Universitätsklinikum Ulm

Institut für Allgemeine Physiologie

Direktor: Prof. Dr. Paul Dietl

Biomechanische Eigenschaften des Keratinnetzwerkes in SCC-25-Zellen und deren Modifikation durch Keratinphosphorylierung

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Michael Dominik Weimer

Ehingen (Donau)

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. Edward Felder

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Franz Oswald

Tag der Promotion: 14.02.2014

Widmung aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1. Einleitung ..... - 1 -

1.1 Grundlagen zu Intermediärfilamenten ..... - 1 -

1.2 Aufgabe und Funktion der Intermediärfilamente ..... - 2 -

1.3 Spezifische Eigenschaften der Keratine ..... - 3 -

1.4 Struktur und Aufbau der Keratinfilamente ..... - 4 -

1.4.1 Aufbau des Keratinmonomers ..... - 4 -

1.4.2 Aufbau und Bildung des Keratinfilaments aus Monomeren ..... - 6 -

1.5 Posttranslationale Modifizierung der Keratinfilamente ..... - 8 -

1.5.1 Phosphorylierung ..... - 9 -

1.5.2 Transglutaminierung ..... - 10 -

1.5.3 Ausbildung von Disulfidbrücken ..... - 10 -

1.5.4 Glykosylierung ..... - 10 -

1.5.5 Citrullination ..... - 10 -

1.6 Mechanische Eigenschaften der Keratinfilamente ..... - 11 -

1.7 Zielsetzung ..... - 12 -

2. Material und Methoden ..... - 13 -

2.1 Zellkultur ..... - 13 -

2.1.1 Die Zelllinie SCC-25 ..... - 13 -

2.1.2 Kultivierungsbedingungen und Zellkulturmedium ..... - 13 -

2.1.3 Passagieren von Zellen und Aussaat auf Silikonmembranen ..... - 13 -

2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen ..... - 14 -

2.2 Induktion von Phosphorylierung und Dephosphorylierung ..... - 15 -

2.2.1 Okadeinsäure ..... - 15 -

2.2.2 Staurosporin ..... - 15 -

2.3 Transfektion der Zellen mit Keratinvektoren ..... - 16 -

2.3.1 Plasmide ..... - 16 -

2.3.2 Transfektionsprotokoll ..... - 17 -

2.4 Immunofärbung der Keratinfilamente ..... - 18 -

2.4.1 Antikörper ..... - 18 -

2.4.2 Immunofärbungsprotokoll ..... - 18 -

2.5 Technische Beschreibung des Zelldehnungsapparates ..... - 19 -

2.5.1 Membranhalter ..... - 19 -

2.5.2 Dehnungsapparat ..... - 20 -

2.6 Durchführung der Dehnungen ... - 21 -
2.6.1 Badlösung ... - 21 -
2.6.2 Dehnprotokolle ... - 22 -
2.7 Bestimmung der verschiedenen Messparameter ... - 24 -
2.7.1 Bestimmung der tolerierbaren Konzentrationen von Okadeinsäure und Staurosporin ... - 24 -
2.7.2 Bestimmung der dehnungsinduzierten Zellschädigung ... - 25 -
2.7.3 Bestimmung des Zelldurchmessers ... - 25 -
2.7.4 Bestimmung der relativen Krümmung peripherer Keratinfilamente ... - 26 -
2.7.5 Quantifizierung der dehnungsinduzierten Veränderungen des Keratinnetzwerkes im perinukleären Bereich ... - 27 -
2.7.6 Bestimmung der welligen Keratinfilamente nach Dehnung und anschließender Relaxierung ... - 29 -
2.8 Bildgebende Verfahren ... - 30 -
2.9 Bildauswertung und Statistik ... - 31 -
3. Ergebnisse ... - 32 -
3.1 Ergebnisse im Rahmen der Methodenetablierung ... - 32 -
3.1.1 Optimierung des Transfektionsprotokolles ... - 32 -
3.1.2 Bestimmung der tolerierbaren Konzentrationen von Okadeinsäure und Staurosporin ... - 33 -
3.1.3 Dehnungsinduzierte Zellschädigung ... - 36 -
3.1.4 Messung des Zelldurchmessers parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse bei verschiedenen Dehnamplituden ... - 38 -
3.1.4.1 Durchmesser der Zellen unter Kontrollbedingungen ... - 39 -
3.1.4.2 Durchmesser der Zellen nach Behandlung mit Okadeinsäure ... - 43 -
3.1.4.3 Durchmesser der Zellen nach Behandlung mit Staurosporin ... - 44 -
3.2 Ergebnisse im Rahmen der wissenschaftlichen Fragestellung ... - 46 -
3.2.1 Krümmung peripherer Keratinfilamente ... - 46 -
3.2.1.1 Messung unter Kontrollbedingungen ... - 46 -
3.2.1.2 Messung nach Behandlung mit Okadeinsäure ... - 48 -
3.2.1.3 Messung nach Behandlung mit Staurosporin ... - 50 -
3.2.2 Veränderungen des perinukleären Keratinnetzwerkes ... - 51 -
3.2.3 Längenzunahme von Keratinfilamenten nach Dehnung unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit Okadeinsäure und Staurosporin ... - 53 -
3.2.4 Verhalten der Keratinfilamente nach Relaxierung ... - 56 -
4. Diskussion ... - 62 -
5. Zusammenfassung ... - 68 -
6. Literaturverzeichnis ... - 70 -

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFP	Cyan fluoreszierendes Protein
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GFAP	glial fibrillary acid protein (saures Gliafaserprotein)
h	Stunde
IF	Intermediärfilament
K	Keratin
k	Kilo
k. V.	keine Veränderung im Beobachtungszeitraum eingetreten
KCl	Kaliumchlorid

MgCl	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol/l	Mol pro Liter
n. a.	nicht auswertbar
NaCl	Natriumchlorid
NEB-1-Zellen	immortalisierte humane Keratinozyten
NF-H	Neurofilament heavy (200- 220 kDa)
NF-L	Neurofilament light (68-70 kDa)
NF-M	Neurofilament medium (145- 160 kDa)
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
p	Signifikanzwert
p38-MAPK	p38-mitogen-activated-protein-kinase (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pCO_2	CO_2-Partialdruck
pM	Pikomolar
s	Sekunde
SCC	squamos cell carcinoma (Plattenepithelkarzinom)
Ser-431	Aminosäure Serin an Position 431

Ser-73	Aminosäure Serin an Position 73
std	Standardabweichung
U/min	Umdrehungen pro Minute
YFP	Gelb fluoreszierendes Protein
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Grundlagen zu Intermediärfilamenten

Intermediärfilamente (IF) stellen neben Aktin und Tubulin die dritte Gruppe der Zytoskelettproteine in vielzelligen tierischen Organismen dar. Bei Pflanzen, Pilzen und Insekten wird deren Funktion durch eine äußere Zellhülle übernommen.

Der Name „Intermediärfilamente“ beruht auf ihrem Durchmesser, welcher ca. 10 nm beträgt und im Vergleich zu Aktin mit 7 nm und den Mikrotubuli mit 25 nm somit dazwischen liegt.

Die IF werden durch etwa 70 Gene codiert, wobei sie eine teils sehr unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweisen, aber dennoch eine gemeinsame Grundstruktur besitzen (Szeverenyi et al. 2008). Ferner wird die Anzahl der verschiedenen IF noch durch unterschiedliches Splicen der vorhandenen Gene im Rahmen der Proteinbiosynthese erhöht (Hol et al. 2003). Die IF können anhand ihrer genetischen Struktur und Aminosäuresequenzhomologien in 5 Klassen unterteilt werden: saure und basische Keratine (K) stellen die Klassen 1 und 2 dar und werden durch 54 Gene codiert. Sie sind somit die größte Untergruppe der IF (Herrmann et al. 2009). Desmin, Vimentin und GFAP (glial fibrillary acid protein) umfassen die Klasse 3. Die Klassen 4 und 5 werden durch die Neurofilamente und Lamine gebildet (Chu u. Weiss 2002; Fuchs u. Cleveland 1998; Ku et al. 1999; Omary et al. 2006). Zusätzlich wird noch eine 6. Klasse definiert, welche zwei für die Linse des Auges spezifische IF umfasst, dem beaded filament structural protein 1, auch Filensin bezeichnet, und dem beaded filament structural protein 2 (Phakinin) (Parry et al. 1999).

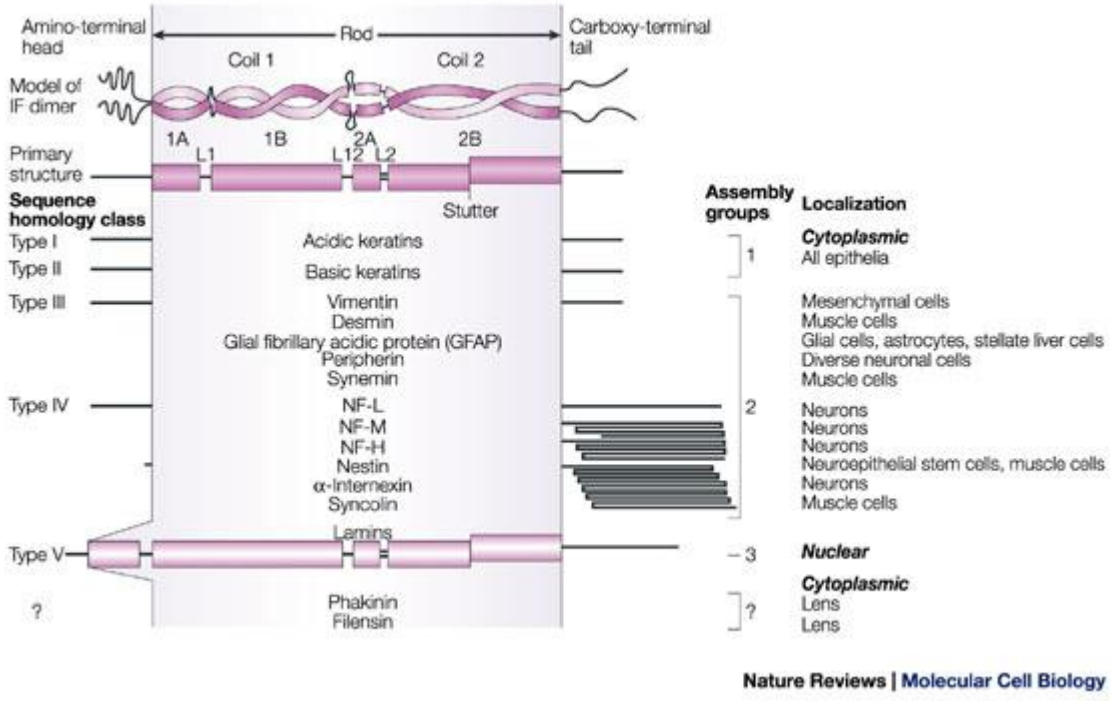

Abbildung 1: Einteilung der Intermediärfilamente in die verschiedenen Klassen mit Nennung typischer Vertreter
GFAP = glial fibrillary acid protein (saures Gliafaserprotein), NF-H = Neurofilament heavy (200- 220 kDa), NF-L = Neurofilament light (68- 70 kDa), NF-M = Neurofilament medium (145- 160 kDa), L1 = Linker-Region 1, L12 = Linker-Region 12, L2 = Linker-Region 2; 1A, 1B, 2A und 2B sind α-helikale Unterdomänen der rod-Domäne.
(Chang u. Goldman 2004)

In der Zelle kommen die IF in zwei unterschiedlichen Bereichen vor: im Zytoplasma und am Rand der inneren Kernmembran (Herrmann u. Aebi 2004), wobei diese beiden Bereiche nicht streng voneinander getrennt sind, denn das zytoplasmatische Netzwerk der IF ist mit dem IF-Netzwerk am Rand der inneren Kernmembran über Proteine wie Plektin, Nesprin 3α und „Sun-Proteine“ verbunden (Ketema et al. 2007).

1.2 Aufgabe und Funktion der Intermediärfilamente

Die Hauptaufgabe der IF besteht darin, den Zellen und dem aus diesen Zellen gebildeten Gewebe Zugfestigkeit und Stabilität zu verleihen. In epithelialen Zellen wird dies z.B. durch K-Filamente - einer Untergruppe der IF – erreicht. Diese K-Filamente bilden eine Art Gerüst, um so den mechanischen Beanspruchungen zu widerstehen und die Zellarchitektur und -integrität aufrechterhalten zu können (Coulombe u. Omary 2002; Gu u. Coulombe 2007). Damit das Zytoskelett sich schnell auf mechanische Veränderungen einstellen kann, weisen die K-Filamente einen schnellen Mechanismus des Auf- und Abbaus auf. Besonders in der

Zellperipherie und dort an den sogenannten focal adhesions befinden sich die K-Grundbausteine, um möglichst schnell neue K-Filamente bilden zu können (Magin et al. 2007). K-Filamente interagieren an der Zellmembran mit Desmosomen und Hemidesmosomen (Maniotis et al. 1997; Coulombe u. Omary 2002) und sind auch mit den Mikrotubuli verbunden. Dies zeigt wiederum die Interaktion der einzelnen Elemente des Zytoskeletts untereinander auf (Kim u. Coulombe 2007; Oriolo et al. 2007).

Knock-out Mäuse, die keine IF (K, Vimentin oder Desmin) exprimieren, sind zwar lebensfähig, jedoch wurde beobachtet, dass bei Abschaltung des Gens für Vimentin die Fibroblasten dieser Mäuse eine deutlich verringerte mechanische Stabilität und Beweglichkeit aufweisen. Ferner ist die Ausbildung von focal adhesions gestört (Eckes et al. 1998).

IF nehmen aber nicht nur mechanische Aufgaben wahr. So scheinen IF vom K-Typ in dermalen Epithelzellen der Säugetiere am Transport von Melanosomen von der Zellperipherie ins Zellzentrum beteiligt zu sein (Planko et al. 2007). Auch in Signalkaskaden sind IF involviert. In Hepatozyten können die K 8 und 18 die Einleitung der Apoptose verhindern, indem sie an spezifische Moleküle der Signalkaskade binden und sie so unterbrechen (Gu u. Coulombe 2007). Das c-terminale Ende des K 18 kann an einen membrangebundenen Rezeptor binden und damit die Aktivierung eines Enzyms, welches in die Signalkaskade der Apoptoseeinleitung eingebunden ist, unterbinden (Inada et al. 2001). Ferner können sowohl K 8 als auch K 18 an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 binden und dadurch eine Veränderung in der Signalkaskade hervorrufen (Paramio u. Jorcano 2002). IF vom K-Typ könnten auch an der Signaltransduktion in Sinneszellen der Haut, wie Merkelzellen, beteiligt sein, indem sie den mechanischen Stimulus, welcher an der apikalen Seite der Zelle auf selbige einwirkt, durch die Zelle hindurch an die basolaterale Seite leiten, wo sich entsprechende Ionenkanäle befinden, die das Signal in einen elektrochemischen Reiz umwandeln (Lumpkin u. Caterina 2007). Ebenso könnten die IF in Stützzellen des Corti-Organs bei der Übertragung der Vibrationen zu den Haarsinneszellen beteiligt sein (Mogensen et al. 1998).

1.3 Spezifische Eigenschaften der Keratine

K stellen wie oben beschrieben die Klassen 1 und 2 der IF dar und werden ausschließlich in Epithelzellen exprimiert. Je nach Art und Aufbau des Epithels werden verschiedene K gebildet.

Zu den basischen K zählen die K 1 - 8, 71 - 80 und 81 - 86 (Coulombe et al. 1989; Coulombe u. Omary 2002; Schweizer et al. 2006). Sie weisen ein Molekulargewicht von 52 bis 67 kDa auf (Fuchs et al. 1981; Moll et al. 1982) und haben einen isoelektrischen Punkt im pH-Bereich von 6,5 - 8,5 (Bowden et al. 1984). Zu den sauren K werden die K 9 - 20 gezählt. Sie weisen einen isoelektrischen Punkt im pH-Bereich von 4,9 - 5,4 auf.

In vorliegender Arbeit untersuchten wir das Verhalten der K 8 und 18. K 8 gehört zu den basischen K und hat ein Molekulargewicht von 52,5 kDa. K 8 bildet mit den sauren K 18 und K 20 Heterodimere (Dale et al. 1985). K 18 hat ein Molekulargewicht von 44 kDa und zählt zu den sauren K (Hutton et al. 1998). K 18 wird in Epithelzellen des Ekto- und Periderms humaner fetaler Haut synthetisiert, ferner in Zellen einfacher Epithelien, sowie in Hepatozyten, Nierentubuluszellen und Epithelien des Verdauungstraktes, der Bronchien und Alveolen (Debus et al. 1982). Sowohl K 8 als auch K 18 werden als frühe K betrachtet, da sie als erste in einfachen Epithelien in Embryonen gebildet werden (Pekny u. Lane 2007).

1.4 Struktur und Aufbau der Keratinfilamente

1.4.1 Aufbau des Keratinmonomers

Wie bei allen IF besteht die kleinste Einheit der K-Filamente aus einem zentralen Anteil von ca. 45 nm Länge, welcher etwa 310 Aminosäuren umfasst und eine α-helikale Struktur aufweist. Dieser Bereich wird als rod-Domäne bezeichnet. Die rod-Domäne endet in ein nicht α-helikales N- bzw. C-terminales Ende, welches als head- bzw. tail-Domäne bezeichnet wird (Hanukoglu u. Fuchs 1982; Steinert et al. 1983). Head- und tail-Domänen sind durch ihre Aminosäuresequenz gekennzeichnet und besitzen bezüglich des Filamentaufbaus und der Verbindung zu anderen Strukturen des Zytoskeletts oder Signalkaskaden verschiedene Aufgaben (Steinert et al. 1984; Hartzfeld u. Burba 1994).

Die head-Domäne der K-Moleküle ist in ihrer Aminosäuresequenz und Anzahl von Aminosäuren überaus variabel. Sie ist im Gesamten positiv geladen (Herrmann u. Aebi 2004). Diese positive Ladung dient zur Interaktion mit anderen Molekülen, wie zum Beispiel den verschiedenen desmosomalen Molekülen (Kazerounian et al. 2002). Verschiedene Serine

können in der head-Domäne durch Phosphorylierung negativ geladen werden, was wiederum zum Zerfall der K-Filamente führt (Herrmann u. Aebi 2004). Die Sekundärstruktur der head-Domäne ist nicht durch α-helikale Elemente gekennzeichnet, sondern durch einen globularen Aufbau mit β-Kehren (Er Rafik et al. 2004; Steinert et al. 1985).

Wie oben bereits erwähnt, besteht die rod-Domäne aus 310 Aminosäuren, welche 4 α-helikale Unterdomänen, als 1A, 1B, 2A und 2B bezeichnet, ausbildet. Diese 4 Unterdomänen werden durch sogenannte „linker"-Regionen, welche keine α-helikale Struktur aufweisen, voneinander getrennt. Die Unterdomänen der K der Klasse 1 sind alle negativ geladen, wohingegen die Unterdomänen der Klasse 2 unterschiedliche Ladungen aufweisen: die Unterdomänen 1B und 2A sind negativ geladen, die Unterdomäne 1A ist positiv geladen und die Unterdomäne 2B ist neutral bezüglich ihrer Ladung (Steinert et al. 1984). Somit ist die rod-Domäne im Gesamten negativ geladen (Herrmann u. Aebi 2004).

Die tail-Domäne kann wie die vorhergehenden Domänen ebenfalls in Unterdomänen unterteilt werden (Steinert et al. 1985).

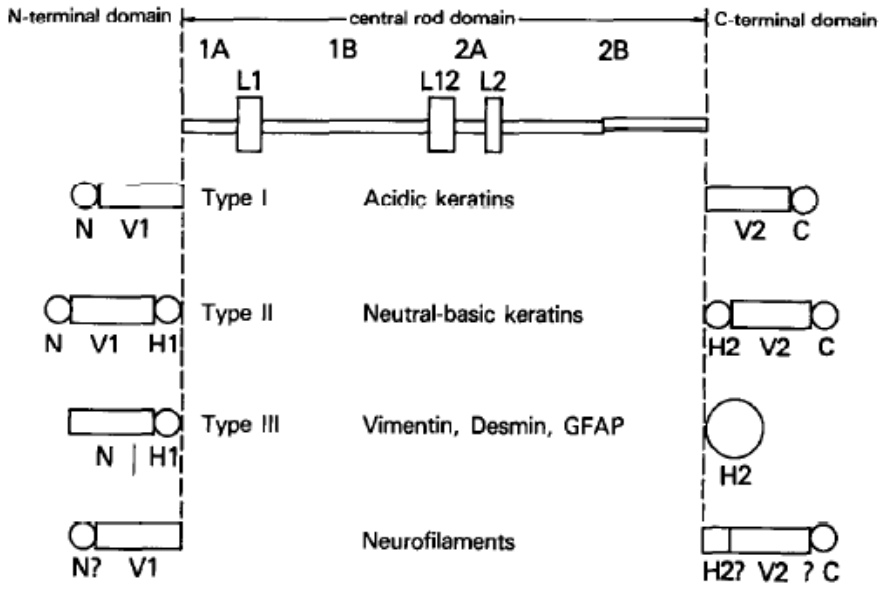

Abbildung 2: Anordnung der verschiedenen Domänen und Unterdomänen der verschiedenen Klassen der Intermediärfilamente
GFAP = glial fibrillary acid protein (saures Gliafserprotein); 1A, 1B, 2A und 2B sind α-helikale Unterdomänen der rod-Domäne; L1 = Linker-Region 1, L12 = Linker-Region 12, L2 = Linker-Region 2; N = N-terminales Ende, dies entspricht der head-Domäne; V1 und H1 sind Untereinheiten der head-Domäne; C = C-terminales Ende, dies entspricht der tail-Domäne; V2 und H2 sind Untereinheiten der tail-Domäne
(Steinert et al. 1985)

Die Sekundärstruktur der K-Filamente, wie α-Helix, β-Faltblatt oder β-Kehren, kann durch den Einfluss mechanischer oder chemischer Kräfte verändert werden (Bragulla u. Homberger 2009). So konnte gezeigt werden, dass die α-helikale Struktur der K-Filamente in Schafshaaren

durch Dehnung in ein β-Faltblatt überführt werden kann (Bendit 1957). Selbiges konnte bei Pferdehaaren gezeigt werden, welche um mehr als 60 % ihrer ursprünglichen Länge gedehnt wurden (Kreplak et al. 2001).

1.4.2 Aufbau und Bildung des Keratinfilaments aus Monomeren

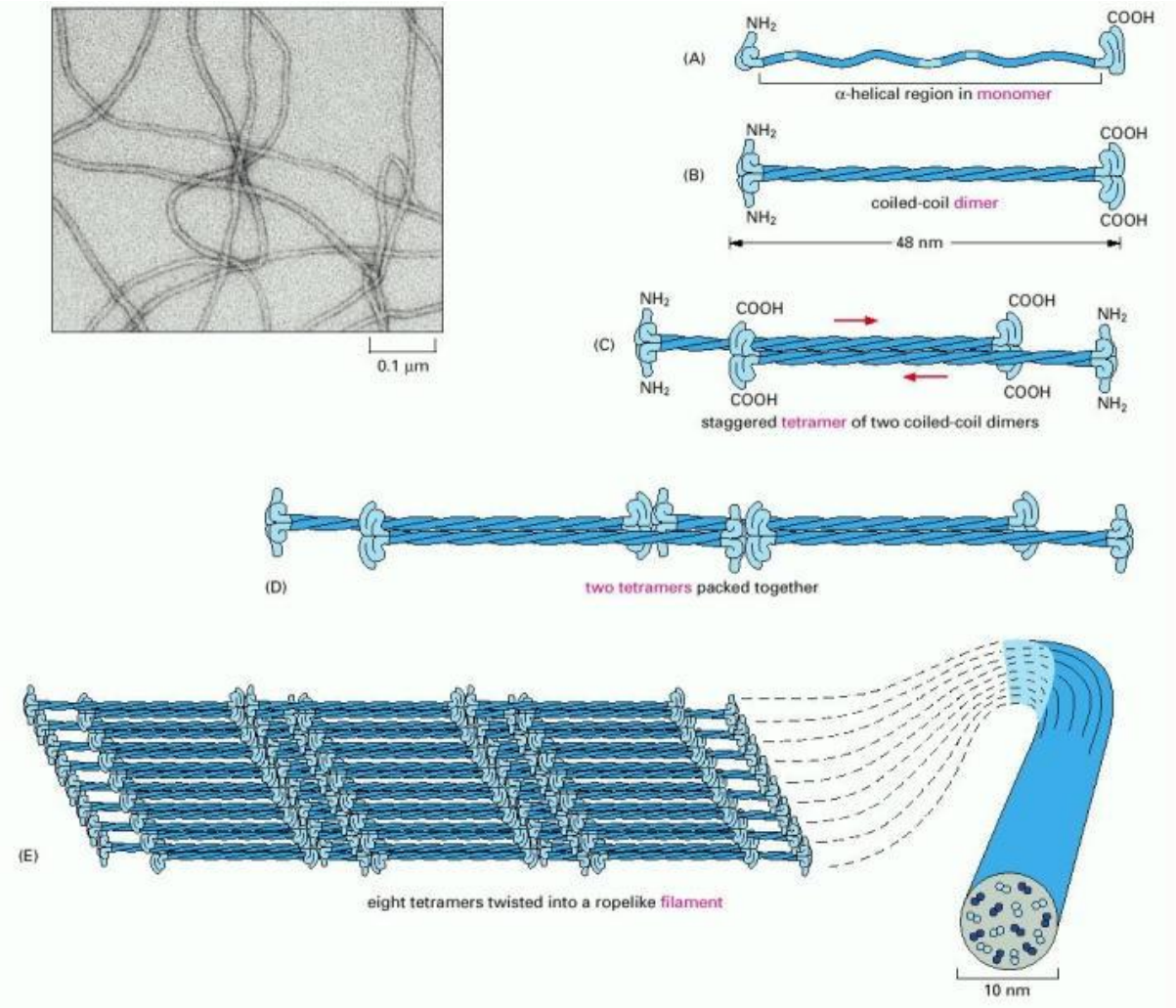

Abbildung 3: Aufbau der Intermediärfilamente
Der Aufbau eines Intermediärfilaments beginnt mit einem Monomer (A). Zwei dieser Monomeren lagern sich zu einem coiled-coil Dimer (B) zusammen. Diese wiederum bilden zu zweit ein Tetramer (C), welches anschließend mit einem weiteren Tetramer ein Protofilament (D) formt. Mehrere Protofilamente lagern sich abschließend zu einem Filament (E) zusammen. µm = Mikrometer, nm = Nanometer, COOH = Carboxylgruppe, NH_2 = Aminogruppe
(Theriot et al. 2007)

Allgemein kann der Aufbau eines K-Filaments wie folgt beschrieben werden: Ein saures und ein basisches K-Monomer winden sich in paralleler Anordnung umeinander und bilden ein „coiled-coil“ (Abb. 3 (B)). Dies scheint die kleinste lösliche Einheit der IF zu sein und wird durch Van-der-Waals-Kräfte verschiedener Seitenketten der Aminosäuren stabilisiert (Coulombe u.

Fuchs 1990; Meng et al. 1998). Anschließend lagern sich zwei coiled-coil-Dimere zu einem Tetramer zusammen, indem sich stets die head-Domäne eines coiled-coil an die tail-Domäne des anderen coiled-coil anlagert (Abb. 3 (C)) (Herrmann et al. 2002). Stabilisiert werden die Tetramere durch elektrostatische Kräfte, welche von den geladenen Seitenketten der Aminosäuren ausgehen (Meng et al. 1998). Diese Tetramere stellen die Speicherform der Filamente in der Zelle dar und können je nach Bedarf zum Auf- und Ausbau des Filamentnetzwerkes in der Zelle rekrutiert werden (Coulombe et al. 1998). Fehlt jedoch an diesen Molekülen die head-Domäne, so bricht hier die Filamentbildung ab und es können keine Filamente gebildet werden (Herrmann u. Aebi 2004). Zwei Tetramere lagern sich in antiparalleler Richtung und um die halbe Länge eines coiled-coil versetzt zusammen. Die entstehende Einheit wird als Protofilament (Abb. 3 (D)) bezeichnet. Das Protofilament weist somit keine polaren Enden auf, wie sie für Aktinfilamente oder Mikrotubuli typisch sind (Aebi et al. 1983). Lagern sich zwei Protofilamente zusammen, bilden sie ein Protofibrill. 3 bis 4 Protofibrillen formen das Filament, welches einen Durchmesser von ca. 10 nm aufweist.

Bei der Bildung der IF kann man 3 Gruppen unterscheiden:

Die 1. Gruppe wird von den K gebildet (siehe Abb. 4 C). Wie oben erwähnt, bilden sie zuerst Heterodimere aus je einem Monomer eines sauren und eines basischen K. Zwei solcher Heterodimere bilden anschließend ein Tetramer. Diese Tetramere formen die Fibrille, indem sie sich gleichzeitig sowohl seitlich als auch längs einer Achse zusammenlagern (Herrmann et al. 2002; Herrmann u. Aebi 1998). Somit bestehen die K-Filamente aus äquimolaren Mengen an K der Klassen 1 und 2 (Moll et al. 1982; Hatzfeld u. Franke 1985). Darum ist eine genaue Kontrolle der Syntheserate von K der Klasse 1 und 2 in den Zellen wichtig, um eine Herstellung in äquimolaren Mengen sicherstellen zu können (Navarro et al. 1995).
Die 2. Gruppe umfasst Vimentin und Desmin, deren Filamentaufbau in 3 Stufen abläuft. (Herrmann et al. 1996). Lamine bilden die 3. Gruppe (Aebi et al. 1986).

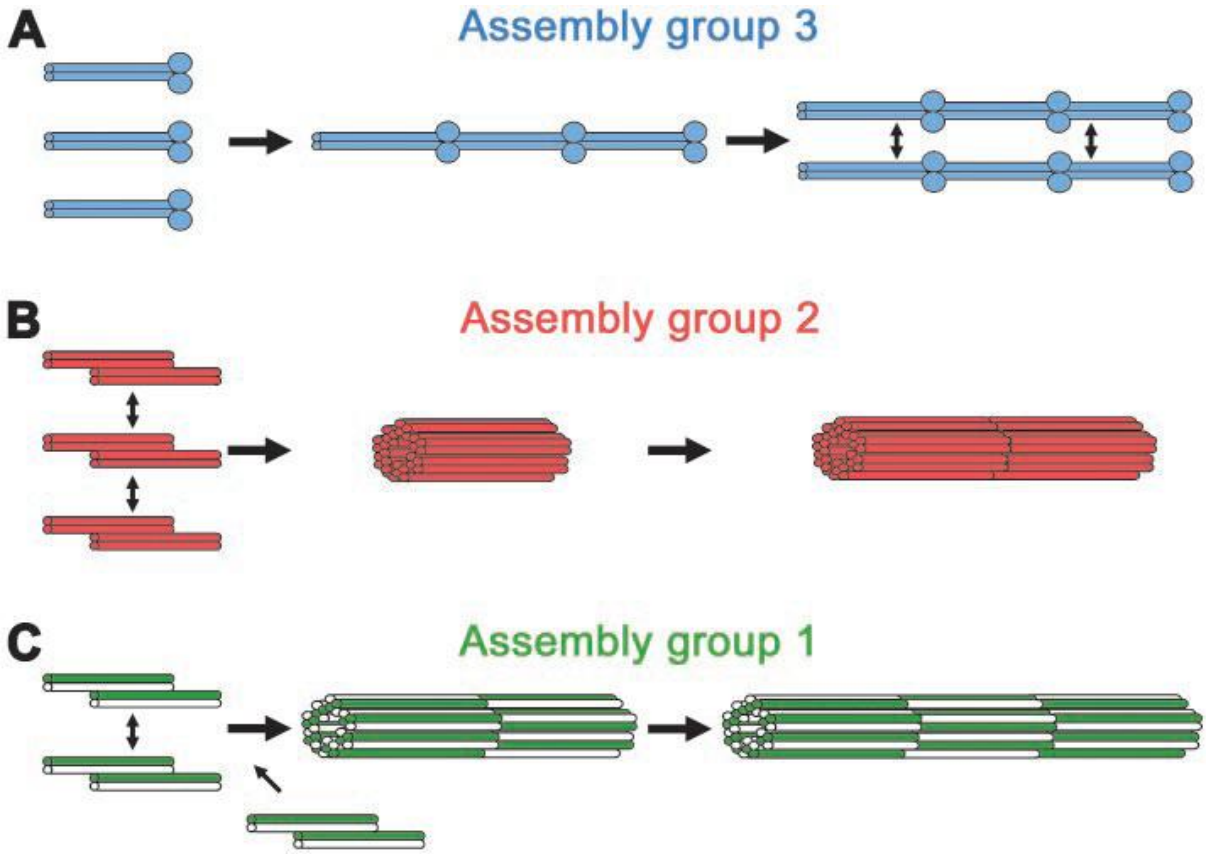

Abbildung 4: Bildung der verschiedenen Klassen der Intermediärfilamente
Lamin-Dimere (A) bilden zuerst head-to-tail Filamente aus, bevor es zur weiteren Zusammenlagerung kommt. Bei Vimentin oder Desmin (B) kommt es zuerst zur Zusammenlagerung von Tetrameren. Die Bildung der Keratine (C) erfolgt durch gleichzeitige longitudinale und seitliche Anlagerung von Tetrameren.
(Herrmann u. Aebi 2004)

Ist das K-Filament gebildet, so weist es eine große Stabilität gegenüber hohen Salz- oder auch Detergenzienkonzentrationen auf. Dies zeigt, dass die einzelnen Untereinheiten der K-Filamente über starke Verbindungen untereinander verfügen, die sowohl von Van-der-Waals-Kräften als auch von Ionenbindungen gebildet werden (Steinert et al. 1988; Starger et al. 1978; Houseweart u. Cleveland 1998).

1.5 Posttranslationale Modifizierung der Keratinfilamente

Posttranslationale Veränderungen der K wirken sich auf deren physikochemische Eigenschaften und damit auf deren Zusammenlagerung zu größeren Filamenten aus (Yamada et al. 2002). Hierbei sind besonders die Phosphorylierung, Transglutaminierung, Ausbildung von Disulfidbrücken, Glykosylierung, und Citrullination zu nennen, welche im Folgenden genauer erläutert werden.

1.5.1 Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von K-Filamenten scheint der wichtigste posttranskriptionale Regulationsmechanismus zu sein. So entscheidet der Grad der Filamentphosphorylierung über die Interaktion zwischen K-Filamenten und anderen Molekülen im Zytoplasma (Kirfel et al. 2003). Ferner ändert es die Löslichkeit der K-Filamente und deren Organisation (Liao et al. 1995; Strnad et al. 2002). Durch die Phosphorylierung der K-Moleküle ändert sich deren Konformation, was wiederum als Voraussetzung für eine Veränderung der K-Filamente angesehen werden kann (Owens u. Lane 2003; Pekny u. Lane 2007). Besonders die Phosphorylierung in der head-Domäne scheint hierbei wichtig zu sein (Wöll et al. 2007). Bei K 8 sind in der head-Domäne 3 Phosphorylierungsstellen beschrieben: Ser-23, Ser-431 und Ser-73. Es konnte gezeigt werden, dass es unter Stressbedingungen (z. B. Hitze) zu einer Phosphorylierung von Ser-73 des K 8 kommt; wohingegen unter Normalbedingungen an dieser Stelle keine Phosphorylierung nachgewiesen werden kann. Während der Mitose scheint es zu einer Zunahme der Phosphorylierung von Ser-431 bei K 8 zu kommen (Ku u. Omary 1997). Eine Hyperphosphorylierung von Ser-73 des K 8 führt zur Apoptose (He et al. 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass das Enzym p38-mitogen-activated-protein-kinase für die Phosphorylierung von Serinseitenketten in der head-Domäne von K 8 verantwortlich ist (Wöll et al. 2007). Auch die Proteinkinase C scheint an der Phosphorylierung von K beteiligt zu sein (Ku et al. 1996). Mechanische Einflüsse wie Dehnung oder Scherkräfte aktivieren die Proteinkinase C (Liu et al. 1999; Cheng et al. 2001). An Alveolarepithelzellen konnte gezeigt werden, dass die Einwirkung von Scherkräften durch Aktivierung der Proteinkinase C δ zu einer Phosphorylierung von K 8 an Ser-73 führt. Dies wiederum bedingt eine Auflösung der K-Filamente in den Zellen (Ridge et al. 2005). Eine Dehnung von lebenden Alveolarepithelzellen Typ II um 20 % führte zu einer Zunahme der Phosphorylierung von K 8 an Ser-431 (Felder et al. 2008). Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass die Zunahme der Phosphorylierung zu einer Abschwächung der dehnungsbedingten Filamentanspannung führt und somit einen Schutzmechanismus der Zelle gegenüber einwirkenden mechanischen Kräften darstellt.

Phosphorylierung kann die Degradation von K 8 und K 18 verhindern, indem es die Bindung von Ubiquitin an das K-Filament verhindert (Ku u. Omary 2000).

1.5.2 Transglutaminierung

Durch eine Transglutaminierung werden K-Filamente innerhalb einer Kette mit sich selbst oder auch mit verschiedenen K-Filamenten quervernetzt. Dies geschieht, indem eine γ-Glutamylseitenkette einer Aminosäure mit einem ε-Lysin durch eine Transglutaminierung vermittelt, verbunden wird (Kubilus u. Baden 1983; Buxman u. Wuepper 1975; Baden et al. 1976; Ahvazi et al. 2003). K können so auch mit anderen Zellbestandteilen wie dem „stratum corneum basic protein“ oder Involucrin quervernetzt werden (Kubilus u. Baden 1983).

1.5.3 Ausbildung von Disulfidbrücken

Disulfidbrücken werden bei K-Filamenten der K 4 und 13 sowohl innerhalb eines K-Filaments als auch zwischen zwei verschiedenen K-Filamenten durch das Enzym Sulfhydryloxidase durch Konjugation zweier Cysteinseitenketten ausgebildet (Hashimoto et al. 2000; Pang et al. 1993). Bei den K 8 und 18 kann es aufgrund des Fehlens von Cystein nicht zur Ausbildung von Disulfidbrücken kommen.

1.5.4 Glykosylierung

Im Rahmen der Glykosylierung wird eine funktionelle Gruppe wie z.B. ein N-Acetylglucosamin an eine Serin- oder Threoninseitenkette gebunden. Dies konnte in Hepatozyten bei den K 8 und 18 gezeigt werden (King u. Hounsell 1989; Chou et al. 1992). Diese Serin- und Threoninseitenketten stehen für eine mögliche Phosphorylierung nicht mehr zur Verfügung.

1.5.5 Citrullination

Während der Citrullination wird durch das Enzym Peptidylarginindeiminase die positiv geladene Aminosäure Arginin in die neutrale Aminosäure Citrullin umgewandelt. Durch den Verlust der positiven Ladung kann es zu Veränderungen in der Konformation der K-Filamente kommen (Senshu et al. 1996).

1.6 Mechanische Eigenschaften der Keratinfilamente

Die mechanischen Eigenschaften der K-Filamente sind praktisch ausschließlich an isolierten K-Fasern bzw. an K-Fasern außerhalb von Zellen (z. B. K aus Wolle) durchgeführt worden. Einzelne IF sind dehnbar und tolerieren Dehnamplituden von bis zu 250 % (Verlängerung um das 3,5-fache) bevor es zum Zerreißen der IF kommt (Fudge et al. 2003; Kreplak et al. 2005; Kreplak u. Fudge 2007). Bei K-Filamenten bestehend aus K 5 und 14 wurde gezeigt, dass diese durchschnittlich um das 2,8-fache gedehnt werden können, ohne zu zerreißen (Kreplak et al. 2005). Nach Beendigung der Dehnung verblieben die K-Filamente über Stunden in gestrecktem Zustand ohne ihre ursprüngliche Länge wieder einzunehmen, weshalb man von einer irreversiblen Dehnung bei so großen Dehnamplituden ausgehen kann.

Weiterhin fiel bei Dehnung eine deutliche Abnahme des Durchmessers der K-Filamente auf (Kreplak et al. 2005). In Dehnexperimenten mit Wolle, welche hauptsächlich aus K aufgebaut ist, konnte mittels Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden, dass die Dehnung der Filamente zu einer Umwandlung der α-helikalen Struktur in eine β-Faltblattstruktur führt (Bendit 1960). In vitro konnte an IF gezeigt werden, dass es ab Dehnamplituden von 30 bis 40 % ebenfalls zu einer irreversiblen α-β-Umwandlung kommt. Dies entspricht somit einer plastischen Umwandlung, wobei bei niedereren Dehnamplituden ein elastisches Verhalten der IF nachgewiesen wurde (Fudge et al. 2003). Für das elastische Verhalten wurde bisher ein Gleiten von Untereinheiten der IF verantwortlich gemacht, da vermutet wurde, dass die IF aus starren Untereinheiten bestünden (Hohenadl et al. 1999). Fudge et al. gehen nicht von so einem Gleitmechanismus aus, sondern von einem elastischen Verhalten der head- und tail-Domänen der IF, wobei die coiled-coil-Domänen als nahezu starr angesehen werden (Fudge et al. 2003). Das plastische Verhalten der IF wird in diesem Modell durch die coiled-coil-Domänen bestimmt, welche eine α-helikale Struktur aufweisen, die durch Dehnung irreversibel in ein β-Faltblatt überführt wird (Fudge et al. 2003).

1.7 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit versucht das Verhalten von K-Filamenten in der Epithelzelllinie SCC-25 bei mechanisch induzierter Beanspruchung unter Beobachtung möglichst vieler objektiver Parameter zu beschreiben. Die Entwicklung dieser Parameter ist Teil der Arbeit. Darüberhinaus sollen Unterschiede bei verändertem Phosphorylierungszustand der K-Filamente festgestellt werden. Zur Veränderung des Phosphorylierungszustandes der K-Filamente wurden die Substanzen Okadeinsäure und Staurosporin eingesetzt. Diese Beschreibung des Verhaltens von K-Filamenten bei Dehnung in lebenden Zellen gehört zu den ersten ihrer Art.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Die Zelllinie SCC-25

Für die Experimente wurde die Zelllinie SCC-25 (SCC = squamos cell carcinoma) verwendet. Diese Zelllinie wurde aus einem Plattenepithelkarzinom der Zunge eines 70 Jahre alten Mannes isoliert (Rheinwald u. Beckett 1981).

2.1.2 Kultivierungsbedingungen und Zellkulturmedium

Alle Zellkulturarbeiten wurden in einer sterilen Werkbank (Laminar flow, NUNC safeflow 1.2) durchgeführt. Die Zellen wurden in handelsüblichen Zellkulturflaschen (Greiner Bio One CELLSTAR 50 ml, 25 cm^2, Polysterol, steril) in einem Inkubator (Hera Cell 150 Heraeus) kultiviert. Die Kultivierungsbedingungen betrugen 5 % CO_2, 100 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C.

Zur Kultivierung wurde ein Zellkulturmedium bestehend aus einer 1:1 Mischung von Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, PAA) und Ham's F-12 Medium (Ham's F-12, PAA), 10 % fetales Kälberserum (HyClone Fetal Bovine, Thermo Scientific), 2 mM L-Glutamin (L-Glutamine solution 200 mM, Sigma-Aldrich), 1 mM Natriumpyruvat (Sodium pyruvate solution 100 mM, Sigma-Aldrich) und 1 % Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml) (Pen/Strep, Gibco) verwendet.

2.1.3 Passagieren von Zellen und Aussaat auf Silikonmembranen

Zuerst wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen (Zellen zu 70 - 80 % konfluent) abgesaugt und 5 ml Trypsin/EDTA (0.25 % Trypsin-EDTA (1X), Phenol Red, Gibco) zugegeben. Danach wurden die Zellkulturflaschen für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde bei 700 U/min für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 8 ml Zellkulturmedium resuspendiert. In jede neu angelegte Zellkulturflasche wurde 1 ml dieser Zellsuspension gegeben und mit 10 ml Medium aufgefüllt.

Wurden die Zellen für die Dehnexperimente auf Silikonmembranen (siehe Abb. 7A) kultiviert, so mussten die Silikonmembranen zuvor mit Fibronektin (Fibronectin from bovine plasma, steril, Sigma-Aldrich) beschichtet werden, um eine Anhaftung der Zellen zu gewährleisten. Dies wurde wie folgt durchgeführt: Jede Membran wurde mit 1 ml Fibronektinlösung (7,5 µg/ml) befüllt. Diese Lösung wurde für 24 Stunden auf der Membran belassen und vor dem Beimpfen mit den Zellen wieder abgesaugt. Dann wurde die Membran mit PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen und 1000 µl Nährmedium auf die Membran gegeben. Anschließend wurde in die Mitte der Silikonmembran ein Aluminiumring (Durchmesser: 6 mm) gelegt. In diesen Ring wurden 100 µl der oben beschriebenen Zellsuspension pipettiert und die Silikonmembranen anschließend für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit adhärierten die Zellen, sodass der Aluminiumring wieder entfernt werden konnte. Die Zellen wuchsen nun ausschließlich im Zentrum der Membran, was sich als Vorteil für die spätere Immunofärbung erwies. Aufgrund der geringeren Menge an Antigen (nur Teile der Membran waren bewachsen) war eine geringere Antikörperkonzentration ausreichend.

2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zellen, die zu 70 – 80 % konfluent waren, wurden, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, trypsiniert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Zellkulturmedium und 10 % Dimethylsulfoxid resuspendiert. Davon wurde je 1 ml in ein Kryotube pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei -80 °C eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Beim Auftauen wurden eingefrorene Zellen in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und bei 700 U/min für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Das hierbei gewonnene Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes nochmals in 4 ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf 2 Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Zellkultuflaschen wurden dann mit 10 ml Zellkulturmedium aufgefüllt.

2.2 Induktion von Phosphorylierung und Dephosphorylierung

2.2.1 Okadeinsäure

Okadeinsäure ist ein Polyetherderivat einer C-38 Monocarbonsäure und wurde erstmals aus dem Schwamm Halichondria okadai isoliert (Kazuo et al. 1981).

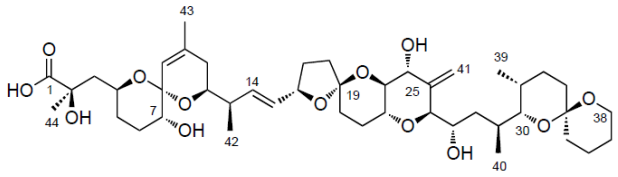

Abbildung 5: Strukturformel von Okadeinsäure
O = Sauerstoff; H = Wasserstoff
(modifiziert nach Cruz et al. 2013)

Das Molekulargewicht beträgt 804,9 und die Summenformel lautet: $C_{44}H_{68}O_{13}$.

Okadeinsäure ist ein Inhibitor der Proteinphosphatase 1 (PP1), Proteinphosphatase 2A (PP2A) und zweier Serin/Threonin-Proteinphosphatasen im Zytosol tierischer Zellen (Cohen et al. 1990; Yanagi et al. 1989; MacKintosh u. Cohen 1989). In einem Konzentrationsbereich von 1- 2 nM wird spezifisch die Proteinphosphatase 2A inhibiert, wohingegen zur Inhibition der Proteinphosphatase 1 deutlich höhere Konzentrationen nötig sind (Bialojan et al. 1988). Okadeinsäure kann die Zellmembran lebender Zellen durchdringen und führt zu einem 2,5- 3-fachen Anstieg der Proteinphosphorylierung einiger Proteine. Dies wurde besonders für Proteine des Lipid- und Kohlehydratstoffwechsels gezeigt (Cohen et al. 1990; Cohen et al. 1989). Ferner wurde gezeigt, dass es durch eine Zunahme der Phosphorylierung von K zum Abbau des K-Netzwerkes in Zellen kommt (Strnad et al. 2001).

2.2.2 Staurosporin

Staurosporin ist ein Alkaloid-Antibiotikum mit einem Molekulargewicht von 466,5 und der Summenformel $C_{28}H_{26}N_4O_3$.

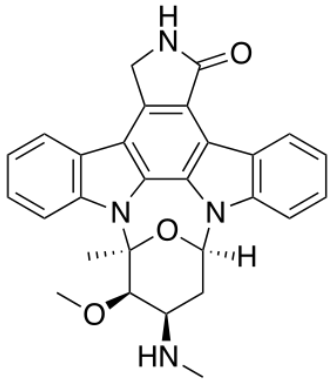

Abbildung 6: Strukturformel von Staurosporin
O = Sauerstoff, H = Wasserstoff, N = Stickstoff
(modifiziert nach Funato et al. 1994)

Staurosporin ist ein Inhibitor der Phospholipid/Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase C (Tamaoki et al. 1986). Es inhibiert auch die cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen und die Protein-Tyrosin-Kinasen (Nakano et al. 1987). Staurosporin hemmt die Bindung von ATP an die Kinasen, indem es eine deutlich stärkere Affinität zur ATP-Bindungsstelle besitzt als ATP selbst (Karaman et al. 2008). Die halbmaximale Hemmung der Proteinkinase C wird mit einer Staurosporinkonzentration von 10^{-8} mol/l angegeben. Eine komplette Blockade der Proteinkinase C in vitro wird mit einer Konzentration von 10^{-7} mol/l erreicht. Staurosporin wurde in den Experimenten eingesetzt, um die Phosphorylierung der K-Filamente zu verringern, indem die Proteinkinase C gehemmt wird. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass die Proteinkinase C δ für die Phosphorylierung von K 8 bei Einwirkung von Scherkräften verantwortlich ist (Ridge et al. 2005).

2.3 Transfektion der Zellen mit Keratinvektoren

2.3.1 Plasmide

Um die K-Filamente in lebenden Zellen betrachten zu können, wurden die Zellen mit den Plasmiden pK8-eCFP und pK18-eYFP transfiziert. CFP (cyan fluorescence protein) ist ein Fluoreszenzprotein, das bei einer Wellenlänge von 452 nm angeregt wird und bei 505 nm emittiert, während YFP (yellow fluorescence protein) bei einer Wellenlänge von 514 nm angeregt wird und bei 527 nm emittiert.

In Tabelle 1 sind die Plasmide pK8-eCFP und pK18-eYFP beschrieben, mit welchen die Zellen bei Lebendzellexperimenten transfiziert wurden.

Tabelle 1: Verwendete Plasmide
Bp = Basenpaare, Kanamycin = Aminoglykosidantibiotikum, Neomycin = Aminoglykosidantibiotikum

Rekombinantes Plasmid	Größe (Bp)	Resistenz	beschrieben in
pK8-eCFP	6.216	Kanamycin/Neomycin	Busch et al. 2012
pK18-eYFP	6.064	Kanamycin/Neomycin	Busch et al. 2012

2.3.2 Transfektionsprotokoll

Zur Transfektion wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, trypsiniert und in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde auf die mit Fibronektin beschichteten Membranen gegeben. Danach ließ man den Zellen ca. 7 Stunden Zeit um zu adhärieren. Anschließend wurde das Zellkulturmedium durch das Transfektionsmedium (1:1 Mischung von Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) und Ham's F-12 Medium (Ham's F-12, PAA), 2 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat ersetzt.

Das Transfektionsgemisch wurde folgendermaßen hergestellt: Das Transfektionsmedium wurde auf 37 °C erwärmt und in einem Eppendorfröhrchen wurden zu 97 µl Transfektionsmedium 3 µl Fugene 6 Transfection Reagenz (Roche) zugegeben. Diese Mischung wurde mittels des Vortexgerätes (Vortex Genie 1, Roth) gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Danach wurde pro Eppendorfröhrchen 1 µg des Plasmides pK8-eCFP und 1 µg des Plasmides pK18-eYFP hinzugefügt, durchmischt und anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 100 µl dieses Transfektionsgemisches wurden pro Membran zugegeben. Es folgte eine Inkubation der Membranen über Nacht im Brutschrank. Am darauffolgenden Tag wurde das Transfektionsmedium samt dem Transfektionsgemisch von den Membranen abgesaugt und durch das Zellkulturmedium ersetzt. Abschließend wurden die Zellen weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, bevor sie für die Experimente verwendet wurden.

2.4 Immunofärbung der Keratinfilamente

2.4.1 Antikörper

Tabelle 2 beschreibt die verwendeten Antikörper.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper unterteilt in primäre und sekundäre Antikörper

Spezies	Spezifität	Firma
Primärer Antikörper		
Maus (monoklonal)	Pan-Zytokeratin	Abcam
Sekundärer Antikörper		
Alexa Fluor 568	Maus	Invitrogen

2.4.2 Immunofärbungsprotokoll

Nach Durchführung des Dehnexperiments am computergesteuerten Zelldehnungsapparat (Kapitel 2.5.2) wurde die Badlösung (Kapitel 2.6.1) abgesaugt und die Zellen mit 4 % Formaldehyd in PBS für 5 Minuten fixiert. Nach Entfernen der Membran aus dem Dehnapparat (aktuelle Länge wurde beibehalten) erfolgten 3 Waschschritte mit PBS. Beim ersten Waschschritt betrug die Inkubationszeit des PBS 1 Minute, bei den nachfolgenden zwei Waschschritten je 10 Minuten. Nach diesen Waschschritten wurde für 20 Minuten mit 0,1 % Triton X in PBS die Zellmembran permeabilisiert. Nach drei Waschschritten wurde für 2 Stunden mit 10 % Ziegenserum in PBS geblockt. Nun folgte die Inkubation mit dem Pan-K-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:50 in PBS und 2 % Ziegenserum über Nacht. Nach Inkubation des primären Antikörpers erfolgten nochmals 3 Waschschritte, bevor die Inkubation des sekundären Antikörpers (Alexa Fluor 568 bei einer Verdünnung von 1:500 in PBS und 2 % Ziegenserum) für 1 Stunde erfolgte. Abschließend wurden nochmals 3 Waschschritte durchgeführt.

2.5 Technische Beschreibung des Zelldehnungsapparates

2.5.1 Membranhalter

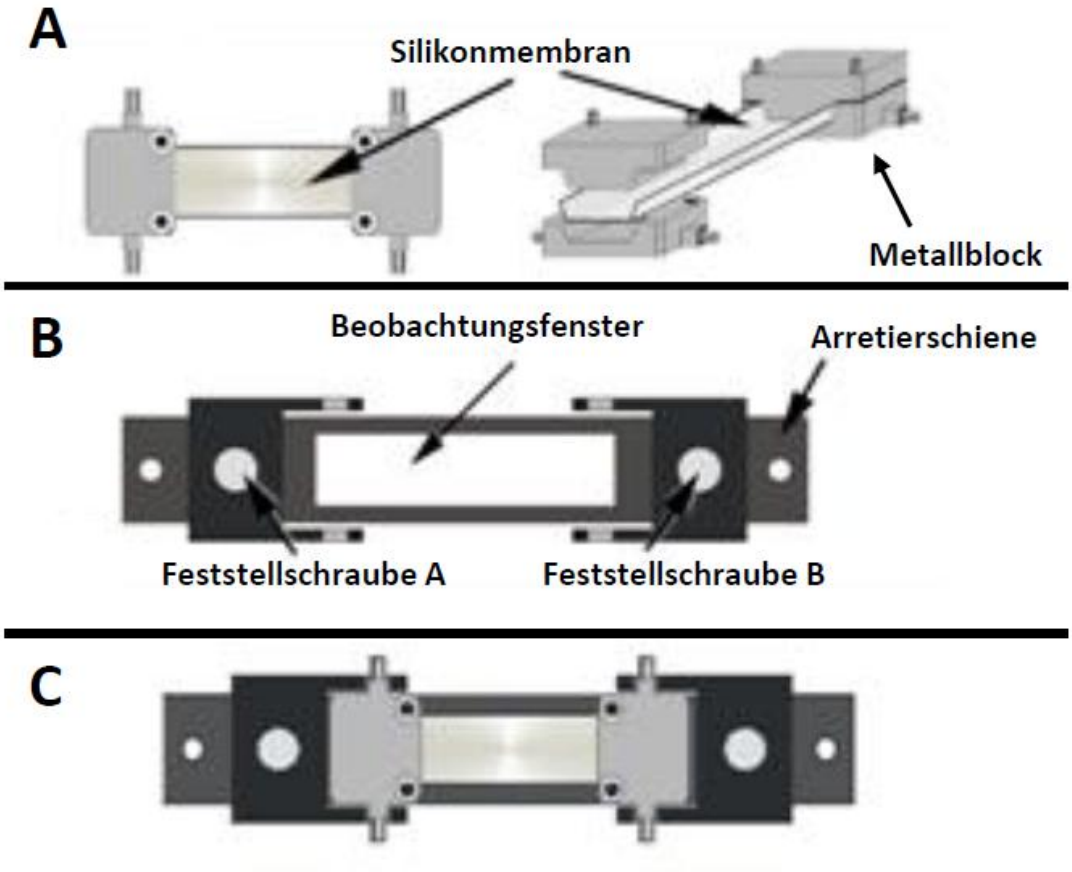

Abbildung 7: Aufbau des Membranhalters mit Silikonmembran
Die Silikonmembran wird zwischen zwei Metallblöcken eingespannt und bildet so eine Wanne aus (A). Der Membranhalter (B) besteht aus einer Arretierschiene und zwei mobilen Reitern, die jeweils mittels einer Feststellschraube fixiert werden können. (C) zeigt den Membranhalter mit eingesetzter Silikonmembran.
(modifiziert nach Gerstmair et al. 2009)

Die Zellen wurden auf einer Silikonmembran (Dicke: 127 µm, Speciality Manufacturing, Saginaw, MI) kultiviert (Abbildung 7A). Diese Silikonmembran wurde an beiden Enden, wie in Abbildung 7A zu sehen ist, zwischen zwei Metallblöcken eingespannt. Die beiden Metallblöcke bestehen aus je zwei Untereinheiten, zwischen welche die Silikonmembran eingeklemmt wurde. Diese zwei Untereinheiten wurden anschließend durch zwei Schrauben miteinander zusammengepresst. Um die so entstandene Kammer abzudichten, wurde an der Unterkante der oberen Untereinheit eine Schicht Silikonkleber (Sista Silikon, Henkel) aufgebracht, welche für 24 Stunden aushärten musste. Nach 24 Stunden wurden die Kammern in den Membranhalter (siehe Abbildung 7B) mit geringer Vordehnung eingelegt, indem der Abstand

zwischen den beiden Metallblöcken von 20 mm auf 24 mm vergrößert wurde. Dieser Abstand wurde durch die beiden Feststellschrauben A und B fixiert. Diese Vordehnung diente zum Geradeziehen der Membranen. Abschließend wurden die Membranen zweimal mit Isopropanol 70%ig und zweimal mit destilliertem Wasser gespült, bevor sie - eingewickelt in Aluminiumfolie - autoklaviert wurden. Anschließend erfolgten das Beschichten mit Fibronektin und die Aussaat der Zellen wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben.

2.5.2 Dehnungsapparat

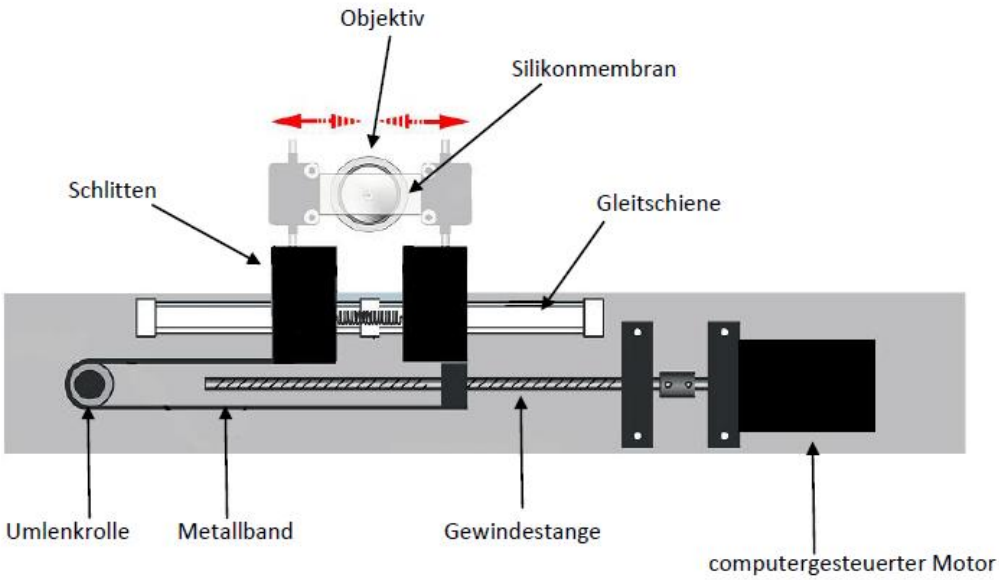

Abbildung 8: Aufbau des computergesteuerten Zelldehnungsapparates
Der Zelldehnungsapparat besteht aus zwei Schlitten, in welche die Silikonmembran während des Experiments eingespannt wird. Diese zwei Schlitten können computergesteuert entlang einer Gleitschiene in ihrem Abstand zueinander verändert werden, um so eine Dehnung oder Stauchung der Membran zu erzielen.
(modifiziert nach Gerstmair et al. 2009)

Wie in Abbildung 8 dargestellt, besteht der Zelldehnungsapparat aus zwei Schlitten, in die die Silikonmembranen mit den Zellen vor dem Experiment eingespannt werden. Der Abstand dieser beiden Schlitten kann computergesteuert während des Experiments entlang einer Gleitschiene zueinander verändert werden, so dass dadurch die dazwischen eingespannte Membran entweder auf einen bestimmten Wert gedehnt oder auch gestaucht werden kann. Einer der beiden Schlitten wird direkt über eine Gewindestange in seiner Position durch den computergesteuerten Motor verschoben. Der andere Schlitten wird durch ein Metallband, welches über eine Umlenkrolle geführt wird und am anderen Schlitten befestigt ist, in die entgegengesetzte Richtung gezogen.

Zur Durchführung der Lebendzellbeobachtungen wurde der Zelldehnungsapparat auf den Objekttisch eines Inversmikroskopes (Zeiss Cell-Observer Z1) montiert. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, wurde der Zelldehnungsapparat so angebracht, dass die Silikonmembran direkt über dem Objektiv positioniert war.

2.6 Durchführung der Dehnungen

2.6.1 Badlösung

Da alle Dehnexperimente bei Raumtemperatur und normalem atmosphärischen $pC0_2$ (CO_2-Partialdruck) durchgeführt wurden, wurde das Zellkulturmedium, welches für eine CO_2-Konzentration von 5 % ausgelegt war, durch eine Badlösung ausgetauscht. Zur Herstellung dieser Badlösung wurden 400 ml destilliertes Wasser in ein Becherglas gegeben und unter ständigem Rühren mit Hilfe eines Magnetrührers (Rotilabo-Mini-Magnetrührer R 1000) 4,091 g Natriumchlorid, 0,187 g Kaliumchlorid, 0,5 ml einer 1 M Magnesiumchloridlösung, 1 ml einer 1 M Calciumchloridlösung, 0,451 g Glucose und abschließend 1,192 g Hepes hinzugefügt. Nach Durchmischung wurde das Volumen mit destilliertem Wasser auf 500 ml gebracht. Anschließend wurde mit einem ph-Meter (S220 SevenCompact™ pH/Ionen-Messgerät, Mettler Toledo) die Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Zum Schluss wurde diese Lösung sterilfiltriert. Die molare Zusammensetzung der Badlösung ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Molare Zusammensetzung der Badlösung
mM = millimolar

Substanz	Konzentration in mM
Natriumchlorid (NaCl)	140
Kaliumchlorid (KCl)	5
Magnesiumchlorid (MgCl)	1
Calciumchlorid (CaCl)	2
Glucose	5
Hepes	10

2.6.2 Dehnprotokolle

Die Membranen mit den Zellen wurden innerhalb von 5 und 180 Sekunden um 10 %, 20 %, 40 %, 60 % und 80 % ihrer Ausgangslänge gedehnt. Abbildung 9 veranschaulicht diese Dehnprotokolle.

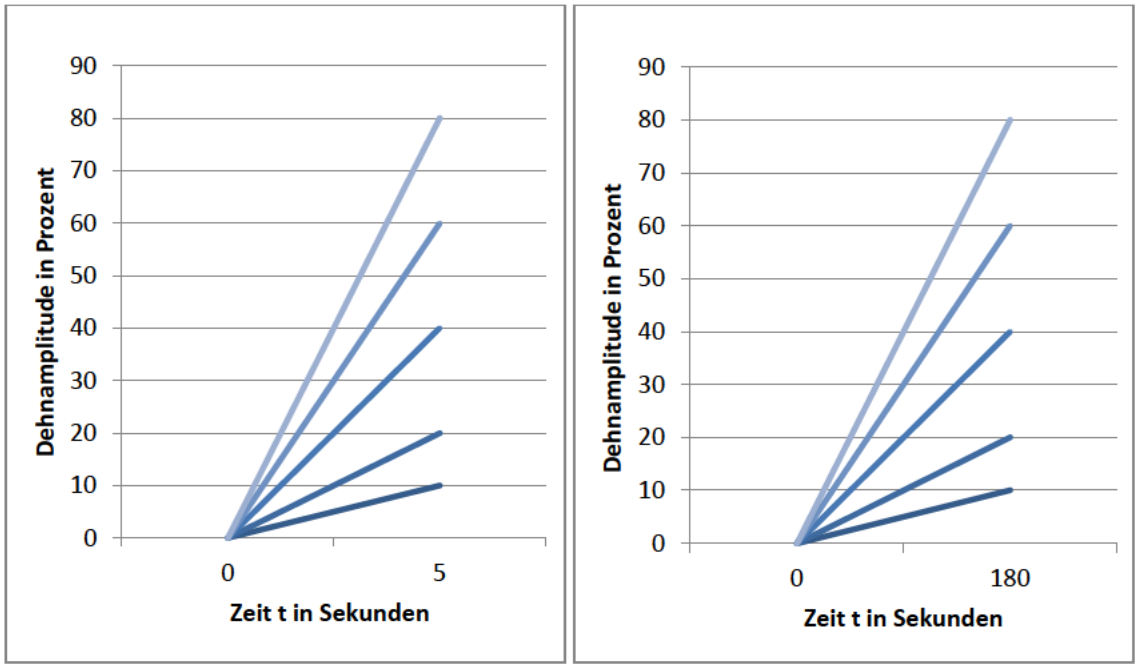

Abbildung 9: Dehnprotokoll ohne Relaxation
Die Zellen wurden mit Dehnamplituden von 10 %, 20 %, 40 %, 60 % und 80 % und einer Dehndauer von 5 bzw. 180 Sekunden gedehnt.

Um die K-Filamente nach Dehnung und Relaxation zu untersuchen, wurden Membranen, wie in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt, gedehnt. Nach der Dehnung wurden die Membranen im gedehnten Zustand für 60 Sekunden belassen und anschließend innerhalb von 5 Sekunden wieder auf ihre Ausgangslänge zurückgefahren.

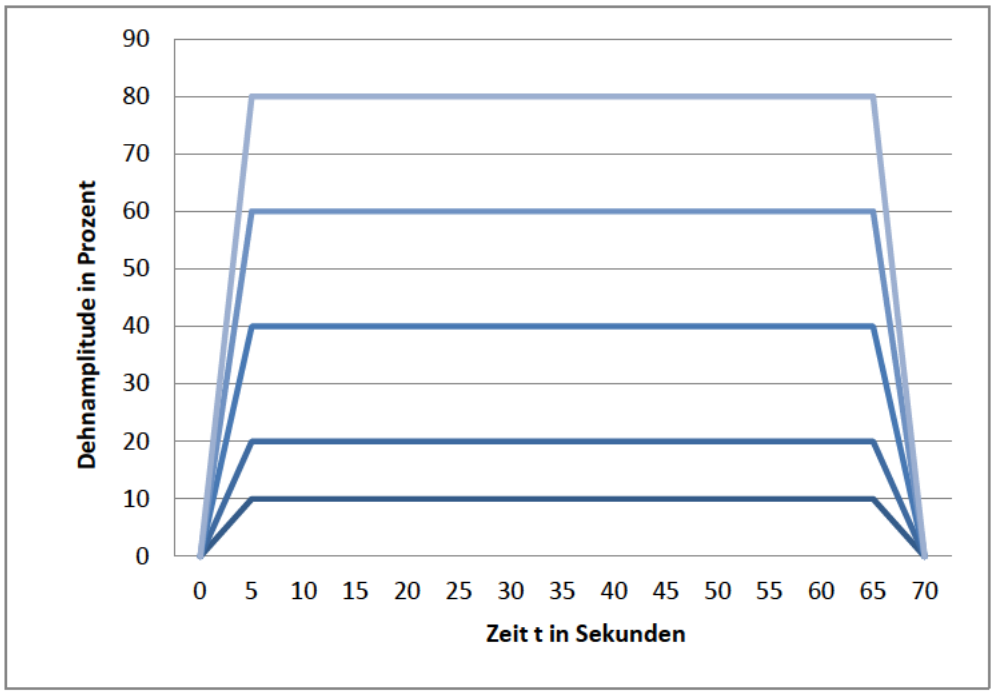

Abbildung 10: Dehnprotokoll mit Relaxierung I
Zuerst wurden die Zellen bei Dehnamplituden von 10 %, 20 %, 40 %, 60 % und 80 % und einer Dehndauer von 5 Sekunden gedehnt. Anschließend verblieb die Membran in gedehntem Zustand für 60 Sekunden und wurde danach innerhalb von 5 Sekunden wieder relaxiert.

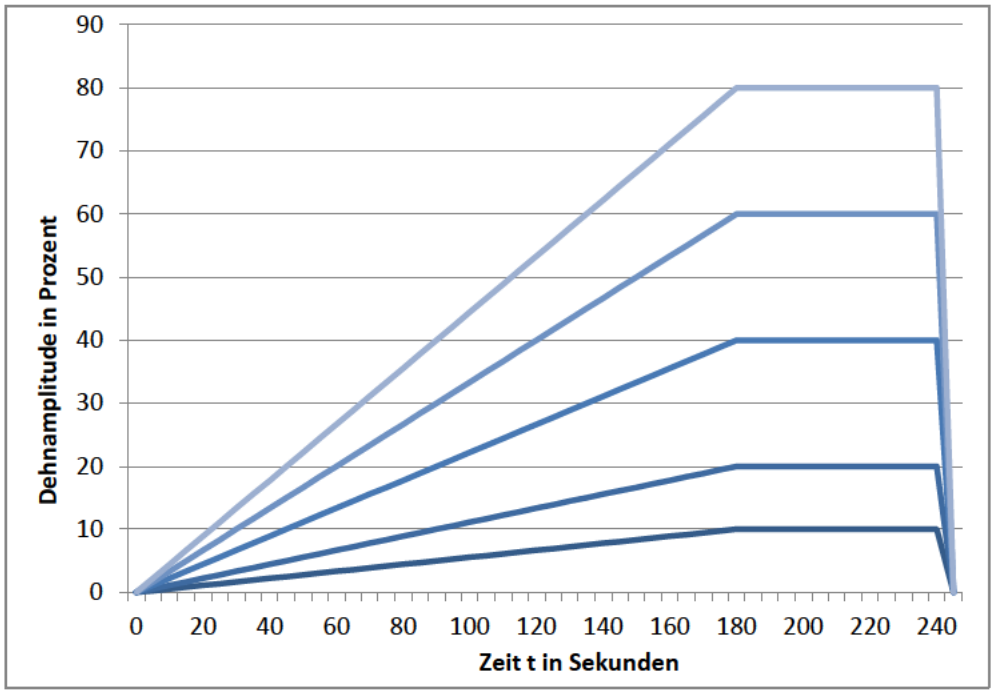

Abbildung 11: Dehnprotokoll mit Relaxierung II
Die Zellen wurden bei Dehnamplituden von 10 %, 20 %, 40 %, 60 % und 80 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden gedehnt. Die Membran verblieb in gedehntem Zustand für 60 Sekunden und wurde danach innerhalb von 5 Sekunden relaxiert.

Für die Lebendzellbeobachtung waren die Zellen mit pK8-eCFP und pK18-eYFP transfiziert worden, um die K-Filamente vor, während und nach Dehnung direkt am Mikroskop abbilden zu können.

Für die Immunofärbung wurden die Zellen sofort nach Durchführung der Dehnexperimente mit 4 % Formaldehydlösung (5 Minuten) fixiert und wie oben beschrieben (Kapitel 2.4.2) gefärbt.

2.7 Bestimmung der verschiedenen Messparameter

2.7.1 Bestimmung der tolerierbaren Konzentrationen von Okadeinsäure und Staurosporin

Wie in den Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben, nehmen die beiden Substanzen Okadeinsäure und Staurosporin Einfluss auf den Phosphorylierungszustand verschiedener Proteine in der Zelle. Da eine Konzentration von 124 nM Okadeinsäure zu einem Abbau des K-Netzwerkes innerhalb von 5 Stunden führt (Strnad et al. 2001), mussten wir eine tolerierbare Konzentration und Wirkungsdauer ermitteln, bei der einerseits eine Phosphorylierung der K erreicht wird, andererseits aber noch kein Abbau der K-Filamente oder sogar ein zytotoxischer Effekt für die Zellen zu erwarten ist. Wir testeten deshalb mehrere Okadeinsäurekonzentrationen und Inkubationszeiten. Ebenso wurde mit dem Proteinkinaseinhibitor Staurosporin verfahren.

Die Zellen wurden 3 Stunden mit Okadeinsäure oder Staurosporin inkubiert und beobachtet, um Effekte auf das K-Netzwerk bzw. Veränderungen der Zellform oder andere lichtmikroskopische Auffälligkeiten feststellen zu können. Bei Okadeinsäure wählten wir folgende Konzentrationen: 62 nM, 31 nM, 3,1 nM, 1,5 nM, 300 pM, 100 pM, 50 pM, 10 pM, 2 pM und 0,4 pM. Bei Staurosporin wurden Konzentrationen von 5 µM, 0,5 µM, 0,25 µM, 0,05 µM, 0,025 µM, 5 nM und 2,5 nM angewandt.

2.7.2 Bestimmung der dehnungsinduzierten Zellschädigung

Zur Bestimmung der dehnungsinduzierten Zellschädigung wurde der DNA-Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Ethidium Homodimer-2, Molecular Probes Invitrogen) verwendet. Dieser Farbstoff ist membranimpermeabel und färbt nur Kerne von Zellen an, deren Membran beschädigt ist. Zellen mit intakter Zellmembran werden hingegen nicht angefärbt. Zur Bestimmung der dehnungsinduzierten Zellschädigung wurden die mit Zellen bewachsenen Silikonmembranen vor dem Dehnexperiment in einer Lösung aus Ethidiumbromid und serumfreiem Nährmedium für 30 Minuten bei 37 °C und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Konzentration von Ethidiumbromid betrug 1 µM. Danach erfolgte der Austausch dieser Lösung mit Badlösung, in der Ethidiumbromid in der gleichen Konzentration (1 µM) vorlag. Vor Dehnung erfolgte die Bestimmung der bereits geschädigten oder toten Zellen in einem definierten Bildausschnitt. Anschließend wurden die Dehnexperimente durchgeführt. 5 Minuten später erfolgte erneut die Bestimmung der geschädigten oder toten Zellen im selben Bildausschnitt. So konnte ermittelt werden, bei wie viel Zellen die Zellmembran durch den Dehnvorgang geschädigt wurde.

2.7.3 Bestimmung des Zelldurchmessers

Um sicherzustellen, dass die Dehnung der Silikonmembran die Zellen entsprechend deformiert, wurde der Zelldurchmesser parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse an ungedehnten und gedehnten Zellen unter Kontrollbedingungen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure und 50 nM Staurosporin bestimmt.
Der Zelldurchmesser wurde stets an der längsten Ausdehnung der Zelle gemessen. Hierzu wurden die Zellen nach Dehnung mit 4 % Formaldehydlösung fixiert und einer Immunofärbung mit dem Antikörper Pan-Zytokeratin (Abcam) unterzogen.

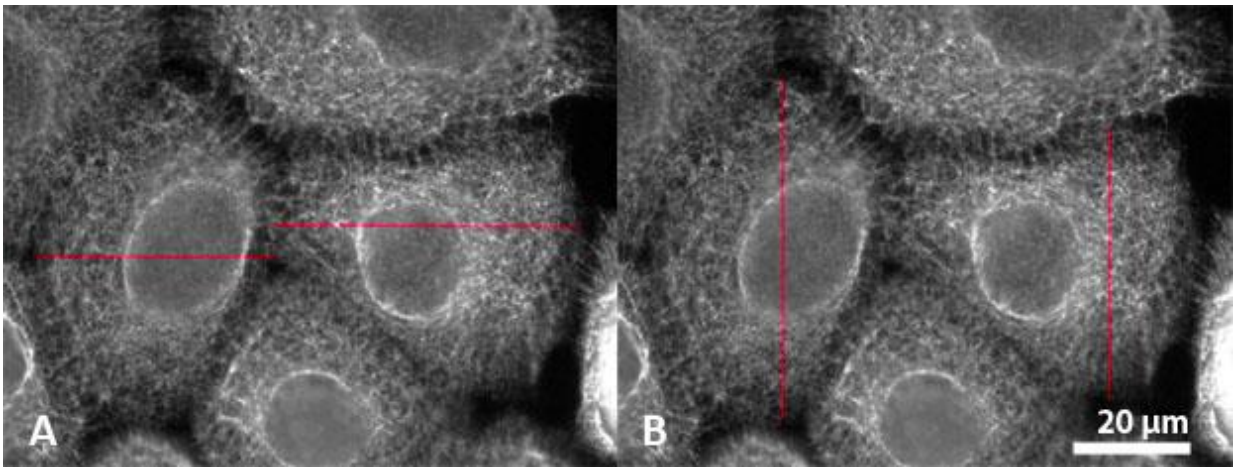

Abbildung 12: Bestimmung des Zelldurchmessers parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse
Zur Bestimmung des Zelldurchmessers wurde die längste Ausdehnung parallel (A) und rechtwinklig (B) zur Dehnungsachse vermessen. Der Maßstab in Teilabbildung (B) ist auch für Teilabbildung (A) gültig. µm = Mikrometer

2.7.4 Bestimmung der relativen Krümmung peripherer Keratinfilamente

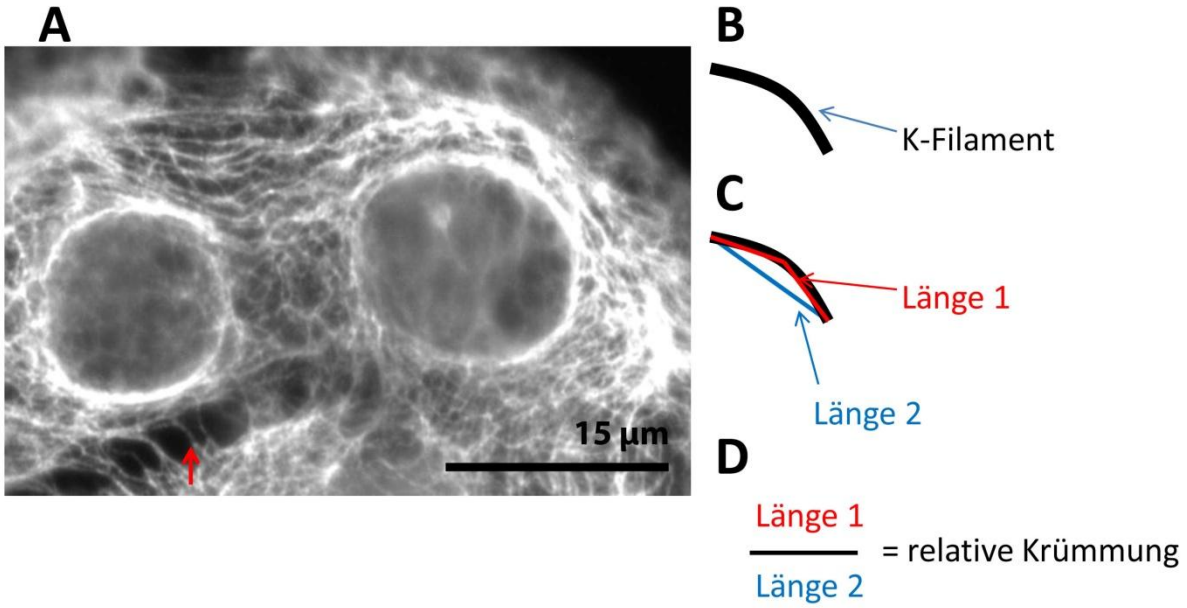

Abbildung 13: Bestimmung der relativen Krümmung peripherer Keratinfilamente
(A) zeigt ungedehnte Zellen nach Immunofärbung. Der rote Pfeil markiert ein Keratinfilament (K-Filament), welches in (B) schematisch dargestellt ist. (C) veranschaulicht die Längenmessung: Länge 1 entspricht der tatsächlichen Länge des Keratinfilaments (Dreipunktmessung). Länge 2 entspricht der Distanz zwischen Anfangs- und Endpunkt der Dreipunktmessung. Zur Berechnung der relativen Krümmung wird der Quotient aus Länge 1 und Länge 2 gebildet. µm = Mikrometer

Die Berechnung der Krümmung peripherer K-Filamente erfolgte an Bildern, in denen die K-Filamente durch Immunofärbung markiert waren. Das Verfahren ist in Abbildung 13 veranschaulicht. Im ersten Schritt wurde über eine Dreipunktmessung die genaue Länge des

K-Filaments bestimmt. Dies entspricht in Abbildung 13 der Länge 1. Im zweiten Schritt wurde die direkte Distanz zwischen dem Anfangs- und Endpunkt der Dreipunktmessung ermittelt. Dies entspricht in Abbildung 13 der Länge 2. Mit diesen Werten für Länge 1 und 2 lässt sich die relative Krümmung des K-Filaments berechnen, indem der Quotient aus Länge 1 und Länge 2 gebildet wird. Vereinfacht lässt sich für den Quotienten Folgendes ableiten: Der Wert 1 steht für ein absolut gerades K-Filament. Je größer die Krümmung des K-Filaments, desto größer wird der berechnete Quotient.

2.7.5 Quantifizierung der dehnungsinduzierten Veränderungen des Keratinnetzwerkes im perinukleären Bereich

Um die Veränderungen des perinukleären K-Netzwerks unter Dehnung quantifizieren zu können, wurde folgende Methode entwickelt und angewandt: Abbildung 14A zeigt das K-Netzwerk ungedehnter Zellen. In Abbildung 14C befinden sich 3 Zellen aus diesem Bildausschnitt, bei denen das perinukleäre K-Netzwerk als Binärdarstellung zu sehen ist. Dies wurde durch Einstellung eines entsprechenden Grauwert-Schwellenwertes erreicht. In Abbildung 14B sind Zellen nach einer Dehnung mit einer Dehnamplitude von 20 % und einer Dehndauer von 5 Sekunden dargestellt. Hier wurde gleich verfahren. Man erkennt beim Vergleich von Abbildung 14C und 14D, dass bei gedehnten Zellen jene Bereiche, die der Dehnung zugewandt sind (linke und rechte Seite), dünner sind bzw. weniger stark ausgeprägt erscheinen.

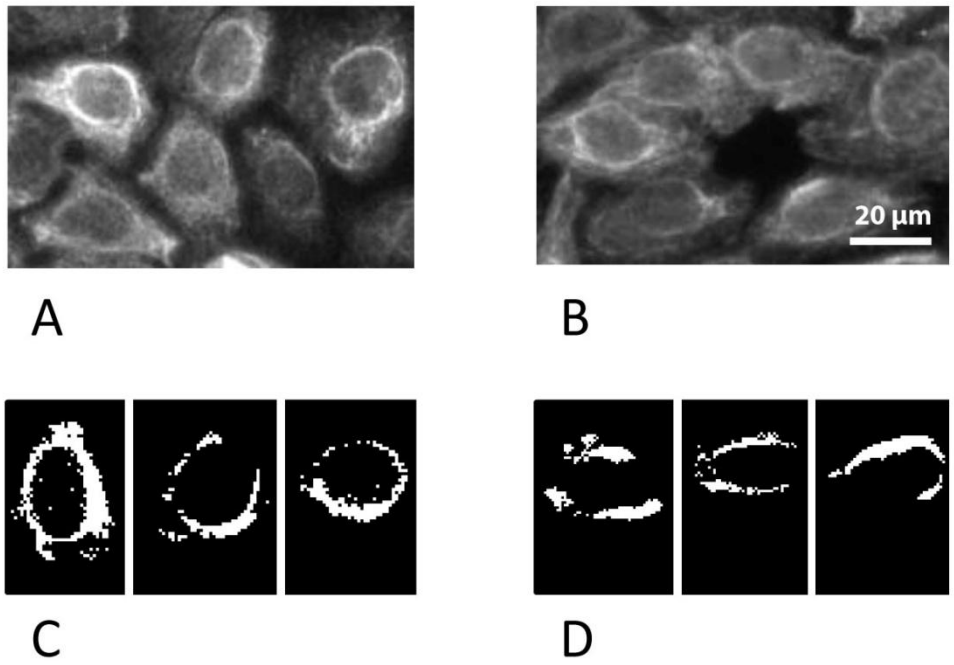

Abbildung 14: Einstellung des Grauwert-Schwellenwertes
In (A) sind ungedehnte Zellen dargestellt. (B) zeigt gedehnte Zellen nach einer Dehnamplitude von 20 % und einer Dehndauer von 5 Sekunden. (C) und (D) zeigen Zellen aus (A) bzw. (B) nach Einstellung des Grauwert-Schwellenwertes. Man erkennt in (D) eine Reduktion des perinukleären Keratinnetzwerkes an jenen Seiten, die der Dehnung zugewandt sind. Der Maßstab in Teilabbildung B ist auch für Teilabbildung (A) gültig. Die Teilabbildungen (C) und (D) sind maßstabslos. µm = Mikrometer

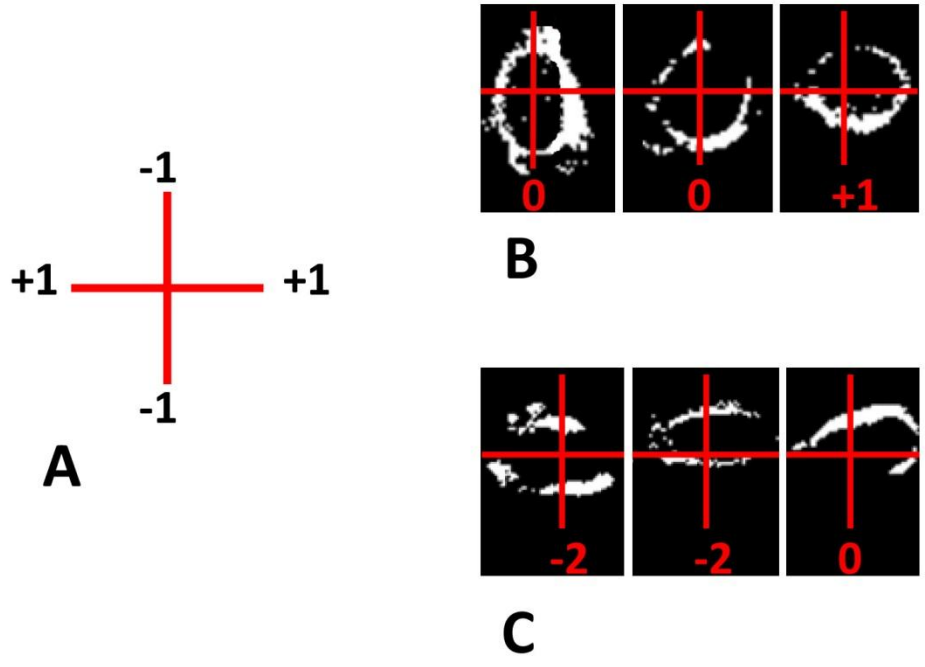

Abbildung 15: Quantifizierung der dehnungsinduzierten Veränderungen des Keratinnetzwerks im perinukleären Bereich
(A) zeigt das zur Quantifizierung verwendete Achsenkreuz. In (B) ist die Anwendung der beschriebenen Methode an ungedehnten Zellen mit entsprechenden Resultaten dargestellt, ebenso in (C) an gedehnten Zellen (Dehnamplitude 20 %, Dehndauer 5 Sekunden). Die Teilabbildungen (B) und (C) sind maßstabslos.

In Abbildung 15 ist zu sehen, wie die Veränderungen des K-Netzwerkes quantifiziert wurden. Nach Anwendung des Grauwert-Schwellenwertes erhielt man ein Binärbild. Wie in Abbildung 15 gezeigt, wurde dann ein Achsenkreuz auf das Bild gelegt und alle Werte des Achsenkreuzes an jenen Stellen summiert, an denen das Achsenkreuz das K-Netzwerk schneidet. In horizontaler Richtung beträgt der Wert an jedem Ende +1, in vertikaler Richtung -1. Besitzt nun eine Zelle ein vollständig intaktes K-Netzwerk im perinukleären Bereich (z.B. linke Zelle in Abbildung 15B), so erhält man den Wert 0. Sind im vertikalen Bereich Lücken im perinukleären K-Netzwerk vorhanden, so ergeben sich negative Werte. Lücken in horizontaler Ausrichtung im K-Netzwerk im perinukleären Bereich führen hingegen zu positiven Werten.

Diese Auswertung wurde an Übersichtsaufnahmen (10x Objektiv, siehe unten) vorgenommen, in denen das K durch Immunofluoreszenz gefärbt wurde.

2.7.6 Bestimmung der welligen Keratinfilamente nach Dehnung und anschließender Relaxierung

Werden Zellen gedehnt und anschließend relaxiert, zeigen viele der K-Filamente einen welligen, gewundenen Verlauf (siehe Abbildung 16B). Zur Bestimmung der Anzahl an Zellen mit welligen Filamenten wurden diese mit Dehnamplituden von 10 %, 20 %, 40 %, 60 % und 80 % und einer Dehndauer von 5 oder 180 Sekunden gedehnt. Anschließend verblieben die Silikonmembranen in gedehntem Zustand für 60 Sekunden (Kapitel 2.6.2). Nach dieser Zeit wurden die Silikonmembranen und die darauf befindlichen Zellen in ihre Ausgangslänge zurückgefahren. Nach Erreichen der Ausgangslänge erfolgte die sofortige Fixierung mit 4 % Formaldehydlösung. Die K-Filamente wurden für die Fluoreszenzmikroskopie mittels Immunofärbung angefärbt. Dies wurde sowohl für Zellen unter Kontrollbedingungen als auch für Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure und 50 nM Staurosporin durchgeführt. Abbildung 16A zeigt Zellen, welche nach einer Dehnamplitude von 10 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden wieder in ihre Ausgangslänge zurückgefahren wurden. Abbildung 16B hingegen zeigt Zellen, die mit einer Dehnamplitude von 80 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden gedehnt wurden und anschließend in ihre Ausgangslage zurückgefahren wurden. Die wellige Morphologie der K-Filamente ist deutlich erkennbar.

Zur Auswertung wurde der prozentuale Anteil an Zellen mit welligen K-Filamenten pro Bildausschnitt ermittelt.

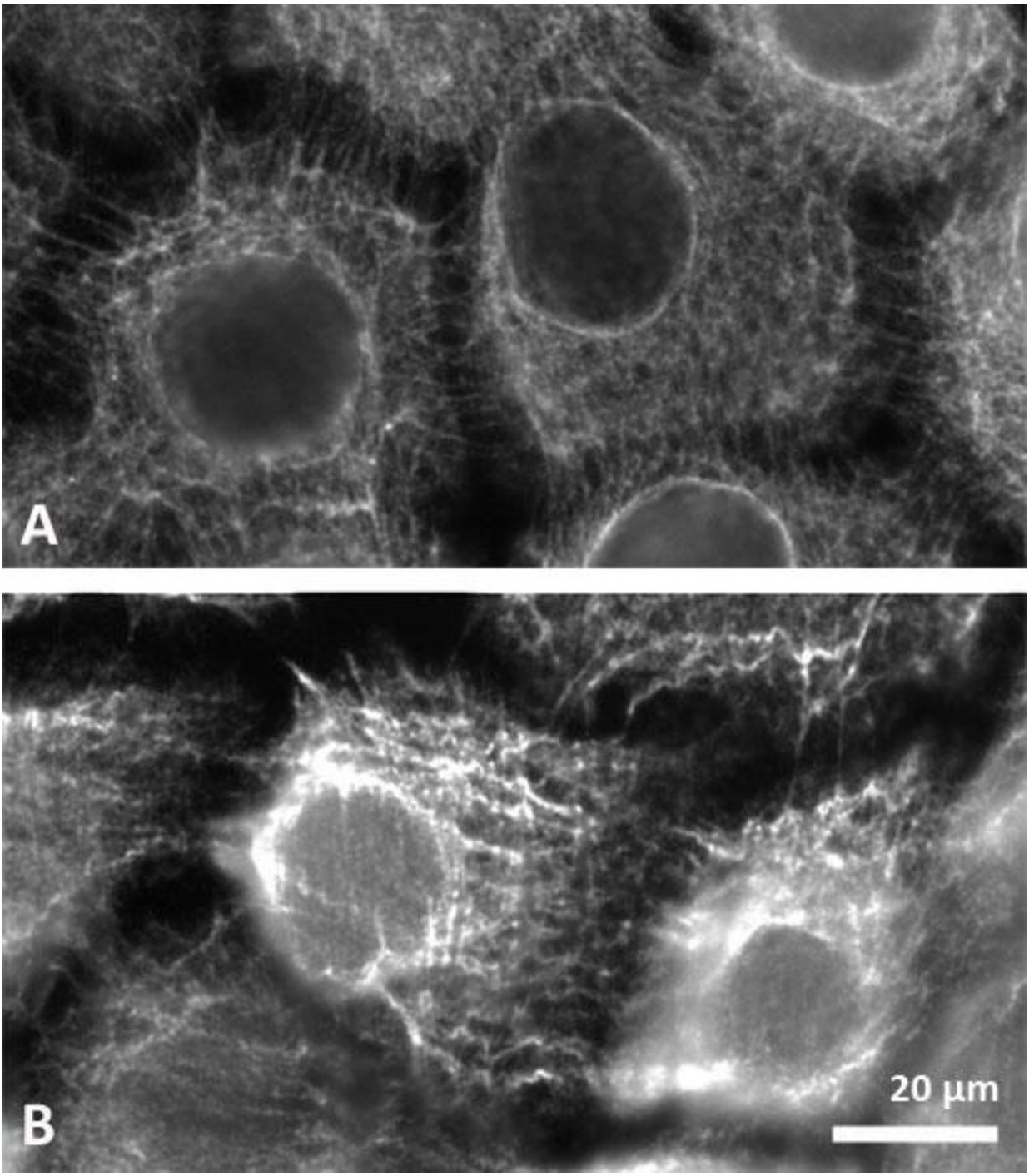

Abbildung 16: Keratinfilamente nach Dehnung und anschließender Relaxierung
Im Vergleich zu Zellen, die lediglich mit einer Dehnamplitude von 10 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden gedehnt und anschließend relaxiert wurden (A), zeigen Zellen nach einer Dehnung mit 80 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden (B) wellige Keratinfilamente. Der Maßstab in Teilabbildung (B) ist auch für Teilabbildung (A) gültig. µm = Mikrometer

2.8 Bildgebende Verfahren

Zur Mikroskopie der immunogefärbten Präparate wurde ein Zeiss Axio Imager M1 Mikroskop verwendet. Daran war eine Fluoreszenzlichtquelle (Kübler Codik) angeschlossen. Die

Übersichtsaufnahmen wurden mit dem Objektiv Achroplan 10x/0,30 w ph 1 (Zeiss) und die Detailaufnahmen mit dem Objektiv W Plan-Apochromat 63x/1,0 UIS-IR ∞/0 (Zeiss) angefertigt. Zur Bildaquisitation diente die Cool SNAP CCD Kamera (Photometrics EZ), welche über die Software Meta Imaging Series 6.1 betrieben wurde.

Die Lebendzellbeobachtungen wurden an einem Inversmikroskop Zeiss Cellobserver Z1 durchgeführt, auf den der Zelldehnungsapparat montiert wurde. Dies ermöglichte eine Bildaquisitation direkt vor, während und nach Durchführung der Dehnung. Die Aufnahmen wurden mit dem Objektiv LD Plan-NEOFLUAR 63x/0,75 Ph2 Korr ∞/0-1,5 (Zeiss) angefertigt. Zur Bildaquisitation diente die oben bereits erwähnte Kamera.

2.9 Bildauswertung und Statistik

Zur Auswertung der Bilddaten wurde das Programm ImageJ 1.42q (Abramoff et al. 2004) angewandt. Zur Längenkalibrierung wurde ein Objektmikrometer (Zeiss) verwendet.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 11.0. Die Daten wurden auf Normalverteilung (Komogorov-Smirnov-Test) getestet. Bei gepaarten Daten wurden p-Werte nach Student-t-Test und bei ungepaarten Daten nach Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden folgendermaßen angegeben: $p < 0,05$ als *, $p < 0,01$ als ** und $p < 0,001$ als ***.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse im Rahmen der Methodenetablierung

3.1.1 Optimierung des Transfektionsprotokolles

Um das K-Netzwerk in lebenden Zellen betrachten zu können, wurden Zellen mit den Plasmiden pK8-eCFP und pK18-eYFP transfiziert. Sie codieren die K-Filamentisoformen 8 bzw. 18 an die verschiedenfarbige Fluoreszenzproteine gebunden sind (cyan fluorescence protein und yellow fluorescence protein). Zur Bestimmung des optimalen Transfektionsgemisches aus Transfektionsreagenz und Plasmiden wurden entsprechend Tabelle 4 verschiedene Mengen und Verhältnisse des Transfektionsreagenz und der Plasmide getestet. Die unten angegebenen Mengen beziehen sich auf eine Silikonmembran, dessen Volumen 1000 µl betrug.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Transfektionsgemische
Die Angaben beziehen sich auf die Menge, die für eine Membran verwendet wurde. Die Plasmide wurden in einer Konzentration von 2 µg/µl verwendet. µl = Mikroliter, µg = Mikrogramm

Ansatz	Medium (serum-/ antibiotikafrei)	Plasmid pK8-eCFP	Plasmid pK18-eYFP	FuGENE 6 (Transfektions-reagenz)	Verhältnis Plasmide und FuGENE 6
A1	97 µl	1 µg	1 µg	3 µl	0,667 µg/µl
A2	97 µl	2 µg	2 µg	3 µl	1,334 µg/µl
A3	97 µl	1 µg	1 µg	6 µl	0,334 µg/µl
B1	97 µl	1 µg	0 µg	3 µl	0,334 µg/µl
B2	97 µl	2 µg	0 µg	3 µl	0,667 µg/µl
B3	97 µl	1 µg	0 µg	6 µl	0.167 µg/µl
C1	97 µl	0 µg	1 µg	3 µl	0.334 µg/µl
C2	97 µl	0 µg	2 µg	3 µl	0,667 µg/µl
C3	97 µl	0 µg	1 µg	6 µl	0,167 µg/µl

Nach 16 Stunden, sowie nach 40 Stunden wurde die Anzahl transfizierter Zellen pro Bildausschnitt bestimmt. Die Transfektionsraten sind aus untenstehendem Diagramm (Abbildung 17) zu entnehmen. Pro Transfektionsgemisch wurden zwischen 500 und 1000 Zellen ausgewertet.

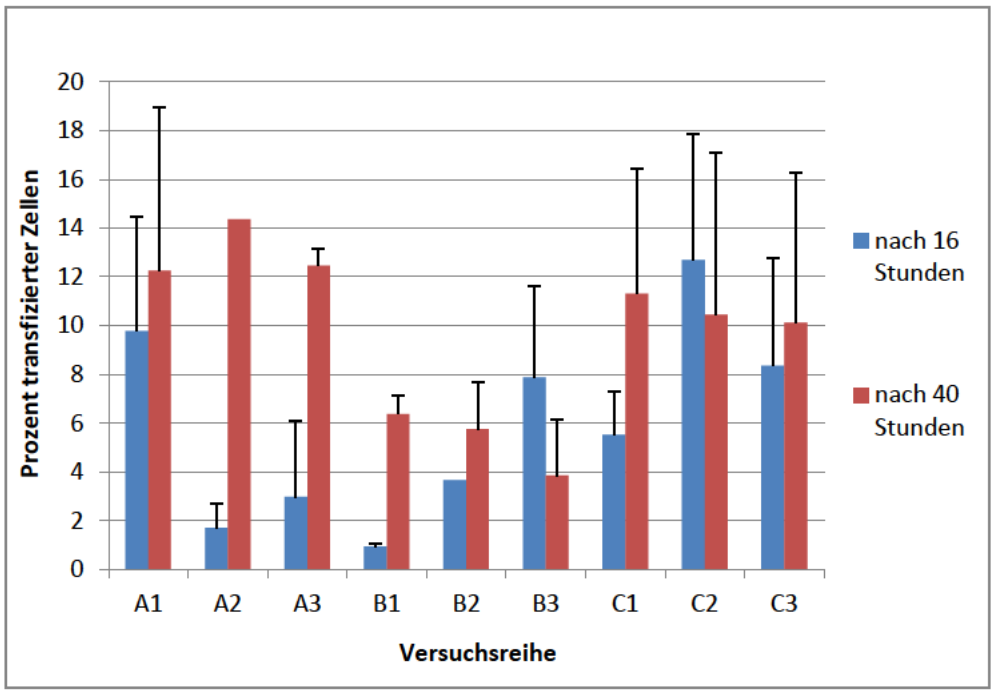

Abbildung 17: Transfektionseffizienz (in Prozent) der verschiedenen Transfektionsgemische nach 16-stündiger und 40-stündiger Inkubation
Von allen Transfektionen, bei denen mit beiden Plasmiden transfiziert wurde, zeigte Ansatz A1 sowohl nach 16 wie auch nach 40 Stunden die besten Ergebnisse.

Für die folgenden Experimente wurde Ansatz A1 verwendet, da hier sowohl nach 16 wie auch nach 40 Stunden die besten Ergebnisse bei Doppeltransfektionen von K 8 und K 18 erzielt wurden.

3.1.2 Bestimmung der tolerierbaren Konzentrationen von Okadeinsäure und Staurosporin

Wie in Kapitel 2.2 bereits beschrieben, nehmen die beiden Substanzen Okadeinsäure und Staurosporin Einfluss auf den Phosphorylierungszustand verschiedener Proteine. Okadeinsäure inhibiert die Proteinphosphatase 1 (PP1), Proteinphosphatase 2A (PP2A) und zwei Serin/Threonin-Proteinphosphatasen im Zytosol tierischer Zellen (Cohen et al. 1990; Yanagi et al. 1989; MacKintosh u. Cohen 1989). Wir wollten die Effekte der K-Phosphorylierung untersuchen und verwendeten deshalb Okadeinsäure um K zu phosphorylieren. Da allerdings eine Konzentration von 124 nM Okadeinsäure zum Abbau des

K-Netzwerkes innerhalb von 5 Stunden führt (Strnad et al. 2001), mussten wir eine tolerierbare Konzentration und Wirkungsdauer ermitteln, bei der einerseits eine Phosphorylierung der K erreicht wird, andererseits aber noch kein Abbau der K-Filamente oder sogar ein zytotoxischer Effekt für die Zellen zu erwarten ist. Wir testeten deshalb mehrere Okadeinsäurekonzentrationen aus. Ungedehnte Zellen wurden dazu 3 Stunden nach Zugabe von Okadeinsäure beobachtet, um einen Effekt auf das K-Netzwerk bzw. Veränderungen der Zellform oder andere Auffälligkeiten feststellen zu können. Okadeinsäure verblieb während der Beobachtung in der Badlösung.

Ebenso wurde mit Staurosporin verfahren, welches ein Inhibitor der Phospholipid/Ca^{2+}-abhängigen Proteinkinase C ist. Auch hier wurden die Zellen verschiedenen Konzentrationen von Staurosporin (siehe Tabelle 6) ausgesetzt und 3 Stunden lang beobachtet, um eventuelle Veränderungen am K-Netzwerk erkennen zu können.

Tabelle 5: Bestimmung der tolerierbaren Konzentration von Okadeinsäure
Abhängig von Konzentrationen und Inkubationszeit von Okadeinsäure kam es zur Auflösung des Keratinnetzwerkes in den Zellen. h = Stunde, Lyse = Auflösung des Keratinnetzwerkes, k. V. = keine Veränderung im Beobachtungszeitraum eingetreten, n. a. = nicht auswertbar; nM = Nanomolar, pM = Pikomolar

Okadeinsäure			
Konzentration	1 h	2 h	3 h
62 nM	Lyse	Lyse	Lyse
31 nM	Lyse	Lyse	Lyse
3,1 nM	k. V.	Lyse	Lyse
1,5 nM	k. V.	k. V.	k. V.
300 pM	k. V.	k. V.	k. V.
100 pM	k. V.	k. V.	k. V.
50 pM	k. V.	k. V.	k. V.
10 pM	n. a.	n. a.	n. a.
2 pM	k. V.	k. V.	k. V.
0,4 pM	k. V.	k. V.	n. a.

Tabelle 6: Bestimmung der tolerierbaren Konzentration von Staurosporin
Auch bei Staurosporin kam es abhängig von Konzentrationen und Inkubationszeit zur Auflösung des Keratinnetzwerkes in den Zellen. h = Stunde, Lyse = Auflösung des Keratinnetzwerkes, k. V. = keine Veränderung im Beobachtungszeitraum eingetreten; µM = Mikromolar, nM = Nanomolar

Staurosporin			
Konzentration	1 h	2 h	3 h
5 µM	Lyse	Lyse	Lyse
0,5 µM	Lyse	Lyse	Lyse
0,25 µM	k. V.	Lyse	Lyse
0,05 µM	k. V.	k. V.	Lyse
0,025 µM	k. V.	k. V.	k. V.
5 nM	k. V.	k. V.	k. V.
2,5 nM	k. V.	k. V.	k. V.

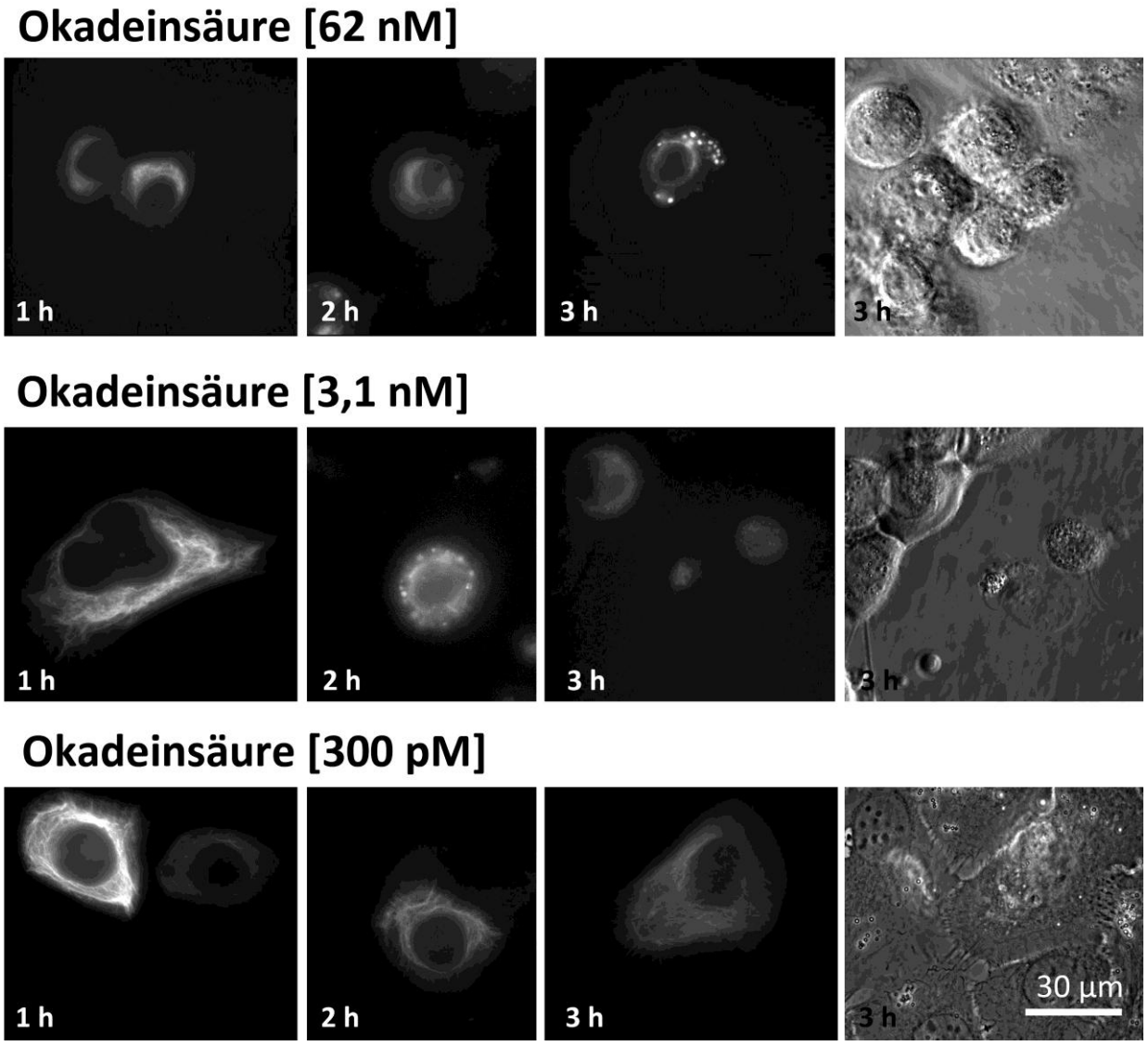

Abbildung 18: Verhalten des Keratinnetzwerkes unter Einwirkung von Okadeinsäure bei Konzentrationen von 62 nM, 3,1 nM und 300 pM nach Inkubationszeiten von 1, 2 und 3 Stunden
Bei einer Okadeinsäure-Konzentration von 62 nM ist eine Auflösung des Keratinnetzwerkes innerhalb der ersten Stunde zu erkennen. Das Keratin bildet punktförmige Aggregate aus und die Zellen nehmen eine Kugelform ein. Bei einer Okadeinsäure-Konzentration von 3,1 nM beginnt die Bildung punktförmiger Aggregate innerhalb von 2 Stunden. Lediglich bei einer Okadeinsäure-Konzentration von 300 pM bleiben die Keratinfilamente über den Beobachtungszeitraum von 3 Stunden intakt. Der Maßstab in der Teilabbildung rechts unten ist für alle Teilabbildungen gültig. nM = Nanomolar, pM = Pikomolar, µm = Mikrometer, h = Stunde

In Abbildung 18 ist exemplarisch das Verhalten der K-Filamente unter der Einwirkung von Okadeinsäure bei Konzentrationen von 62 nM, 3,1 nM und 300 pM nach einer Inkubationszeit von 1, 2 und 3 Stunden gezeigt. Bei einer Konzentration von 62 nM löst sich bereits innerhalb der ersten Stunde das K-Netzwerk in den Zellen auf und es bilden sich punktförmige Aggregate, wie in den Fluoreszenzaufnahmen zu sehen ist. Die Durchlichtaufnahme bei 62 nM nach 3-stündiger Inkubation zeigt, dass die Zellen eine Kugelform einnehmen. Bei einer Okadeinsäurekonzentration von 3,1 nM ist die Aggregatbildung erst nach 2-stündiger Inkubation festzustellen. Auch hier bilden sich wiederum punktförmige Aggregate aus. Bei

einer Konzentration von 300 pM Okadeinsäure bleibt das K-Netzwerk über den gesamten Beobachtungszeitraum von 3 Stunden intakt. Auch eine Veränderung der Zellform ist in der Durchlichtaufnahme nach 3 Stunden nicht zu erkennen.
Aufgrund dieser Resultate entschieden wir uns für eine 2-stündige Inkubation mit Okadeinsäure bei einer Konzentration von 300 pM.

In den Experimenten mit Staurosporin zeigte sich, dass bei Konzentrationen von 5 µM und 0,5 µM ein Auflösen der K-Filamente innerhalb einer Inkubationszeit von 1 Stunde beobachtet werden konnte. Die K-Filamente formten hierbei ähnlich wie bei Okadeinsäure (siehe Abbildung 18) punktförmige Aggregate. Bei einer Konzentration von 0,25 µM trat dies innerhalb von 2 Stunden auf. Bei einer Konzentration von 50 nM waren die beschriebenen punktförmigen Aggregate nach 2 Stunden nicht nachweisbar, weshalb wir diese Konzentration und Inkubationsdauer wählten.

3.1.3 Dehnungsinduzierte Zellschädigung

Für die Dehnexperimente war es entscheidend, ob die Dehnung den Zellen Schaden zufügt oder sogar Zelltod auslöst. Wie bereits in Kapitel 2.7.2 beschrieben, wurde bei diesen Experimenten der fluoreszierende DNA-Farbstoff Ethidiumbromid eingesetzt. Dieser lag während der Experimente in der Badlösung in einer Konzentration von 1 µM vor. Ethidiumbromid kann eine intakte Zellmembran nicht überwinden, nur eine defekte Zellmembran, wie sie bei geschädigten oder toten Zellen vorkommt, bewirkt ein Anfärben des Zellkernes. Durch den Vergleich identischer Bildausschnitte vor und nach Dehnung wurde der Anteil geschädigter Zellen ermittelt. Abbildung 19 zeigt ein Beispiel eines solchen Versuches. Horizontal sind jeweils identische Bildausschnitte zu sehen. In der linken Spalte ist das Bild der Durchlichtmikroskopie abgebildet, in der rechten Spalte der identische Bildausschnitt in der Fluoreszenzbeleuchtung. (A) und (B) zeigen einen Bildausschnitt vor Dehnung. Man kann in (B) erkennen, dass vor Dehnung keine geschädigten Zellen im Bildausschnitt vorhanden sind. Die vorhandenen fluoreszierenden Punkte sind Ethidiumbromidverunreinigungen in der Badlösung. Anschließend erfolgte die Dehnung bei einer Dehnamplitude von 80 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden. 5 Minuten nach Beginn der Dehnung (Abbildung 19C und D) ist ebenfalls keine Zunahme geschädigter oder toter Zellen im Bildausschnitt zu erkennen. Durch Zugabe von Triton X 0,1 % (Abbildung 19E und F) wird die Zellmembran permeabilisiert und alle Zellkerne werden durch Ethidiumbromid markiert.

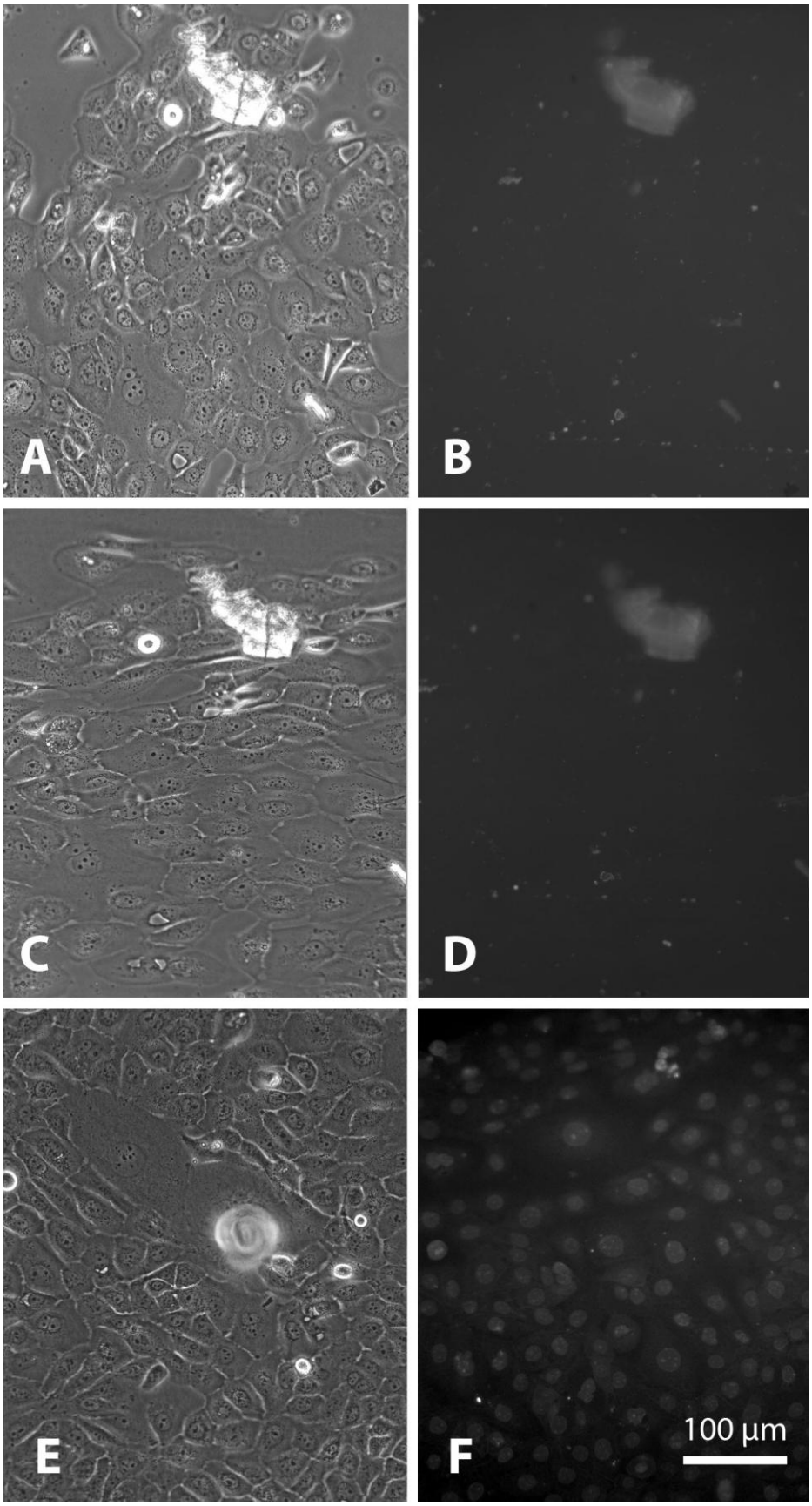

Abbildung 19: Zellschädigung bei maximaler Dehnamplitude (80 %) und Dehndauer (180 Sekunden)
(A), (B), (C) und (D) zeigen den gleichen Bildausschnitt vor Dehnung (A, B) und 5 Minuten nach Dehnung bei einer Dehnamplitude von 80 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden (C, D). Eine Zunahme an geschädigten oder getöteten Zellen ist nicht zu erkennen. Nach Zugabe von Triton X 0,1 % (E und F) kommt es zur Anfärbung aller Zellkerne durch Ethidiumbromid, da die Zellmembran permeabilisiert wurde. Der Maßstab in der Teilabbildung (F) ist für alle Teilabbildungen gültig. µm = Mikrometer

Das Diagramm in Abbildung 20 fasst die Ergebnisse von 10 Experimenten zusammen und zeigt, dass praktisch keine dehnungsinduzierte Zellschädigung unter Kontrollbedingungen beobachtet wurde. Die relative Häufigkeit Ethidiumbromid-gefärbter Zellen auf gedehnten Silikonmembranen unterscheidet sich nicht signifikant von ungedehnten Kontrollpopulationen. Im Rahmen der 10 Experimente wurde insgesamt folgende Anzahl an Zellen pro Dehnamplitude und Dehndauer verwendet: *ungedehnt:* 3008 Zellen; *20 % Dehnung, 5 s:* 1941 Zellen; *20 % Dehnung, 180 s:* 1022 Zellen; *40 % Dehnung, 5 s:* 1720 Zellen; *40 % Dehnung, 180 s:* 686 Zellen; *60 % Dehnung, 5 s:* 1371 Zellen; *60 % Dehnung, 180 s:* 718 Zellen; *80 % Dehnung, 5 s:* 1024 Zellen; *80 % Dehnung, 180 s:* 1048 Zellen.

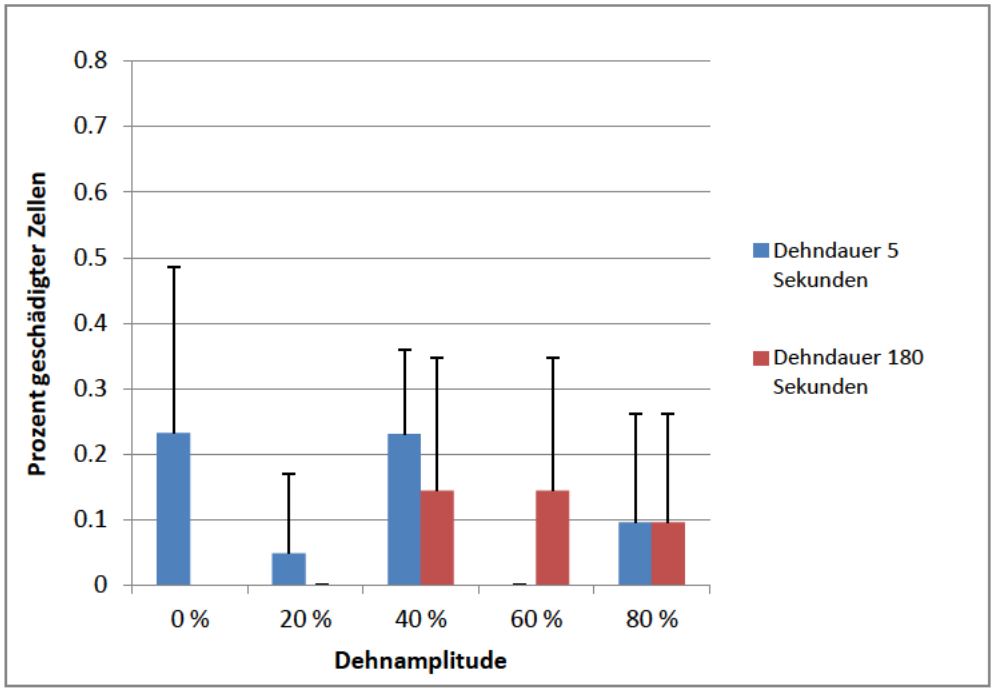

Abbildung 20: Dehnungsinduzierte Zellschädigung
Die Darstellung der relativen Häufigkeit (Mittelwert ± std) von Ethidiumbromid-markierten Zellen zeigt, dass selbst bei einer Dehnung von 80 % kein Anstieg der Zellschädigung im Vergleich zu ungedehnten Zellen festgestellt werden konnte.

3.1.4 Messung des Zelldurchmessers parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse bei verschiedenen Dehnamplituden

Um eine fehlende Adhärenz der Zellen auf den Silikonmembranen und somit ein Ablösen der Zellen während der Dehnung auszuschließen, wurden bei allen Dehnamplituden, sowie bei ungedehnten Zellen die Zelldurchmesser nach Immunofärbung der K-Filamente sowohl parallel als auch rechtwinklig zur Dehnungsachse gemessen. Die Messungen wurden unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure oder 50 nM Staurosporin durchgeführt.

3.1.4.1 Durchmesser der Zellen unter Kontrollbedingungen

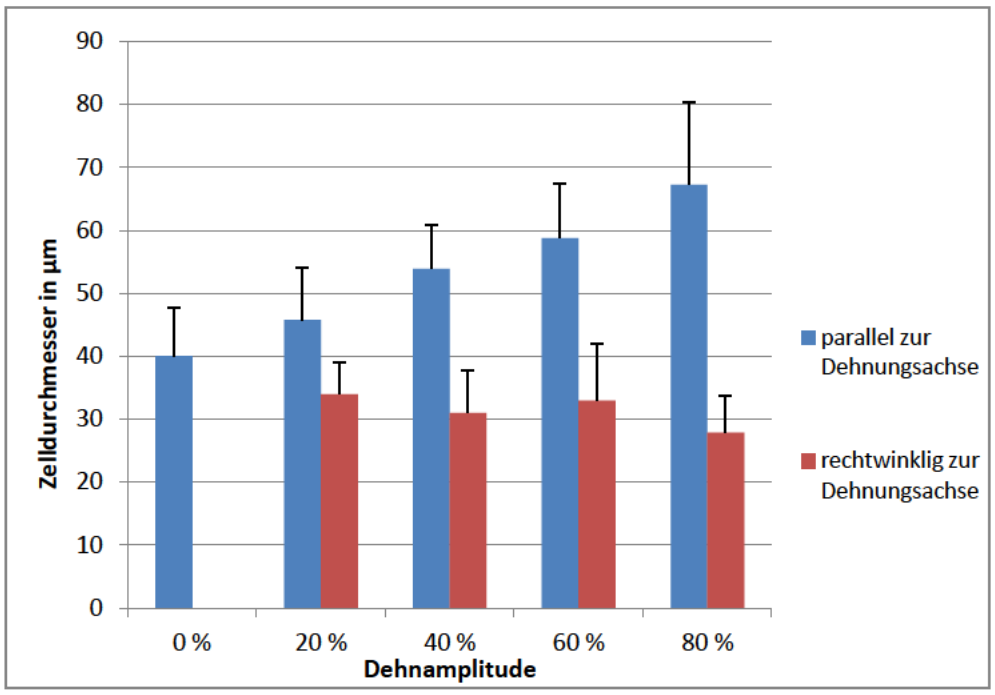

Abbildung 21: Zelldurchmesser in µm (Mittelwert ± std) parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse bei einer Dehndauer von 5 Sekunden unter Kontrollbedingungen
Der Zelldurchmesser parallel zur Dehnungsachse nimmt mit ansteigender Dehnamplitude zu, während der Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse durch eine Kompression der Membran eine Abnahme bei zunehmender Dehnamplitude zeigt. µm = Mikrometer

Das Diagramm in Abbildung 21 zeigt eine annähernd lineare Zunahme des absoluten Zelldurchmessers parallel zur Dehnungsachse unter Kontrollbedingungen mit zunehmender Dehnamplitude bei einer Dehndauer von 5 Sekunden. Die Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse lassen mit zunehmender Dehnamplitude eine Abnahme erkennen, was durch eine seitliche Kompression der Silikonmembran zu erklären ist. Insgesamt wurde bei 95 Zellen der Zelldurchmesser parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse vermessen.

Zur Veranschaulichung der obig dargestellten Ergebnisse ist in Abbildung 22 exemplarisch eine Zelle in ungedehntem Zustand, sowie nach Dehnamplituden von 20 %, 40 %, 60 % und 80 % und einer anschließenden Relaxation in ihre Ausgangslänge gezeigt. Die Längenzunahme der Zelle ist darin deutlich zu erkennen.

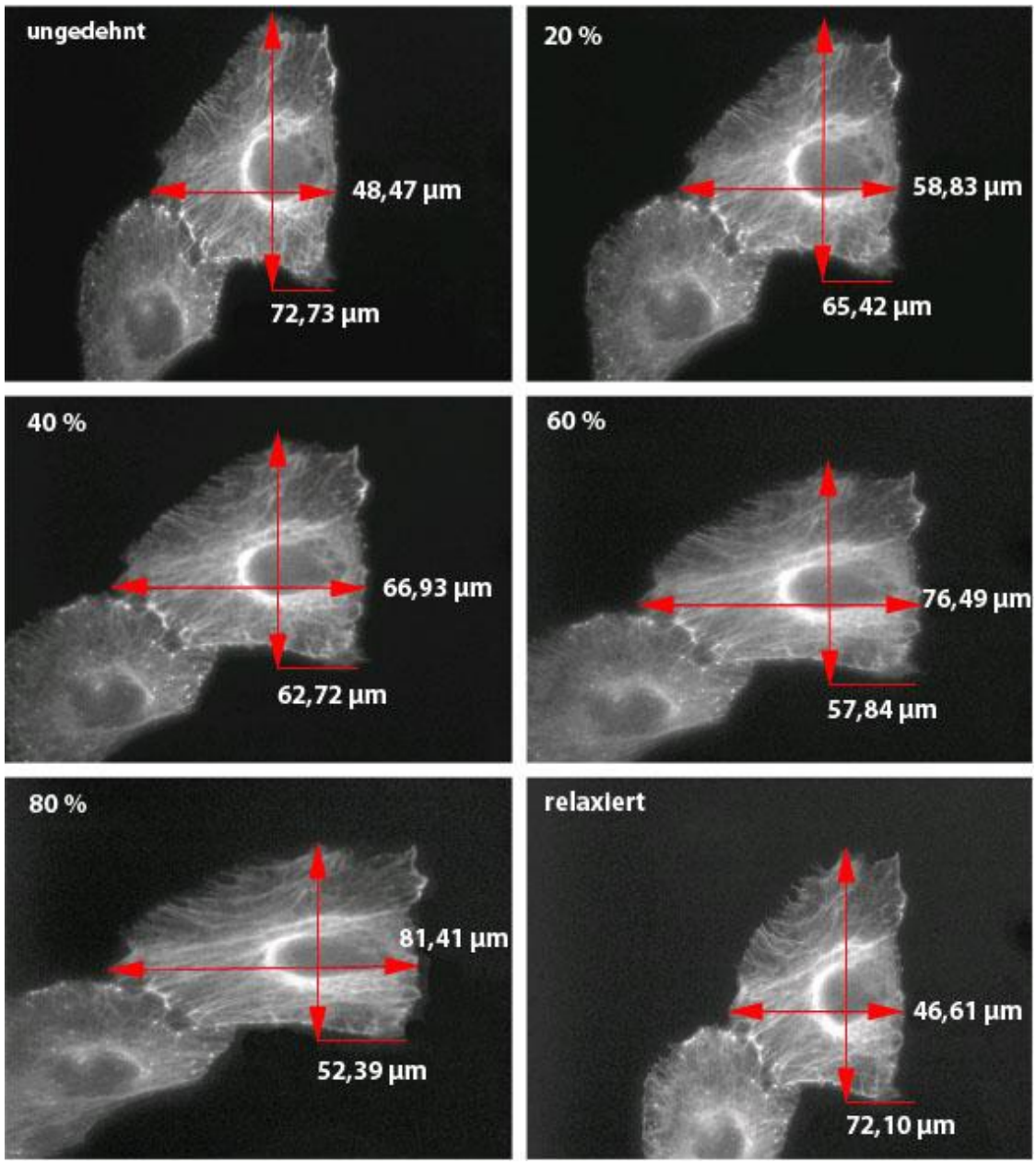

Abbildung 22: Beispiel einer Zelldehnung unter Kontrollbedingungen
Der Zelldurchmesser parallel zur Dehnungsachse nimmt mit zunehmender Dehnamplitude (Angabe in jeder Teilabbildung links oben) zu. Durch laterale Kompression der Silikonmembran bei Dehnung kommt es zu einer Abnahme des Zelldurchmessers rechtwinklig zur Dehnungsachse. Nach Relaxation nimmt die Zelle nahezu wieder ihre ursprüngliche Größe ein. µm = Mikrometer

Betrachtet man nicht die Absolutwerte, sondern bezieht die Mittelwerte auf ungedehnte Zellen (ebenfalls auf Silikonmembranen kultiviert), so zeigt sich, dass die Mittelwerte der relativen Zelldurchmesser parallel zur Dehnungsachse gut mit den entsprechenden Dehnamplituden korrelieren (siehe Abbildung 23). Dies zeigt, dass sich die Zellen während der Dehnung nicht von der Membran ablösen.

Die Abnahme des Zelldurchmessers rechtwinklig zur Dehnungsachse stimmt mit den Ergebnissen einer früheren Studie überein, in der die Dehnungseigenschaften der Silikonmembran und die Funktionsweise des Dehnungsapparates beschrieben wurden und

kann wie bereits oben erwähnt, auf eine seitliche Kompression der Silikonmembran bei Dehnung zurückgeführt werden (Gerstmair et al. 2009).

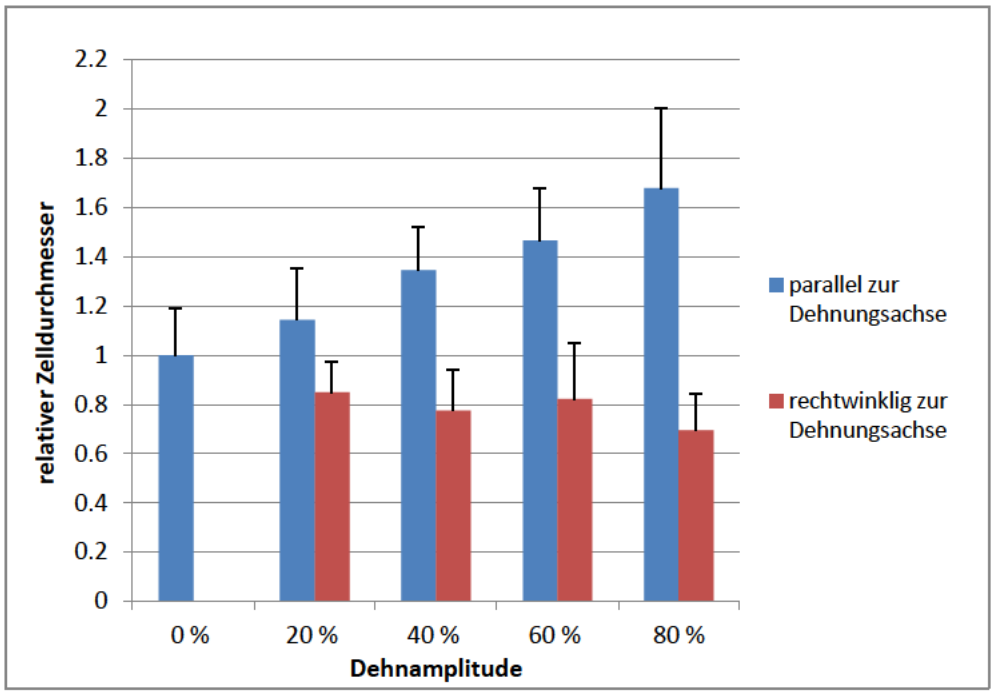

Abbildung 23: Relative Zelldurchmesser (Mittelwert ± std) parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse bei einer Dehndauer von 5 Sekunden unter Kontrollbedingungen
Man kann erkennen, dass die Zunahme der Zelldurchmesser parallel zur Dehnungsachse den je angewandten Dehnamplituden entspricht. Der Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse zeigt die erwartete Abnahme bei ansteigender Dehnamplitude durch seitliche Kompression der Membran.

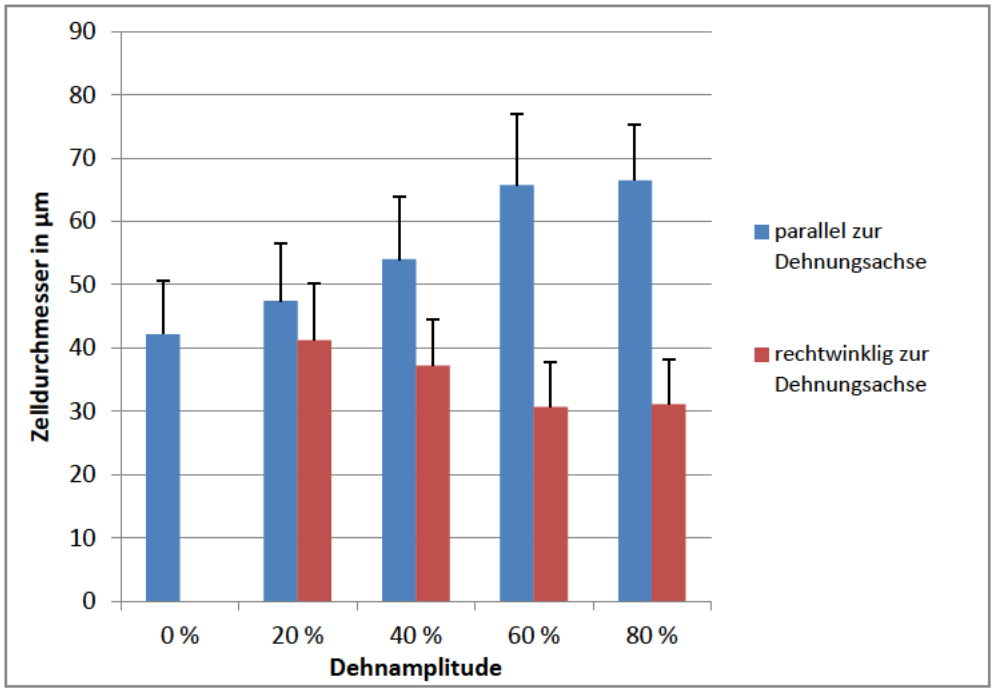

Abbildung 24: Zelldurchmesser in µm (Mittelwert ± std) parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse bei einer Dehndauer von 180 Sekunden unter Kontrollbedingungen
Wie bei einer Dehndauer von 5 Sekunden ist auch hier parallel zur Dehnungsachse eine nahezu lineare Zunahme des Zelldurchmessers zu erkennen. Ebenso kommt es rechtwinklig zur Dehnungsachse zu einer Abnahme des Zelldurchmessers. µm = Mikrometer

Betrachtet man die Zelldurchmesser bei unterschiedlichen Dehnamplituden und einer Dehndauer von 180 Sekunden (Abbildung 24), so erhält man ähnliche Ergebnisse wie bei einer Dehndauer von 5 Sekunden. Es kommt ebenfalls zu einem Anstieg der Mittelwerte des absoluten Zelldurchmessers in µm parallel zur Dehnungsachse (n = 448 Zellen) bei zunehmender Dehnamplitude.

Die Mittelwerte der absoluten Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse (n = 468 Zellen) zeigen erwartungsgemäß auch bei einer Dehndauer von 180 Sekunden eine Abnahme mit zunehmender Dehnamplitude durch seitliche Kompression der Silikonmembran.

Betrachtet man die relativen Mittelwerte der Zelldurchmesser parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse bei verschiedenen Dehnamplituden, so erkennt man auch bei einer Dehndauer von 180 Sekunden, dass die Zunahme der Zelldurchmesser parallel zur Dehnungsachse wiederum gut den Dehnamplituden entspricht. Wie bei 5 Sekunden Dehndauer kann also auch hier ein Ablösen der Zellen ausgeschlossen werden. Bei den relativen Zelldurchmessern rechtwinklig zur Dehnungsachse kommt es wiederum zu einer Abnahme, bedingt durch seitliche Kompression der Silikonmembran.

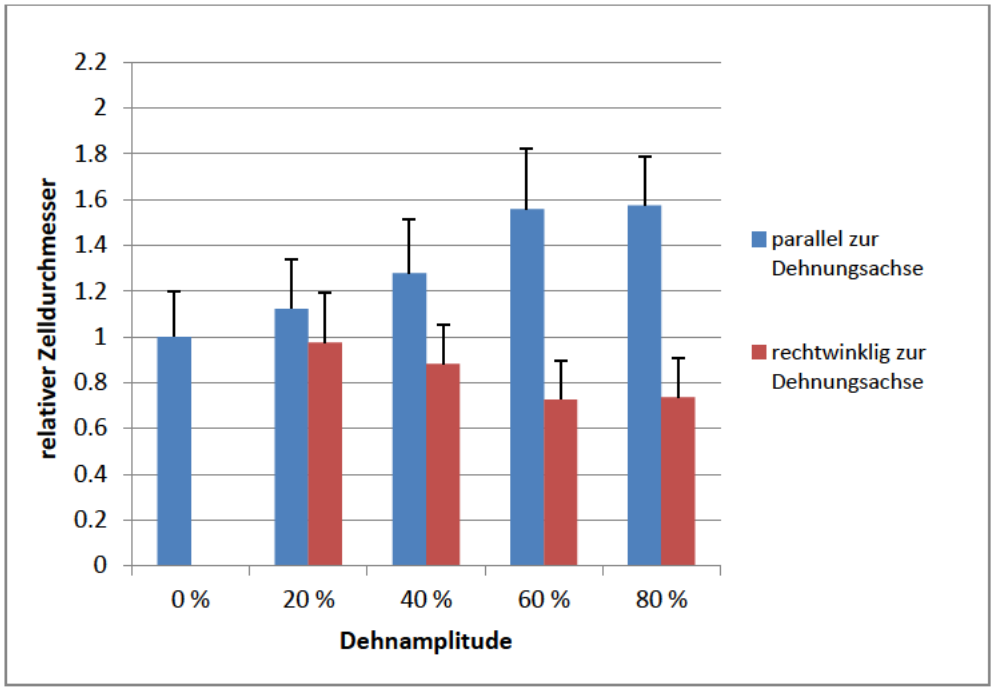

Abbildung 25: Relative Zelldurchmesser (Mittelwert ± std) parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse bei einer Dehndauer von 180 Sekunden unter Kontrollbedingungen
Die Zunahme des Zelldurchmessers parallel zur Dehnungsachse entspricht den Dehnamplituden. Der Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse nimmt aufgrund einer seitlichen Kompression der Silikonmembran ab.

3.1.4.2 Durchmesser der Zellen nach Behandlung mit Okadeinsäure

Im Folgenden sind die Ergebnisse des Zelldurchmessers parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse nach 2-stündiger Inkubation der Zellen mit 300 pM Okadeinsäure dargestellt. Zur besseren Übersichtlichkeit werden keine Absolutwerte mehr, sondern lediglich die Relativwerte gezeigt, die sich auf ungedehnte Zellen beziehen, welche ebenso mit Okadeinsäure inkubiert worden waren.

Auch bei diesen Experimenten lässt sich erkennen, dass der relative Zelldurchmesser parallel zur Dehnungsachse (n = 256 Zellen) den angewandten Dehnamplituden entspricht und sich somit die Zellen bei einer Dehndauer von 5 Sekunden und einer 2-stündigen Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure nicht von der Silikonmembran ablösen.

Wie in Abbildung 26 gezeigt, ist wie unter Kontrollbedingungen eine Abnahme des relativen Zelldurchmessers rechtwinklig zur Dehnungsachse (n = 278 Zellen) mit zunehmender Dehnamplitude nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure und einer Dehndauer von 5 Sekunden zu erkennen.

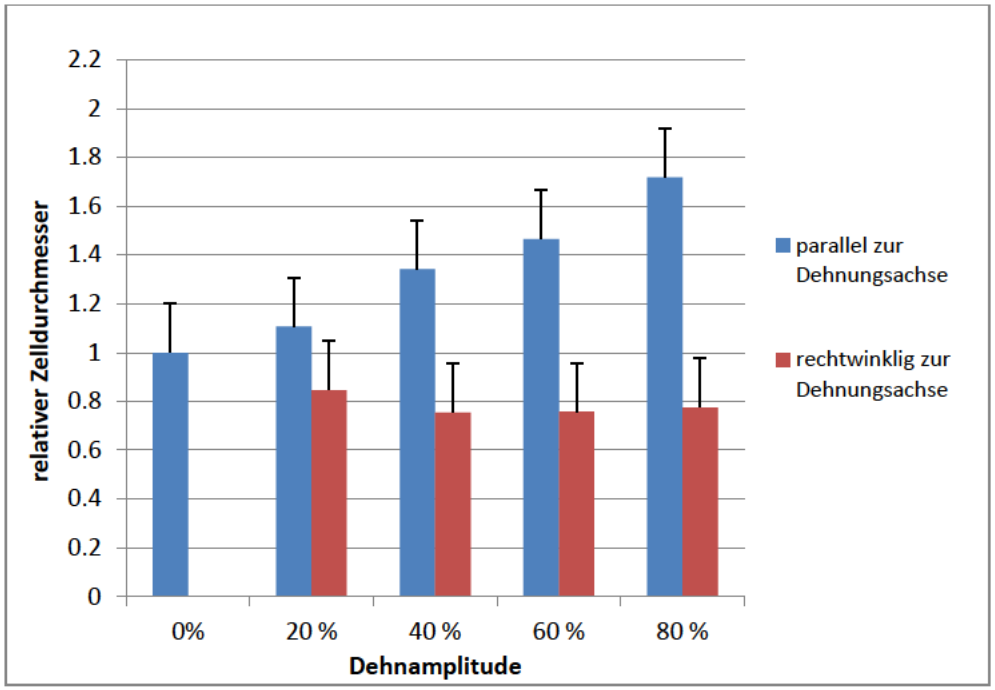

Abbildung 26: Relative Zelldurchmesser (Mittelwert ± std) nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure und einer Dehndauer von 5 Sekunden
Die Zelldurchmesser verhalten sich ähnlich wie unter Kontrollbedingungen. Die Zunahme des Zelldurchmessers parallel zur Dehnungsachse entspricht den Dehnamplituden. Der Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse nimmt aufgrund einer seitlichen Kompression der Silikonmembran ab. pM = Pikomolar

Abbildung 27 zeigt die Mittelwerte des Zelldurchmessers parallel zur Dehnungsachse (n = 277 Zellen) und rechtwinklig zur Dehnungsachse (n = 254 Zellen) bei verschiedenen Dehnamplituden und einer Dehndauer von 180 Sekunden. Es ist zu erkennen, dass es mit Anstieg der Dehnamplitude zu einer Zunahme des relativen Mittelwertes der Zelldurchmesser parallel zur Dehnungsachse kommt und praktisch keine Unterschiede zu den Kontrollbedingungen festzustellen sind.

Betrachtet man die relativen Mittelwerte der Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse, so erkennt man auch hier die erwartete Abnahme aufgrund der seitlichen Kompression der Silikonmembran.

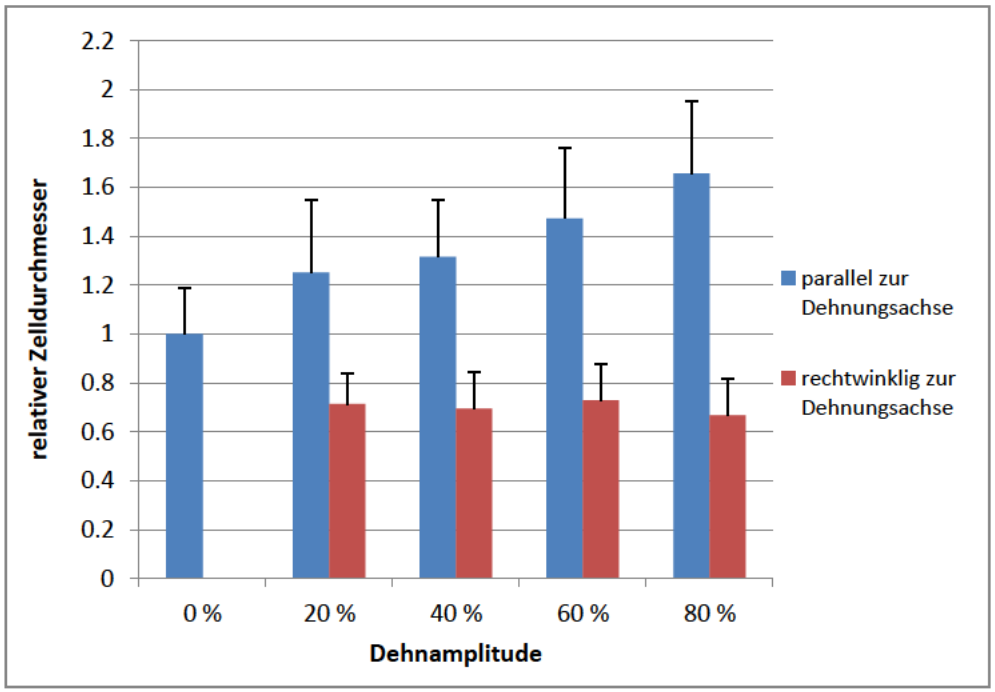

Abbildung 27: Relative Zelldurchmesser (Mittelwert ± std) nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure und einer Dehndauer von 180 Sekunden
Die Zelldurchmesser verhalten sich ähnlich wie unter Kontrollbedingungen. Die Zunahme des Zelldurchmessers parallel zur Dehnungsachse entspricht den angewandten Dehnamplituden. Der Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse nimmt aufgrund der seitlichen Kompression der Silikonmembran bei Dehnung ab. pM = Pikomolar

3.1.4.3 Durchmesser der Zellen nach Behandlung mit Staurosporin

Abbildung 28 zeigt, dass die relativen Zelldurchmesser parallel zur Dehnungsachse (n = 255 Zellen) nach 2-stündiger Inkubation mit 50 nM Staurosporin und einer Dehndauer von 5 Sekunden entsprechend der Dehnamplitude zunehmen und sich ähnlich wie unter Kontrollbedingungen verhalten. Der Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse (n = 281 Zellen) zeigt eine nahezu kontinuierliche Abnahme. Wird die Dehndauer auf 180 Sekunden verlängert (Abbildung 29), so steigt auch hier der relative Zelldurchmesser parallel

zur Dehnungsachse (n = 267 Zellen) entsprechend der Dehnamplitude an. Die relativen Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse (n = 271 Zellen) zeigen die erwartete Abnahme.

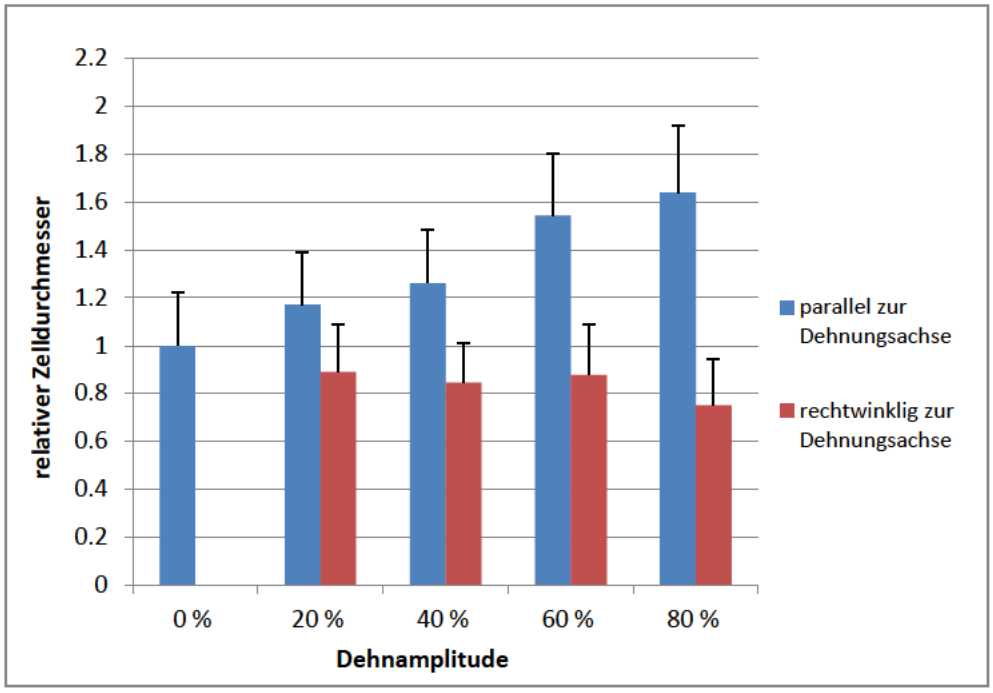

Abbildung 28: Relative Zelldurchmesser (Mittelwert ± std) nach 2-stündiger Inkubation mit 50 nM Staurosporin und einer Dehndauer von 5 Sekunden
Die Zelldurchmesser verhalten sich auch nach Behandlung mit Staurosporin ähnlich wie unter Kontrollbedingungen. Die Zunahme des Zelldurchmessers parallel zur Dehnungsachse entspricht den Dehnamplituden und der Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse nimmt aufgrund einer seitlichen Kompression der Silikonmembran ab. nM = Nanomolar

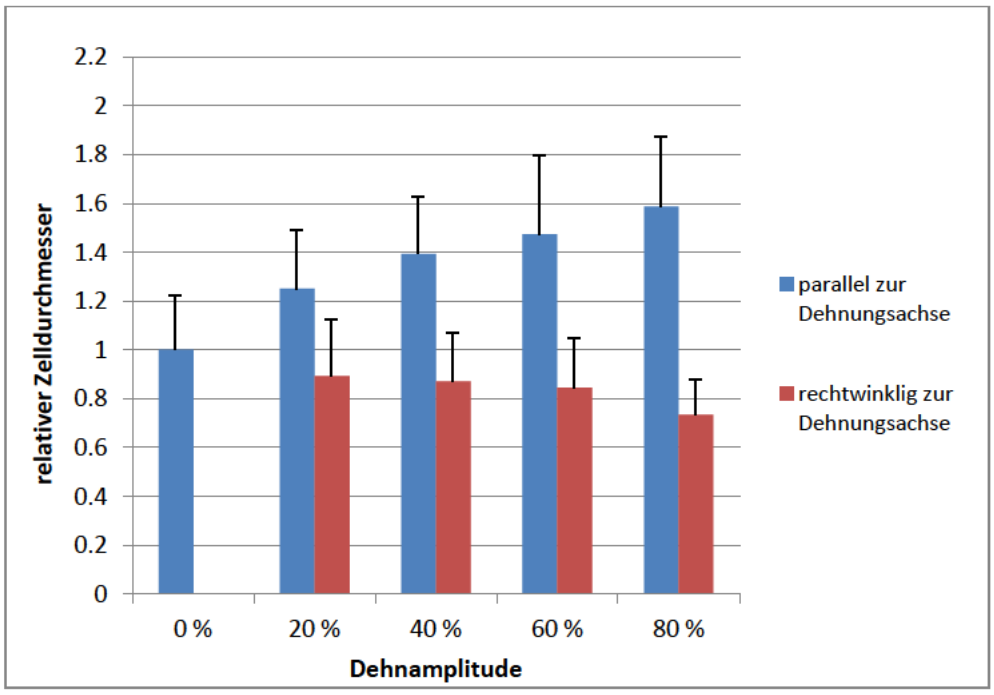

Abbildung 29: Relative Zelldurchmesser (Mittelwert ± std) nach 2-stündiger Inkubation mit 50 nM Staurosporin und einer Dehndauer von 180 Sekunden
Die Zelldurchmesser verhalten sich ähnlich wie unter Kontrollbedingungen. Die Zunahme des Zelldurchmessers parallel zur Dehnungsachse entspricht den angewandten Dehnamplituden. Der Zelldurchmesser rechtwinklig zur Dehnungsachse nimmt wie unter Kontrollbedingungen aufgrund einer seitlichen Kompression der Silikonmembran ab. nM = Nanomolar

3.2 Ergebnisse im Rahmen der wissenschaftlichen Fragestellung

Im nachfolgenden Abschnitt des Ergebnisteils werden die Veränderungen der K-Filamente in SCC-25-Zellen unter Dehnung beschrieben und inwieweit diese Veränderungen vom Phosphorylierungszustand des K abhängen.

3.2.1 Krümmung peripherer Keratinfilamente

Da das K-Netzwerk in ungedehnten Zellen nicht „straff“ gespannt ist, betrachteten wir zuerst die Krümmung peripherer K-Filamente, um abschätzen zu können, wie viel Längenzunahme durch ein „Geradeziehen“ von ursprünglich gekrümmten K-Filamenten kompensiert werden kann. Es wurde die Krümmung dieser Filamente bei verschiedenen Dehnamplituden und unterschiedlicher Dehndauer sowie nach Behandlung mit dem Phosphataseinhibitor Okadeinsäure und dem Kinaseinhibitor Staurosporin untersucht.

3.2.1.1 Messung unter Kontrollbedingungen

In untenstehendem Diagramm (Abbildung 30) ist die relative Krümmung der peripheren K-Filamente in ungedehnten und gedehnten Zellen dargestellt. Die Dauer der Zelldehnung betrug 5 Sekunden. Die Filamente wurden in verschiedene Kategorien unterteilt: a) Filamente, welche annähernd parallel zur Dehnungsachse ausgerichtet waren: 0 - 30°; b) Filamente, die in einem Winkel von ca. 30 - 60° und c) Filamente, die in einem Winkel von 60 - 90° zur Dehnungsachse lagen.

Es ist zu erkennen, dass eine anfänglich vorhandene Krümmung, wie sie bei ungedehnten Zellen vorhanden ist, bereits nach einer Dehnamplitude von nur 10 % und einer Dehndauer von 5 Sekunden signifikant abnimmt. Eine zusätzliche Dehnung bewirkt keine weiteren Veränderungen. Ferner spielte es keine Rolle, in welcher Richtung relativ zur Dehnungsachse die vermessenen K-Filamente angeordnet waren.

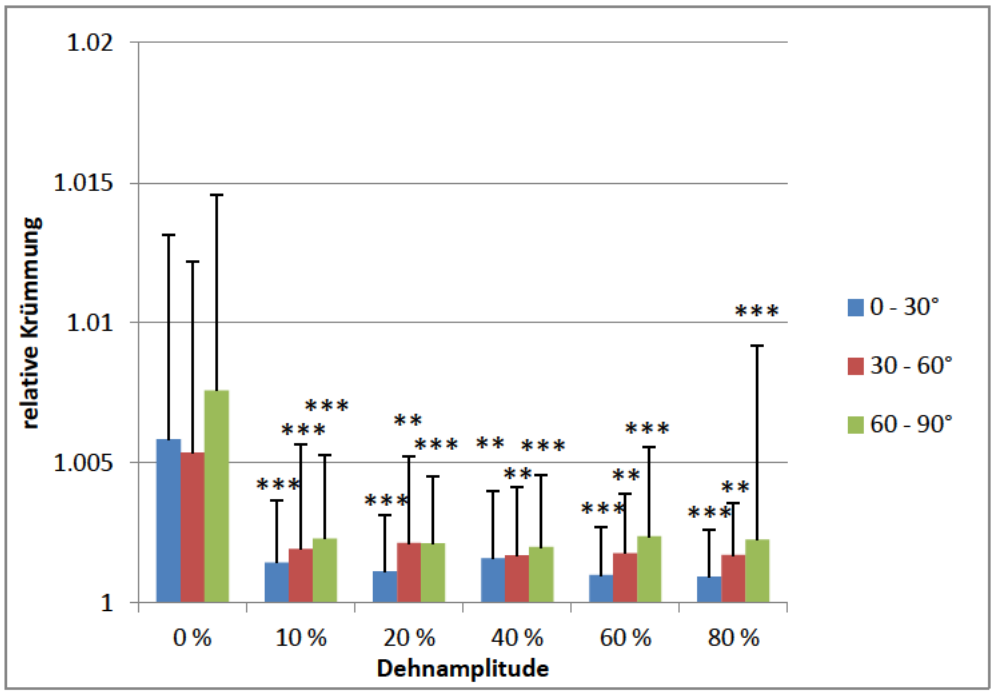

Abbildung 30: Relative Krümmung (Mittelwert ± std) peripherer Keratinfilamente unter Kontrollbedingungen bei einer Dehndauer von 5 Sekunden

Die anfänglich vorhandene Krümmung peripherer Keratinfilamente bei ungedehnten Zellen geht bereits bei einer Dehnamplitude von 10 % unabhängig von der Orientierung des Filaments zur Dehnungsachse signifikant zurück. Durch eine weitere Zunahme der Dehnamplitude kann dieser Effekt nicht verstärkt werden. Die statistische Signifikanz bezieht sich stets auf die Krümmung ungedehnter Keratinfilamente gleicher Orientierung. Signifikanzwert p: ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

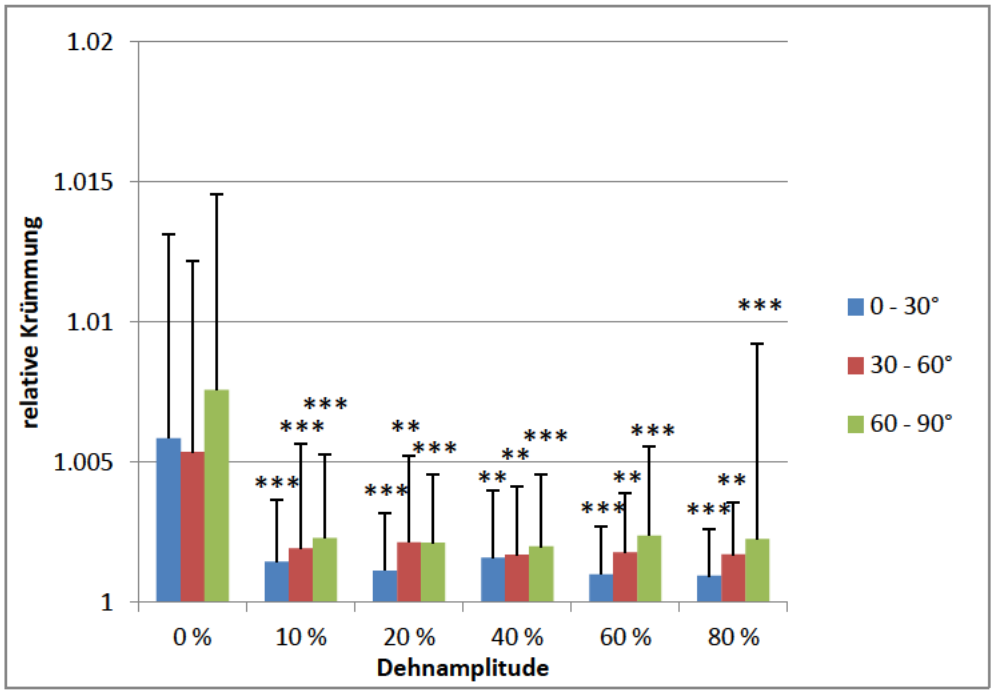

Abbildung 31: Relative Krümmung (Mittelwert ± std) peripherer Keratinfilamente unter Kontrollbedingungen und einer Dehndauer von 180 Sekunden

Auch bei einer Dehndauer von 180 Sekunden erkennt man, dass die anfänglich vorhandene Krümmung bereits bei einer Dehnamplitude von 10 % signifikant zurückgeht. Eine weitere Zunahme der Dehnamplitude verstärkt diesen Effekt auch bei einer verlängerten Dehndauer von 180 Sekunden nicht. Die statistische Signifikanz bezieht sich stets auf die Krümmung ungedehnter Keratinfilamente gleicher Orientierung. Signifikanzwert p: ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$

K-Filamente von Zellen, die in 180 Sekunden gedehnt wurden, verhalten sich ähnlich, wie in Abbildung 31 zu erkennen ist. Auch hier ist eine fast vollständige Reduktion der vorhandenen Filamentkrümmung bereits nach einer Dehnamplitude von 10 % zu erkennen. Größere Dehnamplituden führen zu keiner weiteren Abnahme. Dies zeigt, dass die Dehndauer keinen Einfluss auf die Krümmung peripherer K-Filamente hat.

Die Anzahl der untersuchten Filamente pro Versuch betrug: *ungedehnt:* 48 (0 - 30°), 30 (30 - 60°), 39 (60 - 90°); *10 % Dehnung, 5 s:* 88 (0 - 30°), 105 (30 - 60°), 93 (60 - 90°); *10 % Dehnung*, *180 s*: 66 (0 - 30°), 77 (30 - 60°), 55 (60 - 90°); *20 % Dehnung, 5 s:* 76 (0 - 30°), 57 (30 - 60°), 48 (60 - 90°); 20 % *Dehnung, 18 0s:* 75 (0 - 30°), 61 (30 - 60°), 21 (60 - 90°); *40 % Dehnung, 5 s:* 82 (0 - 30°), 49 (30 - 60°), 55 (60 - 90°); *40 % Dehnung, 180 s:* 67 (0 - 30°), 50 (30 - 60°), 30 (60 - 90°); *60 % Dehnung, 5 s:* 82 (0 - 30°), 37 (30 - 60°), 38 (60 - 90°); *60 % Dehnung, 180 s:* 73 (0 - 30°), 52 (30 - 60°), 39 (60 - 90°); *80 % Dehnung, 5 s:* 23 (0 - 30°), 25 (30 - 60°), 27 (60 - 90°); *80 % Dehnung, 180 s:* 68 (0 - 30°), 46 (30 - 60°), 46 (60 - 90°).

3.2.1.2 Messung nach Behandlung mit Okadeinsäure

Nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure ergibt sich ein ähnliches Bild. Wie die Abbildungen 32 und 33 zeigen, reduziert sich auch hier die vorhandene Krümmung bei ungedehnten Zellen bereits nach einer Dehnamplitude von 10 %. Einen Einfluss der Dehndauer ist, wie bei Zellen unter Kontrollbedingungen, nicht zu erkennen. Ebenso scheint die Orientierung der K-Filamente in Bezug zur Dehnungsachse keinerlei Einfluss zu nehmen. Die anfängliche Krümmung unterscheidet sich nicht von den unbehandelten Kontrollen.

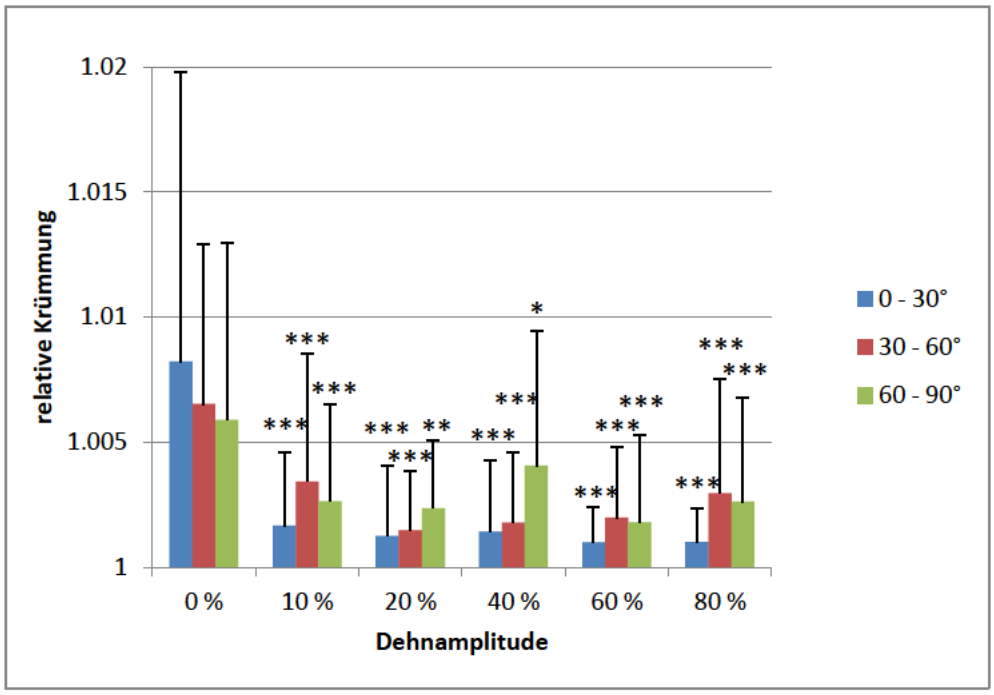

Abbildung 32: Relative Krümmung (Mittelwert ± std) peripherer Keratinfilamente nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure und einer Dehndauer von 5 Sekunden

Ähnlich wie unter Kontrollbedingungen nimmt nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure die vorhandene Krümmung peripherer Keratinfilamente bei ungedehnten Zellen bei einer Dehnamplitude von 10 % statistisch signifikant ab und wird durch eine Steigerung der Dehnamplitude nicht verstärkt. Die statistische Signifikanz bezieht sich stets auf die Krümmung ungedehnter Keratinfilamente gleicher Orientierung. Signifikanzwert p: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001; pM = Pikomolar

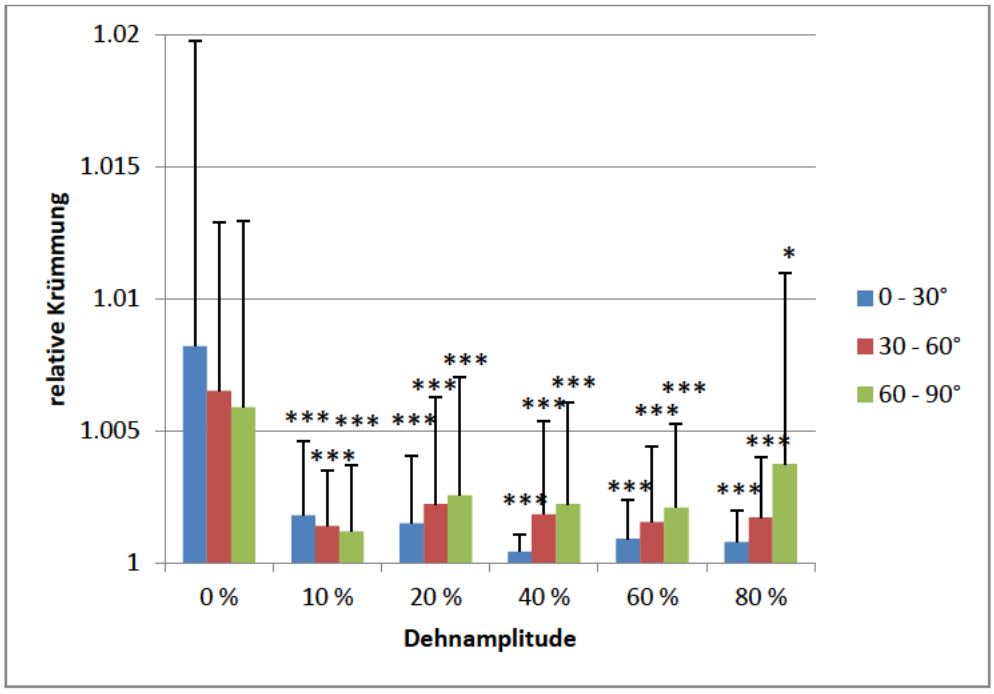

Abbildung 33: Relative Krümmung (Mittelwert ± std) peripherer Keratinfilamente nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure und einer Dehndauer von 180 Sekunden

Auch nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure und einer verlängerten Dehndauer von 180 Sekunden zeigt sich, dass die anfänglich vorhandene Krümmung bei einer Dehnamplitude von 10 % statistisch signifikant abnimmt. Die statistische Signifikanz bezieht sich auf die Krümmung ungedehnter Keratinfilamente gleicher Orientierung. Signifikanzwert p: * = p < 0,05; *** = p < 0,001; pM = Pikomolar

Die Anzahl der untersuchten Filamente pro Versuch betrug: *ungedehnt:* 59 (0 - 30°), 64 (30 - 60°), 54 (60 - 90°); *10 % Dehnung, 5 s:* 71 (0 - 30°), 71 (30 - 60°), 67 (60 - 90°); *10 % Dehnung, 180 s:* 54 (0 - 30°), 71 (30 - 60°), 58 (60 - 90°); *20 % Dehnung, 5 s:* 64 (0 - 30°), 64 (30 - 60°), 62 (60 - 90°); *20 % Dehnung, 180 s:* 66 (0 - 30°), 71 (30 - 60°), 62 (60 - 90°); *40 % Dehnung, 5 s:* 57 (0 - 30°), 58 (30 - 60°), 46 (60 - 90°); *40 % Dehnung, 180 s:* 70 (0 - 30°), 52 (30 - 60°), 43 (60 - 90°); *60 % Dehnung, 5 s:* 47 (0 - 30°), 49 (30 - 60°), 61 (60 - 90°); *60 % Dehnung, 180 s:* 55 (0 - 30°), 45 (30 - 60°), 48 (60 - 90°); *80 % Dehnung, 5 s:* 24 (0 - 30°), 47 (30 - 60°), 61 (60 - 90°); *80 % Dehnung, 180 s:* 44 (0 - 30°), 37 (30 - 60°), 26 (60 - 90°).

3.2.1.3 Messung nach Behandlung mit Staurosporin

Die Situation nach 2-stündiger Behandlung der Zellen mit 50 nM Staurosporin stellt sich ähnlich wie nach Behandlung mit Okadeinsäure dar. Auch hier reduziert sich die Krümmung peripherer K-Filamente nach einer Dehnamplitude von 10 % statistisch signifikant. Dehndauer und Orientierung der K-Filamente in Bezug zur Dehnungsachse scheinen keinen Einfluss zu haben.

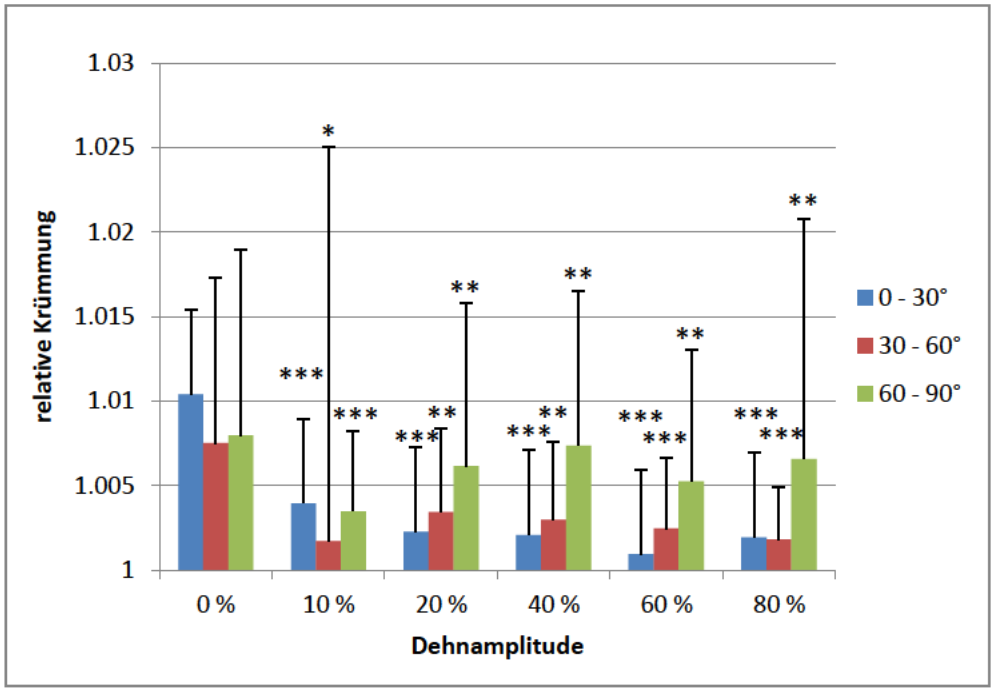

Abbildung 34: Relative Krümmung (Mittelwert ± std) peripherer Keratinfilamente nach 2-stündiger Inkubation mit 50 nM Staurosporin und einer Dehndauer von 5 Sekunden
Nach 2-stündiger Behandlung mit 50 nM Staurosporin zeigen sich ähnliche Resultate wie unter Kontrollbedingungen und wie nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure: eine Dehnamplitude von 10 % ist ausreichend, um die Krümmung statistisch signifikant zu senken. Die statistische Signifikanz bezieht sich stets auf die Krümmung ungedehnter Keratinfilamente gleicher Orientierung. Signifikanzwert p: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; nM = Nanomolar, pM = Pikomolar

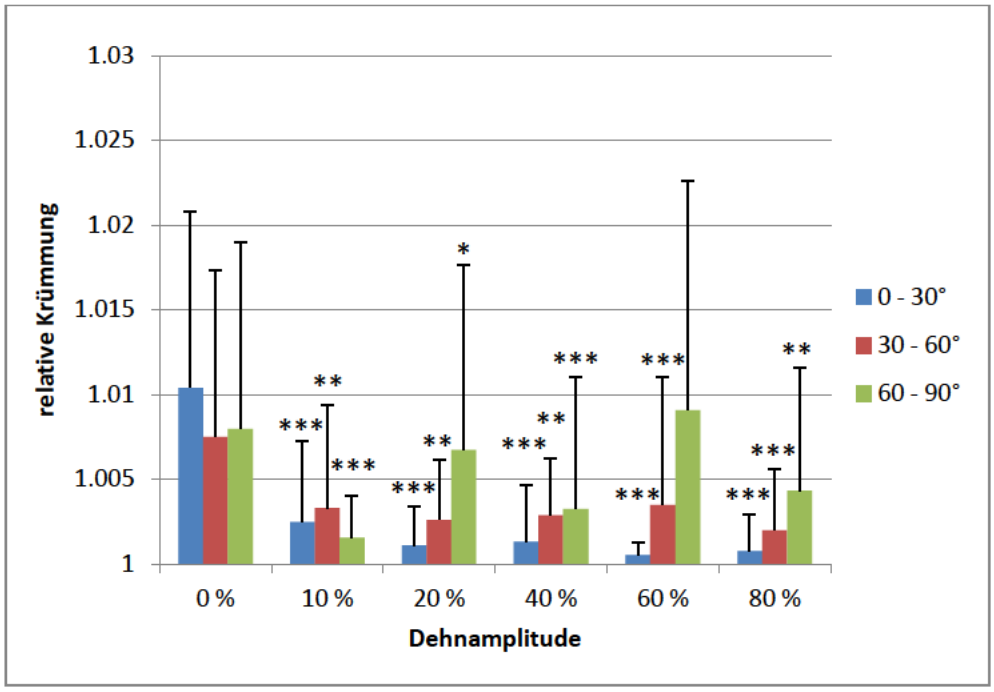

Abbildung 35: Relative Krümmung (Mittelwert ± std) peripherer Keratinfilamente nach 2-stündiger Inkubation mit 50 nM Staurosporin und einer Dehndauer von 180 Sekunden
Ähnlich wie nach 2-stündiger Behandlung mit 50 nM Staurosporin und einer Dehndauer von 5 Sekunden zeigen sich auch nach einer Dehndauer von 180 Sekunden folgende Resultate: bei einer Dehnamplitude von 10 % kommt es zu einer signifikanten Verringerung der anfänglich vorhandenen Krümmung peripherer Keratinfilamente. Eine weitere Zunahme der Dehnamplitude führt zu keiner weiteren Abnahme der Krümmung. Die statistische Signifikanz bezieht sich stets auf die Krümmung ungedehnter Keratinfilamente gleicher Orientierung. Signifikanzwert p: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; nM = Nanomolar

Die Anzahl der untersuchten Filamente pro Versuch betrug: *ungedehnt:* 82 (0 - 30°), 65 (30 - 60°), 68 (60 - 90°); *10 % Dehnung, 5 s:* 53 (0 - 30°), 63 (30 - 60°), 53 (60 - 90°); *10 % Dehnung, 180 s:* 80 (0 - 30°), 55 (30 - 60°), 63 (60 - 90°); *20 % Dehnung, 5 s:* 80 (0 - 30°), 55 (30 - 60°), 63 (60 - 90°); *20 % Dehnung, 180 s:* 76 (0 - 30°), 69 (30 - 60°), 66 (60 - 90°); *40 % Dehnung, 5 s:* 69 (0 - 30°), 50 (30 - 60°), 52 (60 - 90°); *40 % Dehnung, 180 s:* 73 (0 - 30°), 61 (30 - 60°), 47 (60 - 90°); *60 % Dehnung, 5 s:* 52 (0 - 30°), 48 (30 - 60°), 47 (60 - 90°); *60 % Dehnung, 180 s:* 73 (0 - 30°), 62 (30 - 60°), 53 (60 - 90°); *80 % Dehnung, 5 s:* 39 (0 - 30°), 32 (30 - 60°), 52 (60 - 90°); *80 % Dehnung, 180 s:* 72 (0 - 30°), 39 (30 - 60°), 37 (60 - 90°).

3.2.2 Veränderungen des perinukleären Keratinnetzwerkes

Aufgrund der Tatsache, dass die Abnahme der Filamentkrümmung lediglich eine Dehnamplitude (und eine Längenzunahme) von maximal etwa 10 % kompensieren kann

(Kapitel 3.2.1), stellt sich die Frage, wie das K-Netzwerk höhere Dehnamplituden toleriert. Wir untersuchten deshalb, wie sich die besonders dicht angeordneten K-Filamente im perinukleären Bereich bei verschiedenen Dehnungen verhielten. Hierzu verwendeten wir das in Kapitel 2.7.5 beschriebene Verfahren zur Quantifizierung der dehnungsinduzierten Veränderungen des perinukleären K-Netzwerkes. Dabei wurde die Dichte des perinukleären K-Netzwerkes an den Seiten, die der Dehnung zugewandt waren, mit jenen Seiten verglichen, die parallel zur Dehnungsachse lagen.

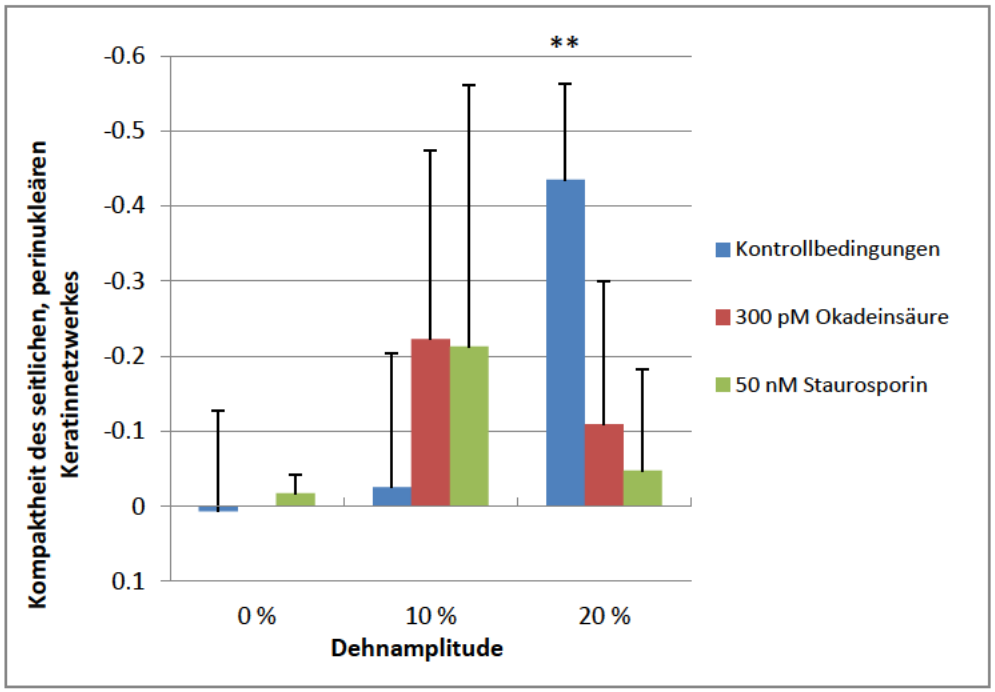

Abbildung 36: Kompaktheit des seitlichen, perinukleären Keratinnetzwerkes
Negative Werte stehen für eine Auflösung des seitlichen Bereichs des perinukleären Keratinnetzwerks, welche der Dehnung ausgesetzt sind. Unter Kontrollbedingungen verlieren die seitlichen Bereiche ab einer Dehnamplitude von 20 % an Kompaktheit. Nach Behandlung mit 300 pM Okadeinsäure oder 50 nM Staurosporin ist dies schon bei einer Dehnamplitude von 10 % festzustellen. Signifikanzwert p: ** = $p < 0,01$; nM = Nanomolar, pM = Pikomolar

Unter Kontrollbedingungen zeigen die Zellen sowohl im ungedehnten als auch nach Dehnung mit Dehnamplituden von bis zu 10 % ein symmetrisch gleichmäßig ausgeformtes K-Netzwerk im perinukleären Bereich. Da nur geringe bzw. keine Dehnung ausgeübt wird, ist das K-Netzwerk an allen Seiten gleich dicht ausgeformt. Ab einer Dehnamplitude von 20 % kommt es zu einer sprunghaften Veränderung jenes Bereiches, der der Dehnung ausgesetzt ist. Es kommt dort zu einer „Auflösung“ des K-Netzwerks, was sich in einem deutlich negativen Wert widerspiegelt. Bei höheren Dehnamplituden (Kontrollbedingungen wie auch bei den Versuchen mit Okadeinsäure und Staurosporin) wurde auf eine Bestimmung der Dichte des perinukleären K-Netzwerkes verzichtet, da hier ein kontrastärmeres Fluoreszenzsignal zu Problemen beim Einstellen des Grauwert-Schwellenwertes (siehe Kapitel 2.7.5) führte.

Wurden die Zellen über 2 Stunden mit 300 pM Okadeinsäure oder 50 nM Staurosporin inkubiert, konnte bereits bei einer Dehnamplitude von 10 % eine Abnahme der Dichte des seitlichen, perinukleären K-Netzwerks beobachtet werden. Bei weiter zunehmender Dehnamplitude zeigen die Zellen sowohl unter 300 pM Okadeinsäure als auch unter 50 nM Staurosporin eine Abnahme der Dichte an allen Seiten des perinukleären K-Netzwerkes. Diese Abnahme spiegelt sich in einem weniger negativen Wert wider. Allerdings traten hier bereits teilweise die obig erwähnten Probleme des kontrastarmen Fluoreszenzsignales auf. Der wichtigste Befund dieser Experimente ist die Tatsache, dass bei Behandlung mit Staurosporin oder Okadeinsäure die Dichte des perinukleären K-Netzwerkes bereits bei einer Dehnamplitude von 10 % abnimmt, im Gegensatz zu den Kontrollen, wo 20 % Dehnung benötigt werden.

Die Anzahl der untersuchten Zellen pro Versuch betrug unter Kontrollbedingungen: *ungedehnt:* 130, *10 % Dehung:* 141, *20 % Dehnung*: 140; nach Behandlung mit 300 pM Okadeinsäure: *ungedehnt*: 0, *10 % Dehnung:* 42, *20 % Dehnung:* 59; nach Behandlung mit 50 nM Staurosporin: *ungedehnt:* 50, *10 % Dehnung:* 65, *20 % Dehnung:* 30.

3.2.3 Längenzunahme von Keratinfilamenten nach Dehnung unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit Okadeinsäure und Staurosporin

Um die Längen einzelner K-Filamente in lebenden Zellen während des Dehnvorganges zu beobachten, wurden die Zellen mit den in Kapitel 2.3.1 beschriebenen Plasmiden (pK8-eCFP und pK18-eYFP) transfiziert. Dann wurde an zwei klar identifizierbaren Strukturen an verschiedenen Positionen des Filamentes eine Längenmessung bei verschiedenen Dehnamplituden durchgeführt. Die verwendeten Strukturen waren das klar erkennbare Ende des K-Filaments an der Zellgrenze auf einer Seite und auf der anderen Seite beispielsweise eine Aufgabelung des K-Filaments. Da diese Messung voraussetzte, dass man K-Filamente klar erkennen kann, konnten diese Versuche nicht an Filamenten durchgeführt werden, die im Zellzentrum lagen, wo die Überlagerung mit anderen Filamenten die Beobachtung erschwerte. Wie in Abbildung 37 zu erkennen, nimmt die Filamentlänge besonders bei Dehnungen über 40 % stärker als die nominelle Dehnamplitude zu.

Folgende Anzahl an K-Filamenten wurden vermessen: *ungedehnt:* 27, *10 % Dehnung:* 10, *20 % Dehnung:* 27, *40 % Dehnung:* 27, *60 % Dehnung:* 24, *80 % Dehnung:* 21.

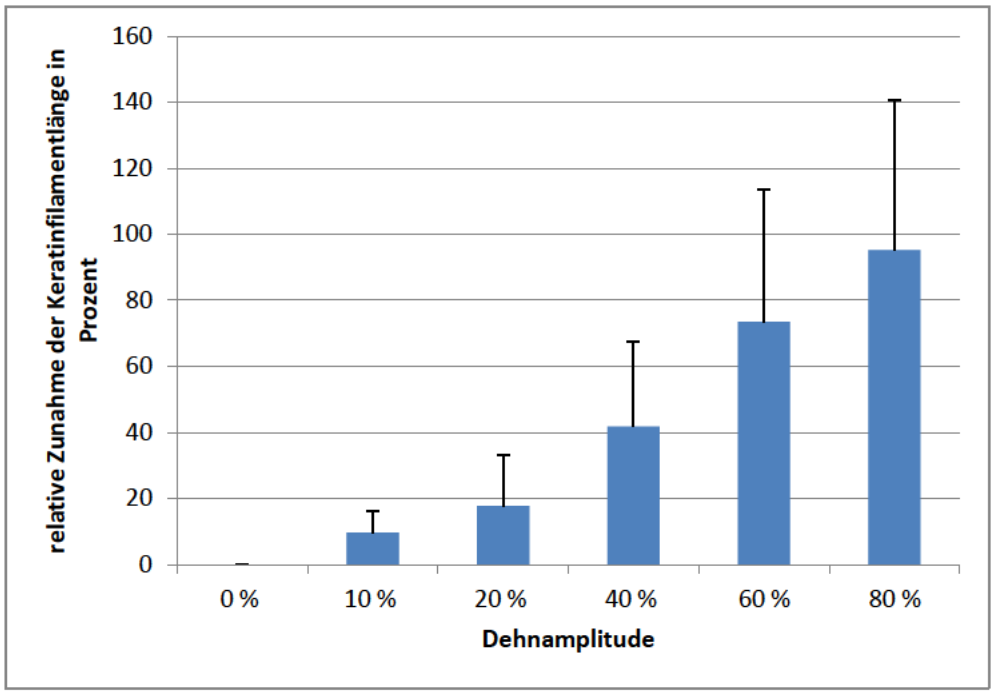

Abbildung 37: Relative Längenzunahme (Mittelwert ± std) einzelner Keratinfilamente bei Dehnung unter Kontrollbedingungen
Die Längenzunahme der Keratinfilamente entspricht den Dehnamplituden bis zu 40 %. Eine weitere Zunahme der Dehnamplitude führt zu einer überproportionalen Zunahme der Keratinfilamentlänge.

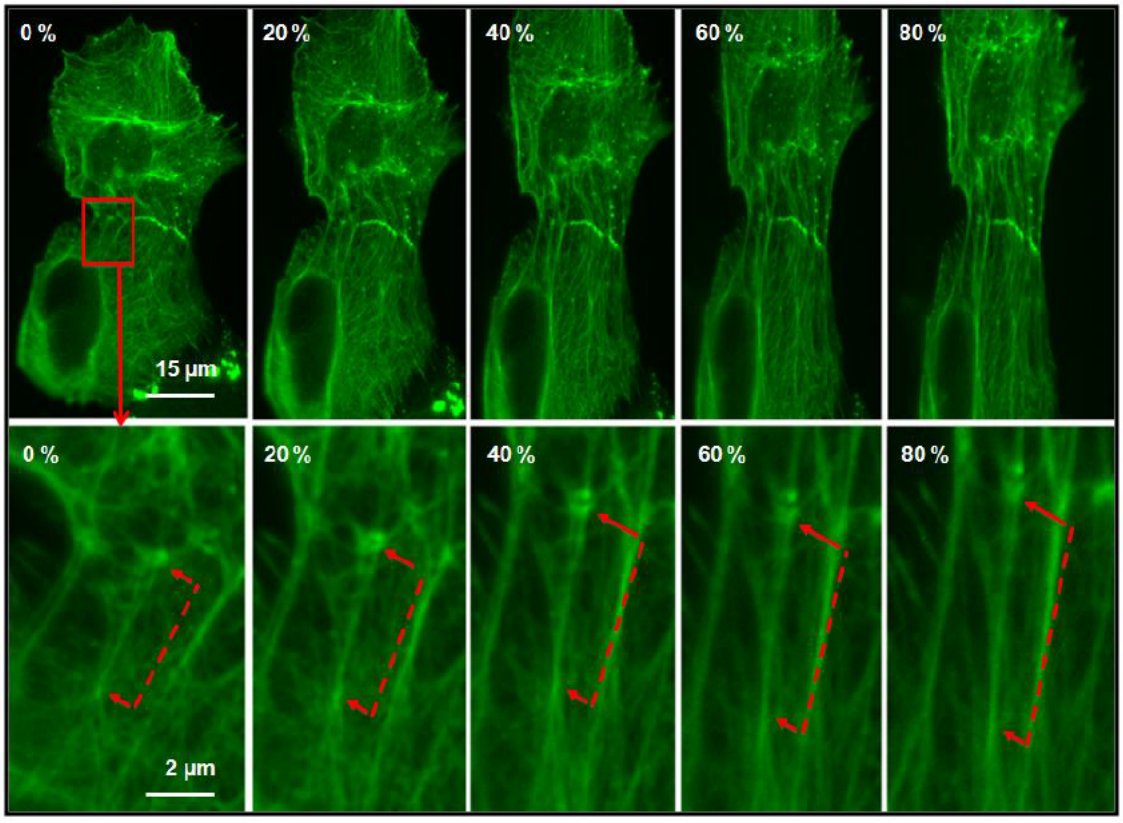

Abbildung 38: Beispiel einer Zelle unter Kontrollbedingungen, wie sie für die Filamentlängenmessung verwendet wurde.
In der unteren Bildreihe ist der in der ersten Übersichtsaufnahme rot umrahmte Bereich dargestellt. Die zwei Pfeile markieren jenen Bereich, der für die Längenmessung verwendet wurde. Der Abstand zwischen den Pfeilen ist an einem Ende durch die Zellgrenze und am anderen Ende durch eine Filamentaufgabelung definiert. Mit ansteigender Dehnamplitude ist eine Zunahme der Filamentlänge innerhalb der definierten Enden deutlich zu erkennen. Der Maßstab in der Teilabbildung oben links ist für alle Teilabbildungen dieser Reihe in horizontaler Richtung gültig. Der Maßstab in der Teilabbildung unten links ist für alle Teilabbildungen dieser Reihe in horizontaler Richtung gültig.

In Abbildung 38 sind zwei Zellen, wie sie für die K-Filamentlängenbestimmung verwendet wurden, exemplarisch dargestellt. In der oberen Reihe sind die beiden Zellen von links nach rechts in ungedehntem Zustand und nach Dehnung bei Dehnamplituden von 20 %, 40 %, 60 % und 80 % gezeigt. Mit zunehmender Dehnamplitude ist eine entsprechende Zunahme der Filamentlänge zu erkennen.

Die Inkubation der Zellen mit 300 pM Okadeinsäure oder 50 nM Staurosporin zeigte ähnliche Ergebnisse wie unter Kontrollbedingungen. Die Längenzunahme der K-Filamente entspricht sowohl nach Behandlung mit 300 pM Okadeinsäure, als auch nach Behandlung mit 50 nM Staurosporin den Dehnamplituden, wie aus den Abbildungen 39 und 40 ersichtlich ist. Eine überproportionale Längenzunahme ab einer Dehnamplitude von 60 %, wie es sich unter Kontrollbedingungen zeigte, konnte nach Inkubation mit Okadeinsäure oder Staurosporin nicht festgestellt werden.

Für die Messung nach Behandlung mit Okadeinsäure wurde die folgende Anzahl an K-Filamenten vermessen: *ungedehnt:* 11, *10 % Dehnung:* 11, *20 % Dehnung:* 11, *40 % Dehnung:* 13, *60 % Dehnung:* 12, *80 % Dehnung:* 9.

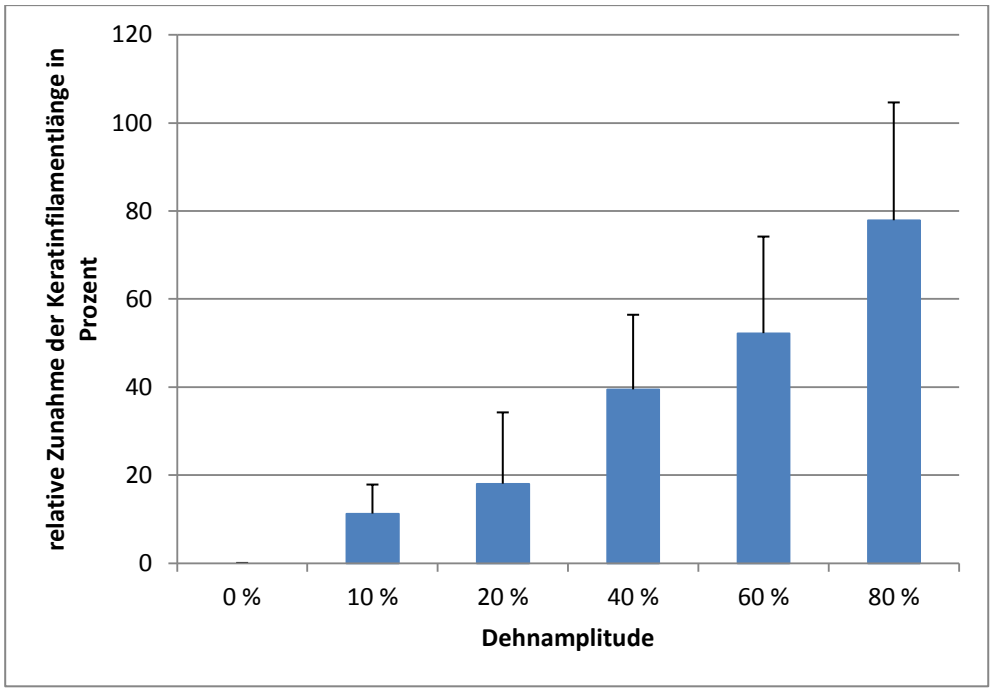

Abbildung 39: Relative Längenzunahme (Mittelwert ± std) einzelner Keratinfilamente bei Dehnung nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure
Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mittelwerte der Längenzunahme der Keratinfilamente den Dehnamplituden entsprechen. pM = Pikomolar

Für die Messung nach Behandlung mit Staurosporin wurde die folgende Anzahl an K-Filamenten vermessen: *ungedehnt:* 12, *10 % Dehnung:* 12, *20 % Dehnung:* 21, *40 % Dehnung:* 16, *60 % Dehnung:* 19, *80 % Dehnung:* 18.

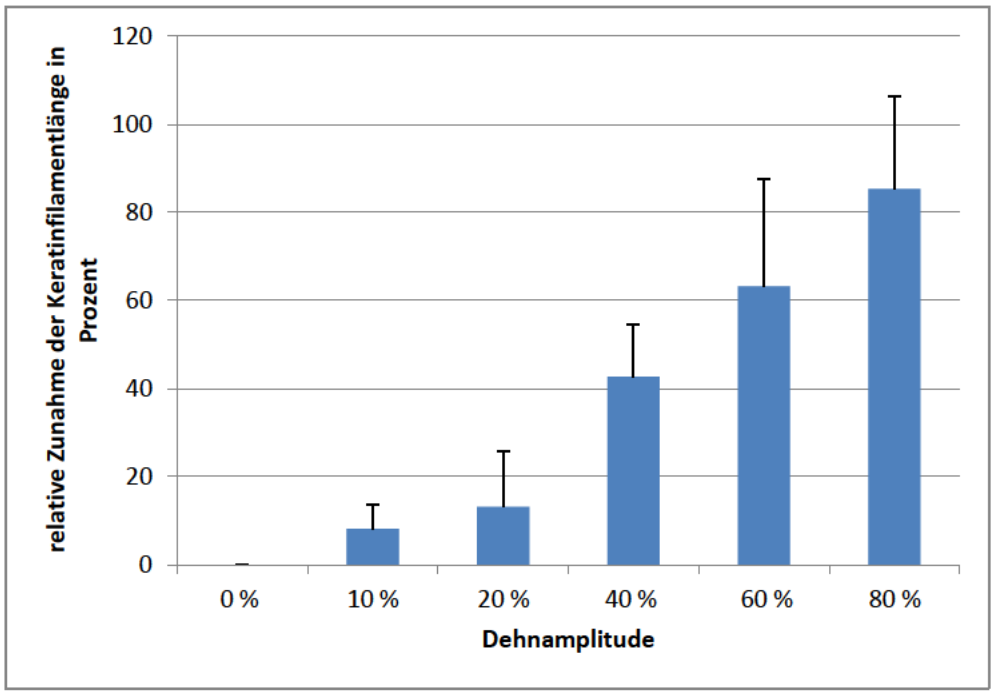

Abbildung 40: Relative Längenzunahme (Mittelwert ± std) einzelner Keratinfilamente bei Dehnung nach 2-stündiger Inkubation mit 50 nM Staurosporin
Die Mittelwerte der Längenzunahme einzelner Keratinfilamente entsprechen den angewandten Dehnamplituden. nM = Nanomolar

Vergleicht man nun die Mittelwerte der einzelnen Dehnamplituden nach Okadeinsäure- und Staurosporinbehandlung mit den unbehandelten Kontrollen, so sind die Unterschiede gering und statistisch nicht signifikant, auch nicht bei Dehnamplituden von 60 % und 80 %, wo unter Kontrollbedingungen eine überproportionale Zunahme der Filamentlänge zu beobachten war.

3.2.4 Verhalten der Keratinfilamente nach Relaxierung

Die unter Kapitel 3.2.3 beschriebenen Versuche zeigen, dass K-Filamente bei Zelldehnung an Länge zunehmen. Es war für die Untersuchungen von großem Interesse, ob diese gedehnten K-Filamente nach Relaxation, d.h. nachdem die Zelle wieder auf ihre ursprüngliche Dimension gebracht wurde, ihre ursprüngliche Länge einnehmen. Das würde bedeuten, dass die Filamente elastisch gedehnt werden. Die Zellen wurden für diese Experimente gedehnt und

relaxiert, wie in Kapitel 2.7.6 beschrieben. Die Experimente ergaben, dass besonders bei höheren Dehnamplituden die Filamente einen „gestauchten“ (welligen) Verlauf zeigten. Abbildung 41 zeigt Beispiele lebender Zellen (Transfektion der Zellen mit den Plasmiden pK8-eCFP und pK18-eYFP), die diese wellige Morphologie der K-Filamente bei verschiedenen Dehnamplituden teilweise aufweisen. Offensichtlich konnten die welligen Filamente nicht mehr in ihre ursprüngliche Länge zurückkehren und wurden unelastisch gedehnt.

Wie in Kapitel 2.7.6 beschrieben, wurde die relative Anzahl der Zellen mit welligen Filamenten bestimmt. Die K-Filamente wurden hier mit Immunofärbung markiert und die Ergebnisse sind in Abbildung 42 dargestellt. Ab einer Dehnamplitude von 40 % ist ein starker Anstieg an Zellen mit welligen Filamenten nach Relaxation zu verzeichnen. Mit zunehmender Dehnamplitude und auch zunehmender Dehndauer zeigen immer mehr Zellen pro Bildausschnitt diese Morphologie, sodass bei einer Dehnamplitude von 80 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden beinahe 95 % aller Zellen wellige Filamente zeigen. Dies ist auch in Abbildung 41 zu erkennen. Die weißen Pfeile weisen auf K-Filamente mit welliger Morphologie nach Relaxation hin. Man erkennt, dass nach Anwendung von Dehnamplituden von 10 % (Abbildung 41 A und B), 20 % (Abbildung 42C und D), sowie von 40 % (Abbildung 41E und F) die K-Filamente noch keine eindeutig wellige Morphologie aufweisen. Dies ändert sich bei Dehnamplituden von 60 % (Abbildung 41G und H) und 80 % (Abbildung 41I und J). Die welligen K-Filamente sind nach Relaxation sehr gut zu erkennen.

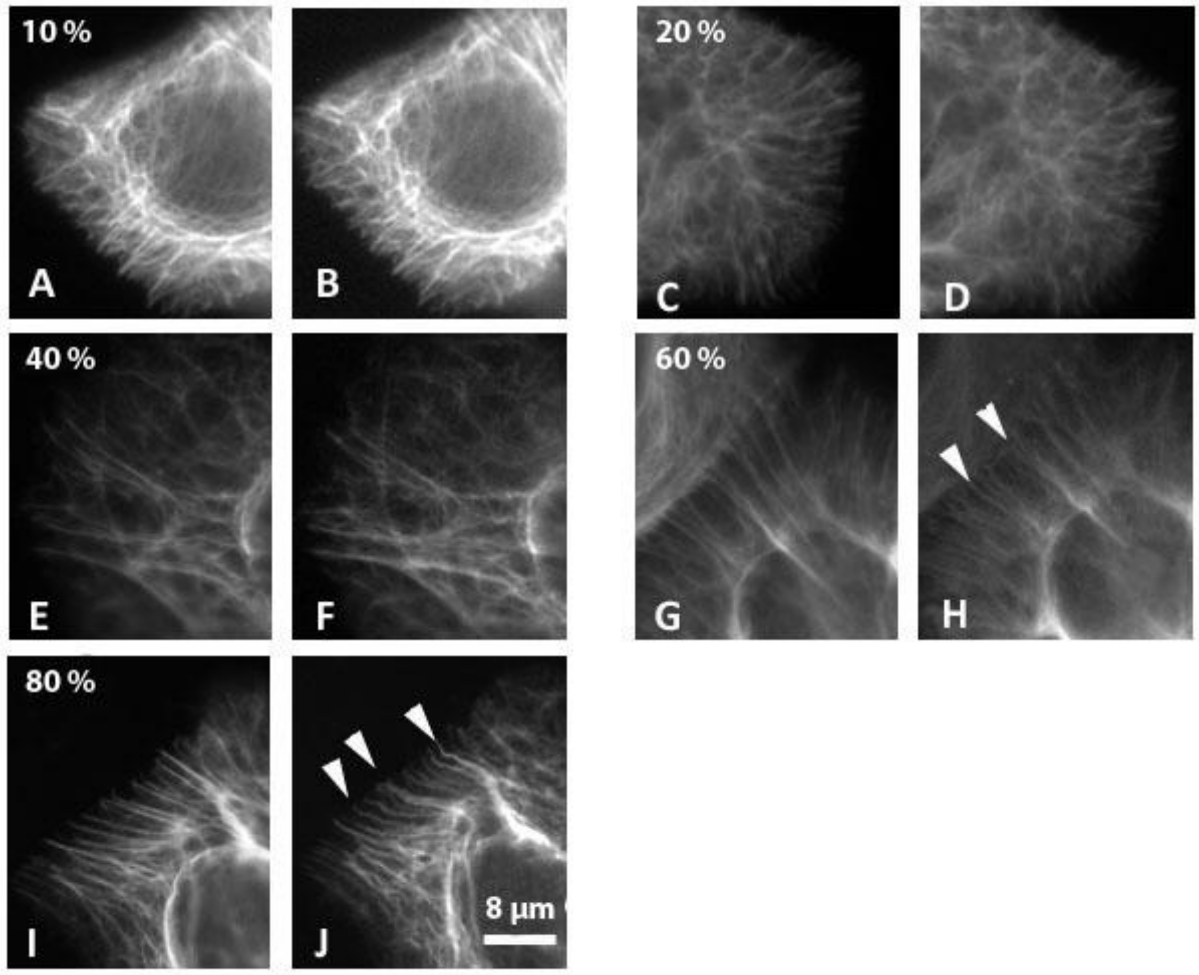

Abbildung 41: Keratinfilamentmorphologie nach Dehnung bei verschiedenen Dehnamplituden (Dehndauer 5 Sekunden) und anschließender Relaxation unter Kontrollbedingungen
In horizontaler Anordnung ist die gleiche Zelle vor Dehnung (links) und nach Relaxierung (rechts) zu sehen. Die Pfeile weisen auf Keratinfilamente mit welliger Morphologie hin. Ab einer Dehnamplitude von 60 % zeigen sich nach Relaxation wellige Keratinfilamente. Der Maßstab in Teilabbildung (J) ist für alle Teilabbildungen gültig. µm = Mikrometer

Pro Dehnamplitude und Dehndauer wurde folgende Anzahl an Zellen ausgewertet: *ungedehnt:* 101; *10 % Dehnung, 5 s:* 103; *10 % Dehnung, 180 s:* 131; *20 % Dehnung, 5 s*: 135; *20 % Dehnung, 180 s:* 122; *40 % Dehnung, 5 s:* 116; *40 % Dehnung, 180 s:* 126; *60 % Dehnung, 5 s:* 121; *60 % Dehnung, 180 s:* 148; *80 % Dehnung, 5 s*: 125; *80 % Dehnung, 180 s:* 127.

Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse für Zellen unter Kontrollbedingungen. Man kann erkennen, dass mit zunehmender Dehnamplitude und zunehmender Dehndauer immer mehr Zellen wellige K-Filamente nach Relaxation aufweisen. Eine statistisch signifikante Zunahme an Zellen mit welligen K-Filamenten tritt unter Kontrollbedingungen ab einer Dehnamplitude von 40 % und einer Dehndauer von 5 bzw. 180 Sekunden auf.

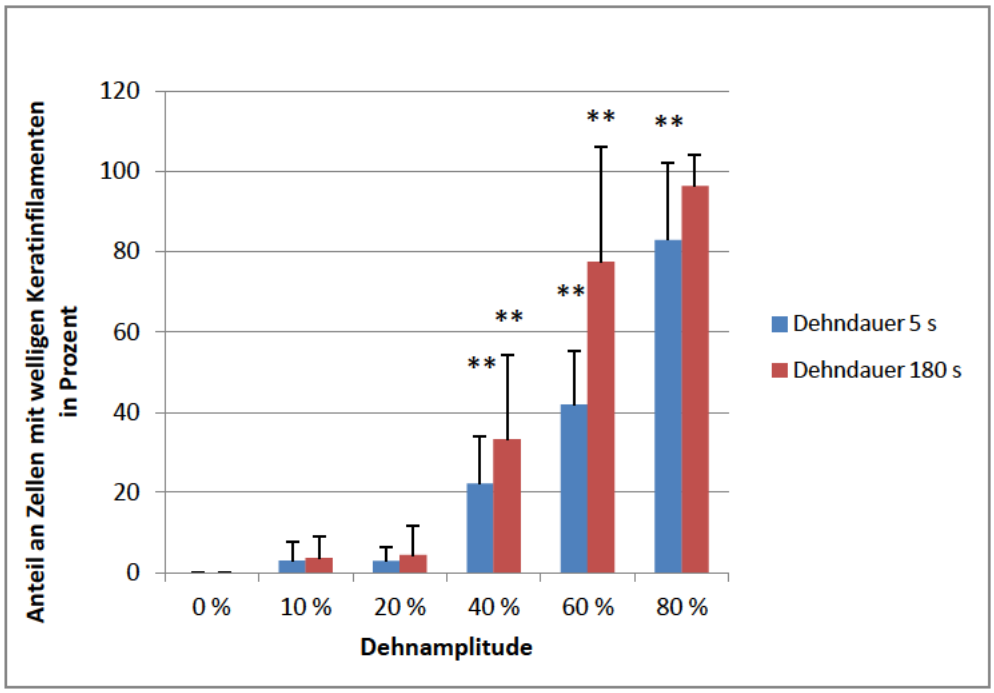

Abbildung 42: Prozentualer Anteil (Mittelwert ± std) an Zellen mit welligen Keratinfilamenten nach Dehnung und anschließender Relaxation bei einer Dehndauer von 5 und 180 Sekunden unter Kontrollbedingungen
Eine statistisch signifikante Zunahme zeigt sich ab einer Dehnamplitude von 40 % und einer Dehndauer von 5 bzw. 180 Sekunden. Eine weitere Zunahme der Dehnamplitude und eine Verlängerung der Dehndauer auf 180 Sekunden führen zu einer Zunahme der Zellen mit welligen Fasern. Statistisch getestet wurde im Vergleich zur vorhergehenden Dehnamplitude gleicher Dehndauer. Signifikanzwert p: ** = $p < 0{,}01$

Wurden, wie in Abbildung 43 dargestellt, die Zellen vor der Dehnung 2 Stunden mit 300 pM Okadeinsäure inkubiert, so zeigte sich, dass 4 % der Zellen bereits bei einer Dehnamplitude von 20 % und einer Dehndauer von 5 Sekunden wellige K-Filamente aufweisen. Eine höhere Dehnamplitude bzw. eine Verlängerung der Dehndauer verstärken wie unter Kontrollbedingungen diesen Effekt, sodass bei einer Dehnamplitude von 60 % und einer Dehndauer von 5 Sekunden nahezu 90 % aller Zellen wellige Filamente aufweisen. Eine Steigerung der Dehnamplitude auf 80 % zeigte keine signifikanten Unterschiede. Pro Dehnamplitude und Dehndauer wurde folgende Anzahl an Zellen ausgewertet: *ungedehnt:* 123; *10 % Dehnung, 5 s:* 111; *10 % Dehnung, 180 s:* 82; *20 % Dehnung, 5 s*: 108; *20 % Dehnung, 180s:* 109; *40 % Dehnung, 5 s:* 100; *40 % Dehnung, 180 s:* 105; *60 % Dehnung, 5 s:* 89; *60 % Dehnung, 180 s:* 92; *80 % Dehnung, 5 s*: 109; *80 % Dehnung, 180 s:* 98.

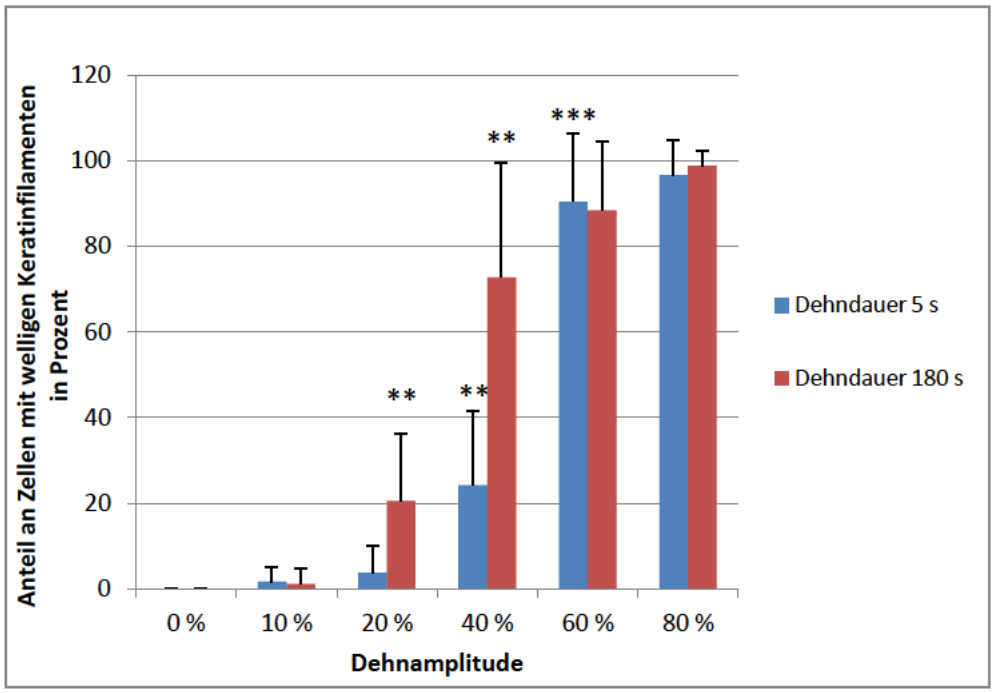

Abbildung 43: Prozentualer Anteil (Mittelwert ± std) an Zellen mit welligen Keratinfilamenten nach Dehnung und anschließender Relaxation bei einer Dehndauer von 5 und 180 Sekunden nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure

Ab einer Dehnamplitude von nur 20 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden kommt es zu einer statistisch signifikanten Zunahme an welligen Keratinfilamenten und somit bei geringeren Dehnamplituden als unter Kontrollbedingungen. Die Zunahme der Dehndauer verstärkt diesen Effekt der welligen Keratinfilamente. Statistisch getestet wurde stets im Vergleich zur vorhergehenden Dehnamplitude gleicher Dehndauer. Signifikanzwert p: ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; pM = Pikomolar

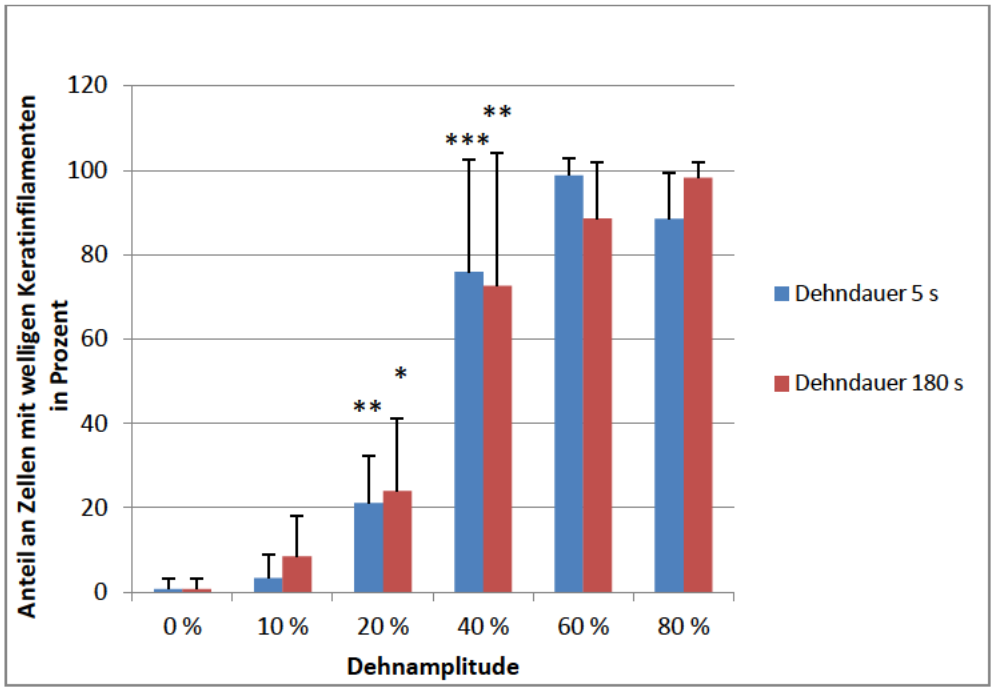

Abbildung 44: Prozentualer Anteil (Mittelwert ± std) an Zellen mit welligen Keratinfilamenten nach Dehnung und anschließender Relaxation und einer Dehndauer von 5 und 180 Sekunden nach 2-stündiger Inkubation mit 50 nM Staurosporin

Eine statistisch signifikante Zunahme der Anzahl an Zellen mit welligen Keratinfilamenten zeigt sich bereits ab einer Dehnamplitude von 20 % und einer Dehndauer von 5 Sekunden und tritt somit ebenfalls früher als unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Okadeinsäure auf. Eine Dehndauer von 180 Sekunden führt ebenso zu einer Verstärkung dieses Effektes. Statistisch getestet wurde stets im Vergleich zur vorhergehenden Dehnamplitude gleicher Dehndauer. Signifikanzwert p: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; nM = Nanomolar

Wie in Abbildung 44 zu sehen, zeigt sich nach Inkubation mit 50 nM Staurosporin über 2 Stunden ein ähnliches Bild wie bei Behandlung mit 300 pM Okadeinsäure. Auch bei 50 nM Staurosporin ist das Phänomen der welligen Filamente bereits ab einer Dehnamplitude von 20 % und einer Dehndauer von 5 Sekunden mit einer ähnlich großen Häufigkeit zu sehen und somit bei deutlich geringeren Dehnamplituden als unter Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Okadeinsäure. Die Häufigkeit nimmt ebenso mit Zunahme von Dehnamplitude und Dehndauer zu, wobei bereits ab 40 % Dehnung keine signifikante Zunahme an Zellen mit welligen Fasern zu erkennen ist. Pro Dehnamplitude und Dehndauer wurde folgende Anzahl an Zellen ausgewertet: *ungedehnt:* 103; *10 % Dehnung, 5 s:* 96; *10 % Dehnung, 180 s:* 114; *20 % Dehnung, 5 s*: 133; *20 % Dehnung, 180 s:* 113; *40 % Dehnung, 5 s:* 129; *40 % Dehnung, 180 s:* 98; *60 % Dehnung, 5 s:* 107; *60 % Dehnung, 180 s:* 125; *80 % Dehnung, 5 s*: 117; *80 % Dehnung, 180 s:* 105.

4. Diskussion

Das K-Netzwerk in eukaryonten Zellen verleiht den Zellen mechanische Stabilität und dient als Schutz vor mechanischer Beanspruchung jeglicher Art. Genetische Erkrankungen, bei welchen durch Mutation in den entsprechenden Genen eine Störung der Synthese normaler K vorliegt, zeigen eine verminderte Stabilität der Zellen gegenüber mechanischer Beanspruchung, wie zum Beispiel bei der Epidermolysis bullosa simplex, wo Mutationen, wie z. B. eine Aminosäurensubstitution (Cystein statt Arginin an Position 125 in K 14), einen Verlust an mechanischer Stabilität verursacht (Ma et al. 2001).

Auch andere Organe, wie z.B. die Leber sind von K-Mutationen betroffen bzw. spielt K ein Rolle bei pathologischen Prozessen in diesen Organen (Green et al. 2005). Es ist daher offensichtlich, dass die mechanischen Eigenschaften von IF im Allgemeinen und der K im Speziellen von großer pathophysiologischer Bedeutung sind. Bis dato wurden mechanische Eigenschaften von IF fast ausnahmslos nur in vitro untersucht (Details weiter unten). Es war daher die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, die mechanischen Eigenschaften auch in lebenden Zellen zu untersuchen, wobei soviel Parameter wie möglich erfasst werden sollten. Da K-Phosphorylierung die bekannteste posttranskriptionale Modifikation von K darstellt (Detail in Kapitel 1.5.1), war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die Effekte von K-Phosphorylierung auf die mechanischen Eigenschaften der K-Filamente zu untersuchen. Wir verwendeten den Phosphataseinhibitor Okadeinsäure um K-Phosphorylierung zu induzieren und den Kinasehemmer Staurosporin um K zu dephosphorylieren.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden SCC-25-Zellen auf Silikonmembranen kultiviert. Die Silikonmembranen konnten mit Hilfe eines computergesteuerten Zelldehnungsapparates gedehnt werden (Gerstmair et al. 2009). Damit die Zellen auf den Silikonmembranen adhärierten, mussten diese zuvor mit Fibronektin, wie in Kapitel 2.1.3 beschrieben, beschichtet werden. Um zu gewährleisten, dass es während des Dehnvorganges zu keinem Ablösen der Zellen von der Silikonmembran kam, überprüften wir die Zellhaftung, indem wir den Zelldurchmesser parallel und rechtwinklig zur Dehnungsachse an ungedehnten und gedehnten Zellen vermaßen. Hierzu wurden die Zellen direkt nach Durchführung des Experiments fixiert und die K-Filamente mittels Immunofluoreszenz markiert. Anschließend ermittelten wir den relativen Zelldurchmesser und errechneten den

Mittelwert (siehe Abbildungen 23 und 25). Weder unter Kontrollbedingungen, noch unter Anwesenheit von 300 pM Okadeinsäure oder 50 nM Staurosporin unterschied sich die Zelldehnung von der nominellen Dehnamplitude. Daher konnte ein Loslösen der Zellen während des Dehnvorganges bei allen Dehnamplituden und Dehndauern ausgeschlossen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Felder et al. 2008; Fudge et al. 2008), die ebenfalls zeigen konnten, dass das Beschichten von elastischen Silikonmembranen mit Fibronektin genügt, um eine ausreichend gute Zellhaftung zu gewährleisten.

Die Kompression der Zellen rechtwinklig zur Dehnungsachse kann durch die seitliche Kompression der Silikonmembran unter Dehnung erklärt werden (Poisson Effekt) und entspricht den Werten, die in einer früheren Arbeit für diese Membran ermittelt wurden (Gerstmair et al. 2009).

Bevor die Dehnungseigenschaften der K-Filamente untersucht werden konnten, musste außerdem noch sichergestellt werden, dass die Dehnung der Silikonmembran zu keiner Schädigung der Zellen führt. Um geschädigte Zellen identifizieren zu können, wurde der DNA-Farbstoff Ethidiumbromid verwendet, der während des Dehnvorganges in der Badlösung vorlag und nur bei Verletzung der Zellmembran den Zellkern anfärbte. In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unabhängig von der Dehnamplitude oder der Dehndauer zu keiner signifikanten Zunahme geschädigter SCC-25-Zellen im Vergleich zu ungedehnten Zellen kam (Abbildung 20). Die Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Fudge et al. 2008), wo an NEB-1-Zellen gezeigt werden konnte, dass sogar uniaxiale Dehnamplituden von bis zu 126 % zu keiner nennenswerten Zellschädigung führten.

Das K-Netzwerk von ungedehnten Zellen ist nicht straff gespannt, sodass geringe Dehnamplituden nicht sofort direkt auf die K-Filamente wirken. Um feststellen zu können, welche Dehnamplitude zu einer Längenzunahme der K-Filamente führt bzw. bis zu welcher Dehnamplitude die Dehnung durch das Geradeziehen anfänglich gekrümmter K-Filamente kompensiert wird, wurde die Krümmung der K-Filamente von ungedehnten Zellen sowie von Zellen mit unterschiedlichen Dehnamplituden und Dehndauern vermessen. Wir teilten die K-Filamente anhand ihrer Orientierung zur Dehnungsachse in drei Untergruppen auf: 0 - 30°, 30 - 60° und 60 - 90°. Zwischen den drei Untergruppen konnte kein nennenswerter Unterschied festgestellt werden, sodass auf die drei Untergruppen nicht gesondert eingegangen wird.

Unter Kontrollbedingungen zeigte sich bei einer Dehndauer von 5 bzw. 180 Sekunden (Abbildungen 30 bzw. 31), dass unabhängig von der Dehndauer eine Dehnung von 10 % ausreichend ist, um die anfänglich vorhandene Krümmung peripherer K-Filamente aufzuheben. Auch bei steigender Dehnamplitude kam es zu keiner weiteren Abnahme der Krümmung peripherer K-Filamente. Somit kann man davon ausgehen, dass ab einer Dehnamplitude von 10 % bereits Zugspannung an den K-Filamenten anliegt und es bei einer Erhöhung der Dehnamplitude zu einer realen Längenzunahme der K-Filamente kommt. Weder die Behandlung mit Okadeinsäure noch mit Staurosporin hatten darauf einen Einfluss.

Bereits in einer früheren Arbeit (Felder et al. 2008) zeigte sich, dass die K-Filamente bei einer Dehnung von 10 % die vorhandene Krümmung verloren. Interessanterweise verringerte sich die Krümmung der peripheren K-Filamente in dieser Studie bei 20 % Dehnung. Dieser unterschiedliche Befund, verglichen zu unserer Arbeit, kann eventuell durch die unterschiedliche Dehnungsart erklärt werden (equibiaxial statt uniaxial). Außerdem wurden in dieser Studie Primärzellen aus der Lunge (Alveolarepithelzellen Typ II) verwendet, die einem völlig anderem Epitheltyp entstammen. Messungen des desmosomalen Spaltes, wie sie in der oben erwähnten Arbeit durchgeführt wurden, waren bei SCC-25-Zellen nicht möglich, da die räumliche Orientierung der Desmosomen und deren Länge eine Messung unmöglich machten.

Das K-Netzwerk in Zellen formt typischerweise ein Hülle um den Zellkern. Bei Betrachtung der gedehnten Zellen fiel auf, dass sich dieses perinukleäre K-Netzwerk bei Zelldehnung veränderte, sodass jene Seiten, die der Dehnungsachse zugewandt waren, dünner erschienen. Um diesen Effekt zu quantifizieren, bestimmten wir die Dichte des K-Netzwerkes in dieser Zellregion nach Dehnung. Es konnte gezeigt werden, dass es unter Kontrollbedingungen zu einer „Ausdünnung“ des K-Netzwerks im Bereich dieser Kernhülle ab einer Dehnamplitude von 20 % an jenen Seiten kam, die der Dehnung zugewandt waren. Diese Beobachtung wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben und wir interpretieren dieses Phänomen als ein dehnungsinduziertes Aufreißen der K-Kernhülle. Nach Inkubation der Zellen mit 300 pM Okadeinsäure oder 50 nM Staurosporin konnte dieser Effekt schon bei einer Dehnamplitude von 10 % beobachtet werden (Abbildung 36). Aufgrund der schlechteren Bildqualität bei höheren Dehnamplituden konnte die Methode nur bei Dehnamplituden bis 20 % angewandt werden. Wir gehen aber von einer Verstärkung des Effekts bei höheren Dehnamplituden aus.

Alle oben erwähnten Effekte beschreiben wohl eine dehnungsinduzierte Veränderung des K-Netzwerks, allerdings beschreibt kein Parameter eine echte Dehnung der K-Filamente im Sinne einer tatsächlichen Veränderung der K-Filamentlänge. Wie bereits in der Einleitung ausführlich beschrieben, ist gerade die Frage von K-Filamentdehnung in lebenden Zellen von bisherigen Studien nicht beantworten worden. Stattdessen wurden die meisten Studien an einzelnen isolierten Filamenten durchgeführt. Diese in vitro Experimente zeigen, dass K-Filamente eine Verlängerung auf das ca. 2,5-fache ertragen ohne zu reißen (Fudge et al. 2003; Kreplak et al. 2005; Kreplak u. Fudge 2007). Ferner verblieben einmal gedehnte K-Filamente über Stunden in diesem Zustand ohne ihre ursprüngliche Länge wieder einzunehmen, weshalb man von einer irreversiblen Dehnung bei Dehnamplituden auf das 2,8-fache ausgehen kann.

In Dehnexperimenten mit K aus Haaren, konnte gezeigt werden, dass es bei Dehnung zu einer Umwandlung der α-helikalen Struktur in eine β-Faltblattstruktur kommt (Bendit 1960). Andere Experimente zeigen, dass es bei IF in vitro ab Dehnamplituden von 30 bis 40 % zu einer irreversiblen α-β-Umwandlung kommt, wobei kleinere Amplituden nur zu elastischem Dehnverhalten führen (Fudge et al. 2003). Beim heutigen Wissenstand ist es nicht klar, was eine elastische Dehnung auf molekularem Niveau bewirkt. Ein Gleiten von Untereinheiten der IF (Hohenadl et al. 1999) wird ebenso angenommen, wie ein elastisches Verhalten der head- und tail-Domänen (Fudge et al. 2003).

Um die Längenzunahme einzelner K-Filamente während der Dehnung beschreiben zu können, verwendeten wir in unseren Versuchen Zellen, welche mit den Plasmiden pK8-eCFP und pK18-eYFP transfiziert wurden. Somit konnten wir die Länge einzelner K-Filamente direkt vor, während und nach der Dehnung in lebenden Zellen bestimmen. Aus methodischen Gründen mussten wir uns auf K-Filamente in der Zellperipherie beschränken, weil nur dort die Messung an zwei klar bestimmbaren Teilen des Filaments möglich war. Das waren z. B. das Ende des K-Filaments an der Zellgrenze und eine Aufgabelung des K-Filaments. Sollte es während des Dehnungsvorganges zu einem Aufspalten der K-Filamente an der Gabelungsstelle kommen, was einer unerwünschten Verschiebung des Messpunktes entsprechen würde, so würde dies zu einer reduzierten Verlängerung des Filaments führen. Da es aber, wie unten erläutert, ohnehin zu einer überproportionalen Dehnung der Filamente kam, vernachlässigten wir diese potentielle Fehlerquelle. Abbildung 37 zeigt, dass die Längenzunahme der K-Filamente bis zu einer Dehnamplitude von 40 % den nominellen Dehnamplituden entspricht.

Interessanterweise kam es bei Dehnamplituden über 60 % zu einer überproportionalen Zunahme der Filamentlänge (bei einer Dehnamplitude von 60 % um den Faktor 1,74 und bei einer Dehnamplitude von 80 % um den Faktor 1,95). Wir erklären uns dieses Phänomen durch eine geringere Dehnung des K-Netzwerks in anderen (nicht peripheren) Bereichen der Zelle. Nach Behandlung mit Okadeinsäure (Abbildung 39) bzw. Staurosporin (Abbildung 40) wurden die Filamente nicht überproportional gedehnt, wobei der Effekt nach Behandlung mit Okadeinsäure ausgeprägter war. Allerdings war dieser Unterschied zwischen Kontrollbedingungen und nach Behandlung mit Okadeinsäure oder Staurosporin statistisch nicht signifikant.

Nach Messung der dehnungsbedingten Verlängerung der K-Filamente in lebenden Zellen stellte sich abschließend die Frage, ob es sich bei der Verlängerung von K-Filamenten um eine plastische (irreversible) oder eine elastische (reversible) Dehnung handelt. Hierzu wurden Zellen wiederum mit verschiedenen Dehnamplituden und Dehndauern gedehnt und anschließend innerhalb von 5 Sekunden relaxiert. Die Dehnprotokolle sind in den Abbildungen 10 und 11 veranschaulicht. Es zeigte sich, dass gedehnte K-Filamente nicht sofort wieder in ihre Ausgangslänge zurückkehren konnten. Je größer die Dehnamplitude und je länger die Dehndauer, desto eher zeigten die ursprünglich geraden K-Filamente nach Relaxation eine wellige, gestauchte Morphologie, wie sie in Abbildung 41 bei K-Filamenten von transfizierten Zellen dargestellt ist.

Abbildung 42 stellt die Resultate der Experimente unter Kontrollbedingungen dar. Eine signifikante Zunahme der Zellen mit welligen K-Filamenten ist ab einer Dehnamplitude von 40 % und einer Dehndauer von 5 Sekunden zu verzeichnen.

Sowohl Okadeinsäure (Abbildung 43) als auch Staurosporin (Abbildung 44) führten zu einer Verstärkung der Welligkeit. Okadeinsäure führt bereits bei einer Dehnamplitude von 20 % und einer Dehndauer von 180 Sekunden zu einem signifikanten Anstieg an Zellen mit welligen K-Filamenten. Bei Staurosporin zeigte sich der Effekt bei 20 % Dehnung und einer Dehndauer von nur 5 Sekunden.

Die Veränderung des Phosphorylierungszustandes der K-Filamente scheint somit die elastischen Eigenschaften der K-Filamente zu verändern. Sowohl bei einer verminderten als auch bei einer verstärkten Phosphorylierung führt bereits eine geringere Dehnamplitude zu einer plastischen Verformung der K-Filamente.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Dehnamplituden bis 80 % zu keiner signifikanten Zunahme der Zellschädigung und zu keinem Loslösen der Zellen während des Dehnvorganges führen. Die Krümmung peripherer K-Filamente ist bereits bei Dehnamplituden von 10 % unabhängig vom Phosphorylierungszustand der Zellen nicht mehr zu beobachten. Zu Veränderungen im perinukleären K-Netzwerk kommt es bei Dehnamplituden von 20 % unter Kontrollbedingungen und bei Dehnamplituden von 10 % nach 2-stündiger Inkubation mit 300 pM Okadeinsäure oder 50 nM Staurosporin. Betrachtet man K-Filamente in lebenden Zellen direkt vor und nach Dehnung, so kann man eine Zunahme der Filamentlänge nachweisen, wobei eine Dehnamplitude ab 60 % bei den Kontrollen zu einer überproportionalen Längenzunahme führt. Ferner konnte gezeigt werden, dass es ab Dehnamplituden von 40 % unter Kontrollbedingungen zu einer plastischen Dehnung der K-Filamente kommt. Eine verminderte oder auch verstärkte Phosphorylierung führt bereits bei geringeren Dehnamplituden zu dieser plastischen Verformung.

Diese Beschreibung des Verhaltens von K-Filamenten bei Dehnung in lebenden Zellen gehört zu den ersten ihrer Art. Neben der Charakterisierung des Dehnverhaltens von K-Filamenten und dem Einfluss der Phosphorylierung auf manchen Dehnparameter waren auch einige methodische Aspekte der Arbeit wissenschaftliches Neuland. Manche der Ergebnisse bleiben im Moment noch ohne klare Interpretation, bilden aber die Grundlage für mehrere Folgestudien und sind vielleicht Basis in der weiteren Erforschung und Therapieoptimierung von Erkrankungen wie der Epidermolysis bullosa simplex. Die Publikation von Teilen dieser Dissertation (Fois u. Weimer et al. 2013; Doppelerstautorenschaft) unterstreicht die wissenschaftliche Bedeutung vorliegender Arbeit.

5. Zusammenfassung

Das Keratinnetzwerk (K-Netzwerk) in eukaryonten Zellen verleiht den Zellen Schutz vor mechanischer Beanspruchung. Um das Verhalten von K-Filamenten bei mechanischer Zelldehnung in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden die SCC-25-Zellen (SCC = squamos cell carcinoma) auf Silikonmembranen kultiviert und mit Hilfe eines computergesteuerten Zelldehnungsapparates gedehnt. Da K-Phosphorylierung die wichtigste posttranskriptionale Veränderung von K darstellt, wurden die Zellen außerdem vor Durchführung der Dehnexperimente in 50 nM Staurosporin, einem Inhibitor der Phospholipid/Calcium-abhängigen Proteinkinase C, sowie in 300 pM Okadeinsäure, einem Phosphataseinhibitor, inkubiert.

Um auszuschließen, dass sich die Zellen während des Dehnvorganges ablösen, wurde der Zelldurchmesser bei verschiedenen Dehnamplituden bestimmt und mit der nominellen Dehnamplitude verglichen. Die Versuche hierzu zeigten, dass sowohl bei Kontrollen als auch bei Okadeinsäure- oder Staurosporin-behandelten Zellen die nominelle Dehnung mit der tatsächlichen Dehnung übereinstimmte und es somit zu keinem Verlust der Zellhaftung kam. Von ebenfalls großer Bedeutung war es, ob es durch die Dehnung zu einer Schädigung der Zellen kommen würde. Hierzu wurden Zellen mit verschiedenen Dehnamplituden und Dehnzeiten gedehnt und die Aufnahme des Kernfarbstoffes Ethidiumbromid bestimmt. Da Ethidiumbromid membranimpermeabel ist, werden nur Zellen mit beschädigter Zellmembran angefärbt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei keiner Dehnamplitude oder Dehndauer zu einer signifikanten Zunahme an geschädigten Zellen kam.

Da das K-Netzwerk von ungedehnten Zellen nicht straff gespannt ist, musste zunächst festgestellt werden, ab welcher Dehnamplitude die K-Filamente in der Zelle „gerade“ gezogen werden. Hierfür wurde die Krümmung der peripheren K-Filamente von ungedehnten und gedehnten Zellen verglichen und bestimmt, ab welcher Dehnamplitude und Dehndauer die Filamente gerade gezogen werden und somit eine weitere Dehnung zu einer tatsächlichen Verlängerung der K-Filament führt. Sowohl bei Kontrollen als auch bei Zellen, die mit Okadeinsäure und Staurosporin behandelt worden waren, zeigte sich, dass eine Dehnamplitude von 10 % ausreicht, um das K-Netzwerk straff zu ziehen.

K bildet eine massiv ausgeformte Kernhülle und so galt unser Interesse auch der dehnungsbedingten Veränderung dieser Struktur. In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass es unter Kontrollbedingungen ab einer Dehnamplitude von 20 % zu einer Beeinträchtigung des perinukleären K-Netzwerks kam. Jene Seiten der Kernhülle, die der Dehnungsrichtung zugewandt waren, verloren an Kompaktheit, da die K-Filamente offensichtlich durch die Dehnung von der Kernhülle weggezogen wurden. Diese Ergebnisse lassen auf einen Beitrag des perinukleären K-Netzwerkes zur dehnungsbedingten Längenzunahme des gesamten K-Netzwerkes schließen. Wir konnten außerdem zeigen, dass der Effekt auf die Kernhülle offensichtlich durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung beeinflusst wird, da hier dieser Effekt schon bei einer Dehnamplitude von 10 % beobachtet werden konnte.

Nach der Quantifizierung der oben genannten Parameter, die nicht direkt mit der Längenveränderung einzelner K-Filamente zu tun haben, konzentrierten wir uns nun auf die tatsächliche Dehnung einzelner K-Filamente. Die Länge von fluoreszenzproteinmarkierten K-Filamenten wurde bei verschiedenen Dehnamplituden gemessen und mit der nominellen Dehnamplitude verglichen. Sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach 2-stündiger Inkubation mit Okadeinsäure oder Staurosporin entsprach die Verlängerung der K-Filamente der nominellen Dehnamplitude, wobei sich unter Kontrollbedingungen ab Dehnamplituden von 60 % eine moderate Überdehnung zeigte.

Um festzustellen, ob die Längenveränderung der K-Filamente reversibel ist, untersuchten wir schließlich noch das Verhalten der K-Filamente nach Relaxation einer 60-sekündigen Dehnung von 80 %. Gedehnte und anschließend relaxierte K-Filamente kehrten nicht in ihre Ausgangslänge zurück, sondern waren wellig gewunden. Sowohl Okadeinsäure als auch Staurosporin bewirkten, dass der Effekt bereits bei einer niedrigeren Dehnamplitude und Dehndauer beobachtet werden konnte.

6. Literaturverzeichnis

1. Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ: Image processing with ImageJ. Biophotonics Int 11: 36-42 (2004)
2. Aebi U, Cohn J, Buhle L, Gerace L: The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. Nature 323: 560-564 (1986)
3. Aebi U, Fowler WE, Rew P, Sun TT: The fibrillary substructure of keratin filaments unraveled. J Cell Biol 97: 1131–1143 (1983)
4. Ahvazi B, Boeshans KM, Idler W, Baxa U, Steinert PM: Roles of calcium ions in the activation and activity of the transglutaminase 3 enzyme. J Biol Chem 278: 23834–23841 (2003)
5. Baden HP, Lee LD, Kubilus J: The fibrous proteins of stratum corneum. J Invest Dermatol 67: 573–576 (1976)
6. Bendit EG: A quantitative x-ray diffraction study of the alpha-beta transformation in wool keratin. Text Res J 30: 547–555 (1960)
7. Bendit EG: The α-β transformation in keratin. Nature 179: 535 (1957)
8. Bialojan C, Takai A: Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. Biochem J 256: 283-290 (1988)
9. Bowden PE, Quinlan RA, Breitkreutz D, Fusenig NE: Proteolytic modification of acidic and basic keratins during terminal differentiation of mouse and human epidermis. Eur J Biochem 142: 29-36 (1984)
10. Bragulla HH, Homberger DG: Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. J Anat 214: 516-559 (2009)
11. Busch T, Armacki M, Eiseler T, Joodi G, Temme C, Jansen J, von Wichert G, Omary MB, Spatz J, Seufferlein T: Keratin 8 phosphorylation regulates keratin reorganization and migration of epithelial tumor cells. J Cell Sci 125: 2148–2159 (2012)
12. Buxman MM, Wuepper KD: Keratin cross-linking and epidermal transglutaminase. A review with observations on the histochemical and immunochemical localization of the enzyme. J Invest Dermatol 65: 107–112 (1975)
13. Cheng JJ, Wung BS, Chao YJ, Wang DL: Sequential activation of protein kinase C (PKC)-alpha and PKC-epsilon contributes to sustained Raf/ERK1/2 activation in endothelial cells under mechanical strain. J Biol Chem 276: 31368-31375 (2001)

14. Chou CF, Smith AJ, Omary MB: Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. J Biol Chem 267: 3901-3906 (1992)
15. Chu PG, Weiss LM: Keratin expression in human tissues and neoplasms. Histopathology 40: 403-439 (2002)
16. Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y: Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. Trends Biochem Sci 15: 98-102 (1990)
17. Cohen P, Klumpp S, Schelling DL: An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. FEBS Lett 250: 596-600 (1989)
18. Coulombe PA, Fuchs E: Elucidating the early stages of keratin filament assembly. J Cell Biol 111: 153–169 (1990)
19. Coulombe PA, Kopan R, Fuchs E: Expression of keratin K14 in the epidermis and hair follicle: Insights into complex programs of differentiation. J Cell Biol 109: 2295–2312 (1989)
20. Coulombe PA, Omary MB: 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. Curr Opin Cell Biol 14: 110–122 (2002)
21. Coulombe PA, Wawersik M, Paladini RD, Noensie E: Type I keratin 16 forms relatively unstable tetrameric assembly subunits with various type II keratin partners: biochemical basis and functional implications. Biol Bull 194: 364–365 (1998)
22. Cruz PG, Norte M, Creus AH, Fernandez JJ, Daranas AH: Self-association of okadaic acid: structural and pharmacological significance. Mar Drugs 11: 1866-1877 (2013)
23. Dale BA, Holbrook KA, Kimball JR, Hoff M, Sun TT: Expression of epidermal keratins and filaggrin during human fetal skin development. J Cell Biol 101: 1257–1269 (1985)
24. Debus E, Weber K, Osborn M: Monoclonal cytokeratin antibodies that distinguish simple from stratified squamous epithelia: characterization on human tissues. EMBO J 1: 1641–1647 (1982)
25. Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvée A, Koteliansky V, Babinet C, Krieg T: Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentindeficient fibroblasts. J Cell Sci 111: 1897–1907 (1998)
26. Er Rafik M, Doucet J, Briki F: The intermediate filament architecture as determined by X-ray diffraction modeling of hard alpha-keratin. Biophys J 86: 3893–3904 (2004)
27. Felder E, Siebenbrunner M, Busch T, Fois G, Miklavc P, Walther P, Dietl P: Mechanical strain of alveolar type II cells in culture: changes in the transcellular cytokeratin network and adaptations. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295: 849-857 (2008)

28. Fois G, Weimer M, Busch T, Felder ET, Oswald F, von Wichert G, Seufferlein T, Dietl P, Felder E: Effects of keratin phosphorylation on the mechanical properties of keratin filaments in living cells. FASEB J 27: 1322-1329 (2013)
29. Fuchs E, Cleveland DW: A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science 279: 514-519 (1998)
30. Fuchs EV, Coppock SM, Green H, Cleveland DW: Two distinct classes of keratin genes and their evolutionary significance. Cell 27: 75–84 (1981)
31. Fudge D, Russell D, Beriault D, Moore W, Lane EB, Vogl AW: The intermediate filament network in cultured human keratinocytes is remarkably extensible and resilient. PLoS ONE 3: e2327. doi:10.1371/journal.pone.0002327 (2008)
32. Fudge DS, Gardner KH, Forsyth VT, Riekel C, Gosline JM: The mechanical properties of hydrated intermediate filaments: insights from hagfish slime threads. Biophys J 85: 2015-2027 (2003)
33. Funato N, Takayanagi H, Konda Y, Toda Y, Harigaya Y, Iwai Y, Omura S: Absolute configuration of staurosporine by X-ray analysis. Tetrahedron Lett 35: 1251-1254 (1994)
34. Gerstmair A, Fois G, Innerbichler S, Dietl P, Felder E: A device for simultaneous live cell imaging during uni-axial mechanical strain or compression. J Appl Physiol 107: 613–620 (2009)
35. Green KJ, Bohringer M, Gocken T, Jones JC: Intermediate filament associated proteins. Adv Protein Chem 70: 143-202 (2005)
36. Gu LH, Coulombe PA: Keratin function in skin epithelia: a broadening palette with surprising shades. Curr Opin Cell Biol 19: 13–23 (2007)
37. Hanukoglu I, Fuchs E: The cDNA sequence of a human epidermal keratin: divergence of sequence but conservation of structure among intermediate filament proteins. Cell 31: 243-252 (1982)
38. Hashimoto K, Mizuguchi R, Tanaka K, Dorman M: Palmoplantar keratoderma (Voerner) with composite keratohyalin granules: Studies on keratinization parameters and ultrastructures. J Dermatol 27: 1–9 (2000)
39. Hatzfeld M, Burba M: Function of type I and type II keratin head domains: Their role in dimer, tetramer and filament formation. J Cell Sci 107: 1959–1972 (1994)
40. Hatzfeld M, Franke WW: Pair formation and promiscuity of cytokeratins. J Cell Biol 101: 1826–1841 (1985)

41. He T, Stepulak A, Holmstrom TH, Omary MB, Eriksson JE: The intermediate filament protein keratin 8 is a novel cytoplasmic substrate for c-Jun N-terminal kinase. J Biol Chem 277: 10767–10774 (2002)
42. Herrmann H, Aebi U: Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. Curr Opin Struct Biol 8: 177-185 (1998)
43. Herrmann H, Aebi U: Intermediate Filaments: Molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. Annu Rev Biochem 73: 749-89 (2004)
44. Herrmann H, Häner M, Brettel M, Müller SA, Goldie KN, Fedtke B, Lustig A, Franke WW, Aebi U: Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. J Mol Biol 264: 933-953 (1996)
45. Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U: Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. J Clin Invest 119: 1772-1783 (2009)
46. Herrmann H, Wedig T, Porter RM, Lane EB, Aebi U: Characterization of early assembly intermediates of recombinant human keratins. J Struct Biol 137: 82–96 (2002)
47. Hohenadl M, Storz T, Kirpal H, Kroy K, Merkel R: Desmin filaments studied by quasi-elastic light scattering. Biophys J 77: 2199–2209 (1999)
48. Hol EM, Roelofs RF, Moraal E, Sonnemans MA, Sluijs JA, Proper EA, de Graan PN, Fischer DF, van Leeuwen FW: Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. Mol Psychiatry 8: 786-796 (2003)
49. Houseweart MK, Cleveland DW: Intermediate filaments and their associated proteins: multiple dynamic personalities. Curr Opin Cell Biol 10: 93–101 (1998)
50. Hutton E, Paladini RD, Yu QC, Yen M, Coulombe PA, Fuchs E: Functional differences between keratins of stratified and simple epithelia. J Cell Biol 143: 487–499 (1998)
51. Inada H, Izawa I, Nishizawa M: Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. J Cell Biol 155: 415–426 (2001)
52. Karaman MW, Herrgard S, Treiber DK, Gallant P, Atteridge CE, Campbell BT, Chan KW, Ciceri P, Davis MI, Edeen PT, Faraoni R, Floyd M, Hunt JP, Lockhart DJ, Milanov ZV, Morrison MJ, Pallares G, Patel HK, Pritchard S, Wodicka LM, Zarrinkar PP: A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. Nat Biotechnol 26: 127–132 (2008)
53. Kazerounian S, Uitto J, Aho S: Unique role for the periplakin tail in intermediate filament association: Specific binding to keratin 8 and vimentin. Exp Dermatol 11: 428–438 (2002)

54. Kazuo T, Scheuer PJ, Tsukitani Y, Kikuchi H, Van Engen D, Clardy J, Gopichand Y, Schmitz FJ: Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus Halichondria. J Am Chem Soc 103: 2469–2471 (1981)
55. Ketema M, Wilhelmsen K, Kuikman I, Janssen H, Hodzic D, Sonnenberg A: Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. J Cell Sci 120: 3384–3394 (2007)
56. Kim S, Coulombe PA: Intermediate filament scaffolds fulfill mechanical, organizational, and signaling functions in the cytoplasm. Genes Dev 21: 1581–1597 (2007)
57. King IA, Hounsell EF: Cytokeratin 13 contains O-glycosidically linked N-acetylglucosamine residues. J Biol Chem 264: 14022–14028 (1989)
58. Kirfel J, Magin TM, Reichelt J: Keratins: a structural scaffold with emerging functions. Cell Mol LIF Sci 60: 56–71 (2003)
59. Kreplak L, Bär H, Leterrier JF, Herrmann H, Aebi U: Exploring the mechanical behavior of single intermediate filaments. J Mol Biol 354: 569–577 (2005)
60. Kreplak L, Doucet J, Briki F: Unraveling double stranded alpha-helical coiled coils: an x-ray diffraction study on hard alpha-keratin fibers. Biopolymers 58: 526–533 (2001)
61. Kreplak L, Fudge D: Biomechanical properties of intermediate filaments: from tissues to single filaments and back. Bioessays 29: 26–35 (2007)
62. Ku NO, Liao J, Chou CF, Omary MB: Implications of intermediate filament protein phosphorylation. Cancer Metastasis Rev 15: 429–444 (1996)
63. Ku NO, Omary MB: Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. J Cell Biol 149: 547–552 (2000)
64. Ku NO, Omary MB: Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431. J Biol Chem 272: 7556–7564 (1997)
65. Ku NO, Zhou X, Toivola DM, Omary MB: The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. Am J Physiol 277: 1108-1137 (1999)
66. Kubilus J, Baden HP: The role of cross-linking in epidermal differentiation. Curr Probl Dermatol 11: 253–263 (1983)
67. Liao J, Lowthert L, Ku NO, Fernandez R, Omary MB: Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: Polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. J Cell Biol 131: 1291–1301 (1995)
68. Liu M, Tanswell AK, Post M: Mechanical force-induced signal transduction in lung cells. Am J Physiol 277: 667–683 (1999)

69. Lumpkin EA, Caterina MJ: Mechanisms of sensory transduction in the skin. Nature 445: 858–865 (2007)
70. Ma L, Yamada S, Wirtz D, Coulombe PA: A 'hot-spot' mutation alters the mechanical properties of keratin filament networks. Nat Cell Biol 3: 503–506 (2001)
71. MacKintosh C, Cohen P: Identification of high levels of type 1 and type 2A protein phosphatases in higher plants. Biochem J 262: 335–339 (1989)
72. Magin TM, Vijayaraj P, Leube RE: Structural and regulatory functions of keratins. Exp Cell Res 313: 2021–2032 (2007)
73. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE: Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. Proc Natl Acad Sci USA 94: 849–854 (1997)
74. Meng JJ, Bornslaeger E, Green KJ, Ip W: Protein–protein interactions in intermediate filament structure and anchorage to the cell surface. Biol Bull 194: 378–379 (1998)
75. Mogensen MM, Henderson CG, Mackie JB, Lane EB, Garrod DR, Tucker JB: Keratin filament deployment and cytoskeletal networking in a sensory epithelium that vibrates during hearing. Cell Motil Cytoskelet 41: 138–153 (1998)
76. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. Cell 31: 11–24 (1982)
77. Nakano H, Kobayashi E, Takahashi I, Tamaoki T, Kuzuu Y, Iba H: Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein p60. J Antibiot 40: 706-708 (1987)
78. Navarro JM, Casatorres J, Jorcano JL: Elements controlling the expression and induction of the skin hyperproliferation-associated keratin K6. J Biol Chem 270: 21362–21367 (1995)
79. Omary MB, Ku NO, Tao GZ, Toivola DM, Liao J: "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. Trends Biochem Sci 31: 383-394 (2006)
80. Oriolo AS, Wald FA, Canessa G, Salas PJI: GCP6 binds to intermediate filaments: a novel function of keratins in the organization of microtubules in epithelial cells. Mol Biol Cell 18: 781–794 (2007)
81. Owens DW, Lane EB: The quest for the function of simple epithelial keratins. Bioessays 25: 748–758 (2003)

82. Pang YY, Schermer A, Yu J, Sun TT: Suprabasal change and subsequent formation of disulfide-stabilized homo- and heterodimers of keratins during esophageal epithelial differentiation. J Cell Sci 104: 727–740 (1993)
83. Paramio JM, Jorcano JL: Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? Bioessays 24: 836-844 (2002)
84. Parry DA, Steinert PM: Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. Q Rev Biophy 32: 99–187 (1999)
85. Pekny M, Lane EB: Intermediate filaments and stress. Exp Cell Res 313: 2244–2254 (2007)
86. Planko L, Böhse K, Höhfeld J, Betz RC, Hanneken S, Eigelshoven S, Kruse R, Nöthen MM, Magin TM: Identification of a keratin-associated protein with a putative role in vesicle transport. Eur J Cell Biol 86: 827-839 (2007)
87. Rheinwald JG, Beckett MA: Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas. Cancer res 41: 1657-1663 (1981)
88. Ridge KM, Linz L, Flitney FW, Kuczmarski ER, Chou Y-H, Omary BM, Sznajder JI, Goldman RD: Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C δ regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. J Biol Chem 280: 30400–30405 (2005)
89. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA: New consensus nomenclature for mammalian keratins. J Cell Biol 174: 169–174 (2006)
90. Senshu T, Kan S, Ogawa H, Manabe M, Asaga H: Preferential deimination of keratin K1 and filaggrin during the terminal differentiation of human epidermis. Biochem Biophys Res Commun 225: 712–719 (1996)
91. Starger JM, Brown WE, Goldman AE, Goldman RD: Biochemical and immunological analysis of rapidly purified 10 nm filaments from baby hamster kidney (BHK-21) cells. J Cell Biol 78: 93–109 (1978)
92. Steinert PM, Parry DA, Racoosin EL: The complete cDNA and deduced amino acid sequence of a type II mouse epidermal keratin of 60 000 Da: analysis of sequence differences between type I and type II keratins. Proc Natl Acad Sci USA 81: 5709–5713 (1984)
93. Steinert PM, Rice RH, Roop DR, Trus BL, Steven AC: Complete amino acid sequence of a mouse epidermal keratin subunit and implications for the structure of intermediate filaments. Nature 302: 794-800 (1983)

94. Steinert PM, Roop DR: Molecular and cellular biology of intermediate filaments. Annu Rev Biochem 57: 593–625 (1988)
95. Steinert PM, Steven AC, Roop DR: Structural features of epidermal keratin filaments reassembled in vitro. J Invest Dermatol 81: 86-90 (1983)
96. Steinert PM, Steven AC, Roop DR: The molecular biology of intermediate filaments. Cell 42: 411–420 (1985)
97. Strnad P, Windoffer R, Leube RE: In vivo detection of cytokeratin filament network breakdown in cells treated with the phosphatase inhibitor okadaic acid. Cell Tissue Res 306: 277-293 (2001)
98. Strnad P, Windoffer R, Leube RE: Induction of rapid and reversible cytokeration filament network remodeling by inhibition of tyrosine phosphatases. J Cell Sci 115: 4133-4148 (2002)
99. Szeverenyi I, Cassidy AJ, Chung CW, Lee BT, Common JE, Ogg SC, Chen H, Sim SY, Goh WL, Ng KW, Simpson JA, Chee LL, Eng GH, Li B, Lunny DP, Chuon D, Venkatesh A, Khoo KH, McLean WH, Lim YP, Lane EB: The human intermediate filament database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. Hum Mutat 29: 351–360 (2008)
100. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M, Tomita F: Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca^{2+} dependent protein kinase. Biochem Biophys Res Commun 135: 397-402 (1986)
101. Theriot J, Bourne H, Goldstein L, Hall A, Howard J, Machesky L, Mitchison T, Vale R: The Cytoskeleton (Chapter 16). In Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Hrsg) Molecular biology of the cell. 5th Edition Garland Science, New York London, S. 965- 1010 (2007)
102. Wöll S, Windoffer R, Leube RE: p38 MAPK-dependent shaping of the keratin cytoskeleton in cultured cells. J Cell Biol 177: 795–807 (2007)
103. Yamada S, Wirtz D, Coulombe PA: Pairwise assembly determines the intrinsic potential for self-organization and mechanical properties of keratin filaments. Mol Biol Cell 13: 382–391 (2002)
104. Yanagi T, Murata M, Torigoe K, Yasumoto T. Biological activities of semisynthetic analogs of dinophysistoxin-3, the major diarrhetic shellfish toxin. Agric Biol Chem 53: 525–529 (1989)

Danksagung

Danksagung aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.