

Der Einfluss von 2D- und 3D- Substratgeometrien und Flexibilität auf Zellform und Zellverhalten

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Franziska Klein

aus Hildburghausen

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Co-Referent: Prof. Dr. Ulrich Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07. – 10.07.2009

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Institut für Zell- und Neurobiologie (Zoologie I) an der Universität Karlsruhe in der Zeit von Mai 2005 bis April 2009 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Franziska Klein, 26. Mai 2009

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Die dreidimensionale Extrazelluläre Matrix.....	10
1.1.1	Fibronektin	11
1.1.2	Kollagen.....	12
1.2	Mechanosensing und Zytoskelettdynamik.....	14
1.2.1	Umwandlung von Kräften in biochemische Signale.....	15
1.2.2	Dynamik und Funktionalität der Aktinfilamente und Mikrotubuli	16
1.2.3	Tensegrity-Modell	19
1.3	Form und Funktion durch mechanische Spannung	20
1.3.1	Einfluss der Geometrie und Topographie	21
1.3.2	Einfluss der Flexibilität.....	22
1.3.3	Einfluss der Dreidimensionalität	23
1.4	Techniken zur Herstellung Dreidimensionaler Substrate.....	24
1.4.1	Konventionelle Herstellungsverfahren zur 3D-Zellkultivierung	25
1.4.2	Neuere Methoden der Festen Freiformflächen-Herstellung (SFF)	29
1.5	Zielsetzung	35
2	Material und Methoden	36
2.1	Chemikalien und Lösungsmittel.....	36
2.2	Herstellung zweidimensionaler strukturierter Substrate	38
2.2.1	Stempelmuster.....	38
2.2.2	Reinigung der Master und Herstellung der Stempel.....	38
2.2.3	Goldbedampfung der Deckgläser	39
2.2.4	Substratherstellung.....	39
2.3	Herstellung dreidimensionaler Substrate mittels 2PP.....	40
2.3.1	Harte 3D-Glassubstrate	41
2.3.2	Flexible 3D-Substrate aus Ormocer®.....	44
2.3.3	Proteinbeschichtung	46
2.3.4	Reinigung der 3D-Substrate	47
2.4	Zellkultur	48
2.4.1	Verwendete Zelllinien	48

2.4.2	Präparation primärer Fibroblasten	49
2.4.3	Präparation kardialer Myozyten	50
2.4.4	Routinezellkultur.....	51
2.4.5	Auszählen der Zellen	52
2.4.6	Inhibition intrazellulärer Kontraktilität	52
2.4.7	Kollagengele	52
2.5	Immunhistochemie	53
2.5.1	Ablauf	53
2.5.2	Verwendete Primär-Antikörper	54
2.5.3	Verwendete Sekundär-Antikörper	55
2.5.4	Andere Färbesubstanzen	55
2.6	Quantifizierung	56
2.6.1	Verwendet Optiken zur Analyse der Präparate	56
2.6.2	Quantifizierung zellmorphometrischer Parameter in 3D-Substraten	57
2.6.3	Zeitrafferuntersuchungen von Kardiomyozyten in flexiblen 3D-Substraten	58
2.6.4	Bildverarbeitung, 3D-Rekonstruktion und Statistik	58
3	Ergebnisse	60
3.1	2D-Substratgeometrie beeinflusst Zell- und Gewebeform	60
3.1.1	Kreisbogenförmige Zellen auf Substraten mit diskreten Anheftungspunkten	61
3.1.2	Kreisbogenförmige Gewebe in Gelen mit diskreten Anheftungspunkten	62
3.1.3	Quantitative Auswertung von Zell- und Gewebeform	66
3.1.4	Spannungsarten und Computersimulationen	67
3.1.5	Spannungs-Elastizitätsmodell (engl. tension-elasticity model)	68
3.1.6	2D-Organisation der Mikrotubuli	71
3.2	3D-Substratgeometrie und Flexibilität beeinflussen Zellform und Verhalten	73
3.2.1	Dreidimensionales Zellwachstum	73
3.2.2	Charakterisierung des Zellwachstums in harten 3D-Strukturen	74
3.2.3	Dreidimensionale Organisation intrazellulärer Komponenten	79
3.2.4	Morphometrische Quantifizierung zelltypspezifischer 3D-Zellform	83
3.2.5	Charakterisierung des Zellwachstums in flexiblen 3D-Substraten	89

Inhaltsverzeichnis

4	Diskussion.....	101
4.1	Mechanismen zur Ausbildung von 2D-Zell- und Gewebeformen	101
4.1.1	Abstandsabhängigkeit des Radius adhärter Zellen und Gewebe.....	101
4.1.2	Formgebung durch filamentöse Netzwerkmechanik und Kontraktilität.....	105
4.2	Zellform und -Verhalten in geometrischen und flexiblen 3D-Substraten	110
4.2.1	Grundlegendes Zellverhalten in geometrischen 3D-Substraten	111
4.2.2	Definierte Flexibilität in der 3.Dimension	119
4.3	Ausblick	123
5	Zusammenfassung.....	125
6	Literaturverzeichnis	126
7	Anhang.....	142
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	142
7.2	Danksagung	143
7.3	Publikationen	144
7.4	Lebenslauf	145
7.5	Begleit-CD	146

Abb. 1	Strukturmodell des Fibronektins	12
Abb. 2	Interaktion von mechanosensitiven Zellkontakte und Aktinzytoskelett	14
Abb. 3	Tensegrity-Modell	20
Abb. 4	Herstellung von 3D-Substraten durch Direktes Laserschreiben	41
Abb. 5	Herstellung 3D-Glassubstrate	41
Abb. 6	Geometrie harter 3D-Glasstrukturen	43
Abb. 7	Kreisbogenförmige Zellkontur auf geometrischen Substraten	61
Abb. 8	Nach Kurzzeitkultivierung ist Migration abgeschlossen	62
Abb. 9	Dynamische Entstehung von Kreisbögen im Kollagengel	63
Abb. 10	Kollagengele ohne Zellen bzw. mit Zellen ohne Adhäsionspunkte	64
Abb. 11	Kreisbogenförmige Gewebekontur im Kollagengel	65
Abb. 12	<i>R-d</i> Korrelation bei Einzelzellen und Gewebe	66
Abb. 13	Einfluss der Bogenstärke	69
Abb. 14	Einfluss der Aktomyosin-Kontraktilität	70
Abb. 15	Zweidimensionale Organisation der Mikrotubuli	71
Abb. 16	Herstellung von 3D-Strukturen und 3D-Zellwachstum	74
Abb. 17	Substratbeschichtung mit Proteinen der ECM	75
Abb. 18	Zellproliferation in verschiedenen 3D-Substratgeometrien	76
Abb. 19	Einwachsen verschiedenener Zelltypen in 3D-Gitterstrukturen	77
Abb. 20	Aktin- und Mikrotubuli-Organisation in harten 3D-Radstrukturen	80
Abb. 21	Zusammensetzung von 3D-Zell-Matrix-Kontakten in harten Radstrukturen	82
Abb. 22	Segmentbasierte Volumen- und Oberflächenmessung	84
Abb. 23	Zelltypspezifische Morphologie in 3D-Radstrukturen	86
Abb. 24	Morphometrische 3D-Quantifizierung abhängig von der 3D-Geometrie	88
Abb. 25	Zytoskelett-Organisation kardialer Myozyten in 3D-Geometrien	90
Abb. 26	Primärer Kardiomyozyt in flexibler Ormocer®-Radstruktur	92
Abb. 27	Vollelastische Eigenschaften von Ormocer®	93
Abb. 28	Kontraktionsbedingte Auslenkung in Abhängigkeit von der Linienstärke	93
Abb. 29	Kalibrierung der elastischen Verformbarkeit durch Rasterkraftmikroskopie	95
Abb. 30	Primärer Kardiomyozyt in flexibler Boxring-Struktur	96

Abbildungsverzeichnis

Abb. 31 Flexibilitätsgradient.....	97
Abb. 32 3D-Zell-Matrix-Kontakte in flexiblen 3D-Substraten	99
Abb. 33 Rho vermittelte Kontrolle über Spannung und Elastizität in Stressfasern	107

Tab. 1	Übersicht über 3D-Zellkultursubstrate	33
Tab. 2	ECM-Proteine für die Substratbeschichtung.....	46
Tab. 3	Verwendete Zelllinien , eingesetztes Medium und Ablösung vom Substrat	49
Tab. 4	Verwendete Primär-Antikörper.....	54
Tab. 5	Verwendete Sekundär-Antikörper.....	55
Tab. 6	Verwendete weitere Färbesubstanzen	55
Tab. 7	Untersuchte Zellzahlen beim Einwachsen in Gitterstrukturen	78
Tab. 8	Zusammensetzung Zell-Matrix-Kontakte	100

1 Einleitung

Das Wachstum von Zellen ist eng mit ihrer Umgebung verknüpft, die durch die dreidimensionale Anordnung von adhäsiven Proteinen und Signalmolekülen in einem flexiblen Netzwerk definiert ist. Die mechanischen Eigenschaften der Umgebung werden von den Zellen aktiv durch Ausbildung von Zellkräften wahrgenommen. Die aufgenommenen Informationen werden mechanosensitiv verarbeitet und beeinflussen die Zellform, wodurch eine Vielzahl zellulärer Funktionen kontrolliert wird. Der nachfolgend beschriebene molekulare Aufbau der Zellumgebung sowie das heutige Verständnis über die Umwandlung von Kräften in biochemische Signale und daraus resultierende zelluläre Antworten sollen grundlegende Kenntnisse für die Beantwortung offener Fragen geben, aus denen diese Arbeit motiviert ist. Denn bis heute sind die Mechanismen zur Ausbildung von Zell- und Gewebeform noch nicht vollständig geklärt. Zudem besteht Bedarf an dreidimensionalen Substraten, die geometrisch kontrolliert und mit definierter Flexibilität hergestellt werden und somit Aufschluss über grundlegendes Zellverhalten in einer *in vivo*-ähnlichen Umgebung geben können.

1.1 Die dreidimensionale Extrazelluläre Matrix

Abgesehen von Blutzellen sind alle Zellen des menschlichen Gewebes in einer sogenannten Extrazellulären Matrix (ECM) verankert. Die ECM stellt für Zellen eine strukturgebende und physikalische Umgebung dar, in der grundlegende zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Wachstum und Migration ermöglicht werden. Mechanische Gewebeeigenschaften wie Stabilität und Elastizität, die eng mit der Gewebefunktion verknüpft sind, werden durch die zelltypspezifische Struktur der ECM bestimmt (CHAN und LEONG, 2008). Die ECM füllt jedoch nicht nur den Raum zwischen den Zellen, sondern enthält auch wichtige Informationen für die Steuerung des Zellverhaltens, die in diesem Kapitel kurz erläutert werden.

Bindegewebe enthalten einen besonders hohen Anteil an ECM. Innerhalb verschiedener Bindegewebetypen kann sich die Zusammensetzung und Struktur der ECM jedoch deutlich unterscheiden (GELSE et al., 2003). Die Expression von Genen, die an der Synthese von ECM-Molekülen beteiligt sind, erfolgt bei Fibroblasten beispielsweise abhängig von den anatomischen Körperachsen (CHANG et al., 2002; RINN et al., 2006). Die ECM setzt sich im Wesentlichen aus einem komplexen dreidimensionalen Netzwerk, bestehend aus unlöslichen Kollagenfasern, hoch viskosen Proteoglykanen und löslichen Multiadhäsionsproteinen zusammen. Aus struktureller Sicht ist die ECM somit ein Gel, dessen Fasern in einem hydratisierten Netzwerk angeordnet sind. Durch die

unterschiedliche Kombination dieser Komponenten wird die Festigkeit der ECM funktionell den verschiedenen Erfordernissen im Organismus angepasst. Die ECM ist überdies auch eine formbare Umgebung, die während entwicklungsbiologischer, physiologischer und pathologischer dynamischer Gewebeprozesse, wie beispielsweise Morphogenese und Wundheilung, durch Zellen umgebaut werden kann (CHAN und LEONG, 2008).

Neben ihrer mechanisch stützenden Funktion steuert die ECM das Zellverhalten über Signal-vermittelnde Proteine, die die Aktivitäten der angesiedelten Zellen regulieren (HERSEL et al., 2003; MAHESHWARI et al., 2000; MASSIA und HUBBELL, 1991). Die Regulation erfolgt dabei durch Hormone und Wachstumsfaktoren, denen die ECM als Speicher dient oder über sogenannte Multiadhäsionsmatrixproteine. Diese werden von Zellen mittels spezifischer Oberflächenrezeptoren erkannt und steuern somit die Signaltransduktion in der Zelle. Zu diesen gehören Fibronectin, Laminin und Vitronectin, wobei das besonders häufig vorkommende Multiadhäsionsmatrixprotein Fibronectin hier näher beschrieben wird.

1.1.1 Fibronectin

Fibronectin vermittelt eine Vielzahl zellulärer Interaktionen mit der ECM durch strukturelle Verknüpfung von ECM-Proteinen. Zudem spielt es eine bedeutende Rolle bei der Zelladhäsion im Zusammenspiel mit Integrin-Rezeptoren (PANKOV und YAMADA, 2002), die die Signale ins Innere der Zelle weiterleiten und so Zelladhäsion, Migration, Wachstum und Entwicklung steuern (LARSEN et al., 2006). Verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten und Neurone besitzen Oberflächenrezeptoren für Fibronectin. Des Weiteren kann Fibronectin die Aktivierung von Wachstumsfaktoren kontrollieren (FONTANA et al., 2005). Fibronectin findet man in Form von Fibrillen vor allem in Bindeweben und auf Zelloberflächen (zelluläres Fibronectin) sowie gelöst in Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Blut (Plasma-Fibronectin). Gelöstes Fibronectin kann auch ins Gewebe diffundieren und somit in die ECM eingebaut werden (MORETTI et al., 2007).

Fibronectin ist ein großes glycosyliertes Protein, das zumeist als Dimer in Form zweier langer Polypeptidketten vorliegt, die C-terminal über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Ca. 20 verschiedene Spleißvarianten der Fibronektinketten sind beim Menschen bekannt (PANKOV und YAMADA, 2002). Jede Kette ist ca. 130nm lang und 2-3nm dick (ENGEL et al., 1981) und besteht aus 29 Domänen, die durch kurze Spacer voneinander getrennt sind (LEISS et al., 2008). Fibronectin wird von über 11 verschiedenen Integrin-Heterodimeren gebunden (Abb. 1), wobei die Bindung auch über andere Rezeptoren erfolgen kann (SAONCELLA et al., 1999). Vor mehr als 20 Jahren wurde gezeigt, dass die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD-Motiv) in der Fibronektindomäne FN III₁₀

(PIERSCHBACHER und RUOSLAHTI, 1984) als Erkennungsmotiv für $\alpha_5\beta_1$ Integrin dient (PYTELA et al., 1985). Seit der Entdeckung dieses Hauptrezeptors wurde die Bindung weiterer Integrine an das RGD-Motiv entdeckt (HYNES, 2002). Das RGD-Motiv ist hochkonserviert und findet sich auch in anderen Multiadhäsionsmatrixkomplexen. In der Domäne FN III₉, die in direkter Nachbarschaft zur RGD-enthaltenden Domäne liegt, befindet sich eine synergistisch wirkende Sequenz der Aminosäurenfolge PHSRN (AOTA et al., 1994; NAGAI et al., 1991). Sie sorgt für eine optimale Adhäsion des Fibronectinhauptrezeptors, obwohl sie während der Fibronectinbindung nicht mit $\alpha_5\beta_1$ Integrin in direktem Kontakt steht. Die hochaffine Bindung wird daher vermutlich indirekt, möglicherweise durch optimierte Freilegung des RGD-Motives (BARON et al., 1992) oder durch Elektrostatik, vermittelt (TAKAGI et al., 2003). Die Bindung des $\alpha_5\beta_1$ Integrinrezeptors ist jedoch nicht nur auf die Fibronectindomänen FN III₉₊₁₀ beschränkt, sondern findet auch in der N-terminalen Region statt. Neben den Fibronectinmolekülen sind die faserbildenden Kollagene, die im folgenden Kapitel näher beschrieben werden, die häufigsten Proteine der ECM.

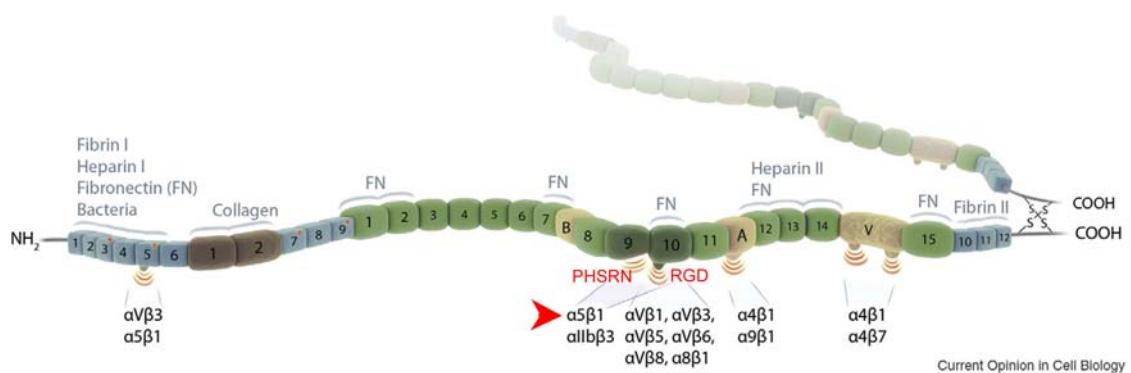


Abb. 1 Strukturmodell des Fibronektins

Modell eines Fibronectin-Dimers. Die beiden Ketten sind carboxy-terminal über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (rechts). Jede Kette besteht aus aneinander gereihten Fibronectin-Domänen, die durch kurze Spacer voneinander getrennt sind. Die drei verschiedenen Typen von Fibronectindomänen sind farblich unterschieden: FN I (blau), FN II (braun), FN III /grün). Die Extradomänen B, A und die variable Region (V) sind ockerfarben dargestellt. Potenzielle Interaktionsbereiche mit anderen Proteinen sind angegeben (blaue Schrift). Für die Zelladhäsion wichtig sind vor allem die beiden synergistisch wirkenden Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Bindestellen in FN III₉₊₁₀ (roter Pfeil). Abbildung aus LEISS et al. (2008).

1.1.2 Kollagen

Die Mitglieder der Kollagenfamilie bilden die Hauptgruppe der unlöslichen Faserproteine. Sie sind die wichtigsten Strukturelemente aller Bindegewebe und vermitteln auch im Zwischengewebe parenchymaler Organe Stabilität und strukturelle Integrität (GELSE et al., 2003). Derzeit sind 28 Kollagen-Subtypen bekannt, die durch 43 Gene kodiert werden

(HEINO, 2007; MULLYHARJU und KIVIRIKKO, 2004). Ursprünglich nahm man an, dass alle Kollagene ausschließlich von Fibroblasten im Bindegewebe sezerniert werden. Heute weiß man, dass auch eine ganze Reihe von Epithelzellen bestimmte Kollagentypen produzieren. Die verschiedenen Kollagene und die von ihnen gebildeten Strukturen dienen insgesamt dem Zweck, einer Überdehnung der Gewebe entgegenzuwirken.

Kollagene bestehen typischerweise aus drei linksgängigen α -Ketten mit sich wiederholenden Glycin-X-Y-Motiven, die je nach Kollagen-Typ identisch (Homotrimere) oder auch verschieden (Heterotrimere) sein können (LEITINGER und HOHENESTER, 2007) und sich zu einer rechtsgängigen Tripelhelix, dem Tropokollagen, umeinander winden (BRODSKY et al., 2008). Die Aminosäure Prolin ist häufig an X-Position zu finden und wird an Y-Position oft hydroxyliert. Die an jeder dritten Position vorkommende kleinste Aminosäure Glycin ermöglicht die dichte Anordnung der Ketten innerhalb der Helix. Hydroxyprolin dagegen verleiht der Helix über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Ketten Stabilität, der genaue molekulare Mechanismus ist noch nicht komplett aufgeklärt (BRODSKY et al., 2005; VITAGLIANO et al., 2001).

Kollagene werden nach Struktur und supramolekularer Organisation in verschiedene Gruppen eingeteilt, die sich durch eine große strukturelle Komplexität, zahlreiche Splice-Varianten, das Auftreten zusätzlicher non-helikaler Domänen sowie in Zusammenbau und Funktion unterscheiden (GELSE et al., 2003). Am weitaus häufigsten verbreitet sind die fibrillenbildenden Kollagene vom Typ I, II, III, V und XI. Grundeinheiten dieser Kollagene sind dreisträngige Helixmoleküle von 300nm Länge und 1.5nm Durchmesser, die ca. 1000 Aminosäuren enthalten und sich zu hoch organisierten supramolekularen Fibrillen mit Durchmessern zwischen 25 und 400nm zusammenlagern. Die einzelnen Kollagenmonomere werden dabei dicht nebeneinander gepackt und um 67nm (sogenannte D-Periodizität) versetzt. Diese schmale Lücke trennt den „Kopf“ eines Monomers vom „Schwanz“ des folgenden (HULMES und MILLER, 1981) und lässt das charakteristische Bänderungsmuster der Kollagenfasern entstehen. Die dichte Packung der Fibrillen wird durch kovalente Bindungen stabilisiert, die zwischen dem N-Terminus des einen Monomers und dem C-Terminus des benachbarten Monomers bestehen (GELSE et al., 2003).

Neben den Kollagenen und dem Fibronectin kommen noch zahlreiche weitere Proteine in der ECM vor. Vitronectin beispielsweise ermöglicht die Zelladhäsion ebenfalls über ein RGD-Motiv und beeinflusst das Zellverhalten ähnlich wie Fibronectin. Ein weiteres ECM-Molekül ist Laminin. Da es kein RGD-Motiv enthält, vermittelt es die Zelladhäsion über eine eigene Gruppe von Integrinrezeptoren. Diese besonders häufig vorkommenden gewebespezifischen Proteine sind in einer dreidimensionalen und weichen ECM

angeordnet. Die Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung der Signale aus der Zellen umgebenden ECM wird im folgenden Kapitel erläutert.

1.2 Mechanosensing und Zytoskelettdynamik

Zellen sind in der Lage, eine Vielzahl verschiedenster Informationen aus der Umgebung wahrzunehmen. Diese Signale werden vorrangig durch die transmembranalen Adhäsionsrezeptoren der Integrinfamilie weitergeleitet (HYNES, 2002). Sehr vereinfacht können die Integrine nach ihrer Ligandenbindung in drei Klassen eingeteilt werden: RGD-Rezeptoren (binden Fibronectin und Vitronektin), Laminin- Rezeptoren und Kollagen-

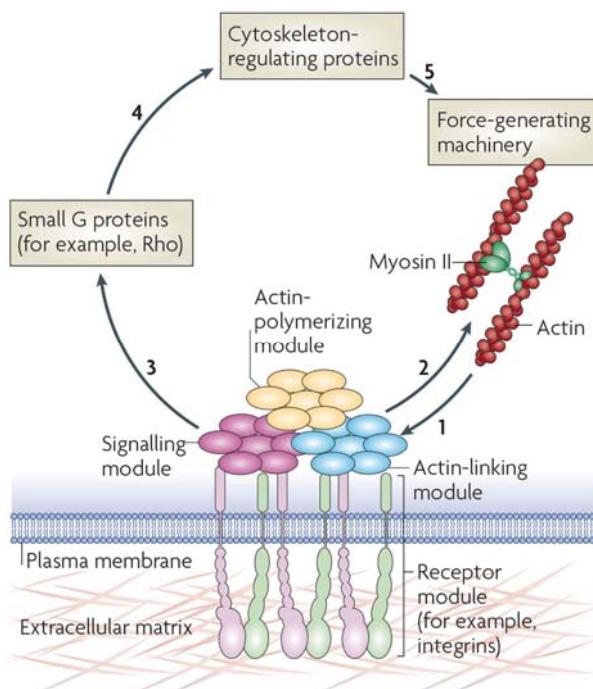


Abb. 2 Interaktion von mechanosensitiven Zellkontakte und Aktinzytoskelett

Schematische Darstellung der Verbindung von Aktomyosinmaschinerie mit Integrin-vermittelten Zellkontakten und entsprechender Rückkopplung. (1) Kräfte, die durch die Aktinpolymerisation und die Myosin-II-abhängige Kontraktilität entstehen, wirken auf mechanosensitive Proteine wie z.B. Talin und Vinculin (Aktin-Linker-Modul), Integrine und deren Corezeptoren (Rezeptor-Modul), Aktinpolymersierungsproteine wie Zyxin und Formin (Aktinpolymerisierungsmodul) sowie signalweiterleitende Moleküle wie FAK (Signalling-Modul). Diese Module interagieren und bilden ein mechanoresponsives Netzwerk aus. (2) Der Effekt auf das Aktinzytoskelett ist abhängig von der integrierten Antwort des gesamten ECM-interagierenden Systems und der angewandten mechanischen Kraft. (3) Stimulation des Signalling-Modules kann zur Aktivierung von GEFs und GTPase aktivierenden Proteinen führen und somit die Aktivität kleiner G-Proteine wie Rac und Rho steuern. (4) Kleine Rho-GTPasen beeinflussen die Aktinpolymerisation und Aktomyosinkontraktilität durch zytoskelettregulierende Proteine, die wiederum (5) Einfluss auf die Kraftentstehung in der Zelle haben. Abbildung aus GEIGER et al. (2009).

Rezeptoren (WIESNER et al., 2005). Integrine sind Heterodimere, die mit ihren extrazellulären Domänen Komponenten der ECM binden, deren kurze zytoplasmatische Domänen jedoch keine katalytische Funktion haben.

Die Signaltransduktion wird daher über eine Reihe nachgeschalteter Adapter- und Effektorproteine vermittelt. Talin (ZHANG et al., 2008) und Kindlin (MONTANEZ et al., 2008) aktivieren beispielsweise die Integrinrezeptoren und verbinden gleichzeitig die zytoplasmatische Domäne von β -Integrin mit den Aktinfilamenten. Die ausgelösten Signalkaskaden beinhalten die Aktivierung von Phosphorylierungs- und Rho-GTPase-vermittelten Signalwegen, die lokale Änderungen in der Zytoskelettdynamik und in der Ausbildung zellmechanischer Kräfte zur Folge haben. Dies wiederum führt zu globalen Änderungen von Zellform und -bewegung und kann langfristige Änderungen in der Transkriptionsregulation, Proliferation, Differenzierung und Apoptose auslösen (GEIGER et al., 2009). Die Interaktionen zwischen dem Aktinzytoskelett und chemo- und mechanosensitiven Zellkontakte sind in Abb. 2 kurz zusammengefasst.

1.2.1 Umwandlung von Kräften in biochemische Signale

Die mechanosensorischen Fähigkeiten von Zellen wurden im vorherigen Kapitel beschrieben. Doch wie werden auf molekularer Ebene Kräfte in biochemische Signale umgewandelt? Einige ausgewählte Proteine, die Teil des physikalischen Netzwerkes sind, das Kräfte bidirektional von außen nach innen und umgekehrt leitet, werden nun hier vorgestellt. Zum Einen können Proteine, durch Zugkräfte vermittelt, entfaltet werden, wie am Beispiel der Fibronektindomäne III₁₀ gezeigt wurde (GAO et al., 2002). Dadurch können Bindestellen freigelegt oder versteckt, der Abstand zwischen Proteindomänen vergrößert oder auch Enzymfunktionen beeinflusst werden (VOGEL und SHEETZ, 2006). Eine andere Möglichkeit ist die Öffnung mechanosensitiver Ionenkanäle. Die Kanalöffnung kann durch die Membranspannung (KUNG, 2005) oder durch kraftvermittelnde Helferproteine erfolgen, die physikalisch mit intra- und/oder extrazellulären Kanaldomänen gekoppelt sind (BAO et al., 2004). Die dritte Möglichkeit ist die Stabilisierung von Rezeptor- und Ligandenbindungen. Die Verbindungen zwischen der ECM und der Zelle werden durch schwache nicht-kovalente Bindungen realisiert, deren stärkste Verbindungen bereits durch einzelne Motorproteine gelöst werden können (MERKEL et al., 1999), wodurch sich hohe Turnover-Raten an der Membran ergeben. Da die Verankerung jedoch nicht über Einzelintegrine, sondern über ganze Cluster erfolgt (BERSHADSKY et al., 2006; RIVELINE et al., 2001; WEHRLE-HALLER und IMHOF, 2002), führen Bindungsbrüche nicht automatisch zur Zellablösung. Diese Cluster wachsen kraftabhängig durch die Rekrutierung neuer Integrine und zusätzlicher Adapter- und Signalmoleküle. Des Weiteren gibt es Mechanismen, Einzelbindungen kraftabhängig in

einen längerlebigen stabilen Zustand zu überführen. Beispiele solcher Adhäsionsmoleküle sind das bakterielle Adhäsin FimH (THOMAS et al., 2002) und L-Selectine (MARSHALL et al., 2003; THOMAS, 2006).

1.2.2 Dynamik und Funktionalität der Aktinfilamente und Mikrotubuli

1.2.2.1 Dynamik der Polymere

Aktinfilamente und Mikrotubuli sind polare Polymere. Aktinfilamente bestehen aus globulären Untereinheiten (G-Aktin), die ATP binden und hydrolysieren können. Mikrotubuli hingegen bestehen aus globulären α/β -Tubulin-Untereinheiten, die GTP binden und hydrolysieren. Die molekulare Polarität beider Filamente resultiert aus der „Kopf an Schwanz“-Polymerisation der jeweiligen Monomere, so dass die Untereinheiten gleich ausgerichtet sind und strukturell zwei verschiedene Enden aufzeigen. Aktinfilamente und Mikrotubuli sind zudem hoch dynamisch. An den Enden beider Polymere ist die Polymerisationsgeschwindigkeit jedoch unterschiedlich (NOGALES, 2000; POLLARD und BORISY, 2003). Diese Unterschiede resultieren aus verschiedenen kritischen Einbaukonzentrationen an beiden Enden. Der Auf- und Abbau beider Filamenten sowie deren Organisation wird zusätzlich durch eine Fülle von Aktinbindeproteinen (engl. actin-binding proteins/ABPs) (WINDER und AYSCOUGH, 2005) bzw. durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine (engl. microtubule-associated proteins/MAPs) (LANSBERGEN und AKHMANOVA, 2006) reguliert. Die Aktivitäten dieser Proteine werden wiederum durch spezifische Signalwege kontrolliert. Der ständige Umbau der Filamente gewährleistet, dass die Zelle flexibel und schnell auf eine veränderte Umgebung reagieren kann.

1.2.2.2 Strukturelle Bedeutung der Aktinfilamente

Mit einem Durchmesser von ca. 7nm stellen F-Aktinfilamente die dünnsten filamentären Strukturen des Zytoskeletts dar und werden daher auch als Mikrofilamente bezeichnet. Die Organisation der Aktinmonomere erfolgt in drei Kategorien: (1) lamellipodiale Netzwerke, (2) filopodiale Aktinbündel und (3) kontraktile Aktinstressfasern (RIDLEY et al., 2003). Da Stressfasern die Hauptvermittler von intrazellulärer Kontraktilität sind, liegt der Schwerpunkt hier auf deren struktureller und funktionaler Bedeutung. Stressfasern wurden schon früh mittels Lichtmikroskopie beschrieben (LEWIS und LEWIS, 1924) und werden nach heutiger Definition als Bündel von 10-30 Aktinfilamenten mit alternierender Polarität bezeichnet (CRAMER et al., 1997). Sie entstehen durch Assemblierung kurzer Aktinbündel in längere und kontraktile Strukturen (HOTULAINEN und LAPPALAINEN, 2006), die in vielen Nicht-Muskelzellen an Adhäsion, Bewegung und Morphogenese beteiligt sind (NAUMANEN et al., 2008). Entgegen der allgemeinen Meinung, dass Stressfasern nur

artifiziell, „innerhalb der Petrischale“, entstehen (BYERS et al., 1984), bilden beispielsweise in Richtung einer Wunde migrierende Fibroblasten *in vivo* Stressfasern aus und differenzieren zu Protomyofibroblasten (HINZ et al., 2001; TOMASEK et al., 2002).

Stressfasern bilden typischerweise ein periodisches α -Aktinin-Myosin-II-Muster aus und ähneln daher trotz ihrer relativen Unordnung sarkomerischen Aktinfilamentstrukturen von Muskelzellen. In Muskelsarkomeren sind die Blöcke gebündelter Aktinfilamente jedoch alternierend mit entgegengesetzter Polarität angeordnet. Während der Kontraktion bewegen sich die Myosinmotoren zum Plusende und schließen die Lücken zwischen den Aktinblöcken. In Nicht-Muskelzellen zeigen zwar einige Stressfasern solch eine alternierende Polarität, manchmal ist die Polarität jedoch auch einheitlich oder zufällig verteilt (CRAMER et al., 1997; SVITKINA et al., 1997). In Fibroblasten gebildete Stressfasern werden nach ihrer subzellulären Lokalisation in drei Klassen eingeteilt: (1) ventrale Stressfasern, (2) dorsale Stressfasern und (3) transverse Bögen (SMALL et al., 1998). Am häufigsten sind ventrale Stressfasern, die an der Zellbasis zwischen Zell-Matrix-Kontakten aufgespannt sind. Diese kontraktile Aktinbündel zeigen oft eine periodische Verteilung von Myosin und α -Aktinin mit alternierender Polarität. Sie sind für das Zurückziehen des Zellhinterandes verantwortlich (CHEN, 1981) und wirken in der Zellperipherie der Membranspannung entgegen (THÉRY et al., 2006). Transverse Bögen sind gebogene Aktinbündel, die ebenfalls eine periodische Verteilung von Myosin und α -Aktinin aufzeigen. Diese Strukturen sind normalerweise nicht in Zell-Matrix-Kontakten verankert (HOTULAINEN und LAPPALAINEN, 2006), werden aber mit Hilfe der dorsalen Stressfasern mit dem Substrat verbunden. Die Kraftübertragung nach Kontraktion ist jedoch noch unklar (PELLEGRIN und MELLOR, 2007). Dorsale Stressfasern sind an einem Ende in Zellkontakte verankert und enden mit dem anderen Ende in einem Aktingeflecht im dorsalen Zellbereich. Im Gegensatz zu ventralen Stressfasern und transversen Bögen sind die α -Aktinin-Myosin-Moleküle hier nicht periodisch verteilt und zeigen eine uniforme Aktinpolarität. Nach der Definition sind sie somit keine echten Stressfasern (NAUMANEN et al., 2008).

Insgesamt ist die periodische Anordnung von α -Aktinin-Myosin-II in Stressfasern sehr variabel. Nach Kontraktionsstimulation mit Calyculin A zeigten Fibroblasten räumlich gradierte Streifenmuster mit verkürzten Sarkomeren in der Peripherie und verlängerten Sarkomeren im Zellzentrum (PETERSON et al., 2004). Die zentralen Regionen scheinen somit weniger kontraktile zu sein und einen geringeren Widerstand gegen Verlängerung aufzuzeigen. Stressfasern zeigen im Gegensatz zu Muskelzellen typischerweise auch keine wiederholten Kontraktionen und Relaxationen in kurzer Zeit. Stattdessen scheinen sie kontinuierlich zu kontrahieren und gelegentlich zu relaxieren (NAUMANEN et al., 2008).

Die kontinuierliche Kontraktion vor allem der ventralen Stressfasern ist mit der Adhäsionsstärke im Gleichgewicht. Diese „stabilen“ Aktinbündel erhalten somit unter Spannung eine relativ konstante Länge aufrecht (GOFFIN et al., 2006). Die intrazelluläre Anpassung an mechanische Änderungen in der Zellumgebung wird durch die Bündelung von F-Aktin realisiert. Neben der Erhöhung der Kontraktilität kann somit auch die Verbiegesteifigkeit der Aktinfilamente durch Aktinbindeproteine dynamisch reguliert werden (CLAESSENS et al., 2006).

1.2.2.3 Strukturelle Bedeutung der Mikrotubuli

Mikrotubuli sind zylindrisch angeordnete, im Inneren hohle Biopolymere mit einem Durchmesser von 24nm. Sie bestehen aus globulären α/β -Tubulin-Untereinheiten, die zu Protofilamenten angeordnet sind. Alle Protofilamente verlaufen parallel zur Längsachse und besitzen die gleiche α/β -Ausrichtung. Während der Zellteilung sind Mikrotubuli im mitotischen Spindelapparat organisiert und bilden während der Interphase ein Gerüst für intrazellulären Stofftransport und Zellpolarisierung (LANSBERGEN und AKHMANOVA, 2006). Die Länge der Mikrotubuli kann zwischen Bruchteilen eines Mikrometers und mehreren hundert Mikrometern liegen (GITTES et al., 1993). Die strukturelle Bedeutung der Mikrotubuli wird kontrovers diskutiert. Mikrotubuli sind mit 28nm die dicksten zytoskelettalen Biopolymere, deren Verbiegesteifigkeit die von Aktinfilamenten um das 100fache übersteigt (GITTES et al., 1993). Mikrotubuli sind jedoch nicht nur relativ stabil im Vergleich zu anderen Zytoskelettfilamenten, sondern auch nachgiebig, wodurch sie die Zelle problemlos auch bei Hindernissen in alle Richtungen nach Bindepartnern durchsuchen können, ohne abzubrechen. Diese Kombination aus Steifigkeit und Elastizität ist in der anisotropischen molekularen Architektur begründet. Strukturaufklärung und theoretische Kalkulationen zeigen, dass sich die lateralen und longitudinalen Interaktionen unterscheiden (DRABIK et al., 2007; WANG und NOGALES, 2005). Laterale Inter-Protofilament-Wechselwirkungen (α - α , β - β) beruhen meist auf schwachen elektrostatischen Bindungen, longitudinale Intra-Protofilamente (α - β , α - β) interagieren dagegen häufig hydrophob mit stärkeren Bindungen (SEPT et al., 2003). Daher unterscheidet sich das elastische Modul längs und quer der Mikrotubuli dramatisch und führt zu mechanischer Anisotropie. Viele biologische Materialien wie beispielsweise Knochen, Holz und Bambusrohre sind mechanisch anisotropisch, wobei die Längsachse am stabilsten ist (PAMPALONI und FLORIN, 2008).

Die Steifigkeit der Mikrotubuli nimmt mit der Konturlänge zu (KIS et al., 2002; PAMPALONI et al., 2006). Dabei zeigen kurze Mikrotubuli eine kleine Persistenzlänge (Richtungsänderungen der Filamentkontur), längere Mikrotubuli weisen dagegen eine deutlich größere Persistenzlänge auf (TAUTE et al., 2008). Die elastischen Eigenschaften

resultieren aus den schwachen Inter-Protofilament-Wechselwirkungen, die die Deformationen erleichtern. Mikrotubuli können somit elastisch ohne Brüche mit kleinen Krümmungsradien verbogen werden (CHRETIEN et al., 1998; ODDE et al., 1999). Neben der ohnehin strukturbedingten Stabilität können die Mikrotubuli-Filamente zusätzlich durch MAPs (engl. microtubule-associated proteins) zu stabileren, geordneten Bündeln organisiert werden (NOGALES, 2000). Je nach Verknüpfungsgrad kann die Verbiegsteifigkeit zwischen einzelnen Filamenten stark variieren und erlaubt so die Feinregulation der mechanischen Filamenteigenschaften (PAMPALONI und FLORIN, 2008). Die Zellform wird nach der Tensegrity-Modellvorstellung durch das Zusammenspiel der beschriebenen Zytoskelettkomponenten realisiert. Die Prinzipien des Tensegrity-Modells werden im folgenden Kapitel erläutert.

1.2.3 Tensegrity-Modell

Das sogenannte Tensegrity-Modell ist ein bekanntes Zellmodell zur Erklärung von Form und Zellmechanik (GALLI et al., 2005). Tensegrity ist ein zusammengesetztes englisches Wort aus *tension* (Spannung) und *integrity* (Zusammenhalt), das in der Mitte des 20. Jahrhunderts geprägt wurde. Der Begriff dient ursprünglich der Beschreibung eines architektonischen Tragwerksystems von BUCKMINSTER FULLER und SNELSON, dessen Prinzipien zu Beginn der 1990 Jahre auf die zelluläre Ebene übertragen wurden (INGBER, 1993).

Nach dem Tensegrity-Modell wird die Zellform durch ein Ausbalancieren mechanischer Kräfte zwischen dem kontraktilen Zytoskelett sowie zytoskelettalen Stützstreben und adhäsiven Verankerungswiderständen bestimmt. Dem aufgrund kontraktiler Aktomyosin-Filamente einwärts gerichteten Zug wirken (1) Intermediärfilamente und Mikrotubuli im Inneren der Zelle und (2) die Verankerung mit der äußeren ECM oder anderen Zellen entgegen. Die Filamente des Zytoskeletts üben dabei duale Funktionen aus. Aktinfilamente können einerseits in Assoziation mit Myosin spannungserzeugende kontraktile Mikrofilamente bilden (Stressfasern) oder sich andererseits in Form flexibler Netzwerke oder quervernetzter Bündel (Filopodien) mit höherer Steifigkeit zusammenlagern (INGBER, 2003). Integrine dienen als Vermittler zwischen der ECM und dem Zytoskelett. Wird auf die Integrine Zug ausgeübt, können globale Neuanordnungen von Filamenten, Organellenbewegungen oder Änderungen der Kernform erfolgen (HU et al., 2003; MANIOTIS et al., 1997). Eine zentrale Rolle in diesem mechanoregulatorischen Mechanismus nehmen die kleinen Rho-GTPasen ein (RIDLEY, 2001), deren bedeutendste Rho-Effektoren die Mitglieder der ROCK-Familie und mDia sind. Sie erhöhen die intrazelluläre Kontraktilität durch Phosphorylierung der MLC und Stimulation der

Aktinpolymerisation (RIVELINE et al., 2001; WATANABE et al., 1999) und modulieren somit wiederum die Struktur und Funktionalität des Zytoskeletts.

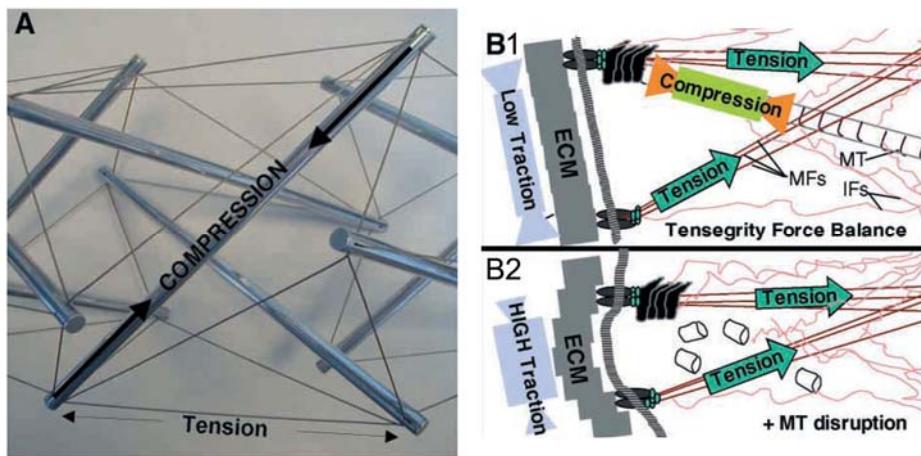


Abb. 3 Tensegrity-Modell

A) Vergrößerung einer Snelson-Skulptur. Das räumliche Gebilde stabilisiert sich durch Spannung und Druck selbst. Starre Elemente (meist Stäbe oder massive 3D-Körper) sind untereinander mit Zugelementen (meist vorgespannte Seile oder sehr dünne Stäbe) verbunden. Die starren Elemente berühren sich nicht. **B1)** Schematische Darstellung des Ausbalancierens von Kräften zwischen gespannten Aktinfilamenten (eng. microfilaments/MFs) und Intermediärfilamenten (IFs) sowie komprimierten Mikrotubuli (MT) und der ECM in einer Region eines zellulären Tensegrity-Bereichs. **B2)** Die kompressiven Kräfte der Mikrotubuli werden nach deren Inhibition auf die Zell-Matrix-Kontakte übertragen, wodurch das Substrat verstärkt gezogen wird. Abbildung aus INGBER et al. (2003).

1.3 Form und Funktion durch mechanische Spannung

Lebende Zellen sind eng mit der ECM verschiedener Bindegewebe verknüpft (Kap.1.1). In den letzten Jahren wurde mehr als deutlich, dass die Fähigkeit der Zellen zur Aufnahme und Weiterleitung von extrazellulären Informationen weit über die simple Detektion biochemischer Liganden hinaus geht (GEIGER et al., 2009) und eine Fülle physikalischer Signale, wie die räumliche Verteilung der Liganden, die Dreidimensionalität der Matrix sowie die Flexibilität der Umgebung umfasst. All diese Signale bestimmen eindeutig die Form der Zellen, wie zahlreiche Beispiele in diesem Kapitel klar demonstrieren werden. Die resultierende Form wiederum kann mannigfaltige Funktionen regulieren. Doch wie genau Zellen die Änderungen in der Zellform in molekulare Signale übertragen, die letztlich die Zellfunktion bestimmen, ist noch nicht vollständig verstanden. Eine große Rolle bei der mechanoregulatorischen Vermittlung von Zellfunktionen (Abb. 2) durch Form spielt die Erzeugung intrazellulärer Spannung bzw. Kontraktilität. Wie bereits mehrfach

erwähnt, nehmen die kleinen Rho-GTPasen dabei sicher eine Schlüsselrolle ein (NOBES und HALL, 1999). Infolge der spannungsvermittelten Signaltransduktion durch Rho-GTPasen können globale Änderungen von Zellform und -bewegung ausgelöst werden. Langfristige Modifikationen in der Proteinexpression sowie auf der Ebene der posttranslationalen Modifikation, ebenso wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose können so kontrolliert werden (WELLS, 2008). Des Weiteren spielen wahrscheinlich auch die Wahrnehmung der Membrankrümmung mit der Freisetzung von GTPasen (VOGEL und SHEETZ, 2006) und das Integrinclustering bzw. die Abstände der adhäisionsvermittelnden Liganden (MASSIA und HUBBELL, 1991) eine tragende Rolle. Doch unabhängig vom auslösenden Signal und dessen Verarbeitung folgt immer eine Änderung des intrazellulären Spannungszustandes.

1.3.1 Einfluss der Geometrie und Topographie

Die geometrische Verteilung adhäser Signale hat einen großen Einfluss auf die Zellform und reguliert somit wichtige Zelfunktionen (LIU und CHEN, 2007). Die systematische Untersuchung der Rolle solcher Substratgeometrien wurde durch die Etablierung von Mikrostrukturierungstechniken ermöglicht, mit denen die Präsentation von ECM-Liganden kontrolliert werden kann. Die Kultivierung epithelialer Zellen auf solchen distinkt angeordneten adhäsen Bereichen zeigte, dass die Größe der Spreadingfläche das Umschalten der zellulären Antwort von Proliferation zu Apoptose reguliert (CHEN et al., 1997). Ähnliche Experimente späterer Studien belegten, dass sich anhand der Zellform lokal die Ausbildung von Lamellipodien (JIANG et al., 2005; PARKER et al., 2002) und Zellkontakte (CHEN et al., 2003) vorhersagen lässt. Mittels mikrostrukturierter Substrate wurde ebenfalls gezeigt, dass die Zellgeometrie die polarisierte Orientierung der mitotischen Spindel definiert (THÉRY et al., 2005). Neben Proliferation, Adhäsion und Migrationsrichtung wird auch die Zelldifferenzierung durch die Geometrie bzw. Zellform bestimmt. Humane mesenchymale Stammzellen differenzieren bei kleiner Spreadingfläche zu Adipozyten, bei großer Spreadingfläche zu Osteoblasten (MCBEATH et al., 2004). Das wechselseitige Verhältnis von „Form und Funktion“ gilt interesserweise nicht nur für Einzelzellen, sondern auch für Zellverbände bzw. Gewebe. Die lokalisierte Proliferation einer Population endothelialer Zellen, deren Wachstum auf adhäse Bereiche beschränkt ist, wird ebenfalls durch die Geometrie des Substrates beeinflusst. Die Zellproliferation nimmt dabei an den Randbereichen und in den Ecken des Monolayers zu (NELSON et al., 2005). Anhand theoretischer Modellierung wurde gezeigt, dass die Proliferation im Gewebe wahrscheinlich durch ein mechanisches Feedback gesteuert wird (SHRAIMAN, 2005). Ein anderes Beispiel für geometrisch induzierte Morphogenese ist die Ausbildung von Myofibrillen bei Kardiomyozyten in Abhängigkeit

von der Form des adhäsiven Substrates (GEISSE et al., 2009; PARKER et al., 2008). Neben der Anordnung von Mikrostrukturen hat auch die Nanotopographie bzw. der Grad ihrer Unordnung einen Einfluss auf das Auslösen spezifischer Zellantworten. Beispielsweise differenzieren humane mesenchymale Stammzellen in Abhängigkeit von der Unordnung des unterliegenden Nanomusters zu einem osteogenen Phänotyp (DALBY et al., 2007). Ungeordnete Nanostrukturen vermitteln gegenüber geordneten Mustern auch eine verbesserte Adhäsion von Osteoblasten, obwohl die Ligandenabstände teilweise >70nm betragen (HUANG et al., 2009).

Alle Beispiele zeigen klar, dass durch Form mannigfaltige Funktionen reguliert werden. Die Übertragung der Information über die Form in molekulare Signale wird sehr wahrscheinlich mechanoregulatorisch durch die kleinen Rho-GTPasen vermittelt, deren Downstream-Effektoren zahlreiche Zellprozesse steuern (RIDLEY, 2001). Dies wiederum führt zu globalen Änderungen von Zellform und -bewegung und kann langfristige Modifikationen in der Transkriptionsregulation, Proliferation, Differenzierung und Apoptose bewirken.

1.3.2 Einfluss der Flexibilität

Die Steifigkeit der Matrix (definiert als Deformationswiderstand) ist ein weiterer wichtiger Parameter, der das Zellverhalten steuert (WELLS, 2008). Während der Zelladhäsion ziehen Zellen durch das Aktomyosinzytoskelett am Substrat und reagieren auf Widerstand mit der Erhöhung der ausgeübten Zugkraft. Dabei bilden Zellen auf härteren Substraten ein steiferes und organisiertes Zytoskelett mit stabileren Zellkontakte aus (DISCHER et al., 2005). Die Steifigkeit der Matrix wird durch den Young-Modul E ($\text{Pa} = \text{N/m}^2$) angegeben und variiert innerhalb verschiedener Gewebe dramatisch (LEVENTAL et al., 2007). Vergleicht man die Steifigkeiten der Gewebe (Bereich kPa-MPa) mit Plastikpetrischalen (~2GPa) wird deutlich, dass die meisten Zellkultivierungsexperimente in einer mechanisch ausgesprochen unphysiologischen Umgebung durchgeführt werden. Moderne Alternativen bieten flexible natürliche oder synthetische Hydrogele (Kap. 1.4.1.5). Wenn auch zweidimensionale Substrate „unphysiologischer“ als 3D-Matrizes sind, bieten sie dennoch die Möglichkeit, gezielt den Einfluss der Flexibilität zu untersuchen.

Die Kultivierung von Epithelzellen und Fibroblasten auf Polyacrylamidgelen variabler Steifigkeit demonstrierte, dass die intrazelluläre Organisation von der Härte der ECM abhängig ist. Auf flexiblen Substraten zeigte sich ein reduziertes Spreading bei erhöhter Motilität und gesteigerter lamellipodialer Aktivität sowie verringrigerter Ausbildung von Stressfasern und verringrigerter Phosphorylierung in Zellkontakten (PELHAM und WANG,

1997). Ein ähnliches Zellverhalten wurde auch auf Substraten mit Kollagenfibrillen, die durch Dehydrierung in ihrer Steifigkeit gezielt modifiziert wurden, beobachtet (MCDANIEL et al., 2007). Die Überexpression von Aktin führt dagegen bei glatten Muskelzellen auch auf weichen Substraten zur Ausbildung von Stressfasern (ENGLER et al., 2004a). Neben essentiellen Zelfunktionen wie Adhäsion, Migration und Proliferation wird auch die Differenzierung von Stammzellen durch die Substratflexibilität reguliert. Mesenchymale Stammzellen können einzig durch die Steifigkeit der Umgebung in einen neurogenen, myogenen oder osteogenen Phänotyp differenzieren (ENGLER et al., 2006). Auch die Myofibrillogenese ist von einer definierten mittleren Substratsteifigkeit abhängig (ENGLER et al., 2004b). Nach Inhibition der Myosin-II-vermittelten intrazellulären Kontraktilität wird jedoch die Fähigkeit zur elastizitätsabhängigen Stammzelldifferenzierung unterbunden (ENGLER et al., 2006). Die Zellantworten hängen somit von der Fähigkeit der Zellen ab, ihre Umgebung durch Rho-gesteuerte Aktomyosinkontraktion zu verformen und die mechanische Antwort in ein biochemisches Signal umzuwandeln (DISCHER et al., 2005).

Die Steifigkeit der Matrix beeinflusst gemeinsam mit der Art und Anzahl präsentierter Liganden die Umgebung einer Zelle und bestimmt somit, inwieweit sie durch Zellen verformt werden kann (GRINNELL et al., 1999) bzw. wie leicht Zellen innerhalb der Matrix migrieren können (LO et al., 2000; PEYTON und PUTNAM, 2005). Je nach Substratsteifigkeit bilden Zellen intrazelluläre Spannungen aus, wodurch die Organisation des Zytoskeletts und damit einhergehend weitere Zelfunktionen, wie Proteinexpression und posttranskriptionale Modifikationen, beeinflusst werden (WELLS, 2008).

1.3.3 Einfluss der Dreidimensionalität

Gewebe und Organe sind dreidimensional, dennoch basieren die meisten zellbiologischen Kenntnisse auf zweidimensionalen Zellkulturstudien (PEDERSEN und SWARTZ, 2005). Erste morphologische Unterschiede zwischen Zellen auf flachen Substraten und in einer dreidimensionalen ECM wurden bereits in den frühen 70er Jahren deutlich (ELSDALE und BARD, 1972). In flexiblen, von Zellen sezernierten 3D-Matrizes, sind vielfältige Zellmorphologien von abgeflacht, spindelförmig, sternförmig bis dendritisch beschrieben worden (CUKIERMAN et al., 2001). Die Form der Zelle variiert in 3D-Gelen mit der Anzahl kontrahierender Zellen und der Zugabe kontraktilitätsfördernder Wachstumsfaktoren. In relaxierten Gelen mit geringer Zelldichte bilden sich vorwiegend dendritische Fibroblastenphänotypen aus. In kontrahierten Gelen mit hoher Zellzahl ist die Morphologie sternförmig oder bipolar (TAMARIZ und GRINNELL, 2002) mit prominenten Stressfasern (FRINGER und GRINNELL, 2001). Neben der Zellmorphologie sind auch fibroblastische Zell-Matrix-Adhäsionen von der Art und Dreidimensionalität der Matrix abhängig. Sogenannte „3D-Zelladhäsionen“ wurden in mechanisch weichen 3D-Matrizes, bestehend aus

verschiedenen ECM-Proteinen, beschrieben. Diese 3D-Kontakte sind länger als fokale oder fibrillare Adhäsionen in einer 3D-Einzelkomponentenmatrix oder auf 2D-Substraten und zeigen als einzige Kontakte eine Kolokalisation von Paxillin, Vinculin, FAK, Phospho-Tyrosin, α -Aktinin, β_1 -Integrin und α_5 -Integrin bei gleichzeitigem Fehlen von Phospho-FAK (CUKIERMAN et al., 2001). Eine niedrigere Rac-Aktivität mit reduzierten peripheren Lamellipodien führt in 3D-Matrizes zu gerichteter (PANKOV et al., 2005) und verstärkter Zellmigration (CUKIERMAN et al., 2001). Zellen in 3D-Matrizes proliferieren zudem stärker (CUKIERMAN et al., 2001) und unterscheiden sich in ihrem Genexpressionsmuster von Zellen auf 2D-Substraten (GHOSH et al., 2005). In Kombination mit Wachstumsfaktoren ist die Zelldifferenzierung in 3D-Hydrogelen im Vergleich zu 2D-Substraten gesteigert (HWANG et al., 2006). In 3D-Netzwerken ist ebenfalls die Fibrillogenese im Vergleich zu 2D-Substraten ohne exogene Stimulation verstärkt und liefert Hinweise, dass die Integrin-Aktivität in 3D-Substraten erhöht ist (MAO und SCHWARZBAUER, 2005). Der Mechanismus, wie Zellen die Dreidimensionalität des Substrates messen, infolgedessen sie veränderte Adhäsionen und Morphologien ausbilden, ist noch unklar. Eine Möglichkeit ist, dass Zellen global alle Faktoren ringsum ihre Oberfläche integrieren und somit die räumliche Organisation der aktiven Adhäsionen erfahren. Denkbar wäre auch, dass die Ausbildung dieser 3D-Matrix-Adhäsionen nur aufgrund einer bestimmten molekularen Substratzusammensetzung mit definierter Flexibilität ausgebildet werden (PEDERSEN und SWARTZ, 2005). Wird die Flexibilität der von Zellen erhaltenen 3D-Matrizes durch Fixierung und Quervernetzung herabgesetzt, verschwinden diese 3D-Adhäsionen (CUKIERMAN et al., 2001). Mechanische Signale könnten daher auch hier die wichtigste Informationsquelle über die umgebende Dreidimensionalität der Matrix sein.

Die in den letzten Jahren gewachsene Erkenntnis über die enorme Bedeutung der Dreidimensionalität ließ eine Vielzahl von Herstellungstechniken entstehen, von denen die am häufigsten verwendeten im nachfolgenden Kapitel vorgestellt werden.

1.4 Techniken zur Herstellung Dreidimensionaler Substrate

Motiviert durch die Notwendigkeit mit Zellmodellen zu arbeiten, die funktional lebendem Gewebe entsprechen, geht seit Jahren der Trend weg vom Monolayer im „Petrischalen-Experiment“ hin zur 3D-Zellkultur - der Geburtsstunde des „Tissue Engineering“ (LANGER und VACANTI, 1993; VACANTI und LANGER, 1999). Seitdem wurden zahlreiche neue Methoden zur dreidimensionalen Zell- bzw. Gewebekultivierung entwickelt, um zelluläres Wachstum, Organisation und Entwicklung zu realisieren. Ursprünglich gedacht für klinische Anwendungen zum therapeutischen Gewebeersatz (LYSAGHT und HAZLEHURST,

2004), werden heute vor allem Studien grundlegender zellulärer physiologischer und pathophysiologischer Prozessen am *in vitro* Modell angestrebt. Somit könnte durch Grundlagenforschung und durch die Entwicklung präventiver Therapien, durch beispielsweise Medikamenten-Screenings, allgemein der Bedarf an Transplantationen verringert werden (GRIFFITH und SWARTZ, 2006).

Im diesem Kapitel wird eine kurze Übersicht aktueller 3D-Substrate und deren Herstellung gegeben. Im ersten Teil werden sogenannte klassische Methoden wie Untersuchungen am Tiermodell, die Ausbildung zellulärer Sphäroide, der Einsatz von Microcarriern und anderer konventioneller Gerüste wie beispielsweise Gele und poröse Schwämme beschrieben. Schwerpunkte im zweiten Teil sind die neueren Methoden der „Festen Freiformflächen-Herstellung“ (engl. solid freeform fabrication/SFF) zur Ausbildung frei schreibbarer dreidimensionaler Substrate.

1.4.1 Konventionelle Herstellungsverfahren zur 3D-Zellkultivierung

1.4.1.1 Tier- und Organmodelle

Eine Möglichkeit der dreidimensionalen Zellkultur ist die Kultivierung von Zellen direkt in embryonalen als auch in adulten tierischen Organismen, in Organen oder in Geweben (SACHLOS und CZERNUSZKA, 2003). Etablierte *in vitro* Modellorganismen sind beispielsweise *Drosophila*, *Medaka*, Zebrafisch oder Maus. Experimente mit Mäusen erfordern dabei aufgrund der erforderlichen Temperatur- und Sauerstoffkontrolle einen weit größeren Aufwand, um das Überleben während des Experiments zu gewährleisten. Imaging-Methoden für solche Mausmodelle sind bereits etabliert (HADJANTONAKIS et al., 2003). Neben den genannten Tiermodellen können Zellen auch in Schnitten von Organ-Explantaten kultiviert werden. Diese werden auf semiporöse Membranen gelegt oder im 3D-Kollagengel eingebettet (TODA et al., 2002). Vorteile der Organschnitte liegen im Erhalt der Zytoarchitektur und der Differenzierung des Originalgewebes. Nachteilig wirken sich dagegen die enorme Komplexität der 3D-Umgebung und die Heterogenität zwischen den tierischen Individuen und der damit verbundenen geringe Transparenz aus. Darüber hinaus können Tiermodelle nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden, da medikamentöse Nebenwirkungen beim Menschen anhand von Tiermodellen nicht immer vorausgesagt werden können (SIVARAMAN et al., 2005) und einige Pathogene beispielsweise speziesabhängig sind. Vereinfachte und stark reduzierte *in vitro* 3D-Modelle sind daher gefordert, um den Bogen zwischen Tiermodellen und humanen Klinikstudien zu spannen (GRIFFITH und SWARTZ, 2006).

1.4.1.2 Filtereinsätze und poröse Membranen

In den 1950er Jahren wurden Filter erstmalig zur Zellseparation von embryonalem Mausgewebe eingesetzt (GROBSTEIN, 1953). Sie ermöglichen die Anordnung von Filtermembranen in allen denkbaren Kulturgefäßen mit variabler Beschichtung und Porengröße und können so an unterschiedliche Anforderungen angepasst werden. Die Hauptanwendung besteht heute in der Kultivierung polarisierter epithelialer Zellkulturen (JUSTICE et al., 2009; PAMPALONI et al., 2007) durch die Erzeugung von oberen und unteren Kompartimenten. So wurde gezeigt, dass die epitheliale Differenzierung aufgrund der Polarisation gegenüber dem einfachen Monolayer verbessert ist (HANDLER et al., 1984). Filtereinsätze bieten zudem die Möglichkeit, beide Oberflächen des Monolayers zu untersuchen und somit transepithelialen Transport (MATLIN und SIMONS, 1984) als auch Mechanismen der Tumorinvasion (LU et al., 2001) zu analysieren.

1.4.1.3 Zelluläre Sphäroide

Zelluläre Sphäroide sind einfache dreidimensionale Systeme, die die Eigenschaft vieler Zelltypen zur Aggregation nutzen. Sie werden oft als Tumormodelle eingesetzt (BATES et al., 2000; SANTINI und RAINALDI, 1999). Die Zellen lagern sich in Einzel- oder Cokulturen (entsprechend mono- oder multizellulare Sphäroide) mit einem Durchmesser von mehreren hundert Mikrometer zusammen, beginnen zu polarisieren und zu differenzieren. Der große Vorteil dieser Technik ist, dass keine externen Gerüste benötigt werden. Nachteilig wirken sich jedoch der erschwerete Austausch von Gasen und Nährstoffen aufgrund der enormen Größe der Zellaggregate aus (GRIFFITH und SWARTZ, 2006). Die Herstellung der Sphäroide beruht auf der Grundlage der Gravität mit nachfolgender Zellaggregation beispielsweise durch die Technik des „hängenden Tropfens“ (KELM et al., 2003; TIMMINS und NIELSEN, 2007) oder durch die Kultivierung in einem rotierende Kulturgefäß (CASTANEDA und KINNE, 2000). Zelluläre Sphäroide wurden bereits erfolgreich bei therapeutisch-klinischen Studien (MUELLER-KLIESER, 1997; SUTHERLAND, 1988), in der Biotechnologie (KALE et al., 2000) oder bei High-Throughput-Analysen (IVASCU und KUBBIES, 2006; ZHANG et al., 2005) eingesetzt.

1.4.1.4 Microcarrier

Microcarrier wurden Mitte der 1960er Jahre zur Massenproduktion viraler Vaccine und biologischer Zellprodukte durch mammatische Zellen eingeführt (VAN WEZEL, 1967). Diese Zellgerüste sind kleine kugelförmige Gebilde, bestehend aus Dextran, Glas, Gelatine, Polystyren oder anderen porösen Polymeren mit einem Durchmesser zwischen 100-400µm (MALDA und FRONDOZA, 2006). Die Zelladhäsion hängt von der Beschichtung mit ECM-Proteinen, der Oberflächentopographie, Porosität und Dichte der Microcarrier in der

Suspension ab. Ursprünglich wurden Microcarrier für die Kultivierung großer Zellzahlen bei gleichzeitig minimalem Mediumeinsatz und verbesserter Wachstumskontrolle eingesetzt, da sie eine große Oberfläche für das Monolayerwachstum in homogener Suspensionszellkultur bereitstellen. Ein Gramm Microcarrier bietet beispielsweise eine Wachstumsoberfläche, vergleichbar mit 15 x 75cm²-Zellkulturflaschen (MALDA und FRONDOZA, 2006). Microcarrier wurden bereits erfolgreich als Implantationsgerüste für mesenchymale Stammzellen eingesetzt (YANG et al., 2007) und sind mit verschiedenen Beschichtungen kommerziell erhältlich.

1.4.1.5 Dreidimensionale Netzwerke/Gele

Grundsätzlich können zur Ausbildung von ECM-Gelen natürliche als auch synthetische Materialien eingesetzt werden. Natürliche ECM-Bestandteile werden entweder aus Tieren oder kultivierten Zellen extrahiert und können in Form von Einzelkomponenten (Kollagen, Fibrin, Elastin und anderen Glycoproteinen) oder deren Gemischen eingesetzt werden. Komplexere ECM-Matrizes werden zum Einen direkt aus Geweben gewonnen oder von Zellen sekretiert. Eine Vielzahl von Dezellularisierungstechniken, basierend auf physikalischen, chemischen und enzymatischen Methoden sind etabliert (BADYLAK, 2004; GILBERT et al., 2006). Grundsätzlich werden dabei die Zellmembranen lysiert, zelluläre Komponenten durch Enzyme entfernt und anschließend mit Detergenzien ausgewaschen. Die Befreiung der Matrix von zellulären Antigenen erfolgt bei gleichzeitigem Erhalt der ECM-Komponenten und, damit verbunden, dem Erhalt von mechanischen und biologischen *in vivo* Eigenschaften (CHAN und LEONG, 2008). Zum Teil unvollständige entfernte Zellreste führen jedoch oft zu inhomogener Zellverteilung. Die andere Möglichkeit zur Gewinnung von ECM-Gerüsten besteht in der Sekretion zelleigener Matrix. Zellen werden bis zur Konfluenz auf thermo-responsiven Polymeren kultiviert. Die Zellen können anschließend thermisch reguliert abgelöst werden, wodurch eine enzymatische Behandlung entfällt (OKANO et al., 1993; TAKEZAWA et al., 1990). Durch Wiederholung von Kultivierung, Sekretion und Ablösung können dickere Matrices hergestellt werden. Da pro Durchgang lediglich Schichtdicken bis 30µm erzielt werden, ist die maximal zu erzielende Schichtdicke stark eingeschränkt (CHAN und LEONG, 2008).

Natürliche Gele sind zwar insgesamt leicht zugänglich, die Herstellung ist jedoch quantitativ schwierig zu kontrollieren, so dass häufig Schwankungen in der Zusammensetzung und den mechanischen Eigenschaften auftreten. Spezifische Effekte einzelner Faktoren sind infolge dessen oft nicht isolierbar (PASZEK et al., 2005). Der Anteil unerwünschter oder gar unbekannter löslicher Komponenten ist starken Schwankungen unterworfen und verhindert so die Beständigkeit und Reproduktion der Experimente (PAMPALONI et al., 2007). Alternativen bieten synthetische Polymere, die reproduzierbar

hergestellt werden können (LUTOLF und HUBBELL, 2005). Synthetische biodegradable Polymere besitzen die Eigenschaft, sich während der Kultur mit Zellen oder nach der Implantation aufzulösen und dabei durch neugebildete gewebespezifische ECM ersetzt zu werden. Häufig angewendete Scaffoldmaterialien sind Homo- und Heteropolymere aus Poly-Glycolat (PGA), Poly-(L)-Lactat (PLLA) und Poly-Lactat-Co-Glycolat (PLGA). Diese aliphatischen Polyester gehören zu den Poly- α -Hydroxsäuren, lassen sich bakteriell herstellen und werden hydrolytisch abgebaut (GRIFFITH, 2000). Synthetische Biomaterialien vermitteln jedoch trotz besserer Kontrolle der physikalischen und mechanischen Eigenschaften die Adhäsion und das Wachstum von Zellen weniger gut als natürliche Polymere (CHAN und LEONG, 2008). Die Herstellungsprozesse sind zudem oft kompliziert und toxische Nebenprodukte erschweren das Überleben der Zellen (DRURY und MOONEY, 2003).

Alternativen bietet der Einsatz einer Fülle an Hydrogelen, bestehend aus Wasser und wasserunlöslichen Polymeren. Der dreidimensionale Vernetzungsgrad wird durch die chemischen (kovalente oder ionische) oder physikalischen (Verschlaufen der Polymerketten) Bindungen zwischen den Polymerketten bestimmt (DRURY und MOONEY, 2003). Vorteile der Hydrogele liegen in der Biodegradierbarkeit, der einfachen Herstellbarkeit sowie der gewebeähnlichen mechanischen Eigenschaften. Natürliche Hydrogele sind beispielsweise Kollagene, Hyaluronate, Fibrine, Alginate, Agarose und Chitosane. Synthetische Hydrogele bestehen aus Polythylenoxid/PEO, Polyvinylalkohol/PVA oder Polyacrylsäure/PAA und Polypeptiden (LEE und MOONEY, 2001). PEO ist eins der am häufigsten eingesetzten synthetischen Hydrogelpolymere und besteht wie das chemisch ähnliche Polyethylenglycol/PEG aus hydrophilen Polymeren, die nach entsprechender Modifikation photovernetzt werden können (MANN et al., 2001).

1.4.1.6 Poröse Netzwerkgerüste

Poröse Gerüste, die Zellwachstum und Organisation vermitteln, bilden den Hauptanteil beim „Tissue Engineering“. Durch die Poren werden Zellbewegung und der Transport löslicher Moleküle ermöglicht. In der Vergangenheit wurden diese Gerüste vor allem für den therapeutischen *in vivo* Einsatz hergestellt, um lokal das Wachstum von Gewebe zu vermitteln. Dazu können die Gerüste direkt mit Zellen versehen und implantiert, oder erst nach *in vitro* Gewebewachstum transplantiert werden (MUSCHLER et al., 2004; STOCK und VACANTI, 2001). Die ersten biodegradierbaren schwammartigen Strukturen wurden in den späten 1980er Jahren entwickelt und bestanden aus gefriergetrockneten und vernetzten Kollagenen und Glycosaminoglykanen (YANNAS et al., 1989). Gerüste mit Porengrößen zwischen zehn und mehreren Hundert Mikrometern sind seriell herstellbar. Abbaubare Polyester-Fasern, angeordnet in dichten Geweben, wurden bereits Anfang der 1980er

Jahre bei chirurgischen Eingriffen als therapeutische Gewebegerüste eingesetzt (STOCK und VACANTI, 2001).

Zahlreiche Methoden zur Herstellung von porösen Strukturen aus synthetischen Polymeren sind etabliert (CHEVALIER et al., 2008). Im Allgemeinen werden feste oder in Lösungsmittel gelöste Materialien mit sogenannten Porogenen versetzt, die gasförmig (Kohlendioxid), flüssig (Wasser) oder fest (Paraffin) sein können. Die Gemische werden aufbereitet, gegossen und die Porogene anschließend durch Techniken wie Sublimation, Evaporation oder Schmelzprozesse entfernt. Nach der Porogenentfernung bleibt ein poröses Gerüst aus PGA oder PLLA übrig (CHAN und LEONG, 2008). Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung poröser Gerüste ist die homogene Verteilung von Salzpartikeln eines bestimmten Durchmessers in einer Polyester- Chlorophorm-Suspension. Das Verdampfen des Lösungsmittels und das Lösen der Salzpartikel in Wasser führt zur Entstehung einer porösen Struktur aus synthetischen Polymeren (MIKOS et al., 1994). Eine andere Möglichkeit ist die Absättigung von Polymeren unter hohem Druck mit CO₂. Beim Absenken des Druckes wird die Löslichkeit des Gases verringert, wobei Gasblasen zwischen 100-500µm entstehen (MOONEY et al., 1996). Zahlreiche andere Herstellungsmethoden sind von SACHLOS et al. (2003) zusammengefasst. Nachteile der synthetischen Polymere sind die Freisetzung von sauren Abbauprodukten (VERT et al., 1994) und das Fehlen von Signal-vermittelnden Multiadhäsionsmatrixproteinen. Des Weiteren gibt es keine Möglichkeit zur Kontrolle der Porengröße, Porengometrie und räumlichen Porenverteilung oder zur Ausbildung von innerporösen Kanälen. Problematisch ist ebenfalls der Einsatz toxischer und karzinogener organischer Lösungsmittel (SACHLOS und CZERNUSZKA, 2003). Allen beschriebenen porösen Strukturen ist eine isotropische Struktur gemeinsam. Aufgrund des Bedarfes an dreidimensionalen Gerüsten, deren Struktur und Komposition den jeweiligen Bedürfnissen angepasst ist, entstanden neue Technologien, von denen die Feste Freiformflächen-Herstellung aufgrund ihrer herausragenden Bedeutung nachfolgend erläutert wird.

1.4.2 Neuere Methoden der Festen Freiformflächen-Herstellung (SFF)

Die Technologien der Festen Freiformflächen-Herstellung (engl. solid freeform fabrication/SFA, additive fabrication) wurden seit Ende der 1980er Jahre im Bereich des Maschinenbaus entwickelt und werden seit einigen Jahren auch in der Biotechnologie eingesetzt. Sie basieren auf der Grundlage der Additiven Fabrikation und sind der Schlüssel zur reproduzierbaren Herstellung von Zellgerüsten mit frei wählbarer vordefinierter Form. Grundsätzlich werden dabei feste dreidimensionale Objekte mit Hilfe rechnerunterstützter Konstruktionen (engl. computer aided design/CAD) durch maschinelles sequentielles und räumlich definiertes Zuführen von Energie und/oder

Material hergestellt. Nachfolgende Prozesse sind zum Teil nötig, um temporäre Strukturen zu entfernen (SACHLOS und CZERNUSZKA, 2003).

1.4.2.1 Techniken der Schmelzablagerungen/SAA

Bei der Schmelzablagerung (engl. melt-dissolution deposition technique) werden durch Hitze geschmolzene Materialschichten mittels Extrusion zu 3D-Objekten ausgebildet (SCOTT, 1991). Eine sich bewegende Düse positioniert das Material, das sich beim Abkühlen verfestigt und an der vorher gebildeten Schicht haftet (YEONG et al., 2004). Erfolgreiches Übereinanderstapeln führt zur Ausbildung komplexer fester 3D-Gerüste. Der Grad der Porosität in der horizontalen Achse wird durch den Abstand der abgelagerten Filamente bestimmt. Der vertikale Abstand entsteht durch Ablagerung von Filamentschichten in einem bestimmten Winkel zur vorherigen Schicht. Das Zeichnen von Musterwiederholungen ermöglicht die Ausbildung poröser Strukturen, die als Zellgerüste eingesetzt werden können (YEONG et al., 2004). Eine repräsentative Methode ist die Modellierung durch Schmelzablagerung (engl. fused deposition modeling/FDM). Dabei wird ein Plastikfilament von einer Spule abgewickelt und zu einer Extrusionsdüse transportiert. Die Düse ist auf einem beweglichen Tisch verankert und wird erhitzt, um das Material zu schmelzen. Während horizontaler und vertikaler Bewegungen presst die Düse ein polymeres Material Schicht für Schicht aus. Die temperaturkontrollierte Umgebung sorgt für ausreichend Schmelzenergie zwischen den Schichten und gewährleistet so deren Haftung untereinander (ZEIN et al., 2002). Im Allgemeinen sind die mittels Schmelzablagerung hergestellten Gerüste relativ hart. Einzige Ausnahme stellen durch 3D-Bioplotter produzierte weiche Gerüste aus Hydrogelen dar, die mechanisch jedoch sehr instabil sind (LANDERS und MÜLHAUPT, 2000; LANDERS et al., 2002).

1.4.2.2 Techniken der Partikelbindung

Bei dieser Technik werden Partikel einer dünnen Pulverschicht selektiv aneinander gebunden und bilden letztlich ein komplexes festes dreidimensionales Objekt aus. Während der Herstellung wird das entstehende Objekt durch das umgebende Pulver eingebettet und gestützt. Somit wird die Ausbildung überhängender Strukturen ermöglicht. Nach der Fertigstellung aller Schichten wird das Objekt aus dem ungebundenem Pulver entfernt. Die kleinstmögliche Porengröße im Gerüst ist durch die Größe der Pulvergranulate bestimmt. Größere Poren können beispielsweise durch Zugabe von Porogenen realisiert werden. Pulverbasierte Materialien haben generell eine rauere Oberfläche, die eine gute zelluläre Adhäsion vermittelt (YEONG et al., 2004). Allerdings verbleibt jedoch oft nichtgebundenes Pulver in den Gerüsten. Besonders häufig verwendete Methoden sind das 3D-Drucken (engl. three dimensional printing/3DP)

(BREDT et al., 1998; LAM et al., 2002) und das selektive Lasersintern (engl. selective laser sintering/SLS) (TAN et al., 2003b; TAN et al., 2005). Der Prozess des 3D-Druckens startet durch das Aufbringen einer Schicht pulverförmiger Polymere, Metalle oder Keramiken auf der Oberseite der Fabrikationskammer. Eine definierte Pulvermenge wird dabei aus einem Vorratsbehälter zugeführt und durch eine Rolle gleichmäßig verteilt. Ein horizontal beweglicher Druckkopf gibt einen flüssigen Binder aus, der das pulverförmige Ausgangsmaterial in Form eines zweidimensionalen Musters verklebt. Die Reaktionskammer wird während des Schreibprozesses in vertikale Richtung stetig abgesenkt und mit neuen Pulverschichten nachgefüllt. Das ungebundene Pulver unterstützt stabilisierend den Schreibprozess und wird am Ende entfernt (LEONG et al., 2003). Das selektive Lasersintern beruht auf dem gleichen Funktionsprinzip, verbindet das pulverförmige Ausgangsmaterial jedoch nicht durch einen gedruckten Binder, sondern durch hohe Temperaturen, die durch Laseranregung erzielt werden (LEONG et al., 2001).

Durch die Methoden der SFF kann die dreidimensionale Geometrie der Gerüste zwar sehr gut kontrolliert werden, die Herstellungsgenauigkeit bzw. kleinstmögliche Porengröße ist jedoch durch die Prozessparameter und Ausgangsmaterialien beschränkt und liegt im Bereich zwischen 100-200µm (LEONG et al., 2003). Sehr nachteilig bei pulverbasierten Techniken wie 3D-Drucken und Selektives Lasersintern wirken sich zudem schwer zu entfernende Pulverreste in den Gerüsten aus. Neuere Methoden auf der Grundlage der Photopolymerisation bieten die Möglichkeit, die Herstellungsgenauigkeit zu verbessern.

1.4.2.3 3D-Mikrofabrikation durch Zwei-Photonen-Polymerisation

Bei der Photopolymerisation wird ein flüssiger lichtaushärtender Kunststoff (Photopolymer) mit Licht bestrahlt und geht nach einer chemischen Reaktion in die feste Phase über. Eine Methode der Photopolymerisation ist beispielsweise die Stereolithographie (CHU et al., 2001), die erstmals das Konzept des Direkten Laserschreibens (DLS) verwirklicht. Bei der Stereolithographie werden dreidimensionale Objekte sequentiell in einem additiven Verfahren aufgebaut. Nach der Belichtung einer Ebene wird eine neue Lackschicht aufgebracht. Durch aufeinanderfolgendes Aufbringen von Schichten können 3D-Stukturen hergestellt werden. Kommerzielle Stereolithographiesysteme erreichen eine Fabrikationspräzision von etwa 10µm. Eine biotechnologische Anwendungsmöglichkeit ist die aufeinanderfolgende Herstellung komplexer, sowohl Zellen als auch Biomoleküle enthaltender, Hydrogelschichten durch UV-Belichtung mittels Fotomasken (TSANG et al., 2007). Im Gegensatz zur planaren stereolithographischen Belichtung bietet die Zwei-Photonen-Polymerisation (2PP) eine weitaus bessere strukturelle Auflösung und Qualität (CUMPSTON et al., 1999). Beide Techniken unterscheiden sich maßgeblich durch die verwendete Wellenlänge des Lichtes.

Bei der Stereolithographie werden meistens ultraviolette Laserstrahlung/UV und bei 2PP Laserpulse im Nahinfrarotbereich/IR zum Belichten der photosensitiven Materialien eingesetzt. Photosensitive Materialien absorbieren in der Regel stark im UV-Bereich und sind dagegen im IR-Bereich transparent. Durch die hohen Feldstärken der IR-Pulse kann die Polymerisation innerhalb eines fokalen Volumens initialisiert werden, weil Multiphotonenprozesse sehr wahrscheinlich werden. Dagegen findet bei der UV-Belichtung aufgrund der Einzelphotonenabsorption die Polymerisation in einer Ebene statt. Das Schwellenwertverhalten der Fotolacke und die Nichtlinearität beim 2PP-Prozess ermöglichen die Herstellung hochauflösender dreidimensionaler Strukturen, deren Voxelgrößen im Bereich von 100nm liegen (BUSCH et al., 2007).

In der Vergangenheit wurde 2PP zur Ausbildung großer Strukturen in der Zahntechnik (SIVAKUMAR und VALIATHAN, 2006) oder für die Herstellung topographischer Lego®-artiger Zellgerüste (DORAISWAMY et al., 2006) und erhabener Flächen (SCHLIE et al., 2007) eingesetzt. Erste Schritte in Richtung 3D-Mikrofabrikation wurden durch Gitterstrukturen mit Gitterkonstanten zwischen 12-110µm realisiert (TAYALIA et al., 2008), deren Gerüste zwar mechanisch stabil, jedoch nicht durch Zellkräfte verformbar sind. Alternativen bieten photovernetzte Proteine wie BSA (KAEHR et al., 2004), vernetzte Hydrogele, in die 3D-Muster bioaktiver Moleküle geschrieben werden können (LEE et al., 2008) oder das direkte Schreiben einer Hydrogel-basierenden „Tinte“ (BARRY et al., 2009), die durch Photopolymerisation verfestigt wird. Eine weitere Möglichkeit zur Strukturierung bei gleichzeitiger mechanischer Kontrolle ist die Herstellung von Hydrogelen aus photovernetzbaren Proteinen. Die Mechanik der Gele kann aufgrund definierten Schwellens durch die chemische Umgebung kontrolliert werden (KAEHR und SHEAR, 2008). Die große Herausforderung bei der Herstellung dreidimensionaler Substrate besteht somit nicht nur in der präzisen Kontrolle von Geometrie und Flexibilität, sondern auch in der gezielten mikrostrukturierten Biofunktionalisierung. Denkbar wären Kompositstrukturen, die aus unterschiedlich funktionalisierten Lacken bestehen, die nacheinander aufgetragen und polymerisiert werden.

Tab. 1 Übersicht über 3D-Zellkultursubstrate

Herstellung von 3D-Gerüsten	Vorteile	Nachteile	Referenz
Tier- und Organmodell	Erhalt von Zytarchitektur und Gewebeeigenschaften	Tierhaltung, Komplexität, Heterogenität	(TODA et al., 2002)
Filtereinsätze	preiswert, einfach, variable Beschichtungen	begrenzte Anwendung auf polares 2D Wachstum	(MATLIN und SIMONS, 1984)
Zelluläre Sphäroide	preiswert, einfach	auf wenige Zelltypen beschränkt, Gas- und Nährstofftransport	(BATES et al., 2000)
Microcarrier	preiswert, Massenkultivierung	Rotationsgefäß erforderlich	(YANG et al., 2007)
Micro-Well-Array	Einzelzellkultur	Beschränkte Dreidimensionalität	(OCHSNER et al., 2007)
Azelluläres Gewebe	Erhalt der natürlichen ECM	oft unvollständige Zellentfernung, keine Kontrolle über Zusammensetzung	(BADYLAK, 2004; GILBERT et al., 2006)
Zellsekretion	natürliche zelleigene Matrix	keine Kontrolle über Zusammensetzung, geringe Höhe	(OKANO et al., 1993)
Natürliche Hydrogele	einfach, gewebeähnlich, flexibel, natürliche ECM	reproduzierbare Zusammensetzung	(GRINNELL et al., 2003)
Synthetische Hydrogele	einfach, gewebeähnlich flexibel, biodegradierbar	geringe Adhäsion und Wachstum	(MANN et al., 2001)
Poröse Polymere durch Porogene	einfach, verschiedene Porengrößen	Lösungsmittel, isotropische Struktur, keine Geometriekontrolle	(MIKOS et al., 1994; MOONEY et al., 1996)
Modellierung durch Schmelzablagerung	Mechanisch sehr stabil, keine Lösungsmittel, hohe Porosität	Hohe Schmelztemperaturen, keine natürlichen Polymere einsetzbar – nur Filament-Materialien, kleines Zeitfenster, sehr steif ~10MPa	(ZEIN et al., 2002)
Druckgesteuerte Mikrospritze	Große Bandbreite an Ausgangsmaterialien, Einbau von Biomolekülen, erzielt kleine Auflösung	Kleine Düse verhindert Partikeleinbau, enger Bereich schreibbarer Viskositäten, Lösungsmittel erforderlich	(VOZZI et al., 2002)
Robocasting	Große Bandbreite an Ausgangsmaterial, organische Tinte	Präzise Kontrolle der organischen Materialien nötig	(TERRIAULT et al., 2003)
3D-Bioplotter	Große Bandbreite an Ausgangsmaterialien, Einbau von Biomolekülen (Hydrogel)	Niedrige mechanische Stabilität, unpräzise, langsam, sehr glatte Oberfläche, präzise Kontrolle der Materialien und des Mediums nötig, Kalibration bei neuem Material	(LANDERS und MÜLHAUPT, 2000)
3D-Drucken™	Mikroporen, große Bandbreite an Ausgangsmaterialien (stärke-basierende	Ausgangsmaterial in Pulverform, toxische Lösungsmittel, mechanisch limitierte Stabilität, auf kleine	(LAM et al., 2002)

	Polymere, Dextran, Gelatine), Wasser als Binder, schnell, Struktur durch umgebendes Pulver gestützt	Poren beschränkt, pulverförmige Oberfläche, Pulverreste, evt. Postprocessing	
Selektives Lasersintering	Mikroporen, große Bandbreite an Ausgangsmaterialien, keine stützenden Strukturen nötig, schnell, keine Lösungsmittel	Ausgangsmaterial in Pulverform, hohe Temperatur, pulverförmige Oberfläche, Pulverreste	(LEONG et al., 2001)
Zwei-Photonen-Polymerisation	Präzise geometrische 3D-Kontrolle, Einbau von Biomolekülen	aufwändig, gezielte Funktionalisierung	(BARRY et al., 2009; LEE et al., 2008)

1.5 Zielsetzung

Die außerordentliche Bedeutung von Zell- und Gewebeform und deren Verknüpfung mit biologischen Funktionen ist in Kapitel 1.3 aufgezeigt. Ziel dieser Arbeit ist es somit zum Einen, auf zwei verschiedenen Ebenen formbestimmende Mechanismen bei kontrollierter Adhäsion zu untersuchen. Als *in vitro* Systeme für Einzelzelluntersuchungen dienen mikrostrukturierte Substrate mit enormer geometrischer Mustervielfalt (LEHNERT et al., 2004) sowie Kollagengele für die Untersuchung von Zellpopulationen (STOPAK und HARRIS, 1982). Die Herstellung der Kollagengele soll dazu den experimentellen Erfordernissen angepasst bzw. optimiert und eine hochauflösende Mikroskopie der Gele ermöglicht werden. Gezielte pharmakologische Inhibition dient dabei der Untersuchung von Kontraktilitätsabhängigen Einflüssen auf die Ausbildung von Zellformen.

Die Ausbildung von Zellformen ist im besonderen Maße von der Dreidimensionalität und Flexibilität der umgebenden Matrix abhängig. Das zweite Ziel der Arbeit beinhaltet daher die Etablierung dreidimensionaler Zellkultursubstrate definierter Geometrie und Flexibilität auf der Grundlage der Zweiphotonenpolymerisation. Schwerpunkte sind Untersuchungen zur Biokompatibilität und Beschichtungsmöglichkeiten der Struktur sowie zum dreidimensionalen Zellverhalten. Die Organisation intrazellulärer Komponenten, die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten und das dreidimensionale Spreading werden mittels Immunhistochemie und Konfokalmikroskopie untersucht und der Einfluss von Geometrie und Flexibilität analysiert.

Für die hier verfolgten Fragestellungen sind die naturwissenschaftlichen Teildisziplinen der Biologie, Physik und Chemie eng miteinander verknüpft. Für die Realisierung der gestellten Ziele sind somit Kooperationen und interdisziplinäre Zusammenarbeit gefordert, durch die sowohl das Verständnis für komplexe Zusammenhänge als auch die Entwicklung neuer Technologien verwirklicht werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Name/Abkürzung	Angaben	Firma
Ammoniak/NH ₃		Carl Roth, Karlsruhe
Blebbistatin/Bleb	50µM in DMSO	Sigma-Aldrich, München
Bovine Growth Serum/BGS	10% in DMEM	Hyclone, Logan/UT, USA
Bovines Serum Albumin/BSA	0.1% in PBS	Sigma-Aldrich
Calciumchloriddihydrat/CaCl ₂ 2H ₂ O	2.7mM	Carl Roth
Dimethylsulphoxide/DMSO		Sigma-Aldrich
Deoxyribonuclease I/Dnase I	0.005% in HBSS (+ Ca ²⁺ , (+)Mg ²⁺)	Worthington, Lakewood/NJ, USA
Dulbecco´s Modified Eagle Medium (high glucose)/DMEM	1x high glucose	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol/EtOH	>99.8% p.a.	Carl Roth
Ethylenglycol-3-O-Mercaptan	1.5mM in EtOH	Prochimia, Sopot, Polen
F-12 Nutrient Mixture (Ham)/F-12	(+) L-Glutamin	Invitrogen
F-12K Nutrient Mixture Kaighn´s Modification/F-12K	(+) L-Glutamin	Invitrogen
Fibronektin/FN	10µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich
Foetal Bovine Serum „GOLD“/FBS	10% in F12	PAA, Pasching, Österreich
Geneticin/G-418 Sulfate	1mg/ml in DMEM	Invitrogen
Gentamycin	0.02mg/ml	Sigma
Hanks balanced salt solution/HBSS		Invitrogen
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure/HEPES	20mM	Carl Roth
Isopropanol/2-Propanol		Carl Roth
Kollagen I	1.5mg/ml in ddH ₂ O pH3	Sigma-Aldrich
Kollagen I	500µg/ml in PBS	Advanced BioMatrix, San Diego/CA, USA
Kollagenase Typ2	0.1% in HBSS (+ Ca ²⁺ , (+)Mg ²⁺)	Worthington
Laminin	20µg/ml in PBS	Invitrogen
Mowiol		Hoechst, Frankfurt/Main

Natriumhydrogencarbonat/NaHCO ₃		Carl Roth
n-Propylgallat	1 Spatelspitze auf 10ml Mowiol	Sigma-Aldrich
Octadecylmercaptan/ODM	1.5mM in Ethanol	Sigma-Aldrich
Octadecyltrichlorsilan/OTS	1mM	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd/PFA	4% in PBS	Sigma-Aldrich
PBS	1x, (-)Ca ²⁺ , (-)Mg ²⁺ (Waschpuffer)	Biochrom, Berlin
PBS	1x; (-)CaCl ₂ , (-)MgCl ₂ (Zellkultur)	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin/Pen/Strep	10U/ml	Invitrogen
Polydimethylsiloxan/Sylgard 184/PDMS		Dow Corning, Wiesbaden
Poly-L-Lysin/PLL	200µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure/H ₂ SO ₄	>95%	Carl Roth
Chicken Serum/CS	2%, 5% in F-12	Invitrogen
Stickstoff/N ₂	Reinheit 5.0	Linde Gas, München
TritonX100	0.1% in PBS	Carl Roth
Trypanblau	1:2	Carl Roth
Trypsin/EDTA	1:5, 1:10 in HBSS (-) Ca ²⁺ , (-)Mg ²⁺	Invitrogen
Vitronektin	5µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid/H ₂ O ₂	min. 30%	Carl Roth
Y-27632	50µg/ml in PBS	Tocris, Ellisville/MO, USA

2.2 Herstellung zweidimensionaler strukturierter Substrate

Zweidimensionale strukturierte Substrate werden durch Microcontact-Printing (μ CP) (KUMAR und WHITESIDES, 1993) hergestellt. Diese Methode beruht auf der Grundlage der Gold-Thiol-Chemie. Etabliert wurde diese Stempeltechnik in unserer Arbeitsgruppe (LEHNERT et al., 2004).

2.2.1 Stempelmuster

Prinzipiell sind die Muster aus quadratischen Strukturen („Dots“) aufgebaut, die später im fertigen Zellkultursubstrat Protein-beschichtete, zelladhäsive Bereiche bilden. Diese Bereiche werden durch nicht beschichtete, anti-adhäsive Bereiche voneinander getrennt. Die Größe der Dots liegt bei $0.09\mu\text{m}^2$ bis $9\mu\text{m}^2$ (Kantenlänge 0.3-3 μm). Die Mustervielfalt wird zusätzlich durch variierende Dotabstände (Abstand 2-35 μm) erhöht.

Der Stempel besteht aus hervorstehenden Silikonstrukturen, die beim Stempelvorgang in Kontakt mit dem Golddeckglas treten. Umgeben sind diese Strukturen von tiefer liegenden, zurückstehenden Bereichen. Zu den hervorstehenden Strukturen gehören neben den Dots auch Stege zwischen den Mustern und, je nach Stempel, meist breitere Außenstege, die im fertigen Substrat großflächige, homogen beschichtete Substratunterlagen darstellen.

2.2.2 Reinigung der Master und Herstellung der Stempel

Zur Herstellung der Silikonstempel werden Abgussformen, sogenannte Master benötigt. Sie bestehen aus reinem metallischem Silizium, in die eine zum späteren Silikon-Stempel inverse dreidimensionale Struktur eingeätzt wird. Die Strukturierung erfolgt mittels Elektronenstrahl-Lithographie (Paul-Scherrer-Institut, Schweiz). Silikon ist der Überbegriff für Polydimethyl-Siloxan (PDMS). Zur Stempelherstellung wird Sylgard 184, ein im auspolymerisierten Zustand elastisches Silikon, verwendet.

Zur Entfernung von organischem Material wird der Master für 10min in Piranha-Lösung, bestehend aus H_2SO_4 und H_2O_2 (1:1), auf einer Heizplatte bis zur Blasenbildung (ca. 80°C) erhitzt. Direkt im Anschluss wird der Master mehrfach mit Bidest (dd H_2O) gespült und mit Stickstoff (Reinheit 5.0) trocken geblasen. Bei starker Verschmutzung kann dieser Vorgang mehrmals wiederholt werden. Abschließend wird der Master in einer Lösung bestehend aus NH_3 , H_2O_2 und Bidest (1:1:5) für 15min nochmals bis zur Blasenbildung erhitzt, erneut gründlich mit Bidest gespült sowie mit Stickstoff getrocknet.

Um ein sauberes und sicheres Ablösen der Stempelabgüsse vom Master gewährleisten zu können, werden die Silizium-Master mit Octadecyltrichlorsilan (OTS) beschichtet. OTS ist eine wasserempfindliche Substanz, die unter Einwirkung von Luftfeuchtigkeit zur Polymerisierung neigt. Die Silanisierung von Silizium-Mastern erfolgt durch Eintauchen der Master unter Stickstoffatmosphäre in einer 1mM OTS- Lösung in Hexan, p.a. (4.1µl OTS in 10ml Hexan) für 10min bei Raumtemperatur und anschließender Stickstoff-Trocknung. Bei erfolgreicher Silanisierung perlt ein auf den Master pipettierter Tropfen Bidest mit großem Kontaktwinkel ab.

Zur Herstellung der Stempel werden ca. 50µl flüssiges, entgastes Silikon über die Stempelstruktur des Masters gegeben. Ein, mit Isopropanol gereinigter, ca. 1cm breiter Objekträger-Glasstreifen wird ohne Einschlüsse von Luftblasen auf den Silikontropfen gelegt. Der Glasstreifen wird mit Messingklötzchen beschwert und gegen Verrutschungen seitlich gesichert. Die Polymerisation des Silikons erfolgt 6h bei 60°C im Ofen. Beim Abtrennen des Glasstreifens vom Master bleibt das auspolymerisierte Silikon an der Glasunterseite haften. Auf die Glasoberseite wird ein Haltegriff geklebt.

2.2.3 Goldbedampfung der Deckgläser

Zur Herstellung von mikrostrukturierten Substraten werden die verwendeten Deckgläser (Carl Roth, 22 x 22mm) vor der Goldbedampfung gereinigt. Dazu werden die Deckgläser in eine speziell angefertigte Halterungen aus Teflon gestellt und 10min in einer Lösung aus NH₃, H₂O₂ und ddH₂O (1:1:5) auf 80°C erwärmt. Anschließend werden die Deckgläser gründlich mit ddH₂O gespült und zügig einzeln mit Stickstoff trocken geblasen.

Zur Goldbedampfung wird eine spezielle angefertigte Halterungsvorrichtung mit den gereinigten Deckgläsern beladen und in eine Aufdampfanlage eingebaut. Bei einem Druck von $\leq 1 \times 10^{-6}$ mbar wird zunächst eine 3-5nm dicke Titanschicht als Haftvermittler aufgedampft. Direkt im Anschluss erfolgt das Aufdampfen der 15-20nm Goldschicht. Fertig bedampfte Deckgläser werden aus Schutz vor Ablagerungen auf der Oberfläche in einer Petrischale gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht.

2.2.4 Substratherstellung

Vor und nach jeder Stempelreihe wird der Stempel mehrmals mit klarem Tesafilm® abgezogen, um grobe Schmutz- und Staubpartikel zu entfernen. Zur Beseitigung eventuell zurückgebliebener Tesafilmreste wird der Stempel gründlich mit reinem Ethanol (>99.8%) abgespült und im Anschluss mit Stickstoff trocken geblasen. Dieser Vorgang kann während des Stempelns wiederholt werden, falls sich der Stempel nicht mehr richtig ansaugt. Das passiert unter Umständen, wenn Gold am Stempel haften geblieben ist oder Thiol-Rückstände auskristallisieren. Bei starker Verschmutzung der Stempel erfolgt eine

10-15 minütige Behandlung im Ultraschallbad, wobei der Stempel in Ethanol oder alternativ in 1% SDS in ddH₂O getaucht wird.

Nach der Reinigung wird der Stempel für 30s mit 1.5mM Octadecylmercaptan (ODM), einem hydrophoben, methyl-terminierten Alkanthiol, inkubiert und danach mit Stickstoff trocken geblasen. Vorsichtiges Aufdrücken des Stempels auf ein goldbedampftes Deckglas überträgt an den vorstehenden Stempelstrukturen ODM auf das Gold. Im Idealfall saugt sich der Stempel von selbst an, ansonsten kann leichter Druck mit einer spitzen Pinzette auf die Deckglasrückseite ausgeübt werden. Bei einem erfolgreichen Stempelvorgang zeigen sich Newtonschen Farbringe auf der Deckglasrückseite. Aufgrund des hohen Diffusionsvermögens von ODM und des damit verbundenen Substrat-Hintergrundes sollte das Stempeln zügig durchgeführt werden. Anschließend erfolgt das Abspülen des Deckglases mit reinem Ethanol und Trockenblasen mit Stickstoff für ca. 30s. Nicht bestempelte Bereiche werden durch Bedecken mit 1.5mM EG3O-Me, einem hydrophilen Thiol, für 30min bei Raumtemperatur inaktiviert. Nach erneuter Reinigung der Deckgläser mit Ethanol wird die strukturierte Oberfläche mit 150µl sterilem Fibronectin (10µg/ml) für 1h bei 4°C beschichtet. Das Protein bindet dabei selektiv an das strukturiert aufgebrachte, hydrophobe erste Thiol. Nach zwei Waschschritten mit PBS können die nun Fibronektin-beschichteten Golddeckgläser für ein Zellkulturexperiment eingesetzt werden.

2.3 Herstellung dreidimensionaler Substrate mittels 2PP

Dreidimensionale Substrate entstehen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. M. Wegener, Universität Karlsruhe, und werden mittels Direktem Laserschreiben (DLS) hergestellt (DEUBEL et al., 2004). Beim DLS wird aus dem Film eines Fotolackes die gewünschte Struktur herausgearbeitet, indem mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahles (gepulster Titan:Saphir-Laser, Spectra Physics Tsunami) durch Zwei-Photonen-Polymerisation lokal der Vernetzungsgrad des Lackes erhöht wird. Nicht belichtete Bereiche werden anschließend selektiv herausgelöst. Das Ergebnis ist ein dreidimensionales Zellkultursubstrat (Abb. 4), dessen Formen beliebig realisierbar sind. Die in diesem Kapitel aufgezeigten Herstellungsverfahren harter und flexibler 3D-Substrate wurden im Rahmen zweier Diplomarbeiten an der Universität Karlsruhe entwickelt (FISCHER, 2008; STRIEBEL, 2007).

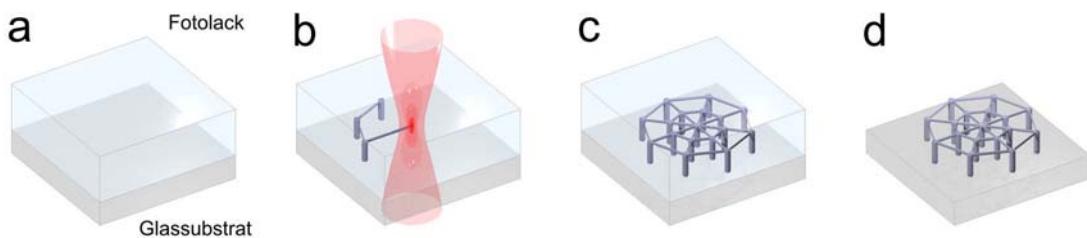


Abb. 4 Herstellung von 3D-Substraten durch Direktes Laserschreiben

a) Ein Fotolack wird gleichmäßig auf ein Glassubstrat aufgebracht b) Mittels eines fokussierten Laserstrahles werden gezielt einzelne Bereiche lokal belichtet. c) Ergebnis des Schreibvorganges sind polymerisierte und unpolymerisierte Bereiche d) Unpolymerisierte Bereiche werden anschließend selektiv herausgelöst und die gewünschte Struktur somit freigelegt (FISCHER, 2008).

2.3.1 Harte 3D-Glassubstrate

Harte dreidimensionale Glassubstrate werden in mehreren Arbeitsschritten hergestellt (Abb. 5). Nach dem Aufbringen des Fotolackes SU-8 wird die gewünschte Struktur durch DLS herausgearbeitet. Aufgrund des hohen SU-8-Brechungsindexes ($n=1.57$), störender Autofluoreszenz bei allen Wellenlängen und des leichten Ablösens der Substrate unter Zellkulturbedingungen werden die Strukturen weiter modifiziert. Nach der Verglasung der gesamten Struktur wird anschließend der störende Photolack entfernt. Ergebnis sind dreidimensionale Glasmehrheiten mit einem niedrigeren Brechungsindex, die sich durch gute mikroskopische Eigenschaften, einer großen Stabilität und der Möglichkeit der Wiederverwendung nach Reinigung auszeichnen.

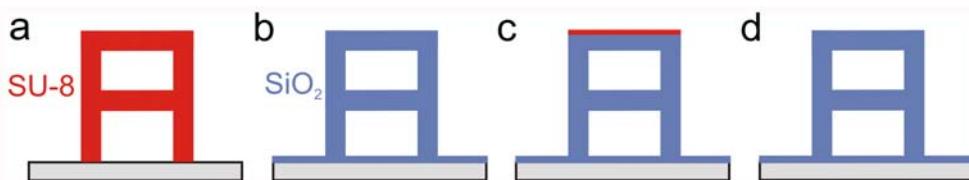


Abb. 5 Herstellung 3D-Glassubstrate

a) Durch DLS wird eine dreidimensionale Struktur in den Fotolack SU-8 geschrieben und polymerisiert. b) Anschließend wird die SU-8-Struktur mit einer Silika-Schicht (SiO_2) gleichmäßig überzogen. c) Die oberste Glasschicht wird durch reaktives Ionenätzen entfernt und d) das SU-8 herausgebrannt (modifiziert nach STRIEBEL 2007)

2.3.1.1 Schreiben der SU-8 Struktur

Der kommerziell erhältliche Negativ-Fotolack SU-8 20 (MicroChem; Newton/MA, USA) wird in einem zweistufigen Programm (10s 500U/min; 30s 1900U/min) mittels Spincoater unter Gelblicht gleichmäßig auf ein Deckglas (22 x 22mm, Roth) aufgebracht. Die resultierende Schichtdicke beträgt ca. 25 μm . SU-8 ist aufgrund seiner hohen Anzahl an

Epoxid-Einheiten ideal für lithographische Prozesse geeignet. Zusätzlich zu den polymerisierbaren Epoxid-Monomeren (Epon SU-8, ein Epoxid-Harz) und dem Lösungsmittel α -Butyrolakton enthält der Lack einen Photoinitiator (Cyracure UVI-6976, ein Gemisch aus Triarylsulfonium-Hexafluoroantimonat-Salzen) zum Verlinken der Monomere. Absorbiert ein solches Photoinitiator-Molekül während des DLS zeitgleich zwei Photonen, so zerbricht es mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit und bildet eine Lewis-Säure. Diese starke Säure ist in der Lage, die Epoxid-Einheiten des SU-8 zu öffnen und zu verlinken. Für die exotherme Polymerisationsreaktion wird noch Aktivierungsenergie benötigt, da die Vernetzung der Monomereinheiten nicht nur von der Säuredichte, sondern auch von Zeitdauer und Temperatur abhängig ist. So findet der Großteil der Polymerisierung bei einem späteren Backschritt im Ofen statt und der Vernetzungsgrad der Epoxid-Moleküle in den belichteten Bereichen wird somit durch nachträgliche Backvorgänge modifiziert.

Nach dem Aufbringen des Lackes schließt sich ein sogenannter „Soft-Bake“ an, bei dem das Lösungsmittel auf einer Heizplatte für 7min bei 95°C verdampft wird. Ergebnis ist ein fester Film aus Monomer und Initiator. Beim nachfolgenden DLS belichtet man mittels eines Ti:Saphir-Lasersystems den Lack in drei Dimensionen (DEUBEL et al., 2004). Im Anschluss an das DLS werden die belichteten Strukturen in einem Konvektionsofen bei einer ansteigenden Temperatur von 65-95°C und einer Dauer von 7min quervernetzt. Schwach vernetzte Bereiche werden anschließend durch ein Bad in einer Entwicklerlösung (mr-600, MicroChem) herausgelöst und Lack- und Entwicklerreste durch Isopropanol entfernt. Abschließend wird die Struktur vorsichtig mit Stickstoff trocken geblasen.

2.3.1.2 Verglasung der SU-8-Struktur

Die SU-8 Strukturen erhalten in diesem Arbeitsschritt eine Siliziumdioxidschicht (SiO_2), um den Brechungsindex anzupassen, den Strukturen Stabilität unter Zellkulturbedingungen zu verleihen sowie die Beständigkeit gegen Chemikalien als auch Hitze zu erhöhen, so dass gebrauchte Strukturen mehrfach verwendet werden können. Der ALD (engl. Atomic Layer Deposition)-Aufbau wurde im Rahmen einer Doktorarbeit an der Universität Karlsruhe fertig gestellt (HERMATSCHWEILER, 2009) und realisiert die Reaktion von Siliziumtetrachlorid (SiCl_4) mit Wasser (H_2O) zu Silikat (SiO_2) und Salzsäure (HCl). Das Siliziumdioxid scheidet sich gleichmäßig an allen Oberflächen ab. Bei einem standardisierten Gasfluss wird innerhalb von 5 Zyklen eine Silikat-Schichtdicke von 300nm erreicht.

2.3.1.3 Schichtdickenmessung und Entfernung des SU-8

Die aufgebrachte Silikatschichtdicke wird reflektometrisch bestimmt und ermöglicht so eine optimierte Entfernung der oberen Silikatschicht auf dem 3D-Substrat, um im nächsten Arbeitsschritt den SU-8-Lack entfernen zu können. Eine Möglichkeit, Glas anisotrop zu ätzen, ist das Reaktive Ionenätzen. Nichtreaktive Moleküle werden in elektrisch geladene reaktive Moleküle umgewandelt, die chemisch an Oberflächen adsorbieren können. Die Ionen werden durch das starke elektrische Feld senkrecht auf die Oberflächen beschleunigt und können dadurch Material ablatieren. Nachdem die obere Schicht des Siliziumdioxids entfernt wurde, kann das SU-8 bei Temperaturen über 380°C verdampft werden.

2.3.1.4 Geometrie harter 3D-Glasstrukturen

Untersuchungen des Zellverhaltens in harten dreidimensionalen Substraten werden in 2 verschiedenen Geometrien durchgeführt (Abb. 6). Zum Einen werden Gitterstrukturen mit einer Grundfläche von 100x100 μm^2 , eine Höhe von ca. 20 μm und Gitterabstände von 2 μm , 5 μm und 10 μm verwendet. Zum Anderen werden Zellen in Radstrukturen kultiviert. Diese Strukturen weisen einen Durchmesser von ca. 95 μm und eine Höhe von 15 μm auf und bestehen aus zwei übereinanderliegenden äußeren und inneren Ringen. Die Strukturen sind durch Querstreben in 8 bzw. 10 Außen- und Innen-Kompartimente unterteilt, die zur besseren Stabilität aus vertikalen Wänden bestehen, welche jedoch nicht durchgängig sind, sondern eine ~ 2 μm große Lücke aufzeigen.

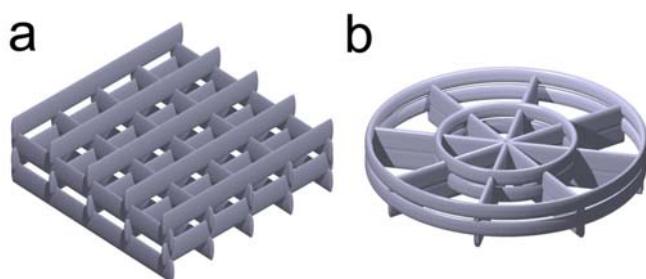


Abb. 6 Geometrie harter 3D-Glasstrukturen

a) Gitterstrukturen weisen eine Grundfläche von 100x100 μm^2 auf und sind ca. 20 μm hoch. Drei Substrattypen mit Gitterabständen von 2 μm , 5 μm und 10 μm werden untersucht. **b)** Radstrukturen bestehen aus zwei äußeren und zwei inneren Ringen (Durchmesser entsprechend 95 μm und 45 μm). Querstreben aus vertikalen Wänden mit Lücken unterteilen die Struktur in 8 bzw. 10 Außen- und Innen-Kompartimente.

2.3.2 Flexible 3D-Substrate aus Ormocer®

Für die Herstellung flexibler dreidimensionaler Substrate wird Ormocer®, ein am Fraunhofer Institut für Silikatforschung in Würzburg entwickelter Fotolack, eingesetzt. Der Hybridcharakter dieses Materials ist dabei namensgebend (engl. **ORganically MOdified CERamics**). Das organisch-anorganische Hybrid-Polymer besteht aus Anteilen organischer Polymere, die eine gute UV-Vernetzbarkeit der Struktur ermöglichen, Silikonanteilen, die dem Material elastische Fähigkeiten verleihen sowie stabilisierenden Glas- bzw. keramischen Komponenten. Durch die relativen Anteile der Komponenten lässt sich die resultierende Materialeigenschaft festlegen.

2.3.2.1 Schreiben der Ormocer®-Struktur

Der Fotolack Ormocer® besteht aus einem hybriden Monomer und dem Fotoinitiator Irgacure 369 (Ciba Chemicals, Lampertheim). Da kein Lösungsmittel enthalten ist, kann der Lack nicht durch Vorbacken in einen festen Film verwandelt werden und wird in viskoser Form belichtet. Bei Absorption zweier Photonen spaltet sich der Fotoinitiator mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit und setzt dabei Radikale frei. Die Freisetzung von Radikalen leitet die Polymerisation ein. Trifft eine radikale Polymerkette auf eine weitere radikale Polymerkette oder einen Radikal-Quencher wie beispielsweise Sauerstoff, stoppt die Kettenreaktion. Durch die Polymerisation gehen belichtete Bereiche in die feste Phase über. Unbelichtete Bereiche hingegen bleiben flüssig und können mit Isopropanol entfernt werden. Die Polymerisationsreaktion findet direkt beim Belichten statt, so dass ein „Post-Bake“ wie beim SU-8 (Kap. 2.3.1.1) entfällt.

Ormocer® hat ebenfalls einen relativ hohen Brechungsindex von 1.52, der jedoch noch unter dem von SU-8 ($n=1.57$) liegt. Ebenfalls nachteilig wirkt sich eine störende Autofluoreszenz aus, die besonders stark bei niedrigen Anregungswellenlängen um 400nm ausgeprägt ist. Die herausragende Eigenschaft dieses Materials besteht jedoch in seiner Elastizität, die in einer früheren Arbeit mit einem Elastizitätsmodul zwischen 300-1000MPa geschätzt wurde (OBI, 2008). Der Grad der Elastizität wird zwar nicht, wie anfangs angenommen, durch einen variablen Polymerisierungsgrad als Abbild der deponierten Schreibenenergie im Lack bestimmt, kann aber durch unterschiedliche Balkendurchmesser infolge verschiedener Leistungen und Schreibgeschwindigkeiten beeinflusst werden.

2.3.2.2 Kalibrierung durch Raster-Kraft-Mikroskopie

Die Quantifizierung der elastischen Eigenschaften von Ormocer® wurde durch Kalibrierungen mittels Raster-Kraft-Mikroskopie (engl. **A**tomic **F**orce **M**icroscopy/AFM) von Dr. C. M. Franz, Universität Karlsruhe, realisiert. Dazu wurden zwei verschiedene

Teststrukturen, deren Abmessungen und Schreibparameter denen der in Zellkulturexperimenten verwendeten Strukturen entsprechen, vermessen. Neben den im Experiment eingesetzten Radstrukturen wurden ebenfalls sogenannte Tore vermessen, bestehend aus 35 μm langen Balken, die durch 15 μm hohe Säulen gestützt werden.

Ein AFM-Kantilever ohne Spitze wird dabei auf die Testbalken der Rad- und Torstrukturen mit einer ansteigenden Kraft bis 20nN abgesenkt. Ergebnis sind Kraftkurven von Strukturen unterschiedlicher Linienbreite (0.6 μm -1.3 μm), in denen die ausgeübte Kraft F über die Position z_P der Piezobühne aufgetragen ist, an der der Kantilever befestigt ist. Da sich der Kantilever jedoch beim Ausüben der Kraft selbst verbiegt, wurde zusätzliche eine Referenzkurve aufgenommen, bei der der Kantilever gegen hartes, inkompressibles Glas (Elastizitätsmodul Quarzglas ~ 70GPa) gedrückt wurde. Unter der Annahme, dass bei gleichen Kräften der Kantilever gleich stark verbogen ist, wird damit auf die Verbiegung des Balkens selbst geschlossen. Zieht man den Piezo-Verfahrweg der Referenzkurve von der Strecke ab, die der Piezo bei gleicher Kraft durch Drücken auf den zu messenden Balken zurücklegt, erhält man das resultierende Kraft-Weg-Verhältnis ohne den Einfluss der Kantilever-Verbiegung. Der Verfahrweg der flexibelsten Struktur mit einer Linienbreite von 0.6 μm , die auch in den Zellkulturexperimenten eingesetzt wurde, wurde zusätzlich mit Kräften bis 120nN quantifiziert.

Da die zellulären Kräfte im Experiment oft seitlich und weniger vertikal ansetzen, werden die Teststrukturen für eine adäquate AFM-Messung um 90°C gedreht. Dazu werden die Teststrukturen mittels Diamantstift in möglichst dünnen Streifen ausgeschnitten und auf die kurze Kante eines Objektträgers geklebt. Die vom AFM applizierte Kraft des Kantilevers auf den flach liegenden Objektträger bzw. auf die aufgerichteten Teststrukturen entspricht dann der zellulären Kraftrichtung.

2.3.2.3 Geometrie flexibler 3D-Ormocer®strukturen

Untersuchungen von Zellverhalten in weichen dreidimensionalen Substraten werden in vier verschiedenen Geometrien durchgeführt. Säulengradienten weisen eine Grundfläche von 100 μm x 200 μm auf, bestehen aus 21 Säulenreihen mit einem Abstand von 5 μm und zunehmender Härte. Die Abnahme der Flexibilität wird durch schrittweise ansteigende Laserleistung (von 100 μW auf 200 μW) mit entsprechend zunehmendem Säulendurchmesser erzielt. Ormocer®-Radstrukturen haben einen Durchmesser von 90 μm und sind in etwa 15 μm hoch. Sie bestehen aus einem äußeren und einem inneren Ring (Durchmesser 45 μm) und sind durch Querstreben in 8 Außen- und 8 Innen-Kompartimente aufgeteilt. Die dicken Säulen weisen einen wesentlich größeren Durchmesser von ca. 6 μm auf und ermöglichen so die nötige Stabilität der Struktur.

Flexible Querstreben sind mit einem Durchmesser zwischen 0.6µm-1.3µm wesentlich dünner und im zellulären Kraftbereich verformbar. Eine weitere Struktur sind sogenannte Boxringe. Vier ca. 15µm hohe Säulen tragen vier Querstreben, wobei der Abstand von Säulenmitte zu Säulenmitte 22µm beträgt. Des Weiteren werden sogenannte Korbstrukturen mit einer Grundfläche von 20x20µm² eingesetzt, die ebenfalls von 4 Säulen getragen werden. Ein Netzboden mit einer Netzgitterkonstante von ca. 5µm verhindert den Zellkontakt zur zweidimensionalen Oberfläche. Vertikale gitterförmige Begrenzungen schaffen ein dreidimensionales Zellkompartiment.

2.3.3 Proteinbeschichtung

Zweidimensionale mikrostrukturierte Substrate werden mit 150µl Fibronektin-Lösung beschichtet und 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die proteinbeschichteten Substrate zweimal mit PBS gewaschen.

Dreidimensionale Strukturen werden vor der Protein-Beschichtung mit reinem Ethanol gespült und unter UV-Licht ca. 30min getrocknet. Anschließend werden die Strukturen mit Poly-L-Lysin (PLL) 1h bei Raumtemperatur beschichtet, 3 x PBS gespült und mit einem Protein der ECM gecoatet (Tab. 2). Eine Ausnahme stellt die Beschichtung mit Kollagen dar. Hier werden die Substrate nach der PLL-Beschichtung mit einer 500µg/ml Kollagenlösung bei 4°C für 1h inkubiert. Um eine gleichmäßige Proteinbeschichtung auch kleiner Gitterkonstanten ≤2µm mit entsprechend engmaschigen Kompartimenten zu gewährleisten, erfolgt die Inkubation mit Proteinen stets unter Entgasung im Exsikator. Nach einem zweimaligen Waschschritt mit PBS sind die proteinbeschichteten 3D-Substrate zur Aufnahme von Zellen bereit.

Tab. 2 ECM-Proteine für die Substratbeschichtung

Protein	Hersteller	Konzentration
Fibronektin	Sigma Aldrich	10µg/ml
Kollagen	Advanced BioMatrix	500µg/ml
Laminin	Sigma Aldrich	20µg/ml
Poly-L-Lysin	Sigma Aldrich	200µg/ml
Vitronectin	Sigma Aldrich	5µg/ml

2.3.4 Reinigung der 3D-Substrate

Um 3D-Substrate aus Glas und Omocer® mehrfach wiederverwenden zu können, werden die fertig mikroskopierten Substrate vorsichtig in einer Petrischale mit Bidest ausgebettet. Das Einbettmedium Mowiol ist wasserlöslich, so dass nach 1-2 Tagen das 3D-Substrat vom Objektträger abschwimmt. Vorsichtiges Schwenken der Petrischale auf einem Schüttler (30U/min) beschleunigt den Ablösevorgang. Für weitere 2-3 Tage erfolgt eine enzymatische Behandlung mit Trypsin (0.5% Trypsin, 5.3mM EDTA) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

3D-Glassubstrate zeichnen sich durch sehr gute Chemikalien- und Hitzebeständigkeit aus und können im Anschluss an die enzymatische Reinigung für 45min unter Blasenbildung in einer Lösung bestehend aus NH₃, H₂O₂ und Bidest (1:1:5) schwach erhitzt werden. Ein starkes Aufkochen sollte aufgrund der daraus resultierenden starken mechanischen Belastung vermieden werden. Nach einem gründlichen Spülen der Substrate in Bidest werden die Strukturen über Nacht auf einem Schüttler in Bidest gewaschen. Nach einem erneuten zwei- bis dreimaligen Erhitzen in Bidest für jeweils 15min werden die Glassubstrate für 1h bei 200°C gebacken und bis zur nächsten Verwendung in Plastikpetrischalen aufbewahrt.

3D-Ormocer®-Substrate sind mechanisch weniger stabil und schwimmen während des Reinigungsprozesses leicht ab. Die chemische Reinigung mit NH₃, H₂O₂ und Bidest (1:1:5) sollte kürzer (10min) und ohne Hitzeeinwirkung erfolgen. Ormocer®-Substrate werden ebenfalls gründlich mit erhitztem Bidest gewaschen, jedoch nicht ausgebacken.

2.4 Zellkultur

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen vorgestellt. Neben adhären wachsenden Zelllinien (Kap. 2.4.1) werden ebenfalls Präparationsmethoden und die entsprechende Kultivierung adhärenter primärer Fibroblasten (Kap. 2.4.2) sowie primärer Kardiomyozyten des Huhns (Kap. 2.4.3) erläutert.

2.4.1 Verwendete Zelllinien

In dieser Arbeit werden vier verschiedene adhärerente Zelllinien unterschiedlicher Organismen- und Gewebeherkunft untersucht (Tab. 3).

Bei der A549-Tumorzell-Linie (ATCC, Rockville/MD, USA, CCL-185) handelt es sich um humane Alveolarepithelzellen, die 1972 aus dem Lungenkarzinomgewebe eines 58jährigen männlichen Patienten kultiviert wurden (GIARD et al., 1973). Multilamellare Einschluskörperchen aufgrund von Phospholipid-Synthese lassen darauf schließen, dass es sich um alveolare Epithelzellen vom Typ2 handelt, die *in vivo* durch Sekretion komplexer Lipoproteine die oberflächenaktiven Eigenschaften der inneren Lungenoberfläche bestimmen (LIEBER et al., 1976).

BRL-Zellen wurden 1968 aus dem Lebergewebe einer 5 Wochen alten weiblichen Ratte (*Rattus norvegicus*) kultiviert (COON, 1968). Ein Subklon wurde als BRL-2A (ATCC, CRL-1442) bezeichnet (DULAK und TEMIN, 1973) und proliferiert auch in serumfreiem Medium (NISSLEY et al., 1977). Das Wachstum von BRL-Zellen wird als parenchymal beschrieben (COON und WEISS, 1969).

B16-Zellen entstammen dem Hautmelanom einer C57BL/6 Maus (*Mus musculus*) und wurden 1954 *in vitro* kultiviert. Diese nicht-epitheliale Linie zeigt eine fibroblastische Morphologie neuroektodermalen Ursprungs (AUFDERHEIDE und EKBLOM, 1988) und produziert Melanin. Murine B16-Zellen werden aufgrund der großen Ähnlichkeit zum humanen Melanom häufig als Modell eines malignen Melanoms verwendet (FIDLER und KRIPKE, 1977). In der vorgestellten Arbeit werden Experimente mit B16-F1-Zellen (ATCC, CRL-6323), einer B16-Melanoma-Sublinie durchgeführt, die nach der Fidler-Methode gewonnen wurden. Zellklone von B16-F0-Zellen wurden intravenös in die Lungen von C57BL/6-Mäusen injiziert. B16-F1-Zellen entstammen *in vivo* Lungenkolonien und sind eher schwach metastasierend. (FIDLER, 1973; IRIMURA et al., 1981; NAKAMURA et al., 2002).

Tab. 3 Verwendete Zelllinien , eingesetztes Medium und Ablösung vom Substrat

Die angegebenen Zelllinien wurden ursprünglich von ATCC bezogen. Die Labore, die die Zellen zur Verfügung stellten bzw. Zellen nach Bezug von ATCC kultivierten, sind ebenfalls aufgelistet. Bei allen Zelllinien wird dem Medium 10% BGS zugesetzt. Die Angaben 1:5 und 1:10 Trypsin entsprechen 0.1% Trypsin und 1.1mM EDTA bzw. 0.05% Trypsin und 0.53mM EDTA. Die Passagierung erfolgt dreimal wöchentlich.

Linie	Zelltyp	Herkunft	Eigenschaft	Medium	Trypsin
A549	Humane Lungen-Karzinom-Zellen	Prof. Dr. Harald Krug, ITG, Karlsruhe	epithelial	F-12K	1:5
BRL-3A	Büffelratte-Leberzellen	ATCC	parenchymal	DMEM	1:5
B16-F1	Mausmelanom-Zelle	Prof. Dr. Beat Imhof, CMU, Genf	fibroblasten-artig	DMEM	1:10
B16-F1 transfiziert mit Aktin-EGFP	Mausmelanom-Zelle	Prof. Dr. Beat Imhof, CMU, Genf	fibroblasten-artig	DMEM 1mg/ml Geneticin G418 (Invitrogen)	1:10

2.4.2 Präparation primärer Fibroblasten

Für die Präparation primärer Hühnerfibroblasten werden pathogenfreie Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ (Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven) verwendet. Ihre Bebrütung erfolgt in einem Brutschrank mit geregeltem Ventilationssystem (37°C Temperaturkonstanz, 60% Luftfeuchtigkeit) und automatischer Wendevorrichtung (180° Drehung pro 2h). Der Einlegetag ist der erste Tag der Bebrütung und wird als „Tag 0“ definiert.

Primäre Hühnerfibroblasten werden 8 Tage alten Hühnerembryonen unter sterilen Bedingungen entnommen. Dazu wird die Eierschale mit 70% Ethanol gesäubert und dann an einer Petrischalen-Kante vorsichtig aufgebrochen. Anschließend kann der Embryo aus dem Ei entnommen, aus dem Chorion befreit, und in eine mit 4°C kaltem Hanks-Medium vorbereitete Petrischale überführt werden. Nach einem Spülsschritt mit Hanks wird der Embryo mit einer Pinzette am Untergrund der Petrischale fixiert während mit einer zweiten Pinzette die Rückenhaut entlang der Wirbelsäule in möglichst großen Stücken vorsichtig abgezogen wird.

Nach Überführung in eine neue Schale mit Hanks-Medium wird die Haut nochmals mit Hanks gespült und in eine neue Petrischale mit serumhaltigem F-12-Medium (10% BGS, 2% Hühner Serum) überführt. Anschließend werden die Hautstücke mittels zweier Pinzetten in kleine Stücke gerissen und an den Boden der Petrischale gedrückt. Innerhalb einer Woche wachsen die Zellen aus den Gewebestücken aus und können in eine

Zellkulturflasche überführt werden. Unter Routinebedingungen werden die Zellen bis zur Passage 10 kultiviert (Kap. 2.4.4).

2.4.3 Präparation kardialer Myozyten

Primäre Kardiomyozyten werden 10 Tage alten Hühnerembryonen unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Schale des Eis wird mit 70% Ethanol desinfiziert, das Ei aufgeschlagen und der Embryo in eine Schale mit Hanks überführt. Um den Anteil apoptotischer Zellen möglichst gering zu halten, werden die folgenden Präparationsschritte auf Eis durchgeführt.

Mittels zweier Pinzetten wird der Bauchraum des Embryos geöffnet und das schlagende Herz entnommen. Anschließend wird das Herz in eine neue Petrischale mit Hanks überführt und die äußereren Blutgefäße sowie der Herzbeutel mit einer Schere entfernt. Das Öffnen der Herzkammern durch Einschnitte mit einer Schere ermöglicht ein gutes Spülen des Organs, um den Anteil von Blutzellen zu verringern. Die entnommenen Herzen werden anschließend mechanisch zerkleinert und gespült; wobei kleine Gewebestückchen nur kurzer Enzym-Einwirkzeiten zur Zellvereinzelung bedürfen. Die sich anschließende enzymatische Trituration erfolgt bei 37°C.

Die Gewebestücke werden kurz und alternierend mit 2 verschiedenen Enzymlösungen behandelt. Viele kurze Enzymbehandlungen sind besonders zellschonend und das Wechseln der Enzyme ermöglicht schrittweise ein Auflösen des Gewebeverbandes. Auf eine 5min Behandlung mit (1) 0.05% Trypsin/0.54mM EDTA in Hanks (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) erfolgt stets eine Inkubation mit (2) 0.1% Kollagenase 2 und 0.005% DNase I in HBBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺).

Die Gewebestücke werden mit 5ml Enzimlösung bei 37°C geschüttelt, der Überstand entnommen und sofort mit F-12-Medium (10% FBS/PAA, 5% Hühner Serum, 26.2mM NaHCO₃, 2.7mM CaCl₂, 2mM L-Glutamin, 10U/ml Pen/Strep, 0.02mg/ml Gentamycin) versetzt. Lediglich der erste Überstand wird aufgrund seines hohen Anteils an toten Zellen sowie Blutzellen verworfen. Ein sofortiges Waschen und Abzentrifugieren der vereinzelten Zellen (5min, 1000U/min) schützt vor weiterer Enzymaktivität. Nach ca. 4 Zyklen sind alle Zellen aus dem Gewebeverband gelöst und die Zellüberstände werden gepoolt. Um restliche Gewebestückchen zu entfernen, wird die gesamte Zellsuspension durch einen Nylonfilter mit einer Porengröße von 40µm (BD Bioscience) gefiltert (HORRES et al., 1977).

Bevor die vereinzelten Kardiomyozyten in flexiblen 3D-Substraten kultiviert werden, wird der Anteil an Fibroblasten aufgrund differenzierter zelltypischer Adhäsionseigenschaften verringert (POLINGER, 1970; SIMPSON und SAVION, 1982). Da Fibroblasten wesentlich schneller als Kardiomyozyten adhärieren, wird die Zellsuspension für 30min unter

Standardbedingungen in einer 75cm² Zellkulturflasche inkubiert. Der Überstand mit den nicht-adhärierten Kardiomyozyten wird entnommen und die Zellen ausgezählt (Kap. 2.4.5). Es ist darauf zu achten, keine Erythrocyten mitzuzählen. Diese ovalen kernhaltigen Zellen sind leicht von anderen Zellen des Herzgewebes zu unterscheiden. Die durchschnittliche Zellausbeute eines embryonalen Hühnerherzens beträgt ungefähr 8 x 10⁵ Kardiomyozyten.

Abschließend wird eine 6-well-plate mit serumhaltigen F-12-Medium vorgewärmt und mit proteinbeschichteten 3D-Strukturen bestückt. Pro Substrat werden 8 x 10⁵ Kardiomyozyten zugegeben, die nach 1-2 Tagen in Kultur zu schlagen beginnen.

2.4.4 Routinezellkultur

Die Zelllinien A549, BRL, B16 und 3T3 (Kap. 2.4.1) werden unter Standardbedingungen im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dreimal wöchentlich werden die Zellen unter sterilen Bedingungen passagiert. Als Medium dient mit 10%BGS angereichertes Medium (Tab. 3). Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgt die Zellablösung durch Zugabe von 150µl Trypsin/EDTA (Tab. 3) und einer 3min dauernden Inkubation im Brutschrank. Zum Auswaschen der Trypsin/EDTA-Lösung werden die Zellen in 5ml serumhaltigem Medium aufgenommen, 5min bei 1000U/min zentrifugiert und das erhaltene Pellet erneut in serumhaltigem Medium resuspendiert. Anschließend können die Zellen auf neue, bereits mit Medium gefüllte Kulturflaschen verdünnt werden.

Primäre Fibroblasten (Kap. 2.4.2) werden ebenfalls unter Standardbedingungen in einem Inkubator, der lediglich für Primärzellkultur genutzt wird, bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dreimal wöchentlich werden die Zellen unter sterilen Bedingungen passagiert. Als Medium dient mit 10%BGS und 2% Hühner Serum angereichertes F-12-Medium. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgt die Zellablösung durch Zugabe von 150µl Trypsin/EDTA (1:10) und einer 3min dauernden Inkubation im Brutschrank. Das nach 5min bei 1000U/min Zentrifugation erhaltene Pellet wird erneut in serumhaltigem Medium resuspendiert. Jedes Umsetzen ist als Passage definiert. Primäre Fibroblasten werden für die Ausbildung von Kollagengelen bei Passage 8 eingesetzt.

Primäre Kardiomyozyten (Kap. 2.4.3) können nicht erfolgreich passagiert werden. Bereits nach der ersten Passage sind kaum schlagende kardiale Myozyten in Kultur. Die überwiegende Mehrzahl der Zellen besteht nach der Passagierung aus Fibroblasten. Auch die Zugabe von 15% Pferdeserum konnte die verstärkte Teilung von Fibroblasten nicht unterdrücken.

2.4.5 Auszählen der Zellen

Um die Zelldichte zu standardisieren, werden die Zellen vor der Aussaat mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei werden 100µl der Zellsuspension mit 100µl Trypanblau-Lösung versetzt und 10µl der Verdünnung in die Zählkammer eingefüllt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytoplasma und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen so unter dem Mikroskop leuchtend hell. Die Zellzahl lebender Zellen wird aus vier Großquadranten der Neubauer-Zählkammer (entspricht 4mm²) bestimmt. Die mittlere Zellzahl wird mit dem Verdünnungsfaktor „2“ und 10⁴ multipliziert und ergibt die Zellzahl pro ml in der Zellsuspension.

2.4.6 Inhibition intrazellulärer Kontraktilität

BRL- und B16-Zellen werden auf zweidimensionalen mikrostrukturierten Substraten (Kap. 2.2) für 1h in serumfreiem Medium vorinkubiert. Zur Reduktion intrazellulärer Kontraktilität wird das Kultivierungsmedium durch serumfreies Y-27632- oder Blebbistatin-enthaltendes Medium ersetzt. Der Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 wird für 20min mit einer Konzentration von 50µM eingesetzt (ISHIZAKI et al., 2000). Zur Inhibition von Myosin II wird Blebbistatin (LIMOUZE et al., 2004), ebenfalls mit einer Konzentration von 50µM, für 10min eingesetzt.

2.4.7 Kollagengele

Das in diesem Kapitel beschriebene Protokoll zur Herstellung von Kollagengelen ist modifiziert nach (STOPAK und HARRIS, 1982). Für das Gewebemodell wird das fibrillenbildende Kollagen I eingesetzt, das *in vivo* besonders häufig vorkommt und aus Heterotrimeren zweier identischer α1(I)-Ketten und einer α2(I)-Kette besteht (FLEISCHMAJER et al., 1990; NIYIBIZI und EYRE, 1989). Der Ansatz der Kollagen I-Stocklösung (Sigma Aldrich) erfolgt durch Verrühren von lyophilisiertem Kollagen mit steriles Bidest (pH3) über Nacht bei 4°C. Um eine vorzeitige Polymerisation zu vermeiden, ist darauf zu achten, dass die Temperatur der Stocklösung stets 4°C beträgt und der pH-Wert konstant in einem saueren Bereich liegt.

Die Kollagen I-Gebrauchslösung wird bei 4°C wie folgt hergestellt: 5 Volumenteile (VT) Kollagenlösung, 2 VT 5 x F-12-Medium mit 20mM HEPES, 0.02mg/ml Gentamycin, 10U/ml Pen/Strep, 1 VT Serum (8% BGS Gold, 2% Hühner Serum), 1.5 VT PBS und 0.5 VT 1M NaOH. Für ein optimales Auswachsen der Zellen ist der pH-Wert der Gebrauchslösung auf 7.4 einzustellen. Die Endkonzentration von Kollagen I im Gel beträgt 1.5mg/ml.

12-Well-Kulturplatten werden mit einer ca. 5mm-Schicht Polydimethylsiloxane (PDMS) ausgegossen und für 6h bei 60°C polymerisiert. Anschließend werden Stahlnadeln (Insektennadeln, Stärke1) als Haltepunkte im PDMS verankert. Als erste sogenannte „Basalschicht“ werden 750µl der Kollagengebrauchslösung gegossen und 0.5-1h bei 37°C polymerisiert. Im zweiten Schritt werden die restlichen 750µl Kollagenlösung mit 5×10^5 primären Hühnerfibroblasten (Kap. 2.4.2) über die Basalschicht gegossen. Die Kollagengele werden unter Standardbedingungen kultiviert und die Gelbildung täglich am Binokular dokumentiert. Nach ca. 7 Tagen werden die Gele 45min mit 4% PFA in PBS fixiert, 24h mit 0,1% Triton-X100 in PBS permeabilisiert und anschließend zwei Tage mit Phalloidin Alexa488 und DAPI (Tab. 6) gefärbt. Nach Entfernung der Stahlnadeln werden die Kollagengele aus der Kulturplatte entnommen und in größere PBS gefüllte Petrischalen überführt. Die Gele werden im Anschluss am Fluoreszenzbinokular Lumar V12 fotografiert und die Einzelbilder mit Hilfe von Photoshop zusammengesetzt.

Zur Anfertigung von Präparaten werden die Kollagengele in Mowiol eingebettet. Als Spacer dienen ca. 5mm breite Objektträgerstreifen. Bei Bedarf können weitere 170µm hohe Deckglasstreifen eingesetzt werden. Größere Vergrößerungen werden mit einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop (Axioplan) oder ApoTome erstellt.

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Ablauf

Die Zellen werden bei Raumtemperatur für 10min mit 4% PFA in PBS fixiert und anschließend 3 x 5min mit 0,1% Triton-X100 in PBS gewaschen und permeabilisiert. Anschließend werden die Primärantikörper 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Primärantikörper werden in 1% BSA in PBS verdünnt. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschritt mit 0,1% Triton-X100 in PBS erfolgt die Inkubation mit Sekundärantikörpern ebenfalls für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Dabei handelt es sich um fluoreszenzmarkierte F(ab)₂-Fragmente, die wie die Primärantikörper in 1% BSA in PBS verdünnt werden. Für die Färbung des Aktin-Zytoskeletts und des Zellkerns wird dem Sekundärantikörper-Mix fluoreszenzmarkiertes Phalloidin oder DAPI zugegeben. Abschließend wird nochmals 3 x 5min mit 0,1% Triton-X100 in PBS gewaschen und die Präparate in Mowiol eingebettet. Als Spacer werden ca. 5mm breite Streifen von 70µm hohen Dünngläsern (Schott, Jena) verwendet.

Das Einbetten ist sowohl auf Objektträgern als auch auf Deckgläsern möglich. Vorteil beim Einbetten von 3D-Strukturen auf Deckgläsern ist die Mikroskopie sowohl von der Unter- als auch von der Oberseite der Struktur. So kann der Verlust an Fluoreszenzsignal

hoher Strukturen mit kleinen Gitterkonstanten kompensiert werden. Diese Präparate sind zum Mikroskopieren in eine handgefertigte Halterung für den Mikroskopisch einzuspannen, um das Durchbiegen der dünnen Deckgläser bei der Verwendung von Immersionsobjektiven zu vermeiden.

Die Präparate werden 2-3 Tage zum Aushärten des Mowials im Dunkeln bei 4°C gelagert und im Anschluss an die Konfokalmikroskopie unverzüglich wieder ausgebettet.

2.5.2 Verwendete Primär-Antikörper

Tab. 4 Verwendete Primär-Antikörper

Antigen	Antikörper-Typ	Herkunft	Verdünnung
BrdU	mkl IgG	Roche, Mannheim	1:10
cardiac actin	mkl IgG	US Biological, Swampscott/MA, USA	1:100
FAK	mkl IgG	BD Biosciences, Heidelberg	1:100
Fibronektin	mkl IgG	BD Biosciences	1:500
Fibronektin	pkl IgG	Sigma Aldrich	1:400
GM130	mkl IgG	BD Biosciences	1:400
Kollagen	pkl IgG	Abcam, Cambridge/MA, USA	1:200
Laminin	pkl IgG	Sigma Aldrich	1:100
Paxillin	mkl IgG	BD Biosciences	1:500
p-FAK (Tyr397)	pkl IgG	Biosource, Solingen	1:300
p-Paxillin (Tyr118)	pkl IgG	Cell Signaling, Danvers/MA, USA	1:400
p-Tyrosin (Tyr99)	mkl IgG	Santa Cruz, Heidelberg	1:100
Vinculin	mkl IgG	Sigma Aldrich	1:50
Vitronektin	mkl IgM	Sigma Aldrich	1:1000
α-actinin (sarcomeric)	mkl IgG	Sigma-Aldrich	1:300
α-Tubulin	IgG (Ratte)	AbD Serotec, Düsseldorf	1:200
β1-Integrin	IgG (Ratte)	BD Biosciences	1:50

2.5.3 Verwendete Sekundär-Antikörper

Tab. 5 Verwendete Sekundär-Antikörper

Antigen	Farbstoff	Herkunft	Verdünnung
Maus IgG	Alexa488	Invitrogen	1:200
Maus IgG	AMCA	Dianova, Hamburg	1:200
Maus IgG	Cy3	Dianova	1:500
Maus IgG	Cy5	Dianova	1:200
Maus IgM, μ -Kette	Cy3	Dianova	1:200
Kaninchen IgG	Alexa488	Molecular Probes	1:200
Kaninchen IgG	AMCA	Dianova	1:200
Kaninchen IgG	Cy3	Dianova	1:500
Kaninchen IgG	Cy5	Dianova	1:200
Ratte IgG	Alexa488	Invitrogen	1:200
Ratte IgG	Alexa568	Invitrogen	1:200

2.5.4 Andere Färbesubstanzen

Tab. 6 Verwendete weitere Färbesubstanzen

Farbstoff	Herkunft	Konzentration/Verdünnung
CellTracker green	Lonza, Köln	10 μ M
Phalloidin Alexa543	Invitrogen	1:200
Phalloidin Alexa488	Invitrogen	1:200
DAPI	Sigma Aldrich	1:1000

2.5.4.1 Bestimmung der Zellproliferationsrate durch BrdU-Einbau

Zur Quantifizierung der Zellproliferationsrate in harten dreidimensionalen Glassubstraten wird 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin/BrdU (Roche) zum Medium zugegeben. BrdU ist analog zu Thymidin und wird während der S-Phase des Zellzyklus in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Spezifische Antikörper gegen BrdU weisen die stattgefundene DNA-Synthese immunhistochemisch nach. Für die Bindung des Antikörpers an BrdU ist eine Denaturierung der DNA notwendig, die durch Nukleasen realisiert wird.

A549-Zellen werden in harten Fibronektin-beschichteten Gitter- und Radstrukturen in serumfreiem F-12K-Medium kultiviert. Nach 24h wird das Medium abgesaugt und für 30min durch 10µM BrdU in F-12K ersetzt. Zum Auswaschen von nicht eingebautem BrdU wird das Medium abgesaugt und die Zellen 3 x mit PBS gespült. Anschließend erfolgt die Fixierung mit Ethanol (Zugabe von 30ml 50mM Glycin-Lösung zu 70ml reinem EtOH, pH2) für 20min bei -20°C. Die Zellen werden 3 x 5min mit PBS gewaschen und 30min bei 37°C mit dem BrdU-Antikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt erfolgt die Inkubation mit dem entsprechenden fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper. Vor dem Einbetten werden die Zellen abschließend 3 x 5min mit PBS gewaschen.

Die Gesamt-Zellzahl wird mittels DAPI-Kernfärbung erfasst und der Anteil an BrdU-positiven Zellen in 3D-Gitter- und Radstrukturen prozentual ermittelt. Die Quantifizierung der in der S-Phase befindlichen Zellen auf zweidimensionalen Substraten erfolgt unmittelbar neben den 3D-Strukturen.

2.5.4.2 Färbung der gesamten Zelle mittels CellTracker

Der eingesetzte thiol-reaktive CellTracker diffundiert frei durch die Membran lebender Zellen. Im Inneren der Zelle erfolgt eine Transformation in ein zellimpermeables fluoreszierendes Reaktionsprodukt, das in den Zellen über mehrere Generationen verbleibt.

Zellen werden in Fibronektin-beschichteten 3D-Substraten für 1½h kultiviert und anschließend 10µM CellTracker in serumfreiem Medium für 30min zugeben. Nach einer sich anschließenden 30min Inkubation in CellTracker-freiem Medium erfolgt die Fixierung und immunhistochemische Färbung unter Standardbedingungen (Kap. 2.5.1).

2.6 Quantifizierung

2.6.1 Verwendete Optiken zur Analyse der Präparate

2.6.1.1 Mikroskope und Objektive

Apotom Imager Z1, Carl Zeiss, Göttingen	aufrechtes Mikroskop; Streifenprojektion mittels optischem Gitter
Axioplan, Carl Zeiss	konventionelles Mikroskop mit Durchlicht und Fluoreszenzlicht, aufrecht <input type="checkbox"/> Ph1 Plan NEOFLUAR 10x/0.30 <input type="checkbox"/> Ph2 Plan NEOFLUAR 20x/0.50

Axiovert 200M, Carl Zeiss	konventionelles Mikroskop mit Durchlicht, Fluoreszenzlicht, CO ₂ -, Temperatur- Kontrolleinheit, invers <input type="checkbox"/> EC Plan NEOFLUAR 40x/0.75
Fluoreszenzbinokular Lumar.V12, Carl Zeiss	Binokular mit Fluoreszenzlicht
LSM 510 Meta, Carl Zeiss	konfokales Laser Scanning Mikroskop, invers <input type="checkbox"/> LCI Plan NEOFLUAR 63x/1.3 DIC ImKorr
SteReo Discovery.V12, Carl Zeiss	Binokular

2.6.2 Quantifizierung zellmorphometrischer Parameter in 3D-Substraten

Alle in diesem Kapitel erläuterten zellmorphometrischen Parameter werden mittels MetaMorph® anhand konfokaler Bilderstapel quantifiziert. Die Voxelgröße bzw. die daraus resultierende Segmenthöhe beträgt zwischen 350nm und 410nm. In die Quantifizierung gehen nur Daten von Zellen ein, die vorwiegend in der dreidimensionalen Umgebung adhärieren (Volumen <5% auf zweidimensionalem Substrat bzw. Boden des 3D-Substrates).

Der überwiegende Teil der Daten wurde anhand von aktingefärbten Zellen erfasst. Da in der Zelle F-Aktin nicht homogen verteilt ist, sind z.T. manuell vereinzelte Anpassungen der mutmaßlichen Zellkontur bei Vorhandensein von „Löchern“ durch entsprechende Kontur-Verknüpfung erforderlich. „Löcher“ in der Färbung und sehr komplexe Zellformen erschweren die Erfassung dreidimensionaler Daten und bergen das Risiko zu kleiner Messwerte.

2.6.2.1 Durchschnittliche Segment-Fläche

In jedem Segment eines konfokalen Bilderstapels werden die Umrisse der aktingefärbten Zelle durch das Festlegen eines manuellen Schwellenwertes mit anschließender Kontur-Erfassung ermittelt. Das arithmetische Mittel aller daraus resultierender Segmentflächen des Stapels ergibt die durchschnittliche Segmentfläche (μm^2)

2.6.2.2 Maximal projizierte Fläche mit Länge und Breite

Durch Maximalprojektion wird die gesamte Bildinformation des Stapels in eine zweidimensionale Ebene gebracht. Die Fläche der aktingefärbten Zelle (μm^2) wird durch das Festlegen eines manuellen Schwellenwertes mit anschließender Kontur-Erfassung

quantifiziert. Gleichzeitig werden die maximale Länge der Zelle sowie perpendikular die maximale Breite der Zelle (μm) erfasst.

2.6.2.3 Volumen

Zur Volumenberechnung (μm^3) werden alle Segmentflächen eines konfokalen Bilderstapels aufaddiert und mit der Voxelhöhe multipliziert.

2.6.2.4 Oberfläche

Der Umfang aller Segmentflächen (μm) eines konfokalen Bilderstapels mit Ausnahme des ersten und letzten Segmentes wird aufaddiert und mit der Voxelhöhe multipliziert. Die Addition der ersten und letzten Segmentfläche (μm^2) ergibt die Gesamtoberfläche (μm^2) der Zelle (FELDER und KAM, 1994).

2.6.3 Zeitrafferuntersuchungen von Kardiomyozyten in flexiblen 3D-Substraten

Die Zeitraffer-Untersuchungen werden am inversen Axiovert 200M (Carl Zeiss) durchgeführt. Während der Aufnahmen kultivieren die Zellen in einer Inkubationskammer bei konstant 37°C , 5% CO_2 sowie 98% Luftfeuchtigkeit. Alle 150-700ms wird ein DIC-Bild aufgenommen und mit Metamorph verarbeitet.

Die Auslenkung dreier unterschiedlich flexibler Säulen im Ormocer®-Härtegradienten durch Kardiomyozyten wird durch Objekt-Tracking erfasst. Objekte können mit diesem Tool in einer Bildserie verfolgt und Angaben über zurückgelegte Wegstrecken, Positionen und Geschwindigkeiten erhalten werden. Die Auslenkung (μm) wird dabei gegen die Zeit (s) aufgetragen.

Die Quantifizierung der Balkenauslenkung von Ormocer®-Radstrukturen erfolgt durch einen sogenannten Linescan. Dabei wird die Grauwertverteilung der DIC-Aufnahmen entlang einer festgelegten Linie erfasst. Die Graustufen werden gegen die Auslenkung (μm) aufgetragen und anhand der Graustufen-Maxima die absolute Auslenkung pro Kontraktionszyklus ermittelt.

2.6.4 Bildverarbeitung, 3D-Rekonstruktion und Statistik

2.6.4.1 Verwendete Software zur Analyse und Auswertung

- MetaMorph® Version 6.2r6, Visitron (Puchheim)

Verwendete Tools: Threshold (Festlegen eines Intensitätsschwellenwertes), Create Regions Around Objects (Konturerfassung aufgrund Schwellenwert), Join/Cut Drawing (Verbinden/Trennen von Konturen), Region Measurements (Anzeige von Messparametern wie Fläche, Umfang, Länge, Breite ect.) , Linescan

(Grauwertverteilung entlang Linie), Track Objects (Objektverfolgung in zeitlicher Bildabfolge)

- LSM Release Version 4.2 SP1, Carl Zeiss

2.6.4.2 Verwendete Software zur 3D-Rekonstruktion

- Volocty® Version 4.3.2, Improvision, Tübingen

Verwendetes Tool: HR. Opacity Renderer; Rendering mode: Fluorescence

2.6.4.3 Verwendete Software zur Darstellung und statistischen Analyse

- Photoshop® CS2, Version 9.0.2, Adobe, München
- Office Excel 2003 SP3, Microsoft, Redmont/WA, USA
- Origin 6.0, Microcal, Bucks, UK (Durchführung eines unabhängigen T-Testes zweier Populationen auf der Signifikanzebene 0.05)

3 Ergebnisse

Ziel aller *in vitro* Zellkulturmodelle ist es, der *in vivo* Situation möglichst gerecht zu werden, und somit Parameter, die Zellwachstum und Entwicklung beeinflussen, wirklichkeitsnah im Experiment untersuchen zu können. In der Vergangenheit hat sich gezeigt, dass sowohl die geometrische Verteilung adhäsiver Liganden (CHEN et al., 1997), die Dreidimensionalität der umgebenden Matrix (CUKIERMAN et al., 2001) als auch deren Flexibilität (ENGLER et al., 2006) einen entscheidenden Anteil an Zellform und -Funktion haben. In dieser Arbeit werden Zell- und Gewebeformen in Abhängigkeit von der zweidimensionalen Geometrie untersucht und eine Methode zur Herstellung dreidimensionaler und durch Einzelzellen verformbarer Substrate vorgestellt, anhand derer das 3D-Zellwachstum verschiedener Zelltypen aus unterschiedlichen Geweben analysiert wird.

3.1 2D-Substratgeometrie beeinflusst Zell- und Gewebeform

Mittels Microcontact-Printing (μ CP) werden zweidimensionale mikrostrukturierte Substrate hergestellt, deren geometrische Mustervielfalt die Verteilung adhäsiver Signale der ECM *in vitro* simuliert (Kap.2.2). Dabei orientiert sich die Morphologie kultivierter Zellen bei Dotabständen $\leq 25\mu\text{m}$ an der Geometrie des unterliegenden Substrates (LEHNERT et al., 2004). Ähnlich zu Zellen, deren Wachstum durch adhäsive Bereiche limitiert ist, wurden schon zu Beginn der 80er Jahre Fibroblastenpopulationen in Kollagengelen kultiviert, die durch Polystyrol-Stäbchen mit der darunterliegenden Plastikkulturschale verankert wurden (STOPAK und HARRIS, 1982). Sowohl bei Einzelzellen als auch in Geweben, deren Adhäsion zweidimensional begrenzt ist, zeigten sich in der Kontur auffällige nach innen gerichtete Kreisbögen, deren Entstehung in früheren Modellen entweder durch Elastizität (FUNG, 1993) oder Spannung (INGBER, 2003) begründet wurde.

Zur Untersuchung von gemeinsamen formbestimmenden Faktoren bei Zellen und Geweben wurden im Rahmen der vorgestellten Dissertation biologische Experimente durchgeführt, bei denen zum Einen verschiedene Zelltypen auf geometrischen Substraten mit vielfältigen Dotmustern kultiviert und mittels pharmakologischer Inhibitoren gezielt der Einfluss der intrazellulären Kontraktilität untersucht wurde. Zum Anderen wurden erfolgreich Gewebemodelle nach (STOPAK und HARRIS, 1982) etabliert und modifiziert, deren zeitliche Entstehung sowie zelluläre Anordnung bezüglich der Lage im Kollagengel mikroskopisch hochauflösend untersucht wurde. Die im Anschluss erfolgte quantitative Bildanalyse, Computersimulationen und theoretische Modellierung wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Schwarz realisiert (BISCHOFS et al., 2008).

3.1.1 Kreisbogenförmige Zellen auf Substraten mit diskreten Anheftungspunkten

Parenchymale BRL-Zellen und fibroblastenartige B16-Zellen werden 80min in serumfreiem Medium auf geometrischen Mustern mit Dotkantenlängen zwischen 0.5 - 3 μ m und Abständen zwischen 5 - 25 μ m (Abb. 7) kultiviert und anschließend fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Über den Fibronektin-Dots bilden sich Zellkontakte aus (Abb. 7: Paxillin, Abb. 8b, d: Phospho-Tyrosin, Abb. 8c: Vinculin), die durch Aktinfilamente verbunden sind. Dots einer Größe bis zu 3 μ m² werden über ihre gesamte Fläche zu Kontaktbildung genutzt, während 12 μ m² große Dots nur teilweise und hauptsächlich entlang ihrer Kanten eine zelluläre Kontaktbildung aufweisen (LEHNERT et al., 2004).

Auffällig ist, dass Aktinfilamente, die die Kontur der Zelle festlegen, eine nach innen gerichtete kreisbogenförmige Gestalt annehmen, deren Radien bei geringen Dotabständen kleiner sind als bei größeren diagonalen Dotabständen (Abb. 7b2, c2). Auf homogen beschichteten Substraten spreaden parenchymale BRL-Zellen zwar kreisrund (Abb. 16e, f), fibroblastenartige B16-Zellen (LEHNERT, 2003), embryonale SV-T2 Mausfibroblasten (BAR-ZIV et al., 1999) und epitheliale RPE1-Zellen (THÉRY et al., 2006) bilden dagegen auch auf homogenen Substraten ohne geometrische Adhäsionspunkte konkave Kreisbögen aus.

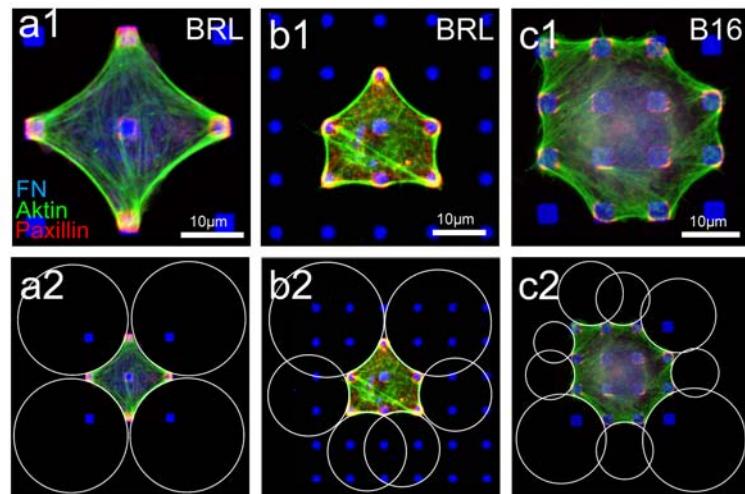


Abb. 7 Kreisbogenförmige Zellkontur auf geometrischen Substraten

a1,-b1) Parenchymale BRL-Zellen und **c1)** fibroblastenartige B16-Zellen kultivieren 80min auf zweidimensionalen mikrostrukturierten Substraten. Nach der Fixierung erfolgt eine immunhistochemische Färbung (Fibronektin/blau, Aktin/grün, Paxillin/rot). **a1-c1)** Zellen spannen sich mit kreisbogenförmiger Zellkontur geometrisch zwischen Fibronektin-Dots auf. **a2-c2)** Durch ein Programm automatisiert angelegte Kreise stimmen mit der durch Aktinfilamente bestimmten Zellkontur überein. Kreisbögen, die sich zwischen diagonalen Distanzen aufspannen, weisen größere Radien auf als Kreisbögen zwischen kleineren Dotabständen (BISCHOFS et al., 2008).

Die in Abb. 7 gezeigten Zellen haben nach 80min in Kultur ihre endgültige Zellform bereits angenommen und migrieren kaum noch. Auch nach sechs Stunden Kultivierungszeit sind die charakteristischen Aktinfilamente der Zellperipherie sowohl bei BRL-Zellen (Abb. 8b) als auch B16-Zellen (Abb. 8d) kreisbogenförmig nach innen gerichtet. Trotz des Verzichtes auf Serum aufgrund der darin enthaltenen undefinierten Wachstumsfaktoren sekretieren die Zellen verstärkt Proteine und modifizieren so die Substratgeometrie. Aufgrund des stationären Zellverhaltens auch nach kurzer Zeit und der geringeren zellbedingten Geometrieänderung wurden die Kreisbögen von BRL- und B16-Zellen nach 80min Kultivierung quantitativ ausgewertet (Kap.3.1.3).

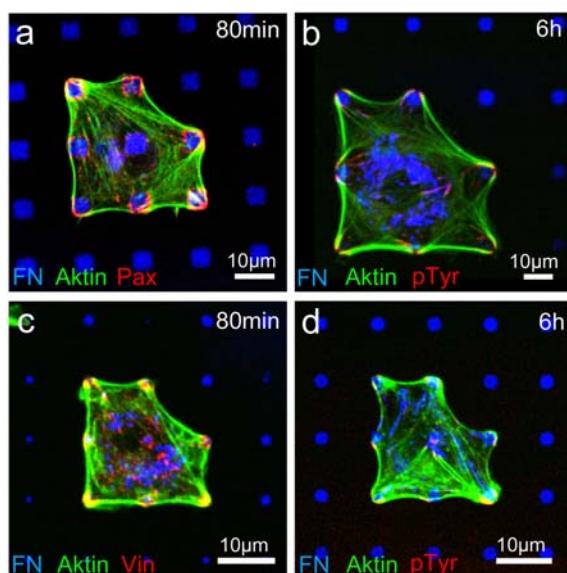


Abb. 8 Nach Kurzzeitkultivierung ist Migration abgeschlossen

a-b) BRL-Zellen und c-d) B16-Zellen kultivieren a-c) 80min und b-d) 6h auf mikrostrukturierten Substraten, werden fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Fibronektin/blau, Aktin/grün, Paxillin, Phospho-Tyrosin, Vinculin/rot). Das Zellsprewing ist nach 1h abgeschlossen. Die Zellen sind stationär und migrieren kaum. Der Vergleich beider Zelltypen nach 80min und 6h Kultivierung zeigt keine Unterschiede in der Ausbildung der kreisbogenförmigen Zellkontur (BISCHOFS et al., 2008).

3.1.2 Kreisbogenförmige Gewebe in Gelen mit diskreten Anheftungspunkten

Eine ähnliche kreisbogenförmige Kontur wird nicht nur bei Einzelzellen, sondern auch im Gewebemodell ausgebildet. Die im folgenden Kapitel gezeigten Gewebemodelle sind an Experimente von (STOPAK und HARRIS, 1982) angelehnt, zeigen jedoch in einigen Punkten wesentliche Modifikationen. Zum Einen dienen hier als Anheftungspunkte nicht mit der Plastikpetrischale verschmolzene Polystyrol-Stäbchen, sondern Stahlnadeln, die in eingegossenes und auspolymerisiertes PDMS gedrückt werden. Somit wird die gezielte

Anordnung der Adhäsionspunkte erleichtert, da das Schmelzen von Plastikstäbchen über dem Bunsenbrenner schwierig zu kontrollieren und die resultierende Verankerung wenig stabil ist. Inertes PDMS und rostfreie Nadeln aus Stahl sind zudem hervorragend für Zellkulturexperimente geeignet. Zum Anderen ist die Anordnung der Zellen nach Gelkontraktion und Bogenentstehung hochauflösend in optischen Schnitten aufgezeigt.

Aus einem acht Tage alten Hühnerembryo präparierte Fibroblasten (Kap.2.4.2) werden mehrere Tage in einer Kollagenmatrix kultiviert, die durch Nadeln im planaren, mit PDMS überschichteten Petrischalenboden fixiert ist (Kap.2.4.7). Das Kollagen I aus dem Rattenschwanz geliert und wird durch die Fibroblasten kontrahiert. Das anfänglich homogen in der Petrischale verteilte Kollagen wird dabei zusammengezogen (Abb. 9). Der entstehende zelluläre Zug ist so stark, dass das Gel im Bereich der eingesteckten Nadeln einreißt (Löcher Abb. 11a). Diese starken Kontraktionskräfte wurden auch in früheren Arbeiten mit Rinderhautkollagen beobachtet (STOPAK und HARRIS, 1982). Hinweise auf die Ausbildung sehr großer zellulärer Kräfte liefert auch ein erstes Experiment mit flexiblen PDMS-Säulen, die während der Kontraktion in die Richtung der Gelmitte ausgelenkt werden, wobei die Gelkontur im Vergleich zu harten Stahlnadeln weniger klar ausgeprägt ist (nicht gezeigt).

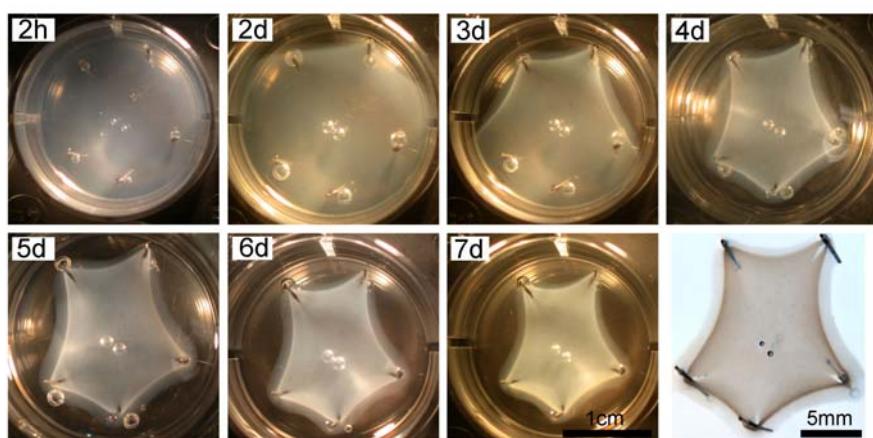


Abb. 9 Dynamische Entstehung von Kreisbögen im Kollagengel

Zeitserie der Kultivierung von primären Fibroblasten im Kollagengel (Kollagen I; Rattenschwanz, engl. rat tail). Nach 2h sind Zellen und Kollagen homogen verteilt. Stahlnadeln, die im darunterliegenden PDMS verankert sind, dienen als Fixpunkte und leisten den zellulären Kräften Widerstand. Nach einigen Tagen bildet sich die kreisbogenförmige Form des Geles entsprechend der vorgegebenen Fixpunkten aus. Nach 7 Tagen erfolgt die Fixierung (letztes Bild) (BISCHOFS et al., 2008).

Die Kontur des Kollagengeles wird durch die zellulären Kontraktionskräfte kreisbogenförmig nach innen gerichtet und ist durch die Geometrie der Stahlnadeln bestimmt. Kollagengele, die keine kontrahierenden Zellen enthalten, bleiben homogen

verteilt. Die Verformung des Geles ist daher nicht auf Dehydratisierung oder Schrumpfungseffekte zurückzuführen (Abb. 10a). Bei Zellkultivierung in einem Kollagengel ohne Adhäsionspunkte wird das Gel während der ersten zwei Tage isometrisch kontrahiert (Abb. 10b), wobei die Gelperipherie strukturell dichter erscheint. Nach einer Woche hat sich das Volumen des Gels dramatisch verkleinert und die Kontraktion führte zur Einstülpung der Geles. Die zeitliche Entstehung der Bögen kann durch Zugabe einer höheren Zellzahl oder Kultivierung in einer Matrix mit geringerer Kollagenkonzentration beschleunigt werden. Zu hohe Zelldichten führen zwar zu einer schnelleren Ausbildung von peripheren Kreisbögen, lassen das System jedoch auch vorzeitig, möglicherweise aufgrund von Nährstoff- und Platzmangel in der Matrix, kollabieren. Die optimale Zelldichte in einer 12-well-Platte beträgt zu Beginn des Experiments 5×10^5 Fibroblasten, die in einer Kollagenmatrix mit einer Konzentration von 1.5mg/ml Kollagen kultivieren.

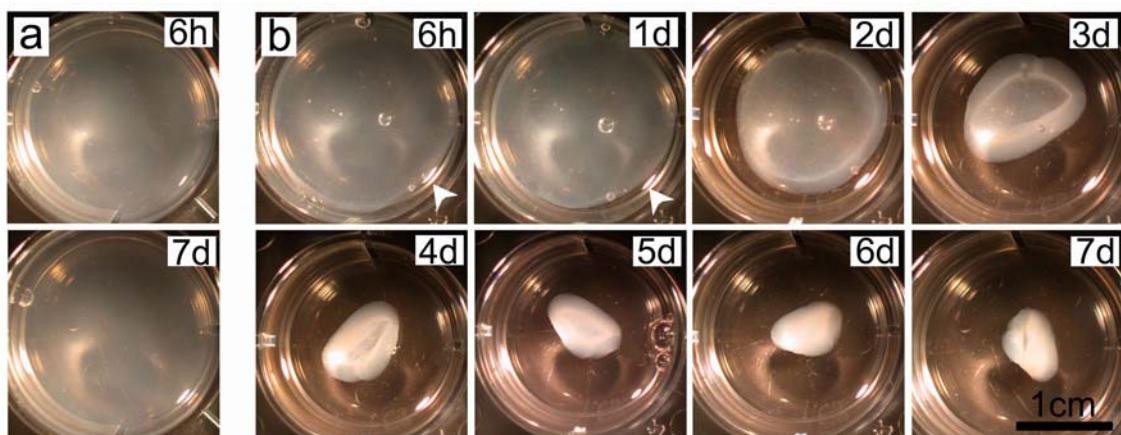


Abb. 10 Kollagengele ohne Zellen bzw. mit Zellen ohne Adhäsionspunkte

a) Zeitserie der Kollagenkontrolle ohne sich kontrahierende Zellen. Das Kollagengel ist auch nach einer Woche homogen verteilt und zeigt keine Dehydratisierungs- oder Schrumpfungseffekte. b) Zeitserie eines Kollagengels mit primären Fibroblasten ohne Nadeln. Während der ersten zwei Tage erfolgt eine isometrische Kontraktion mit kompakter erscheinender Peripherie. Nach einer Woche ist das Gelvolumen dramatisch verkleinert und das Kollagengel ist eingestülpft.

Primärer Zellpopulationen unterliegen immer Schwankungen, verursacht beispielsweise durch individuelle Unterschiede in der Embryonalentwicklung des organentnommenen Tieres oder Abweichungen während Zellpräparation. Stabile Zelllinien bieten daher eine gute Alternative. Die Gelkontraktion ist bei Kultivierung parenchymaler BRL-Zellen und Aktin-EGFP transfizierter B16-Zellen jedoch deutlich weniger stark im Vergleich zu Primärzellen ausgeprägt (nicht gezeigt). Da Zelllinien scheinbar nicht genügend Zugkräfte für die Gelkontraktion aufbringen können, bieten möglicherweise transient transfizierte

primäre Fibroblasten eine Alternative, um die Ausrichtung und Anordnung sowie Teilung der Zellen während der Gelkontraktion beobachten zu können. Die Anordnung der Zellen könnte mittels Aktin- oder Zytoplasmafluoreszenz, die Zellteilung beispielsweise durch Kernfluoreszenz untersucht werden. Denkbar ist ebenfalls der Einsatz thiol-reaktiver CellTracker, die auch eine Langzeitfärbung über mehrere Tage ermöglichen.

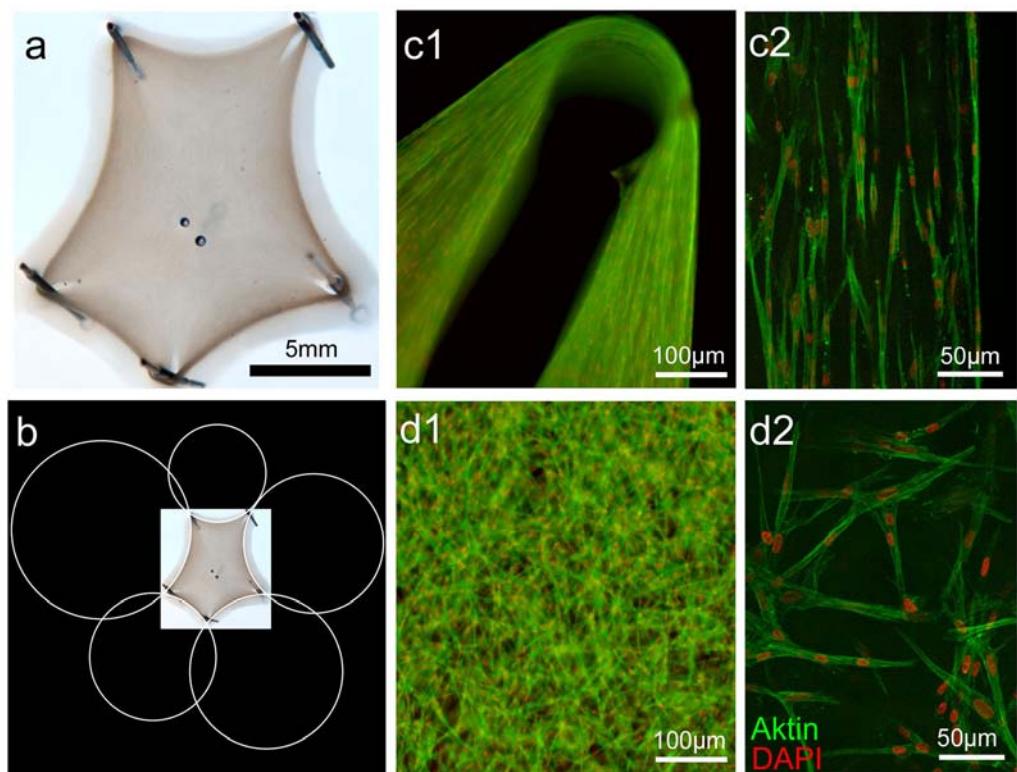


Abb. 11 Kreisbogenförmige Gewebekontur im Kollagengel

a) Primäre Fibroblasten werden über mehrere Tage im Kollagengel (Kollagen I, Rattenschwanz, engl. rat tail) kultiviert, dass durch Stahlnadeln mit dem darunterliegendem PDMS verankert ist. Wie bei Einzelzellen auf mikrostrukturierten Substraten ist die Kontur des Kollagengeles kreisbogenförmig. b) Die durch die Gelperipherie definierten Kreisbögen stimmen mit Kreisen überein, die durch ein Programm automatisiert angelegt werden. Von Zellen durchwachsene Kollagengele werden fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Aktin/grün, Zellkerne/rot). Höhere Auflösungen werden durch c1-d1) Weitfeldfluoreszenzmikroskopie und c2-d2) optische Schnitte mittels ApoTome erzielt. c1-c2) Periphere Zellen in der Nähe des durch hohe zelluläre Zugkräfte entstandenen Loches im Gel im rechten oberen Bildausschnitt aus a) sind längs ausgerichtet und parallel angeordnet. d1-d2) Zellen innerhalb des Kollagengeles sind zufällig verteilt (BISCHOFS et al., 2008).

Frühere Phasenkontrastbilder mit Rinderhautkollagen ließen parallel ausgerichtete Zellen im Randbereich erkennen, die sich bei andauernder Kontraktion immer dichter anordneten (STOPAK und HARRIS, 1982). Weitfeldfluoreszenzaufnahmen und optische Schnitte immunhistochemisch gefärbter Rattenschwanzkollagen-Gele zeigen die gleiche Zellanordnung (Abb. 11). Fibroblasten in der Peripherie der Kollagenmatrix sind längs

ausgerichtet und parallel angeordnet (Abb. 11c1, c2). Innerhalb des Kollagengeles sind die Zellen dagegen isotropisch verteilt (Abb. 11d1, d2). Diese Zellverteilung lässt Parallelen zu Einzelzellen erkennen, bei denen Aktomyosinfilamente in der Peripherie ebenfalls längs ausgerichtet, in der Zelle dagegen isotropisch verteilt sind (Abb. 7).

3.1.3 Quantitative Auswertung von Zell- und Gewebeform

Die in diesem und im folgendem Kapitel gezeigte quantitative Bildanalyse, Computersimulationen und Modellierungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Schwarz entwickelt und durchgeführt (BISCHOFS et al., 2008).

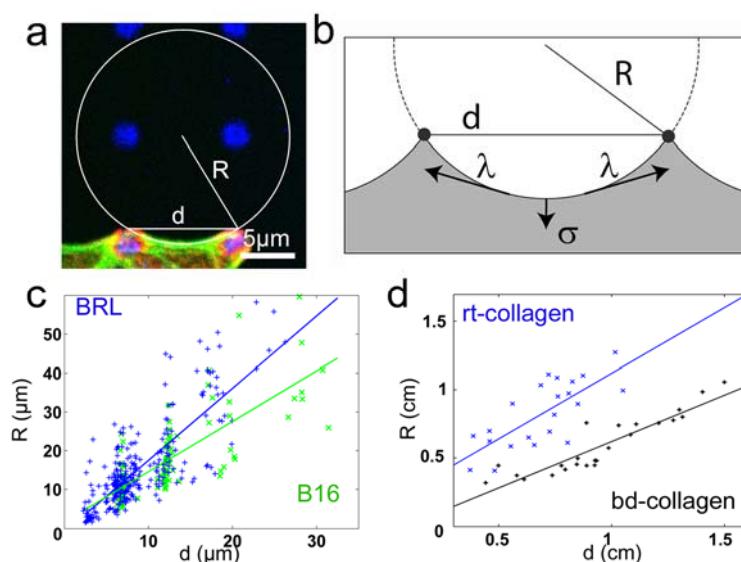


Abb. 12 R-d/Korrelation bei Einzelzellen und Gewebe

a) Für jeden Kreisbogen werden Radius R und Abstand d ermittelt. **b)** Einfaches Spannungsmodell/Simple Tension: die Linienspannung σ versucht die Kontur zwischen zwei Adhäsionspunkten zu begradigen, die Oberflächenspannung δ dagegen zieht ins Innere. Im mechanischen Gleichgewicht ist der Radius der Kontur ($R = \lambda / \delta$) unabhängig vom Abstand d . **c)** Bei zwei verschiedenen Zelllinien BRL/blau (91 Zellen) und B16/grün (38 Zellen) nimmt der Bogenradius R mit dem Abstand d zu. **d)** Auch im Gewebemodell bei der Kultivierung primärer Fibroblasten in zwei verschiedenen Kollagentypen nimmt der Bogenradius R mit dem Abstand d zu. Rattenschwanzkollagen/blau (engl. rat tail collagen; 22 Datenpunkte); Rinderhautkollagen/schwarz (engl. bovine dermis collagen; 24 Datenpunkte). Eingezeichnete Linien verdeutlichen Anstieg (BISCHOFS et al., 2008).

Eine automatisierte quantitative Erfassung von Zell- und Gewebeformen wurde durch computergesteuertes Anlegen von Kreisen an Konturen sowohl von Einzelzellen als auch von Geweben ermöglicht, wobei von allen vermessenen Bögen der Radius R und der Dotabstand d angegeben sind (Abb. 12a). In die Auswertung gingen neben parenchymalen BRL- und fibroblastenartigen B16-Zellen mit ansteigenden Dotabständen

(Abb. 12c) auch Fibroblastenpopulationen in Rattenschwanzkollagen (engl. rat tail/rt) und Rinderhautkollagen (engl. bovine dermis/bd) mit verschiedenen Nadelabständen (Abb. 12d) ein. Die Kreisbögen aus dem Rinderhautkollagen-Gel wurden aus der Arbeit von (STOPAK und HARRIS, 1982) ausgewertet. Sowohl bei Einzelzellen als auch im Gewebemodell nimmt der Radius R der kreisbogenförmigen Kontur mit dem Abstand d der Adhäsionspunkte zu.

3.1.4 Spannungsarten und Computersimulationen

Die Ausbildung von Kreisbögen weist auf die Anwendbarkeit des Laplace Gesetzes hin, das die Form unbelebter Materie wie beispielsweise Seifenblasen in drei Dimensionen bestimmt. Dabei verkleinert die Oberflächenspannung die Fläche der Seifenblase und der dabei im Inneren der Blase entstehende Druck wirkt dieser Kraft entgegen. Beide Kräfte werden an jedem Punkt ausbalanciert, so dass die Seifenblase eine kugelige Gestalt annimmt.

Die hier gezeigten Experimente von kultivierten Zellen auf strukturierten Substraten bzw. Zellpopulationen im festgesteckten Kollagengel entsprechen eher einer zweidimensionalen Situation, die eine Anpassung des Laplace-Modells erfordert. In diesem Zusammenhang stimmen die nach innen gerichteten Kräfte, die die projizierte Fläche verkleinern, mit einer Oberflächenspannung δ überein. Dem entgegen wirkt die Linienspannung α , die aus dem Widerstand zur Konturverlängerung entsteht. Die Kräfte werden an jedem Punkt der Kontur ausgeglichen und lassen für alle entstehenden Bögen denselben Radius unabhängig vom Abstand erwarten.

Bei Einzelzellen enthält die Oberflächenspannung möglicherweise Anteile des Aktinkortex und der Plasmamembran, die die gesamte Zelle umspannen und bei Limitierung des Wachstums durch distinkte Adhäsionspunkte seitlich kontrahieren. Diese kontraktilen Effekte sind an der Zellbegrenzung ebenso wie zusätzliche Effekte der peripheren Aktinfilamente an der Entstehung der Linienspannung beteiligt. Kontraktion in der Peripherie, ausgelöst durch Myosin-II-Motoren und Aktinfilamente, tragen aktiv zur Linienspannung bei. Beim Gewebemodell sind Oberflächen- und Linienspannung durch die räumliche Verteilung der kontraktilen Zellen im Kollagen bestimmt. In der Kollagenperipherie sind die Zellen parallel ausgerichtet (Abb. 11c1, c2) und leisten einen Beitrag zur Linienspannung. Innerhalb der Kollagenmatrix sind die Zellen dagegen willkürlich verteilt (Abb. 11d1, d2) und haben Anteil an der isotropischen Oberflächenspannung.

Für ein besseres Verständnis wurden Computersimulationen durchgeführt, bei denen das Einfache Spannungsmodell (“simple tension model”) durch elastische Komponenten erweitert ist. Sowohl im Einzelzell- als auch im Gewebemodell wird interne Spannung durch kontraktile Elemente in einem filamentösen Netzwerk erzeugt. Myosinmotoren ziehen am Aktinzytoskelett und Fibroblasten üben auf das Kollagengel Kräfte aus. Unter der Annahme, dass der Kontraktilität nicht nur eine einfache Linienspannung entgegenwirkt, sondern die Elastizität eines filamentösen Netzwerkes, werden Computersimulationen durchgeführt. Dabei wird die Kontur eines simulierten mechanischen Netzwerkes, dessen Ecken befestigt sind, unter isometrischer Kontraktion nach innen gezogen. Das Ausmaß dieser Kontraktion wird durch den elastischen Widerstand des Netzwerkes bestimmt. Unter der Annahme eines vollelastischen Netzwerkes, bestehend aus harmonischen Federn, entstehen Bögen, die jedoch nicht kreisförmig sind, und deren Form von der Geometrie und Topologie des Netzwerkes abhängt. Nur Simulationen in einem Kabelnetzwerk führen zur Ausbildung kreisbogenförmiger Konturen, deren Ausbildung unabhängig von der Geometrie oder Netzwerktopologie ist. Kabel sind unter Zug dehnbar wie harmonische Federn, leisten bei Kompression bzw. Druck jedoch keine Gegenkräfte (COUGHLIN und STAMENOVIC, 2003). Es ist bekannt, dass Filamente, aus denen das mechanische Netzwerk besteht (Aktinfilamente beim Einzelzellmodell, Kollagenfilamente beim Gewebemodell), unter Kompression gestaucht und gekrümmmt werden (BERRO et al., 2007; MESHET et al., 2005).

3.1.5 Spannungs-Elastizitätsmodell (engl. tension-elasticity model)

Um die Bedingungen in der Kontur mit einzubeziehen, wird das beschriebene Modell des filamentösen Netzwerkes zu einem sogenannten Spannungs-Elastizitätsmodell (engl. tension-elasticity model) erweitert, wobei das Konzept von Linienspannung und Oberflächenspannung bestehen bleibt. Da Zellen und Gewebe eine strukturell verstärkte und kontraktile Kontur aufweisen, wird eine elastisch modifizierte Linienspannung eingeführt. Die Linienspannung wirkt im erweiterten Modell durch zwei Kontrollwege der Oberflächenspannung entgegen. Zum einen wird die Zellform durch den „Elastizitätskontrollweg“ (engl. elasticity control) bestimmt. Durch verdickte Aktinfilamentbündel wird die Peripherie strukturell verstärkt und deren Steifigkeit nimmt somit zu. Der „Spannungskontrollweg“ dagegen (engl. tension control) nimmt über die Kontraktilität Einfluss auf die Kontur. Gesteigerte Kontraktilität in den Aktinfilamentbündeln führt zu Filamentkontraktionen und somit einer Abnahme der Konturlänge, wodurch die Spannung in der Peripherie erhöht wird. Vorhersagen des Spannungs-Elastizitätsmodells stimmen mit Computersimulationen des Kabelnetzwerkes überein.

Beide Kontrollmechanismen können unabhängig voneinander die $R(d)$ -Abhängigkeit simulieren, die experimentelle Trennung beider Wege gestaltet sich allerdings schwierig.

3.1.5.1 Kontrolle der Linienspannung durch Elastizität

Zur Unterscheidung der Anteile von Spannung und Elastizität an der Linienspannung wurde der Einfluss der Steifigkeit bzw. die Dicke der Aktinfilamente auf die Ausbildung der Kreisbögen untersucht. Da die Filamentdicke durch die begrenzte optische Auflösung nicht vermessen werden kann, wurde die Messung einer dimensionslosen Bogenstärke S etabliert. Dabei gibt die Bogenstärke die relative Zunahme der Fluoreszenz in der Aktinfärbung im Verhältnis zur zellulären Durchschnittsfluoreszenz an.

Zu jedem Bogen wurden zusätzlich noch der Radius R und der Abstand d ermittelt. Im Durchschnitt bilden Zellen, die sich zwischen identischen Dotabständen mit dickeren Aktinbündeln aufspannen, größere Kreisbögen aus als Zellen mit dünnen Filamenten (Abb. 13). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Zellen die Linienspannung bzw. die Ausbildung der Bögen über den „Elastizitätskontrollweg“ steuern.

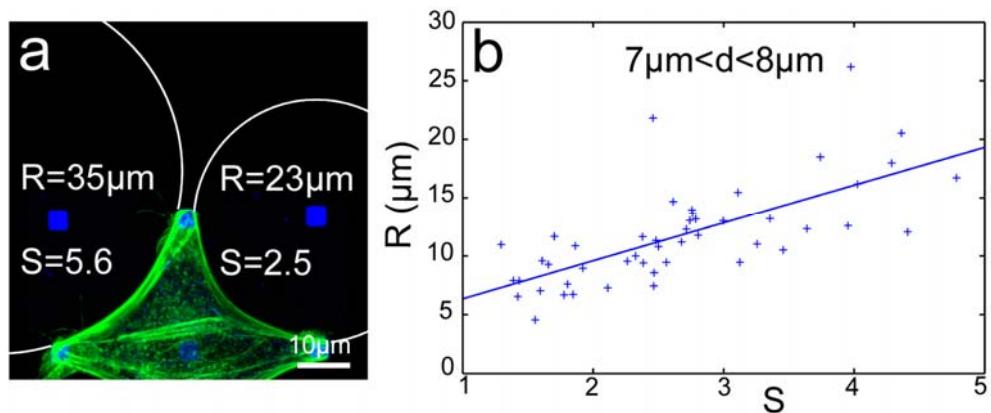


Abb. 13 Einfluss der Bogenstärke

a) BRL-Zellen werden 80min auf geometrischen Substraten in serumfreiem Medium kultiviert und Aktin (grün) und Fibronektin (blau) angefärbt. Kreisbögen mit stärkerer Fluoreszenz in der Aktinfärbung (Bogenstärke S) lassen größere Radien R vermuten als schwächere Aktinbögen. b) Korrelation zwischen Bogenstärke S und Radius R einer Distanz zwischen 7 und 8 μm . Trotz Datenstreuung bilden Zellen mit dünnen Aktinfilamenten kleinere Kreisbögen aus als Zellen mit dicken peripheren Filamenten. Die Linienspannung wird demnach über die Elastizität kontrolliert (BISCHOFS et al. 2008).

3.1.5.2 Kontrolle der Linienspannung durch Tension

Um den Einfluss der Aktin-Myosin-Kontraktilität zu untersuchen, wurden Zellen mit Y-27632, einem Inhibitor des Rho-Kinase-Signalweges (IMAMURA et al., 2000; ISHIZAKI et al., 2000) und Blebbistatin, einem Myosin-II-Inhibitor (KOVACS et al., 2004; LIMOUZE et al.,

2004), behandelt. In Beiden Fällen bilden die Zellen deutlich weniger Aktinstressfasern aus und bei zeitlich längerer Inhibition der Rho-Kinase wurden bereits verkleinerte Zellkontakte quantitativ nachgewiesen (KLEIN, 2005).

Nach Inhibition der Aktomyosin-Kontraktilität verkleinerten sich die Radien (Abb. 14). Die Linienspannung ist daher stark reduziert, wobei eine gewisse Rest-Oberflächenspannung erhalten bleibt. Beide Inhibitoren führten jedoch ebenfalls zur Entstehung von dünneren Aktinfilamentbündeln in der Peripherie. Diese strukturelle Änderung nach Hemmung der intrazellulären Kontraktilität zeigt, dass Spannung und Elastizität mechanosensitiv gekoppelt sind.

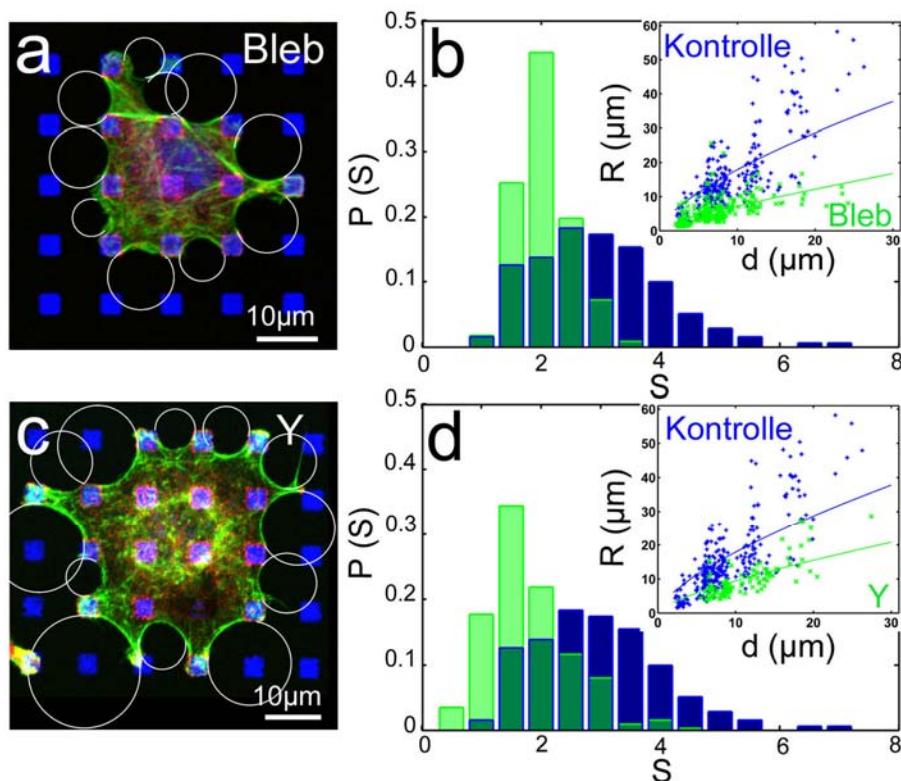


Abb. 14 Einfluss der Aktomyosin-Kontraktilität

Parenchymale BRL-Zellen werden 1h in serumfreiem Medium auf mikrostrukturierten Substraten vorkultiviert und für **a)** 10min mit 50 μ M Blebbistatin, einem Myosin-II-Inhibitor oder für **c)** 20min mit 50 μ M Y-27632, einem Rho-Kinase-Inhibitor, inhibiert, fixiert und gefärbt (Aktin/grün, Paxillin/rot, Fibronectin/blau). Die quantitativen Analysen **b, d)** zeigen, dass beide Inhibitoren zur Ausbildung kleinerer Kreisbögen führen [$R(d)$ eingefügt] und die Bogenstärke abnimmt (Kontrolle/blau, Aktomyosin-Inhibition/grün). $P(S)$ gibt dabei die Wahrscheinlichkeitsverteilung P der Bogenstärke S an. Die Bogenstärken sind nach Inhibition/grün kleiner im Vergleich zu Kontrollzellen/blau (BISCHOFS et al. 2008).

Die Reduktion der Bogenstärke ist bei beiden Inhibitionen gleich (Abb. 14b, d). Da Kontrollzellen bei gleichen Bogenstärken S jedoch größere Radien in Abhängigkeit vom

Abstand aufzeigen als inhibierte Zellen, scheint die Kontraktilität einen direkten Einfluss auf die Ausbildung der Spannung zu nehmen. Somit wird die Zellform sowohl durch Elastizität als auch durch Spannung bestimmt.

3.1.6 2D-Organisation der Mikrotubuli

Im vorgestellten Modell des filamentösen kontraktilen Netzwerkes vermitteln Aktinfilamente Spannung und Elastizität, der möglicherweise strukturgebende Einfluss der Mikrotubuli ist im Modell nicht berücksichtigt. Daher wird die Morphologie der Mikrotubuli auf zweidimensionalen Substraten in diesem Kapitel näher untersucht.

Es wurde beschrieben, dass in bestimmten Zonen von Lungenepithelzellen des Molches die Organisation und Bewegung von Mikrotubuli- und Aktinfilamenten gekoppelt sind (SALMON et al., 2002) und Mikrotubuli in Zell-Matrix-Kontakten enden (KRYLYSHKINA et al., 2003). Auf homogenen Substraten zeigen BRL-Zellen in der Peripherie häufig Mikrotubuli, die ähnlich Aktinfilamenten parallel zum Leading Edge angeordnet sind (Abb. 15a2, b2). Aktinstressfasern, die die Zelle durchziehen, verlaufen jedoch ohne Bezug zu Mikrotubuli-Filamenten, die auch scheinbar zufällig in Fokalkontakten enden (Abb. 15b1).

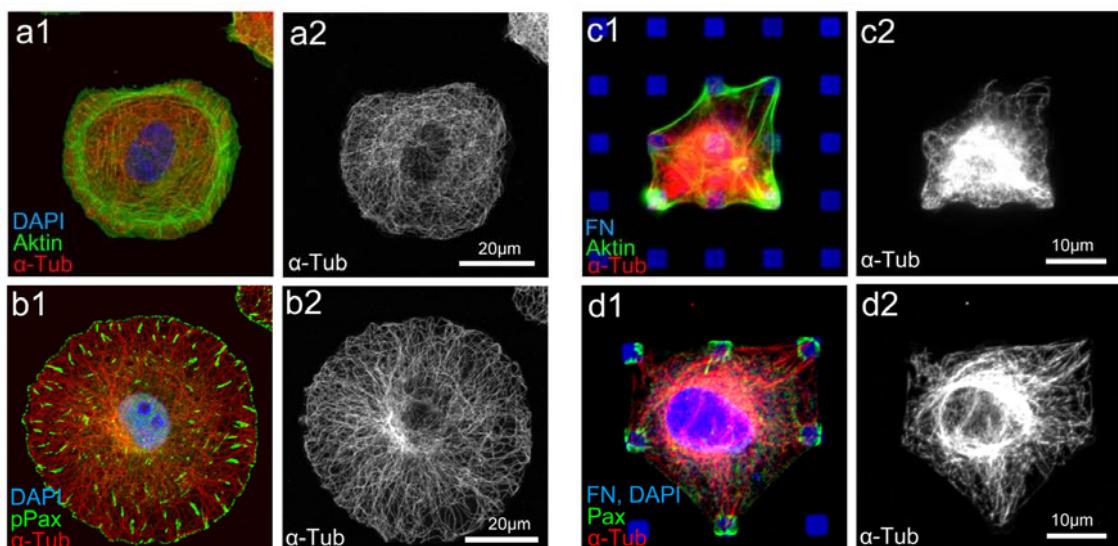


Abb. 15 Zweidimensionale Organisation der Mikrotubuli

Parenchymale BRL-Zellen werden 80min auf **a1-2, b1-2**) homogenen und **c1-2, d1-2**) mikrostrukturierten Substraten kultiviert, fixiert und immunhistochemisch angefärbt (Zellkerne und Fibronektin/blau, Aktin und Phospho-Paxillin/grün, Mikrotubuli/rot und weiß). **a1, c1)** Auf homogenen und auf strukturierten Substraten verlaufen die Mikrotubuli ungeordnet und korrelieren kaum mit Aktinfilamenten. Der Substrateinfluss auf die Mikrotubuliorganisation ist wenig offensichtlich und nur wenige Filamente verbinden zwei benachbarte Dots. **b1, d1)** Mikrotubuli enden vereinzelt in Zell-Matrix-Kontakten.

Auch auf strukturierten Substraten zeigt sich ebenfalls keine klare Korrelation von Aktin- und Mikrotubuli-Filamenten. Die Mikrotubuli verlaufen eher ungeordnet und im Gegensatz zum Aktinzytoskelett verbinden nur vereinzelt Filamente zwei benachbarte Dots miteinander (Abb. 15c2, d2). Der Substrateinfluss auf die Organisation der Mikrotubuli ist somit weit weniger offensichtlich als bei Aktinfilamenten (LEHNERT, 2003).

An der Ausbildung der strukturellen Bedingungen in der Kontur einer Zelle, die zwischen Protein-beschichteten Dots aufgespannt ist, haben Mikrotubuli morphologisch keinen klar erkennbaren Einfluss. Einzig Aktinfilamente scheinen offensichtlich an der geometrischen Formgebung beteiligt zu sein. Es ist zwar bekannt, dass Mikrotubuli Zellkontakte auflösen können (KAVERINA et al., 1999), doch spielen die dynamischen Prozesse in diesem Fall keine Rolle, da die Zellen nach bereits 80min nicht mehr migrieren. Welche stabilisierende und strukturgebende Rolle die Mikrotubuli jedoch aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften spielen, bleibt zu diskutieren.

3.2 3D-Substratgeometrie und Flexibilität beeinflussen Zellform und Verhalten

Die überwiegende Mehrzahl bisheriger *in vitro* Studien wurde auf harten und planaren zweidimensionalen Zellkultursubstraten durchgeführt. Zellen wachsen *in vivo* jedoch in einer dreidimensionalen ECM, deren Zusammensetzung, Struktur und Flexibilität sich innerhalb verschiedener Gewebetypen unterscheidet (CHAN und LEONG, 2008; GELSE et al., 2003). Die in dieser Arbeit aufgezeigte Herstellung dreidimensionaler Zellkultursubstrate durch Direktes Laserschreiben ermöglicht die *in vitro* Simulation einer komplexen zellulären Umgebung unter definierten Bedingungen. Dabei realisieren die hergestellten 3D-Strukturen eine Vielzahl von *in vivo* Eigenschaften der ECM, wie beispielsweise deren Strukturgebung und Stabilität, die Bereitstellung einer Vielzahl zelladhäsiver Moleküle zur Vermittlung von Anheftung und Wachstum sowie durch Geometrie und Flexibilität definierte physikalische Eigenschaften. Faktoren, die das Verhalten von Zellen bekanntermaßen beeinflussen, können so einzeln und gezielt in einem umfassenden System untersucht werden.

3.2.1 Dreidimensionales Zellwachstum

Dreidimensionale Substrate werden durch DLS in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Wegener hergestellt (Kap. 2.3). Der Schreibprozess ist schematisch in Abb. 16a dargestellt. Ein Fotolack wird im Laserfokus durch Zwei-Photonenabsorption belichtet, so dass jede Struktur, deren Elemente untereinander verbunden sind, in drei Dimensionen frei schreibbar ist (Abb. 16b). Nach der Entwicklung eines Negativ-Fotolackes entsteht aus ausreichend belichteten Regionen letztlich das Polymer. Basierend auf der Grundlage dieser nanophotonischen Methode sind routinemäßig Linien schreibbar, deren laterale Ausdehnung im Bereich um 100nm liegt (BUSCH et al., 2007). So können neben sogenannten topographischen „2.5D“-Substraten (Säulenfeld in Abb. 16c) auch 3D-Substrate mit beliebigen Formen realisiert werden (Radstruktur in Abb. 16d).

Auf zweidimensionalen Substraten sind die Zellen flächig ausgebreitet. BRL-Zellen erscheinen typischerweise abgerundet mit Aktinstressfasern, einem kontraktilen Aktinring und ausgeprägten Lamellipodien (Abb. 16a). Adhärente Zellen sind üblicherweise in Kernnähe über 1µm hoch und flachen im Bereich des Lamellipodiums bis zu 0.1-0.2µm ab (ABRAHAM et al., 1999). Doch nicht nur das Aktinzytoskelett ist planar ausgebreitet, auch Organellen wie der Zellkern (Abb. 16f) und der Golgi-Apparat (nicht gezeigt) erscheinen artifiziell abgeflacht.

In dreidimensionalen Substraten dagegen haben die Zellen die Möglichkeit, zusätzlich in die Höhe auszuwachsen (Abb. 16f). Abhängig von der Höhe des Substrates können sich Zellen über 20µm in die vertikale Richtung ausbreiten. Vom Zellwachstum auf strukturierten zweidimensionalen Substraten ist bekannt, dass Distanzen bis 25µm überbrückt werden (LEHNERT et al., 2004). Auch Zellorganellen wie der Kern (Abb. 16f) und der Golgi-Apparat (Abb. 16h) nehmen in 3D-Strukturen eine räumliche Form an, die je nach Substratgeometrie und resultierender Zellform äußerst vielgestaltig und variabel ist.

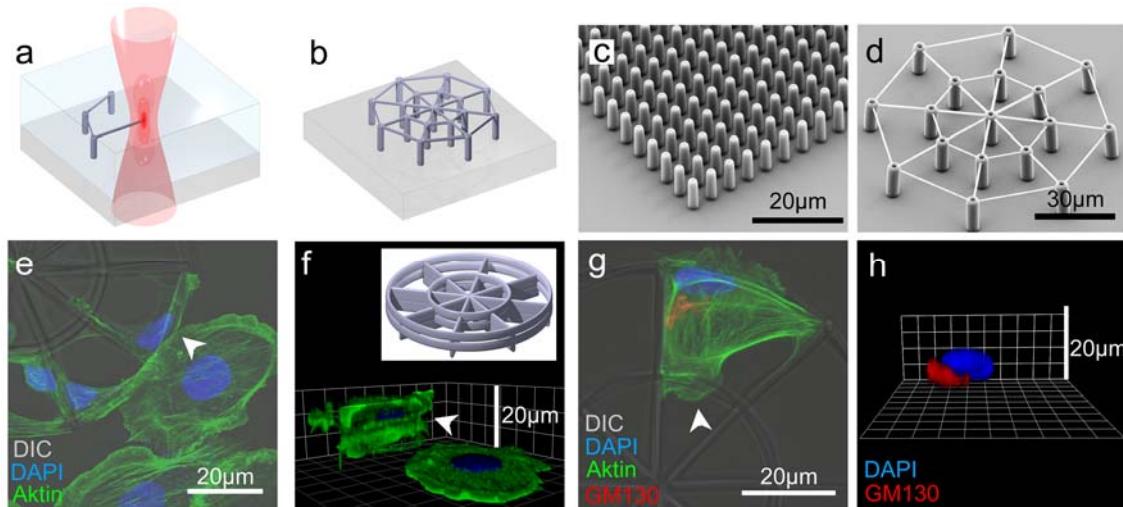


Abb. 16 Herstellung von 3D-Strukturen und 3D-Zellwachstum

a, b) Schematische Darstellung des DLS. **a)** Der Fotolack wird im Laserfokus (rot) durch 2-Photonen-Absorption belichtet. **b)** Ergebnis sind in drei Dimensionen frei schreibbare Substrate bestehend aus Linien, die untereinander verbunden sind. **c)** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (REM) eines topographischen, „2.5-D“-Ormocer®-Säulenfeldes. **d)** REM-Aufnahme einer 3D-Ormocer®-Radstruktur. **e-h)** Wachstum von BRL-Zellen in harten 3D-Glassubstraten (3D-Modell der Radstruktur in **f** eingefügt). Zellkerne (blau), F-Aktin (grün) und der Golgi-Apparat (rot) sind immunhistochemisch angefärbt. **e, g)** Maximalprojektion eines konfokalen Bilderstapels. DIC (Differentieller Interferenzkontrast) und Immunfärbung sind übereinander gelegt. **f, h)** Schrägaussichten von 3D-Rekonstruktionen konfokaler Bilderstapels. **f)** verdeutlicht das dreidimensionale Zellwachstum im Vergleich zum planaren Wachstum auf einem 2D-Substrat unmittelbar neben der 3D-Struktur. Weiße Pfeile in **e** und **f**) zeigen die gleiche Blickrichtung auf. **h)** Zellorganellen wie der Kern und der Golgi-Apparat sind in 3D-Substraten räumlich organisiert.

3.2.2 Charakterisierung des Zellwachstums in harten 3D-Strukturen

Harte 3D-Glassubstrate werden durch DLS hergestellt und weiter prozessiert (Kap. 2.3.1). Aufgrund des hohen Brechungsindex des belichteten Fotolackes, seiner störenden Autofluoreszenz und eines leichten Substrat-Ablösens unter Zellkulturbedingungen werden die Strukturen verglast und der Fotolack anschließend entfernt (Kap. 2.3.1). Im

Wesentlichen werden zwei verschiedenen Geometrien dreidimensionaler Substrate (Abb. 6), Gitter- und sogenannte Radstrukturen, hinsichtlich Biokompatibilität und Zellwachstumsverhalten untersucht. Schwerpunkte liegen dabei auf dem immunhistochemischen Nachweis der Struktur-Beschichtung mit extrazellulären Matrix-Proteinen, Untersuchungen zur Zellproliferation in 2D und 3D sowie der Erfassung von zelltypischer geometrischer Limitierung beim Einwachsen in 3D-Gitterstrukturen.

3.2.2.1 Beschichtung dreidimensionaler Substrate mit extrazellulären Matrixproteinen

3D-Substrate werden vor der Zellkultivierung mit Proteinen der Extrazellulären Matrix/ECM beschichtet (Kap. 2.3.3). In Abb. 17 ist gezeigt, dass die *in vivo* besonders häufig vorkommenden Moleküle Fibronectin, Laminin, Kollagen und Vitronektin erfolgreich an die Glas-Oberfläche binden. Mit Ausnahme von Vitronektin sind die Proteine gleichmäßig über die gesamte 2D- und 3D-Oberfläche verteilt. Nach der Zellkultur erfolgt eine immunhistochemische Färbung mit anschließender Konfokalmikroskopie.

BRL-Zellen spannen das Aktinzytoskelett dreidimensional in mit ECM-Proteinen beschichteten Radstrukturen auf (Abb. 17) und bilden in Fibronectin-beschichteten Substraten typische Zellkontakte aus (Kap. 3.2.3.2). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich 3D-Substrate erfolgreich mit bioaktiven Oberflächenmolekülen beschichten lassen, die die Anheftung und das Wachstum der Zellen vermitteln. Der Großteil der in den nachfolgenden Kapiteln erläuterten Experimente wird in Fibronectin-beschichteten Substraten durchgeführt.

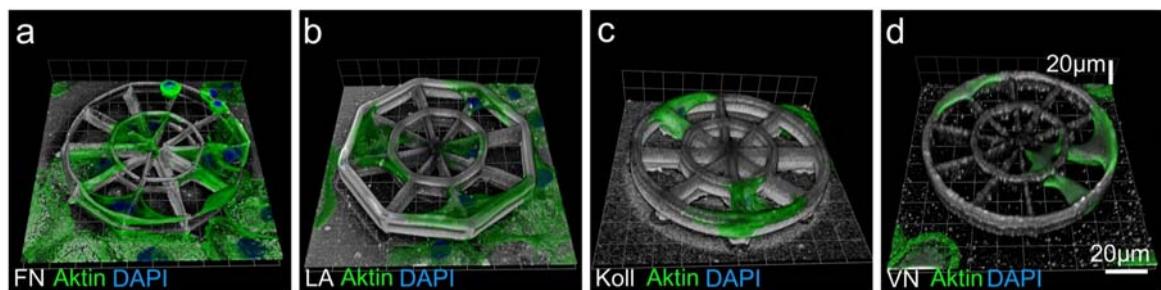


Abb. 17 Substratbeschichtung mit Proteinen der ECM

Am Beispiel harter 3D-Radstrukturen ist die Beschichtung mit einer Vielzahl an Proteinen der Extrazellulären Matrix/ECM aufgezeigt. **a-d)** 3D-Rekonstruktionen konfokaler Bilderstapel in der Schrägangsicht. Dreidimensionale Strukturen werden mit **a)** Fibronectin, **b)** Laminin, **c)** Kollagen und **d)** Vitronektin beschichtet und BRL-Zellen 2h kultiviert, fixiert und ECM-Proteine (weiß), Aktin (grün) und Kerne (blau) angefärbt.

3.2.2.2 Zellproliferation in verschiedenen 3D-Substratgeometrien

Um zu klären, ob der Ablauf grundlegender zellulärer Prozesse, wie beispielsweise Zellproliferation, auch in dreidimensionalen Substraten gewährleistet ist, wird der Anteil an A549-Zellen, die sich in der S-Phase befinden, bestimmt und mit der Zellproliferation auf zweidimensionalen Substraten verglichen. Die eingesetzten 3D-Gitter- und Radstrukturen werden vor der Aussaat der Zellen mit Fibronektin beschichtet. Anschließend werden A549-Zellen 24h in 3D-Substraten in serumfreiem F12-K-Medium kultiviert, um den Zellzyklus durch Serumentzug zu synchronisieren. Während der 30min Zugabe von BrdU wird das Thymidin-Analogon bei stattfindender S-Phase in die neu synthetisierte DNA eingebaut und nachfolgend immunhistochemisch detektiert (Kap. 2.5.4.1). Der prozentuale Anteil BrdU-positiver Zellen auf zweidimensionalen Substraten, sowohl unmittelbar neben 3D-Substraten als auch in dreidimensionalen Gitter- und Radstrukturen, ist in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 18). Die Daten von 5µm-, 10µm und 15µm-Gitterkonstanten werden ebenso wie Radstrukturen mit 8 oder 10 Innen- und Außenkompartimenten zusammengefasst. Unabhängig von der Dimensionalität und/oder Geometrie der Substrate befinden sich 35-40% der Zellen nach 24h in der S-Phase. Die Zellproliferation ist in 3D-Gitterstrukturen signifikant erhöht ($p=0.001$), in Radstrukturen jedoch vergleichbar ($p=0.569$) zur Teilungsrate auf zweidimensionalen Substraten unmittelbar neben den 3D-Substraten. Eine Verdopplung der Zellproliferationsrate wie bei der Kultivierung von Fibroblasten in einer von Zellen sezernierten 3D-Matrix (CUKIERMAN et al., 2001), ist nicht beobachtet worden.

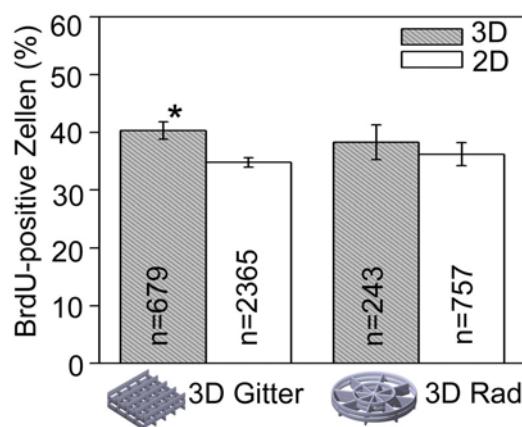


Abb. 18 Zellproliferation in verschiedenen 3D-Substratgeometrien

A549-Zellen werden 24h in serumfreiem Medium in harten Fibronektin-beschichteten 3D-Gitter- und Radstrukturen kultiviert. Nach Zugabe von BrdU mit anschließender Immunfärbung werden alle in der S-Phase befindlichen Zellen detektiert. Die prozentuale Zellzahl BrdU-positiver Zellen sowohl in 3D-Strukturen (graue Balken) als auch auf 2D-Substraten unmittelbar neben den 3D-Strukturen (weiße Balken) ist aufgezeigt. Die absolute Zellzahl BrdU-positiver Zellen (n) ist in die zugehörigen Diagrammbalken eingetragen. Der Anteil an teilungsaktiven Zellen in 3D-Gitterstrukturen ist signifikant erhöht (*), in Radstrukturen jedoch vergleichbar mit der Teilungsrate von planaren Zellen neben der 3D-Struktur ($p=0.569$).

3.2.2.3 Zellwachstum in 3D-Gitterstrukturen mit ansteigender Gitterkonstante

Zur Untersuchung geometrischer Limitierung beim Einwachsen von Zellen in dreidimensionale Substrate werden drei Zelllinien unterschiedlicher Gewebeherkunft (2.4.1) in Strukturen mit einer zunehmenden Gitterkonstante analysiert. Epitheliale A549-Zellen, parenchymale BRL-Zellen und fibroblastenartige B16-Zellen werden sowohl 2h als auch 24h in Fibronectin-beschichteten Strukturen kultiviert, immunhistochemisch gefärbt und konfokale Bilderstapel erstellt.

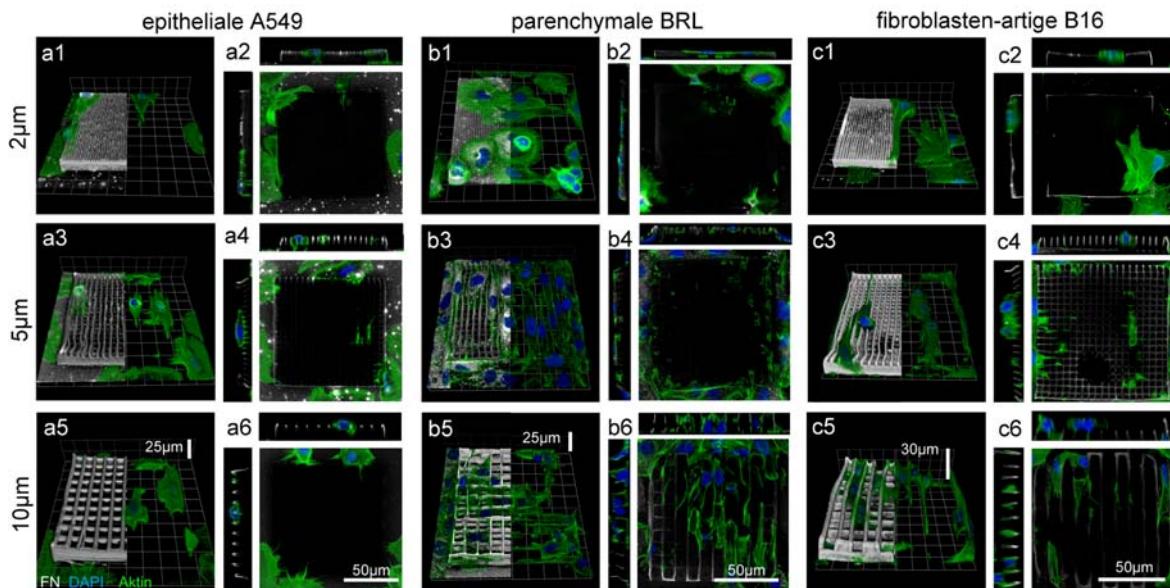


Abb. 19 Einwachsen verschiedenener Zelltypen in 3D-Gitterstrukturen

a1-a6) Epitheliale A549-Zellen, **b1-b6)** Parenchymale BRL-Zellen und **c1-c6)** fibroblastenartige B16-Zellen werden 2h in harten Fibronectin-beschichteten Gitterstrukturen mit einer Gitterkonstante von **a1-c1, a2-c2)** 2μm, **a3-c3, a4-c4)** 5μm und **a5-c5, a6-c6)** 10μm kultiviert, fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Fibronektin/weiß, Aktin/grün, Kerne/blau). **a1-c1, a3-c3, a5-c5)** Schrägangsichten konfokaler Bilderstapel in einer 3D-Rekonstruktion mit (jeweils linke Bildhälfte) und ohne (jeweils rechte Bildhälfte) die Fibronektin-Färbung. **a2-c2, a4-c4, a6-c6)** Einzelschnitte konfokaler Bilderstapel am Boden des 3D-Substrates. Die schmalen Bildausschnitte oberhalb bzw. links der Einzelschnitte zeigen entsprechend horizontale und vertikale Querschnitte durch den Bilderstapel und verdeutlichen Lage der Zellkerne. Zellen durchwachsen unabhängig vom Gewebeursprung 3D-Strukturen mit Hohlräumen ab 10μm. Jedoch zeigen Epithelzellen ein weniger invasives Einwachsen mit z.T. kleineren Projektionsflächen als parenchymale oder fibroblastenartige Zellen.

A549-Zellen spreaden auf der Oberseite von 2μm-Gittern oft länglich mit ähnlicher bis verringriger projizierter Zellfläche im Vergleich zu 2D-Substraten (Abb. 19a1, a2). Einige wenige Zellausläufer durchdringen die fein verzweigte Struktur und Zellkerne verbleiben auf der Substratoberseite. In 5μm-Gitterstrukturen (Abb. 19a3, a4) durchziehen längliche A549-Zellen wenig verzweigt die Kanäle. Die Kerne verbleiben auf der Substratoberseite.

3 Ergebnisse

Erst ab Abständen von 10µm (Abb. 19a5, a6) spreaden A549 in der 3D-Struktur, zeigen aber nur ein geringes Durchwachsen in Form weniger zellulärer Verzweigungen.

Parenchymale BRL-Zellen spreaden auf der Oberseite der 2µm-Gitterstruktur abgeflacht mir runder Morphologie ähnlich BRL-Zellen auf flachen 2D-Substraten. Die Orientierung der Aktinstressfasern ist abhängig von der Ausrichtung Gitterstreben. Die Zellkerne verbleiben auf der Oberseite des 2µm-Gitters. Aktin-enthaltende Zellfortsätze erstrecken sich in das Gitternetz (Abb. 19b1, b2). In 5µm-Gittern sind die BRL-Zellen langgestreckt und an die Geometrie der Kanäle angepasst. Längliche Zellkerne verbleiben auf der Substratoberseite und zahlreiche Zellfortsätze durchziehen die Struktur bis in Bodennähe (Abb. 19b3, b4). In 10µm-Gitterstrukturen durchwachsen BRLs die gesamte Struktur (Abb. 19b5, b6).

Fibroblastenartige B16-Zellen spreaden länglich und großflächig auf der Oberseite von 2µm-Strukturen, Fortsätze in das Gitter entsendend, wobei die Zellkerne außerhalb des engmaschigen Gitters verbleiben (Abb. 19c1, c2). Auch dieser Zelltyp kann 5µm-Gitter durchwachsen, ohne jedoch die Zellkerne innerhalb der Struktur zu lokalisieren (Abb. 19c3, c4). Das Durchwachsen der gesamten Struktur verbunden mit dem Einwandern der Zellkerne innerhalb gelingt B16-Zellen ab einer Gitterkonstante von 10µm (Abb. 19c5, c6).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Epithelzellen ein weniger invasives Einwachsen mit teilweise kleineren Projektionsflächen als parenchymale oder fibroblastenartige Zellen aufzeigen. Diese Fähigkeit ändert sich auch bei 24h Langzeitkultivierung nicht (Bilder nicht gezeigt). Zellen durchwachsen unabhängig vom Gewebeursprung 3D-Strukturen mit Hohlräumen ≥10µm. Für weitere Untersuchungen bzw. die Charakterisierung von dreidimensionalem Zellwachstum werden daher Radstrukturen verwendet, deren Grundgerüst aus Streben mit vielfältigen Winkeln und großzügigen Hohlräumen bzw. Kompartimenten besteht (Abb. 6).

Tab. 7 Untersuchte Zellzahlen beim Einwachsen in Gitterstrukturen

Zellanzahl (Zz) untersuchter epithelialer A549-, parenchymaler BRL- und fibroblastenartiger B16-Zellen nach 2h und 24h Kultivierung in Fibronectin-beschichteten Gitterstrukturen mit ansteigender Gitterkonstante

Zelltyp	2µm		5µm		10µm	
	Zz nach 2h	Zz nach 24h	Zz nach 2h	Zz nach 24h	Zz nach 2h	Zz nach 24h
A549	14	3	22	2	15	7
BRL	47	25	64	22	15	50
B16	6	17	31	105	27	47

3.2.3 Dreidimensionale Organisation intrazellulärer Komponenten

Im vorausgegangenen Kapitel 3.2.1 wurde bereits gezeigt, dass auf planaren 2D-Substraten Zellorganellen wie der Kern und der Golgi-Apparat artifiziell stark abgeflacht erscheinen. In 3D-Substraten hingegen sind diese Organellen tatsächlich dreidimensional und vielgestaltig organisiert. Im folgenden Kapitel werden weitere intrazelluläre Komponenten hinsichtlich ihrer Anordnung und Morphologie untersucht. Schwerpunkte liegen dabei auf der Untersuchung von Bestandteilen des zellulären Zytoskelettes wie Aktin- und Mikrotubuli-Filamenten sowie der Ausbildung von 3D-Zell-Matrix-Kontakten.

3.2.3.1 3D-Aktin- und Mikrotubuli-Organisation in harten Radstrukturen

BRL-Zellen zeigen sich auf zweidimensionalen homogen proteinbeschichteten Substraten nahezu kreisrund mit Aktinstressfasern, die in willkürlich in der Peripherie auftretenden Zell-Matrix-Kontakten enden (Abb. 15a1, b1). Auf strukturierten 2D-Substraten dagegen sind spreadende Zellen an vorgegebenen Fibronektin-Dots fest verankert und zeigen eine geometrische, dem Muster angepasste Morphologie. Die fixen Adhäsionspunkte werden von der Zelle kreisbogenförmig mit Aktinfilamentbündeln, die die Kontur der Zelle festlegen, überspannt (Abb. 7). Mikrotubuli scheinen dagegen morphologisch keinen strukturgebenden Anteil an der Zellkontur zu haben (Abb. 15).

In dreidimensionalen Substraten adhärieren parenchymale BRL-Zellen nicht nur an den proteinbeschichteten flächigen Streben der Radstruktur, sondern spannen sich auch frei im Raum auf (Kap.3.2.4). Die Zelle überbrückt so räumlich in drei Dimensionen relativ große Distanzen zwischen ihren Adhäsionspunkten. Auffällig ist, dass die Zellen dabei eine ebenfalls kreisbogenförmige Zellkontur ähnlich auf strukturierten 2D-Substraten aufweisen.

In Abb. 20 sind zwei typische BRL-Zellen gezeigt. Weiße Pfeile markieren das Auftreten von kreisbogenförmigen Zell-Konturen, die neben Aktinfilamentbündeln (Abb. 20a1, b1) oft auch Mikrotubuli-Filamente (Abb. 20a2, b2) aufweisen. Hierbei verlaufen die Mikrotubuli nicht in Bündeln geordnet wie oftmals Aktinfilamente. Daher geben nicht dekonvolvierte 3D-Rekonstruktionen nur begrenzt Aufschluss über die tatsächliche räumliche Anordnung dieser Zytoskelett-Komponenten. Maximalprojektionen, die die gesamte Bildinformation eines konfokalen Stapels in einer Ebene präsentieren (Abb. 20a4, b4), zeigen jedoch eine kreisbogenförmige Zellperipherie, in der neben Aktin- auch Mikrotubuli-Filamente enthalten sind, die in 3D möglicherweise neben den Aktinfilamenten ebenfalls einen strukturellen Beitrag zur Ausbildung der Zellkontur leisten.

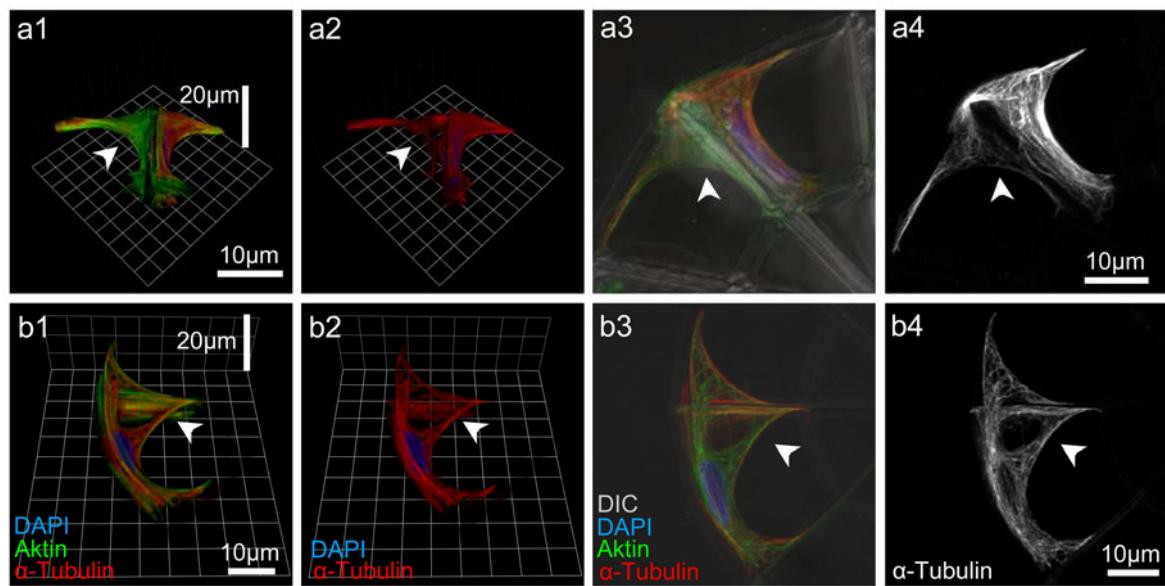


Abb. 20 Aktin- und Mikrotubuli-Organisation in harten 3D-Radstrukturen

Parenchymale BRL-Zellen werden 2h in Fibronectin-beschichteten 3D-Radstrukturen aus Glas kultiviert, fixiert und immunhistochemisch angefärbt (Kerne/blau, Aktin/grün, Mikrotubuli/rot). **a1, b1)** Schrägansichten konfokaler Bilderstapel zweier Zellen in einer 3D-Rekonstruktion mit bzw. **a2, b2)** ohne Aktin-Färbung. **a3, b3)** Maximalprojektion eines konfokalen Bilderstapels; DIC (Differentieller Interferenzkontrast) und Immunfärbung sind übereinander gelegt. Zur besseren Visualisierung der Mikrotubuli sind in **a4, b4)** die Mikrotubuli weiß dargestellt. Weiße Pfeile zeigen auf periphere Kreisbögen der Zelle. Sowohl Aktin- als auch Mikrotubuli-Filamente sind Bestandteile der dreidimensionalen Bögen, mit denen sich die Zelle im Raum aufspannt.

3.2.3.2 3D-Zell-Matrix-Kontakte in harten Radstrukturen

Es ist bekannt, dass sich die Ausbildung klassischer 2D-Kontakte von Zell-Matrix-Kontakten in 3D-Matrizes, die von Zellen sezerniert werden, unterscheidet. In solchen 3D-Strukturen wurde eine $\alpha 5$ -Integrin-abhängige verstärkte Zelladhäsion sowie das Fehlen von $\beta 3$ -Integrin und Phospho-FAK in den bis zu 19 μm langen und schmalen 3D-Kontakten gezeigt (CUKIERMAN et al., 2001). Um zu untersuchen, ob sogenannte 3D-Kontakte allein aufgrund der Dreidimensionalität eine andere molekulare Zusammensetzung aufweisen, werden epitheliale A549-, parenchymale BRL- und fibroblastenartige B16-Zellen 2h in fibronektinbeschichteten harten 3D-Substraten Radstrukturen in serumfreiem Medium kultiviert. Die Expression klassischer Kontaktmarkerproteine wie Phospho-Tyrosin (Tyr99), FAK (engl. focal adhesion kinase), Phospho-FAK (Tyr397), Paxillin, Phospho-Paxillin (Tyr118) und Vinculin wird immunhistochemisch detektiert. In Tab. 8 sind alle untersuchten Zelltypen mit den jeweils analysierten Kontaktmarkern aufgelistet, wobei in diesem Kapitel beispielhaft für alle

Zelltypen auf dreidimensionale Zell-Matrix-Kontakte von BRL-Zellen eingegangen wird. Davon sind einige ausgewählte Kontaktmarkerproteine in Abb. 21 aufgezeigt.

Auf zweidimensionalen Substraten spreaden BRL-Zellen mit runder Morphologie; wobei Aktinfilamentbündel in prominenten länglichen Zell-Matrix-Kontakten in der Zellperipherie enden (Abb. 21a1-d1). Die Phospho-Tyrosin-Färbung zeigt das Vorkommen tyrosinphosphorylierter Proteine in peripheren Zellkontakten als Marker für stattfindende Signaltransduktion. FAK ist dagegen eher diffus und schwach in der gesamten Zelle exprimiert und nur einige wenige punktförmige und längliche Kontakte sind ausgebildet (nicht gezeigt). In der Phospho-FAK-Färbung sind Zellkontakte zwar klarer ausgeprägt, wenn auch deutlich kleiner im Vergleich zu anderen Kontaktmarkerproteinen. Phospho-FAK zeigt jedoch vor allem in Kernnähe eine hohe intrazelluläre Hintergrundfärbung sowie eine unspezifische Färbung auch außerhalb der Zelle (Abb. 21b1). Das Vorkommen von Paxillin und Phospho-Paxillin korreliert (nicht gezeigt), obgleich Paxillin auch schwach diffus in der gesamten Zelle vorkommt (Abb. 21c1) und Phospho-Paxillin dagegen distinkt nur in Zell-Matrix-Kontakten ausgebildet ist (Abb. 21d1). Vinculin zeigt eine sehr starke intrazelluläre Hintergrundfärbung und Vinculin enthaltende Zell-Matrix-Kontakte sind nur sehr schwach ausgeprägt (nicht gezeigt).

Für einen besseren räumlichen Eindruck sind von den dreidimensional aufgespannten Zellen mit ausgewählter Kontaktmarker-Färbung Schrägsichten von 3D-Aktin-Rekonstruktionen gezeigt (Abb. 21a2-d2). Zellkontakte weisen allgemein eine relativ geringe vertikale Ausdehnung von ca. 150nm auf (FRANZ und MULLER, 2005). Da die vertikale Auflösungsgrenze konfokaler Bilderstapel nur rund 600nm beträgt, wird zur Darstellung dreidimensionaler Zellkontakte die Maximalprojektion verwendet, bei der die gesamte Bildinformation in eine Ebene gebracht wird (Abb. 21a4-d4). In dreidimensionalen Substraten adhärieren BRL-Zellen nicht nur an den proteinbeschichteten eher flächigen Streben der Radstruktur, sondern spannen sich auch frei im Raum auf (Kap.3.2.3.1). Aktinfilamentbündel, die zwei Adhäsionspunkte im Raum miteinander verbinden, enden vergleichbar zu Aktinstressfasern auf zweidimensionalen Substraten in Zell-Matrix-Kontakten mit klassischen Markerproteinen. Die Phospho-Tyrosin-Färbung zeigt klar das Vorkommen tyrosinphosphorylierter Proteine in 3D-Substraten (Abb. 21a4). FAK ist dagegen vergleichbar zu Zellen auf 2D-Substraten eher diffus verteilt, klare Zellkontakte sind nicht ausgebildet (nicht gezeigt). Einige wenige, Phospho-FAK enthaltende, kleinere Kontakte treten dagegen auf, die jedoch durch die Hintergrundfärbung innerhalb und außerhalb der Zelle nicht leicht detektierbar sind (Abb. 21b4). Sowohl Paxillin als auch Phospho-Paxillin sind hingegen klar exprimiert und kolokalisiert, Phospho-Paxillin mit einem deutlich geringeren intrazellulären Hintergrund

(Abb. 21c4, d4). Vinculin zeigt, wie auch auf 2D-Substraten, eine sehr starke intrazelluläre Hintergrundfärbung, und Vinculin enthaltende Zell-Matrix-Kontakte sind kaum ausgeprägt (nicht gezeigt).

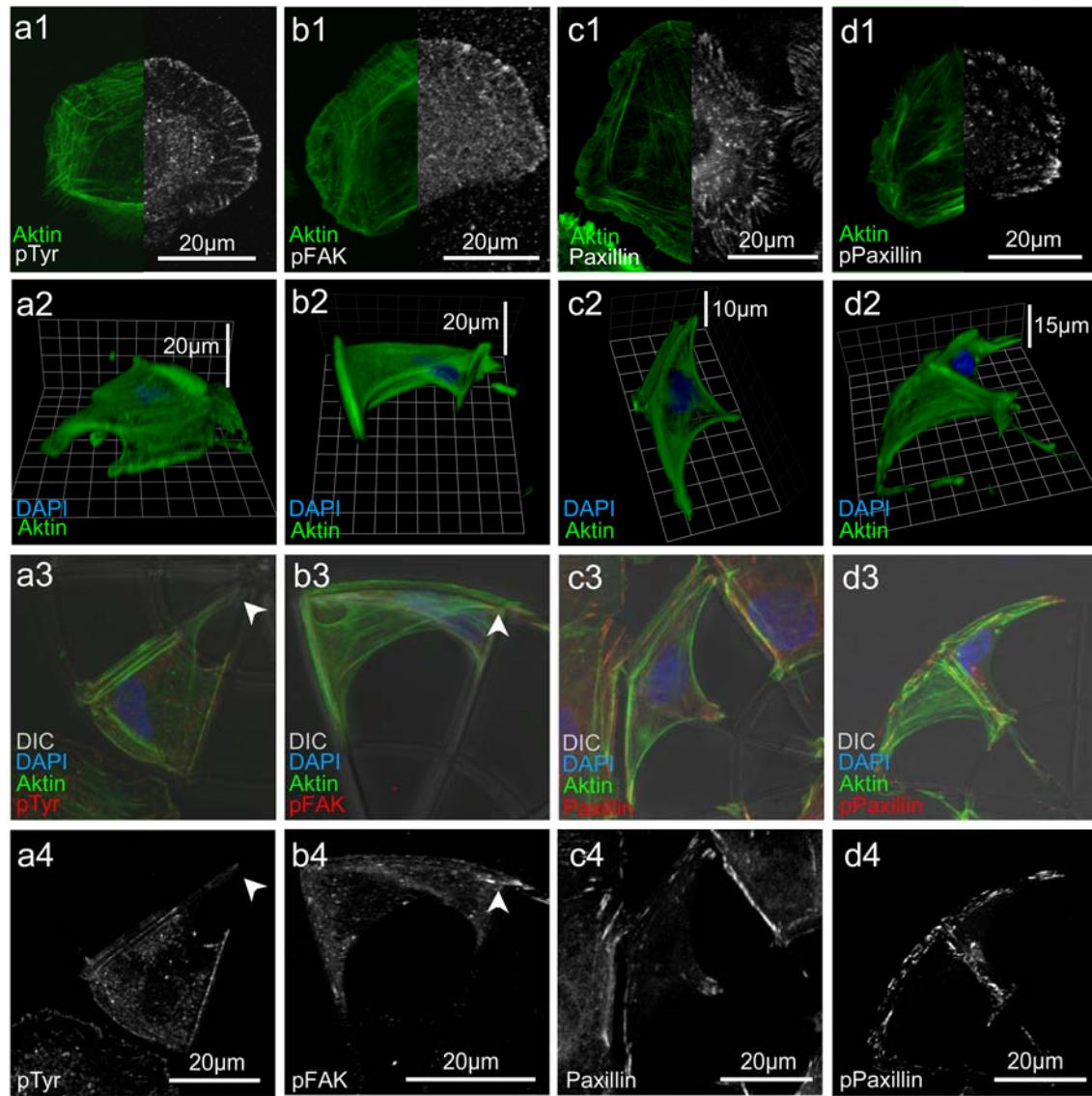


Abb. 21 Zusammensetzung von 3D-Zell-Matrix-Kontakten in harten Radstrukturen

Parenchymale BRL-Zellen werden 2h in Fibronectin-beschichteten 3D-Radstrukturen aus Glas kultiviert, fixiert und immunhistochemisch angefärbt. Die Kontaktmarker **a1-a4**) pTyrosin (Tyr118), **b1-b4**) pFAK (Tyr397), **c1-c4**) Paxillin und **d1-d4**) pPaxillin (Tyr118) sind rot bzw. weiß, Aktin grün und Zellkerne blau dargestellt. **a1-d1)** Auf zweidimensionalen Substraten kultivierte BRL-Zellen sind aktingefärbt (linke Bildhälfte) oder die Kontaktmarker (rechte Bildhälfte). Hier korrelieren alle untersuchten Kontaktmarker mit dem Ende von Aktinfilamentbündeln. **a2-d2)** Schrägansicht von 3D-Rekonstruktionen konfokaler Bilderstapel. **a3-d3)** Maximalprojektionen konfokaler Bilderstapel. DIC (Differentieller Interferenzkontrast) und Immunfärbung sind übereinander gelegt. **a4-d4)** Maximalprojektionen konfokaler Bilderstapel mit Zell-Kontaktmarkern. Weiße Pfeile zeigen auf 3D-Kontakte. Die untersuchten Kontaktmarkerproteine werden von Zellen sowohl in harten zweidimensionalen als auch harten dreidimensionalen Substraten ausgebildet.

In harten 3D-Glassubstraten unterscheiden sich Zell-Matrix-Kontakte qualitativ nicht von Kontakten auf 2D-Substraten, unabhängig von der Herkunft der untersuchten Zellen (Tab. 8). Eine quantitative Untersuchung zur Größenausdehnung ist durch die vertikale Auflösungsgrenze des Konfokal-Mikroskopes limitiert.

3.2.4 Morphometrische Quantifizierung zelltypspezifischer 3D-Zellform

In den vorangegangen Kapiteln wurde das dreidimensionale Zellwachstum in harten Substraten anhand von Zellproliferationsanalysen und der Untersuchung intrazellulärer Komponenten wie Zytoskelett und Zellkontakte beschrieben. In diesem Kapitel wird nun der Ansatz einer quantitativen Analyse des dreidimensionalen Zellwachstums vorgestellt. Dabei werden konfokale Bilderstapel immunhistochemisch gefärbter Zellkulturen segmentweise mit Bildverarbeitungsprogrammen ausgewertet (Kap.2.6.2).

3.2.4.1 Prinzip der morphometrischen Segmentanalyse

Ein konfokaler Bilderstapel setzt sich je nach Zell-/Substrathöhe aus bis zu 50 Einzelschnitten bzw. Einzelsegmenten zusammen, deren Schichtdicke zwischen 350-410nm beträgt (in Abb. 22 skizziert). Die Einzelinformationen der Segmente werden dann zu einer dreidimensionalen Gesamtinformation extrapoliert. Probleme in der hier aufgezeigten 3D-Datenanalyse bestehen vor allem aus der begrenzten konfokalen z-Auflösung, der verwendeten manuellen und nichtstandardisierten Bildverarbeitung sowie der Auswahl eines geeigneten Zellmarkers, die nachfolgend diskutiert wird.

In Abb. 22 ist eine BRL-Zelle dargestellt, die in einer 3D-Radstruktur (nicht gezeigt) aufgespannt ist und bei der Aktinfilamente und das Zytoplasma (Kap.2.5.4.2) angefärbt sind. Die Segmentflächen und Segmentumrisse beider Färbungen werden manuell durch Festlegen eines Schwellenwertes mit Konturerkennung erfasst (Kap.2.6.2). Das Volumen der Zelle ergibt sich aus allen einzelnen Segment-Querschnittsflächen (pro Segment aufgetragen in Abb. 22a1, b1), die addiert und mit der Segmenthöhe multipliziert werden. Die aktingefärbten Segmentflächen ergeben ein Volumen von $2853\mu\text{m}^3$. Das Volumen der Zytoplasma-gefärbten Segmente ist etwas größer und beträgt $2887\mu\text{m}^3$. Der Vergleich der ermittelten einzelnen Segment-Flächen dieser beiden Färbungen in Relation zur Stapelhöhe zeigt jedoch einige Abweichungen. Die Zelle exprimiert filamentöses Aktin nicht homogen (Abb. 22a1) und weist dadurch beim Festlegen des Schwellenwertes in Regionen ohne F-Aktin „Löcher“ auf, dessen Flächen nicht mit erfasst werden. Da die Abweichung der ermittelten Volumina zwischen den beiden Färbungen jedoch relativ klein ist, werden alle weiteren Quantifizierungen mit aktingefärbten Zellen durchgeführt. So können zusätzlich zu den morphometrischen Aktin-basierenden Daten auch gleichzeitig

Informationen über die Organisation der Aktinfilamente in 3D gewonnen werden (Kap.3.2.3).

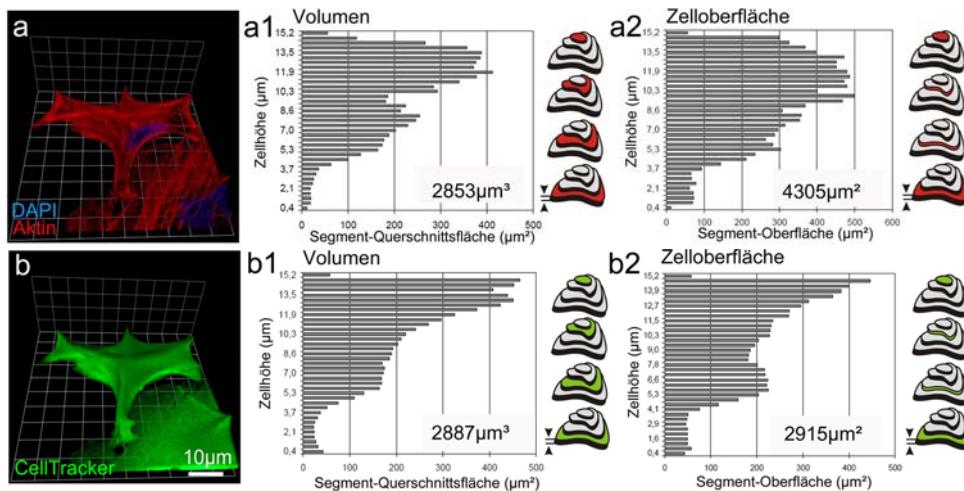


Abb. 22 Segmentbasierte Volumen- und Oberflächenmessung

Eine BRL-Zelle wird 2h in Fibronektin-beschichteten 3D-Radstrukturen (nicht dargestellt) kultiviert und das Zytosol mittels CellTracker grün markiert. Anschließend wird die Zelle fixiert und Aktin rot und Kerne blau immunhistochemisch gefärbt. Schrägansicht des konfokalen Bilderstapels einer 3D-Rekonstruktion zeigt das **a**) Aktinzytoskelett mit Zellkern und **b**) Zytoplasma der Zelle. **a1, b1)** Zur Volumenberechnung (μm^3) werden alle Segmentflächen eines konfokalen Bilderstapels aufaddiert und mit der Voxelhöhe multipliziert. Die anhand der **a1)** Aktin-Färbung und **b1)** Zytoplasma-Färbung erfassten Segmentflächen sind einzeln entsprechend ihrer Höhe im konfokalen Bilderstapel aufgetragen (graue Längsbalken).

Zur Erfassung der Zelloberfläche wird der Umfang aller Segmentflächen mit Ausnahme des ersten und letzten Segmentes aufaddiert und mit der Segmentenhöhe multipliziert. Das Hinzufügen der ersten und letzten Segmentfläche ergibt die Gesamtoberfläche der Zelle (pro Segment aufgetragen in Abb. 22a2, b2). Die ermittelte Oberfläche für aktin gefärbte Segmente beträgt $4305\mu\text{m}^2$ und für Zytoplasma gefärbte Segmente $2915\mu\text{m}^2$. Aufgrund der enormen Abweichung in diesem aufgezeigtem Beispiel und der deutlich erhöhten Schwierigkeit in der Erfassung dieses Parameters durch manuelle Auswertung wird die Zelloberfläche nicht weiter quantifiziert.

3.2.4.2 Zelltypspezifische 3D-Morphologie

In Kapitel 3.2.2.3 ist dargestellt, dass alle Zellen unabhängig vom Gewebeursprung in 3D-Strukturen mit Hohlräumen $\geq 10\mu\text{m}$ einwachsen können. Ebenso ist bereits gezeigt, dass auch in harten 3D-Substraten vor allem BRL-Zellen ihre Aktinfilamente zwischen Adhäsionspunkten kreisbogenförmig aufspannen und in Zell-Matrix-Kontakten enden, deren molekulare Zusammensetzung sich in harten Substraten bei allen untersuchten Zelltypen nicht von 2D-Zellkontakten unterscheidet (Kap.3.2.3). Nun soll geklärt werden,

ob es zelltypspezifische Unterschiede hinsichtlich des dreidimensionalen Spreadingverhaltens in Radstrukturen gibt. Diese Strukturen weisen eine Vielzahl unterschiedlicher Winkel und Kompartimente auf, deren Größe bzw. räumliche Ausdehnung klar über denen der Gitterstrukturen liegen. Somit sind mögliche Adhäsionspunkte im Raum deutlich weiter voneinander entfernt, zu deren Überbrückung Zellen eine dreidimensionale Morphologie annehmen müssen. Epitheliale A549-Zellen, parenchymale BRL-Zellen und fibroblastenartige B16-Zellen werden 2h in Fibronektin-beschichteten 3D-Radstrukturen kultiviert, immunhistochemisch gefärbt und Maximalprojektionen (Abb. 23a1-c1) sowie 3D-Rekonstruktionen erstellt (Abb. 23a2-c2).

In der Maximalprojektion wird bereits deutlich, dass A549-Zellen häufig an den Fibronektin-beschichteten Streben der Radstruktur oder den eher flächigen Außenwänden adhärieren. Sie erscheinen in der Aufsicht eher kompakt bis länglich. Aus einem 3D-Gewebe stammende BRL- und B16-Zellen spannen sich dagegen häufig horizontal frei im dreidimensionalen Raum auf (Abb. 23c1). Die untersuchten Zellen weisen dennoch eine große Heterogenität auf, die ursächlich auf Inhomogenitäten der Substratoberfläche beispielsweise durch Reinigungsartefakte (Kap.2.3.4) oder intrazelluläre Unterschiede zurückzuführen sein kann. Die Dynamik des Spreadings wurde bei der Beschreibung der Zellmorphologie ebenfalls nicht berücksichtigt.

Die morphometrische Analyse aller einzeln aufgespannter Zellen in den Außenbereichen von Radstrukturen mit acht und zehn Außenkompartimenten zeigt, dass alle drei Zelltypen unabhängig von ihrer Herkunft in die dritte Dimension mit vergleichbaren Zellhöhen um $14\mu\text{m}$ einwachsen (Abb. 23d). Lediglich die Zellhöhe der A549-Zellen unterscheidet sich signifikant von den BRLs ($p=0.044$). Die durchschnittliche Segmentfläche pro Bilderstapel (Kap.2.6.2) beträgt bei A549-Zellen jedoch nur $94\pm4\mu\text{m}^2$ und ist bei BRL-Zellen ($161\pm10\mu\text{m}^2$) und B16-Zellen ($146\pm13\mu\text{m}^2$) deutlich größer (Abb. 23e, schwarze Balken). Die durchschnittliche dreidimensionale horizontale Fläche ist bei Epithelzellen daher um ca. 30% gegenüber den parenchymalen und fibroblastenartigen Zellen verringert. Die durchschnittliche Segmentfläche der BRL- und B16-Zellen unterscheidet sich dagegen nicht signifikant ($p=0.420$). Im Gegensatz zu den dreidimensionalen Flächen sind alle drei Zelltypen auf homogen beschichteten 2D-Substraten deutlich großflächiger ausgebreitet (Abb. 23a3-c3). Im Unterschied zu den 3D-Substraten nehmen die epithelialen A549-Zellen auf planaren 2D-Substraten die größte Spreadingfläche ($1938\pm163\mu\text{m}^2$) ein, BRL-Zellen ($1544\pm49\mu\text{m}^2$) und B16-Zellen ($1350\pm90\mu\text{m}^2$) sind hingegen kleiner (Abb. 23e, weißer Balken).

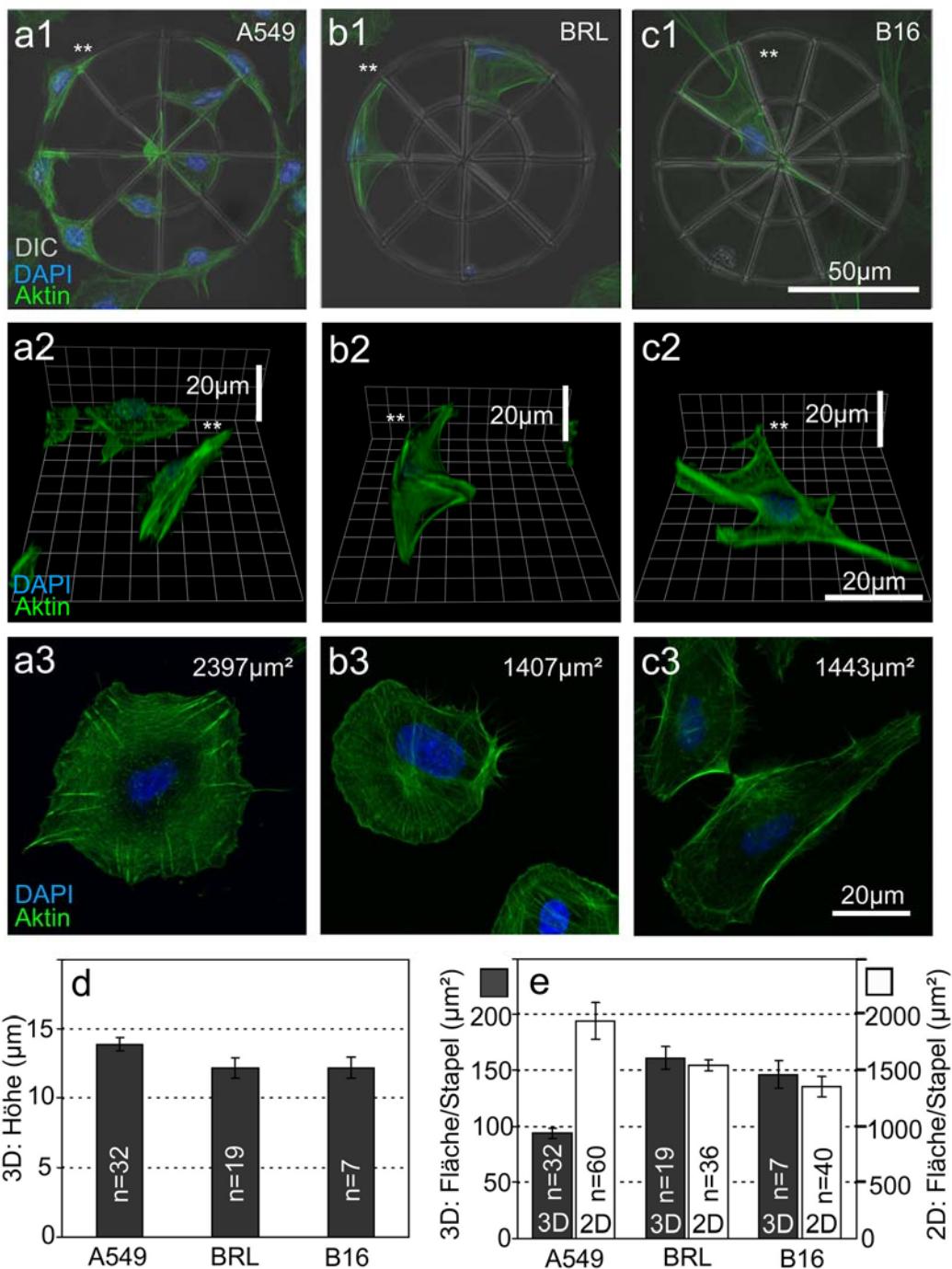


Abb. 23 Zelltypspezifische Morphologie in 3D-Radstrukturen

a1-a2) Epitheliale A549-Zellen, **b1-b2)** parenchymale BRL-Zellen und **c1-c2)** fibroblastenartige B16-Zellen werden 2h in fibronectinbeschichteten Radstrukturen oder auf 2D-Substraten unmittelbar neben den Radstrukturen (**a3-c3**) kultiviert, fixiert und Kerne blau und Aktin grün markiert. **a1-c1)** In der Maximalprojektion des konfokalen Bilderstapels sind der Differentielle Interferenzkontrast (DIC) und die Immunfärbung übereinander gelegt. Die mit Sternen (**) markierten Zellen sind in Schrägaufnahmen von 3D-Rekonstruktionen **a2-c2)** gezeigt. A549-Zellen verbleiben eher an den Streben der Radstruktur, wohingegen sich BRL- und B16-Zellen frei im dreidimensionalen Raum aufspannen. **d,e)** Morphometrische 3D-Quantifizierung von Zellen in den Außenbereichen von Radstrukturen mit 8 und 10 Außenkompartimenten; der Standardfehler ist angegeben **d)** Alle Zelllinien wachsen in die dritte Dimension. Die Zellhöhen der A549-

Zellen unterscheiden sich von der der BRLs ($p=0.044$). Die Mittelwerte der anderen Zelltypen (A549/B16 und BRL/B16) sind nicht signifikant verschieden ($p=0.132$ und $p=0.985$). e) Vergleich der Zellfläche auf 2D-Substraten (weißer Balken) mit der durchschnittlichen Segmentfläche pro konfokalem Stapel in 3D-Substraten (schwarzer Balken). Epitheliale A549-Zellen zeigen auf 2D-Substraten die größte Spreadingfläche, haben jedoch in 3D-Substraten eine ca. 30% verringerte Durchschnittssegmentfläche im Vergleich zu BRL- und B16-Zellen. Die Fähigkeit, eine dreidimensionale Morphologie anzunehmen, ist zelltypspezifisch.

Die Fähigkeit, eine dreidimensionale Morphologie anzunehmen, scheint zelltypspezifisch zu sein. Epithelzellen verbleiben eher an flächigen Strukturen und können sich nur begrenzt im Raum aufspannen, obwohl sie auf 2D-Substraten die größte Zellfläche einnehmen. Zellen aus parenchymalen und fibroblastenartigen Geweben zeigen dagegen häufiger eine dreidimensionale Morphologie. Im folgenden Kapitel wird nun untersucht, ob die Lage der Zellen innerhalb der 3D-Struktur einen Einfluss auf die Morphologie der Zelle hat.

3.2.4.3 3D-Morphologie in Abhängigkeit von 3D-Geometrie

Die Segmente konfokaler Bilderstapel einzeln aufgespannter epithelialer A549-Zellen, parenchymaler BRL-Zellen und fibroblastenartiger B16-Zellen werden quantifiziert (Kap.2.6.2) und die morphometrischen Parameter graphisch aufgetragen (Abb. 24). Dabei ist sowohl die Strukturgeometrie, d.h. die Anzahl der Außen- bzw. Innenkompartimente des Rades (R08/acht Kompartimente; R10/zehn Kompartimente) als auch die Lage der Zellen in der Struktur (AK/Außenkompartiment; IK/Innenkompartiment) berücksichtigt. In Radstrukturen mit zehn Kompartimenten liegen mögliche Zelladhäsionspunkte im Raum näher beieinander; das gleiche gilt auch allgemein für Innenkompartimente. Hier werden jedoch nur Tendenzen aufgezeigt, da für eine gesicherte statistische Analyse der Stichprobenumfang vergrößert werden sollte.

Alle untersuchten Zelltypen wachsen unabhängig von der Geometrie bzw. Lage im Rad zwischen 10-15 μm vergleichbar in die dritte Dimension (Abb. 24a1-c1). Schwankungen in der Zellhöhe könnten ursächlich auch auf unterschiedliche Strukturhöhen aufgrund von Abweichungen während des Schreibprozesses zurückzuführen sein. Tendenziell haben B16-Zellen beim Wachstum in Außenkompartimenten eine etwas größere Zellhöhe. Überbrücken B16-Zellen Kompartimentgrenzen, spreaden die Zellen flächig im Raum mit geringerer Zellhöhe (Abb. 24c1). A549-Zellen zeigen unabhängig von Geometrie und Lage im Rad die kleinste durchschnittliche Segmentfläche pro Stapel (Abb. 24a2). In Außenkompartimenten von R08- und R10-Strukturen beträgt diese Fläche ca. 100 μm^2 und zeigt in Innenkompartimenten eine deutliche Zunahme bis zu 50% in R08-Strukturen ($184\pm35\mu\text{m}^2$) und bis zu 25% in R10-Strukturen ($145\pm20\mu\text{m}^2$). Da die Zellhöhe relativ konstant, die Zellen aber unterschiedliche Durchschnittssegmentflächen aufzeigen, ist das

resultierende Zellvolumen in Außenbereichen kleiner (R08: $1284 \pm 112 \mu\text{m}^3$ und R10: $1298 \pm 77 \mu\text{m}^3$) als in Innenbereichen der Radstruktur (R08: $2642 \pm 464 \mu\text{m}^3$ und R10: $1892 \pm 286 \mu\text{m}^3$). Die Zellform maximal projizierter Zellen ist in Außenkompartimenten eher länglich (Abb. 24a4). In Innenbereichen dagegen sind Länge und Breite der A549-Zellen annähernd gleich, da die Radstreben näher beieinander liegen und das 3D-Spreading möglicherweise erleichtern.

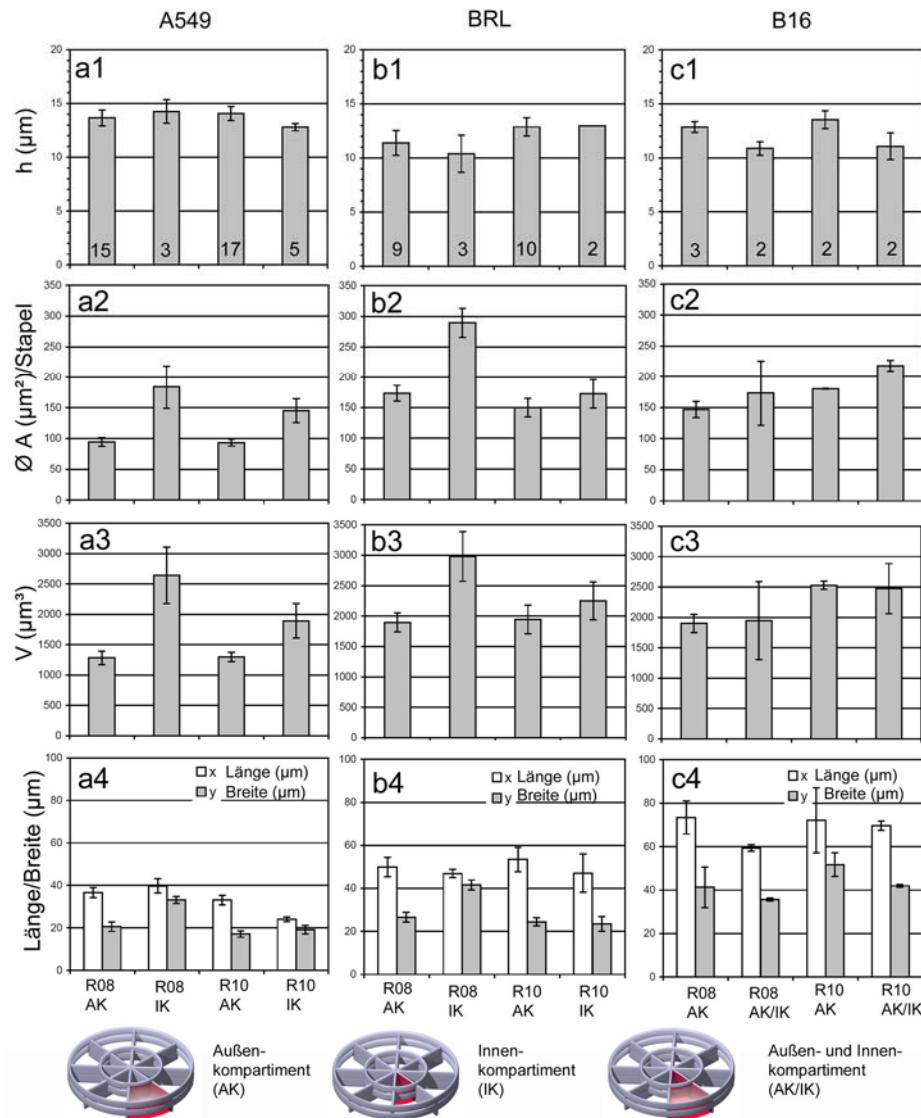


Abb. 24 Morphometrische 3D-Quantifizierung abhängig von der 3D-Geometrie

Die Segmente konfokaler Bilderstapel der in Fibronectin-beschichteten 3D-Radstrukturen einzeln aufgespannten epithelialen A549-Zellen, parenchymalen BRL-Zellen und fibroblastenartigen B16-Zellen werden morphometrisch quantifiziert. (a1-c1) Die Zellhöhe, (a2-c2) die durchschnittliche Segmentfläche pro Stapel, (a3-c3) das Volumen sowie (a4-c4) die Länge und Breite der maximal projizierten Zellfläche werden je nach Anzahl der Außen- bzw. Innenkompartimente des Rades (R08/acht Kompartimente; R10/zehn Kompartimente) und Lage der Zellen in der Struktur (AK/Außenkompartiment; IK/Innenkompartiment) aufgetragen. Die Lage der Zellen in der Struktur ist durch rote Bereiche in 3D-Modellen der Radstrukturen aufgezeigt.

BRL-Zellen weisen mit Ausnahme des Radinnenbereiches mit acht Kompartimenten ($290 \pm 24 \mu\text{m}^2$) eine durchschnittliche Segmentfläche von ca. $150 \mu\text{m}^2$ auf. Das Volumen ist somit bis auf die bereits genannte Ausnahme konstant um $2000 \mu\text{m}^3$. Tendenziell adhäriert die Mehrzahl der Zellen in den Außenbereichen mit länglicher Zellform. Die wenigen Zellen in den Innenbereichen sind in Länge und Breite nach Maximalprojektion annähernd gleich (R08) bis länglich (R10). Vom B16-Zelltyp sind nur relativ geringe Zellzahlen quantifiziert, die häufig Kompartimentgrenzen überbrücken und sich großflächig im dreidimensionalen Raum aufspannen. Die durchschnittliche Segmentfläche beträgt $150-220 \mu\text{m}^2$. Das resultierende Zellvolumen schwankt zwischen 2000 und $2500 \mu\text{m}^3$. B16-Zellen haben eine längliche Morphologie, unabhängig von Geometrie und Lage in der Struktur.

Das dreidimensionale Zellwachstum epithelialer A549-Zellen scheint von der Geometrie der Struktur beeinflusst zu sein. Dagegen zeigen parenchymale BRL-Zellen und fibroblastenartige B16-Zellen ein dreidimensionales Wachstum, relativ unabhängig von der 3D-Geometrie. Da die Zellen jedoch eine relativ große Heterogenität aufweisen, sollte eine weit größere Zellzahl für einen besseren repräsentativen Überblick untersucht werden.

3.2.5 Charakterisierung des Zellwachstums in flexiblen 3D-Substraten

In den vorangegangenen Kapiteln ist das Zellwachstum in harten 3D-Glassubstraten untersucht worden. *In vivo* sind jedoch alle Gewebe nicht nur dreidimensional, sondern zusätzlich auch weich und von Zellen verformbar (CUKIERMAN et al., 2002).

Mittels Direktem Laserschreiben können neben harten Substraten auch geometrische 3D-Strukturen erzeugt werden, die aus flexiblen Materialien bestehen (FISCHER, 2008; STRIEBEL, 2007). In dieser Arbeit aufgezeigte Untersuchungen sind mit Strukturen aus Ormocer®, einem organisch-anorganische Hybrid-Polymer, durchgeführt worden (Kap.2.3.2). Sie beschäftigen sich mit der Charakterisierung von Materialeigenschaften und dem kombinierten Einfluss von Dreidimensionalität und Flexibilität auf das zelluläre Wachstumsverhalten. Die Weichheit der Struktur ist in den nachfolgenden Kapiteln anhand der Verformbarkeit durch primäre Hühner-Kardiomyozyten und einer sich anschließenden Kalibrierung mittels Rasterkraftmikroskopie/AFM (Kap.2.3.2.2) belegt. Der Einfluss der gezeigten Substratflexibilität wird dann anhand von immunhistochemischen Untersuchungen an Zell-Matrix-Kontakten bei Zelltypen verschiedenen Gewebeursprungs geprüft.

3.2.5.1 Zellform und Zytoskelett-Organisation von Kardiomyozyten in Abhängigkeit von 3D-Geometrie

Primäre Hühner-Kardiomyozyten werden aus zehn Tage alten Embryonen gewonnen (Kap.2.4.3) und ein bis zwei Tage in Protein-beschichteten Ormocer®-Substraten mit verschiedenen Geometrien (Kap.2.3.2.3) kultiviert. Die fixierten und immunhistochemisch gefärbten Substrate werden mittels Konfokalmikroskopie analysiert und anschließend 3D-Rekonstruktionen sowie Maximalprojektionen erstellt (Abb. 25).

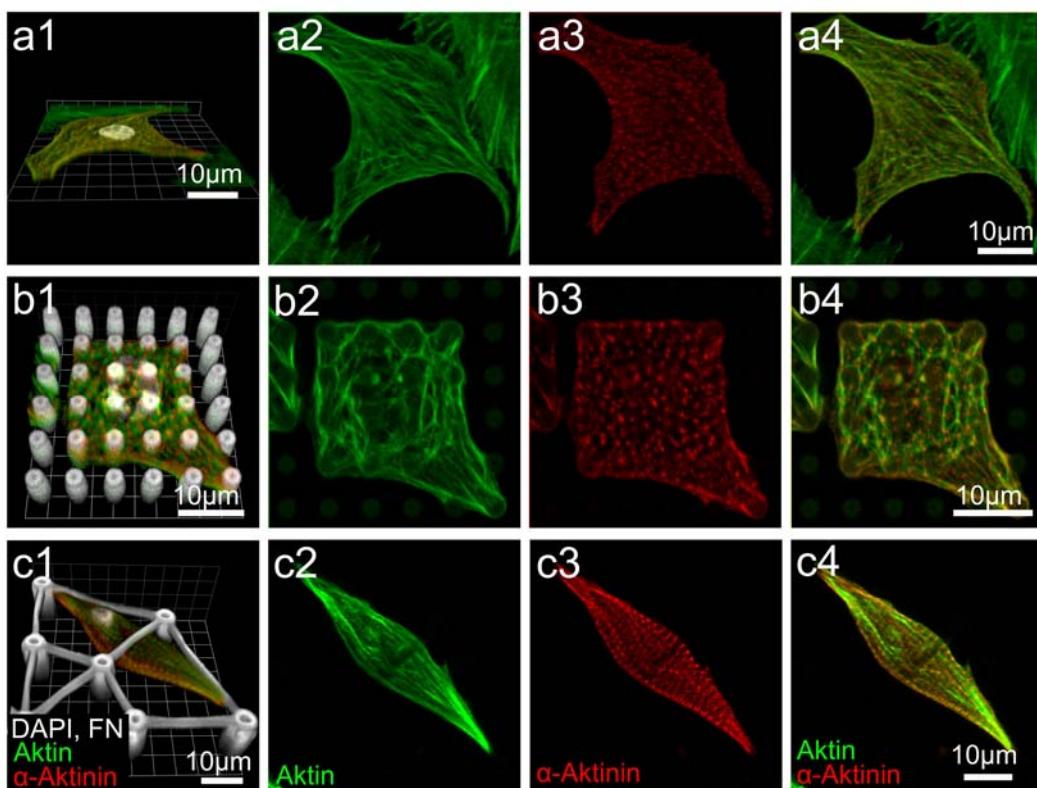


Abb. 25 Zytoskelett-Organisation kardialer Myozyten in 3D-Geometrien

Embryonale Hühner-Kardiomyozyten werden 1-2 Tage in Protein-beschichteten flexiblen 3D-Ormocer®-Substraten kultiviert, fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Zellkern und Fibronektin/weiß, Aktin/grün, α -Aktinin/rot). **a1-c1)** Schrägaussicht von 3D-Rekonstruktionen konfokaler Bilderstapel. Die entsprechenden Maximalprojektionen sind in **a2-a4, b2-b4, c1-c4)** dargestellt. **a1-a4)** Kardiomyozyt zeigt auf planarem Glas-Substrat eine pleomorphe Zellform mit ungeordneten Aktinfilamenten und isotropischer Sarkomer-Anordnung. **b1-b4)** Auf einem elastischen Säulenfeld mit Säulenabständen von 5 μm ist die Zelle geometrisch mit nahezu identischer Längen- und Breitenausdehnung und multiaxialen Aktinfilamenten und Myofibrillen aufgespannt. **c1-c4)** In der gezeigten Radstruktur spannt sich der Kardiomyozyt dreidimensional im Raum auf und zeigt eine einheitliche anisotropische Myofibrillen-Anordnung parallel zur kontraktilen Längsachse. Die Ausrichtung der Sarkomere und die längliche Zellform entsprechen der *in vivo*-Morphologie.

Auf harten 2D-Substraten unmittelbar neben 3D-Ormocer®-Substraten zeigen Kardiomyozyten eine äußerst vielfältige Morphologie. Neben länglichen und runden Zellen kommen auch Zellen mit pleomorpher Form vor, die sich willkürlich auf dem Substrat aufspannen. Die Aktinfilamente mit teilweise ausgeprägten Stressfasern durchziehen ungeordnet mit isotropischen Sarkomeren die Zelle (Abb. 25a1-a4). Kardiomyozyten, die auf einem Ormocer®-Säulenfeld (Abb. 25b1-b4) mit Abständen von 5µm kultivieren, spannen sich geometrisch und oft mit identischer Längen- und Breitenausdehnung auf. Aktinfilamente und Sarkomere durchziehen multiaxial die Zelle, deren Adhäsion durch α-Aktinin-enthaltende kostamere Z-Bänder vermittelt wird.

In Radstrukturen mit vielfältigen Winkeln und großzügigen dreidimensionalen Kompartimenten spannen sich Kardiomyozyten oft länglich (Abb. 25c1-c4) oder geometrisch (Abb. 26) im Raum ohne Kontakt zum darunter liegenden 2D-Substrat auf. Die Zellen bilden einheitliche anisotropische Myofibrillen parallel zur kontraktilem zellulären Längsachse aus. In dieser *in vitro* Substratgeometrie entspricht sowohl die Ausrichtung der Sarkomere, die oft längliche Zellform und die Kostamer-vermittelte Adhäsion sehr stark der *in vivo* Morphologie. Daher ist diese Geometrie besonders geeignet, die messbare Verformung von 3D-Strukturen aus Ormocer® durch Kardiomyozyten zu untersuchen.

3.2.5.2 3D-Ormocer®-Strukturen sind durch zelluläre Kräfte verformbar

Nach 1-2 Tagen *in vitro* Kultivierung spannen sich primäre Kardiomyozyten in 3D-Strukturen auf und kontrahieren rhythmisch. In Abb. 26a ist ein Myozyt gezeigt, der sich frei und ohne Kontakt zum darunter liegenden 2D-Substrat mit geordneten Myofibrillen (Abb. 26b) aufspannt (Kap.3.2.5.1).

Während einer 1.5 min dauernden Zeitrafferaufnahme erfolgen 26 Kontraktionen, währenddessen die 3D-Struktur aus Ormocer® mit Linienstärken um 0.6µm sichtbar deformiert wird (Abb. 26c). Die Auswertung der Grauwertverteilung (Abb. 26d) einer entlang der Kontraktionsrichtung angelegten Linie ergibt eine durchschnittliche Strebenauslenkung von $0.81 \pm 0.07 \mu\text{m}$ (Minimum $0.16 \mu\text{m}$, Maximum $1.13 \mu\text{m}$), wobei am Ende der Kontraktion die in die Länge gezogenen Strebe wieder in die Ausgangsposition zurückkehrt. Die dicken Säulen mit einem Durchmesser von ca. $6 \mu\text{m}$, auf denen die Streben verankert sind, werden während der Kontraktion nicht sichtbar deformiert.

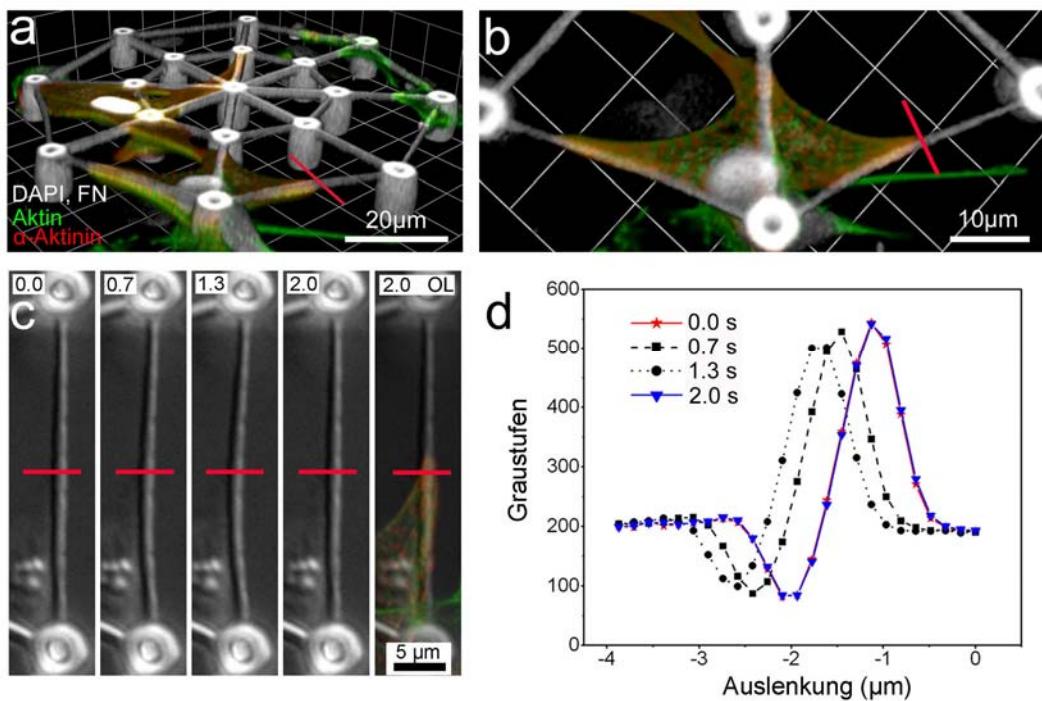


Abb. 26 Primärer Kardiomyozyt in flexibler Ormocer®-Radstruktur

Embryonale Kardiomyozyten kultivieren 1-2 Tage in Protein-beschichteten Ormocer®-Radstrukturen und werden anschließend fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Kerne und Fibronektin/weiß, Aktin/grün, α-Aktinin/rot). **a)** 3D-Rekonstruktion eines konfokalen Bilderstapels in der Schrägansicht und **b)** Aufsicht. **c)** Zeitrafferaufnahme von DIC-Einzelbildern (Differentieller Interferenzkontrast) während eines Kontraktionszyklus zeigt, dass die Strebe (Durchmesser 0.6μm), an der der Kardiomyozyt adhäriert, verbogen wird (**OL**/Overlay: DIC ist mit der Maximalprojektion übereinander gelegt). Die Zeitangabe erfolgt in Sekunden. **d)** Durch Analyse der Grauwertverteilung entlang der rot skizzierten Linie in **a-c)** wird während der gezeigten Kontraktion eine maximale Auslenkung der Strebe von 0.8μm ermittelt. Am Ende der Kontraktion kehrt die Strebe in ihre Ausgangsposition zurück.

Auch nach 26 stattgefunden Kontraktionen erfolgt keine Änderung der mechanischen Materialeigenschaften. Die kontraktionsbedingt verformte Strebe kehrt stetig in ihre Originalposition zurück (Abb. 27). Innerhalb des hier untersuchten Kraftbereiches und der beschriebenen zeitlichen Auflösung zeigt Ormocer® daher volle Elastizität.

Durch Regulation der Laserintensität während des Direkten Laserschreibens werden Ormocer®-Strukturen mit zunehmendem Strebendurchmesser von 0.6μm bis 1.3μm geschrieben. Nach 1-2 Tagen Zellkultur in Radstrukturen, bestehend aus fünf verschiedenen Linienbreiten, werden in kurzen Intervallen von ~0.7s DIC-Einzelbilder (Differentieller Interferenzkontrast) kontrahierender Kardiomyozyten zu Zeitrafferaufnahmen zusammengesetzt. Die Analyse der Grauwertverteilung entlang einer in Kontraktionsrichtung angelegten Linie bei insgesamt 20 Kardiomyozyten ermöglicht die Quantifizierung der Strebenauslenkung in Abhängigkeit zur Linienbreite (Abb. 28). Die

Abnahme der kontraktionsbedingten Auslenkung bei zunehmender Linienbreite lässt auf eine Korrelation von Strebendurchmesser und Steifigkeit schließen.

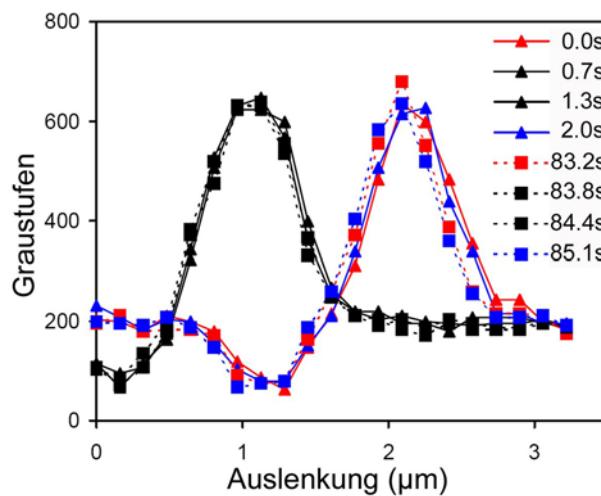


Abb. 27 Vollelastische Eigenschaften von Ormocer®

Kardiomyozyten werden 1-2 Tage in Protein-beschichteten Ormocer®-Radstrukturen kultiviert und die kontraktionsbedingte Verformung quantifiziert. Die Grauwertverteilung des ersten und letzten Kontraktionszyklus der Zeitrafferaufnahme ist aufgetragen, wobei die Strebe aus Abb. 26 während eines Kontraktionszyklus maximal 1.1 μm ausgelenkt wird. Auch nach 26 Kontraktionen kehrt die Strebe am Ende der Kontraktion in ihre Ausgangsposition zurück und demonstriert so die vollelastischen Materialeigenschaften innerhalb des untersuchten Kraft- und Zeitbereiches.

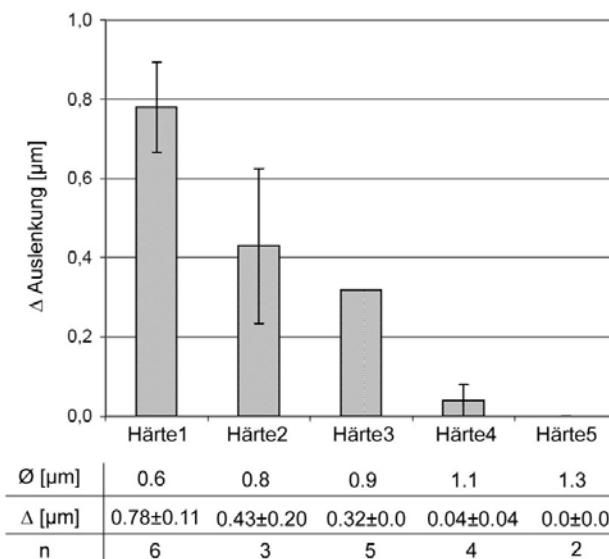


Abb. 28 Kontraktionsbedingte Auslenkung in Abhängigkeit von der Linienstärke

Durch ansteigende Laserintensität beim Direkten Laserschreiben/DLS werden Radstrukturen mit zunehmendem Strebendurchmesser von 0.6 μm bis 1.3 μm geschrieben. Nach 1-2 Tagen Zellkultur werden in kurzen Intervallen DIC-Einzelbilder kontrahierender Kardiomyozyten aufgenommen. Die Auswertung der Grauwertverteilung dieser Zeitrafferaufnahmen ermöglicht die Quantifizierung der Strebenauslenkung. Es sind 20 Kardiomyozyten in Radstrukturen bestehend aus fünf verschiedenen Linienbreiten vermessen worden. Der Durchschnitt der Auslenkungsmaxima pro Zelle ist mit Standardfehler aufgetragen. Mit zunehmender Linienbreite nimmt die kontraktionsbedingte Maximalauslenkung ab.

Um die in Zeitrafferausnahmen gemessenen kontraktionsbedingten Auslenkungen der flexiblen 3D-Strukturen mit den jeweils ausgeübten zellulären Kräfte zu korrelieren und den Zusammenhang zwischen Linienbreite der Strukturen und Substratflexibilität zu untersuchen, werden die 3D-Ormocer®-Strukturen durch Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic force microscopy/AFM) kalibriert (Kap.2.3.2.2; Dr. C. M. Franz). Ein AFM-Kantilever ohne Spitze wird dabei auf Balken von Teststrukturen abgesenkt, bis eine definierte Kraft erreicht ist (Abb. 29). Für die Erstellung von Kraftkurven unter horizontaler Last, wie sie oft durch Kardiomyozyten (Abb. 26c) ausgeübt wird, sind die Teststrukturen um 90° gedreht bzw. aufgestellt und entsprechen in ihren Abmessungen und Schreibparametern den in Zellexperimenten verwendeten Strukturen. Der Piezogesteuerte Verfahrweg des Kantilevers bis zum Erreichen einer definierten Kraft wird dabei aufgezeichnet. Durch Vermessung einer Anordnung entsprechender Teststrukturen wird der Zusammenhang zwischen Linienbreite und Struktursteifigkeit somit systematisch untersucht (Abb. 29d).

Beim Ausüben einer Kraft bis 20nN steigen die resultierenden Kraft-Weg-Kurven kontinuierlich an und demonstrieren, dass die Flexibilität der Strukturen von der Linienbreite der Ormocer®-Strukturen abhängig ist. Testbalken mit dünner Linienbreite werden bei gleicher Krafteinwirkung stärker ausgelenkt als Balken mit dickerer Linienbreite. Die im Zellkulturexperiment beobachtete kontraktionsbedingte Auslenkung durch Kardiomyozyten in Abhängigkeit zur Linienstärke (Abb. 28) wird somit durch AFM-Messung bestätigt. Die Verformbarkeit der Ormocer®-Strukturen ist allein von der Breite der geschriebenen Linien abhängig. Unter der Annahme eines konstanten E-Moduls, kleiner Auslenkungen und starrer Säulen konnten die Kraft-Weg-Kurven erfolgreich modelliert werden (FISCHER, 2008).

Um die kontraktionsbedingten Auslenkungen der flexibelsten bzw. dünnsten Strukturen ab 0.6µm (Abb. 26) mittels AFM nachzumessen, wird der Kantilever bis zu einer Kraft von 200nN auf die Strukturen gedrückt und eine Kraft-Auslenkungskurve erstellt (Abb. 29e). Eine durch Einzelzellen verursachte Strebenauslenkung von 0.8µm, wie in Abb. 26 beschrieben, wird durch eine AFM-vermittelte Krafteinwirkung von ca. 50nN erzielt. Aus Hühnerembryonen gewonnene primäre Kardiomyozyten üben somit während der Kontraktion durchschnittlich Kräfte von ca. 50nN (Abb. 26) aus. Im Vergleich zu anderen Studien ist die ermittelte Kraft relativ gering. Bei der Kultivierung von Kardiomyozyten der Ratte auf elastischen Säulenfeldern wurden beispielsweise Kräfte bis 400nN im kontrahierten Zustand kalkuliert (KAJZAR et al., 2008).

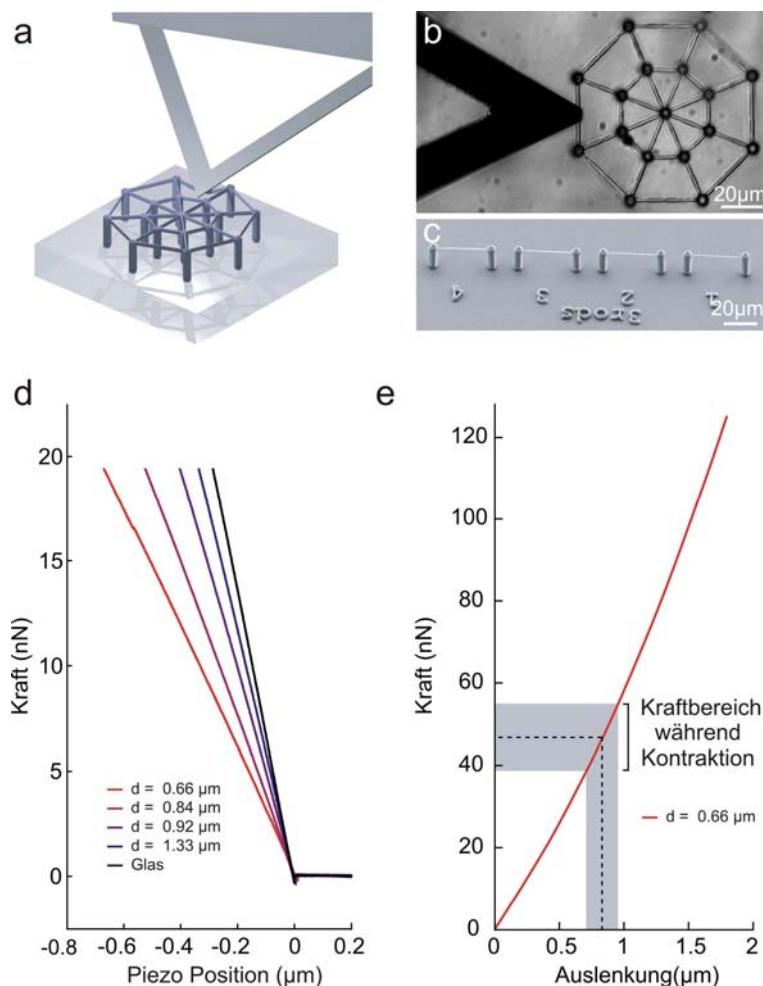


Abb. 29 Kalibrierung der elastischen Verformbarkeit durch Rasterkraftmikroskopie

- a) Schema einer rasterkraftmikroskopischen Messung. Ein Kantilever wird mit definierter Kraft auf eine Strebe der 3D-Ormocer®-Radstruktur gedrückt und der Piezo-Verfahrweg des Kantilevers aufgezeichnet.
- b) Phasenkontrastbild eines Kantilevers beim Drücken auf eine Strebe der 3D-Ormocer®-Radstruktur.
- c) Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Anordnung von Teststrukturen. Balken, deren Durchmesser stetig zunimmt, werden von stabilen Säulen getragen.
- d) Kraft-Weg-Kurve. Ein Kantilever drückt mit einer Kraft bis 20nN auf Radstreben mit Durchmessern von 0.66μm bis 1.33μm unter Angabe der Position des Piezos. Als Referenzkurve dient die Kraft-Weg-Kurve beim Drücken auf die inkompressible Glasoberfläche.
- e) Die Auslenkung einer Strebe mit einem Durchmesser von 0.66μm (entsprechend der Struktur aus Abb. 26) ist gegen die ausgeübte Kraft aufgetragen. Eine Auslenkung von 0.8μm wird durch eine Kraft von 47nN ausgelöst (gestrichelte Linie). Aus der analysierten Zeitrafferaufnahme von Abb. 26 ergibt sich eine Durchschnittsauslenkung von $0.8 \pm 0.07 \mu\text{m}$. Der graue Bereich entspricht dem Standardfehler. (zur Verfügung gestellt von Dr. C. M. Franz)

Adhäsierende Fibroblasten üben Kräfte zwischen 5-20nN pro Zell-Matrix-Kontakt aus (BALABAN et al., 2001). Einzelne Zell-Matrix-Kontakte sollten daher zu Substratverformungen führen, die durch Lichtmikroskopie aufgelöst werden können. Wird beispielsweise auf eine Ormocer®-Struktur mit einer Linienbreite von ca. 0.6μm eine Kraft von 20nN ausgeübt, erfolgt eine Auslenkung um 0.4μm (Abb. 29e).

3.2.5.3 Vielfalt in Geometrie und Steifigkeitsgradienten

Neben den aufgezeigten Säulen- und Radstrukturen können mittels DLS weitere vielfältige 3D-Geometrien geschrieben und als flexible 3D-Zellkultursubstrate eingesetzt werden (Kap.2.3.2.3). Ein Beispiel ist die sogenannte Boxringstruktur (Abb. 30), deren ca. 20 μm lange Querstreben an vier 15 μm hohen Säulen befestigt sind.

Einzelne Kardiomyozyten spannen sich dreidimensional mit vorwiegend ungeordneten Aktinfilamenten und Myofibrillen auf und verbiegen während der Kontraktion die ca. 0.8 μm dicke Querstrebe um 0.2 μm . Diese Verformung entspräche bei den kalibrierten Teststrukturen in Abb. 29d einer Krafteinwirkung von ca. 20nN. Da sich die Balkenlänge der Teststrukturen von dem hier vermessenen Balken jedoch unterscheidet, sind die Messwerte der AFM-Kalibrierung nicht übertragbar. Kleinere Kontraktionskräfte im Vergleich zu den in Radstrukturen ausgeübten Zellkräften sind dennoch denkbar, da die Organisation der Zytoskelettkomponenten abhängig von der Geometrie zu unregelmäßig ist. Kardiomyozyten mit isotropisch angeordneten Sarkomeren bilden weniger starke Kräfte aus als Zellen mit regelmäßigen Myofibrillen (ENGLER et al., 2004b).

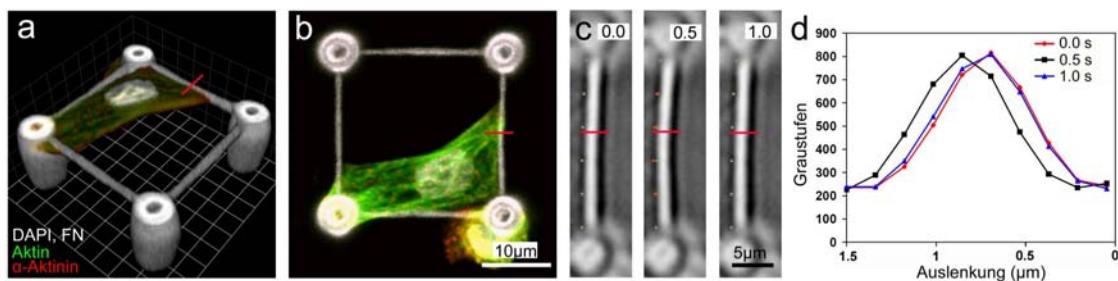


Abb. 30 Primärer Kardiomyozyt in flexibler Boxring-Struktur

Primäre Kardiomyozyten kultivieren 1-2 Tage in Protein-beschichteten Ormocer®-Radstrukturen und werden anschließend fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Kerne und Fibronektin/weiß, Aktin/grün, α -Aktinin/rot). **a)** 3D-Rekonstruktion eines konfokalen Bilderstapels in der Schrägangsicht und **b)** Aufsicht. **c)** Zeitrafferaufnahme von DIC-Einzelbildern während eines Kontraktionszyklus zeigt, dass die Strebe (Durchmesser ~0.8 μm), an der der Kardiomyozyt die größte Adhäsionsfläche aufweist, verbogen wird. Die Zeitangabe erfolgt in Sekunden. **d)** Durch Analyse der Grauwertverteilung entlang der rot skizzierten Linie in **a-c)** wird während der gezeigten Kontraktion eine maximale Auslenkung der Strebe von 0.2 μm ermittelt. Am Ende der Kontraktion kehrt die Strebe in ihre Ausgangsposition zurück.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des DLS besteht in der Herstellung kontinuierlicher und dreidimensionaler Flexibilitätsgradienten für beispielsweise Zellmigrationsstudien zur Durotaxis. Die in Abb. 31 gezeigte Anordnung eines topographischen 2.5D-Säulenfeldes besteht aus 21 Säulenreihen mit einem Abstand von 5 μm , die durch ansteigende Laserintensität an Steifigkeit zunehmen. Als Nachweis für die durch zelluläre Kräfte

verursachte Verformbarkeit werden Kardiomyozyten für ein bis zwei Tage kultiviert (Abb. 31a, b) und die Säulenauslenkung anhand der Zeitrafferaufnahmen quantifiziert.

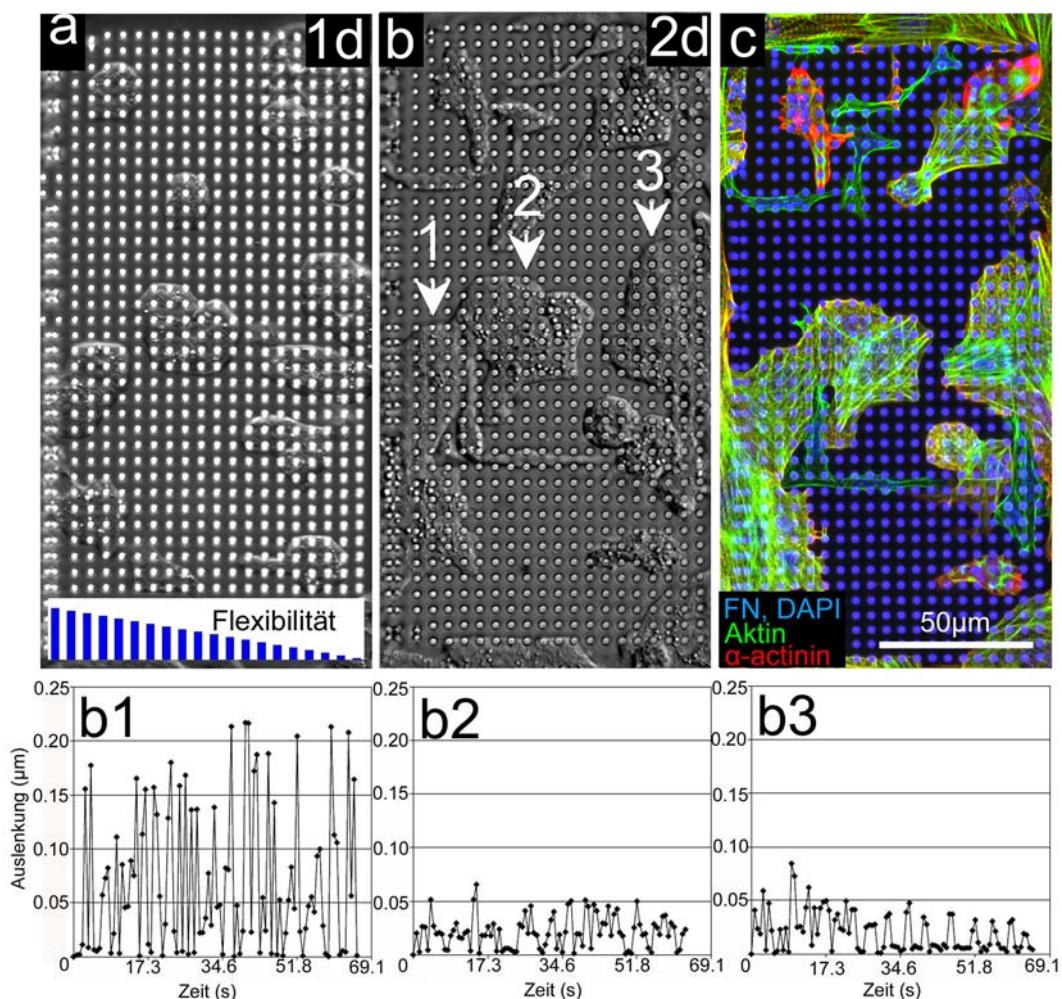


Abb. 31 Flexibilitätsgradient

Embryonale Kardiomyozyten werden auf einem Fibronektin-beschichteten Ormocer®-Härtegradienten, bestehend aus 21 Säulenreihen mit einem Abstand von 5 μm, deren Flexibilität durch Zunahme der Säulen- bzw. Linienstärke abnimmt, ausgesät. Nach a) einem und b) zwei Tagen in Kultur werden Zeitrafferaufnahmen angefertigt. In kurzen Intervallen von ca. 0.7s werden DIC-Einzelbilder aufgenommen. Anschließend werden die Zellen fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Kerne und Fibronektin/weiß, Aktin/grün, α-Aktinin/rot) und c) Maximalprojektionen von konfokalen Bilderstapeln angefertigt. Die Quantifizierung der kontraktionsvermittelten Säulenauslenkung während der Zeitrafferaufnahme erfolgt durch das Metamorph® „Object Tracking Tool“. Die Auslenkung dreier ausgewählter Säulen aus b) ist gegen die Zeit aufgetragen (1/weich, 2/mittelweich, 3/hart).

Nach einem Tag in Kultur kontrahieren die Kardiomyozyten bereits, sind jedoch häufig noch abgerundet und weniger flächig ausgebreitet. Nach einem weiteren Tag in Kultur zeigen die Zellen eine der Geometrie angepasste Morphologie (Abb. 25b1-b4). Durch die Kontraktion der Kardiomyozyten werden die Säulen rhythmisch horizontal deformiert und

die Auslenkung gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 31b1-b3). Weiche Säulen werden sichtbar ausgelenkt, harte Säulen dagegen weniger. Da die quantifizierten Auslenkungswerte jedoch unter der mikroskopischen Auflösungsgrenze liegen, können keine weiteren Angaben gemacht werden. Prinzipiell ist die Herstellung dreidimensionaler Flexibilitätsgradienten für durotaktische Zellmigrationsstudien jedoch realisierbar.

3.2.5.4 3D-Zell-Matrix-Kontakte in flexiblen Substraten

Die Dreidimensionalität allein hat in harten 3D-Substraten keinen Einfluss auf die Ausbildung und Zusammensetzung von Zell-Matrix-Kontakten (Kap.3.2.3.2). Um zu untersuchen, ob der von CUKIERMAN et al. (2001) gezeigte Unterschied in der Ausbildung von 3D-Zell-Matrixkontakten daher auf die Flexibilität der umgebenden 3D-Matrix zurückzuführen ist, werden epitheliale A549-, parenchymale BRL- und fibroblastenartige B16-Zellen 2h in fibronektinbeschichteten verformbaren 3D-Ormocer®-Substraten verschiedener Geometrien in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend wird die Expression klassischer Kontaktmarkerproteine wie Phospho-Tyrosin (Tyr99), FAK, Phospho-FAK (Tyr397), Paxillin und Phospho-Paxillin (Tyr118) immunhistochemisch detektiert. In Tab. 8 sind alle untersuchten Zelltypen mit den jeweils analysierten Kontaktmarkern aufgelistet, wobei in diesem Kapitel beispielhaft für alle Zelltypen die Ausbildung dreidimensionaler Zell-Matrix-Kontakte von BRL-Zellen in flexiblen 3D-Ormocer®-Substraten gezeigt wird (Abb. 32).

Der Signaltransduktionsmarker Phospho-Tyrosin ist in punktförmigen bis länglichen dreidimensionalen Zell-Matrix-Kontakten ausgebildet (Abb. 32a1-a3). FAK ist dagegen sehr diffus verteilt und zeigt sich nur vereinzelt in kleinen punktförmigen Kontakten (nicht gezeigt). Die FAK-enthaltenden Zellkontakte scheinen sich im Vergleich zu zweidimensionalen Zellkontakten zu verkleinern, bzw. die Focal Adhesion Kinase ist in weichen 3D-Substraten scheinbar noch diffuser angeordnet. Die phosphorylierte Form (Phospho-FAK) kommt hingegen in flexiblen 3D-Substraten zwar eindeutig vor (Abb. 32b3), wenn auch deutlich weniger distinkt ausgebildet als bei zytoskelettassoziierten Proteinen wie beispielsweise Paxillin und Phospho-Paxillin (Abb. 32c3, d3). Die hohe intrazelluläre Hintergrundfärbung sowie ein unspezifisches Phospho-FAK-Signal auch außerhalb der Zelle erschweren die Beurteilung des räumlichen Vorkommens von FAK und Phospho-FAK. Insgesamt scheinen jedoch alle untersuchten Kontaktmarkerproteine auch in flexiblen dreidimensionalen Substraten exprimiert zu werden.

Tendenziell gibt es bei den drei untersuchten Zelltypen Schwankungen in der FAK- und Phospho-FAK-Expression im Vergleich von 2D- zu 3D-Substraten unabhängig von der Härte. Jedoch sind diese Immunfärbungen auch auf planaren 2D-Substraten relativ

schwach mit hohem intrazellulärem Hintergrund, so dass die Beurteilung der dreidimensionalen Organisation durch die diffuse Verteilung dieser Proteine erschwert ist. Ein komplettes Fehlen von Phospho-FAK kann allerdings bei keinem untersuchtem Zelltyp weder in harten noch in weichen 3D-Substraten bestätigt werden, so dass die von CUKIERMAN et al. (2001) beschriebene Abwesenheit von Phospho-FAK daher vermutlich eher auf die molekulare Zusammensetzung der durch Zellen sezernierten 3D-Matrix oder auf deren spezifische Substratflexibilität oder möglicherweise einer Kombination beider Parameter zurückzuführen ist.

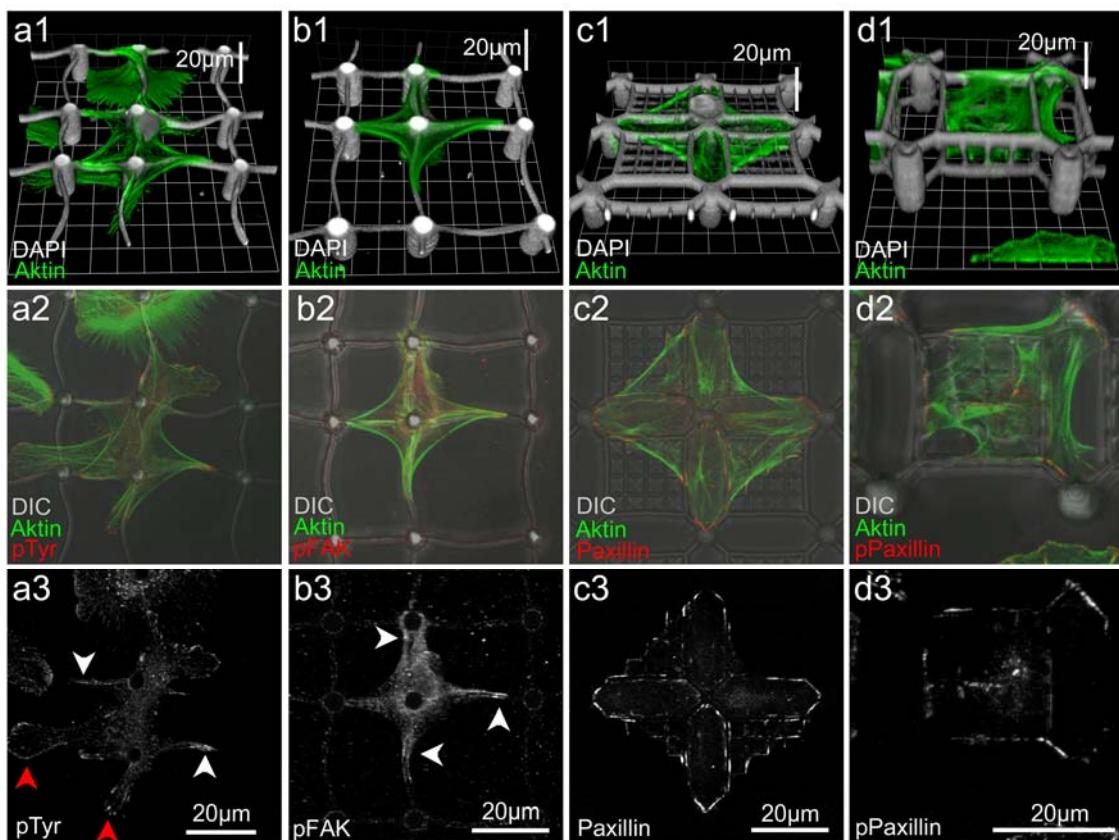


Abb. 32 3D-Zell-Matrix-Kontakte in flexiblen 3D-Substraten

Parenchymale BRL-Zellen werden 2h in Fibronectin-beschichteten 3D-Ormocer®-Strukturen unterschiedlicher Geometrie kultiviert, fixiert und gefärbt (Aktin/grün, DAPI/weiß). Die Kontaktmarker **a1-a4** pTyrosin (Tyr118), **b1-b4** pFAK (Tyr397), **c1-c4** Paxillin und **d1-d4** pPaxillin (Tyr118) sind rot bzw. weiß dargestellt. **a1-d1** Schrägangsichten von 3D-Rekonstruktionen konfokaler Bilderstapel. Aufgrund der Autofluoreszenz im Kurzweligen Anregungsbereich sind die Ormocer®-Strukturen weiß. Maximalprojektionen von Immunfärbungen (Aktin/grün, Kontaktmarker/rot bzw. weiß) sind mit **b1-b4** bzw. ohne **a3-a4** DIC dargestellt. Weiße Pfeile zeigen auf 3D-Kontakte, rote Pfeile auf 2D-Kontakte. Sowohl in weichen als auch in harten 3D-Substraten exprimieren Zellen ähnlich Kontaktmarker.

Das zytoskelettassoziierte Protein Paxillin und dessen phosphorylierte Variante werden jedoch relativ stabil in 3D-Zellkontakte unabhängig vom Zelltyp und von der

3 Ergebnisse

Substratflexibilität ausgebildet. Einzig bei epithelialen A549-Zellen war eine $\beta 1$ -Integrin-Färbung möglich, die Hinweise auf wenige und verkleinerte $\beta 1$ -Integrin-Cluster liefert. Da jedoch auch diese Immunfärbung eine diffuse Verteilung des untersuchten Rezeptors bereits auf planaren 2D-Substraten mit entsprechend geringer z-Ausdehnung offenbart, sollte diese Aussage kontrovers diskutiert werden. Bei CUKIERMAN et al. (2001) beispielsweise wurde keine Änderung der $\beta 1$ -Integrin-Expression beschrieben.

Tab. 8 Zusammensetzung Zell-Matrix-Kontakte

Zelllinien werden 2h in Fibronektin-beschichteten harten 3D-Radstrukturen und in weichen 3D-Substraten in serumfreiem Medium kultiviert. Nach der Fixierung erfolgt der Nachweis der Zellkontaktmarker mittels Immunhistochemie und Konfokalmikroskopie. (n.d./nicht durchgeführt)

	A549			BRL3A			B16-F1		
	2D hart	3D hart	3D weich	2D hart	3D hart	3D weich	2D hart	3D hart	3D weich
p-Tyr (Tyr99)	+	+	+	+	+	+			
FAK	+	+	+/-	+	+/-	+/-			
p-FAK (Tyr397)	+	+/-	+/-	+	+	+	+	+/-	+/-
Paxillin				+	+	+	+	+	+
p-Paxillin (Tyr118)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$\beta 1$ - Integrin	+	+/-	+/-	kein funktionierender Antikörper			kein funktionierender Antikörper		

4 Diskussion

4.1 Mechanismen zur Ausbildung von 2D-Zell- und Gewebeformen

Bei Zellen und Geweben ist die Form eng mit ihrer Funktion verknüpft. Eine große Rolle bei der Vermittlung der Zell- und Gewebefunktionen spielt die geometrieabhängige Verteilung von Spannung durch intrazelluläre Kontraktilität (Kap.1.3.1). Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung gemeinsamer formbestimmender Faktoren unter kontrollierten Adhäsionsbedingungen, die sowohl für Einzelzellen als auch für Gewebemodelle anwendbar sind. Durch gezielte pharmakologische Inhibition sollte zusätzlich der Einfluss der zellulären Kraftentwicklung auf die Ausbildung von Zellformen untersucht werden. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Schwarz erfolgten im Anschluss die quantitativen Bildanalysen, Computersimulationen und theoretischen Modellierungen.

4.1.1 Abstandsabhängigkeit des Radius adhärierter Zellen und Gewebe

4.1.1.1 Kreisbogenform und Abstandsabhängigkeit von Einzelzellen auf mikrostrukturierten Substraten

Im Falle der Einzelzellen ist die kontrollierte Herstellung adhäsiver Dotmuster durch Microcontact Printing erfolgt (LEHNERT et al., 2004). Parenchymale BRL- und fibroblastenartige B16-Zelllinien bilden auf Mustern mit verschiedenen Dotgrößen und Abständen eine kreisbogenförmige, nach innen gerichtete Zellkontur aus. Der Radius der Kreisbögen nimmt dabei mit dem Abstand der Adhäsionspunkte zu. Die Peripherie ist durch prominente Aktinfilamente definiert, die zwei Adhäsionspunkte miteinander verbinden und in Zellkontakte über den Fibronektin-Dots enden. Sie sind somit per Definition ventrale und infolgedessen kontraktile Stressfasern (Kap.1.2.2) (NAUMANEN et al., 2008; SMALL et al., 1998). Der Aufbau dieser Stressfasern ist aus der Literatur hinreichend bekannt. Die periodische Verteilung von Myosin und α -Aktinin (ZAND und ALBRECHT-BUEHLER, 1989) bei alternierender Aktinfilamentpolarität ermöglicht die Kontraktion (Abb. 33). Nach 80min in Kultur haben beide Zelllinien ihre endgültige Zellform angenommen. Auch nach längerer Kultivierungszeit von sechs Stunden zeigen sich keine Änderungen in der kreisbogenförmigen Zellperipherie, da Migrationsprozesse bereits abgeschlossen sind. Die Verringerung von Migrationsprozessen, abhängig vom Substrat, sowie die Reproduzierbarkeit von Zellformen bei Adhäsionsbegrenzung wurde schon mehrfach beschrieben (SINGHVI et al., 1994; THÉRY et al., 2006). Eine verlängerte Kultivierungszeit wirkt sich eher nachteilig auf die Kontrolle der Adhäsionspunkte aus, da

Zellen trotz Kultivierung in serumfreiem Medium Proteine sekretieren und die Substratgeometrie modifizieren. Die Bildung von Fibronektinfibrillen wurde bereits in Abhängigkeit von der Substratgeometrie (BROCK et al., 2003) und auf den hier verwendeten Substratmustern demonstriert (LEHNERT, 2003). Auch das Abreißen von Fibronektin-Dots ist eine Möglichkeit der zellulären Substratmodifikation (LEHNERT, 2003). Die Kurzzeitkultivierung ist somit besser geeignet und stellt dennoch ein stabiles System dar, in dem dynamische Migrationsprozesse keine Rolle spielen.

Die Form der Zellen ist klar durch die Anordnung und Ausrichtung der Aktinfilamente definiert. Um die strukturelle Bedeutung der Mikrotubuli zu untersuchen, sind Tubulin-Färbungen durchgeführt worden. In der Peripherie von Zellen auf homogenen Substraten sind Mikrotubuli ähnlich wie Aktinfilamente häufig parallel zum Leading Edge angeordnet. Die Bewegung von Mikrotubuli-Plusenden entlang von Aktinfilament-Bündeln wurde bereits gezeigt (KODAMA et al., 2003) und auch die Kopplung beider Filamente ist beschrieben (SALMON et al., 2002). Aktin- und Mikrotubulifilamente zeigen hier jedoch keinen klar erkennbaren Bezug zueinander. Ebenso wurde bereits gezeigt, dass Mikrotubuli in Zellkontakte enden können (KRYLYSHKINA et al., 2003). Auf den in dieser Arbeit hergestellten strukturierten Substraten sind die möglichen Zellkontakte durch die Geometrie vorgegeben. Mikrotubuli enden hier zwar in Zellkontakte, jedoch deutlich seltener als Aktinfilamente. Der Substrateinfluss auf die Organisation der Mikrotubuli bzw. die damit verbundene Zellform ist weit weniger offensichtlich als bei Aktinfilamenten (LEHNERT, 2003). Die Bedeutung der Mikrotubuli ergibt sich vermutlich eher aus der Dynamik der Zelladhäsion bzw. Migration, die hier jedoch unberücksichtigt bleibt, da die Zellen bereits maximal ausgebreitet sind.

4.1.1.2 Kreisbogenform und Abstandsabhängigkeit adhärierter zellgewebeartiger Kollagengele

Das Gewebemodell ist an frühere Experimente zur Gewebeentwicklung durch Zugkräfte angelehnt (BELL et al., 1979; STOPAK und HARRIS, 1982) und wurde im Rahmen dieser Arbeit modifiziert und weiterentwickelt. Die Kontrolle der Adhäsionspunkte erfolgt durch die Verankerung von Stahlnadeln in auspolymerisiertem PDMS, das zuvor in eine Plastikpetrischale gegossen wurde. Primäre Hühnerfibroblasten kontrahieren das anfänglich homogen verteilte Kollagengel, wodurch sich eine kreisbogenförmige Gelkontur ausbildet. Auch im Gewebemodell nimmt der Kreisbogenradius mit dem Abstand der Stahlnadeln zu. In der Peripherie der Kollagenmatrix sind die Fibroblasten längs ausgerichtet und parallel angeordnet. Innerhalb des Kollagengeles sind die Zellen dagegen isotropisch verteilt. Die Verformung des Geles resultiert einzig durch die enthaltenen Fibroblasten, da sich Kontrollgele ohne Zellen nicht verformen und während

des Untersuchungszeitraumes auch nicht austrocknen. Die kontrollierte Dehydratisierung durch Zugabe hygroskopischer Salze lässt das Gel zwar schrumpfen, kann jedoch das durch Zellkontraktion ausgelöste Alignment der Kollagenfibrillen nicht simulieren, wie Phasenkontrast- und Dunkelfeldmikroskopieaufnahmen früherer Arbeiten zeigten (STOPAK und HARRIS, 1982). FERNANDEZ et al. (2009) beobachteten zuerst das Alignment bzw. die irreversibele Anordnung der Kollagenfibrillen und erst in einem zweiten Schritt die Zellorientierung entlang der ausgerichteten Kollagenfibrillen und möglicherweise aufgrund der Wahrnehmung der steiferen Umgebung. Die Ausrichtung der Kollagenfibrillen ist somit nicht eine direkte Folge anisotroper Zellaktivität, sondern folgt aus dem Zusammenspiel isotroper Zellkontraktion und anisotropen Gelkollaps bei den gegebenen Randbedingungen. In der hier vorgestellten Arbeit scheinen die zellulären Zugkräfte während der Gelkontraktion mit verankernden Nadeln enorm zu sein, da das Gel im Bereich der eingesteckten Nadeln einreißt. Diese großen Kontraktionskräfte wurden auch in früheren Experimenten mit Kollagengelen beobachtet (STOPAK und HARRIS, 1982). FERNANDEZ et al. (2009) inhibierten die Aktivität der Motorproteine durch Blebbistatin zu Beginn der Gelbildung und verhinderten so die Gelkontraktion. Die Inhibitor-Zugabe zu einem späteren Zeitpunkt stoppte das kontraktionsbedingte Zusammendrücken. Da die Myosinhibition gleichzeitig nur zu einer sehr geringen Materialentspannung führte, ist der Großteil der Kontraktion daher eine plastische Deformation (FERNANDEZ und BAUSCH, 2009). Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit Experimenten, bei denen kontrahierte Gele auch nach der Zellentfernung durch Detergenzien oder Enzyme komprimiert bleiben (GUIDRY und GRINNELL, 1987).

Die zellulären Kontraktionskräfte sind vom Zelltyp abhängig. Die Kultivierung der BRL- und B16-Zelllinien hat in dieser Arbeit zu einer verringerten Gelkontraktion im Vergleich zu Primärzellen geführt und lässt somit zelltypabhängig die Ausbildung geringerer Zellkräfte vermuten. Ähnliche Beobachtungen über höhere Zellkräfte von Primärzellen gegenüber Zelllinien sind mehrfach beschrieben (FERNANDEZ und BAUSCH, 2009; STOPAK und HARRIS, 1982). Neben der Auswahl des Zelltypes spielen die verwendeten Zelldichten und Kollagenkonzentrationen eine entscheidende Rolle. Dies wurde bereits gegen Ende der 1970 Jahre systematisch getestet (BELL et al., 1979). In der hier vorgestellten Arbeit beträgt die optimale Zelldichte zu Beginn des Experiments 5×10^5 Fibroblasten, die in 3ml einer Kollagenlösung mit einer Konzentration von 1.5mg/ml kultiviert werden. Daß die Ausgangszelldichte bedeutend für die Gelkontraktion ist, zeigt die häufige Migration weniger isolierter Zellen im Vergleich zu dichten, stationären, zugausübenden Zellclustern (FERNANDEZ und BAUSCH, 2009). Im Falle der hier verwendeten primären Fibroblasten führen zu hohe Zelldichten zwar zu einer beschleunigten Kontraktion, lassen das System aber auch vorzeitig kollabieren. Platz- und Nährstoffmangel könnten dabei eine Rolle

spielen. Erste Experimente mit flexiblen PDMS-Säulen als Verankerungspunkte zeigen eine weniger klar definierte Gelkontur. Der Widerstand gegen die Kontraktionskräfte ist kleiner als bei Stahlnadeln und die Auslenkung der PDMS-Säulen in Richtung der Gelmitte lässt auf die Kraftrichtung schließen. Zukünftige Experimente mit definiert flexiblen Säulen könnten eine Vielzahl von Untersuchungsmöglichkeiten wie beispielsweise die Dynamik der Kraftentstehung oder den Einfluss der Verankerungskräfte auf die Zell- und Kollagenverteilung im Gel ermöglichen. Kollagengele ohne Adhäsionspunkte kontrahieren anfangs gleichmäßig und lösen sich kreisrund vom Petrischalenrand ab. Eine optisch dichtere Gelperipherie ist dabei erkennbar. Nach vier Tagen beginnt eine Einstülpung des Geles, bei der sich die kompakte Peripherie immer weiter einschnürt und das Volumen des Kollagengels stetig verkleinert. Eine durch Zellen bedingte Kollagenschrumpfung bis zu 1% des Originalvolumens ist möglich (FERNANDEZ und BAUSCH, 2009). Der Widerstand gegen Kompressionskräfte scheint daher ohne Adhäsionspunkte sehr klein zu sein. *In vivo* kommen Kollagene oft in einer zähen und gleichzeitig komprimierbaren proteoglykanhaltigen Matrix vor. Die Interaktionen mit Proteoglykanen (MAYNE, 1989) werden durch den hohen Anteil an Hydroxy-Lysinen sowie Glycosyl- als auch Galatosyl-Resten vermittelt und sind in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Zusammenfassend sind Einzelzellen und Gewebe zwei Modellsysteme auf vollkommen unterschiedlichen Ebenen, die dennoch erstaunliche Gemeinsamkeiten in der Ausbildung ihrer Form aufzeigen, wenn geometrische Adhäsionspunkte vorgegeben sind. Quantitative Bildanalysen zeigen, dass sowohl Einzelzellen als auch Zellpopulationen im Gewebemodell eine kreisbogenförmige Kontur aufweisen, deren Durchschnittsradius R mit dem Abstand d der Adhäsionspunkte zunimmt. Seit einigen Jahren werden Substratstrukturierungstechniken zur Untersuchung des Einflusses von Adhäsionsgeometrie auf Einzelzellen eingesetzt (Kap.1.3.1). Dennoch wurde bisher die Zellform in Abhängigkeit zur Substratgeometrie noch nicht systematisch vermessen. Kreisbogenförmige Zellkonturen auf homogenen (BAR-ZIV et al., 1999; ZAND und ALBRECHT-BUEHLER, 1989) und zum Teil auf strukturierten Substraten wurden zwar, abhängig vom zeitlichen Verlauf des Spreadings, bereits beschrieben (THÉRY et al., 2006). Das Auftreten der Bögen wurde jedoch bisher mit dem einfachen Spannungsmodell basierend auf dem Laplace-Gesetz erklärt (BAR-ZIV et al., 1999; THÉRY et al., 2006; ZAND und ALBRECHT-BUEHLER, 1989). Dabei wirkt eine Oberflächenspannung einer Linienspannung entgegen und definiert so die Zellkontur. Die Abstandsabhängigkeit der Kreisbogenradien kann mit diesem einfachen Modell allerdings nicht erklärt werden.

4.1.2 Formgebung durch filamentöse Netzwerkmechanik und Kontraktilität

Die in biologischen Experimenten beobachteten Kreisbögen konnten durch Computersimulationen, bei denen das Einfache Spannungsmodell durch elastische Komponenten erweitert ist, erzeugt werden. Das einfachste theoretische Modell im Einklang mit biologischen Experimenten ist ein kontraktiles Kabelnetzwerk, das jedoch nicht vollelastisch ist, sondern bei Kompression keinen Verformungswiderstand zeigt. Die Modifikation des Laplace-Gesetzes berücksichtigt eine strukturell verstärkte und kontraktile Kontur und kann nicht nur die Kreisbögen, sondern auch die Abhängigkeit des Radius R vom Abstand d erklären. Bisherige Modelle zur Ausbildung der Zellform basierten entweder auf der Elastizität (FUNG, 1993) oder auf der Spannung (INGBER, 2003). Doch die Kombination von Spannung und Elastizität mit der Mechanik eines filamentösen, aktiv kontrahierenden Netzwerkes scheint für die Formgebung ausschlaggebend zu sein. Dabei ist das filamentöse Netzwerk als Kabelnetzwerk modelliert, das in sich Eigenschaften von Polymeren vereint. Polymere sind unter Zug elastisch und verformen sich bei Kompression (COUGHLIN und STAMENOVIC, 2003). Experimente belegen die *in vitro* Verformung von Aktinfilamente durch Myosin-II-Motorproteine (BERRO et al., 2007) oder auch die Verformung von Kollagenfibrillen durch Fibroblasten (MESHEL et al., 2005). Aufgrund der asymmetrischen mechanischen Antwort im Spannung-Elastizitätsmodell spielen weittragende Kompressionselemente nur eine untergeordnete Rolle.

4.1.2.1 Untergeordnete Rolle der Kompressionselemente

Im Tensegrity-Modell (Kap.1.2.3) vermitteln vor allem Mikrotubuli und Intermediärfilamente den Widerstand gegen zelluläre Kompression und kompensieren als eine Art Stützstreben die Zugkräfte des umgebenden Zytoskeletts (INGBER, 2008). Die hier gezeigte immunhistochemische Tubulin-Färbung belegt, dass Mikrotubuli in der Zelle im Gegensatz zu den meist gestreckten Aktinfilamenten deformiert sind (sogenanntes „buckling“). Diese klassische „buckling“-Wellenform wird ausgebildet, wenn Mikrotubuli auf härtere Zellkomponenten oder die Zellperipherie treffen oder wenn die intrazelluläre Spannung erhöht wird (BRANGWYNNE et al., 2006; KAECH et al., 1996; WANG et al., 2001, Waterman-Storer, 1997 #986). Mikrotubulifilamente zeigen jedoch nicht nur eine gewisse Steifigkeit, sondern sind zudem auch elastisch, da sie sich nach dem Durchschneiden mit einem Laser begradigen (HEISTERKAMP et al., 2005). Im Modell werden die Eigenschaften der Mikrotubuli, ähnlich wie Aktinfilamente unter Kompression zu buckeln, durch den Kabelcharakter des filamentösen Netzwerkes wiedergegeben.

Doch wie hoch ist tatsächlich der kompressive Beitrag der Mikrotubuli in der Zelle? Die Interpretation der Wellenlänge der Mikrotubuli sowie Inhibitionsexperimente geben kontroverse Hinweise. Die relativ kleine „buckling“-Wellenlänge von 2-3µm könnte durch die Kompression aufgrund von Verbindungen zu anderen Zytoskelettkomponenten (BRODLAND und GORDON, 1990; CHANG und GOLDMAN, 2004) zustande zu kommen. Mikrotubuli könnten somit einen größeren Widerstand gegen Verformungen aufbringen als bisher aufgrund der Wellenlänge angenommen (BRANGWYNNE et al., 2006). Für die Stützfunktion der Mikrotubuli spricht auch, dass nach ihrer Inhibition die Zellen verstärkt kontrahieren (BROWN et al., 1996; GILLS et al., 1998). Mikrotubuli-Inhibitionsexperimente sollten allerdings kritisch diskutiert werden. Mikrotubuli-Inhibitoren wie Nocodazol erhöhen die Phosphorylierung der MLC und steigern daher die Kontraktilität (KOLODNEY und ELSON, 1995) oder können, wie Colchicin und Paclitaxel, die Aktinpolymerisation auslösen, wodurch sich ebenfalls die Zytoskelett-Steifigkeit erhöht (TSAI et al., 1998). Nach Mikrotubuli-Inhibition durch Colchicin zeigte eine Zunahme der kontraktilen Kraft auf das unten liegende Substrat, dass Mikrotubuli nur ca. 12% der zellinternen Spannung ausbalancieren. Der Großteil wird vermutlich über die Substratadhäsion kompensiert (STAMENOVIC et al., 2002). Spätere Arbeiten betrachten die Rolle der Mikrotubuli dynamisch. Bei kleiner Spreadingfläche gleichen Mikrotubuli ca. 80%, bei großer Spreadingfläche nur noch ca. 10% der intrazellulären Spannung aus (STAMENOVIC, 2005). Die Bedeutung der Mikrotubuli als kompressible Elemente in einer vollständig ausgebreiteten Zelle ist daher wahrscheinlich sehr klein.

4.1.2.2 Rho-vermittelte Kontrolle über Spannung und Elastizität in der Peripherie

Im vorgestellten Modell wird die Ausbildung von Zell- und Gewebeform über zwei Kontrollwege vermittelt. Der eine Weg reguliert die strukturelle Verstärkung der Begrenzung bzw. der Peripherie und der andere kontrolliert die aktive Kontraktion der Kabelkontur und reduziert so deren Länge. Im Fall der Zellen stimmen die beiden Kontrollwege mit der Rho-vermittelten Signaltransduktion, die sich hauptsächlich in zwei Wege unterteilt, überein. Einerseits werden die Aktinstrukturen durch das Formin mDia umorganisiert und andererseits wird durch die Rho-Kinase ROCK die Myosin-II-Motoraktivität reguliert (BURRIDGE und WENNERBERG, 2004; RIVELINE et al., 2001). Die Unterscheidung der beiden Kontrollwege wurde zum Einen durch die Steifigkeit bzw. die Vermessung der Dicke der Aktinfilamente in Abhängigkeit von den Kreisbogenradien ermöglicht und zum Anderen durch Inhibition der intrazellulären Kontraktilität realisiert.

Durchschnittlich bilden Stressfasern mit dickeren Filamentbündeln größere Kreisbögen aus und Stressfasern mit weniger dicken Bündeln entsprechend kleinere. Die Elastizität des kontraktilen Netzwerkes wird daher durch die strukturellen Eigenschaften der Kontur

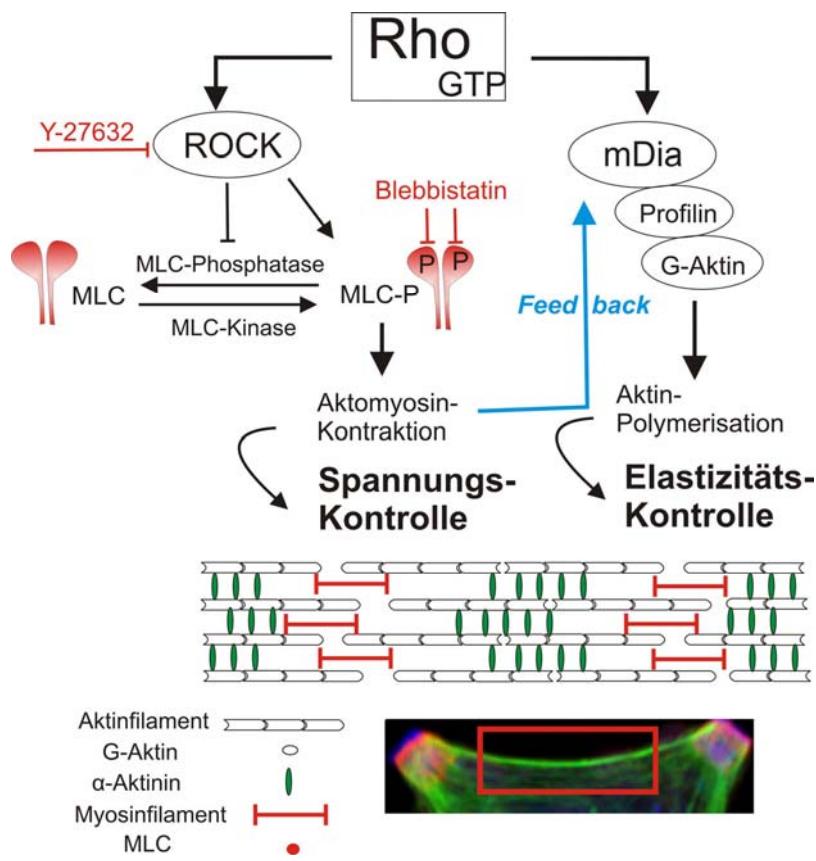


Abb. 33 Rho vermittelte Kontrolle über Spannung und Elastizität in Stressfasern

Die Rho-Effektoren ROCK und mDia tragen zur Ausbildung organisierter Stressfasern bei und regulieren über zwei mechanosensitiv gekoppelte Kontrollwege die Zellform. ROCK vermittelt indirekt über Inhibition der MLC-Phosphatase oder direkt die MLC (engl myosin light chain) Phosphorylierung und trägt dadurch zur verstärkten Aktomyosinkontraktion bei. Die Zellform wird infolgedessen spannungsabhängig kontrolliert (durch die kontrollierte Filamentrestlänge und Motoraktivität). Durch die Interaktion von mDia mit Profilin wird die Aktinpolymerisation ausgelöst. In der Zellperipherie vorkommende Stressfasern werden so strukturell verstärkt. Die Zellform wird demzufolge auch über die Elastizität kontrolliert. Die Inhibitoren Y-27632 und Blebbistatin führen zu einer Dephosphorylierung der MLC bzw. Inhibition der Myosin-ATPase und hemmen die Ausbildung intrazellulärer Kontraktilität. Modifiziert nach RIVELINE et al. (2001) und BESSER und SCHWARZ (2007).

definiert, die durch den Einbau neuer Aktinmonomere verstärkt werden kann. Das zur Formin-Familie gehörende Aktinbindeprotein mDia (engl. diaphanous-related formin/DRF) vermittelt sowohl die Aktinpolymerisation durch einen Profilin-abhängigen Mechanismus sowie die Stabilisierung der Mikrotubuli-Plusenden während der Zellmigration (SCHWARTZ, 2004). Formine sind Multidomänenproteine und werden durch die Bindung von Rho-GTP aktiviert bzw. inhibitorische Interaktionen zwischen den Domänen aufgehoben (EVANGELISTA et al., 2003; LI und HIGGS, 2003). Die Prolin-reiche FH1-Domäne bindet an das G-Aktin-bindende Protein Profilin (IMAMURA et al., 1997; WATANABE et al., 1997).

Durch Interaktion von Formin und Profilin können ATP-gebundene Aktinmonomere an die wachsenden Plus/barbed-Enden der Aktinfilamente gebracht werden (THERIOT und MITCHISON, 1993; WEAR et al., 2000). Die Stressfasern werden durch den Monomereinbau strukturell verstärkt und somit weniger elastisch (Abb. 33). Die theoretisch erwarteten größeren Kreisbögen werden auch im Experiment ausgebildet.

Bei Vorhandensein großer Spannungen in den Stressfasern werden große Kreisbögen erwartet und umgekehrt. Der spannungsabhängige Kontrollweg des Modells wurde experimentell durch Zugabe von Y-27632 und Blebbistatin, zwei pharmakologischen Inhibitoren der intrazellulären Kontraktilität, überprüft. Das Pyridinderivat Y-27632 inhibiert konzentrationsabhängig u.a. den Rho-Effektor ROCK (ISHIZAKI et al., 2000; UEHATA et al., 1997). Zwei wichtige ROCK-Substrate sind die regulatorische MLC von Myosin II und die MBS (engl. myosin binding subunit) der MLC-Phosphatase (BISHOP und HALL, 2000). Durch Y-27632 nimmt die Phosphorylierung der MLC ab, wodurch Aktin-Interaktionen, die zur Aktivierung der Myosin-ATPase führen, verringert werden (RIENTO und RIDLEY, 2003). Die Zellkontraktilität wird somit unterdrückt. Blebbistatin greift downstream der Signalkaskade an und inhibiert direkt die Myosin-ATPase (KOVACS et al., 2004; LIMOUZE et al., 2004). Problematisch bei der Inhibition der Myosinmotoren ist die gleichzeitig erwartete Reduktion der Oberflächenspannung. Die Kreisbögen könnten daher prinzipiell zu- oder abnehmen. Bei beiden Inhibitoren zeigt sich im Experiment eine starke Verkleinerung der Radien und somit eine Reduktion der Linienspannung, die auch in früheren Arbeiten beobachtet wurde (THÉRY et al., 2006). Eine gewisse Rest-Oberflächenspannung scheint daher erhalten zu bleiben. Bei der Inhibition mit Y-27632 könnte ein Teil der Kontraktilität über andere Signalwege aufrechterhalten oder kompensiert werden. Kleine GTPasen wie Rac und Cdc42 phosphorylieren die MLC über PAK und können ebenfalls Kontraktilität induzieren (CHEW et al., 1998; DEL POZO et al., 2000; SELLS et al., 1999). Zur Kompensation der inhibierten Myosin-ATPase ist weniger bekannt. Insgesamt jedoch führen beide Inhibitoren zu einer Verkleinerung der Kreisbögen in gleichem Maße. Allgemein könnte die Oberflächenspannung durch Anteile der Plasmamembran oder des Aktinkortex erhalten bleiben.

4.1.2.3 Mechanosensing in Stressfasern

Beide Inhibitoren führten jedoch nicht nur zu verkleinerten Radien, sondern ebenso zur Entstehung dünnerer Aktinfilamentbündel in der Peripherie. Diese strukturelle Änderung nach Hemmung der Myosinmotoren zeigt, dass beide Wege mechanosensitiv gekoppelt sind. Es ist bekannt, dass Myosin vermittelte Kontraktilität wichtig für die Integrität der Stressfasern ist. Bei Verlust an Myosin-II bilden sich entsprechend weniger Stressfasern aus (CHRZANOWSKA-WODNICKA und BURRIDGE, 1996), (HOTULAINEN und LAPPALAINEN,

2006). In den inhibierten Zellen sind die Aktinfilamente nicht völlig verschwunden. Einige Aktinfaserreste werden trotz Langzeit-Inhibition ab Beginn des Spreadings ausgebildet (KLEIN, 2005) bzw. bleiben während der hier gezeigten 20min Inhibition erhalten. Es gibt Hinweise, dass Rac und Cdc42 über die LIMK Aktinfilamente stabilisieren und F-Aktin akkumulieren (MAEKAWA et al., 1999). Auch mDia1 kann in Abwesenheit von ROCK dünne, desorganisierte Stressfasern ausbilden (WATANABE et al., 1999). Aufgrund der hier gezeigten Kopplung von kontraktilitätsabhängiger Spannung und strukturell bedingter Elastizität ist der mDia-Aktin-Komplex möglicherweise ein Mechanosensor, der auf erhöhte Kraft durch verstärkte Aktinpolymerisation reagiert (BERSHADSKY et al., 2006). Formine binden an das Plusende und ermöglichen im Gegensatz zu herkömmlichen Capping-Proteinen das Anlagern von Aktinmonomeren. Eine, durch ein einzelnes Myosinmolekül entstehende Zugkraft von ~3.5pN, reduziert bereits die kritische Monomerkonzentration am Plusende um eine Größenordnung im Vergleich zur Konzentration ohne Krafteinwirkung. Eine kraftinduzierte Aktinpolymerisation ist die Folge (KOZLOV und BERSHADSKY, 2004).

Doch auch die Interaktion von mDia mit Profilin steigert die Aktinpolymerisation an freien Plus/barbed-Enden der Aktinfilamente (KANG et al., 1999; PANTALONI und CARLIER, 1993; WATANABE et al., 1997). Profiline sind kleine Aktinbindende Proteine, die Aktinmonomere mobilisieren und in engen Kontakt zu polymerisierenden Plusenden bringen (LAMBRECHTS et al., 2004). Durch den kraftabhängigen Einbau neuer Monomere in Aktinfilamente durch Polymerisation kann mehr Aktomyosinabhängige Kraft erzeugt werden, die ein weiteres Filamentwachstum induziert. Das so theoretisch unbegrenzte Wachstum kann ebenfalls durch mDia gestoppt werden. Das Formin mDia1 koordiniert die parallele Ausrichtung von Mikrotubuli und Aktinfilamenten (ISHIZAKI et al., 2001; YAMANA et al., 2006) und die Mikrotubuli-Stabilisierung (PALAZZO et al., 2004). Durch die somit gerichtete Polymerisation können Mikrotubuli in Zellkontakte enden (KAVERINA et al., 1999; KAVERINA et al., 1998), die dann aufgelöst werden können. Denkbar wäre eine lokale Inhibition der Myosin-II-abhängigen Kontraktilität (SMALL et al., 2002), beispielsweise durch die lokale Inaktivierung einiger Rho-GEFs durch Mikrotubuli (KRENDEL et al., 2002). Der duale mDia Charakter ermöglicht somit einerseits kraftabhängige Aktinpolymerisation und anderseits Mikrotubuli-abhängige Kontraktilitätsabnahme und spiegelt somit die mechanosensitive Kopplung des Spannungs- und Elastizitätsmodells wider. Um die Stressfasern gezielt zu manipulieren und so die Beziehungen zwischen Mechanik und Signaltransduktion zu untersuchen, können die Methoden der laserbasierten Nanochirurgie oder AFM-vermittelten Mikromanipulationen eingesetzt werden (COLOMBELLI et al., 2009; KUMAR et al., 2006). Somit konnten bereits genauere Modellierungen von Stressfasern sowohl in Bezug auf die Mechanik (BESSER und

SCHWARZ, 2007; LUO et al., 2008) als auch in Bezug auf die Biochemie (BESSER und SCHWARZ, 2007) durchgeführt, sowie experimentelle Hinweise auf das Mechanosensing in Stressfasern aufgezeigt werden. COLOMBELLI et al. (2009) demonstrierten die kraftabhängige Akkumulation von Zyxin an den Enden Laser-durchtrennter Stressfasern oder auch beim Ausüben eines externen Zugs durch einen AFM-Kantilever. Zyxin könnte demnach auch ein Spannungssensor sein, der während des Gleitens von Stressfasern über der Membran kraftabhängig α -Aktinin aktiviert und somit beispielsweise Stressfasern mit Zellkontakte verbindet (ZAIDEL-BAR et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit beeindruckende Gemeinsamkeiten zwischen Einzelzellen und Zellpopulationen im Gewebemodell bei kontrollierter Adhäsion aufgezeigt sind. Beide Modellsysteme präsentieren krafterzeugende kontraktile Motoren in einem filamentösen Netzwerk auf verschiedenen Ebenen. In Einzelzellen kontrahieren Myosinmotoren ein Aktinnetzwerk, im Gewebe kontrahieren die eingebetteten Zellen das umgebende Kollagennetzwerk. Strukturelle Gemeinsamkeiten in der Peripherie sind parallel ausgerichtete Aktinmyosinfilamente in Einzelzellen bzw. langgestreckte Zellen in ausgerichteten Kollagenfasern im Gel. Computersimulationen und theoretische Modellierungen zeigen, dass die experimentell beobachteten Kreisbögen aufgrund eines kontraktilen filamentösen Netzwerkes entstehen, dass abhängig von Spannung und Elastizität die Form von Zellen und Geweben bestimmt.

4.2 Zellform und -Verhalten in geometrischen und flexiblen 3D-Substraten

Die überwiegende Mehrheit zellbiologischer Studien wurde in der Vergangenheit auf planaren Glas- oder Plastiksubstraten durchgeführt. Diese konventionellen Substrate stellen jedoch für die Zellen artifizielle flache und steife Umgebungen dar (ELSDALE und BARD, 1972), wodurch die Interpretation der Ergebnisse sehr stark eingeschränkt ist. Wirklichkeitsnahe Zellkultursubstrate sollten verstärkt die *in vivo* Eigenschaften der ECM widerspiegeln, deren Multiadhäsionsmatrixproteine in einem dreidimensionalen und flexiblen Gerüst organisiert sind. Die Umsetzung dieses Ziels gelang in dieser Arbeit durch die Herstellung und Charakterisierung völlig neuartiger geometrischer dreidimensionaler Zellkultursubstrate mit definierter Flexibilität, die in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Wegener entwickelt wurden. Die nachfolgende systematische Kultivierung von Zelltypen verschiedenen Gewebeursprungs lieferte neue

Erkenntnisse über die Bedeutung der Dreidimensionalität, Geometrie und Flexibilität auf die Ausbildung von Zellformen sowie grundsätzliche Zellverhaltensweisen.

4.2.1 Grundlegendes Zellverhalten in geometrischen 3D-Substraten

4.2.1.1 Herstellung und Biokompatibilität der 3D-Substrate

Die hier gezeigte Herstellung dreidimensionaler Substrate erfolgt durch Direktes Laserschreiben auf der Grundlage der Zwei-Photonenabsorption (CUMPSTON et al., 1999). Es sind beliebige Formen von 3D-Substraten, bestehend aus Linien mit einer lateralen Ausdehnung >100nm und einer Gesamthöhe von ~80µm in sehr kurzer Zeit realisierbar und sie garantieren die Kontrolle über die 3D-Architektur im Submikrometerbereich. Somit können Kompartimente ausgebildet werden, deren Porengrößen das Einwachsen von Zellen und den Transport von Nährstoffen und Metaboliten sichern. Bei der Herstellung gewöhnlicher Gele und herkömmliche poröser 3D-Substrate fehlt dagegen die Kontrolle über die Architektur bzw. die Adhäsionspunkte (Kap.1.4), die erst durch die Methoden der Festen Freiformflächen-Herstellung realisiert wurde (SACHLOS und CZERNUSZKA, 2003). Unter all diesen Methoden zeichnet sich die 2PP durch die schnelle Herstellung deutlich kleinerer und vor allem präziser kontrollierbarer Kompartimente aus.

Die enge Verknüpfung von Dreidimensionalität und Flexibilität erschwert in konventionellen 3D-Gelen die Bedeutungserkenntnis einzelner Parameter. Um gezielt und alleinig den Einfluss der Dreidimensionalität auf das Zellverhalten zu untersuchen, sind Zellen in 3D-Glassubstraten mit einheitlicher Materialsteifigkeit kultiviert worden. Harte 3D-Substrate werden nach der 2PP verglast und der Lack entfernt. Die Struktur besteht somit aus dreidimensional angeordneten Glasröhren (Kap.2.3.1). Nachteilig wirken sich die vielen zeitaufwendigen Arbeitsschritte aus. Die Vorteile von 3D-Glassubstraten bestehen in der Langlebigkeit aufgrund der hohen Stabilität sowie der sehr guten Chemikalien- und Hitzebeständigkeit, die ein mehrmaliges Wiederverwenden ermöglichen. Die Glasröhren haben jedoch auch den Nachteil, dass toxische Chemikalienreste nur schwer vollständig entfernt werden können, was zwar oftmals das Zellwachstum beeinträchtigt, jedoch durch häufige Spülsschritte unterbunden werden kann. Aufgrund der gewährleisteten Kontrolle über die Geometrie und die Stabilität des Substrates wird ein erstes wichtiges Kriterium für den Einsatz der 3D-Substrate im Bereich der Zellkulturanwendungen erfüllt.

Die systematische Kultivierung epithelialer, parenchymaler und fibroblastenartiger Zelllinien in Gitterstrukturen mit ansteigenden Gitterabständen hat deutlich gezeigt, dass für ein vollständiges Einwachsen der Zellen Abstände von $\geq 10\mu\text{m}$ erforderlich sind (Abb. 19). Bei kleineren Gitterabständen werden lediglich Zellfortsätze in das Substrat

gesendet. Zellkerne verbleiben dann als limitierender Faktor außerhalb der Struktur. Auch nach Langzeitkultivierungen wird diese geometrische Grenze nicht unterschritten. Ebenso definierten TAYALIA et al. (2008) bei 3D-Zellmigrationsstudien mit vergleichbaren Substraten die Gitterkonstante von ~10µm als kleinstmögliche Porengrößen. Aufgrund der gewonnenen Kenntnisse über die geometrische Limiterung des zellulären Einwachsens sind 3D-Radstrukturen entstanden, die infolge ihrer vielfältigen Winkel und großzügigen Hohlräume für Zellverhaltensanalysen verwendet wurden.

Die Zelladhäsion in den 3D-Substraten wird durch die Beschichtung mit zahlreichen ECM-Proteinen gewährleistet, die *in vivo* am häufigsten vorkommen (Kap.1.1). Der Nachweis der Ligandenbindung von Fibronektin, Laminin, Kollagen und Vitronektin ist durch immunhistochemische Färbungen mit sich anschließender Konfokalmikroskopie erbracht worden (Abb. 17). Während der Kultivierung spannen sich Zellen dreidimensional in den Substraten mit Aktinstressfasern auf und zeigen eine räumliche Anordnung von Zellorganellen (Zellkern, Golgi-Apparat) sowie die Ausbildung typischer Zell-Matrix-Kontakte.

In den 3D-Gitterstrukturen ist die Zellproliferation im Vergleich zu zweidimensional spreadenden Zellen unmittelbar neben den 3D-Strukturen zwar signifikant erhöht, in den Radstrukturen jedoch vergleichbar zur Teilungsrate auf 2D-Substraten. Die Unterschiede in der Proliferationsrate könnten auch auf eine nicht ausreichende Zellzyklus-Synchronisation durch Serumzug (CHANG und BASERGA, 1977) zurückzuführen zu sein. Überdies gibt es keine Unterschiede in der Teilungsrate von 2D-Kontrollzellen unmittelbar neben den Gitterstrukturen mit den Zellen innerhalb der 3D-Räder, was die Möglichkeit von Zellzyklusschwankungen untermauert. CUKIERMAN et al. (2001) zeigten eine Verdopplung der Proliferationsrate von Fibroblasten in einer von Zellen sezernierten 3D-Matrix im Vergleich zu einer identisch zusammengesetzten komprimierten 2D-Matrix. Die Proliferationsrate der von CUKIERMAN et al. verwendeten humanen Fibroblasten (1-2%) ist jedoch sehr viel niedriger als bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen (ca. 40%), so dass die Verdopplung bei dieser niedrigen Teilungsrate schon durch Zunahme von nur einem Prozentpunkt erfolgt. Des Weiteren ist die Proliferationsrate in 3D-Kollagengelen und auf 2D-Substraten identisch (CUKIERMAN et al., 2001), die Dreidimensionalität als bestimmender Faktor scheidet somit aus. Höchstwahrscheinlich spielen die Zusammensetzung und/oder die physikalischen Matrixeigenschaften die ausschlaggebende Rolle. FRINGER et al. (2001) wiesen beispielsweise eine gesteigerte Teilungsrate in adhärierten gegenüber frei schwimmenden Kollagengelen nach, die durch Inhibition des Aktinzytoskeletts oder Serumverzicht vermindert wurde. Ein direkter Zusammenhang zwischen aktinabhängiger isometrischer Kontraktion und Erk-vermittelter

Proliferation konnte zwar nicht gezeigt werden (FRINGER und GRINNELL, 2001), dennoch scheinen die Zellverankerung und die Ausbildung von Spannung Voraussetzungen für die Teilungsfähigkeit der Zellen zu sein. Eine erhöhte Substratsteifigkeit kann daher ebenfalls die Proliferation steigern (GEORGES und JANMEY, 2005; PASZEK und WEAVER, 2004).

Die Sicherstellung der wesentlichsten fundamentalen Zellfunktionen wie der Zelladhäsion und der Proliferation demonstrieren eindeutig die Biokompatibilität und unbegrenzten Einsatzmöglichkeiten der hier verwendeten 3D-Strukturen in der Zellkultur. Zur Untersuchung des Einflusses der 3D-Geometrie auf die Ausbildung von Zytoskelett-Filamenten sowie die Quantifizierung von Zellformen verschiedenen Gewebeursprungs sind einheitlich harte Glasradstrukturen mit vielfältigen Winkeln und großzügigen Kompartimenten eingesetzt worden. Der Einfluss der Flexibilität wird in Kap.4.2.2 diskutiert.

4.2.1.2 Kreisbogenform dreidimensional aufgespannter Aktinfilamente und Mikrotubuli

In dieser Arbeit ist klar dargelegt, dass alle Zellen unabhängig vom Zelltyp vertikal in die dritte Dimension einwachsen. Die Adhäsion erfolgt dabei meist flächig an den äußeren und inneren Ringen der Radstruktur mit frei aufgespannten Flächen zwischen den Streben, deren Ausdehnung zelltypabhängig variiert (Kap.4.2.1.4). Die Aktin- und Zytoplasmafärbungen zeigen, dass die im Raum aufgespannten Flächen zu kreisbogenförmig nach innen gerichteten Sattelstrukturen angeordnet sind. Dabei zieht eine Oberflächenspannung die im Raum frei aufgespannte Fläche zusammen, eine Linienspannung entlang der Sattellinie wirkt dem entgegen. Das auf dem Laplace-Gesetz basierende Modell von Oberflächen- und Linienspannung gilt demnach auch in einer dreidimensionalen Umgebung (Kap.4.1.2). Durch verstärkte Geometrie-Diversität erzielte Formenvielfalt bietet in Zukunft die Möglichkeit, das bestehende Modell zu erweitern und die Komplexität der formbestimmenden Mechanismen in der dritten Dimension zu berücksichtigen.

Erste prägnante Unterschiede im Vergleich zwischen 2D- und 3D-Zellwachstum werden in der Organisation der Mikrotubuli deutlich. Mikrotubuli sind im Großteil der dreidimensional aufgespannten Zelle wellenförmig verbogen und intensiv gekrümmmt, ähnlich wie auf 2D-Substraten. Im Gegensatz zur Peripherie von Zellen auf 2D-Substraten verlaufen Mikrotubuli dreidimensional entlang der Sattellinie über lange Bereiche auffällig in gestreckter Form (Abb. 20). Aktinfilamente sind hier mit Mikrotubuli klar kolokalisiert, was weder auf homogen beschichteten noch auf strukturierten 2D-Substraten in solchem Umfang beobachtet wurde (Abb. 15). Diese gestreckte Polymeranordnung bzw. große Persistenzlänge entlang der Sattelstruktur liefert möglicherweise Indizien auf

unterschiedliche mechanische Beanspruchungen der Mikrotubuli innerhalb der Zelle. In der 3D-Peripherie finden unter Umständen stärkere Interaktionen oder Verbindungen zu Aktinfilamenten oder zu anderen Zytoskelettkomponenten (BRODLAND und GORDON, 1990) statt. Infolge der Kolokalisation mit Aktin- und Intermediärfilamenten sowie durch die Stabilisierung durch Mikrotubuli-assoziierte Proteine könnten längere Polymere gebildet werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Zunahme in der Filamentlänge zu einer größeren Persistenzlänge führt (TAUTE et al., 2008), infogedessen die Steifigkeit der Polymere zunimmt (KIS et al., 2002; PAMPALONI und FLORIN, 2008). Daher ist eine Zunahme des Mikrotubuli-Anteils an der Formgebung in dreidimensionalen Zellen im Gegensatz zu planaren Zellen denkbar. Ein weiterer Hinweis auf eine möglicherweise gesteigerte Bedeutung der Mikrotubuli in dreidimensional aufgespannten Zellen liefert ein Modell von STAMENOVIC et al. (2005), basierend auf der Tensegrity-Vorstellung. Das Modell sagt voraus, dass die Stützfunktion der Mikrotubuli umgekehrt proportional zur Spreadingfläche ist. Da Zellen in 3D-Substraten, wie in dieser Arbeit gezeigt, weniger flächig spreaden, könnte der Anteil der Mikrotubuli an der Formgebung größer sein. Zeitrafferaufnahmen über die dynamische Ausbildung von Mikrotubuli und Aktinfilamenten in Kombination mit Mikrotubuli-Inhibitionsexperimenten könnten die Bedeutung des zellformbestimmenden Anteils der Filamente in einer 3D-Umgebung analysieren. Auch die Untersuchung der Organisation von Intermediärfilamenten bietet möglicherweise interessante Anhaltspunkte über Kolokalisationen und interfilamentäre Verbindungen. Weiterführende gezielte Untersuchung hinsichtlich Zellverhaltensunterschiede auf 2D- und 3D-Substraten sind mittels segmentbasierter morphometrischer Messungen durchgeführt worden.

4.2.1.3 Herausforderungen bei der Segmentanalyse

Das Prinzip der morphometrischen Messung zur quantitativen Erfassung von Zellformen beruht auf Färbungen fixierter Zellen nach Kultivierung in 3D-Radstrukturen und der Aufnahme konfokaler Bilderstapel mit sich anschließender intensitätsbasierter Schwellenwertmessung (Kap.2.6.2). Zum einen sind segmentbasierte Messungen der Zellhöhe, der durchschnittlichen Segementfläche pro konfokalem Bilderstapel und des Volumens durchgeführt worden. Zum Anderen ist die Ausdehnung maximal projizierter Zellflächen ausgewertet worden, die nur Informationen über die horizontale Zellfläche nach Reduzierung des Bilderstapels in eine Ebene liefert. Durchschnittliche beträgt die Voxel- bzw. Segmenthöhe 400nm. Das in vertikale Richtung verfahrbare Objektiv schafft zwar minimale Schrittweiten von 25nm, wodurch der Fehler aufgrund großer Segmenthöhen verringert werden kann - die bestmögliche konfokale Auflösung beträgt jedoch nur ca. 500-600nm. Das heißt, auch wenn die Segmenthöhe theoretisch minimiert

werden kann, sind die erhaltenen Informationen weit unter der Auflösungsgrenze. Erschwerend kommt hinzu, dass kleinere Schrittweiten in der Bildaufnahme deutlich zeitintensiver sind und die Farbstoffe verstkt ausbleichen würden.

Neben dem Kompromiß zwischen mikroskopischer Auflösung und Segmenthe ist die Auswahl eines geeigneten Farbstoffes ein weiteres Kriterium für die morphometrischen Quantifizierungen. Zwei Farbstoffe sind in dieser Arbeit miteinander verglichen worden. In derselben Zelle sind das filamentose Aktin (Phalloidin) und das Zytoplasma (CellTracker) gefrt worden. Der segmentanalytische Vergleich beider Farbstoffe offenbart eine enorme Diskrepanz in der Messung der Zelloberfche (Abb. 22). Die aufgrund der Aktinfbung ermittelte Zelloberfche ist um den Faktor 1.5 gegener der Zytoplasmafbung erhöht und daher nicht weiter quantifiziert worden. Die Messungen der Segment-Querschnittsflächen bzw. des Volumens anhand der F-Aktin-Fbung weichen dagegen tolerierbar von der Zytoplasmafbung ab. Daher sind trotz des inhomogenen Vorkommens von Aktinfilamenten in der Zelle und daraus resultierender „Löcher“ bzw. nicht erfasster Segmentflächen aktingefrbte Zellen vermessen worden. Der in der Fbung begrnte Messfehler ist durch das Vorkommen gebündelter Aktinfilamente in der Zellperipherie eher klein anzusehen. Die Quantifizierung vielfältiger Zellformen ist die grte Herausforderung bei der hier durchgeführten manuellen Auswertung, da die Verknüpfung von Segmentflächen basierend auf der vermuteten Zellform durch den Experimentator stetig neu entschieden werden muss. Der grte Vorteil aktingefrbter Bilderstapel liegt hier klar im Informationszugewinn über die räumliche Anordnung der Filamente.

4.2.1.4 Ausbildung einer 3D-Zellmorphologie ist von der Dreidimensionalität des zellulären Ursprungsgewebes abhängig

Die morphometrische Analyse einzeln adhärierter Zellen in den Außenbereichen von Radstrukturen (Strukturen mit acht und zehn Außenkompartimenten zusammengefasst) zeigt, dass alle Zellen, unabhängig von der Gewebeherkunft grundsätzlich in die dritte Dimension einwachsen. Die Zellhe der epithelialen A549-Zellen ist zwar signifikant von der der BRLs verschieden, diese Abweichung könnte jedoch auch auf unterschiedliche Strukturhen infolge von Unregelmigkeiten beim Schreibprozess bzw. auf Schwankungen der Schreibparameter zurückzuführen sein. Die Zellhen der anderen Zellen sind vergleichbar. Die mittlere Zellhe von sowohl A549- und B16-Zellen als auch BRL- und B16-Zellen sind nicht signifikant verschieden (Abb. 23).

Dramatische Unterschiede zeigen sich dagegen im Spreadingverhalten. Epitheliale A549-Zellen adhieren vorwiegend mit länglicher Zellform an den flächigen Außenwänden.

Parenchymale BRL- und fibroblastenartige B16-Zellen spannen sich dagegen häufig frei im dreidimensionalen Raum auf. Die morphometrische Analyse zeigt, dass die durchschnittliche Segmentfläche pro Bilderstapel zelltypabhängig ist. Epithelzellen bilden im Vergleich zu Zellen, die aus einem 3D-Gewebe entnommen wurden, deutlich kleinere durchschnittliche Segmentflächen aus, die bis zu 30% verringert sind. Die BRL- und B16-Zellen unterscheiden sich dagegen nicht voneinander. Im Gegensatz dazu spreaden Epithelzellen auf homogen beschichteten planaren 2D-Substraten mit der größten Zellfläche. Das verringerte Spreadingverhalten der Epithelzellen in den 3D-Substraten könnte auf die Dreidimensionalität und/oder das Ligandenangebot des Zellkultursubstrates pro Volumen zurückzuführen sein. Die Flexibilität spielt hier keine Rolle, da sowohl die 2D- als auch die 3D-Substrate aus hartem Glas bestehen.

In 3D-Substraten müssen Zellen die adhäsionsvermittelnden Liganden global um ihre Oberfläche wahrnehmen. Im Rahmen einer Doktorarbeit an der Universität Karlsruhe wurde gezeigt, dass das Spreadingverhalten auf 2D-Substraten mit unterschiedlicher Ligandendichte, die durch Proteinverdünnung erzielt wurde, zelltypabhängig ist. Epitheliale A549-Zellen verringern ihre Spreadingfläche um die Hälfte, wenn nur 50% der Liganden angeboten werden. Parenchymale BRL- und fibroblastenartige B16-Zellen zeigen dagegen in Bezug auf ihre maximale Spreadingfläche eine deutlich größere Toleranz gegenüber der Ligandenverringerung. Die Halbierung der Zellfläche erfolgt bei BRLs ab einer Ligandendichte von 25% und bei B16-Zellen erst ab 5% (JIANG, 2009). Die niedrige Toleranz im Bezug auf geringe Proteinbedeckungen könnte eine Ursache für das verringerte 3D-Spreading der Epithelzellen sein und liegt vielleicht auch in der zellulären *in vivo*-Umgebung begründet: Epithelzellen sitzen *in vivo* auf einer engmaschigen Basallamina mit einer Vielzahl an dicht angeordneten ECM-Proteinen, Fibroblasten dagegen in einem weitmaschigen Bindegewebe.

Zukünftige morphometrische Analysen sollten daher die von den Zellen tatsächlich ausgelesene Ligandenanzahl mit der dreidimensionalen Spreadingfläche korrelieren. Experimente, die die Dreidimensionalität mit der Kontrolle über die Ligandendichte kombinieren, sind daher erforderlich. Demzufolge sollten in Zukunft Techniken etabliert werden, die eine gezielte quantitative Funktionalisierung der 3D-Substrate ermöglichen.

4.2.1.5 Epithelzellen werden verstärkt durch 3D-Geometrie beeinflusst

Die verringerte epitheliale Durchschnittssegmentfläche lieferte erste Hinweise auf einen zelltypabhängigen Einfluss der Dreidimensionalität. Die weiterführende zellmorphometrische Auswertung mit Rücksicht auf die Strukturgeometrie sollte Aufschluss über den Einfluß der 3D-Substratform auf die Zellform geben. Dabei ist sowohl

die Lage der Zellen im Innen- oder Außenkompartiment als auch die Anzahl der Kompartimente (acht oder zehn) berücksichtigt worden (Abb. 24). Für eine gesicherte statistische Analyse ist der Stichprobenumfang zwar nicht ausreichend, dennoch können in dieser Arbeit Tendenzen aufgezeigt werden, die in späteren Experimenten überprüft werden sollten.

Epithelzellen haben in 3D-Substraten durchschnittlich die kleinste Segmentfläche ausgebildet. Betrachtet man die Segmentflächen in Abhängigkeit von der Anzahl der Kompartimente und der Lage im Rad, so scheinen tendenziell die Flächen und daraus resultierend die Volumina in den Außenbereichen der Radstrukturen kleiner zu sein. Eine mögliche Erklärung ist, dass vergleichbar zur 2D-Situation, die adhäsionsvermittelnden Liganden räumlich zu weit auseinander liegen und somit die Ligandendichte für ein optimales Spreading zu klein ist (JIANG, 2009) und/oder die Distanzen für die Zellen nicht überbrückbar sind (LEHNERT et al., 2004). Dann sollten jedoch die Segmentflächen und Volumina in Strukturen mit zehn Kompartimenten und einer entsprechend höheren Ligandendichte pro Volumen zunehmen, was nicht der Fall ist. Parenchymale BRL-Zellen zeigen einen deutlichen Anstieg in Segmentfläche und Volumen im Innenbereich einer Radstruktur mit acht Kompartimenten, jedoch widersprüchlich eine Abnahme im gleichen Bereich bei höherer Ligandendichte. Da die untersuchten B16-Zellen Kompartimentgrenzen überschreiten, sind Vergleiche hinsichtlich der Lage in der Struktur nur eingeschränkt möglich. Klare Tendenzen von B16-Zellen im Vergleich zwischen Innenkompartimenten mit acht oder zehn Trennstreben sind jedoch nicht erkennbar.

Grundsätzlich ist zudem fraglich, ob solche teils dramatischen Volumenänderungen bei Zellen in der Interphase überhaupt möglich sind und falls ja, wie sie reguliert werden. Es ist bekannt, dass Zellen durch hypotonische Schwellung aufgrund großer Membranreserven ihre Oberfläche um den Faktor 3.6 ± 0.2 und ihr Volumen um den Faktor 10.7 ± 1.5 vergrößern könnten, bevor sie lysieren (GROULX et al., 2006). Volumenänderungen aufgrund osmotischen Stresses spielen jedoch hier sicher keine Rolle. Generell würde man ein konstantes Volumen mit variabler Oberfläche erwarten wie eine Leukozyten-Migrationsstudie zeigt. Eine langsame Zelle hat aufgrund ihrer komplizierten Gestalt eine größere Oberfläche als eine schnell migrierende Zelle bei gleich großem Volumen (FELDER und KAM, 1994). In der hier vorgestellten Arbeit geht es nicht um Migration, sondern vordergründig um Adhäsion und Wachstum. Dass die Substratoberfläche das Volumen von Zellen beeinflussen kann, wurde mittels AFM-Studien an abgeflachten bzw. reifen mesenchymalen Stammzellen (engl. flattened cells) demonstriert. Dieser Zelltyp verdoppelt sein Volumen auf Glassubstraten im Vergleich zu Plastik und Kollagen-beschichteten Oberflächen (DOCHEVA et al., 2008). Aufgrund der

langsamem Replikationsrate spielt in dem genannten Beispiel die Volumenzunahme durch Zellteilung sicher nur eine untergeordnete Rolle. Eine steifigkeitsinduzierte Zelldifferenzierung in großervolumige Osteoblasten, wie 2006 von ENGLER et al. gezeigt, wäre denkbar. Dagegen sprechen jedoch zum Einen die kurzen Kultivierungszeiten, in denen eine Ausdifferenzierung nicht möglich wäre und zum Anderen die ebenfalls relativ hohe Steifigkeit aller eingesetzten Substratunterlagen. Die Volumenänderung scheint bei DOCHEVA et al. (2008) tatsächlich substratinduziert zu sein. Ein weiteres Beispiel aus der Literatur für AFM-vermessene Volumenänderungen ist die Kultivierung von Kardiomyozyten auf rechteckigen adhäsiven Inseln, deren Längen- und Breitenverhältnis systematisch geändert, die Adhäsionsfläche jedoch relativ konstant gehalten wurde ($\pm 150\mu\text{m}^2$). Dabei beträgt der Volumenunterschied zwischen dem Minimal- und Maximalvolumen der Myozyten bis zu 35% auf Inseln mit einem Längen- und Breitenverhältnis von entsprechend 5:1 und 7:1 (GEISSE et al., 2009). Hierbei argumentieren GEISSE et al. (2009) mit konstanten Volumina, die tendenzielle Zunahme des Zellvolumens mit der Zellfläche auf adhäsiven rechteckigen Inseln wurde jedoch nicht erörtert. Generell sind zelluläre Volumendaten aus der Literatur eher selten und werden kaum diskutiert, so dass unbedingt weiterführende Experimente erforderlich sind, die Erkenntnisse über die Volumenregulation und seine mögliche Bedeutung in der Zelladhäsion liefern.

Insgesamt scheint die Form von hier untersuchten BRL- und B16-Zellen eher unabhängig von der angebotenen Strukturgeometrie zu sein. Nur Epithelzellen zeigen dramatische Schwankungen, abhängig von der 3D-Struktur. In Zukunft sollte daher durch die Erfassung einer größeren Zellzahl geklärt werden, ob die diskutierten Trends repräsentativ sind oder eher die große Heterogenität der verwendeten Zellen widerspiegeln. Denkbar wäre die Validierung der Ergebnisse durch andere Mikroskopieverfahren wie z.B. der Erstellung optischer Schnitte mittels ApoTome oder der Zellvermessung durch AFM. Bei der AFM-Messung sind größere Volumina als bei immunhistochemischen Färbungen zu erwarten. Zellen bilden zum Teil eine sehr dicke Hyaluronsäurschicht aus, wie beispielsweise Chondrozyten mit $4.4 \pm 0.7\mu\text{m}$ (COHEN et al., 2003), die je nach ausgeübter Kraft durch den Kantilever mit erfasst werden kann. Insgesamt sind AFM-Messungen zwar nicht für komplexe vertikal ausgebretete 3D-Zellen geeignet, können jedoch Referenzwerte für planare Zellen liefern. Für weitere Untersuchungen sind auf jeden Fall Optimierungen in der Substratreinigung und Färbung, der Bildaufnahme und der Etablierung einer automatisierten objektiven Auswertung dieser umfangreichen 3D-Bilderstapel hilfreich.

4.2.2 Definierte Flexibilität in der 3.Dimension

Nicht nur die Verteilung von ECM-Proteinen in der dritten Dimension, auch die Steifigkeit der umgebenden Matrix beeinflusst entscheidend das Zellverhalten (Kap1.3.2). Die definierte Kontrolle über die mechanischen Eigenschaften der Zellkultursubstrate ist in der vorgestellten Arbeit durch den Einsatz von Ormocer®, einem organisch-anorganischen Hybridmolekül, erstmalig gelungen. Die elastischen Fähigkeiten von Ormocer® resultieren aus den Silikonanteilen, die Stabilität dagegen wird durch keramische Komponenten gewährleistet (Kap.2.3.2). Um zu prüfen, ob das verwendete Material biokompatibel und durch Einzelzellen verformbar ist, sind die Materialeigenschaften durch die Kultivierung von rhythmisch kontrahierenden Kardiomyozyten systematisch untersucht und die Substratverformung mittels AFM kalibriert worden. Durch die Realisierung der definierten Flexibilität in der dritten Dimension konnte anschließend gezielt die Zusammensetzung von Zellkontakte in verschiedenen Zelllinien analysiert werden.

4.2.2.1 Substratverformung durch Einzelzellen und Kraftkalibrierung mittels AFM

Nach ein bis zwei Tagen in Kultur beginnen primäre Hühner-Kardiomyozyten in 3D-Ormocer®-Substraten zu kontrahieren und demonstrieren somit die Biokompatibilität des verwendeten Materials, wie auch frühere Arbeiten mit flächenhaften Ormocer®-Strukturen aufgezeigt (DORAISWAMY et al., 2006; SCHLIE et al., 2007). Die Technik der 2PP ermöglicht die Herstellung einer enormen geometrischen dreidimensionalen Mustervielfalt. So konnte systematisch die für eine optimale Kardiomyozytenkontraktion erforderliche Geometrie ausgewählt werden, die eine einheitliche anisotropische Myofibrillenanordnung induziert. Die Bedeutung des Substrat-Aspektverhältnisses planarer Substrate auf die Myofibrillenanordnung ist bereits aufgezeigt worden (GEISSE et al., 2009) und konnte in dieser Arbeit in 3D-Substratgeometrien übertragen werden.

Auf Säulenfeldern mit 5µm Abständen sind Kardiomyozyten vorwiegend auf der Säulenoberseite mit identischer Längen- und Breitenausdehnung und ungeordneten Myofibrillen adhäriert. Auch wenn in dieser Arbeit der Säulenabstand nicht systematisch variiert wurde, kann man bei größeren Abständen die Ausbildung organisierter Myofibrillen erwarten (KAJZAR et al., 2008). Ob allerdings mit einer von KAJZAR et al. (2008) beschriebenen „bevorzugten“ Zelladhäsion zwischen den Säulen gegenüber der planaren Oberfläche zu rechnen ist, bleibt zweifelhaft. In den hier verwendeten „Boxring-Strukturen“ mit Abständen von ca. 20µm (Abb. 30) ist die Adhäsion im Vergleich zu 2D-Oberflächen jedenfalls nicht erhöht, obwohl die Säulen durch adhäsionsfördernde Streben verbunden sind. In den komplexen Radstrukturen dagegen spannen sich Kardiomyozyten deutlich häufiger dreidimensional auf und bilden einheitliche Myofibrillen parallel zur

kontraktilen Längsachse, entsprechend der *in vivo* Morphologie, aus. Generell sind Rad- und Boxringstrukturen tatsächlich dreidimensionale Zellgerüste, die im Gegensatz zu den eher topographischen bzw. reliefartigen Säulenfeldern realitätsnahere *in vitro*-Substrate darstellen.

Während 26 Kontraktionen in Radstrukturen (Strebendurchmesser 0.6 μm) sind die Streben durchschnittlich um 0.8±0.1 μm (maximal 1.13 μm) ausgelenkt worden (Abb. 26). Innerhalb dieses Zeitraumes hat Ormocer® volle Elastizität ohne Erscheinungen von Materialermüdung gezeigt (Abb. 27). Im Gegensatz zu herkömmlichen Säulenanordnungen werden die Balken nicht einfach abgeknickt, sondern, ähnlich zur natürlichen ECM, durch Zellkräfte elastisch gedehnt. Durch den kontrollierten Anstieg in der Laserintensität während des DLS konnten gezielt größere Strebendurchmesser hergestellt werden, die zu geringeren kontraktionsbedingten Auslenkungen führten. Die Verformbarkeit des Materials kann demnach durch die Linienbreite modifiziert werden (Abb. 28). ENGLER et al. (2004) zeigten die Ausbildung geordneter Myofibrillen auf definiert vernetzten und mikrostrukturierten Polyacrylamid-Gelen mittlerer Steifigkeiten. Unterschiede in der Ausbildung der Myofibrillen abhängig von der Substratsteifigkeit sind in dieser Arbeit qualitativ nicht beobachtet worden, genaue Quantifizierungen der Sarkomere sind jedoch nicht durchgeführt worden.

Um die quantifizierten Strebenauslenkungen mit den entsprechenden Zellkräften zu korrelieren, sind mittels AFM Kraft-Auslenkungskurven erstellt worden. Die AFM-vermittelte Eichung ermöglichte direkt die Kalibrierung der hier verwendeten Zellkultursubstrate (Abb. 29) und nicht, wie weit verbreitet, die Vermessung stark vergrößerter Nachbildungen im Millimeterbereich (KAJZAR et al., 2008). Somit konnten, basierend auf den Strebenauslenkungen, Kontraktionskräfte embryonaler Kardiomyozyten von durchschnittlich 50nN abgeleitet werden. Im Vergleich zu anderen Literaturwerten sind die ermittelten Kräfte relativ gering. In Kardiomyozyten aus adulten Rattenherzen wurden Kontraktionskräfte von 0.7 μN bis zu 40 μN beschrieben (TASCHE et al., 1999; VANNIER et al., 1996; YIN et al., 2005). Als Messinstrumente dienten verschiedene Designs von Kraftaufnehmern (engl. force transducer), die kommerziell erhältlich (VANNIER et al., 1996) oder teilweise spezialangefertigt wurden (TASCHE et al., 1999). Andere Beispiele von Messsystemen basieren auf magnetischen Kugeln (YIN et al., 2005), Absaugpipetten (BRADY et al., 1979; CECCHI et al., 1993), Glasnadeln (TARR et al., 1979) oder PDMS-Säulen (TAN et al., 2003a). Im Gegensatz zu den genannten Techniken auf planaren oder topographischen Substratunterlagen zeichnen sich die in dieser Arbeit aufgezeigten definiert flexiblen 3D-Substrate durch die *in vivo* nahen Kultivierungsbedingungen aus. Auch die Zellkontakte von Herzmuskelzellen werden durch

die Dreidimensionalität der umgebenden Matrix bestimmt, worauf beispielsweise die vermutliche Ausbildung sogenannter kostamerer Adhäsionen auf topographischen Säulenstrukturen hindeutet (KAJZAR et al., 2008).

Die große Variabilität der in der Literatur beschriebenen Kräfte resultiert vor allem aus der Datenerfassung nach externer Kalzium- oder elektrischer Spannungszufuhr im Vergleich zu spontanen Kontraktionsmessungen, wie sie in dieser Arbeit demonstriert ist. Die hier aufgezeigten deutlich kleineren Kräfte sind wahrscheinlich zudem in der Vermessung embryonaler Zellen begründet. Andere Arbeiten mit embryonalen Rattenkardiomyozyten ermittelten ebenfalls deutlich kleinere Kräfte um 400nN (KAJZAR et al., 2008), die dennoch um den Faktor von acht im Vergleich zu hier kultivierten embryonalen Hühnerkardiomyozyten erhöht sind. Dies könnte zum Einen auf eine speziesabhängige Kraftausbildung zurückzuführen sein. Zum Anderen ist in dieser Arbeit die Kraftrichtung unberücksichtigt, so dass auch Zellkräfte erfasst wurden, die nicht exakt senkrecht und/oder horizontal zum Balken ausgeübt wurden. Ungeachtet der maximal möglichen Kontraktionskraft embryonaler Hühner-Kardiomyozyten sind die 3D-Ormocer®-Substrate grundsätzlich auch für Fibroblasten verformbar, da Zellen pro Zellkontakt nachweislich Kräfte bis 20nN auf das Substrat ausüben können (BALABAN et al., 2001). Die zweifelsfreie Verformung durch primäre Fibroblasten konnte kürzlich experimentell in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (unveröffentlichte Daten).

4.2.2.2 Gleiche Kontaktzusammensetzung in harten und weichen 3D-Substraten

In dieser Arbeit ist eine Methode zur Herstellung definiert flexibler und proteinbeschichteter dreidimensionaler Substrate etabliert worden. Somit konnten Zellverhaltensstudien durchgeführt werden, die gezielt den Einfluss der Dreidimensionalität und Flexibilität untersuchen (Kap.3.2). Es konnte gezeigt werden, dass weder die Dreidimensionalität noch die hier aufgezeigte Substratsteifigkeit die Zusammensetzung der Zell-Matrix-Kontakte im Vergleich zu harten 2D-Substraten wesentlich qualitativ beeinflusst (Tab. 8). Die Zusammensetzung der Kontakte wurde immunhistochemisch durch den Nachweis von Phospho-Tyrosin, einem allgemeinen Marker für Tyrosin-phosphorylierende Kinase-Aktivitäten (FLINN und RIDLEY, 1996) und den Nachweis der Signaltransduktionsmarker FAK bzw. Phospho-FAK (PARSONS, 2003) sowie des Adapterproteins Paxillin bzw. Phospho-Paxillin (DEAKIN und TURNER, 2008) analysiert. Bei Epithelzellen konnte zudem die Verteilung von β 1-Integrin untersucht werden.

Tendenziell hat sich zelltypabhängig eine leichte Reduzierung von FAK und Phospho-FAK in harten und weichen 3D-Substraten gezeigt. Unspezifische Antikörperbindungen und ein

entsprechend schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis erschweren jedoch die Beurteilung in der dritten Dimension. Dies gilt ebenso für die Expression von $\beta 1$ -Integrin. Das Vorkommen von Paxillin und Phospho-Paxillin ist dagegen klar in allen Substraten belegt. In anderen Arbeiten gibt es Hinweise auf eine verminderte FAK-Phosphorylierung in 3D-Kollagengelen (ISHII et al., 2001) und zellsezernierten 3D-Matrizes, wobei die Phosphorylierung von Paxillin unverändert bleibt (CUKIERMAN et al., 2001). Das nahezu unverminderte Vorhandensein von Phospho-FAK könnte darauf zurückzuführen sein, dass aufgrund der relativ kurzen Kultivierungszeit die von CUKIERMAN et al. (2001) beschriebenen 3D-Kontakte während der gezeigten Experimente noch nicht ausgebildet wurden bzw. reifen konnten. Eine allgemein bekannte Modellvorstellung zur Ausbildung von fibroblastischen 3D-Adhäsionen schließt die Entwicklung von Fokalkomplexen über Fokaladhäsionen zu fibrillären Adhäsionen ein (CUKIERMAN et al., 2002). Die Ausbildung von 3D-Kontakten setzen nach diesem Modell die Fibrillogenese, die in einer dreidimensionalen ECM-Matrix verstärkt stattfindet (MAO und SCHWARZBAUER, 2005), voraus (CUKIERMAN et al., 2001). Denkbar ist jedoch auch, dass andere Zellen in *in vivo*-Geweben ebenfalls andere Arten von 3D-Kontakten ausbilden und sich der vermittelnde Rezeptor und die Adapterproteine unterscheiden (CUKIERMAN et al., 2002). Da ein komplettes Fehlen von Phospho-FAK weder in harten noch in weichen 3D-Substraten bestätigt werden kann, ist der von CUKIERMAN et al. (2001) beschriebene Effekt neben der Kultivierungsdauer möglicherweise auf die molekulare Zusammensetzung der zellsezernierten 3D-Matrix und/oder deren Steifigkeit zurückzuführen. Die Untrennbarkeit der zellbestimmenden Parameter zeigt klar die Grenzen undefinierter ECM-Gele auf. Die in dieser Arbeit dargestellte Methode besticht dagegen durch die präzise Kontrolle der Liganden Zusammensetzung, Dreidimensionalität und Flexibilität. So könnten 3D-Zellkontakte in Zukunft durch die Beschichtung der 3D-Ormocer®-Substraten mit einem definierten ECM-Komponenten-Mix bei gleichzeitig weicheren 3D-Substraten analysiert werden. Dadurch kann beispielsweise geklärt werden, ob das Vorhandensein von Phospho-FAK in einer zu großen Steifigkeit der hier untersuchten Substrate begründet ist, was auch die unveränderte Ausbildung von Aktinstressfasern nahelegt. Ein weiterer Hinweis aus der Literatur zeigt, dass die FAK-Phosphorylierung in dichten und steiferen Kollagengelen im Vergleich zu flexibleren Gelen verstärkt ist (WOZNIAK et al., 2003), was auf mögliche mechanosensorische Fähigkeiten von FAK hindeutet (MITRA et al., 2005). Die Wahrnehmung der Steifigkeit bedarf immer der gleichen Mitspieler wie Integrinrezeptoren, Zellkontakte und myosinbasierter Kontraktilität (Kap.1.3.2). In flexiblen Substraten wird allgemein angenommen, dass die Weichheit des Substrates direkt die Spannung in den Zellkontakten einer sich aktiv kontrahierenden Zelle verringert und dadurch die Reifung von Zellkontakten unterdrückt wird.

Die Interpretation der Ergebnisse lässt Raum für mögliche Unterschiede in der Signaltransduktion zwischen 2D- und 3D-Substraten, die jedoch sehr wahrscheinlich mit den physikalischen Eigenschaften der umgebenden Matrix variieren. Die zugrundeliegenden Mechanismen beinhalten sicher eine Vielzahl von Faktoren, die in zukünftigen Arbeiten gezielt und einzeln untersucht werden können.

4.2.2.3 Verwirklichung aller Anforderungen an ein 3D-*in vitro*-Substrat

Die Voraussetzung für weiterführende Experimente ist durch die hier etablierte Methode zur Herstellung von 3D-Zellkultursubstraten geschaffen, da alle Anforderungen für ein dreidimensionales *in vitro*-Substrat verwirklicht wurden. Die hier demonstrierten Strukturen vermitteln die Adhäsion und Zellproliferation und ermöglichen durch die Kontrolle der Porengemometrie das Einwachsen der Zellen in eine biokompatible und nicht-toxische Umgebung. Die kontrollierte Beschichtung mit Proteinen aus der ECM gestattet die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten. Daneben werden die physikalischen Materialeigenschaften durch die Schreibparameter während des DLS definiert.

4.3 Ausblick

Die hier gezeigten Experimente liefern neue Einblicke in die Mechanismen zur Ausbildung von Zell- und Gewebeformen sowohl auf 2D- als auch in 3D-Substraten. Gleichzeitig sind viele interessante Beobachtungen gemacht und spannende Fragestellungen aufgeworfen worden. Zu deren Beantwortung bedarf es zusätzlicher Experimente, von denen einige in diesem Kapitel aufgezeigt werden.

Von einer Zellpopulation besiedelte Kollagengele sind hervorragend als Gewebemodelle geeignet. Die zellbedingte Kontraktion und die daraus resultierende Entstehung peripherer Kreisbögen sollte in Zukunft dynamisch über die Zeit und mikroskopisch hochauflösend mit modernen 3D-Mikroskopieverfahren analysiert werden. Besonders interessant ist dabei die Ausrichtung und Proliferation der Zellen innerhalb des Geles und die Anordnung der Kollagenfibrillen. Die Verwirklichung dieses Ziels kann zum Einen durch die Miniaturisierung der Gele erreicht werden. Die Technik der 2PP ermöglicht die Herstellung deutlich kleinerer, definiert flexibler und besser mikroskopierbarer Strukturen, die durch mikromanipulierte Kapillaren mit Kollagen und Zellen gefüllt werden könnten. Zum Anderen ist durch die gezielte Transfektion die Visualisierung der Zellen denkbar. Um sich noch optimierter der *in vivo*-Situation anzunähern, könnten Proteoglykane zugegeben und deren Einfluss auf die Entstehung der Gewebekonturen untersucht werden.

Auch auf der Einzelzellebene sind in dieser Arbeit Hypothesen erarbeitet worden, die in zukünftigen Experimenten geprüft werden sollten. Im Vordergrund steht sicherlich die dynamische, durch Zeitrafferaufnahmen erfassste, 2D- als auch 3D-Bogenentstehung in der Peripherie adhärierter Zellen. Aufschluss über Mechanismen in Aktinstressfasern können zudem Experimente mit laserbasierten nanochirurgischen Methoden geben. Des Weiteren könnte die Rolle der Mikrotubuli in der zellulären 3D-Formgebung durch gezielte Inhibition untersucht werden. Die hier aufgezeigte morphometrische Quantifizierung von 3D-Zellformen sollte durch eine verbesserte 3D-Bildverarbeitung optimiert und die Daten durch andere Verfahren, wie beispielsweise AFM, validiert werden. Durch die Erfassung einer größeren Zellzahl kann dann geklärt werden, ob die hier diskutierten Trends repräsentativ sind. Ein weiterer interessanter Aspekt ist die Korrelation der 3D-Spreadingflächen mit der von den Zellen tatsächlich ausgelesenen Ligandenzahl. Daher sollten in Zukunft Techniken etabliert werden, die eine gezielte quantitative Funktionalisierung der 3D-Substrate ermöglichen. Darüber hinaus kann die gezielte Kontrolle über die Flexibilität zukünftige durotaktische Migrationsstudien in 3D-Substraten verwirklichen und die Entkopplung des relativen Anteils von mechanischen und biochemischen Substratparametern auf das Zellverhalten ermöglichen.

5 Zusammenfassung

In einem Organismus sind Zellen eng mit der Extrazellulären Matrix verknüpft. Hierbei bestimmen die mechanischen Eigenschaften der Matrix und die 3D-Anordnung von adhäsiven Proteinen und Signalmolekülen die Zellform und das Differenzierungsverhalten. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von 2D- und 3D-Substratgeometrien und der Flexibilität auf die Ausbildung von Zell- und Gewebeformen untersucht und die daraus resultierenden zellulären Verhaltensweisen sowie zugrunde liegende Mechanismen analysiert.

Als 2D-*in vitro*-Systeme für Einzelzelluntersuchungen dienten durch Microcontact Printing hergestellte adhäsive geometrische Substrate. Einzelne Zellen spannen zwischen den Adhäsionspunkten kreisbogenförmig Aktinfilamente auf, deren Radius mit dem Abstand zunimmt. Vergleichbare Kreisbögen entstehen auch in einem einfachen Gewebemodell, wenn Zellpopulationen ein adhäriertes Kollagengel kontrahieren. Die experimentell auf beiden Ebenen beobachteten abstandsabhängigen Kreisbögen konnten durch Computersimulationen und theoretische Modellierungen eines kontraktilen filamentösen Kabelnetzwerkes auf der Grundlage eines modifizierten Laplace-Gesetzes reproduziert werden. Die quantitative Bildverarbeitung in Kombination mit Inhibitionsexperimenten belegt, dass der zelluläre Radius zum Einen von der strukturellen Verstärkung der Aktinfilamente und zum Anderen von der intrazellulären Kontraktilität abhängig ist. Das Modell und diese experimentellen Beobachtungen zeigen, dass die Zellform einerseits spannungs- und andererseits elastizitätsabhängig bestimmt wird. Beide Kontrollwege werden Rho-gesteuert und können durch die Effektoren ROCK und mDia vermittelt werden.

Des Weiteren wurden erstmalig mikrostrukturierte 3D-Zellgerüste mit variablen, frei definierbaren Formen hergestellt. Der Einfluss der 3D-Geometrie auf die Ausbildung von Zellformen wurde durch Konfokalmikroskopie und Bildverarbeitung aktingefärbter Zellen quantifiziert und belegt die Ausbildung einer zelltypspezifischen 3D-Morphologie. Zellen epithelialen Ursprungs bilden signifikant kleinere horizontale 3D-Spreadingflächen als parenchymale und fibroblastenartige Zellen. Die Flexibilität in der dritten Dimension wurde durch den Einsatz von 3D-Ormocer®-Substraten ermöglicht. Die kontraktionsbedingte und reversible Substratverformung durch Kardiomyozyten demonstrierte die volle Elastizität des Materials. Die mittels Rasterkraftmikroskopie bestimmten flexiblen Substrat-eigenschaften zeigen, dass zelluläre Kontraktionskräfte bis 20nN messbar sind. Auf die molekulare Zusammensetzung der Zellkontakte scheint hier jedoch weder die Dreidimensionalität noch die Flexibilität einen Einfluss zu haben. Durch die einzigartige Kombination definierter mechanischer und biochemischer Substrateigenschaften bietet die hier etablierte Methode die Grundlage für zukünftige zellbiologische Untersuchungen.

6 Literaturverzeichnis

- ABRAHAM, V. C., KRISHNAMURTHI, V., TAYLOR, D. L. und LANNI, F.** (1999). The Actin-Based Nanomachine at the Leading Edge of Migrating Cells. *Biophysical Journal* 77, 1721-1732.
- AOTA, S., NOMIZU, M. und YAMADA, K. M.** (1994). The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* 269, 24756-24761.
- AUFDERHEIDE, E. und EKBLOM, P.** (1988). Tenascin during gut development: appearance in the mesenchyme, shift in molecular forms, and dependence on epithelial-mesenchymal interactions. *J Cell Biol* 107, 2341-9.
- BADYLAK, S. F.** (2004). Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology* 12, 367-377.
- BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., RIVELINE, D., GOICHBERG, P., TZUR, G., SABANAY, I., MAHALU, D., SAFRAN, S., BERSHADSKY, A., ADDADI, L. et al.** (2001). Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol* 3, 466-72.
- BAO, L., LOCOVEI, S. und DAHL, G.** (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Letters* 572, 65-68.
- BAR-ZIV, R., TLUSTY, T., MOSES, E., SAFRAN, S. A. und BERSHADSKY, A.** (1999). Pearling in cells: a clue to understanding cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10140-5.
- BARON, M., MAIN, A. L., DRISCOLL, P. C., MARDON, H. J., BOYD, J. und CAMPBELL, I. D.** (1992). 1H NMR assignment and secondary structure of the cell adhesion type III module of fibronectin. *Biochemistry* 31, 2068-73.
- BARRY, R. A. I., SHEPHERD, R. F., HANSON, J. N., NUZZO, R. G., WILTZIUS, P. und LEWIS, J. A.** (2009). Direct-Write Assembly of 3D Hydrogel Scaffolds for Guided Cell Growth. *Advanced Materials* 9999, NA.
- BATES, R. C., EDWARDS, N. S. und YATES, J. D.** (2000). Spheroids and cell survival. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 36, 61-74.
- BELL, E., IVARSSON, B. und MERRILL, C.** (1979). Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 1274-8.
- BERRO, J., MICHELOT, A., BLANCHOIN, L., KOVAR, D. R. und MARTIEL, J. L.** (2007). Attachment conditions control actin filament buckling and the production of forces. *Biophys J* 92, 2546-58.
- BERSHADSKY, A. D., BALLESTREM, C., CARRAMUSA, L., ZILBERMAN, Y., GILQUIN, B., KHOCHBIN, S., ALEXANDROVA, A. Y., VERKHOVSKY, A. B., SHEMESH, T. und KOZLOV, M. M.** (2006). Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *European Journal of Cell Biology* 85, 165-173.
- BESSER, A. und SCHWARZ, U. S.** (2007). Coupling biochemistry and mechanics in cell adhesion: a model for inhomogeneous stress fiber contraction. *New Journal of Physics* 9.
- BISCHOF, I. B., KLEIN, F., LEHNERT, D., BASTMEYER, M. und SCHWARZ, U. S.** (2008). Filamentous Network Mechanics and Active Contractility Determine Cell and Tissue Shape. *Biophys. J.* 95, 3488-3496.
- BISHOP, A. L. und HALL, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-55.
- BRADY, A. J., TAN, S. T. und RICCHIUTI, N. V.** (1979). Contractile force measured in unskinned isolated adult rat heart fibres. *Nature* 282, 728-9.

- BRANGWYNNE, C. P., MACINTOSH, F. C., KUMAR, S., GEISSE, N. A., TALBOT, J., MAHADEVAN, L., PARKER, K. K., INGBER, D. E. und WEITZ, D. A.** (2006). Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement. *J Cell Biol* 173, 733-41.
- BREDT, J. F., SACH, E., BRANCAZIO, D., CIMA, M., CURODEAU, A. und FAN, T.** (1998). Three dimensional printing system. (US Patent)
- BROCK, A., CHANG, E., HO, C. C., LEDUC, P., JIANG, X., WHITESIDES, G. M. und INGBER, D. E.** (2003). Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir* 19, 1611-7.
- BRODLAND, G. W. und GORDON, R.** (1990). Intermediate filaments may prevent buckling of compressively loaded microtubules. *J Biomech Eng* 112, 319-21.
- BRODSKY, B., PERSIKOV, A. V., DAVID, A. D. P. und JOHN, M. S.** (2005). Molecular Structure of the Collagen Triple Helix. *Advances in Protein Chemistry* Volume 70, 301-339.
- BRODSKY, B., THIAGARAJAN, G., MADHAN, B. und KAR, K.** (2008). Triple-helical peptides: an approach to collagen conformation, stability, and self-association. *Biopolymers* 89, 345-53.
- BROWN, R. A., TALAS, G., PORTER, R. A., McGROUTHER, D. A. und EASTWOOD, M.** (1996). Balanced mechanical forces and microtubule contribution to fibroblast contraction. *J Cell Physiol* 169, 439-47.
- BURRIDGE, K. und WENNERBERG, K.** (2004). Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167-79.
- BUSCH, K., von FREYMANN, G., LINDEN, S., MINGALEEV, S. F., TKESHELASHVILI, L. und WEGENER, M.** (2007). Periodic nanostructures for photonics. *Physics Reports* 444, 101-202.
- BYERS, H. R., WHITE, G. E. und FUJIWARA, K.** (1984). Organization and function of stress fibers in cells in vitro and in situ. A review. *Cell Muscle Motil* 5, 83-137.
- CASTANEDA, F. und KINNE, R. K.** (2000). Short exposure to millimolar concentrations of ethanol induces apoptotic cell death in multicellular HepG2 spheroids. *J Cancer Res Clin Oncol* 126, 305-10.
- CECCHI, G., COLOMO, F., POGGESI, C. und TESI, C.** (1993). A force transducer and a length-ramp generator for mechanical investigations of frog-heart myocytes. *Pflugers Arch* 423, 113-20.
- CHAN, B. P. und LEONG, K. W.** (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 17 Suppl 4, 467-79.
- CHANG, H. L. und BASERGA, R.** (1977). Time of replication of genes responsible for a temperature-sensitive function in a cell cycle-specific ts mutant from a hamster cell line. *J Cell Physiol* 92, 333-43.
- CHANG, H. Y., CHI, J.-T., DUODIT, S., BONDRE, C., VAN DE RIJN, M., BOTSTEIN, D. und BROWN, P. O.** (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 12877-12882.
- CHANG, L. und GOLDMAN, R. D.** (2004). Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 601-613.
- CHEN, C. S., ALONSO, J. L., OSTUNI, E., WHITESIDES, G. M. und INGBER, D. E.** (2003). Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 355-61.
- CHEN, C. S., MRKSICH, M., HUANG, S., WHITESIDES, G. M. und INGBER, D. E.** (1997). Geometric control of cell life and death. *Science* 276, 1425-8.
- CHEN, W. T.** (1981). Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J. Cell Biol.* 90, 187-200.
- CHEVALIER, E., CHULIA, D., POUGET, C. und VIANA, M.** (2008). Fabrication of porous substrates: a review of processes using pore forming agents in the biomaterial field. *J Pharm Sci* 97, 1135-54.

- CHEW, T. L., MASARACCHIA, R. A., GOECKELER, Z. M. und WYSOLMERSKI, R. B.** (1998). Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J Muscle Res Cell Motil* 19, 839-54.
- CHRETIEN, D., FLYVBJERG, H. und FULLER, S. D.** (1998). Limited flexibility of the inter-protofilament bonds in microtubules assembled from pure tubulin. *Eur Biophys J* 27, 490-500.
- CHRZANOWSKA-WODNICKA, M. und BURRIDGE, K.** (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 133, 1403-15.
- CHU, T. M., HALLORAN, J. W., HOLLISTER, S. J. und FEINBERG, S. E.** (2001). Hydroxyapatite implants with designed internal architecture. *J Mater Sci Mater Med* 12, 471-8.
- CLAESSENS, M. M. A. E., BATHE, M., FREY, E. und BAUSCH, A. R.** (2006). Actin-binding proteins sensitively mediate F-actin bundle stiffness. *Nat Mater* 5, 748-753.
- COHEN, M., KLEIN, E., GEIGER, B. und ADDADI, L.** (2003). Organization and Adhesive Properties of the Hyaluronan Pericellular Coat of Chondrocytes and Epithelial Cells. *Biophys. J.* 85, 1996-2005.
- COLOMBELLI, J., BESSER, A., KRESS, H., REYNAUD, E. G., GIRARD, P., CAUSSINUS, E., HASELMANN, U., SMALL, J. V., SCHWARZ, U. S. und STELZER, E. H. K.** (2009). Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *J Cell Sci* 122, 1665-1679.
- COON, H. G.** (1968). Clonal culture of differentiated cells from mammals: rat liver cell culture. *Carnegie Inst. Washington Yearbook* 67, 419-421.
- COON, H. G. und WEISS, M. C.** (1969). A Quantitative Comparison Of Formation Of Spontaneous And Virus-Produced Viable Hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 62, 852-859.
- COUGHLIN, M. F. und STAMENOVIC, D.** (2003). A prestressed cable network model of the adherent cell cytoskeleton. *Biophys J* 84, 1328-36.
- CRAMER, L. P., SIEBERT, M. und MITCHISON, T. J.** (1997). Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force. *J. Cell Biol.* 136, 1287-1305.
- CUKIERMAN, E., PANKOV, R., STEVENS, D. R. und YAMADA, K. M.** (2001). Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension. *Science* 294, 1708-1712.
- CUKIERMAN, E., PANKOV, R. und YAMADA, K. M.** (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion in Cell Biology* 14, 633-640.
- CUMPSTON, B. H., ANANTHAVEL, S. P., BARLOW, S., DYER, D. L., EHRLICH, J. E., ERSKINE, L. L., HEIKAL, A. A., KUEBLER, S. M., LEE, I. Y. S., McCORD-MAUGHON, D. et al.** (1999). Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication. *Nature* 398, 51-54.
- DALBY, M. J., GADEGAARD, N., TARE, R., ANDAR, A., RIEHLE, M. O., HERZYK, P., WILKINSON, C. D. W. und OREFFO, R. O. C.** (2007). The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* advanced online publication.
- DEAKIN, N. O. und TURNER, C. E.** (2008). Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 121, 2435-2444.
- DEL POZO, M. A., PRICE, L. S., ALDERSON, N. B., REN, X. D. und SCHWARTZ, M. A.** (2000). Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *Embo J* 19, 2008-14.
- DEUBEL, M., VON FREYMANN, G., WEGENER, M., PEREIRA, S., BUSCH, K. und SOUKOULIS, C. M.** (2004). Direct laser writing of three-dimensional photonic-crystal templates for telecommunications. *Nat Mater* 3, 444-447.
- DISCHER, D. E., JANMEY, P. und WANG, Y.-L.** (2005). Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science* 310, 1139-1143.

- DOCHEVA, D., PADULA, D., POPOV, C., MUTSCHLER, W., CLAUSEN-SCHAUMANN, H. und SCHIEKER, M.** (2008). Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *J Cell Mol Med* 12, 537-52.
- DORAI SWAMY, A., JIN, C., NARAYAN, R. J., MAGESWARAN, P., MENTE, P., MODI, R., AU YEUNG, R., CHRISEY, D. B., OVSIANIKOV, A. und CHICHKOV, B.** (2006). Two photon induced polymerization of organic-inorganic hybrid biomaterials for microstructured medical devices. *Acta Biomaterialia* 2, 267-275.
- DRABIK, P., GUSAROV, S. und KOVALENKO, A.** (2007). Microtubule Stability Studied by Three-Dimensional Molecular Theory of Solvation. *Biophysical Journal* 92, 394-403.
- DRURY, J. L. und MOONEY, D. J.** (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* 24, 4337-4351.
- DULAK, N. C. und TEMIN, H. M.** (1973). A partially purified polypeptide fraction from rat liver cell conditioned medium with multiplication-stimulating activity for embryo fibroblasts. *J Cell Physiol* 81, 153-60.
- ELSDALE, T. und BARD, J.** (1972). Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol* 54, 626-37.
- ENGEL, J., ODERMATT, E., ENGEL, A., MADRI, J. A., FURTHMAYR, H., ROHDE, H. und TIMPL, R.** (1981). Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *Journal of Molecular Biology* 150, 97-120.
- ENGLER, A., BACAKOVA, L., NEWMAN, C., HATEGAN, A., GRIFFIN, M. und DISCHER, D.** (2004a). Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys J* 86, 617-28.
- ENGLER, A. J., GRIFFIN, M. A., SEN, S., BONNEMANN, C. G., SWEENEY, H. L. und DISCHER, D. E.** (2004b). Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* 166, 877-887.
- ENGLER, A. J., SEN, S., SWEENEY, H. L. und DISCHER, D. E.** (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-89.
- EVANGELISTA, M., ZIGMOND, S. und BOONE, C.** (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci* 116, 2603-2611.
- FELDER, S. und KAM, Z.** (1994). Human neutrophil motility: time-dependent three-dimensional shape and granule diffusion. *Cell Motil Cytoskeleton* 28, 285-302.
- FERNANDEZ, P. und BAUSCH, A. R.** (2009). The compaction of gels by cells: a case of collective mechanical activity. *Integrative Biology* 1, 252-259.
- FIDLER, I. J.** (1973). Selection of successive tumour lines for metastasis. *Nat New Biol* 242, 148-9.
- FIDLER, I. J. und KRIPKE, M. L.** (1977). Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* 197, 893-5.
- FISCHER, J.** (2008). Herstellung und Charakterisierung von elastischen dreidimensionalen Mikrostrukturen für biologische Zellexperimente. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe
- FLEISCHMAIER, R., MACDONALD, E. D., PERLISH, J. S., BURGESON, R. E. und FISHER, L. W.** (1990). Dermal collagen fibrils are hybrids of type I and type III collagen molecules. *J Struct Biol* 105, 162-9.
- FLINN, H. und RIDLEY, A.** (1996). Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J Cell Sci* 109, 1133-1141.
- FONTANA, L., CHEN, Y., PRIJATELJ, P., SAKAI, T., FASSLER, R., SAKAI, L. Y. und RIFKIN, D. B.** (2005). Fibronectin is required for integrin $\{\alpha\}\nu\{\beta\}6$ -mediated activation of latent TGF- $\{\beta\}$ complexes containing LTBP-1. *FASEB J.* 19, 1798-1808.
- FRANZ, C. M. und MULLER, D. J.** (2005). Analyzing focal adhesion structure by atomic force microscopy. *J Cell Sci* 118, 5315-5323.

6. Literaturverzeichnis

- FRINGER, J. und GRINNELL, F.** (2001). Fibroblast quiescence in floating or released collagen matrices: Contribution of the ERK signaling pathway and actin cytoskeletal organization. *J. Biol. Chem.*, M101898200.
- FUNG, Y. C.** (1993). Biomechanics: mechanical properties of living tissues. *Springer, New York*.
- GALLI, C., GUIZZARDI, S., PASSERI, G., MACALUSO, G. M. und SCANDROGLIO, R.** (2005). Life on the wire: on tensegrity and force balance in cells. *Acta Biomed* 76, 5-12.
- GAO, M., CRAIG, D., VOGEL, V. und SCHULTEN, K.** (2002). Identifying Unfolding Intermediates of FN-III10 by Steered Molecular Dynamics. *Journal of Molecular Biology* 323, 939-950.
- GEIGER, B., SPATZ, J. P. und BERSHADSKY, A. D.** (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 21-33.
- GEISSE, N. A., SHEEHY, S. P. und PARKER, K. K.** (2009). Control of myocyte remodeling in vitro with engineered substrates. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*.
- GELSE, K., PÖSCHL, E. und AIGNER, T.** (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 1531-1546.
- GEORGES, P. C. und JANMEY, P. A.** (2005). Cell type-specific response to growth on soft materials. *J Appl Physiol* 98, 1547-1553.
- GHOSH, S., SPAGNOLI, G. C., MARTIN, I., PLOEGERT, S., DEMOUGIN, P., HEBERER, M. und RESCHNER, A.** (2005). Three-dimensional culture of melanoma cells profoundly affects gene expression profile: A high density oligonucleotide array study. *Journal of Cellular Physiology* 204, 522-531.
- GIARD, D. J., AARONSON, S. A., TODARO, G. J., ARNSTEIN, P., KERSEY, J. H., DOSIK, H. und PARKS, W. P.** (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-23.
- GILBERT, T. W., SELLARO, T. L. und BADYLAK, S. F.** (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27, 3675-3683.
- GILLS, J. P., ROBERTS, B. C. und EPSTEIN, D. L.** (1998). Microtubule disruption leads to cellular contraction in human trabecular meshwork cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 653-658.
- GITTES, F., MICKEY, B., NETTLETON, J. und HOWARD, J.** (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J. Cell Biol.* 120, 923-934.
- GOFFIN, J. M., PITTEL, P., CSUCS, G., LUSSI, J. W., MEISTER, J.-J. und HINZ, B.** (2006). Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of $\{\alpha\}$ -smooth muscle actin to stress fibers. *J. Cell Biol.* 172, 259-268.
- GRIFFITH, L. G.** (2000). Polymeric biomaterials. *Acta Materialia* 48, 263-277.
- GRIFFITH, L. G. und SWARTZ, M. A.** (2006). Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 211-224.
- GRINNELL, F., HO, C.-H., LIN, Y.-C. und SKUTA, G.** (1999). Differences in the Regulation of Fibroblast Contraction of Floating Versus Stressed Collagen Matrices. *J. Biol. Chem.* 274, 918-923.
- GRINNELL, F., HO, C.-H., TAMARIZ, E., LEE, D. J. und SKUTA, G.** (2003). Dendritic Fibroblasts in Three-dimensional Collagen Matrices. *Mol. Biol. Cell* 14, 384-395.
- GROBSTEIN, C.** (1953). Morphogenetic interaction between embryonic mouse tissues separated by a membrane filter. *Nature* 172, 869-70.
- GROULX, N., BOUDREAU, F., ORLOV, S. N. und GRYGORCZYK, R.** (2006). Membrane reserves and hypotonic cell swelling. *J Membr Biol* 214, 43-56.
- GUIDRY, C. und GRINNELL, F.** (1987). Contraction of hydrated collagen gels by fibroblasts: evidence for two mechanisms by which collagen fibrils are stabilized. *Coll Relat Res* 6, 515-29.

- HADJANTONAKIS, A. K., DICKINSON, M. E., FRASER, S. E. und PAPAIOANNOU, V. E.** (2003). Technicolour transgenics: imaging tools for functional genomics in the mouse. *Nat Rev Genet* 4, 613-25.
- HANDLER, J. S., PRESTON, A. S. und STEELE, R. E.** (1984). Factors affecting the differentiation of epithelial transport and responsiveness to hormones. *Fed Proc* 43, 2221-4.
- HEINO, J.** (2007). The collagen family members as cell adhesion proteins. *BioEssays* 29, 1001-10.
- HEISTERKAMP, A., MAXWELL, I. Z., MAZUR, E., UNDERWOOD, J. M., NICKERSON, J. A., KUMAR, S. und INGBER, D. E.** (2005). Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses. *Opt Express* 13, 3690-6.
- HERMATSCHWEILER, M.** (2009). Unveröffentlichte Daten. Dissertation, Universität Karlsruhe
- HERSEL, U., DAHMEN, C. und KESSLER, H.** (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24, 4385-4415.
- HINZ, B., CELETTA, G., TOMASEK, J. J., GABBIANI, G. und CHAPONNIER, C.** (2001). Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity. *Mol. Biol. Cell* 12, 2730-2741.
- HORRES, C. R., LIEBERMAN, M. und PURDY, J. E.** (1977). Growth orientation of heart cells on nylon monofilament. Determination of the volume-to-surface area ratio and intracellular potassium concentration. *J Membr Biol* 34, 313-29.
- HOTULAINEN, P. und LAPPALAINEN, P.** (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* 173, 383-394.
- HU, S., CHEN, J., FABRY, B., NUMAGUCHI, Y., GOULDSTONE, A., INGBER, D. E., FREDBERG, J. J., BUTLER, J. P. und WANG, N.** (2003). Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytoskeleton of living cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 285, C1082-1090.
- HUANG, J., GRAINGER, S. V., CORBELLINI, F., RINCK, S., BOCK, E., KEMKEMER, R., KESSLER, H., DING, J. und SPATZ, J. P.** (2009). Impact of Order and Disorder in RGD Nanopatterns on Cell Adhesion. *Nano Letters* 9, 1111-1116.
- HULMES, D. J. und MILLER, A.** (1981). Molecular packing in collagen. *Nature* 293, 239-4.
- HWANG, N. S., KIM, M. S., SAMPATTAVANICH, S., BAEK, J. H., ZHANG, Z. und ELISSEEFF, J.** (2006). Effects of Three-Dimensional Culture and Growth Factors on the Chondrogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 24, 284-291.
- HYNES, R. O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-87.
- IMAMURA, F., MUKAI, M., AYAKI, M. und AKEDO, H.** (2000). Y-27632, an inhibitor of rho-associated protein kinase, suppresses tumor cell invasion via regulation of focal adhesion and focal adhesion kinase. *Jpn J Cancer Res* 91, 811-6.
- IMAMURA, H., TANAKA, K., HIHARA, T., UMIKAWA, M., KAMEI, T., TAKAHASHI, K., SASAKI, T. und TAKAI, Y.** (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 16, 2745-55.
- INGBER, D. E.** (1993). Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J Cell Sci* 104, 613-627.
- INGBER, D. E.** (2003). Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci* 116, 1157-1173.
- INGBER, D. E.** (2008). Tensegrity-based mechanosensing from macro to micro. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 97, 163-179.
- IRIMURA, T., GONZALEZ, R. und NICOLSON, G. L.** (1981). Effects of tunicamycin on B16 metastatic melanoma cell surface glycoproteins and blood-borne arrest and survival properties. *Cancer Res* 41, 3411-8.

- ISHII, I., TOMIZAWA, A., KAWACHI, H., SUZUKI, T., KOTANI, A., KOSHUSHI, I., ITOH, H., MORISAKI, N., BUJO, H., SAITO, Y. et al. (2001). Histological and functional analysis of vascular smooth muscle cells in a novel culture system with honeycomb-like structure. *Atherosclerosis* 158, 377-384.
- ISHIZAKI, T., MORISHIMA, Y., OKAMOTO, M., FURUYASHIKI, T., KATO, T. und NARUMIYA, S. (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol* 3, 8-14.
- ISHIZAKI, T., UEHATA, M., TAMECHIKA, I., KEEL, J., NONOMURA, K., MAEKAWA, M. und NARUMIYA, S. (2000). Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* 57, 976-83.
- IVASCU, A. und KUBBIES, M. (2006). Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen* 11, 922-32.
- JIANG, X., BRUZEWICZ, D. A., WONG, A. P., PIEL, M. und WHITESIDES, G. M. (2005). Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 975-978.
- JIANG, Z. (2009). Unveröffentlichte Daten. Dissertation, Universität Karlsruhe
- JUSTICE, B. A., BADR, N. A. und FELDER, R. A. (2009). 3D cell culture opens new dimensions in cell-based assays. *Drug Discovery Today* 14, 102-107.
- KAECH, S., LUDIN, B. und MATUS, A. (1996). Cytoskeletal Plasticity in Cells Expressing Neuronal Microtubule-Associated Proteins. *Neuron* 17, 1189-1199.
- KAEHR, B., ALLEN, R., JAVIER, D. J., CURRIE, J. und SHEAR, J. B. (2004). Guiding neuronal development with *in situ* microfabrication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16104-8.
- KAEHR, B. und SHEAR, J. B. (2008). Multiphoton fabrication of chemically responsive protein hydrogels for microactuation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 8850-8854.
- KAJZAR, A., CESÁ, C. M., KIRCHGESSNER, N., HOFFMANN, B. und MERKEL, R. (2008). Toward Physiological Conditions for Cell Analyses: Forces of Heart Muscle Cells Suspended Between Elastic Micropillars. *Biophys. J.* 94, 1854-1866.
- KALE, S., BIERMANN, S., EDWARDS, C., TARNOWSKI, C., MORRIS, M. und LONG, M. W. (2000). Three-dimensional cellular development is essential for *ex vivo* formation of human bone. *Nat Biotechnol* 18, 954-8.
- KANG, F., PURICH, D. L. und SOUTHWICK, F. S. (1999). Profilin Promotes Barbed-end Actin Filament Assembly without Lowering the Critical Concentration. *J. Biol. Chem.* 274, 36963-36972.
- KAVERINA, I., KRYLYSHKINA, O. und SMALL, J. V. (1999). Microtubule Targeting of Substrate Contacts Promotes Their Relaxation and Dissociation. *J. Cell Biol.* 146, 1033-1044.
- KAVERINA, I., ROTTNER, K. und SMALL, J. V. (1998). Targeting, Capture, and Stabilization of Microtubules at Early Focal Adhesions. *J. Cell Biol.* 142, 181-190.
- KELM, J. M., TIMMINS, N. E., BROWN, C. J., FUSSENEGGER, M. und NIELSEN, L. K. (2003). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 83, 173-80.
- KIS, A., KASAS, S., BABIC, B., KULIK, A. J., BENOIT, W., BRIGGS, G. A., SCHONENBERGER, C., CATSICAS, S. und FORRO, L. (2002). Nanomechanics of microtubules. *Phys Rev Lett* 89, 248101.
- KLEIN, F. (2005). Zelladhäsion auf mikrostrukturierten Substraten nach Inhibition der intrazellulären Kraftentwicklung und Aktin-Dynamik. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- KODAMA, A., KARAKESISOGLOU, I., WONG, E., VAEZI, A. und FUCHS, E. (2003). ACF7: An essential integrator of microtubule dynamics. *Cell* 115, 343-354.

- KOLODNEY, M. S. und ELSON, E. L.** (1995). Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10252-6.
- KOVACS, M., TOTH, J., HETENYI, C., MALNASI-CSIZMADIA, A. und SELLERS, J. R.** (2004). Mechanism of Blebbistatin Inhibition of Myosin II. *J. Biol. Chem.* 279, 35557-35563.
- KOZLOV, M. M. und BERSHADSKY, A. D.** (2004). Processive capping by formin suggests a force-driven mechanism of actin polymerization. *J. Cell Biol.* 167, 1011-1017.
- KRENDEL, M., ZENKE, F. T. und BOKOCHE, G. M.** (2002). Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol* 4, 294-301.
- KRYLYSHKINA, O., ANDERSON, K. I., KAVERINA, I., UPMANN, I., MANSTEIN, D. J., SMALL, J. V. und TOOMRE, D. K.** (2003). Nanometer targeting of microtubules to focal adhesions. *J. Cell Biol.* 161, 853-859.
- KUMAR, A. und WHITESIDES, G. M.** (1993). Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching. *Appl. Phys. Lett.* 63, 2002.
- KUMAR, S., MAXWELL, I. Z., HEISTERKAMP, A., POLTE, T. R., LELE, T. P., SALANGA, M., MAZUR, E. und INGBER, D. E.** (2006). Viscoelastic Retraction of Single Living Stress Fibers and Its Impact on Cell Shape, Cytoskeletal Organization, and Extracellular Matrix Mechanics. *Biophysical Journal* 90, 3762-3773.
- KUNG, C.** (2005). A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* 436, 647-654.
- LAM, C. X. F., MO, X. M., TEOH, S. H. und HUTMACHER, D. W.** (2002). Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. *Materials Science and Engineering: C* 20, 49-56.
- LAMBRECHTS, A., VAN TROYS, M. und AMPE, C.** (2004). The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 1890-1909.
- LANDERS, R. und MÜLHAUPT, R.** (2000). Desktop manufacturing of complex objects, prototypes and biomedical scaffolds by means of computer-assisted design combined with computer-guided 3D plotting of polymers and reactive oligomers. *Macromolecular Materials and Engineering* 282, 17-21.
- LANDERS, R., PFISTER, A., HÜBNER, U., JOHN, H., SCHMELZEISEN, R. und MÜLHAUPT, R.** (2002). Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques *Journal of Materials Science* 37.
- LANGER, R. und VACANTI, J. P.** (1993). Tissue engineering. *Science* 260, 920-6.
- LANSBERGEN, G. und AKHMANOVA, A.** (2006). Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic* 7, 499-507.
- LARSEN, M., ARTYM, V. V., GREEN, J. A. und YAMADA, K. M.** (2006). The matrix reorganized: extracellular matrix remodeling and integrin signaling. *Current Opinion in Cell Biology* 18, 463-471.
- LEE, K. Y. und MOONEY, D. J.** (2001). Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev* 101, 1869-79.
- LEE, S.-H., MOON, J. J. und WEST, J. L.** (2008). Three-dimensional micropatterning of bioactive hydrogels via two-photon laser scanning photolithography for guided 3D cell migration. *Biomaterials* 29, 2962-2968.
- LEHNERT, D.** (2003). Einfluss von Mikro- und Nanostrukturen auf Zellwachstum und -Migration. Dissertation, Universität Konstanz
- LEHNERT, D., WEHRLE-HALLER, B., DAVID, C., WEILAND, U., BALLESTREM, C., IMHOF, B. A. und BASTMEYER, M.** (2004). Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci* 117, 41-52.

- LEISS, M., BECKMANN, K., GIROS, A., COSTELL, M. und FÄSSLER, R.** (2008). The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Current Opinion in Cell Biology* 20, 502-507.
- LEITINGER, B. und HOHENESTER, E.** (2007). Mammalian collagen receptors. *Matrix Biology* 26, 146-155.
- LEONG, K. F., CHEAH, C. M. und CHUA, C. K.** (2003). Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials* 24, 2363-2378.
- LEONG, K. F., PHUA, K. K., CHUA, C. K., DU, Z. H. und TEO, K. O.** (2001). Fabrication of porous polymeric matrix drug delivery devices using the selective laser sintering technique. *Proc Inst Mech Eng [H]* 215, 191-201.
- LEVENTAL, I., GEORGES, P. C. und JANMEY, P. A.** (2007). Soft biological materials and their impact on cell function. *Soft Matter* 3, 299-306.
- LEWIS, W. H. und LEWIS, M. R.** (1924). Behavior of cells in tissue cultures. *General Cytology*, 385-447.
- LI, F. und HIGGS, H. N.** (2003). The Mouse Formin mDia1 Is a Potent Actin Nucleation Factor Regulated by Autoinhibition. *Current Biology* 13, 1335-1340.
- LIEBER, M., SMITH, B., SZAKAL, A., NELSON-REES, W. und TODARO, G.** (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17, 62-70.
- LIMOUZE, J., STRAIGHT, A. F., MITCHISON, T. und SELLERS, J. R.** (2004). Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil* 25, 337-41.
- LIU, W. F. und CHEN, C. S.** (2007). Cellular and multicellular form and function. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, 1319-1328.
- LO, C.-M., WANG, H.-B., DEMBO, M. und WANG, Y.-L.** (2000). Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophysical Journal* 79, 144-152.
- LU, Z., JIANG, G., BLUME-JENSEN, P. und HUNTER, T.** (2001). Epidermal Growth Factor-Induced Tumor Cell Invasion and Metastasis Initiated by Dephosphorylation and Downregulation of Focal Adhesion Kinase. *Mol. Cell. Biol.* 21, 4016-4031.
- LUO, Y., XU, X., LELE, T., KUMAR, S. und INGBER, D. E.** (2008). A multi-modular tensegrity model of an actin stress fiber. *Journal of Biomechanics* 41, 2379-2387.
- LUTOLF, M. P. und HUBBELL, J. A.** (2005). Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 23, 47-55.
- LYSAGHT, M. J. und HAZLEHURST, A. L.** (2004). Tissue engineering: the end of the beginning. *Tissue Eng* 10, 309-20.
- MAEKAWA, M., ISHIZAKI, T., BOKU, S., WATANABE, N., FUJITA, A., IWAMATSU, A., OBINATA, T., OHASHI, K., MIZUNO, K. und NARUMIYA, S.** (1999). Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895-898.
- MAHESHWARI, G., BROWN, G., LAUFFENBURGER, D. A., WELLS, A. und GRIFFITH, L. G.** (2000). Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci* 113, 1677-1686.
- MALDA, J. und FRONDOZA, C. G.** (2006). Microcarriers in the engineering of cartilage and bone. *Trends in Biotechnology* 24, 299-304.
- MANIOTIS, A., CHEN, C. und INGBER, D. E.** (1997). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 849-854.
- MANN, B. K., GOBIN, A. S., TSAI, A. T., SCHMEDLEN, R. H. und WEST, J. L.** (2001). Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials* 22, 3045-3051.

- MAO, Y. und SCHWARZBAUER, J. E.** (2005). Stimulatory effects of a three-dimensional microenvironment on cell-mediated fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Sci* 118, 4427-4436.
- MARSHALL, B. T., LONG, M., PIPER, J. W., YAGO, T., McEVER, R. P. und ZHU, C.** (2003). Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature* 423, 190-193.
- MASSIA, S. P. und HUBBELL, J. A.** (1991). An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3- mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J. Cell Biol.* 114, 1089-1100.
- MATLIN, K. S. und SIMONS, K.** (1984). Sorting of an apical plasma membrane glycoprotein occurs before it reaches the cell surface in cultured epithelial cells. *J. Cell Biol.* 99, 2131-2139.
- MAYNE, R.** (1989). Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum* 32, 241-6.
- MCBEATH, R., PIRONE, D. M., NELSON, C. M., BHADIRAJU, K. und CHEN, C. S.** (2004). Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental Cell* 6, 483-495.
- MCDANIEL, D. P., SHAW, G. A., ELLIOTT, J. T., BHADIRAJU, K., MEUSE, C., CHUNG, K.-H. und PLANT, A. L.** (2007). The Stiffness of Collagen Fibrils Influences Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype. *Biophysical Journal* 92, 1759-1769.
- MERKEL, R., NASSOY, P., LEUNG, A., RITCHIE, K. und EVANS, E.** (1999). Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature* 397, 50-53.
- MESHEL, A. S., WEI, Q., ADELSTEIN, R. S. und SHEETZ, M. P.** (2005). Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts. *Nat Cell Biol* 7, 157-64.
- MIKOS, A. G., THORSEN, A. J., Czerwonka, L. A., BAO, Y. und LANGER, R.** (1994). Preparation and Characterization of Poly(L-Lactic Acid) Foams. *Polymer* 35, 1068-1077.
- MITRA, S. K., HANSON, D. A. und SCHLAEPFER, D. D.** (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.
- MONTANEZ, E., USSAR, S., SCHIFFERER, M., BOSL, M., ZENT, R., MOSER, M. und FASSLER, R.** (2008). Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev* 22, 1325-30.
- MOONEY, D. J., BALDWIN, D. F., SUH, N. P., VACANTI, J. P. und LANGER, R.** (1996). Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* 17, 1417-22.
- MORETTI, F. A., CHAUHAN, A. K., IACONCIG, A., PORRO, F., BARALLE, F. E. und MURO, A. F.** (2007). A Major Fraction of Fibronectin Present in the Extracellular Matrix of Tissues Is Plasma-derived. *J. Biol. Chem.* 282, 28057-28062.
- MUELLER-KLIESER, W.** (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *Am J Physiol Cell Physiol* 273, C1109-1123.
- MUSCHLER, G. F., NAKAMOTO, C. und GRIFFITH, L. G.** (2004). Engineering Principles of Clinical Cell-Based Tissue Engineering. *J Bone Joint Surg Am* 86, 1541-1558.
- MYLLYHARJU, J. und KIVIRIKKO, K. I.** (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends in Genetics* 20, 33-43.
- NAGAI, T., YAMAKAWA, N., AOTA, S., YAMADA, S. S., AKIYAMA, S. K., OLDEN, K. und YAMADA, K. M.** (1991). Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly. *J. Cell Biol.* 114, 1295-1305.
- NAKAMURA, K., YOSHIKAWA, N., YAMAGUCHI, Y., KAGOTA, S., SHINOZUKA, K. und KUNITOMO, M.** (2002). Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sciences* 70, 791-798.
- NAUMANEN, P., LAPPALAINEN, P. und HOTULAINEN, P.** (2008). Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of Microscopy* 231, 446-454.

- NELSON, C. M., JEAN, R. P., TAN, J. L., LIU, W. F., SNIADECKI, N. J., SPECTOR, A. A. und CHEN, C. S.** (2005). Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11594-11599.
- NISSLEY, S. P., SHORT, P. A., RECHLER, M. M., PODSKALNY, J. M. und COON, H. G.** (1977). Proliferation of Buffalo rat liver cells in serum-free medium does not depend upon multiplication-stimulating activity (MSA). *Cell* 11, 441-6.
- NIYIBIZI, C. und EYRE, D. R.** (1989). Bone type V collagen: chain composition and location of a trypsin cleavage site. *Connect Tissue Res* 20, 247-50.
- NOBES, C. D. und HALL, A.** (1999). Rho GTPases Control Polarity, Protrusion, and Adhesion during Cell Movement. *J. Cell Biol.* 144, 1235-1244.
- NOGALES, E.** (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69, 277-302.
- OBI, S.** (2008). Replicated Optical Microstructures in Hybrid Polymers: Process Technology and Applications. Dissertation, University of Neuchâtel
- OCHSNER, M., DUSSEILLER, M. R., GRANDIN, H. M., LUNA-MORRIS, S., TEXTOR, M., VOGEL, V. und SMITH, M. L.** (2007). Micro-well arrays for 3D shape control and high resolution analysis of single cells. *Lab Chip* 7, 1074-7.
- ODDE, D. J., MA, L., BRIGGS, A. H., DEMARCO, A. und KIRSCHNER, M. W.** (1999). Microtubule bending and breaking in living fibroblast cells. *J Cell Sci* 112, 3283-3288.
- OKANO, T., YAMADA, N., SAKAI, H. und SAKURAI, Y.** (1993). A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J Biomed Mater Res* 27, 1243-51.
- PALAZZO, A. F., ENG, C. H., SCHLAEPPER, D. D., MARCANTONIO, E. E. und GUNDERSEN, G. G.** (2004). Localized Stabilization of Microtubules by Integrin- and FAK-Facilitated Rho Signaling. *Science* 303, 836-839.
- PAMPALONI, F. und FLORIN, E.-L.** (2008). Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends in Biotechnology* 26, 302-310.
- PAMPALONI, F., LATTANZI, G., JONÁČÍK, A., SURREY, T., FREY, E. und FLORIN, E.-L.** (2006). Thermal fluctuations of grafted microtubules provide evidence of a length-dependent persistence length. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 10248-10253.
- PAMPALONI, F., REYNAUD, E. G. und STELZER, E. H. K.** (2007). The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 839-845.
- PANKOV, R., ENDO, Y., EVEN-RAM, S., ARAKI, M., CLARK, K., CUKIERMAN, E., MATSUMOTO, K. und YAMADA, K. M.** (2005). A Rac switch regulates random versus directionally persistent cell migration. *J. Cell Biol.* 170, 793-802.
- PANKOV, R. und YAMADA, K. M.** (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115, 3861-3863.
- PANTALONI, D. und CARLIER, M.-F.** (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin [beta]4. *Cell* 75, 1007-1014.
- PARKER, K. K., BROCK, A. L., BRANGWYNNE, C., MANNIX, R. J., WANG, N., OSTUNI, E., GEISSE, N. A., ADAMS, J. C., WHITESIDES, G. M. und INGBER, D. E.** (2002). Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J.* 16, 1195-1204.
- PARKER, K. K., TAN, J., CHEN, C. S. und TUNG, L.** (2008). Myofibrillar architecture in engineered cardiac myocytes. *Circ Res* 103, 340-2.
- PARSONS, J. T.** (2003). Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116, 1409-1416.
- PASZEK, M. J. und WEAVER, V. M.** (2004). The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 325-42.

- PASZEK, M. J., ZAHIR, N., JOHNSON, K. R., LAKINS, J. N., ROZENBERG, G. I., GEFEN, A., REINHART-KING, C. A., MARGULIES, S. S., DEMBO, M., BOETTIGER, D. et al.** (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* 8, 241-254.
- PEDERSEN, J. A. und SWARTZ, M. A.** (2005). Mechanobiology in the third dimension. *Ann Biomed Eng* 33, 1469-90.
- PELHAM, R. J., JR. und WANG, Y.** (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13661-5.
- PELLEGRIN, S. und MELLOR, H.** (2007). Actin stress fibres. *J Cell Sci* 120, 3491-3499.
- PETERSON, L. J., RAJFUR, Z., MADDOX, A. S., FREEL, C. D., CHEN, Y., EDLUND, M., OTEY, C. und BURRIDGE, K.** (2004). Simultaneous Stretching and Contraction of Stress Fibers In Vivo. *Mol. Biol. Cell* 15, 3497-3508.
- PEYTON, S. R. und PUTNAM, A. J.** (2005). Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *Journal of Cellular Physiology* 204, 198-209.
- PIERSCHBACHER, M. D. und RUOSLAHTI, E.** (1984). Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5985-8.
- POLINGER, I. S.** (1970). Separation of cell types in embryonic heart cell cultures. *Exp Cell Res* 63, 78-82.
- POLLARD, T. D. und BORISY, G. G.** (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* 112, 453-465.
- PYTEL, R., PIERSCHBACHER, M. D. und RUOSLAHTI, E.** (1985). Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 40, 191-198.
- RIDLEY, A. J.** (2001). Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 114, 2713-2722.
- RIDLEY, A. J., SCHWARTZ, M. A., BURRIDGE, K., FIRTEL, R. A., GINSBERG, M. H., BORISY, G., PARSONS, J. T. und HORWITZ, A. R.** (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* 302, 1704-1709.
- RIENTO, K. und RIDLEY, A. J.** (2003). Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 446-56.
- RINN, J. L., BONDRE, C., GLADSTONE, H. B., BROWN, P. O. und CHANG, H. Y.** (2006). Anatomic Demarcation by Positional Variation in Fibroblast Gene Expression Programs. *PLoS Genet* 2, e119.
- RIVELINE, D., ZAMIR, E., BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., ISHIZAKI, T., NARUMIYA, S., KAM, Z., GEIGER, B. und BERSHADSKY, A. D.** (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol* 153, 1175-86.
- SACHLOS, E. und CZERNUSZKA, J. T.** (2003). Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *Eur Cell Mater* 5, 29-39; discussion 39-40.
- SALMON, W. C., ADAMS, M. C. und WATERMAN-STORER, C. M.** (2002). Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J. Cell Biol.* 158, 31-37.
- SANTINI, M. T. und RAINALDI, G.** (1999). Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology* 67, 148-57.
- SAONCELLA, S., ECHTERMEYER, F., DENHEZ, F., NOWLEN, J. K., MOSHER, D. F., ROBINSON, S. D., HYNES, R. O. und GOETINCK, P. F.** (1999). Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rhodependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 2805-2810.

- SCHLIE, S., NGEZAHAYO, A., OVSIANIKOV, A., FABIAN, T., KOLB, H.-A., HAVERKAMP, H. und CHICHKOV, B. N.** (2007). Three-Dimensional Cell Growth on Structures Fabricated from ORMOCER(R) by Two-Photon Polymerization Technique. *J Biomater Appl* 22, 275-287.
- SCHWARTZ, M.** (2004). Rho signalling at a glance. *J Cell Sci* 117, 5457-5458.
- SCOTT, C. S.** (1991). Apparatus and method for creating three-dimensional objects. 5121329. (US.Patent)
- SELLS, M. A., BOYD, J. T. und CHERNOFF, J.** (1999). p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol* 145, 837-49.
- SEPT, D., BAKER, N. A. und McCAMMON, J. A.** (2003). The physical basis of microtubule structure and stability. *Protein Sci* 12, 2257-61.
- SHRAIMAN, B. I.** (2005). Mechanical feedback as a possible regulator of tissue growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3318-3323.
- SIMPSON, P. und SAVION, S.** (1982). Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. Cross-striations, ultrastructure, and chronotropic response to isoproterenol. *Circ Res* 50, 101-116.
- SINGHVI, R., KUMAR, A., LOPEZ, G. P., STEPHANOPOULOS, G. N., WANG, D. I., WHITESIDES, G. M. und INGBER, D. E.** (1994). Engineering cell shape and function. *Science* 264, 696-8.
- SIVAKUMAR, A. und VALIATHAN, A.** (2006). Dental Ceramics and Ormocer Technology - Navigating the Future! *Trends Biomater. Artif. Organs* 20, 40-43.
- SIVARAMAN, A., LEACH, J. K., TOWNSEND, S., IIDA, T., HOGAN, B. J., STOLZ, D. B., FRY, R., SAMSON, L. D., TANNENBAUM, S. R. und GRIFFITH, L. G.** (2005). A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction. *Curr Drug Metab* 6, 569-91.
- SMALL, J. V., GEIGER, B., KAVERINA, I. und BERSHADSKY, A.** (2002). How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 957-64.
- SMALL, J. V., ROTTNER, K., KAVERINA, I. und ANDERSON, K. I.** (1998). Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1404, 271-281.
- STAMENOVIC, D.** (2005). Microtubules may harden or soften cells, depending of the extent of cell distension. *Journal of Biomechanics* 38, 1728-1732.
- STAMENOVIC, D., MIJAILOVICH, S. M., TOLIC-NORRELYKKE, I. M., CHEN, J. und WANG, N.** (2002). Cell prestress. II. Contribution of microtubules. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C617-624.
- STOCK, U. A. und VACANTI, J. P.** (2001). Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med* 52, 443-51.
- STOPAK, D. und HARRIS, A. K.** (1982). Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction : I. Tissue culture observations. *Developmental Biology* 90, 383-398.
- STRIEBEL, T.** (2007). Herstellung und Charakterisierung von dreidimensionalen Templanten für Zellwachstumstudien. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe
- SUTHERLAND, R. M.** (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* 240, 177-84.
- SVITKINA, T. M., VERKHOVSKY, A. B., MCQUADE, K. M. und BORISY, G. G.** (1997). Analysis of the Actin-Myosin II System in Fish Epidermal Keratocytes: Mechanism of Cell Body Translocation. *J. Cell Biol.* 139, 397-415.
- TAKAGI, J., STROKOVICH, K., SPRINGER, T. A. und WALZ, T.** (2003). Structure of integrin alpha5beta1 in complex with fibronectin. *Embo J* 22, 4607-15.
- TAKEZAWA, T., MORI, Y. und YOSHIZATO, K.** (1990). Cell culture on a thermo-responsive polymer surface. *Biotechnology (N Y)* 8, 854-6.

- TAMARIZ, E. und GRINNELL, F.** (2002). Modulation of Fibroblast Morphology and Adhesion during Collagen Matrix Remodeling. *Mol. Biol. Cell* 13, 3915-3929.
- TAN, J. L., TIEN, J., PIRONE, D. M., GRAY, D. S., BHADIRAJU, K. und CHEN, C. S.** (2003a). Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1484-9.
- TAN, K. H., CHUA, C. K., LEONG, K. F., CHEAH, C. M., CHEANG, P., ABU BAKAR, M. S. und CHA, S. W.** (2003b). Scaffold development using selective laser sintering of polyetheretherketone-hydroxyapatite biocomposite blends. *Biomaterials* 24, 3115-3123.
- TAN, K. H., CHUA, C. K., LEONG, K. F., CHEAH, C. M., GUI, W. S., TAN, W. S. und WIRIA, F. E.** (2005). Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 15, 113-24.
- TARR, M., TRANK, J. W., LEIFFER, P. und SHEPHERD, N.** (1979). Sarcomere length-resting tension relation in single frog atrial cardiac cells. *Circ Res* 45, 554-559.
- TASCHE, C., MEYHOFER, E. und BRENNER, B.** (1999). A force transducer for measuring mechanical properties of single cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277, H2400-2408.
- TAUTE, K. M., PAMPALONI, F., FREY, E. und FLORIN, E. L.** (2008). Microtubule dynamics depart from the wormlike chain model. *Phys Rev Lett* 100, 028102.
- TAYALIA, P., MENDONCA, C. R., BALDACCHINI, T., MOONEY, D. J. und MAZUR, E.** (2008). 3D Cell-Migration Studies using Two-Photon Engineered Polymer Scaffolds. *Advanced Materials* 20, 4494-4498.
- THERIOT, J. A. und MITCHISON, T. J.** (1993). The three faces of profilin. *Cell* 75, 835-838.
- THERRIAULT, D., WHITE, S. R. und LEWIS, J. A.** (2003). Chaotic mixing in three-dimensional microvascular networks fabricated by direct-write assembly. *Nat Mater* 2, 265-271.
- THÉRY, M., PÉPIN, A., DRESSAIRE, E., CHEN, Y. und BORNENS, M.** (2006). Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63, 341-355.
- THÉRY, M., RACINE, V., PEPIN, A., PIEL, M., CHEN, Y., SIBARITA, J.-B. und BORNENS, M.** (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol* 7, 947-953.
- THOMAS, W.** (2006). For catch bonds, it all hinges on the interdomain region. *J. Cell Biol.* 174, 911-913.
- THOMAS, W. E., TRINTCHINA, E., FORERO, M., VOGEL, V. und SOKURENKO, E. V.** (2002). Bacterial Adhesion to Target Cells Enhanced by Shear Force. *Cell* 109, 913-923.
- TIMMINS, N. E. und NIELSEN, L. K.** (2007). Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method. *Methods Mol Med* 140, 141-51.
- TODA, S., WATANABE, K., YOKOI, F., MATSUMURA, S., SUZUKI, K., OOTANI, A., AOKI, S., KOIKE, N. und SUGIHARA, H.** (2002). A new organotypic culture of thyroid tissue maintains three-dimensional follicles with C cells for a long term. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294, 906-911.
- TOMASEK, J. J., GABBIANI, G., HINZ, B., CHAPONNIER, C. und BROWN, R. A.** (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349-363.
- TSAI, M. A., WAUGH, R. E. und KENG, P. C.** (1998). Passive Mechanical Behavior of Human Neutrophils: Effects of Colchicine and Paclitaxel. *Biophysical Journal* 74, 3282-3291.
- TSANG, V. L., CHEN, A. A., CHO, L. M., JADIN, K. D., SAH, R. L., DELONG, S., WEST, J. L. und BHATIA, S. N.** (2007). Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels. *FASEB J.* 21, 790-801.
- UEHATA, M., ISHIZAKI, T., SATOH, H., ONO, T., KAWAHARA, T., MORISHITA, T., TAMAKAWA, H., YAMAGAMI, K., INUI, J., MAEKAWA, M. et al.** (1997). Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389, 990-994.

- VACANTI, J. P. und LANGER, R.** (1999). Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 354 Suppl 1, SI32-4.
- VAN WEZEL, A. L.** (1967). Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture. *Nature* 216, 64-65.
- VANNIER, C., CHEVASSUS, H. und VASSORT, G.** (1996). Ca-dependence of isometric force kinetics in single skinned ventricular cardiomyocytes from rats. *Cardiovasc Res* 32, 580-586.
- VERT, M., MAUDUIT, J. und LI, S.** (1994). Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials* 15, 1209-13.
- VITAGLIANO, L., BERISIO, R., MAZZARELLA, L. und ZAGARI, A.** (2001). Structural bases of collagen stabilization induced by proline hydroxylation. *Biopolymers* 58, 459-64.
- VOGEL, V. und SHEETZ, M.** (2006). Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 265-275.
- VOZZI, G., PREVITI, A., DE ROSSI, D. und AHLUWALIA, A.** (2002). Microsyringe-based deposition of two-dimensional and three-dimensional polymer scaffolds with a well-defined geometry for application to tissue engineering. *Tissue Eng* 8, 1089-98.
- WANG, H.-W. und NOGALES, E.** (2005). Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature* 435, 911-915.
- WANG, N., NARUSE, K., STAMENOVIC, D., FREDBERG, J. J., MIJAILOVICH, S. M., TOLIC-NORRELYKKE, I. M., POLTE, T., MANNIX, R. und INGBER, D. E.** (2001). Mechanical behavior in living cells consistent with the tensegrity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7765-7770.
- WATANABE, N., KATO, T., FUJITA, A., ISHIZAKI, T. und NARUMIYA, S.** (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol* 1, 136-43.
- WATANABE, N., MADAULE, P., REID, T., ISHIZAKI, T., WATANABE, G., KAKIZUKA, A., SAITO, Y., NAKAO, K., JOCKUSCH, B. und NARUMIYA, S.** (1997). p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 16, 3044-56.
- WEAR, M. A., SCHAFER, D. A. und COOPER, J. A.** (2000). Actin dynamics: Assembly and disassembly of actin networks. *Current Biology* 10, R891-R895.
- WEHRLE-HALLER, B. und IMHOFF, B.** (2002). The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol* 12, 382-9.
- WELLS, R. G.** (2008). The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology* 47, 1394-400.
- WIESNER, S., LEGATE, K. R. und FASSLER, R.** (2005). Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci* 62, 1081-99.
- WINDER, S. J. und AYSCOUGH, K. R.** (2005). Actin-binding proteins. *J Cell Sci* 118, 651-654.
- WOZNIAK, M. A., DESAI, R., SOLSKI, P. A., DER, C. J. und KEELY, P. J.** (2003). ROCK-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J. Cell Biol.* 163, 583-595.
- YAMANA, N., ARAKAWA, Y., NISHINO, T., KUROKAWA, K., TANJI, M., ITOH, R. E., MONYPENNY, J., ISHIZAKI, T., BITO, H., NOZAKI, K. et al.** (2006). The Rho-mDia1 Pathway Regulates Cell Polarity and Focal Adhesion Turnover in Migrating Cells through Mobilizing Apc and c-Src. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6844-6858.
- YANG, Y., ROSSI, F. M. V. und PUTNINS, E. E.** (2007). Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials* 28, 3110-3120.
- YANNAS, I. V., LEE, E., ORGILL, D. P., SKRABUT, E. M. und MURPHY, G. F.** (1989). Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 933-7.

- YEONG, W.-Y., CHUA, C.-K., LEONG, K.-F. und CHANDRASEKARAN, M.** (2004). Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends in Biotechnology* 22, 643-652.
- YIN, S., ZHANG, X., ZHAN, C., Wu, J., Xu, J. und CHEUNG, J.** (2005). Measuring Single Cardiac Myocyte Contractile Force via Moving a Magnetic Bead. *Biophysical Journal* 88, 1489-1495.
- ZAIDEL-BAR, R., ITZKOVITZ, S., MA'AYAN, A., IYENGAR, R. und GEIGER, B.** (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* 9, 858-867.
- ZAND, M. S. und ALBRECHT-BUEHLER, G.** (1989). What structures, besides adhesions, prevent spread cells from rounding up? *Cell Motil Cytoskeleton* 13, 195-211.
- ZEIN, I., HUTMACHER, D. W., TAN, K. C. und TEOH, S. H.** (2002). Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* 23, 1169-85.
- ZHANG, X., JIANG, G., CAI, Y., MONKLEY, S. J., CRITCHLEY, D. R. und SHEETZ, M. P.** (2008). Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol* 10, 1062-8.
- ZHANG, X., WANG, W., Yu, W., XIE, Y., ZHANG, Y. und MA, X.** (2005). Development of an in vitro multicellular tumor spheroid model using microencapsulation and its application in anticancer drug screening and testing. *Biotechnol Prog* 21, 1289-96.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

a	alpha-, oder anti-	h	Stunden
°C	Grad Celcius	IgM/G	Immunglobulin G/M
µCP	Microcontact Printing	Kap.	Kapitel
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)	kDa	Kilodalton
µl	Mikroliter (10^{-6} l)	l	Liter
µm	Mikrometer (10^{-6} m)	LSM	Laser Scanning Mikroskop
2D	zweidimensional	M	Molar (mol/l)
2PP	Zwei-Photonenpolymerisation	max.	maximal
3D	dreidimensional	mbar	Millibar (10^{-3} bar)
Abb.	Abbildung	min	Minuten
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. atomic force microscope)	mind.	mindestens
ATCC	American Type Culture Collection	ml	monoclonaler Antikörper (meist aus Maus)
ATP	Adenosin-triphosphat	ml	Milliliter (10^{-6} l)
BGS	Bovine Growth Serum	MLCK	Myosin-Leichtketten-Kinase (engl. myosin light chain kinase)
Bidest	zweifach destilliertes Wasser, aqua bidestillata	 mM	Millimolar (10^{-3} M)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumin)	mm	Millimeter (10^{-3} m)
bzw.	beziehungsweise	N	Newton
ca.	circa	NH₃	Ammoniak
cm	Zentimeter (10^{-2} m)	nm	Nanometer (10^{-9} m)
CO₂	Kohlendioxid	nN	Nanonewton (10^{-9} N)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride	PAA	Polyacrylsäure
DIC	Differentieller Interferenzkontrast (engl. differential interference contrast)	PGA	Poly-Glycolat
DLS	Direktes Laserschreiben	PDMS	Polydimethyl-Siloxan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Growth Medium	PEG	Polyethyenglycol
DMSO	Dimethylsulfoxid	PEO	Polyethylenoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure	PFA	Paraformaldehyd
ECM	Extrazelluläre Matrix	pkl	polyklonaler Antikörper
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure	PLAA	Poly-(L)-Lactat
EGFP	enhanced (verstärkt) grün fluoreszierendes Protein	PLL	Poly-L-Lysin
engl.	englisch	PVA	Polyvinylalkohol
evt.	eventuell	Tab.	Tabelle
FAK	Focal Adhesion Kinase	u.a.	unter anderem
FN	Fibronektin	U/min	Umdrehungen pro Minute
g	Gramm	z.B.	zum Beispiel
GTP	Guanosin-triphosphat	z.T.	zum Teil

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Bastmeyer nicht nur für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen, sondern auch für sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie sein großes Engagement in der Schaffung exzellenter Arbeitsbedingungen im Rahmen des CFN bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Ulrich Schwarz für die freundliche Übernahme des Co-Referats, die hilfreiche konstruktive Kritik und seine motivierende Begeisterungsfähigkeit.

Großer Dank gebührt allen Kooperationspartnern für die sehr erfolgreiche und unkomplizierte Zusammenarbeit. Namentlich erwähnt seien Ilka Bischofs-Pfeifer, Thomas Striebel und Joachim Fischer. Des Weiteren danke ich auch Clemens Franz für die von ihm aufgenommenen AFM-Kraft-Kurven.

Ein besonderer Dank gebührt an dieser Stelle Zhongxiang Jiang für die gegenseitige Unterstützung und anregenden Diskussionen während unserer gemeinsamen Laborarbeit und nicht zuletzt Tanja Landmann – der besten TA, die man sich wünschen kann.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Freunde Roberto Lattanzio, Sabrina König, Micha Dietzscht, Verena Orth, Jubin Kashef und Melanie Langhauser für die entspannenden und lustigen Mensarunden, in denen wir dem oft frustrierenden Laboralltag ein herzliches Lachen abgewinnen konnten.

Mein spezieller Dank gilt meiner Familie, die mich in jeder Hinsicht unterstützt und in den letzten Wochen verständnisvoll entbehrt hat. Und nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinem Freund Jan, für seine verständnisvolle Geduld und Liebe und seine Nähe trotz der großen Entfernung zwischen Jena und Karlsruhe.

7.3 Publikationen

Veröffentlichungen

Bischofs, I. B., Klein, F., Lehnert, D., Bastmeyer, M. and Schwarz, U. S. (2008). Filamentous Network Mechanics and Active Contractility Determine Cell and Tissue Shape. *Biophys. J.* **95**(7): 3488-3496.

Klein, F., Striebel, T., Fischer, J., Jiang, Z., Franz, C. M., von Freymann, G., Wegener, M., and Bastmeyer, M. (2009). Elastic fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements.

In Bearbeitung.

Poster

Klein, F., Kurth, I., Bastmeyer, M. and D. Lehnert. Limits of ECM geometry for cell adhesion and spreading. 347. WE-Heraeus-Seminar: Dynamics of cell and tissue structure. Physikzentrum Bad Honnef, Mai 2005.

Jiang, Z., Klein, F., Bastmeyer, M. and D. Lehnert. Cell size on micropatterned substrates is controlled by intracellular tension and ECM-induced signaling but not by ECM-geometry. 29. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ). Braunschweig, April 2006.

Jiang, Z., Klein, F. and Bastmeyer, M. Cell size on micropatterned substrates is controlled by intracellular tension and ECM-induced signaling but not by ECM-geometry. Gordon Research Conference: Fibronectin, Integrins & Related Molecules. Lucca (Barga), April 2007.

Autenrieth, T., Jiang, Z., Klein, F. and Bastmeyer, M. Controlling cell behaviour with mikro- and nanostructured substrates: from 2D to 3D. 5th International Summer School of the DFG-Center for Functional Nanostructures. Bad Herrenalb, August 2007.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Franziska Klein

geboren am 08.September 1977 in Hildburghausen

ledig

Schulausbildung

09/1984 – 07/1991	Polytechnische Oberschule „Karl Liebknecht“ Schönbrunn
09/1991 – 07/1996	Hennebergisches Gymnasium „Georg-Ernst“ Schleusingen

Berufsausbildung

09/1996 – 07/1999	Staatliche Berufsbildende Schule für Gesundheit und Soziales Jena Abschluss: Medizinisch-technische Laboratoriumsassistentin
-------------------	--

Akademische Ausbildung

10/1999 – 05/2005	Biologiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Hauptfach: Allgemeine Zoologie Nebenfächer: Medizinische Mikrobiologie, Genetik, Neurobiologie (fakultativ) Diplomarbeitsthema: „Zelladhäsion auf mikrostrukturierten Substraten nach Inhibition der intrazellulären Kraftentwicklung und Aktindynamik“ (Gesamtnote 1.4)
-------------------	--

05/2005 – 07/2009	Promotion am Institut für Zell- und Neurobiologie, Universität Karlsruhe
-------------------	---

7.5 Begleit-CD

Die in dieser Arbeit durchgeführten Zeitrafferaufnahmen befinden sich auf dieser Begleit-CD.