

Masterarbeit

Morphologie und Zell-Zell-Kontakte von flusskultivierten Endothelzellen

Anita Reiser

24.10.2014

Betreut von Prof. Ben Fabry

Lehrstuhl für Physikalisch-Medizinische Technik
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg



Zusammenfassung

Endothelzellen sind wesentlicher Bestandteil aller Blutgefäße und kleiden die gesamte luminale Oberfläche der Gefäße aus. Eine der Hauptaufgaben ist die Erhaltung der lebenswichtigen Barrierefunktion des Endothels zur Regulierung des Stoffaustausches zwischen Blut und dem darunterliegenden Gewebe. Im lebenden Organismus sind die Endothelzellen permanent dem mechanischen Stimulus der Scherspannung ausgesetzt, welcher durch die Zirkulation des Blutes erzeugt wird. Von großer Bedeutung für den Erhalt der Integrität des Endothels sind hierbei Proteine der Zell-Zell-Kontakte, die die Zell-Zell-Adhäsion und den Transfer intrazellulärer Signale regulieren und damit Einfluss auf die Morphologie und Physiologie der Zellschicht haben. Um die Entwicklung und Differenzierung von Endothelzellen besser zu verstehen, wird im Rahmen dieser Arbeit untersucht, wie sich eine konfluente Endothelzellschicht *in vitro* unter Scherspannung über einen Zeitraum von vier Tagen verändert. Hierfür werden primäre Zellen der humanen Nabelschnur (HUVEC) unter definierter Scherspannung flusskonditioniert. Dadurch können Veränderungen mehrerer Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Immunfluoreszenzfärbungen und Impedanz-Messungen parallel untersucht werden. Durch quantitative Analysen konnte die dynamische Modifizierung der Zellmorphologie und die Formierung von drei unterschiedlichen Zell-Zell-Kontakt Proteinen analysiert und mit den Veränderungen des physiologischen Verhaltens der Zellschicht verglichen werden.

Inhaltsverzeichnis

1. Wissenschaftlicher Hintergrund und Motivation	1
1.1. Das Endothel	1
1.2. Zell-Zell-Kontakte des Endothels	2
1.2.1. Adherens Junction	3
1.2.2. Tight Junction	4
1.2.3. Gap Junction	4
1.3. Flusskultivierung	5
1.4. Fragestellung	7
2. Material und Methoden	9
2.1. Kultivierung HUVEC	10
2.2. Vorbereitung Flusskultivierung	10
2.2.1. Scherspannung	10
2.2.2. Kanalslides	11
2.2.3. Aufbau Pumpe	11
2.2.4. Viskositätsmessung	12
2.3. Kalibrierung des Perfusionssystems	13
2.4. Flusskultivierung	14
2.4.1. Einsaat der Zellen	14
2.4.2. Anschluss der Slides	15
2.4.3. Flusskonditionierung	15
2.4.4. Fixierung	16
2.5. Western Blot	18
2.5.1. Zellysat und Proteingehalt	19
2.5.2. Verfahren	19
2.6. Immunfluoreszenzfärbung	20
2.7. Mikroskopie	21
2.7.1. Nikon Eclipse Ti	21
2.7.2. Leica TCS SP5	22
2.7.3. Olympus CKX41	23
2.8. Impedanz Messung	24
2.8.1. Messprinzip ECIS	25
2.8.2. Durchführung Versuch	26
2.9. Datenverarbeitung und Analyse	28
2.9.1. Morphologie	28
2.9.2. Zell-Zell-Kontakt Proteine	29
2.9.3. Konfokalmikroskopie: z-Stapel	30
2.9.4. Impedanz-Messungen	30
2.9.4.1. Rohdaten	30
2.9.4.2. Mikromotion	30
2.9.5. Korrelationsanalyse	31
2.9.6. Time Lapse Aufnahmen	31

3. Ergebnisse	33
3.1. Viskositätsmessung	33
3.2. Western Blot	33
3.3. Morphologie	34
3.3.1. Phasenkontrastaufnahmen	34
3.3.2. Zellfläche	36
3.3.3. Zellform	37
3.3.4. Ausrichtung der Zellen	38
3.4. Zell-Zell-Kontakt Proteine	40
3.4.1. VE-Cadherin - Adherens Junction	40
3.4.2. Claudin-5 - Tight Junction	42
3.4.3. Connexin43 - Gap Junction	43
3.4.4. Konfokalmikroskopische Aufnahmen	44
3.4.4.1. Übersichtsaufnahmen	44
3.4.4.2. z-Stapel	47
3.5. Impedanz Messung	48
3.5.1. Widerstand	48
3.5.2. Mikromotion	50
3.5.3. Kapazität	52
3.5.4. Erweiterte Experimente	53
3.6. Korrelationsanalyse	54
4. Diskussion	57
4.1. Morphologie	57
4.2. Zell-Zell-Kontakte	60
4.3. Physiologie	63
4.4. Fazit	66
Nomenklatur	69
A. Materialien	71
A.1. Labormaterialien	71
A.2. Geräte	73
A.3. Computerprogramme	74
B. Datenträger	75
Literaturverzeichnis	77
Danksagung	81
Erklärung	83

1. Wissenschaftlicher Hintergrund und Motivation

1.1. Das Endothel

Das Endothel ist ein Zellverbund, der die innere Zellschicht aller Blutgefäße und des lymphatischen Systems ausbildet. Endothelzellen zeigen eine hohe metabolische Aktivität und sind bei vielen physiologischen Prozessen wichtig, wie zum Beispiel die Gewährleistung der Barrierefunktion zwischen Blut und dem darunterliegenden Gewebe, der Regulation der Permeabilität für einen kontrollierten Stoffaustausch oder für die Immunantwort. Das Endothel zeigt, über das gesamte vaskuläre System betrachtet, eine bemerkenswerte Heterogenität. Diese zeigt sich im Hinblick auf Struktur und Funktion, sowie in Zeit und Ort und weist große Unterschiede zwischen gesundem und krankem Gewebe auf [1]. Aus Sicht der Forschung ist das Endothel zudem besonders interessant, da es in fast allen Krankheiten eine Rolle spielt, entweder als primärer Faktor der Pathophysiologie oder da das Endothel durch die ursprünglichen Krankheiten geschädigt wird [2]. Sehr häufige Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind zum Beispiel Arteriosklerose, Hypertonie oder Herzinfarkte. Trotzdem sind im Bereich der vaskulären Biologie noch immer viele grundlegende Zusammenhänge nicht komplett verstanden. Um ein besseres Verständnis für die Entwicklung und Funktion des Endothels zu erhalten, wurde ab der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts begonnen Versuche an Blutgefäßen durchzuführen. Durch die Elektronenmikroskopie gelang es erstmals die Heterogenität des Endothels in seiner Struktur und unterschiedlichen Morphologie nachzuweisen [3].

1922 wurde die erste Studie veröffentlicht, in der der Versuch unternommen wurde Endothelzellen in einer Zellkultur zu untersuchen [4]. Das Hauptproblem dabei war vor allem die isolierten Zellen eindeutig als Endothelzellen zu charakterisieren. Zunächst wurden weitere *in vitro* Analysen an kompletten Segmenten von Blutgefäßen durchgeführt und es erfolgte keine Separation der verschiedenen Zelltypen. Zur Untersuchung separierter Endothelzellen wurde erstmals von Maruyama versucht aus menschlichen Nabelschnüren Endothelzellen zu isolieren und zu kultivieren, es war jedoch keine gesicherte Identifizierung der isolierten Zellen als Endothelzellen möglich [5]. Erst 1973 gelang es Jaffe et al. über morphologische und immunologische Untersuchungen zu zeigen, dass es sich bei von ihnen ebenfalls aus der Nabelschnur isolierten Zellen um Endothelzellen und nicht etwa um Fibroblasten oder glatte Muskelzellen handelte [6]. Seit den frühen 1990er Jahren werden für *in vitro* Untersuchungen primärer humaner Endothelzellen häufig isolierte Zellen der menschlichen Nabelschnur verwendet. Was hauptsächlich dadurch zu begründen ist, da es sich bei Nabelschnüren um leicht zugängliches Gewebe handelt aus dem sich relativ einfach Endothelzellen isolieren lassen [7]. Eine Charakterisierung, ob es sich bei der isolierten Zellpopulation um Endothelzellen handelt, erfolgt meist durch einen immunhistochemischen Nachweis des spezifischen Von-Willebrand-Faktors, welcher in den Weibel-Palade-Körperchen vorliegt [8]. Aus Gründen der Verfügbarkeit und der Tatsache, dass diese Zellen in der Wissenschaft sehr häufig Verwendung finden, werden auch in dieser Arbeit menschliche Endothelzellen der Nabelschnur verwendet.

1.2. Zell-Zell-Kontakte des Endothels

Einen sehr wichtigen Beitrag zur Erhaltung der Funktionalität und Integrität des Endothels liefern die Zell-Zell-Kontakte. Neben der Herstellung der Adhäsion benachbarter Zellen sind die Zell-Zell-Kontakt Proteine beteiligt am Transfer intrazellulärer Signale [9]. Diese Signale regulieren kontaktinduzierte Inhibierung von Zellwachstum, Apoptose, Genexpression oder Gefäßneubildung [10, 11]. Das bedeutet, dass eine Änderung in der Zusammensetzung der Zell-Zell-Kontakte und ihrer Organisation möglicherweise komplexe Konsequenzen auf die Funktionsfähigkeit des Endothels hat. Ein genaues Verständnis dieser Veränderungen unter verschiedenen Bedingungen und deren Auswirkungen auf die Funktionalität der Zell-Zell-Kontakte ist zum Beispiel nötig um Ansatzpunkte für medizinische Therapien zu entwickeln.

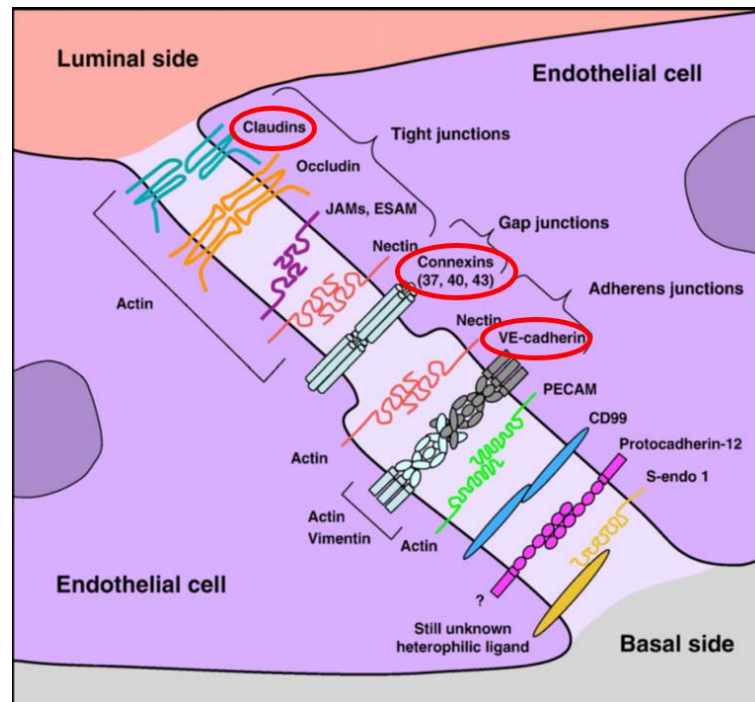


Abbildung 1.1.: Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen [12]. Rot eingekreist sind die Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Es gibt im wesentlichen drei Typen von Zellkontakten im Endothel, die wiederum durch unterschiedliche Proteine gebildet werden. Die vorkommenden Zellkontakttypen werden Adherens Junction, Tight Junction und Gap Junction genannt. Alle Typen haben gemein, dass sie aus Transmembranproteinen gebildet werden. Transmembranproteine benachbarter Zellen des selben Typs gehen miteinander Bindungen ein, wodurch der eigentliche Zell-Zell-Kontakt entsteht. Die Unterschiede im strukturelle Aufbau dieser Zell-Zell-Kontakte im Endothel wurde erstmals 1976 von Simionescu et al. beschrieben [13]. Sie konnten zeigen, dass sich im Endothel ebenfalls spezialisierte Zell-Zell-Kontaktarten vergleichbar mit denen im Epithel ausbilden. Expression und Organisation dieser Proteinkomplexe zur Ausbildung interzellulärer Adhäsion ist stark abhängig von der Art des Gefäßes und von den jeweiligen Anforderungen des perfundierten Organs [14]. Die genaue molekulare Komposition der Zell-Zell-Kontakte konnte ab den 1990er Jahren aufgeklärt werden. Verschiedene Proteine bilden die drei genannten Typen der Zell-Zell-Kontakte aus wie in Abb. 1.1 schematisch gezeigt wird. Die Darstellung zeigt die Transmembranproteine der wichtigsten Zell-Zell-Kontakte zwischen benachbarten Endothelzellen. Die Proteine, die stellvertretend für den jeweiligen Kontakttyp in dieser Arbeit untersucht wurden, sind rot umrandet. Folglich wurden VE-Cadherin (Adherens Junction), Claudin-5 (Tight Junction) und Connexin43 (Gap

Junction) analysiert. Die einzelnen Junction Proteine sind oft direkt oder über sogenannte 'Scaffold' Proteine mit Proteinen des Zytoskeletts verbunden. Claudin-5 und VE-Cadherin werden über jeweils für den Kontakttyp spezifische Proteinkomplexe mit dem Aktinskelett verbunden [15, 16]. VE-Cadherin kann dazu auch mit dem Intermediärfilament Vimentin verbunden sein, dann spricht man allerdings von Complexus Adhernes statt Adherens Junction [17]. Die Verbindung zu Komponenten des Zytoskelett dient nicht nur der Stabilisierung der Zell-Zell-Kontakte und damit der Zellschicht, sondern auch deren dynamischer Regulierung. Die Assoziation zwischen Zytoskelett und Zell-Zell-Kontakten ist zusätzlich wichtig für die Morphologie der Zelle [18]. Die drei verschiedenen Typen von Zell-Zell-Kontakten übernehmen dabei unterschiedliche Aufgaben.

1.2.1. Adherens Junction

Als Adherens Junctions bezeichnet man einen Zell-Zell-Adhäsionskomplex, welcher im Allgemeinen aus Cadherinen und Catenine besteht und mit Aktinfilamenten verbunden ist. Im Endothel wird ubiquitär das Cadherin-5 exprimiert, weshalb es meist als 'vascular endothelial cadherin', abgekürzt VE-Cadherin, bezeichnet wird. VE-Cadherin ist das am häufigsten vorkommende Transmembranprotein der Adherens Junction [19], weshalb dieses Protein als Marker für die Veränderung der Adherens Junctions in dieser Arbeit untersucht wird.

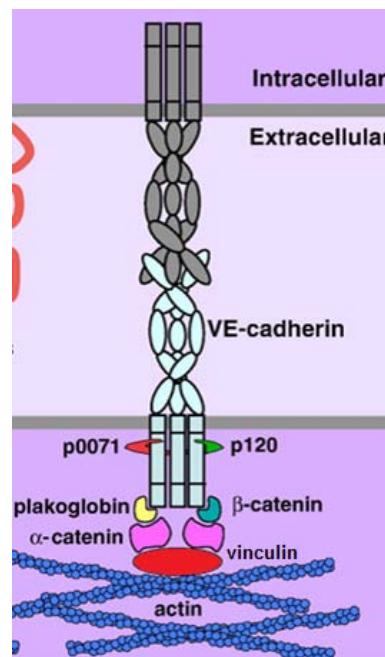


Abbildung 1.2.: Adherens Junction gebildet aus VE-Cadherine [12]

Ein VE-Cadherin Komplex besteht aus drei VE-Cadherin Dimeren. Ein solcher Komplex bildet eine homophile Bindung mit benachbarten Zellen aus, wodurch die Adherens Junctions entstehen (Abb. 1.2). Die VE-Cadherine sind dabei über die gesamte Fläche des interzellulären Spalts zwischen benachbarten Zellen verteilt. Die Stabilität dieser Bindung ist dabei stark abhängig von Calciumionen Ca^{2+} . Am cytoplasmatischen Teil der VE-Cadherine befinden sich viele Bindestellen für die Interaktion mit anderen Proteinen [16]. Die meisten dieser Proteine gehören zur Catenin Familie, wie p0071, p120 oder α-catenin. Diese Interaktionspartner der VE-Cadherine übernehmen entweder Aufgaben der Signaltransduktion oder bilden ein Proteingerüst, das wiederum mit dem Aktinskelett verbunden ist. VE-Cadherine werden früh durch interzellulären Kontakt ausgebildet. Die Adherens Junction sind maßgeblich mitverantwortlich für die Inte-

grität, da sie eine mechanische Stabilisierung darstellen, und über sie wird auch zum Teil die vaskuläre Permeabilität und die Leukozyten Transmigration gesteuert [20].

1.2.2. Tight Junction

Tight Junctions bilden eine weitere mechanische Stabilisierung der Endothelzellschicht, jedoch zeigen sie eine beträchtliche Variabilität innerhalb des vaskulären Systems. Dabei ist Claudin-5 das am häufigsten vorkommende Protein der Tight Junction im Endothel [21]. Claudin-5 gehört zu der Proteinfamilie der Claudine, von der im Menschen 24 Typen bekannt sind. Im Endothel jedoch kommt maßgeblich das untersuchte Claudin-5 vor [22].

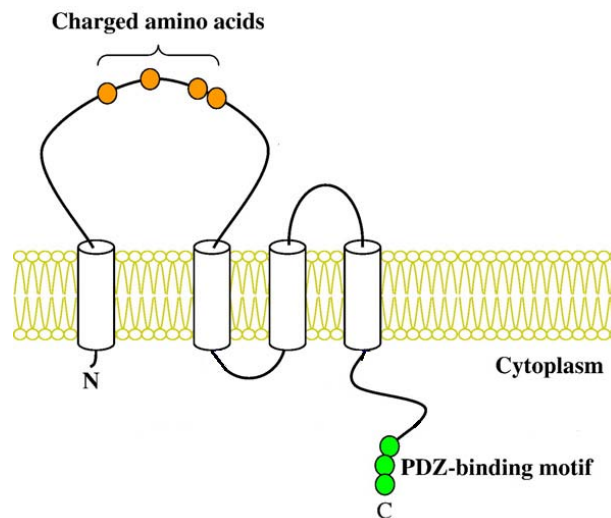


Abbildung 1.3.: Schematischer Aufbau eines Claudin Proteins [23].

Claudin-5 ist wie VE-Cadherin über den kompletten interzellulären Spalt verteilt aber es liegt im Gegensatz zum Epithel keine apikale Ausrichtung vor. Im Vergleich zu den Adherens Junctions ist jedoch der interzelluläre Spalt zwischen Tight Junction enger. Daher treten Tight Junction Proteine gehäuft im mikrovaskulären Bereich der Blut-Hirn-Schranke auf um die Barrierefunktion zu erhöhen [24]. Es handelt sich bei Claudin-5 um ein Protein mit vier transmembranen Domänen, durch die zwei extrazelluläre Schleifen ausgebildet werden und zeichnet sich durch ein Proteingewicht von rund 23 kDa aus. Die extrazellulären Schleifen wirken Ionenselektiv, da sie geladene Aminosäuren enthalten. Dadurch ist die Regulierung von Flüssigkeiten und dem Ionenfluss über die Endothelzellschicht möglich. Vergleichbar mit dem VE-Cadherin weist Claudin-5 Bindestellen für andere Proteine auf (Abb. 1.3). Am C-Terminus des Proteins befindet sich zum Beispiel eine sogenannte PDZ-Domäne, an welche zahlreiche Scaffold-Proteine binden können. PDZ-Domänen binden an spezifische kurze Aminosäuresequenzen, die sich in verschiedenen Proteinen wiederfinden. Benannt ist diese spezifische Region nach den Proteinen, in denen sie gefunden wurde, wie beispielsweise Zona occludens-1, ein häufig an Claudin-5 und andere Tight Junction Proteine bindendes Protein [9].

1.2.3. Gap Junction

Die Gap Junctions bilden Kanäle zwischen benachbarten Zellen aus. Diese Kanäle bestehen aus Proteinen der Connexin Familie und erlauben direkten interzellulären Signal- und Stoffaustausch zwischen verbundenen Endothelzellen. Durch Diffusion ist ein Austausch von verschiedenen Stoffen, wie zum Beispiel Metaboliten oder Ionen, bis zu einem molekular Gewicht von 1 kDa möglich

[25]. In Abb. 1.4 *B* ist der Aufbau der Gap Junction gezeigt. Eine Gap Junction besteht aus zwei transmembranen Halbkanälen, Connexone genannt, von benachbarten Zellen. Ein Connexon ist hierbei aus sechs Untereinheiten aufgebaut und kann in der Plasmamembran im geschlossenen oder geöffneten Zustand vorliegen. Ein Connexon kann neben der Bildung einer Gap Junction auch als Halbkanal fungieren und Diffusion zwischen dem Cytoplasma und dem extrazellulären Raum ermöglichen. Die Untereinheiten werden aus Proteinen der Connexin Familie gebildet. Beim Menschen sind 21 Mitglieder dieser Proteinfamilie bekannt. In HUVEC treten folgende Connexine Cx auf: Cx37, Cx40, Cx43 (Die Zahl gibt die theoretische molekulare Masse in kDa an) [26]. Diese drei Connexin Isoformen treten auch hauptsächlich im Endothel anderer Gefäße auf [27].

Ein Connexin ist aus vier, die Plasmamembran durchspannenden, Domänen aufgebaut. Es bilden sich dadurch zwei extrazelluläre Schleifen aus, die jeweils drei stark konservierte Cysteine aufweisen und durch Bildung von Disulfidbrücken benachbarter Connexone das Anlagern gegenüberliegender Halbkanäle stabilisieren [28]. Auf cytoplasmatischer Seite liegen der N- und C-Terminus des Connexin sowie eine intrazelluläre Schleife zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne vor (Abb. 1.4 *A*). Bei der Bildung von Kanälen und Connexonen sind verschiedene Kombinationen von Connexin Isoformen möglich [29]. Diese Heterogenität könnte zu einer großen Vielfalt an regulatorischen Möglichkeiten führen.

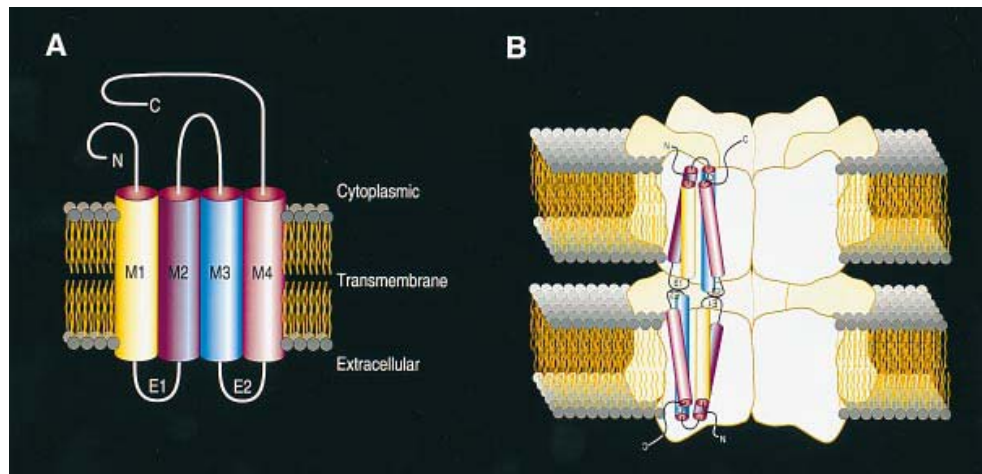


Abbildung 1.4.: *A* Topologisches Modell eines Connexins. Die Zylinder M1-M4 zeigen die Transmembrandomänen. Die extrazellulären Schleifen E1 und E2 enthalten je 3 stark konservierte Cysteine. *B* Schematischer Aufbau der Gap Junction aus gegenüberliegenden Connexonen (Halbkanäle in der Plasmamembran einer Zelle). Jedes Connexon ist aus sechs Untereinheiten, den Connexinen, aufgebaut. [28]

In dieser Arbeit wird das Protein Connexin43 über einen entsprechend spezifischen Antikörper als Vertreter der Gap Junction Proteine untersucht. Cx43 wurde ausgewählt, da gezeigt werden konnte, dass dieses Protein *in vivo* unter mechanischen Stress besonders stark moduliert wird [27]. Auch *in vitro* gibt es eine klare Evidenz, dass Cx43 empfindlich auf Veränderungen von physikalischen Reizen reagiert [30].

1.3. Flusskultivierung

Unter Einbeziehung der Umgebung ist das Endothel im lebendem Organismus stets dem Fluss von Blut oder Lymphe ausgesetzt. Dadurch wirkt an der luminalen Oberfläche der Zellen permanent eine Scherspannung (im Englischen: Shear Stress). Der Einfluss der Scherspannung ist

bereits rein optisch sichtbar wie Abb. 1.5 verdeutlicht. Im Bild A sind flusskultivierte Endothelzellen gezeigt, deren Zellränder durch Immunfluoreszenzfärbung der VE-Cadherine (grün) gut erkennbar sind. Die Ausrichtung der Zellen in Richtung des Flusses (weißer Pfeil) ist offensichtlich, wohingegen statisch kultivierte Endothelzellen B diese Charakteristik nicht aufweisen. Die Scherspannung entsteht durch die über die Zellen strömende Flüssigkeit und ist zu verstehen als die Kraft, welche an der Oberfläche der Blutgefäße in Richtung des Blutflusses wirkt. Die Konversion dieses mechanischen Reizes in biochemische Reaktionen wird als Mechanotransduktion bezeichnet und ist im Endothel wichtig für Organisation, Wachstum, und Funktionalität des lebenden Gewebes [31]. Durch die Deformation des Endothels wird diese mechanische Störung über das Zytoskelett an verschiedene Stellen übertragen. So hat die Scherspannung Einfluss auf die Zell-Matrix-Adhäsionskomplexe, Zell-Zell-Kontakte und die Zellkernmembran [32]. Es werden auch nachweisbar viele physiologische und pathophysiologische Aspekte des vaskulären Systems reguliert, da dieser physikalische Stimulus zum Beispiel zur Abgabe von Stickstoffmonoxid, Wachstumsfaktoren oder anderen Molekülen führt [33, 34]. Scherspannung ist unter anderem einbezogen in die Entwicklung von phänotypischen Veränderungen des Endothels, die zu krankhaften Veränderungen führen kann und zum Beispiel Atherosklerose verursacht [35]. Dabei spielt es nicht nur eine Rolle, ob Scherspannung vorliegt, sondern auch in welcher Stärke und wie sich das Flussprofil durch die Geometrie des Blutgefäßes verändert.

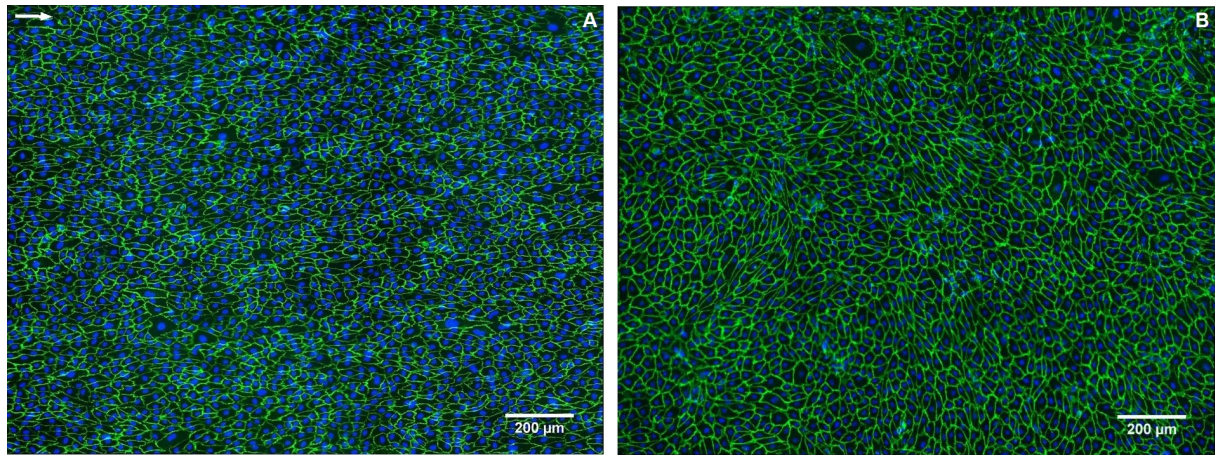


Abbildung 1.5.: Vergleich von flusskultivierten (Pfeil gibt Flussrichtung des Zellkulturmediums an) und statisch kultivierten Endothelzellen *in vitro*. In Blau sind die Zellkerne dargestellt; Grün gibt die Fläche der Zell-Zell-Kontakte der Endothelzellschicht wieder (Immunfluoreszenzfärbung der VE-Cadherine).

Im Blutgefäß lässt sich die vorliegende Scherspannung τ in guter Näherung nach Gleichung 1.1 berechnen [36]. Die Scherspannung ist also direkt proportional zur Flussrate Φ des Bluts und indirekt proportional zum Radius r des Blutgefäß unter Berücksichtigung der Viskosität η der Flüssigkeit.

$$\tau = \frac{4 * \eta}{r^3} * \Phi \quad (1.1)$$

Um Endothelzellen unter Fluss kultivieren zu können, muss folglich ein System mit standardisierten Bedingungen geschaffen werden, in welchem Flussrate, Geometrie und Viskosität des Zellkulturmediums bekannt sind. Ansonsten ist es nicht möglich die Scherspannung definiert einzustellen um unabhängig durchgeführte Experimente *in vitro* mit der Situation *in vivo* zu vergleichen. Für die Einstellung einer definierten Scherspannung an der Zelloberfläche werden

entweder Flusskammern beziehungsweise Microslides oder Scherrheometer verwendet [37]. Die verschiedenen entwickelten Systeme zur Untersuchung von Zellen unter Fluss und dass die Vielzahl an zellulären Prozessen auf die Scherspannung einen Einfluss hat machen deutlich, dass man diesen physikalischen Stimulus unbedingt berücksichtigen muss in der weiteren Erforschung des Endothels mittels *in vitro* Experimenten.

1.4. Fragestellung

Seit Jahrzehnten wird an isolierten Endothelzellen geforscht um die Funktionsweise und besonders um die krankheitsbedingten Veränderungen des Endothels zu verstehen. Um die Situation des Endothels in lebenden Organismen besser nachahmen zu können, werden die Endothelzellen immer häufiger unter Fluss kultiviert, damit die Zellen dem natürlichen physikalischen Reiz der Scherspannung ausgesetzt sind. Jedoch wurde in den meisten *in vitro* Studien nur ein Zeitraum von einem bis maximal zwei Tagen untersucht. Es kann dabei jedoch nicht gewährleistet werden, dass die dabei untersuchte Endothelschicht bereits vergleichbar entwickelt ist wie das Endothel in einem intakten Blutgefäß. Das Verhalten von primären Endothelzellen im Fall von Langzeitexperimenten ist nur unzureichend erforscht. Ziel dieser Arbeit ist das Langzeitverhalten flusskonditionierter menschlicher Endothelzellen zu analysieren und die Veränderung verschiedener Aspekte miteinander zu vergleichen. Dabei sollen folgende Fragen untersucht werden:

1. Welche morphologischen Unterschiede zeigen sich zwischen flusskultivierten und statischen Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen?
2. Wie stark ist der Einfluss der Scherspannung auf die Ausbildung und Differenzierung von Proteinen der Zell-Zell-Kontakte? Lassen sich insbesondere Tight Junction durch Scherspannung vermehrt ausbilden?
3. Welchen Einfluss haben die Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte auf das physiologische Verhalten einer konfluenten Endothelzellschicht?

Um diese Fragen zu klären, wurden verschiedene experimentelle Methoden etabliert, mit denen es möglich ist Endothelzellen unter Fluss zu kultivieren und zu verschiedenen Zeitpunkten Veränderungen der Morphologie, der Zell-Zell-Kontakte und der Physiologie zu untersuchen. Ziel ist es die Endothelzellen in Kultur unter vergleichbaren Bedingungen wie in lebenden Organismen zu analysieren.

2. Material und Methoden

Das in dieser Arbeit entwickelte Verfahren zur Untersuchung der Veränderungen von Morphologie und Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen über einen Zeitraum von vier Tagen wird nachfolgend unter Berücksichtigung aller angewendeten Techniken beschrieben. Es lassen sich morphologische Parameter wie Zellorientierung oder Zellfläche mit Veränderung auf Proteinebene korrelieren und zu definierten Zeitpunkten untersuchen. Nachfolgend werden die verwendeten Methoden dieser Arbeit erläutert und die dabei benötigten Materialien genannt. Tabellen aller Materialien, Reagenzien, Geräte und der verwendeten Computerprogramme sind unter Anhang A zu finden. Stichpunkt-Protokolle einiger Methoden und Programmcodes, die für die Datenauswertung geschrieben wurden, sind auf dem beigelegten Datenträger zu finden. Alle Versuche mit lebenden Zellen wurden unter der Sterilbank durchgeführt um Verfälschung der Ergebnisse durch Kontaminationen mit Bakterien zu vermeiden.

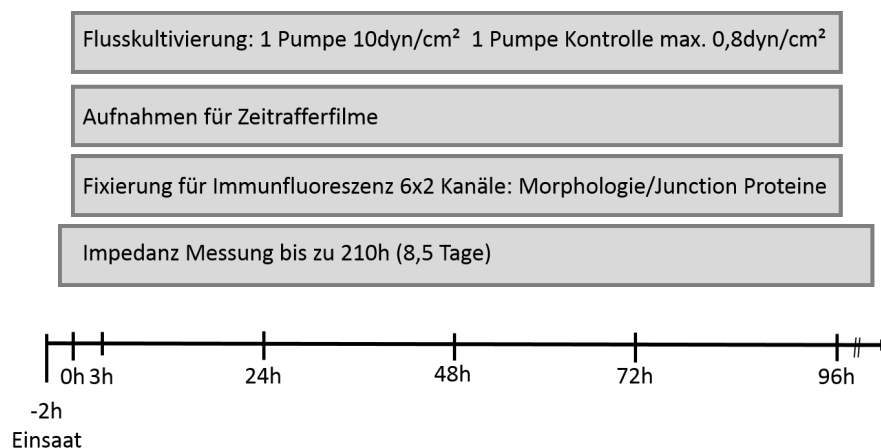


Abbildung 2.1.: Überblick über zeitlichen Verlauf und Aufbau der durchgeführten Experimente.

Der generelle Ablauf der durchgeführten Experimente ist in Abb. 2.1 skizziert. Alle Experimente wurden mit primären Endothelzellen der Nabelschnur durchgeführt. Diese wurden unter zwei verschiedenen Bedingungen kultiviert um Veränderungen über die Zeit zwischen diesen Bedingungen vergleichen zu können. Die Flusskultivierung wurde bei einer Scherspannung von $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ und unidirektionalen laminaren Fluss durchgeführt. Die gewählte Scherspannung liegt damit im physiologischen Bereich von arteriellen Gefäßen. Die Kontrollbedingung wurde unter quasi statischen Bedingungen realisiert. Für die Versorgung der Zellen wurde alle fünf Stunden ein schwacher Fluss erzeugt, durch welchen maximal eine Scherspannung von $0,8 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ generiert wurde. Die Daten werden in der Regel über einen Zeitraum von vier Tagen (96 h) aufgenommen. Beginn der Messung ist je zwei Stunden nach Aussaat der Zellen. Ein Experiment besteht dabei aus je sechs Kanälen mit Zellen pro Bedingung, die zu den sechs angegebenen Zeitpunkten fixiert werden, um mittels Immunfluoreszenzfärbungen die Morphologie und die Zell-Zell-Kontakte zu untersuchen. Für eine genauere Untersuchung der Morphologie wurden ebenfalls Zeitrafferaufnahmen im Abstand von 10 min aufgenommen. Für die physiologische Analyse der Zellschicht wurden Impedanz Messungen durchgeführt. Für diese Messungen wurden die Daten länger als

die üblichen vier Tage aufgenommen.

2.1. Kultivierung HUVEC

Alle Experimente dieser Arbeit, die zur Datenerhebung verwendet wurden, sind mit primären Zellen aus der menschlichen Nabelschnur durchgeführt worden. Die sogenannten 'Human umbilical vein endothelial cells' kurz HUVEC wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Zahler (Lehrstuhl für pharmazeutische Biologie, LMU München), wie bereits beschrieben, isoliert [38] und in Passage 2 zur Verfügung gestellt. Die Phasenkontrastaufnahme in Abb. 2.2 zeigt HUVEC in Kultur. Für alle Versuche wurden lediglich Zellen in Passage 3 oder 4 verwendet. Vor dem Passagieren von Zellen wurde eine Zellkulturflasche mit Collagen G-Lösung beschichtet. Die Lösung des Herstellers wird in PBS auf eine Konzentration von $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ verdünnt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen bei 37°C , 5% CO_2 und 90% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Alle wichtigen Angaben zur Kultivierung der HUVEC sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

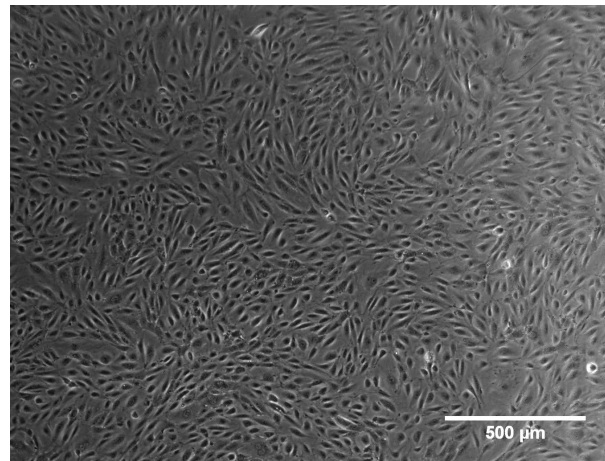


Abbildung 2.2.: Phasenkontrastaufnahme HUVEC Passage 2 in Zellkulturflasche (EVOS 4x Objektiv NA 0,13)

Tabelle 2.1.: Verwendetes Material zur Kultivierung primärer Endothelzellen der Nabelschnur (HUVEC).

Medium	Endothelial Cell Growth Medium ECGM
Zusatz	Supplement Mix (enthält 2% FCS)
Antibiotika	1% Penicillin - Streptomycin
Ablösen	Accutase
Flasche	25 cm ² oder 75 cm ²
Beschichtung	Collagen G Lösung in PBS mit $10 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$

2.2. Vorbereitung Flusskultivierung

2.2.1. Scherspannung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist der entscheidende physikalische Reiz auf flusskultivierte Zellen nicht die Flussrate, der über die Zellen strömenden Flüssigkeit, sondern die dabei

entstehende Scherspannung an der Oberfläche der Zellen. Die Scherspannung oder auch Schubspannung gibt an, welche Kraft pro Fläche auf die Zellschicht wirkt. Die Schubspannung τ ergibt sich allgemein aus dem Verhältnis der Scherkraft F , die auf die Fläche A wirkt. Damit hat die Schubspannung die Dimension eines Drucks (SI-Einheit: Pascal bzw. $\frac{\text{N}}{\text{m}^2}$).

Die resultierende Scherspannung in den verwendeten Kanalslides wird nach einer Publikation von Corish für einen Fluss in einem Kanal mit rechteckiger Querschnittsfläche berechnet [39]. Auf Grundlage dieses Modells wurde die Scherspannung, die am Boden des Kanals anliegt, bestimmt [40]. Da die Zellen am Kanalboden adhären, ist die dort vorliegende Scherspannung von Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Scherspannung τ in der Einheit $\frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ angegeben, wobei $1 \text{ dyn } 10^{-5} \text{ N}$ entspricht. Die Scherspannung ist dabei abhängig von der Viskosität η [$\frac{\text{dyn}\cdot\text{s}}{\text{cm}^2}$], der Geometrie des Kanals (Höhe und Breite) und der Flussrate Φ [$\frac{\text{ml}}{\text{min}}$]. Höhe und Breite des Kanals werden durch die Wahl des verwendeten μ -Slides festgelegt. Die Viskosität wird experimentell bestimmt, siehe Kap. 2.2.4. Die Flussrate ist abhängig von dem durch die Pumpe generierten Druck und wird über eine Software eingestellt wie unter Kap. 2.3 beschrieben wird.

Abb. 2.3 zeigt in Orange den Bereich am Kanalboden eines μ -Slide, in dem die Scherspannung homogen ist. Bei den späteren Mikroskopieaufnahmen muss darauf geachtet werden in diesem Bereich zu arbeiten.

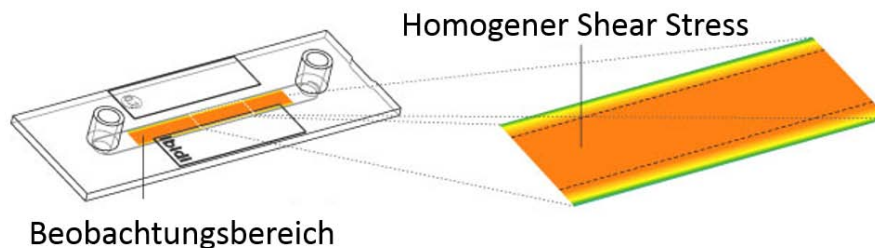


Abbildung 2.3.: Beobachtungsbereich des μ -Slide I Luer mit homogenem Bereich der Scherspannung [40].

2.2.2. Kanalslides

Für die Datenerhebung dieser Arbeit wurden μ -Slide I^{0.4} Luer mit Collagen IV Beschichtung verwendet. Dieser Kanalslide weist folgende Spezifikationen auf: Volumen 100 μl , Höhe 0,4 mm, Breite 5 mm, Länge 50 mm, Bodenfläche 2,5 cm^2 . Um Ausschließen zu können, dass Schwankungen der Messergebnisse durch qualitativ unterschiedliche Collagen Beschichtungen oder andere mögliche Fehlerquellen der Kanäle zustande kommen, wurden nur Kanäle einer Produktionscharge verwendet und alle mit der selben Beschichtungslösung behandelt. Die Beschichtungslösung bestand aus einer 40 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Collagen IV Lösung in 0,05 M Salzsäure. Jeder Kanal wurde mit 100 μl dieser Beschichtungslösung gefüllt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Kanäle getrocknet, einzeln verpackt und zur Sterilisation durch EO-Begasung gegeben. Einzelne Luer-Kanäle dieser Charge wurden stichprobenartig vor Verwendung in den üblichen Funktionskontrollen getestet und danach zur Verwendung freigegeben.

2.2.3. Aufbau Pumpe

Die Versuchsanordnung mit dem dazugehörigen Anschluss der Pumpe ist im linken Bild der Abb. 2.4 schematisch dargestellt. Die Pumpe und ein Computer werden neben dem Inkubator

aufgebaut, jeweils ans Stromnetz angeschlossen und über ein USB-Kabel verbunden. Die Luftschläuche und das Elektrikkabel werden an der Rückwand des Inkubators durchgezogen und eine sogenannte „Fluidic Unit“ in den Brutschrank gestellt. Die Fluidic Unit enthält zwei Ventile um einen unidirektionalen Fluss in den über das Perfusionsset angeschlossenen Kanal zu generieren. Das Prinzip der Ventilschaltungen ist im rechten Teil der Abb. 2.4 gezeigt. Die Fluidic Unit wird mit der Pumpe durch den Luftschlauch und ein Elektrikkabel zur Steuerung der Ventilschaltung verbunden. Der Luftschlauch, der zur Trocknungsflasche führt, hängt frei im Inkubator, durch den die 5 % CO₂-haltige Umgebungsluft mittels der Pumpe eingezogen wird. Die Trocknungsflasche wird benötigt um Korrosionsschäden durch die feuchte Inkubatorluft am Pumpengehäuse zu vermeiden. Mittels der Software PumpControl wird über den Computer der von der Pumpe zu generierende Druck gesteuert und die Schaltzeiten der Ventile der Fluidic Unit festgelegt. In der Software können alle relevanten Parameter, wie Viskosität oder die gewünschte Scherspannung (Shear Stress) eingestellt werden. Der Aufbau der Software wird in Kap. 2.3 im Rahmen der Kalibrierung des Perfusionssystems näher erläutert.

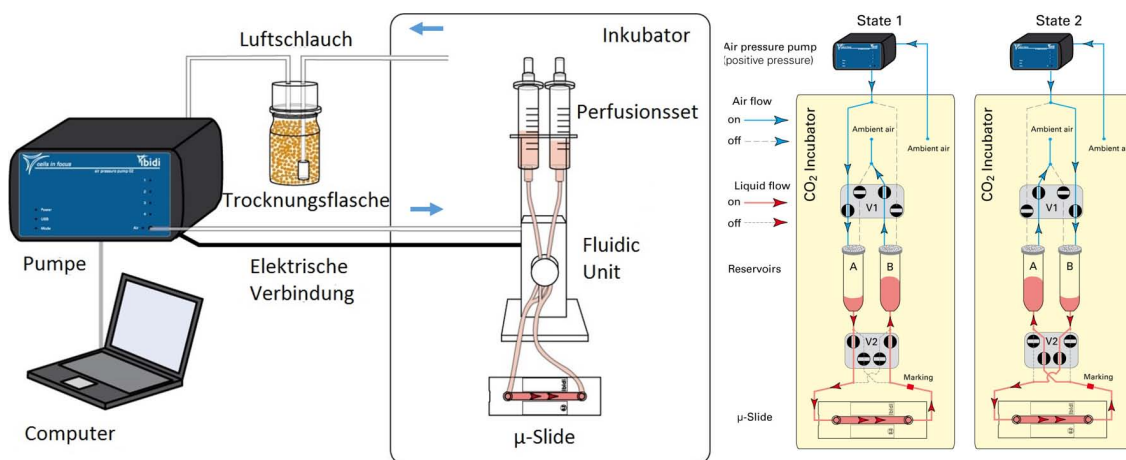


Abbildung 2.4.: Links: Schematischer Versuchsaufbau. Die Richtung des Luftstroms ist durch die Pfeile gekennzeichnet. Rechts: Schaltung der zwei Ventile (V1,V2) in einer Fluidic Unit um im µ-Slide unidirektionalen Fluss durch positiven Druck zu erzeugen. Beide Graphiken sind der Anleitung für das ibidi Pump System entnommen [41].

2.2.4. Viskositätsmessung

Die Viskosität η des verwendeten Zellkulturmediums wurde bestimmt um die resultierende Scherspannung τ , die in den Kanälen mit den eingesäten Zellen entsteht, berechnen zu können.

Die Viskosität des verwendeten Zellkulturmediums wurde mit einem Rollviskosimeter ermittelt. Das Messprinzip beruht darauf die Rollzeit einer Stahlkugel mit bekannter Dichte und Durchmesser in einer Kapillare von definierten Innendurchmesser und Volumen unter einem vorgegebenen Winkel α zu bestimmen [42]. Hierfür wird eine Kapillare aus Glas mit einem Innendurchmesser von 1,6 mm und einem Volumen von 400 µl verwendet. Diese Kapillare ist geeignet um Viskositäten im Bereich von 0,3-10 mPa.s zu messen. In die Kapillare wird eine Stahlkugel mit Innendurchmesser von 1,5 mm und einer Dichte von $\rho_K = 7,85 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ gegeben und die Kapillare mit der zu vermessenden Flüssigkeit befüllt.

Für die Bestimmung der Viskosität verschiedener Flüssigkeiten muss zu Beginn der Kalibrierungsfaktor $K_1(\alpha)$ bestimmt werden. Dies geschieht, indem man destilliertes Wasser in die Kapillare füllt und bei einer Temperatur von 37 °C vermisst um das System zu kalibrieren. Eine Temperatur von 37 °C wird gewählt, da alle Experimente dieser Arbeit, bei denen die Viskosität

von Flüssigkeiten von Bedeutung ist, bei 37 °C ausgeführt werden. Für die Messung muss im Programm des Geräts der Winkel α , die Dichte von Wasser bei 37 °C $\rho_W = 0,9332 \frac{\text{g}}{\text{cm}^3}$ und die Viskosität von Wasser bei 37 °C $\eta_W = 0,6915 \text{ mPa.s}$ angegeben werden. Die Dichte- und Viskositätswerte sind einem physikalischen Tabellenwerk entnommen [43]. Die Berechnung von $K_1(\alpha)$ erfolgt nach 2.1, wobei t_1 die Rollzeit der Kugel in der Kapillare ist. Diese Zeit wird vom Gerät gemessen.

$$K_1(\alpha) = \frac{\eta_W}{t_1 * (\rho_K - \rho_W)} \quad (2.1)$$

Der berechnete Kalibrierungsfaktor ist ein gemittelter Wert aus zehn Wiederholungen der Messung bei $\alpha = 30^\circ$. Die Berechnung der Viskosität η anderer Flüssigkeiten erfolgt über eine Umstellung obiger Formel unter der Annahme, dass die Dichte ρ der gemessenen Flüssigkeiten sich nicht unterscheiden von ρ_W .

$$\eta = K_1(\alpha) * (\rho_K - \rho_W) * t_1 \quad (2.2)$$

Für jede gemessene Flüssigkeit errechnet sich die Viskosität aus dem Mittelwert der vierfach gemessenen Rollzeiten der Stahlkugel. Auf der Anzeige des Geräts wird zu jeder Messung die Viskosität in mPa.s ausgegeben und dem dazugehörige Variationskoeffizienten VarCo eine Normierung der Varianz angegeben als VarCo in Prozent.

2.3. Kalibrierung des Perfusionssystems

Für alle Versuche, außer den Time Lapse Aufnahmen, wurden die Perfusionssets des Typs Rot verwendet. Diese zeichnen sich durch einen Schlauchinnendurchmesser von 1,6 mm, einer Länge von 15 cm und zwei 10 ml Reservoiren aus. Unter der Sterilbank wurden das erwärmte Medium, die benötigten Perfusionssets und Fluidic Units bereitgestellt. Zellkulturmedium und Perfusionssets wurden über Nacht im Brutschrank entgast. Die Perfusionssets wurden in die Fluidic Unit eingehängt, eine bebilderte Beschreibung dieses Vorganges findet sich in der Application Note 13 der Firma ibidi [44]. Jedes Perfusionssset wurde mit 12,5 ml Medium befüllt (beide Spritzenreservoire müssen bis zur 5 ml Markierung befüllt sein) und danach in den Inkubator, in dem das Experiment stattfand, gestellt. Nachdem alle benötigten Einheiten in den Inkubator gestellt wurden, sind diese an die jeweilige Fluss- oder Kontrollpumpe angeschlossen worden. Die Kalibrierung war für alle Systeme einheitlich unabhängig davon welche Systeme später unter Kontroll- oder Flussbedingungen verwendet wurden.

Vor der Kalibrierung musste zuerst mittels manueller Druckgabe die Flüssigkeit in beiden Spritzenreservoiren auf die Markierung von 5 ml eingestellt werden, damit die Flüssigkeitsniveaus in beiden Reservoiren auf selber Höhe waren. In diesem Zustand wurde nun das automatisierte Programm der Software PumpControl verwendet. Folgende Parameter wurden bei jeder Kalibrierung eingestellt: rotes Perfusionssset (Innendurchmesser 1,6 mm), ohne Slide, Viskosität $\eta = 0,007 \frac{\text{dyn.s}}{\text{cm}^2}$ (Wert der Viskositätsmessung), Kalibrierungsfaktor KF=1, Druck 40 mbar. Aus diesen Angaben berechnet das Programm für die gegebenen Einstellungen eine Flussrate von $29,85 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$. Eine Softwareübersicht ist in Abb.2.5 zu sehen. Es wurden für die Kalibrierung die Zeitdauer der Volumenänderung von 2 ml (Volumenänderung von der 4 ml Markierung der Spritze auf die 6 ml Markierung) mit einer Stoppuhr bestimmt. Auf diese Weise wurde die tatsächliche Flussrate aus einer Mittlung von zehn Messungen pro Perfusionssset bestimmt. Aus dem Verhältnis der vorgegebenen Flussrate zur gemessenen Flussrate berechnet sich der vorliegende Kalibrierungsfaktor

des Sets. Der Kalibrierungsfaktor wurde im Computerprogramm unter Angabe der genannten Flussraten berechnet. Dadurch erzeugt die Pumpe den tatsächlich notwendigen Druck um die gewünschte Flussrate zu generieren. Die Kalibrierung war vor allem wegen der Toleranzen des Schlauchmaterials der Perfusionssets nötig.

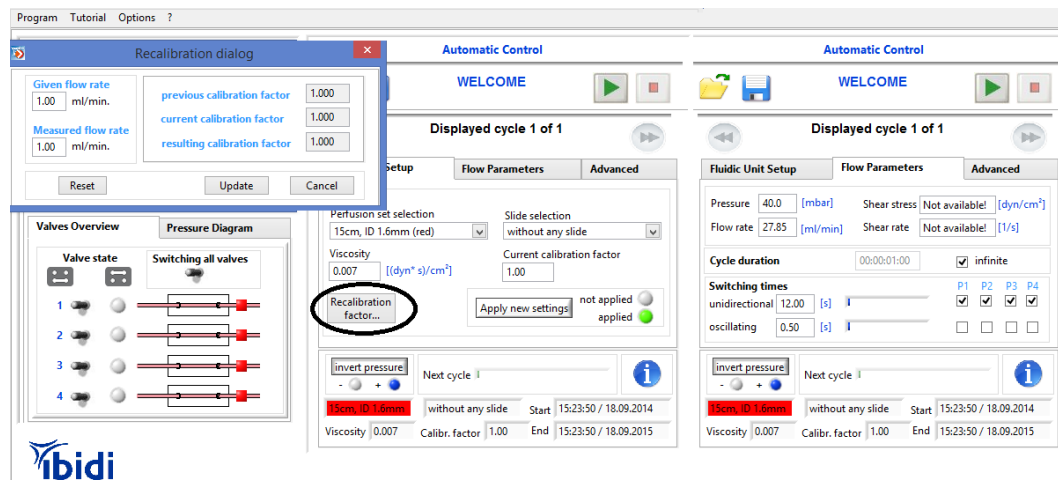


Abbildung 2.5.: Übersicht Software-Einstellung von PumpControl zur Kalibrierung des roten Perfusionsystems. Gezeigt sind die Register für die Eingabe der Materialparameter und das Register für die Flussparameter. Das zusätzlich gezeigte Fenster für die Kalibrierung öffnet sich über das 'Recalibration factor'-Feld (schwarz umrandet).

2.4. Flusskultivierung

Für einen Versuch von 4 Tagen Dauer wurden zwölf Kanäle benötigt, sechs für die Kultivierung unter Fluss mit einer Scherspannung von $\tau = 10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ und sechs Kanäle für die Kontrollbedingung. Waren ausreichend Zellen vorhanden, konnten auch zwei Experimente parallel gestartet werden. Dies war möglich indem je zwei Fluidic Units pro Pumpe angeschlossen wurden

2.4.1. Einsaat der Zellen

Die HUVEC wurden mittels Accutase aus der Flasche abgelöst und die dabei entstehende Zellsuspension zur Einsaat in die Kanäle verwendet. Eine Zellkonzentration von $2 \cdot 10^6 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$ wurde für alle Versuche hergestellt. Dadurch ergab sich eine Einsaatdichte von $8 \cdot 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^2}$. Die zwölf Kanäle eines Experiments wurden nun nacheinander mit je 100 μl Zellsuspension befüllt. Abb. 2.6 A zeigt eine Phasenkontrastaufnahme frisch eingesäter Zellen in einem Kanal. Bei dem Befüllen der Kanäle dürfen keine Luftblasen entstehen, da diese später durch die Flusskultivierung Schäden an der Zellschicht verursachen können. Die Kanäle mit den eingesäten Zellen wurden dann für ungefähr eine Stunde zurück in den Brutschrank gestellt. Nach dieser Zeit sollten die HUVEC zum großen Teil adhären und die Reservoirs jedes Kanals wurden mit 120 μl Medium aufgefüllt um ein Eintrocknen der Kanäle zu verhindern. Zwei Stunden nach Einsaat wurden die Kanäle an die jeweiligen Perfusionssets angeschlossen. In Abb. 2.6 B ist zu sehen, dass die meisten Zellen nach diesem Zeitraum adhären waren und sich eine weitestgehend geschlossene Zellschicht gebildet hat.

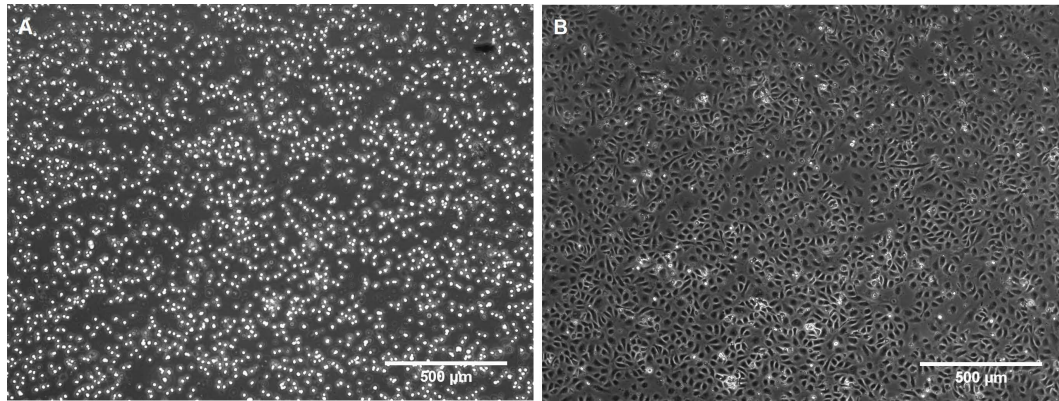


Abbildung 2.6.: HUVEC in μ -Slide I^{0.4} Luer mit Collagen IV Beschichtung direkt nach befüllen der Kanäle mit der Zellsuspension (A) und zwei Stunden danach (B).

2.4.2. Anschluss der Slides

Jeweils fünf Kanalslides werden an ein Perfusionssystem angeschlossen. Der sechste Kanal wird sofort nach Anschluss der anderen Kanäle fixiert und verbleibt bis zur Fixierung im Inkubator. Für den Anschluss der Kanäle wird eine kalibrierte Einheit aus Fluidic Unit und Perfusionssystem aus dem Inkubator entnommen und unter die Sterilbank gestellt, sowie vier serielle Verbinder und frisches Zellkulturmedium. Eine bebilderte Anleitung zum hintereinander Schalten von 2 Kanälen ist in der Application Note 25 der Firma ibidi beschrieben [45]. Das Anschließen von fünf Kanälen erfolgt analog zum Verfahren von Zwei. Es muss jedoch besonders darauf geachtet werden keine Luftblasen beim Anschluss der Slides zu produzieren, da durch diese beim Start des Flusses Schäden an den adhären Zellen zu erwarten sind. Erfolgte der Einbau des Perfusionssystems nach Anleitung, befindet sich die rote Markierung des 15 cm Schlauchstücks rechts und der laminare Fluss erfolgt in diese Richtung. Auf alle Slides werden Pfeile in die spätere Flussrichtung angebracht um die Richtung nach Ausbau der Kanäle nachvollziehen zu können. Der Vorgang muss möglichst zügig ablaufen, da durch das Abkühlen die Gefahr besteht, dass sich die HUVEC zum Teil wieder ablösen. Die Fluidic Unit wird zurück in den Inkubator gestellt und an die Pumpe angeschlossen. Jede weitere Einheit wird gleich behandelt um je fünf Slides anzuschließen. Sind alle Einheiten im Inkubator angeschlossen, kann der Fluss gestartet werden. Ab diesem Zeitpunkt werden die Kanäle unter Fluss- oder Kontrollbedingungen unterschiedlich kultiviert.

In Abb.2.7 ist der Aufbau von zwei Experimenten im Inkubator gezeigt und die genannte Schlauchmarkierung ist an dem rechten Perfusionssystem hervorgehoben. Die Zahlen auf den Ventilköpfen geben an, welche Einheiten zum ersten oder zum zweiten Experiment gehören. Die beiden linken Einheiten sind an die Pumpe angeschlossen, welche eine Scherspannung von $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ generiert. An die rechten Einheiten sind die Kanäle zur Kultivierung unter Kontrollbedingungen angeschlossen.

2.4.3. Flusskonditionierung

Die Zellen unter Flussbedingungen wurden unter einer Schubspannung von $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ kultiviert. Das Programm, dass die Pumpe hierfür steuert, muss in einigen Parametern umgestellt werden. Es muss von keinem Slide auf μ -Slide I^{0.4} Slides umgestellt werden und es werden im Fenster für die Schubspannung $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ angegeben. Zudem wird der Kalibrierungsfaktor aus Erfahrungswerten auf 2 gestellt. Dies ist nötig, da das Computerprogramm nur von einem Kanal am System ausgeht und den erhöhten Fließwiderstand durch weitere vier Slides nicht berechnet. Nun kann der

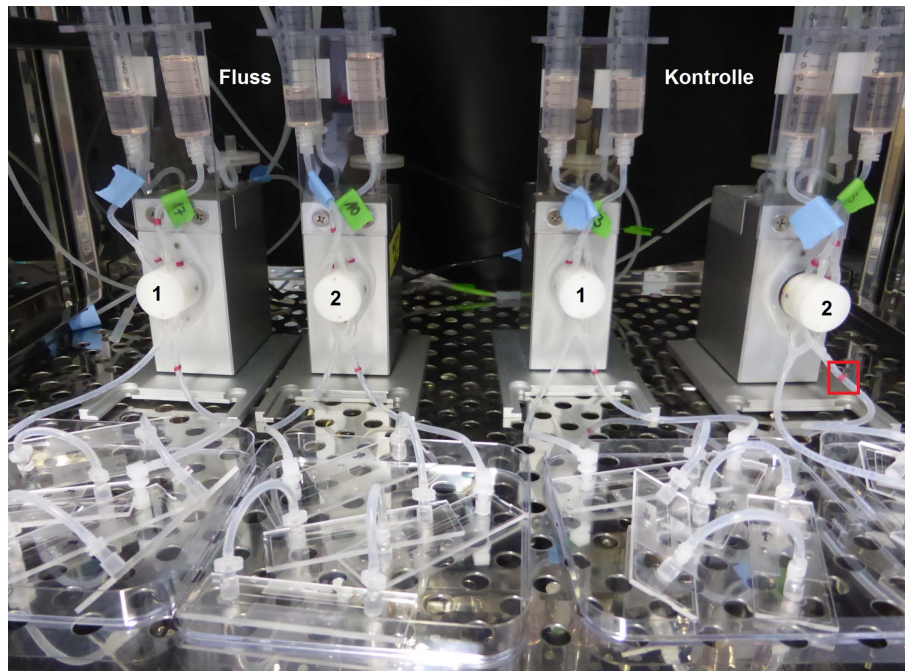


Abbildung 2.7.: Aufbau von zwei parallel ablaufenden Experimenten zur Flusskultivierung von HUVEC im Inkubator. Die Kanäle der beiden linken Einheiten werden unter laminaren Fluss bei $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ kultiviert. Die Einheiten auf der rechten Seite dienen der Kultivierung für die Zellen der Kontrollgruppe. Die Zahlen auf den Ventilköpfen der Fluidic Units geben an zu welchem Experiment die Einheit gehört. Das rote Quadrat umrandet die Markierung des 15 cm Schlauchstücks.

Fluss gestartet werden. Um sicherzustellen, dass unabhängige Experimente unter den gleichen Bedingungen ablaufen, muss nun das System erneut kalibriert werden wie unter Kap. 2.3 beschrieben. Die Kalibrierung muss zudem nach jedem Ausbau eines Kanals erneut erfolgen, wobei jede weitere Kalibrierung vom voreingestellten Kalibrierungsfaktor ausgeht. Sind die Kalibrierungen sauber erfolgt, ist der Kalibrierungsfaktor mit einem Kanal gleich dem Kalibrierungsfaktor der vorherigen Kalibrierung.

Für die Kultivierung unter Kontrollbedingungen ist eine extrige Programmerweiterung für Pump-Control geschrieben worden. Diese ermöglicht für ein bestimmtes Zeitintervall einen geringen Fluss anzustellen um das Medium über den Zellen auszutauschen und beendet die Druckgabe für eine definierte Pausenlänge. Der Medienwechsel erfolgte für acht Minuten und die Pause dazwischen betrug fünf Stunden. Eine komplett statische Kultivierung innerhalb der Kanäle ist über den Zeitraum von vier Tagen nicht möglich, da die Zellen dadurch unter zunehmenden Nährstoffmangel leiden und letztlich absterben. Der Druck wird je nach Anzahl der angeschlossenen Slides gewählt und die Zellen werden höchstens einer Schubspannung von $0,8 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ ausgesetzt. Der dafür maximal erlaubte Druck wird ausgehend vom Kalibrierungsfaktor des Flusssystems berechnet. Abb. 2.8 zeigt die Nutzeroberfläche der Erweiterung für die Steuerung der Pumpe und der Schaltung der Ventile der Fluidic Unit.

2.4.4. Fixierung

Es wurden verschiedene Reagenzien zur Fixierung getestet um die Antikörperfärbungen der drei Zell-Zell-Kontakt Proteine zu ermöglichen. Es stellte sich heraus, dass eine gute Immunfluoreszenzfärbung für Claudin-5 nicht mit auf Formalin basierenden Fixierlösungen möglich war.



Abbildung 2.8.: Programmerweiterung AutoStart für die Steuerung der Pumpe und das Schalten der Ventile.

Vermutlich wird durch das Formalin die Erkennungsregion für das Epitop des Claudin-5 Antikörpers vernetzt und eine Bindung des Antikörpers ist dadurch nicht mehr möglich. Von einer Fixierung mit Methanol wurde abgesehen, da das Methanol die Aktinfasern zerstört. Die besten Ergebnisse wurden durch kaltes Aceton (-20°C) erzeugt. Bei dieser Fixierung konnten gute Ergebnisse für alle Antikörper und die Aktin Färbung erzielt werden. Für die Aceton-Fixierung wurde ein Zeitreihenexperiment mit verschiedener Inkubationsdauer für Aceton durchgeführt und auf dieser Grundlage eine Zeitspanne von zwölf Minuten festgelegt.

Zu den in Tab. 2.2 angegebenen Zeitpunkten werden die Kanalslides der flusskultivierten Zellen und der Kontrolle jeweils fixiert. Zum Ausbau eines Kanals muss das jeweilige Programm zur Steuerung der Pumpe angehalten werden. Eine Fluidic Unit wird aus dem Inkubator genommen und eine Phasenkontrastaufnahme des zu fixierenden Kanals gemacht. Anschließend wird das System unter die Sterilbank gestellt und das Perfusionssset abgeklemmt. Es wird der Adapter des markierten 15 cm Schlauchstücks entfernt. Das ist wichtig, da eventuell entstehende Luftblasen bei dem Wiederanschluss und erneuten Start des Flusses dadurch in ein Spritzenreservoir gedrückt werden und nicht über die Zellen in den Kanälen. Der serielle Verbinder am anderen Luer-Kontakt des auszubauenden Kanals wird ebenfalls entfernt. Der ausgebaute Kanal wird auf den Ständer gestellt. Zunächst wird nun der serielle Verbinder auch vom nachfolgenden Slide entfernt; das Medium im Verbinder sollte dabei das Reservoir des Slides füllen. Der freie Adapter wird genutzt um das Perfusionssset wieder zu schließen und in das freie Reservoir gesteckt. Danach wird die Einheit mit den Kanälen sofort zurück in den Inkubator gestellt. Das Ausbauen findet erst ab dem Zeitpunkt 2 der Tab. 2.2 statt. Für den ersten Zeitpunkt werden die unangeschlossenen Kanäle aus dem Inkubator genommen und direkt nach Start des Flusses fixiert.

Der zu fixierende Kanal wird nun viermal mit kaltem Aceton gespült, entsprechend der Bedingung und des Zeitpunktes beschriftet und für 12 min bei -20°C inkubiert. Diese Beschriftungen dienen der späteren Zuordnung für die Aufnahmen der Immunfluoreszenz. Nach der Fixierung mit Aceton werden die Kanäle dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wird eine erneute Phasenkontrastaufnahme des Kanals gemacht. Der Ausbau und die Fixierung der Kanäle der anderen Einheiten erfolgt zeitlich überschritten während der vorher ausgebaute Kanal auf -20°C inkubiert. Sind alle Kanäle eines Zeitpunktes fixiert und dokumentiert, werden diese bei 4°C gelagert.

In Abb. 2.9 sind beispielhaft Aufnahmen der HUVEC nach zwei Tagen gezeigt. A zeigt die Zellen, die unter laminaren Flussbedingungen bei $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ Schubspannung kultiviert wurden. Der Pfeil in der oberen linken Ecke des Bildes gibt die Flussrichtung an. In Aufnahme B sind die fixierten

HUVEC zu sehen. Die Zellschicht scheint durch die Fixierung an Plastizität zu verlieren, was auf die Dehydrierung der Zellen durch das Aceton zurück zu führen ist. Diese Veränderung muss hingenommen werden um die Färbung von Claudin-5 zu ermöglichen. Aufnahme *C* zeigt die HUVEC unter Kontrollbedingungen, in Ausschnitt *D* sind analog die Zellen nach der Fixierung gezeigt.

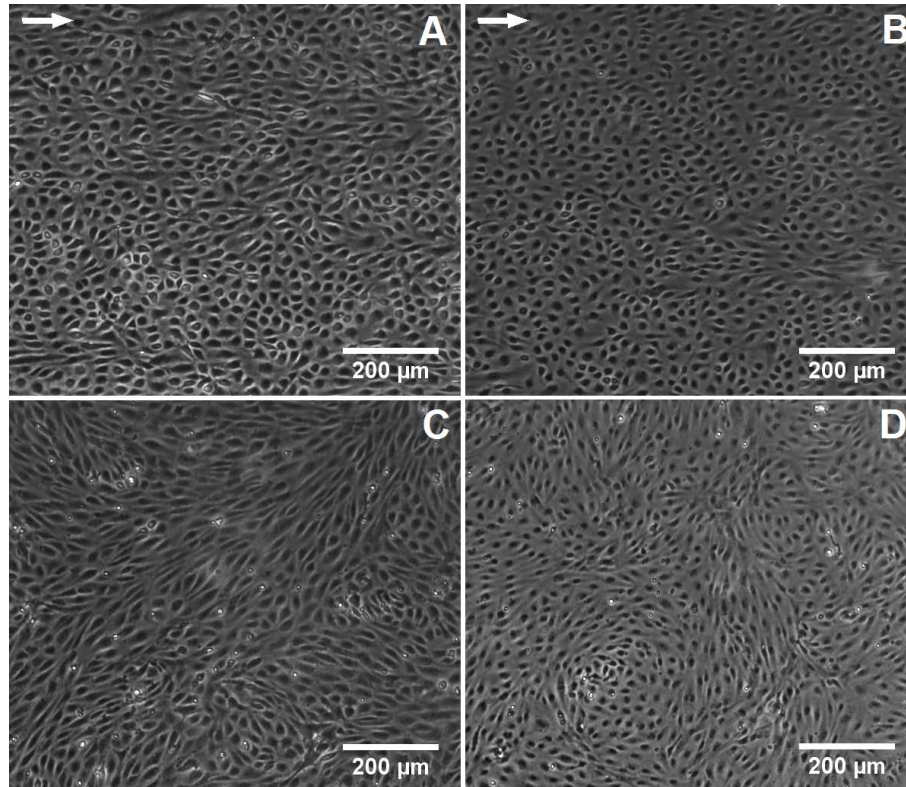


Abbildung 2.9.: Phasenkontrastaufnahmen der Endothelzellen nach zwei Tagen (4. Zeitpunkt) der Kultivierung: *A* unter Fluss vor der Fixierung, *B* Aceton fixierte HUVEC, *C* Kultivierung unter Kontrollbedingungen, *D* fixierte Zellen der Kontrolle

Tabelle 2.2.: Zeitpunkte der Fixierung der HUVEC in Kanalslides für spätere Immunfluoreszenzfärbungen.

Slide Nr.	Zeitpunkt
1	2 Std. nach Einsaat; Start Fluss
2	3 Std. nach Anlegen des Flusses
3	1 Tag nach Anlegen des Flusses
4	2 Tage nach Anlegen des Flusses
5	3 Tage nach Anlegen des Flusses
6	4 Tage nach Anlegen des Flusses

2.5. Western Blot

Für flusskultivierte Zellen wurde ein Verfahren etabliert um Proteine der Zell-Zell-Kontakte von Endothelzellen mittels Western Blot Analysen nachzuweisen. Die Idee war diese Methode zur

Quantifizierung der drei Proteine (VE-Cadherin, Claudin-5, Connexin43) zu nutzen um die Veränderung des Proteingehalts zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen. Der Grund, warum diese Methode letztlich keine Anwendung fand, ist die hohe Zellzahl, die benötigt wird um zwei Lysate zu allen sechs Zeitpunkten herzustellen. Es werden mindestens vier Kanäle pro Lysat benötigt. Hierfür standen pro Experiment nicht genügend Zellen zur Verfügung. Zudem wären zusätzliche Pumpen und Fluidic Units nötig um die Anzahl der Kanalslides kultivieren zu können.

2.5.1. Zelllysate und Proteingehalt

Wie bereits erwähnt, sind für Analysen der drei Proteine mindestens vier gleich behandelte Kanalslides für die Herstellung eines Lysats nötig, ansonsten wäre der Gesamtproteingehalt zu gering um eine Detektion der einzelnen Proteine zu gewährleisten. Um die Zellen in den Kanälen lysieren zu können, wurden anfangs verschiedene Herangehensweisen getestet. Ausprobiert wurde unter anderem die Trypsinisierung der Zellen aus Kanälen und anschließende Lysierung der entstandenen Zellsuspension sowie das Abkratzen der Zellen aus dem Kanal mit einem im Kanal befindlichen Magneten oder das Ausschneiden der bewachsenen Zellfläche mit einem Skalpell und Abkratzen der Zellen. Bei diesen Methoden traten verschiedene Probleme wie bedingte Reproduzierbarkeit auf, weshalb die Methoden hier nicht näher erläutert werden. Die letztlich gewählte Methode war die Zellen durch Scherung, mittels einer aufgesetzten Spritze, aus den Kanälen zu lösen.

Hierfür wurden die Kanalkammern vom Perfusionssset ausgebaut, sofort auf Eis gestellt und mit kaltem PBS gewaschen. Alle Arbeiten müssen möglichst auf Eis durchgeführt werden um die Aktivität von Proteasen zu verringern, damit keine Proteine abgebaut werden. Anschließend wurde aus einem Kanal das PBS komplett abgesaugt und mittels einer 1 ml Spritze mit 200 µl Lysepuffer gefüllt. Der Lysepuffer wurde zuvor frisch mit Phenylmethylsulfonylfluorid PMSF versetzt. PMSF dient hierbei zusätzlich als Protease-Inhibitor. Die getesteten Lysepuffer sind in Tab. 2.3 aufgeführt. Der Lysepuffer inkubierte je nach Puffer ein bis fünf Minuten. Danach wurden die Zellen mit der aufgesetzten Spritze aus dem Kanal geschert. Ist die Zellschicht in einem Kanal lysiert, wurde der Puffer-Lysat-Mix mit der Spritze aufgezogen und der Mix in den nächsten, vorher abgesaugten Kanal gegeben. Diese Vorgehensweise ist für alle Kanäle (mindestens vier) wiederholt worden. Nach Behandlung des letzten Kanals wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und das Lysat durch eine Kanüle nochmals geschert. Danach wurde das Lysat zusätzlich sonifiziert. Die Scherung durch die Kanüle und das Sonifizieren wurden durchgeführt um Transmembranproteine besser aus der Zellmembran zu lösen. Abschließend wurde jedes Lysat bei 4 °C für 30 min bei 14.000x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Überstände können bei -20 °C gelagert werden.

Der gesamte Proteingehalt wurde mittels des Pierce™ BCA Protein Assay Kit bestimmt. Es handelt sich bei dem BCA-Assay um ein Verfahren der kolorimetrischen Detektion und Quantifizierung des Gesamtproteingehalts basierend auf Bicinchoninsäure (BCA) [46]. Das Verfahren wurde nach Anleitung des Herstellers mit einer BSA-Standardreihe aus neun verschiedenen Verdünnungen (0-2 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ BSA in Lysepuffer) angewendet. Die Lysate wurden in einer 96well Platte 1:20 in 200 µl der Arbeitslösung des Kits verdünnt und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Platte in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm ausgelesen und nach Herstellerangaben ausgewertet. Auf diese Weise wurden für alle getesteten Lysate der Gesamtproteingehalt ermittelt.

2.5.2. Verfahren

Für die Western Blot Analysen wurden Gradienten-Gele (8%-16% SDS) verwendet um eine gute Auftrennung des Proteinlysats zu erhalten. Die Lysatproben wurden vor Beladung des Gels

Tabelle 2.3.: Getestete Lysepuffer für Western Blot Analysen von flusskultivierter Zellen.

Puffer	Inhalt
RIPA	50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0,5% Na-Doxycholat, 1% Triton-X100
RIPA 2.5	modifizierter RIPA mit 2,5% SDS
Cell Lysis Buffer	kommerzieller Puffer, siehe Datenblatt des Herstellers

mit dem Ladepuffer Rotiload im Verhältnis 4:1 gemischt und für 5 min bei 90 °C aufgeköcht. Pro Gelkammer wird eine Probe geladen und zusätzlich zu den Proben eine Kammer mit 4 µl Proteinstandard. Das Gel läuft bei einer konstanten Spannung von 200 V für 30 Minuten. Das Blotting des Gels erfolgt auf eine Nitrocellulose Membran im Nassblotverfahren für zwei Stunden bei konstanten 250 mA. Zur Kontrolle der Übertragungseffizienz der Proteinbanden vom Gel auf die Membran wird eine reversible unspezifische Proteinfärbung mit Ponceau S durchgeführt und dokumentiert. Die Ponceau Färbung wird durch Waschen der Membran mit 0,075% Tween-20 in PBS unter ständigen Schwenken entfernt. Anschließend wird die Membran für eine Stunde in Milchpulverlösung (5% Milchpulver in 0,075% Tween-20/PBS) geblockt. Die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern in gewünschter Konzentration erfolgt über Nacht bei 4 °C ebenfalls in frischer Milchpulverlösung unter ständigen Schwenken. Die Membran wurde am nächsten Tag dreimal für zehn Minuten mit 0,075% Tween-20/PBS gewaschen und anschließend für eine Stunde mit den sekundären Antikörpern in Milchpulverlösung inkubiert. Der Waschschrift vor der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wurde nochmals wiederholt um nicht gebundene sekundäre Antikörper zu entfernen. Anschließend ist die Membranen zwischen Filterpapier gelegt und für mindestens eine Stunde gepresst und getrocknet worden. Die getrockneten Membranen wurden mit dem Typhoon TRIO Imager eingescannt. Über die Computersoftware werden die benötigten Kanäle eingestellt (FITC für sekundären Antikörper mit AF488, Cy3 für sekundären Antikörper mit AF555). Für den ersten Scan wird jeweils eine Spannung von 360 V für den Photomultiplier eingestellt. Sind die Banden dabei nur schwach sichtbar kann ein erneuter Scan mit höherer Spannung gestartet werden. Die Auflösung des Scanvorgangs wird auf 50 microns eingestellt. Die Dateien des Membranscans können mit ImageJ geöffnet und bearbeitet werden.

Alternativ zu sekundären Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen kann mit HRP-Antikörpern gearbeitet werden. Die HRP-Antikörper sind statt mit einem Fluorophor mit dem Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt. Der Nachweis der mit den HRP-Antikörpern markierten Proteinbanden, erfolgte dabei durch Chemolumineszenz. Hierfür dürfen die Membranen nicht getrocknet werden. Um die Lumineszenz detektieren zu können, wurde die Membran in eine Luminol-Lösung gelegt. Das Enzym HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol und die dabei entstehende Lumineszenz wird auf einem Film detektiert. Dieses Verfahren ist sehr sensitiv für geringe Mengen an Protein.

2.6. Immunfluoreszenzfärbung

Um quantitative Messungen mittels Fluoreszenzfärbung zu ermöglichen, wurden alle Experimente nach einem standardisiertem Färbeprotokoll durchgeführt. Ein komplettes Experiment von zwölf Kanälen wurde immer zusammen gefärbt um Schwankungen durch Unterschiede in den Antikörper-Lösungen ausschließen zu können. Ist von einem Waschschrift oder Medienwechsel die Rede, bedeutet dies, dass der Kanal mit dem dreifachen Kanalvolumen gespült wurde um die Flüssigkeit im Kanal komplett auszutauschen und gleichmäßige Färbeergebnisse über die komplette Kanallänge zu gewährleisten.

Zuerst wurden alle Kanäle für 5 min mit einer 0,5 % Triton-X100/PBS Lösung gefüllt um die Membran der Zellen zu permeabilisieren. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit einem Blockpuffer (1% BSA und 0,2% Triton-X100 in PBS) inkubiert um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden. Die primären Antikörper wurden in einem extra Puffer (1% BSA mit 0,05% Triton-X100 in PBS) aufgenommen. Die Verdünnung der verwendeten Antikörper sind Tab. 2.4 zu entnehmen. Aufgrund der Spezies, in denen die Antikörper produziert wurden, können nur VE-Cadherin mit Claudin-5 oder VE-Cadherin mit Connexin43 gefärbt werden. Eine Färbung aller drei Zell-Zell-Kontakt-Proteine in einem Kanal war mit den verwendeten Antikörpern nicht möglich. Pro Experiment wurde eine der genannten Antikörper Kombinationen verwendet. Hierfür wurde die Flüssigkeit jedes Kanals komplett abgenommen und der Kanal mit 120 µl der primären Antikörperlösung gefüllt. Die primären Antikörper sind über Nacht bei 4 °C inkubiert worden. Zur Entfernung der nicht gebundenen primären Antikörper wurden die Kanäle dreimal für zehn Minuten mit PBS gewaschen. Zusammen mit den beiden sekundären Antikörpern (siehe Tab. 2.4) wird der Zellkern mit DAPI ($1 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$) und das Aktinskelett (Phalloidin-AF660 Verdünnung der Stocklösung 1:40) gefärbt. Die sekundären Antikörper, DAPI und Phalloidin-AF660, wurden in dem gleichen Puffer wie die primären Antikörper aufgenommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Hierfür wurde wieder die Flüssigkeit jedes Kanals komplett abgezogen und der Kanal mit 100 µl Färbelösung gefüllt. Abschließend wurde der Färbemix abpipettiert, die Kanäle dreimal für zehn Minuten mit PBS gewaschen und anschließend mit Mounting Medium, zum Schutz der Fluorophore, befüllt.

Tabelle 2.4.: Verwendete Konzentrationen der primären und sekundären Antikörper für die quantitative Immunfluoreszenzfärbung der Kanalslides.

Antikörper	Spezies	Konzentration [$\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$]
anti-Claudin-5	Kaninchen	2,5
anti-Connexin43	Kaninchen	1,25
anti-VE-Cadherin	Maus	1
anti-Kaninchen-AF555	Ziege	2
anti-Maus-AF488	Ziege	2

2.7. Mikroskopie

Je nach Zielsetzung wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Mikroskope verwendet. Diese Mikroskope und die damit verbundenen Bildaufnahmen mit allen notwendigen Angaben werden im jeweiligen Abschnitt erläutert.

2.7.1. Nikon Eclipse Ti

Das Nikon Eclipse Ti wurde für die Aufnahme der quantitativen Immunfluoreszenzbilder verwendet. Diese Aufnahmen wurden genutzt um die morphologischen Parameter zu bestimmen und die Veränderung der Zell-Zell-Kontakte zu analysieren. Bei der verwendeten Fluoreszenzlampe handelt es sich um eine Intensilight C-HG TIE von Nikon. Alle Bilder wurden mit der CCD-Kamera von Princeton Instruments aufgenommen. Um die Intensitätswerte der Fluoreszenzbilder vergleichen zu können, wurde für jede Färbung immer die gleiche Belichtungszeit und auch ansonsten die gleichen Einstellungen am Mikroskop verwendet (wie zum Beispiel die Einstellung der Blenden). Die Belichtungszeiten für die unterschiedlichen Fluorophore mit den entsprechenden Filterwürfel sind der Tab. 2.5 zu entnehmen.

Tabelle 2.5.: Belichtungszeiten für quantitative Analysen der Immunfluoreszenz Aufnahmen mit dem 20x Objektiv.

Filter	Fluorophor	Markierung	Belichtungszeit [ms]
UV-2A	DAPI	Zellkern	50
FITC	AF488	VE-Cadherin	1000
RFP	AF555	Claudin-5	250
RFP	AF555	Connexin43	200
Cy5	AF660	Aktin	2000

Alle zwölf Kanäle eines Experiments wurden am selben Tag nacheinander aufgenommen. Zusätzlich wurden auch Aufnahmen eines unbenutzten Kanals, der nur mit Mounting Medium befüllt wurde, gemacht. Dieser Kanal diente dazu, um die Intensitätswerte einzelner Experimente vergleichen zu können, die ohne Anregung eines Fluorophors entstehen. Der gemittelte Intensitätswert dieser Aufnahmen enthält Rauschquellen, wie zum Beispiel die schwache Autofluoreszenz des Mounting Mediums oder der Kanalfolie. Zur Kontrolle, ob die Kamera zwischen den verschiedenen Aufnahmetagen das selbe Verhalten zeigt, wurde zusätzlich der mittlere Intensitätswert zu allen Belichtungszeiten jedes Experiments bestimmt ohne das Licht auf den Kamerachip fällt. Diese Werte waren konstant für alle Experimente.

Alle Aufnahmen wurden mit einem Objektiv PlanFluor 20x NA 0.45 aufgenommen und das Mikroskop über das Computerprogramm MicroManager angesprochen. Pro Kanal wurden fünf Aufnahmen, über die gesamte Länge verteilt, gemacht. Pro Stelle wurde über die Programmeinstellung 'Multi-dimensional Acquisition' für alle im Kanal vorhandenen Fluorophore die Aufnahmeeinstellung (Tab. 2.5) angegeben sowie der Speicherort festgelegt. Dieser Aufnahmemodus wurde für alle Färbungen gleich angewendet, wodurch die Aufnahmen verschiedener Experimente vergleichbar sind.

2.7.2. Leica TCS SP5

Für Aufnahmen an einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop wurde das Leica TCS SP5 am „Center for Advanced Light Microscopy“ (CALM, LMU München) genutzt. Mittels konfokaler Mikroskopie wurden Übersichtsaufnahmen mit hoher Auflösung angefertigt und Stapelaufnahmen in z-Richtung durchgeführt. Die Stapelaufnahmen sollen die Veränderung der Zell-Zell-Kontakte auch in z-Richtung auflösen, um so eventuelle Unterschiede der Lage und Ausprägung der Proteine zu bestimmen. Die Aufnahmen wurden alle mit einem HCX PL APO Lambda Blue 63x 1.4 oil Objektiv durchgeführt. Die verwendeten Laser mit Angabe der damit illuminierten Fluorophore sind in Tab. 2.6 aufgelistet. Die Einstellung an der Software zur Steuerung des Mikroskops für die jeweilige Bildaufnahme sind in Tab. 2.7 zu sehen. Gain und Laserleistung wurden möglichst konstant eingestellt.

Tabelle 2.6.: Verwendete Laser zur Bildgebung am Konfokalmikroskop Leica TCS SP5.

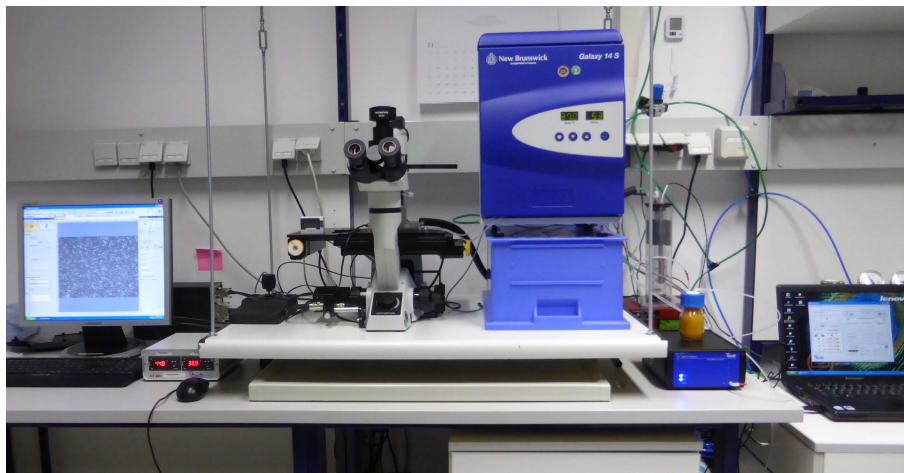
Laser	Fluorophor
Diodenlaser 405nm kpl Coherent (25mW)	DAPI
Argon Laser (458nm, 476nm, 488nm, 514nm)	AF488
DPSS Laser kpl 561nm MG (10mW)	AF555
HeNe Laser 633nm, Uniphase (10mW)	AF660

Tabelle 2.7.: Einstellungen der Computersoftware für Bildaufnahme am Konfokalmikroskop Leica TCS SP5.

Einstellung	Übersicht	Stapel
Zoom	1,0	2,5
z-Abstand	0	0,21µm
Line Average	4	4
Frame Average	1	1

2.7.3. Olympus CKX41

Für die Zeitraffer-Aufnahmen wurden die HUVEC wie für alle bisher beschriebenen Versuche. Es wird ein Kanalslide pro Aufnahme benötigt und ein extra angefertigtes Perfusionssset. Das Set besteht aus dem gleichen Schlauch wie das rote Set, jedoch mit einer Länge von 1 m statt 15 cm. Diese Länge ist nötig um die Distanz zwischen Brutschrank und Kanal auf dem Mikroskop zu überbrücken. In Abb. 2.10 ist der Aufbau für Langzeitaufnahmen von flusskultivierten Zellen gezeigt. Für die Kalibrierung des Sets wird in der Software das PS gelb/grün eingestellt und ein Druck von 50 mbar. Ansonsten läuft die Kalibrierung ab wie in Kap. 2.3 beschrieben.

**Abbildung 2.10.:** Aufbau für Langzeit-Aufnahmen von flusskultivierten Endothelzellen am Olympus CKX41

Vor Einsaat der Zellen wird der Versuch am Mikroskop aufgebaut, damit in dieser Zeit der Brutschrank und die Mikroskopheizung eine Temperatur von 37 °C haben und eine Umgebung von 5% CO₂ eingestellt ist. Danach wurde das Perfusionssset kalibriert und bis zum Anschluss des Kanals im Brutschrank gestellt. Nun wurden die HUVEC in der üblichen Konzentration von $2 \cdot 10^6 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$ eingesät und für ungefähr 30 min in den Zellkulturinkubator gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert. Ist der Großteil der Zellen adhären, konnte der Kanal an das vorbereitete Perfusionssset angeschlossen werden und der Kanal in die Mikroskopheizung eingebaut werden. Abb. 2.11 zeigt die Bodenplatte der verwendeten Heizung mit dem angeschlossenen Kanal in der Halterung, sowie die verwendete Schlauchführung für das Perfusionssset. Auf diese Anordnung wird der beheizte Deckel angebracht und die Aufnahmeposition am Computer eingestellt. Die Bilder wurden im Phasenkontrast alle zehn Minuten aufgenommen. Der Fluss wurde, wie in den anderen Experimenten, erst zwei Stunden nach Einsaat der Zellen gestartet, der Versuch dauerte ab diesen Zeitpunkt die üblichen 96 h. Der Aufbau für Zeitrafferaufnahmen wurde auch analog am Nikon Eclipse Ti durchgeführt.

Es sind zum Teil verschiedene Probleme bei Langzeitaufnahmen von 96 Stunden aufgetreten. Es können Luftblasen entstehen, da der Schlauch zwischen Brutschrank und Mikroskopheizung abkühlt und Gas aufnimmt. Dieses wird bei erwärmen der Heizung wieder frei und die dadurch entstehenden Blasen bleiben im Schlauch des Systems und können die Zellschicht beschädigen oder sogar den Kanal verstopfen. Dieses Problem trat aber nur selten auf. Das Hauptproblem war, dass viel Flüssigkeit des Mediums über diesen langen Aufnahmezeitraum verdunstet und deswegen die Salzkonzentration ansteigt. Die steigende Salzkonzentration führt zu morphologischen Veränderungen. Dadurch sind die Zeitrafferaufnahmen nur bedingt vergleichbar mit den Experimenten zur Immunfluoreszenzfärbung und konnten deshalb nicht für quantitative Auswertungen verwendet werden.

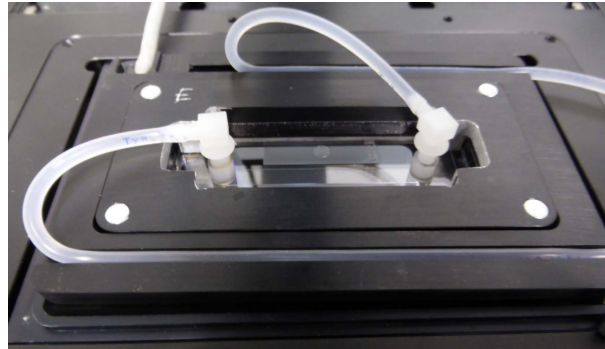


Abbildung 2.11.: Angeschlossener Kanal mit Zellen in Halterung der Mikroskopheizung und Schlauchführung des Perfusionsset

2.8. Impedanz Messung

Die Impedanz Messungen wurden durchgeführt um die Veränderungen der Physiologie der Endothelzellen über die Zeit zu charakterisieren. Die physiologischen Eigenschaften der Zellschicht zeichnen sich durch die Veränderung der Barrierefunktion des Endothels aus und hängen maßgeblich von der Permeabilität der Zellschicht für kleine anorganische Ionen ab. Die Permeabilität für Ionen ist wiederum stark von der Morphologie und den Zell-Zell-Kontakten determiniert. Bevor die verwendete Messmethode zur Untersuchung der Physiologie erläutert wird, erfolgt eine kurze Erklärung was man unter Impedanz versteht und wie die Impedanz-Spektroskopie genutzt wird um die Barrierefunktion einer Endothelschicht *in vitro* zu untersuchen. Die wichtigsten Aspekte, die notwendig sind für Anwendungen in dieser Arbeit, werden nachfolgend erklärt. Diese Aspekte und eine weiterführende Erläuterung der Bedeutung von Impedanz-Spektroskopie in der Biologie sind der weiterführenden Literatur zu entnehmen [47, 48].

In einem typischen Experiment der Impedanz-Spektroskopie wird eine sinusförmige Spannung $U(t)$ mit einer Kreisfrequenz $\omega = 2\pi f$ an das zu untersuchende System angelegt und der dadurch resultierende Strom $I(t)$ gemessen. Die Spannung ist wie folgt definiert, wobei U_0 die Amplitude der Sinusschwingung entspricht und t der Zeit, somit ist $U(t)$ der Momentanwert der Spannung (i ist die imaginäre Einheit und als $i^2 = -1$ definiert).

$$U(t) = U_0 * e^{i\omega t} \quad (2.3)$$

Analog zur Spannung ist die Stromstärke $I(t)$ definiert, wobei hier die Phasenverschiebung φ

zwischen der Spannung und der Stromstärke berücksichtigt wird.

$$I(t) = I_0 * e^{i(\omega t - \varphi)} \quad (2.4)$$

Das Verhältnis der Amplitude der Wechselspannung U_0 mit der Amplitude des Wechselstroms I_0 und der Phasenverschiebung φ zwischen diesen versteht man als Impedanz, auch Wechselstromwiderstand genannt. Mathematisch können das Amplitudenverhältnis und die Phasenverschiebung als komplexe elektrische Impedanz Z definiert werden (2.5). Das Verhältnis der Amplituden wird auch als Amplitude der Impedanz $|Z|$ bezeichnet.

$$Z = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0}{I_0} * e^{i\varphi} = |Z| * e^{i\varphi} \quad (2.5)$$

Die Impedanz beschreibt also analog zum Ohmschen Gesetz bei Gleichstrom den Quotienten aus einer Wechselspannung und der resultierenden Stromstärke. Neben dem Ohmschen Gesetz sind auch die Kirchhoffschen Regeln für elektrische Netzwerke gültig. Für einen Ohmschen Widerstand gilt, dass die Impedanz gleich dem Widerstand R ist, da keine Phasenverschiebung auftritt und das Verhältnis aus Spannung und Stromstärke unabhängig von der angelegten Frequenz ist. Die Impedanz an Kondensatoren hingegen ist abhängig von der Frequenz mit $|Z| = 1/\omega C$ und einer Phasenverschiebung von -90° mit Kapazität C des Kondensators. Kombiniert man in Schaltkreisen nun Ohmsche Widerstände mit Kondensatoren, so erhält man in der frequenzabhängigen Darstellung der Impedanz ein Spektrum, welches für das vorliegende elektrische Netzwerk spezifisch ist. Grundsätzlich besteht jedes Spektrum eines Schaltkreises aus der Überlagerung der Spektren der Einzelkomponenten.

2.8.1. Messprinzip ECIS

Alle Impedanzmessungen dieser Arbeit wurden mit dem Gerät ECIS Model Z Θ durchgeführt. ECIS steht für 'Electrical Cell-substrate Impedance Sensing', das Verfahren wurde 1984 von Giaever und Keese publiziert [49] und auch weiterentwickelt [50, 51]. Das Gerät misst die Impedanz und gibt zusätzlich den gemessenen Widerstand und die gemessene Kapazität über die Zeit in Abhängigkeit der jeweils angelegten Frequenz des Wechselspannungssignals aus. Abb. 2.12 zeigt schematisch den Versuchsaufbau einer ECIS-Messung. Die Endothelzellen wachsen auf planaren Goldelektroden. Zwischen der Arbeits- und Gegenelektrode wird eine sinusförmige Wechselspannung von 10 mV angelegt und die elektrische Impedanz gemessen. Wegen der geringen Wechselspannung von 10 mV handelt es sich um eine nicht invasive Messmethode. Der Stromkreis zwischen beiden Elektroden wird über das leitende Kulturmedium geschlossen. Wie die Aufsicht im linken unteren Teil der Abbildung zeigt, ist die Arbeitselektrode mit einem Durchmesser von 250 μm deutlich kleiner als die Gegenelektrode (ca. Faktor 100), weshalb die gemessene Impedanz dominiert wird von der Impedanz der Arbeitselektrode, während der Anteil der Gegenelektrode an der Gesamtimpedanz vernachlässigt werden kann. Denn es gilt, dass die Impedanz mit dem reziproken Wert der Fläche ansteigt. Zellbiologische Änderungen werden also nur von Zellen, die sich auf der Arbeitselektrode befinden, gemessen. Die Zellen sind näherungsweise als Isolatorpartikel auf den Elektroden zu betrachten, weil die Zellmembran den Stromfluss begrenzt. Darum erhöht sich die Impedanz im Vergleich zu einer Elektrode mit Zellen zu einer Elektrode ohne Zellen.

Auf diese Weise lassen sich physiologische Änderungen der Zellen detektieren, in dem man Messungen bei gleicher Aufnahme Frequenz wiederholt und die Änderungen als Funktion der Zeit darstellt und analysiert. Analysiert werden die Rohdaten der Impedanzmessung. Neben der

Impedanz wird der gemessene Widerstand und die gemessene Kapazität über die Zeit aufgezeichnet. Der Zusammenhang zwischen diesen drei physikalischen Größen ist in 2.6 aufgezeigt. Die komplexe Impedanz lässt sich in einen Realteil Re und einen imaginär Teil Im zerlegen. Der Realteil entspricht dabei dem Wirkwiderstand R und der Imaginärteil dem sogenannten kapazitiven Blindwiderstand $1/\omega C$. Von der sonst typischen Modellierung von Impedanzdaten bei ECIS-Messungen wird abgesehen, da das Modell hierfür von den Zellen als Zylinder mit einem definierten Radius ausgeht. Dass diese Annahme nicht erfüllt, ist machen die gemessenen Veränderung der Zellfläche und Zellform deutlich.

$$Z = \sqrt{Re^2 + Im^2} = \sqrt{R^2 + \left(\frac{1}{\omega C}\right)^2} \quad (2.6)$$

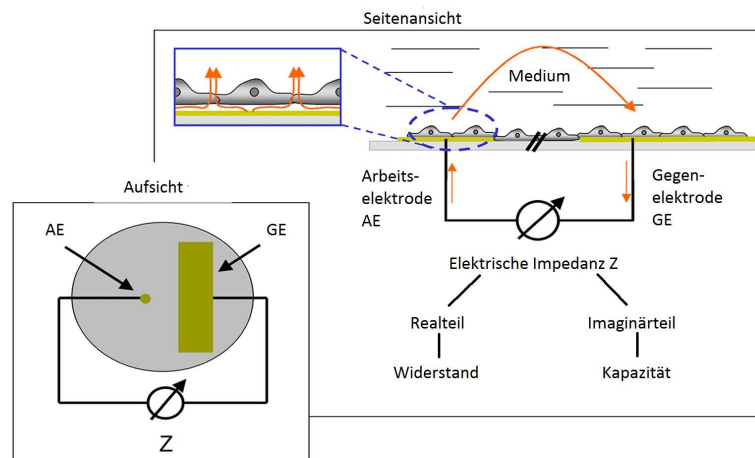


Abbildung 2.12.: Messprinzip ECIS. Die Zellen sind direkt auf den Goldelektroden kultiviert. Die Impedanz dieser Elektroden wird gemessen um nichtinvasiv morphologische Parameter der konfluenten Zellschicht zu bestimmen [48].

Für die Analyse des Impedanzspektrums eines biologischen Systems muss ein Ersatzschaltbild gefunden werden, welches das gemessene frequenzabhängige Impedanzspektrum durch eine Übertragungsfunktion erklärt. In Abb. 2.13 A ist das typische Impedanzspektrum einer Endothelzellschicht gezeigt. Die gefüllten Kreise zeigen das Spektrum eines zellfreien Systems, die andere Darstellung das gleiche System mit Zellen. Der zur Erklärung dieses Spektrums verwendete Schaltkreis ist in Abb. 2.13 B dargestellt. Die Zellschicht wird über die kapazitiven Eigenschaften C_{cl} der Zelle und dem Widerstand R dargestellt. Der Widerstand des Mediums R_{med} und die Impedanz der Messelektrode Z_{el} sind die nötigen Bestandteile des Schaltbildes. In dieser Arbeit wird das gezeigte Ersatzschaltbild angenommen.

2.8.2. Durchführung Versuch

Die benötigten Materialien (Elektrodenkanäle, rote Perfusionssets, Medium) wurden, wie in allen anderen Versuchen, am Tag vor Beginn zum Entgasen in den Inkubator gestellt. Für alle Messungen wurden die Flusskanäle mit acht Elektroden pro Kanal verwendet. Jede einzelne Elektrode ist kreisförmig und hat einen Durchmesser von 250 μm . Diese Kanalslides wurden ebenfalls mit einer Collagen IV Lösung beschichtet, wie in Kap. 2.2.2. Die Beschichtungslösung wurde mit MilliQ Wasser aus Kanälen gewaschen und anschließend durch Zellkulturmedium ersetzt. Die Kanäle

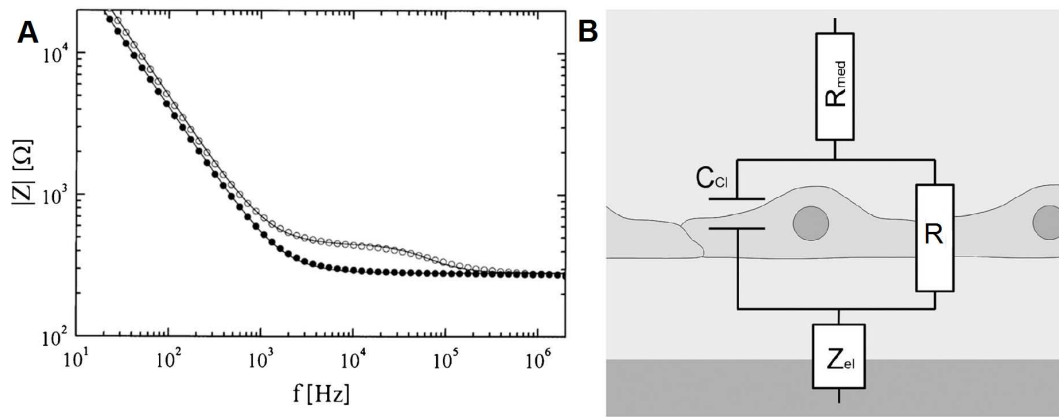


Abbildung 2.13.: A Impedanzspektrum in Abhängigkeit der Frequenz des Systems mit (leere Kreise) und ohne Zellen (gefüllte Kreise). B Ersatzschaltbild für gezeigtes Impedanz-Spektrum mit den für die Beschreibung nötigen Bestandteile der Zelle C_{dl} und R , dem Widerstand des Mediums R_{med} und der Impedanz der Elektrode Z_{el} . [47]

mit Medium wurden bis zur Verwendung im Brutschrank gelagert. Der prinzipielle Aufbau eines ECIS-Versuchs ist unter anderem von Szulcek et al. beschrieben worden und in einem Video inklusive Messprogrammsteuerung erklärt [52].

Das Messgerät ECIS Z Θ wurde neben dem Brutschrank aufgebaut und über USB mit dem dazugehörigen Computer verbunden. Die Messhalterung für die Elektrodenkanäle wurde in den Brutschrank gestellt und ebenfalls mit dem Messgerät verbunden. Vor der Messung wurden mittels eines Testarrays die Elektrodenkontakte auf Funktionsfähigkeit geprüft. Pro Versuch wurden zwei Kanäle benötigt, einer für die Kultivierung mit $10 \frac{dyn}{cm^2}$ und einer für die Kontrollbedingung. Vor Einsaat der Zellen wurde das Medium aus den Slides komplett abgezogen und die Kanäle mit einer Zellsuspension von $2 \cdot 10^6 \frac{Zellen}{ml}$ befüllt. Zum Befüllen wurde eine 1 ml Spritze verwendet um Luftblasen im Slide zu vermeiden, da sich die Elektrodenkanäle ansonsten nur sehr schwer befüllen lassen. Nach Einsaat der Zellen wurden diese zurück in den Inkubator gestellt und eine Stunde für den Vorgang des Adhärenz abgewartet. Es ist danach jeweils ein Slide an ein Perfusionssystem angeschlossen und jeder Kanal in der Messhalterung befestigt worden. Der Aufbau ist in Abb. 2.14 gezeigt. Die Messung wurde über das zum Gerät gehörende Computerprogramm im Multifrequenz Modus gestartet. Zwei Stunden nach Einsaat der Zellen ist der Fluss beziehungsweise die Kontrollbedingung gestartet worden. Der Start wurde im Messverlauf markiert. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Messung für 96 Stunden ohne weitere Änderungen des Versuchsaufbaus fortgeführt. Nach Beenden eines Versuchs wurden die Kanäle ausgebaut und fixiert. Da keine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt wurde, erfolgt die Fixierung mit 4% Formalin Lösung. Die Kanäle wurden zuerst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 30 min bei Raumtemperatur mit der 4% Formalin Lösung inkubiert. Nach der Fixierung mit Formalin werden die Kanäle dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und Phasenkontrastbilder der Zellen auf jeder der acht Elektroden pro Kanal gemacht. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 4x Objektiv am Mikroskop EVOS fl. Die Daten des Versuchs wurden zur weiteren Bearbeitung in eine .csv-Datei konvertiert.

Aufgrund des Versuchsverlaufs wurden zwei der drei durchgeführten Experimente länger als die nötigen vier Tage durchgeführt und bis zu acht Tage lang Messwerte aufgenommen. Phasenkontrastbilder wurden hierbei zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Fixierung von Kanälen aufgenommen. Der Versuchsverlauf sowie die Aufnahmen sind im Ergebnisteil der Arbeit unter Kap. 3.5.4 explizit erläutert.

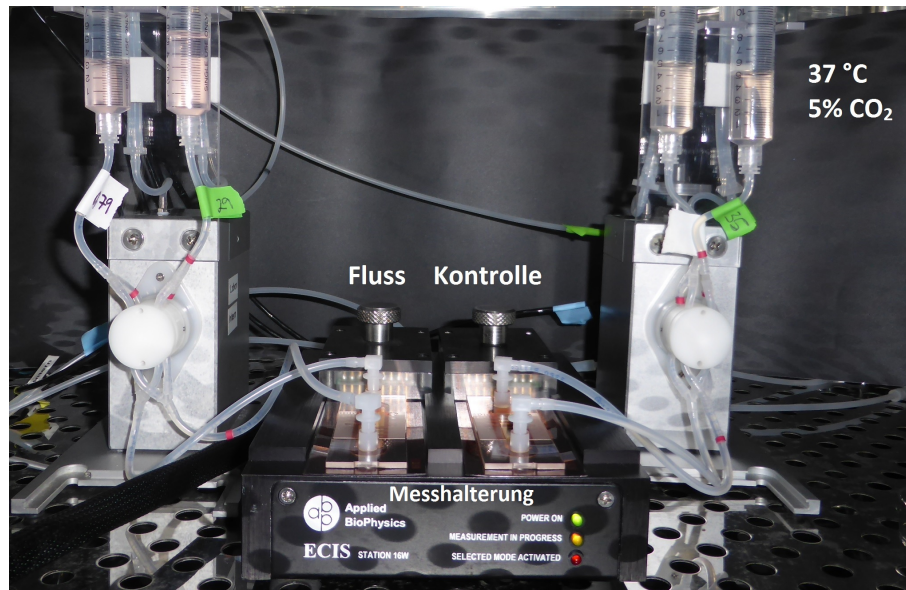


Abbildung 2.14.: Versuchsaufbau ECIS im Inkubator unter Standardbedingungen. Die Elektrodenkanäle sind in die Messhalterung eingebaut und jeder Kanal ist mit einem Perfusionsset verbunden.

2.9. Datenverarbeitung und Analyse

2.9.1. Morphologie

Die Bestimmung der morphologischen Parameter basierend auf den Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung der VE-Cadherine. Die VE-Cadherine geben zuverlässig die Zell-Zell-Kontaktfläche der Endothelzellschicht wieder und somit die Zellränder der einzelnen Zellen. Damit lässt sich der jeweilige Umfang aller Zellen eines Bildes mittels eines Computeralgorithmus bestimmen und somit verschiedene Parameter berechnen. Analysiert worden sind die Zellfläche, die Zellform und die Ausrichtung der Zellen unter Fluss und Kontrollbedingung zu den sechs Fixierungszeitpunkten 0 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h. Die Generierung der Rohdaten erfolgte mit ImageJ. Hierzu wird ein Bild der VE-Cadherin Färbung in ImageJ geöffnet und das entsprechende Pixel zu μm Verhältnis angegeben. Aus diesem Bild wird eine binäre Maske erzeugt um das implementierte Verfahren des 'Analyze Particles' der Software zu nutzen. Die Schwarz-Weiß-Maske wird über manuelle Einstellung des Treshholds erzeugt und Lücken in den Zellrändern werden wenn nötig manuell geschlossen. Unter 'Set Measurements' wird angegeben welche Parameter des ausgewählten Bildes bestimmt werden sollen (Area, Shape descriptor, Perimeter, Fit ellipse). Sind alle nötigen Voreinstellungen getroffen, kann das Verfahren des 'Analyze Particles' genutzt werden. In dem sich öffnenden Fenster werden folgende Angaben gemacht beziehungsweise aktiviert: Size (μm^2 : 150-3500, Display results, Exclude on edges, Clear results, Include holes, Add to manager). Falls gewünscht, können extra Bilder ausgegeben werden, die die gefitteten Ellipsen zeigen oder die bestimmten Flächen.

In Abb. 2.15 ist schrittweise das Vorgehen der Bildbearbeitung beispielhaft an dem markierten Ausschnitt der VE-Cadherin Färbung (Bild links) gezeigt. Im rechten Teil der Abbildung ist unter *a* die erzeugte Maske des Ausschnitts zu sehen, *b* zeigt die bestimmte Fläche der analysierten Partikel, die ohne Randberührung sind, *c* zeigt die gefitteten Ellipsen und *d* die Überlagerung der Maske mit den Rändern der analysierten Partikel und Nummerierung. Der in ImageJ angewendete Algorithmus basiert darauf, dass die Eigenschaften der Ellipse über die Momente des analysierten Partikels bestimmt werden. Die Ellipsen zeichnen sich also dadurch aus, dass sie die-

selbe Fläche und denselben Mittelpunkt haben wie die entsprechenden Zellen [53]. Der Winkel der Hauptachse der Ellipse entspricht dabei dem Ausrichtungswinkel der Zelle. Der Winkel liegt zwischen 0° und 180° , wobei 90° einer Ausrichtung in Flussrichtung entspricht. Das Verhältnis der Nebenachse zur Hauptachse wird als Maß für die Zellform, auch Elongationsfaktor genannt, berücksichtigt und direkt als 'Shape descriptor' ausgegeben. Die Tabelle der Messparameter wird als .txt-Datei zur Weiterverarbeitung abgespeichert. Die Auflistung erfolgt nach Nummerierung der Partikel wie in Abb. 2.15 *d* gezeigt.

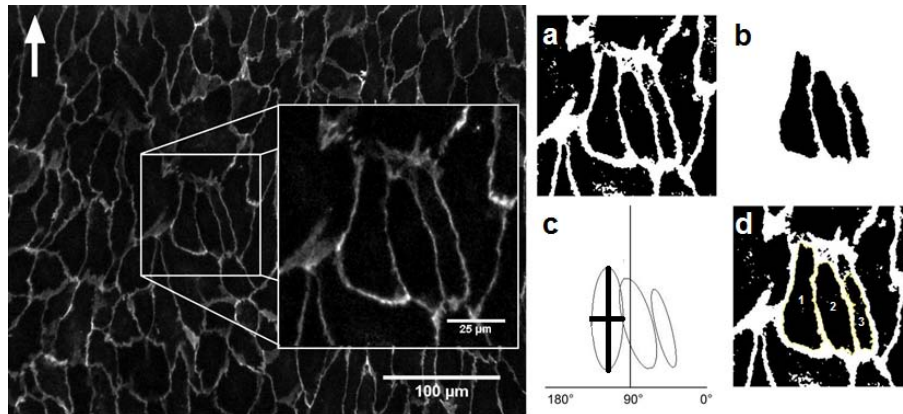


Abbildung 2.15.: Generierung der Rohdaten für die Analyse der morphologischen Parameter mittels imageJ. Links: Graubild der VE-Cadherin Färbung mit Pfeil in Flussrichtung, Markierung eines Beispielausschnitts. Rechts: *a* Maske des links markierten Ausschnitts des Rohbildes, *b* Fläche der gefundenen Partikel, *c* gefittete Ellipsen der Zellen, *d* Nummerierung der Zellen und Umfang.

Pro Fixierungszeitpunkt und Bedingung werden drei Bilder analysiert und die Einzeltabellen zu einer Tabelle zusammengefasst. Auf diese Weise erhält man pro Experiment zwölf Tabellen. Die Daten werden mittels des Statistikprogramms R untersucht. Zuerst werden von den drei genannten Parametern Fläche, Elongationsfaktor und Ausrichtungswinkel der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung sowie die Anzahl der Messpunkte n bestimmt und in einer neuen Datei zur Weiterverarbeitung abgespeichert. Neben dem Ausrichtungswinkel wird auch der Sinuswert des Winkels abgespeichert. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung wurde ebenfalls R verwendet. Wenn im Ergebnisteil nicht anders angegeben, wurde ein zweiseitiger t-Test (Befehl: `t.test`) verwendet und vorher die Gleichheit der Varianzen mit einem F-Test (Befehl: `var.test`) überprüft. Detaillierte Informationen der jeweiligen Tests und ihrer Implementierung in R können bei Interesse in der Dokumentation des Programms oder im Internet nachgelesen werden [54]. Die entsprechenden p-Werte der Tests wurden zusammen mit den anderen Daten aller Experimente in einer Excel-Datei zusammengefasst, die auf dem beigelegten Datenträger im Ordner Daten unter Morphologie.xlsx zu finden ist.

2.9.2. Zell-Zell-Kontakt Proteine

Um die Veränderung der Menge des jeweils vorliegenden Proteins zu bestimmen, wurden die Fluoreszenzaufnahmen der jeweiligen Antikörperfärbung verwendet. Da die Aufnahme des Fluoreszenzsignals von allen unabhängigen Versuchen immer unter den gleichen standardisierten Bedingungen stattfand, können die gemittelten Intensitätswerte pro Bild mit der vorliegenden Menge an Protein in Beziehung gesetzt werden. Für einen direkten Vergleich der absoluten Werte des mittleren Grauwerts sind die Schwankungen trotz Standardisierung zu groß. Deshalb wurden für die Analyse der Veränderung der Junction Proteine die gemittelten Intensitäten der Zell-Zell-Kontakt Fläche und der Cytoplasma Fläche berechnet. Aus diesen beiden Werten wurde das

Verhältnis Zellränder zu Cytoplasma gebildet. Somit erhält man ein Maß, unabhängig der Größe der Absolutwerte, wie viel stärker das jeweilige Protein an den Zellrändern vorliegt im Vergleich zum Cytoplasma. Ein Verhältnis von 1 bedeutet folglich, dass das Fluoreszenzsignal im Cytoplasma gleich hoch ist wie an den Zellrändern. Das Protein liegt in der Zelle ist damit überall gleich vor. Umso höher das Verhältnis, desto klarer sind Zell-Zell-Kontakte durch das untersuchte Protein ausgeprägt. Untersucht wurden insgesamt acht Experimente und pro Bedingung und Zeitpunkt sind drei Bilder jeder Proteinfärbung analysiert worden.

Diese Analyse wurde mit MATLAB durchgeführt. Es werden die Maske der VE-Cadherin Färbung, das Rohbild der VE-Cadherine und die entsprechende Aufnahme des parallel gefärbten Proteins (Claudin-5 oder Connexin43) eingelesen. In einer Schleife wird über die Maske abgefragt, ob die entsprechenden Pixel der Rohbilder zur Zell-Zell-Kontakt Fläche oder zum Cytoplasma gehören und entsprechend in einer Matrix der Grauwert des Pixel geschrieben. Gleichzeitig wird über entsprechende Laufparameter abgespeichert wie viel Pixel zu welcher Fläche gehören. Gebildet werden nun die Mittelwerte beider Flächen und das entsprechende Verhältnis wird für das jeweilige Bild berechnet. Dieses Verfahren wird für alle Aufnahmen durchgeführt.

2.9.3. Konfokalmikroskopie: z-Stapel

Mittels konfokaler Mikroskopie wurden Stapelaufnahmen von Zellrändern gemacht um eventuell auftretende Unterschiede in der Organisation der analysierten Zell-Zell-Kontakt Proteine in der Zellwand aufzuzeigen. Die Analyse erfolgt mit ImageJ. Es wurde die Bildersequenz der aufgenommenen Kanäle an einer Position eingelesen und je zu einem Stack zusammengefügt. Von jedem Stack wurde der mittlere Grauwert jedes Bildes im Stapel ausgelesen. Jede Bildposition wird seiner z-Position zugeordnet. Auf diese Weise kann ein Diagramm erstellt werden, welches den mittleren Intensitätsverlauf in z-Position aufzeigt. Am Maximum jeder Kurve zeigt sich also das höchste Intensitätssignal und somit liegt an entsprechender z-Position am meisten Protein vor. Diese Stapel der drei Kanäle werden zur Visualisierung je einer Falschfarbe zugeordnet und zu einem überlagerten Stapel kombiniert. Dieser Stapel wird unter Angabe eines Skalierungsbalken und der entsprechenden z-Position pro Bild als Videodatei abgespeichert.

2.9.4. Impedanz-Messungen

2.9.4.1. Rohdaten

Die Analyse und graphische Darstellung der Impedanz Messungen wurden mit MATLAB durchgeführt. Die hierfür geschriebenen Programmcodes sind auf dem Datenträger hinterlegt. Die Rohdaten der drei Messungen sowie die MATLAB-Kodes sind auf dem beigelegten Datenträger der Arbeit zu finden. Die Messungen wurden sowohl im Hinblick auf die Barrierefunktion der Endothelzellschicht als Zeit-Widerstand-Diagramm (Aufnahmefrequenz: 4.000 Hz) als auch auf die Belegung der Elektroden als Zeit-Kapazität-Diagramm (Aufnahmefrequenz: 64.000 Hz) dargestellt. Zusätzlich wurden die Mittelwerte des Widerstands mit der dazugehörigen Standardabweichung aller Elektrodenmessungen analog zu den Zeitpunkten für die Fixierung, siehe Tab. 2.2, extra ausgelesen um die Widerstandswerte mit den Ergebnissen der Morphologie und der Veränderung der Zell-Zell-Kontakte korrelieren zu können.

2.9.4.2. Mikromotion

Neben der Veränderung des gemittelten Widerstandes über die Zeit zeigt sich in den Fluktuationen des Widerstandes die sogenannte Micromotion. Unter Micromotion ist die Bewegung der adhärennten Zellen auf der Goldelektrode selbst zu verstehen. Durch diese Bewegung kommt es zu

Reorganisationen der Zell-Zell-Kontakte und damit zu Schwankungen der Widerstandsmessung. Die Fluktuationen können als Maß für die Aktivität der Zellen gesehen werden [50].

Für die Analyse sind verschiedene Herangehensweisen möglich [55] um die Mikromotion der Endothelzellschicht quantifizieren zu können. In dieser Arbeit werden die Fluktuation des Widerstands der einzelnen Elektroden (bei einer Aufnahme Frequenz von 4000 Hz) in definierte Zeitintervalle von zwölf Stunden untersucht. Es wird eine Varianzanalyse durchgeführt, indem innerhalb eines Zeitintervall und pro Elektrode die Varianz der Fluktuation berechnet wird. Um nur die Schwankungen zu quantifizieren und nicht den Trend des Widerstands in diesem Zeitintervall wird ein sogenanntes 'linear detrending' durchgeführt. Von der Datenreihe einer Elektrode eines Zeitabschnitts wird die Geradengleichung der besten linearen Regression zur Korrektur der Messreihe genutzt. Dies führt dazu, dass die Daten lediglich Schwankungen um die Null zeigen. Aus den linear korrigierten Daten wird die Varianz des Datensatzes als Maß für die Mikromotion berechnet. Die Varianz wird für alle acht Elektroden eines Kanals berechnet und gemittelt. Die hierfür notwendige Datenanalyse wurde mit MATLAB durchgeführt.

In diesem File ist ebenfalls eine Möglichkeit zur Fourier-Analyse implementiert. Hierfür werden ebenfalls die trendkorrigierten Daten definierter Zeitabschnitte genutzt und das Powerspektrum der Fast Fourier Analyse gegen den entsprechenden Frequenzbereich dargestellt. Die Idee ist, mittels dieser Methode, die Frequenz bzw. Frequenzen, welche die Mikromotion dominieren zu bestimmen. Dies ist mit den Daten dieser Arbeit leider nicht möglich da die Abtastrate der Messung pro Elektrode lediglich 0,0017 s beträgt.

2.9.5. Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse wurde mit R durchgeführt. Hierfür wurde eine Tabelle erstellt, die spaltenweise die Mittelwerte der Parameter enthält. Die Zeilen sind dem jeweiligen Zeitpunkt der Fixierung bzw. Messung zugeordnet (0 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h). Folgende Parameter wurden verwendet (Fluss und Kontrolle): Fläche, Ausrichtung, Zellform, VE-Cadherin, Claudin-5, Connein43, Widerstand und Zeitpunkte der Messungen. Verwendet wurde hierfür der Befehl 'corrgram' des gleichnamigen Pakets [56]. Aus der eingelesenen Mittelwert-Tabelle wird mit Hilfe des genannten Befehls eine Korrelationsmatrix erstellt. Der Korrelationskoeffizient für je zwei Parameter wird graphisch dargestellt und der Absolutwert ausgegeben. Der Korrelationskoeffizient $r_{x,y}$ der Merkmale x und y ist definiert nach Bravais und Pearson [57] und gibt den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen wieder und liegt im Intervall [-1,1]. Man spricht von negativer bzw. positiver Korrelation je nach Vorzeichen des Koeffizienten. Die statistische Signifikanz des Korrelationswert wird anhand der Berechnung des kritischen t-Werts beurteilt. Für die sechs gegebenen Messwerte und einem Signifikanzniveau von $p=0,05$ ergibt sich ein kritischer t-Wert von 2,7764.

2.9.6. Time Lapse Aufnahmen

Die Videos der Zeitrafferaufnahmen wurden mit ImageJ erstellt. Zunächst wurden jedoch die Bilddateien im .tif-Format mit IrfanView in .jpg-Dateien umgewandelt. Die gewünschten Einzelbilder werden in ImageJ geladen und zu einem Stack zusammengefügt. Jedes Bild erhält einen Skalierungsbalken und einen Zeitstempel (Programmregister: Image → Stacks → Label). Ein Video des Versuchs erhält man durch Speicherung des Bildstapels als .avi-Datei mit beliebig festgelegter Bildrate in Bilder pro Sekunde.

3. Ergebnisse

Alle Datentabellen und Diagramme der aufgeführten Ergebnisse sind auf dem Datenträger, welcher der Arbeit beigelegt ist, zu finden. Auch die gezeigten Mikroskopieaufnahmen und erwähnten Time-Lapse-Filme sind auf diesem Datenträger hinterlegt.

3.1. Viskositätsmessung

Für den Kalibrierungsfaktor bei einem Winkel von $\alpha=30^\circ$ und einer Messtemperatur von 37°C ergab sich bei der durchgeführten Messung ein Wert von $K_1(\alpha)=8,84\cdot 10^{-3}$. Die Ergebnisse der verschiedenen gemessenen Flüssigkeiten sind in Tab. 3.1 gelistet.

Tabelle 3.1.: Messwerte der Viskositätsmessung mit dem AMVn Viskosimeter bei 37°C und einem Winkel von $\alpha=30^\circ$.

Flüssigkeit	Viskosität [mPa.s]	VarCo [%]
Wasser	0,6916	0,01
PBS	0,7024	0,01
ECGM + Supplement Mix	0,7154	0,02
ECGM + Supp. Mix + FCS	0,7326	0,01
FCS	2,5114	7,37

Die Messwerte zeigen, dass die Viskosität η von Wasser, PBS und dem Zellkulturmedium ECGM mit verschiedenen Zusätzen in guter Näherung $0,7\text{mPa.s}$ beträgt, was umgerechnet $0,007 \frac{\text{dyn.s}}{\text{cm}^2}$ entspricht. Dieser Wert wird für alle Experimente als Wert für die Viskosität im Programm PumpControl zur Steuerung der Pumpe angegeben.

3.2. Western Blot

Abb. 3.1 zeigt beispielhaft den Nachweis der untersuchten Proteine: VE-Cadherin (Adherens Junction), Claudin-5 (Tight Junction) und Connexin43 (Gap Junction). In gezeigten Fall wurden $15 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Proteingehalt pro Bande aufgetragen. Das verwendete Lysat ist aus vier Kanälen, die unter Fluss kultiviert wurden, hergestellt. Das VE-Cadherin erscheint als distinkte Bande bei etwa 140kDa und ist deutlich zu sehen. Ein Nachweis von Claudin-5 ist bei beiden Scan Einstellungen von 360V und 420V nicht nachweisbar. Möglicherweise liegt das daran, dass Claudin-5 in einer zu geringen Menge vorliegt um es mittels Fluoreszenz detektieren zu können. Das Gap Junction Protein Connexin43 ist wiederum als Bande bei 43kDa zu erkennen. Die Bande ist im zweiten Scan mit 420V jedoch besser zu erkennen.

Da der Nachweis der Proteine mittels Western Blot nicht weiter durchgeführt wurde, werden die Ergebnisse auch nicht weitergehend diskutiert. Es ist festzuhalten, dass die entwickelte Methode jedoch im Allgemeinen funktioniert. Im Fall von Claudin-5 muss der Nachweis jedoch noch über Anpassungen des Versuchprotokolls erfolgen. Ansatzpunkte hierfür sind eine Erhöhung der aufgetragenen gesamten Proteinmenge, die Verwendung von mehr Zellen für ein Lysat oder die Wahl eines anderen Antikörpers für Claudin-5.

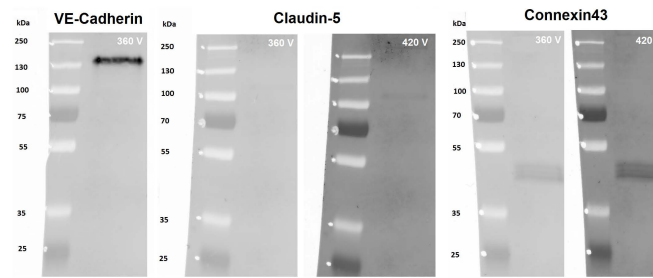


Abbildung 3.1.: Scans der Nitrocellulosemembranen mit verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen für entsprechende Zell-Zell-Kontaktproteine.

3.3. Morphologie

Wie im Methodenteil beschrieben wurden die Veränderung der morphologischen Parameter mittels Bildanalyse der VE-Cadherin Färbung bestimmt. Die nachfolgenden Diagramme zeigen den jeweiligen gemittelten Parameter aus den Mittelwerten von sieben unabhängigen Experimenten. Als Fehler ist immer die Standardabweichung der sieben Mittelwerte aufgetragen. In Tab. 3.2 ist die Anzahl der insgesamt analysierten Zellen aus dem Zelltracking angegeben. In den Abbildungen sind die wichtigen relevanten Signifikanzniveaus gekennzeichnet. Die paarweise getesteten Stichproben sind verbunden und über der Markierung ist das Niveau angegeben. Folgende Symbole entsprechen einem p-Wert von * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,001$. In den Tabellen sind nicht signifikant unterschiedliche Mittelwerte zweier Stichproben mit n.s. gekennzeichnet. Die Tabellen aller durchgeführten Tests sind auf dem, der Arbeit beiliegenden, Datenträger hinterlegt. Es wurden die morphologischen Parameter Einzelzellfläche, Zellform und Ausrichtung der Zellen untersucht. Die Diagramme aller drei Bedingungen sind gleich aufgebaut. Blaue Balken geben den Mittelwert der Zellen unter Flussbedingung wieder. Analog dazu sind die Werte der Kontrollen in rot dargestellt. Die angegebene Stundenzahl entspricht jeweils der Dauer der Kultivierung unter unterschiedlichen Bedingungen bis die jeweiligen Zellen fixiert worden sind.

Tabelle 3.2.: Anzahl der insgesamt getrackten Zellen für die morphologische Analyse aus sieben unabhängigen Experimenten.

Zeitpunkt	Fluss	Kontrolle
0 h	995	1052
3 h	1607	1674
24 h	2392	2267
48 h	2837	2678
72 h	3145	2583
96 h	3235	2560

3.3.1. Phasenkontrastaufnahmen

Phasenkontrastaufnahmen, die die morphologische Erscheinung der Zellschicht in den Kanälen deutlich zeigen sind beispielhaft in Abb. 3.2 gezeigt. Die Abbildung zeigt die HUVEC in Passage 3 eines Experiments unter Kultivierungsbedingungen bei konstanten $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$, der Pfeil gibt die Flussrichtung an, oder die statische Kultivierung. Die angegebene Stundenzahl in der rechten oberen Ecke jeder Aufnahme entspricht den Fixierungszeitpunkten für die Analysen basierend auf den Immunfluoreszenzfärbungen.

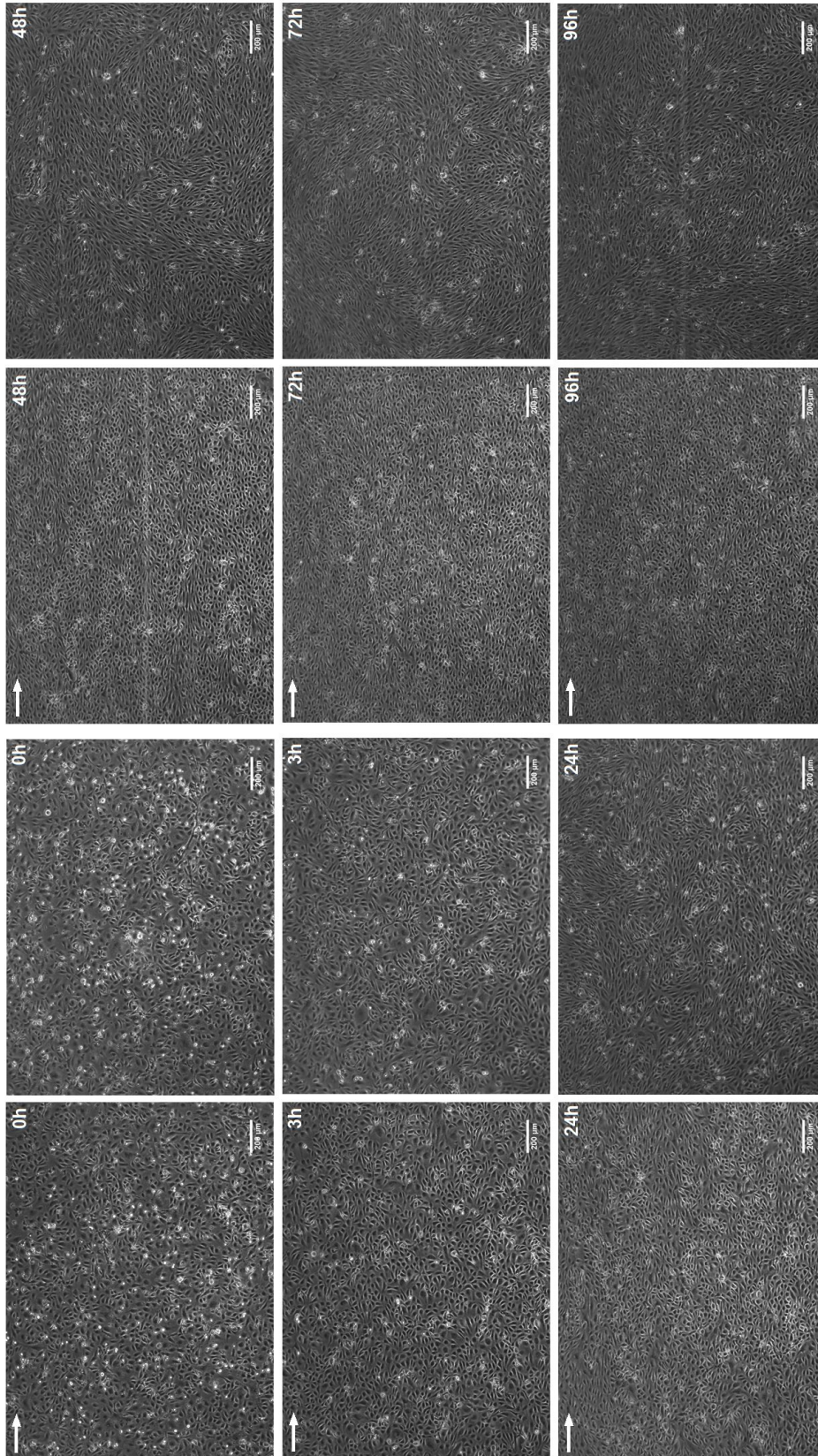


Abbildung 3.2.: Phasenkontrastaufnahmen von HUVEC kultiviert in μ -Slide I^{0.4} Collagen IV. Die erste und dritte Spalte zeigen Zellen unter Flusskultivierung mit $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ und die zweite und vierte Spalte geben Zellen unter Kontrollbedingungen wieder. Der Pfeil gibt die Richtung des Mediumflusses an und in der rechten oberen Ecke ist jeweils der Zeitpunkt innerhalb des Versuchsverlaufs angegeben.

Zum Zeitpunkt 0 h (2 Stunden nach Einsaat) sehen die Bilder beider Bedingungen gleich aus, da die Fixierung vor Start des Flusses statt fand. Es liegt eine annähernd geschlossene Endothelschicht vor. Drei Stunden nach Start der unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen ist eine erste Ausrichtung in Flussrichtung teilweise zu erkennen. Der Unterschied der morphologischen Erscheinung im Vergleich zur Kontrollbedingung ist noch nicht stark ausgeprägt. Zum Zeitpunkt der dritten Fixierung (24 h) sind Unterschiede vor allem in der Ausrichtung deutlich zu erkennen. In der Kontrollgruppe sieht man, dass eine Ausrichtung nur in kleineren Domänen des Ausschnitts vorhanden ist. Das Erscheinungsbild beider Bedingungen zeigt zu den darauffolgenden Tagen (48 h und 72 h) nur geringe Abweichungen zur Morphologie der HUVEC an Tag 1. Auffällig ist, dass der Bereich um den Zellkern von Zellen unter Fluss deutlich dunkler und kompakter erscheint wie unter Kontrollbedingungen. Nach 96 Stunden der Kultivierung sieht man in den Kontrollen vermehrt, dass die Zellen beginnen übereinander zu wachsen, was in einer intakten Endothelzellschicht nicht der Fall sein sollte. Unter Flussbedingungen scheinen die Zellen zum Teil die Ausrichtung leicht aufzulösen. Aussagen über die drei morphologischen Parameter sind nur unter Betrachtung der Aufnahmen schwer zu treffen, weshalb wie beschrieben eine computergestützte Quantifizierung durchgeführt wurde.

3.3.2. Zellfläche

Das Balkendiagramm in Abb. 3.3 zeigt die mittlere Zellfläche in μm^2 zu den sechs untersuchten Zeitpunkten. Die Mittelwerte mit dazugehörigen Standardabweichungen sind Tab. 3.3 zu entnehmen.

Tabelle 3.3.: Zellfläche aufgetragen als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=7$)

Zeitpunkt	Fluss [μm^2]	Kontrolle [μm^2]
0h	1027 $\pm$ 121	1032 $\pm$ 96
3h	952 $\pm$ 130	955 $\pm$ 92
24h	945 $\pm$ 193	879 $\pm$ 133
48h	775 $\pm$ 106	786 $\pm$ 100
72h	707 $\pm$ 69	793 $\pm$ 66
96h	685 $\pm$ 61	802 $\pm$ 87

Wie man erwarten würde, ist die mittlere Zellfläche zum ersten Zeitpunkt zwischen beiden Gruppen gleich und beträgt rund $1030 \mu\text{m}^2$. Unter beiden Bedingungen nimmt die mittlere Zellfläche über den Versuchszeitraum von vier Tagen ab. Jedoch ist die Zellfläche unter Flussbedingungen ab dem Zeitpunkt 72 h signifikant kleiner als die mittlere Fläche der Kontrollen zu den entsprechenden Zeitpunkten. Zwischen erstem und letztem Zeitpunkt ändert sich die Zellfläche unter Fluss um ca. $350 \mu\text{m}^2$, die Zellen unter Kontrollbedingungen lediglich um $230 \mu\text{m}^2$. Die Zellfläche ist unter Kontrollbedingungen bereits nach einem Tag signifikant kleiner als zu Beginn des Versuchs. Unter Bedingungen der Flusskultivierung ist der Unterschied erst nach zwei Tagen statistisch nachweisbar, der p-Wert ist dann jedoch kleiner als 0,1 %. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass bei einem Teil der Experimente beobachtet wurde, dass die Zellfläche unter Fluss zwischen der Fixierung bei 3 h und der Fixierung bei 24 h zu genommen hat. Dadurch ist auch die höhere Standardabweichung zu diesem Zeitpunkt zu erklären. Die Abnahme der Zellfläche zwischen zwei Messzeitpunkten innerhalb einer Bedingung ist in beiden Fällen nie signifikant. Abschließend lässt sich berechnen, dass im Mittel die Zellen der Kontrolle nach vier Tagen um den Faktor 1,17 größer sind als flusskonditionierte Zellen. Verglichen mit der ursprünglichen Zellfläche

zu Beginn von $1030 \mu\text{m}^2$ nimmt die Fläche unter Fluss um 33 % und unter Kontrollbedingungen nur um 22 % ab.

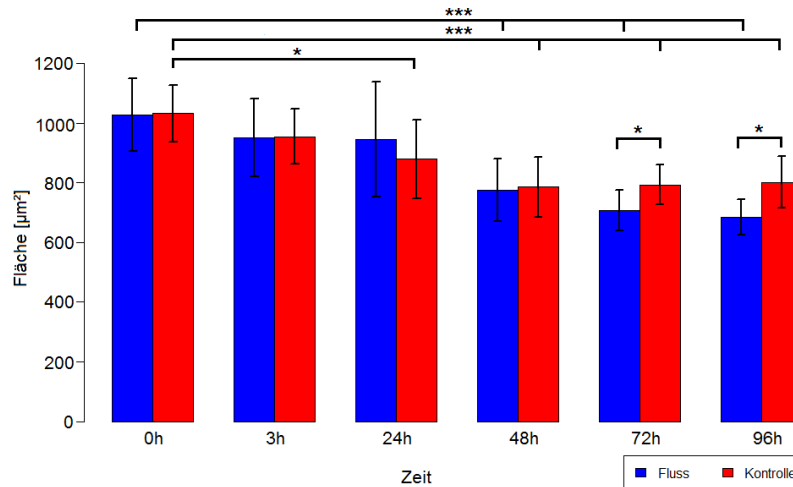


Abbildung 3.3.: Die mittlere Zellfläche [μm^2] zum jeweiligen Zeitpunkt der Fixierung. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der Fläche ($n=7$). In Blau flusskultivierte Zellen, in Rot Messergebnis der Kontrollbedingung.

3.3.3. Zellform

Die Zellform wird bestimmt über das Achsenverhältnis $\frac{\text{Hauptachse}}{\text{Nebenachse}}$, der in die Zellen gefitteten Ellipsen und wird als Elongationsfaktor bezeichnet. Der Wert gibt an wie viel länger als breit eine Zelle ist. Zur Veranschaulichung sind im Balkendiagramm (Abb. 3.4) Ellipsen eingezeichnet, die immer die gleiche Länge der Nebenachse haben und die Hauptachse der Ellipse ist das angegebene Vielfache der Nebenachse. Die exakten Messwerte sind Tab. 3.4 zu entnehmen.

Tabelle 3.4.: Zellform als Verhältnis der Hauptachse zur Nebenachse zu den verschiedenen Analysezeitpunkten angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung.

Zeitpunkt	Fluss	Kontrolle
0h	$1,82 \pm 0,07$	$1,88 \pm 0,16$
3h	$2,43 \pm 0,13$	$2,14 \pm 0,09$
24h	$3,11 \pm 0,48$	$2,53 \pm 0,28$
48h	$2,93 \pm 0,48$	$2,75 \pm 0,45$
72h	$2,48 \pm 0,29$	$2,71 \pm 0,45$
96h	$2,30 \pm 0,23$	$2,65 \pm 0,44$

Betrachtet man zuerst die Veränderung des Achsenverhältnis der Zellen unter Flussbedingungen, sieht man, dass diese sich während des ersten Tages der Kultivierung (Messung 3 h und 24 h) hoch signifikant verändern und deutlich länglicher werden von 1,8 auf 3,1. Bereits nach drei Stunden sind die Zellen deutlich elongiert. Auch die Zellen der Kontrolle ändern ihre Zellform in einen elongierteren Zustand, jedoch sind die Kontrollen zu den Messpunkten 3 h und 24 h statisch unterschiedlich zu den flusskultivierten Zellen und weniger gestreckt. Der Unterschied zwischen beiden Bedingungen ist allerdings nach dem ersten Tag statistisch nicht mehr vorhan-

den. Das bedeutet, die Zellen unter Fluss verlieren ihre deutlich gestrecktere Form gegenüber den Kontrollzellen.

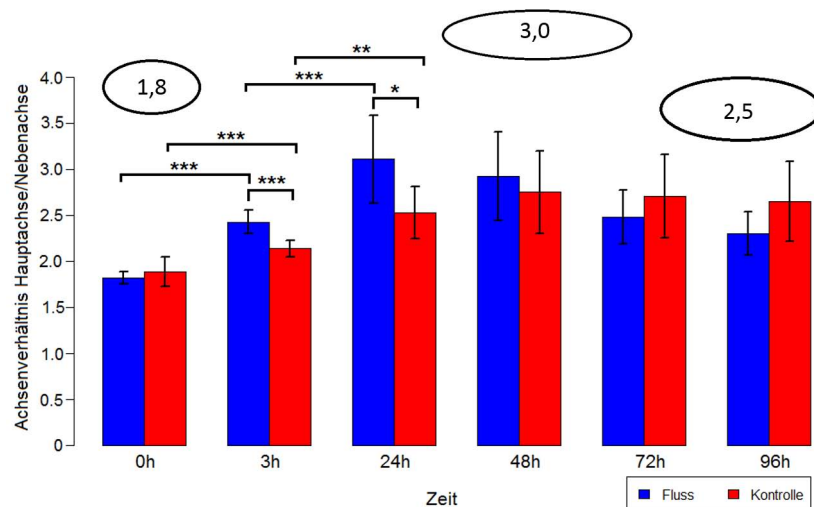


Abbildung 3.4.: Veränderung der Zellform definiert als Verhältnis zwischen Hauptachse und Nebenachse. Angabe als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=7$).

3.3.4. Ausrichtung der Zellen

Für die Bestimmung der Zellausrichtung wurde nicht der Mittelwert der Winkel der Hauptachse verwendet, sondern der Sinuswert dieses Winkels. Dies ist notwendig, da unter beiden Bedingungen (Fluss und Kontrolle) der Mittelwert des Winkels um 90° streut. Dies entspricht auch dem Erwartungswert für beide Fälle der Kultivierung. Die Flussrichtung ist definiert als 90° und entspricht dem Normalenvektor auf die Flussfront. Der gesamte Winkelbereich liegt im Bereich von 0° bis 180° , da der Algorithmus in ImageJ zur Generierung der Daten nicht zwischen zum Beispiel 90° und 270° unterscheidet. Unter Fluss würde man davon ausgehen, dass sich die Zellen in Flussrichtung ausrichten und normalverteilt sind. Unter Kontrollbedingungen sollte sich allerdings kein Einfluss auf die Ausrichtung der Zellen zeigen und alle Winkel zwischen 0° und 180° gleich wahrscheinlich, also gleichverteilt sein. Dass man diese Annahme machen kann, wird in Abb. 3.5 deutlich. In beiden Diagrammen wurde die empirische Verteilungsfunktion der Messdaten aufgetragen, links flusskultivierte Zellen und rechts Zellen der Kontrolle, (schwarzer Graph) und die empirische Verteilungsfunktion von simulierten Zufallszahlen der entsprechend angenommenen Verteilung (roter Graph) eingezeichnet. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die gezeigten Daten den angenommenen Verteilungen folgen. Folglich kann in beiden Fällen von einem Erwartungswert von 90° ausgegangen werden, was sich auch in den Daten als Mittelwert zeigt.

Aus diesem Grund wird der Sinuswert aller Winkel berechnet und der mittlere Sinuswert im Balkendiagramm der Abb. 3.6 dargestellt. Umso mehr die Gesamtheit der Zellen ausgerichtet ist, desto näher muss der Mittelwert der Sinuswerte gegen 1 tendieren, da gilt $\sin(\pi/2)=1$. Für die Interpretation des Graphen ist es wichtig zu erwähnen, dass der Erwartungswert für die Sinuswerte einer gleichverteilten Zufallsvariable auf dem Intervall $[0, \pi]$ exakt $2/\pi$ ist, also ca. 0,64. Liegt also keine Ausrichtung vor, sollte der Mittelwert der Daten nicht signifikant unterschiedlich sein von 0,64. Testet man dies durch einen zweiseitigen t-Test einer Stichprobe mit der Nullhypothese, dass der Mittelwert gleich $2/\pi$ ist, muss die Nullhypothese für alle Mittelwerte der Kontrollen und der ersten Fixierung unter Flussbedingung (0 h) angenommen werden. Für alle anderen Mittelwerte der flusskultivierten Zellen ist der Wert jedoch hoch signifikant unterschiedlich vom

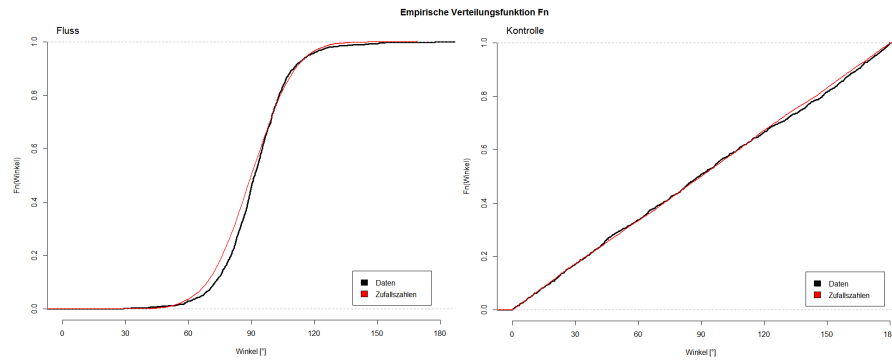


Abbildung 3.5.: Gezeigt ist die empirische Verteilungsfunktion anhand eines Datensatzes zu einem Zeitpunkt. Der schwarze Graph zeigt die empirische Verteilung der Daten und in rot ist die Verteilung von Zufallszahlen gezeigt. Das linke Diagramm zeigt die Winkel von fluss-kultivierten Zellen mit der Annahme einer Normalverteilung. Das zweite Diagramm zeigt den Ausrichtungswinkel der Kontrollzellen unter der Annahme einer Gleichverteilung der Winkel.

berechneten Erwartungswert.

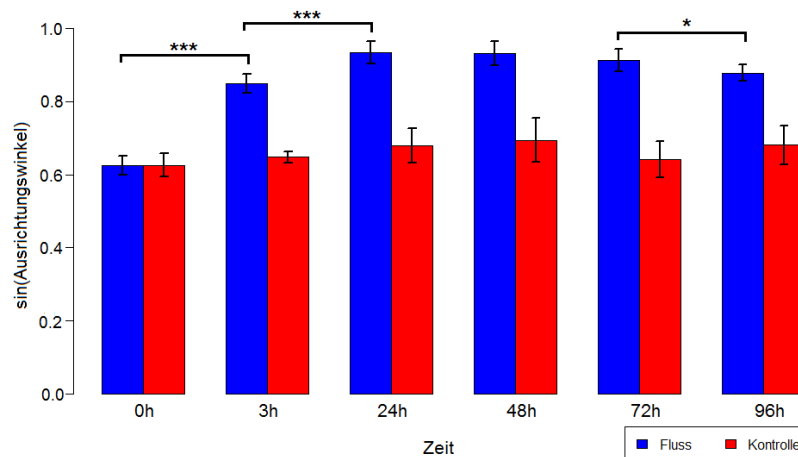


Abbildung 3.6.: Ausrichtung der Zellen als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung der Sinuswerte der Ausrichtungswinkel ($n=7$).

Betrachtet man den zeitlichen Verlauf unter Flussbedingungen, wird deutlich, dass bereits nach drei Stunden eine deutliche Ausrichtung stattgefunden hat und der Mittelwert signifikant unterschiedlich ist zum Ausgangswert von 0,63 (Tab.3.5). Es findet jedoch noch bis zur Messung nach einem Tag eine stärkere Ausrichtung in Flussrichtung statt. Diese starke Ausrichtung bleibt bei einem Wert von 0,93 auch an Tag 2 erhalten und bleibt statistisch gleich bis zum dritten Tag. Zum Mittelwert des letzten Zeitpunkt zeigt sich eine leichte Abnahme der Ausrichtung (p-Wert von 0,047). Eine deutliche Ausrichtung im Vergleich zur Kontrolle bleibt jedoch erhalten. Die Kontrollen bleiben über den gesamten Zeitraum auf dem Niveau des Erwartungswertes, die Ausrichtungswinkel der Kontrollen bleiben also über den gesamten Winkelbereich verteilt.

Tabelle 3.5.: Ausrichtung der Zellschicht ausgehend von den Sinuswerten der Ausrichtungswinkel aufgetragen als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (n=7)

Zeitpunkt	Fluss	Kontrolle
0h	$0,63 \pm 0,03$	$0,63 \pm 0,03$
3h	$0,85 \pm 0,03$	$0,65 \pm 0,02$
24h	$0,93 \pm 0,03$	$0,68 \pm 0,05$
48h	$0,93 \pm 0,03$	$0,69 \pm 0,06$
72h	$0,91 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,05$
96h	$0,88 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,06$

3.4. Zell-Zell-Kontakt Proteine

3.4.1. VE-Cadherin - Adherens Junction

Das Adherens Junction Protein VE-Cadherin zeigt über den Beobachtungszeitraum von 96 Stunden Veränderung über die Zeit und Unterschiede zwischen den zwei verschiedenen Kultivierungsbedingungen. In Abb. 3.7 sind exemplarisch Färbungen zu allen Zeitpunkten abgebildet. Zwei Stunden nach Einsaat der HUVEC in die Kanäle haben sich bereits VE-Cadherine ausgebildet und die Zellschicht ist zum großen Teil geschlossen. Zur Orientierung ist die DAPI Färbung der Zellkerne zusätzlich gezeigt. Diese beiden Bilder geben das Erscheinungsbild vor Start der Flusskonditionierung wieder und entsprechen dem Zeitpunkt 0 h. Betrachtet man zuerst den zeitlichen Verlauf der Ausbildung der Adherens Junction unter Scherspannung (Abb. 3.7: 1. und 2. Spalte) sieht man anhand der VE-Cadherine, welche die Zellränder deutlich wiedergeben, die Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung. Nach drei Stunden ist, wie zu Beginn der Kultivierung, ein deutliches Fluoreszenzsignal im Cytoplasma zu sehen, aber die Zellränder sind durch Bildung der Adherens Junction ebenfalls gut zu erkennen. Nach einem Tag der Flusskultivierung ist die Zellschicht entgültig komplett konfluent und die Zell-Zell-Kontaktfläche ist zwischen allen Zellen deutlich ausgebildet. Dieses Erscheinungsbild des VE-Cadherins bleibt auch nach 48 h und 72 h optisch erhalten. Aufnahmen der letzten Fixierung bei 96 h zeigen an einzelnen Stellen kleine Unterbrechungen der Zellränder und die Intensität der VE-Cadherinfärbung erscheint schwächer. Die HUVEC der Flusskultivierung zeigen zudem vom ersten Tag bis zum vierten Tag gleichmäßig breite Zellränder.

Das Fluoreszenzsignal unter Kontrollbedingungen unterscheidet sich bis zur Aufnahme bei 48 h nicht deutlich von dem Signal der flusskultivierten HUVEC (Abb. 3.7: 3. und 4. Spalte). Das Signal im Cytoplasma ist vor allem zum ersten und zweiten Zeitpunkt, wie auch unter Fluss, deutlich vorhanden und es zeigen sich Lücken in der Zellschicht. Danach liegt eine konfluente Zellschicht vor, jedoch zeigen sich unterschiedlich breite Zellränder und gerade an breiten Stellen zeigt sich, dass die VE-Cadherine nicht gleichmäßig über die Kontaktfläche verteilt sind, sondern Löcher freilassen. Diese Charakteristik wird separat an Konfokalaufnahmen erläutert. Die Intensität der Fluoreszenz der Kontrollen scheint über den gesamten Zeitraum der vier Tage nicht abzunehmen. Beide Bedingungen zeigen, dass die Zellränder benachbarter Zellen nicht glatt sind, sondern sich häufig 'Reißverschluss-Strukturen' ausbilden. Es bilden sich gezackte Ränder, wie wenn die Zellen sich durch die vergrößerte Fläche ineinander verhaken würden.

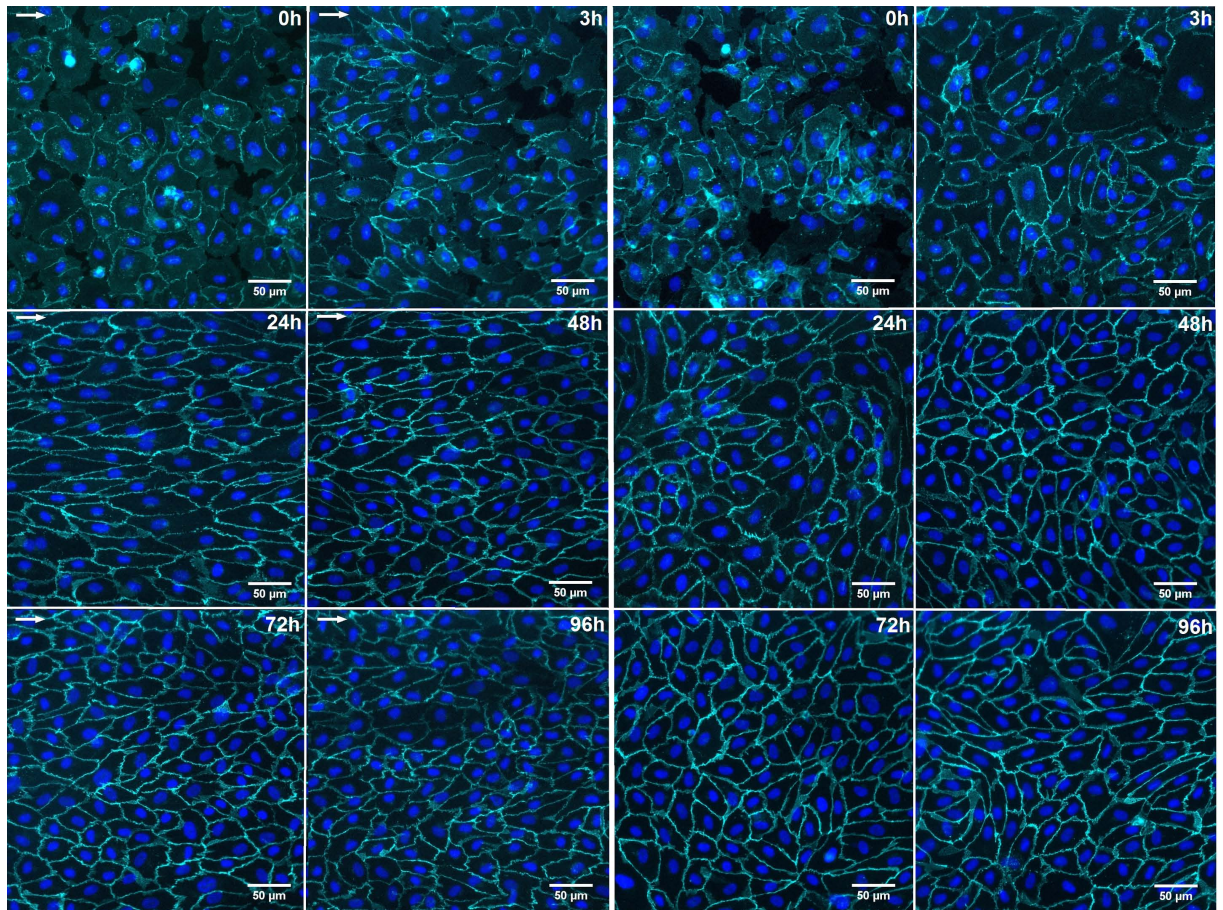


Abbildung 3.7.: Immunfluoreszenzfärbung der VE-Cadherine (Adherens Junction). VE-Cadherine sind in cyan und Zellkerne in blau dargestellt. Die ersten zwei Spalten zeigen fluss-konditionierte HUVEC zu einzelnen Messzeitpunkten (Stundenangabe in rechter oberer Ecke) und der Pfeil gibt die Flussrichtung an. Analog sind in Spalte drei und vier HUVEC unter Kontrollbedingungen gezeigt. Aufnahmen mit Nikon Eclipse Ti und Objektiv PlanFluor 20x NA 0.45.

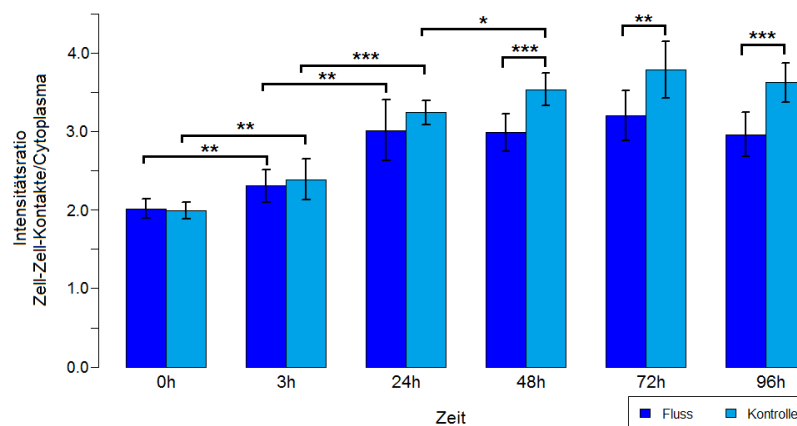


Abbildung 3.8.: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen des Intensitätsratio der Zellränder zum Cytoplasma der Bildanalyse des VE-Cadherins (n=8).

Das Diagramm der Abb. 3.8 zeigt das Ergebnis der quantifizierten Analyse der Veränderung der VE-Cadherine. Verwendet wurden acht Messungen und es ist der Mittelwert mit Standardabweichung aufgetragen. Als Maß für die Veränderung ist das Verhältnis der mittleren Grauwerte zwischen Zell-Zell-Kontaktfläche und Cytoplasma verwendet. Bis 24 Stunden zeigen sich bei der Ausbildung der VE-Cadherine zwischen den beiden untersuchten Bedingungen keine statistischen Unterschiede und das Intensitätsverhältnis nimmt signifikant zu zwischen 0 h und 24 h. Unter Flussbedingungen bleibt das Verhältnis nach dem ersten Tag bis zu Versuchsende konstant. Die Kontrollen zeigen ein verzögertes konstantes Verhalten nach Tag 2, davor kommt es noch zu einer Zunahme des Intensitätsverhältnisses. Auffallend ist, dass ab dem zweiten Tag das Fluoreszenzsignal der Zell-Zell-Kontakte unter Kontrollbedingung signifikant stärker ist im Vergleich zum mittleren Intensitätswert des Cytoplasmas, als unter Flusskonditionierung.

3.4.2. Claudin-5 - Tight Junction

Claudin-5 entwickelt sich über den gesamten Zeitraum von 96 Stunden stark unterschiedlich je nach Kultivierungsbedingung. Die in Abb. 3.9 gezeigten Immunfluoreszenzaufnahmen sind analog angeordnet zu den VE-Cadherin Färbungen. Zu Beginn des Experiments zeigt sich eine vergleichbare Färbung des Claudin-5. Vereinzelt sind definierte Zellränder zu erkennen und in einigen Zellen ist ein deutliches Signal im Cytoplasma sichtbar. Dieses ist nicht diffus (siehe VE-Cadherin Färbung zum gleichen Zeitpunkt), sondern erscheint punktuell. Unter Fluss ist zu keinem Zeitpunkt eine homogene Ausbildung der Zellränder durch das untersuchte Tight Junction Protein zu erkennen. Bis zum zweiten Tag scheint das Signal im Cytosol in allen Zellen vorhanden zu sein und liegt gleichmäßig verteilt vor. Am dritten und vierten Tag nimmt das Signal im Cytoplasma ab und Fluoreszenz ist nur an einzelnen definierten Zellrändern erkennbar. Das Ausbilden der Tight Junction durch Claudin-5 entsteht nur partiell und erscheint in einigen Abschnitten, über den gesamten Kanal betrachtet, überhaupt nicht. Es ist aber durch die Färbungen der Kontrollen sicher, dass HUVEC in der Lage sind Claudin-5 gleichmäßig auszubilden (Abb. 3.9: 48 h, 72 h, 96 h). Im Fall der Kontrolle ist bis 48 Stunden ebenfalls ein diffuses Fluoreszenzsignal im Cytosol der HUVEC zu erkennen, wobei bereits nach einem Tag spätestens nach zwei Tagen ein beinahe homogenes Erscheinungsbild von Claudin-5 eingetreten ist. Im Vergleich zu den VE-Cadherine zeigen sich die vorhandenen Zellränder deutlich schmaler, gezackte Ränder des interzellulären Spaltes bleiben erhalten.

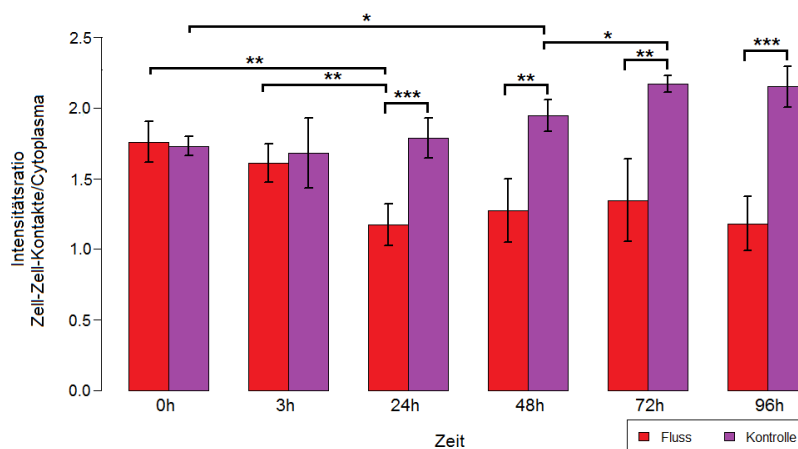


Abbildung 3.10.: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen des Intensitätsratio der Zellränder zum Cytoplasma der Bildanalyse von Claudin-5 (n=4).

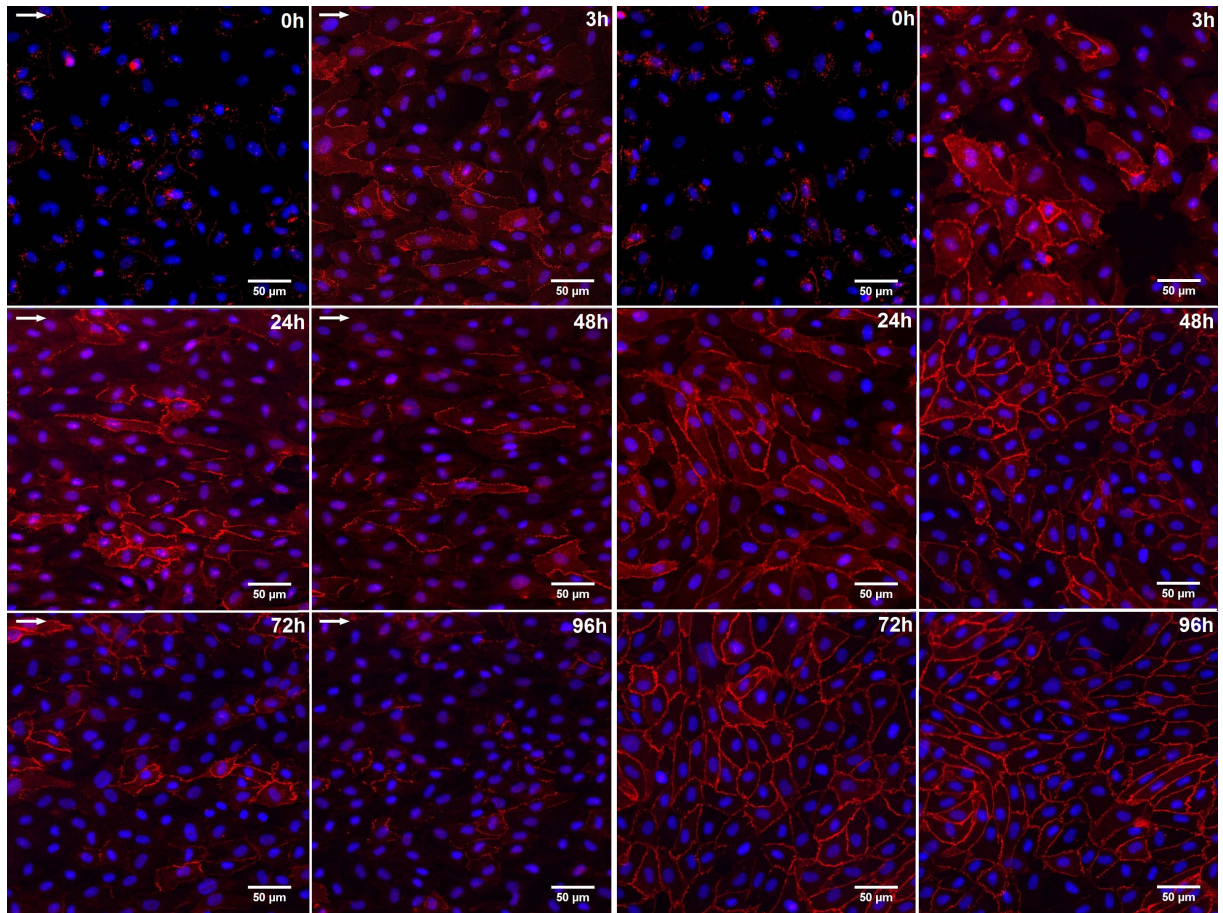


Abbildung 3.9.: Immunfluoreszenzfärbung des Claudin-5 (Tight Junction). Claudin-5 sind in rot und Zellkerne in blau dargestellt. Die ersten zwei Spalten zeigen flusskonditionierte HUVEC zu einzelnen Messzeitpunkten (Stundenangabe in rechter oberer Ecke) und der Pfeil gibt die Flussrichtung an. Analog sind in Spalte drei und vier HUVEC unter Kontrollbedingungen gezeigt. Aufnahmen mit Nikon Eclipse Ti und Objektiv PlanFluor 20x NA 0.45.

Betrachtet man die Veränderung des Intensitätsverhältnisses (Abb. 3.10) über die Zeit, zeigt sich, dass die Intensität an den Zellrändern im Vergleich zum Cytoplasma in den Kontrollen zunimmt. Nach 48 Stunden ist ein signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal an der Zell-Zell-Kontaktfäche vorhanden, welches auch bis zu Tag 3 weiter zunimmt. Unter Flussbedingungen nimmt das Verhältnis jedoch nach einem Tag ab und bleibt dann auf einem vergleichbaren Level konstant. Dies stimmt mit den Beobachtungen überein und es ist nach dem ersten Tag ein deutlicher Unterschied zwischen dem Intensitätsverhältnis der Flusszellen und der Kontrollen zu sehen.

3.4.3. Connexin43 - Gap Junction

Betrachtet man das Gap Junction Protein Connexin43 zeigt sich über den kompletten Versuchsverlauf von vier Tagen ebenfalls ein deutlicher Unterschied im Erscheinungsbild von Connexin43 zwischen Fluss und Kontrolle, siehe Abb. 3.12. Die Ausbildung von Connexin43 zeigt erst bei der Färbung nach 48 h einen deutlichen Unterschied im Erscheinungsbild zwischen Fluss und Kontrolle. Zu den drei Zeitpunkten davor sind keine klaren Zellränder bei den Zellen beider Bedingungen erkennbar und es zeigen sich nur Punkte und ein stärkeres perinukleäres Fluoreszenzsignal. Neben diesem Signal nahe dem Zellkern ist kaum Fluoreszenz im Cytoplasma zu erkennen. Dieses Erscheinungsbild bleibt unter Fluss erhalten. Die Zellen, die unter Kontrollbedingungen kultiviert

wurden, zeigen dazu Unterschiede. Die Intensität an den Zellrändern nimmt deutlich zu und die punkthaften Fluoreszenzsignale schließen sich zu einem fast durchgehenden Signal, welches die Zellränder gut wieder gibt. Am zweiten und dritten Tag der Kontrolle erscheint zu dem auch das Signal im Cytosol stärker. An Tag 4 ist dieses jedoch nicht mehr zu sehen.

Die Auswertung der Intensitätsverhältnisse (Abb. 3.11) der Fluoreszenzbilder von Connexin43 zeigen unter Fluss, dass es kaum zu Veränderung des Verhältnisses kommt. Lediglich nach drei Stunden der Flusskultivierung zeigt sich ein statistisch relevanter Anstieg, der jedoch nach einem Tag wieder auf den Anfangswert zurückgekehrt ist und auf diesem Niveau für die restliche Versuchsdauer verbleibt. Bei der Kontrolle hingegen zeigt sich erst nach einem Tag ein Anstieg des Intensitätsratio bezogen auf den Anfangswert. Dieser Wert nach dem Anstieg steigt über die verbleibenden drei Tage des jeweiligen Experiments noch leicht an. Ein Unterschied zwischen den Kultivierungen zeigt sich, wie auch in den Fluoreszenzbildern, nur zu den letzten drei Untersuchungszeitpunkten.

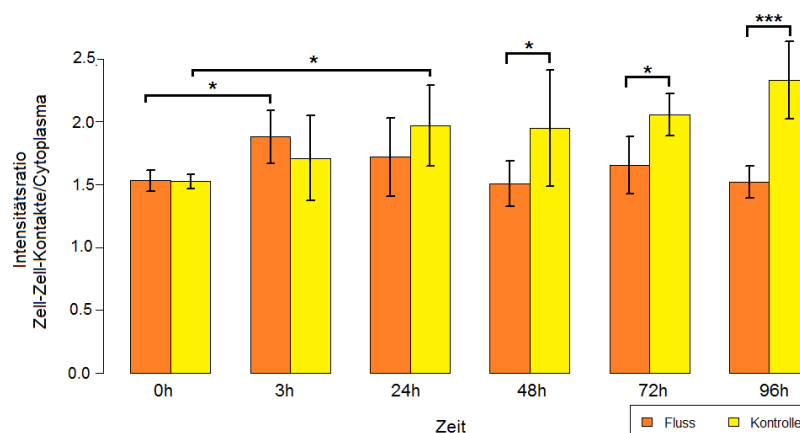


Abbildung 3.11.: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen des Intensitätsratio der Zellränder zum Cytoplasma der Bildanalyse von Connexin43 (n=4).

3.4.4. Konfokalmikroskopische Aufnahmen

3.4.4.1. Übersichtsaufnahmen

Um das Erscheinungsbild der drei untersuchten Zell-Zell-Kontakt Proteine besser zu analysieren sind in Abb. 3.13 Fluoreszenzbilder, die mittels Konfokalmikroskopie aufgenommen worden sind, gezeigt. Zur besseren Orientierung ist die DAPI-Färbung der Zellkerne mit der Aufnahme eines Junction Proteins überlagert. Gezeigt sind nur Bilder von drei Zeitpunkten: Start des Experiments (0 h), nach einem Tag (24 h) und am Ende des Versuchs (96 h). Die erste Zeile der Abbildung zeigt das Fluoreszenzsignal der Claudin-5 Färbung, die zweite das von Connexin43 und die letzte Zeile das VE-Cadherin.

In den gezeigten Aufnahmen wird im Fall von Claudin-5 deutlich, dass sich schmale Zellränder ausbilden, wenn das Protein vorhanden ist. Besonders deutlich und homogen sind diese allerdings nur in den Kontrollen ausgebildet. Da unter Fluss Claudin-5 keine homogen verteilte Ausbildung von Tight Junction der gesamten Zellschicht zeigt, kann dieses nicht für die mechanische Stabilität verantwortlich sein.

Bei den Aufnahmen von Connexin43 wird deutlich, dass das perinukleäre Signal in fast allen Zellen nur auf einer Seite des Zellkerns ist. Die Fluoreszenzmarkierung zeigt zu dem keine in

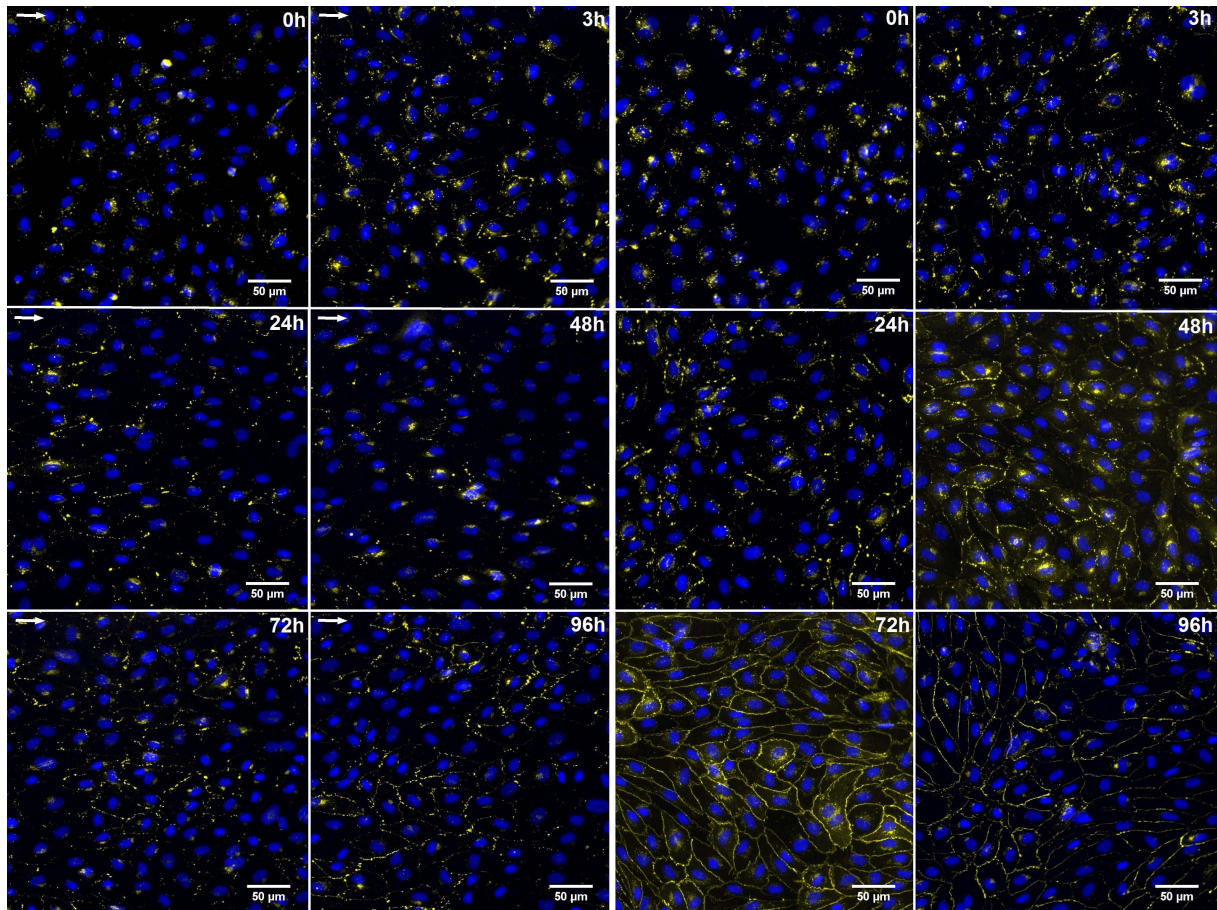


Abbildung 3.12.: Immunfluoreszenzfärbung des Connexin43 (Gap Junction). Connexin43 sind in gelb und Zellkerne in blau dargestellt. Die ersten zwei Spalten zeigen flusskonditionierte HUVEC zu einzelnen Messzeitpunkten (Stundenangabe in rechter oberer Ecke) und der Pfeil gibt die Flussrichtung an. Analog sind in Spalte drei und vier HUVEC unter Kontrollbedingungen gezeigt. Aufnahmen mit Nikon Eclipse Ti und Objektiv PlanFluor 20x NA 0.45.

sich geschlossene Struktur, sondern scheint eine Ansammlung von größeren Vesikeln zu sein. Das Connexin43 an den Zellrändern scheint zudem punktuell anzuordnen. Unter Fluss wirkt die Verteilung an den Zellrändern mit großen Abständen gleichverteilt. Im Fall der Kontrolle scheint sich das Gap Junction Protein gleichmäßig über die kompletten Zellränder zu verteilen.

In den konfokalen Aufnahmen der VE-Cadherin Färbung wird die bereits erwähnte typische Reißverschluss-Struktur besonders deutlich. Es zeigt sich, dass die VE-Cadherine eine maschenartige Verteilung über die gesamte Zell-Zell-Kontakt Fläche ausbilden. Dadurch entstehen in der Kontaktfläche kleine VE-Cadherin freie Löcher. Die Breite der Zellränder erscheint zwischen Fluss und Kontrolle sehr unterschiedlich. Im Fluss sind viele Zellränder sehr dünn und der maschenartige Aufbau ist nicht zu erkennen. Wohingegen im Fall der statisch kultivierten HUVEC häufig Zellränder auftreten, die ein Vielfaches der Breite der unter Fluss kultivierten Zellen aufweisen. Exemplarisch sind in Abb. 3.14 der komplette Zellrand je einer Zelle unter Fluss (*A*) und einer Zelle unter Kontrollbedingungen gezeigt (*B*).

Zur besseren Übersicht der gezeigten Proteinfärbungen wurden bisher keine Aufnahmen des Aktinskeletts gezeigt. Es wurde aber in allen durchgeführten Versuchen festgestellt, dass sich die Aktinfasern parallel zur Flussrichtung ausrichten. Abb. 3.15 *A* zeigt deutlich, dass die Ausrichtung des Aktinskeletts parallel zur Flussrichtung angeordnet ist und sich deutliche Stressfasern

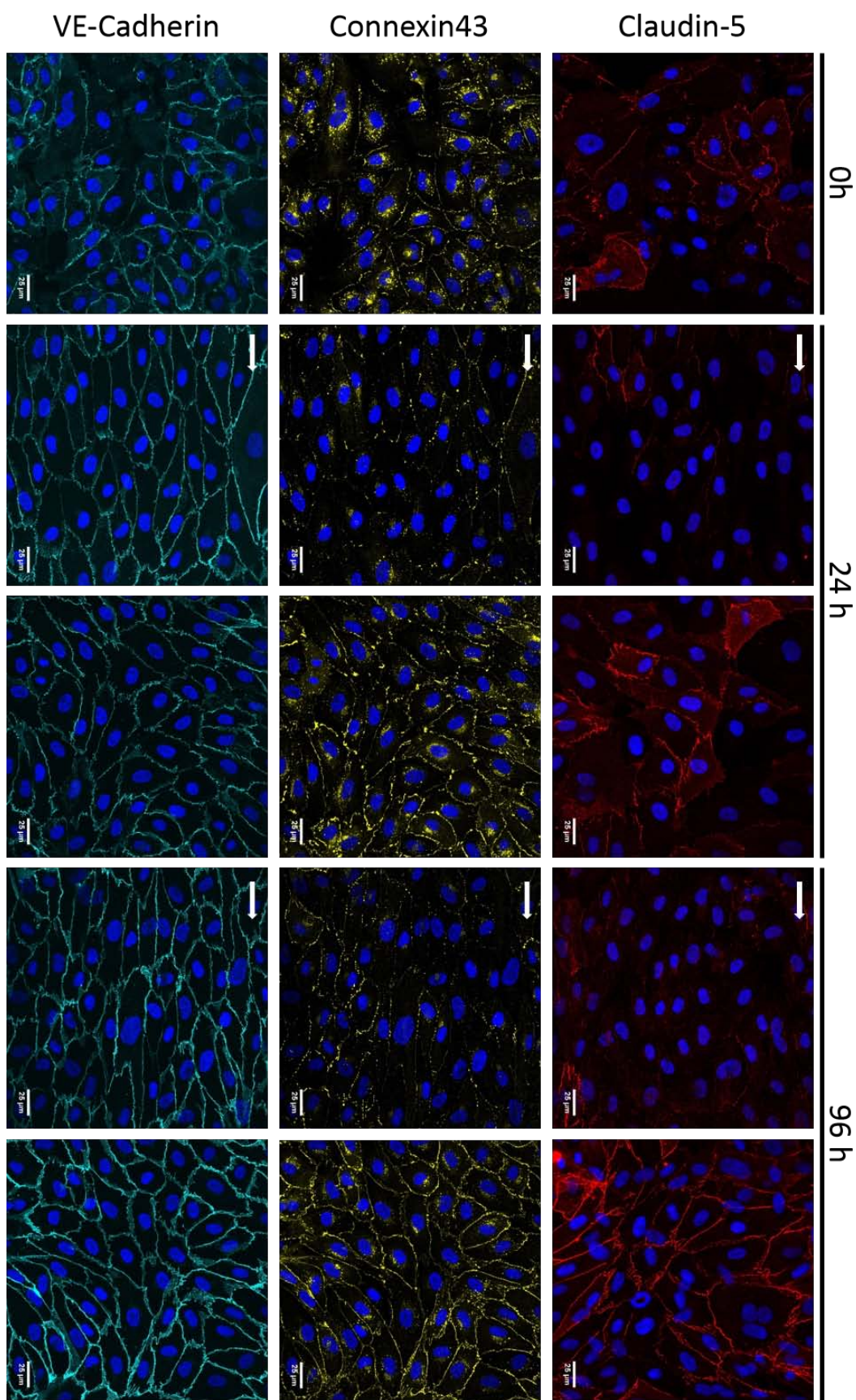


Abbildung 3.13.: Konfokale Aufnahmen mit Leica Laser-Scanning-Mikroskop SP5 (63x 1.4 Öl Objektiv). Zeitliche Entwicklung von Claudin-5 (rot), Connexin43 (gelb) und VE-Cadherin (cyan) zu den angegebenen Zeitpunkten (Pfeil gibt Richtung der Flusskultivierung an).

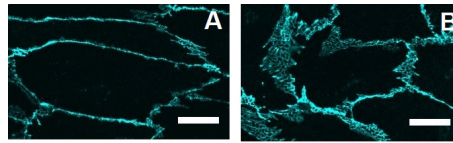


Abbildung 3.14.: Unterschiedliche Breite der Zellränder von Zelle, die unter Scherspannung kultiviert wurden (A) und kultivierte HUVEC ohne Scherspannung (B). Der eingezeichnete Skalierungsbalken entspricht 15 μm

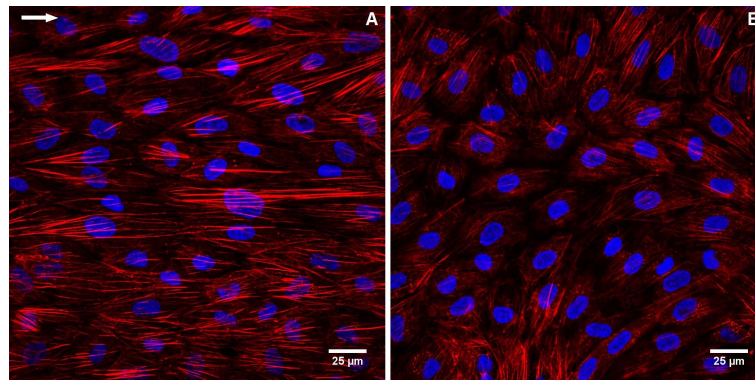


Abbildung 3.15.: Konfokale Mikroskopiebilder des Aktinskeletts (rot), angefärbt durch Phalloidin-AF660, verdeutlichen die Ausrichtung der Aktinfasern unter Fluss in Pfeilrichtung A. Im Vergleich dazu ist das Aktin unter Kontrollbedingungen in B gezeigt.

bilden. Das Aktinskelett unter quasi statischer Kultivierung zeigt dazu deutliche Unterschiede (Abb.3.15 B). Die Aktinfasern scheinen weniger stark ausgebildet und es zeigt sich keine Ausrichtung des Aktinskeletts aller Zellen in eine Richtung. Es ist aber festzuhalten, dass sich Aktinfasern ausbilden und dass sich diese innerhalb einer Zelle bevorzugt parallel zu einander anordnen.

3.4.4.2. z-Stapel

Die Aufnahmen von z-Stapeln zeigen, dass jedes der untersuchten Proteine ungeordnet über den interzellulären Spalt verteilt ist. Anhand der begrenzten Anzahl an Aufnahmen konnte kein Unterschied der Verteilung der Proteine zwischen flusskonditionierten HUVEC und den Zellen der Kontrolle festgestellt werden. Exemplarisch sind auf dem Datenträger einige z-Stapel als Videodateien hinterlegt. Eine Stapelaufnahme verläuft in z-Richtung von apikal nach basal. Abb. 3.16 zeigt exemplarisch vier Aufnahmen eines Stapels aus verschiedenen z-Ebenen. Die z-Ebene ist in der rechten oberen Bildecke in μm angegeben. Der Skalierungsbalken jedes Bildes entspricht 10 μm . Gezeigt ist ein z-Scan von HUVEC kultiviert unter Kontrollbedingungen nach 96 Stunden mit der Immunfluoreszenzfärbung von VE-Cadherin (cyan) und Connexin43 (gelb). Der Graph in der Abbildung rechts gibt die mittlere Intensität für jeden Fluoreszenzkanal in Abhängigkeit von der z-Position wieder. Das Maximum von VE-Cadherin und Connexin43 ist auf gleicher Höhe, dort liegt folglich das meiste Protein vor. Auch die Färbungen von VE-Cadherin und Claudin-5 zeigen sehr ähnliches Verhalten, zudem ist kein deutlicher Unterschied zwischen Fluss und Kontrolle sowie im zeitlichen Verlauf zu sehen. Die absoluten Werte des mittleren Grauwerts unterscheiden sich zudem stark, vergleichbar mit den Weitfeld Aufnahmen. Aus diesen Gründen werden die Ergebnisse der z-Scans nicht weiter diskutiert.

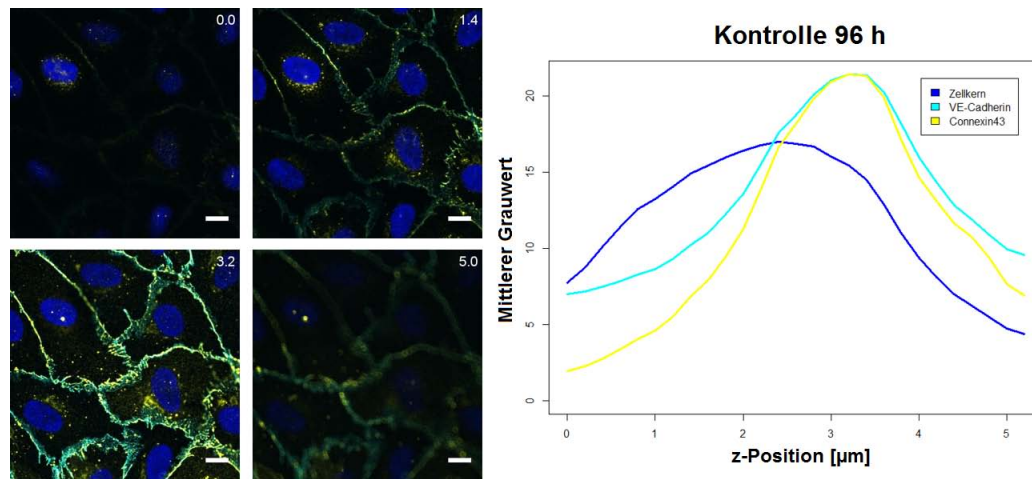


Abbildung 3.16.: Stapelaufnahme in z-Richtung von VE-Cadherin (cyan) und Connexin43 (gelb). Die vier gezeigten Bilder sind aus unterschiedlichen z-Ebenen, diese ist in der rechten oberen Ecke angegeben. Das Diagramm zeigt den gemittelten Grauwert jedes Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der z-Position.

3.5. Impedanz Messung

3.5.1. Widerstand

Über einen Zeitraum von vier Tagen zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen dem Verlauf des Widerstandes, der durch die HUVEC unter Fluss- und Kontrollbedingungen ausgebildet wird, siehe Abb. 3.17. Das gezeigte Diagramm stellt den Verlauf des Mittelwerts von drei unabhängigen Experimenten da. Die schattierten Flächen beider Graphen geben jeweils die Standardabweichung an. Zu Beginn der Experimentaufzeichnung ist ein unterschiedlich breiter Peak zu erkennen, dieser entsteht als Antwort auf das Anlegen der Scherspannung (Fluss $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$, Kontrolle ca. $0,75 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$), wobei der Peak unter Flussbedingung über einen deutlich kürzeren Zeitraum zu sehen ist. Nach diesem Peak steigt der gemessene Widerstand an der Zellschicht auf den Elektroden unter beiden Bedingungen bis 25 Stunden an. Unter Flussbedingungen scheint sich der erhöhte Widerstand schneller auszubilden. Nach etwa einem Tag beginnt der Widerstand unter Flussbedingungen (blauer Graph) kontinuierlich abzunehmen und erreicht auch nach vier Tagen keinen konstanten Minimalwert. Der Widerstand der Kontrolle (roter Graph) nimmt bis ungefähr 50 Stunden noch leicht zu und pendelt sich dann auf ein Niveau ein. Die schattierten Flächen beider Graphen geben jeweils die Standardabweichung an. Die Phasenkontrastbilder zeigen fixierte HUVEC nach vier Tagen, A zeigt Zellen auf einer Kontrollelektrode und B flusskonditionierte Zellen.

Tabelle 3.6.: Widerstand [kΩ] zu definierten Zeitpunkten aufgetragen als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (n=24).

Zeitpunkt	Fluss	Kontrolle
0h	$6,97 \pm 1,74$	$7,81 \pm 2,12$
3h	$8,66 \pm 2,63$	$8,89 \pm 2,66$
24h	$15,89 \pm 0,90$	$14,56 \pm 1,52$
48h	$13,08 \pm 1,20$	$16,39 \pm 1,65$
72h	$11,45 \pm 0,91$	$17,07 \pm 1,45$
96h	$10,22 \pm 696,44$	$17,67 \pm 0,06$

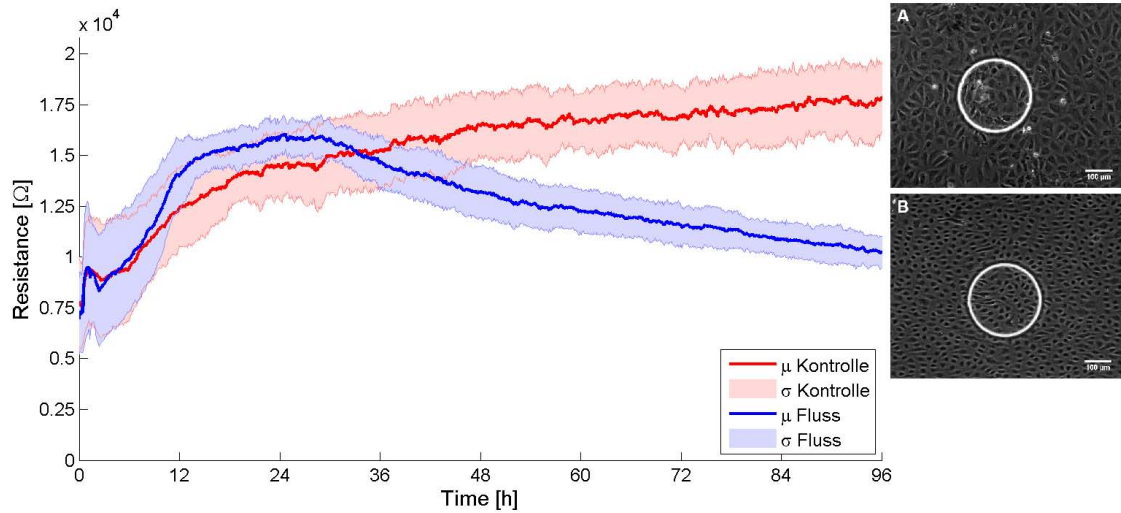


Abbildung 3.17.: Verlauf des Widerstand $[\Omega]$ gezeigt als Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung ($n=24$; drei Experimente mit je 8 Elektroden). Phasenkontrastbilder rechts zeigen fixierte HUVEC nach 96h (Nikon Eclipse TiE, 10x Objektiv). Der Ring gibt den Rand einer Elektrode wieder (Durchmesser der Kreiselektrode von $250\mu\text{m}$). A Kontrollbedingung, B Kultivierung mit $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$.

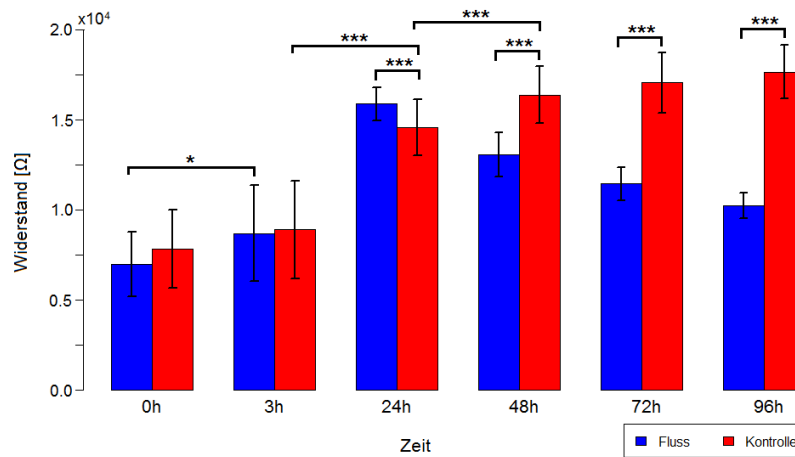


Abbildung 3.18.: Messwerte des Widerstand $[\Omega]$ als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($n=24$) zu bestimmten Zeitpunkten.

Betrachtet man die Absolutwerte des Widerstands zu den sechs Zeitpunkten, zu denen die Morphologie und die Veränderung der Zell-Zell-Kontakte analysiert wurden, erhält man bei Auftragung der Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten (Messung an 24 Elektroden pro Bedingung) einen Graphen, der mit den vorher aufgezeigten Ergebnissen verglichen werden kann. Das Balkendiagramm der Abb. 3.18 gibt die beschriebene Veränderung des Widerstands an. Zu Beginn der Experimente und auch nach drei Stunden ist der Widerstand der Kontrolle und des Flusses statistisch gleich. Der Widerstand nimmt, wie auch in Abb. 3.17 deutlich zu sehen, bis zu 24 Stunden stark zu und erreicht im Fall der flusskultivierten HUVEC sein Maximum. Danach nimmt der Widerstand unter der Flussbedingung signifikant ab. Der Widerstand der Kontrolle steigt bis zum zweiten Tag an und bleibt dann im Mittel auf einem Wert um die $17\text{k}\Omega$. Die exakten Mittelwerte mit Standardabweichung sind in Tab. 3.6 aufgeführt.

3.5.2. Mikromotion

Zur Untersuchung der zeitlichen Veränderung der Mikromotion beider Bedingungen wird die Gesamtdauer des Experiments von 96 Stunden in acht zwölf Stunden Intervalle unterteilt. Für jedes dieser Intervalle wird die Varianz der Fluktuationen des Widerstands (gemessen bei 4000 Hz) einer Elektrode berechnet. Betrachtet man den Verlauf des Widerstandes von kultivierten HUVEC unter Fluss- bzw. Kontrollbedingungen anhand einer Messung einer Elektrode, sieht man, dass die Schwankungen des Widerstands stark unterschiedlich sind zwischen den Bindungen. Besonders deutlich wird dies nach ca. 40 Stunden des Experiments (Abb. 3.19), die Kontrollen (rot) weisen deutlich größere Fluktuationen auf als die Messung unter Fluss (blau). Der Messverlauf selber entspricht dem Verlauf der Mittelwerte (vgl. Abb. 3.17).

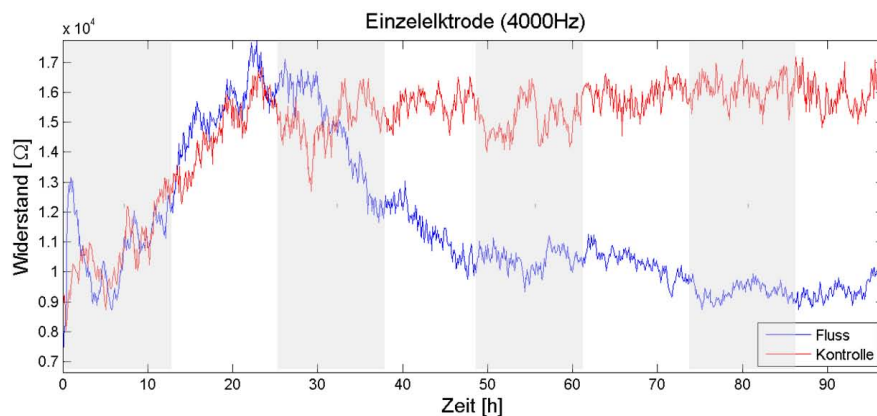


Abbildung 3.19.: Verlauf des Widerstands über 96h am Beispiel der Messwerte einer Elektrode. Fluktuationen der jeweiligen Messreihe (Blau: Fluss, Rot: Kontrolle) zeigen Mikromotion der Zellen. Die grau hinterlegten Flächen markieren jeweils die zwölf Stunden Intervalle.

Die Unterschiede der Fluktuation werden besonders deutlich, betrachtet man diese in verschiedenen Zeitintervallen. Abb. 3.20 A zeigt die Widerstandsmessung von acht Kontrollelektroden (rot) und acht Flusselektroden (blau) eines Experiments im Zeitintervall zwischen zwölf und 24 Stunden. Die Daten sind korrigiert und der lineare Trend ist durch den Abzug der Geradengleichung einer linearen Regression entfernt. Damit wird gewährleistet, dass lediglich die Fluktuation untersucht wird. B zeigt analog dazu die korrigierte Widerstandsmessung im Intervall von 84 bis 96 Stunden. Für jede Messung einer Elektrode wird für das jeweilige Zeitintervall die Varianz der Fluktuation berechnet. In Abb. 3.20 A sieht man, dass sowohl die Werte der Kontrollen, als auch die des Flusses Fluktuationen über einen gleich großen Bereich von ungefähr 3500Ω aufweisen. Im zweiten gezeigten Intervall (Abb. 3.20 B) hingegen fluktuiert der Widerstand der flusskultivierten Zellen im Bereich von $\pm 500 \Omega$, die Kontrolle zeigt aber immer noch eine hohe Fluktuation ähnlich der im Intervall von 12 h bis 24 h. Berechnet man nun die Varianz der Fluktuation erwartet man, dass die Varianz der flusskultivierten Zellen des Intervalls B kleiner ist, als im Intervall A. Die Varianz der Kontrolle von Intervall A und B jedoch ähnlich ist.

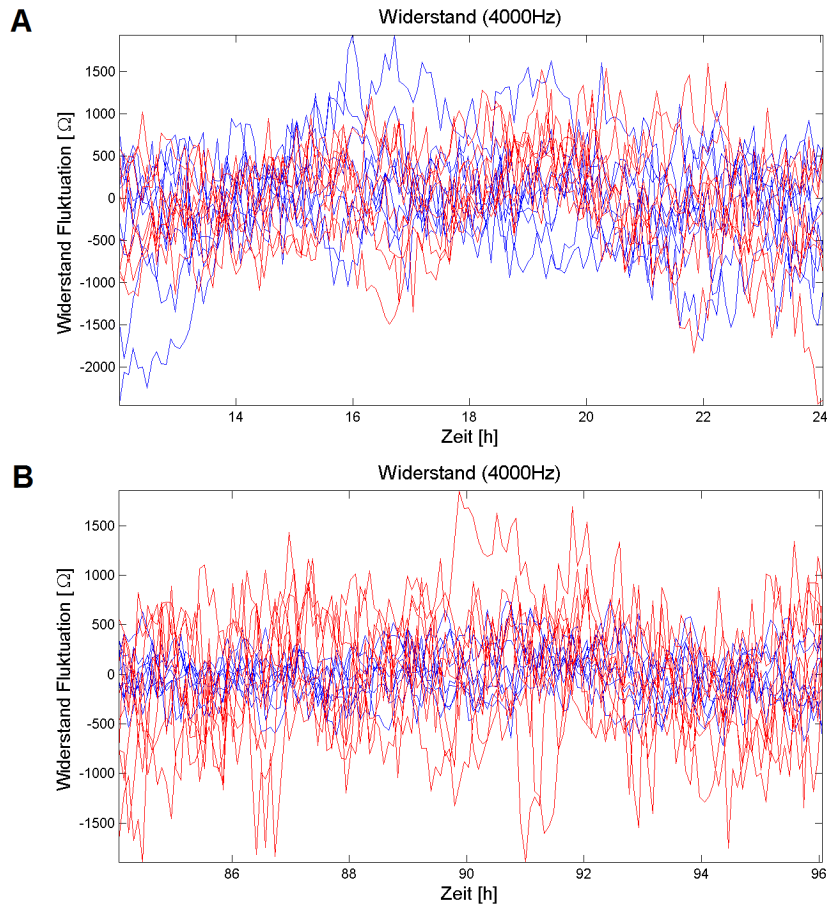


Abbildung 3.20.: Fluktuation des Widerstands gemessen bei 4000Hz im Zeitintervall von A 12 h bis 24 h und B 84 h bis 96 h. Gezeigt sind die Fluktuationen des Widerstands eines Experiments, je acht Elektroden des Flusses (blau) und acht Elektroden der Kontrolle (rot), im jeweiligen Zeitintervall.

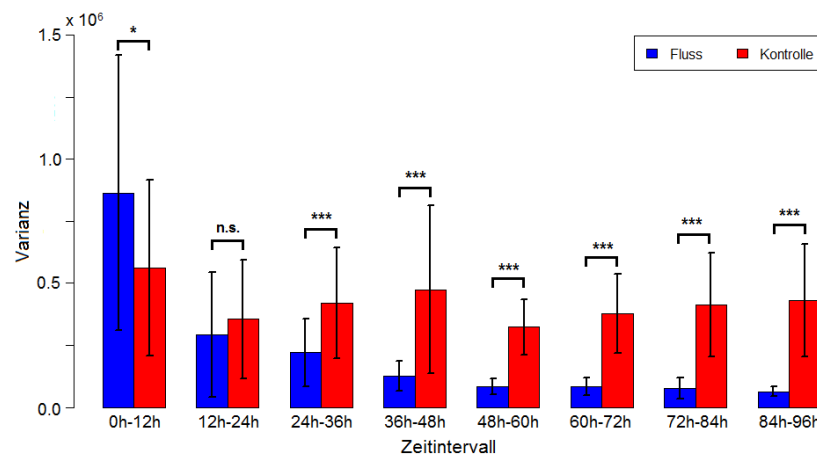


Abbildung 3.21.: Analyse der Mikromotion einer Endothelzellschicht aus drei unabhängigen Versuchen. Aufgetragen ist der Mittelwert der Varianz der Fluktuation des gemessenen Widerstandes (4000 Hz) in Zeitintervallen von zwölf Stunden. Der aufgetragene Fehler entspricht der Standardabweichung der Mittelwerte. Eingezeichnet ist der p-Wert des jeweiligen t-Tests für zwei Stichproben.

Betrachtet man die Mittelwerte der Varianz aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten in den gewählten acht Zeitintervallen, zeigt sich, dass sich die Varianz über die Zeit der flusskultivierten HUVEC deutlich anders entwickelt wie unter Kontrollbedingungen (Abb. 3.21). Im Diagramm zeigt sich in den gewählten Intervallen, dass außer im zweiten Intervall (12 h bis 24 h) der Mittelwert der Varianz von Fluss und Kontrolle statistisch unterschiedlich sind. Der Unterschied im ersten Zeitintervall ist durch die Reaktion der HUVEC auf das Anlegen der verschiedenen starken Scherspannung zurückzuführen. Dass der Mittelwert der Varianz des zweiten Intervalls im Rahmen der Standardabweichung gleich ist, war zu erwarten (Abb. 3.20 A). Unterschiede der Varianz, als Maß für die Veränderung der Mikromotion zu betrachten, ergibt auch erst ab dem zweiten Zeitintervall Sinn, da davor noch keine konfluente Zellschicht vorliegt, wie die Aufnahmen am Mikroskop zeigen. Betrachtet man den weiteren zeitlichen Verlauf, zeigt sich eine Abnahme der Varianz unter Flussbedingungen, die Varianzen der Kontrolle bleiben zu jedem nachfolgenden Intervall in derselben Größenordnung wie im zweiten Intervall. Die Mikromotion, die die Zellen unter Kontrollbedingungen zeigen, bleibt also unverändert. Wohingegen die Mikromotion der flusskultivierten Zellen bis zum Intervall 48 h bis 60 h signifikant abnimmt und erst danach bis zum Ende des Experiments konstant niedrig bleibt. Die Varianz der flusskultivierten Zellen ist ab dem dritten Intervall stark signifikant kleiner als die Varianz der Kontrollen, zudem wird die Standardabweichung auch kleiner. Die Fluktuation des Widerstands ist also unter Fluss unabhängig von der Elektrode und dem Experiment deutlich gleichmäßiger als unter Kontrollbedingungen.

3.5.3. Kapazität

Betrachtet man die Veränderung der Kapazität über die Zeit, ist unabhängig in allen drei Experimenten derselbe graphische Verlauf zu erkennen. Abb. 3.22 zeigt die gemittelte Kapazität, aufgenommen bei 64.000 Hz in Abhängigkeit von der Zeit von einem Versuch. In blau ist die Veränderung der Kapazität der unter Fluss kultivierten HUVEC eingezeichnet. Der Graph sinkt von zunächst 1,1 nF im Verlauf von 24 Stunden auf einen sehr niedrigen Wert um 0,4 nF ab. Danach nimmt die Kapazität kontinuierlich über den gesamten Versuch zu. Beim Beenden des Versuchs liegt die mittlere Kapazität bei 0,6 nF. Die Kapazität der Kontrolle zeigt einen unterschiedlichen Verlauf. Um einen ähnlich niedrigen Kapazitätswert von 0,4 nF, wie der Minimalwert unter Fluss, zu erreichen vergehen rund zwei Tage und ist damit deutlich langsamer. Danach hält sich die Kapazität über die restliche Zeit auf diesem niedrigen Level.

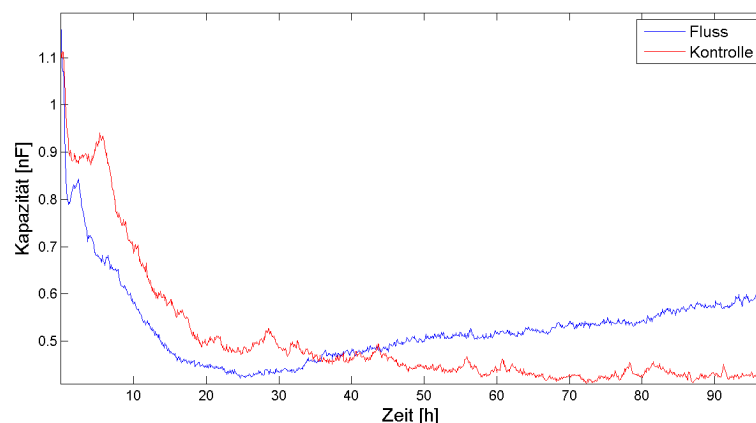


Abbildung 3.22.: Änderung der Kapazität [nF] über Gesamtdauer des Experiments (Messfrequenz von 64000 Hz). Gezeigt ist der Verlauf der flusskultivierten Zellen (blau) und die Kontrollbedingung (rot).

3.5.4. Erweiterte Experimente

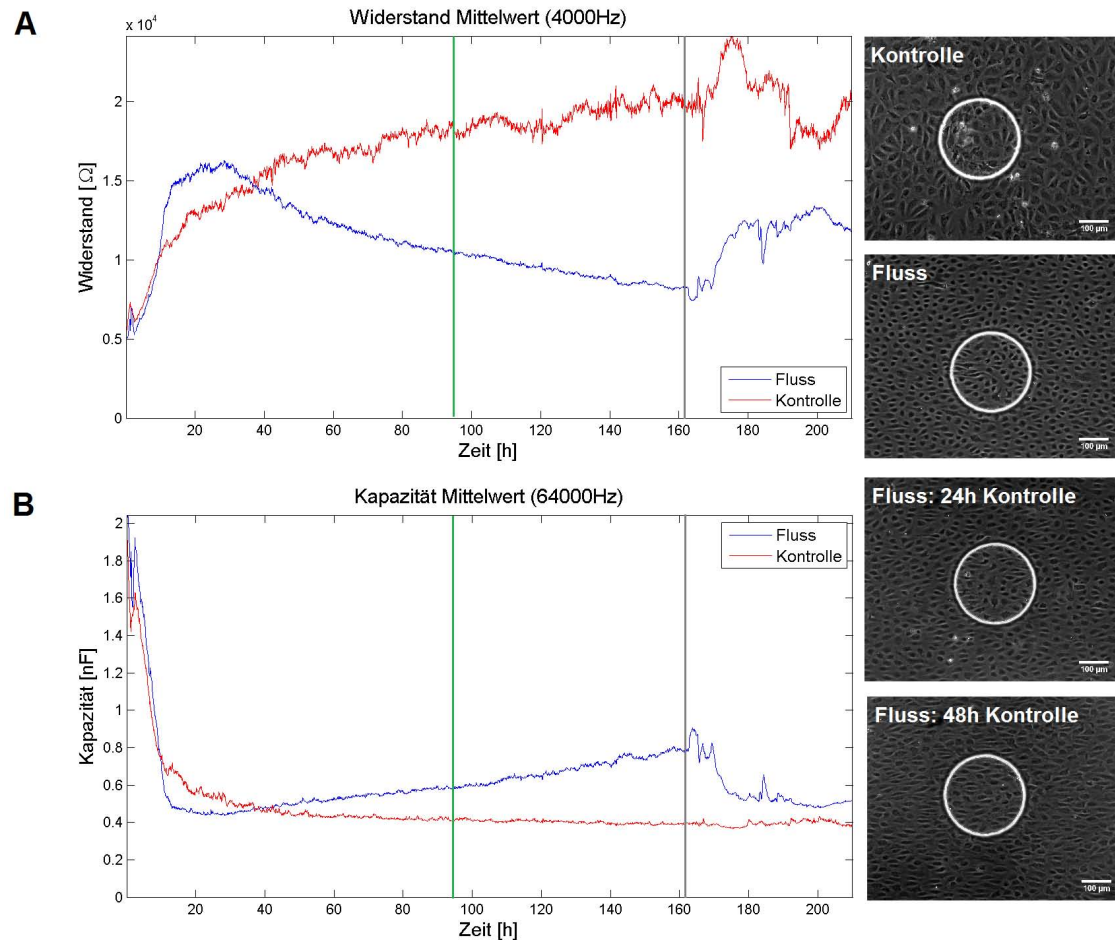


Abbildung 3.23.: Langzeitmessung eines ECIS-Versuchs bis zu 210 Stunden (8,75 Tage). Die grüne Linie markiert das Ende der Messdauer von 96 Stunden. Bei der grauen Markierung nach 162 Stunden wurde ein partieller Austausch des Mediums durchgeführt und die Kultivierung der Flusszellen auf Kontrollbedingungen umgestellt. *A* Widerstand [Ω] in Abhängigkeit der Zeit. *B* Kapazität [nF] im selben Zeitraum wie in *A*. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen fixierte HUVEC, der jeweils im Bild angegebenen Bedingung.

Da sich sowohl bei der Messung des Widerstands, als auch bei der Kapazität, nach der zunächst festgelegten Messdauer von 96 Stunden kein stabiles Niveau im Fall der flusskultivierten HUVEC zeigte, wurde der Versuch fast eine komplette Woche laufen gelassen. Diese Versuchsdauer konnte lediglich zweifach wiederholt werden, weshalb die Ergebnisse lediglich diskutiert werden um aufzuzeigen, wie plastisch das Verhalten der untersuchten Endothelzellen ist. Für eine gesicherte Annahme müssten weitere Wiederholungen des Versuchsaufbaus durchgeführt werden. Die Diagramme *A* und *B* der Abb. 3.23 zeigen den Verlauf des Widerstands bzw. der Kapazität über die gesamte Zeitspanne der Datenaufzeichnung. Zur besseren Orientierung ist der Zeitpunkt nach 96 Stunden durch eine grüne Linie gekennzeichnet, bis zu diesem Zeitpunkt wurden alle bisher aufgezeigten Daten gemessen. Am Zeitpunkt der grauen Markierung (162 h) wurde das Zellkulturmedium zum Teil durch frisches Medium ersetzt. Nach dem Mediumswechsel wurde die Kultivierung der HUVEC, die bisher einer Scherspannung von $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ ausgesetzt waren, auf Kontrollbedingungen umgestellt. Dadurch soll untersucht werden, ob die durch Scherspannung verursachten Veränderungen reversibel sind.

Im Zeitraum zwischen der grünen und grauen Markierung zeigt sich sowohl beim Widerstand als auch bei der Kapazität das gleiche Verhalten wie vor der grünen Markierung. Unter Flussbedingungen fällt der gemessene Widerstand weiter kontinuierlich ab, analog dazu steigt die Kapazität. Die Messungen der Kontrollen hingegen zeigen lediglich im Fall des Widerstands eine leichte Zunahme, die Kapazität bleibt konstant niedrig. Nach dem Austausch von Zellkulturmedium und der Umstellung der bisher flusskonditionierten Zellen auf die Kultivierung unter Kontrollbedingungen erkennt man eindeutig, dass sich der Widerstand und die Kapazität den Wert der Kontrolle annähern. Betrachtet man dazu die Phasenkontrastaufnahmen (Abb. 3.23), zeigt sich, dass sich die HUVEC unter Fluss nach der Umstellung auch morphologisch verändern. Die Ausrichtung der Zellen scheint sich zwar nicht aufzuheben, jedoch erscheint der Zellkörper der HUVEC mit zunehmender Dauer das Aussehen der Kontrolle anzunehmen.

3.6. Korrelationsanalyse

Die Korrelation der 15 analysierten Parameter zeigt, dass einige Parameter stark miteinander korrelieren. Um die Aussagekraft der einzelnen Korrelationskoeffizienten beurteilen zu können wird der jeweilige t-Wert für jeden Korrelationskoeffizienten $r_{x,y}$ zwischen den Parametern x und y berechnet. Für eine Stichprobengröße von sechs und einem Signifikanzniveau von 0,05 ergibt sich ein kritischer t-Wert von 2,78. Ist die Differenz zwischen dem kritischen t-Wert mit und dem t-Wert des Koeffizienten $r_{x,y}$ größer Null, liegt eine statistische Signifikanz vor. Dies ist der Fall für Korrelationskoeffizienten, die größer als 0,81 sind. In der Diskussion werden folglich nur Korrelationen betrachtet, die einen linearen, statistisch relevanten Zusammenhang aufweisen.

Betrachtet man die Abb. 3.24 zeigt diese oberhalb der Diagonalen des Graphen die Korrelationskoeffizienten zwischen dem Parameter der Spalte x und dem Parameter der Zeile y . Auf der Diagonalen ist kein Wert angegeben, da dort der jeweilige Parameter mit sich selbst korreliert wird und sich daraus immer $r_{x,y}=1$ ergeben würde. Unter der Diagonalen sind die Korrelationskoeffizienten graphisch dargestellt. An der Farbe des Kreises erkennt man, ob positive (lila) oder negative (grün) Korrelation vorliegt. Der Anteil der Farbfüllung entspricht der Höhe des Koeffizienten. Ein leerer Kreis bedeutet $r_{x,y}=0$, ein komplett gefüllter Kreis analog dazu $r_{x,y}=1$. Zusätzlich wurden die Korrelationskoeffizienten farblich hinterlegt, welche größer als 0,81 sind und damit einen statistisch signifikanten Zusammenhang aufzeigen. Bei den insgesamt 210 getesteten Parameterkonstellationen besteht bei 46 ein statistisch relevanter linearer Zusammenhang zwischen den getesteten Parametern.

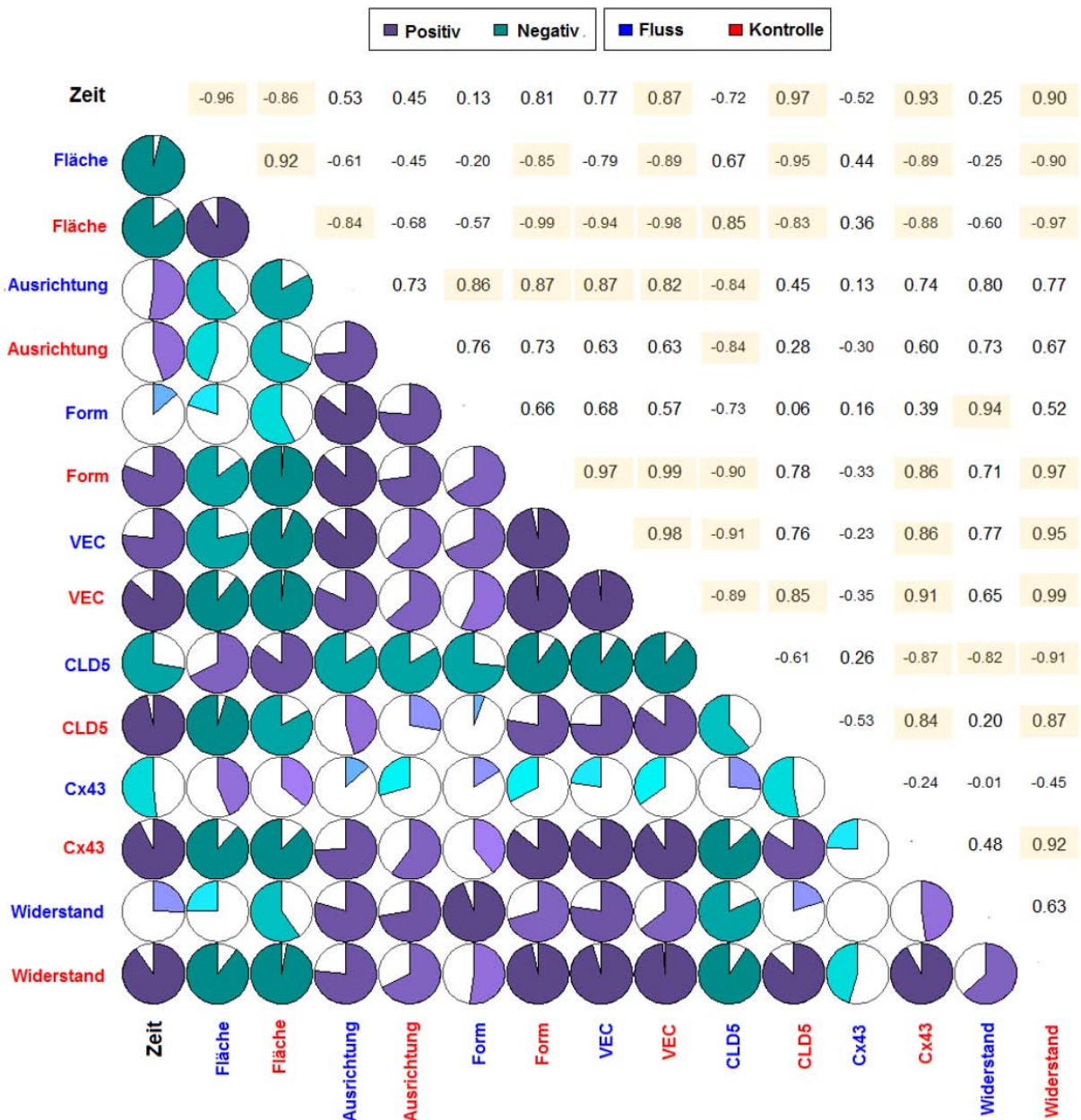


Abbildung 3.24.: Korrelogramm aller Messparameter zu den sechs Zeitpunkten der Probenahme. Aufgetragen sind die Parameter gegeneinander. Die untere Hälfte der Korrelationsmatrix zeigt in Kreisdiagrammen den Grad der Korrelation (Lila: positive Korrelation; grün: negative Korrelation). Die Schriftfarbe der Parameter gibt die Zugehörigkeit der Kultivierung an (Blau: Fluss; rot: Kontrolle).

4. Diskussion

4.1. Morphologie

Wie zu erwarten, zeigten sich deutliche morphologische Unterschiede zwischen den beiden Kultivierungsbedingungen. In den Phasenkontrastbildern ist klar erkennbar, dass der Bereich um den Zellkern unter Flussbedingungen deutlich dunkler abgebildet wird wie der entsprechende Bereich der Kontrollen. Dies lässt darauf schließen, dass sich unter Fluss eine deutlich dichtere Struktur im Zellkernbereich ausbildet und es dadurch bei mikroskopischen Aufnahmen mittels Phasenkontrast zu einer dunkleren Abbildung dieser Strukturen kommt (Abb. 3.2). Dies ist bereits ein erstes Anzeichen auf die durch Scherspannung ausgelöste Mechanotransduktion, die neben der Veränderung der Morphologie auch zu Veränderungen der mechanischen Eigenschaften von HUVEC führt. So konnten zum Beispiel Sato et al. mittels Rasterkraftmikroskopie an bovinen Endothelzellen untersuchen, dass es zu Unterschieden in der Zelloberfläche und der Steifigkeit um den Zellkern zwischen statischen Kontrollen und flusskonditionierten Zellen kommt. Es wurde gezeigt, dass unter statischen Bedingungen ein maximaler Höhenunterschied der Oberfläche von $3,5 \pm 0,7 \mu\text{m}$ vorliegt welcher unter Scherspannung auf $1,8 \pm 0,5 \mu\text{m}$ abnimmt [58]. Die Topographie der luminalen Zelloberfläche verändert sich also durch die Scherspannung stark, was vermutlich auch an einer Reorganisation des Zytoskeletts liegt. Die Endothelzellen, die unter Scherspannung kultiviert wurden, zeigen eine höhere Steifigkeit im Bereich des Zellkerns, welche mit der Dauer der Flusskultivierung zunimmt [59]. In einer anderen Studie konnte ausgehend von morphologischen Beobachtungen gezeigt werden, dass es zu einer Remodellierung des Zellkerns durch Scherspannung kommt. Diese Veränderung führt zu einem erhöhten Elastizitätsmodul des Zellkerns flusskonditionierter Zellen, also einer Versteifung des Nucleus [60]. Diese Beobachtungen erklären das unterschiedliche Erscheinungsbild der Region um die Nuclei in den Phasenkontrastaufnahmen. Im Rahmen dieser Arbeit sind Veränderungen der Oberfläche, Zellhöhe oder Steifigkeit nicht näher untersucht worden, müssen aber berücksichtigt werden. Zur Untersuchung der morphologischen Dynamik in Langzeitversuchen wurden die Parameter der Zellfläche, Zellelongation und Ausrichtung analysiert, welche nun einzeln diskutiert werden.

Zellfläche

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die Fläche der einzelnen Zellen im Mittel unter beiden Bedingungen verkleinert. Jedoch zeigen sich deutliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf (Abb. 3.3). Unter Flussbedingungen zeigt sich eine verzögerte Abnahme der mittleren Zellfläche, die erst nach zwei Tagen beginnt. Unter statischen Bedingungen ist die Abnahme der Zellfläche bereits in der Messung bei 24 h erkennbar. Dass die Zellen unter Flussbedingung sich nicht bereits innerhalb des ersten Tages signifikant verkleinern, liegt daran, dass die HUVEC in der Lage sind sich an die angelegte Scherspannung anzupassen, indem sie sich stärker ausbreiten als Zellen unter statischen Bedingungen [61]. Dadurch ist eine Verkleinerung der Zellfläche der flusskonditionierten Zellen erst nach zwei Tagen zu beobachten. Vermutlich setzt die Abnahme der Zellfläche erst nach Adaption der HUVEC an die Scherspannung ein. Zu diesem Zeitpunkt ist unter Kontrollbedingung bereits die Abnahme der Zellfläche auf einen danach konstant bleibenden Wert erfolgt. Eine konstante Zellfläche wird unter Scherspannung um einen Tag verzögert erreicht (ab 72 h statt 48 h). Auffallend ist, dass sich in der zweiten Hälfte des Langzeitexperiments signifikante

Unterschiede zwischen den Kultivierungsbedingungen zeigen. Unklar ist, warum die Zellfläche unter Fluss insgesamt stärker abnimmt und damit kleiner ist als unter Kontrollbedingungen.

Wahrscheinlich wird die Regulation der Zellgröße durch die von der Scherspannung ausgelöste Inhibierung des Zellwachstums verändert und die Zellen sind deshalb kleiner [62]. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass die Scherspannung dazu führt, dass die Zellen steifer werden und sich dadurch in der Höhe verändern. Vorstellbar ist, dass durch mechanisch stabilere Zellen eine Zunahme der Zellhöhe erfolgt. Alternativ könnte durch die Scherspannung eine Komprimierung der Zellen erfolgen und daraus eine dichtere Zellstruktur entstehen. Es käme dann zu einer Abnahme der Zelle. Ausgehend von einem gleichbleibenden Volumen der Zellen würde eine Zunahme in der Höhe eine verkleinerte Zellfläche bedeuten. Natürlich könnte auch eine Kombination beider Erklärungen vorliegen. Um dies weitergehend zu diskutieren müssten die gemessenen Zellflächen mit Daten aus anderen wissenschaftlichen Arbeiten verglichen werden. Ein Vergleich mit Angaben zur Zellfläche aus der Literatur ist jedoch schwierig, da die Zellfläche von vielen Faktoren abhängig ist, wie vom Spenderorganismus oder der Gefäßart aus dem die Endothelzellen isoliert wurden [63]. Zudem wurde von Feugier et al. an HUVEC gezeigt, dass die Größe der Zellfläche stark abhängig ist von dem Material und deren Beschichtung, auf dem die Zellen adhäreren [61]. Daten zur Zellfläche von Endothelzellen, die unter ähnlichen Bedingungen über länger als einen Tag kultiviert wurden, konnten zudem nicht gefunden werden.

Zellform

Betrachtet man die Zellform, fällt auf, dass die Zellen unter Fluss nur während des ersten Versuchstages (Messungen bei 3 h und 24 h) im Vergleich zur Kontrolle elongiert sind. Zu Beginn des Versuchs haben die HUVEC eine polygonale Form und einen Elongationsfaktor von 1,8. Dieser Wert scheint typisch zu sein für Endothelzellen *in vitro*, da sich dieser auch in anderen Studien wiederfindet [64]. Ab 48 h zeigt sich in beiden Bedingungen ein vergleichbarer Elongationsfaktor der HUVEC (Abb. 3.4). Denn auch unter Kontrollbedingungen ist der Elongationsfaktor signifikant angestiegen. Dies bedeutet, dass die Zellen im Durchschnitt länglicher wurden. In anderen Untersuchungen von Endothelzellen wird die Zellform der Kontrollen durchgehend als polygonal beschrieben, was im Widerspruch der hier vorgestellten Ergebnisse ist. Diese Abweichung kann daran liegen, dass oft die Kontrollen in großflächigen Kulturschälchen durchgeführt werden. Ein Einfluss der Kanalgeometrie, in dem die Kontrollzellen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden, ist aber anzunehmen.

Vergleicht man die in dieser Arbeit bestimmten Elongationsfaktoren mit der Arbeit von Ye et al. zeigen sich bei 24 h vergleichbare Achsenverhältnisse für HUVEC bei den Zellen der statischen Kontrolle und unter Fluss [65]. Dies spricht dafür, dass es bei der in dieser Arbeit durchgeführten Kontrolle nicht zu einer Flusskultivierung durch das Spülen der Kanäle für den Medienwechsel gekommen ist. Ye et al. untersuchten Endothelzellen beider Kultivierungsbedingung, wie auch in dieser Arbeit, in derselben Geometrie. Sie wiesen zudem für humane mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns (HBMEC) nach, dass diese unter Scherspannung nach einem Tag keine Elongation zeigen. Dadurch wird deutlich, dass man nicht annehmen kann, dass Endothelzellen ihre Zellform unter Scherspannung dauerhaft ändern. Möglicherweise adaptieren HBMEC schneller an die auftretende Scherspannung und zeigen deshalb bereits nach einem Tag keine Unterschiede in der Zellform zu statischen Zellen. Zur Auflösung der stärkeren Zellelongation benötigen die HUVEC rund zwei Tage. Ye et al. stellen die Hypothese auf, dass es ein evolutionärer Vorteil sein könnte die Zellelongation zu verhindern, indem die Länge der Zellränder pro Längeneinheit des Gefäßes minimiert wird.

Zusammenhang Zellform und Zellfläche

Unter Kontrollbedingungen ist die Zellfläche stark negativ korreliert mit der Zellform (Korrelationskoeffizient von -0,99) und beide Parameter nehmen zwischen 24 h und 48 h konstante Werte an. Unter Scherspannung sind die Parameter zwar nicht signifikant korreliert, doch stellt man hier fest, dass die deutlich stärkere Elongation nur innerhalb des ersten Tages stattfindet. In diesem Zeitraum ändert sich die mittlere Zellfläche jedoch nicht, da die HUVEC ausgebreitet bleiben um Konfluenz zu erreichen. Der ab dem zweiten Tag stattfindende kontinuierliche Rückgang der Elongation ist gleichzeitig verbunden mit der Abnahme der Zellfläche. Diese Feststellung deutet darauf hin, dass es durch die Scherspannung zu einer Deformation der Zellform kommt, die sich als Elongation zeigt. Die Elongation der Zelle ist vermutlich eine direkt durch den physikalischen Reiz verursachte morphologische Veränderung und nicht bedingt durch die Aktivierung einer Signalkaskade. Nach Adaption an die Scherspannung nimmt die größere Zellelongation ab und es kommt gleichzeitig zur Abnahme der Zellfläche. Diese Prozesse werden innerhalb der Zelle durch Signalwege gesteuert. Somit zeigen die Zellfläche und die Zellform im Langzeitversuch zu bestimmten Zeitpunkten Unterschiede zwischen den Kultivierungsbedingungen, die abhängig sind von der Adaption an die Scherspannung. Zur Verdeutlichung zeigt Abb. 4.1 wie sich die Parameter Zellfläche und Zellform ausgehend von einer Ellipse verändern. Die jeweiligen Ellipsen geben dabei die durchschnittliche morphologische Erscheinung (Fläche und Elongationsfaktor) der HUVEC zum jeweiligen Zeitpunkt und der jeweiligen Kultivierungsbedingung wieder.

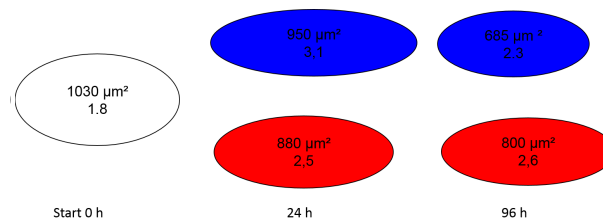


Abbildung 4.1.: Gemeinsame Betrachtung der Zellform und Zellfläche zu angegebenen Zeitpunkten. Die Ellipsen zeigen jeweils die entsprechende Zellfläche und Elongation, welche die Zellen der jeweiligen Bedingung (Blau: Fluss; Rot: Kontrolle) im Mittel aufweisen.

Zellausrichtung

Die Ausrichtung der Zellen (Abb. 3.6) zeigt, dass dieser Parameter über die gesamte Dauer des Langzeitversuchs unterschiedlich ist zwischen statischen und flusskultivierten HUVEC unterschiedlich ist. Die Ausrichtung der Zellen unter Fluss findet dabei sehr schnell statt und ist nach nur drei Stunden schon nachweisbar. Damit wird deutlich, dass es durch die Scherspannung zu einer nahezu unverzögerten Anpassung der Zellorientierung in Flussrichtung kommt. Die Ausrichtung, wie auch die Elongation der Zellen, ist eine direkte Anpassung an die veränderte physikalische Umgebung. Die Veränderung der physikalischen Umgebung in den Kontrollen tritt nur alle fünf Stunden für wenige Minuten mit deutlich schwächerer Scherspannung auf und ist offensichtlich nicht ausreichend um eine Ausrichtung zu bewirken. Denn es zeigt sich zu keinem Messzeitpunkt, dass es zu einer Ausrichtung der gesamten Zellschicht kommt.

Die Ausrichtung von vaskulären Endothelzellen ist bereits vielfach in anderen wissenschaftlichen Arbeiten beschrieben worden [66, 67] und zeigt sich als typisches Merkmal der Flusskonditionierung. Häufig wird in Studien zur Ausrichtung von Endothelzellen durch Scherspannung auch die Ausrichtung und Veränderung des Aktinskeletts beschrieben [67]. Die Veränderung des Aktinskeletts wurde in dieser Arbeit nicht quantitativ analysiert, eine Ausrichtung von Aktinfasern konnte aber, in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, beobachtet werden (Abb. 3.15).

Zusammenfassung

Alle drei untersuchten Parameter zeigen, dass die morphologischen Veränderungen spätestens nach zwei Tagen abgeschlossen sind. Danach bleibt die Morphologie der HUVEC ohne weitere große Veränderungen. In wie weit die morphologischen Änderungen abhängig sind von dem Betrag der Scherspannung, bleibt jedoch zu klären. Es kann nicht angenommen werden, dass nach rund zwei Tagen die vorhandene morphologische Erscheinung im Fall unterschiedlicher Scherspannung auftritt. Möglicherweise verändert sich die Zeitspanne, in der sich eine vergleichbare stabile Morphologie ergibt. Im Fall von Flusskultivierungsexperimenten bis zu einem Tag ist bekannt, dass die Ausprägung morphologischer Parameter stark abhängig ist von der vorliegenden Scherspannung. So wurde bereits in bovinen Endothelzellen der Aorta nachgewiesen, dass die Elongation im Zeitraum von 24 Stunden mit der Erhöhung von laminarer Scherspannung bis $20 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ kontinuierlich zunimmt, wobei eine Ausrichtung der Zellen erst ab $7 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ festgestellt wurde [68]. Die Ergebnisse dieser Studie, dass sich Zellausrichtung und Elongation bei $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ innerhalb des ersten Tages zeigen, stehen also in keinem Widerspruch mit den vorgestellten Ergebnissen. Damit stellt sich die Frage welchen Einfluss der Betrag der Scherspannung auf die Morphologie von Endothelzellen hat und in wie weit diese Veränderungen reversibel sind.

Allein durch die Beobachtung der morphologischen Veränderung kann festgestellt werden, dass für bestimmte wissenschaftliche Fragestellungen eine Langzeitkultivierung nötig ist. Will man zum Beispiel Zusammenhänge in einem intakten Blutgefäß *in vitro* nachahmen, muss eine Endothelzellschicht vorliegen, welche konfluent ist und eine geringe Dynamik in ihrer Morphologie aufweist. In dieser Arbeit wird eindeutig gezeigt, dass dies erst nach zwei Tagen der Kultivierung der Fall ist. Der Zeitpunkt, in dem eine stabile Endothelzellschicht erreicht wird, kann dabei von verschiedenen Faktoren abhängen. Wahrscheinlich ist die Einsaatdichte der Zellen und die angelegte Scherspannung von wesentlicher Bedeutung für die benötigte Zeitspanne der Etablierung einer stabilen Morphologie.

4.2. Zell-Zell-Kontakte

Die drei untersuchten Junction Proteine zeigen unterschiedliche zeitliche Reaktionen auf die applizierte Scherspannung. Zudem weisen vor allem Claudin-5 und Connexin43 verschiedene Formierungen im Vergleich zwischen den Kultivierungsbedingungen auf. Dies lässt sich sowohl aus den Fluoreszenzaufnahmen entnehmen als auch aus der Bildanalyse schließen.

Adherens Junction

Das Adherens Junction Protein VE-Cadherin zeigt von den drei untersuchten Proteinen, als einziges eine ähnliche Ausbildung unter Scherspannung und in der Kontrolle. Die Intensität an den Zellrändern im Vergleich zum Cytoplasma steigt stark an (Abb. 3.8). Das bedeutet, es bilden sich definierte Zell-Zell-Kontakte aus.

Das Protein ist in der Kontrollbedingung nach zwei Tagen stärker vorhanden als unter Fluss. Die Unterschiede in den Intensitätsverhältnissen liegen möglicherweise anhand der unterschiedlichen Ausbildung der Zell-Zell-Kontakt Flächen. Unter statisch kultivierten HUVEC ist durch Transmissionselektronenmikroskopie eine Überlappung benachbarter HUVEC nachgewiesen [69]. Das Erscheinungsbild der breiten Netzwerkstrukturen in statischen HUVEC erklärt sich also durch den Überlapp benachbarter Zellen (Abb. 3.14 A). Unter Fluss zeigen sich hauptsächlich schmale Bereiche des VE-Cadherins und nur selten ist die Netzwerkstruktur deutlich ausgebildet (Abb. 3.14 B). Diese Erscheinung ist erklärbar, wenn es durch die Scherspannung zu einer apikalen Ausrichtung der Zellen kommt. Dadurch würden die Plasmamembranen benachbarter

Zellen parallel zu einander stehen, wodurch sich die Kontaktfläche benachbarter Zellen minimiert. Es würde also weniger Protein benötigt um über die komplette Fläche des interzellulären Spalts Adherens Junction auszubilden und trotzdem eine mechanische Stabilisierung auszuüben. Die Immunfluoreszenzfärbungen lassen aufgrund der schmalen Zellränder vermuten, dass es zu einer Ausrichtung der Zellen kommt. Durch die unterschiedlich große Kontaktfläche zwischen beiden Bedingungen wäre der gemessene Unterschied des Intensitätsverhältnisses erklärbar und die Funktionsfähigkeit der VE-Cadherine unter beiden Bedingungen vergleichbar.

Da die Zellschicht der HUVEC über den gesamten Zeitraum intakt bleibt und eine gleichmäßige Formierung der VE-Cadherine vorliegt, ist es wahrscheinlich, dass die VE-Cadherine die Funktionen zur Erhaltung der Integrität maßgeblich übernehmen und auch verantwortlich sind für die Regulierung des Stoffaustauschs. Durch zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Ausbildung von funktionierenden Adherens Junction für viele Funktionen des Endothels zwingend notwendig ist. Es ist auch bekannt, dass die VE-Cadherine eine Schlüsselrolle in der Erhaltung der vaskulären Integrität spielen. So ist gezeigt worden, dass VE-Cadherin über die Bindung von α -Catenin die Regulierung des Aktinskeletts stark beeinflusst und somit die Form, Zellmotilität und Stabilität der Zelle [70]. Durch die hohe Anzahl an Interaktionen zwischen VE-Cadherin und anderen Proteinen wird über die Formierung des VE-Cadherins viele wichtige Signalwege innerhalb der Zelle, wie die Leukozyten Transmigration, reguliert [16]. Eine funktionierende Formierung von VE-Cadherin ist also zwingend erforderlich für jegliche Art von Endothel. Und durch die Auswertung des Fluoreszenzsignals von VE-Cadherin-Färbungen konnte nachgewiesen werden, dass sich durchgehende Adherens Junctions durch dieses Protein ausbilden.

Tight Junction

Ein komplett anderes Verhalten als bei den VE-Cadherinen zeigt sich bei der Ausbildung des Tight Junction Proteins Claudin-5 zwischen den beiden untersuchten Bedingungen. Claudin-5 ist zu keinem der untersuchten Zeitpunkte in flusskultivierten HUVEC innerhalb der kompletten Zellschicht homogen ausgebildet. Folglich kann das Claudin-5 nicht für die Erhaltung der intakten Zellschicht verantwortlich sein und in HUVEC keinen Einfluss auf die mechanische Stabilität haben, was aber aufgrund des ausgebildeten VE-Cadherins nicht zwingend nötig ist. Damit muss durch die gezeigte Formierung von Claudin-5 die in der Einleitung formulierte Hypothese, dass sich Claudin-5 über Scherspannung hoch regulieren lassen müsste, verworfen werden. Diese Annahme wurde getroffen, da von Walsh et al. für mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns zeigten, dass es durch Scherspannung zu einer Stabilisierung der Barrierefunktion durch Tight Junction Formierung des Proteins Occludin kommt [71]. Da Occludin nachweislich über Claudin-5 zur Tight Junction Formierung rekrutiert wird und Claudin-5 das häufigste Tight Junction Protein im Endothel ist, wurde dieses als Marker für Tight Junction ausgewählt [12].

Eine stärkere Formierung von Claudin-5 konnte aber zumindest bei dem durchgeführten Versuchsaufbau nicht erreicht werden. Dies liegt möglicherweise daran, dass HUVEC als venöse Endothelzellen in vivo deutlich schwächere Tight Junctions zeigen. Deshalb könnte es sein, dass sich HUVEC nicht vergleichbar regulieren lassen wie Zellen aus mikrovaskulären Gewebe. Dies könnte erklären warum die Ausbildung von Claudin-5 bei den angewendeten $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ nur begrenzt zu beobachten war. Denn $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ entsprechen einer Scherspannung, die unter physiologischen Bedingungen in arteriellen Gefäßen und nicht in venösen auftritt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es bei anderen Beträgen der Scherspannung zu einer definierten Formierung von Claudin-5 kommt.

Durch die Ergebnisse, die sich in der Kontrolle zeigen, ist gesichert, dass HUVEC in der Lage sind Claudin-5 auszubilden. Denn es zeigt sich abhängig von der Zeit der Formierung ein homogenes Fluoreszenzsignal an den Zellrändern für Claudin-5. Die alle fünf Stunden wieder einsetzende

schwache Scherspannung könnte eventuell ausreichen für eine Rekrutierung von Claudin-5. Eine andere Möglichkeit ist, dass Claudin-5 generell in statischen HUVEC auftritt. Es ist zudem bekannt, dass VE-Cadherin die Expression von Claudin-5 kontrolliert [72]. Unter Kontrollbedingungen scheint das Auftreten von Claudin-5 positiv korreliert zu sein mit VE-Cadherin (Korrelationskoeffizient von 0,85). Bei einer Scherspannung von $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ hingegen sind die beiden Proteine negativ korreliert (Korrelationskoeffizient -0,91). Die Scherspannung könnte statt eines direkten Einflusses auf die Claudin-5 Expression auch indirekt über VE-Cadherin verantwortlich sein für die unterschiedliche Ausbildung von Claudin-5. Nur unter der Betrachtung von Claudin-5 scheinen HUVEC bei $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ nicht in der Lage zu sein Tight Junction gleichmäßig auszubilden. Die Intensitätsmessungen von VE-Cadherin und Claudin-5 zeigen, dass es nur zur gleichmäßigen Ausbildung von Claudin-5 kommt, wenn das Intensitätsverhältnis von VE-Cadherin der Kontrolle signifikant höher ist als unter Fluss. Die Regulierung von Claudin-5 könnte also abhängig sein von einer Mindestmenge an VE-Cadherin, die unter Fluss nicht erreicht wird. Um diese Vermutung zu bestätigen müssten die Proteinmengen genauer untersucht werden. Gesichert ist lediglich, dass Claudin-5 bei $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ keine definierten Tight Junctions ausbildet. Um sicher zu stellen, ob es überhaupt zu einer Formierung von Tight Junctions kommt müssten auch andere Proteine überprüft werden. Es ist vorstellbar, dass durch Scherspannung zur sofortigen Rekrutierung anderer Tight Junction Proteine kommt. Colgan et al. zeigten beispielsweise, dass es bei 10 und $14 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ zu einem Anstieg von Occludin und dem damit assoziierten Protein ZO-1 nach 24 Stunden kommt. Sie haben nachgewiesen, dass laminare Scherspannung sowohl zu erhöhter Translation von Occludin mRNA und zu erhöhter Protein Expression führt im Vergleich zu statischen Kontrollen [73]. Verwendet wurden hierfür wieder mikrovaskuläre Endothelzellen wie auch bei Walsh et. al. Im mikrovaskulären Gewebe scheint es also durch mechanische Kräfte über eine Zeitdauer von mehreren Stunden oder Tagen zu einer Stärkung der Tight Junction zu kommen [74].

Dass keine Zunahme von Claudin-5 beobachtet wurde, kann also mehrere Gründe haben. Zum einen kann es daran liegen, dass HUVEC nicht in der Lage sind unter Scherspannung intakte Tight Junctions zu bilden, da sie sich nicht auf arterielle Bedingungen einstellen lassen. Es wurde also ein Betrag der Scherspannung gewählt, bei der es zu keiner Formierung in HUVEC kommt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass mit Claudin-5 ein unpassender Marker für die Untersuchung innerhalb von Langzeitversuchen gewählt wurde.

Gap Junction

Connexin43, als Vertreter für ein Gap Junction Protein, zeigt unter Fluss nur geringe Veränderungen und wird in der Kontrolle vermehrt gebildet. Nur durch Immunfluoreszenzaufnahmen kann nicht aufgeklärt werden, ob Connexin43 unter Fluss oder im Fall der erhöhten Expression in der Kontrolle funktionsfähig ist. Es kann sein, dass das Connexin43 für den Austausch von interzellulären Signalen seine Funktionsfähigkeit verliert. In Time Lapse Aufnahmen zeigt sich eine hohe Zellbeweglichkeit im Fall der Kontrolle. Es könnte sein, dass Connexin43 Kanal unabhängig an der Zellmigration unter statischen Bedingungen beteiligt ist. Für Connexin43 ist dies nämlich nachgewiesen [11]. Connexin43 könnte in statisch kultivierten HUVEC neben der Funktion der interzellulären Kommunikation eine Rolle in der Zellmotilität spielen. Dadurch wäre die deutlich stärkere Ausbildung von Cx43 zu erklären. Unter Scherspannung tritt weniger Cx43 an den Zellrändern auf, das Fluoreszenzsignal erscheint nur punktuell. Es wäre vorstellbar, dass unter Fluss nur die Aufgabe des Signalaustauschs von Cx43 übernommen wird.

Meens et al. haben für Connexin43 gezeigt, dass es sehr sensitiv gegenüber der Veränderung von physikalischen Reizen ist und es durch Scherspannung zu Veränderungen der relativen Zusammensetzung von verschiedenen Connexinen kommt [30]. Es ist denkbar, dass eine Scherspannung von $10 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ dazu führt, dass Connexin 37 oder Connexin40 vermehrt gebildet werden, anstatt

Connexin43. Das hätte zur Folge, dass trotz geringeren Cx43 vorkommen unter Fluss ausreichend Connexin in den HUVEC auftreten um den Austausch verschiedener Signale zu gewährleisten.

Eine weitere Rolle von Cx43 ist von Giepmans et. al. beschrieben worden. Sie stellten fest, dass Cx43 direkt mit Mikrotubuli interagiert [75]. Über eine Anfärbung der Mikrotubuli könnte sich nachweisen lassen, ob sich auch in HUVEC Verbindungen zwischen Cx43 und Mikrotubuli ausbilden. Unter Scherspannung könnten sich auch dabei Unterschiede zeigen.

Zusammenfassung

Die Analysen der Zell-Zell-Kontakte machen deutlich, dass die Scherspannung großen Einfluss auf die Ausbildung aller drei Zell-Zell-Kontakt Typen hat beziehungsweise auf die gewählten Marker. Ein geringer Einfluss zeigt sich lediglich auf VE-Cadherin und es kann davon ausgegangen werden, dass HUVEC unter beiden Bedingungen stabile Adherens Junctions ausbilden. Ob auch funktionierende Tight und/ oder Gap Junction unter Fluss vorliegen, müssten auch andere Marker für diese Zell-Zell-Kontakte untersucht werden.

4.3. Physiologie

Da die Zell-Zell-Kontakte wesentlich sind für die Regulierung des Ionenflusses über den interzellulären Spalt zwischen benachbarten Endothelzellen, bestimmen diese maßgeblich den Widerstand einer konfluenten Endothelzellschicht. Betrachtet man den Verlauf des Widerstands über den Zeitraum von vier Tagen, stellt sich unter Flussbedingung eine kontinuierliche und deutliche Abnahme des Widerstands ein (Abb.3.17) . Das bedeutet, die physiologischen Eigenschaften der Zellschicht ändern sich dramatisch.

Widerstand der Zellschicht

Innerhalb des ersten Tages steigt der Widerstand unter beiden Bedingungen deutlich an und verdoppelt sich innerhalb dieser Zeit (Abb.3.17). Auffällig ist dabei, dass dieser Prozess unter Fluss schneller stattfindet. Aus der Untersuchung der Morphologie ist bereits bekannt, dass in diesem Zeitraum eine komplett konfluente und intakte Zellschicht gebildet wird. Folglich kommt der Anstieg des Widerstands durch die Belegung der Elektrode. Betrachtet man den Verlauf der Kapazität im selben Zeitraum, wird deutlich, dass diese unter Scherspannung ihr Minimum bereits nach rund einem Tag erreicht (Abb.3.22). Die Zellen der Kontrolle fallen im Zeitraum des ersten Tages auch ab. Jedoch geschieht dies langsamer und sie erreichen einen Minimalwert erst nach etwa zwei Tagen. Wegener et al. haben gezeigt, dass bei hohen Aufnahmefrequenzen (im Fall dieser Arbeit 64 kHz) der Kapazitätsmessung der Verlauf der Kapazität die Kinetik des Adhärerens und der Ausbreitung von Zellen wieder gibt [76]. Es wird durch die ECIS-Messung also deutlich, dass sich unter Fluss schneller eine konfluente Zellschicht ausbildet als unter Kontrollbedingungen. Durch den beschleunigten Vorgang der Bildung einer geschlossenen Zellschicht ist auch zu erklären, dass sich der Widerstand schneller erhöht, da die Elektrode schneller mit Zellen bedeckt ist. Die Zellen wiederum wirken als Isolatorpartikel, wodurch der erhöhte Widerstand zu erklären ist. Da im Fall der statisch kultivierten Zellen das Ausbreiten bis zu zwei Tage dauert, erhöht sich der Widerstand auch in diesem Zeitraum.

Interessant ist das Verhalten der flusskultivierten Zellschicht nachdem sie die Konfluenz erreicht hat. Ab diesem Zeitpunkt beginnt der Widerstand kontinuierlich zu sinken. Dies kann daran liegen, dass die mittlere Zellfläche auch kontinuierlich abnimmt. Dadurch ergibt sich eine steigende Zellzahl pro Messelektrode. Durch mehr Zellen wird folglich auch die Gesamtlänge des interzellulären Spalts zwischen den Zellen größer. Bei gleichbleibender angelegter Spannung von 10 mV

am Messgerät könnte das dazu führen, dass mehr Strom zwischen den Zellen durchfließen kann. Das wiederum bedingt eine Abnahme des gemessenen Widerstands. Auch die Ausrichtung des interzellulären Spalts und die vorliegenden Zell-Zell-Kontakte könnten Einfluss auf den Abfall des Widerstands haben. Unter Fluss scheinen viele Zell-Zell-Kontakt Flächen apikal ausgerichtet zu sein und es zeigt sich, dass nach 24 Stunden nur das VE-Cadherin gleichmäßig ausgebildet ist um eine Barrierefunktion zu übernehmen. Der Abstand zwischen benachbarten Zellen, die über Adherens Junction verbunden sind, beträgt aber rund 20 nm und ist damit für Ionen passierbar [74].

Die Kontrollen zeigen nach einem Tag noch einen weiteren leichten Anstieg bis Tag zwei und verbleiben dann auf einem konstanten Widerstandsniveau. Bis zum Versuchsende nach vier Tagen und auch darüber hinaus verbleiben die Zellen der Kontrolle auf diesem Niveau, was durch die weiterführenden Versuche gezeigt wurde (Abb. 3.23). Dieser Anstieg korreliert sehr stark mit der Differenzierung der VE-Cadherine unter Kontrollbedingungen (Korrelationskoeffizient: 0,99), aber auch mit dem Verhalten von Claudin-5 (Korrelationskoeffizient: 0,87). In einer Studie von Kluger et al. wurde dasselbe Verhalten an HUVEC über einen Zeitraum von fünf Tagen nach Erreichen der Konfluenz beobachtet [69]. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die interzelluläre Barriere in HUVEC durch VE-Cadherin und nicht durch Claudin-5 ausgebildet wird. Dieser Nachweis wurde über das Ausschalten von Claudin-5 in HUVEC erbracht. Bei HUVEC, die kein Claudin-5 bilden konnten, konnten keine Unterschiede in der Höhe des Widerstands zu unveränderten HUVEC gemessen werden. Kluger et al. zeigen auch, dass in HDMEC (humane dermal microvascular EC) Claudin-5 für die Ausbildung der Barrierefunktion verantwortlich ist. Es wird die Schlussfolgerung getroffen, dass Claudin-5 Expression und Organisation die parazelluläre Barriere in HDMEC kontrolliert, wohingegen diese Aufgabe in HUVEC durch die VE-Cadherine übernommen wird.

Die Ergebnisse der Widerstandsmessung beider Bedingungen decken sich mit einer wissenschaftlichen Arbeit von Seebach et al., dass es bei HUVEC unter Fluss zu einer Abnahme des Widerstands kommt [77]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen erfolgen bei $12 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$, wohingegen Kontrollzellen bei schwachen Fluss von $0,5 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ über den beobachteten Zeitraum konstant bleiben. Die Bedingungen der Kultivierung sind also mit denen in dieser Arbeit vergleichbar. Jedoch stellt sich bei Seebach et al. unter Fluss nach einem Tag ein konstantes Verhalten ein, was in dieser Arbeit nicht beobachtet wurde. Denn der Widerstand nimmt bis zu 160 Stunden kontinuierlich weiter ab. In Übereinstimmung mit dieser Studie ist aber, dass der Abfall des Widerstands bei hoher Scherspannung reversibel ist, wenn eine Umstellung auf Kontrollbedingung erfolgt (Abb. 3.23). Seebach et al. stellen anhand von VE-Cadherin Färbungen fest, dass die Zellen ihre Ausrichtung beibehalten, sich aber ansonsten morphologisch verändern. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Phasenkontrastaufnahmen von fixierten Zellen in den ECIS-Kanälen (Abb. 3.23). In dieser Arbeit kann also gezeigt werden, dass die HUVEC auch nach rund sieben Tagen der Flusskultivierung ein plastisches Verhalten beibehalten und sofort auf eine Umstellung der Scherspannung reagieren. Als Anmerkung ist zu erwähnen, dass Seebach et al. auch die Reorganisation des VE-Cadherins zwischen den zwei untersuchten Bedingungen beschreiben und zeigen, dass sich VE-Cadherin in den Kontrollen als irreguläres Netzwerk ausbildet und es unter $12 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ zu einer Umformierung in ein lineares Muster kommt (vgl. Abb. 3.14). Dies spricht wieder für die Annahme der Ausrichtung der Zellen.

Mikromotion

In der bisherigen Beobachtung des Widerstandsverlauf wurde nicht die Veränderung der Fluktuation des Widerstands berücksichtigt. Diese zeigt sich zum einen in der Betrachtung der Standardabweichung, welche unter Fluss deutlich kleiner wird (Abb. 3.17), und im Verlauf des Widerstands einer einzelnen Elektrode (Abb. 3.19). In diesen Schwankungen zeigt sich die Zellmotilität [55]

und es kann nachgewiesen werden, dass diese durch Scherspannung stark abnimmt.

Die Varianzanalyse der Widerstandsfluktuation innerhalb von zwölf Stundenintervallen, gezeigt in Abb. 3.21, verdeutlicht die Abnahme der Widerstandsschwankungen unter dem Einfluss von Scherspannung. Die Mikromotion nimmt folglich deutlich ab, wie sich auch in Time Lapse Aufnahmen vermuten lässt. Diese Zeitrafferfilme zeigen, dass sich die Zellen unter Fluss weniger bewegen und auch dies nur parallel zur Flussrichtung tun. Zellen der Kontrolle hingegen weisen über den gesamten Zeitraum Migration in alle Richtungen auf. Diese Beobachtung wird durch die unverändert hohe Varianz des Widerstands ab dem zweiten Zeitintervall belegt. Anhand der hohen Zellmotilität der Kontrollen wird deutlich, dass die Bildung und Formierung von Zell-Zell-Kontakten ein sehr dynamischer Prozess sein muss. Jedoch ist es unwahrscheinlich, dass eine Endothelzellschicht, die dauerhafte Veränderungen der Zell-Zell-Kontakte aufweist, in der Lage ist den Stoffaustausch gezielt zu regulieren. In einem gesunden und intakten Blutgefäß kann davon ausgegangen werden, dass sich die Mikromotion als vergleichbar gering erweist, wie es unter Fluss nach zwei Tagen der Fall ist. Es bleibt festzuhalten, dass sich die Motilität der flusskonditionierten Zellen ab der Konfluenz der Zellschicht konstant verhält.

Kapazität

Der zeitliche Verlauf der Kapazität nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht zeigt unter Scherspannung ein reziprokes Verhalten im Vergleich zur Widerstandsmessung. Unter Kontrollbedingungen bleibt die Kapazität jedoch konstant bei einem Minimalwert von 0,4 nF. Wegener et al. interpretieren den Anstieg der Kapazität als sich ablösende Zellen von der Elektrode [76], was im Fall der kultivierten HUVEC aber ausgeschlossen werden kann. Denn in den Phasenkontrastaufnahmen zeigt sich eine intakte Zellschicht unter Flussbedingungen. Somit liegt kein Verlust von Zellen vor, wodurch zeitweise eine offene Elektrodenfläche entstehen würde. Der Grund für den Anstieg der Kapazität von flusskultivierten HUVEC kann mehrere Gründe haben.

Zum einen kann nicht ausgeschlossen werden, dass es durch die Berechnung des Widerstands und der Kapazität aus der gemessenen Impedanz auf Grundlage des Ersatzschaltbildes zu Abhängigkeiten der beiden berechneten Parametern kommt, so dass sich also der Abfall des Widerstands aus rein technischen Gründen in der Kapazität zeigt. Was auch daran liegen kann, dass das Ersatzschaltbild das Verhalten der Zellschicht nicht exakt beschreibt. Schließt man technische Gründe aus, ergeben sich aus der Veränderung der Kapazität als weitere Begründung folgende zellbiologische Schlüsse.

Eine Zellschicht lässt sich aufgrund der Plasmamembran als Plattenkondensator betrachten. Eine Veränderung der Höhe oder der Leitfähigkeit der Zellschicht würde also eine Veränderung der Kapazität bedeuten. Die kapazitiven Eigenschaften der Zellschicht könnten aber auch von einer Veränderung der Glykokalyx stammen. Die luminale Oberfläche von Endothelzellen weist ein breites Spektrum an membrangebundenen Makromolekülen (Glykoproteine und Proteoglykane) auf, welche die Glykokalyx ausbilden. Von dieser Struktur wird angenommen, dass sie neben den Zell-Zell-Kontakten den Stofftransport über die Endothelschicht beeinflusst [74]. Zeng und Tarbell haben nachgewiesen, dass es zu örtlichen und zeitlichen Veränderungen von Komponenten der Glykokalyx durch Scherspannung kommt. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass in bovinen Endothelzellen der Aorta es zu Anreicherungen von bestimmten Bestandteilen der Glykokalyx kommt, welche durch Scherspannung verursacht wurden. Diese Veränderungen wurden bei $15 \frac{\text{dyn}}{\text{cm}^2}$ nach 24 Stunden beobachtet. Sie konnten zeigen, dass diese Veränderungen im Zusammenhang mit Oberflächenveränderungen der Plasmamembran und einer Remodellierung des Aktinskeletts stehen [78]. Veränderungen der Membranoberfläche würden die Kapazität ebenfalls beeinflussen. Dass der Anstieg der Kapazität von flusskultivierten HUVEC also durch Veränderungen der Zellbiologie kommen, ist wahrscheinlich.

Zusammenfassung

Die durchgeführten ECIS-Messungen unter Betrachtung des Widerstands und der Kapazität weisen auf, dass sich im Langzeitverhalten von HUVEC unter Scherspannung die Physiologie der Zellschicht kontinuierlich verändert. Es konnte im Vergleich zu Untersuchungen der Morphologie und der Zell-Zell-Kontakte nicht nachgewiesen werden, dass sich ein gleichbleibendes Verhalten einstellt. Interessant ist, dass die konditionierten HUVEC innerhalb weniger Stunden nach Umstellung der Kultivierung auf statische Bedingungen wieder verändern und sowohl die Werte des Widerstands als auch der Kapazität einen Anstieg bzw. Rückgang zeigen. Es scheint sich der Zustand der zuvor flusskonditionierten Zellen dem Zustand der statischen Kontrollen anzugleichen. Die Zellschicht zeigt somit ein sehr plastisches Verhalten.

4.4. Fazit

In dieser Arbeit konnte ein Versuchsaufbau zur Flusskonditionierung entwickelt werden, anhand dessen man eine Vielzahl von Parametern über einen Zeitraum von mehreren Tagen parallel analysieren kann. Die Analyse der verschiedenen aufgeführten Parameter machen deutlich, dass die Flusskultivierung auch im Langzeitverhalten zu großen Unterschieden verglichen mit statisch kultivierten Zellen führt. Um Vorgänge in einer intakten Endothelzellschicht zu untersuchen müssen Langzeitversuche durchgeführt werden. Denn es muss abgewartet werden bis eine konfluente Zellschicht vorliegt. Unter *in vitro* Bedingungen ist es möglich eine solche Endothelschicht zu kultivieren und ein konstantes Verhalten bezüglich der Morphologie und den Zell-Zell-Kontakten zu erhalten. Ungeklärt bleibt warum sich kein konstantes Erscheinungsbild der Physiologie im selben Zeitraum messen lässt. Im Zeitraum bevor sich eine Konfluenz der Endothelzellschicht zeigt, befindet sich diese in einem dynamischen Bereich der Reorganisation und Anpassung an die Scherspannung. Untersuchungen an Endothelzellen ohne den Einfluss von Scherspannung sind anhand der gezeigten Ergebnisse nicht sinnvoll, da sich flusskultivierte Zellen sehr unterschiedlich verhalten im Vergleich zu statisch kultivierten Zellen. Die Situation der statischen Kultivierung entspricht dabei schlichtweg nicht den physiologischen Bedingungen *in vivo*.

Um ein besseres Verständnis bezüglich der Situation in intakten Blutgefäßen zu bekommen, kann der vorgestellte Versuchsaufbau auch noch weiter verbessert werden. Zum Beispiel wäre eine Kultivierung von Endothelzellen mit glatten Muskelzellen interessant um den Aufbau eines Blutgefäßes besser nachzuahmen. Es muss auch noch ausgeschlossen werden, ob es sich bei den gemachten Beobachtungen um ein Artefakt der Zellkultur handelt oder ob die Ergebnisse vergleichbar sind mit der Situation in ganzen Gefäßen oder in einem gesamten Organismus. Welche Veränderungen universell für alle Typen von Endothelzellen gelten, ist zudem unklar. Es ist nicht ausreichend geklärt welche Bedeutung die Wahl des Organismus und Art des Blutgefäßes für die Untersuchung an isolierten Endothelzellen hat. Das bedeutet, dass man sich für die Nachahmung *in vitro* mehr Gedanken machen muss über die Wahl der zu untersuchenden Endothelzellen. HUVEC könnten für Flusskultivierungen im Bereich von arterieller Scherspannung kein passendes Modell sein.

Es bleibt festzuhalten, dass die generierten Daten etliche Korrelationen der gemessenen Parameter aufzeigen, woraus sich etliche neue Fragestellungen ergeben. Am interessantesten erscheint die Frage, welchen Einfluss der Betrag der Scherspannung auf die Ausbildung einer Endothelschicht hat. Um den Einfluss der Scherspannung weiter zu analysieren sollte zunächst der etablierte Versuchsaufbau mit anderen Beträgen der Scherspannungen durchgeführt werden um den Einfluss dieser genauer zu bestimmen. Im Folgenden sind einige Fragen von wissenschaftlichen Interesse:

- Welchen Einfluss zeigt der Betrag der Scherspannung auf Morphologie, Zell-Zell-Kontakte und Physiologie?

- Zeigen sich nur kurzzeitige Unterschiede in der Entwicklung der Zellschicht oder auch in Langzeitversuchen?
- Welchen Einfluss hat die Wahl der Gefäßart aus dem Endothelzellen für *in vitro* Versuche isoliert werden?
- Lassen sich andere Tight Junction Proteine wie Claudin-5 unter Fluss in HUVEC hochregulieren?

Nomenklatur

*	p<0,05
**	p<0,01
***	p<0,001
Ω	Ohm
AF	Alexa Fluor - Fluoreszenzfarbstoff
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovine serum albumin
Cx	Connexin
Da	Dalton; atomare Masseneinheit
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EC	Endothelial cells
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
FCS	Fetal calf serum
HBMEC	Human brain microvascular endothelial cells
HDMEC	Humane dermal microvascular endothelial cells
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
Hz	Herz
KF	Kalibrierungsfaktor
microns	Mikrometer μm
n.s.	nicht signifikant
NA	numerische Apertur
nF	Nanofarad
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Perfusionsset
SDS	Natriumdodecylsulfat
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VarCo	Variationskoeffizient
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin

A. Materialien

A.1. Labormaterialien

Tabelle A.1.: Verwendetes Labormaterial (Hersteller und Verwendung) für die durchgeführten Experimente.

Material	Hersteller	Verwendung
15 ml-Tubes	Sarstedt	Zellkultur
50 ml-Tubes	Sarstedt	Zellkultur
ECIS Flow array 1E	Applied BioPhysics	Impedanz-Messung
Filterpapier	BioRad	Western Blot
Filterspitzen vers. Volumina	Starlab	Zellkultur
Neubauer Zählkammer	Marienfeld	Flusskultivierung
Omnifix®-F (Spritze 1 ml)	B. Braun Melsungen	Lysat, Western Blot
Perfusion Set RED 15 cm ID 1,6 mm	ibidi	Flusskultivierung
Roti®-NC 100% Nitrocellulose	Roth	Western Blot
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	eppendorf	Fluoreszenzfärbung
Serial Connector for µ-Slides	ibidi	Flusskultivierung
Serologische Pipetten vers. Volumina	Sarstedt	Zellkultur
Zellkulturflasche (25 cm ² / 75 cm ²)	Falcon	Zellkultur
µ-Plate 96-well	ibidi	Western Blot
µ-Slide I ^{0.4} Luer Collagen IV	ibidi	Flusskultivierung

Tabelle A.2.: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung oder Western Blot.

Antikörper	Spezies	Hersteller
anti-Claudin-5	Kaninchen	Invitrogen
anti-Connexin43	Kaninchen	Sigma-Aldrich
anti-mouse IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate)	Ziege	Cell Signaling
anti-rabbit IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor® 555 Conjugate)	Ziege	Cell Signaling
anti-GAPDH	Maus	Sigma-Aldrich
anti-VE-Cadherin	Maus	Santa Cruz Biotechnology
anti-VE-Cadherin	Kaninchen	Sigma-Aldrich

Tabelle A.3.: Liste der verwendeten Reagenzien und Chemikalien unter Angabe des Herstellers und des Verwendungszwecks innerhalb der Arbeit.

Reagenzien/ Chemikalien	Hersteller	Verwendung
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Carl Roth	Zellkernfärbung
8–16% Mini-PROTEAN® TGX™ Gel	BioRad	Western Blot
Accutase	PAA	Zellkultur
Aceton	Carl Roth	Fixierung Zellen
AlexaFluor® 660 Phalloidin	Life Technologies	Aktinfärbung
Bovine serum albumin (BSA)	Cell Signaling	Pufferbestandteil
Collagen IV	BD Bioscience	Flusskultivierung
Collagen G	Biochrom AG	Zellkultur
ddH ₂ O, Rotipuran®	Carl Roth	Zellkultur
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	PromoCell	Zellkultur
Formalin, 10% (enthält 4% Formaldehyd)	Sigma-Aldrich	Fixierung Zellen
Milchpulver	Roth	Western Blot
Mounting Medium	ibidi	Immunfluoreszenz
Na-Doxycholat	Roth	Pufferbestandteil
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific	Western Blot
PBS	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Penicillin/Streptomycin	cc-pro	Zellkultur
Phenylmethanesulfonyl Fluoride (PMSF)	Cell Signaling	Western Blot
Pierce™ BCA™ Protein Assay	Thermo Scientific	Western Blot
Protein Electrophoresis Buffers	BioRad	Western Blot
Roti®-Load 1	Roth	Western Blot
Supplement Mix	PromoCell	Zellkultur
TRIS	Roth	Pufferbestandteil
Triton® X-100 Lösung	Sigma-Aldrich	Pufferbestandteil
Trypan Blue 0,4%	Sigma-Aldrich	Zellkultur
Tween-20	Sigma-Aldrich	Western Blot

A.2. Geräte

Tabelle A.4.: Verwendete Geräte zur Durchführung der experimentellen Arbeit mit jeweiligen Verwendungszweck.

Gerät	Hersteller	Verwendung
ECIS Model Z Θ	Applied BioPhysics	Impedanz-Messung
EVOS fl	AMG	Zellkultur Mikroskop
Mixing Block MB-120	Bioer	Western Blot
Mini-PROTEAN Tetra System	BioRad	Western Blot
MiniRocker MR-1	BioSan	Western Blot
Typhoon TRIO	GE Healthcare	Western Blot, Scanner
Pipetten vers. Volumen	Gilson	Experimente
Universal 320 (R)	Hettich Zentrifugen	(Kühl-)Zentrifuge
Pumpe mit Fluidic Unit	ibidi	Flusskultivierung
Gasmischer	ibidi	Time Lapse Aufnahmen
Heizsystem	ibidi	Time Lapse Aufnahmen
Mini MRstandard	IKA-Werke	Western Blot, Magnetplatte
ALS I20-4	Kern	Feinwaage
Intensilight C-HG TIE	Nikon	Fluoreszenzmikroskopie
Nikon Eclipse Ti	Nikon	Fluoreszenzmikroskopie
Olympus CKX41	Olympus	Mikroskop, Time Lapse
CCD-Kamera	Princeton Ins.	Mikroskopie
Micro Galaxy Incubator	RS Biotech	Time Lapse Aufnahmen
MCO-20AK	SANYO	Experimente Brutschrank
HeraCell 240i	Thermo Scientific	Zellkultur Brutschrank
HeraSafe KS	Thermo Scientific	Sterilbank
Multiskan GO	Thermo Scientific	Western Blot, Photometer

A.3. Computerprogramme

Tabelle A.5.: Liste der verwendeten Computerprogramme (Version, Hersteller, Verwendungszweck).

Name	Version	Hersteller	Verwendung
imageJ	1.47	NIH	Bildbearbeitung
IrfanView	4.33	Irfan Skiljan	Bildbearbeitung
JabRef	2.10	Alver et al.	Literaturverzeichnis
LYX	2.1.0	Abravanel et al.	Textverarbeitung
matlab	R2010b	Mathworks	Bildverarbeitung
MicroManager	1.4	Vale Lab	Mikroskopsteuerung Nikon
Office Excel	365	Microsoft	Tabellenkalkulation
PumpControl	1.5.1	ibidi	Steuerung Pumpe
R	3.0.0	R Foundation	Statistikprogramm
R Studio Desktop	0.98.994	R Studio	Nutzeroberfläche R

B. Datenträger

1. Schriftliche Arbeit im PDF Format
2. Abbildungen aus der Masterarbeit
3. Mikroskopie Aufnahmen (Weitfeld, Konfokale, Time Lapse)
4. Datentabellen
5. Protokolle
6. Programmkodes

Literaturverzeichnis

- [1] W. C. Aird. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ. Res.*, 100(2):158–173, Feb 2007.
- [2] W. C. Aird. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(1):a006429, Jan 2012.
- [3] L. Florey. The endothelial cell. *Br Med J*, 2(5512):483–484, Aug 1966.
- [4] Warren H Lewis. Endothelium in tissue cultures. *Am. J. Anat.*, 30(1):39–59, 1922.
- [5] Y. Maruyama. The human endothelial cell in tissue culture. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 60:69–79, 1963.
- [6] E. A. Jaffe, R. L. Nachman, C. G. Becker, and C. R. Minick. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.*, 52(11):2745–2756, Nov 1973.
- [7] R. L. Nachman and E. A. Jaffe. Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology. *J. Clin. Invest.*, 114(8):1037–1040, Oct 2004.
- [8] E. R. Weibel. Fifty years of Weibel-Palade bodies: the discovery and early history of an enigmatic organelle of endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.*, 10(6):979–984, Jun 2012.
- [9] E. Dejana. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5(4):261–270, Apr 2004.
- [10] M. S. Balda and K. Matter. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta*, 1788(4):761–767, Apr 2009.
- [11] P. Kameritsch, K. Pogoda, and U. Pohl. Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818(8):1993–2001, Aug 2012.
- [12] Y. Wallez and P. Huber. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778(3):794–809, Mar 2008.
- [13] M. Simionescu, N. Simionescu, and G. E. Palade. Characteristic endothelial junctions in different segments of the vascular system. *Thromb. Res.*, 8(2 suppl):247–256, May 1976.
- [14] G. Bazzoni and E. Dejana. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.*, 84(3):869–901, Jul 2004.
- [15] M. S. Balda and K. Matter. Tight junctions at a glance. *J. Cell. Sci.*, 121(Pt 22):3677–3682, Nov 2008.
- [16] L. Bravi, E. Dejana, and M. G. Lampugnani. VE-cadherin at a glance. *Cell Tissue Res.*, 355(3):515–522, Mar 2014.
- [17] S. Hatsell and P. Cowin. Deconstructing desmoplakin. *Nat. Cell Biol.*, 3(12):E270–272, Dec 2001.
- [18] S. M. Dudek and J. G. Garcia. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J. Appl. Physiol.*, 91(4):1487–1500, Oct 2001.
- [19] M. G. Lampugnani, M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Russo, and E. Dejana. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.*, 118(6):1511–1522, Sep 1992.
- [20] E. Dejana, F. Orsenigo, and M. G. Lampugnani. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J. Cell. Sci.*, 121(Pt 13):2115–2122, Jul 2008.

-
- [21] K. Morita, H. Sasaki, M. Furuse, and S. Tsukita. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J. Cell Biol.*, 147(1):185–194, Oct 1999.
 - [22] G. Krause, L. Winkler, S. L. Mueller, R. F. Haseloff, J. Piontek, and I. E. Blasig. Structure and function of claudins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778(3):631–645, Mar 2008.
 - [23] H. Chiba, M. Osanai, M. Murata, T. Kojima, and N. Sawada. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778(3):588–600, Mar 2008.
 - [24] I. Cooper, K. Cohen-Kashi-Malina, and V. I. Teichberg. Claudin-5 expression in in vitro models of the blood-brain barrier. *Methods Mol. Biol.*, 762:347–354, 2011.
 - [25] G. Sohl and K. Willecke. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc. Res.*, 62(2):228–232, May 2004.
 - [26] H. Van Rijen, M. J. van Kempen, L. J. Analbers, M. B. Rook, A. C. van Ginneken, D. Gros, and H. J. Jongsma. Gap junctions in human umbilical cord endothelial cells contain multiple connexins. *Am. J. Physiol.*, 272(1 Pt 1):C117–130, Jan 1997.
 - [27] J. A. Haefliger, P. Nicod, and P. Meda. Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovasc. Res.*, 62(2):345–356, May 2004.
 - [28] N. M. Kumar and N. B. Gilula. The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3):381–388, Feb 1996.
 - [29] J. C. Saez, V. M. Berthoud, M. C. Branes, A. D. Martinez, and E. C. Beyer. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.*, 83(4):1359–1400, Oct 2003.
 - [30] M. J. Meens, A. Pfenniger, B. R. Kwak, and M. Delmar. Regulation of cardiovascular connexins by mechanical forces and junctions. *Cardiovasc. Res.*, 99(2):304–314, Jul 2013.
 - [31] C. S. Chen, J. Tan, and J. Tien. Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng*, 6:275–302, 2004.
 - [32] B. D. Johnson, K. J. Mather, and J. P. Wallace. Mechanotransduction of shear in the endothelium: basic studies and clinical implications. *Vasc Med*, 16(5):365–377, Oct 2011.
 - [33] U. Pohl, J. Holtz, R. Busse, and E. Bassenge. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*, 8(1):37–44, Jan 1986.
 - [34] S. Moncada. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 361(1469):735–759, May 2006.
 - [35] Y. Mohamied, E. M. Rowland, E. L. Bailey, S. J. Sherwin, M. A. Schwartz, and P. D. Weinberg. Change of Direction in the Biomechanics of Atherosclerosis. *Ann Biomed Eng*, Aug 2014.
 - [36] P. F. Davies. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 6(1):16–26, Jan 2009.
 - [37] B. M. Cooke, S. Usami, I. Perry, and G. B. Nash. A simplified method for culture of endothelial cells and analysis of adhesion of blood cells under conditions of flow. *Microvasc. Res.*, 45(1):33–45, Jan 1993.
 - [38] B. Baudin, A. Bruneel, N. Bosselut, and M. Vaubourdolle. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*, 2(3):481–485, 2007.
 - [39] R. J. Corish. Flow in a pipe of rectangular cross-section. *Proc. R. Soc. Lond.*, 120(786):691–700, Oct 1928.
 - [40] R. Zantl. *Application Note 11: Shear stress and shear rates for all channel Slides - based on numerical calculations*. ibidi GmbH, 3.5 edition, Jul 2012.
 - [41] M. Kroutvar and Z. Guttenberg. *ibidi Pump System*. ibidi GmbH, 1.5.1 edition, Jun 2013.

- [42] Anton Paar GmbH. *Instruction Manual: AMVn Automated Microviscometer*, 1.7x edition, Jul 2008. Document no.: B80IB01O.fm.
- [43] D. R. Lide, editor. *Handbook of Chemistry and Physics*. CRC Press, 90th edition 2009-2010 edition, 2009.
- [44] H. Wagner. *Application Note 13: Flow experiment with the ibidi pump system and Slide Luer*. GmbH, 3.1 edition, Sep 2012.
- [45] H. Wagner. *Application Note 25: Serial Connection for Luer-Slides*. ibidi GmbH, 1.1 edition, Jul 2012.
- [46] Manual. *Pierce BCA Protein Assay Kit*. Thermo Scientific.
- [47] J. Wegener and J. Seebach. Experimental tools to monitor the dynamics of endothelial barrier function: a survey of in vitro approaches. *Cell Tissue Res.*, 355(3):485–514, Mar 2014.
- [48] C. E. Rommel. *Tierische Zellen auf nanoporösen Oberflächen: Grundlagen und bioanalytische Anwendungen*. PhD thesis, Westfälische Wilhelms-Universität, April 2007.
- [49] I. Giaever and C. R. Keese. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81(12):3761–3764, Jun 1984.
- [50] I. Giaever and C. R. Keese. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(17):7896–7900, Sep 1991.
- [51] C. R. Keese, K. Bhawe, J. Wegener, and I. Giaever. Real-time impedance assay to follow the invasive activities of metastatic cells in culture. *BioTechniques*, 33(4):842–844, Oct 2002.
- [52] R. Szulcek, H. J. Bogaard, and G. P. van Nieuw Amerongen. Electric cell-substrate impedance sensing for the quantification of endothelial proliferation, barrier function, and motility. *J Vis Exp*, (85), 2014.
- [53] B. Rodieck. EllipseFitter (imageJ), <http://rsb.info.nih.gov/ij/developer/source/>.
- [54] R Documentation, <http://www.rdocumentation.org/>.
- [55] C. M. Lo, C. R. Keese, and I. Giaever. Monitoring motion of confluent cells in tissue culture. *Exp. Cell Res.*, 204(1):102–109, Jan 1993.
- [56] M. Friendly. Corrgrams: Exploratory displays for correlation matrices. *The American Statistician*, 56(4):316–324, Jan 2002.
- [57] L. Fahrmeier, R. Kuenstler, I. Pigeot, and G. Tutz. *Statistik*. Springer-Verlag, 7 edition, 2011.
- [58] M. Sato, K. Nagayama, N. Kataoka, M. Sasaki, and K. Hane. Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured bovine endothelial cells exposed to shear stress. *J Biomech*, 33(1):127–135, Jan 2000.
- [59] K. A. Barbee, P. F. Davies, and R. Lal. Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy. *Circ. Res.*, 74(1):163–171, Jan 1994.
- [60] S. Deguchi, K. Maeda, T. Ohashi, and M. Sato. Flow-induced hardening of endothelial nucleus as an intracellular stress-bearing organelle. *J Biomech*, 38(9):1751–1759, Sep 2005.
- [61] P. Feugier, R. A. Black, J. A. Hunt, and T. V. How. Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials*, 26(13):1457–1466, May 2005.
- [62] K. Lin, P. P. Hsu, B. P. Chen, S. Yuan, S. Usami, J. Y. Shyy, Y. S. Li, and S. Chien. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(17):9385–9389, Aug 2000.

-
- [63] B. Garipcan, S. Maenz, T. Pham, U. Settmacher, Jandt K. D., J. Zanow, and J. Bossert. Image analysis of endothelial microstructure and endothelial cell dimensions of human arteries. *Advanced Engineering Materials*, 13(1-2):B54–B57, Feb 2011.
 - [64] P. C. Dartsch and E. Betz. Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation. *Basic Res. Cardiol.*, 84(3):268–281, 1989.
 - [65] M. Ye, H. M. Sanchez, M. Hultz, Z. Yang, M. Bogorad, A. D. Wong, and P. C. Searson. Brain microvascular endothelial cells resist elongation due to curvature and shear stress. *Sci Rep*, 4:4681, 2014.
 - [66] J. T. Butcher, A. M. Penrod, A. J. Garcia, and R. M. Nerem. Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24(8):1429–1434, Aug 2004.
 - [67] S. Noria, F. Xu, S. McCue, M. Jones, A. I. Gotlieb, and B. L. Langille. Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress. *Am. J. Pathol.*, 164(4):1211–1223, Apr 2004.
 - [68] T. Kadohama, N. Akasaka, K. Nishimura, Y. Hoshino, T. Sasajima, and B. E. Sumpio. p38 Mitogen-activated protein kinase activation in endothelial cell is implicated in cell alignment and elongation induced by fluid shear stress. *Endothelium*, 13(1):43–50, 2006.
 - [69] M. S. Kluger, P. R. Clark, G. Tellides, V. Gerke, and J. S. Pober. Claudin-5 controls intercellular barriers of human dermal microvascular but not human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 33(3):489–500, Mar 2013.
 - [70] M. Giannotta, M. Trani, and E. Dejana. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev. Cell*, 26(5):441–454, Sep 2013.
 - [71] T. G. Walsh, R. P. Murphy, P. Fitzpatrick, K. D. Rochfort, A. F. Guinan, A. Murphy, and P. M. Cummins. Stabilization of brain microvascular endothelial barrier function by shear stress involves VE-cadherin signaling leading to modulation of pTyr-occludin levels. *J. Cell. Physiol.*, 226(11):3053–3063, Nov 2011.
 - [72] J. Gavard and J. S. Gutkind. VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat. Cell Biol.*, 10(8):883–885, Aug 2008.
 - [73] O. C. Colgan, G. Ferguson, N. T. Collins, R. P. Murphy, G. Meade, P. A. Cahill, and P. M. Cummins. Regulation of bovine brain microvascular endothelial tight junction assembly and barrier function by laminar shear stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 292(6):H3190–3197, Jun 2007.
 - [74] J. M. Tarbell. Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc. Res.*, 87(2):320–330, Jul 2010.
 - [75] B. N. Giepmans, I. Verlaan, T. Hengeveld, H. Janssen, J. Calafat, M. M. Falk, and W. H. Moolenaar. Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr. Biol.*, 11(17):1364–1368, Sep 2001.
 - [76] J. Wegener, C. R. Keese, and I. Giaever. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp. Cell Res.*, 259(1):158–166, Aug 2000.
 - [77] J. Seebach, G. Donnert, R. Kronstein, S. Werth, B. Wojciak-Stothard, D. Falzarano, C. Mrowietz, S. W. Hell, and H. J. Schnittler. Regulation of endothelial barrier function during flow-induced conversion to an arterial phenotype. *Cardiovasc. Res.*, 75(3):596–607, Aug 2007.
 - [78] Y. Zeng and J. M. Tarbell. The adaptive remodeling of endothelial glycocalyx in response to fluid shear stress. *PLoS ONE*, 9(1):e86249, 2014.

Danksagung

Ich möchte mich bedanken für jede Art der Unterstützung, die ich im Rahmen der Anfertigung dieser Arbeit erfahren habe. Einen herzlichen Dank an:

Professor Ben Fabry für die gute Betreuung meiner Masterarbeit und seiner Unterstützung während des gesamten Zeitraums. Danken möchte ich auch Professor Wolfgang Goldmann und Astrid Mainka für ihr Interesse an meiner Arbeit und ihre sehr hilfreichen Ratschläge.

Dr. Roman Zantl für die Möglichkeit dieses interessante Thema in der Forschungs- und Entwicklungsabteilung der Firma ibidi durchzuführen.

Helga Wagner für die Betreuung der Arbeit bei ibidi und ihre Hilfe in allen Phasen der Arbeit. Jana Peliskova des Arbeitskreises Prof. Dr. Zahler (LMU München) für die Bereitstellung der HUVEC.

Andrea Buchfeller der Firma chromotek für ihre Hilfe bei der Etablierung des Western Blots.

Dr. Andrea Rottach des Arbeitskreises Prof. Dr. Leonhardt (LMU München) für die Hilfe bei den Aufnahmen am Konfokalmikroskop.

Das gesamte ibidi-Team für die sehr gute Arbeitsatmosphäre. Besonders danken möchte ich Dr. Armin Bieser für seine Hilfe bei den ECIS-Messungen und Andreas Rainer für die Programmerweiterung der PumpControl Software.

Meine Familie für ihr Verständnis und ihren Rückhalt über die gesamte Dauer meines Studiums, besonders in den schweren Zeiten.

Meinen Freund Sebastian Hischke für all seine Unterstützung und Geduld.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die Masterarbeit einschließlich beigefügter Protokolle und graphischer Darstellungen selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet habe. Alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem einzelnen Fall unter Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Erlangen, den 24.10.2014

Anita Reiser