

Max-Planck-Institut  
für  
Metallforschung

Biophysikalische Funktionen des Keratinnetzwerks  
in malignen Panc-1 Zellen

Doktorarbeit

von

*Melih Kalafat*

aus

Stuttgart

Möhringen

2011



**INAUGURAL - DISSERTATION**  
zur  
**Erlangung der Doktorwürde**  
der  
**Naturwissenschaftlich - Mathematischen**  
**Gesamtfakultät**  
**der Ruprecht - Karls - Universität**  
**Heidelberg**

**vorgelegt von**  
**Dipl.-Phys. Melih Kalafat**  
**aus Stuttgart**

**Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2011**

**Biophysikalische Funktionen des Keratinnetzwerks  
in malignen Panc-1 Zellen**

**Gutachter: Prof. Dr. Joachim P. Spatz  
Prof. Dr. Ulrich Schwarz**

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	7
Summary	9
<b>1 Grundlagen</b>	<b>10</b>
1.1 Zytoskelett	11
1.1.1 Aktin	12
1.1.2 Intermediärfilament Keratin	13
1.1.3 Mikrotubuli	14
1.2 Zelladhäsion	15
1.2.1 Extra-Zellulare-Matrix	15
1.2.2 Integrine	16
1.2.3 Fokale Adhäsion	17
1.3 Zell-Mechanik	18
1.3.1 Zellmechanische Sensoren	18
1.3.2 Zell-Migration	19
1.3.3 Morphologische Zellreorganization durch Kräfte	20
1.3.4 SPC-Effekt auf das Keratin-Zytoskelett	22
1.4 Physikalische Zellmodelle	23
1.4.1 Viskoelastische Materialien	23
1.4.2 Two-string-Model	25
1.4.3 Tensegrity-Model	27
1.4.4 Fluidization-Model	29
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>31</b>
2.1 Materialwissenschaftlicher Teil	31
2.1.1 Photolithographie	33

---

2.1.2	Reaktives Ionenätzen	35
2.1.3	Säulen-Substrate	37
2.1.4	Rillen-Substrate	38
2.1.5	Polydimethylsiloxan-Substrate	39
2.2	Biologischer Teil	40
2.2.1	Zelllinie und Zellkultur	40
2.2.2	Probenpräparation	40
2.2.3	Immuncytochemische Färbung	41
2.3	Biophysikalischer Teil	42
2.3.1	Mikroskopie	42
2.3.2	Dehnungsvorrichtung	44
2.3.3	Analyse der Zellmorphologie	44
2.3.4	Analyse der Zellmigration	46
2.3.5	Analyse der Orientierung von Aktin und Keratin	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>50</b>
3.1	Charakterisierungen der Substrate	50
3.1.1	Charakterisierung der Säulen-Substrate	50
3.1.2	Charakterisierung der Rillen-Substrate	52
3.2	Reaktion von Panc-1 auf physikalische Signale	53
3.3	Zellorientierung	55
3.3.1	Orientierung auf flachen PDMS-Substraten	55
3.3.2	Orientierung bei Dehnversuchen	56
3.3.3	Zeitliche Dauer der Neuausrichtung	58
3.3.4	Diskussion	61
3.4	Zellmigrationen	63
3.4.1	Migration auf flachen PDMS-Substraten	63
3.4.2	Migration bei Dehnversuchen	65
3.4.3	Migration auf Rillen-Substraten	68
3.4.4	Migration auf den Säulen-Substraten	74
3.4.5	Diskussion	78
3.5	Einfluss vom Zytoskelett auf die Morphologie	80
3.5.1	Einfluss von Keratin auf die Zellmorphologie	81
3.5.2	Einfluss der Mikrotubuli auf die Zellmorphologie	84
3.5.3	Einfluss von Aktin auf die Zellmorphologie	86
3.5.4	Diskussion	89
3.6	Aktin-Keratin Orientierung	92

---

3.6.1	<b>Aktin-Orientierung</b>	94
3.6.2	<b>Keratin-Orientierung</b>	94
3.6.3	<b>Aktin-Keratin-Korrelation</b>	96
3.6.4	<b>Diskussion</b>	97
<b>4</b>	<b>Anhang</b>	<b>100</b>
4.1	Verwendete ImageJ Makros	100
4.1.1	Einzel-Ausrichtungsmakro für Aktin und Keratin	100
4.1.2	Doppel-Ausrichtungsmakro für Orientierungsvergleiche	108
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>119</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>134</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>135</b>



# Zusammenfassung

Die lebende Zelle ist ein hochkomplexes System, das von vielen gekoppelten und gleichzeitig ablaufenden Vorgängen im Inneren und durch äußere Signale reguliert wird. Dabei stellen mechanische Kräfte und die Geometrie der Umgebung wichtige Steuerungssignale auf zellulärer Ebene dar. Signale werden wahrgenommen und verarbeitet, wobei das dynamische Zytoskelett der Zelle eine zentrale Rolle einnimmt. Es reguliert insbesondere grundlegende Eigenschaften wie die mechanische Stabilität und Morphologie als auch deren Adaption, wie es in Migrationsprozessen notwendig ist. Kleinste Veränderungen wie die Abweichung des Zytoskeletts von der gewöhnlichen Struktur können somit großen Einfluss auf das Gesamtverhalten einer Zelle haben. Dies wird besonders offensichtlich bei der Betrachtung von Migrationsphänomenen oder dem Eindringverhalten von Tumorzellen beim Durchqueren eines Zellverbands im Rahmen der Metastasierung. Ein vertieftes Verständnis über die Auswirkungen physikalischer Signale auf das Zytoskelett und die daraus resultierenden Zellreaktionen könnte somit zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze beitragen. Aus diesem Grund erscheint es wichtig, die Mechanismen der zellulären Biomechanik zu verstehen.

In diesem Zusammenhang wurden in dieser Arbeit maligne Pankreas-Tumorzellen dem Einfluss von mechanischen Kräften und verschiedener Oberflächentopographien ausgesetzt, um den Einfluss des Keratin-Zytoskeletts auf die morphologische Umgestaltung und die Migrationseigenschaften der Zellen zu untersuchen. Durch die Kombination von materialwissenschaftlicher, biophysikalischer und zellbiologischer Methoden zusammen mit einem interdisziplinären Ansatz wurde das induzierte Zellverhalten quantitativ charakterisiert. Die Untersuchung des Migrationsverhaltens und die morphologische Reorientierung des Zellkörpers bei periodischer Dehnung zeigen, dass die Zellen mit einem unveränderten Keratin-Netzwerk auf die ihnen dargelegten physikalischen Signale reagieren. Die Beobachtungen zeigen eine gerichtete Migration entlang topographischer Strukturen oder eine Zellpolarisation senkrecht zur mechanischen Dehnungsrichtung.

Die Manipulation des Keratinnetzwerks durch die Behandlung der Pankreas Zellen mit dem Wirkstoff Sphingosylphosphorylcholin führt zu einer Umstrukturierung des Keratinnetzwerks von der Zellperipherie hin zum Zellkern. Die manipulierten Pankreas Zellen reagieren auf die gleiche physikalische Stimulation mit einem veränderten Zellverhalten. Die Tumorzellen zeigen nun einen höheren Grad der gerichteten Migration auf topographischen Substraten und eine schnellere zellmorphologische Umgestaltung bei den Dehnversuchen.

Zusammenfassend zeigen die Analysen, dass die räumliche Ausdehnung und die Struktur des zellulären Keratinnetzwerks einen erheblichen Einfluss auf die Migrationseigenschaften entlang von Oberflächentopographien und die Zellreaktionen auf periodische mechanische Dehnungen hat. Dieser Einfluss könnte möglicherweise mit einer stabilisierenden Wirkung des Keratins auf das Aktinnetzwerk und die daraus resultierende Erhaltung der mechanische Zellintegrität erklärt werden.

# Summary

Living cells are extremely sophisticated systems, in which various linked processes take place simultaneously. These processes are regulated by many external extrinsic signals. Cells in the human body are subjected to mechanical forces or to a specific geometry of the environment, both are important signals for a cell. In this context the dynamic cytoskeleton plays a crucial role in many processes like mechanical stability, morphology and cell migration. Even the smallest modification in cells, like variations in the cytoskeleton, can have a deep impact on overall cell reactions. Modifications of cytoskeleton elements can effect the velocity of migration or invasion characteristics in metastatic cancer formation. A comprehension of how single cytoskeleton elements and their potential interactions influence a cells ability to respond to external signals could may help on development of new treatment methods. Therefore it is important to understand fundamental mechanisms of cellular biomechanics.

In this context pancreas cells as model system for malignant tumor cells, were subjected to different surface topographies and mechanical forces as physical signals. Lithographic, biophysical and cell biology methods were used to explore the impact of the keratin network on migration and morphological alignment in response to the external physical signals. The quantitative determination of migration properties and reorganization processes with an unmodified keratin network reveal that pancreas cells react to these signals. The studies reveal, for example, a directed cell migration along topographic surface cues and a reorientation of cell alignment perpendicular to the direction of periodically applied strain.

Manipulations of the keratin network with the bioactive lipid Sphingosylphosphorylcholin induce a reorganization of keratin filaments from the cell periphery to the perinuclear region of the cell. Modified pancreas cells show an enhanced response to the same physical signals. The modified pancreas cells react with a higher degree of directed migration along topographic cues and a quicker reorganization of the cell morphology in experiments with cyclic tensile strain.

In summary the studies reveal that the structure of cellular keratin network has an important impact on cell migration properties and cells response to surface topography and deformation. This altered behaviour could potentially be explained by a stabilizing effect of the keratin network on actin and cell integrity.

# Kapitel 1

## Grundlagen

Lebende Zellen stellen in ihrer Vielfalt und Komplexität die Grundbausteine höherer Organismen dar. Hierbei ist der Aufbau und das Verhalten einer einzelnen Zelle auf Signale aus ihrer Umwelt, aufgrund von vielen aneinander gekoppelten und gleichzeitig ablaufenden Vorgängen im Inneren, sehr komplex. In diesem Zusammenhang stellen mechanische Kräfte wie Kompression, Zug- und Scherkräfte einen wichtige Signale dar, denen Zellen im Körper ständig unterliegen. Sie sind im menschlichen Körper allgegenwärtig, wie z.B. beim Dehnen und Zusammenziehen von Herzmuskel- oder Blutgefäßzellen. Kleinste Veränderungen an einer Zelle wie insbesondere die Abweichung von der gewöhnlichen Struktur eines Elements des Zytoskeletts können großen Einfluss auf das Gesamtverhalten einer Zelle haben. Infolgedessen nimmt das dynamische Zytoskelett, neben der Signalübertragung in einer Zelle (Mechanotransduktion), eine besondere Stellung ein.

Das Zytoskelett spielt eine entscheidende Rolle bei grundlegenden Prozessen wie der mechanischen Stabilität, Zellmorphologie und Migration. Veränderungen an den viskoelastischen Eigenschaften einer Zelle durch Umstrukturierung innerer Bestandteile können sich z.B. auf die Migrationsgeschwindigkeit oder das Eindringverhalten beim Durchqueren eines Zellverbands auswirken. Diese Fähigkeiten spielen bei der Wundheilung von Verletzungen oder der Metastasierung bei Krebsvorfällen eine wesentliche Rolle. Eine weitere grundlegende Fähigkeit von Zellen stellt die Mechanotransduktion dar. Sie beschreibt die Wahrnehmung von mechanischen Reizen und deren Umwandlung in intrazelluläre Signale. Somit nimmt sie eine Schlüsselrolle in der Signalübertragung von außen ins Zellinnere und umgekehrt ein. Die Beeinträchtigung der Signalübertragung mechanischer Kräfte und das daraus resultierende Zellverhalten stehen im Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten wie Krebs, Osteoporose und Asthma. Aus diesen Gründen ist es wichtig, die grundlegenden Mechanismen der Biomechanik von Zellen zu verstehen. Die ausführliche

Erforschung der einzelnen Elemente des Zytoskeletts und deren mögliche Interaktion untereinander könnten einen großen Anteil an der Entwicklung neuer Ansätze für Heilmethoden in der Zukunft haben. In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten Elemente, die diese Arbeit betreffen, detaillierter vorgestellt.

## 1.1 Zytoskelett

Die Fähigkeit von Zellen verschiedene Komponenten im Zellinneren zu organisieren, mit ihrer Umgebung mechanisch in Wechselwirkung zu treten und Bewegungen auszuführen, verdanken eukaryotische Zellen dem Zytoskelett [Goode00] [Etienne04] [Gardel08] [Cai09] [Geiger01] [Schmoranz03] [Wehrle03]. Es ist ein kompliziertes Netzwerk aus unterschiedlichen Proteinfilamenten, die sich durch das gesamte Zytoplasma erstrecken. Dieses Netzwerk besteht aus einem Gerüst, das hauptsächlich aus drei Proteinfilamenttypen mit unterschiedlichen Durchmessern zusammengesetzt ist. Dies sind die Aktinfilamente ( $d=6-8\text{nm}$ ), Intermediärfilamente ( $d=10\text{nm}$ ) und Mikrotubuli ( $d=25\text{nm}$ ). Jeder der genannten Typen besteht aus anderen Proteinuntereinheiten und hat charakteristische Eigenschaften. Ihre Funktionen und Eigenschaften werden in den drei Unterabschnitten 1.1.1 bis 1.1.3 näher erläutert.

Im Vergleich zu den Knochen des menschlichen Skeletts besitzt das Zytoskelett einer Zelle eine sehr dynamische Struktur, in der innere Bestandteile auf- und abgebaut bzw. Strukturen verstärkt oder geschwächt werden können [Chancellor10] [Estevez10] [Skwarek09] [Sheetz10] [Kaunas05] [Wei08]. Diese Eigenschaften befähigen Zellen auf Oberflächen zu migrieren und auf mechanische Reize zu reagieren [Wehrle03] [Suresh07] [Geiger01]. Das Zytoskelett spielt hierbei eine entscheidende Rolle in der Vermittlung von äußeren mechanischen Reizen in das Zellinnere und umgekehrt [Vogel06] [Geiger01]. Verbunden damit sind neben den Reaktionen einer Zelle auch selbst generierte Zellkräfte und deren Übertragung auf ihre Umgebung (*zellmechanische Sensoren*, vgl. Abschnitt 1.3.1) [Geiger01] [Cai09] [Gardel08] [Vogel06]. Das Zytoskelett passt sich sowohl den inneren als auch den äußeren Reizen und Bedingungen durch eine Umstrukturierung innerer Bestandteile an [Sheetz10] [Chancellor10] [Bathe08] [Vogel06] [Cannas07] [Neidlinger01] [Wang01] [Cai09].

In diesem Zusammenhang ist das Zytoskelett in vielen grundlegenden Vorgängen, wie z.B. Zellteilung, Migration, Beweglichkeit, mechanische Stabilität, und Gestaltung der Zellmorphologie eingebunden [Fletcher10] [Thery06] [Ingber03] [Goode00] [Li05]. Obwohl mehrere Zellelemente eine Rolle in den mechanosensitiven Eigenschaften einer Zelle und deren Signalwegen spielen, scheint das Aktinnetzwerk die treibende Kraft für diese Vorgänge zu sein, deren Erforschung im Mittelpunkt vieler

biophysikalischer Arbeiten steht [Sheetz10] [Bathe08] [Li05] [Cai09]. Die Abbildung 1.2 auf Seite 15 zeigt eine schematische Darstellung einer Zelle mit den Zytoskelettelementen und den Komponenten der Fokalen Adhäsion.

### 1.1.1 Aktin

Das zelluläre Aktinnetzwerk besteht aus globulären Aktinmonomeren (*G-Aktin*), die je nach Anforderung zu filamentösen Aktinpolymeren (*F-Aktin*) auf- und abgebaut werden können [Prasain09] [Suresh07]. Der Aufbau der Aktinfilamente wird über die Hydrolyse von ATP gesteuert und weist eine inhärente Polarität mit einem plus- (*barbed*) und minus- (*pointed*) Ende auf. Die Aktinfilamente wachsen in Richtung Plus-Pol, da die Polymerisierungsrate an diesem Ende höher ist als am Minus-Pol [Small78]. Obwohl das Aktin im gesamten Zytoplasma einer Zelle vorkommt, befindet sich ein spezieller Anteil des Aktins direkt unterhalb der Plasmamembran, im sog. Zellkortex. Dieser besteht aus einem Geflecht aus einzelnen Aktinfilamenten, das die äußere Zelloberfläche unterstützt und ihr mechanische Festigkeit verleiht [Urban10]. Abhängig von zusätzlichen Proteinen können die Aktinfilamente steife und beständige Strukturen ausbilden, indem diese die Polymerisation der Aktinfilamente steuern und Quervernetzungen ausbilden [Reymann10]. Diese können ein lockeres Netzwerk oder an die Membran gebundene steife Bündel sein. Hierbei können sich 10 bis 30 Aktinfilamente in den Lamellipodien über aktinbindende Proteine wie z.B.  $\alpha$ -Aktinin, Myosin, Filamin und weitere Proteine zu Aktinstressfasern anlagern [Remidos03] [Sjöblom08] [Brawley09] [Deguchi09]. In diesem Zusammenhang führt z.B. Filamin zu einer losen Quervernetzung der Aktinfilamente, während das  $\alpha$ -Aktinin zu einer Anordnung mit einzelnen parallel ausgerichteten Aktinfilamenten führt, die mit Myosin aneinander gebunden und gestaucht werden können [Remidos03] [Pellegrin07]. Die Anbindung von Aktinfilamenten über Myosin verleiht den Aktinstressfasern eine erhöhte Kontraktilität, indem sich einzelne Fasern unter Spannung verschieben lassen (Aktomyosin-Kontraktion) [Fouchard11] [Cai10] [Pellegrin07]. Die Aktinstressfasern verlaufen oftmals quer durch das gesamte Zytoplasma und sorgen für die mechanische Stabilität einer Zelle [Geiger01] [Bischofs08]. Häufig starten und münden die Aktinstressfasern an ihren Enden an den Bindungspunkten bzw. Verankerungen zwischen der Zelle und ihrer Umgebung, dem so genannten fokalen Kontakt [Sheetz10] [Yoshigi05] (vgl. Abschnitt 1.2.3 auf Seite 17). Der Auf- und Abbau von Aktinfilamenten ist eine grundlegende Notwendigkeit, die insbesondere bei der Zellmigration zum Tragen kommt [Pollard09] [Goldyn09] [Wehrle03] [Etienne04]. Die Zelle verstärkt hierzu den Bereich des Aktinnetzwerks

in Migrationsrichtung und schwächt bzw. löst diese im hinteren Teil, um die notwendigen Spannungen innerhalb der Zelle für die Migration zu erzeugen [Bretscher08] [Galbraith02]. Des Weiteren wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten gezeigt, dass das Aktinnetzwerk für die Wahrnehmung von äußeren Kräften und deren Signalübertragung in einem Zusammenhang stehen, indem die Aktinstressfasern Spannungen auf fokale Adhäsionen ausüben und damit ihre weitere Entwicklung beeinflussen [Cai09] [Shutova08] [Cai06] [Bershadsky03] [Geiger01].

### 1.1.2 Intermediärfilament Keratin

Es gibt sechs verschiedene Typen von Intermediärfilamenten, unter denen Keratin speziell in epithelialen Zellen gebildet wird [Fuchs94]. Die kleinste Einheit der Keratinfilamente besteht aus einem zentralen  $\alpha$ -helikalen Proteinstäbchen (*rod-Domäne*), an dessen Ende sich eine Kopf- (*head*) oder Schwanz- (*tail*) Domäne befindet. Lagern sich zwei dieser Polypeptide zusammen, so entsteht ein Dimer, dessen Form aufgrund ihrer hydrophobischen Struktur spiralartig (*coiled-coil*) aufgebaut ist. Die coiled-coil Dimere formen eine Kette, bei der sich jeweils die head-Domäne an die tail-Domäne des nächsten Dimers anlagert. Eine zweite auf gleiche Weise aufgebaute Kette lagert sich an die erste Kette an und bildet mit ihr zusammen das Protofilament. Zwei aneinander gebundene Protofilamente bilden wiederum ein Protofibril. Vier dieser Protofibrils lagern sich schließlich zu einem ca. 10nm dicken Keratinfilament zusammen [Fuchs94]. Die folgende Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung vom Aufbau des Keratins.

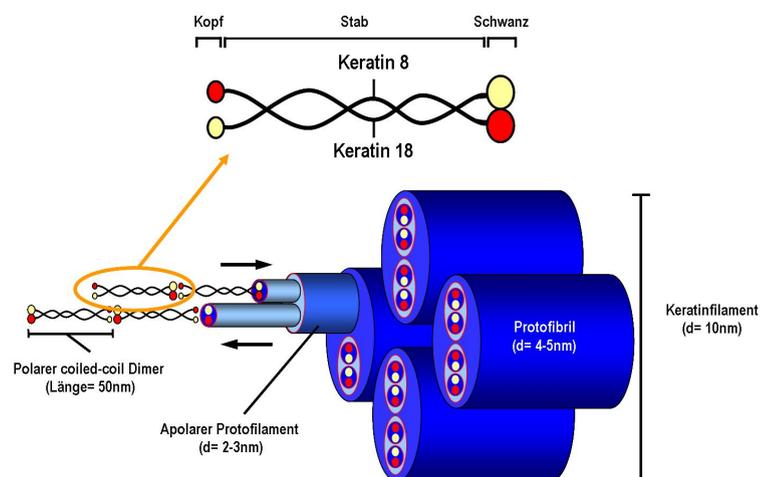


Abbildung 1.1: Darstellung vom Aufbau des Keratins nach [Fuchs98].

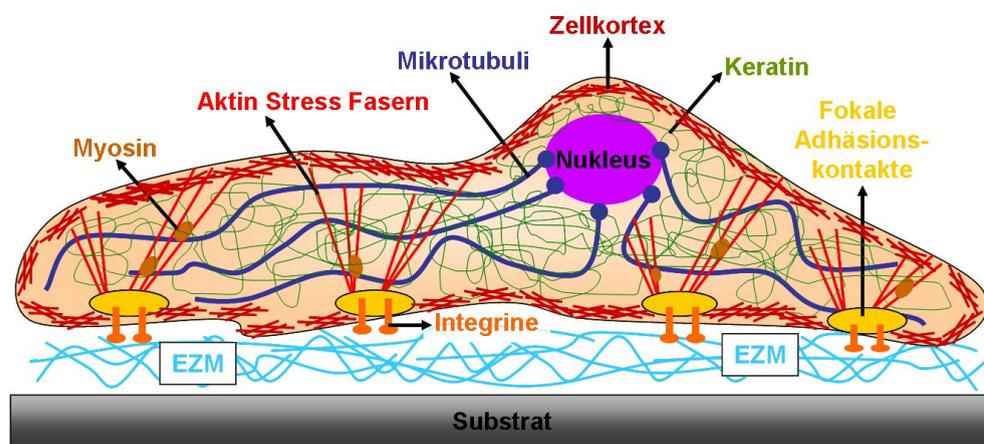
Die Struktur der Keratinfilamente innerhalb der Zelle gleicht einem Bündel, das vom perinuklearen Bereich der Zelle bis hin zur Zellperipherie reicht. Ihr Aufbau besteht aus obligaten Heteropolymeren, die sich jeweils aus einer als Typ I (K9-K20) und einer als Typ II (K1-K8) klassifizierten Untergruppe des Keratins bilden [Hatzfeld85]. Die Kombination aus den zwei Gruppen legt die mechanischen Eigenschaften der Filamente fest [Fuchs98] [Maniotis97] [Yamada02]. Das Filament aus K8 und K18 stellt die häufigste Kombination aus beiden Typen in epithelialen Zellen dar [Fuchs94]. Obwohl das Keratinnetzwerk aufgrund seiner Steifigkeit und seiner zellstrukturbildenden Fähigkeit starr wirken kann, zeigen neuere Forschungsergebnisse, dass es ein hoch dynamisches Element ist, das unter anderem eine Rolle bei Prozessen wie Wachstum, Proliferation, Migration und mechanischer Stabilität spielt [Goldman08] [Russell04] [Windoffer99] [Oriolo07] [Magin07] [Helfand03] [Helfand04]. Als Folge dessen muss das Keratinnetzwerk einem ständigen Umbau (*turn-over*) unterliegen, der schnell moduliert und reorganisiert werden kann. In den letzten Jahren konnte der hierfür notwendige hoch dynamische Mechanismus für den Auf- und Abbau vom Keratinnetzwerk teilweise aufgedeckt werden. Es stellte sich heraus, dass die Vorläufer der Keratinfilamente nah am aktinreichen Zellkortex, konzentriert an den fokalen Adhäsionen, gebildet werden [Windoffer06] [Bessard08]. Im Anschluss wachsen diese in den Lamipodien und werden entlang der Aktinfilamente in das Zellinnere transportiert bis sie schließlich in das bestehende Keratinnetzwerk eingebunden werden [Kölsch09]. Die Transportgeschwindigkeit nimmt hierbei in Richtung Zellkern ab. In zellkernnähe angekommen, löst sich das Keratinfilament nach einiger Zeit wieder auf [Kölsch10].

### 1.1.3 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind starre Hohlzylinder mit einem Durchmesser von ca. 25nm, die durch Polymerisation von dimeren Tubulinuntereinheiten gebildet werden. Dabei handelt es sich um polare Strukturen mit einem schnell wachsenden Plus- und einem langsam wachsenden Minus-Ende, vergleichbar mit den Aktinfilamenten [Alberts]. Die Mikrotubuli sind innerhalb des Zytoskeletts das steifste Element. Im Zytoplasma einer Zelle liegt häufig ein Gleichgewicht zwischen polymerisiertem und depolymerisiertem Tubulin vor. Mikrotubuli werden in den Centrosomen gebildet, wobei das minus-Ende an diese verankert ist. Darüber hinaus zeigen vorangegangene Arbeiten, dass Mikrotubuli mechanosensitiv sind. Wirkt lokal eine äußere Kraft auf die Zelle, so wachsen die Mikrotubuli aus den Centrosomen in subzelluläre Bereiche heraus [Kaverina02] [Suter98]. In diesem Prozess nimmt die Masse vom gelösten Tubuli

im Zytoplasma ab und die vom polymeren Tubulin zu [Putnam98]. Eine Reihe von Proteinen kann zusätzlich die Mikrotubuli stabilisieren, in dem sie sich an das plus-Ende und andere Zellbestandteile binden (*microtubule associated proteins*) [Alberts] [Goode00].

Neben anderen Elementen spielen Mikrotubuli eine grundlegende Rolle in der Zellmigration, Zellteilung und dem Transport von inneren Bestandteilen [Ballestrom00] [Schmoranz03] [Small02] [Wehrle03] [Etienne04] [Ingber95] [Allen85]. Eine Unterbrechung der Mikrotubuli Dynamik verhindert unter anderem die morphologische Umstrukturierung einer Zelle unter Scherströmung, obwohl Aktinstressfasern weitgehend unbeeinflusst bleiben [Malek96] [Hu02].



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung einer Zelle auf einem Substrat mit den Zytoskelettelementen, Zellkortex, Nukleus und weiteren Elementen der Fokalen Adhäsion.

## 1.2 Zelladhäsion

Eine grundlegende Eigenschaft und Voraussetzung für Zellmigration ist die Anhaftung von Zellen an eine Oberfläche. Die Interaktion der Zelle mit ihrer Umgebung nimmt eine zentrale Rolle in vielen verschiedenen Prozessen wie z.B. morphologische Stabilität, Migration, Mobilität, Wundheilung oder Metastasierung bei Krebs ein [Li05] [Hynes09] [Ingber08] [Wang2001]. In den folgenden drei Unterabschnitten sollen die beteiligten Komponenten vorgestellt und kurz erläutert werden.

### 1.2.1 Extra-Zelluläre-Matrix

Der Bereich zwischen einer Zelle und ihrer Umgebung besteht aus einem Geflecht aus Makromolekülen verschiedener Proteine und Polysacchariden, die unter dem Be-

griff Extra-Zelluläre-Matrix (EZM) zusammengefasst werden. Darüber hinaus stellen Zellen lokal Proteine her und sondern diese in die EZM ab, in der sie einer ständigen Umgestaltung unterliegen [Alberts] [Hynes90]. Die faserartigen Proteine in der EZM lassen sich in zwei Hauptgruppen unterteilen. Die erste Gruppe bestimmt die biophysikalischen Eigenschaften und die Struktur der EZM, wie z.B. Kollagen und Elastin. Das Kollagen sorgt *in vivo* für die Zugfestigkeit und das Elastin für die Belastbarkeit des Gewebes. Die zweite Gruppe stellen die Adhäsionsproteine wie z.B. Fibronectin oder Laminin dar. Diese Proteine ermöglichen *in vitro* und *in vivo* die Anhaftung von Zellen an künstliche Substratoberflächen, indem sie häufig als Bindeglied zwischen den Oberflächenrezeptoren einer Zelle (Integrine, vgl. Abschnitt 1.2.2) und der EZM-Umgebung wirken. Fibronectin ist ein Glykolprotein Dimer, das in allen Wirbeltieren vorkommt [Hynes87]. Ihre Struktur besteht aus zwei identischen Untereinheiten, die über Disulfidbrücken an einem Ende verknüpft sind. Die Untereinheiten beinhalten verschiedene Domänen, die spezifische Bindungsstellen für Makro- und Zelladhäsionsmoleküle in der EZM aufweisen. In diesem Zusammenhang bindet sich das Fibronectin an künstliche PDMS-Substratoberflächen und beinhaltet zusätzlich spezifische Bindungsstellen (RGD-Motiv) für die Integrine von Zellen und kann somit die Anhaftung der Zelle an die EZM vermitteln [Ruoslahti87].

## 1.2.2 Integrine

Integrine bezeichnen eine große Gruppe von Zelloberflächenrezeptoren, die eine wichtige Rolle bei der Gestaltung und bei physiologischen Funktionen von Organen spielen. Infolgedessen sind sie an vielen Prozessen wie Zytoskelettorganisation, Adhäsion, Migration, Proliferation und Zelltod beteiligt [Hood02] [Stupack02].

Sie sind nicht kovalent gebundene Heterodimere, die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bestehen [Hynes87]. Derzeit sind 18 verschiedene  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten bekannt, die in mindestens 24 verschiedenen Heterodimeren auftreten. Die Kombination der beiden Untereinheiten bestimmt die Spezifität des gebildeten Integrins für einen EZM-Liganden wie z.B.  $\alpha_V\beta_3$  Integrin an das RGD-Motiv beim Fibronectin [Ruoslahti87].

Darüber hinaus nehmen Integrine eine grundlegende Rolle in der Signaltransduktion der Zelle von außen nach innen und umgekehrt ein [Hynes02]. In diesem Zusammenhang binden sich die Integrine in der zytosolischen Domäne der  $\beta$ -Untereinheit an intrazelluläre Ankerproteine, wie Talin,  $\alpha$ -Aktinin und Filamin. Diese können sich direkt oder erneut über Ankerproteine wie Vinkulin an das Aktinzytoskelett binden und aufgrund dessen Kräfte von außen nach innen und umgekehrt vermitteln

[Puklin-Faucher09].

Zellen können zusätzlich die Aktivität der Integrine über ihre Affinität zu den spezifischen Rezeptoren regulieren. Dies erfolgt über die Aktivierung der Integrine. In der inaktiven Phase sind die Bindungsstellen der Integrine durch die angewinkelten Kopf- und Endstücke des Proteins räumlich geschützt und können nicht durch die Rezeptoren erreicht werden. In der aktiven Phase ändert sich die angewinkelte Form des Proteins derart, dass die Bindungsstellen zugänglich für die Rezeptoren werden [Carman03].

### 1.2.3 Fokale Adhäsion

Fokale Adhäsionen (FA) sind Proteinkomplexe bestehend aus vielen Molekülen, die eine regulierende Funktion haben [Geiger01] [Geiger09]. Sie ermöglichen die Anhaftung von Zellen an ihre extrazelluläre Matrix (EZM) und werden über ein Zusammenspiel vom Zytoskelett und spezifischen Adhäsionsstrukturen realisiert [Zamir01]. Die Funktion dieser Komplexe besteht darin, mittels transmembraner Proteine (vgl. Integrine in Abschnitt 1.2.2) einen Kontakt zwischen dem Zellinneren und der EZM aufzubauen [Geiger01]. Die transmembranen Integrinmoleküle sind im inneren Teil der Zelle über den Fokalen Komplex Plaque an das Aktin-Zytoskelett gekoppelt [Berrier07] [Humphries07]. Diese Kopplung erfolgt jedoch nicht direkt, sondern durch einen großen Proteinkomplex bestehend aus bis zu 100 Proteinen [Puklin-Faucher09]. Die Verbindung vom Aktin-Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix über FA ermöglicht es der Zelle, sowohl äußere mechanische Reize in das Zellinnere zu leiten und darauf zu reagieren, als auch selbst Zellkräfte zu generieren und diese auf die extrazelluläre Matrix zu übertragen [Frame10] [Geiger09] [Rape10]. In diesem Zusammenhang werden Fokale Adhäsionen oft in Verbindung mit *Mechano-Sensoren* (vgl. Abschnitt 1.3.1) gebracht [Geiger02] [Katsumi04] [Galbraith02] [Vogel06]. Die Lebensdauer, Größe und Form der FA wird maßgeblich über wirkende Kräfte auf die FA bestimmt, unabhängig davon ob es sich um geäußerte Kräfte des Zytoskeletts oder um äußere Kräfte handelt [Yoshigi05] [Mould04] [Nicolas04]. Diese Eigenschaften sind auf die FA und Integrine wirkenden Kräfte zurück zu führen, die eine vermehrte Integrin-Aktivierung zur Folge hat und damit die Fokale Adhäsion durch einen anwachsenden Plaque verstärkt [Katsumi04] [Tamada04].

Darüber hinaus spielen Mikrotubuli neben dem Aktinnetzwerk ebenfalls eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer FA, indem sie ihre Dynamik, Form und Stabilität beeinflussen [Small02] [Kaverina02].

## 1.3 Zell-Mechanik

Lebende Zellen sind in der Regel in einer mechanischen Umgebung eingebettet, die sich ständig verändern kann. Ein gängiges Beispiel stellt der Puls in den Blutgefäßen dar, bei der die Zellen einer ständigen Kompression und Dehnung in den Adern und Venen ausgesetzt sind. Sie müssen daher in der Lage sein, sich an diese mechanischen Veränderungen anzupassen [Campbell10]. Daher spielen die mechanischen Eigenschaften und Wechselwirkungen von Zellkomponenten sowie innere Spannungen des Zytoskeletts eine grundlegende Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen wie z.B. Adhäsion, mechanische Stabilität und vor allem in der Zellmigration [Wehrle03] [Chen97] [Schoumacher10]. In den folgenden Unterabschnitten werden einige Punkte zu diesem Thema, die mit dieser Arbeit eng verbunden sind, vorgestellt.

### 1.3.1 Zellmechanische Sensoren

Die Wahrnehmung der Umgebung einer Zelle und deren Veränderungen sind zusammen mit einer entsprechenden Reaktion auf diese eine überlebenswichtige Fähigkeit [Geiger02] [Katsumi04] [Vogel06]. Die Signalübertragung über Fokale Adhäsion versorgt eine Zelle darüber hinaus mit wichtigen Informationen über die mechanischen Eigenschaften ihrer unmittelbaren Umgebung wie z.B. die topographische Beschaffenheit oder Steifigkeit, und ermöglicht es der Zelle sich darauf einzustellen [Bershadsky06] [Pelham97] [Bischofs03]. Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit ist in diesem Zusammenhang die Zellreaktion der Panc-1 Zellen auf eine topographisch veränderte Umgebung, die z.B. die Migrationseigenschaften beeinflussen (vgl. Abschnitt 1.3.2). Infolgedessen ist die zelluläre mechanische Wahrnehmung ein sehr komplexer Prozess, der bis heute nicht vollständig verstanden ist. Wirkt ein mechanischer Reiz auf die FA einer Zelle, so wird eine Kaskade von Proteinreaktionen und die Aktin-Myosin Maschinerie in Gang gesetzt, die zusammen letztendlich zu einer Zellreaktion führen [Mizutani2009] [Wang06] [Lee10]. In diesem Prozess wirken eine ganze Reihe von Proteinen und Mechanismen zusammen und treten darüber hinaus gegenseitig in Wechselwirkung, wodurch einzelne Zusammenhänge nahezu unmöglich festzustellen sind [Schwartz09] [Puklin-Faucher09] [Geiger01]. Infolgedessen gestaltet es sich als sehr schwierig eine klare Definition von zellmechanischen Sensoren eindeutig zu definieren. Der Sachverhalt deutet eher auf ein Zusammenspiel verschiedener Elemente hin, die in ihrer Gesamtheit als zellmechanische Sensoren wirken. Hierzu wurden in der Vergangenheit eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um die mechanosensitiven Eigenschaften von Zellen zu untersuchen [Ingber2003] [Wang06] [Alenghat02]. Einige der bekanntesten Beispiele für die zellmechanischen Sensorele-

mente sind neben anderen z.B. Dehnungsaktivierte Ionenkanäle, Integrin vermittelte Fokale Adhäsion und das Zytoskelettsystem [Hayakawa08] [Geiger09] [Matthews06] [Schoumacher10].

### 1.3.2 Zell-Migration

Migration ist eine essentielle Fähigkeit von Zellen, die sowohl in physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen im menschlichen Körper eine wichtige Funktion einnimmt. Sie spielt neben anderen Zellfunktionen eine Schlüsselrolle bei Embryogenese, Wundheilung und Metastasierung bei Krebs [Keller02] [Wang2001] [Ingber08]. Im Allgemeinen unterliegen Zellen während der Migration physikalischen und chemischen Signalen, die zusammen den Migrationsmechanismus dirigieren [Fouchard11] [Hood02] [Wang2001]. Bekannte Vertreter der physikalischen Signale sind *Durotaxis* und *Contact-Guidance*. Durotaxis beschreibt in diesem Zusammenhang die Beeinflussung der Migrationsrichtung durch die Veränderung der Oberflächensteifigkeit, bei den Zellen bevorzugt in Richtung der steiferen Bereiche der Oberfläche migrieren [Lo00] [Pelham97] [Wang2001]. Bei der Contact-Guidance wird die Migrationsrichtung durch eine veränderte Oberflächengeometrie beeinflusst, die je nach Beschaffenheit der Topographie eine bevorzugte Migrationsrichtung vorgeben kann [Loesberg06] [Doyle09]. So können mikro- oder nanostrukturierte Oberflächen die Migrationsrichtung beeinflussen, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurden [Teixeira03] [Frey06] [Saez07] [Hamilton10]. Als chemische Signale dienen meist attraktive Lockstoffe, die die Migration der Zellen entlang eines Gradienten hin zum Lockstoff lenken [Haastert10]. Der Migrationsprozess wird hierbei hauptsächlich durch die Umstrukturierung des Zytoskeletts zusammen mit der Bildung und Auflösung von Fokalen Adhäsionen gesteuert [Wehrle03] [Etienne04] [Ballestrem00]. Sie lässt sich in vier Teilschritte gliedern [Ridley03] [Bretscher08]:

- (a) Bildung der Vorläufer am führenden Zellrand (*Protrusion*)
- (b) Adhäsion an die Extra-Zelluläre-Matrix
- (c) Verlagerung vom Schwerpunkt der Zelle in Migrationsrichtung
- (d) Lösen und Abzug des hinteren Zellkörpers

In diesem Zusammenhang ist das Aktinzytoskelett die treibende Kraft für den vorderen Bereich der Zellperipherie, der die Bildung und Förderung der Vorläufer bestimmt [Clainche08] [Wehrle03] [Li05]. Nach der Ausbildung der Vorläufer setzen die Fokalen Adhäsionen mittels der Integrine ein [Puklin-Faucher09] [Geiger01] [Geiger09]. Sie dienen als Ankerpunkte für die darauf folgenden Zugkräfte, die vom Aktinnetzwerk geäußert werden [Pellegrin07]. Im dritten Schritt wird mittels des

Aktinnetzwerks der Zellkörper verlagert. Im letzten Teilschritt werden die Fokalen Adhäsionen im hinteren Bereich der Zelle gelöst, bei der überwiegend Mikrotubuli wirken [Ballestrem00] [Ridley03] [Doyle09].

### 1.3.3 Morphologische Zellreorganization durch Kräfte

Ein interessantes Teilgebiet der Zellforschung stellt die morphologische Umstrukturierung einer Zelle aufgrund von wirkenden Kräften dar [Wang01] [Chancellor10]. Diese treten in vivo z.B. bei Kompression, Dehnung und Scherkräften in den Blutgefäßen auf [Malek96] [Suciu97]. Auf Zellen wirkende Kräfte spielen sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Prozessen wie z.B. Embryogenese, Zellteilung und Wundheilung eine wichtige Rolle [Ingber2003-1] [Alenghat02]. In diesem Zusammenhang dienen die wirkenden Kräfte häufig als Signale auf Zellen, indem sie z.B. die Zellmorphologie, Migrationsrichtung, Fokale Adhäsionen oder innere Bestandteile wie das Aktinnetzwerk beeinflussen und bestimmte Zellreaktionen hervorrufen [Hayakawa00] [Lee10] [Rape10] [Goldyn09].

Eine weit verbreitete Methode um mechanische Kräfte künstlich von außen auf Zellen wirken zu lassen, stellen Dehnungsversuche dar (vgl. Abschnitt 2.3.2 auf Seite 44). In diesen können adhärenente Zellen auf elastische Substrate, wie z.B. aus PDMS, gedehnt bzw. gestaucht werden und dadurch Kräfte auf die Zellen ausüben [Jung]. Besonderes Interesse erfährt die Morphologie der Zelle und die Umstrukturierung innerer Bestandteile wie des Aktinnetzwerks.

Im Folgenden sollen kurz die allgemeinen Erkenntnisse vorgestellt werden.

**Morphologie** Die meisten adhärenenten Zellen reagieren bei zyklischer uniaxialer Spannung des Substrates mit einer Minimierung der Adhäsionsfläche in Zugrichtung [Cannas07] [Jung] [Jung08]. In diesem Zusammenhang zeigen vorangegangene Arbeiten, dass der Grad der Ausrichtung bei den meisten Zellen von der Amplitude der Dehnung abhängt [Neidlinger01] [Jung08]. Ähnlich verhält es sich mit der Dauer der zellmorphologischen Umstrukturierung senkrecht zur Zugrichtung. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der benötigten Zeit zur Neuausrichtung der Zelle und der steigenden Amplitude beim Ziehen des Substrates nach Überschreiten einer Schwelle [Jung] [Jung08]. In der Vergangenheit wurde neben der Amplitudenabhängigkeit auch die Rate der Dehnung pro Zeiteinheit näher untersucht, um deren Wirkung auf die Umstrukturierung der Zellmorphologie zu bestimmen. Die Raten reichen von 0.0001Hz bis 20Hz. In den meisten Experimenten wurde überwiegend eine Frequenz von ca. 1Hz verwendet, ähnlich dem physiologischen Ruhepuls von

Menschen. Einige Arbeiten berichten darüber hinaus, dass eine kritische Dehnungsfrequenz  $f_c$  überschritten werden muss, bevor die morphologische Umstrukturierung einer Zelle als Reaktion auf eine uniaxiale zyklische Dehnung einsetzt [Wei08] [Jung08]. Im Gegensatz dazu berichten andere Arbeiten, dass die Umstrukturierung der Zelle nicht abhängig von der Rate des Ziehens ist, sondern von der Amplitude der Dehnung abhängt [Wang01] [Cannas07]. Die Resultate der genannten Arbeiten führen zu widersprüchlichen Ergebnissen und unterscheiden sich im Verhalten der Zellen. Dies wird im Allgemeinen der unterschiedlichen Reaktionsfähigkeit und den verwendeten Frequenzen zugeschrieben, die je nach verwendeter Zelllinie durch ihre unterschiedlichen Eigenschaften abweichen kann.

**Innere Bestandteile** Abgesehen von den morphologischen Veränderungen, können wirkende Kräfte auf eine Zelle darüber hinaus auch zellinnere Bestandteile wie z.B. das Aktinnetzwerk beeinflussen [Pollard09] [Pellegrin07] [Suciu97] [Wehrle03]. Es gibt zahlreiche Untersuchungen bezüglich der Umstrukturierung des Aktinnetzwerks unter uniaxialer zyklischer Dehnung. In allen Arbeiten zeigte sich, dass die anfänglich zufällig orientierten Aktinstressfasern, sich senkrecht zur Zugrichtung umstrukturieren [Yoshigi05] [Cannas07] [Dartsch89] [Wang01] [Kaunas05]. Arbeiten von Hayakawa et al. berichten, dass die Umstrukturierung der Aktinstressfasern senkrecht zur Zugrichtung bereits nach 15 Minuten zu erkennen ist, während die morphologische Ausrichtung der Zelle zwei bis drei Stunden beträgt [Hayakawa00]. Zusätzliche Untersuchungen mit aktinaufbau-hemmenden Stoffen wie Cytochalasin B und D zeigen, dass der Umstrukturierungsprozess ausbleibt. Infolgedessen muss das Aktinnetzwerk eine entscheidende Rolle bei der morphologischen Umstrukturierung spielen [Hornberger05] [Langevin05]. Die Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass aufgrund der Zeitverzögerung zwischen der Aktinumstrukturierung und Zellmorphologie zusätzliche Mechanismen wie z.B. Fokale Adhäsionen wirksam sein könnten. So ist beispielsweise bekannt, dass Fokale Adhäsionen unter Krafteinwirkung anwachsen [Bershadsky03] [Balaban01]. Dabei steht die wirkende Kraft auf die FA in einem linearen Zusammenhang mit ihrer lateralen Größe [Kong08]. Zusätzlich zeigen andere Arbeiten eine Ausrichtung der FA senkrecht zur Zugrichtung unter uniaxialer zyklischer Dehnung des Substrates, ähnlich wie die Umgestaltung der Zellmorphologie [Yoshigi05] [Kaunas05] [Kong08].

Neu entwickelte Methoden ermöglichen inzwischen nicht nur Kräfte auf Zellen wirken zu lassen, sondern auch die geäußerten Kräfte von Zellen zu messen [Kaunas05] [Lee10]. Hierzu dienen z.B. mikrostrukturierte Oberflächen wie die Säulen Substrate (vgl. Abschnitt 2.1.3 auf Seite 37) [Sniadecki07] [Tan03]. Sie ermöglichen über die Auslenkungen der Säulenspitzen die geäußerten Kräfte von Zellen nach außen zu messen [Roure05] [Cesa07].

Zusammenfassend lässt sich die weit verbreitete allgemeine Hypothese aufstellen, dass unter uniaxialer zyklischer Spannungen stehende Zellen, ihre Morphologie und andere Elemente wie das Aktinnetzwerk und Fokale Adhäsionen senkrecht zur Zugrichtung ausrichten und anpassen, um Spannungen innerhalb der Zelle zu minimieren und Störungen der inneren Bestandteile zu mindern [Jung08] [Yoshigi03].

### 1.3.4 SPC-Effekt auf das Keratin-Zytoskelett

Sphingosylphosphorylcholin (SPC) ist ein natürlicher biologisch aktiver Lipid, der bei Frauen mit Eierstockkrebs in einem erhöhtem Maß vorkommt. Es ist an einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie z.B. Wundheilung, Zellmigration und Zellwachstum beteiligt [Wakita98] [Boguslawski00] [Seufferlein95]. Darüber hinaus wird ihm eine wichtige Funktion in der Krebsbiologie, speziell bei der Metastasierung, nachgesagt [Boguslawski00] [Pyne10]. In diesem Zusammenhang untersuchte Beil et al. die Wirkung von SPC auf das Keratinnetzwerk [Beil03]. Es zeigte sich, dass die SPC-Behandlung, einhergehend mit einer Veränderung der viskoelastischen Eigenschaften der Zelle, zu einer Umstrukturierung des Keratinnetzwerks im Zytoplasma führt. Hierbei wird das anfängliche Keratinnetzwerk, das normalerweise maschenartig gebündelt vom perinuklearen Bereich der Zelle bis hin zur Zellperipherie reicht, umstrukturiert [Windoffer06] [Hatzfeld85]. Die Ursache der Umstrukturierung wird der einhergehenden SPC induzierten Phosphorylierung an der Stelle Ser52 am K18 Polymer zugeschrieben [Omary98]. Experimente mit phosphorylierungshemmenden Mitteln zeigten ein Ausbleiben der Umstrukturierung [Toivola97]. Nach etwa 15 Min. der Zugabe vom SPC startet die Umstrukturierung der Keratinfilamente von der anfänglich bis zur Zellperipherie ausgeweiteten Form in eine perinukleare, ringartige Struktur [Beil03]. Die Umstrukturierung erreicht nach etwa 45 Min. ihren Höhepunkt. In diesem Zustand ist der größte Teil des Keratins um den Nukleus herum konzentriert [Beil03] [Kölsch10] [Kölsch09].

Die Auswirkungen auf das Zytoskelett und dem damit verbundenem Zellverhalten, wie Zellmorphologie, Migration und Orientierung der einzelnen Elemente wie Aktin, Keratin und deren Interaktion war die Zielsetzung dieser Doktorarbeit.

## 1.4 Physikalische Zellmodelle

Biologisches Gewebe und besonders Zellen sind hochkomplexe Systeme, die neben anderen Komponenten hauptsächlich aus einem polymerbasiertem Material aufgebaut sind. Ihr Verhalten und ihre Reaktion auf Signale von außen werden größtenteils von den Veränderungen der unmittelbaren Umgebung (EZM) beeinflusst [Geiger02] [Geiger09]. Einfache physikalische Modelle können das Verhalten einer Zelle als Reaktion auf ein Signal von außen beschreiben und wiedergeben. In den letzten Jahrzehnten wurden einige Modelle für das Zellverhalten entwickelt, die jede für sich zwar gewisse Aspekte und Reaktionen von Zellen richtig vorhersagen und im Einklang mit gemessenen Werten stehen, jedoch erscheint ein vereinigtes Gesamtmodell für eine Zelle im Moment nicht erreichbar [Kasza07] [Trepap07] [Ingber2008] [Schwarz06]. In den folgenden Unterabschnitten werden hierzu einige Modelle zur Charakterisierung von Zellen und ihren Eigenschaften vorgestellt.

### 1.4.1 Viskoelastische Materialien

Eine charakteristische Eigenschaft eines Materials ist das Verhalten auf eine angelegte mechanische Spannung oder Dehnung. In der Regel hängt die Veränderung von der Rate bzw. der Dauer der angelegten Belastung ab. Diese Abhängigkeit kann zur Unterscheidung herangezogen werden, ob es sich beim Material, um einen elastischen Festkörper oder eine viskose Flüssigkeit handelt. In diesem Zusammenhang werden Zellen als viskoelastische Materialien bezeichnet, da sie Charakteristika beider Zustände aufweisen [Kasza07]. Die Deformation eines Materials als Reaktion auf eine mechanische Belastung kann über das Hookesche Gesetz in Gleichung 1.1 beschrieben werden. Die Gleichung 1.1 beschreibt das elastische Verhalten von Festkörpern, deren elastische Verformung proportional zur einwirkenden Belastung ist. Dieses Verhalten ist z. B. typisch für Metalle bei kleinen Belastungen.

$$\sigma = E_y \epsilon \quad \text{bzw.} \quad \frac{d\sigma}{dt} = E_y \frac{d\epsilon}{dt} \quad (1.1)$$

Hierbei beschreibt  $\sigma$  die angelegte Spannung zur resultierenden Dehnungsrate  $d\epsilon/dt$  mit  $E_y$  als das Elastizitätsmodul. Wird das Elastizitätsmodul  $E$  durch die Viskosität  $\eta$  ersetzt, so erhält man das viskose Verhalten von Flüssigkeiten. Die Gleichung 1.1 beruht auf einer linearen Annäherung des Spannungs-  $\sigma_{ij}$  und Dehnungstensors  $\epsilon_{ij}$ , bei der sie einem zwei Komponenten System als elastische Feder mit dem Elastizitätsmodul  $E$  und einem Dämpfungsglied mit der Viskosität  $\eta$  entspricht. Es gibt eine Reihe von Verknüpfungen für Gleichung 1.1 in mehreren Modellen, die zur Be-

schreibung von viskoelastischem Verhalten biologischer Materialien dienen [Fung93] [Thoumine99]. Zwei einfache Systeme aus den Verknüpfungsmöglichkeiten stellt das Maxwell- und Kelvin-Model dar.

Das Maxwell-Model beschreibt vorrangig newtonsche Flüssigkeiten und Strömungen. Die Verknüpfung beider Komponenten besteht aus einer in Reihe geschalteten Feder und einem Dämpfungsglied. Auf diese Weise summieren sich die Elemente der Dehnung im System unter einer gleichmäßigen Spannung  $\sigma$  zu:

$$\sigma = \sigma_1 = \sigma_2 \quad \text{und} \quad \epsilon = \epsilon_1 + \epsilon_2 \quad (1.2)$$

Setzt man die Gleichung 1.1 in die differenzierte Gleichung 1.2 ein, so ergibt sich für das Maxwell-Model folgende Gleichung:

$$\frac{d\epsilon}{dt} = \frac{1}{E} \frac{d\sigma}{dt} + \frac{\sigma}{\eta} \quad (1.3)$$

Im Falle der gleichmäßigen Dehnung  $\epsilon = \epsilon_0$  kann die Gleichung 1.3 leicht integriert werden und sagt einen exponentiellen Abfall der Spannung des Materials mit der charakteristischen Relaxationszeit  $\tau_0 = \eta/E$  vorher:

$$\sigma = \sigma_0 e^{-t/\tau_0} \quad (1.4)$$

Das Kelvin-Model besteht aus denselben Elementen wie das Maxwell-Model, jedoch mit dem Unterschied, dass die Elemente parallel statt in Reihe geschaltet sind. Diese Anordnung der Feder und des Dämpfungsglieds führt zu einer gleichförmigen Dehnung statt einer Spannung wie beim Maxwell-Model. Die Gesamtspannung lässt sich ähnlich wie Gleichung 1.2 mit  $\epsilon = \epsilon_1 = \epsilon_2$  und  $\sigma = \sigma_1 + \sigma_2$  aufsummieren. Die einzelnen Teilspannungen können über die entsprechende Gleichung 1.1 erhalten werden. Setzt man diese in  $\sigma$  und  $\epsilon$  ein, so kann das Kelvin-Model wie folgt beschrieben werden:

$$\frac{d\epsilon}{dt} = \frac{\sigma}{\eta} - E \frac{\epsilon}{\eta} \quad (1.5)$$

Unter einer gleichmäßigen Spannung  $\sigma = \sigma_0$  hat die Differentialgleichung 1.5 mit  $\epsilon = J(t) \sigma$  eine einfache Lösung. Hierbei stellt  $J(t)$  eine Art Kriechfunktion dar (*creep compliance function*). Im Einzelnen sieht die Gleichung mit der charakteristischen Relaxationszeit  $\tau_0 = \eta/E$  wie folgt aus:

$$\epsilon = \frac{\sigma_0}{E} (1 - e^{-t/\tau_0}) \quad (1.6)$$

Die Funktion  $J(t)$  beschreibt den Verlauf der Materialdehnung während einer angelegten gleichmäßigen Spannung. Die erzielte Dehnung des viskoelastischen Körpers wird aber durch das Dämpfungsglied mit der Viskosität  $\eta$  zeitlich verzögert. Im Gegensatz dazu beschreibt die Relaxationsfunktion die Veränderungen einer Druck- oder Zugspannung während einer gleichmäßigen Dehnung.

Aufgrund der komplexen Struktur von Zellen und ihren viskoelastischen Eigenschaften kann sie nicht durch ein einziges Maxwell- oder Kelvin-Modell beschrieben werden. Daher geht man zu verallgemeinerten Modellen mit verketteten Verknüpfungen dieser Modelle über. Obwohl in den letzten Jahren neue Ansätze entwickelt und geprüft wurden, konnten sich nur wenige Modelle auf dieser Basis für vereinfachte Situationen etablieren. So wird beispielsweise das Kelvin-Modell zur Beschreibung für Experimente mit beidseitig adhärennten Zellen an zwei gegenüberliegenden Oberflächen verwendet, wie z.B. bei der *single cell force spectroscopy* [Schmitz08] [Beil03].

### 1.4.2 Two-string-Model

Die Wechselwirkung zwischen einer Zelle und ihrer unmittelbaren Umgebung (EZM) über Fokale Adhäsionen ist eine Schlüsselfähigkeit, die an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt ist [Li05] [Ingber08] [Wang2001]. Das Verhalten von adhärennten Zellen wird maßgeblich von den chemischen, topographischen und mechanischen Eigenschaften der Oberfläche, an dem sie anhaften, bestimmt [Curtis98] [Curtis01]. In diesem Zusammenhang dienen die Fokalen Adhäsionen als mechanische Sensoren (vgl. Abschnitt 1.2.3 auf Seite 17 und Abschnitt 1.3.1 auf Seite 18) [Geiger02] [Katsumi04]. Folglich wird angenommen, dass die Ausbildung einer Fokalen Adhäsion der erste Schritt der mechanischen Signalübertragung darstellt [Vogel06]. Im Verlauf dieses Prozesses äußert die Zelle Kräfte auf ihre EZM aus und reagiert auf die elastischen Eigenschaften der Umgebung ähnlich zur erzielten Auslenkung einer Feder durch eine wirkende Kraft. In diesem Zusammenhang wurde in den letzten Jahren ein Modell für die prinzipielle biomolekulare Bindung der Zelle an die EZM entwickelt, die die intrazellulären Kräfte und extrazelluläre Elastizität verknüpft und als *two-spring model* von Schwarz U. et al. bezeichnet wird [Seifert00] [Schwarz06]. Dieses Modell beschreibt die Wechselwirkung der Zelle mit ihrer Umgebung, bei der intrazelluläre Kräfte und elastische Eigenschaften der EZM durch harmonische Federn verkörpert werden, die in Reihe geschaltet sind. Die effektive Federkonstante  $K$  des gesamten Systems wird durch die Reihenschaltung der

Federn in der Gleichung 1.7 beschrieben:

$$\frac{1}{K} = \frac{1}{K_e} + \frac{1}{K_i} \quad (1.7)$$

Die effektive Federkonstante  $K$  wird hauptsächlich durch die Feder mit der kleineren Federkonstanten bestimmt. Die aufgrund von intrazellulären Kräften erzeugten Spannungen in der Zelle werden hauptsächlich über die Verschiebung der molekularen Motoren wie z.B. MyosinII gesteuert und können daher über eine linearisierte Kraft-Geschwindigkeits-Relation  $\nu(F)$  dargestellt werden [Chancellor10]:

$$\nu(F) = \nu_0 \left( 1 - \frac{F}{F_S} \right) \quad (1.8)$$

Hierbei beschreibt  $\nu(F)$  die molekulare Motorgeschwindigkeit und  $F_S$  die maximale Stellkraft. Während der Kraftwirkung steht die Feder unter Spannung und kann die Energie im statischen Fall nach  $W = F^2/2K$  speichern. Folglich muss weniger Arbeit für ein gewisses Grad an Kraft investiert werden, je steifer die Umgebung ist. Im dynamischen Fall gilt  $dW/dF = F/K$ . Die aufgewendete Energie der Zelle auf ihr Zytoskelett lässt sich dadurch mittels Gleichung 1.8 zu folgender Gleichung 1.9 bestimmen:

$$\frac{dW}{dt} = \frac{F}{K} \frac{dF}{dt} = F \cdot \nu(F) \quad (1.9)$$

Integration von Gleichung 1.9 führt zur folgenden Gleichung mit der charakteristischen Zeit  $t_k = F_S/\nu_0 K$ . :

$$F(t) = F_S \left( 1 - e^{-t/t_k} \right) \quad (1.10)$$

Letztendlich steht die mittlere Lebensdauer  $T$  der Bindung in einem reziproken Verhältnis zu deren Auflösungsrate  $k_{off}$  [Bell78]:

$$T = \frac{1}{k_{off}} = \frac{1}{k_0} e^{-F_S/F} \quad (1.11)$$

Gesetzt den Fall einer steifen Umgebung, einhergehend mit einem hohen Wert für  $K$  und unter der Annahme einer gleichmäßigen Elastizität  $K_i$  der beteiligten intrazellulären Strukturen, lässt sich unter Verwendung der Gleichungen 1.10 und 1.11 schlussfolgern, dass die charakteristische Zeit für die Kraftübertragung kleiner ist als die mittlere Lebensdauer der Bindung ( $t_k < T$ ) [Bell78] [Schwarz06]. In diesem Fall misst die Zelle die konstante Belastung mit der maximalen Stellkraft  $F_S$ . Sind die Verhältnisse der Umgebung weicher und damit  $K$  kleiner, so ist die Belastung

näherungsweise linear zu ihrer Rate  $F_S/t_k$ . In diesem Fall ist die charakteristische Zeit größer als die mittlere Lebensdauer der Bindung ( $t_k > T$ ). Dies hat zur Folge, dass die Bindung mit der Dissoziationsrate  $k_0$  zerfällt bevor die Wirkung der Kraft relevant wird.

Zusammenfassend beschreibt dieses Model die Wechselwirkung einer Zelle mit ihrer EZM mittels der Fokalen Adhäsionen, die Kräfte übertragen können. Zur Ausbildung einer FA ist ein gewisser Grad von Kräften nötig, um relevante Signalwege zu aktivieren. Nur wenn lokal eine Mindeststeifigkeit vorhanden ist, können genug Kräfte geäußert werden, um eine FA auszubilden. Verschiedene Experimente mit Steifigkeitsgradienten der Substratoberfläche zeigen in diesem Zusammenhang z.B. eine bevorzugte Polarisierung und Migrationsrichtung der Zellen hin zu steiferen Bereichen der Substratoberflächen (*Durotaxis*) [Lo00] [Saez07] [Pelham97] [Wang2001].

### 1.4.3 Tensegrity-Model

Jede adhärente eukaryotische Zelle übt Kräfte auf ihre Umgebung aus. Darüber hinaus unterliegen angesiedelte Zellen im Herzen, Lunge oder Darm einer ständigen periodischen Kraft z.B. in Form von Dehnung. Als Reaktion auf eine solche Kraft können Zellen ihr Zytoskelett versteifen, Zugkräfte erhöhen und sich den Gegebenheiten durch Umstrukturierung innerer Bestandteile wie das Aktinnetzwerk anpassen [Yoshigi05] [Chancellor10] [Wang01]. Das *Tensegrity-Model* beschreibt in diesem Zusammenhang den Aufbau einer Zelle als Ganzes und deren interne Elemente zur Stabilisierung der Morphologie [Ingber95] [Ingber03] [Ingber2003] [Ingber2008]. Hierbei ist Tensegrity ein englisches Kofferwort, das aus tension (Zugspannung) und integrity (Integrität) zusammengesetzt ist.

Ausgangspunkt von diesem Model ist, dass die ganze Zelle als ein vorgespanntes Gerüst betrachtet wird. In diesem Zusammenhang werden Zugkräfte von Aktin- und Intermediärfilamenten des Zytoskeletts ausgeübt und durch Strukturen wie Fokale Adhäsionen und Mikrotubuli als Druckstäbe ausgeglichen, die der Kompression entgegenwirken [Ingber03]. Darüber hinaus können, je nach Struktur oder Größe, einzelne Filamente gleichzeitig zwei Funktionen wie Druck oder Zugspannung ausüben. Ein Beispiel hierfür sind z.B. steife Aktinfilamentbündel, die Druckspannungen in den Filopodien ausüben können. Die Zugspannungen für die Stabilisierung der Zelle werden hauptsächlich über die zusammenziehbare Aktinmyosin Maschinerie erzeugt [Cai10] [Mizutani2009]. Einen weiteren Beitrag zur Vorspannung der Zelle entammt der Zelldeformation aus einer FA und den erzeugten Kräften bei der Filamentpolymerisierung. Zusätzlich können Intermediärfilamente entlang ihrer

Struktur Aktinfasern, Mikrotubuli und die Oberfläche des Nukleus an vielen Stellen miteinander verbinden [Fuchs94] [Fuchs98] [Goldman08]. Sie erhöhen auf diese Weise die mechanische Festigkeit der Zelle, durch ihre Fähigkeit als verknüpfende Seile zu wirken [Goldman08] [Helfand04] [Helfand03]. Darüber hinaus ist das Zytoskelett an der Zellperipherie mit einem hoch elastischen Kortikalnetzwerk direkt unterhalb der Zellmembran verbunden. Dies ermöglicht ihr über die FA einen direkten Kontakt nach außen herzustellen und die FA als Sensor zu benutzen (vgl. Abschnitt 1.3.1 auf Seite 18). Auf diese Weise können z.B. lokale Veränderungen der EZM oder Deformationen der Zellmorphologie einen unterschiedlichen Grad von Kräften erzeugen, was eine veränderte intrazelluläre Biochemie und Mechanik zur Folge hat. Diese Veränderungen können unterschiedliche Signale als Reaktion hervorrufen, die das Schicksal der Zelle wie z.B. das Zellwachstum, die Differenzierung und den Zelltod beeinflussen [Chen97].

Eine einzigartige Eigenschaft, die die Tensegrity Architektur und lebende Zellen ebenso gemeinsam haben, ist ihre strukturelle Hierarchie, die Systeme in Systemen verschachtelt. So kann beispielsweise der Nukleus einer Zelle in eine andere nukleusfreie Zelle eingesetzt werden, in der sie nach einem Verbinden an ihre neue Umgebung ihrer Funktion weiter nachgehen kann und folglich nicht an die Ursprungszelle gebunden ist [Ingber03].

Eine häufig verwendete Verbildlichung des Tensegrity-Modells stellt ein geodätisches Zelt dar. Bei diesem Vergleich entsprechen die Verankerungen im Boden den Fokalen Adhäsionen, das Zelt selber der Zellmembran und die Seile und Stangen den Zytoskelettelementen wie Aktin- und Intermediärfilamenten, die die Zelle aufspannen. Wirkt eine Kraft auf eine Zelle oder äußert diese Kraft nach außen, so wird eine Kaskade von Signalen ausgelöst und das Gerüst passt sich den neuen Gegebenheiten an, indem die zellinneren Bestandteile umorganisiert werden, bis sie ein neues Gleichgewicht zwischen den Druck- und Zugspannungen erreichen. Die Vorteile einer solchen Tensegrity-Architektur der Zelle mit isometrischen Spannungen sind die hohe Stabilität, das elastische Dehnvermögen und die Möglichkeit einer umgehenden Reaktion auf externe mechanische Belastungen (vgl. Abschnitt 1.3.3 auf Seite 20) [Ingber03].

Obwohl das Tensegrity-Modell eine ganze Reihe von Reaktionen passend beschreiben kann und der Vergleich mit dem Zelt gut im Einklang mit den phänomenologischen Beobachtungen steht, gibt es auch andere Möglichkeiten die Gegebenheiten zu erklären [Heidemann00]. Ein weiteres Problem von diesem Modell ist die vor kurzem entdeckte Beobachtung, dass Zellen kurzfristig nach einer Kraftwirkung ihre Steifigkeit erniedrigen und sich verflüssigen, was im Widerspruch zum Versteifungsprozess

beim Tensegrity-Model steht [Treat07]. Obwohl diese Beobachtung zu einem anderen Modell führte (vgl. Abschnitt 1.4.4), gibt es Arbeiten, die die unterschiedliche Beobachtung näher untersuchen [Krishnan09] [Chen10]. Zum bisherigen Zeitpunkt ist es noch unklar, welcher der beiden Prozesse unter welchen Bedingungen sich durchsetzt und welche Faktoren dafür verantwortlich sind [Krishnan09].

#### 1.4.4 Fluidization-Model

In der Vergangenheit glaubte man, dass die Reaktion einer Zelle auf eine einwirkende Dehnung immer sehr ähnlich ist. Eine ausgiebig untersuchte Reaktion auf eine Dehnung stellt die Versteifung der Zelle dar (*reinforcement*) [Yoshigi05] [Chancellor10] [Hayakawa00] [Wang01] [Bershadsky06]. Bei angesiedelten Zellen in Organen wie Herzmuskel-, Darm- oder Lungenzellen, die einer ständigen Dehnung unterliegen, könnte jedoch dieser Versteifungsprozess zur Selbstzerstörung führen. Es ist daher eine biologische Notwendigkeit einen entgegenwirkenden Prozess zu unterhalten, der für ein Gleichgewicht sorgt. Das Fluidization-Model könnte diesen entgegenwirkenden Prozess beschreiben. Im Gegensatz zum Tensegrity-Model aus Abschnitt 1.4.3 auf Seite 27 beschreibt das Fluidization-Model eine neu entdeckte andere Reaktion der Zelle auf eine von außen wirkende Kraft bzw. Dehnung [Treat07] [Chen10] [Krishnan09]. Treat et al. konnte zeigen, dass der Quotient aus der aktuellen und der anfänglichen Steifigkeit ( $G' = G_{\text{aktuell}}/G_0$ ) kurz nach dem Einwirken einer Dehnung auf eine Zelle, diese aufweicht und beginnt sich zu verflüssigen. Die Steifigkeit der Zelle nimmt in diesem Prozess kurzfristig stark ab und erreicht langsam nach wenigen Minuten den Ursprungszustand wieder [Treat07]. Ähnlich verhält es sich mit dem Phasenwinkel  $\delta = \tan^{-1}(G''/G')$ , der kurz nach Beendigung der Dehnung stark ansteigt und dann langsam wieder zu seinem Ursprungswert zurück fällt [Treat07]. Hierbei gilt für hooksche Festkörper  $\delta = 0$  und newtonsche Flüssigkeiten  $\delta = \pi/2$ . Für lebende Zellen gilt  $0.15 < \delta < 0.50$ , wonach sie eher den festkörperähnlichen Stoffen zuzuordnen sind.

Die Verflüssigung und die verminderte Steifigkeit der Zelle werden in diesem Model größtenteils der Unterbrechung der Aktin-Myosin Vernetzung zugeschrieben [Gavara08] [Krishnan09]. Obwohl schon länger bekannt war, dass die Reaktion einer Zelle auf eine Dehnung die Depolymerisierung von F-Aktinfilamenten zur Folge hat, wurde sie aufgrund ihrer zu klein gehaltenen Rate ausgeschlossen, um das Fluidization-Model zu erklären [Pender91]. Jüngste Untersuchungen mit Fluoreszenzmikroskopie bezüglich des F-Aktins in Zellen zeigen jedoch, dass die Verflüssigung genau diesem Prozess der Depolymerisierung zugeschrieben werden kann

[Chen10]. Vorläufige Ergebnisse von Chen et al. zeigen, dass der Gehalt an F-Aktin einer Zelle vor und sofort nach der Dehnung sich innerhalb kürzester Zeit beinahe halbiert [Chen10]. Der Grund für diese rapide Abnahme ist jedoch zurzeit noch unklar. Es wird angenommen, dass nach der Verflüssigung die Zelle ein neues Gleichgewicht für ihr Aktinnetzwerk aufbaut abhängig von den Veränderungen einhergehend mit der Aktin-Myosin Maschinerie, die wieder zur alten Steifigkeit führt [Sheetz10] [Chancellor10] [Fouchard11].

# Kapitel 2

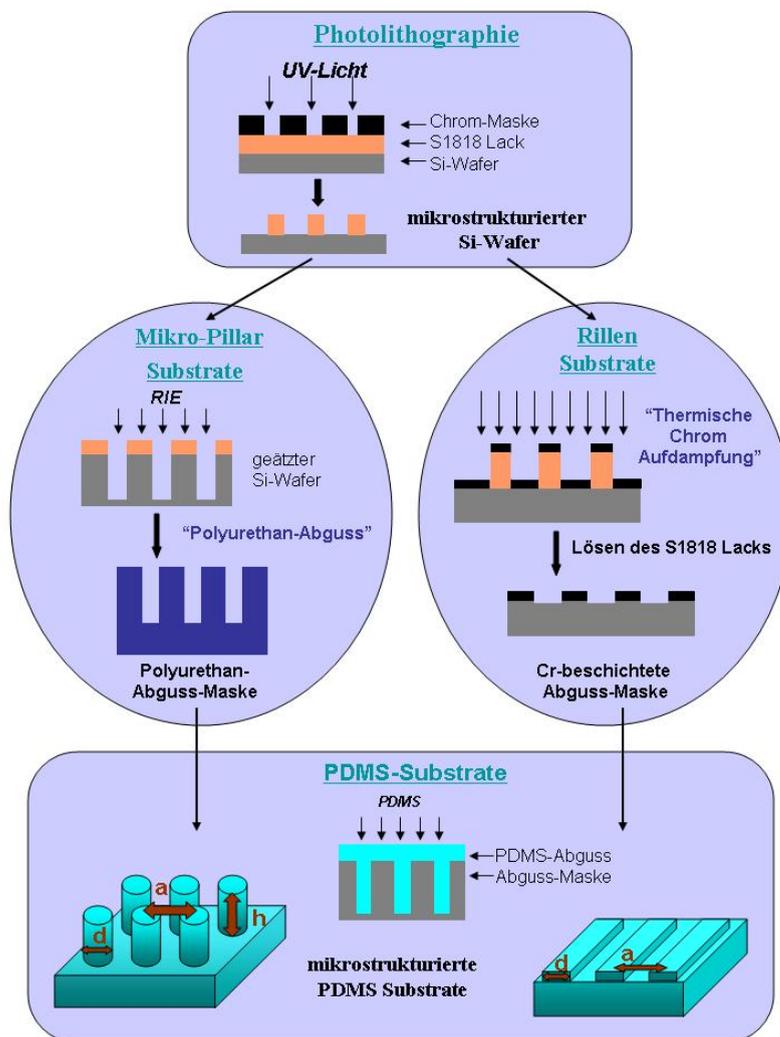
## Material und Methoden

Das folgende Kapitel ist in drei Abschnitte untergliedert. Der Erste befasst sich mit den verwendeten Materialien und Techniken dieser Arbeit (Materialwissenschaftlicher Teil). Der zweite Abschnitt beinhaltet die verwendeten biologischen Methoden und Materialien. Im dritten und letzten Abschnitt werden die biophysikalischen Methoden der Experimente vorgestellt.

### 2.1 Materialwissenschaftlicher Teil

Zur Durchführung der Experimente wurden in dieser Arbeit Substrate mit drei unterschiedlichen Oberflächen aus demselben Material produziert und verwendet. Ein Teil der Experimente verwendete Substrate mit einer unstrukturierten flachen Oberfläche (*Polydimethylsiloxan-(PDMS)-Substrate*). Die Oberflächen der restlichen Substrate waren entweder mit rillenartigen (*Rillen-Substrate*) oder säulenartigen Strukturen (*Säulen-Substrate*) im Mikrometer-Bereich ausgestattet. Eine schematische Darstellung ihrer Herstellung wird in [Abbildung 2.1](#) auf [Seite 32](#) illustriert. Die Substrate mit der flachen Oberfläche wurden durch eine einfache PDMS Abformung aus einer Maske erhalten. Die Herstellung der topographisch mikrostrukturierten Oberflächen gestaltete sich aufwendiger. Ausgangspunkt für die Rillen- und Säulen-Substrate stellt die aus Photolack mikrostrukturierte Oberfläche mittels Litographie auf einem Si-Wafer dar. Im Falle der Rillen-Substrate wurde die vorstrukturierte Oberfläche mittels thermischer Aufdampfung von Chrom weiter verarbeitet. Nach der Cr-Aufdampfung wurde der Photolack vom Si-Wafer gelöst und stellte eine Maske für eine letzte Abformung mittels PDMS dar (vgl. [Abbildung 2.1](#)). Zur Herstellung der Säulen-Substrate wurden die zuvor mit Lithographie erzeugten Mikrostrukturen weiter mit dem Ionenätzer bearbeitet. Hierbei wurde die mikrostrukturierte Oberfläche vom Si-Wafer solange geätzt bis sich durch die unter-

schiedliche Abtragsrate zwischen Photolack und Silizium ein definiertes Aspektverhältnis zwischen der Oberfläche vom Photolack und vom Silizium eingestellt hatte. Im Anschluss wurde der geätzte Si-Wafer einer Abformung aus einem Polyurethan gel unterzogen und ausgehärtet. Die neu erhaltene Maske aus Polyurethan diente als Vorlage für eine letzte PDMS Abformung, die letztendlich das verwendeten Endsubstrat für die Säulenstrukturen lieferte.



**Abbildung 2.1:** Herstellungsschema der verwendeten Substrate. Die Substrate mit der flachen Oberfläche werden durch eine PDMS Abformung aus einer Maske hergestellt (vgl. Abschnitt 2.4 auf Seite 39), während die Säulen und Rillen-Substrate zusätzlichen Prozessen unterzogen werden (vgl. Abschnitt 2.1.3 und Abschnitt 2.1.4). Die hergestellten Rillen-Substrate besaßen einmal eine Breite und Lücke zwischen den Rillen von  $2\mu\text{m}$  und einmal  $4\mu\text{m}$  ( $a=d=2,4\mu\text{m}$ ). Die Höhe der Rillen betrug  $h=200\text{nm}$  und  $h=350\text{nm}$ . Die Säulen-Substrate hatten einen Durchmesser von  $d=4\mu\text{m}$  mit einer Höhe von ca.  $h=8,7\mu\text{m}$ . Der Abstand zwischen den quadratisch angeordneten Säulen-Mittelpunkten betrug  $a=10\mu\text{m}$ .

Die folgende Tabelle 2.1 enthält die Werte für die Dimensionierung der hergestellten Säulen und Rillen-Substrate.

Struktur	Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Abtand [ $\mu\text{m}$ ]	Höhe [ $\mu\text{m}$ ]
Säulen	4	10	8.7
Struktur	Breite [ $\mu\text{m}$ ]	Abtand [ $\mu\text{m}$ ]	Höhe [ $\mu\text{m}$ ]
Rillen	2	2	0.2
Rillen	4	4	0.2
Rillen	2	2	0.35
Rillen	4	4	0.35

**Tabelle 2.1:** Darstellung der Dimensionierung der verwendeten Säulen und Rillen-Substrate.

Eine detaillierte Erklärung zur Herstellung der verwendeten Substrate wird in den folgenden Unterabschnitten 2.1.1 bis 2.1.5 beschrieben und vorgestellt.

### 2.1.1 Photolithographie

Zur Herstellung einer Maske für die Abformung der Rillen- und Säulenstrukturen im Mikrometer-Bereich wurde die Photolithographie eingesetzt. Das Prinzip der Photolithographie beruht auf den lichtempfindlichen Photolacken. Im Allgemeinen bestehen Photolacke aus Polymeren, deren Löslichkeit sich durch eine geeignete Belichtung verändert. Man unterscheidet zwischen Positiv- und Negativlacken. Der Unterschied besteht in der verschiedenen Löslichkeit der belichteten Bereiche des Lacks. Bei Positivlacken wird durch Belichtung das Polymernetzwerk im Lack geschwächt, was zu einer erhöhten Löslichkeit führt. Im Gegensatz dazu wird bei Negativlacken durch Belichtung eine Polymerisation in Gang gesetzt, die die Löslichkeit erniedrigt. Dieser Unterschied wirkt sich später im Entwicklungsprozess auf die erzeugten Strukturen aus. Man erhält beim Positivlack eine Struktur, die identisch ist mit dem Muster der Cr-Photomaske. Im Falle des Negativlacks entspricht die Struktur dem invertierten Muster der Cr-Photomaske. Zur Herstellung der Substrate für diese Arbeit wurde der Positivlack S1818 der Firma Dow Chemical (Michigan USA) verwendet [S1818].

Der Photolithographieprozess für den S1818 Lack lässt sich in fünf Teilprozesse unterteilen und wird im Folgenden detaillierter beschrieben:

**Vorbereitung** Für einen guten Kontakt zwischen dem Photolack und dem Si-Wafer ohne Einschlüsse müssen die Si-Wafer möglichst rein und wasserfrei sein.

Zu diesem Zweck wurde der Si-Wafer (3 Zoll, 100 Orientierung, p-type, Siegert Consulting, Aachen Deutschland) als erstes 2 Stunden in eine Carosche Lösung gelegt. Die Carosche Lösung besteht aus einer 30%igen Wasserstoffperoxidlösung und konzentrierter Schwefelsäure im Volumenverhältnis 1:3. Im Anschluss wurde der Wafer vor der Beschichtung mit dem Photolack erst in Aceton und danach in eine Isopropanol-Lösung jeweils drei Minuten lang gelegt, um grobe Verunreinigungen an der Oberfläche zu beseitigen. Danach wurde der Wafer mit Reinstwasser umspült. Zum Schluss wurde der Si-Wafer 10 Minuten auf eine 200°C heiße Kontaktheizplatte (Präzitherm von LHG Laborgeräte GmbH, Deutschland) gelegt, um das an der Oberfläche befindliche Wasser in die Gasphase zu bringen.

**Beschichtung** Im zweiten Schritt wurde der Si-Wafer mittig in einem Spincoater (WS-400B-6NPP-Lite, Laurell Technologies Corp., USA) eingesetzt und Verunreinigungen mit der Stickstoff-Pistole entfernt. Danach wurden 3ml vom S1818 Lack aufgebracht. In einem zweistufigen Prozess wurde der Lack erst grob auf den Wafer verteilt und im zweiten Schritt auf die gewünschte Schichtdicke eingestellt. In der ersten Stufe drehte sich der Spincoater hierzu 5 Sekunden mit 500 Umdrehungen/Minute und in der zweiten Stufe wurde 30 Sekunden lang eine Drehzahl von 3000 U/min eingestellt, um die gewünschte Schichtdicke zu erhalten. Unter den genannten Bedingungen stellte sich eine Schichtdicke von ca.  $1.8\mu\text{m}$  ein.

**Wärmebehandlung** Nach der Belackung vom Si-Wafer wurden die enthaltenen Lösungsmittel durch Erhitzen auf einer 115°C warmen Kontaktheizplatte eine Minute lang aus dem Lack in die Gasphase gebracht. Durch die Verdunstung der Lösungsmittel wurde der Photolack verdichtet und damit stabiler. Dies führte zu einem besseren Kontakt zwischen dem Photolack und dem Si-Wafer und eine Wulstbildung am Rand des Wafers blieb aus. Im Anschluss wurde der Si-Wafer fünf Stunden bei Raumtemperatur gelagert.

**Belichtung** Im nächsten Schritt erfolgte die Belichtung durch eine mikrostrukturierte Chrom-Photomaske (ML&C, Jena Deutschland) vom belackten Si-Wafer mit dem manuellen Mask-Aligner MJB4 (Süss-Microtech, Deutschland). Beim Belichten wurde ein Filter (LIF350) verwendet, der nur Wellenlängen oberhalb von 350nm durchlässt, um durch Wellenlängen kleiner als 350nm entstehende Reaktionen im Lack zu unterdrücken. Die Belichtung vom Lack, mit einer Dauer von zwei Sekunden, erfolgte über einer 350W Hg-Dampflampe am Mask-Aligner mit einer Wellenlänge von 365nm. Für einen gleichmäßigen Kontakt

zwischen Chrommaske und Si-Wafer wurde im Hard-Contact Modus ein Anpressdruck (WEC) von 1.7bar eingestellt. Die Bindungen im S1818 Photolack werden in den belichteten Bereichen geschwächt und können im anschließenden Schritt abgetragen werden.

**Entwickeln** Im letzten Schritt wurden die belichteten Bereiche vom Photolack in der Entwicklerlösung MF-319 Microposit Developer (MicroChem, USA) 30 bis max. 40 Sekunden herausgelöst. Anschließend wurde der Si-Wafer mit Reinstwasser gespült, um Rückstände des Entwicklers zu beseitigen. Danach wurde der Wafer mit der Stickstoffpistole trocken geblasen. Der Si-Wafer liegt am Schluss in den gelösten Bereichen des Photolacks frei.

Nach der Photolithographie erhält man abhängig von der Wahl der Chrom-Photomaske eine vorstrukturierte Oberfläche im Mikrometer-Bereich für die Rillen- oder Säulen-Substrate. Eine detaillierte Dimensionierung der erzeugten Strukturen ist in der Tabelle 2.1 auf Seite 33 hinterlegt.

### 2.1.2 Reaktives Ionenätzen

Die Erzeugung von Strukturen mittels reiner Photolithographie mit großen Aspektverhältnissen zwischen Höhe und Durchmesser, wie beispielsweise bei Säulenstrukturen im Mikrometer-Bereich, gestaltet sich durch den großen Oberflächenkontakt und den damit verbundenen Adhäsions- und Reibungskräften sehr oft als schwierig. Um dennoch hohe Aspektverhältnisse zu erzielen, kann eine Kombination aus Photolithographie und Trockenätzprozessen wie die Anisotrope Ionenätztechnik (RIE, engl.: *Reactive Ion Etching*) eingesetzt werden, um diese Probleme bei der reinen Photolithographie zu umgehen. Die mittels Photolithographie hergestellten Strukturen im Mikrometer-Bereich dienen als Maske für den Ätzprozess. Die entscheidenden Faktoren bei dieser Technik sind zum einen eine hohe Selektivität (Verhältnis zwischen Wafer- und Lackabtrag beim Ätzprozess) und zum anderen eine hohe Anisotropie des Ätzprozesses. Bei diesem Verfahren werden sowohl chemische als auch physikalische Ätzprozesse ausgenutzt [Zengerle07], [Letzkus03].

Beim chemischen Abtrag reagiert das hier verwendete Ätzgas Schwefelhexafluorid ( $\text{SF}_6$ ) mit der Substratoberfläche vom Si-Wafer unter Bildung von gasförmigen Produkten, die durch Vakuumpumpen abtransportiert werden. Dieser Vorgang ist jedoch weitgehend richtungsunabhängig und damit unzureichend für einen anisotropen Ätzprozess, da die mittels Photolithographie erzeugten Strukturen aus Photolack im gleichen Maße abgetragen werden wie das zu ätzende Silizium. Durch die große Anzahl von unterschiedlichen Ätzgasen kann jedoch eine sehr hohe Selektivität zwischen

dem Lack und dem Silizium erzielt werden.

Beim physikalischen Abtrag wird ein Ionenplasma durch eine hochfrequente Wechselspannung (ICP-Generator) erzeugt [Gabriel05]. Die ionisierten Gasteilchen im Plasma werden durch eine zweite Wechselspannung (RF-Generator) zur Probe hin beschleunigt. Aufgrund der Geometrie ist die Flächenladung der Probe groß und die der Kammer klein. Dadurch werden Ionen stark zur Probe hin, jedoch nur schwach Richtung Kammer beschleunigt. Daraus ergibt sich ein Nettofluss der Ionen in Richtung der Probe. Beim Aufprall werden durch Impulsübertrag Oberflächenatome aus der Probe herausgeschlagen (Sputter-Effekt). Dieser Vorgang ermöglicht im Vergleich zum chemischen Abtrag einen anisotropen Ätzprozess.

Die Kombination beider Abtrag-Prozesse reicht jedoch für eine hohe Anisotropie und hohe Aspektverhältnisse nicht aus und muss durch einen Passivierungsschritt ergänzt werden (Bosch-Prozess) [Bosch]. Hierzu wurde die Oberfläche unter Verwendung des Passivierungsgases Trifluormethan ( $\text{CHF}_3$ ) mit einer dünnen Schutzschicht versehen, die hauptsächlich durch physikalisches Ätzen entfernt werden kann und nahezu inert gegenüber dem chemischen Abtrag ist. Dies ermöglicht einen wirksamen Schutz der Seitenwände beim chemischen Abtrag. Erst diese Eigenschaft ermöglicht eine sehr hohe Anisotropie beim Ätzprozess mit senkrechten Seitenwänden und hohen Aspektverhältnissen.

Für die Herstellung der Säulen-Substrate diente beim anisotropen Ätzprozess der Ionenätzer Plasmalab80 Plus (Oxford Instruments, England). Nach dem Einbau der zu ätzenden Maske aus der Photolithographie wurde die Probe für eine höhere Selektivität beim Ätzprozess auf  $-20^\circ\text{C}$  gekühlt [Kroner07]. Der Ätzprozess bestand aus 4 Teilschritten, die zusammen einen Zyklus darstellen. Nach jedem Ätz- oder Passivierungsprozess erfolgte ein Abpumpen der Kammer, damit entstandene Abfallprodukte abtransportiert werden konnten, um das Plasma nicht negativ zu beeinflussen. Die Teilschritte und Parameter für den gesamten Ätzprozess sind in der folgenden Tabelle 2.2 dargestellt.

Schritt	t[s]	p[mTorr]	$\text{SF}_6$ [sccm]	$\text{CHF}_3$ [sccm]	$P_{RF}$ [W]	$P_{ICP}$ [W]
Ätzen	5	40	15	18	30	300
Pumpen	7	40	0	0	0	0
Passivieren	8	70	0	50	30	100
Pumpen	7	40	0	0	0	0

**Tabelle 2.2:** Darstellung der einzelnen Teilschritte und Parameter in chronologischer Reihenfolge beim Ätzprozess für einen Zyklus. Hierbei beschreibt t die Dauer vom Teilschritt in Sekunden und p den Arbeitsdruck in der Gaskammer.  $\text{SF}_6$  (Ätzen) und  $\text{CHF}_3$  (Passivierung) kennzeichnen den Gasfluss der verwendeten Arbeitsgase.  $P_{RF}$  und  $P_{ICP}$  geben die Leistung vom RF- und ICP-Generator an.

Hierbei diente ein Gemisch von Schwefelhexafluorid ( $\text{SF}_6$ ) und Trifluormethan ( $\text{HCF}_3$ ) im Verhältnis 5:6 als Ätzgas. Beim Passivierungsprozess wurde lediglich Trifluormethan zur Bildung der Schutzschicht in die Kammer eingeleitet.

Unter den beschriebenen Bedingungen wurde beim Ätzen der Wafer ein Abtrag von ca. 60nm pro Durchlauf erreicht. Die gewünschte Ätztiefe wurde durch die Anzahl der Durchläufe eingestellt. Die Höhe der Säulenstrukturen ergab sich am Ende aus der Ätztiefe und der verbliebenen Photolackschichtdicke. Für diese Arbeit wurden die belackten Si-Wafer 150 Zyklen unterzogen, um eine Ätztiefe von ca.  $8.7\mu\text{m}$  zu erreichen.

### 2.1.3 Säulen-Substrate

Zur Herstellung der Säulen-Substrate im Mikrometer-Bereich wurde anfangs die Photolithographie eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.1.1 auf Seite 33) [Chen05] [Kajzar08] [Kuo09]. Auf der hierfür genutzten Chrom-Photomaske befanden sich unterschiedliche  $1\text{cm}^2$  große Felder von quadratisch angeordneten Punkten aus Chrom, die sich im Durchmesser und Abstand voneinander unterschieden. Das ausgewählte Feld für die Säulenstrukturen mit einem Durchmesser von  $d=4\mu\text{m}$  und einem Mittelpunktabstand von  $a=10\mu\text{m}$  wurde aus dem vorstrukturierten Si-Wafer heraus geschnitten und am nächsten Tag einem Trockenätzprozess unterzogen, wie sie in Abschnitt 2.1.2 auf Seite 35 erklärt ist. Der geätzte Si-Wafer wurde im nächsten Schritt einer Abformung aus Polyurethangel unterzogen. Das verwendete Polyurethangel besteht aus den folgenden Polymer-Komponenten, die in Gewichtsprozent angegeben sind [Choi04]:

Einem Diacrylat Prepolymer EBECRYL284 von Cytec Surface Specialties Deutschland(66%), M3160 von MIWON Korea(30%), Irgacure184 und Darocur1173 von der Firma Ciba Specialty Chemicals Schweiz(je 1.5%) und Rad2200N von der Firma TEGO Chemie Service Deutschland (1%).

Nach der Polyurethanabformung wurde die Probe 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, um Lufteinschlüsse zu entfernen. Anschließend wurde die Probe in eine Petri-Schale gelegt und danach in eine Ultraviolettstrahlungskammer (UVA-Cube100, Honle UV Technology, Deutschland) gegeben und eine Minute mit einer UVA Lampe bestrahlt. Die poröse und harte Abformung wurde nach der UVA Bestrahlung eine Stunde im Ofen bei  $65^\circ\text{C}$  gelagert. Anschließend wurde die Polyurethananformung vom Si-Wafer abgelöst und in die Mitte der normalen Maske für die Abformung der PDMS-Substrate angebracht. Eine letzte PDMS Abformung lieferte am Schluss die Säulen-Substrate im Mikrometer-Bereich. Eine schematische

Darstellung vom Prozess ist in der Abbildung 2.1 auf Seite 32 illustriert. Die Dimensionierung der Säulenstrukturen ist in der Tabelle 2.1 enthalten. Die folgende Abbildung 2.2 zeigt die verwendeten Komponenten der Säulen-Substrate.



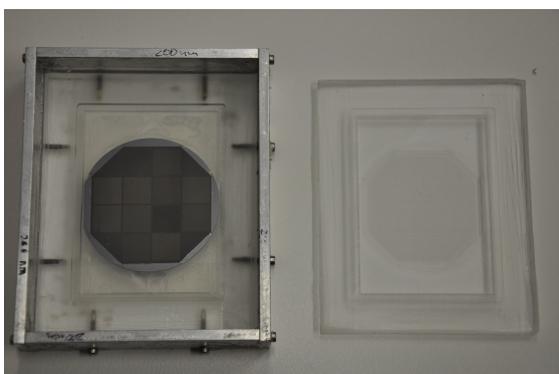
**Abbildung 2.2:** Aufnahme vom mikrostrukturierten Si-Wafer mit den verschiedenen Säulenstrukturen (links), deren Kammer für die PDMS Abformung mit mittig angebrachter Polyurethan-Abformung (mitte) und der erzeugten PDMS Abformung (rechts).

#### 2.1.4 Rillen-Substrate

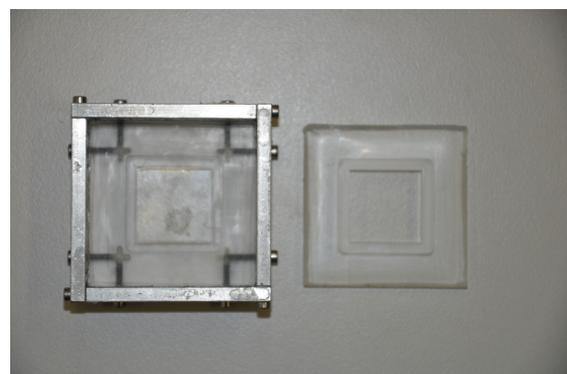
Die Herstellung der Rillen-Substrate beginnt ähnlich wie bei den Säulen-Substraten mit der Mikrostrukturierung der Oberfläche von einem Si-Wafer mittels Photolithographie (siehe Abschnitt 2.1.1 auf Seite 33). Auf der hierzu genutzten Chrom-Photomaske befanden sich verschiedene  $1\text{cm}^2$  große Felder mit rillenartigen Strukturen, wie sie in der Abbildung 2.1 auf Seite 32 schematisch dargestellt sind. Die verwendeten Rillenstrukturen besaßen entweder eine Breite und einen Abstand zwischen den Rillen von  $2\mu\text{m}$  oder  $4\mu\text{m}$ . Die Dimensionierung der Strukturen für die verwendeten Rillen-Substrate in dieser Arbeit sind in der Tabelle 2.1 auf Seite 2.1 detaillierter dargestellt. Die mittels Photolithographie erzeugten Rillenstrukturen auf dem Si-Wafer wurden durch eine thermische Aufdampfung von Chrom an der PVD Anlage der ZWE Dünnschichtlabor (MPI, Stuttgart) bearbeitet. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Schichtdicken von ca.  $200\text{nm}$  und  $350\text{nm}$  Chrom thermisch aufgedampft, die die Höhe der Rillen im späteren Verlauf vorgibt. Im Anschluss wurden die Chrom beschichteten Wafer zwei Stunden bei  $65^\circ\text{C}$  im Ofen temperiert, um Spannungen in der Chrom-Schicht auszutreiben. Im Anschluss wurden die Si-Wafer in eine Glasschale mit dem Lackentferner S1818G2 Removal von MicroChem USA gegeben und eine Minute im Ultraschallbad behandelt. Hierbei lösten sich die Bereiche vom Positivlack mit der Chrombeschichtung vom Si-Wafer ab. Zwischen den gelösten Bereichen befand sich weiterhin die aufgedampfte Cr-Schicht, während der Rest nun frei lag. Die auf diese Weise erhaltene Cr-Si-Maske diente, ähnlich wie bei den Säulenstrukturen, als Vorlage für eine PDMS Abformung, die letztendlich die verwendeten Rillen-Substrate lieferten. In der Abbildung 2.3 auf Seite 39 sind die verwendeten Komponenten der Rillen-Substrate abgebildet.

### 2.1.5 Polydimethylsiloxan-Substrate

Als Werkstoff für die Substrate diente ein Silikon basierter Elastomer mit der Bezeichnung Polydimethylsiloxan (PDMS) Sylgard 184 der Firma Dow Corning USA [PDMS]. Der Vorteil von PDMS-Substraten besteht darin, dass sie in ihrer flüssigen Phase auf eine vorstrukturierte Form im Mikrometer-Bereich abgeformt und anschließend ausgehärtet werden können. Die PDMS-Substrate sind zudem ungiftig, biologisch inert und vor allem optisch transparent für die Mikroskopie [Wipff09] [Pakstis10]. Das verwendete PDMS ist ein Zweikomponentensystem bestehend aus einem Vernetzer und einem Prepolymer. Werden beide Komponenten gemischt und erhitzt, reagiert das Prepolymer mit dem Vernetzer. Dabei werden Vernetzungen zwischen den Polydimethylsiloxanketten des Prepolymers gebildet. Das Mischungsverhältnis und die Temperatur zum Aushärten im Ofen haben einen wesentlichen Einfluss auf die elastischen Eigenschaften des Materials. Sämtliche PDMS Abformungen dieser Arbeit wurden mit einem Mischungsverhältnis des Prepolymers zum Kreuzvernetzer von 10:1 gemischt [Khanfer09]. Beim Durchmischen der Komponenten entstanden Luftbläschen im PDMS, die durch eine 20 minütige Lagerung in einem Exikator entweichen konnten. Danach wurde das flüssige PDMS in die Maske der Abformung eingeleitet. Anschließend wurde die Abformung im Ofen bei einer Temperatur von 65°C über 24 Stunden gelagert und zum Schluss aus der Form abgezogen. Die PDMS-Substrate, die nach diesem Verfahren hergestellt wurden, hatten einen Elastizitätsmodul von ca. 2MPa [Aydin09] [Walter10]. In der folgenden Abbildung 2.4 sind die Komponenten für die PDMS Substrate dargestellt.



**Abbildung 2.3:** Aufnahme der Kammer für die PDMS Abformung der Rillenstrukturen mit angebrachtem Si-Wafer (links) und dessen PDMS Abformung (rechts).



**Abbildung 2.4:** Darstellung der Komponenten für die PDMS-Substrate mit flacher Oberfläche. Links die Kammer für die Abformung des flüssigen PDMS und rechts das abgezogene PDMS-Substrat.

## 2.2 Biologischer Teil

Im diesem Abschnitt werden die verwendeten biologischen Materialien und Methoden vorgestellt.

### 2.2.1 Zelllinie und Zellkultur

Die Wahl der Zelllinie für die Untersuchung der Zytoskelett-Elemente fiel auf die Panc-1 Zellen [Lieber75]. Es handelt sich hierbei um Epithelkrebszellen aus der Bauchspeicheldrüse. Diese Zelllinie war durch die Kertainumstrukturierung bei SPC Zugabe (vgl. Abschnitt 1.3.4 auf Seite 22) geradezu prädestiniert für die durchgeführten Experimente [Beil03] [Busch08]. Diese Zelllinie erlaubte eine gezielte Manipulation am Keratin des Zytoskeletts und die Untersuchung deren Auswirkung auf das Zellverhalten.

Die Panc-1 Zellen wurden von der Firma ECACC (European Collection of Cell Cultures #87092802, England) bezogen und in einem Inkubator in 75cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen (ZKF) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Kultivierung wurde Zellkulturmedium bestehend aus Dulbecco´s modified Eagle medium 11960 von der Firma Gibco Deutschland verwendet, dem 10% fötales Kälber Serum (FKS) der Firma PAA Laboratories Deutschland, 1% Penicillin/Streptavidin (Gibco) und 1% L-Glutamin (Gibco) beigesetzt wurden. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gegen Neues ausgetauscht und beim Erreichen einer Oberflächenbedeckung von ca. 60-70% wurden die Zellen umgesetzt. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und mit einer 37°C vorgewärmten PBS-Lösung gespült. Im Anschluss wurden 4ml einer 2.5%igen Trypsin-EDTA Lösung hinzugegeben, um die Zellen von der Oberfläche der ZKF zu lösen. Nach drei Minuten befanden sich die meisten Zellen in der Lösung und wurden nach Zugabe von 5ml des Mediums zusammen in ein 15ml Flacon-Röhrchen umgesetzt und anschließend 5 Minuten bei 750 Umdrehungen/Min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand im Flacon-Röhrchen abgesaugt und das Pelett in 6ml neues Medium resuspendiert. Zum Schluss wurde die resuspendierte Lösung mit einer Verdünnung von 1:10 und 1:20 in eine neue ZKF ausgesät.

### 2.2.2 Probenpräparation

Die Probenpräparation begann mit der Reinigung der PDMS-Substrate, indem diese je 5 Minuten erst in eine 70%ige Ethanol-Lösung und danach in eine PBS-Lösung gegeben wurden. Im Folgenden wurde die Substratoberfläche zwei Stunden lang mit humanem Fibronectin der Firma Calbiochem (#341635 Deutschland) beschichtet.

Die Konzentration des aufgetragenen Fibronektins betrug  $50\mu\text{g}/\text{ml}$ . Im Anschluss wurde das Substrat zweimal mit PBS gespült. Die Panc-1 Zellen wurden zum Schluss mit einer Konzentration von  $80\text{ Zellen}/\text{mm}^2$  auf die PDMS-Substrate ausgesät und über Nacht im Inkubator gelagert. Eine Stunde bevor das Experiment startete, wurde das Kulturmedium gegen das Experimentmedium ausgetauscht. Der Unterschied zwischen den Medien liegt in der FKS Konzentration, deren Anteil im Experimentmedium statt 10% bei 5% lag. Die Experimente unter Verwendung des Wirkstoffs SPC, erhältlich bei Calbiochem (Darmstadt, Deutschland), wurde dem Experimentmedium des PDMS-Substrates mit einer Konzentration von  $10\mu\text{M}$  hinzugegeben. Das PDMS-Substrat wurde nach dem Austausch des Mediums und eventueller SPC-Hinzugabe in die Dehnungsvorrichtung eingebaut und vorgespannt, um Unebenheiten zu glätten. Die Probe wurde zum Schluss für eine Stunde in der Klimakammer gelagert bevor das Experiment startete. Dies diente einerseits den Zellen zum Erreichen eines neuen Gleichgewichts und andererseits der vollständigen Wirkung des SPC Wirkstoffs [Busch08] [Beil03] (vergleiche Abschnitt 1.3.4 auf Seite 22).

### 2.2.3 Immuncytochemische Färbung

Bei der Betrachtung und Untersuchung innerer Bestandteile von Zellen, wie z.B. den Zytoskelett-Elementen, bedient man sich sehr häufig der immuncytochemischen Färbung und der Fluoreszenzmikroskopie (vgl. Abschnitt 2.3.1 auf Seite 42). Sie findet häufig Anwendung in der Biologie und wird benutzt, um Proteine zu markieren. Das Prinzip dieser Technik beruht auf dem Einsatz von Antikörpern. Dabei bindet sich ein erster Antikörper spezifisch an das gewünschte Protein, wie z.B. an das Keratin. Im folgenden Schritt wird ein zweiter fluorochrom-markierter Antikörper verwendet, der sich spezifisch an den ersten Antikörper bindet und damit indirekt das gewünschte Protein kennzeichnet.

Die immuncytochemische Färbung des Keratins für diese Arbeit begann mit dem Absaugen des Mediums und anschließendem Spülen der Zellen mit einer vorgewärmten PBS-Lösung ( $37^\circ\text{C}$ ). Im Anschluss wurden die Zellen mit einer ebenfalls vorgewärmten 4%igen Paraformaldehydlösung (Roth Karlsruhe, Deutschland) in PBS 10 Minuten lang fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit einer PBS-Lösung gespült und 8 Minuten lang mit 0.5% TritonX-100 in PBS behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit einer PBS-Lösung wurden die Zellen drei Stunden bei Zimmertemperatur mit 0.2% Fischgelantine (Sigma) in PBS geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Als nächstes wurde der erste Antikörper (siehe Tabelle 2.3) auf die Zellen gegeben und 4 Stunden bei Zimmertemperatur gelagert. Danach wurde die

Probe erneut dreimal mit einer PBS-Lösung gespült und es erfolgte eine einstündige Behandlung mit dem zweiten Antikörper (siehe Tabelle 2.3). Bei einer Mehrfachfärbung von z.B. Keratin und Aktin gleichzeitig, wurde der Farbstoff für das Aktin mit dem zweiten Antikörper zusammen hinzugegeben. In der folgenden Tabelle 2.3 sind die verwendeten Farbstoffe und Antikörper für diese Arbeit dargestellt.

Spezies	Spezifität	Verdünnung	Herkunft
<u>Primäre Antikörper</u>			
Maus (monoklonal)	Pan-Zytokeratin(KL1)	1:200	Immunotech
<u>Sekundäre Antikörper</u>			
IgG Alexa 488/568	Maus	1:250	Invitrogen
<u>Farbstoffe</u>			
Phalloidin 488/568	F-Aktin	1:50	Invitrogen
Höchst 33342	DNA (Zellkern)	1:1000	BioMol

**Tabelle 2.3:** Angaben für verwendete Antikörper und Farbstoffe für die durchgeführten immunocytochemischen Färbungen mit der entsprechenden Verdünnung.

## 2.3 Biophysikalischer Teil

In diesem Abschnitt werden der Aufbau mit den verwendeten Geräten und die Methoden der Analysen vorgestellt.

### 2.3.1 Mikroskopie

In der Regel dient die Lichtmikroskopie als adäquate Methode zur Untersuchung von lebenden Zellen, insbesondere der Migration und Zellmorphologie. Hierbei hängt die Detailtreue einer Aufnahme zum einen von der Auflösung (*Rayleigh-Kriterium*) und zum anderen vom Kontrast des Bildes ab. Durch Ausbleiben von Lichtabsorption und sehr kleinen Unterschieden im Lichtbrechungsindex unterliegen biologische Objekte wie Zellen häufig Kontrastarmut. Zur Erhöhung des Kontrastes wird daher überwiegend auf zwei unterschiedliche Methoden zurückgegriffen.

Das Phasenkontrast-Verfahren von Frits Zernike nutzt den Phasenunterschied des Lichts beim Durchlaufen eines Objektes aus. Der Phasenunterschied entsteht, wenn das Licht durch ein optisch dichteres Material (höherer Brechungsindex) durchläuft als seine Umgebung. Hierbei nutzt diese Technik die Interferenz zwischen dem Hintergrund- und Objektlicht aus, bei der sich beide fast vollständig schwächen. Dadurch erscheint nun das Objekt bei der Aufnahme dunkel vor hellem Hintergrund.

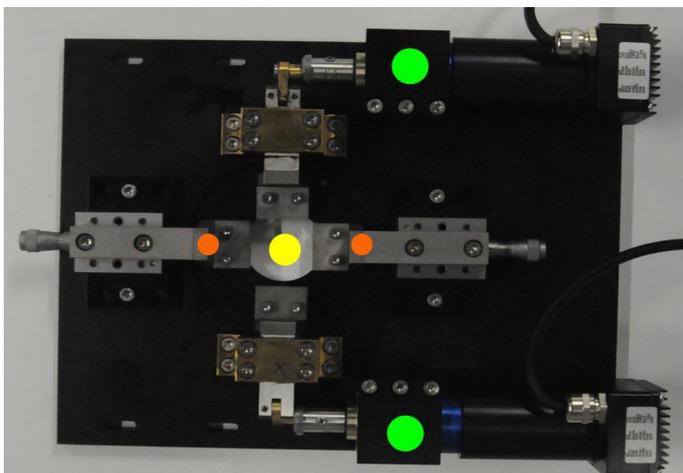
Dies wird als positiver Phasenkontrast bezeichnet. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu anderen liegt in einem höheren Kontrast bei der Bildaufnahme, ohne jedoch das Auflösungsvermögen des Mikroskops wesentlich zu verringern. Für die Phasenkontrastaufnahmen wurde das Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit unterschiedlichen Objektiven (A-Plan 5x/0.12 Ph0, A-Plan 10x/0.25 Ph1, EC-Plan-Neofluar 20x/0.50 Ph2 und LD A-Plan 40x/0.50 Ph2) und die AxioCam MR CCD Kamera der Firma Zeiss verwendet. Als Lichtquelle diente die Halogen-Metalldampf-Lampe X-Cite, 120 W DC (EXFO Europe, England). An dem Mikroskop wurde eine Klimakammer der Firma EMBL (Heidelberg, Deutschland) angebracht, die für konstante körperähnliche Bedingungen von 37°C und einer CO<sub>2</sub> Konzentration von 5% sorgte.

Eine weitere häufig verwendete Methode stellt die Fluoreszenzmikroskopie dar. Einzelne Objekte oder Bestandteile einer Zelle werden hierbei mit spezifischen Farbstoffen (Fluorochrome) angefärbt. Die Fluorochrome absorbieren die Bestrahlung einer spezifischen Wellenlänge  $\lambda_{in}$  und gehen in einen angeregten Zustand über. Beim Abfall in den Grundzustand emittiert das Fluorochrome eine Strahlung  $\lambda_{out}$ , die im Vergleich zur Absorption eine niedrigere Energie und damit größere Wellenlänge aufweist. Die Energiedifferenz entsteht durch Impulserhaltung beim Rückstoß und wird in Wärme- bzw. Schwingungsenergie umgewandelt. Dieser Effekt wird als die Stokes-Verschiebung  $\lambda_S$  bezeichnet ( $\lambda_S = \lambda_{in} - \lambda_{out}$ ). Das Anregungs- und Emissionslicht kann aufgrund dieser Verschiebung über einen Strahlteiler im selben Strahlengang optisch getrennt werden und ermöglicht eine kontrastreiche Bildaufnahme. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden an einem Axio Observer Z1 Durchlichtmikroskop und am Imager Z1 Aufrechtmikroskop mit unterschiedlichen Objektiven (LD Plan-Neofluar 20x/0.40 Ph2 Korr., LD Plan-Neofluar 40x/0.60 Korr. und LD Plan-Neofluar 63x/0.75 Korr.) der Firma Zeiss mit einer Klimakammer von ENBL durchgeführt. Die Colibri Fluoreszenzlampe (LED-Modul 365nm, 470nm, 505nm und 590nm) und die dazugehörigen Filter (60HE, 62HE von Zeiss) wurden ebenfalls verwendet.

Für Messungen und Analysen im Nanometer-Bereich wie beispielsweise zur Charakterisierung von Substratoberflächen wurden zusätzlich Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop (Ultra-55-Feldemissions-Rasterelektronenmikroskop Gemini, Zeiss, Deutschland) und Weißlichtinterferometer (Zygo, N.V.5000, Middlefield, CT) durchgeführt.

### 2.3.2 Dehnungsvorrichtung

Einen wesentlichen Teil dieser Arbeit stellen Experimente dar, bei denen die flachen PDMS-Substrate periodisch gedehnt wurden. Sie bedienten sich einer Dehnungsvorrichtung, die in einer vorangegangenen Arbeit entwickelt wurde und in dieser Arbeit als *Dehnungsexperiment* bezeichnet wird [Jung08] [Jung]. Die Dehnungsvorrichtung besteht aus einem DC-Schrittmotor der Firma Faulhaber (Schöneich, Deutschland), der das eingespannte PDMS-Substrat periodisch entlang einer Achse dehnen kann (s. Abbildung 2.5). Die verstellbaren Halterungen seitlich des PDMS-Substrates ermöglichen diese vorzuspannen, um Verzerrungen beim Einbau der Probe aufzulösen. Die Motoren und Funktionen des Mikroskops wurden über ein integrierbares selbst entwickeltes Program (Visual Basic for Applications, Microsoft) in der AxioVision Software gesteuert. Die verwendeten Frequenzen für die Dehnungsexperimente waren 0.05Hz, 0.1Hz, 0.2Hz, 0.5Hz, 1.0Hz und 2Hz bei einer konstanten Amplitude von 8%. Für jede Einstellung wurden immer drei unabhängige Experimente mit einer Dauer von 8 Stunden durchgeführt. Die folgende Abbildung 2.5 zeigt den Aufbau der Zugvorrichtung.



**Abbildung 2.5:** Dehnungsvorrichtung für das zyklische Dehnen der PDMS-Substrate [Jung]. Die grünen Kreise markieren die Schrittmotoren, die orangenen Punkte die verstellbaren Halterungen und der gelbe Punkt die Position vom PDMS-Substrat.

### 2.3.3 Analyse der Zellmorphologie

Die mittels Phasenkontrastmikroskopie aufgenommenen Zeitrafferaufnahmen wurden zur Analyse der Zellmorphologie mit der ImageJ Software analysiert [Rasband08]. Bei der Analyse wurden Veränderungen der Zellmorphologie untersucht, wie z.B. Orientierung der Zellen oder Zelladäsionsfläche. Dabei wurden immer Mittelwerte von mehreren Zellen aus je drei unabhängigen Experimenten für jede Einstellung (Frequenz, SPC Zugabe) betrachtet. Die verwendeten Größen und Parameter werden im Folgenden vorgestellt:

**Orientierungsparameter S.** Die Umrisse der Zelle aus den Zeitrafferaufnahmen wurden manuell für jede Zelle einzeln mittels der ImageJ Software markiert. Danach wurde an jeden Umriss der Zelle eine Ellipse angepasst. Als nächstes wurde der Winkel  $\varphi$  zwischen der Ellipsenhauptachse und der Zugrichtung bestimmt. Bei Kontrollversuchen diente die X-Richtungsachse der Aufnahmen als Referenz. Der Mittelwert der Vorzugsorientierung von Zellen als Reaktion auf die zyklische Dehnung der Substrate wurde durch den nicht-polaren Orientierungsparameter S in der Gleichung 2.1 quantifiziert [Jung08] [Kemkemer06]. Die Winkelverteilungsfunktion  $f(\varphi)$  und der Orientierungswinkel  $\varphi$  sind durch die Fokker-Planck Gleichung gegeben [Gruler00].

$$S = \langle \cos(2\varphi) \rangle = \int f(\varphi) \cos(2\varphi) d\varphi \quad (2.1)$$

Der Vorteil dieser Charakterisierungsgröße liegt in ihrer Faltung der Ausrichtungswinkel mit der Cos-Funktion. Dies erlaubt aufgrund der Spiegelsymmetrie an den Achsen ( $f(\psi) = f(-\psi)$  und  $f(x) = f(-x)$ ) symmetrische Orientierungen, wie z.B. die Ausrichtungswinkel der Zelle bezogen auf die X-Achse als Zugrichtung von  $85^\circ$  und  $95^\circ$  oder  $10^\circ$  und  $170^\circ$  aufzusummieren, da die Zellen nicht zwischen rechts und links unterscheiden können [Kemkemer99]. In diesem Zusammenhang wurde der Orientierungsparameter  $S_i$  für jede einzelne Zelle bestimmt. Danach wurde für jeden Zeitpunkt der Mittelwert aller Orientierungen S der Zellen bestimmt ( $S = \frac{1}{n} \sum S_n$  mit n untersuchten Zellen). Liegt eine zufällige Verteilung der Orientierung von Zellen vor, so erhält man für den Mittelwert des Orientierungsparameters den Wert 0 ( $S = 0$ ). Eine parallele Ausrichtung aller Zellen zur Zugrichtung führt zu  $S = 1$  und eine senkrechte Orientierung zu  $S = -1$ .

**Charakteristische Zeit  $\tau$ .** Die charakteristische Zeit  $\tau$  wurde verwendet, um die Dynamik einer Zelle bei der Reaktion auf eine zyklisch wirkende Kraft von außen zu beschreiben [Goldyn09] [Jung]. Folglich charakterisiert sie die morphologische Umstrukturierung der Zellen. In diesem Zusammenhang beschreibt die charakteristische Zeit  $\tau$  die Dauer, die die Zellen benötigen, um von einer anfänglichen Orientierung  $\langle \cos(2\varphi) \rangle_0$  ca. 63% ( $1/e$ ) einer maximalen Vorzugsorientierung  $\langle \cos(2\varphi) \rangle_{Max}$  zu erreichen [Kemkemer99]. Zu diesem Zweck wurde der zeitliche Verlauf vom Mittelwert des Orientierungsparameters S (siehe Gleichung 2.1) graphisch aufgetragen. Als nächstes wurde die Funktion aus der Gleichung 2.2 an den zeitlichen Verlauf von S mittels der Software Origin 6.0 angepasst, um die

charakteristische Zeit  $\tau$  zu bestimmen.

$$S(t) = \langle \cos(2\varphi) \rangle (t) = \langle \cos(2\varphi) \rangle_{Max} + [\langle \cos(2\varphi) \rangle_0 - \langle \cos(2\varphi) \rangle_{Max}] \exp(-t/\tau) \quad (2.2)$$

Hierbei stellt  $\langle \cos(2\varphi) \rangle_0$  den Mittelwert der Orientierung der Zellen am Anfang dar. Die im späteren Verlauf erreichte Vorzugsorientierung der Zellen wird durch  $\langle \cos(2\varphi) \rangle_{Max}$  beschrieben. Eine schnelle Umstrukturierung der Morphologie führt zu einem schnellen Abfall der Kurve aus Gleichung 2.2. Dies spiegelt sich in einem kleinen Wert für die charakteristische Zeit  $\tau$  wieder. Für jedes Experiment wurde die charakteristische Zeit  $\tau$  bestimmt anschließend der über die Anzahl der Zellen gewichtete Mittelwert für jede Einstellung (Frequenz, SPC Zugabe) gebildet.

**Zelladhäsionsfläche A.** Die Bestimmung der Zelladhäsionsfläche erfolgte über die manuelle Markierung der Zellumrisse aus den Phasenkontrastaufnahmen mittels ImageJ. Die eingeschlossene Fläche der Umrisse stellte die Adäsionsfläche A dar. Die Zelladhäsionsfläche A wurde bei der Datenanalyse (Microsoft Exel) auf ihren Anfangswert  $t=0$  normiert und ihr zeitlicher Verlauf aus den Phasenkontrastaufnahmen untersucht. Die beschriebene Normierung erlaubte die Streuungen der Adhäsionsflächen, die von Zelle zu Zelle stark abweichen konnten, miteinander zu vergleichen. Darüber hinaus ermöglichte sie die Wirkung von unterschiedlichen Drogen auf die Zelladhäsionsfläche zu untersuchen, die unabhängig von der Anfangsgröße der Zellen war.

### 2.3.4 Analyse der Zellmigration

Die Zellmigration wurde mittels der Aufnahmen aus der Phasenkontrastmikroskopie zu verschiedenen Zeitpunkten  $t_i$ , ähnlich wie in Abschnitt 2.3.3, mit dem Bildverarbeitungsprogram ImageJ untersucht. Hierbei wurde im Falle der Dehnungsexperimente ein Manual Tracking Plug-In verwendet, um den Mittelpunkt der Zelle während der Zeitrafferaufnahmen zu verfolgen und deren Koordinaten zum jeweiligen Zeitpunkt zu erhalten [Cordel05]. Im Anschluss wurde bei der Datenanalyse mittels Microsoft Exel die Geschwindigkeit und Richtung der Zellmigration zwischen den Aufnahmen anhand der Koordinaten und den Zeitabständen  $t_i$  ermittelt [Walmod01] [Gruler94]. Zusätzlich wurde für die Analyse der Zellmigration auf Rillen und Säulen-Substraten das Chemotaxis and Migration Tool 1.01 (Integrated BioDiagnostic, Martinsried, Deutschland) für ImageJ verwendet [Ibidi]. Diese Anwendung weist unter anderem der Zellmigration einen Wert zu, der die Richtungsabhängigkeit

beschreibt und wird anhand der Gleichung 2.3 berechnet.

$$\text{Richtungsabhängigkeit} = \frac{\text{euklidischer Abstand}}{\text{akkumulierter Abstand}} \quad (2.3)$$

Der euklidische Abstand beschreibt in diesem Zusammenhang die Differenz zwischen Start- und Endposition der Zellmigration, wohingegen der akkumulierte Abstand die aufsummierte Gesamtstrecke aus den einzelnen Migrationsschritten entspricht. Erhält man für die Richtungsabhängigkeit einen Wert nah bei eins, so weist das auf eine gerichtete Migration hin, wogegen ein Wert nah bei Null auf eine ungerichtete beliebige Migration hin deutet. Gesetzt den Fall, dass die Start- und Endposition identisch ist, ergibt sich für die Richtungsabhängigkeit  $D=0$ . Darüber hinaus erhält man aus der Anwendung die einzelnen Werte für die Laufwege ( $\mu\text{m}$ ) und Geschwindigkeiten ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ) der Zellmigration zwischen den einzelnen Bildern, welche sich als Winkelverteilung der Zellmigration graphisch in Form von einem Rose-Diagramm darstellen lassen.

Im Verlauf der Analysen der gerichteten Zellmigration ergab sich ein Parameter aus der Analogie zum chemotaktischen Index [Gavin00] [Biela09]. Dieser projiziert die Migration auf zwei senkrechte Achsen. In diesem Fall auf die X- und Y-Achse der Aufnahmen. Die X-Achse entsprach im Falle der Dehnungsexperimente der Zugrichtung. Im Falle der Experimente mit den Rillen-Substraten verliefen die Rillen entlang der Y-Achse. In den Kontrollexperimenten entspricht die X-Achse immer der frei wählbaren Achse. Die projizierten Bewegungen entlang der Achsen wurden anhand der Gleichung 2.4 für jeden Migrationsschritt einer Zelle bestimmt und das Verhältnis  $(M_y/M_x)_i$  berechnet. Danach wurde der Mittelwert für das Verhältnis einer Zelle bestimmt ( $\overline{M_y/M_x} = \frac{1}{n}\sum(M_y/M_x)_n$  mit n Migrationsschritten). Im Anschluss wurde der Mittelwert für alle untersuchte Zellen gebildet ( $M_y/M_x = \frac{1}{n}\sum(\overline{M_y/M_x})_n$  mit n untersuchten Zellen).

$$M_x = \sqrt{x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2} \quad M_y = \sqrt{y_1^2 + y_2^2 + \dots + y_n^2} \quad (2.4)$$

In diesem Zusammenhang beschreiben  $x_i$  und  $y_i$  die Bewegung bzw. die Distanz entlang der Achsen zwischen den einzelnen Bildern, wobei n die Anzahl der Gesamtbilder angibt. Ergibt sich für das Verhältnis ein Wert nah bei eins ( $M_x/M_y=1$ ), so liegt eine zufällige ungerichtete Migration der Zelle vor. Ein Verhältnis von kleiner als eins ( $M_x/M_y<1$ ) entspricht hierbei einer bevorzugten Migration entlang der Y-Achse und größer eins ( $M_x/M_y>1$ ) einer bevorzugten Migration entlang der X-Achse.

### 2.3.5 Analyse der Orientierung von Aktin und Keratin

Im Verlauf der Experimente wurde unter anderem die Orientierung der Aktin- und Keratinnetzwerke des Zytoskeletts mittels immunocytochemischen Färbungen (*Stainings*) und elektronenmikroskopischen Aufnahmen untersucht (vgl. Abschnitt 2.2.3). Für den Fall der immunocytochemischen Färbungen wurden Fluoreszenzbilder des entsprechenden Zytoskelett-Elements aufgenommen und anschließend mit einem selbstgeschriebenen Makro für ImageJ verarbeitet. Im Falle der Elektronenmikroskopaufnahmen wurden die Panc-1 Zellen nach Beil et al. präpariert und ihre Aufnahmen ebenfalls mit demselben Makro für ImageJ analysiert [Beil03] [Walter10]. Die verwendeten Makros sind in Abschnitt 4.1.1 auf Seite 100 und 4.1.2 auf Seite 108 im Anhang hinterlegt. Im Folgenden werden die Arbeitsprozesse der Makros erklärt:

**Einzel-Ausrichtungsmakro EAM.** Dieses Makro analysiert die Orientierung des zu untersuchenden Aktin- oder Keratinnetzwerks. Das Makro unterteilt zunächst das Einkanalfluoreszenzbild des betreffenden Netzwerks in viele kleine Teilgebiete ( $32 \times 32$  Pixel). Anschließend wurden die enthaltenen Strukturen in den Teilgebieten mittels schneller Fourier-Transformation analysiert analog zu [Kemkemer00]. Auf diese Weise wurde die Ausrichtung und der dazugehörige Winkel  $\vartheta$  der Filamente in den Teilgebieten bestimmt und graphisch abgebildet (siehe Abbildung 3.50 auf Seite 93). Hierbei beschreibt  $\vartheta$  den Winkel zwischen der X-Achse vom Originalbild und der Ausrichtung vom Filament. In diesem Zusammenhang stellte die X-Achse bei den Dehnungsexperimenten die Zugrichtung und im Fall der Kontrollexperimente die frei wählbare Achse dar. Der Mittelwert  $\bar{S} = \langle \cos(2\varphi) \rangle$  über alle Ausrichtungen der Filamente in den Teilgebieten ergab die durchschnittliche Orientierung des Netzwerks einer Zelle ähnlich zum Orientierungsparameter  $S$  in Abschnitt 2.3.3 auf Seite 44. Die dargestellten Ergebnisse wurden aus dem Mittelwert aus allen untersuchten Zellen gebildet ( $S = \frac{1}{n} \sum \bar{S}_n$ ), wobei  $n$  die Anzahl der untersuchten Zellen darstellt.

**Doppel-Ausrichtungsmakro DAM.** Dieses Makro analysiert die Orientierung zweier Netzwerke (Aktin und Keratin). Im Gegensatz zum EAM, bei dem nur ein Kanal beim Fluoreszenzbild vorliegt, verwendet das DAM ein Fluoreszenzbild mit 2 Kanälen für die zwei Netzwerke. Das DAM arbeitet analog zum EAM, indem das Fluoreszenzbild vom ersten Netzwerk auf Strukturen analysiert wird. Bei einer positiven Messung der Strukturen im Teilgebiet wird das zweite Netzwerk an derselben Position betrachtet und ebenfalls auf Strukturen analysiert. Wenn bei-

de Messungen positiv waren, wurden die ermittelten Ausrichtungswinkel  $\vartheta_{Aktin}$  und  $\vartheta_{Keratin}$  bestimmt und anschließend mittels Autokorrelationsanalyse der Microsoft Excel Software untersucht. Die lokalen Bereiche mit positiver Messung für Aktin und Keratin waren im Vergleich zur Gesamtfläche der Zelle häufig kleiner ( $\approx 30\%$ ) und die Bestimmung der Analyseparameter wurden für die jeweiligen Netzwerke einzeln angepasst. Durch die Analyse erhielt man für jede Zelle einen Korrelationsfaktor  $r$ . Die gezeigten Resultate für den durchschnittlichen Korrelationsfaktor  $\bar{r}$  errechneten sich aus dem Mittelwert von mehreren Zellen. Liegt der Betrag des Korrelationsfaktors  $\bar{r}$  nah bei 1 ( $|\bar{r}| = 1$ ), so deutet das auf eine hohe Korrelation hin und die Ausrichtung vom Aktin- und Keratinfilament ist identisch. Ein Korrelationsfaktors  $\bar{r}$  nah bei 0 deutet auf eine zufällig voneinander unterschiedliche Ausrichtung hin ( $|\bar{r}| = 0$ ).

# Kapitel 3

## Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse dieser Arbeit vorgestellt. Den Anfang bilden die Charakterisierungen der verwendeten Rillen- und Säulen-Substrate, gefolgt von den Ergebnissen zur Orientierung und Migration der Panc-1 Zellen unter zyklischer Dehnung. Anschließend werden die Resultate zur Migration auf den verschiedenen Substraten vorgestellt. Den Abschluss bilden die Ergebnisse der morphologischen Veränderungen der Panc-1 Zellen auf verschiedene Drogen.

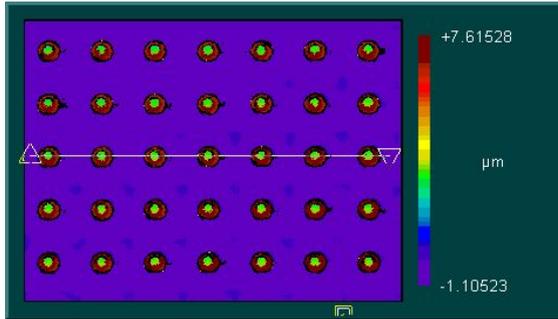
### 3.1 Charakterisierungen der Substrate

Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei verschiedene Substrattypen für die Analysen der Migrationseigenschaften von Panc-1 Zellen mit und ohne den SPC-Effekt verwendet. Diese umfassen die PDMS-, Rillen- und Säulen-Substrate. Die PDMS-Substrate mit der flachen Oberfläche werden häufig für Zellexperimente verwendet und sind für diese Arbeit analog zu anderen Arbeiten verarbeitet und verwendet worden [Jung] [Goldyn09].

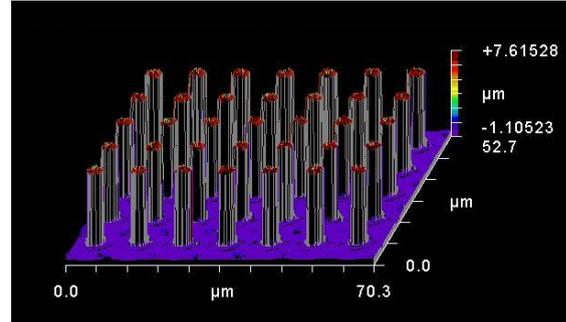
#### 3.1.1 Charakterisierung der Säulen-Substrate

Die Verfahrensweise zur Herstellung der Säulen-Substrate ist in Abschnitt 2.1.3 auf Seite 37 hinterlegt. In diesem Abschnitt sind lediglich die vermessenen Dimensionierungen der verwendeten Substrate dargestellt. Zu diesem Zweck wurden perspektivische Bilder mit dem Elektronenmikroskop aufgenommen. Zusätzlich wurden die Substrate mit dem Weißlichtinterferometer (Zygo,N.V.5000, Middlefield,CT) und der entsprechenden Software (Metropro 7.10) untersucht. Die Analysen lieferten Aufnahmen über die Topographie der untersuchten Rillen- und Säulen-Abformungen aus PDMS. Die folgenden Aufnahmen zeigen exemplarische Messungen für die verwendete

ten Säulen-Substrate aus PDMS einmal aus einer Vogelperspektive in Abbildungen 3.1 und einmal aus einer perspektivischen Sichtweise in Abbildung 3.2.

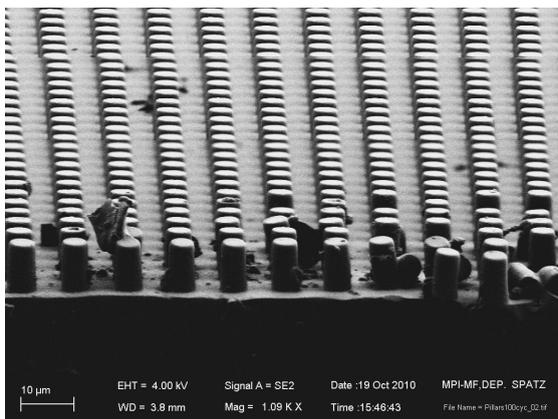


**Abbildung 3.1:** Zweidimensionale Visualisierung der verwendeten Säulenstrukturen mit dem Weißlichtinterferometer aus der Vogelperspektive. Die Höhe der Säulen beträgt ca.  $8.7\mu\text{m}$  mit einer Breite von  $4\mu\text{m}$  und einem Abstand der Mittelpunkte zwischen den Säulen von  $10\mu\text{m}$ .

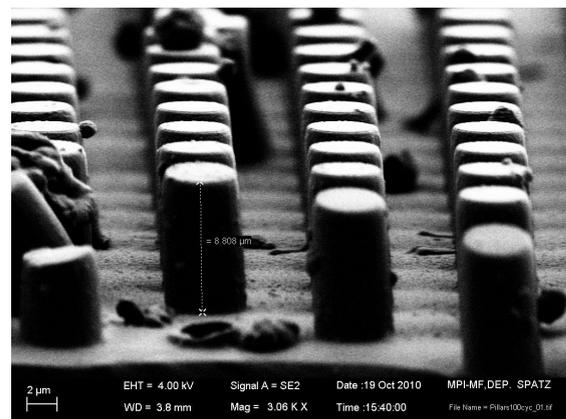


**Abbildung 3.2:** Dreidimensionale Visualisierung der verwendeten Säulenstrukturen mit dem Weißlichtinterferometer aus einer perspektivischen Sichtweise. Die Höhe der Säulen beträgt ca.  $8.7\mu\text{m}$  mit einer Breite von  $4\mu\text{m}$  und einem Abstand der Mittelpunkte zwischen den Säulen von  $10\mu\text{m}$ .

In den Aufnahmen wurden mehrere Linienprofile ausgewertet und gemittelt. Die Standardabweichung des Mittelwerts der gemessenen Höhe von  $H=8,7\mu\text{m}$  liegt unterhalb von  $50\text{nm}$  und ist im Vergleich zur Gesamthöhe  $H$  vernachlässigbar klein. Analog wurde die Standardabweichung für die Breite  $B=4,02 \pm 0.04 \mu\text{m}$  und der Mittelpunktabstand der Säulen zueinander von  $A= 10,03 \pm 0.05 \mu\text{m}$  bestimmt. Zur Bestätigung der Charakterisierung mittels dem Weißlichtinterferometer wurden zusätzlich Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop durchgeführt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Säulenstrukturen aus einer perspektivischen Sichtweise (Abb. 3.3) und anhand einer Einzelnahaufnahme von einzelnen Säulen (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.3:** Perspektivische Aufnahme der PDMS-Säulenstrukturen mit dem Elektronenmikroskop.

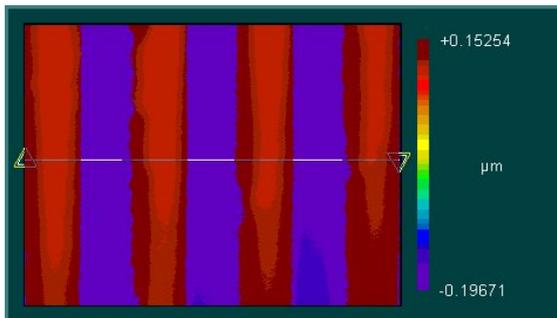


**Abbildung 3.4:** Großaufnahme der PDMS-Säulenstrukturen mit dem Elektronenmikroskop.

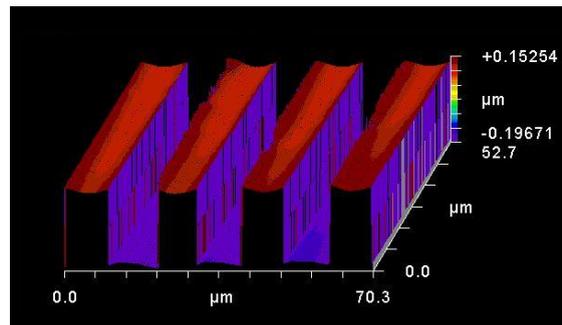
Beide Verfahren zeigen bei der Dimensionierung dieselben Werte für die hergestellten Säulen-Substrate, die zugleich mit den Abständen und Breiten der verwendeten Ausgangsmaske bei der Photolithographie übereinstimmen (vgl. Abschnitt 2.1 auf Seite 31). Infolgedessen ist die Herstellung von uniformen gleichmäßigen Säulen-Substrate gewährleistet und ausreichend charakterisiert.

### 3.1.2 Charakterisierung der Rillen-Substrate

Das Verfahren zur Herstellung der Rillen-Substrate ist im Abschnitt 2.1.4 auf Seite 38 erklärt. Die Geometrie und Größenverhältnisse der erzeugten Strukturen wurden analog zur Charakterisierung der Säulen-Substrate mit dem Elektronenmikroskop und dem Weißlichtinterferometer untersucht. In den folgenden Abbildungen 3.5 und 3.6 sind die Visualisierungen mit dem Weißlichtinterferometer für die Rillenstrukturen mit  $4\mu\text{m}$  Durchmesser und einem Abstand der Rillen von  $6\mu\text{m}$  zueinander mit einer Höhe von ca.  $350\text{nm}$  exemplarisch dargestellt. Auf die Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop wird verzichtet.



**Abbildung 3.5:** Zweidimensionale Visualisierung der verwendeten Rillenstrukturen mit dem Weißlichtinterferometer aus der Vogelperspektive. Die Höhe der Rillen beträgt ca.  $350\text{nm}$  mit einer Breite von  $4\mu\text{m}$  und einem Abstand zwischen den Rillen von  $4\mu\text{m}$ .



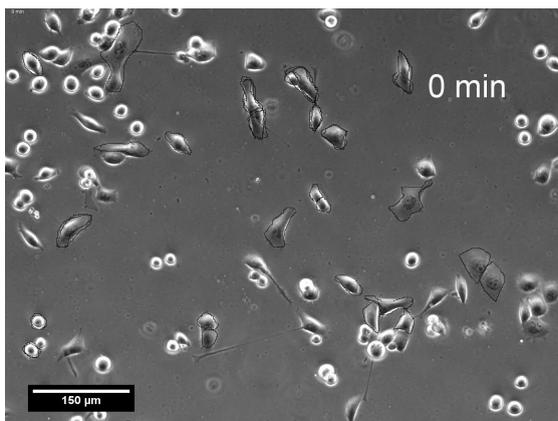
**Abbildung 3.6:** Dreidimensionale Visualisierung der verwendeten Rillenstrukturen mit dem Weißlichtinterferometer. Die Rillenhöhe beträgt ca.  $350\text{nm}$  mit einer Breite und einem Abstand zwischen den Rillen von  $4\mu\text{m}$ . Die Skala der X-Achse muss durch den Faktor zwei halbiert werden, da ein anderes Objektiv verwendet wurde als in der Software eingestellt war.

In den Aufnahmen wurden wie bei der Charakterisierung der Säulen-Substrate mehrere Linienprofile ausgewertet und gemittelt. Die Standardabweichung für die Rillenhöhe liegt bei ca.  $H=351 \pm 5\text{nm}$ . Analog wurde die Breite zu  $B=4,01 \pm 0.03\mu\text{m}$  und der Abstand zwischen den Rillen zu  $A=6,02 \pm 0.04\mu\text{m}$  bestimmt. Die ermittelten Werte für die Rillenstrukturen stehen in Einklang mit den Werten für die Ausgangsmasken. Aufgrund dessen ist die uniforme und gleichmäßige Form der Rillen-Substrate gewährleistet und ausreichend charakterisiert.

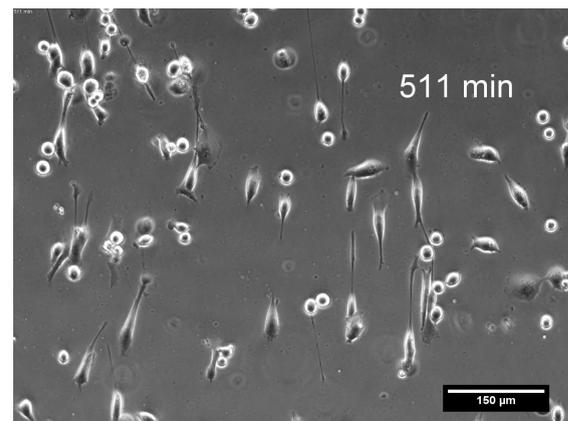
## 3.2 Reaktion von Panc-1 auf physikalische Signale

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit beruht neben der Umstrukturierung des Keratinnetzwerks durch den SPC-Effekt (vgl. Abschnitt 1.3.4 auf Seite 22) auf der mechanischen Reaktionsfähigkeit der Panc-1 Zellen [Beil03]. Diese wurde durch Dehnversuche (vgl. Abschnitt 2.3.2 auf Seite 44) und Aufnahmen der Zellmigration auf mikrostrukturierten Oberflächen untersucht, um aufzuklären ob Panc-1 Zellen auf äußere Kräfte oder topographische Oberflächen wie bei den Rillen-Substraten reagieren.

Die folgenden Aufnahmen 3.7 und 3.8 zeigen die zufällige Polarisierung der Zellmorphologie von Panc-1 Zellen bei einem Kontrollexperiment (links) und die Ausrichtung während des Dehnversuchs auf einem flachen PDMS-Substrat. Die Zugrichtung entspricht hierbei der X-Achse. Die Zellen aus Aufnahme 3.8 unterlagen beim Dehnversuch einer SPC-Behandlung und wurden mit einer Amplitude von 8% und einer Frequenz von 2Hz gedehnt.



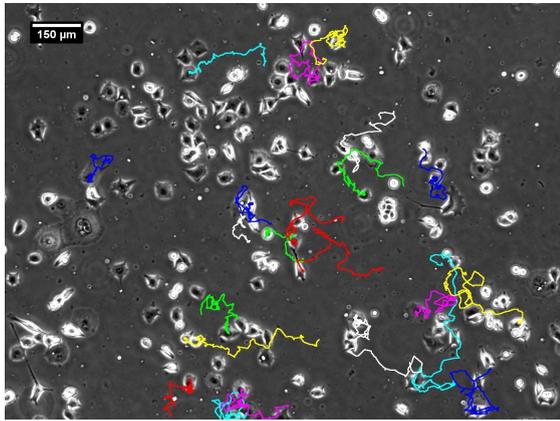
**Abbildung 3.7:** Aufnahme der morphologischen Orientierung von Panc-1 Zellen zum Zeitpunkt  $t=0$  vor dem Dehnversuch. Die eingezeichnete Skala entspricht  $150\mu\text{m}$ .



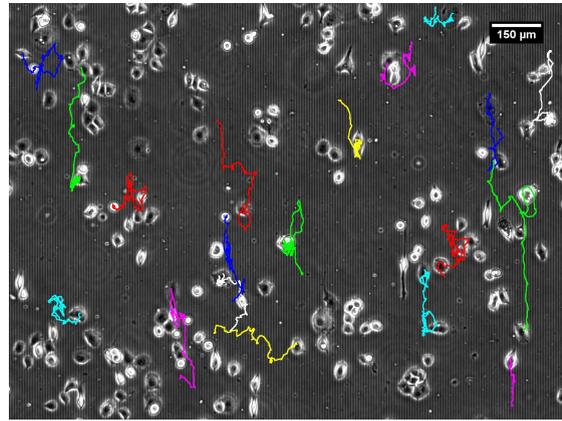
**Abbildung 3.8:** Aufnahme der morphologischen Orientierung von Panc-1 Zellen zum Zeitpunkt  $t=511$  Minuten nach dem Dehnversuch. Die eingezeichnete Skala entspricht  $150\mu\text{m}$ .

Beim Vergleich der Aufnahmen 3.7 und 3.8 erkennt man wie die zufällige Verteilung der Orientierungen der Zellen sich im Verlauf des Dehnversuchs in eine senkrecht zur Zugrichtung ausgeprägte Form verlagern. Folglich führen die mechanischen Signale bei den Dehnungsexperimenten zu einer Reaktion der Panc-1 Zellen in Form einer morphologischen Umstrukturierung senkrecht zur Zugrichtung.

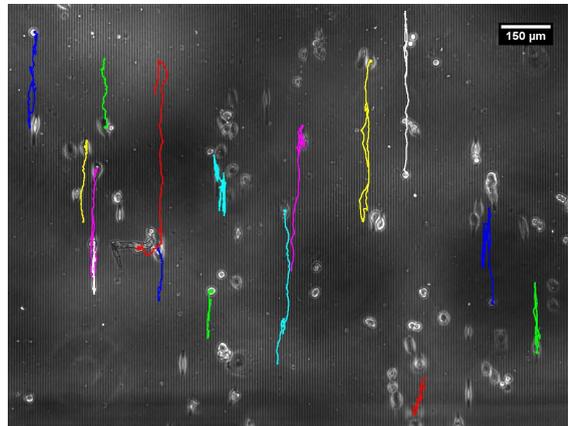
Zusätzlich zu den Dehnversuchen wurde die Zellmigration auf Rillen-Substraten untersucht. Die folgenden Abbildungen 3.9 bis 3.11 zeigen exemplarisch den Unterschied der Migrationsbewegung auf flachen PDMS-Substraten (links) und auf Rillenstrukturen mit unterschiedlichen Höhen ( $H=200\text{nm}$ ,  $350\text{nm}$ ).



**Abbildung 3.9:** Aufnahme der Migrationswege von Panc-1 Zellen aus 14 Stunden auf einem flachen PDMS-Substrat. Die eingezeichnete Skala entspricht  $150\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.10:** Aufnahme der Migrationswege von Panc-1 Zellen aus 14 Stunden auf einem  $200\text{nm}$  hohen Rillen-Substrat. Die Breite und Abstand der Rillen beträgt  $4\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.11:** Aufnahme der Migrationswege von Panc-1 Zellen aus 14 Stunden auf einem  $350\text{nm}$  hohen Rillen-Substrat. Die Breite und Abstand der Rillen beträgt  $4\mu\text{m}$ . Die eingezeichnete Skala entspricht  $150\mu\text{m}$ .

Beim Vergleich der Abbildungen 3.9 bis 3.11 erkennt man, wie aus der zufälligen Verteilung der Migrationsrichtungen von Panc-1 Zellen in der Kontrolle sich mit zunehmender Rillenhöhe  $H$  eine gerichtete Bewegung entlang der Rillenstrukturen entwickelt.

Die Beobachtungen aus der Ausrichtung der Zellen bei Dehnversuchen und dem Migrationsverhalten zeigen die grundsätzliche mechanische Reaktionsfähigkeit von Panc-1 Zellen auf, und schaffen infolgedessen die Grundvoraussetzung für die anschließenden Analysen der Umstrukturierung der Zellmorphologie und der Migrationseigenschaften der Panc-1 Zellen.

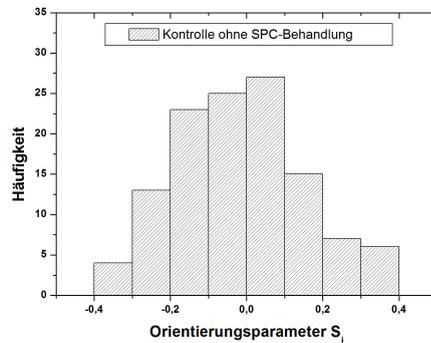
## 3.3 Zellorientierung

Mechanische Kräfte spielen eine entscheidende Rolle zur Erhaltung der Integrität und Funktionalität einer Zelle [Janmey07]. Die Experimente mit zyklischer Dehnung von Substraten stellen ein etabliertes Verfahren dar, um mechanischen Kräfte nachzuahmen. In der Regel führen solche Experimente häufig zu einer Polarisierung und Umstrukturierung der Zellmorphologie in eine bestimmte Richtung [Jung08] [Hayakawa00] [Wang01]. In diesem Zusammenhang wurden in vorangegangenen Arbeiten verschiedene Größen wie der Orientierungsparameter  $S$  und die charakteristische Zeit  $\tau$  eingeführt und verwendet, um diese morphologische Umstrukturierung zu beschreiben. Sie werden in diesem Abschnitt herangezogen, um den Einfluss der Keratinumstrukturierung durch den SPC Effekt auf die morphologische Neuausrichtung und ihre benötigte Dauer bei den Dehnversuchen zu untersuchen. Die genaue Berechnung der verwendeten Größen ist in Abschnitt 2.3.3 auf Seite 44 hinterlegt.

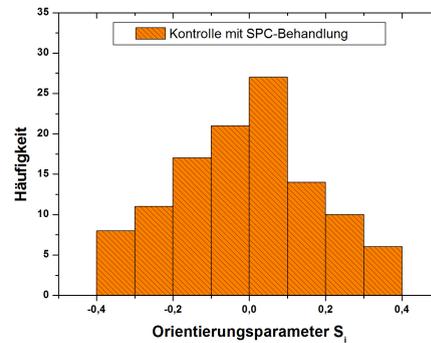
### 3.3.1 Orientierung auf flachen PDMS-Substraten

In diesem Unterabschnitt werden die Ergebnisse aus Kontrollversuchen vorgestellt. Hierfür wurden die Panc-1 Zellen auf flache PDMS-Substrate ausgesät und über ein Zeitraum von acht Stunden Phasenkontrastbilder in regelmäßigen Zeitabständen aufgenommen. Aus den Aufnahmen wurde der Mittelwert für den Orientierungsparameter  $S$  der Panc-1 Zellen bestimmt. Sie dienen als Referenz für die Ergebnisse aus dem folgenden Abschnitt 3.3.2. Die zwei Abbildungen 3.12 und 3.13 auf Seite 56 zeigen die Verteilungen für den Mittelwert vom Orientierungsparameter  $S$  für die Kontrollexperimente jeweils mit und ohne SPC-Behandlung. Hierzu wurde für jedes Experiment zu jedem Zeitpunkt  $t_i$  der Phasenkontrastaufnahmen die Orientierung aller gemessenen Zellen bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert  $S_i$  aus  $n$  Zellen zum Zeitpunkt  $t_i$  gebildet. Die Abbildungen 3.12 und 3.13 auf Seite 56 zeigen die Verteilung für  $S_i$  jeweils mit und ohne SPC-Behandlung.

Beim Vergleich der Verteilungen aus den Abbildungen 3.12 und 3.13 auf Seite 56 erkennt man keinen Unterschied in der Orientierung der Panc-1 Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten  $t_i$ . In beiden Fällen wurde der Orientierungsparameter  $S$  aus dem Mittelwert aus allen Werten für  $S_i$  mit dem Standardfehler zu  $S_{Kont.} = S_{Kont.SPC} = 0.00 \pm 0.02$  bestimmt.



**Abbildung 3.12:** Die Abbildung zeigt die Verteilung für den Orientierungsparameter  $S_i$  aus den Kontrollversuchen ohne SPC-Behandlung ( $n=120$  aus vier Experimenten mit 69 Zellen und bis zu 38 Zeitpunkten).



**Abbildung 3.13:** Die Abbildung zeigt die Verteilung für den Orientierungsparameter  $S_i$  aus den Kontrollversuchen mit SPC-Behandlung ( $n=114$  aus vier Experimenten mit 31 Zellen und bis zu 38 Zeitpunkten).

### 3.3.2 Orientierung bei Dehnversuchen

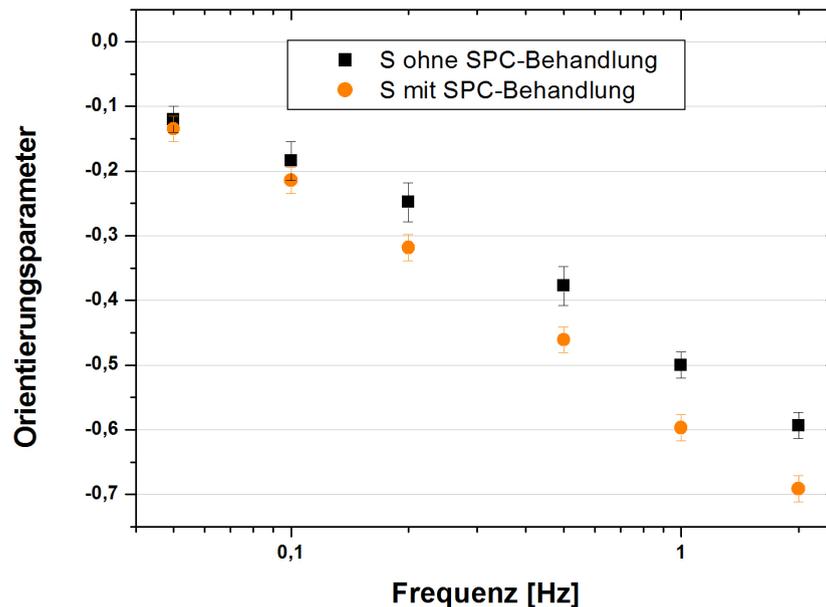
Um die Wirkung vom SPC Effekt auf die Umstrukturierung der Zellmorphologie zu untersuchen, wurden Panc-1 Zellen auf flache PDMS-Substrate ausgesät und jeweils mit und ohne SPC-Behandlung acht Stunden lang mit verschiedenen Frequenzen zwischen 0.05Hz und 2.0Hz zyklisch gedehnt. Zur Charakterisierung der Zellorientierung wurde der Orientierungsparameter  $S$  verwendet. Dieser wurde wie in Unterabschnitt 3.3.1 beschrieben bestimmt. Bei jedem Experiment wurde die Orientierung zum jeweiligen Zeitpunkt  $t_i$  aller gemessenen Zellen bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert  $S_i$  aus  $n$  Zellen zum Zeitpunkt  $t_i$  gebildet. Zur Charakterisierung der verschiedenen Einstellungen (Frequenz, SPC-Behandlung) wurde der Mittelwert aus den Werten für  $S_i$  gebildet. In der Tabelle 3.1 auf Seite 57 sind die Mittelwerte des Orientierungsparameters  $S$  für die verwendeten Frequenzen dargestellt.

Bei Betrachtung der Werte aus Tabelle 3.1 erkennt man eine Abnahme vom Orientierungsparameter  $S$  bei steigender Frequenz  $f$ . Folglich ist die Orientierung der Zellmorphologie im Mittel mit steigender Frequenz  $f$  häufiger senkrecht zur Zugrichtung ausgerichtet. Dieser Verlauf wird durch die SPC-Behandlung der Panc-1 Zellen weiter verstärkt. Liegen die Werte für kleine Frequenzen noch dicht beieinander, unterscheiden sich die Werte ab einer Frequenz von 0.2Hz zum ersten Mal. Ab dieser Schwelle sind die Orientierungsparameter für SPC-behandelte Zellen niedriger als ohne SPC-Behandlung. Infolgedessen scheint die Umstrukturierung des Keratinnetzwerks durch SPC die Ausrichtung der Zellmorphologie zu verstärken.

Frequenz f [Hz]	S ohne SPC	n	S mit SPC	n
0.00	$0.00 \pm 0.02$	69	$0.00 \pm 0.02$	31
0.05	$-0.12 \pm 0.02$	74	$-0.13 \pm 0.02$	60
0.10	$-0.18 \pm 0.02$	42	$-0.21 \pm 0.02$	52
0.20*	$-0.25 \pm 0.02$	53	$-0.32 \pm 0.02$	46
0.50*	$-0.38 \pm 0.02$	72	$-0.46 \pm 0.02$	46
1.00*	$-0.50 \pm 0.02$	45	$-0.60 \pm 0.02$	47
2.00*	$-0.60 \pm 0.02$	63	$-0.68 \pm 0.02$	69

**Tabelle 3.1:** Die Tabelle zeigt die verschiedenen Orientierungsparameter S mit Standardfehler  $S_E$  und n untersuchten Zellen für die Ausrichtung der Panc-1 Zellen mit und ohne SPC-Behandlung für die verschiedenen Frequenzen der Dehnung an. (\* = signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung nach T-Test mit  $p < 0.05$ ).

Trägt man die Werte für S logarithmisch über die Frequenz f graphisch auf, ergibt sich die folgende Abbildung 3.14.



**Abbildung 3.14:** Darstellung des Orientierungsparameters S für die verschiedenen Frequenzen der Dehnung jeweils mit und ohne SPC-Behandlung aus der Tabelle 3.1.

Man erkennt anhand der Abbildung 3.14 eine Verschiebung für den Orientierungsparameter  $S$ , hin zu kleineren Werten für den Orientierungsparameter bei gleichen Frequenzen. Wird eine exponentielle Funktion wie in Gleichung 3.1 an die Werte angeglichen, ergeben sich zwei unterschiedliche Exponenten  $f_c$ .

$$S(f) = A e^{-\frac{f}{f_c}} + B \quad (3.1)$$

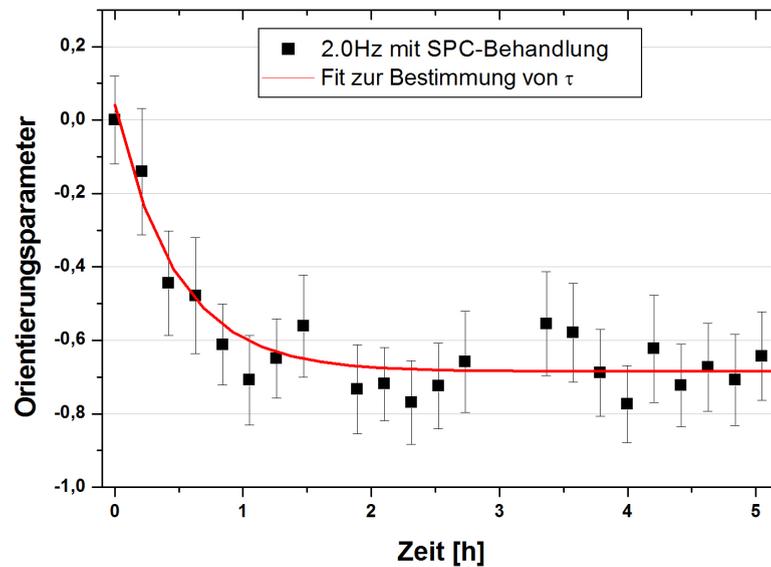
Ihr Wert und die Varianz wurde ohne SPC-Behandlung zu  $f_c(\text{Kontrolle}) = 0.54 \pm 0.02 \frac{1}{s}$  und mit SPC-Behandlung zu  $f_c(\text{KontrolleSPC}) = 0.63 \pm 0.02 \frac{1}{s}$  bestimmt. Der Unterschied deutet darauf hin, dass die SPC-Behandlung den Ausrichtungsgrad für die angewandte Frequenz erhöht. Betrachtet man z.B. den Wert für  $S=-0.60$ , so wird dieser ohne SPC-Behandlung bei einer Frequenz von 2.0Hz erreicht, jedoch mit SPC-Behandlung schon bei 1.0Hz.

Zusammenfassend deuten die Daten auf eine erhöhte Anzahl von senkrecht zur Zugrichtung orientierten SPC-behandelten Panc-1 Zellen hin. Der Ausrichtungsgrad scheint durch die Keratinumstrukturierung verstärkt zu werden.

### 3.3.3 Zeitliche Dauer der Neuausrichtung

In diesem Unterabschnitt werden die Ergebnisse zur Dynamik der morphologischen Umstrukturierung vorgestellt. Hierfür wird die charakteristische Zeit  $\tau$  herangezogen, die den Prozess der morphologischen Umgestaltung charakterisiert. Sie beschreibt die Dauer von einer anfänglich zufälligen Ausrichtung der Zellen ( $S=0$ ) zu einer neuen Vorzugsrichtung ( $S \neq 0$ ) mit einem exponentiellen Verlauf (vgl. Abschnitt 2.3.3 auf Seite 44). Zu diesem Zweck wurde die zeitliche Entwicklung des Orientierungsparameters  $S$  bei einem Dehnversuch über die Zeit  $t$  aufgetragen und anhand der Gleichung 2.2 auf Seite 46 mittels der Origin-Software angeglichen. Die Abbildung 3.15 auf Seite 59 zeigt exemplarisch, wie die charakteristische Zeit  $\tau$  aus einem Experiment bestimmt wurde.

Um die Genauigkeit der charakteristischen Zeit  $\tau$  nicht zu verfälschen, wurden die Werte des Orientierungsparameters  $S$ , die im Vergleich zum allgemeinen Verlauf mehr als 100% aufgrund von Zellteilung und ähnlichen Effekten abwichen als Ausreißer ausgeschlossen. Für jede Einstellung (Frequenz, SPC-Behandlung) wurden mindestens drei Experimente durchgeführt und anschließend der Mittelwert für die charakteristische Zeit  $\tau$  gebildet. Die auf diese Weise ermittelten Werte für die Dehnversuche sind in der folgenden Tabelle 3.2 dargestellt. Die Werte für die charakteristische Zeit  $\tau$  mit Frequenzen unterhalb von 0.2Hz konnten aufgrund ihrer Schwankungen nur mit sehr großen Fehlern an die Funktion aus Gleichung 2.2 auf Seite 46



**Abbildung 3.15:** Darstellung der zeitlichen Entwicklung vom Orientierungsparameter  $S$  bei einem Dehnversuch mit SPC-Behandlung bei 8% Amplitude und einer Frequenz von 2,0Hz. Die rote Linie ist die Angleichungskurve aus Gleichung 2.2 auf Seite 46, die mittels Origin angepasst wurde. In diesem Fall beträgt die charakteristische Zeit  $\tau=0.43\pm 0.07$  h.

angeglichen werden und werden für die weitere Betrachtung ausgeschlossen. In der folgenden Tabelle 3.2 sind die Werte der charakteristische Zeit  $\tau$  für die verschiedenen Frequenzen der Dehnung dargestellt.

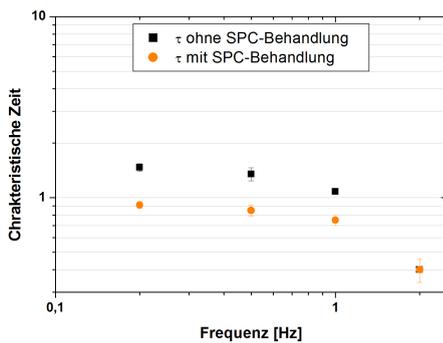
Frequenz $f$ [Hz]	$\tau$ [h] ohne SPC	n	$\tau$ [h] mit SPC	n
0.20*	$1.47 \pm 0.06$	34	$0.91 \pm 0.03$	46
0.50*	$1.35 \pm 0.8$	28	$0.85 \pm 0.06$	46
1.00*	$1.08 \pm 0.04$	35	$0.75 \pm 0.05$	47
2.00	$0.40 \pm 0.06$	63	$0.40 \pm 0.06$	69

**Tabelle 3.2:** Die Tabelle zeigt die charakteristische Zeit  $\tau$  für die verschiedenen Frequenzen der Dehnung bei konstanter Amplitude von 8% an. Der angegebene Fehler beim Orientierungsparameter entspricht der Varianz aus der Angleichung und n der untersuchten Anzahl von Zellen. (\*=signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung nach T-Test mit  $p<0.05$ )

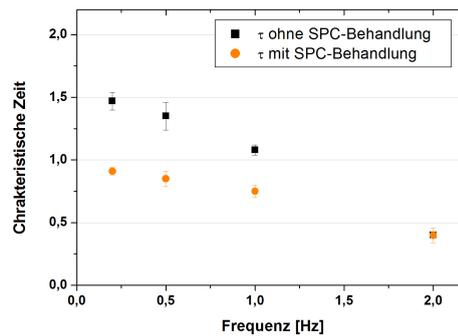
Die Werte aus Tabelle 3.2 zeigen unabhängig von der SPC-Behandlung eine Abnahme für die charakteristische Zeit  $\tau$  mit steigender Frequenz  $f$ . Beim Vergleich der Werte  $\tau$  erkennt man, dass mit SPC-Behandlung zu einer weiteren Abnahme der

charakteristische Zeit für Frequenzen unterhalb von 2.0Hz führt. Im Fall von 2.0Hz scheint die SPC-Behandlung keinen Einfluss mehr auf die charakteristische Zeit  $\tau$  zu haben und wurde unabhängig zu  $\tau_{2.0Hz} = 0.40 \pm 0.06$  h bestimmt.

Zur Untersuchung der Beziehung zwischen der charakteristischen Zeit  $\tau$  und der Dehnungsfrequenz  $f$  wurden die Werte aus Tabelle 3.2 graphisch aufgetragen. Die folgenden Abbildung 3.16 und 3.17 zeigen die Werte sowohl in doppellogarithmischer (links) als auch in linearer (rechts) Auftragung.



**Abbildung 3.16:** Darstellung der charakteristischen Zeit  $\tau$  für die verschiedenen Frequenzen der Dehnung jeweils mit und ohne SPC-Behandlung aus der Tabelle 3.2 in doppellogarithmischer Auftragung.



**Abbildung 3.17:** Darstellung der charakteristischen Zeit  $\tau$  für die verschiedenen Frequenzen der Dehnung jeweils mit und ohne SPC-Behandlung aus der Tabelle 3.2 in linearer Auftragung.

Beide Abbildungen 3.16 und 3.17 zeigen eine Verschiebung der Werte für die charakteristische Zeit  $\tau$  mit SPC-Behandlung. Beim Vergleich der Messpunkte führt die SPC-Behandlung zu einer verkürzten Reaktionszeit der Panc-1 Zellen, die ab einer Frequenz von 2.0Hz in eine Art Sättigung über geht und die charakteristische Zeit unabhängig von der SPC Zugabe wird. Die doppellogarithmische Auftragung in Abbildung 3.16 lässt auf keine konkrete Beziehung zwischen der charakteristischen Zeit  $\tau$  und der Frequenz  $f$  der Form  $\tau \propto f^\alpha$  schließen. Betrachtet man lediglich den Bereich zwischen 0.2Hz und 2.0Hz aus Abbildung 3.17, erkennt man ein eher lineares Verhalten. Dabei ist die Steigung für das lineare Verhalten mit SPC-Behandlung kleiner als ohne.

Folglich steigert die SPC-Behandlung ähnlich wie im Unterabschnitt 3.3.2 zuvor die Reaktionsfähigkeit der Panc-1 Zellen bei Dehnversuchen, die jedoch ab einer Frequenz von 2.0Hz in eine Art Sättigung zu gehen scheint. Das durch den SPC Effekt umstrukturierte Keratinnetzwerk scheint die morphologische Neuausrichtung der Zelle bis zu einem gewissen Grad zu begünstigen.

### 3.3.4 Diskussion

Mechanische Kräfte spielen eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Integrität und der Funktionalität einer Zelle [Janmey07]. Kräfte, die von außen auf eine Zelle wirken, werden von ihr wahrgenommen und in Signale umgewandelt, die verschiedene Zellreaktionen hervorrufen. In diesem Zusammenhang stellen Experimente mit zyklischer Dehnung von Substraten ein etabliertes Verfahren dar, um diese mechanische Kräfte nachzuahmen. Eine häufig beobachtete Reaktion von Zellen auf eine zyklische Dehnung der Substrate ist die Polarisierung und Umstrukturierung der Zellmorphologie senkrecht zur Zugrichtung [Jung08] [Hayakawa00] [Wang01]. In diesem Zusammenhang wurden Panc-1 Zellen auf flache PDMS-Substrate ausgesät und jeweils mit und ohne SPC-Behandlung mit verschiedenen Frequenzen gedehnt, um den Einfluss der Keratinumstrukturierung durch den SPC Effekt auf die morphologische Umgestaltung als Reaktion auf die Dehnung zu untersuchen.

Die dargestellten Ergebnisse aus Abschnitt 3.3 zeigen, dass die Panc-1 Zellen sich unter den beschriebenen Bedingungen für die Dehnversuche bevorzugt senkrecht zur Zugrichtung ausrichten. Der Orientierungsparameter  $S$ , der die Ausrichtung der Zellen charakterisiert, ist in diesem Zusammenhang aus der Kontrolle mit  $S \approx 0$  mit steigender Dehnungsfrequenz abgefallen  $S_{sHz} = -0.60 \pm 0.02$ , was eine höhere Anzahl von senkrecht zur Zugrichtung orientierten Zellen entspricht. Die SPC-Behandlung führte für Frequenzen oberhalb von 0.2Hz bei den Dehnversuchen zu einem weiteren Abfall der Orientierungsparameter. Folglich scheint das umstrukturierte Keratinnetzwerk den Grad an Ausrichtung der Panc-1 Zellen positiv zu begünstigen.

Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte eine unterschiedlich stark wirkende Deformation auf die Panc-1 Zellen bei den Dehnungsversuchen sein. Das Keratinnetzwerk wird häufig in Verbindung mit den mechanischen Eigenschaften von Epithelzellen gebracht und könnte aufgrund dessen einen Teil der Deformation, die auf eine Zelle wirkt, absorbieren [Yamada02] [Beil03] [Magain07] [Russell04] [Sivara09]. Eine Umstrukturierung des Keratinnetzwerks könnte den absorbierenden Beitrag der Deformation erniedrigen und infolgedessen könnte eine höhere effektive Deformation auf die Zelle wirken, die eine stärker ausgeprägte Zellreaktion, wie z.B eine erhöhte Ausrichtung der Zellen senkrecht zur Zugrichtung, zur Folge hätte.

Der Einfluss der SPC-Behandlung wurde ebenfalls für die Dauer der morphologischen Umstrukturierung beobachtet, bei der die charakteristische Zeit  $\tau$  mit zunehmender Dehnungsfrequenz bis zu einer Art Sättigung bei 2Hz abnahm. In beiden Fällen führte die Keratinumstrukturierung durch den SPC Effekt zu einer schnelleren Reorientierung der Panc-1 Zellen für Dehnungsfrequenzen unterhalb von 2Hz.

Eine mögliche Erklärung für die schnellere Reorientierung bezüglich der charakteristischen Zeit  $\tau$  könnte die erniedrigte Steifigkeit der Panc-1 Zellen bei SPC-Behandlung liefern [Beil03]. In der Arbeit von Beil et al. wurde gezeigt, dass die Steifigkeit von Panc-1 Zellen durch die SPC-Behandlung abnimmt. Die Abnahme wird der Umstrukturierung vom Keratinnetzwerk zugeschrieben. Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die Resultate aus den Dehnversuchen könnte zu der Schlussfolgerung führen, dass die durch die Aktin-Myosin-Maschinerie generierten Kontraktionen bei der morphologischen Umgestaltung auf eine erniedrigte Steifigkeit der Zelle stößt, und aufgrund dessen die Zellreaktion schneller ablaufen kann. Die sterische Interaktion zwischen den Keratinfilamenten und dem Aktinnetzwerk wäre in diesem Zusammenhang erniedrigt und würde mit dem gleichen Maß an Kontraktion eine schnellere Umstrukturierung erreichen. Folglich könnte die sterische Wechselwirkung zwischen dem Aktin- und Keratinnetzwerk den Reorganisationsprozess der Aktinfaser verlangsamen. Eine andere Möglichkeit die schnellere Reorientierung bezüglich der charakteristischen Zeit  $\tau$  zu erklären, könnte an der leicht erhöhten Polymerisierung von F-Aktin liefern. Die SPC Behandlung führt, neben der Abnahme der Steifigkeit der Panc-1 Zelle, zu einer leichten Erhöhung von filamentösen Aktin (ca. 5%), die die morphologische Umstrukturierung der Zelle beschleunigen könnte [Beil03].

Der Fall für die Dehnungsfrequenz von 2.0Hz als eine Art Sättigung ist gesondert zu betrachten. Die SPC-Behandlung scheint bei dieser Sättigung keinen Einfluss mehr auf die morphologische Umgestaltungsdauer zu haben und folglich unabhängig von der Keratinstrukturierung zu sein. Dies könnte durch die Zerstörung der Keratinstrukturen in der Zellperipherie erklärt werden. Bei hohen Frequenzen (2.0Hz) könnten die Keratinstrukturen in der Zellperipherie beeinträchtigt sein oder sogar zerstört werden. Infolgedessen könnte man einen ähnlichen Effekt der verkürzten charakteristischen Zeit  $\tau$  wie bei der Umstrukturierung des Keratinnetzwerks durch SPC erwarten. Eine Unterscheidung zwischen der Umstrukturierung des Keratinnetzwerks durch SPC Behandlung und den zerstörten Keratinfilamenten in der Zellperipherie bei hohen Dehnfrequenzen (2.0Hz) wäre nicht mehr möglich und beide Fälle könnten das gleiche Verhalten aufweisen.

## 3.4 Zellmigrationen

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Zellmigration werden in diesem Abschnitt vorgestellt. Diese umfassen die Migration der Panc-1 Zellen auf flachen PDMS-Substraten als Kontrolle, sowie die Migration bei den Dehnversuchen und mikrostrukturierten Oberflächen. Die Berechnung der verwendeten charakteristischen Größen aus den gewonnen Daten ist in Abschnitt 2.3.4 auf Seite 46 beschrieben.

### 3.4.1 Migration auf flachen PDMS-Substraten

Als Referenz für die Migrationsanalysen bei den Dehnversuchen, Säulen und Rillen-Substraten dienten die flachen PDMS-Substrate. Die Migration der Zellen wurde unter gleichen Bedingungen analysiert und für verschiedene Größen, wie sie in Abschnitt 2.3.4 auf Seite 46 beschrieben sind, berechnet. Es wurden die Richtungsabhängigkeit  $D$ , der Orientierungsparameter  $S$  und das Verhältnis von  $M_y/M_x$  bestimmt, die die Migration der Zellen charakterisieren. Die folgende Tabelle 3.3 umfasst die charakteristischen Größen mit den ermittelten Geschwindigkeiten für die Kontrollexperimente mit und ohne SPC-Behandlung und werden anschließend im Einzelnen vorgestellt.

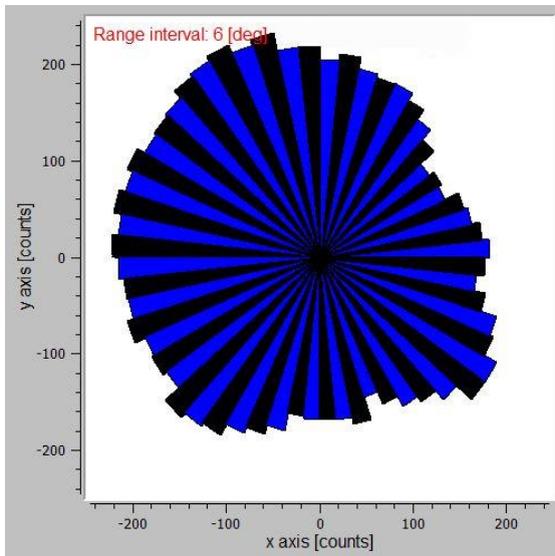
Charakteristische Größe	ohne SPC	mit SPC
Orientierungsparameter $S_{Kontrolle}$	$0.02 \pm 0.03$	$0.04 \pm 0.05$
$M_x/M_y$ (Kontrolle)	$0.98 \pm 0.03$	$0.99 \pm 0.02$
Richtungsabhängigkeit $D_{Kontrolle}$	$0.174 \pm 0.006$	$0.181 \pm 0.007$
Geschwindigkeit $\bar{v}$ [ $\mu\text{m}/\text{min}$ ]	$0.44^* \pm 0.02$	$0.65^* \pm 0.02$

**Tabelle 3.3:** Die Tabelle zeigt die verschiedenen charakteristischen Größen mit Standardfehler  $S_E$  für die Zellmigration mit ( $n=71$ ) und ohne ( $n=179$ ) SPC-Behandlung für die Kontrollexperimente auf flachen PDMS-Substraten, die nach Abschnitt 2.3.4 auf Seite 46 berechnet wurden. (\*=signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung nach T-Test mit  $p<0.05$ ).

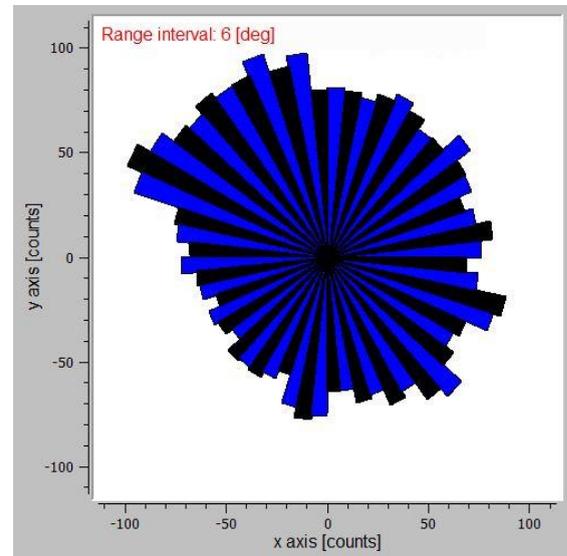
Aus dem Winkel zwischen der X-Achse und der Gerade aufeinander folgender Positionen während der einzelnen Migrationsschritte wurde der Orientierungsparameter  $S_i$  nach Gleichung 2.1 auf Seite 45 bestimmt. Die auf diese Weise erhaltenen Werte wurden für die gesamte Migration der Zelle gemittelt ( $\bar{S} = \frac{1}{n} \sum S_i$  mit  $n$  Migrationsschritten). Anschließend wurde der Mittelwert für alle untersuchten Zellen gebildet ( $S = \frac{1}{n} \sum \bar{S}$  mit  $n$  untersuchten Zellen) und führten für den Orientierungsparameter  $S$  ohne SPC-Behandlung zu  $S_{Kon.} = 0.02 \pm 0.03$  und mit zu  $S_{Kon.SPC} = 0.04 \pm$

0.05. Beide Werte sind annähernd Null. Folglich liegt eine zufällige Migration der Panc-1 Zellen vor, die im Mittel keine bestimmte Richtung bevorzugen. Bildet man das Verhältnis zwischen der projizierten Migration auf die senkrecht zueinander stehenden X- und Y-Achsen, ergeben sich folgende Zahlen für die Verhältnisse ohne SPC-Behandlung  $M_x/M_y(\text{Kon.}) = 0.98 \pm 0.03$  und mit  $M_x/M_y(\text{Kon.SPC}) = 0.99 \pm 0.02$ . Der Wert nah bei eins entspricht ebenfalls einer Migration in zufällige Richtungen ohne das eine bestimmte bevorzugt wird. Als dritte charakteristische Größe wurde zusätzlich der Wert für die Richtungsabhängigkeit  $D$  bestimmt. Dieser errechnet sich aus dem Verhältnis des euklidischen ( $A_e$ ) und des akkumulierten Abstands ( $A_a$ ) der Zellmigration. Er beschreibt bei einem Wert von eins die absolut gerichtete Bewegung in eine einzige Richtung ( $A_e=A_a$ ), während eines Werts nah bei Null auf eine ungerichtete Bewegung hindeutet ( $A_e \ll A_a$ ), bei der die Start- und Endposition nah beieinander liegen. Eine Migration bei der die Start- und Endposition identisch ist ergibt sich für die Richtungsabhängigkeit ein Wert von  $D=0$ . Die Richtungsabhängigkeit  $D$  wurde ohne SPC-Behandlung zu  $D_{\text{Kon.}} = 0.18 \pm 0.01$  und mit zu  $D_{\text{Kon.SPC}} = 0.19 \pm 0.02$  bestimmt. Die niedrigen Werte in beiden Fällen entsprechen analog den anderen Größen einer ungerichteten zufälligen Migration der Zellen. Zusätzlich zu den charakteristischen Größen wurden die Geschwindigkeiten  $v_i$  der Zellen mit und ohne SPC-Behandlung aus den verschiedenen Positionen während der Migration und den dazugehörigen Zeitabständen bestimmt. Hierbei wurde die mittlere Geschwindigkeit  $\bar{v}$  einer einzelnen Zelle aus den einzelnen Geschwindigkeiten während der Migration bestimmt ( $\bar{v} = \frac{1}{n} \sum v_i$  mit  $n$  Einzelgeschwindigkeiten einer Zelle) und anschließend der Mittelwert für alle untersuchten Zellen bestimmt ( $v = \frac{1}{n} \sum \bar{v}$  mit  $n$  untersuchten Zellen). Die ermittelten Werte betragen ohne SPC-Behandlung  $v_{\text{Kon.}} = 0.44 \pm 0.02 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$  und mit  $v_{\text{Kon.SPC}} = 0.65 \pm 0.02 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$ . Die zwei Abbildungen 3.18 und 3.19 auf Seite 65 zeigen die Winkelverteilung der einzelnen Migrationsschritte als Rose-Diagramme aus jeweils 179 Zellen ohne und 71 Zellen mit SPC-Behandlung. Die Winkelverteilungen in den Abbildungen 3.18 und 3.19 weisen eine isotrope runde Form auf, was auf eine ungerichtete Migration der Panc-1 Zellen hindeutet und mit den ermittelten charakteristischen Größen weiter oben im Einklang steht.

Zusammenfassend deuten die ermittelten charakteristischen Größen auf eine ungerichtete Migration der Zellen hin, bei der keine Richtung bevorzugt wird. Der einzige Unterschied zur SPC-Behandlung ist in der Migrationsgeschwindigkeit zu erkennen, die bei SPC-Behandlung zu einer Steigerung der Migrationsgeschwindigkeit führt. Folglich begünstigt die Umstrukturierung des Keratinnetzwerks die Migrationsseigenschaften von Panc-1 Zellen.



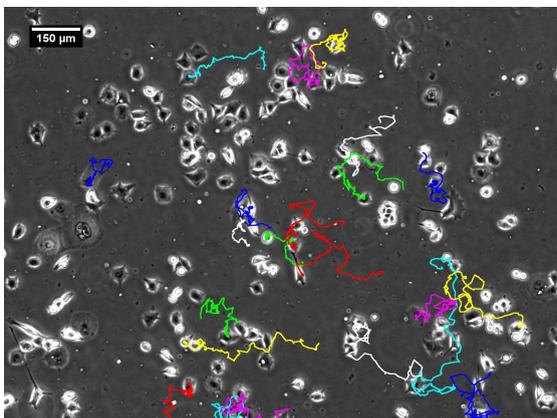
**Abbildung 3.18:** Rose-Diagramm für die Winkelverteilung der einzelnen Migrationsschritte aus 170 Panc-1 Zellen ohne SPC-Behandlung auf flachen PDMS-Substraten.



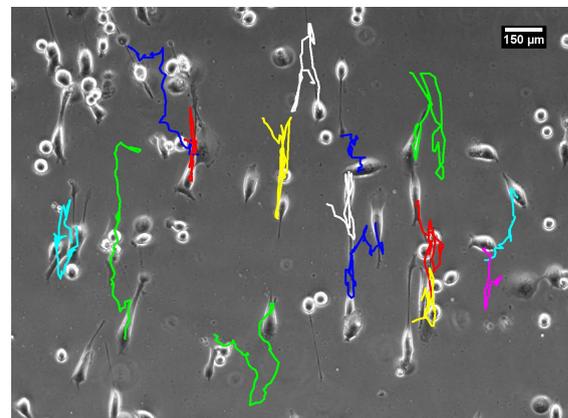
**Abbildung 3.19:** Rose-Diagramm für die Winkelverteilung der einzelnen Migrationsschritte aus 71 Panc-1 Zellen mit SPC-Behandlung auf flachen PDMS-Substraten.

### 3.4.2 Migration bei Dehnversuchen

Ein weiterer Aspekt der Untersuchungen zur Migrationseigenschaften von Panc-1 Zellen stellen, neben der morphologischen Umstrukturierung, die Migration auf flachen zyklisch gedehnten PDMS-Substraten dar. Man erkennt den Einfluss der zyklischen Dehnung auf das Migrationsverhalten anhand der Bewegungstrajektorien, wie sie in den folgenden zwei Abbildungen 3.20 und 3.21 dargestellt sind.



**Abbildung 3.20:** Darstellung der Trajektorien von Panc-1 Zellen auf einem flachen PDMS-Substrat aus 14 Stunden. Die eingezeichnete Skala entspricht  $150\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.21:** Darstellung der Trajektorien von Panc-1 Zellen auf einem flachen PDMS-Substrat bei einem Dehnversuch mit SPC-Behandlung, Amplitude von 8% und Dehnungsfrequenz von 2.0Hz über knapp 8 Stunden.

In der linken Abbildung 3.20 ist das Migrationsverhalten in Form von Bewegungstrajektorien aus einem Kontrollexperiment dargestellt, bei dem die Panc-1 Zellen auf einem flachen PDMS-Substrat ausgesät und die Migration aus Phasenkontrastaufnahmen erfasst wurde. Die rechte Abbildung 3.21 zeigt die Trajektorien aus einem Dehnversuch mit der X-Achse als Zugrichtung. Am Verlauf der Trajektorien erkennt man, wie sich die ungerichtete Migration ohne Vorzugsrichtung in eine gerichtete Migration senkrecht zur Zugrichtung entlang der Y-Achse verändert.

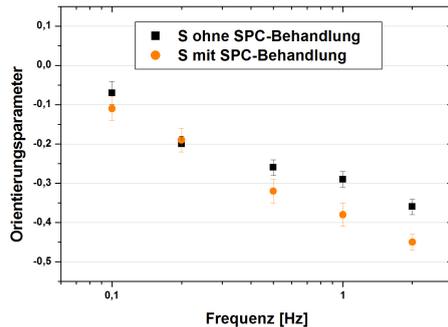
Zur Charakterisierung der Zellmigration diene ähnlich wie in Abschnitt 3.4.1 der Orientierungsparameter  $S$ . Dieser dient in der Regel zur Charakterisierung der Ausrichtung einer Zelle. Wird im Falle der Migration der Winkel zwischen der X-Achse (Zugrichtung) und der Gerade aufeinander folgender Positionen während der Migration ermittelt, so kann dieser ermittelte Winkel genutzt werden, um die Migration anhand des Orientierungsparameters  $S$  zu charakterisieren. Es wurde für jeden Migrationsschritt einer Zelle der Orientierungsparameter  $S_i$  bestimmt. Im nächsten Schritt wurde der Mittelwert für jede einzelne Zelle gebildet ( $\bar{S} = \frac{1}{n} \sum S_i$  mit  $n$  Migrationsschritten). Anschließend wurde der Mittelwert für alle untersuchten Zellen gebildet ( $S = \frac{1}{n} \sum \bar{S}$  mit  $n$  untersuchten Zellen). Die folgende Tabelle 3.4 zeigt die Resultate für den Orientierungsparameter  $S$  aus den Dehnungsexperimenten mit und ohne SPC-Behandlung.

Frequenz $f$ [Hz]	$S$ ohne SPC	$n$	$S$ mit SPC	$n$
0.10	$-0.07 \pm 0.03$	42	$-0.11 \pm 0.03$	52
0.20	$-0.20 \pm 0.02$	53	$-0.19 \pm 0.03$	46
0.50*	$-0.26 \pm 0.02$	72	$-0.32 \pm 0.02$	46
1.00*	$-0.29 \pm 0.02$	45	$-0.38 \pm 0.03$	47
2.00*	$-0.36 \pm 0.02$	63	$-0.45 \pm 0.02$	69

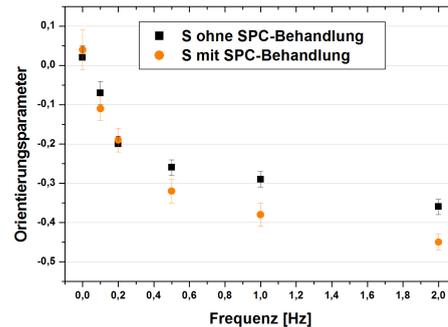
**Tabelle 3.4:** Darstellung der verschiedenen Orientierungsparameter  $S$  aus der Migration bei den Dehnungsexperimenten mit und ohne SPC-Behandlung für die verschiedenen Dehnungsfrequenzen mit Standardfehler  $S_E$  und  $n$  als Anzahl der untersuchten Zellen. (\*= signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung).

Bei Betrachtung der Werte erkennt man eine Abnahme des Orientierungsparameters  $S$  mit steigender Frequenz  $f$ , was einer erhöhten Anzahl von Zellen entspricht, die senkrecht zur Zugrichtung orientiert sind. Die Abnahme vom Orientierungsparameter wird durch SPC Zugabe für Frequenzen oberhalb von 0.2Hz verstärkt. Zur

Visualisierung der Werte aus Tabelle 3.4 wurden diese logarithmisch und linear in den folgenden Abbildungen 3.22 und 3.23 dargestellt.



**Abbildung 3.22:** Darstellung des Orientierungsparameters S für die verschiedenen Frequenzen der Dehnung jeweils mit und ohne SPC-Behandlung in logarithmischer Auftragung aus Tabelle 3.4.



**Abbildung 3.23:** Darstellung des Orientierungsparameters S für die verschiedenen Frequenzen der Dehnung jeweils mit und ohne SPC-Behandlung in linearer Auftragung aus Tabelle 3.4.

Am Verlauf der Messpunkte erkennt man aus den beiden Abbildungen 3.22 und 3.23 eine Verschiebung für den Orientierungsparameter S, je nachdem ob eine SPC-Behandlung vorliegt oder nicht. In beiden Fällen liegt eine bevorzugte Migration der Panc-1 Zellen senkrecht zur Zugrichtung entlang der Y-Achse vor. Dieser Effekt wird mit zunehmender Frequenz stärker. Hierbei scheint die SPC Zugabe Frequenzen unterhalb von 0,5Hz keinen Unterschied auf die Migrationseigenschaften zu haben. Dies ändert sich ab einer Frequenz von 0,5Hz. Im Bereich von 0,5Hz bis 2,0Hz scheint die SPC-Behandlung die bevorzugte Migration senkrecht zur Zugrichtung zu verstärken. Beim Vergleich der Werte für  $S_{2,0Hz} = -0,36 \pm 0,02$  mit  $S_{1,0HzSPC} = -0,38 \pm 0,03$  erkennt man, dass die SPC-Behandlung die benötigte Dehnungsfrequenz nahezu halbiert. Folglich scheint das umstrukturierte Keratinnetzwerk die Migration während der Dehnversuche derart zu beeinflussen, dass die gerichtete Migration der Panc-1 Zellen senkrecht zur Zugrichtung zunimmt.

Zusätzlich wurden die Geschwindigkeiten der Panc-1 Zellen für die verschiedenen Frequenzen bei den Dehnungsexperimenten ermittelt und sind in der Tabelle 3.5 auf Seite 68 dargestellt. Diese sind jedoch kritisch zu betrachten, da die Unterschiede in der Geschwindigkeit einzelner Zellen innerhalb der Experimente um teilweise 20% abwichen. Die dargestellten Werte wurden mit dem Mittelwert aus den Experimenten bestimmt und zusätzlich aus der Anzahl der untersuchten Zellen gewichtet.

Frequenz $f$ [Hz]	$v$ ohne SPC [ $\frac{\mu m}{min}$ ]	$n$	$v$ mit SPC [ $\frac{\mu m}{min}$ ]	$n$
0.10*	$0.50 \pm 0.06$	42	$0.71 \pm 0.7$	52
0.20*	$0.47 \pm 0.04$	53	$0.60 \pm 0.04$	46
0.50*	$0.47 \pm 0.03$	72	$0.69 \pm 0.04$	46
1.00*	$0.43 \pm 0.04$	45	$0.66 \pm 0.04$	47
2.00*	$0.50 \pm 0.05$	63	$0.61 \pm 0.05$	69

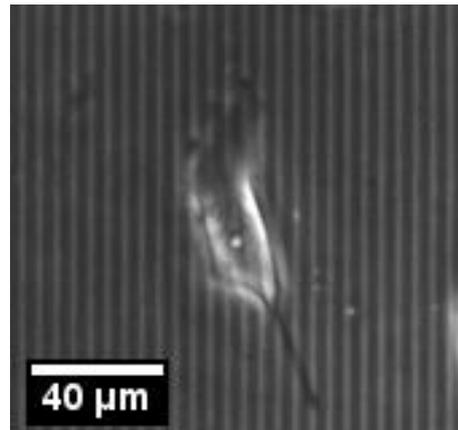
**Tabelle 3.5:** Darstellung der verschiedenen mittleren Geschwindigkeiten  $v$  bei der Migration aus den Dehnungsexperimenten mit und ohne SPC-Behandlung für verschiedene Dehnungsfrequenzen mit Standardfehler  $S_E$  und  $n$  untersuchten Zellen. (\* = signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung nach T-Test  $p < 0.05$ )

Die ermittelten Werte sind beim Vergleich zu den Geschwindigkeiten aus den Experimenten mit Kontrollbedingungen ohne Dehnung etwa gleichgroß (vgl. Tabelle 3.3 auf Seite 63). Eine Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Dehnungsfrequenz konnte nicht festgestellt werden.

### 3.4.3 Migration auf Rillen-Substraten

Im Allgemeinen unterliegen Zellen während der Migration physikalischen und chemischen Signalen, die zusammen den Migrationsmechanismus dirigieren [Fouchard11] [Hood02] [Wang2001]. Ein Vertreter der physikalischen Signale stellt eine veränderte Topographie dar [Loesberg06] [Doyle09]. Sie beeinflusst sowohl die Zellpolarisation wie z.B. in Abbildung 3.24 als auch die Migrationsrichtung und wird als Contact-Guidance bezeichnet [Teixeira03] [Frey06] [Saez07] [Hamilton10].

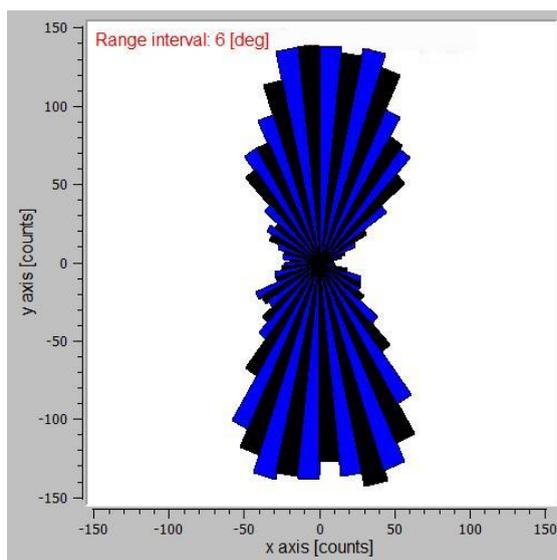
In diesem Zusammenhang wurden Panc-1 Zellen auf verschiedene Rillen-Substrate mit und ohne SPC-Behandlung kultiviert (vgl. Abschnitt 2.1.4 auf Seite 38), um den Einfluss der Keratinstrukturierung auf die Migrationseigenschaften zu untersuchen. Die Abbildung 3.24 zeigt exemplarisch eine SPC-behandelte Panc-1 Zelle auf einem Rillen-Substrat. Die Zellpolarisation verläuft parallel zu den Rillenstrukturen entlang der Y-Achse. Darüber hinaus



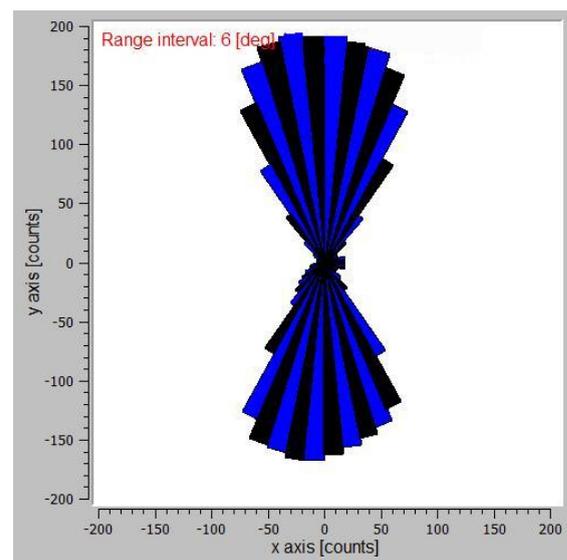
**Abbildung 3.24:** Darstellung der Zellpolarisation einer SPC-behandelten Panc-1 Zelle auf einem Rillen-Substrat mit Höhe=350nm, Breite=4µm und Abstand=4µm.

zeigen die Trajektorien der Migration in den Abbildungen 3.9 bis 3.11 auf Seite 54 den Einfluss der Rillenstrukturen auf die Migrationseigenschaften. Die Zellen migrieren bevorzugt entlang der Rillen im Vergleich zu der ungerichteten Migration bei der Kontrolle auf flachen PDMS-Substrate. Zur Quantifizierung der Zellmigration wurden verschiedene charakteristische Größen bestimmt, die im Folgenden einzeln vorgestellt werden.

Zuerst werden die Winkelverteilungen aus der Zellmigration mit und ohne SPC-Behandlung dargestellt. Sie sind als Rose-Diagramme in den folgenden Abbildungen 3.25 und 3.26 dargestellt.



**Abbildung 3.25:** Rose-Diagramm für die Zellmigration ohne SPC-Behandlung auf einem Rillen-Substrat mit Höhe=350nm, Breite=4 $\mu$ m und Abstand=4 $\mu$ m. Das Diagramm zeigt die Winkelverteilung der Migrationsrichtung für n=64 Zellen.



**Abbildung 3.26:** Rose-Diagramm für die Zellmigration mit SPC-Behandlung auf einem Rillen-Substrat mit Höhe=350nm, Breite=4 $\mu$ m und Abstand=4 $\mu$ m. Das Diagramm zeigt die Winkelverteilung der Migrationsrichtung für n=66 Zellen.

Beim Vergleich der Abbildungen 3.25 und 3.26 mit den entsprechenden Abbildungen 3.18 und 3.19 auf Seite 65 aus den Kontrollen, erkennt man eine Veränderung der Verteilung. Diese verändert sich von einer runden (Kontrolle) in eine stark oval ausgeprägte Form, die entlang der Rillen ausgerichtet ist. Darüber hinaus kann man bei der SPC-Behandlung im Vergleich zu ohne eine Abnahme der Verteilung entlang der X-Achse im mittleren Bereich erkennen. Folglich scheint die mikrostrukturierte Oberfläche einen Einfluss auf die Migrationsrichtung von Panc-1 Zellen zu haben, die durch SPC-Behandlung verstärkt werden kann. Infolgedessen stellt die gerichtete Migration durch die verwendete Topographie die Grundvoraussetzung für die folgenden Analysen dar. Im Folgenden werden die berechneten Werte vorgestellt, die diese Winkelverteilung charakterisieren.

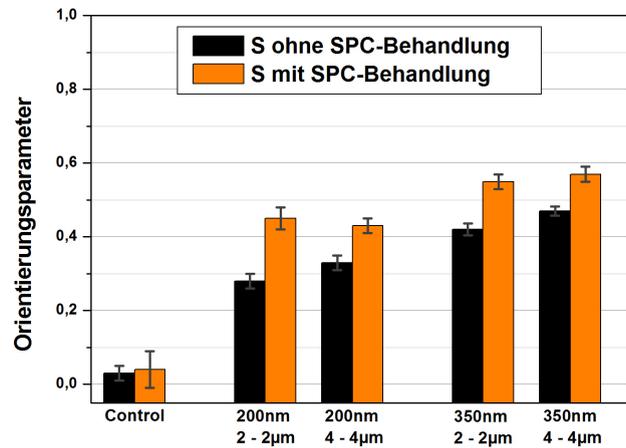
Als erstes wurde der Orientierungsparameter  $S$  für die Migration auf den verschiedenen Rillen-Substraten analog wie in Unterabschnitt 3.4.2 auf Seite 65 beschrieben berechnet. Im Vergleich zu den Ergebnissen bei den Dehnversuchen (vgl. Abschnitt 3.4.2) bei dem die Zugrichtung gleich mit der X-Achse verläuft, verlaufen die Rillenstrukturen entlang der Y-Achse. Infolgedessen entspricht bei den Rillenexperimenten ein Wert für  $S=1$  einer Migration entlang der Rillen,  $S=-1$  senkrecht zu diesen und  $S=0$  einer beliebigen Migration ohne Vorzugsrichtung. Die Berechnung des Orientierungsparameters  $S$  für die verschiedenen Rillen-Substrate mit und ohne SPC-Behandlung führt zu den in Tabelle 3.6 enthaltenen Werten.

Experiment	S ohne SPC	n	S mit SPC	n
Kontrolle	$0.02 \pm 0.03$	179	$0.04 \pm 0.05$	71
H200-B2-A2*	$0.28 \pm 0.02$	95	$0.45 \pm 0.03$	52
H200-B4-A4*	$0.33 \pm 0.02$	90	$0.43 \pm 0.02$	53
H350-B2-A2*	$0.42 \pm 0.02$	91	$0.55 \pm 0.02$	61
H350-B4-A4*	$0.47 \pm 0.02$	89	$0.57 \pm 0.02$	59

**Tabelle 3.6:** Die Tabelle zeigt die verschiedenen Orientierungsparameter  $S$  mit Standardfehler  $S_E$  für die Zellmigration mit und ohne SPC-Behandlung für die Kontrollen und auf den Rillen-Substraten. Hierbei beschreibt  $H$  die Höhe der Rillen in nm,  $B$  die Breite in  $\mu\text{m}$ ,  $A$  den Abstand zwischen den Rillen in  $\mu\text{m}$  und  $n$  die Anzahl der untersuchten Panc-1 Zellen. (\* = signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung nach T-Test  $p < 0.05$ )

Zur Veranschaulichung werden die Werte aus Tabelle 3.6 in der Abbildung 3.27 auf Seite 71 dargestellt.

Die Betrachtung der Werte für den Orientierungsparameter  $S$  führt zu vier Erkenntnissen. Erstens migrieren die Panc-1 Zellen auf allen Substraten entlang der Rillenstrukturen für alle Dimensionierungen der Rillenstrukturen (Höhe, Breite und Abstand) und der SPC-Behandlung ( $S_{Exp.} > S_{Kont.}$ ). Zweitens führt die SPC-Behandlung bei allen verwendeten Rillen-Substraten zu einem verstärkten Vermögen, entlang der Rillenstrukturen zu migrieren ( $S_{+SPC} > S_{-SPC}$ ). Drittens steigert sich ohne SPC-Behandlung das Vermögen der Zellen entlang der Rillenstrukturen zu migrieren mit zunehmender Breite und Abstand der Rillenstrukturen ( $S_{B4-A4} > S_{B2-A2}$ ), die mit zunehmender Höhe der Rillenstrukturen weiter verstärkt wird ( $S_{H350} > S_{H200}$ ). Sie erreicht ihr Maximum ohne SPC-Behandlung bei den Substraten H350-B4-A4 und erreicht einen Wert von  $S = 0.47 \pm 0.02$ . Viertens führt die SPC-Behandlung ebenfalls zu einem verstärkten Vermögen entlang der Rillenstrukturen zu migrieren, wenn



**Abbildung 3.27:** Darstellung des Orientierungsparameters  $S$  mit Standardfehler  $S_E$  für die Zellmigration mit und ohne SPC-Behandlung für die Kontrollen und auf den Rillen-Substraten aus Tabelle 3.6.

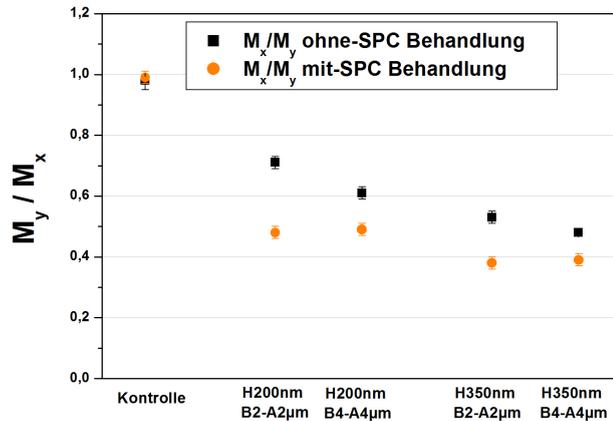
die Höhe der Rillenstrukturen von 200nm auf 350nm zunimmt. Jedoch scheint die Dimensionierung der Substrate, betreffend der Breite  $B$  und dem Abstand  $A$ , keinen Einfluss mehr auf dieses Vermögen zu haben. In beiden Fällen wurde für den Orientierungsparameter ein ähnlicher Wert ermittelt, der mit SPC-Behandlung ein Maximum bei den H350-B4-A4 Rillen-Substraten von  $S=0.57\pm 0.02$  erreicht.

Bildet man wie im Unterabschnitt 3.4.1 die Verhältnisse zwischen der projizierten Migration auf die senkrecht zueinander stehenden X- und Y-Achsen, ergeben sich folgende in der Tabelle 3.7 enthaltenden Werte. Hierbei entspricht die Y-Achse dem Verlauf der Rillenstrukturen.

Experiment	$M_x/M_y$ ohne SPC	n	$M_x/M_y$ mit SPC	n
Kontrolle	$0.98 \pm 0.03$	136	$0.99 \pm 0.02$	57
H200-B2-A2*	$0.71 \pm 0.02$	56	$0.48 \pm 0.02$	55
H200-B4-A4*	$0.61 \pm 0,02$	86	$0.49 \pm 0.02$	59
H350-B2-A2*	$0.53 \pm 0.02$	101	$0.38 \pm 0.02$	53
H350-B4-A4*	$0,48 \pm 0.02$	102	$0.39 \pm 0.02$	52

**Tabelle 3.7:** Die Tabelle zeigt die verschiedenen Mittelwerte für die Verhältnisse  $M_x/M_y$  mit dem Standardfehler  $S_E$  für die Zellmigration mit und ohne SPC-Behandlung für die Kontrollen und auf den Rillen-Substraten. Hierbei beschreibt H die Höhe der Rillen in nm, B die Breite in  $\mu\text{m}$ , A den Abstand zwischen den Rillen in  $\mu\text{m}$  und n die Anzahl der untersuchten Panc-1 Zellen. (\*= signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung nach T-Test  $p < 0.05$ )

Die ermittelten Werte für  $M_x/M_y$  zeigen ein ähnliches Verhalten der Panc-1 Zellen bei Rillenstrukturen auf wie beim Orientierungsparameter S. Zur Visualisierung sind die Werte für  $M_x/M_y$  aus Tabelle 3.7 in der folgenden Abbildung 3.28 dargestellt.



**Abbildung 3.28:** Darstellung der Verhältnisse  $M_x/M_y$  mit Standardfehler aus Tabelle 3.7 für die Migration mit und ohne SPC-Behandlung für die Kontrollen und auf den Rillen-Substraten.

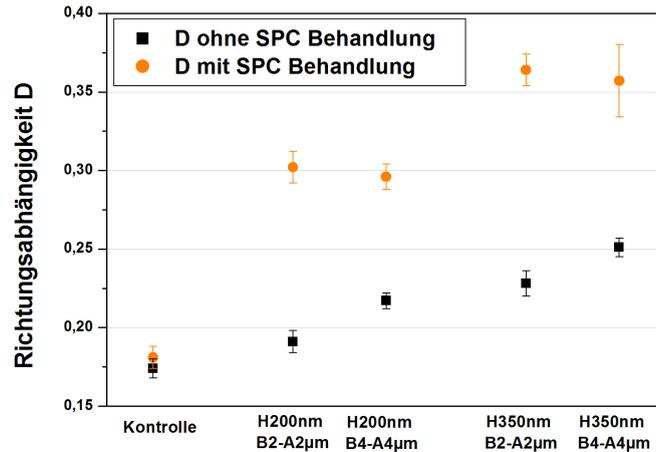
Ohne SPC-Behandlung fällt der Wert für die Verhältnisse mit steigender Breite B und steigendem Abstand A der Rillenstrukturen ab, die durch höhere Rillenstrukturen noch weiter abfällt. Die SPC-Behandlung führt bei allen Substraten zu einer verstärkten Migration entlang der Rillenstrukturen  $M_x/M_y(\text{mit SPC}) < M_x/M_y(\text{ohne SPC})$ . Jedoch ist diese wie beim Orientierungsparameter S nur von der Rillenhöhe H abhängig und nicht von der Dimensionierung der Rillenstrukturen.

Zusätzlich wurde die Richtungsabhängigkeit D der Zellen für die unterschiedlichen Substrate berechnet und sind in der folgenden Tabelle 3.8 dargestellt.

Experiment	D ohne SPC	n	D mit SPC	n
Kontrolle	$0.174 \pm 0.006$	162	$0.181 \pm 0.007$	68
H200-B2-A2*	$0.191 \pm 0.007$	56	$0.302 \pm 0.010$	58
H200-B4-A4*	$0.217 \pm 0.005$	89	$0.296 \pm 0.008$	62
H350-B2-A2*	$0.228 \pm 0.008$	108	$0.364 \pm 0.010$	66
H350-B4-A4*	$0.251 \pm 0.006$	62	$0.357 \pm 0.023$	65

**Tabelle 3.8:** Darstellung der Richtungsabhängigkeit D mit Standardfehler aus der Zellmigration mit und ohne SPC-Behandlung für die Kontrollen und auf den Rillen-Substraten für n Zellen. (\* = signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung nach T-Test  $p < 0.05$ )

Eine graphische Auftragung der ermittelten Werte D führt zur folgenden Abbildung.



**Abbildung 3.29:** Darstellung der Richtungsabhängigkeit D mit Standardfehler aus der Zellmigration mit und ohne SPC-Behandlung für die Kontrollen und auf den Rillen-Substraten.

Am Verlauf der Werte erkennt man analog zu den anderen Parametern, dass ohne SPC-Behandlung die Richtungsabhängigkeit D mit steigender Breite B, Abstand A und Höhe H der Rillenstrukturen zunimmt. Die SPC-Behandlung verstärkt diesen Effekt für alle verwendeten Substrate und erhöht sich um ca. 35% bei H=200nm und um 50% bei H=350nm. Jedoch scheint auch an dieser Stelle die SPC-Behandlung zwar die Richtungsabhängigkeit mit steigender Rillenhöhe zu verstärken, jedoch ist diese unabhängig von der Dimensionierung der Rillenstrukturen.

Als letztes wurde die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit  $\bar{v}$  auf den Rillen-Substraten bestimmt. Ihre Werte sind in der folgenden Tabelle 3.9 dargestellt.

Experiment	$\bar{v}$ ohne SPC	n	$\bar{v}$ mit SPC	n
Kontrolle*	$0.44 \pm 0.04$	179	$0.65 \pm 0.05$	71
H200-B2-A2*	$0.45 \pm 0.05$	107	$0.65 \pm 0.03$	58
H200-B4-A4*	$0.46 \pm 0.06$	73	$0.63 \pm 0.03$	52
H350-B2-A2*	$0.47 \pm 0.04$	112	$0.68 \pm 0.05$	67
H350-B4-A4*	$0.47 \pm 0.05$	110	$0.69 \pm 0.06$	66

**Tabelle 3.9:** Darstellung der Migrationsgeschwindigkeiten  $\bar{v}$  mit Standardfehler für die Experimente aus den Kontrollen und Rillen-Substraten jeweils mit und ohne SPC-Behandlung. (\*=signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung nach T-Test  $p < 0.05$ )

Beim Vergleich der Werte für Experimente ohne SPC-Behandlung fällt auf, dass die Dimensionierung der Rillen-Substrate für die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit  $v$  keinen Einfluss hat. Sie ist nahezu gleich mit dem Wert für die Kontrollen und liegt bei ca.  $0.45 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ . Das gleiche Verhalten zeigen die Werte mit der SPC-Behandlung auf. Ungeachtet der SPC-Behandlung scheint die Dimensionierung der Rillenstrukturen im Vergleich zur Kontrolle mit SPC-Behandlung keinen Einfluss auf die mittlere Migrationsgeschwindigkeit zu haben und ihr Mittelwert beträgt ca.  $0.65 \pm 0.05 \mu\text{m}/\text{min}$ .

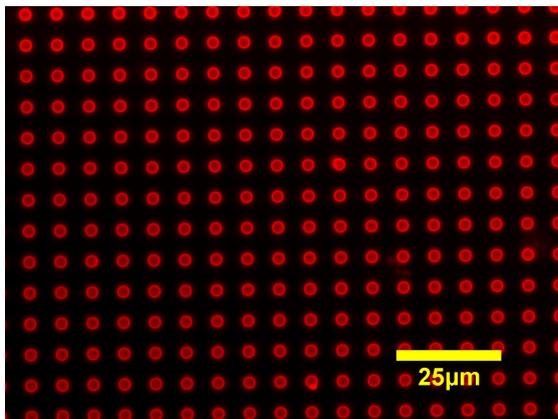
Obwohl die Migrationsgeschwindigkeit innerhalb der Experimente mit oder ohne SPC-Behandlung nahezu konstant erscheint, zeigt der Orientierungsparameter zusammen mit den anderen charakteristischen Größen ein erhöhtes Vermögen entlang der Rillenstrukturen zu migrieren. Dieser Effekt nimmt ohne SPC-Behandlung bei Zunahme von Höhe, Breite und Abstand der Rillenstrukturen zu und wird durch SPC-Behandlung weiter verstärkt. Jedoch scheint die gerichtete Migration der Panc-1 Zellen auf den Rillenstrukturen durch die SPC-Behandlung nur von der Höhe der Rillen abhängig zu sein und nicht vom Abstand und Breite der Rillen.

#### 3.4.4 Migration auf den Säulen-Substraten

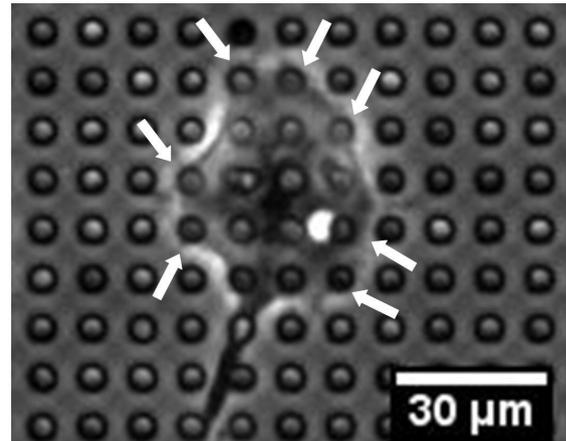
Im Rahmen dieser Arbeit dienten neben den Rillenstrukturen die Säulen-Substrate als ein weiterer Typ einer mikrostrukturierten Oberfläche mit einer anderen Art der Anisotropie (vgl. Abschnitt 2.1.3 auf Seite 37). Im Gegensatz zu den flachen PDMS-Substraten und Rillenstrukturen wurden diese jedoch lediglich an den Spitzen der Säulen mit Fibronectin beschichtet, wie sie aus einem Vergleichssubstrat in Abbildung 3.30 einzusehen ist. Infolgedessen konnten die Panc-1 Zellen nur auf den Säulenspitzen Adhäsionen via Integrine ausbilden. Dies äußert sich in der morphologischen Zellform dadurch, dass der Bereich der Zellperipherie sich entlang der Säulenspitzen abstützt, wie man exemplarisch an Abbildung 3.31 auf Seite 75 erkennen kann. Entsprechend den Ergebnissen aus den Rillenstrukturen in Abschnitt 3.4.3 auf Seite 68 wurde die Wirkung der SPC-Behandlung auf die Migrationseigenschaften von Panc-1 Zellen auf den Säulen-Substraten untersucht. Die Ergebnisse werden im Folgenden vorgestellt.

Die Beobachtung der Phasenkontrastaufnahmen für die Migration auf den Säulen-Substraten zeigten, dass die Panc-1 Zellen bis auf einige wenige Zellen ausschließlich auf den Säulenspitzen migrierten. Zellen die zwischen den Säulenstrukturen migrierten wurden für die Analyse der Migration auf den Säulen-Substraten ausgeschlossen. Den Anfang der Analysen stellen die errechneten Mittelwerte für die Geschwindig-

keit  $v$  dar. Sie wurden ohne SPC-Behandlung zu  $v(\text{ohneSPC}) = 0.45 \pm 0.02 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$  und mit zu  $v(\text{mitSPC}) = 0.58 \pm 0.02 \frac{\mu\text{m}}{\text{min}}$  bestimmt. Vergleichbar zu den anderen Substraten führt die SPC-Behandlung zu einer Steigerung der Geschwindigkeit der Panc-1 Zellen auf den Säulen-Substraten.

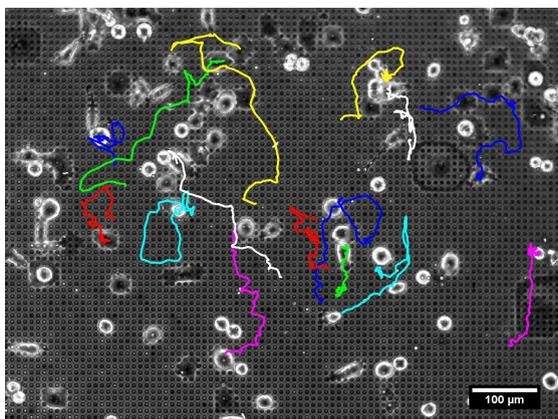


**Abbildung 3.30:** Darstellung der Säulenstrukturen mit Breite  $2\mu\text{m}$ , einem Abstand zwischen den Säulen  $6\mu\text{m}$  und einer Höhe  $10\mu\text{m}$ . Die Spitzen der Säulenstrukturen wurden mit Alexa568 angefärbten Fibronektin beschichtet. Die eingezeichnete Skala entspricht  $25\mu\text{m}$ .

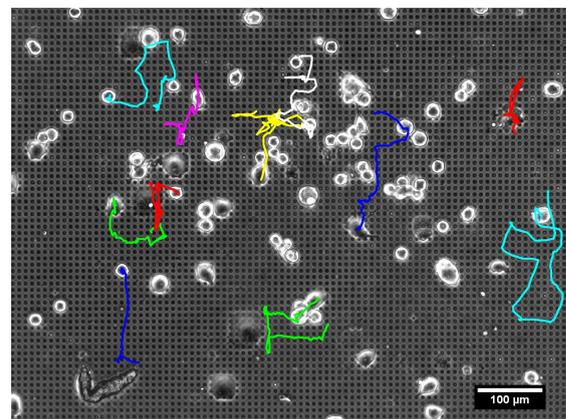


**Abbildung 3.31:** Darstellung einer Panc-1 Zelle auf den Säulenstrukturen mit Durchmesser  $4\mu\text{m}$ , Abstand zwischen den Säulen von  $6\mu\text{m}$  und einer Höhe von  $8,7\mu\text{m}$ . Die eingezeichneten weißen Pfeile stellen die Ankerpunkte der Zellaufgabe dar. Die eingezeichnete Skala entspricht  $30\mu\text{m}$ .

Im nächsten Schritt sind die Trajektorien aus der Migration auf den Säulenstrukturen mit und ohne SPC-Behandlung in den Abbildungen 3.32 und 3.33 dargestellt. Der Durchmesser der Säulenstrukturen betrug  $4\mu\text{m}$  mit einem Abstand zwischen den Säulen von  $6\mu\text{m}$  und einer Höhe von  $8.7\mu\text{m}$ .

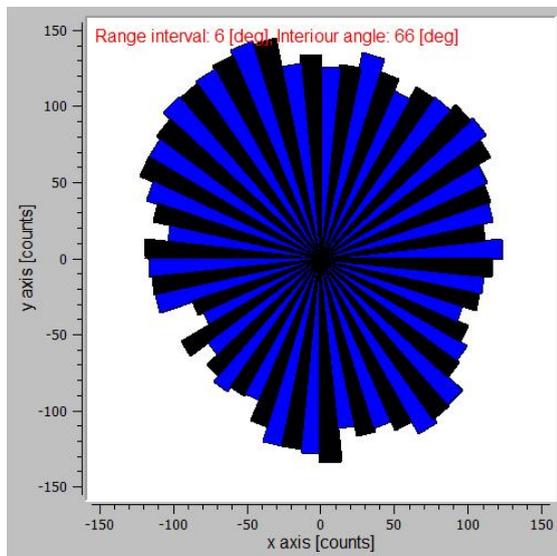


**Abbildung 3.32:** Darstellung der Migrationstrajektorien für Panc-1 Zellen auf einem Säulen-Substrat ohne SPC-Behandlung. Die eingezeichnete Skala entspricht  $100\mu\text{m}$ .

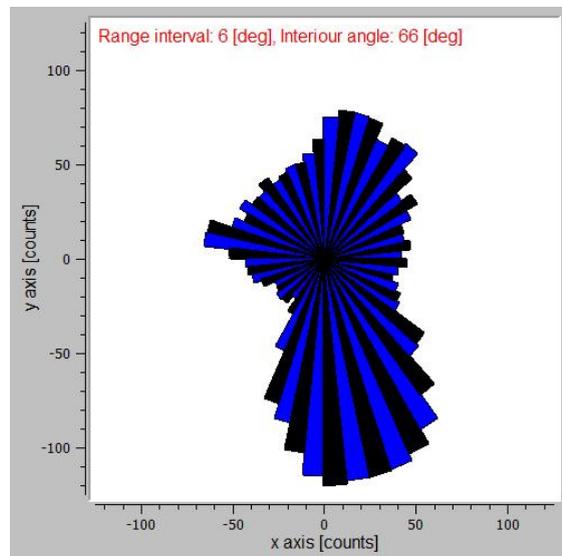


**Abbildung 3.33:** Darstellung der Migrationstrajektorien für Panc-1 Zellen auf einem Säulen-Substrat mit SPC-Behandlung. Die eingezeichnete Skala entspricht  $100\mu\text{m}$ .

Beim Vergleich der Abbildungen 3.32 und 3.33 erkennt man auf dem ersten Blick kein großen Unterschied, wie bei den Trajektorien aus den Rillenstrukturen in den Abbildungen 3.9 bis 3.11 auf Seite 54. Bei näherer Betrachtung erkennt man jedoch bei SPC-Behandlung eine leichte Tendenz zur Migration entlang der X- und Y-Achse. Zur Untersuchung einer möglichen Veränderung der Migrationseigenschaften sind die Winkelverteilungen der Migrationsschritte als Rose-Diagramme in den folgenden Abbildungen 3.34 und 3.35 jeweils mit und ohne SPC-Behandlung dargestellt.



**Abbildung 3.34:** Winkelverteilung der Migrationsbewegungen auf den Säulen-Substraten ohne SPC-Behandlung ( $n=111$ ).

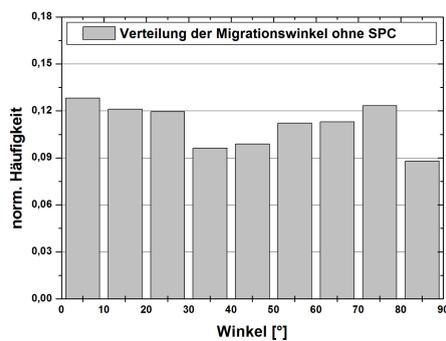


**Abbildung 3.35:** Winkelverteilung der Migrationsbewegungen auf den Säulen-Substraten mit SPC-Behandlung ( $n=56$ ).

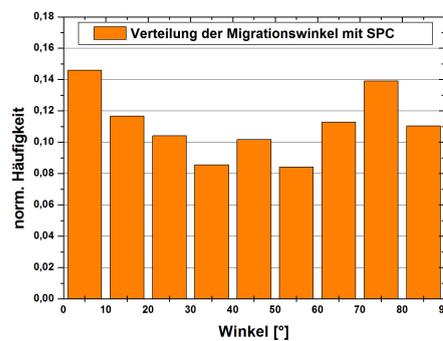
Man erkennt bei der linken Abbildung 3.34 ohne SPC-Behandlung eine isotrope Winkelverteilung für die Migration auf den Säulen-Substraten. Folglich migrieren die Zellen ohne SPC-Behandlung in zufällige ungerichtete Richtungen. Im Gegensatz dazu zeigt die Winkelverteilung aus Abbildung 3.35 bei SPC-Behandlung eine deutlich veränderte Form auf.

Die Berechnung des Orientierungsparameters  $S$  aus der Migration analog zu den Ergebnissen aus den Rillen-Experimenten in Abschnitt 3.4.3 auf Seite 68 ergibt mit und ohne SPC-Behandlung einen Wert von  $S=0.00 \pm 0.04$ . Die Werte deuten auf eine zufällige Migration der Zellen hin und scheinen im Widerspruch zu der Winkelverteilung in Abbildung 3.35 zu stehen. Jedoch muss bedacht werden, dass eine mögliche bevorzugte Migration entlang der X- und Y-Achse sich durch die Mittelwertbildung für den Orientierungsparameter  $S$  aus den einzelnen Migrationsschritten aufheben könnte. In diesem Fall wäre eine Unterscheidung zwischen einer zufälligen Migration und einer gerichteten Migration entlang der Hauptachsen nicht mit dem Orientierungsparameter zu unterscheiden. Ähnlich verhält es sich mit den

Verhältnissen aus der Projektion der Migration auf die X- und Y-Achse ( $M_x/M_y$ ). Diese wurden ohne SPC-Behandlung zu  $M_x/M_y(\text{ohneSPC})=1.01 \pm 0.04$  und mit zu  $M_x/M_y(\text{mitSPC})=1.02 \pm 0.06$  bestimmt. Entsprechend des Orientierungsparameters S deuten die Werte für  $M_x/M_y$  nah bei eins ebenfalls auf eine zufällige Migration hin. Gleichermaßen lassen sich die Verhältnisse  $M_x/M_y$  im Falle einer zufälligen Migration und einer gerichteten Migration entlang der X- und Y-Achse nicht unterscheiden. Zur Unterscheidung der beiden Fälle zeigen die folgenden Abbildungen 3.36 und 3.37 die Winkelverteilung der Migration in Grad. Hierbei wurden alle Migrationswinkel aus Symmetriegründen in den ersten Quadranten gespiegelt [Kemkemer06].



**Abbildung 3.36:** Winkelverteilung der Migrationsbewegungen auf den Säulen-Substraten ohne SPC-Behandlung ( $n=111$ ) in Grad. Die Häufigkeit wurde auf die Gesamtzahl der Werte normiert. Die Schrittweite beträgt  $10^\circ$ .



**Abbildung 3.37:** Winkelverteilung der Migrationsbewegungen auf den Säulen-Substraten mit SPC-Behandlung ( $n=56$ ) in Grad. Die Häufigkeit wurde auf die Gesamtzahl der Werte normiert. Die Schrittweite beträgt  $10^\circ$ .

Die linke Abbildung 3.36 zeigt eine eher gleichmäßige Verteilung der Migrationsschritte an. Folglich liegt ohne SPC-Behandlung eine ungerichtete Migration der Panc-1 Zellen auf den Säulen-Substraten vor. Im Gegensatz dazu zeigt die Abbildung 3.37 eine leichte Umverteilung der Winkel hin zu den Werten bei  $0^\circ$  und  $90^\circ$  auf. Folglich scheinen die Panc-1 Zellen durch die SPC-Behandlung eher entlang der X- und Y-Achse zu migrieren.

Zusammenfassend scheint die SPC Zugabe und der damit verbundenen Keratinstrukturierung die Migrationsrichtung der Panc-1 Zellen ähnlich wie bei den Dehnungsexperimenten aus Abschnitt 3.4.2 und den Rillenstrukturen aus Abschnitt 3.4.3 zu beeinflussen.

### 3.4.5 Diskussion

Die Zellmigration ist ein komplexer Vorgang, die von einem koordinierten Zusammenspiel des Aktinnetzwerks und anderen Zytoskelettelementen zusammen mit Zelladhäsionen gesteuert wird [Goldyn2009] [Wang2001] [Ridley03] [Clainche08]. Das Aktinnetzwerk spielt bei der Migration die tragende Rolle in der morphologischen Gestaltung der Frontlinie in Migrationsrichtung durch die Ausbildung von Filo- und Lamellipodien zusammen mit der Aktin-Myosin Kontraktilität, während z.B. die Mikrotubuli den Rückzug vom hinteren Teil der Zelle regulieren [Ballestrem00] [Wehrle03]. Die Zellen unterliegen während der Migration physikalischen und chemischen Signalen, die zusammen den Migrationsmechanismus dirigieren [Fouchard11] [Hood02] [Wang2001]. Ein bekannter Vertreter der physikalischen Signale auf das Zellverhalten wird als *Contact-Guidance* bezeichnet. Bei der Contact-Guidance wird die ungerichtete Migrationsrichtung durch eine strukturierte Oberflächengeometrie beeinflusst, die je nach Beschaffenheit der Topographie eine bevorzugte Migrationsrichtung vorgeben kann [Loesberg06] [Doyle09]. Unter anderem wurden in anderen Arbeiten rillenartige Strukturen vergleichbar mit den Rillen-Substraten dieser Arbeit hergestellt, die für verschiedene Zelllinien eine gerichtete Migration und Zellpolarisation zeigten [Teixeira03] [Kemkemer06] [Andersson03].

In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss der Keratinstruktur auf die Migrationseigenschaften in verschiedenen Experimenten und Substraten untersucht (Dehnversuche, Rillen- und Säulen-Substrate).

Die dargestellten Ergebnisse aus dem Kapitel 3.4 zeigen deutlich, dass die Panc-1 Zellen bevorzugt senkrecht zur Zugrichtung bei den Dehnversuchen bzw. entlang der Rillen bei den mikrostrukturierten Substraten migrieren.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung bei den Dehnversuchen könnte die wirkende Deformation auf die Zelle liefern. Die Aktinfasern könnten bei den Dehnversuchen senkrecht zur Zugrichtung im Vergleich zur Zugrichtung einer geringeren Belastung durch die Deformation unterliegen. Dementsprechend könnte die Ausbildung von Aktinfasern in Zugrichtung gestört und instabil sein, während die Polymerisierung von Aktinfasern senkrecht dazu stabiler wäre [Teixeira03]. Die Folge hieraus wäre eine bevorzugte Migration der Zellen senkrecht zur Zugrichtung, die mit zunehmender Beeinträchtigung in diesem Fall mit steigender Frequenz stärker ausgeprägt wäre. Die Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass die bevorzugte Migration senkrecht zur Zugrichtung durch das umstrukturierte Keratinnetzwerk weiter verstärkt werden kann. Dies könnte durch die stabilisierende Wirkung des Keratinnetzwerks erklärt werden. Ähnlich wie in Unterabschnitt 3.3.4 diskutiert wurde,

könnte das Keratinnetzwerk eine stabilisierende Wirkung auf die Zellintegrität in der Zelleripherie haben, die einen Teil der wirkenden Deformation absorbiert und dadurch den Grad an Beeinträchtigung der Aktinfaser in Zugrichtung entgegenwirkt. Die Umstrukturierung vom Keratinnetzwerk durch die SPC-Behandlung könnte diese stabilisierende Wirkung aufheben, was eine verstärkte Migration der Panc-1 Zellen mit SPC-Behandlung senkrecht zur Zugrichtung zur Folge hätte.

Die Analysen aus der gerichteten Migration auf den Rillen-Substraten zeigen ein abweichendes Zellverhalten zu ähnlichen Arbeiten mit anderen Zelllinien, bei denen die Polarisation und gerichtete Migration zunahm mit abnehmendem Abstand zwischen den Rillenstrukturen [Biela09] [Curtis98] [Grew08]. Das abweichende Verhalten der Panc-1 Zellen könnte durch instabile Aktinfasern erklärt werden. Gesehen den Fall, dass die Zelloberfläche bei kleinen Rillenabständen keinen oder nur einen sehr geringen Kontakt zum Substratboden herstellen kann, könnte die Polymerisierung von Aktinfasern entlang der Rillenstrukturen im Vergleich zur senkrechten Ausbildung dieser durch die fehlenden Adhäsionsmöglichkeiten zwischen den Rillenstrukturen stabiler sein [Teixeira03]. Bei steigendem Abstand zwischen den Rillenstrukturen könnte der Kontakt zwischen der Zelle und dem Substratboden ansteigen, was zu einer Steigerung der Adhäsionsmöglichkeiten führen würde. Dies könnte zur Ausbildung von mehr stabilen Aktinfilamenten führen und als ein stärkeres Signal auf die Zelle wirken, die bevorzugt entlang der Rillen migriert. Dieser Mechanismus würde die stärker gerichtete Migration der Panc-1 Zellen mit steigendem Rillenabstand  $A$  und steigender Rillenhöhe  $H$  erklären.

Die Auswirkungen der SPC-Behandlung auf das Migrationsverhalten auf den Rillen-Substraten könnten durch eine stabilisierende Wirkung des Keratinnetzwerks auf die Zellintegrität erklärt werden. Die SPC-Behandlung und die damit verbundene Umstrukturierung des Keratinnetzwerks könnte ähnlich wie bei den Dehnversuchen eine eventuelle stabilisierende Wirkung auf die Zellintegrität aufheben. Dies könnte zur Folge haben, dass der Kontakt zwischen der Zell- und Substratoberfläche größer wäre als im Vergleich zu einem intakten Keratinnetzwerk. Die Zelle könnte den gesamten zur Verfügung stehenden Raum zwischen den Rillenstrukturen einnehmen, unabhängig davon, ob der Abstand zwei oder vier Mikrometer sind. Entsprechend dem Absatz vorher könnte der größere Kontakt zwischen der Zelle und der Substratoberfläche als ein stärkeres Signal auf die Zelle wirken, die bevorzugt entlang der Rillen migriert. Dieser Mechanismus würde darüber hinaus erklären, dass die gerichtete Migration bei SPC behandelten Panc-1 Zellen zwar unabhängig von der verwendeten Breite und Abstand der Rillenstrukturen war, wohl aber von deren Höhe. Analog zum Absatz vorher könnte der Kontakt zwischen der Zell- und Sub-

stratoberfläche mit zunehmender Höhe der Rillenstrukturen ansteigen, was zu einer Steigerung der Adhäsionsmöglichkeiten führen würde. Dies könnte zur Folge haben, dass ein stärkeres Signal auf die Zelle wirkt und sie infolgedessen bevorzugt entlang der Rillen migriert. Einige Arbeiten zeigen in diesem Zusammenhang z.B. das die Wirkung der Rillenhöhe bis zu einer bestimmten Höhe die Ausrichtung von Zellen beeinflusst [Teixeira03] [Hamilton10] [Andersson03] [Dalby04].

Die Analysen zur Migration auf den Säulen-Substrate könnten sich durch eine ähnliche Erklärung wie bei den Rillen-Substraten deuten lassen. Die Migration auf den Säulen-Substraten zeigt ohne SPC-Behandlung eine zufällige Migration auf den Säulen. Folglich scheint diese topographische Oberfläche keine Signalwirkung auf die Migration der Panc-1 Zellen zu haben. Die Winkelverteilung für die Migrationschritte der SPC behandelten Panc-1 Zellen zeigt eine Veränderung auf, die sich von der isotropen Verteilung der Migrationschritte ohne SPC-Behandlung unterscheidet. Eine mögliche Erklärung könnte analog zu den bisherigen Beobachtungen aus den Experimenten mit den Rillen-Substraten sein, dass das intakte Keratinnetzwerk als stabilisierendes Integritätselement die Ausrichtung von Aktinfasern unterstützt und hierdurch die topographische Oberfläche nicht als Signal wahrgenommen wird. Die Umstrukturierung des Keratinnetzwerks durch die SPC-Behandlung könnte die Zellintegrität reduzieren und infolgedessen, die Migrationseigenschaften verändern. Eine mögliche Erwartung wäre, dass infolge der SPC-Behandlung die Panc-1 Zellen bevorzugt in Richtung des kleinsten Abstandes zwischen den Säulen migrieren (X- und Y-Achse). Dies ist jedoch nicht aus den Migrationsanalysen hervorgegangen. Weitere Experimente mit einer höheren Anzahl an untersuchten Zellen und anderen Säulenabständen könnten teilweise auf solche Erwartungen erfüllen.

### 3.5 Einfluss vom Zytoskelett auf die Morphologie

Das Zytoskelett einer Zelle ist an einer Vielzahl von zellspezifischen Funktionen wie z.B. die Wechselwirkung der Zelle mit ihrer Umgebung in Form von Fokalen Adhäsionen oder der Zellmigration beteiligt [Fletcher10] [Wehrle03] [Magin07]. Eine weitere wichtige Funktion stellt die Stabilisierung der Zellmorphologie dar. Neuste Arbeiten von Small et al. zeigen in diesem Zusammenhang wie das Aktin im Zellkortex die Stabilisierung der Form unterstützt [Urban10] [Alberts]. Einen ähnlichen Effekt wird den Intermediärfilamenten nachgesagt [Magin07] [Helfand03] [Helfand04] [Toivola97]. Die einzelnen Funktionen und Eigenschaften der Zytoskelettelemente können im Abschnitt 1.1 auf Seite 11 nachgelesen werden.

In diesem Zusammenhang stellt die Untersuchung der stabilisierenden Wirkung der

Zellmorphologie durch die einzelnen Zytoskelettelemente mittels der Adhäsionsfläche einen Aspekt in dieser Arbeit dar. Hierzu wurden Panc-1 Zellen auf flache PDMS-Substrate ausgesät (vgl. Abschnitt 2.1.5 auf Seite 39) und mit unterschiedlichen Drogen behandelt, die die einzelnen Zytoskelettelemente Aktin, Mikrotubuli und Keratin als Intermediärfilament manipulieren. Zur Untersuchung der morphologischen Stabilität der Zelle wurde die zeitliche Entwicklung der Adhäsionsfläche  $A$  auf den Substraten ca. 45 Min. vor und 90 Min. nach der Drogenzugabe erfasst und mit Kontrollexperimenten verglichen. Hierzu wurde die Adhäsionsfläche  $A$  von mehreren Zellen erfasst, auf ihren Anfangswert normiert und zu jedem Zeitpunkt  $t_i$  über die Anzahl der Zellen gemittelt. Die Tabelle 3.10 enthält die auf die Zytoskelettelemente gewirkten Drogen mit ihren Endkonzentrationen im Experimentiermedium.

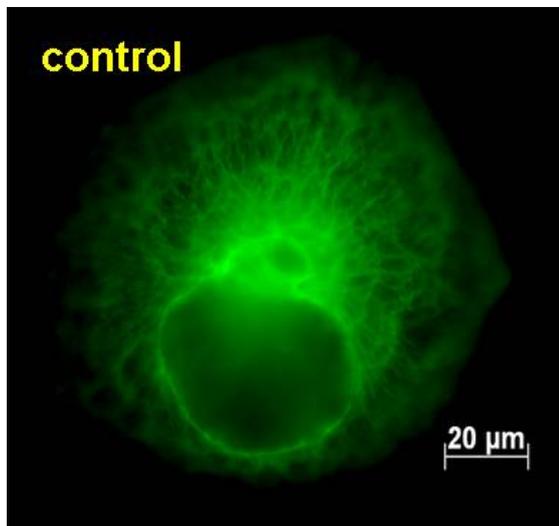
Droge	Wirkung	Konzentration	Literatur
CytochalasinD	Bindet an die Aktinpolymere und verhindert ihre Polymerisierung	1 $\mu\text{mM}$	[Waka01]
Nocodazol	Stört das Mikrotubuli-Netzwerk durch Depolymerisierung	3 $\mu\text{mM}$	[Mikha98]
SPC	Führt zu einer Umstrukturierung des Keratinnetzwerks (vgl. Abschnitt 1.3.4 auf Seite 22)	1.5 $\mu\text{mM}$	[Beil03]

**Tabelle 3.10:** Angaben für die Endkonzentration der verwendeten Drogen und ihre Wirkung auf die einzelnen Zytoskelettelemente [Bershadsky96] [Seufferlein95] [Wakita98].

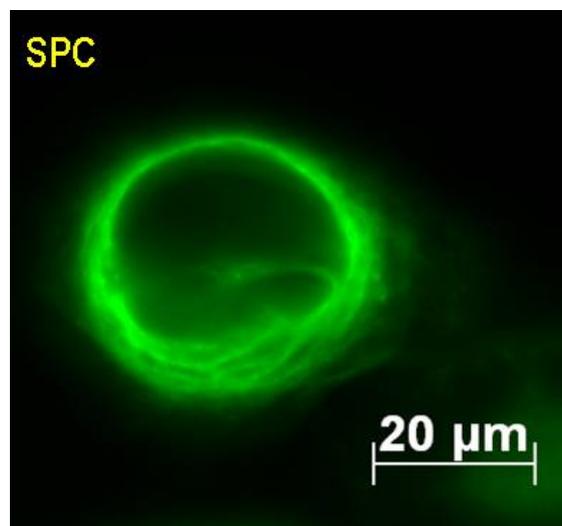
In den folgenden Unterabschnitten 3.5.1 bis 3.5.3 werden die Ergebnisse der verwendeten Drogen vorgestellt.

### 3.5.1 Einfluss von Keratin auf die Zellmorphologie

Die Untersuchung der Stabilität in Bezug auf die Adhäsionsfläche  $A$  mit Keratin als Intermediärfilament bedient sich am SPC-Effekt (vgl. Abschnitt 1.3.4 auf Seite 22) [Beil03] [Seufferlein95] [Wakita98]. Dieser ermöglicht die Auswirkungen einer Umstrukturierung vom Keratinnetzwerk auf die Zellmorphologie zu untersuchen. Die Fluoreszenzaufnahmen in den Abbildungen 3.38 und 3.39 auf Seite 82 zeigen in diesem Zusammenhang links die Aufnahme einer gewöhnlichen Panc-1 Zelle als Kontrolle und rechts das einer mit umstrukturiertem Keratinnetzwerk eine Stunde nach SPC Zugabe.

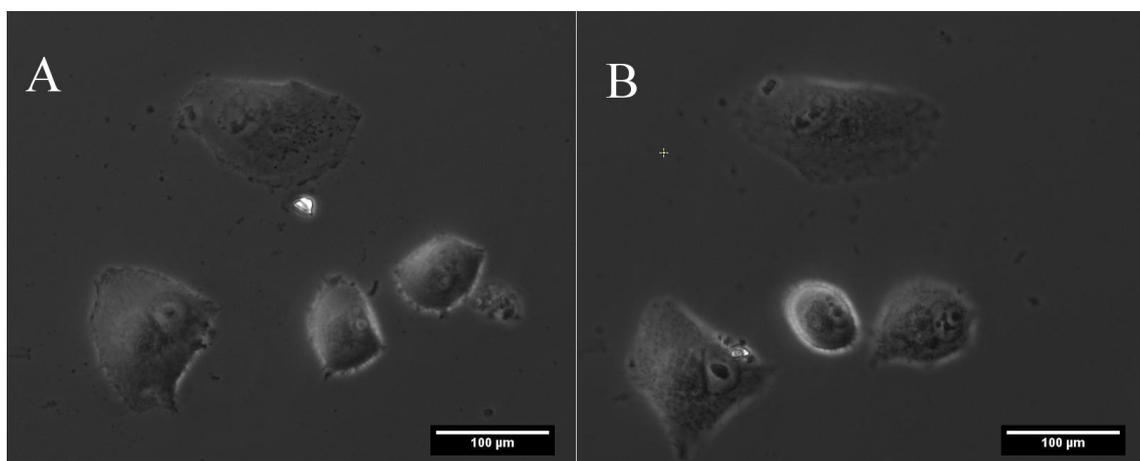


**Abbildung 3.38:** Darstellung vom Keratinnetzwerk einer Panc-1 Zelle ohne SPC-Behandlung. Die Skala entspricht  $20\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.39:** Darstellung vom Keratinnetzwerk einer Panc-1 Zelle eine Stunde nach SPC-Behandlung. Die Skala entspricht  $20\mu\text{m}$ .

Man erkennt in der linken Abbildung 3.38 wie das Keratinnetzwerk vom perinuklearen Bereich bis in die Zellperipherie reicht [Beil03]. Im Gegensatz dazu ist das Keratin in Abbildung 3.39 nach einer Stunde SPC Zugabe hauptsächlich um den Zellkern konzentriert. Um den Einfluss der Umstrukturierung des Keratinnetzwerks zu untersuchen, wurde die zeitliche Entwicklung der Zelladhäsionsfläche  $A$  von mehreren Zellen bestimmt. Anschließend wurden die Flächen auf die Ausgangsgröße normiert und am Schluss gemittelt. Die folgenden Phasenkontrastaufnahmen in der Abbildung 3.40 zeigt exemplarisch Panc-1 Zellen vor und nach der SPC Zugabe.



**Abbildung 3.40:** Phasenkontrastaufnahme von Panc-1 Zellen (A) 45 Minuten vor und (B) 95 Minuten nach SPC Zugabe. Die Skala entspricht  $100\mu\text{m}$ .

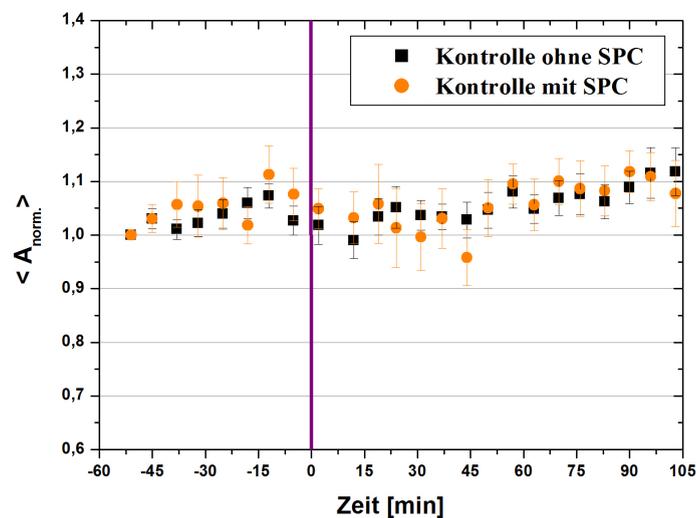
Beim Betrachten der Abbildung 3.40 erkennt man keinen merklichen Unterschied in der Adhäsionsfläche der Panc-1 Zellen. Die Berechnung des Mittelwerts der Adhäsions-

onsfläche  $A$  aus dem Zeitraum vor der SPC Zugabe und des Mittelwerts der letzten 100 Minuten des Experiments als eine Art Grenzwert für die SPC-Behandlung führt zu den in der Tabelle 3.11 dargestellten Werten. Aufgrund der starken Streuung der Zellgröße und der damit verbundenen Adhäsionsfläche  $A_{absolut}$  innerhalb derselben Experimente ergeben sich große Abweichungen. Infolgedessen wurde die Adhäsionsfläche auf ihre Anfangsgröße normiert  $A_{normiert}$ . Die folgende Tabelle 3.11 beinhaltet die absolute und normierte Adhäsionsfläche  $A$  für die Kontrollexperimente mit und ohne SPC Zugabe.

Typ	ohne SPC	$S_E$	mit SPC	$S_E$
$A_{absolut} [\mu\text{m}^2]$	4102	$\pm 418$	4206	$\pm 465$
$A_{normiert}$	1.04	$\pm 0.05$	1.05	$\pm 0.06$

**Tabelle 3.11:** Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der absoluten und normierten Adhäsionsfläche  $A$  vor der SPC Zugabe und den Mittelwert aus den letzten 100 Minuten nach SPC Zugabe als Grenzwert mit Standardfehler  $S_E$ .

Ein Vergleich der Werte zeigt, dass die SPC-Behandlung keinen Einfluss auf die Adhäsionsfläche der Panc-1 Zellen hat. Zur Veranschaulichung zeigt die folgende Abbildung 3.41 die zeitliche Entwicklung des Mittelwerts der normierten Adhäsionsfläche  $A_{norm.}$  von Panc-1 Zellen vor und nach Zugabe vom Wirkstoff SPC.

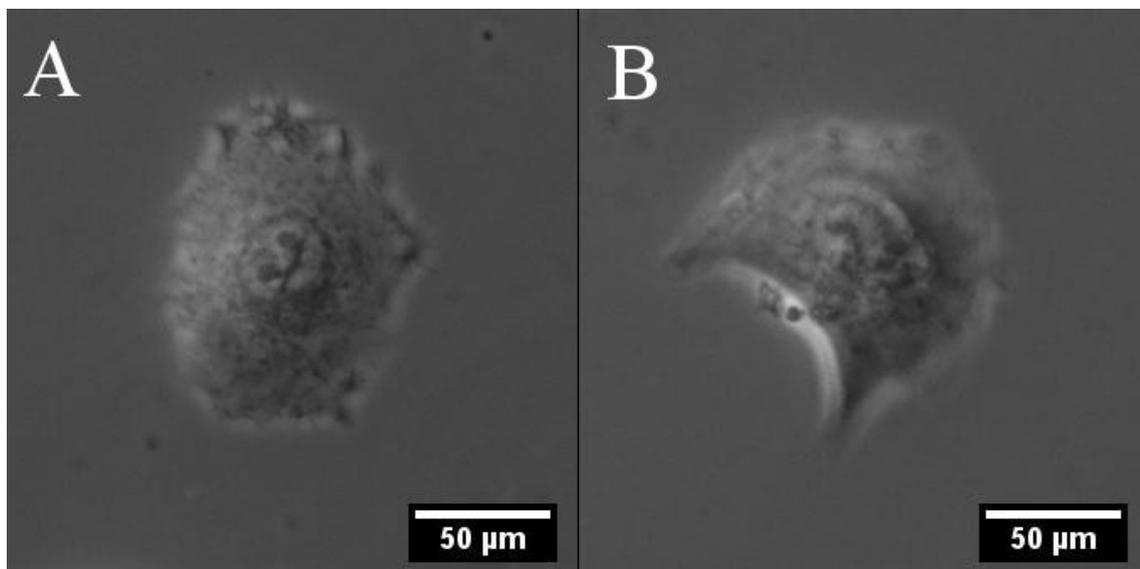


**Abbildung 3.41:** Darstellung der zeitlichen Entwicklung des Mittelwerts der normierten Adhäsionsfläche  $A_{norm.}$  mit (orange,  $n=27$ ) und ohne (schwarz,  $n=31$ ) SPC-Behandlung.

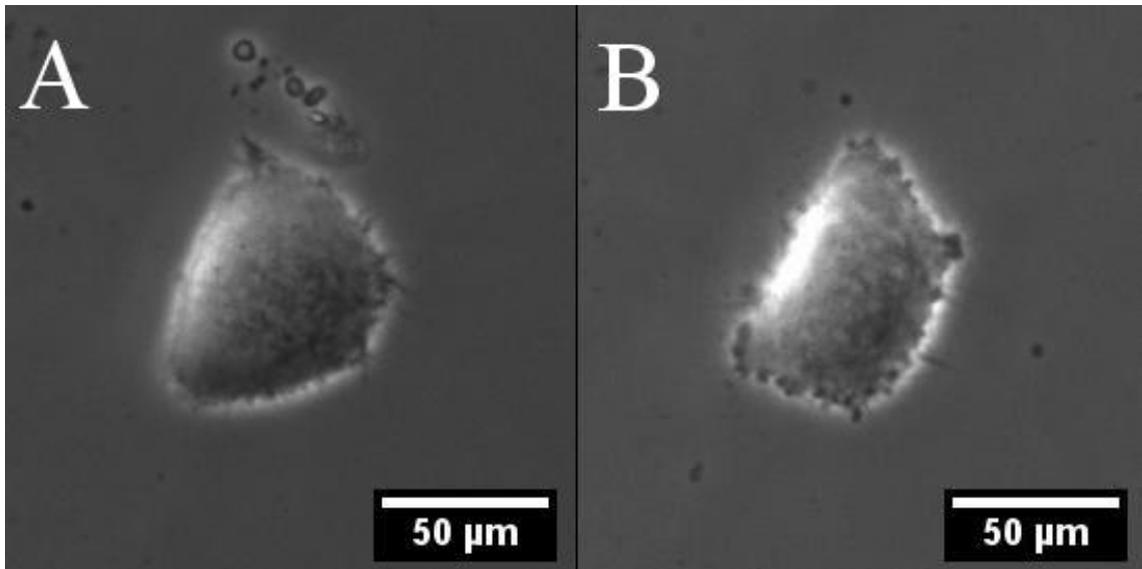
Die Abbildung 3.41 zeigt im untersuchten Zeitraum von ca. 150 Minuten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollexperimenten, trotz Zugabe des Wirkstoffs SPC. Die Schwankungen um den Wert eins herum im Graphen 3.41 können in beiden Experimenten den kleinen Veränderungen der Adhäsionsfläche A bedingt durch die Migration der Zellen während dem betrachteten Zeitfenster von ca. 150 Minuten zugeschrieben werden. Folglich hat die Umstrukturierung des Keratinnetzwerks keinen großen Einfluss auf die Größe der Adhäsionsfläche.

### 3.5.2 Einfluss der Mikrotubuli auf die Zellmorphologie

Der Beitrag der Mikrotubuli zur Stabilisierung der Adhäsionsfläche wurde mit dem Wirkstoff Nocodazol untersucht [Mikha98] [Bershadsky96]. Dieser Wirkstoff depolymerisiert das bestehende Mikrotubulinetzwerk und ermöglicht auf diese Weise dessen Auswirkungen auf die Adhäsionsfläche zu bestimmen. Darüber hinaus wurden Experimente mit SPC-behandelten Panc-1 Zellen durchgeführt, denen ebenfalls Nocodazol zugesetzt wurden, um deren mögliche Interaktionen zu bestimmen. Die folgenden vier Phasenkontrastaufnahmen in den Abbildungen 3.42 und 3.43 zeigen exemplarisch Panc-1 Zellen vor und nach der Zugabe von Nocodazol jeweils mit und ohne SPC Vorbehandlung.



**Abbildung 3.42:** Phasenkontrastaufnahme von Panc-1 Zellen (A) 45 Minuten vor und (B) 95 Minuten nach Nocodazol Zugabe ohne SPC-Behandlung. Die Skala entspricht  $50\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.43:** Phasenkontrastaufnahme von Panc-1 Zellen (A) 45 Minuten vor und (B) 95 Minuten nach Nocodazol Zugabe mit SPC-Behandlung. Die Skala entspricht  $50\mu\text{m}$ .

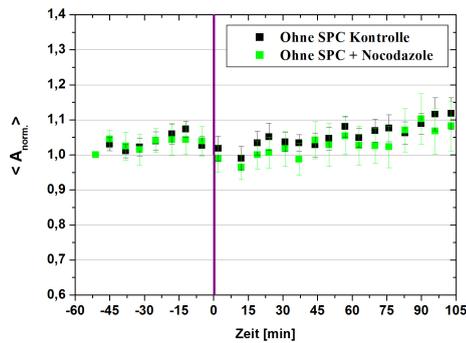
Beim Vergleich der Aufnahmen 3.42 und 3.43 ist kein deutlicher Unterschied der Adhäsionsfläche A zu erkennen. Zur Untersuchung wurde wie im Unterabschnitt 3.5.1 zuvor der Mittelwert der Adhäsionsfläche A aus dem Zeitraum vor der SPC Zugabe und dem Mittelwert der letzten 100 Minuten des Experiments als eine Art Grenzwert für die Nocodazol Behandlung berechnet. Diese lieferten vergleichbare Werte nahe eins wie im Falle der Keratinumstrukturierung und sind in der folgenden Tabelle 3.12 dargestellt. Die Abweichungen der Adhäsionsfläche  $A_{\text{absolut}}$  in der Tabelle 3.12 im Vergleich zur Tabelle 3.11 ist auf die starke Streuung der Zellgrößen zurückzuführen. Infolgedessen wurde die Adhäsionsfläche jeder Zelle auf ihre Anfangsgröße normiert  $A_{\text{normiert}}$  und anschließend gemittelt.

Typ	ohne Nocodazol	$S_E$	mit Nocodazol	$S_E$
$A_{\text{absolut}}$ (Kont.)	$5177 \mu\text{m}^2$	$\pm 375$	$5377 \mu\text{m}^2$	$\pm 409$
$A_{\text{normiert}}$ (Kont.)	1.04	$\pm 0.05$	1.10	$\pm 0.06$
$A_{\text{absolut}}$ (SPC)	$5124 \mu\text{m}^2$	$\pm 506$	$5352 \mu\text{m}^2$	$\pm 525$
$A_{\text{normiert}}$ (SPC)	1.02	$\pm 0.03$	1.07	$\pm 0.06$

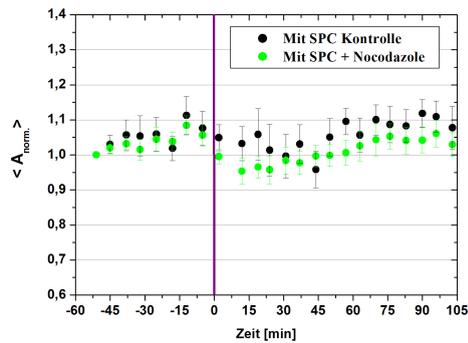
**Tabelle 3.12:** Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der absoluten und normierten Adhäsionsfläche A vor und den Mittelwert aus den letzten 100 Minuten des Experiments nach der Nocodazol Zugabe als Grenzwert mit Standardfehler  $S_E$ .

Beim Vergleich der Werte ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen

mit und ohne SPC mit der Nocodazol Behandlung nachweisbar. Zur Veranschaulichung zeigen die folgenden Graphen in den Abbildungen 3.44 und 3.45 die zeitliche Entwicklung des Mittelwerts der normierten Adhäsionsfläche  $A_{normiert}$ .



**Abbildung 3.44:** Darstellung der zeitlichen Entwicklung der normierten Adhäsionsfläche von SPC freien Panc-1 Zellen, die mit (grün,  $n=33$ ) und ohne (schwarz,  $n=31$ , (Kontrolle)) Nocodazol behandelt worden sind.



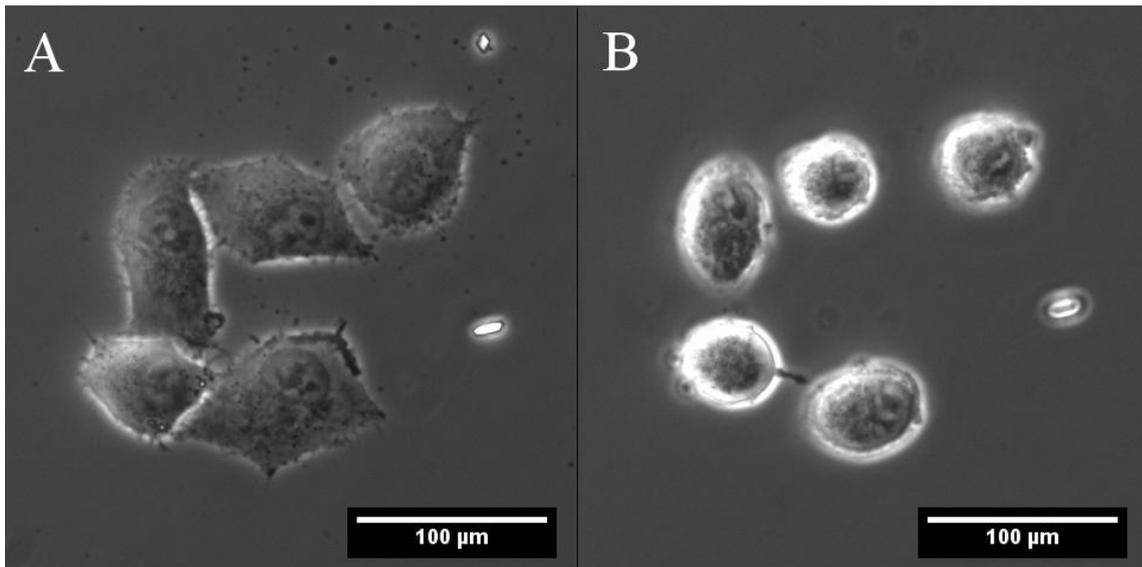
**Abbildung 3.45:** Darstellung der zeitlichen Entwicklung der normierten Adhäsionsfläche von SPC-behandelten Panc-1 Zellen, die zusätzlich mit (grün,  $n=32$ ) und ohne (schwarz,  $n=27$ , (Kontrolle)) Nocodazol behandelt worden sind.

Die Betrachtung des linken Graphen 3.44 zeigt ähnlich wie im oberen Abschnitt 3.5.1 keinen merklichen Unterschied der Adhäsionsfläche nach Zugabe von Nocodazol. Folglich haben Mikrotubuli ebenfalls keinen großen Einfluss auf die Stabilität der Adhäsionsfläche. Im Falle der SPC-behandelten Panc-1 Zellen ergibt sich für den Graphen 3.45 das gleiche Verhalten. Auch in diesem Fall ist kein Effekt außer den kleinen Schwankungen erkennbar. Vergleicht man beide Graphen miteinander, so scheint das umstrukturierte Keratinnetzwerk keinen zusätzlichen Einfluss auf die Adhäsionsfläche zu haben. Infolgedessen scheint das Keratinnetzwerk zusammen mit den Mikrotubuli eine eher untergeordnete Rolle in der Stabilität der Adhäsionsfläche zu spielen.

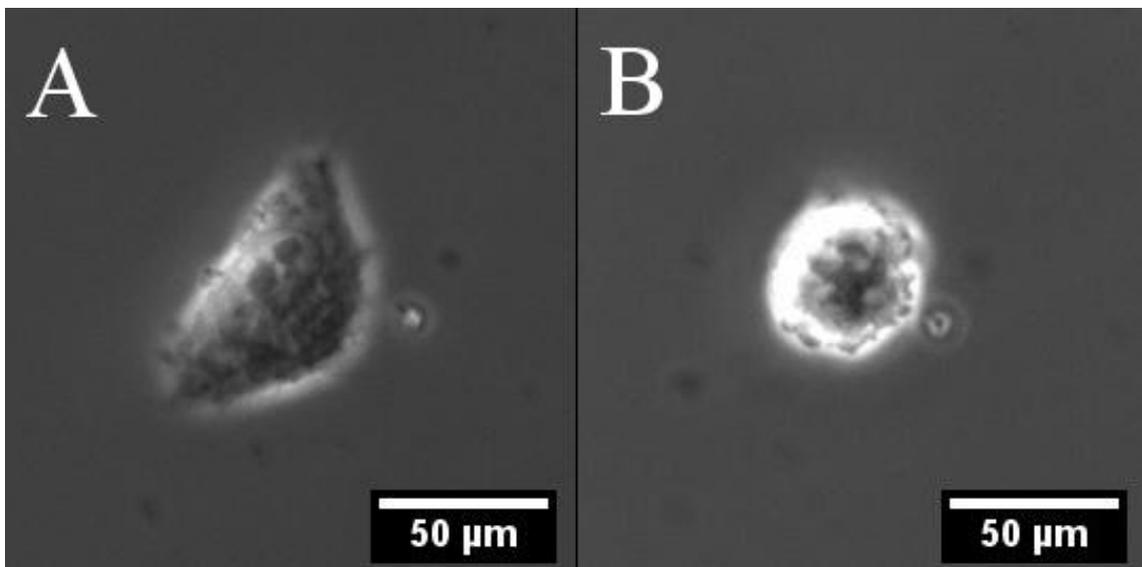
### 3.5.3 Einfluss von Aktin auf die Zellmorphologie

Der Einfluss des Aktinnetzwerks auf die Stabilität der Adhäsionsfläche wurde mittels dem Wirkstoff CytochalasinD untersucht [Waka01]. CytochalasinD bindet an die Aktinpolymere und verhindert ihre Polymerisierung und beeinträchtigt das bestehende Aktinnetzwerk. Die Experimente mit der CytochalasinD Behandlung von Panc-1 Zellen erfolgten analog zu denen der Nocodazol-Experimente aus Abschnitt 3.5.2. Die Wirkung der Keratinumstrukturierung durch den SPC-Effekt wurde zusätzlich zur Behandlung mit CytochalasinD untersucht, um mögliche Interaktionen

zu prüfen. Die folgenden vier Phasenkontrastaufnahmen in den Abbildungen 3.46 und 3.47 zeigen exemplarisch Panc-1 Zellen vor und nach der Zugabe von CytochalasinD jeweils mit und ohne SPC Vorbehandlung.



**Abbildung 3.46:** Phasenkontrastaufnahme von Panc-1 Zellen (A) 45 Minuten vor und (B) 95 Minuten nach CytochalasinD Zugabe ohne SPC-Behandlung. Die Skala entspricht 100µm.



**Abbildung 3.47:** Phasenkontrastaufnahme einer Panc-1 Zelle (A) 45 Minuten vor und (B) 95 Minuten nach CytochalasinD Zugabe mit SPC-Behandlung. Die Skala entspricht 100µm.

Beim Vergleich der Phasenkontrastaufnahmen ohne SPC Vorbehandlung aus der Abbildung 3.46 erkennt man eine deutliche Abnahme der Adhäsionsfläche. Dieser Effekt scheint durch eine SPC Vorbehandlung verstärkt zu werden (vgl. Abbildung 3.47). Zur Charakterisierung der Abnahme wurde wie in den zwei Unterabschnitten

3.5.1 und 3.5.2 zuvor der Mittelwert der Adhäsionsfläche  $A$  aus dem Zeitraum vor der SPC Zugabe und dem Mittelwert der letzten 100 Minuten des Experiments als eine Art Grenzwert für die CytochalasinD Behandlung berechnet. Die ermittelten Werte sind in der folgenden Tabelle 3.13 dargestellt.

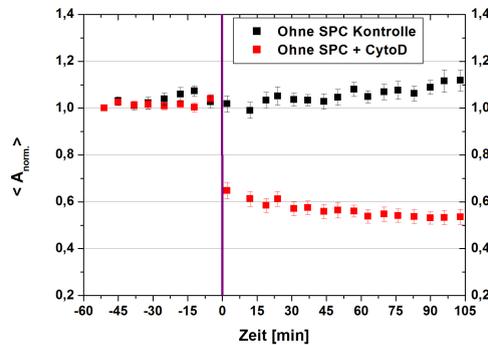
Typ	ohne CytoD	$S_E$	mit CytoD	$S_E$
$A_{absolut}$ (Kont.)*	5050 $\mu\text{m}^2$	$\pm 385$	2719 $\mu\text{m}^2$	$\pm 156$
$A_{normiert}$ (Kont.)*	1.01	$\pm 0.03$	0.54	$\pm 0.03$
$A_{absolut}$ (SPC)*	5208 $\mu\text{m}^2$	$\pm 545$	2135 $\mu\text{m}^2$	$\pm 188$
$A_{normiert}$ (SPC)*	1.00	$\pm 0.03$	0.41	$\pm 0.03$

**Tabelle 3.13:** Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der absoluten und normierten Adhäsionsfläche  $A$  vor und den Mittelwert aus den letzten 100 Minuten des Experiments nach der CytochalasinD Zugabe als Grenzwert mit Standardfehler  $S_E$ . (\*= signifikant unterschiedlich zwischen mit und ohne SPC-Behandlung nach T-Test  $p < 0.05$ )

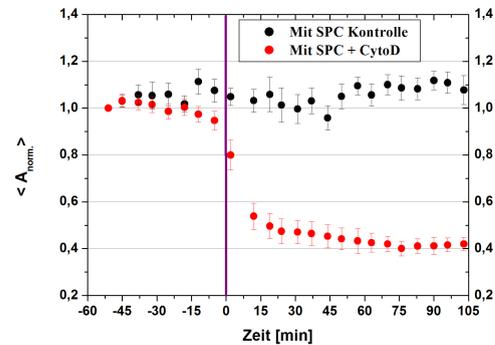
Die Abweichung der Adhäsionsfläche  $A_{absolut}$  in der Tabelle 3.13 im Vergleich zu den Tabellen 3.11 und 3.12 ist auf die starke Streuung der Zellgrößen zurückzuführen. Infolgedessen wurde die Adhäsionsfläche jeder Zelle auf ihre Anfangsgröße normiert und anschließend gemittelt. Beim Vergleich der Werte aus Tabelle 3.13 erkennt man eine deutliche Abnahme der Adhäsionsfläche ohne SPC Vorbehandlung um ca. 46% ( $A_{norm.} = 0.54 \pm 0.03$ ). Die Abnahme ist im Falle einer SPC Vorbehandlung stärker ausgeprägt und nimmt im Vergleich ohne SPC Vorbehandlung nochmals um 24% ab ( $A_{norm.} = 0.41 \pm 0.03$ ). Zur Veranschaulichung wurde die zeitliche Entwicklung der Adhäsionsfläche  $A$  mit der Zugabe von CytochalasinD jeweils mit und ohne SPC Vorbehandlung in den Abbildungen 3.44 und 3.45 auf Seite 86 aufgetragen.

Der linke Graph 3.44 zeigt im Vergleich zur Kontrolle kurz nach Zugabe von CytochalasinD einen starken Abfall der Adhäsionsfläche. Sie halbiert sich nahezu innerhalb von zwei bis drei Minuten nach Zugabe der Droge auf einen Wert von ca. 54% der Anfangsgröße.

Dieser Effekt wird für die SPC-behandelten Panc-1 Zellen aus dem rechten Graphen 3.45 weiter verstärkt und es ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu ohne SPC-Behandlung (T-Test  $p < 0.05$ ). In diesem Fall ist eine Abnahme von ca. 59% zu verzeichnen. Im Vergleich zu den SPC freien Panc-1 Zellen nimmt die Adhäsionsfläche mit SPC-Behandlung nochmals um ca. 24% weiter ab.



**Abbildung 3.48:** Darstellung der zeitlichen Entwicklung der normierten Adhäsionsfläche von SPC freien Panc-1 Zellen, die mit (rot, n=46) und ohne (schwarz, n=31, (Kontrolle)) CytochalasinD behandelt worden sind.



**Abbildung 3.49:** Darstellung der zeitlichen Entwicklung der normierten Adhäsionsfläche von SPC-behandelten Panc-1 Zellen, die zusätzlich mit (rot, n=16) und ohne (schwarz, n=27, (Kontrolle)) CytochalasinD behandelt worden sind.

### 3.5.4 Diskussion

Das Zytoskelett einer Zelle ist an vielen zellspezifischen Funktionen beteiligt, wie z.B. die Wechselwirkung der Zelle mit ihrer Umgebung [Fletcher10] [Urban10] [Magin07]. Eine weitere wichtige Funktion stellt die Stabilisierung der Zellmorphologie dar. Aktuelle Ergebnisse von Small et al. zeigen z.B. wie das Aktin im Zellkortex dicht unterhalb der Zellmembran die Stabilisierung der Zellmorphologie unterstützt [Urban10] [Alberts]. Ähnlich verhält es sich mit den Intermediärfilamenten, denen nachgesagt wird, dass sie ebenfalls einen Anteil zur Stabilisierung der Zellmorphologie beitragen [Magin07] [Helfand03] [Helfand04] [Toivola97]. Zur Untersuchung der morphologischen Stabilität der Panc-1 Zellen wurden verschiedene Drogen (vgl. Tabelle 3.10 auf Seite 3.10) eingesetzt, die die einzelnen Elemente des Zytoskeletts beeinflussen, wie z.B. CytochalasinD die Polymerisierung von Aktinfilamenten verhindert. Die Auswirkungen der Drogen auf die Morphologie wurden über die Zelladhäsionsfläche charakterisiert.

Den Anfang der Untersuchungen bildete das Keratinnetzwerk als Intermediärfilament. Diesem wird nachgesagt, dass es aufgrund seiner Steifigkeit und zellstrukturbildenden Fähigkeit starr wirken kann [Helfand04]. Infolgedessen wird sie häufig mit der morphologischen Stabilität in Verbindung gebracht [Coulombe00] [Helfand03]. Die dargestellten Ergebnisse aus Unterabschnitt 3.5.1 zeigen jedoch, dass die Umstrukturierung der Keratinfilamente durch den SPC Effekt (vgl. Abschnitt 1.3.4 auf Seite 22) keine Veränderung der Adhäsionsfläche zur Folge hat. Folglich scheint das Keratinnetzwerk unter Bedingungen ohne mechanischen Einfluss bei der morphologischen Stabilisierung der Zelle unter Ruhebedingungen eine vorerst eher passive

untergeordnete Rolle zu spielen. Dies könnte sich jedoch in Anlehnung an die Dehnversuche ändern, wenn mechanische Kräfte auf die Zelle in Form von Deformationen wirken. Unter Wirkung von mechanischen Kräften wie die Deformation könnte das Keratinnetzwerk aktiv werden und als stabilisierendes Element der Zellintegrität agieren. In diesem Zusammenhang deuten neuere Forschungsergebnisse das steife und starr wirkende Keratinnetzwerk als ein eher hoch dynamisches Element, das einem ständigen Auf- und Abbauprozess unterliegt [Windoffer99] [Windoffer06] [Kölsch09] [Kölsch10]. Die Beobachtungen und Ergebnisse aus diesem Abschnitt könnten dazu dienen, beide Vorstellungen über das Keratinnetzwerk als steifes und zugleich hochdynamisches Netzwerk zu betrachten.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Mikrotubuli auf die morphologische Stabilität untersucht. Die dargestellten Ergebnisse in Unterabschnitt 3.5.2 deuten ähnlich wie Falle des Keratinnetzwerks auf eine eher untergeordnete Rolle der Mikrotubuli auf die morphologische Stabilität bei den Panc-1 Zellen hin. Es ist keine Veränderung der Adhäsionsfläche nach Zugabe von Nocodazol zu verzeichnen. Die zusätzliche Vorbehandlung der Panc-1 Zellen mit SPC, führt trotz Zugabe von Nocodazol zu keinen signifikanten Veränderungen der Adhäsionsfläche. Obwohl die Mikrotubuli in einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie der Zellmigration oder dem Transport von inneren Objekten beteiligt ist, scheint sie bei dieser Zelllinie keine aktive Rolle in der Stabilisierung der Zellmorphologie zu spielen [Kaverina02] [Bershadsky96] [Goode00] [Hu02] [Mikha98] [Allen85].

Im letzten Schritt zeigten die Ergebnisse aus Unterabschnitt 3.5.3 einen starken Einfluss der Aktinfilamente auf die morphologische Stabilität. Nach Zugabe von CytochalasinD halbierte sich nahezu der Wert für die Adhäsionsfläche. Folglich spielt das Aktinnetzwerk im Vergleich zu den anderen Zytoskelettelementen Mikrotubuli und Keratin als Intermediärfilament die tragende Rolle in der morphologischen Stabilität der Adhäsionsfläche. Dies könnte insbesondere mit den Adhäsionsstrukturen und den Aktinfasern am Zellkortex erklärt werden [Urban10]. Das feinstrukturierte Aktinnetzwerk im Zellkortex dicht unterhalb der Zellmembran stabilisiert lokal die Morphologie der Zelle, die ihrerseits durch den Aktin-Myosin-Komplex miteinander verbunden wird [Alberts] [Ballestrem00] [Clainche08] [Pollard09]. Eine Beeinträchtigung der Aktinfasern könnte zu einem globalen Kollaps der Morphologie führen, wie sie beispielsweise bei der Trypsinierung von Zellen durch die Abrundung der Zellperipherie zu beobachten sind. Beim Vergleich der Adhäsionsflächen von SPC-behandelten Panc-1 Zellen führen diese zu einer weiteren Abnahme der Adhäsionsfläche, die im Vergleich zu Zellen ohne SPC-Behandlung nochmals um 24% abnimmt. Folglich scheint das Keratinnetzwerk beim Ausbleiben der Stabilisie-

rung der Adhäsionsfläche durch das Aktinnetzwerk einen Beitrag zur Stabilisierung zu leisten. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Verteilung der Keratinfilamente innerhalb der Zelle liefern, die von der Zellperipherie in Richtung Zellkern zunimmt [Kölsch10] [Kölsch09]. Hierbei könnte die geringere Anzahl von Keratinfilamenten in der Zellperipherie im Vergleich zum perinuklearen Bereich der Zelle nur für eine unzureichende Stabilität sorgen. Mit Zunahme und entsprechender Anzahl der Keratinfilamente in Richtung Zellkern könnte die unzureichende stabilisierende Wirkung der Keratinfilamente in eine stabile Zellmorphologie übergehen. Werden die Beobachtungen aus der CytochalasinD Zugabe auf die Panc-1 Zellen auf die Verbildlichung des Tensegrity-Modells übertragen, entspricht das der Beeinträchtigung der Stützpfiler des geodätischen Zeltes, das zu einem Kollaps führen würde. Das Keratinnetzwerk könnte als eine Art weiteres Gerüst betrachtet werden, die den Kollaps durch die Aktinfasern mindert. Wird jedoch dieses Gerüst zusätzlich beeinträchtigt, so könnte der Zusammenbruch der Zelle verstärkt werden.

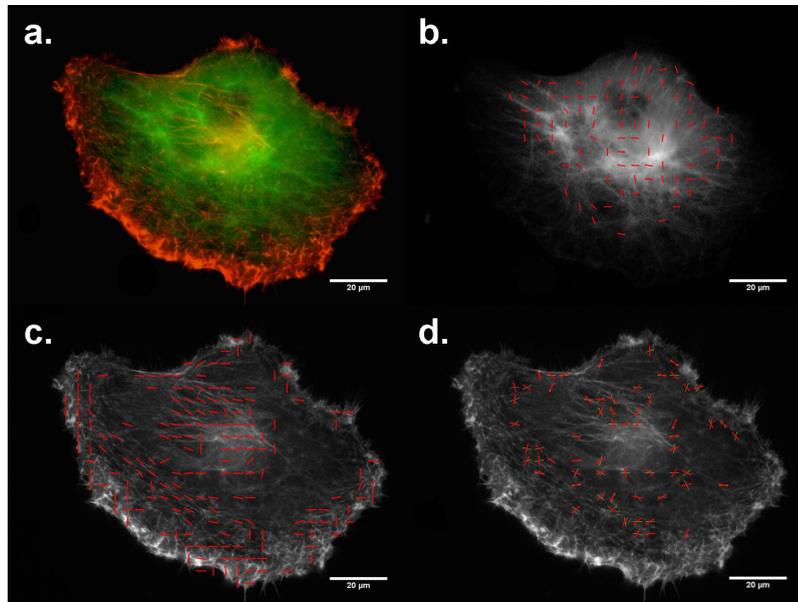
Die dargestellten Ergebnisse führen zu einer vorläufigen Hierarchie bezüglich der stabilisierenden Wirkung einzelner Zytoskelettelemente auf die Adhäsionsfläche. Hierbei spielt das Aktinnetzwerk eindeutig die tragende Rolle. Als zweitstärkstes Element erweist sich aus den dargestellten Ergebnissen das Keratinnetzwerk, das einen Anteil zur Stabilisierung im perinuklearen Bereich der Zelle beiträgt. Als letztes und schwächstes Element erwiesen sich die Mikrotubuli, die zu keinen Veränderungen der Adhäsionsfläche bei Zugabe von Nocodazol, unabhängig von der SPC-Behandlung, führten.

## 3.6 Aktin-Keratin Orientierung

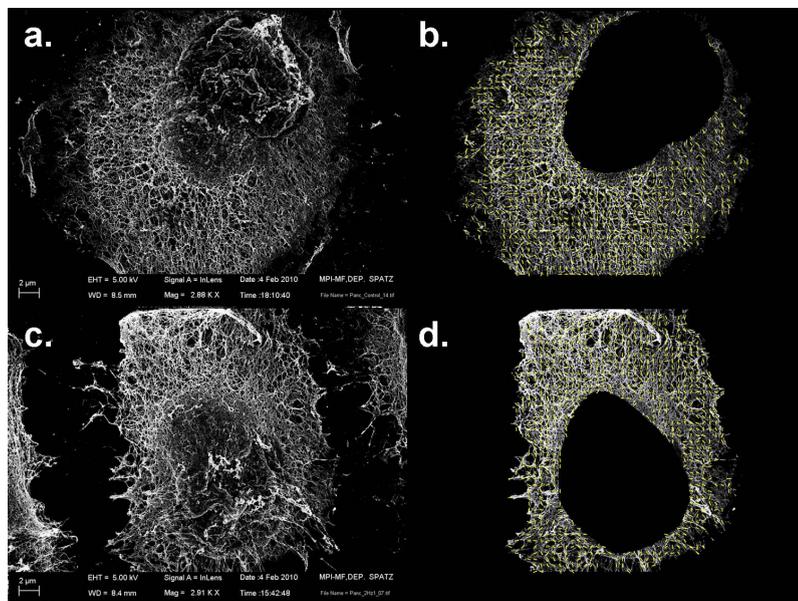
Die Umstrukturierung innerer Bestandteile ist eine überlebenswichtige Fähigkeit von Zellen, die an zahlreichen Prozessen wie z.B. Fokale Adhäsion, Morphologische Stabilität und in der Zellmigration beteiligt ist [Wehrle03] [Chen97] [Schoumacher10] [Campbell10]. Das Zytoskelett spielt in diesem Zusammenhang eine tragende Rolle bei Umstrukturierungsprozessen (vgl. Abschnitt 1.1 auf Seite 11). Von allgemeinem Interesse der Zellforschung sind die Auswirkungen von äußeren Kräften auf eine Zelle und deren innere Bestandteile. Infolgedessen nimmt insbesondere das Aktinnetzwerk als die treibende Kraft der morphologischen Umstrukturierung eine gesonderte Stellung ein [Gavara08] [Pellegrin07] [Pollard09] [Schoumacher10] [Clainche08]. Darüber hinaus beleuchten jüngste Arbeiten die Interaktionen zwischen den einzelnen Zytoskelettelementen wie beispielsweise das Aktinnetzwerk und die Mikrotubuli bei der Zellmigration [Goode00] [Ballestrem00] [Etienne04].

In diesem Zusammenhang wurde in dieser Arbeit die mögliche strukturelle Wechselwirkung zwischen dem Aktinnetzwerk und dem Keratin als Intermediärfilamente untersucht. Hierbei wurde die räumliche Orientierung des Aktin- und Keratinnetzwerks untersucht. Hierzu wurden immuncytochemische Färbungen (vgl. Abschnitt 2.2.3 auf Seite 41) am Aktin und Keratin durchgeführt und ihre Orientierung mittels eines selbstgeschriebenen Programms untersucht (vgl. Abschnitt 2.3.5 auf Seite 48). Die dargestellten Ergebnisse in den kommenden Unterabschnitten 3.6.1 und 3.6.2 sind kritisch zu betrachten, weil die Bildanalyse der Strukturen nicht den gesamten Bereich der Zelle umfasst, sondern lediglich kleinere Bereiche der Zelle analysiert werden konnten. Darüber hinaus wurde die Bildanalyse durch die unterschiedliche Struktur und die starken Intensitätsgefälle bei den Fluoreszenzaufnahmen erschwert. Daher wurde das Keratinnetzwerk zusätzlich mit dem Elektronenmikroskop untersucht, um daraus auf einem zweiten Weg die Orientierung vom Keratinnetz zu bestimmen. Die Abbildungen 3.50 und 3.51 auf der nächsten Seite zeigen exemplarisch die Orientierungsanalysen des Aktin- und Keratinnetzwerks aus den immuncytochemischen Färbungen und aus den Elektronenmikroskopaufnahmen.

Die durchgeführten Experimente umfassten Panc-1 Zellen auf flachen PDMS-Substraten (Kontrolle) und zusätzlich Dehnversuche (siehe Abschnitt 2.3.2 auf Seite 44), jeweils mit und ohne dem Wirkstoff SPC. Die PDMS-Substrate wurden 8 Stunden mit einer Frequenz von 2Hz und einer Amplitude von 8% gedehnt und im Anschluss fixiert. In den folgenden Unterabschnitten werden die Resultate vorgestellt.



**Abbildung 3.50:** Veranschaulichung der Datengewinnung für die Orientierungsanalyse des Aktins und Keratins aus den immuncytochemischen Färbungen. In Abbildung A ist die Fluoreszenzaufnahme einer Panc-1 Zelle aus den Kontrollen abgebildet, mit GFP angefärbten Keratin und Phalloidin 568 gefärbten Aktin (vgl. Tabelle 2.3 auf Seite 42). In Abbildung B ist das Keratinnetzwerk und in C das Aktinnetzwerk der Zelle zu sehen mit den Orientierungslinien der Bildanalyse vom EAM-Makro. In Abbildung D sind die Analysen mittels des DAM-Makro zu sehen, wobei rot die Orientierung vom Aktin und gelb die vom Keratin ist. Der Maßstab entspricht  $20\mu\text{m}$ .



**Abbildung 3.51:** Veranschaulichung der Datengewinnung für die Orientierungsanalyse des Keratinnetzwerks mittels Elektronenmikroskopie. In Abbildung A ist das Keratinnetzwerk einer Panc-1 Zelle eines Kontrollelexperiments dargestellt. In der Abbildung rechts daneben (B) ist die verarbeitete Aufnahme mit eingezeichneten gelben Orientierungslinien dargestellt. Der Zellkern und die anliegenden Zellen wurden vor der Bearbeitung entfernt, um Fehlmessungen zu vermeiden. Die Abbildung C zeigt das präparierte Keratinnetzwerk einer Panc-1 Zelle, die 8 Stunden lang auf einem PDMS-Substrat mit 2Hz bei einer Amplitude von 8% gedehnt wurde. Rechts daneben (D) ist die verarbeitete Aufnahme von Abbildung C. Der Maßstab entspricht  $2\mu\text{m}$ .

### 3.6.1 Aktin-Orientierung

Die Orientierung der Aktinfilamente wurde über den Orientierungsparameter  $S$  charakterisiert (vgl. Abschnitt 2.3.5 auf Seite 48). Der Orientierungsparameter  $S$  wurde jeweils für die Kontrollen und Dehnversuche bestimmt. Hierbei wurde die Orientierung  $S_i$  an lokalen Stellen der Zelle bestimmt und für jede Zelle der Mittelwert des Orientierungsparameters  $\bar{S}$  aus diesen Einzelmessungen berechnet ( $\bar{S} = \frac{1}{n} \sum S_i$  mit  $n$  Einzelmessungen). Anschließend wurde der Mittelwert für den Orientierungsparameter  $S$  über die Anzahl der untersuchten Zellen bestimmt ( $S = \frac{1}{n} \sum \bar{S}$ ). Ihre Auswertung führt zu den in der Tabelle 3.14 enthaltenen Werten.

Experiment	S	$S_e$	n
Kontrolle Aktin	-0.03 ± 0.04		20
Kontrolle SPC Aktin	-0.03 ± 0.05		21
2Hz Aktin	-0.51 ± 0.04		25
2Hz SPC Aktin	-0.49 ± 0.03		32

**Tabelle 3.14:** Darstellung des Orientierungsparameters  $S$  für das Aktinnetzwerk mit Standardfehler  $S_e$  und der untersuchten Anzahl  $n$  von Panc-1 Zellen aus den immunocytochemischen Färbungen. Die Dehnungsversuchexperimente (vgl. Abschnitt 2.3.2) dauerten 8 Stunden und wurden bei einer Amplitude von 8% und einer Frequenz von 2Hz jeweils mit und ohne SPC durchgeführt.

Die Werte für die Kontrollen mit und ohne SPC zeigen, dass das Aktinnetzwerk im Mittel für alle Zellen eine zufällige Verteilung hat ( $S_{Aktin} \approx 0$ ). Anders verhält sich das in den Dehnversuchen. Hier fällt der Wert auf  $S_{Aktin} \approx -0.5$  ab und ist folglich eher senkrecht zur Zugrichtung ausgerichtet [Wei08] [Hayakawa00]. In beiden Fällen scheint die Orientierung der Aktinfasern unabhängig von der Umstrukturierung des Keratinnetzwerks durch den SPC-Effekt zu sein.

### 3.6.2 Keratin-Orientierung

Die Ausrichtung des Keratinnetzwerks wurde analog zu der des Aktins aus Abschnitt 3.6.1 ermittelt. Die folgende Tabelle 3.15 zeigt die ermittelten Werte für den Orientierungsparameter  $S$  für die Kontrollen und aus den Dehnversuchen jeweils mit und ohne dem Wirkstoff SPC.

Immun. Färbung	S	$S_e$	n
Kontrolle Keratin	-0.01 ± 0.05		19
Kontrolle SPC Keratin	-0.01 ± 0.05		19
2Hz Keratin	-0.15 ± 0.03		18
2Hz SPC Keratin	-0.00 ± 0.01		33

**Tabelle 3.15:** Darstellung der Orientierungsparameter  $S$  für das Keratinnetzwerk mit Standardfehler  $S_e$  und der untersuchten Anzahl  $n$  von Panc-1 Zellen aus den immuncytochemischen Färbungen. Die Dehnungsexperimente (vgl. Abschnitt 2.3.2) dauerten 8 Stunden und wurden bei einer Amplitude von 8% und einer Frequenz von 2Hz jeweils mit und ohne SPC durchgeführt.

Die Kontrollexperimente bei den immun. Färbungen weisen mit und ohne SPC auf eine zufällige Orientierung der Keratinfilamente für alle untersuchten Zellen  $S_{Keratin} \approx 0$ , ähnlich wie im Falle der Aktinfasern. Betrachtet man die Werte für die Dehnversuche erkennt man einen Abfall des Orientierungsparameters auf  $S_{2Hz} \approx -0.15$ . Dasselbe Experiment mit SPC-Behandlung hingegen scheint wieder eine zufällige Verteilung der Keratinfilamentorientierungen aufzuweisen.

Aufgrund der starken Intensitätsunterschiede bei den Fluoreszenzaufnahmen und der feinmaschigen Struktur des Keratinnetzwerks konnten aus den Aufnahmen der immun. Färbungen nur Bereiche in der Nähe vom Zellkern untersucht werden. Bereiche der Zellperipherie konnten nicht ausreichend genug erfasst werden. Infolgedessen wurden zusätzliche Aufnahmen des Keratinnetzwerks mit dem Elektronenmikroskop in unabhängigen Experimenten durchgeführt. Hierzu mussten die Proben einen Extraktionsvorgang und kritisch Punkttrocknen durchlaufen [Walter10] [Beil03], um Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop durchführen zu können. Aus diesen Aufnahmen wurde ebenfalls der Orientierungsparameter  $S$  für Kontrollen und Dehnexperimente jeweils mit und ohne SPC bestimmt und ist in der Tabelle 3.16 auf Seite 96 dargestellt.

Die Auswertung des Orientierungsparameters  $S$  für die Kontrollen mit und ohne SPC Zugabe zeigen wie im Falle der immun. Färbung eine zufällige Verteilung vom Keratinnetzwerk  $S_{Kontrolle} \approx 0$ . Die Werte für die Dehnversuche mit und ohne SPC zeigen einen Abfall. Hierbei ist der Abfall ohne SPC-Behandlung größer als mit ( $|S_{2Hz}| > |S_{2HzSPC}|$ ). Der Unterschied kann mit dem SPC-Effekt erklärt werden, bei dem sich das Keratinnetzwerk von der Zellperipherie in den runden perinuklearen Bereich umstrukturiert (vgl. Abschnitt 1.3.4 auf Seite 22) [Beil03]. Durch den SPC Effekt sind weniger Keratinstrukturen in den Bereichen der Zellperipherie anzutref-

<b>E.-Mikroskop</b>	<b>S</b>	<b>S<sub>e</sub></b>	<b>n</b>
Kontrolle Keratin	-0.02 ±	0.04	22
Kontrolle SPC Keratin	-0.03 ±	0.04	16
2Hz Keratin	-0.30 ±	0.03	22
2Hz SPC Keratin	-0.20 ±	0.03	28

**Tabelle 3.16:** Orientierungsparameter  $S$  für das Keratinnetzwerk mit Standardfehler  $S_e$  für  $n$  untersuchte Panc-1 Zellen aus den Elektronenmikroskopaufnahmen. Die Dehnversuche dauerten 8 Stunden bei einer Amplitude von 8% und einer Frequenz von 2Hz.

fen und damit sinkt der Beitrag zu der gerichteten Form  $S_{2HzSPC} \approx -0.20$ .

### 3.6.3 Aktin-Keratin-Korrelation

Für jede nach Unterabschnitt 3.6.1 und 3.6.2 untersuchte Zelle erhält man anhand einer Korrelationsanalyse mittels Microsoft Excel einen Korrelationsfaktor  $r$ .

Zusätzlich zu den einzelnen Orientierungen des Aktins und Keratins wurde die räumliche Ausrichtung beider Strukturen lokal untersucht. Hierzu wurde an derselben Position die örtliche Ausrichtung des Aktins und Keratins einer Zelle bestimmt und mittels Korrelationsanalyse (Microsoft Excel) für mehrere Zellen untersucht (vgl. Abschnitt 2.3.5 auf Seite 48). Hieraus wurde ein durchschnittlicher Korrelationsfaktor  $\bar{r}$  aus dem Mittelwert von mehreren Zellen bestimmt. Die folgende Tabelle 3.17 stellt die ermittelten Korrelationsfaktoren  $r$  für die Experimente aus den Kontrollen und den Dehnversuchen dar.

<b>Experiment</b>	<b>r</b>	<b>n</b>
Kontrolle	-0.04	24
Kontrolle SPC	-0.05	17
2Hz	0.04	18
2Hz SPC	0.09	35

**Tabelle 3.17:** Darstellung der Korrelationsfaktoren  $r$  für die lokale Ausrichtung zwischen Aktin und Keratin mit der untersuchten Anzahl  $n$  von Panc-1 Zellen aus den Aufnahmen der immun. Färbungen. Die angegebenen Werte für die Korrelationsanalyse wurden mit dem Fischer-Test kontrolliert. Die Dehnungsexperimente (vgl. Abschnitt 2.3.2) dauerten 8 Stunden und wurden bei einer Amplitude von 8% und einer Frequenz von 2Hz jeweils mit und ohne SPC durchgeführt.

Obwohl die Orientierung des Keratins bei den Dehnversuchen eine leichte Ausrich-

tung senkrecht zur Zugrichtung bei den Elektronenmikroskopaufnahmen aufwies, konnte in allen vier Fällen keine Korrelation zwischen der Ausrichtung der Aktinfasern mit dem Keratinnetzwerk nachgewiesen werden. Folglich scheint die räumliche Ausrichtung des Keratinnetzwerks unabhängig von den Aktinfasern und umgekehrt zu sein.

### 3.6.4 Diskussion

Die Ausrichtung und Umstrukturierung innerer Bestandteile wie beispielsweise das Aktinnetzwerk über die Aktin-Myosin-Maschinerie ist ein notwendiger Schritt bei vielen biologischen Prozessen und spielen infolgedessen eine grundlegende Rolle in zahlreichen physiologischen Mechanismen wie z.B. Adhäsion, mechanische Stabilität und vor allem in der Zellmigration [Wehrle03] [Chen97] [Schoumacher10] [Campbell10]. In diesem Zusammenhang nimmt das Zytoskelett bei Umstrukturierungsprozessen eine zentrale Rolle ein (vgl. Abschnitt 1.1 auf Seite 11). So wird z.B. in vielen Arbeiten die Umstrukturierung des Aktinnetzwerks unter Kraftereinwirkung untersucht [Gavara08] [Pellegrin07] [Pollard09] [Schoumacher10] [Clainche08]. Darüber hinaus werden Zusammenhänge und Interaktionen zwischen den einzelnen Zytoskelettelementen während der Zellmigration erforscht [Goode00] [Ballestrem00] [Etienne04], um deren Mechanismen zu verstehen. Neuere Arbeiten beleuchten die Interaktion und die räumliche Anordnung des Aktinnetzwerks und der Mikrotubuli, die z.B. zeigen dass der Umstrukturierungsprozess des Aktins unabhängig von den Mikrotubuli ist, obwohl sie räumlich eine ähnliche Ausrichtung innerhalb der Zelle aufweisen und die Migration ohne ein intaktes Mikrotubulinetzwerk beeinträchtigt ist [Goldyn09] [Goldyn2009] [Ballestrem00].

Ein bisher weniger erforschter Bereich stellt die strukturelle Wechselwirkung zwischen dem Aktinnetzwerk und den Intermediärfilamenten dar. Obwohl es viele Arbeiten zu den einzelnen Zytoskelettelementen gibt, findet man nur vereinzelt Arbeiten zu den Interaktionen zwischen dem Aktinnetzwerk und den Intermediärfilamenten [Suciu97] [Oriolo07] [Schoumacher10]. Eine dieser wenigen Interaktionen wurde jüngst durch Kölsch et al. nachgewiesen. Die Arbeiten zeigen, dass die Einbindung der Keratinfilamente, die in der Zellperipherie entstehen, entlang von Aktinfasern wandern bis diese in das Keratinnetzwerk eingebunden werden [Kölsch10] [Wöll05]. Eine Beeinträchtigung der Aktinfasern mit CytochalasinD führt zu einem Ausbleiben der Beförderung der Keratinfilamente [Kölsch09]. In diesem Zusammenhang wurde die räumliche Ausrichtung von Aktinfasern und Keratin als Intermediärfilament untersucht. Hierzu wurden immunocytochemische Färbungen (vgl. Abschnitt 2.2.3 auf

Seite 41) am Aktin und Keratin durchgeführt und ihre räumliche Orientierung bestimmt.

Die Ergebnisse der Aktinfaser-Orientierung aus Unterabschnitt 3.6.1 zeigen, dass die Aktinfasern ohne ein zyklisches Dehnen des Substrates eine zufällige Ausrichtung haben ( $S \approx 0$ ). Bei den Dehnversuchen ändert sich das in eine Orientierung senkrecht zur Zugrichtung ( $S \approx -0.5$ ). Die Ausrichtung der Zellen ist beim Vergleich der Werte für den Orientierungsparameter unabhängig von der SPC Zugabe und damit unabhängig von der Keratinstrukturierung. Folglich kann angenommen werden, dass ein intaktes Keratinnetzwerk für die Ausrichtung von Aktinfasern nicht notwendig ist.

Die Ergebnisse aus Unterabschnitt 3.6.2 unterscheiden sich in der Ausrichtung des Keratinnetzwerks. Die Ergebnisse aus den immun. Färbungen zeigten eine ungerichtete zufällige Orientierung der Keratinfilamente. Die Aufnahmen des Elektronenmikroskops hingegen zeigen einen leichten Abfall für den Orientierungsparameter  $S$  und damit eine leichte Orientierung senkrecht zur Zugrichtung. Der Unterschied könnte mit der eingesetzten Methode für die Aufnahmen erklärt werden. Die feinmaschige Struktur des Keratinnetzwerks zusammen mit den starken Intensitätsgefällen bei den Fluoreszenzaufnahmen der immun. Färbungen erschwerten die Auswertung von Bereichen der Zellperipherie und sind daher sehr kritisch zu betrachten. Beim Vergleich der Methoden ist den Aufnahmen mittels Elektronenmikroskop eine größere Beweiskraft beizumessen. Der Abfall des Orientierungsparameters  $S$  für die Keratinfilamente bei den Dehnversuchen könnte sich mit der morphologischen Ausrichtung der Zelle erklären lassen. Richtet sich die Zelle bei den Dehnversuchen aus, so führt dies zu einer Minimierung der Zelladhäsionsfläche senkrecht zur Zugrichtung (vgl. Abschnitt 3.3 auf Seite 55) [Goldyn09] [Jung]. In diesem Prozess könnte das anfänglich zufällig orientierte Keratinnetzwerk in Zugrichtung gestaucht werden und würde sich der neuen ausgerichteten Zellform unter Beibehaltung der maschenartigen Struktur anpassen. Hierbei würden sich die Maschen des Keratinnetzwerks von einer eher runden Form auf eine ovale Form umgestalten, die bei der Auswertung einen leichten Abfall des Orientierungsparameters  $S$  zur Folge hätte.

Zusammenfassend deuten die dargestellten Ergebnisse aus den Unterabschnitten 3.6.1 bis 3.6.3 einschließlich der Korrelationsanalysen darauf hin, dass kaum strukturelle Interaktion in Form einer gleichgerichteten Orientierung zwischen den Aktinfasern und dem Keratinnetzwerk vorliegt. Darüber hinaus kann nicht eindeutig geklärt werden, ob die Ausrichtung des Keratinnetzwerks der Panc-1 Zellen sich durch Dehnversuche aktiv mechanisch umstrukturieren oder ein eher passiver Prozess vorliegt, bei dem die Aktinfasern das Keratin ausrichten. So zeigt z.B. die Arbeit von Sivara-

makrishnan et al., dass Phosphorylierungen am Keratinnetzwerk bei Epithelzellen ausgelöst werden, wenn diese einer Scherströmung unterliegen. Diese Phosphorylierungen führen zur einer erhöhten Häufigkeit von gleichgerichteten Keratinfilamenten senkrecht zur Strömung, ähnlich zu den dargestellten Ergebnissen der Keratinausrichtung bei Dehnungsexperimenten in dieser Arbeit [[Sivara09](#)].

# Kapitel 4

## Anhang

### 4.1 Verwendete ImageJ Makros

#### 4.1.1 Einzel-Ausrichtungsmakro für Aktin und Keratin

```
macro "Melih_Single_OK_Orientation" {

//-----Definitionen-----

dir_source = getDirectory("C:\\Kalafat\\Messungen\\PancCyclicStretch");
dir_save = getDirectory("C:\\Kalafat\\Messungen\\PancCyclicStretch");
Filename = File.getName(dir_source);
list = getFileList(dir_source);
listlength=list.length;
open("");
Picture = getImageID();
i = 1; // Zählt die verarbeiteten FFT-Bilder durch...
for (i = 1; i <= listlength; i++) {
selectImage(Picture);
Name = getTitle();
index = lastIndexof(Name, ".");
if (index!=-1) {
Name = substring(Name, 0, index);
} // Fragt Filenamen ab
Janein = 1;
selectImage(Picture);

while ( Janein >= 1 ) { // While-Schleife für Janein

//-----Input Dialog Text-----
s1 = "Größe des Rasterausschnitts: ";
s2 = "Überlappungsfaktor: ";
```

```
s3 = "Anzahl der Erode Vorgänge zur Entfernung des Hintergrunds: ";
s4 = "Unterer Schwellenwert zur Hintergrunddiskriminierung: ";
s5 = "Oberer Schwellenwert zur Hintergrunddiskriminierung: ";
s6 = "Maskengröße für Hintergrunddiskriminierung: ";
s7 = "Minimale Partikelgröße (px) in der FFT-Analyse: ";
s8 = "Unterer Schwellenwert FFT: ";
s9 = "Oberer Schwellenwert FFT: ";
s10 = "Mittlerer Grauwert des Bides: ";
s11 = "Maximaler Grauwert des Bildes: ";
s12 = "Minimale Standardabweichung des Grauwerts: ";
s13 = "Maximale Standardabweichung des Grauwerts: ";
s14 = "Linienbreite der Ausrichtungsmarkierung: ";
s15 = "Offset: ";
s16 = "Circ-Wert: ";

//-----Input Dialog Analysis Parameters-----

Dialog.create("Analyse Parameter");
Dialog.addNumber(s1, 16);
Dialog.addNumber(s2, 1);
Dialog.addNumber(s3, 1);
Dialog.addNumber(s4, 10);
Dialog.addNumber(s5, 255);
Dialog.addNumber(s6, 300000);
Dialog.addNumber(s7, 6);
Dialog.addNumber(s8, 110);
Dialog.addNumber(s9, 255);
Dialog.addNumber(s10, 30);
Dialog.addNumber(s11, 255);
Dialog.addNumber(s12, 4);
Dialog.addNumber(s13, 90);
Dialog.addNumber(s14, 2);
Dialog.addNumber(s15, 1);
Dialog.addNumber(s16, 0.800);
Dialog.show();

//-----Datenabfrage aus Dialogbox-----

FFT_ROI = Dialog.getNumber(); //s1
UEB_ROI = Dialog.getNumber(); //s2
erod = Dialog.getNumber(); //s3
lowThres = Dialog.getNumber(); //s4
upThres = Dialog.getNumber(); //s5
p_area = Dialog.getNumber(); //s6
```

```

part = Dialog.getNumber(); //s7
FFTLow = Dialog.getNumber(); //s8
FFTHi = Dialog.getNumber(); //s9
MeanWert = Dialog.getNumber(); //s10
MaxMean = Dialog.getNumber(); //s11
GrauMin = Dialog.getNumber(); //s12
GrauMax = Dialog.getNumber(); //s13
LineWidth = Dialog.getNumber(); //s14
Offset = Dialog.getNumber(); //s15
CircWert = Dialog.getNumber(); //s16

//-----Speichern der Analyse Parameter in Param.txt-----

param = "-param";
run("New... ", "name="+param+" type=[Text File]");
print ("["+param+"]", s1+FFT_ROI + "\n");
print ("["+param+"]", s2+UEB_ROI + "\n");
print ("["+param+"]", s3+erod + "\n");
print ("["+param+"]", s4+lowThres + "\n");
print ("["+param+"]", s5+upThres + "\n");
print ("["+param+"]", s6+p_area + "\n");
print ("["+param+"]", s7+part + "\n");
print ("["+param+"]", s8+FFTLow + "\n");
print ("["+param+"]", s9+FFTHi + "\n");
print ("["+param+"]", s10+MeanWert+"\n");
print ("["+param+"]", s11+MaxMean+"\n");
print ("["+param+"]", s12+GrauMin+"\n");
print ("["+param+"]", s13+GrauMax+"\n");
print ("["+param+"]", s14+LineWidth+"\n");
print ("["+param+"]", s15+Offset+"\n");
print ("["+param+"]", s16+CircWert+"\n");

//-----Start der Bilderverarbeitung-----

selectImage(Picture);
print("\n", Name+"-Orientation", "\n");
print ("\n", "n" , " \t" , "Winkel" , "\t", "theta [°]" , "\t" ,
"theta_Ori [RAD]" , "\n");
print ("\n");
selectImage(Picture);
    run("Duplicate...", "title=Bild1 vom Stack");
ID_Original1 = getImageID();

//-----Entfernung des Hintergrundes über eine Maske-----

```

```

setBatchMode(true);
//run("Smooth");
//run("Sharpen");
//run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
run("8-bit");
ID_Original1 = getImageID();
rename("Original1"); // Originalbild für die Maske...
run("Duplicate...", "title=Maske.tif");
setThreshold(lowThres, upThres); // Schwellenwert für Maske
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Options...", "iterations=1 count=1");
run("Close-");
run("Options...", "iterations="+erod+" count=1");
run("Erode");

ID_Zwischenmaske = getImageID(); // Zwischenbild vor dem Analyze...
run("Set Scale...", "distance=1 known=1 pixel=1 unit=pixel global");
run("Analyze Particles...", "size= "+p_area+"-Infinity circularity=0.00-1.00
show=Masks clear include");
ID_Maske = getImageID();
rename("Maske");
run("Image Calculator...", "image1=Original1 operation=AND image2=Maske create");
ID_Endmaske = getImageID();
rename("End-Maske"); // Maske...
selectImage(ID_Zwischenmaske);
close();
selectImage(ID_Maske);
close();
selectImage(ID_Endmaske);

//-----Einlesen der Grund- und Ausgabeparameter-----

height = getHeight(); // Parameter des Bildes definieren...
width  = getWidth();
run("RGB Color"); // Farbe für die Orientierungslinien festlegen
run("Color Picker...");
setForegroundColor(255, 255, 0);
close();
selectImage(ID_Original1);
close();
selectImage(ID_Endmaske);

```

```
//-----Doppelschleife für für das Rastern der Bilder-----

n = 0;
setResult("Major", 0, 9999);

for (XCt = OffSet; XCt<UEB_ROI*round(width/FFT_ROI) - 1; XCt++) {
    XSelC = XCt*FFT_ROI/UEB_ROI;

    for (YCt = OffSet; YCt<UEB_ROI*round(height/FFT_ROI - 1);YCt++){
        YSelC = YCt*FFT_ROI/UEB_ROI;
        selectImage(ID_Endmaske);
        makeRectangle(XSelC, YSelC, FFT_ROI, FFT_ROI);
        getStatistics(area, mean, min, max, std);

//-----Bestimmung der Actin-Ausrichtung durch FFT-----

        if(mean >= MeanWert && mean <= MaxMean) {
            // If-Bedingung für den mittleren Grauwert des Rasters...
            if(GrauMin <= std && std <= GrauMax) {
                // If-Bedingung für die Standard-Abweichung der Grauwerte
                run("FFT");
                ID_FFT=getImageID();
                run("Duplicate..." , "title=[FFT1.tiff]");
                ID_FFT1=getImageID();
                setThreshold(FFTLow, FFTHi);
            }
        }
// Kritischer Schwellenwert für Bestimmung des Schwerpunkts in der FFT-Funktion
        run("Convert to Mask");
        run("Set Measurements...", "area fit center circularity
        redirect=None decimal=3");
        nRS = nResults();
        run("Analyze Particles...", "size="+part+"-Infinity
        circularity=0.00-1.00 show=Outlines display include");
        nRE = nResults();
        if (nRS == nRE) {
            setResult("Major",nResults(), 9999);
            Winkel = 0;
            circ = 1;
            close();
        } // Ende Ergebnis Dummy Eintragung
        else { // Berechnet den Winkel Theta
            Winkel = getResult("Angle");

if ( Winkel >= 180 ){
Winkel = Winkel -180; }

            if (Winkel >= 90) {
```

```

        theta = Winkel -90; }
    else {
        theta = Winkel + 90; }
    // Ende der if-else-Schleife zur Bestimmung von theta
    theta_Ori = theta * PI/180;
major = getResult("Major");

    minor = getResult("Minor");
    circ = minor/major;
    close();
    } // Ende der Berechnung von Theta
    if (circ <= CircWert ) {
    // Zeichnet Orientierungslinien (Circ-Schleife)
        n=n+1; // Zählt die Schritte durch...
        Orientierungslinien (XSelC,YSelC,FFT_ROI,theta_Ori);
    print (n, " \t", Winkel , "\t" , theta, "\t", theta_Ori);
} // Ende der Circ Schleife

    selectImage(ID_FFT);
    close();

    selectImage(ID_FFT1);

    close();
    } // Ende der if-Schleife für den std-Wert...
    } // Ende der if-Schleife vom Mean-Wert...
    } // Ende YScan...
} // Ende XScan...

//-----Optische Kontrolle des Zwischenergebnisses durch den Benutzer-

selectImage(ID_Endmaske);
setBatchMode(false);
    wait(1000); // Wartezeit 1000 ms
setBatchMode(false);

Janein = getNumber(" Schreib '0' für Save&Weiter, '1'
für Nochmal oder '2' für 10sek Pause ! " , 1 );

while(Janein ==2 ){
wait(10000);
Janein = getNumber(" Schreib '0' für Save&Weiter, '1' für Nochmal
oder '2' für 10sek Pause ! " , 1 );
}

if ( Janein >= 1 ) {
selectWindow("Log");
run("Close");

```

```

selectWindow("-param");
run("Close");
if(isOpen("Results")==1) {
selectWindow("Results");
run("Close"); } // Ende if-Results
selectImage(ID_Endmaske);
close();
} // Ende für Janein = 1
if ( Janein == 0 ) {

//-----Speichern des Ergebnisses als Bilddatei, Log- und Result-Datei-

    selectWindow("Log");
    saveAs("text",dir_save+Name+"-Log");
    //selectWindow(Name+"-Log"+" .txt");
    selectWindow("Log");
    run("Close");
    selectWindow("-param");
    saveAs("Text" , dir_save+Name+param);
    selectWindow(Name+param+".txt");
    run("Close");
    if(isOpen("Results")==1) {
selectWindow("Results");
run("Close"); } // Ende if-Results
    //selectWindow("Results");
    //saveAs("text",dir_save+Name+"-Results");
    //selectWindow("Results");
    //run("Close");
    selectImage(ID_Endmaske);
    saveAs("tif", dir_save+Name+"-Orientation");
    selectImage(ID_Endmaske);
    close();
} // Ende für Janein = 0
    } // Ende für while-Schleife
    selectImage(Picture);
    run("Open Next");
    } // Ende der for-Schleife für die i verschiedenen Bilder
//} // Ende des Actin-Auswertung

//-----FUNKTIONEN-----

// Orientierungslinien...
function Orientierungslinien(XSelC,YSelC,FFT_ROI,theta_Ori) {

```

```
selectImage(ID_Endmaske);
XNewCen = XSelC+FFT_ROI/2;
YNewCen = YSelC+FFT_ROI/2;
r = FFT_ROI / 4;
setLineWidth( LineWidth);
drawLine( round(XNewCen+r*cos(theta_Ori)) , round(YNewCen-r*sin(theta_Ori))
, round(XNewCen-r*cos(theta_Ori)) , round(YNewCen+r*sin(theta_Ori)));
} // Ende der Funktion Orientierungslinien...

//-----
selectImage(Picture);
close();
} // Ende Makro Melih_Single_OK_Orientation
```

## 4.1.2 Doppel-Ausrichtungsmakro für Orientierungsvergleiche

```

macro "Melih_Co_Alignment" {

//-----Definitionen-----

dir_source = getDirectory("C:\\Kalafat\\Messungen\\PancCyclicStretch");
dir_save = getDirectory("C:\\Kalafat\\Messungen\\PancCyclicStretch");
Filename = File.getName(dir_source);
list = getFileList(dir_source);
listlength=list.length-1;
open("");
Pic_Stack = getImageID();
i = 1; // Zählt die verarbeiteten FFT-Bilder durch...
for (i = 1; i <= listlength; i++) {
Pic_Stack = getImageID();
Name = getTitle();
index = lastIndexOf(Name, ".");
if (index!=-1) {
Name = substring(Name, 0, index);
} // Fragt Filenamen ab
Janein = 1;
selectImage(Pic_Stack);

while ( Janein >= 1 ) {

//-----Input Dialog Text-----

s1 = "Größe des Rasterausschnitts: ";
s2 = "Überlappungsfaktor: ";
s3 = "Anzahl der Erode Vorgänge zur Entfernung des Hintergrunds: ";
s4 = "Unterer Schwellenwert zur Hintergrunddiskriminierung: ";
s5 = "Oberer Schwellenwert zur Hintergrunddiskriminierung: ";
s6 = "Maskengröße für Hintergrunddiskriminierung: ";
s7 = "Minimale Partikelgröße (px) in der FFT-Analyse fürs Actin: ";
s8 = "Minimale Partikelgröße (px) in der FFT-Analyse fürs Keratin: ";
s9 = "Unterer Schwellenwert für FTT Bild für Actin: ";
s10 = "Unterer Schwellenwert für FTT Bild für Keratin: ";
s11 = "Oberer Schwellenwert FFT: ";
s12 = "Mittlerer Grauwert des Bides Actin: ";
s13 = "Mittlerer Grauwert des Bides Keratin: ";
s14 = "Maximaler Grauwert des Bildes Actin: ";
s15 = "Maximaler Grauwert des Bildes Keratin: ";

```

```
s16 = "Minimale Standardabweichung des Grauwerts Actin: ";
s17 = "Minimale Standardabweichung des Grauwerts Keratin: ";
s18 = "Maximale Standardabweichung des Grauwerts Actin: ";
s19 = "Maximale Standardabweichung des Grauwerts Keratin: ";
s20 = "Linienbreite der Ausrichtungsmarkierung: ";
s21 = "Offset: ";
s22 = "Circ-Wert Actin: ";
s23 = "Circ-Wert Keratin: ";

//-----Input Dialog Analysis Parameters-----

Dialog.create("Analyse Parameter");
Dialog.addNumber(s1, 36);
Dialog.addNumber(s2, 1);
Dialog.addNumber(s3, 1);
Dialog.addNumber(s4, 10);
Dialog.addNumber(s5, 255);
Dialog.addNumber(s6, 300000);
Dialog.addNumber(s7, 6);
Dialog.addNumber(s8, 6);
Dialog.addNumber(s9, 90);
Dialog.addNumber(s10, 90);
Dialog.addNumber(s11, 255);
Dialog.addNumber(s12, 25);
Dialog.addNumber(s13, 25);
Dialog.addNumber(s14, 145);
Dialog.addNumber(s15, 145);
Dialog.addNumber(s16, 6);
Dialog.addNumber(s17, 6);
Dialog.addNumber(s18, 30);
Dialog.addNumber(s19, 30);
Dialog.addNumber(s20, 12);
Dialog.addNumber(s21, 1);
Dialog.addNumber(s22, 0.7);
Dialog.addNumber(s23, 0.8);
Dialog.show();

//-----Datenabfrage aus Dialogbox-----

FFT_ROI = Dialog.getNumber(); //s1
UEB_ROI = Dialog.getNumber(); //s2
erod = Dialog.getNumber(); //s3
lowThres = Dialog.getNumber(); //s4
upThres = Dialog.getNumber(); //s5
```

```

p_area = Dialog.getNumber(); //s6
part_Acti = Dialog.getNumber(); //s7
part_Kera = Dialog.getNumber(); //s8
FFT_Thres_Acti = Dialog.getNumber(); //s9
FFT_Thres_Kera = Dialog.getNumber(); //s10
FFTHi = Dialog.getNumber(); //s11
MeanWert_Actin = Dialog.getNumber(); //s12
MeanWert_Keratin = Dialog.getNumber(); //s13
MaxMean_Actin = Dialog.getNumber(); //s14
MaxMean_Keratin = Dialog.getNumber(); //s15
GrauMin_Actin = Dialog.getNumber(); //s16
GrauMin_Keratin = Dialog.getNumber(); //s17
GrauMax_Actin = Dialog.getNumber(); //s18
GrauMax_Keratin = Dialog.getNumber(); //s19
LineWidth = Dialog.getNumber(); //s20
Offset = Dialog.getNumber(); //s21
CircWert_Actin = Dialog.getNumber(); //s22
CircWert_Keratin = Dialog.getNumber(); //s23

//-----Speichern der Analyse Parameter in Param.txt-

param = "-param";
run("New... ", "name="+param+" type=[Text File]");
print ("["+param+"]", s1+FFT_ROI + "\n");
print ("["+param+"]", s2+UEB_ROI + "\n");
print ("["+param+"]", s3+erod + "\n");
print ("["+param+"]", s4+lowThres + "\n");
print ("["+param+"]", s5+upThres + "\n");
print ("["+param+"]", s6+p_area + "\n");
print ("["+param+"]", s7+part_Acti + "\n");
print ("["+param+"]", s8+part_Kera + "\n");
print ("["+param+"]", s9+FFT_Thres_Acti + "\n");
print ("["+param+"]", s10+FFT_Thres_Kera + "\n");
print ("["+param+"]", s11+FFTHi+"\n");
print ("["+param+"]", s12+MeanWert_Actin+"\n");
print ("["+param+"]", s13+MeanWert_Keratin+"\n");
print ("["+param+"]", s14+MaxMean_Actin+"\n");
print ("["+param+"]", s15+MaxMean_Keratin+"\n");
print ("["+param+"]", s16+GrauMin_Actin+"\n");
print ("["+param+"]", s17+GrauMin_Keratin+"\n");
print ("["+param+"]", s18+GrauMax_Actin+"\n");
print ("["+param+"]", s19+GrauMax_Keratin+"\n");
print ("["+param+"]", s20+LineWidth+"\n");
print ("["+param+"]", s21+Offset+"\n");

```

```

    print ("["+param+"]", s22+CircWert_Actin+"\n");
    print ("["+param+"]", s23+CircWert_Keratin+"\n");

//-----Start der Bilderverarbeitung-----

selectImage(Pic_Stack);
print("\n", Name+"-Keratin-Actin-Orientation", "\n");
print ("\n", "n" , " \t" ,"Keratin [°] " , " \t" , "Actin [°] " ,
" \t" , " \t" , "Keratin [Rad]" , " \t" , "Actin [Rad]" , " \t" , "\n");
print ("\n");
selectImage(Pic_Stack);
run("Duplicate...", "title=Actin");
Pic_Acti = getImageID();
//run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
selectImage(Pic_Stack);
run("Next Slice [>]");
run("Duplicate...", "title=Keratin");
Pic_Kera = getImageID();
//run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
selectImage(Pic_Stack);
run("Previous Slice [<]");

//----- Entfernung des Hintergrundes über eine Maske für das Keratin -

    setBatchMode(false);

    selectImage(Pic_Kera);
    rename("Keratin");
    run("Smooth");
    run("Sharpen");
    run("8-bit");
    //run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
    ID_Original1 = getImageID();
    rename("Original1"); // Originalbild für die Maske...
    run("Duplicate...", "title=Maske.tif");
    setThreshold(lowThres, upThres); // Schwellenwert für Maske
    run("Convert to Mask");
    run("Fill Holes");
    run("Options...", "iterations=1 count=1");
    run("Close-");
    run("Options...", "iterations="+erod+" count=1");
    run("Erode");

    ID_Zwischenmaske = getImageID();

```

```

run("Set Scale...", "distance=1 known=1 pixel=1 unit=pixel global");
run("Analyze Particles...", "size= "+p_area+"-Infinity
circularity=0.00-1.00 show=Masks clear include");
ID_Maske = getImageID();
rename("Maske");
run("Image Calculator...", "image1=Original1 operation=AND
image2=Maske create");
ID_Endmaske_Keratin = getImageID();
rename("End-Maske-Keratin"); // Maske für "Keratin" ...
run("RGB Color");
selectImage(ID_Zwischenmaske);
close();
selectImage(ID_Maske);
close();
selectImage(ID_Original1);
close();
selectImage(ID_Endmaske_Keratin);

//----- Entfernung des Hintergrundes über eine Maske für das Actin -

selectImage(Pic_Acti);
rename("Actin");
run("Smooth");
run("Sharpen");
run("8-bit");
//run("Enhance Contrast", "saturated=0.5");
ID_Original1 = getImageID();
rename("Original1"); // Originalbild für die Maske...
run("Duplicate...", "title=Maske.tif");
setThreshold(lowThres, upThres); // Schwellenwert für Maske
run("Convert to Mask");
run("Fill Holes");
run("Options...", "iterations=1 count=1");
run("Close-");
run("Options...", "iterations="+erod+" count=1");
run("Erode");

ID_Zwischenmaske = getImageID();
run("Set Scale...", "distance=1 known=1 pixel=1 unit=pixel global");
run("Analyze Particles...", "size= "+p_area+"-Infinity
circularity=0.00-1.00 show=Masks clear include");
ID_Maske = getImageID();
rename("Maske");
run("Image Calculator...", "image1=Original1 operation=AND

```

```

image2=Maske create");
ID_Endmaske_Actin = getImageID();
rename("End-Maske-Actin"); // Maske für "Actin" ...
run("RGB Color");
selectImage(ID_Zwischenmaske);
close();
selectImage(ID_Maske);
close();
selectImage(ID_Original1);
close();
selectImage(ID_Endmaske_Actin);

//----- Einlesen der Grund- und Ausgabeparameter -----

selectImage(ID_Endmaske_Keratin);
height = getHeight();
width  = getWidth();

//----- Doppelschleife für für das Rastern der Bilder -----

setBatchMode(true);
n = 0;
setResult("Major", 0, 9999);

for (XCt = OffSet; XCt<UEB_ROI*round(width/FFT_ROI) - 1; XCt++) {
    XSelC = XCt*FFT_ROI/UEB_ROI;

    for (YCt = OffSet; YCt<UEB_ROI*round(height/FFT_ROI - 1); YCt++){
        YSelC = YCt*FFT_ROI/UEB_ROI;
        selectImage(ID_Endmaske_Keratin);
        makeRectangle(XSelC, YSelC, FFT_ROI, FFT_ROI);
        getStatistics(area, mean, min, max, std);

//-----Bestimmung der Keratin-Ausrichtung durch FFT-----

        if(mean >= MeanWert_Keratin && mean <= MaxMean_Keratin ) {
            // If-Bedingung für den mittleren Grauwert des Rasters...
            if(GrauMin_Keratin <= std && std <= GrauMax_Keratin) {
                // If-Bedingung für die Standard-Abweichung der Grauwerte...
                run("FFT");

                ID_FFT_Keratin=getImageID();
                run("Duplicate..." , "title=[FFT1_Keratin.tif]");
                ID_FFT1_Keratin=getImageID();
                setThreshold(FFT_Thres_Kera, FFTHi);

```

```

// Kritischer Schwellenwert für Bestimmung des Schwerpunkts in der FFT-Funktion
run("Convert to Mask");
run("Set Measurements...", "area fit center circularity redirect=None decimal=3");
nRS = nResults();
run("Analyze Particles...", "size="+part_Kera+"-Infinity
circularity=0.00-1.00 show=Outlines display include");
nRE = nResults();
if (nRS == nRE) {
    setResult("Major",nResults(), 9999);
    Winkel_Keratin = 0;
circ_Keratin = 1;

    close();
} // Ende Ergebnis Dummy Eintragung
else { // Berechnet den Winkel Theta
    Winkel_Keratin = getResult("Angle");
    if (Winkel_Keratin >= 180) {
        // Abfrage für Winkel über 180°
        Winkel_Keratin = Winkel_Keratin -180 ; }
if (Winkel_Keratin >= 90) { // Drehung der FFT zur Orientierung
    theta_Keratin = Winkel_Keratin - 90; }
    else {
        theta_Keratin = Winkel_Keratin + 90; } /
/ Ende der if-else-Schleife zur Bestimmung von theta
    Keratin_Ori = theta_Keratin * (PI/180);
    major_Kera = getResult("Major");
    minor_Kera = getResult("Minor");
    circ_Keratin = minor_Kera / major_Kera;
    close();
} // Ende der Berechnung von Theta
selectImage(ID_FFT_Keratin);
    close();
selectImage(ID_FFT1_Keratin);
    close();

//-----Bestimmung der Actin-Ausrichtung durch FFT-----

selectImage(ID_Endmaske_Actin);
    makeRectangle(XSelC, YSelC, FFT_ROI, FFT_ROI);
    getStatistics(area, mean, min, max, std);
if(mean >= MeanWert_Actin && mean <= MaxMean_Actin ) {
// If-Bedingung für den mittleren Grauwert des Rasters...
if(GrauMin_Actin <= std && std <= GrauMax_Actin) {
// If-Bedingung für die Standard-Abweichung der Grauwerte...
run("FFT");

```

```

        ID_FFT_Actin=getImageID();
        run("Duplicate..." , "title=[FFT1_Actin.tiff]");
        ID_FFT1_Actin=getImageID();
        setThreshold(FFT_Thres_Acti, FFTHi);
// Kritischer Schwellenwert für Bestimmung des Schwerpunkts in der FFT-Funktion
        run("Convert to Mask");
        run("Set Measurements...",
            "area fit center circularity redirect=None decimal=3");
        nRS = nResults();
        run("Analyze Particles...",
"size="+part_Acti+"-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Outlines display include");
        nRE = nResults();
        if (nRS == nRE) {
            setResult("Major",nResults(), 9999);
            Winkel_Actin = 0;

circ_Actin = 1;

            close();
        } // Ende Ergebnis Dummy Eintragung
        else { // Berechnet den Winkel Theta
            Winkel_Actin = getResult("Angle");
            if (Winkel_Actin >= 180) {
Winkel_Actin = Winkel_Actin -180; }
            if (Winkel_Actin >= 90) { // Drehung der FFT zur Orientierung
                theta_Actin = Winkel_Actin -90; }
            else {
                theta_Actin = Winkel_Actin + 90; }
            Actin_Ori = theta_Actin * (PI/180);
            major_Acti = getResult("Major");
            minor_Acti = getResult("Minor");
            circ_Actin = minor_Acti / major_Acti;
            close();

        }
    selectImage(ID_FFT_Actin);
        close();
    selectImage(ID_FFT1_Actin);
        close();
    if (circ_Keratin <= CircWert_Keratin && circ_Actin <= CircWert_Actin){
n=n+1; // Zählt die Schritte durch...
Orientierungslinien1(XSelC,YSelC,FFT_ROI,Keratin_Ori);
        Orientierungslinien2(XSelC,YSelC,FFT_ROI,Actin_Ori);
    print (n, " \t", theta_Keratin, " \t", theta_Actin ,
" \t", " \t", Keratin_Ori, " \t", Actin_Ori ," \t");
    } // Ende der Circ Schleife
    selectImage(ID_Endmaske_Keratin);

```

```

} // Ende der if-Schleife für den std-Wert...
    } // Ende der if-Schleife vom Mean-Wert...
selectImage(ID_Endmaske_Keratin);
    } // Ende der if-Schleife für den std-Wert...
    } // Ende der if-Schleife vom Mean-Wert...
    } // Ende YScan...
} // Ende XScan...

//-----Optische Kontrolle des Zwischenergebnisses durch den Benutzer-

setBatchMode(false);
selectImage(ID_Endmaske_Keratin);
    wait(1000); // Wartezeit 1000 ms

selectImage(ID_Endmaske_Actin);
    wait(1000); // Wartezeit 1000 ms

Janein = getNumber(" Schreib '0' für Save&Weiter, '1' für Nochmal
oder '2' für 10sek Pause ! " , 1 );

while(Janein ==2 ){
wait(10000);
Janein = getNumber(" Schreib '0' für Save&Weiter, '1' für Nochmal
oder '2' für 10sek Pause ! " , 1 );

if ( Janein >= 1 ) {
selectWindow("Log");
run("Close");
selectWindow("-param");
    run("Close");
if(isOpen("Results")==1) {
selectWindow("Results");
run("Close"); } // Ende if-Results
selectImage(ID_Endmaske_Keratin);
close();
selectImage(ID_Endmaske_Actin);
close();
} // Ende für Janein = 1
if ( Janein == 0 ) {

//-----Speichern des Ergebnisses als Bilddatei-----

selectWindow("Log");

```

```

    saveAs("text",dir_save+Name+"-Log");
    //selectWindow(Name+"-Log"+" .txt");
    selectWindow("Log");
    run("Close");
    selectWindow("-param");
    saveAs("Text" , dir_save+Name+param);
    selectWindow(Name+param+".txt");
    run("Close");
    //selectWindow("Results");
    //saveAs("text",dir_save+Name+"-Results");
    if(isOpen("Results")==1) {
selectWindow("Results");
run("Close"); } // Ende if-Results
    selectImage(ID_Endmaske_Keratin);
    saveAs("tif", dir_save+Name+"-Keratin");
    close();
    selectImage(ID_Endmaske_Actin);
    saveAs("tif", dir_save+Name+"-Aktin");
    close();
} // Ende für Janein = 0
    } // Ende für while-Schleife
    selectImage(Pic_Stack);
    run("Open Next");
    } // Ende der for-Schleife für die verschiedenen Bilder...
//selectImage(Pic_Stack);
//close();
//} // Ende des Actin-Auswertung

//-----FUNKTIONEN-----

// Orientierungslinien 1 ...
function Orientierungslinien1(XSelC,YSelC,FFT_ROI,Keratin_Ori) {
XNewCen = XSelC+FFT_ROI/2;
YNewCen = YSelC+FFT_ROI/2;
r = FFT_ROI / 3;
setForegroundColor(255, 255, 0); // Farbe: Gelb !
setLineWidth( LineWidth);
selectImage(ID_Endmaske_Keratin);
drawLine( round(XNewCen+r*cos(Keratin_Ori)) , round(YNewCen-r*sin(Keratin_Ori)) ,
round(XNewCen-r*cos(Keratin_Ori)) , round(YNewCen+r*sin(Keratin_Ori)));
setLineWidth( LineWidth);
selectImage(ID_Endmaske_Actin);
drawLine( round(XNewCen+r*cos(Keratin_Ori)) , round(YNewCen-r*sin(Keratin_Ori)) ,
round(XNewCen-r*cos(Keratin_Ori)) , round(YNewCen+r*sin(Keratin_Ori)));

```

```
} // Ende der Funktion Orientierungslinien 1

// Orientierungslinien 2 ...
function Orientierungslinien2(XSelC,YSelC,FFT_ROI,Actin_Ori) {
XNewCen = XSelC+FFT_ROI/2;
YNewCen = YSelC+FFT_ROI/2;
r = FFT_ROI / 3;
setForegroundColor(255, 0, 0); // Farbe: Rot !
setLineWidth( LineWidth);
selectImage(ID_Endmaske_Actin);
drawLine( round(XNewCen+r*cos(Actin_Ori)) , round(YNewCen-r*sin(Actin_Ori)) ,
round(XNewCen-r*cos(Actin_Ori)) , round(YNewCen+r*sin(Actin_Ori)));
setLineWidth( LineWidth);
selectImage(ID_Endmaske_Keratin);
drawLine( round(XNewCen+r*cos(Actin_Ori)) , round(YNewCen-r*sin(Actin_Ori)) ,
round(XNewCen-r*cos(Actin_Ori)) , round(YNewCen+r*sin(Actin_Ori)));
} // Ende der Funktion Orientierungslinien 2
} // Ende Makro Melih_Co_Alignment
```

# Literaturverzeichnis

- [Alberts] Alberts, Bray, Hopkin, Johnson, Lewis, Raff, Roberts, Walter, Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 3. Auflage, Wiley-Verlag, 2005
- [Alenghat02] Alenghat F.J., Ingber D.E., Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins, Sci STKE., 2002
- [Allen85] Allen R.D. et al., Gliding movement of a bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport, J. Cell Biol., 1985, 100: 1736-1752
- [Andersson03] Andersson A.S., Olsson P., Lidberg U., Sutherland D.; The effects of continuous and discontinuous groove edges on cell shape and alignment, Exp Cell Res., 2003
- [Aydin09] Aydin Daniel, PhD Thesis: Dynamik der fokalen Adhäsion auf mikrostrukturierten Oberflächen, Heidelberg Deutschland 2009
- [Balaban01] Balaban et al., Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates, Nature Cell Biology 3, 466 - 472, 2001
- [Ballestrem00] Ballestrem et al., Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration., Molecular biology of the cell, 2000
- [Bathe08] Mark Bathe, Claus Heussinger, Mireille M. A. E. Claessens, Andreas R. Bausch, and Erwin Frey, Cytoskeletal bundle mechanics., Biophysical journal, 2008
- [Beil03] Beil et al., Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells, NATURE CELL BIOLOGY, VOLUME 5 | NUMBER 9, 2003
- [Bell78] Bell G.I., Models for the specific adhesion of cells to cells, Science, 1978

- [Berrier07] Berrier, Yamada, Cell - Matrix Adhesion, Journal of Cellular Physiology, 2007
- [Bershadsky96] Bershadsky A. et al., Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction, Curr Biol, 1996
- [Bershadsky03] Bershadsky A.D., Balaban N.Q., Geiger B.; Adhesion-dependent cell mechanosensitivity; Annu Rev Cell Dev Biol. 2003;19:677-95
- [Bershadsky06] Bershadsky A., Kozlov M., Geiger B., Adhesion-mediated mechanosensitivity a time to experiment and a time to theorize, Current Opinion in Cell Biology, 18472-481, 2006
- [Bertaud10] Bertaud, Qin, Buehler, Intermediate filament-deficient cells are mechanically softer at large deformation a multi-scale simulation study., Acta biomaterialia, 2010
- [Bessard08] Bessard, Sheng, Marceau, Keratin contribution to cellular mechanical stress response at focal adhesions as assayed by laser tweezers, Biochem Cell Biol. 2008
- [Biela09] Biela et al., Different sensitivity of human endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts to topography in the nano-micro range., Acta biomaterialia, 2009
- [Bischofs03] Bischofs I.B., Schwarz U.S., Cell organization in soft media due to active mechanosensing., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003
- [Bischofs08] Bischofs et al., Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape, Biophysical journal, 2008
- [Boguslawski00] Boguslawski G. et al., Sphingosylphosphorylcholine induces endothelial cell migration and morphogenesis, Biochem Biophys Res Commun., 2000
- [Bosch] A. Urban, F. Lärmer, Patentschrift über den Bosch-Prozess, Robert Bosch GmbH, 1992
- [Brawley09] Brawley, Rock, Unconventional myosin traffic in cells reveals a selective actin cytoskeleton., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009
- [Bretscher08] Bretscher, On the shape of migrating cells - a 'front-to-back' model., Journal of cell science, 2008
- [Busch08] Tobias Ulrich Busch, Dissertation: Die Rolle von Zytoskelettelementen bei der zellulären Migration und Differenzierung, Universitätsklinikum Ulm, 2008

- [Cai06] Cai Y., Biais N., Giannone G., Tanase M., Jiang G., Hofman J. M., Wiggins C. H., Silberzan P., Buguin A., Ladoux B., Sheetz M. P., Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow, *Biophys J* 2006, 91(10), 3907-20
- [Cai09] Cai Y., Sheetz M. P., Force propagation across cells: mechanical coherence of dynamic cytoskeletons, *Cell Biol* 2009, 21(1), 47-50
- [Cai10] Cai et al., Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility., *Journal of cell science*, 2010
- [Campbell10] Campbell et al., Cellular and molecular biomechanics, *Technology and health care official journal of the European Society for Engineering and Medicine*, 2010
- [Cannas07] Boccafoschi F., Bosetti M., Gatti S., Cannas M., Dynamic fibroblast cultures: response to mechanical stretching, *Cell Adh Migr* 2007, 1(3), 124-8
- [Carman03] Carman C.V. and Springer T.A., Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized, *Current opinion in cell biology*, 15, (5): 547-556, 2003
- [Cesa07] Cesa C.M., Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns, *Rev Sci Instrum.*, 2007
- [Chancellor10] Chancellor et al., Actomyosin Tension Exerted on the Nucleus through Nesprin-1 Connections Influences Endothelial Cell Adhesion, Migration, and Cyclic Strain-Induced Reorientation, *Biophysical Journal*, 2010
- [Chen97] Chen C.S. et al., Geometric Control of Cell Life and Death, *Science*, 1997
- [Chen05] Chen C. et al., Microengineering the environment of mammalian cells in culture, *Materials Research Society Bulletin*, Vol.30, No.3. March 2005, pp.194-201
- [Chen10] Chen et al., Fluidization and resolidification of the human bladder smooth muscle cell in response to transient stretch, *PloS one*, 2010
- [Choi04] Choi et al., An ultraviolet-curable mold for sub-100-nm lithography., *Journal of the American Chemical Society*, 2004
- [Clainche08] Le Clainche, Carlier, Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration, *Physiological reviews*, 2008
- [Cordel05] F.P. Cordelieres: Manual Tracking plugin 2005; <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>
- [Coulombe00] Coulombe P.A., Bousquet O., Ma L., Yamada S., Wirtz D.; The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization; *Trends Cell Biol.*, 2000

- [Curtis98] Curtis A. et al., Reactions of cells to topography, *J. Biomater Sci. Polymer Edn*, Vol.9, No12, pp. 1313-1329, 1998
- [Curtis01] Curtis A., Riehle M., Tissue engineering: the biophysical background. *Phys. Med. Biol.* 46, R57-R65, 2001
- [Dalby04] Dalby M.J., Riehle M.O., Johnstone H., Affrossman S., Curtis A.S.; Investigating the limits of filopodial sensing: a brief report using SEM to image the interaction between 10 nm high nano-topography and fibroblast filopodia; *Cell Biol Int.*, 2004
- [Dartsch89] Dartsch P. C., Betz E., Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation, *Basic Res Cardiol* 1989, 84(3), 268-81
- [Deguchi09] Deguchi S, Sato M; Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells; *Biorheology.* 2009;46(2):93-105
- [Doyle09] Doyle et al., One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration., *The Journal of cell biology*, 2009
- [Estevez10] Estevez M., Samitier J.; Changes in the internal organization of the cell by microstructured substrates, *Soft Matter* 2010, 6, 582-590
- [Etienne04] Etienne-Manneville S., Actin and microtubules in cell motility: which one is in control?, *Traffic* 2004
- [Fletcher10] Fletcher, Mullins, Cell mechanics and the cytoskeleton., *Nature*, 2010
- [Fouchard11] Fouchard, Mitrossilis, Asnacios, Acto-myosin based response to stiffness and rigidity sensing, *Cell adhesion and migration*, 2011
- [Frame10] Frame M.C., Patel H., Serrels B., Lietha D., Eck M.J., The FERM domain: Organizing the structure and function of FAK, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 802-814, 2010
- [Frey06] Frey et al., Cellular responses to substrate topography role of myosin II and focal adhesion kinase., *Biophysical journal*, 2006
- [Fuchs94] Fuchs E. and Weber K., Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease, *Annu. Rev. Biochem.* 63, 345-382, 1994
- [Fuchs98] Fuchs E. and Cleveland D. W., A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease, *Science* 279, 514-519, 1998
- [Fung93] Fung Y.C., *Biomechanics: mechanical properties of living tissues*, 1993

- [Gabriel05] G. Gabriel, Analyse absoluter Dichten stabiler und transienter Spezies mittels IR-TDLAS in einer fluorkohlenstoffhaltigen Hochfrequenz-Entladung, Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, 2005
- [Galbraith02] Galbraith, Yamada, Sheetz, The relationship between force and focal complex development., *The Journal of cell biology*, Volume 159, Number 4, page 695-705, 2002
- [Gardel08] Gardel M. L., Kasza K. E., Brangwynne C. P., Liu J., Weitz D. A., Chapter 19 Mechanical Response of Cytoskeletal Networks, *Methods Cell Biol* 2008, 89, 487-519
- [Gavara08] Gavara et al., Mapping cell-matrix stresses during stretch reveals inelastic reorganization of the cytoskeleton., *Biophysical journal*, 2008
- [Gavin00] Gavin R. H., Humana Press Inc., Totowa, NJ 2000, 161.
- [Geiger01] Geiger, B.; Bershadsky, A.; Pankov, R.; Yamada, K. M., Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, 2(11), 793-805
- [Geiger02] Geiger B., Bershadsky A., Exploring the Neighborhood: Adhesion-Coupled Cell Mechanosensors, *Cell* Vol.110, 139-142, 2002
- [Geiger09] Geiger, Spatz, Bershadsky, Environmental sensing through focal adhesions., *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2009
- [Goldman08] Goldman R.D., Grin B., Mendez M.G., Kuczmarski E.R., Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure, *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(1):28-34
- [Goldyn09] Goldyn A., Doktorarbeit: The spatiotemporal response of cells and their cytoskeleton to cyclic stretching, Heidelberg Deutschland 2009
- [Goldyn2009] Goldyn et al., Force-induced cell polarisation is linked to RhoA-driven microtubule-independent focal-adhesion sliding., *Journal of cell science*, 2009
- [Goode00] Goode B. L., Drubin D. G., Barnes G., Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons, *Cell Biol* 2000, 12(1), 63-71
- [Grew08] Grew J.C., Ricci J.L., Alexander H.; Connective-tissue responses to defined biomaterial surfaces. II. Behavior of rat and mouse fibroblasts cultured on microgrooved substrates; *J Biomed Mater Res A*; 2008
- [Gruler00] Gruler H., Nuccitelli R., The galvanotaxis response mechanism of keratinocytes can be modeled as a proportional controller, *Cell Biochem Biophys* 2000, 33(1), 33-51

- [Gruler94] Gruler H. et al., Random walk and directed movement-comparison between inert particles and self-organized molecular machines, *Physical Review E* Volume49 Number6, June 1994
- [Haastert10] Van Haastert P.J., Chemotaxis: insights from the extending pseudopod, *J Cell Sci.*, 2010
- [Hamilton10] Hamilton et al., Migration of Periodontal Ligament Fibroblasts on Nanometric Topographical Patterns Influence of Filopodia and Focal Adhesions on Contact Guidance, *PLoS ONE*, 2010
- [Hatzfeld85] Hatzfeld M. and Franke W. W., Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides, *J. Cell Biol.*101, 1826-1841, 1985
- [Hayakawa00] Hayakawa K., Hosokawa A., Yabusaki K., Obinata T., Orientation of Smooth Muscle-Derived A10 Cells in Culture by Cyclic Stretching: Relationship between Stress Fiber Rearrangement and Cell Reorientation, *Zoolog Sci* 2000, 17(5), 617-24
- [Hayakawa08] Hayakawa, Tatsumi, Sokabe, Actin stress fibers transmit and focus force to activate mechanosensitive channels., *Journal of cell science*, 2008
- [Heidemann00] Heidemann et al., Opposing views on tensegrity as a structural framework for understanding cell mechanics, *Journal of applied physiology*, 2000
- [Helfand03] Helfand, Chang, Goldman, The dynamic and motile properties of intermediate filaments., *Annual review of cell and developmental biology*, 2003
- [Helfand04] Helfand, Chang, Goldman, Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture., *Journal of cell science*, 2004
- [Hood02] Hood J.D., Cheresch D.A., Role of integrins in cell invasion and migration, *Nat Rev Cancer* 2002, 2:91-100
- [Horn04] A. Horn, Modellierung und Simulation orientierungsabhängiger Ätzprozesse in Silizium, Dissertation an der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik TU München, 2004
- [Hornberger05] Hornberger et al., Intracellular signaling specificity in response to uniaxial vs. multiaxial stretch implications for mechanotransduction., *American journal of physiology. Cell physiology*, 2005

- [Hu02] Hu Y.L., Li S., Miao H., Tsou T.C., del Pozo MA, Chien S.; Roles of microtubule dynamics and small GTPase Rac in endothelial cell migration and lamellipodium formation under flow; *J Vasc Res.* 2002 Nov-Dec;39(6):465-76
- [Humphries07] Humphries et al., Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin., *The Journal of cell biology*, 2007
- [Hynes87] Richard O. Hynes, Alternative splicing of chicken fibronectin in embryos and in normal and transformed cells., *Molecular and cellular biology*, 1987
- [Hynes90] Richard O. Hynes, *Fibronectins*, Springer-Verlag New York Inc., 1990
- [Hynes02] Richard O. Hynes, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell.* 20;110(6):673-87, 2002
- [Hynes09] Richard O. Hynes, The extracellular matrix not just pretty fibrils., *Science*, 2009
- [Ibidi] Chemotaxis and Migration Tool Version 1.01 manual, <http://www.ibidi.de/>
- [Ingber95] Ingber D. E., Prusty D., Sun Z., Betensky H., Wang N.; Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis, *Journal of Biomechanics*, Volume 28, Issue 12, Pages 1471-1484, December 1995
- [Ingber03] Ingber D. E., Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology, *J Cell Sci* 2003, 116, 1397-408
- [Ingber2003] Ingber D. E., Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks, *Journal of Cell Science*, 2003
- [Ingber2003-1] Ingber D. E., Mechanobiology and diseases of mechanotransduction, *Ann Med.*;35(8):564-77, 2003
- [Ingber08] Ingber D. E., Can cancer be reversed by engineering the tumor microenvironment, *Semin Cancer Biol.* 2008 Oct;18(5):356-64. 2008
- [Ingber2008] Ingber D.E., Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro, *Progress in biophysics and molecular biology*, 2008
- [Janmey07] Janmey P.A., McCulloch C.A., Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli, *Annu Rev Biomed Eng.*, 2007
- [Jung] Jungbauer S., PhD Theses: Mechanical stimulation of cells: Dynamic behavior of cells on cyclical stretched substrates, Heidelberg Deutschland 2008
- [Jung08] Jungbauer et al., Two characteristic regimes in frequency-dependent dynamic reorientation of fibroblasts on cyclically stretched substrates, *Biophysical journal*, 2008

- [Kasza07] Kasza K.E., The cell as a material, *Curr Opin Cell Biol.*, 2007
- [Kajzar08] Kajzar et al., Toward physiological conditions for cell analyses forces of heart muscle cells suspended between elastic micropillars., *Biophysical journal*, 2008
- [Katsumi02] Katsumi A., Milanini J., Kiosses W. B., del Pozo M. A., Kaunas R., Chien S., Hahn K. M., Schwartz M. A., Effects of cell tension on the small GTPase Rac, *J Cell Biol* 2002, 158(1), 153-64
- [Katsumi04] Katsumi et al., Integrins in mechanotransduction., *The Journal of biological chemistry*, 2004
- [Kaunas05] Kaunas et al., Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization, *Sciences-New York*, 2005
- [Kaverina02] Kaverina et al., Tensile stress stimulates microtubule outgrowth in living cells., *Journal of cell science*, 2002
- [Keller02] Keller R., Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements, *Science* 2002
- [Kemkemer99] Kemkemer R., Neidlinger-Wilke C., Claes L., Gruöer H.; Cell orientation induced by extracellular signals, *Cell Biochem Biophys* 1999, 30(2), 167-92
- [Kemkemer00] Kemkemer R., Kling D., Kaufmann D., Gruler H., Elastic properties of nematoid arrangements formed by amoeboid cells, *European Physical Journal E* 2000, 1(2-3), 215-225
- [Kemkemer06] Kemkemer et al., Cell orientation by a microgrooved substrate can be predicted by automatic control theory., *Biophysical journal*, 2006, 90(12), 4701-11
- [Khanafer09] Khanafer et al., Effects of strain rate, mixing ratio, and stress-strain definition on the mechanical behavior of PDMS material as related to its biological applications, *Biomedical microdevices*, 2009
- [Kong08] Kong, Ji, Dai, Stability of Adhesion Clusters and Cell Reorientation under Lateral Cyclic Tension, *Biophysical Journal*, 2008
- [Kölsch09] Kölsch, Windoffer, Leube, Actin-dependent dynamics of keratin filament precursors., *Cell motility and the cytoskeleton*, 2009
- [Kölsch10] Kölsch et al., The keratin-filament cycle of assembly and disassembly, *Journal of cell science*, 2010
- [Krishnan09] Krishnan R., Fredberg J. et al., Reinforcement versus Fluidization in Cytoskeletal Mechanoresponsiveness, *PlosOne Volume 4 Issue 5*, 2009

- [Kroner07] Kroner E., Diplomarbeit, Einfluss des Substrats auf das Kontraktionsverhalten von Herzmuskelzellen, MPI Stuttgart 2007
- [Kuo09] Kuo et al., Microfabricating high-aspect-ratio structures in polyurethane-methacrylate (PUMA) disposable microfluidic devices., Lab on a chip, 2009
- [Langevin05] Langevin et al., Dynamic fibroblast cytoskeletal response to subcutaneous tissue stretch ex vivo and in vivo., American journal of physiology. Cell physiology, 2005
- [Lee10] Lee Chin-Fu et al., Cyclic stretch-induced stress fiber dynamics, Rho-kinase and MLCK, Dependence on strain rate, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010
- [Letzkus03] F. Letzkus, Membran- und Struktur-Ätzprozesse für großflächige Projektionsmasken in der Nanolithografie, Dissertation am Institut für Mikroelektronik Stuttgart, 2003
- [Li05] Li S., Guan J. L., Chien S., Biochemistry and biomechanics of cell motility, Annu Rev Biomed Eng 2005, 7, 105-50
- [Lieber75] Lieber et al., Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas., International journal of cancer. Journal international du cancer, 1975
- [Lo00] Lo et al., Cell movement is guided by the rigidity of the substrate., Biophysical journal, 2000
- [Loesberg06] Loesberg et al., The effect of combined hypergravity and micro-grooved surface topography on the behaviour of fibroblasts., Cell motility and the cytoskeleton, 2006
- [Magin07] Magin, Vijayaraj, Leube, Structural and regulatory functions of keratins, Experimental cell research, 2007
- [Malek96] Malek A. M., Izumo S., Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress, J Cell Sci 1996, 109(Pt4), 713-26
- [Maniotis97] Maniotis A. J., Chen C. S. and Ingber D. E., Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 849-854, 1997
- [Matthews06] Matthews et al., Cellular adaptation to mechanical stress role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels., Journal of cell science, 2006

- [Mikha98] Mikhailov A., Gundersen G., Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol, *Cell Motil Cytoskeleton*, 1998
- [Mizutani09] Mizutani T., Kawabata K., Koyama Y., Takahashi M., Haga H., Cellular stiffness response to external deformation: tensional homeostasis in a single fibroblast, *Cell Motil Cytoskeleton* 2009, 66(7), 389-397
- [Mizutani2009] Mizutani T., et al., Regulation of Cellular Contractile Force in Response to mechanical stretch by diphosphorylation of myosin regulatory light chain via RhoA signaling cascade, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 2009
- [Mould04] Mould P., Humphries M., Regulation of integrin function through conformational complexity: not simply a knee-jerk reaction, *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 16, Issue 5, Pages 544-551, October 2004
- [Neidlinger01] Neidlinger-Wilke C., Grood E. S., Wang J.-C., Brand R. A., Claes L., Cell alignment is induced by cyclic changes in cell length: studies of cells grown in cyclically stretched substrates, *J Orthop Res* 2001, 19(2), 286-93
- [Nicolas04] Nicolas, Geiger, Safran, Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004
- [Omary98] Omary M.B., Ku N.O., Liao J., Price D., Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro, *Subcell Biochem.*, 1998
- [Oriolo07] Oriolo et al., Intermediate filaments a role in epithelial polarity., *Experimental cell research*, 2007
- [Pakstis10] Pakstis et al., Evaluation of polydimethylsiloxane modification methods for cell response., *Journal of biomedical materials research. Part A*, 2010
- [PDMS] Dow Corning, Information about Dow Corning ® brand Silicone Encapsulants Silicones and Electronics, Components Corning, Information about Dow Corning ® brand Silicone Encapsulants Silicones and Electronics, Components, <http://bdml.stanford.edu/twiki/pub/Rise/PDMSProceSS//PDMSdatasheet.pdf>
- [Pelham97] Pelham J.R. et al., Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Cell Biology*, Vol. 94, p.13661-13665, 1997
- [Pellegrin07] Pellegrin S, Mellor H.; Actin stress fibres; *J Cell Sci.* 2007 Oct 15;120(Pt 20):3491-9

- [Pender91] Pender N., McCulloch C.A., Quantitation of actin polymerization in two human fibroblast sub-types responding to mechanical stretching, *J Cell Sci.*, 1991
- [Pollard09] Pollard T., Cooper J.; Actin, a central player in cell shape and movement, *Science (New York, N.Y.)*, 2009
- [Prasain09] Nutan Prasain and Troy Stevens, The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes, *Microvascular Research* Volume 77, Issue 1, January 2009, Pages 53-63
- [Puklin-Faucher09] Puklin-Faucher, Sheetz, The mechanical integrin cycle, *Journal of Cell Science*, 2009
- [Putnam98] Putnam et al., Microtubule assembly is regulated by externally applied strain in cultured smooth muscle cells, *Strain*, 1998
- [Pyne10] Pyne N., Pyne S., Sphingosine 1-phosphate and cancer, *Nature reviews Cancer*, 2010
- [Rape10] Rape, Guo, Wang, The regulation of traction force in relation to cell shape and focal adhesions, *Biomaterials*, 2010
- [Rasband08] W.Rasband: „ImageJ“, U.S. National Institutes of Health, Bethesda Maryland, USA 1997-2008, <http://www.rbs.info.nih.gov/ij/>
- [Remidos03] dos Remedios et al., Actin binding proteins regulation of cytoskeletal microfilaments, *Physiological reviews*, 2003
- [Reymann10] Reymann A.C., Martiel J.L., Cambier T., Blanchoin L., Boujemaa-Paterski R., Théry M., Nucleation geometry governs ordered actin networks structures, *Nat Mater.* 2010 Oct;9(10):827-32. Epub 2010
- [Ridley03] Ridley A.J. et al., Cell migration: integrating signals from front to back, *Science*, 2003
- [Roure05] Roure et al., Force mapping in epithelial cell migration., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005
- [Russell04] Russell et al., Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes., *Journal of cell science*, 2004
- [Ruoslahti87] Ruoslahti E., Pierschbacher M.D., New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins, *Science* 238(4826):491-7, 1987
- [S1818] Informationsblatt für Umgang mit S1818-Lack, [http://cmi.epfl.ch/photo/photo\\_process/files/Data\\_S1800.pdf](http://cmi.epfl.ch/photo/photo_process/files/Data_S1800.pdf)

- [Saez07] Saez et al., Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007
- [Sbrana08] Sbrana F., Sassoli C., Meacci E., Nosi D., Squecco R., Paternostro F., Tiribilli B., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Formigli L., Role for stress fiber contraction in surface tension development and stretch-activated channel regulation in C2C12 myoblasts, *Am J Physiol Cell Physiol* 2008, 295(1), C160-72
- [Schmitz08] Schmitz J., Benoit M. and Gottschalk K.E., The viscoelasticity of membrane tethers and its importance for cell adhesion, *Biophysical Journal*, 2008
- [Schmoranz03] Schmoranz J., Kreitzer, G.; Simon, S. M.; Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge, *J Cell Sci* 2003, 116, 4513-9
- [Schoumacher10] Schoumacher et al., Actin, microtubules, and vimentin intermediate filaments cooperate for elongation of invadopodia., *The Journal of cell biology*, 2010
- [Schwartz09] Schwartz M.A., *CELL BIOLOGY: The Force Is with Us*, Science; 323(5914):588-9, 2009
- [Schwarz06] Schwarz U.S., Erdmann T., Bischofs I.B., Focal adhesions as mechanosensors: the two-spring model, *Biosystems.*, 2006
- [Seifert00] Seifert U., Rupture of multiple parallel molecular bonds under dynamic loading, *Physical Review Letters*, 2000
- [Seufferlein95] Seufferlein, T., Rozengurt E., Sphingosylphosphorylcholine activation of mitogenactivated protein kinase in Swiss 3T3 cells requires protein kinase C and pertussis toxin-sensitive G protein., *J. Biol. Chem.*270, 1995
- [Sheetz10] Rossier O., Sheetz M. et al., Force generated by actomyosin contraction builds bridges between adhesive contacts., *The EMBO journal*, 2010
- [Shutova08] Shutova M. S., Alexandrova A. Y., Vasiliev J. M., Regulation of polarity in cells devoid of actin bundle system after treatment with inhibitors of myosin II activity, *Cell Motil Cytoskeleton* 2008, 65(9), 734-46
- [Sivara09] Sivaramakrishnan et al., Shear Stress Induced Reorganization of the Keratin Intermediate Filament Network Requires Phosphorylation by Protein Kinase C, *Molecular Biology of the Cell*, 2009
- [Sjöblom08] Sjöblom, Salmazo, Djinovic-Carugo, Alpha-actinin structure and regulation., *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 2008

- [Skwarek09] Skwarek-Maruszewska et al., Contractility-dependent actin dynamics in cardiomyocyte sarcomeres., *Journal of cell science*, 2009
- [Small78] Small J.V. et al, Polarity of actin at the leading edge of cultured cells, *Nature* 272, 638-639, 1978
- [Small02] Small J.V., Geiger B., Kaverina I., Bershadsky A., How do microtubules guide migrating cells, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 957-964, 2002
- [Sniadecki07] Sniadecki et al., Magnetic microposts as an approach to apply forces to living cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007
- [Stupack02] Stupack, Get a ligand, get a life integrins, signaling and cell survival, *Journal of Cell Science*, 2002
- [Suciu97] Suciu A., Civelekoglu G., Tardy Y., Meister J. J., Model for the alignment of actin filaments in endothelial cells subjected to fluid shear stress, *Bull Math Biol* 1997, 59(6), 1029-46
- [Suresh07] Suresh S., Biomechanics and biophysics of cancer cells, *Acta Biomater* 2007, 3(4), 413-38
- [Suter98] Suter et al., The Ig superfamily cell adhesion molecule, apCAM, mediates growth cone steering by substrate-cytoskeletal coupling., *The Journal of cell biology*, 1998
- [Tan03] Tan et al., Cells lying on a bed of microneedles an approach to isolate mechanical force., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003
- [Tamada04] Tamada M., Sheetz M.P., Sawada Y., Activation of a Signaling Cascade by Cytoskeleton Stretch, *Developmental Cell*, Vol.7, 709-718, 2004
- [Teixeira03] Teixeira et al., Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nano-structured substrates., *Journal of cell science*, 2003
- [They06] They, M.; Bornens, M., Cell shape and cell division, *Cell Biol* 2006, 18(6), 648-57
- [Thoumine99] Thoumine O., Ott A., Cardoso O. and Meister J.J., Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 1999
- [Toivola97] Toivola et al., Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments., *Journal of cell science*, 1997

- [Trepato07] Trepato X., Fredberg J., Universal physical responses to stretch in the living, Nature Vol 447 31 May 2007
- [Urban10] Urban E, Jacob S, Nemethova M, Resch GP, Small JV; Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia; Nat Cell Biol. 2010 May;12(5):429-35. Epub 2010
- [Vogel06] Vogel V., Sheetz M., Local force and geometry sensing regulate cell functions., Nature reviews. Molecular cell biology, 2006
- [Walmod01] Walmod P. et al., Evaluation of Individual-Cell Motility, Methods Mol Biol, 161:59-83, 2001
- [Walter10] Walter N., Doktorarbeit: A Cell Mechanical Study on Adherent and Suspended Pancreatic Cancer Cells using AFM and Microfluidics, Universität Heidelberg Deutschland, 2010
- [Wang01] Wang J. H., Goldschmidt-Clermont P., Wille J., Yin F. C., Specificity of endothelial cell reorientation in response to cyclic mechanical stretching, J Biomech 2001, 34(12), 1563-72
- [Wang2001] Wang et al., Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001
- [Wang06] Wang J.H., Thampatty B.P., An introductory review of cell mechanobiology, Biomech Model Mechanobiol, 2006
- [Waka01] Wakatsuki et al., Effects of cytochalasin D and latrunculin B on mechanical properties of cells, Journal of cell science, 2001
- [Wakita98] Wakita et al., Sphingosylphosphorylcholine stimulates proliferation and upregulates cell surface-associated plasminogen activator activity in cultured human keratinocytes, Journal of Investigative Dermatology, 1998
- [Wei08] Wei Z., Deshpande V. S., McMeeking R. M., Evans A. G., Analysis and interpretation of stress fiber organization in cells subject to cyclic stretch, J Biomech Eng 2008
- [Wehrle03] Wehrle-Haller B., Imhof B. A., Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration, J Biochem Cell Biol 2003, 35(1), 39-50
- [Windoffer99] Windoffer, Leube, Detection of cytokeratin dynamics by time-lapse fluorescence microscopy in living cells., Journal of cell science, 1999

- [Windoffer06] Windoffer et al., Focal adhesions are hotspots for keratin filament precursor formation., *The Journal of cell biology*, 2006
- [Wipff09] Wipff et al., The covalent attachment of adhesion molecules to silicone membranes for cell stretching applications., *Biomaterials*, 2009
- [Wozniak09] Wozniak, M. A.; Chen, C. S., Mechanotransduction in development: a growing role for contractility, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10(1), 34-43
- [Wöll05] Wöll S., Windoffer R., Leube R.E.; Dissection of keratin dynamics: different contributions of the actin and microtubule systems; *Eur J Cell Biol.*; 2005
- [Yamada02] Yamada, S., Wirtz, D. and Coulombe, P. A. Pairwise assembly determines the intrinsic potential for self-organization and mechanical properties of keratin filaments. *Mol. Biol. Cell* 13, 382-391, 2002
- [Yoshigi03] Yoshigi M., Clark E. B., Yost H. J., Quantification of stretch-induced cytoskeletal remodeling in vascular endothelial cells by image processing, *Cytometry A* 2003, 55(2), 109-18
- [Yoshigi05] Yoshigi M., Hoffman L. M., Jensen C. C., Yost H. J., Beckerle M. C., Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement, *J Cell Biol* 2005, 171(2), 209-15
- [Zamir01] Zamir E., Geiger B., Components of cell-matrix adhesions, *Journal of cell science*, 2001
- [Zengerle07] R. Zengerle, Vorlesung: Mikrosystemtechnik: Technologien und Prozesse: 6. Schichtabtragung durch Ätzen, Institut für Mikrosystemtechnik, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2007

# Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und damit zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt ....

- Herrn Prof. Dr. J. Spatz für die Annahme und die Möglichkeit der Promotion am MPI Institut für Metallforschung.
- Herrn Prof. Dr. U. Schwarz für die Übernahme des Mitberichts.
- Herrn Dr. R. Kemkemer für die Betreuung der Doktorarbeit in den letzten drei Jahren mit seinen kritischen und hilfreichen Anregungen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern unserer Gruppe. Ganz besonders bei meinen Zimmerkollegen und Freunden Borja Aragues, Claudio Rolli und Martin Deibler, die mich durch die gesamte Promotion unterstützt haben und stets ein offenes Ohr für schwierige Probleme hatten. Ich werde unsere Diskussionen, Witze, Scherze, Flugstunden mit Helikoptern, Eispausen und tägliche Besuche bei der Kantine, und den Spanienurlaub niemals vergessen. Danke dafür! Ich wünsche euch alles Gute für eure Zukunft und Erfolg bei euren Arbeiten und im Privatleben. Danke euch!

Darüber hinaus möchte ich mich bei weiteren Arbeitskollegen und Freunden Christian Kreidler, Timo Burek, Alex Goldyn, Ilia Louban, Daniel Aydin, Simon Ulrich, Tobias Wolfram, Janis Grigoridis, Peter Kaiser, Tobias Busch, Max Nülle und Marc Gronle für zahlreiche Hilfen bei der Technik und wissenschaftsfernen Diskussionen bedanken.

Zum Schluß möchte ich mich bei meiner Familie und Freundin Kati für die Hilfe und Aufopferungen bedanken, ohne die ich, diese Arbeit sicherlich nicht erfolgreich zum Abschluss gebracht hätte. Obwohl die letzten Jahre mehr als schwierig waren, kann ich mich immer auf euch verlassen und möchte mich bei euch dafür aus ganzem Herzen bedanken und uns allen v.a. mehr Gesundheit und Erfolg wünschen.

# Erklärung

*Hiermit erkläre ich, Melih Kalafat, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe, und das alle Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden sind.*

*Melih Kalafat*