betragen für beide Versuchsbedingungen $0,02 \text{ pJ}$, bei einer Verteilung über vier Größenordnungen ($\times/\div 100$). Der Median der

4 Ergebnisse und Diskussion

Gesamtkraft lag in beiden Versuchsbedingungen ebenfalls nah beieinander, mit einem Wert von $0,29 \mu\text{N}$ für unbehandelte und $0,27 \mu\text{N}$ für behandelte Zellen, bei einer Verteilung innerhalb eines Bereichs von Median $\times/\div 10$. Dies bedeutet, dass SiR-Actin-gefärbte Zellen immer noch mit der gleichen Stärke mit dem Substrat in Wechselwirkung stehen und dass die Kopplung an das Substrat durch die Färbung nicht beeinträchtigt wird.

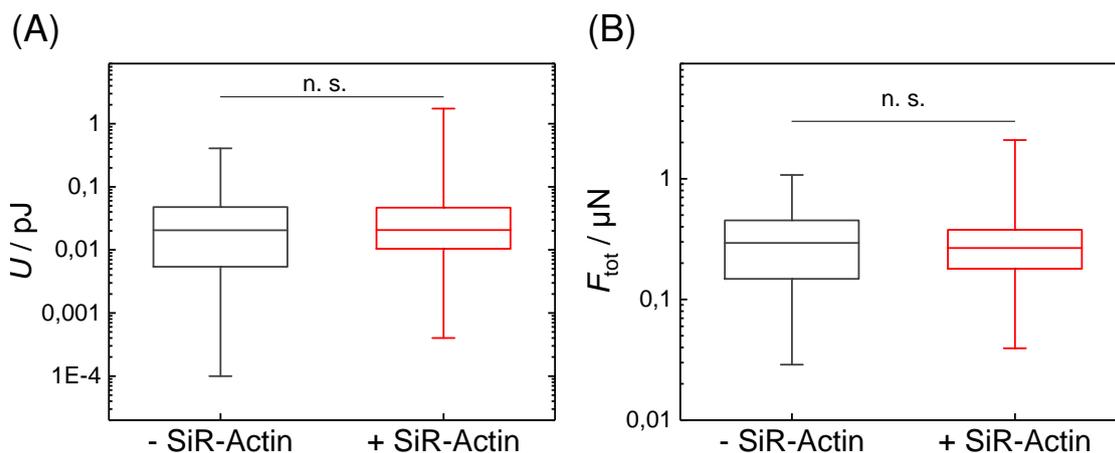


Abbildung 4.18: Vergleich relevanter Zellzugkraftparameter von unbehandelten und SiR-Actin-behandelten HUVECs. Weder (A) Deformationsenergie noch (B) Gesamtkraft unterscheiden sich signifikant voneinander (n. s.: nicht signifikant, $p > 0,05$; Mann-Whitney U-Test; 117 Zellen pro Bedingung).

4.4.1.3 Die Proliferation wird durch SiR-Actin reduziert

Um eine Beeinträchtigung der sonstigen Funktionalität der Zellen durch eine Färbung mit SiR-Actin beurteilen zu können, wurde zusätzlich eine EdU-Färbung durchgeführt. Hierbei können die Zellen identifiziert werden, die sich innerhalb des Behandlungszeitraums geteilt haben. Es zeigte sich, dass durch die Gabe von SiR-Actin zwar eine Verringerung der Proliferation stattfindet, aber diese nicht völlig unterbunden wird (Abb. 4.19).

4.4.2 Diskussion der SiR-Actin-Färbung

Vergleichende Färbungen mit SiR-Actin und Phalloidin in fixierten Zellen sowie die Charakterisierung des Aktinskeletts in lebenden Zellen ergaben, dass sich die beobachtete Aktinstruktur nicht wesentlich voneinander unterschied. Für Jasplakinolid-basierte Proben wurde für die Bindung zu F-Aktin eine Halbwertszeit von ca. 5 min ermittelt,¹⁰⁹ was in etwa der Verweildauer von Aktin in Stressfasern entspricht.⁴⁴ Dementsprechend ist zu

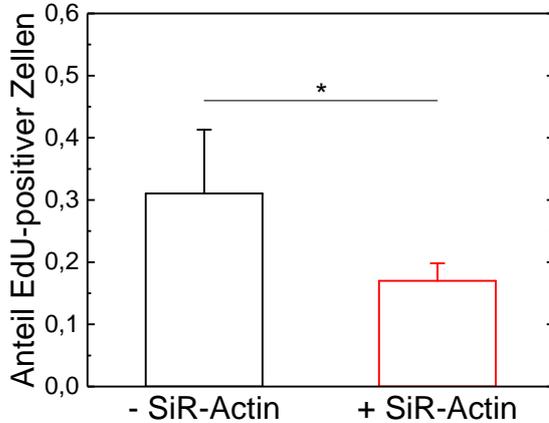


Abbildung 4.19: Zellproliferation mit SiR-Actin. Zellen, die sich teilen, inkorporieren EdU, welches per Fluoreszenz ausgelesen werden kann. Die Proliferation wird durch SiR-Actin verringert, aber nicht unterbunden. (Beobachtungszeitraum: 22 h, Zellen wurden auf fünf unterschiedlichen Streifenbreiten kultiviert, mindestens 100 Zellen pro Muster wurden ausgewertet. Darstellung: Mittelwert + SD, *: $p < 0,05$, zweiseitiger t -Test)

berücksichtigen, dass SiR-Actin für eine Färbung besonders dynamischer Aktinstrukturen, wie zum Beispiel das kontraktile Netzwerk des Lamellipodiums, weniger geeignet ist. Trotz dieser Einschränkung ist davon auszugehen, dass dennoch eine gute Beobachtung der Stressfasern möglich ist und dass deren Dynamik gut mit dem nativen Zustand vergleichbar ist.

Um die für diese Arbeit relevante Funktion der SiR-Actin gefärbten Zellen zu überprüfen, wurden Zellzugkraftmessungen durchgeführt, die ergaben, dass die Parameter Dehnungsenergie und Gesamtkraft durch die Anwesenheit des Farbstoffs nicht verändert wurden. Zusätzlich wurde die Zellproliferation betrachtet. In diesen Versuchen wurde eine Beeinträchtigung der Proliferation gemessen, wie bereits gezeigt wurde.¹¹⁰ Die Minderung der Proliferation konnte aber im Rahmen dieser Arbeit toleriert werden.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen die Zell-Substrat-Kopplung und die Beeinflussung der Aktinskelettmorphologie und des Zellzugkraftverhaltens durch eine vorgegebene Substratgeometrie. Hierfür erschien SiR-Actin als ein geeigneter F-Aktin-Marker, der auch eine Langzeitbeobachtung (Minuten – Stunden) lebender Zellen erlaubt.

4.4.3 Beschreibung der Stressfaserdynamik

SiR-Actin-gefärbte Zellen auf strukturierten PAAm-Hydrogelen wurden für eine Stunde in dreiminütigen Intervallen mikroskopiert. In diesem Abschnitt wird zuerst eine kurze qualitative Diskussion der Beobachtungen folgen. Da einige Zellen während des Beobachtungszeitraums den adhäsiven Streifenbereich oder das Beobachtungsfenster verließen, konnte eine quantitative Analyse nur mit einer kleinen Anzahl Zellen durchgeführt werden, deren Darstellung im Anschluss folgt.

4.4.3.1 Qualitative Beschreibung der Stressfaserdynamik

In den meisten Zellen konnte ein Entstehen der Stressfasern am langen Zellrand beobachtet werden. Diese bewegten sich oft in Richtung des Zellinneren. Zusätzlich wurde ein Verharren der Stressfasern am Zellrand und im Zellinneren festgestellt. Der Anfang einer beispielhaften Zeitserie ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Nach ihrer Wanderung in das Zellinnere erfolgte häufig ein Auflösen der Stressfasern, wobei es in der Regel nicht zu einem abrupten Reißen der Stressfasern, gefolgt von einer Retraktion, sondern zu deren zeitlich ausgedehnten Verschwinden kam.

Trotz der einwärts gerichteten Bewegung der Stressfasern konnte beobachtet werden, dass durch das Nachbilden und die Auflösung der Stressfasern die allgemeine Aktinskelettarchitektur einigermaßen konstant blieb. Das Aussehen wurde durch die laterale Einschränkung vorgegeben. Beispielsweise zeigte sich, dass die mittlere Abweichung der Stressfaserorientierung von der Streifenrichtung mit der Streifenbreite zunahm und auch über den Verlauf einer Stunde innerhalb eines charakteristischen Bereichs blieb (Abb. 4.21). Dies lässt sich als Hinweis auf eine stärkere Verzweigtheit der Aktinskelette in Zellen auf breiteren Streifen deuten. Neben der Bewegung in y -Richtung kam es, mitunter auch durch die Migration der Zelle entlang des Streifens, zur Verschiebung des Aktinskeletts in x -Richtung. In dieser Arbeit wurde aber nur die Bewegung in y -Richtung betrachtet.

4.4.3.2 Quantitative Beschreibung der Stressfaserdynamik

Um den Transport der Aktinstressfasern besser charakterisieren zu können, wurde in ausgewählten Zellen eine Kymograph-Analyse durchgeführt, wie in Abbildung 4.22 dargestellt. Es wurden solche Zellen ausgewählt, die während des gesamten Beobachtungszeitraums stationär oder zumindest komplett im Sichtfeld waren, nicht über den Streifen hinauswuchsen und deren Färbung eine durchgängige Charakterisierung des Aktinskeletts zuließ. Hierdurch konnte nur eine kleine Teilmenge aller beobachteten Zellen quantitativ beurteilt werden. Die Ergebnisse entsprechen aber im Wesentlichen den qualitativen Beobachtungen in anderen Zellen.

Für die Auswertung wurden in kontrasterhöhten Querprofilen eine Markierung der Stressfasern vorgenommen und aus den entsprechenden Zeitreihen durch Aneinanderreihung ein Kymograph erstellt. Daran schloss sich eine Analyse der Trajektorien der Stressfasern (Ort-Zeit-Kurven) an. In einem ersten Schritt wurden die Instantangeschwindigkeiten der Stressfasern an den jeweiligen Positionen in der Zelle bestimmt. Hiermit konnte die Beobachtung einer einwärts gerichteten Stressfaserbewegung untermauert werden (Abb. 4.23 A), wobei Geschwindigkeitsbeträge bis ca. $1 \mu\text{m}/\text{min}$ gemessen wurden. Da hierbei keine Informationen zum zeitabhängigen Verhalten der Stressfasern gesammelt wurden, erfolgte in einem zweiten Schritt eine zeitaufgelöste Analyse einzelner Stressfasertrajektorien. Hierfür wurde jede Trajektorie in eine Ruhephase, eine Phase der gleichmäßigen

4.4 Dynamik des Aktinskeletts in Abhängigkeit der Streifenbreite

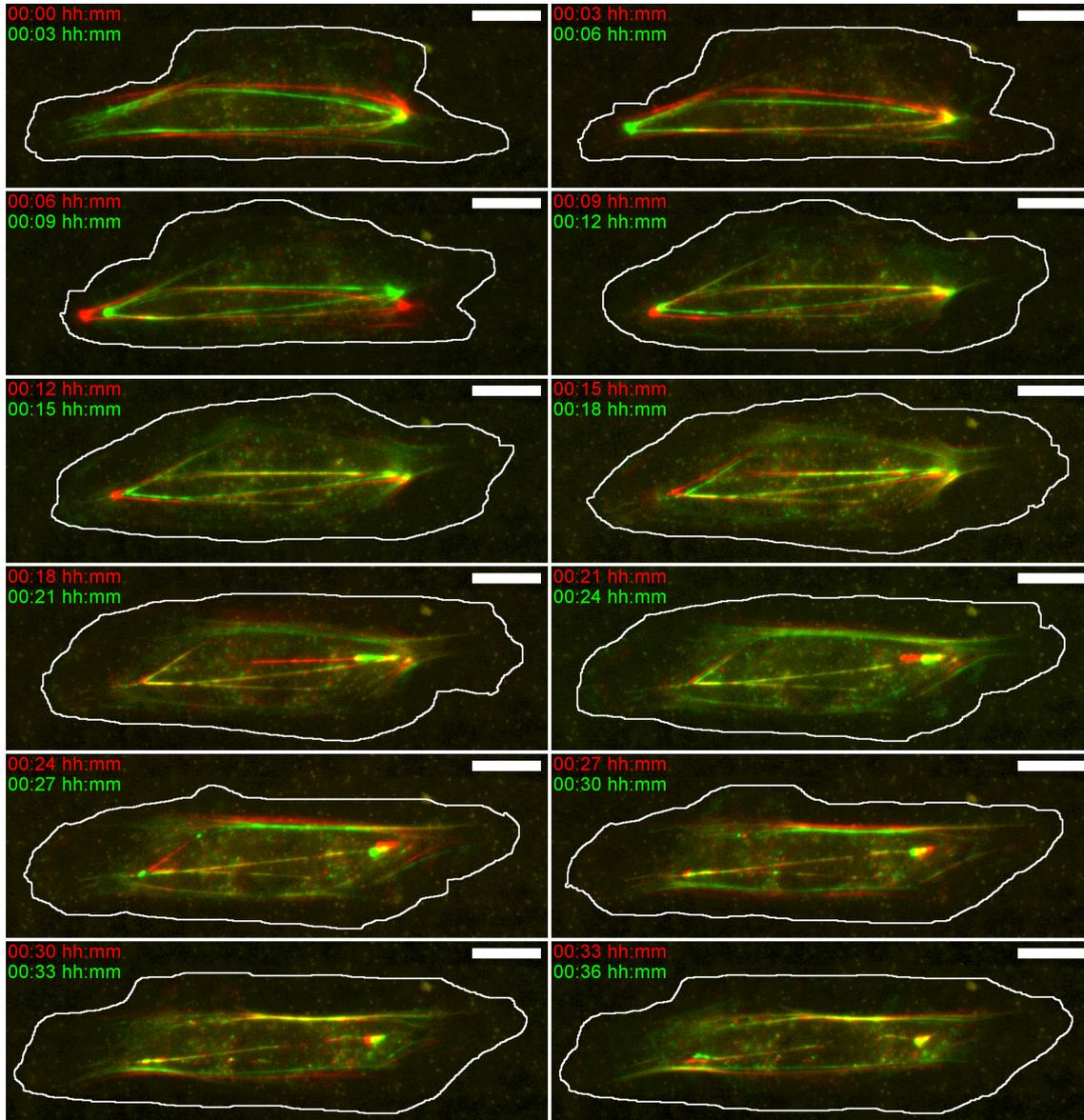


Abbildung 4.20: Ausschnitt einer zeitaufgelösten Messung. Aufeinanderfolgende Bilder (Abstand 3 min) sind überlagert und gemäß ihrer Abfolge eingefärbt (vorher: rot, nachher: grün). Die Färbung des Aktinskeletts erfolgte mittels SiR-Actin. Die maximale Zellkontur der beiden Zeitpunkte ist weiß markiert. Es ist eine Bewegung der Stressfasern vom Streifenrand zur Zellmitte erkennbar, ebenso wie die Entstehung von Stressfasern am Zellrand. Maßstabsbalken: 20 μm .

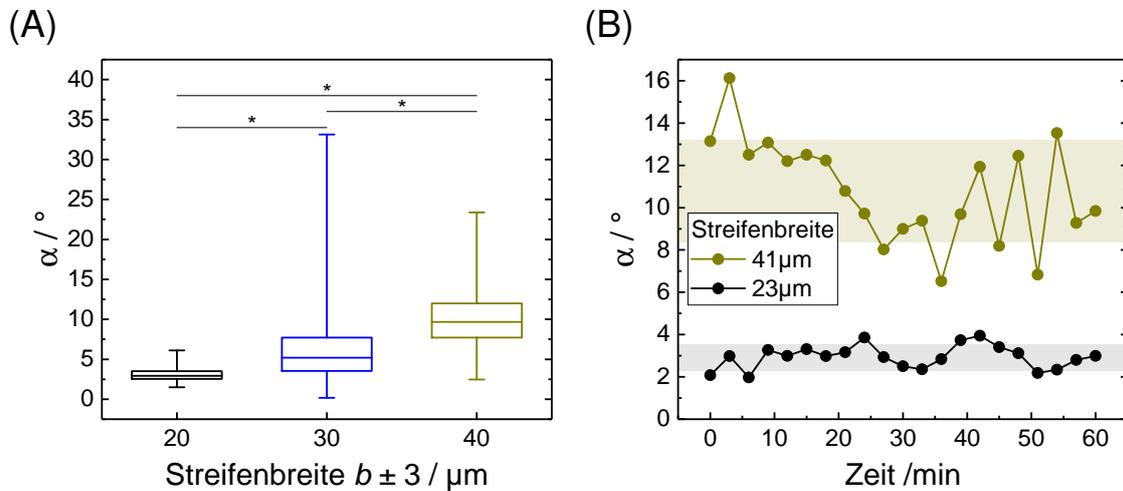


Abbildung 4.21: Stressfaserausrichtung während zeitlich aufgelöster Messungen. (A) Die Stressfaserausrichtung hängt stark von der Streifenbreite ab. Die Stressfasern weichen mit zunehmender Breite immer stärker von der Streifenrichtung ab (2, 6 und 5 Zellen mit jeweils 21 Zeitpunkten, *: $p < 0,0167$, Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur). (B) Beispielhafte Zeitverläufe der mittleren Stressfaserausrichtung für eine relativ schmale Zelle (schwarz) und eine relativ breite Zelle (gelb). Die Winkel lassen sich im Beobachtungszeitraum klar charakteristischen Bereichen zuordnen und die Winkel der schmalen Zelle zeigen geringere Schwankungen als die der breiten Zelle (gefüllte Bereiche zeigen Mittelwert \pm Standardabw.: $2,9^\circ \pm 0,6^\circ$ für schmale Zelle, $10,8^\circ \pm 2,4^\circ$ für breite Zelle).

Bewegung und eine finale Ruhephase unterteilt und mittels eines zusammengesetzten Fits charakterisiert (siehe Abb. 4.22 C). Die Beträge der Geschwindigkeiten während der Bewegungsphase wurden schließlich für Zellen auf verschiedenen breiten Streifen zusammengefasst (Abb. 4.23 B).

Es zeigte sich, dass die Stressfasern in Zellen auf breiteren Streifen ($30 \mu\text{m}$, $40 \mu\text{m}$, gegenüber $20 \mu\text{m}$) höhere Geschwindigkeiten erreichen und die Geschwindigkeitsverteilung eine größere Streuung aufweist (Abb. 4.23 B). Die Mediane der Geschwindigkeitsbeträge steigen mit der Streifenbreite von $0,19 \mu\text{m}/\text{min}$ über $0,22 \mu\text{m}/\text{min}$ zu $0,33 \mu\text{m}/\text{min}$ an. Die Minimalwerte liegen auf allen Streifenbreiten unter $0,1 \mu\text{m}/\text{min}$. Der Maximalwert auf schmalen Streifen beträgt ca. $0,41 \mu\text{m}/\text{min}$, während die Maximalwerte auf den breiten Streifen nahezu doppelt so hohe Werte, $0,77 \mu\text{m}/\text{min}$ beziehungsweise $0,76 \mu\text{m}/\text{min}$, erreichen. Aufgrund der starken Streuung und der Menge an Daten konnte dieser Trend allerdings nicht durch einen Signifikanztest untermauert werden.

Da die bisherige Analyse auf einer händischen Markierung von Stressfasern beruhte, kam zusätzlich eine automatisierte Methode zur Anwendung. Hierbei wurden aufeinanderfolgende Bilder der Zeitserien des Aktinskeletts einer Zelle einer Kreuzkorrelationsanalyse unterzogen, um den Fluss innerhalb der Zelle zu bestimmen. Auf diese Art wurden ließen sich nicht nur ausgewählte Stressfasern verfolgen, sondern sämtliche Struk-

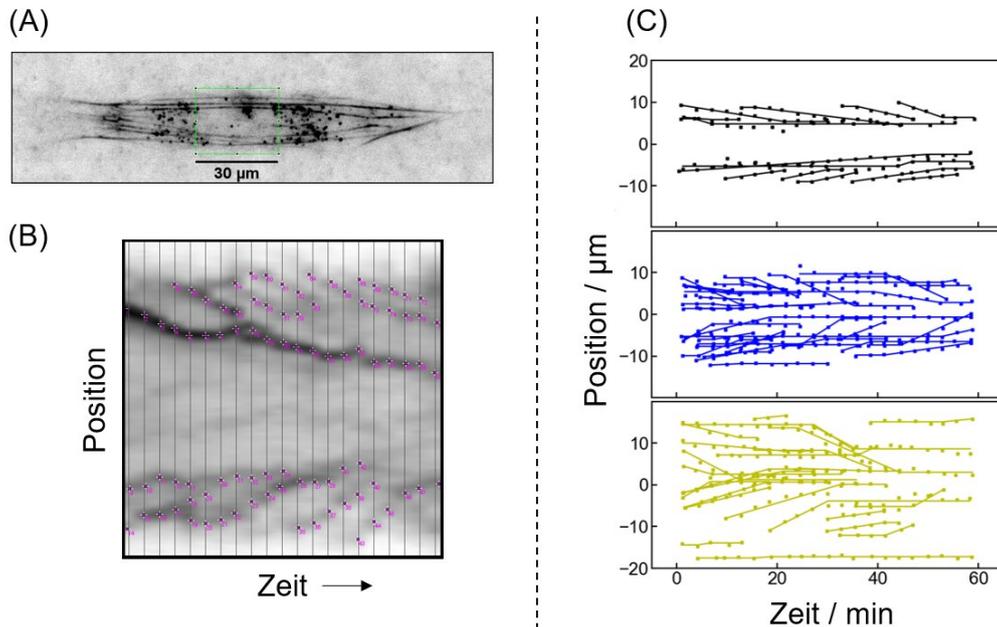


Abbildung 4.22: Kymographanalyse der Stressfaserbewegung. (A) Invertierte Fluoreszenzaufnahme einer Zelle mit Aktinfasern (schwarz) und Untersuchungsgebiet (grün). (B) Aneinanderreihung von Profilen des Untersuchungsgebietes mit einem zeitlichen Abstand von 3 min. Die Stressfaserpositionen wurden händisch markiert (magenta). (C) Rekonstruierte Stressfaser-Trajektorien für verschiedene Streifenbreiten: $20\pm 3\ \mu\text{m}$ (oben, schwarz), $30\pm 3\ \mu\text{m}$ (mittig, blau), $40\pm 3\ \mu\text{m}$ (unten, gelb). Die Geschwindigkeiten der Stressfasern wurden einerseits zwischen aufeinanderfolgenden Zeitpunkten und andererseits gemittelt über die gesamte Bewegungsphase bestimmt. Hierfür wurden die Trajektorien in 3 Phasen unterteilt: Ruhe, lineare Bewegung und Ruhe.

turen, die im Fluoreszenzkanal sichtbar waren. Dies bedeutet einerseits eine objektivere Analyse des Fließverhaltens, andererseits aber auch die Berücksichtigung von Strukturen, die nicht auf tatsächliche Aktinstressfasern, sondern zum Beispiel auf angefärbte Protein-Aggregate zurückzuführen waren. Gleichwohl konnte auch bei dieser Analyse der einwärts gerichtete Fluss visualisiert werden, siehe Abbildung 4.24. Da keine eindeutige Zuordnung zu Stressfasern möglich war, wurde auf eine weitergehende Analyse verzichtet.

4.4.4 Diskussion der Aktinskelettdynamik

Die in dieser Arbeit gefundene Geschwindigkeitsverteilung der Aktinstressfasern im Bereich $0,1\text{--}0,8\ \mu\text{m}/\text{min}$ steht im Einklang zu Beschreibungen ähnlicher Phänomene in der Literatur. Ein einwärts gerichteter Transport von Stressfasern wurde auch in Fibroblasten beobachtet,²³⁶ ebenso wie in Hepatozyten aus der Ratte.¹⁰² Der Transport erfolgte dabei gleichfalls von der freien Zellflanke in Richtung der Zellmitte. Die Transportgeschwindig-

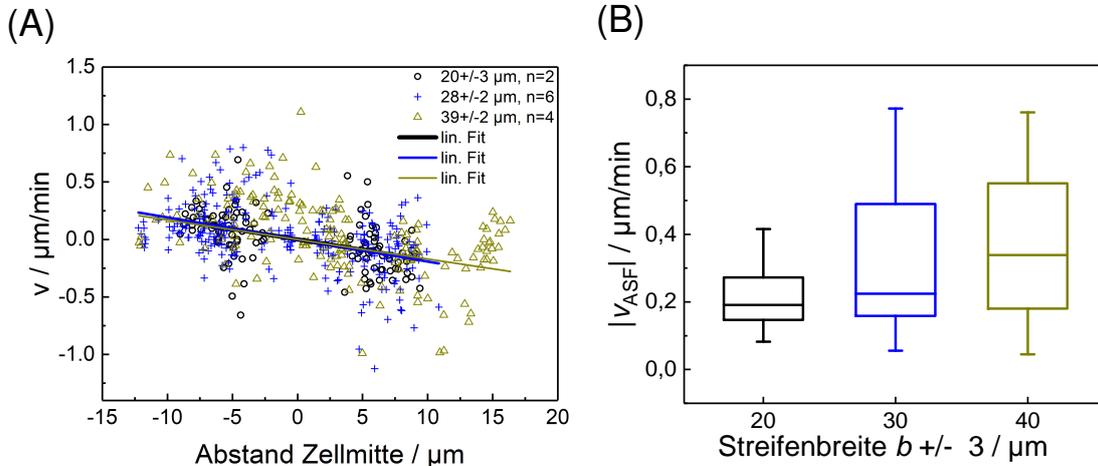


Abbildung 4.23: (A) Instantangeschwindigkeiten von Stressfasern in lateral eingeschränkten Zellen. Die Geschwindigkeiten ergeben sich aus den zurückgelegten Wegstrecken der Stressfasern zwischen zwei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten. Die Zellen wurden anhand der Streifenbreite in drei Gruppen eingeteilt (für die Anzahl von Zellen pro Gruppe, siehe Legende). Trotz der starken Streuung ist die Tendenz einer einwärts gerichteten Bewegung erkennbar (lineare Fits zeigen ähnliche Anstiege). (B) Geschwindigkeitsbeträge einzelner Stressfasern, gemittelt über den Zeitraum der Bewegung. Die Stressfasern von Zellen auf schmalen Streifen (20 μm) zeigen eine verminderte Bewegung, sowohl was den mittleren Geschwindigkeitsbetrag betrifft als auch die Streuung der Geschwindigkeitsbeträge ($n_{\text{ASF}} = 13, 32, 25$).

keiten lagen dort ebenfalls im Bereich von 0,15–0,35 μm . Äußere Einflüsse, die in vivo den Transport beeinflussen können, sind Zell-Zellkontakte,¹⁰² die zu einer Fixierung der Aktinfasern an Rezeptoren der Kontaktpunkte führen können. Dies wurde in dieser Arbeit aber ausgeschlossen, wodurch die breitere Geschwindigkeitsverteilung erklärt werden kann.

Die Bewegung von Aktinfasern innerhalb adhärenter Zellen ist ein häufig untersuchter Prozess und wird mitunter als "retrograder Fluss" bezeichnet. Als Ursache wird einerseits der Polymerisationsdruck entstehender Aktinfilamente im Lamellipodium beschrieben. Durch das Entstehen neuer Filamente und das gerichtete Wachstum wird das verzweigte Netzwerk durch den Kontakt mit der Zellmembran in Richtung des Zellinneren verschoben. Dieser Mechanismus wurde bereits als Ursache für den Transport von Aktinbögen nahe des Zellrands diskutiert.⁸¹ Zusätzlich kommt es durch die antiparallele Verknüpfung von Aktinfilamenten über Motorproteine zur Kontraktion der Fasern und damit zu einem aktiven Transport beziehungsweise zur einwärts gerichteten Bewegung von beispielsweise dorsalen Stressfasern in Richtung der Zellmitte.⁴⁴ Daraus abgeleitet würde auch eine erhöhte Vernetzung verschiedener Stressfasern zu einer erhöhten Kontraktilität führen. So konnte demonstriert werden, dass der Grad der Vernetzung innerhalb eines Netzwerks auch Einfluss auf globale Zytoskelett-Eigenschaften hat.¹⁵³

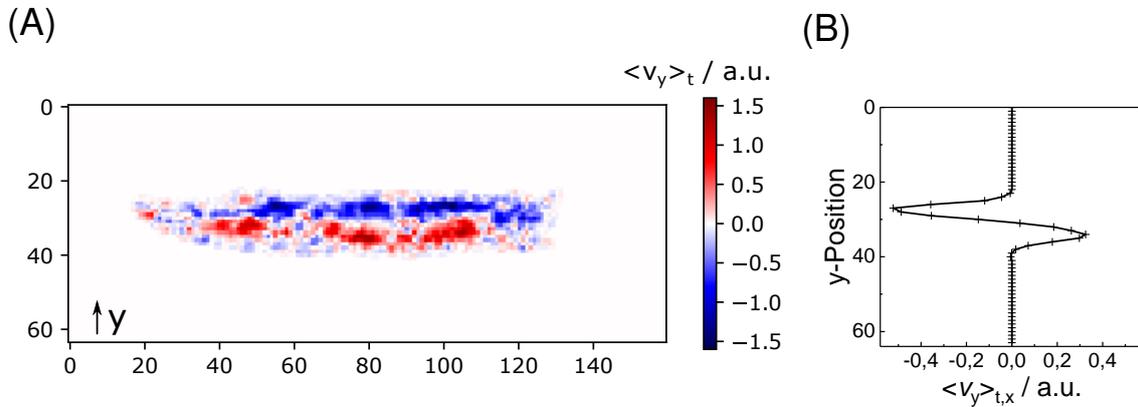


Abbildung 4.24: Visualisierung des intrazellulären F-Aktin-Flusses in einer lateral eingeschränkten Zelle. (A) Zeitlich gemittelttes Flussfeld der Bewegungen senkrecht zur Streifenrichtung. Die Vorzeichen der Geschwindigkeiten ergeben sich durch die Bewegungsrichtung zum unteren Bildrand hin (blau, negativ) oder vom unteren Bildrand weg (rot, positiv). (B) Das über die x -Richtung gemittelte Flussprofil $\langle v_y \rangle_{t,x}$ vs. Position.

Die bekannten Ursachen des retrograden Flusses können auch in der vorliegenden Arbeit herangezogen werden, um die beobachtete Bewegung zu erklären. Die leichte Zunahme der Bewegung in y -Richtung auf breiteren Streifen lässt sich durch eine zunehmende Ausrichtung der Fasern senkrecht zur Streifenrichtung beziehungsweise einen zunehmenden Grad an Quervernetzung begründen. Sowohl die größere Variation der mittleren Abweichung der Faserorientierung von der Streifenrichtung als auch die erhöhte Beweglichkeit der Stressfasern in breiteren Zellen sind Indizien für eine erhöhte Dynamik des Aktinskeletts in ausgebreiteten Zellen, beziehungsweise Merkmale einer verringerten Dynamik in eingeschränkten Zellen. Aus den Vermessungen der Aktinskelette in fixierten Zellen wurde ersichtlich, dass in stark eingeschränkten Zellen weniger Variabilität der Morphologien auftrat, das heißt, dass dort die Stressfasern vor allem am Zellrand lokalisiert waren und weniger in der Ausrichtung von der Streifenrichtung abwichen. Angesichts der stärkeren Vorgabe einer Netzwerkkonfiguration durch die Umgebungsgeometrie ist es deshalb plausibel, dass die Dynamik dieser Netzwerkzustände ebenfalls reduziert ist, da weniger Zustände eingenommen werden können als in flächigeren Zellen.

Weiterhin wurde ein Entstehen der Stressfasern am Zellrand beobachtet. Da diese nach ihrer Entstehung einem einwärts gerichteten Transport unterlagen, ist davon auszugehen, dass es sich um sogenannte transverse Bögen (*Transverse Arcs*) handelte, also Stressfasern, die nicht direkt mit Fokalen Adhäsionen in Kontakt stehen. Es ist bekannt, dass diese Stressfasern durch ein Aneinanderlagern von Myosin- und Aktinfilamenten im Umfeld des Netzwerks des Lamellipodiums entstehen.^{70,237} Dabei wird ein Beitrag einer gerichteten, Myosin-abhängigen Kontraktion des initial ungeordneten Netz-

werks diskutiert, was zu einer stärkeren Ausrichtung und schnelleren Anlagerung der Filamente führt.²³⁸ In Bezug auf die vorliegende Arbeit ist dieser Prozess für breite Zellen wahrscheinlich, in denen am Streifenrand tatsächlich oft ein schmaler Bereich frei von Stressfasern beobachtet wurde. In lateral stark eingeschränkten Zellen, die am Streifenrand auch einen höheren Kontaktwinkel aufweisen, ist es wahrscheinlich, dass dieser Prozess nur vermindert abläuft und dadurch ebenfalls die Dynamik der Stressfaserbewegung reduziert wird.

Außerdem wurde ein Abstoppen des Stressfasertransports und eine Auflösung der Fasern in der Zellmitte beobachtet, wo die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Zellkerns am höchsten ist. Hierfür können zwei Erklärungen angebracht werden. Einerseits ist eine isotrope Kontraktion des Netzwerks denkbar, wodurch die Kontraktionsgeschwindigkeit in der Mitte dieses Netzwerks am geringsten ist. Andererseits ist eine Rolle des Zellkerns als mechanische Barriere denkbar, wodurch die Bewegung der Stressfasern innerhalb der Zelle eingeschränkt wird. Zusätzlich ist eine Deformation der Stressfasern im Bereich des Zellkerns, eine damit verbundene mechanische Destabilisierung und ein dadurch beschleunigter Abbau möglich.²² Indizien für eine Rolle des Zellkerns bei der Regulierung der Stressfaserdynamik in insbesondere schmalen Zellen ergeben sich aus den Bildern des reduzierten Aktinskeletts in schmalen Zellen, der geringen Breite des Zellkerns in solchen Zellen und auch aus den Trajektorien der Stressfasern (Abb 4.22), die in schmalen Zellen den zentralen Zellbereich nicht erreichen. Somit kann sowohl die reduzierte Form des Aktinskeletts in Zellen auf schmalen Streifen, als auch eine sterische Wechselwirkung auf eingeschränktem Raum die reduzierte Dynamik des Aktinskeletts in schmalen Zellen erklären.

4.5 Einfluss der lateralen Einschränkung auf die Zellzugkräfte

Wie anfänglich diskutiert, ist das Aktinskelett eine Schlüsselkomponente der Mechanotransduktion und eng mit der Kraftgeneration der Zelle verbunden. Aus diesem Grund wurden neben der Zellmorphologie und der Struktur und Dynamik des Aktinskeletts ebenfalls die Zellzugkräfte von lateral eingeschränkten Zellen untersucht. Um einen höheren experimentellen Durchsatz der Einzelzellversuche zu erzielen, kamen dabei auch ungefärbte Zellen zum Einsatz, was immer noch eine Korrelation zwischen Zugkräften und genereller Zellmorphologie ermöglicht. Ebenfalls wurden zeitaufgelöste Messungen an Zellen mit gefärbtem Aktinskelett durchgeführt, um eine direkte Korrelation von Zellzugkräften und der dynamischen Struktur des Aktinskeletts zu erkennen. Die Zellen wurden auf mikrostrukturierten, mit Fluoreszenzpartikeln präparierten Polyacrylamidhydrogelsubstraten ausgesät und für eine Stunde anwachsen gelassen. Nach dieser Zeit ist mit einem Abschluss des Ausbreitens der Zellen zu rechnen, das heißt, dass die Zellen einen stabilen Zustand erreicht haben.²¹¹ Die Bestimmung der Zellzugkräfte erfolgte sowohl einmalig als auch zeitaufgelöst sowie zusätzlich mit einer SiR-Actin-Färbung, zur

parallelen Untersuchung der Aktinskelettstruktur. Die zeitaufgelöste Messungen fanden über einen Zeitraum von einer Stunde statt. Die Messung der Geldeformation durch das Einwirken zellulärer Zugkräfte gestattet die Berechnung der Gesamtzugkraft sowie die Analyse der Orientierung der Zugkräfte relativ zu einer Vorzugsrichtung; als diese wurde die Ausrichtung des Streifens gewählt (siehe Abb. 4.25).

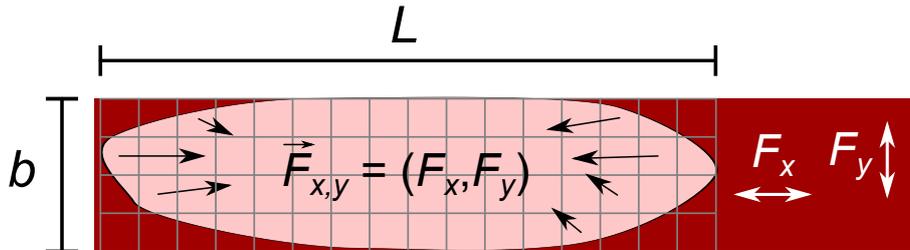


Abbildung 4.25: Schema zur Zugkraftmessung. Die Streifenrichtung wird mit x bezeichnet, die dazu senkrechte Richtung mit y . Die Verschiebungen werden auf einem regelmäßigen Gitter berechnet. Zusammen mit den Materialparametern ergeben sich dann die Zellzugkräfte und die Dehnungsenergie.

4.5.1 Gesamtkraft und Dehnungsenergie in Abhängigkeit der lateralen Einschränkung

Zur Charakterisierung der allgemeinen Zellkontraktilität wurden die skalaren Größen F_{tot} (Gesamtkraft) und U (Dehnungsenergie) berechnet. Eine Diskussion der Größen F_x und F_y als Indikatoren für eine Polarisierung der Zellkräfte erfolgt in Abschnitt 4.5.2.

4.5.1.1 Die Gesamtkraft nimmt mit Streifenbreite bzw. Adhäsionsfläche zu

Die aufsummierte Gesamtkraft F_{tot} in Abhängigkeit der Zellgröße ist in Abb 4.26 dargestellt für Zellen auf Streifen mit einer Breite von $1\ \mu\text{m}$ bis $80\ \mu\text{m}$. Zu erkennen ist ein Anstieg mit der Streifenbreite. Die Kräfte nahmen von ca. $0,1\ \mu\text{N}$ auf schmalen Streifen bis auf über $1\ \mu\text{N}$ auf breiten Streifen zu. Der Zusammenhang lässt sich durch ein Power-Law darstellen mit einem Exponenten p von ca. $0,8$ für die Korrelation zwischen Gesamtkraft und Streifenbreite.

Da ein Teil der Zellen mit SiR-Actin angefärbt war, konnte eine Zuordnung der Zellzugkraftgrößen zu verschiedenen Aktinskelett-Phänotypen vorgenommen werden, ebenso wie ein genereller Vergleich zwischen ungefärbten und gefärbten Zellen. Die gefärbten Zellen wurden unterteilt in Zellen mit nur zwei Stressfasern am Rand und solchen mit komplexeren Aktinnetzwerken. Dies ist exemplarisch in der Auftragung der Gesamtkraft gegenüber der Streifenbreite dargestellt. Mit der Ausnahme, dass Zellen mit nur zwei Stressfasern nur bis zu einer Streifenbreite von maximal ca. $25\ \mu\text{m}$ zu beobachten waren, zeigten sich keine charakteristischen Unterschiede hinsichtlich der Kraftparameter

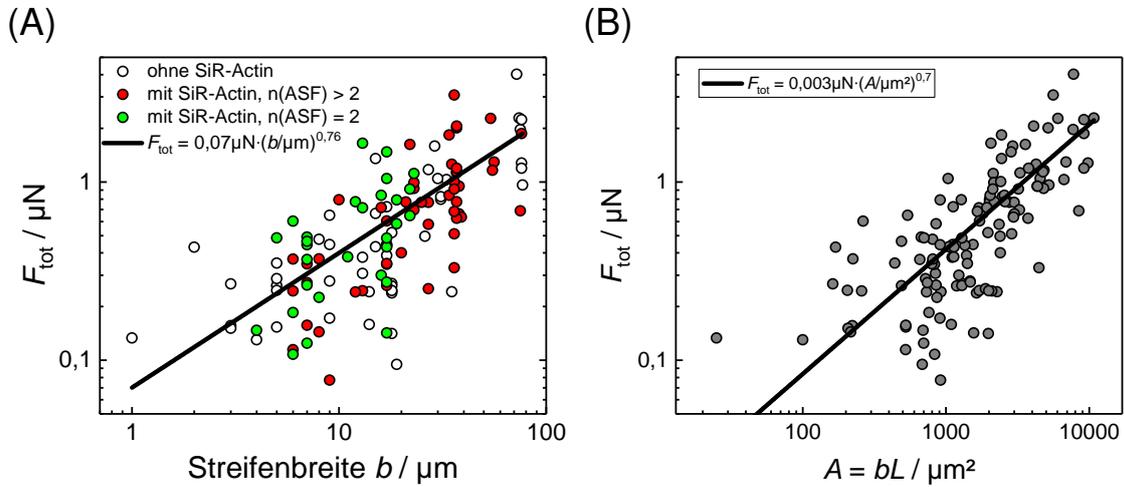


Abbildung 4.26: (A) Die Gesamtkraft F_{tot} in Abhängigkeit der Streifenbreite b . Die Gesamtkraft nimmt mit der Streifenbreite zu. Neben ungefärbten Zellen (schwarze Kreise, 50 Zellen) sind SiR-Actin-gefärbte Zellen aufgetragen, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Zugkraft und Aktinfasern sichtbar zu machen. Speziell wurden Zellen mit nur zwei Stressfasern am Zellrand (grün, 30 Zellen) und solche mit komplexeren Aktinskeletten (rot, 51 Zellen) unterschieden. Hierbei ist kein augenscheinlicher Unterschied zu erkennen, mit der Ausnahme, dass Zellen mit nur zwei Stressfasern vor allem auf schmaleren Streifen zu finden sind. (B) Auftragung der Gesamtkraft gegenüber der Zellfläche.

bei vergleichbaren Zellen, weder in Abhängigkeit von der Aktinskelettstruktur noch hinsichtlich der SiR-Actin-Färbung. Die Auftragung der Gesamtkraft gegenüber der Zellfläche liefert einen Zusammenhang der Form $F_{\text{tot}} \sim A^p$, mit $p \approx 0,7$.

4.5.1.2 Die Dehnungsenergie nimmt mit Streifenbreite bzw. Adhäsionsfläche zu

Die pro Zelle aufsummierte Größe Deformationsenergie U ist in Abb 4.27 dargestellt. Zu erkennen ist ein Anstieg mit der Streifenbreite über mehrere Größenordnungen von 0,001 pJ auf 10 μm breiten Streifen zu über 1 pJ auf 80 μm breiten Streifen. Der Zusammenhang lässt sich durch ein Power-Law darstellen, mit einem Exponenten p von ca. 0,9 für die Korrelation zwischen der Dehnungsenergie und der Streifenbreite, was nahe an einem linearen Zusammenhang ist. Neben der streifenbreitenabhängigen Auftragung wurde in Analogie zur Gesamtkraft die Auftragung gegenüber der Zellfläche (100 μm^2 – 10 000 μm^2) gewählt, welche ebenfalls eine deutliche Korrelation zwischen diesen beiden Größen zeigt, wiederum mit einer Skalierung von $U \sim A^{0,9}$.

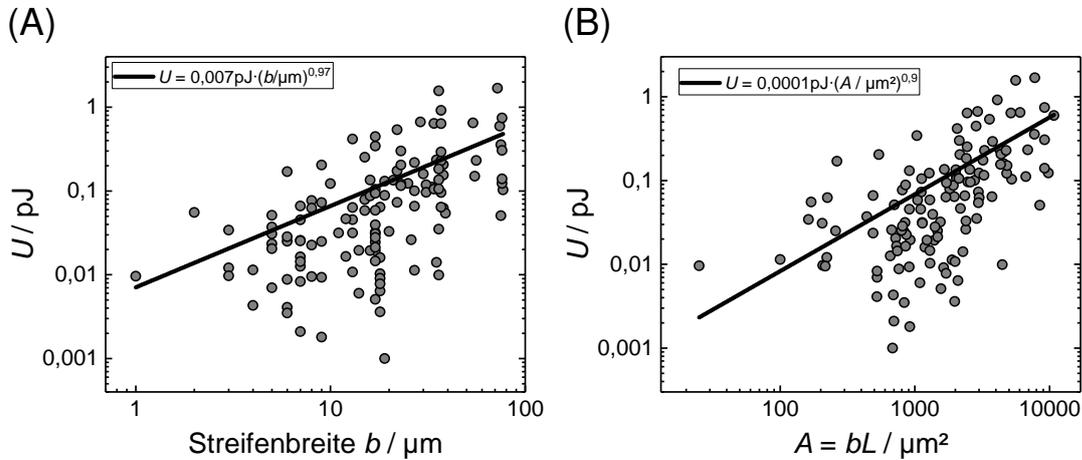


Abbildung 4.27: (A) Korrelation zwischen der Deformationsenergie U und der Streifenbreite. (B) Deformationsenergie gegenüber Zellfläche. Die Deformationsenergie zeigt vergleichbare Zusammenhänge mit der Streifenbreite und der Zellfläche wie die Gesamtkraft.

4.5.2 Die Polarisierung der Zellzugkräfte steigt mit der Zellelongation

Neben der Information über die Gesamtkraft lässt sich auch die Richtungsabhängigkeit der Zellkräfte untersuchen. Zu diesem Zweck erfolgte eine Projektion der Zellkräfte auf die x -Achse (Streifenrichtung, entspricht der langen Zellachse) und die y -Achse (senkrecht zur Streifenrichtung). Die Beträge der Kraftkomponenten wurden aufsummiert und die Summen der Kräfte in beide Achsenrichtungen ins Verhältnis gesetzt, um ein Maß für die Anisotropie der Kraftverteilung zu erhalten. Wiederum erfolgte die Auftragung gegenüber der Zellelongation (Zellseitenverhältnis, AR) als Maß für die Anisotropie der Zellmorphologie.

Es zeigt sich, dass mit zunehmender Einschränkung beziehungsweise Zellelongation sich eine zunehmend ungleiche Verteilung der Zellzugkräfte in Richtung der beiden Zellachsen einstellt (Abb. 4.28 A). Für ein Seitenverhältnis nahe Eins wurden Kräfteverhältnisse von ebenfalls nahe Eins gemessen. Für stark elongierte Zellen ($AR > 10$) wurde hingegen eine Verteilung der Kräfte entlang der Streifenrichtung (F_x) und senkrecht dazu (F_y) im Verhältnis 2:1 bis ca. 7:1 bestimmt. Mit zunehmender Einschränkung der Zellen erfolgt eine deutliche Polarisierung der Kräfte entlang der Streifenrichtung. Interessanterweise bleibt das Verhältnis der Zugkräfte entlang der beiden Hauptrichtungen hinter dem Verhältnis der Zellseitenlängen zurück. Dieser Fakt spiegelt sich in der gefundenen Skalierung von $F_x/F_y = AR^{0,4}$ wider.

Da die Möglichkeit besteht, dass die Summe der Kräfte in Streifenrichtung auch von der Streifenbreite abhängen kann (eine einfache Annahme ist, dass eine doppelt so breite Zelle auch doppelt so viel Kraft generieren kann), wurden die aufsummierten Kraftbeträge (parallel und senkrecht zur Streifenrichtung) zusätzlich noch auf die Breite be-

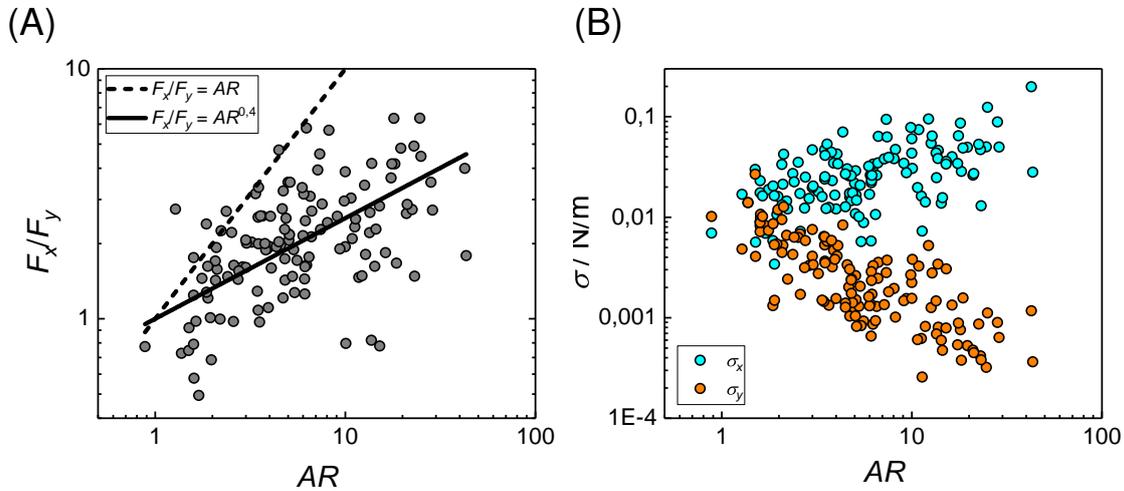


Abbildung 4.28: Polarisierung der Zellkräfte gegenüber Zellseitenverhältnis. (A) F_x/F_y vs. Zellseitenverhältnis (AR , Zellelongation). Die Verteilung der Kräfteausrichtungen wird mit zunehmender Elongation der Zelle ebenfalls anisotroper. In stark gestreckten Zellen ($AR \gg 1$) ist das Verhältnis der Summe der Kräfte in x -Richtung zur Summe der Kräfte in y -Richtung stark erhöht. Der Zusammenhang zwischen Seitenverhältnis und Kräfteverhältnis lässt sich näherungsweise mit einem Power-Law beschreiben: $F_x/F_y = AR^{0,4}$ (durchgehende Linie). Das Kräfteverhältnis scheint durch das Seitenverhältnis beschränkt zu sein (gestrichelte Linie, $F_x/F_y = AR$). (B) Spannungen an den Zellseiten gegenüber Zellseitenverhältnis. Die Spannungen $\sigma_x = F_x/b$ und $\sigma_y = F_y/L$ gegenüber Zellseitenverhältnis AR demonstrieren ebenfalls die starke Polarisierung elongierter Zellen.

beziehungsweise Länge der Zelle normiert, woraus einheitenmäßig Liniendichten der Kraft ($\sigma_x = F_x/b$ und $\sigma_y = F_y/L$) resultieren. Auch anhand dieser Spannung lässt sich eine Polarisierung der Zelle bei hoher Elongation (hohes Seitenverhältnis) ableiten, siehe Abbildung 4.28 B. Gestrecktere Zellen weisen ein deutlich verschiedene Spannungen auf, das heißt die Kräfte entlang der x -Richtung werden auf einem schmaleren Bereich konzentriert, während die Kräfte entlang der y -Richtung auf einen längeren Bereich verteilt werden.

4.5.3 Diskussion der Zellzugkräfte in lateral eingeschränkten Zellen

Die Zunahme der Gesamtkraft im Bereich von ca. $0,1 \mu\text{N}$ auf Streifen mit einer Breite von $10 \mu\text{m}$ beziehungsweise Flächen in der Größenordnung von $100 \mu\text{m}^2$ zu Kräften im Bereich von reichlich über $1 \mu\text{N}$ auf Streifenbreiten jenseits von $40 \mu\text{m}$ beziehungsweise Zellflächen über $3000 \mu\text{m}^2$ entspricht einer zehnfachen Vergrößerung der Gesamtkraft. Die Beträge der Gesamtkräfte im Bereich $0,1 \mu\text{N} - 4 \mu\text{N}$ entsprechen in etwa denen von uneingeschränkten Zellen, wie in Abschnitt 4.4.1 beschrieben (siehe auch Abb. 4.18) und stimmen größenordnungsmäßig mit dem in der Literatur beschriebenen

Bereich von mehreren 100 nN für uneingeschränkte HUVECs auf Polyacrylamidgelen überein.^{15,143,211} Ein genauer Vergleich mit anderen Ergebnissen gestaltet sich allerdings als schwierig, da mitunter andere Gelsysteme und Ligandenmodifikationen benutzt wurden. Eine Korrelation mit der Streifenbreite war gegeben. Hierbei ist aber anzunehmen, dass es sich um einen indirekten Effekt handelt, der durch die Abhängigkeit der Zellfläche von der Streifenbreite gesteuert wird,

Für die Beziehung zwischen Gesamtkraft und Zellfläche findet man verschiedene postulierte Zusammenhänge. Diese lassen sich in der Regel als ein Power-Law der Form $F_{\text{tot}} = cA_{\text{Zelle}}^p$ beschreiben, mit einem Exponenten p mit $1 \leq p \leq 2$. Ein Exponent von 1 entspricht einer direkten Proportionalität zwischen der Zellfläche und der Gesamtkraft,^{174,175} ein Exponent von 0,5 lässt sich als direkte Proportionalität zwischen der Gesamtkraft und dem Radius der Zelle (bei ideal kreisförmigen Zellen) beziehungsweise ihrem Umfang interpretieren.¹⁷³ Der in dieser Arbeit gefundene Exponent von $p \approx 0,7$ reiht sich gut in diesen Bereich ein. Der sub-lineare Zusammenhang wird auch daran verdeutlicht, dass eine Normierung der Gesamtkraft auf die Zellfläche für kleine Zellflächen höhere Werte ergibt (siehe Anhang, Abb. A.6). Diese Größe lässt sich als Oberflächenspannung definieren und ist ein Hinweis darauf, dass kleine Zellen noch im Prozess des Ausbreitens sind. Weiterhin sind verschiedenste Einflussgrößen auf mögliche Abhängigkeiten zwischen Zellzugkraftparametern und Zellformparametern bekannt, beispielsweise die Substrathärte oder die Ligandendichte. Zusätzlich gelten die genannten Power-Laws für Zellen, die ein Fließgleichgewicht erreicht haben, während für Zellen im Stadium der initialen Adhäsion komplizierte Zusammenhänge modelliert und experimentell gefunden wurden.^{187,211} Da in Zellen auf schmalen Streifen ein unvollständig ausgeprägtes Aktinskelett beobachtet wurde, wäre es deshalb interessant, zu überprüfen, ob der Zusammenhang zwischen Gesamtkraft und Zellfläche auf verschiedenen Streifenbreiten einer unterschiedlichen Skalierung folgt. Die starke Streuung der Werte, insbesondere für kleinflächige Zellen (vgl. Abb. 4.26 C) könnte ein Indiz für eine Kraftgeneration außerhalb des Fließgleichgewichts sein, verhindert aber auch eine genauere quantitative Auswertung. Anhand der stichprobenartigen Unterteilung der gefärbten Zellen in solche mit nur zwei Stressfasern und solche mit einem komplexeren Aktinstressfasernetzwerk konnte allerdings keine Unterscheidung erreicht werden.

Die gemessenen Werte der Deformationsenergie (ca. 0,01 pJ auf Streifen bis 10 μm Breite und 0,1 pJ – 1 pJ auf 40 μm – 100 μm breiten Streifen) entsprechen ebenfalls Werten, die in der Literatur zu uneingeschränkten HUVECs auf fibronectinbeschichteten Polyacrylamidhydrogelen zu finden sind.^{211,239} Die Zunahme der Dehnungsenergie mit der Streifenbreite kann wiederum als ein indirekter Effekt, der durch die Zellfläche vermittelt wird, interpretiert werden. Für Fibroblasten, die auf Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Härte und mit Adhäsionsmustern unterschiedlicher Größe ausgesät wurden, wurde bereits ein linearer Zusammenhang zwischen Dehnungsenergie und Zellfläche beschrieben.¹⁸¹ Der hier gefundene Zusammenhang mit $U \sim A^p$ mit $p \approx 0,9$ impliziert

ebenfalls eine starke Kopplung zwischen Dehnungsenergie und Fläche. Erwartungsgemäß liegt der Exponent des Power-Laws für die Dehnungsenergie über dem der Gesamtkraft, da die Dehnungsenergie ihrerseits näherungsweise mit dem Quadrat der Kraft skaliert (in dieser Arbeit: $U \sim F_{\text{tot}}^{1,7}$, siehe Anhang, Abb. A.7). Das annähernd gleichbleibende Verhältnis von Dehnungsenergie und Zellfläche kann als Oberflächenspannung betrachtet werden, in dieser Arbeit mit einer Größenordnung von ca. $10^{-2} \text{ nN}/\mu\text{m} - 0,1 \text{ nN}/\mu\text{m}$, was ebenfalls gut zu bereits veröffentlichten Werten im Bereich $0,1 \text{ nN}/\mu\text{m} - 1 \text{ nN}/\mu\text{m}$ passt, wobei dort andere Zellen oder andere Substrate genutzt wurden (Fibroblasten bzw. Micropillar-Arrays).^{112,181,208}

Zur Normierung der Zellkräfte auf die Zelldimensionen gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen kann eine Normierung auf den Zellrand geschehen, wenn unterstellt wird, dass die Summe der Komponenten der Kraftvektoren, die senkrecht zu einer Zellseite sind, proportional zur Größe dieser Zellseite ist ($F_x \sim b$ und $F_y \sim L$), was eine gleichmäßige Verteilung der Adhäsionsstellen, eine gleichmäßige Kraftübertragung an den Adhäsionsstellen und eine senkrecht zur Zellkante gerichtete Kraftübertragung voraussetzt. Diese Auftragung lieferte eine klare Polarisierung der resultierenden Spannungen. Hierbei ist zu bemerken, dass σ_y in der doppelt-logarithmischen Auftragung eine stärkere Änderung durchläuft als σ_x . Zum einen ist eine solche Aufspaltung anhand der Morphologie des Aktinzytoskeletts zu erwarten. Dieses zeigte eine Polarisierung, die sich gut in Abhängigkeit des Seitenverhältnisses beschreiben ließ, wobei die Polarisierung der Stressfasern (gemessen als $\tan(|\alpha_{\text{ASF}}|)$, Verhältnis der Summe der Längen der x - und y -Projektionen der Fasersegmente) stärker ausgeprägt war als die Polarisierung der Zellform (gemessen als Seitenverhältnis der Zelle), während die Polarisierung der Kräfte, gemessen als Verhältnis der Summen der x - und y -Projektionen der Kräfte, weniger stark als die Polarisierung der Zellform ausfiel. Hierbei ist anzumerken, dass für die Kraftentwicklung einer Zelle die Aktinstressfasern keine Voraussetzung sind, da auch verzweigte Netzwerke, wie das des Lamellipodiums oder das unvollständig ausgebildete Aktinskelett während der initialen Zelladhäsion Kräfte generieren können.^{185,187}

Zudem ist es möglich, dass die starke Abnahme der Kräfte senkrecht zur Streifenrichtung durch die Geometrie der Zelle entlang der dritten Dimension reguliert wird. Da die Zelle an der Position des Zellkerns erhöht ist und die Breite des Zellkerns auf schmalen Streifen der Zelle entspricht, ist dort der Kontaktwinkel zwischen Zelle und Substrat erhöht. Dies ist aber ein kritischer Parameter für das Entstehen von Zellzugkräften, die erst unterhalb eines Kontaktwinkels von 90° generiert werden.¹⁸³ Aufgrund des höheren Kontaktwinkels der Zelle mit dem Substrat am Streifenrand kann nur ein verminderter Polymerisationsdruck aufgebaut werden, was zu einem verminderten retrograden Fluss und einer geringeren Kraftübertragung auf das Substrat führt. Dies deckt sich mit der Beobachtung einer reduzierten Stressfaserbewegung in schmalen Zellen.

In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten wurde eine Abnahme der Gesamtzugkräfte mit zunehmender seitlicher Einschränkung festgestellt, wie es zum Beispiel für pseudo-

eindimensionale Substrate im Vergleich zu zweidimensionalen Substraten der Fall ist.¹⁵⁷ Gleichzeitig kann aber beobachtet werden, dass die Orientierung der Zugkräfte stark zunimmt und diese entlang des Substrats orientiert sind. Dies kann beispielsweise zu einer effizienteren Migration entlang einer gegebenen extrazellulären Struktur führen. Physiologisch bedeutsam ist die Ungleichverteilung von Zellkräften in Zellen der Muskulatur. Zellen der Skelettmuskulatur und der glatten Muskulatur unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Elongation und dementsprechend hinsichtlich ihrer Kontraktionsachsen. Die in dieser Arbeit gefundenen Daten zur Kraftpolarisation zeigen, dass stark elongierte HUVECs nur noch zu einer richtungsmäßig eingeschränkten Kontraktion befähigt sind, was, übertragen auf die Zellen des gesamten Blutgefäßsystems, zu einer unzureichenden Regulierung des Blutdrucks führen könnte.

4.5.4 Zeitaufgelöste Messungen

Da es sich bei den oben aufgeführten Messungen nur um Untersuchungen von Zellen zu einem Zeitpunkt handelte, wurden zeitaufgelöste Messungen durchgeführt, um auch den zeitlichen Verlauf der Zellzugkräfte in Korrelation zur Dynamik des Aktinskeletts untersuchen zu können. Zellen wurden über eine Stunde im Abstand von drei Minuten mikroskopiert. Es erfolgten Aufnahmen der Zelle, des Aktinskeletts und des deformierten Gels. Eine exemplarische Bilderserie ist in Abbildung 4.29 dargestellt. Es ist sowohl ein Umbau des Aktinskeletts als auch die punktuelle Übertragung der Kräfte auf das Substrat zu erkennen. Zur Charakterisierung wurden die Ausrichtung der Stressfasern α_{ASF} sowie die Zellzugkraftparameter bestimmt.

Interessanterweise erwies sich die räumliche Verteilung der Übertragungspunkte der Zugkräfte als teilweise sehr stabil. Einzelne Stellen hoher Kraftübertragung von Zelle zu Substrat waren über mehrere Beobachtungszeitpunkte bis hin zum gesamten Beobachtungszeitraum von einer Stunde sichtbar (siehe Abb. 4.29). Dies ist insofern bemerkenswert, als dass aufgrund der freien Zellenden entlang der Streifenrichtung von einer weniger starken Ausbildung der Fokalen Adhäsionen ausgegangen werden kann, wie es auf rechteckigen Adhäsionsstrukturen zu erwarten ist (vergleiche dazu Abschnitt 4.3.3 zur Diskussion der Fokalen Adhäsionen).

Der zeitliche Verlauf der Zugkraftparameter weist starke Schwankungen auf (Veränderung der Dehnungsenergie um eine Größenordnung innerhalb einer Stunde), ebenso andere Größen zur Beschreibung der Zellmorphologie, wie zum Beispiel die Zellfläche ($\pm 20\%$ in 3 min). Exemplarische Zeitverläufe sind in Abbildung 4.30 dargestellt. Eine stichprobenartige Analyse der Kreuzkorrelationen ergab dabei keine neuen Zusammenhänge. Die Dynamik der Zellzugkraftparameter und der Zellfläche zeigte erwartungsgemäß hohe Korrelationen (Abbildungsteil A), während eine Korrelation zur zeitlichen Entwicklung anderer Größen, wie zum Beispiel charakteristischer Messwerte der Polarisierung, wie der Stressfaserwinkel und das Kräfteverhältnis, nicht gegeben schien (Abbildungsteil

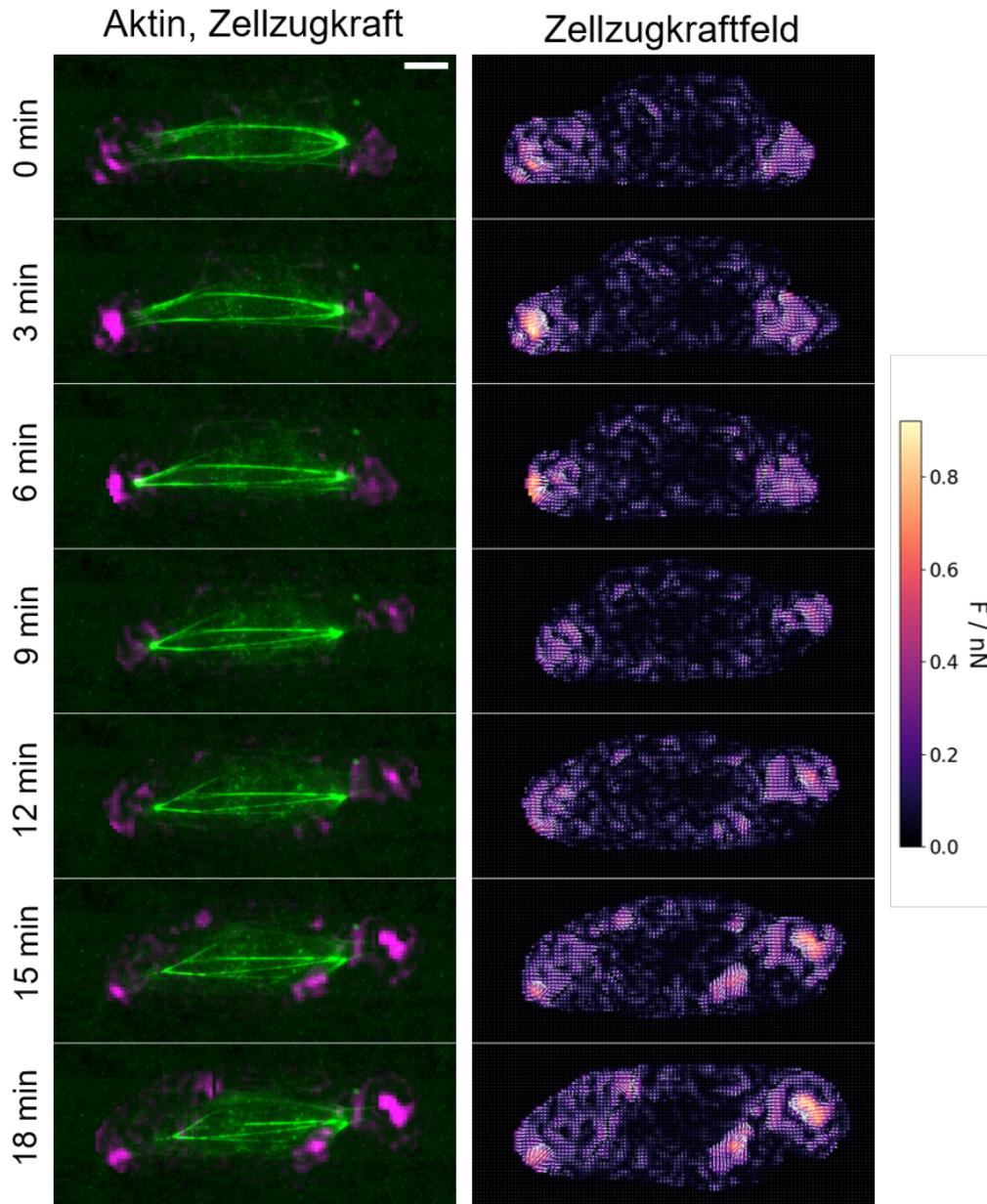


Abbildung 4.29: Zeitserie: Aktinskelett und Zellzugkraft. Die ersten 7 Zeitpunkte in dreiminütigen Intervallen einer einstündigen Zeitserie. In der linken Spalte sind das Aktinskelett (grün) sowie farbkodiert die Beträge der Zellzugkräfte (magenta) zu sehen. Zu beachten ist die kaum vorhandene Aktinfärbung in den Bereichen hoher Kraftübertragung. In der rechten Spalte ist zur besseren Veranschaulichung das Zellzugkraftfeld dargestellt. Zu erkennen sind einzelne Positionen, an denen über mehrere Zeitpunkte hinweg große Kräfte auf das Substrat übertragen werden. (Maßstabsbalken: 20 μm , Streifenbreite: 38 μm)

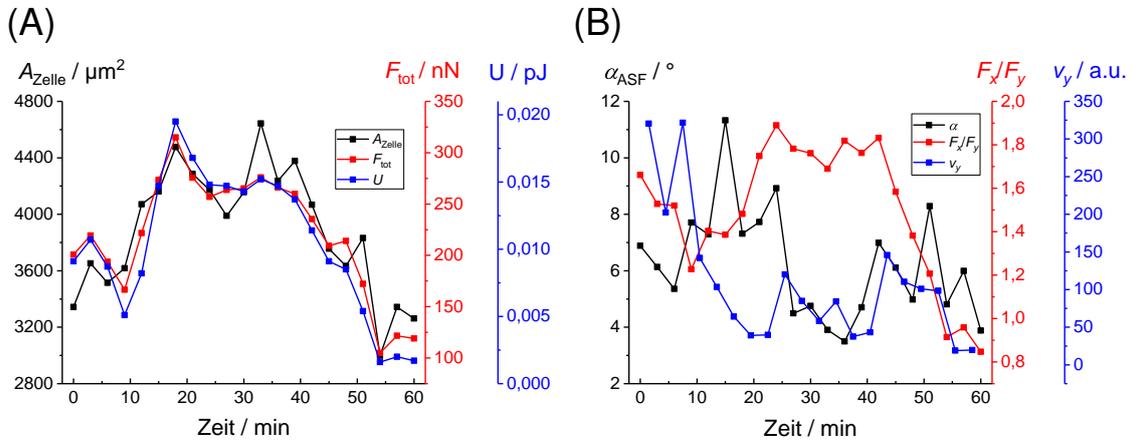


Abbildung 4.30: Beispielhafte Zeitverläufe relevanter Zellparameter der Zelle aus Abb. 4.29. (A) Die Parameter Zellfläche A , Gesamtkraft F_{tot} und Dehnungsenergie U zeigen zeitlich ähnliche Verläufe. Die paarweisen Kreuzkorrelationskoeffizienten ρ betragen: $\rho(A, F) = 0,91$, $\rho(A, U) = 0,87$, $\rho(F, U) = 0,71$ (B) Die Polarisierungs-Parameter α_{ASF} , F_x/F_y sowie die betragsmäßige Summe der Flussfeldkomponenten in y -Richtung v_y zeigen verschiedene Zeitverläufe; $\rho(\alpha, F_x/F_y) = 0,0075$, $\rho(\alpha, v_y) = 0,078$, $\rho(F_x/F_y, v_y) = 0,17$. (Berechnung nach Pearson in Origin Pro 2017)

B). Ebenso ließ sich keine eindeutige Aussage zum Zusammenhang vom Zeitverlauf der Zellkräfte und des Aktinflusses machen.

4.5.5 Diskussion der zeitaufgelösten Messungen

Ein Ansatz zur Erklärung der mangelnden Korrelation zwischen spezifischen Aktinskelett- und Zellzugkraftparametern ist die räumliche und zeitliche Auflösung der Aufnahmen. Bei Betrachtung von Abbildung 4.29 wird insbesondere in der linken Spalte, die die Überlagerung der Aktinskelettbilder und des Zellzugkraftfeldes enthält, klar, dass in den Bereichen der fokalen Adhäsionen, den Orten der höchsten Kraftübertragung, kaum gefärbtes Aktin vorliegt. Dies ist durch die Reorganisation des Aktinskeletts an den Fokalen Adhäsionen, wo der Aufbau von Stressfasern stattfindet, erklärbar. An den Fokalen Adhäsionen werden Stressfasern neu gebildet, was durch den Farbstoff SiR-Actin nicht sofort abgebildet werden kann, da dieser eine etwas geringere Austausch-Kinetik als Aktin selbst aufweist.¹⁰⁹ Damit kann eine Sichtbarmachung von Aktinstrukturen in Bereichen, in denen ein schneller Umbau erfolgt, wie im Lamellipodium und an den Fokalen Adhäsionen, nicht erfolgen.

Weiterhin ist bekannt, dass die Verknüpfung des Aktinskeletts mit dem Substrat als "viskose Kupplung" modelliert werden kann, das bedeutet, dass zeitlich transiente Bindungen ausgebildet werden. Das Öffnen und Schließen dieser Bindungen ist durch die On- und Off-Raten der Bindungspartner mitbestimmt, erfolgt aber nicht-deterministisch,

das heißt, die Bindung einer Aktinstruktur zum Untergrund besteht nur zeitweise.^{40,186} Durch diese effektive Reibung zwischen Aktinfasern und Adhäsionsstellen kommt es zu einer stochastischen Kraftübertragung an das Substrat. Zudem ist bekannt, dass das Aktinskelett auf mechanische Belastung dynamisch mit einer Dehnungsversteifung (*strain stiffening*) reagieren kann.¹⁸⁷ Zusammen mit der langreichweitigen Wechselwirkung verschiedener Domänen des Aktinnetzwerks (bei hinreichender Verknüpfung) lässt sich daraus also erklären, weshalb die zeitliche Entwicklung der Zellkräfte nicht zwangsläufig mit einer Entwicklung der Parameter zur Beschreibung des Aktinskeletts korreliert sein muss.

Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die entsprechenden Parameter (Ausrichtung der Stressfasern, Gesamtmenge) im Wesentlichen durch die Zellgeometrie vorgegeben sind und sich während des Beobachtungszeitraums nur innerhalb eines charakteristischen Wertebereichs bewegen. Wiederum war die Variation der Werte für Zellen auf schmalen Streifen ($b \approx 20 \mu\text{m}$) geringer als auf breiteren Streifen (siehe Abb. 4.21 B).

Weiterhin ist es möglich, die verschiedenen Zusammensetzungen von Stressfasern zur Erklärung einer uneindeutigen Zuordnung von Aktinskelettmorphologie und Zellzugkräften heranzuziehen. Aktinbündel können in verschiedenem Maß aus antiparallel und parallel angeordneten Aktinfilamenten bestehen, wobei die antiparallele Anordnung eine Grundvoraussetzung für Kontraktilität ist. In parallel angeordneten Aktinfilamenten ist kein gegenläufiges Verschieben durch Myosin-Motorproteine möglich. In der Literatur wird entsprechend eine Unterteilung von Stressfasern vorgenommen; die Zuordnung kann beispielsweise durch die Färbung der Myosine oder anderer Crosslinker-Proteine erfolgen.^{67,240} Zwar wurde im Umfang der vorliegenden Arbeit eine Färbung von Myosin vorgenommen, allerdings wurde dies nicht bei den Lebendzellversuchen durchgeführt, sondern um einen generellen Nachweis kontraktile Stressfasern in lateral eingeschränkten Zellen zu erhalten (siehe Anhang, Abbildung A.5).

Weiterhin spielen bei der Kraftübertragung innerhalb der Zelle nicht nur das Aktinskelett, sondern auch andere Bestandteile des Zellskeletts, wie die Mikrotubuli und die Intermediärfilamente eine Rolle.²⁴¹ Die langreichweitige Verteilung der Kräfte innerhalb der Zelle verhindert ebenso eine eindeutige Zuordnung der Zugkräfte zu gegebenen Aktinstressfasern wie der zeitabhängige Wandel von elastischem zu plastischem Verhalten innerhalb des Zytoskeletts.^{242–244} Auch die Verteilung der Fokalen Adhäsionen kann die Kraftverteilung beeinflussen, wobei eine direkte Korrelation zwischen der Struktur einer ausgereiften Fokalen Adhäsion und den übertragenen Kräften ebenfalls nicht gegeben sein muss, was sich wiederum durch die Querverbindungen des Zellskeletts erklärt.¹⁷⁷

Schlussendlich wurde auch in dieser Arbeit bestätigt, dass eine direkte Korrelation zwischen der lokalen Zugkraftverteilung und der Aktinskelettarchitektur nicht gegeben ist, was sich mit anderen Beobachtungen aus der Literatur deckt.^{237,245,246} Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass Parameter der Zellform mit globalen Parametern der Kraftentwicklung korrelieren.

5 Zusammenfassung

Der Zusammenhang von Form und Funktion gilt nicht nur im Design und der Architektur, sondern auch beim Aufbau unterschiedlicher Gewebe und der daran beteiligten Zellen. Bei der Entwicklung mehrzelliger Lebewesen muss in der Regel ein kugelförmiger Zellhaufen komplexe Formänderungen durchlaufen, bis die endgültige Gestalt des Organismus erreicht ist. Dies wird unter anderem durch Formänderungen auf der Zellebene und Bewegungen von Zellverbänden, gesteuert durch Zellkräfte, erreicht. Ebenso finden sich in ausgereiften Organismen verschiedene Zellformen, die spezialisierten Zellarten zugewiesen werden können. Im Gegensatz dazu kann eine fehlgesteuerte Zellform Ausdruck eines pathologischen Zustands sein. Angesichts der Wichtigkeit des Zusammenhangs zwischen Zellform und Zellfunktion stellt sich die Frage, wodurch die Zellform festgelegt wird. Es ist bekannt, dass neben einer biochemischen auch eine biophysikalische Regulation stattfindet, die durch die räumliche Beschränkung durch die extrazelluläre Matrix gegeben ist und auf der Übertragung von Kräften beruht. Hierbei ist zum Teil immer noch unverständlich, wie die Einwirkung der Umgebung die Zelle prägt und welche Konsequenzen im Zellverhalten dies zur Folge hat.

Ziel dieser Arbeit war es, sowohl die Anpassung der Zellstruktur an eine räumliche Einschränkung als auch die Anpassung der Zellfunktion quantitativ zu charakterisieren. Die Adaption der Zellstruktur sollte anhand der äußeren Zellform und der intrazellulären Struktur, speziell der des Aktinzytoskeletts, beschrieben werden, da dieses eine zentrale Rolle bei der Mechanotransduktion und der Kraftentwicklung der Zelle einnimmt. Von einer Vielzahl möglicher Zellfunktionen sollte die Erzeugung von Zellzugkräften untersucht werden, da diese große Wichtigkeit für die Gestaltung von sich entwickelndem Gewebe haben. Neben der parallelen Betrachtung von Zellstruktur und Zellfunktion sollte zusätzlich deren Dynamik bestimmt werden, um eine weitere Dimension der Anpassung von Zellen an räumliche Einschränkung zu analysieren. Die Charakterisierung von Zellen in räumlicher Einschränkung sollte somit Aussagen treffen (i) zur Änderung der Zellmorphologie, (ii) zur Anpassung des Aktinzytoskeletts und dessen Dynamik in räumlicher Einschränkung und (iii) zur Anpassung des Zellzugkraftverhaltens und einer möglichen Korrelation mit anderen untersuchten morphologischen Parametern.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVECs) – ein weitverbreitetes Modellsystem für mechanosensitive humane Primärzellen – auf mikrostrukturierten Oberflächen ausgesät. Als Substrate dienten einerseits Deckgläser, um optimale Mikroskopiebedingungen zu gewährleisten, und andererseits flexible Poly-

acrylamidhydrogele ($E = 5 \text{ kPa}$ und $E = 9 \text{ kPa}$), um die physiologische Umgebung anzunähern und Zellzugkraftmessungen durchzuführen. Die Strukturierung wurde durch Mikrokontaktdruck mit dem Adhäsionsprotein Fibronectin erzeugt. Als Muster wurden Streifen variabler Breite ($b = 5 \mu\text{m} - 80 \mu\text{m}$) verwendet, auf denen die Zellen anwachsen konnten. Der Einsatz von Streifen erzeugte eine laterale Einschränkung, die den Zellen immer noch die Möglichkeit eines unbeschränkten Längenwachstums ließ. Die eingeschränkten Zellen wurden zum einen morphologisch charakterisiert, das heißt, dass die Fläche und das Seitenverhältnis AR der Zelle und des Zellkerns bestimmt wurden. Zudem wurde durch eine automatisierte Bildauswertung eine Charakterisierung der Aktinzytoskelette vorgenommen, wobei die Gesamtlänge und die mittlere Ausrichtung der Stressfasern pro Zelle bestimmt wurden. Die Dynamik des Aktinskeletts wurde mithilfe einer Lebendzellfärbung mit SiR-Actin ebenfalls untersucht. Zusätzlich erfolgten Zellzugkraftmessungen der Zellen und es wurden die Dehnungsenergie U , die Gesamtkraft F_{tot} und die Kraftkomponenten parallel und senkrecht zur Streifenrichtung berechnet. Auch für die Zellzugkräfte wurden zusätzlich zeitaufgelöste Datensätze erhoben.

Die Anpassung an die laterale Einschränkung war sowohl an der Zellfläche als auch anhand der Werte des Zellseitenverhältnisses erkennbar. Da die Zellen in Abhängigkeit der Streifenbreite ihre Länge nur wenig änderten ($109 \pm 37 \mu\text{m}$ für $b < 20 \mu\text{m}$ und $95 \pm 30 \mu\text{m}$ für $20 \mu\text{m} \leq b < 40 \mu\text{m}$), nahm die Zellfläche deutlich erkennbar mit der Streifenbreite zu (ca. $500 - 1000 \mu\text{m}^2$ für $b = 10 \mu\text{m}$, ca. $1000 \mu\text{m} - 5000 \mu\text{m}^2$ für $b = 40 \mu\text{m}$). Das Zellseitenverhältnis verhielt sich näherungsweise invers zur Streifenbreite, wobei auf den schmalsten Streifen AR -Werte bis zu ca. 30 erreicht wurden, während auf breiteren Streifen ein deutlicher Trend gegen 1 erkennbar war. Die geringe Änderung der Zelllänge lässt einerseits deren Wichtigkeit für den physiologischen Zustand vermuten, andererseits deutet dies auf das Vorhandensein eines robusten Regulierungsmechanismus hin. Eine Regulation der Zelllänge durch die Balance zwischen der Kontraktilität der Aktin-Myosin-Verbindungen und einer Gegenkraft durch Mikrotubuli ist hierfür ein plausibler Erklärungsansatz. Ein Vergleich der Morphologie zwischen Zellen, die auf Glassubstraten und solchen, welche auf Gelen angewachsen waren, ergab, dass die verschiedenen Substrathärten deutlich geringere Änderungen der Morphologieparameter hervorriefen, als die Zell-zu-Zell-Variabilität. Zusätzlich zur allgemeinen Zellmorphologie wurde auch die Morphologie des Zellkerns untersucht. Auch bei diesem konnte eine Änderung der projizierten Fläche (ca. $100 \mu\text{m} - 500 \mu\text{m}^2$), streifenbreitenabhängige AR -Werte (ca. 3 bzw. 1,5 für $b = 10 \mu\text{m}$ bzw. $b = 40 \mu\text{m}$) und eine starke Kopplung der Breite und Länge an die entsprechenden Zelldimensionen beobachtet werden. Die Ausrichtung des Zellkerns war ebenfalls stark mit der Zellausrichtung korreliert. Der starke Zusammenhang zwischen der Form der Zelle und des Kerns lässt sich ebenfalls über Bestandteile des Zytoskeletts, wie Mikrotubuli, Intermediärfilamente und perinukleäre Stressfasern, erklären. Die relative laterale Kompression des Zellkerns auf schmalen Streifen lässt sich weiterhin als ein Hinweis auf einen anisotropen mechanischen Spannungszustand der Zelle

deuten. Die geänderte Form des Zellkerns kann weiterhin die Zugänglichkeit der DNA im Inneren des Zellkerns beeinflussen, wodurch die laterale Einschränkung zu einer veränderten Genexpression führen kann.

Ein besonderer Fokus dieser Arbeit lag auf der Anpassung des Aktinzytoskeletts an räumliche Einschränkung, da dieses in den Prozess der Mechanotransduktion eingebunden ist. Die Charakterisierung fand einerseits statisch, also in fixierten Zellen, und andererseits dynamisch, also in lebenden Zellen, die mit SiR-Actin gefärbt waren, statt. Die quantitative Beschreibung erfolgte mittels binärisierter Bilder des gefärbten Aktinskeletts. In diesen Bildern wurden Geradensegmente detektiert und so das Aktinskelett rekonstruiert. Die deskriptiven Parameter Gesamtlänge und Ausrichtung der Stressfasern zeigten dabei eine deutliche Abhängigkeit von der lateralen Einschränkung. Die Gesamtlänge der Aktinfasern korrelierte stark mit der Gesamtfläche der Zelle, welche mit der Streifenbreite zunahm. Das Verhältnis aus Gesamtlänge der Aktinfasern und der Zellfläche ergab über weite Bereiche der Streifenbreite Werte von ca. $0,5 \mu\text{m}^{-1}$. Die mittlere Abweichung der Fasern von der Streifenrichtung betrug ca. 5° für $b < 10 \mu\text{m}$ und etwa $5^\circ - 40^\circ$ für $b = 40 \mu\text{m}$, was einer deutlichen Polarisierung entspricht. Eine Auswertung der Längenverteilung der detektierten Geradensegmente ergab eine geringere Häufigkeit längerer Segmente. Interessanterweise zeigte sich bei einer Aufteilung der Daten nach schmalen ($b < 20 \mu\text{m}$) und breiten Zellen (bzw. flächenmäßig kleinen ($A < 2000 \mu\text{m}^2$) und großen Zellen) eine relative Zunahme von Geradensegmenten im Bereich $40 \mu\text{m} - 50 \mu\text{m}$. Dies entspricht etwa der halben mittleren Zelllänge und passt zur Beobachtung, dass Zellen auf schmalen Streifen oft nur über zwei periphere, am Streifenrand anliegende Stressfasern verfügten. In breiteren Zellen waren die Aktinskelette komplexer aufgebaut und insbesondere stärker quervernetzt, wodurch eine feinere Aufteilung der Aktinfasersegmente gegeben war. Somit stützt die quantitative Auswertung den qualitativen Befund, dass Zellen auf schmalen Streifen ($b < 20 \mu\text{m}$) über ein reduziertes, weniger stark vernetztes Aktinskelett verfügen.

Zusätzlich wurde die Dynamik des Aktinskeletts in Zellen auf Streifen untersucht. Zum einen wurde die Bewegung von Stressfasern, die entlang der Streifenrichtung orientiert waren, durch eine Kymographenanalyse gemessen, und zum anderen wurde die Bewegung sämtlicher, durch SiR-Actin gefärbter Elemente innerhalb der Zelle mittels einer automatisierten Flussanalyse untersucht. Beide Auswertungen ergaben einen von den Zellrändern (Streifenrändern) einwärts gerichteten Fluss. Die Fließgeschwindigkeiten betrugen dabei ca. $0,1 \mu\text{m}/\text{min} - 0,8 \mu\text{m}/\text{min}$. Dies entspricht in etwa den Geschwindigkeiten, die mit dem retrograden Fluss von Aktin assoziiert werden. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Stressfaserentstehung am Zellrand (Streifenrand) stattfand und sich die einwärts transportierten Stressfasern in der Nähe des Zellkerns auflösten. Als Ursachen für den Einwärtstransport der Stressfasern lassen sich sowohl ein Polymerisationsdruck am Zellrand als auch die Kontraktilität des gesamten Aktinnetzwerks diskutieren. Interessanterweise war auf schmalen Streifen sowohl die Transportgeschwindigkeit der Stressfasern

minimal geringer als auch die Streuung der Geschwindigkeitswerte. Somit erscheint es wahrscheinlich, dass der einwärts gerichtete Transport durch die Quervernetzungen innerhalb des Aktinnetzwerks in Zellen auf breiteren Streifen zumindest beschleunigt wird.

Eine für die Formgebung relevante Eigenschaft von Zellen ist ihre Fähigkeit, Kräfte auf die Umgebung übertragen zu können. Dementsprechend wurden Zellzugkraftversuche mit auf Streifen angewachsenen Zellen durchgeführt. Hierbei konnte eine vielschichtige Beeinflussung der Zellzugkräfte durch die laterale Einschränkung festgestellt werden. Zum einen wiesen Zellen auf schmalen Streifen deutlich geringere Gesamtkräfte und Dehnungsenergien auf als auf breiten Streifen. Dies korreliert gut mit der Abhängigkeit der Zellfläche A von der Streifenbreite. Die Fläche ist als wichtiger Parameter bei der Steuerung der Zugkräfte bekannt und die in dieser Arbeit gefundene Abhängigkeit $F_{\text{tot}} \sim A^{0,7}$ geht konform mit bisher gefundenen Zusammenhängen von $F \sim A^{0,5-1}$. Zusätzlich wurde eine Abhängigkeit der Polarisierung der Zellkräfte von der Streifenbreite gefunden. Während für Zellseitenverhältnisse nahe 1 das Verhältnis der Kräfte parallel und senkrecht zur Streifenrichtung nahe 1 war, nahm es für $AR \approx 50$ zu, bis hin zu Werten von $F_x/F_y \approx 5$. Somit führt eine Elongation der Zellen zu einer starken Ungleichverteilung der Zellkräfte, welche zu einer anisotropen Deformation der Umgebung beitragen und so ihrerseits die Anisotropie des umliegenden Gewebes verstärken können. Ein direkter Zusammenhang zwischen der zeitlichen Entwicklung von Zellzugkräften und der Dynamik des Aktinskeletts konnte nicht ermittelt werden, was sich nicht nur durch die transiente Kopplung der Aktinfasern an die Fokalen Adhäsionen, sondern auch durch die langreichweitige Kraftverteilung innerhalb des Aktinskeletts erklären lässt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass laterale Einschränkung einen deutlichen Einfluss auf (i) die Zellmorphologie, (ii) die Zelldynamik und (iii) die Zellfunktion hat. Dies wird sichtbar an (i) der abnehmenden Zellfläche, der zunehmenden Elongation, dem deformierten Nukleus und der starken Ausrichtung der Stressfasern, (ii) dem gerichteten Transport von Aktinstressfasern vom Zell-/Streifenrand ins Innere und (iii) der Polarisierung und Verringerung der Zellkräfte. Diese Erkenntnisse unterstreichen, dass die Untersuchung mehrerer Zellmerkmale nötig ist, um allgemeine Hypothesen zur Anpassung von Zellen an räumliche Einschränkung zu entwickeln. Zudem konnte gezeigt werden, dass die morphologische und funktionelle Anpassung von HUVECs an eine räumliche Umgebung sich gut nachvollziehen lässt, dass aber der Nachweis einer direkten Korrelation zwischen Struktur und Funktion auf Einzelzellebene weiterhin eine Herausforderung darstellt. Im Kontext des aktuellen Forschungsstands ist es in dieser Arbeit gelungen sowohl struktur- als auch funktionsbezogene Parameter zu finden, die sich mit der Anpassung von HUVECs an eine laterale Einschränkung korrelieren lassen. Somit konnte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Aufrechterhaltung von zellübergreifender Ordnung durch räumliche Einschränkung beitragen.

Literatur

- [1] A. Haupt und N. Minc. *How cells sense their own shape – mechanisms to probe cell geometry and their implications in cellular organization and function*. Journal of Cell Science 131 (2018).
- [2] J. V. Shah. *Cells in tight spaces: the role of cell shape in cell function*. The Journal of Cell Biology 191 (2010), 233–236.
- [3] V. Vogel und M. P. Sheetz. *Local force and geometry sensing regulate cell functions*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 7 (2006), 265–275.
- [4] A. C. Olson, N. M. Larson und C. A. Heckman. *Classification of cultured mammalian cells by shape analysis and pattern recognition*. Proceedings of the National Academy of Sciences 77 (1980), 1516–1520.
- [5] B. Alberts u. a. *Molecular Biology of the Cell*. Hrsg. von M. Anderson und S. Grannum. Garland Science, 2008.
- [6] A. Zemel u. a. *Optimal matrix rigidity for stress-fibre polarization in stem cells*. Nature Physics 6 (2010), 468–473.
- [7] J. Solon u. a. *Fibroblast adaptation and stiffness matching to soft elastic substrates*. Biophysical Journal 93 (2007), 4453–4461.
- [8] S. D. Subramony u. a. *The guidance of stem cell differentiation by substrate alignment and mechanical stimulation*. Biomaterials 34 (2013), 1942–1953.
- [9] R. McBeath u. a. *Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment*. Developmental Cell 6 (2004), 483–495.
- [10] C. S. Chen u. a. *Geometric control of cell life and death*. Science 276 (1997), 1425–1428.
- [11] L. E. Dike u. a. *Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal 35 (1999), 441–448.
- [12] T. Watanabe und Y. Takahashi. *Tissue morphogenesis coupled with cell shape changes*. Current Opinion in Genetics and Development 20 (2010), 443–447.
- [13] V. Barone und C.-P. Heisenberg. *Cell adhesion in embryo morphogenesis*. Current Opinion in Cell Biology 24 (2012), 148–153.
- [14] J. D. Amack und M. L. Manning. *Knowing the boundaries: extending the differential adhesion hypothesis in embryonic cell sorting*. Science 338 (2012), 212–215.

- [15] K. M. Stroka, J. A. Vaitkus und H. Aranda-Espinoza. *Endothelial cells undergo morphological, biomechanical, and dynamic changes in response to tumor necrosis factor- α* . European Biophysics Journal 41 (2012), 939–947.
- [16] F. Grinnell und C.-H. Ho. *The effect of growth factor environment on fibroblast morphological response to substrate stiffness*. Biomaterials 34 (2013), 965–974.
- [17] B. Lin u. a. *Synthetic spatially graded Rac activation drives cell polarization and movement*. Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (2012), E3668–E3677.
- [18] A. M. Turing. *The chemical basis of morphogenesis*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. 237 (1952), 37–72.
- [19] M. Théry u. a. *Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment*. Cell Motility and the Cytoskeleton 63 (2006), 341–345.
- [20] B. Geiger, J. P. Spatz und A. Bershadsky. *Environmental sensing through focal adhesions*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 10 (2009), 21–33.
- [21] A. S. Piotrowski-Daspit u. a. *Dynamics of tissue-induced alignment of fibrous extracellular matrix*. Biophysical Journal 113 (2017), 702–713.
- [22] M. Versaevel, T. Grevesse und S. Gabriele. *Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells*. Nature Communications 3 (2012), 671.
- [23] A. Mitra u. a. *Cell geometry dictates TNF α -induced genome response*. Proceedings of the National Academy of Sciences 114 (2017), E3882–E3891.
- [24] A. L. Berrier und K. M. Yamada. *Cell-matrix adhesion*. Journal of Cellular Physiology 213 (2007), 565–573.
- [25] C. S. Chen, J. Tan und J. Tien. *Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts*. Annual Review of Biomedical Engineering 6 (2004), 275–302.
- [26] D. E. Ingber. *Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again*. The FASEB Journal 20 (2006), 811–827.
- [27] M. A. Arnaout, B. Mahalingam und J.-P. Xiong. *Integrin, structure, allostery, and bidirectional signaling*. Annual Review of Cell and Development Biology 21 (2005), 381–410.
- [28] A. Sales, A. W. Holle und R. Kemkemer. *Initial contact guidance during cell spreading is contractility-independent*. Soft Matter 13 (30 2017), 5158–5167.
- [29] N. D. Bade u. a. *Edges impose planar alignment in nematic monolayers by directing cell elongation and enhancing migration*. Soft Matter 14 (2018), 6867–6874.
- [30] E. Ruoslahti. *RGD and other recognition sequences for integrins*. Annual Review of Cell and Development Biology 12 (1996), 697–715.

-
- [31] S. E. Winograd-Katz u. a. *The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 15 (2014), 273.
- [32] C. G. Galbraith, K. M. Yamada und M. P. Sheetz. *The relationship between force and focal complex development*. The Journal of Cell Biology 159 (2002), 695–705.
- [33] C. Margadant u. a. *Mechanisms of integrin activation and trafficking*. Current Opinion in Cell Biology 23 (2011), 607–614.
- [34] L. B. Case u. a. *Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions*. Nature Cell Biology 17 (2015), 880.
- [35] F. Kong u. a. *Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand*. The Journal of Cell Biology 185 (2009), 1275–1284.
- [36] G. Jiang u. a. *Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin*. Nature 424 (2003), 334–337.
- [37] S. Walcott und S. X. Sun. *A mechanical model of actin stress fiber formation and substrate elasticity sensing in adherent cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences 107 (2010), 7757–7762.
- [38] B. D. Hoffman, C. Grashoff und M. A. Schwartz. *Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction*. Nature 475 (2011), 316–323.
- [39] T. Shemesh, A. D. Bershadsky und M. M. Kozlov. *Physical model for self-organization of actin cytoskeleton and adhesion complexes at the cell front*. Biophysical Journal 102 (2012), 1746–1756.
- [40] V. Swaminathan und C. M. Waterman. *The molecular clutch model for mechanotransduction evolves*. Nature Cell Biology 18 (2016), 459.
- [41] V. Swaminathan u. a. *Actin retrograde flow actively aligns and orients ligand-engaged integrins in focal adhesions*. Proceedings of the National Academy of Sciences 114 (2017), 10648–10653.
- [42] Y. Chen u. a. *Orientation-specific responses to sustained uniaxial stretching in focal adhesion growth and turnover*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110 (2013), E2352–E2361.
- [43] A. Ponti u. a. *Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells*. Science 305 (2004), 1782–1786.
- [44] A. Livne und B. Geiger. *The inner workings of stress fibers – from contractile machinery to focal adhesions and back*. Journal of Cell Science 129 (2016), 1293–1304.
- [45] T. W. Anderson, A. N. Vaughan und L. P. Cramer. *Retrograde flow and myosin II activity within the leading cell edge deliver F-actin to the lamella to seed the formation of graded polarity actomyosin II filament bundles in migrating fibroblasts*. Molecular Biology of the Cell 19 (2008), 5006–5018.

- [46] N. A. Medeiros, D. T. Burnette und P. Forscher. *Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones*. *Nature Cell Biology* 8 (2006), 216–226.
- [47] V. Vogel und M. P. Sheetz. *Cell fate regulation by coupling mechanical cycles to biochemical signaling pathways*. *Current Opinion in Cell Biology* 21 (2009), 38–46.
- [48] D. M. Pirone u. a. *An inhibitory role for FAK in regulating proliferation: a link between limited adhesion and RhoA-ROCK signaling*. *Journal of Cell Biology* 174 (2008), 277–288.
- [49] B. Hinz. *Formation and function of the myofibroblast during tissue repair*. *Journal of Investigative Dermatology* 127 (2007), 526–537.
- [50] J. J. Tomasek u. a. *Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (2002), 349.
- [51] D. A. Fletcher und R. D. Mullins. *Cell mechanics and the cytoskeleton*. *Nature* 463 (2010), 485–492.
- [52] S. Huang, C. S. Chen und D. E. Ingber. *Control of cyclin D1, p27kip1, and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension*. *Molecular Biology of the Cell* 9 (1998), 3179–3193.
- [53] P. P. Provenzano und P. J. Keely. *Mechanical signaling through the cytoskeleton regulates cell proliferation by coordinated focal adhesion and Rho GTPase signaling*. *Journal of Cell Science* 124 (2011), 1195–1205.
- [54] S.-T. Sit und E. Manser. *Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton*. *Journal of Cell Science* 124 (2011), 679–683.
- [55] A. D. Bershadsky, N. Q. Balaban und B. Geiger. *Adhesion-dependent cell mechanosensitivity*. *Annual Review of Cell and Development Biology* 19 (2003), 677–695.
- [56] M. Dogterom und G. H. Koenderink. *Actin-microtubule crosstalk in cell biology*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (2019), 38–54.
- [57] O. Esue u. a. *A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin*. *Journal of Biological Chemistry* 281 (2006), 30393–30399.
- [58] J. Lammerding. *Mechanics of the nucleus*. *Comprehensive Physiology* (2011), 783–807.
- [59] H.-R. Thiam u. a. *Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments*. *Nature Communications* 7 (2016), 10997.

- [60] C. Denais und J. Lammerding. "Nuclear Mechanics in Cancer". *Cancer Biology and the Nuclear Envelope: Recent Advances May Elucidate Past Paradoxes*. Hrsg. von E. C. Schirmer und J. I. de las Heras. New York, NY: Springer New York, 2014, 435–470.
- [61] J. P. Winer, S. Oake und P. A. Janmey. *Non-linear elasticity of extracellular matrices enables contractile cells to communicate local position and orientation*. PLoS ONE 4 (2009), e6382.
- [62] X. Li u. a. *On the mechanism of long-range orientational order of fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences 114 (2017), 8974–8979.
- [63] E. D. Korn. *Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells*. Physiological Reviews 62 (1982), 672–737.
- [64] T. D. Pollard, L. Blanchoin und R. D. Mullins. *Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 29 (2000), 545–576.
- [65] K. J. Amann und T. D. Pollard. *Cellular regulation of actin network assembly*. Current Biology 10 (2000), R728–R730.
- [66] R. K. Meyer und U. Aebi. *Bundling of actin filaments by α -actinin depends on its molecular length*. The Journal of Cell Biology 110 (1990), 2013–2024.
- [67] L. P. Cramer, M. Siebert und T. J. Mitchison. *Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force*. The Journal of Cell Biology 136 (1997), 1287–1305.
- [68] C. Erlenkämper und K. Kruse. *Treadmilling and length distributions of active polar filaments*. The Journal of Chemical Physics 139 (2013), 164907.
- [69] K. Guo, J. Shillcock und R. Lipowsky. *Treadmilling of actin filaments via brownian dynamics simulations*. The Journal of Chemical Physics 133 (2010), 155105.
- [70] P. Hotulainen und P. Lappalainen. *Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells*. The Journal of Cell Biology 173 (2006), 383–394.
- [71] Z. M. Goeckeler, P. C. Bridgman und R. B. Wysolmerski. *Nonmuscle myosin II is responsible for maintaining endothelial cell basal tone and stress fiber integrity*. American Journal of Physiology: Cell Physiology 295 (2008), C994–C1006.
- [72] M. Ghosh u. a. *Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility*. Science 304 (2004), 743–747.
- [73] S. Tojkander u. a. *Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly*. eLife 4 (2015), e06126.
- [74] P. Chugh und E. K. Paluch. *The actin cortex at a glance*. Journal of Cell Science 131 (2018).

- [75] R. Vargas-Pinto u. a. *The effect of the endothelial cell cortex on atomic force microscopy measurements*. Biophysical Journal 105 (2013), 300–309.
- [76] J.-Y. Tinevez u. a. *Role of cortical tension in bleb growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (2009), 18581–18586.
- [77] J. Étienne und A. Duperray. *Initial dynamics of cell spreading are governed by dissipation in the actin cortex*. Biophysical Journal 101 (2011), 611–621.
- [78] V. Delorme u. a. *Cofilin activity downstream of PAK1 regulates cell protrusion efficiency by organizing lamellipodium and lamella actin networks*. Developmental Cell 13 (2007), 646–662.
- [79] J. Zimmerman u. a. *Actin filament elasticity and retrograde flow shape the force-velocity relation of motile cells*. Biophysical Journal 102 (2012), 287–295.
- [80] E. L. Batchelder u. a. *Membrane tension regulates motility by controlling lamellipodium organization*. Proceedings of the National Academy of Sciences 108 (2011), 11429–11434.
- [81] T. Shemesh u. a. *Role of focal adhesions and mechanical stresses in the formation and progression of the lamellum interface*. Biophysical Journal 97 (2009), 1254–1264.
- [82] J. T. Parsons, A. R. Horwitz und M. A. Schwartz. *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 11 (2010), 633–643.
- [83] P. K. Mattila und P. Lappalainen. *Filopodia: molecular architecture and cellular functions*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 9 (2008), 446–454.
- [84] A. Schirenbeck u. a. *The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (2006), 7694–7699.
- [85] S. Tojkander, G. Gateva und P. Lappalainen. *Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles*. Journal of Cell Science 125 (2012), 1–10.
- [86] L. B. Case und C. M. Waterman. *Integration of actin dynamics and cell adhesion by a three-dimensional, mechanosensitive molecular clutch*. Nature Cell Biology 17 (2015), 955.
- [87] M. Maninová und T. Vomastek. *Dorsal stress fibers, transverse actin arcs, and perinuclear actin fibers form an interconnected network that induces nuclear movement in polarizing fibroblasts*. The FEBS Journal 283 (2016), 3676–3693.
- [88] S. Lee und S. Kumar. *Actomyosin stress fiber mechanosensing in 2D and 3D*. F1000Research 5 (2016), 2261.

- [89] K. A. Taylor, D. W. Taylor und F. Schachat. *Isoforms of α -actinin from cardiac, smooth, and skeletal muscle form polar arrays of actin filaments*. The Journal of Cell Biology 149 (2000), 635–645.
- [90] N. Endlich u. a. *Movement of stress fibers away from focal adhesions identifies focal adhesions as sites of stress fiber assembly in stationary cells*. Cell Motility and the Cytoskeleton 64 (2007), 966–976.
- [91] H. Lodish u. a. *Molecular Cell Biology*. 4. Aufl. W. H. Freeman, 2000.
- [92] J. A. Rall. *What makes skeletal muscle striated? Discoveries in the endosarcomeric and exosarcomeric cytoskeleton*. Advances in Physiology Education 42 (2018), 672–684.
- [93] M. Vicente-Manzanares u. a. *Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 10 (2009), 778–790.
- [94] K. Burridge und C. Guilly. *Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension*. Experimental Cell Research 343 (2016), 14–20.
- [95] J. R. Chapman und J. Waldenström. *With reference to reference genes: a systematic review of endogenous controls in gene expression studies*. PLOS ONE 10 (2015), 1–18.
- [96] M.-F. Carlier und S. Shekhar. *Global treadmilling coordinates actin turnover and controls the size of actin networks*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 18 (2017), 389–401.
- [97] C. Suarez und D. R. Kovar. *Intenetwork competition for monomers governs actin cytoskeleton organization*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 17 (2016), 799–810.
- [98] M. Melak, M. Plessner und R. Grosse. *Actin visualization at a glance*. Journal of Cell Science 130 (2017), 525–530.
- [99] E. G. Stringham u. a. “Chapter Eleven - Live Cell Imaging of the Cytoskeleton”. *Imaging and Spectroscopic Analysis of Living Cells*. Hrsg. von P. Conn. Bd. 505. Methods in Enzymology. Academic Press, 2012, 203–217.
- [100] C. U. Nworu, P. A. Krieg und C. C. Gregorio. *Preparation of developing Xenopus muscle for sarcomeric protein localization by high-resolution imaging*. Methods 66 (2014), 370–379.
- [101] J. A. Cooper. *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. The Journal of cell biology 105 (1987), 1473–1478.
- [102] M. F. Krendel und E. M. Bonder. *Analysis of actin filament bundle dynamics during contact formation in live epithelial cells*. Cell Motility 43 (1999), 296–309.

- [103] B. J. Belin, L. M. Goins und R. D. Mullins. *Comparative analysis of tools for live cell imaging of actin network architecture*. BioArchitecture 4 (2014), 189–202.
- [104] T. M. Doggett und J. W. Breslin. *Study of the actin cytoskeleton in live endothelial cells expressing GFP-actin*. Journal of Visualized Experiments 57 (2011), e3187.
- [105] K. Sliogeryte u. a. *Differential effects of LifeAct-GFP and actin-GFP on cell mechanics assessed using micropipette aspiration*. Journal of Biomechanics 49 (2016), 310–317.
- [106] J. Riedl u. a. *LifeAct: a versatile marker to visualize F-actin*. Nature Methods 5 (2008), 605–607.
- [107] L. R. Flores u. a. *LifeAct-tagGFP2 alters F-actin organization, cellular morphology and biophysical behaviour*. Scientific Reports 9 (2019), 3241.
- [108] N. Courtemanche, T. D. Pollard und Q. Chen. *Avoiding artefacts when counting polymerized actin in live cells with LifeAct fused to fluorescent proteins*. Nature Cell Biology 18 (2016), 676–683.
- [109] L.-G. Milroy u. a. *Selective chemical imaging of static actin in live cells*. Journal of the American Chemical Society 134 (2012), 8480–8486.
- [110] G. Lukinavicius u. a. *Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton*. Nature Methods 11 (2014), 731–733.
- [111] K. Katoh u. a. *Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts*. American Journal of Physiology: Cell Physiology 280 (2001), C1669–C1679.
- [112] C. Labouesse u. a. *Cell shape dynamics reveal balance of elasticity and contractility in peripheral arcs*. Biophysical Journal 108 (2015), 2437–2447.
- [113] B. Fabry u. a. *Focal adhesion kinase stabilizes the cytoskeleton*. Biophysical Journal 101 (2011), 2131–2138.
- [114] X.-D. Ren, W. B. Kiosses und M. A. Schwartz. *Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton*. The EMBO Journal 18 (1999), 578–585.
- [115] K. Sawada u. a. *Lysophosphatidic acid induces focal adhesion assembly through Rho/Rho-associated kinase pathway in human ovarian cancer cells*. Gynecologic Oncology 87 (2002), 252–259.
- [116] K. Burridge und E. S. Wittchen. *The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers*. The Journal of Cell Biology 200 (2013), 9–19.
- [117] S. Kümper u. a. *Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis*. eLife 5 (2016), e12203.

- [118] A. Kawska u. a. *How actin network dynamics control the onset of actin-based motility*. Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (2012), 14440–14445.
- [119] J. Pernier u. a. *Profilin interaction with actin filament barbed end controls dynamic instability, capping, branching, and motility*. Developmental Cell 36 (2016), 201–214.
- [120] M. R. Bubb u. a. *Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin*. Journal of Biological Chemistry 269 (1994), 14869–14871.
- [121] E. G. Yarmola u. a. *Actin-Iatruunculin A structure and function: differential modulation of actin-binding protein function by Iatruunculin A*. Journal of Biological Chemistry 275 (2000), 28120–28127.
- [122] M. J. Tyska u. a. *Myosin-1A is critical for normal brush border structure and composition*. Molecular Biology of the Cell 16 (2005), 2443–2457.
- [123] M.-A. Bray, S. P. Sheehy und K. K. Parker. *Sarcomere alignment is regulated by myocyte shape*. Cell Motility 65 (2008), 641–651.
- [124] P.-L. Kuo u. a. *Myocyte shape regulates lateral registry of sarcomeres and contractility*. The American Journal of Pathology 181 (2012), 2030–2037.
- [125] P. W. Alford u. a. *vascular smooth muscle contractility depends on cell shape*. Integrative Biology 3 (2011), 1063–1070.
- [126] T. Lecuit und P.-F. Lenne. *Cell surface mechanics and the control of cell shape, tissue patterns and morphogenesis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 8 (2007), 633–644.
- [127] G. Schoenwolf und J. Smith. *Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances*. Development 109 (1990), 243–270.
- [128] C. M. Nelson u. a. *Change in cell shape is required for matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition of mammary epithelial cells*. Journal of Cellular Biochemistry 105 (2008), 25–33.
- [129] R. Kalluri und R. A. Weinberg. *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. The Journal of Clinical Investigation 119 (2009), 1420–1428.
- [130] S. E. Leggett u. a. *Morphological single cell profiling of the epithelial–mesenchymal transition*. Integrative Biology 8 (2016), 1133–1144.
- [131] J.-A. Park u. a. *Unjamming and cell shape in the asthmatic airway epithelium*. Nature Materials 14 (2015), 1040–1048.
- [132] J. Sulston und H. Horvitz. *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Developmental Biology 56 (1977), 110–156.

- [133] Z. Bao u. a. *Automated cell lineage tracing in Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (2006), 2707–2712.
- [134] A. McKenna u. a. *Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing*. Science 353 (2016).
- [135] S. Frisch und H. Francis. *disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. The Journal of Cell Biology 124 (1994), 619–626.
- [136] P. Roca-Cusachs u. a. *Micro patterning of single endothelial cell shape reveals a tight coupling between nuclear volume in G1 and proliferation*. Biophysical Journal 94 (2008), 4984–4995.
- [137] L. Gao, R. McBeath und C. S. Chen. *Stem cell shape regulates a chondrogenic versus myogenic fate through Rac1 and N-cadherin*. Stem Cells 28 (2010), 564–572.
- [138] D. R. Stamov und T. Pompe. *Structure and function of ECM-inspired composite collagen type I scaffolds*. Soft Matter 8 (2012), 10200–10212.
- [139] M. N. Nakatsu u. a. *Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: the role of fibroblasts and angiopoietin-1*. Microvascular Research 66 (2003), 102–112.
- [140] C. Frantz, K. M. Stewart und V. M. Weaver. *The extracellular matrix at a glance*. Journal of Cell Science 123 (2010), 4195–4200.
- [141] K. Shroff u. a. *Fibronectin-mimetic peptide-amphiphile nanofiber gels support increased cell adhesion and promote ECM production*. Soft Matter 6 (2010), 5064–5072.
- [142] M. P. Lutolf u. a. *Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100 (2003), 5413–5418.
- [143] S. Weng und J. Fu. *Synergistic regulation of cell function by matrix rigidity and adhesive pattern*. Biomaterials 32 (2011), 9584–9593.
- [144] X. Tang, M. Y. Ali und M. T. A. Saif. *A novel technique for micro-patterning proteins and cells on polyacrylamide gels*. Soft Matter 8 (2012), 7197–7206.
- [145] E. Cukierman u. a. *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. Science 294 (2001), 1708–1712.
- [146] K. M. Yamada, R. Pankov und E. Cukierman. *Dimensions and dynamics in integrin function*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 36 (2003), 959–966.
- [147] J. S. Harunaga und K. M. Yamada. *Cell-matrix adhesions in 3D*. Matrix Biology 30 (2011), 363–368.

-
- [148] E. M. Balzer u. a. *Physical confinement alters tumor cell adhesion and migration phenotypes*. The FASEB Journal 26 (2012), 4045–4056.
- [149] Y.-J. Liu u. a. *Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells*. Cell 160 (2015), 659–672.
- [150] A. D. Doyle u. a. *One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration*. Journal of Cell Biology 184 (2009), 481–490.
- [151] S. L. Schuster u. a. *Contractility as a global regulator of cellular morphology, velocity, and directionality in low-adhesive fibrillary micro-environments*. Biomaterials 102 (2016), 137–147.
- [152] A. Zemel u. a. *Cell shape, spreading symmetry, and the polarization of stress-fibers in cells*. Journal of Physics: Condensed Matter 22 (2010), 194110.
- [153] E. Kassianidou u. a. *Geometry and network connectivity govern the mechanics of stress fibers*. Proceedings of the National Academy of Sciences 114 (2017), 2622–2627.
- [154] B. Eltzner u. a. *The filament sensor for near real-time detection of cytoskeletal fiber structures*. PLOS ONE 10 (2015), 1–28.
- [155] S. R. K. Vedula u. a. *Emerging modes of collective cell migration induced by geometrical constraints*. Proceedings of the National Academy of Sciences 109 (2012), 12974–12979.
- [156] S. H. Shabbir u. a. *Geometric control of vimentin intermediate filaments*. Biomaterials 35 (2014), 1359–1366.
- [157] S. S. Chang u. a. *Guidance of cell migration by substrate dimension*. Biophysical Journal 104 (2013), 313–321.
- [158] J. J. Tomasek, E. D. Hay und K. Fujiwara. *Collagen modulates cell shape and cytoskeleton of embryonic corneal and fibroma fibroblasts: distribution of actin, α -actinin, and myosin*. Developmental Biology 92 (1982), 107–122.
- [159] M. Ochsner u. a. *Dimensionality controls cytoskeleton assembly and metabolism of fibroblast cells in response to rigidity and shape*. PLoS ONE 5 (2010), 1–12.
- [160] M. Versaevel u. a. *Cell confinement: putting the squeeze on the nucleus*. Soft Matter 9 (2013), 6665–6676.
- [161] P. M. Davidson u. a. *Nuclear deformability constitutes a rate-limiting step during cell migration in 3-D environments*. Cellular and Molecular Bioengineering 7 (2014), 293–306.
- [162] M. Krause u. a. *Cell migration through three-dimensional confining pores: speed accelerations by deformation and recoil of the nucleus*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences 374 (2019), 20180225.

- [163] G. J. C. Ye u. a. *The contractile strength of vascular smooth muscle myocytes is shape dependent*. Integrative Biology 6 (2 2014), 152–163.
- [164] Q. Li u. a. *The regulation of dynamic mechanical coupling between actin cytoskeleton and nucleus by matrix geometry*. Biomaterials 35 (2014), 961–969.
- [165] S. Huelsman und N. H. Brown. *Nuclear positioning by actin cables and perinuclear actin*. Nucleus 5 (2014), 219–223.
- [166] T. L. Downing u. a. *Biophysical regulation of epigenetic state and cell reprogramming*. Nature Materials 12 (2013), 1154–1162.
- [167] R. G. Thakar u. a. *Cell-shape regulation of smooth muscle cell proliferation*. Biophysical Journal 96 (2009), 3423–3432.
- [168] M. Théry u. a. *Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103 (2006), 19771.
- [169] M. T. Kelliher, H. A. Saunders und J. Wildonger. *Microtubule control of functional architecture in neurons*. Current Opinion in Neurobiology 57 (2019), 39–45.
- [170] M. Arnold u. a. *Cell interactions with hierarchically structured nano-patterned adhesive surfaces*. Soft Matter 5 (2009), 72–77.
- [171] J. A. Deeg u. a. *Impact of local versus global ligand density on cellular adhesion*. Nano Letters 11 (2011), 1469–1476.
- [172] S. R. Coyer u. a. *Nanopatterning reveals an ecm area threshold for focal adhesion assembly and force transmission that is regulated by integrin activation and cytoskeleton tension*. Journal of Cell Science 125 (2012), 5110–5123.
- [173] P. J. Albert und U. S. Schwarz. *Dynamics of cell shape and forces on micropatterned substrates predicted by a cellular Potts model*. Biophysical Journal 106 (2014), 2340–2352.
- [174] C. A. Reinhart-King, M. Dembo und D. A. Hammer. *The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading*. Biophysical Journal 89 (2005), 676–689.
- [175] Y. Brill-Karniely u. a. *Dynamics of cell area and force during spreading*. Biophysical Journal 107 (2014), L37–L40.
- [176] A. D. Rape, W.-h. Guo und Y.-L. Wang. *The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions*. Biomaterials 32 (2011), 2043–2051.
- [177] J. Stricker u. a. *Spatiotemporal constraints on the force-dependent growth of focal adhesions*. Biophysical Journal 100 (2011), 2883–2893.
- [178] A. F. Mertz u. a. *Scaling of traction forces with the size of cohesive cell colonies*. Physical Review Letters 108 (19 2012), 198101.

- [179] M. L. McCain u. a. *Matrix elasticity regulates the optimal cardiac myocyte shape for contractility*. American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology 306 (2014), H1525–H1539.
- [180] U. S. Schwarz u. a. *Measurement of cellular forces at focal adhesions using elastic micro-patterned substrates*. Materials Science and Engineering C 23 (2003), 387–394.
- [181] P. W. Oakes u. a. *Geometry regulates traction stresses in adherent cells*. Biophysical Journal 107 (2014), 825–833.
- [182] W. R. Legant u. a. *Multidimensional traction force microscopy reveals out-of-plane rotational moments about focal adhesions*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110 (2013), 881–886.
- [183] J. Fouchard u. a. *Three-dimensional cell body shape dictates the onset of traction force generation and growth of focal adhesions*. Proceedings of the National Academy of Sciences 111 (2014), 13075–13080.
- [184] N. Q. Balaban u. a. *Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates*. Nature Cell Biology 3 (2001), 466–472.
- [185] Y. Aratyn-Schaus, P. W. Oakes und M. L. Gardel. *Dynamic and structural signatures of lamellar actomyosin force generation*. Molecular Biology of the Cell 22 (2011), 1330–1339.
- [186] M. L. Gardel u. a. *Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed*. The Journal of Cell Biology 183 (2008), 999–1005.
- [187] N. Nissenholz u. a. *Active mechanics and dynamics of cell spreading on elastic substrates*. Soft Matter 10 (37 2014), 7234–7246.
- [188] E. Sackmann und R. F. Bruinsma. *Cell adhesion as wetting transition?* Chem-PhysChem 3 (2002), 262–269.
- [189] J.-L. Maitre u. a. *Adhesion functions in cell sorting by mechanically coupling the cortices of adhering cells*. Science 338 (2012), 253–256.
- [190] A. Müller u. a. *Cytoskeletal transition in patterned cells correlates with interfacial energy model*. Soft Matter 10 (2014), 2444–2452.
- [191] S. Douezan und F. Brochard-Wyart. *Dewetting of cellular monolayers*. The European Physical Journal E 35 (5 2012), 1–6.
- [192] J. F. Joanny u. a. *The actin cortex as an active wetting layer*. The European Physical Journal E 36 (2013), 52.
- [193] F. Jülicher u. a. *Active behavior of the cytoskeleton*. Physics Reports 449 (2007), 3–28.

- [194] M. Murrell u. a. *Spreading dynamics of biomimetic actin cortices*. Biophysical Journal 100 (2011), 1400–1409.
- [195] Y. Shokef und S. A. Safran. *Scaling laws for the response of nonlinear elastic media with implications for cell mechanics*. Physical Review Letters 108 (17 2012), 178103.
- [196] R. Paul u. a. *Propagation of mechanical stress through the actin cytoskeleton toward focal adhesions: model and experiment*. Biophysical Journal 94 (2008), 1470–1482.
- [197] J. R. D. Soiné u. a. *Model-based traction force microscopy reveals differential tension in cellular actin bundles*. PLOS Computational Biology 11 (2015), 1–16.
- [198] P. Guthardt Torres, I. B. Bischofs und U. S. Schwarz. *Contractile network models for adherent cells*. Physical Review E 85 (1 2012), 011913.
- [199] I. B. Bischofs u. a. *Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape*. Biophysical Journal 95 (2008), 3488–3496.
- [200] Z.-L. Zhao u. a. *A dynamic biochemomechanical model of geometry-confined cell spreading*. Biophysical Journal 112 (2017), 2377–2386.
- [201] B. M. Friedrich und S. A. Safran. *How cells feel their substrate: spontaneous symmetry breaking of active surface stresses*. Soft Matter 8 (2012), 3223–3230.
- [202] O. Nagel u. a. *Geometry-driven polarity in motile amoeboid cells*. PLOS ONE 9 (2014), e113382.
- [203] D. Thalmeier, J. Halatek und E. Frey. *Geometry-induced protein pattern formation*. Proceedings of the National Academy of Sciences 113 (2016), 548–553.
- [204] A. Vigliotti u. a. *A thermodynamically motivated model for stress-fiber reorganization*. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology 15 (2015), 761–789.
- [205] A. Vigliotti, R. M. McMeeking und V. S. Deshpande. *Simulation of the cytoskeletal response of cells on grooved or patterned substrates*. Journal of The Royal Society Interface 12 (2015), 20141320.
- [206] E. Monteiro u. a. *Analyzing the interplay between single cell rheology and force generation through large deformation finite element models*. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology 10 (2011), 813–830.
- [207] C. A. Lemmon und L. H. Romer. *A predictive model of cell traction forces based on cell geometry*. Biophysical Journal 99 (2010), L78–L80.
- [208] I. B. Bischofs, S. S. Schmidt und U. S. Schwarz. *Effect of adhesion geometry and rigidity on cellular force distributions*. Physical Review Letters 103 (4 2009), 048101.

- [209] U. S. Schwarz und S. A. Safran. *Elastic interactions of cells*. Phys. Rev. Lett. 88 (4 2002), 048102.
- [210] E. G. Rens und R. M. Merks. *Cell contractility facilitates alignment of cells and tissues to static uniaxial stretch*. Biophysical Journal 112 (2017), 755–766.
- [211] C. Müller und T. Pompe. *Distinct impacts of substrate elasticity and ligand affinity on traction force evolution*. Soft Matter 12 (2016), 272–280.
- [212] J. Schindelin u. a. *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nature Methods 9 (2012), 676.
- [213] Python. *Version 2.7.12*. Python Software Foundation. URL: www.python.org.
- [214] A. Müller u. a. *Actin stress fiber dynamics in laterally confined cells*. Integrative Biology 11 (2019), 175–185.
- [215] J. P. Butler u. a. *Traction fields, moments and strain energy that cells exert on their surroundings*. American Journal of Physiology: Cell Physiology 282 (2002), C595–C605.
- [216] I. M. Tolic-Norrelykke u. a. *Spatial and temporal traction response in human airway smooth muscle cells*. American Journal of Physiology: Cell Physiology 283 (2002), C1254–C1266.
- [217] MATLAB. *Version 9.1.0 (2016b)*. Natick, Massachusetts, USA: The Mathworks Inc. URL: <http://de.mathworks.com>.
- [218] S. Müller. “Zelladhäsion unter lateraler Beschränkung”. Magisterarb. Universität Leipzig, 2015.
- [219] E. A. Jaffe u. a. *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. identification by morphologic and immunologic criteria*. The Journal of Clinical Investigation 52 (1973), 2745–2756.
- [220] J. D. Baranski u. a. *Geometric control of vascular networks to enhance engineered tissue integration and function*. Proceedings of the National Academy of Sciences 110 (2013), 7586–7591.
- [221] M. Michaelis u. a. *Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo*. Molecular Pharmacology 65 (2004), 520–527.
- [222] P. M. Kopp u. a. *Studies on the morphology and spreading of human endothelial cells define key inter- and intramolecular interactions for talin1*. European Journal of Cell Biology 89 (2010), 661–673.
- [223] T. Pompe u. a. *Friction-controlled traction force in cell adhesion*. Biophysical Journal 101 (2011), 1863–1870.
- [224] Y.-H. M. Chan und W. F. Marshall. *Scaling properties of cell and organelle size*. eng. Organogenesis 6 (2010), 88–96.

- [225] J. J. Martín de Llano u. a. *Birth weight and characteristics of endothelial and smooth muscle cell cultures from human umbilical cord vessels*. *Journal of Translational Medicine* 7 (2009), 30.
- [226] H. Liao u. a. *Effects of long-term serial cell passaging on cell spreading, migration, and cell-surface ultrastructures of cultured vascular endothelial cells*. *Cytotechnology* 66 (2014), 229–238.
- [227] R. Adamson. *Microvascular endothelial cell shape and size in situ*. *Microvascular Research* 46 (1993), 77–88.
- [228] R. R. Bruns und G. E. Palade. *Studies on blood capillaries*. *The Journal of Cell Biology* 37 (1968), 244–276.
- [229] E. M. Levina u. a. *Cytoskeletal control of fibroblast length: experiments with linear strips of substrate*. *Journal of Cell Science* 114 (2001), 4335–4341.
- [230] R. Vishavkarma u. a. *Role of actin filaments in correlating nuclear shape and cell spreading*. *PLOS ONE* 9 (2014), e107895.
- [231] I. Dupin und S. Etienne-Manneville. *Nuclear positioning: mechanisms and functions*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43 (2011), 1698–170.
- [232] J. Alvarado, B. M. Mulder und G. H. Koenderink. *Alignment of nematic and bundle semiflexible polymers in cell-sized confinement*. *Soft Matter* 10 (2014), 2354–2364.
- [233] K. M. Schmoller u. a. *Fragmentation is crucial for the steady-state dynamics of actin filaments*. *Biophysical Journal* 101 (2011), 803–808.
- [234] S. Deshpande und T. Pfohl. *Real-time dynamics of emerging actin networks in cell-mimicking compartments*. *PLOS One* (2015), 0116521.
- [235] M. Versaevel u. a. *Probing cytoskeletal pre-stress and nuclear mechanics in endothelial cells with spatiotemporally controlled (de-)adhesion kinetics on micropatterned substrates*. *Cell Adhesion & Migration* 11 (2017), 98–109.
- [236] K. A. Giuliano und D. L. Taylor. *Formation, transport, contraction, and disassembly of stress fibers in fibroblasts*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* (1990), 14–21.
- [237] P. W. Oakes u. a. *Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template*. *The Journal of Cell Biology* 196 (2012), 363–374.
- [238] A. B. Verkhovskiy, T. M. Svitkina und G. G. Borisy. *Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles*. *Journal of Cell Biology* 131 (1995), 989–1002.
- [239] T. Pompe u. a. *Dissecting the impact of matrix anchorage and elasticity in cell adhesion*. *Biophysical Journal* 97 (2009), 2154–2163.

-
- [240] A.-C. Reymann u. a. *Actin network architecture can determine myosin motor activity*. Science 336 (2012), 1310–1314.
- [241] S. Hu u. a. *Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytoskeleton of living cells*. American Journal of Physiology: Cell Physiology 285 (2003), C1082–C1090.
- [242] M. J. Rosenbluth u. a. *Slow stress propagation in adherent cells*. Biophysical Journal 95 (2008), 6052–6059.
- [243] A. M. Alencar u. a. *Non-equilibrium cytoquake dynamics in cytoskeletal remodeling and stabilization*. Soft Matter 12 (41 2016), 8506–8511.
- [244] P. Bursac u. a. *Cytoskeletal remodelling and slow dynamics in the living cell*. Nature Materials 4 (2005), 557–561.
- [245] E. T. Valent u. a. *Traction force dynamics predict gap formation in activated endothelium*. Experimental Cell Research 347 (2016), 161–170.
- [246] C. Chen u. a. *Fluidization and resolidification of the human bladder smooth muscle cell in response to transient stretch*. PLoS ONE 5 (2010), e12035.

Tabellenverzeichnis

3.1	Ansätze für die Hydrogelherstellung	38
3.2	Eingabeparameter für die MATLAB-Zellzugkraftauswertungsroutine	55

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schema einer adhärennten Zelle	6
2.2	Schematischer Aufbau einer Fokalen Adhäsion	8
2.3	Entstehung von Aktinfilamenten und Stressfasern	12
2.4	Schema verschiedener Aktinstrukturen	13
2.5	Beispiele für verschiedene Formen spezialisierter Zellen	19
2.6	Einfluss der Zellfläche auf die Zellfunktion	22
2.7	Beeinflussung der Zellstruktur durch die Zellform	23
3.1	Schema Substratpräparation	36
3.2	Charakterisierung der Zellmorphologie in Fiji	46
3.3	Charakterisierung der Aktinskelettmorphologie in Fiji und Python	48
3.4	Charakterisierung der Aktinskelettdynamik I	50
3.5	Charakterisierung der Aktinskelettdynamik II	51
3.7	Prinzip der Zellzugkraftmessung	53
4.1	Übersicht über die durchgeführten Versuche	58
4.2	Beispielzellen auf Streifen	59
4.3	Schema der Morphologieanalyse	61
4.4	Zelllänge in Abhängigkeit der Streifenbreite	63
4.5	Elongation in Abhängigkeit der Streifenbreite	64
4.6	Zellfläche in Abhängigkeit der Streifenbreite	65
4.7	Exemplarische Zellkerne	66
4.8	Kerngröße und -ausrichtung	66
4.9	Kerndeformation in Abhängigkeit der Einschränkung	67
4.10	Kernausdehnung in Abhängigkeit der Einschränkung	68
4.11	Aktinskelette eingeschränkter Zellen	72
4.12	Gesamtlänge der Aktinfasern pro Zelle	73
4.13	Verteilung der Segmentlängen	74
4.14	Ausrichtung der Stressfasern in Abhängigkeit der Zellform	76
4.15	Antikörperfärbung Fokaler Adhäsionen	77
4.16	Kontrollfärbung SiR-Actin, qualitativ	80
4.17	Kontrollfärbung SiR-Actin, quantitativ	81
4.18	Zugkraftvergleichsmessungen	82
4.19	Zellproliferation mit SiR-Actin	83
4.20	Zeitserie Aktinskelett	85
4.21	Stabilität der Stressfaserausrichtung	86
4.22	Kymographanalyse	87

Abbildungsverzeichnis

4.23	Geschwindigkeit von Stressfasern	88
4.24	Intrazellulärer F-Aktin-Fluss	89
4.25	Schema zur Zellzugkraftmessung	91
4.26	Gesamtkraft	92
4.27	Dehnungsenergie	93
4.28	Polarisierung der Zellkräfte	94
4.29	Zeitserie Aktin und Zugkraft	98
4.30	Zeitverläufe relevanter Größen	99
A.1	Zellfläche vs. projizierte Zellkernfläche	129
A.2	Kerndimensionen vs. Streifenbreite	129
A.3	Mittlere Stressfaserausrichtung	130
A.4	Färbung Fokaler Adhäsionen	131
A.5	Myosinfärbung	132
A.7	U vs F	133

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
Arp2/3	Komplex aus Aktin-ähnlichen Proteinen (<i>actin-related protein</i>)
ASF	Aktinstressfaser
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Reinstwasser
EZM	Extrazelluläre Matrix
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN	Fibronektin
G-Aktin	Globuläres Aktin (Aktin-Monomere)
GTP	Guanosintriphosphat
HUVEC	Humane Endothelzelle aus der Nabelschnurvene (<i>human umbilical vein endothelial cell</i>)
p. a.	reinst (<i>pro analysis</i>)
PAAm	Polyacrylamid, $(-\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}-)_n$
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDMS	Polydimethylsiloxan, $(-\text{C}_2\text{H}_6\text{OSi}-)_n$
PEMA	Poly(ethen- <i>alt</i> -maleinsäureanhydrid), $(-\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3-)_n$
PFA	Paraformaldehyd
rpm	Umdrehungen pro Minute, U min^{-1} (<i>revolutions per minute</i>)
ROCK	Rho-Kinase (<i>rho-associated coiled-coil containing protein kinase</i>)
SiR-Actin	Jasplakinolid-Derivat mit Silicon-Rhodamin-Farbstoff-Markierung
TAMRA	5-(6)-Carboxytetramethylrhodamin-NHS-Ester
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

A Anhang

A.1 Weitere Abbildungen

A.1.1 Zellkernmorphologie

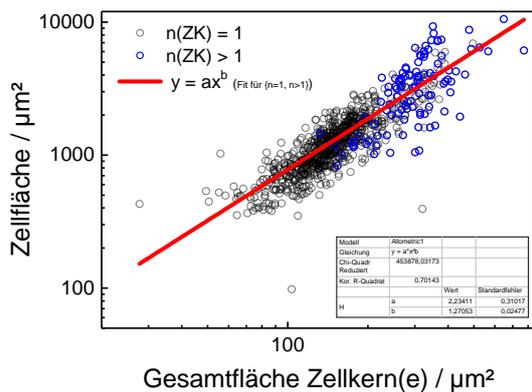


Abbildung A.1: Zellfläche vs. projizierte Zellkernfläche. Multinukleäre Zellen (blaue Kreise) haben in der Regel eine größere Zellfläche als uninukleäre Zellen (schwarze Kreise). Der Zusammenhang zwischen Zellfläche und projizierter Zellkernfläche scheint unabhängig von der Zahl der Zellkerne zu sein (rote Kurve).

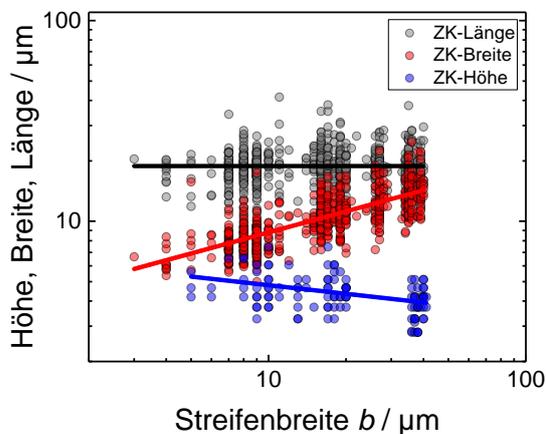


Abbildung A.2: Kerndimensionen vs. Streifenbreite. Bei einigen Zellen wurde die Höhe des Zellkerns (blau) am Konfokalmikroskop gemessen. Die Kernlänge ist mit einer konstanten Funktion angenähert ($L_{\text{ZK}} = 19,3 \mu\text{m}$, schwarz); die Kernbreite mit einem Power-Law ($b_{\text{ZK}} = 3,9 \mu\text{m} \times (b/\mu\text{m})^{0,35}$, rot); die Höhe mit einem Power-Law ($b_{\text{ZK}} = 6,7 \mu\text{m} \times (b/\mu\text{m})^{-0,14}$, blau).

A.1.2 Aktinskelett

A.1.2.1 Ausrichtung der Stressfasern

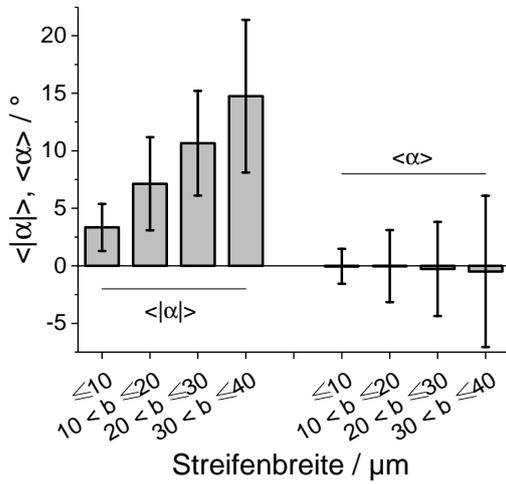


Abbildung A.3: Mittlere Stressfaserausrichtung. Die Berechnung des mittleren Winkels erfolgte nach der Formel $\langle |\alpha_{ASF}| \rangle = \frac{\sum_i L_i |\alpha_i|}{\sum_i L_i}$ und $\langle \alpha_{ASF} \rangle = \frac{\sum_i L_i \alpha_i}{\sum_i L_i}$ mit $L_{ASF} = \sum_i L_i$. Die mittlere Ausrichtung $\langle \alpha \rangle$ bleibt dadurch nahe Null, da die Stressfasern zufällig gegen die Längsachse (Streifenrichtung) orientiert sind. (Mittelwert \pm Stabw., $n_{\text{Zellen}} = 284, 275, 80, 142$).

A.1.2.2 Färbung Fokaler Adhäsionen

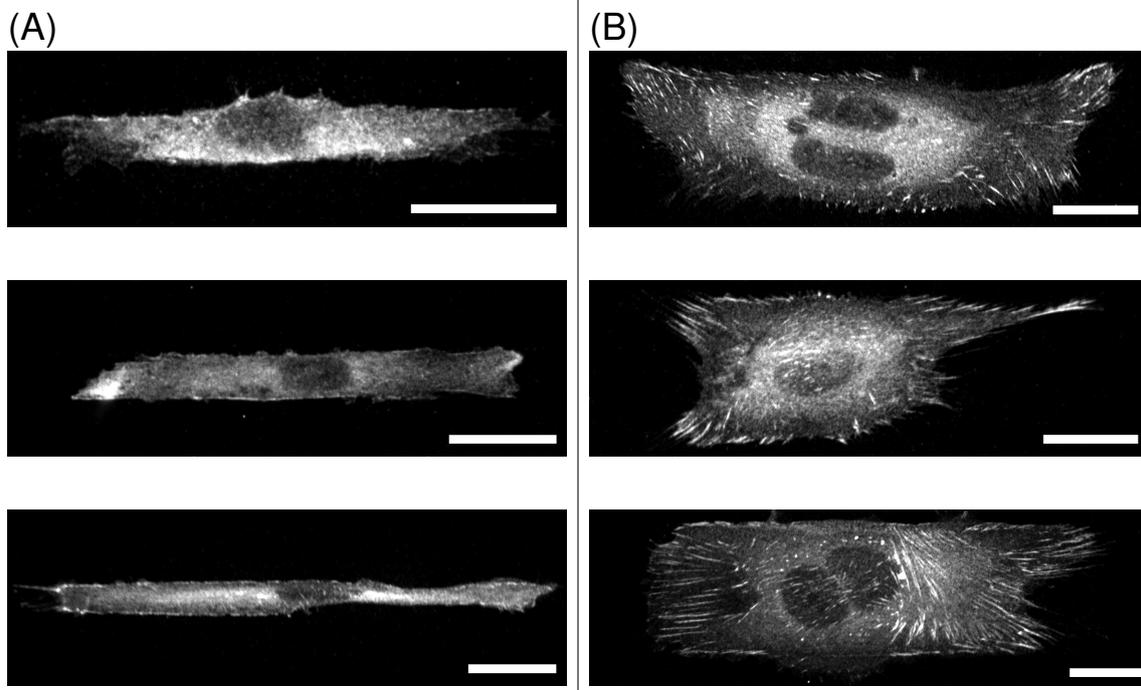


Abbildung A.4: Färbung Fokaler Adhäsionen mittels Vinkulinantikörper. (A) HUVECs auf schmalen Streifen ($b = 9 \mu\text{m}$) zeigen nur eine diffuse Färbung, aber keine Fokalen Adhäsionen. (B) Zellen auf breiten Streifen ($b = 37\text{--}39 \mu\text{m}$) weisen deutliche Fokale Adhäsionen auf.

A.1.2.3 Färbung Myosin

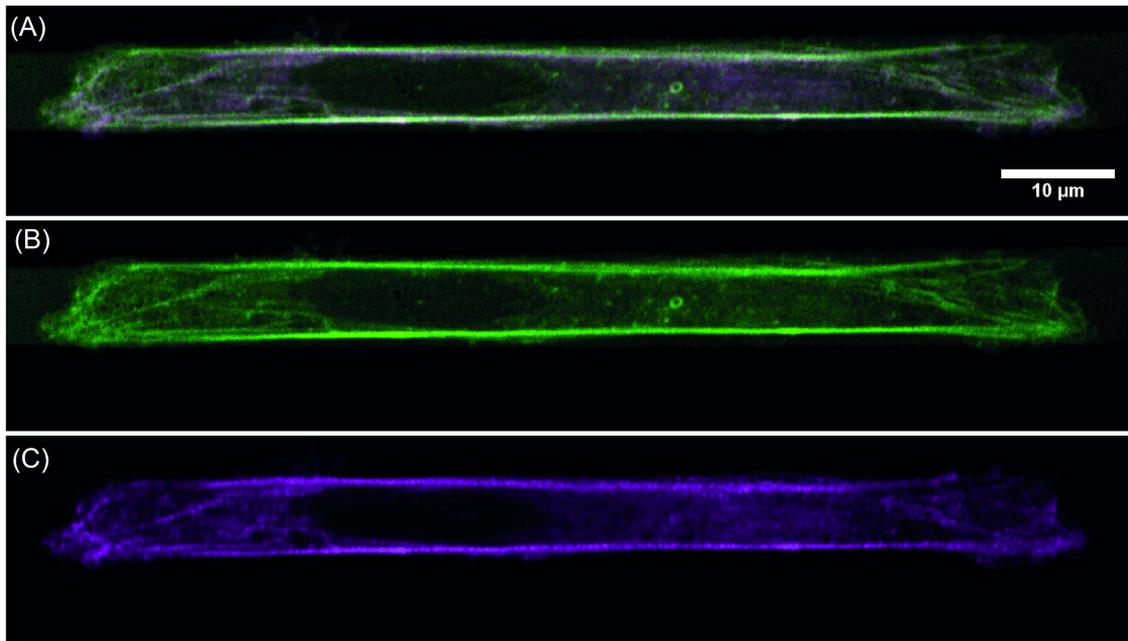


Abbildung A.5: Myosinfärbung. Zellen auf schmalen Streifen haben ein reduziertes Aktinskelett, oftmals mit nur zwei peripheren Fasern am Zellrand. (A) Überlagerung der (B) Färbung mit Alexa Fluor 488 Phalloidin und der (C) Myosin II-Färbung.

Die Zellen wurden nach der Fixierung in 4% PFA und Permeabilisierung mit 0,1% TritonX100 mit 2% BSA-Lösung gewaschen. Die Färbung erfolgte mit Primärantikörper (anti-non-muscle myosin IIB, Ursprung: Maus, abcam, ab684) in einer 1:2500-Verdünnung über eine Stunde. Nach einem Waschvorgang mit 2% BSA wurde Sekundärantikörper (anti-mouse, Ursprung: Esel, IgG-CFL 647, Santa Cruz Biotechnology) in einer 1:500 Verdünnung hinzugegeben. Nach 1 h Inkubationszeit wurden die Proben mit PBS gewaschen und wie in 3.3.1.2 beschrieben haltbar gemacht und wie in 3.4.1.2 mikroskopiert.

A.1.3 Zugkräfte

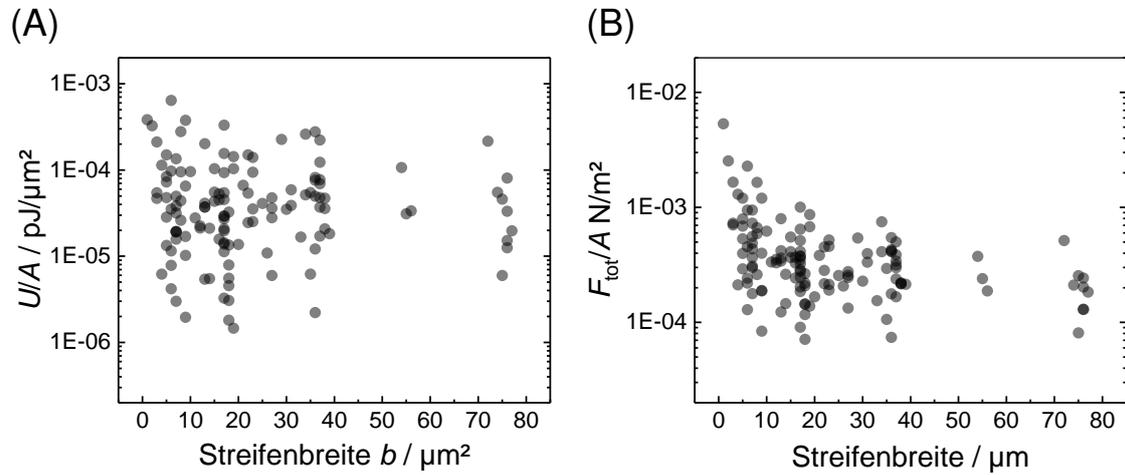


Abbildung A.6: (A) Auftragung des Verhältnisses U/A gegen die Streifenbreite. (B) Auftragung von F_{tot}/A gegen die Streifenbreite.

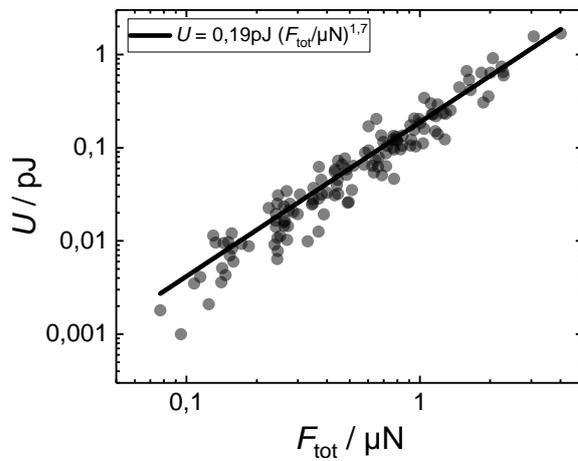


Abbildung A.7: Dehnungsenergie U vs. Gesamtkraft F_{tot} . Die Skalierung folgt einem Power-Law der Form $U \sim F_{\text{tot}}^{1,7}$.

A.2 Makros und Skripte

A.2.1 Fiji/ImageJ

A.2.1.1 Detektion Zellmorphologie

Makro A.1: Makro zur Aufbereitung der Zellbilder (bestehend aus Aufnahme der Streifen (TAM-RA), des Aktinskeletts (Alexa Fluor 488 Phalloidin) und des Zellkerns (DAPI). Die Zellen werden an den Bildkanten ausgerichtet und sowohl die Zellkontur und die Zellkernkontur markiert und die bearbeiteten Bilder werden abgespeichert. Das Auslesen der Zellgröße etc. erfolgte mit einer einfachen Partikelanalyse innerhalb.

```
1 pfad=getDirectory("Verzeichnis der Zellbilder");
2 liste=getFileList(pfad);
3 File.makeDirectory(pfad+"/superposition/");
4
5 for(j=0; j<liste.length; j++){
6     if (endsWith(liste[j],".tif")){
7         print(j+1+"/"+liste.length+": "+liste[j]);
8         run("Bio-Formats Importer", "open="+pfad+liste[j]+" color_mode=Default view
          =Hyperstack stack_order=XYZCT");
9         UrStapel=getTitle();
10        run("Select None");
11        Stack.getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
12        Stack.setDimensions(3, 1, frames);
13        //Bildreihenfolge: (1) Streifen/TAMRA (2) Aktin/Alexa488 (3) Zellkern/DAPI
14        //Erkennung der Zellkontur (wird spaeter gebraucht)
15        run("Duplicate...", "duplicate channels=2");
16        AktinKontur=getTitle();
17        run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
18        run("Apply LUT", "slice");
19        setAutoThreshold("Huang dark");
20        run("Set Measurements...", "area centroid center perimeter bounding fit
          shape redirect=None decimal=3");
21        run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity display clear include add");
22        while(nResults>1){
23            run("Remove Overlay");
24            resetThreshold();
25            run("Multiply...", "value=1.250");
26            setAutoThreshold("Huang dark");
27            run("Set Measurements...", "area centroid center perimeter bounding fit
          shape redirect=None decimal=3");
28            run("Analyze Particles...", "size=50-Infinity display clear include add
          ");
29        }
30        roiManager("Select", 0);
31        roiManager("Update");
32        run("Clear Outside");
33        setOption("BlackBackground", false);
34        run("Make Binary", "thresholded remaining black");
35        run("Fill Holes");
36        for(i=0; i<20; i++){
37            run("Dilate");
38        }
39        run("Fill Holes");
```

```

40     for(i=0;i<19;i++){
41         run("Erode");
42     }
43     //Messung des Streifenwinkels
44     selectWindow(UrStapel);
45     run("Duplicate...", "duplicate channels=1");
46     StreifenBild=getTitle();
47     run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
48     run("Apply LUT");
49     run("Smooth");
50     setAutoThreshold("Mean dark");
51     setOption("BlackBackground", false);
52     run("Convert to Mask");
53     run("Find Edges");
54     run("Analyze Particles...", " circularity=0.00-0.10 include clear add");//
55         Ausschluss Defektstellen, Einschluesse
56     roiManager("Show All without labels");
57     roiManager("Select", 0);
58     setBackgroundColor(0, 0, 0);
59     run("Clear");
60     run("Clear Outside");
61     run("Flatten");
62     KantenTemp=getTitle();
63     run("8-bit");
64     run("Multiply...", "value=255.000");
65     run("Smooth");
66     run("FFT");
67     titleF=getTitle();
68     run("Gaussian Blur...", "sigma=2");
69     run("Enhance Contrast...", "saturated=0.02 normalize");
70     setThreshold(230, 255);
71     size=1;
72     run("Analyze Particles...", "size=1-Infinity display clear include add");
73     while(nResults>6){
74         run("Analyze Particles...", "size="+size+"-Infinity display clear
75             include add");
76         size=size+1;
77     }
78     StreifenWinkel=getResultString("Angle", 0);
79     selectWindow(titleF);
80     close();
81     selectWindow(StreifenBild);
82     close();
83     selectWindow(KantenTemp);
84     close();
85     //Rotation des Bilderstapels, Detektion der Zellposition, Beschneidung des
86     Bilderstapels
87     selectWindow(AktinKontur);
88     run("Invert LUT");
89     run("Rotate...", "angle="+StreifenWinkel+" grid=1 interpolation=Bicubic
90         fill enlarge");
91     run("Remove Overlay");
92     setAutoThreshold("Li dark");
93     run("Analyze Particles...", "size=10-Infinity display clear include add");
94     rWidth=getResult("Width",0);
95     rHeight=getResult("Height",0);
96     xpos=getResult("BX",0);

```

```

93     ypos=getResult("BY",0);
94     xpos=xpos-0.5*rWidth;
95     ypos=ypos-0.1*rHeight;
96     width=2*rWidth;
97     height=1.2*rHeight;
98     toUnscaled(xpos,ypos);
99     toUnscaled(width);
100    toUnscaled(height);
101    roiManager("Select", 0);
102    roiManager("Update");
103    makeRectangle(xpos,ypos,width,height);
104    run("Crop");
105    selectWindow(UrStapel);
106    run("Rotate... ", "angle="+StreifenWinkel+" grid=1 interpolation=Bicubic
        fill enlarge stack");
107    makeRectangle(xpos,ypos,width,height);
108    run("Crop");
109    //Messung der Streifenbreite, weitere Beschneidung des Bildes
110    widths=newArray(0);
111    bxpos=newArray(0);
112    getDimensions(width, height, channels, slices, frames);
113    for(i=0;i<11;i++){
114        makeRectangle(0,i*height/11,width,height/11);
115        run("Duplicate...", "duplicate channels=1");
116        titled=getTitle();
117        run("Smooth");
118        setAutoThreshold("Mean dark");
119        size=1;
120        run("Analyze Particles...", "size=1-Infinity display clear include add"
            );
121        while(nResults>1){
122            run("Analyze Particles...", "size="+size+"-Infinity display clear
                include add");
123            size=size+1;
124        }
125        if(nResults>0){
126            w=getResult("Width",0);
127            x=getResult("BX",0);
128            widths=Array.concat(widths,w);
129            bxpos=Array.concat(bxpos,x);
130        }
131        selectWindow(titled);
132        run("Close");
133        selectWindow(UrStapel);
134    }
135    widths=Array.sort(widths);
136    bxpos=Array.sort(bxpos);
137    wpt=widths[5];
138    bxpt=bxpos[5];
139    toUnscaled(wpt);
140    toUnscaled(bxpt);
141    if(2*bxpt+wpt>width){// falls Bild noch zu breit ist
142        makeRectangle(2*bxpt+wpt-width,0,2*width-2*bxpt-wpt,height);
143        run("Crop");
144        selectWindow(AktinKontur);
145        makeRectangle(2*bxpt+wpt-width,0,2*width-2*bxpt-wpt,height);
146        run("Crop");

```

```
147         selectWindow(UrStapel);
148         bxpt=width-bxpt-wpt;
149     }
150     else{
151         makeRectangle(0,0,wpt+2*bxpt,height);
152         run("Crop");
153         selectWindow(AktinKontur);
154         makeRectangle(0,0,wpt+2*bxpt,height);
155         run("Crop");
156         selectWindow(UrStapel);
157     }
158     //Aufbereitung des Bildes und Abspeichern
159     run("Stack to Images");
160     run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use");
161     makePoint(bxpt,0.95*height);
162     run("Scale Bar...", "width="+round(widths[5])+" height=16 font=54 color=
        White background=None location=[At Selection] bold overlay");
163     run("Select None");
164     aa=round(widths[5]);
165     bb=round(rHeight);
166     if(bb<10){
167         fname="_00"+bb+"_"+UrStapel;
168     }
169     else if(bb<100){
170         fname="_0"+bb+"_"+UrStapel;
171     }
172     else{
173         fname="_"+bb+"_"+UrStapel;
174     }
175     if(aa<10){
176         fname="00"+aa+fname;
177     }
178     else if(aa<100){
179         fname="0"+aa+fname;
180     }
181     else{
182         fname=aa+fname;
183     }
184     run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
185     saveAs("Tiff", pfad+"/superposition/"+fname);
186     selectWindow(fname);
187     run("Close");
188 }
189 }
```

A.2.1.2 Binärisierung Aktinskelett

Makro A.2: Makro zur Herausstellung des Aktinskeletts, ausgehend von den vorab aufbereiteten Zellbildern. Die binärisierten Bilder werden in einem separaten Ordner abgespeichert.

```
1 pfad=getDirectory("Verzeichnis der vorprozessierten Zellbilder");
2 File.makeDirectory(pfad+"//actin//");
3 liste=getFileList(pfad);
4
5 for(j=0; j<liste.length; j++){
6     if(endsWith(liste[j], ".tif")){
7         print(liste[j]);
8         run("Bio-Formats Importer", "open="+pfad+liste[j]+" color_mode=Default view
          =Hyperstack stack_order=XYZT");
9         title=getTitle();
10        Stack.setSlice(3);
11        run("Duplicate...", "use");
12        title1=getTitle();
13        run("Remove Overlay");
14        run("Enhance Contrast...", "saturated=0 normalize");
15        run("Gaussian Blur...", "sigma=0.1 scaled");
16        run("Duplicate...", " ");
17        title2=getTitle();
18        run("Gaussian Blur...", "sigma=.99 scaled");
19        imageCalculator("Subtract create", title1,title2);
20        run("Enhance Contrast", "saturated=0 normalize");
21        setAutoThreshold("Li dark");
22        setOption("BlackBackground", false);
23        run("Convert to Mask");
24        print(title);
25        saveAs("Tiff", pfad+"//actin//"+liste[j]);
26        run("Close");
27        selectWindow(title);
28        run("Close");
29        selectWindow(title1);
30        run("Close");
31        selectWindow(title2);
32        run("Close");
33    }
34 }
```

A.2.2 Python

A.2.2.1 Rekonstruktion Aktinskelett

Makro A.3: Skript zur Rekonstruktion des Aktinskeletts aus Geradensegmenten anhand des Binärbildes des Aktinskeletts. Abgespeichert wird ein Bild der Rekonstruktion sowie eine Text-Datei mit den Endkoordinaten der detektierten Segmente. Die Koordinaten können zur Bestimmung der Segmentlängen und der Winkel benutzt werden.

```

1 import os
2 import matplotlib.pyplot as plt
3 import numpy as np
4 import scipy.ndimage as spnd
5 import scipy.misc as spms
6 from PIL import Image
7
8
9 pfad2="C:/Pfad_zu_Zellbildern/"
10 pfad="C:/Pfad_zu_Aktinbildern/"
11
12 os.chdir(pfad)
13
14 ldir=os.listdir(pfad)
15 ldir=[i for i in ldir if i[-4:]==' .tif']
16
17 def profiler(x0,x1,y0,y1):
18     '''Rueckgabe der Punktmenge eines Geradensegments'''
19     nprof=int(max(abs(x0-x1),abs(y0-y1)))
20     profilx=np.around(np.linspace(x0,x1,nprof)).astype(int)
21     profily=np.around(np.linspace(y0,y1,nprof)).astype(int)
22     return profilx,profily
23
24 def reader(fname,seek=0):
25     '''Einlesen eines Bildes, mit Normierung und Binaerisierung'''
26     im_real=Image.open(fname)
27     im_real.seek(seek)
28     im_real=np.array(im_real)
29     im_real=1-im_real/im_real.max()
30     im_real=np.rot90(im_real)
31     im_real[np.where(im_real!=0)]=1
32     return im_real
33
34 def hough_line(img):
35     '''Erzeugen eines Akkumulators fuer die Hough-Transformation
36     Rueckgabe: Akkumulator, Winkel und Radien'''
37     y_idx, x_idx=np.nonzero(img)
38     thetas=np.deg2rad(np.linspace(-90.0, 90.0,361))
39     diag_len=np.ceil(max(np.hypot(y_idx+1,x_idx+1)))
40     radien=np.linspace(-diag_len, diag_len, diag_len * 2.0)
41     cos_t=np.cos(thetas).astype(np.float32)
42     sin_t=np.sin(thetas).astype(np.float32)
43     num_thetas=len(thetas)
44     accumulator=np.zeros((2*int(diag_len), num_thetas), dtype=np.uint)
45     radius=np.zeros((len(x_idx),len(cos_t))).astype(np.float32)
46     radius+=np.outer(x_idx,cos_t).astype(np.float32)
47     radius+=np.outer(y_idx,sin_t).astype(np.float32)

```

A Anhang

```
48     radius=np.round(radius+diag_len).astype(int)
49     z,s=radius.shape
50     for i in range(s):
51         binc=np.bincount(radius[:,i])
52         accumulator[:len(binc),i]=binc
53     return accumulator, thetas, radien
54
55 def alternative(Accu,im,rhos,thetas):
56     '''Beschneidung der dominantesten Linie auf ein Geradensegment;
57     Loeschung des Geradensegments aus dem Binaerbild'''
58     z,s=im.shape
59     c0=np.where(Accu==Accu.max())
60     rh0=rhos[c0[0][-1]]
61     th0=thetas[c0[1][-1]]
62     MAX=Accu.max()
63     coords=np.zeros((1,4))
64     if 0<=rh0/np.sin(th0)<=z:
65         coords[0,1]=min(rh0/np.sin(th0),z-1)
66         if 0<=rh0/np.cos(th0)<=s:
67             coords[0,2]=rh0/np.cos(th0)-1
68         elif 0<=(rh0-s*np.cos(th0))/np.sin(th0)<=z:
69             coords[0,2]=s-1
70             coords[0,3]=(rh0-s*np.cos(th0))/np.sin(th0)-1
71         elif 0<=(rh0-z*np.sin(th0))/np.cos(th0)<=s:
72             coords[0,3]=z-1
73             coords[0,2]=(rh0-z*np.sin(th0))/np.cos(th0)-1
74     elif 0<=rh0/np.cos(th0)<=s:
75         coords[0,0]=rh0/np.cos(th0)-1
76         if 0<=(rh0-s*np.cos(th0))/np.sin(th0)<=z:
77             coords[0,2]=s-1
78             coords[0,3]=(rh0-s*np.cos(th0))/np.sin(th0)-1
79         elif 0<=(rh0-z*np.sin(th0))/np.cos(th0)<=s:
80             coords[0,3]=z-1
81             coords[0,2]=(rh0-z*np.sin(th0))/np.cos(th0)-1
82     else:
83         coords[0,0]=s-1
84         coords[0,1]=(rh0-s*np.cos(th0))/np.sin(th0)-1
85         coords[0,3]=z-1
86         coords[0,2]=(rh0-z*np.sin(th0))/np.cos(th0)-1
87     profilx,profily=profiler(coords[0,0],coords[0,2],coords[0,1],coords[0,3])
88     im_test=spnd.morphology.binary_dilation(im.astype(np.uint8),np.ones((5,5)))
89     profil=''.join([str(1*m) for m in im_test[profily,profilx]])
90     for i in range(30):#Luecken bis ca. 2.1um werden ueberbrueckt
91         profil.replace('10'+i*'0'+ '1','11'+i*'1'+ '1')
92     ind=1
93     st=ind*'1'
94     while st in profil:
95         ind2=profil.find(st)
96         ind+=1
97         st=ind*'1'
98     if ind+ind2>len(profilx):
99         ind=len(profilx)-ind2
100     im_red=np.zeros(im.shape)
101     im_red[profily[ind2:ind2+ind],profilx[ind2:ind2+ind]]=1
102     for i in range(12):#empirisch begruendet
103         im_red=spnd.morphology.binary_dilation(im_red,structure=np.ones((3,3)))
104     im_red=im-1*im_red
```

```

105     im_red[np.where(im_red<0)]=0
106     return im_red, [profilx[ind2], profilx[ind+ind2-1], profily[ind2], profily[ind2+ind
        -1]], MAX
107
108 def im_reducer(I):
109     '''Rueckgabe des groessten Objekts'''
110     A,num=spnd.measurements.label(I.astype(np.uint8))
111     if num>0:
112         delt=np.bincount(A.flatten())[1:].argmax()+1
113         B=np.copy(A)
114         B[np.where(B!=delt)]=0
115         B[np.where(B==delt)]=1
116         B=spnd.morphology.binary_erosion(B,np.ones((3,3)))
117         if sum(sum(B))>500:#Ausgabe, solange Flaechen(OBJEKT)>~2.5um^2
118             B=spnd.morphology.binary_erosion(B,np.ones((3,3)))
119             return B
120         else:
121             return I
122     else:
123         I[0,0]=1
124         return I
125
126 def eroder2(imag,fname,cords):
127     '''Beschneiden und Reskalieren des Zellbilds auf Aktinmaske'''
128     cwd=os.getcwd()
129     os.chdir(pfad2)
130     A=reader(fname)
131     im_Akt=Image.open(fname)
132     im_Akt.seek(2)
133     im_Akt=np.rot90(np.array(im_Akt))
134     inds=np.where(A==0)
135     A=A[min(inds[0]):max(inds[0])+1,min(inds[1]):max(inds[1])+1]
136     im_Akt=im_Akt[min(inds[0]):max(inds[0])+1,min(inds[1]):max(inds[1])+1]
137     im_Akt=spms.imresize(im_Akt,imag.shape)
138     os.chdir(cwd)
139     return im_Akt
140
141 def processor(fname):
142     '''Einlesen der Bilder (Aktin,Zelle); Segmentsuche; Darstellung in
143     Binaerbild und in Zellbild; Speichern der Ergebnisse (Koordinaten der
144     Geradensegment, Bilder); Ausgabe der mittleren Winkel'''
145     im_real=reader(fname)
146     im_w=np.copy(im_real)
147     z,s=im_w.shape
148     koordinaten=[]
149     langs=[20,20,20]#Segmentsuche, solange d. summierte Laenge der letzten 3 >3.6um
150     while sum(langs)>50:
151         im_w2=im_reducer(im_w)
152         H,thet,rho=hough_line(im_w2)
153         im_w,c0ss,MAX=alternative(H,im_w,rho,thet)
154         lang=((c0ss[0]-c0ss[1])**2+(c0ss[2]-c0ss[3])**2)**.5
155         langs.append(lang)
156         langs=langs[1:]
157         koordinaten.append(c0ss)
158     koordinaten=[i for i in koordinaten if ((i[0]-i[1])**2+(i[2]-i[3])**2)**.5>70]
159     with open(pfad+fname+'-2.txt','w') as txt:
160         strin=[[str(st) for st in sub] for sub in koordinaten]

```

```

161     strin=['\t'.join(st) for st in strin]
162     strin='\n'.join(strin)
163     txt.write(str(strin))
164     im_Akt=eroder2(im_real, fname, koordinaten)
165     plt.subplot(211)
166     plt.imshow(im_real)
167     plt.subplot(212)
168     plt.imshow(im_Akt)
169     plt.show()
170     winkel=[]
171     laengen=[]
172     plt.subplot(211)
173     plt.imshow(im_real, interpolation='nearest')
174     for item in koordinaten:
175         laengen.append(((item[0]-item[1])**2+(item[2]-item[3])**2)**.5)
176         winkel.append(180*np.arccos(abs(float(item[2]-item[3])/laengen[-1]))/np.pi)
177         plt.plot(item[:2], item[2:], 'g-', linewidth=1)
178         plt.plot(item[:2], item[2:], 'y.', linewidth=1)
179         plt.plot(koordinaten[-1][:2], koordinaten[-1][2:], 'y-', linewidth=1)
180     mid_ang=sum([abs(i[0])*i[1] for i in zip(winkel, laengen)]/sum(laengen))
181     plt.xlim((0,s))
182     plt.ylim((z,0))
183     plt.title(fname)
184     plt.subplot(212)
185     plt.imshow(im_Akt, interpolation='nearest', cmap='gray')
186     for item in koordinaten:
187         plt.plot(item[:2], item[2:], 'g-', linewidth=1)
188         plt.plot(item[:2], item[2:], 'y.', linewidth=1)
189         plt.plot(koordinaten[-1][:2], koordinaten[-1][2:], 'y-', linewidth=1)
190     plt.xlim((0,s))
191     plt.ylim((z,0))
192     plt.savefig(fname+"-2.png", dpi=192, bbox_inches='tight')
193     plt.close()
194     return mid_ang
195
196 #-----
197 for index in range(len(ldir)):
198     fname=ldir[index]
199     mittel_winkel=processor(fname)
200     print(fname, int(fname[:3]), int(fname[4:7]), mittel_winkel)

```

A.2.3 Berechnung des Aktin-Flussfelds

Makro A.4: Makro zur Berechnung des Aktinflusses. Das Aktinflussfeld wird in Anlehnung an das MATLAB-Programm zur Bestimmung des Deformationsfeldes bestimmt. Zwei aufeinanderfolgende Bilder einer Zeitserie werden ausschnittsweise miteinander verglichen (Kreuzkorrelation). Die Berechnung wird iterativ verfeinert. Es werden die x - und y -Komponenten der Flussfelder ausgegeben.

```

1 from __future__ import division
2 import matplotlib.pyplot as plt
3 import numpy as np
4 import scipy.ndimage as spnd

```

```

5 import os,PIL
6 from PIL import Image
7
8 #Je 2 Zellbilder aufeinanderfolgender Zeitpunkte in einem Tiff.
9 pfad='C:/Users/AM/Google Drive/Daten/171129_2/test/'
10 pfad='C:/Ordner_mit_Zellbildern/'
11 os.chdir(pfad)
12
13 flist=os.listdir(pfad)
14 flist=[i for i in flist if ".tif" in i]
15 flist=[i for i in flist if i[-4:]==' .tif']
16
17 def normalize(x):
18     '''return zero-mean, sd=1 array'''
19     x=x-np.mean(x)
20     if np.var(x)!=0:
21         return x/(np.var(x)**.5)
22     else:
23         return x
24
25 def imreader(fname,seek=0,saturate=True):
26     '''return np.array from fname, scaled 0-255 if saturate=True'''
27     IM=Image.open(fname)
28     IM.seek(seek)
29     IM=np.array(IM)
30     IM=IM-IM.min()
31     IM=255*IM/IM.max()
32     return IM
33
34 def calccorr(Im1,Im2):
35     '''Berechnung der Kreuzkorrelation,
36     Ausgabe der Verschiebung bei Erreichen eines minimalen Kreuzkorr.effizienten'''
37     Im1=normalize(Im1)
38     Im2=normalize(Im2)
39     Y=np.real(np.fft.irfft2(np.fft.rfft2(Im1)*np.fft.rfft2(Im2[:,::-1,::-1])))
40     z,s=Y.shape
41     halbe=int(z/2)
42     y1=Y[:,:halbe]
43     y2=Y[:,halbe:]
44     Y=np.hstack((y2,y1))
45     y1=Y[:halbe,:]
46     y2=Y[halbe:,:]
47     Y=np.vstack((y2,y1))
48     i,j=np.where(Y==Y.max())
49     dy=z/2-1-i[0]
50     dx=z/2-1-j[0]
51     Y=Y/((z)*(s))
52     if Y.max()>0.6: return Y,-dx, dy
53     else: return Y,0,0
54
55 def corcort(Im2,dx,dy):
56     '''Ausgabe eines verschobenen Bildausschnitts'''
57     Im2=Im2.copy()
58     if dx>=0:
59         Im2[:,:-dx]=Im2[:,dx:]
60         Im2[:,dx:]=0
61     else:

```

A Anhang

```
62     Im2[:, -dx:] = Im2[:, :dx]
63     Im2[:, :-dx] = 0
64     if dy >= 0:
65         Im2[:-dy, :] = Im2[dy, :]
66         Im2[-dy, :] = 0
67     else:
68         Im2[-dy, :] = Im2[dy, :]
69         Im2[:-dy, :] = 0
70     return Im2
71
72 def convolver(M):
73     '''Verrechnung der Verschiebung benachbarter Ausschnitte'''
74     M2 = np.vstack((np.zeros((1, M.shape[1])), M))
75     M2 = np.hstack((np.zeros((M2.shape[0], 1)), M2))
76     M2 = spnd.convolve(M2, np.ones((2, 2))/4)
77     return M2
78
79 def increaser(XY):
80     '''Vorbelegung des Verschiebungsfelds fuer die naechste Iteration'''
81     z, s = XY.shape
82     XYN = np.zeros((2*z, 2*s))
83     for i in range(z):
84         for j in range(s):
85             XYN[2*i:2*i+2, 2*j:2*j+2] = XY[i, j]
86     XYN2 = spnd.convolve(XYN, np.ones((2, 2))/4)
87     return XYN2[:-1, :-1]
88
89 def shifterR(Ref, Img, siz, shiftx=False, shifty=False):
90     '''Berechnung der Verschiebungsfelds, Fehlerbehandlung'''
91     SS2 = int(siz/2)
92     Gridshape = [int(i/SS2)-1 for i in Ref.shape]
93     if type(shiftx) == type(False) and type(shifty) == type(False):
94         DOX = np.zeros(Gridshape)
95         DOY = np.zeros(Gridshape)
96     else:
97         DOX = increaser(shiftx)
98         DOY = increaser(shifty)
99     for i in range(Gridshape[0]):
100         if DOX[i, 0] > 0: DOX[i, 0] = 0
101         if DOX[i, -1] < 0: DOX[i, -1] = 0
102     for i in range(Gridshape[1]):
103         if DOY[0, i] > 0: DOY[0, i] = 0
104         if DOY[-1, i] < 0: DOY[-1, i] = 0
105     DOX = DOX.astype(int)
106     DOY = DOY.astype(int)
107     for i in range(Gridshape[0]):
108         for j in range(Gridshape[1]):
109             dx = DOX[i, j]
110             dy = DOY[i, j]
111             Rx1 = i*SS2 + dy
112             Rx2 = i*SS2 + dy + siz
113             Ry1 = j*SS2 - dx
114             Ry2 = j*SS2 - dx + siz
115             if Rx1 < 0:
116                 DOX[i, j] = DOX[i, j] - Rx1
117                 Rx1 = 0
118                 Rx2 = siz
```

```

119         if Rx2>Ref.shape[0]:
120             DOX[i,j]=DOX[i,j]-Rx2+Ref.shape[0]
121             Rx2=Ref.shape[0]
122             Rx1=Rx2-siz
123         if Ry1<0:
124             DOY[i,j]=DOY[i,j]-Ry1
125             Ry1=0
126             Ry2=siz
127         if Ry2>Ref.shape[1]:
128             DOY[i,j]=DOY[i,j]-Ry2+Ref.shape[1]
129             Ry2=Ref.shape[1]
130             Ry1=Zy2-siz
131         R_=R[Rx1:Rx2,Ry1:Ry2]
132         Z_=Z[i*SS2:i*SS2+siz,j*SS2:j*SS2+siz]
133         if R_.shape!=Z_.shape:
134             print('!: '+str(siz),SS2,i,j,dx,dy,Gridshape,'\n',Rx1,Rx2,Ry1,Ry2)
135         Y,dx,dy=calccorr(Z_,R_)
136         DOX[i,j]+=dx
137         DOY[i,j]+=dy
138     return DOX,DOY,Y
139
140 def combi_shiftR(R,Z,siz,shiftx=False,shifty=False):
141     '''Berechnung des Verchiebungsfelds, Glaettung benachbarter Verschiebungen'''
142     DX,DY,Y=shifterR(R,Z,siz,shiftx,shifty)
143     DX=convolver(DX)
144     DY=convolver(DY)
145     return DX,DY
146
147 def matrix_to_file(M,pfad,fname):
148     s=''
149     for i in range(M.shape[0]):
150         s=s+', '.join([str(M[i,j]) for j in range(M.shape[1])])
151         s=s+'\n'
152     with open(fname+'.dat','w') as f:
153         f.write(s)
154
155 #-----
156 for fname in flist:
157     print(fname)
158     refz=imreader(fname)
159     zell=imreader(fname,seek=1)
160
161     R=normalize(refz)
162     Z=normalize(zell)
163
164     ## 4 Iterationsstufen
165     DX,DY=combi_shiftR(R,Z,128)
166     DX,DY=combi_shiftR(R,Z,64,DX,DY)
167     DX,DY=combi_shiftR(R,Z,32,DX,DY)
168     DX,DY=combi_shiftR(R,Z,16,DX,DY)
169
170 #Speichern der Verschiebungen in .dat-Datei und ein Bild des Flussfelds
171     matrix_to_file(DX,pfad,fname[:-4]+'X')
172     matrix_to_file(DY,pfad,fname[:-4]+'Y')
173     DXY=(DX**2+DY**2)**.5
174     fig=plt.figure()
175     ax = plt.axes([0,0,1,1])

```

A Anhang

```
176     ax.set_aspect('equal')
177     fig.set_size_inches((DX.shape[1]/37.5,DX.shape[0]/37.5))
178     ax.patch.set_facecolor('black')
179     ax.set_frame_on(False)
180     plt.setp(ax.get_yticklabels(), visible=False)
181     plt.setp(ax.get_xticklabels(), visible=False)
182     ax.yaxis.set_tick_params(size=0)
183     ax.xaxis.set_tick_params(size=0)
184     cmap=plt.cm.Greys
185     cmap.set_under('black')
186     plt.imshow(np.zeros(DXY.shape)+1,cmap='Greys',vmin=0.1)
187     plt.quiver(DX,DY,color='white',scale=100,headwidth=5,headlength=5,width=0.0005)
188     plt.xlim((-0.5,DX.shape[1]-0.5))
189     plt.ylim((DX.shape[0]-.5,-.5))
190     extent = ax.get_window_extent().transformed(fig.dpi_scale_trans.inverted())
191     plt.savefig('R-'+str(fname[:-4])+'.png',dpi=600,bbox_inches='tight', pad_inches
192               =0)
192     plt.close()
```

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst Tilo Pompe, der mich in der Biophysikalischen Chemie aufgenommen und geduldig mit Arbeit, Geld, Ausflügen, Ideen und Raum zum Probieren versorgt hat – zusammen mit einem Dreamteam aus Menschen/Kollegen/Freunden: Besonderer Dank gilt den Langzeitgefährten aus Büro 116: Liv Kalbitzer war Genossin der ersten Stunde, hat immer ausgesprochen, was wir alle gedacht haben, war Anker der Vernunft, soziales Zentrum und hat immer gefehlt, wenn sie nicht da war! Michael Ansorge war immer da, wenn er gebraucht wurde und auch beim Feierabendbier und darüber hinaus noch zum Diskutieren bereit, das wird unerreicht bleiben. Allergrößten Dank an Christina Müller für die schönste Zeit. Martin Espig hat immer selbstlos geholfen und verbessert, eine Pracht! Tina König kennt alle Tricks der Zellkultur, den besten Kirschlikör in Lissabon, hatte immer ein Gespür für meine Laune und ein offenes Ohr – Danke! Falco Altenkirch brachte frischen Wind ins Büro, war zu kurz da und ist mit gutem Beispiel vorangegangen. Franziska Ullm war Quelle des gesunden Menschenverstands, Gute-Laune-Leuchtturm, Kummerkasten, Essensspenderin, Fahrerin, Eisesserin, Perfektionistin, Vorbild! Herzlichen Dank für gemeinsame Zeit, Inspiration und fruchtbaren Austausch an: Katja Franke als Ruhepol und abgeklärte Junior-Chefin, Jiranuwat "Bas" Sapudom für einen Lebensvorrat gute Laune, Steve Martin für Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft, Petra Zamzows Perfektionismus, David Rettke für gern geteilte Kompetenz und Menschlichkeit, Manuela Mießlers Unverwüstlichkeit, Energie und Lebensweisheit, Philipp Riedls Nerdigkeit und Ruhe, Veronika Riedls Elan und Zielgerichtetheit, Maximilian Quaas als Physikbruder und Mensagänger, Susanne Vogts Fröhlichkeit, Stephan Schmidts Hilfsbereitschaft, Josefine Schneiders Zellkulturmagie, Johannes Waschkes Programmierkünsten, Hilfestellungen und Sushi-Abenden. Vielen Dank auch denen, die mir ihre Zeit, Ratschläge und Arbeit geschenkt haben: Annette Beck-Sickinger, Rayk Hassert, Mareen Pagel, Ulf Anderegg, Hans-Dieter Arndt, Veselin Nasufovic, Wolfgang Pompe, Manfred Bobeth, Klaus Kroy, Ralf Seidel, Constantin Huster. Danke an Jörg Meyer und Tina Pauer für ihre Anstrengungen. Laura Orgus vielen Dank für selbstlose stoische moralische und technische Unterstützung. Menschen, von denen ich viel gelernt habe: Felix Jahn, Jan Zeika, Oliver Rhiel, Philipp Wolff, Katrin Mörters, Alexander Hueser, Christina Mages, Lars Binder, Asis Mousa, Frankie Vanterpool, Maik Pankonin, Max Feußner. Besonderer Dank an Christopher Schuchardt für das Teilen der Lehre-Last und an Sandra Müller für ihr mitreißendes Engagement und ihre gründliche Arbeit. In Projekten wurde mein Horizont erweitert durch: Winfried Speuser, Marc Osterwald, Kai Ostermann, Julia Döring, Matthias Schröder, Lisa Hannusch. Die Bürokratie haben mir dort abgenommen: Grit Kost, Gianauelio Cuniberti, Johanna Meyer. Aus der Vergangenheit in die Zukunft: Freunde, die mich inspiriert, abgelenkt, motiviert und fokussiert haben: Friedrich C. und Johannes S. als Kompass, ebenso Lotte S., in deren Windschatten das Schreiben in der Bibo besonders gut lief und Miriam G. Danke! Und natürlich Dank an meine allzeit wohlwollenden und allumfassend unterstützenden Eltern und die gesamte Verwandtschaft! Dank für Kommentare zum Manuskript: HM, HGM, CM, MA, MQ, FU, LO, TP.

– Herzlichen Dank euch allen!