

Stimulation von Zellwachstum in dynamisch modulierten akustischen Kraftfeldern - vom Phänomen zum Mechanismus

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.



eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Universität Augsburg

von

Kathrin Baumgartner

Augsburg, Oktober 2024

Erster Gutachter: Prof. Dr. Christoph Westerhausen

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Regina Fluhrer

Dritter Gutachter: Prof. Dr. Joachim Rädler

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2024

Kurzfassung

Die Stimulation von Zellwachstum zur Geweberegeneration ist ein wichtiger Bestandteil der regenerativen Medizin und biomedizinischen Forschung. Akustische Wellen haben sich in den letzten Jahrzehnten nicht nur zu einer wichtigen Technologie zur Förderung von Heilungsprozessen etabliert, sondern haben auch großes Potenzial für die weitere Entwicklung dieses Bereichs. Vertiefte interdisziplinäre Grundlagenforschung könnte die Entwicklung effizienter und kostengünstiger Stimulationstechnologien entscheidend vorantreiben. Die hier vorliegende Arbeit befasst sich daher mit dem Phänomen des akustisch stimulierten Zellwachstums und dessen zugrundeliegenden Mechanismen. Zur Erzeugung akustischer Kraftfelder wird hier die Technologie der akustischen Oberflächenwellen (engl. *surface acoustic waves*, SAW) angewendet, die sich in den letzten Jahren als vielversprechende Methode zur Stimulation von Zellwachstum *in vitro* herausgestellt hat.

Akustische Oberflächenwellen werden durch Anlegen einer elektrischen Wechselspannung auf piezoelektrischen Substraten erzeugt und breiten sich daraufhin als mechanische Deformation entlang der Oberfläche aus. Vorarbeiten zeigen, dass sich das Zellwachstum, besonders die Zellmigration in Wundheilungsmodellen, durch die so entstehende mechanische Vibration des Substrats auf mehr als das Doppelte beschleunigen lässt [1, 2]. Die zugrundeliegenden intrazellulären Mechanismen dieses Phänomens wurden bisher noch nicht identifiziert und sind daher ein zentraler Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit. Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu den Auswirkungen verschiedener akustischer Kraftfelder auf Zellen und Zellwachstum lassen sich in vier Kernanwendungen gliedern:

- Anwendung dynamisch modulierter akustischer Kraftfelder zur Untersuchung von Endothelzellen aus humanen Aorten unter akustischer Strömung
- Beeinflussung von Neuritenwachstum durch statische und dynamisch modulierte akustische Potentiallandschaften
- Quantifizierung von Stimulationsgrenzen von Zellwachstum im Wundheilungsmodell durch dynamisch modulierte akustische Kraftfelder
- Identifikation intrazellulärer Mechanismen der SAW-stimulierten Wundheilung

Um indirekte Auswirkungen akustischer Kraftfelder auf Zellen näher zu beleuchten, wird zunächst der Einfluss akustisch erzeugter Strömungen auf die Struktur von Endothelzellen untersucht. Die akustisch erzeugten dynamischen Kraftfelder können in dem hier entwickelten Aufbau *Aorta-on-a-SAW-Chip* bereits nach kurzer Behandlungszeit morphologische Veränderungen in Endothelzellen aus humanen Aorten induzieren. Auch auf intrazellulärer Ebene können verschiedene Strömungsbedingungen zudem Merkmale des Aktin-Zytoskeletts dieser Zellen, wie dessen Ausprägung, die Filamentbreite und die Filamentorientierung, verändern.

Direkte Einflüsse statischer und dynamisch modulierter akustischer Stehwellenfelder werden durch Analysen des Neuritenwachstums von Neuroblastomzellen quantifiziert. Die hier erzeugten akustischen Potentiallandschaften führen dazu, dass Neuriten verstärkt entlang von Vorzugsrichtungen in den Druckminima des Kraftfeldes sowie senkrecht dazu wachsen. Weitere dynamische Modulationen akustischer Kraftfelder geben zudem einen Einblick in die Grenzen der Stimulierbarkeit von Zellwachstum im Wundheilungsmodell. Während unter Variation der SAW-Amplitude bei einer im zeitlichen Mittel konstanten Leistung die Stimulationseffizienz der behandelten Zellen erhalten bleibt, zeigt die Stimulierbarkeit unter weiterer Modulation eine Abhängigkeit von der Pulsbreite des SAW-Signals. Unterhalb einer kritischen Pulsbreite wird dadurch keine Stimulation der Wundheilung mehr beobachtet.

Um das Phänomen der SAW-stimulierten Wundheilung weiter aufzuklären, werden durch einen Blick in das Zellinnere mögliche intrazelluläre Mechanismen untersucht, die eng mit dem Prozess der Zellmigration verbunden sind. Analysen verschiedener genetisch modifizierter Zelllinien mit unterschiedlicher Expression von Membranproteasen sollen den Einfluss des Glykosylierungsmusters von Zellen auf ihre Stimulierbarkeit näher beleuchten. Die Zelllinien weisen unterschiedliche Wundheilungsgeschwindigkeiten auf, die mit zunehmendem Komplexitätsgrad der genetischen Veränderung abnehmen und damit unabhängig von der SAW-Stimulation sind. Da somit kein Einfluss der Glykosylierung auf den Stimulationsmechanismus feststellbar ist, wird weiterhin untersucht, ob die akustische Stimulation die Aktivität von mechanosensitiven Proteinen in der Wundheilung verändert. Während zwar teilweise erhöhte Proteinaktivitäten im gesamten Zellrasen sowie in einzelnen migrierenden Zellen beobachtet werden, lässt sich im Mittel jedoch keine signifikante Abhängigkeit von der SAW-Stimulation erkennen. Zuletzt werden Auswirkungen der Stimulation mit akustischen Kraftfeldern auf das Aktin-Zytoskelett quantifiziert, da dieses eine zentrale Rolle bei der Mechanotransduktion und Migration von Zellen spielt. Die Behandlung mit SAW führt zu Veränderungen von Aktineigenschaften, wie der Breite und Orientierung der Filamente, sowie zu einer veränderten Orientierung von Zellkernen und ganzen Zellen. Die Stimulation führt zu einer verstärkten Ausrichtung von Filamenten und Kernen in die Ausbreitungsrichtung der Welle und damit Migrationsrichtung. Diese intrazellulären Veränderungen äußern sich auch in der Morphologie der Zellen im Wundheilungsprozess, indem sie zur schnelleren Ausrichtung der Zellen in Migrationsrichtung und damit mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Phänomen der beschleunigten Wundheilung unter SAW-Stimulation führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass sich Zellwachstum durch dynamisch modulierte akustische Kraftfelder beeinflussen lässt. Im Rahmen eines Wundheilungsmodells werden mögliche Mechanismen des akustisch stimulierten Zellwachstums identifiziert, die anhand intrazellulärer und morphologischer Veränderungen vor allem eine durch SAW beschleunigte Ausrichtung der Zellen und damit ein gerichteteres Zellwachstum demonstrieren. Diese Ergebnisse stellen maßgebliche Einblicke in die Mechanismen der akustisch stimulierten Geweberegeneration für zukünftige Anwendungen der SAW-Technologie dar.

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
2. Grundlagen	5
2.1. Akustische Oberflächenwellen	5
2.1.1. Ausbreitung akustischer Wellen in Festkörpern	5
2.1.2. Moden akustischer Oberflächenwellen	7
2.1.3. Erzeugung akustischer Oberflächenwellen	9
2.2. Grundlagen von Zellen	13
2.2.1. Aufbau einer Zelle	13
2.2.2. Zellzyklus und Zelltod	16
2.2.3. Zelladhäsion	17
2.2.4. Zellmigration	18
2.3. Interaktion akustischer Oberflächenwellen mit Materie	20
2.3.1. Interaktion akustischer Oberflächenwellen mit Flüssigkeiten	20
2.3.2. Interaktion akustischer Oberflächenwellen mit Objekten	23
3. Methoden und Materialien	27
3.1. SAW-Chips zur Erzeugung akustischer Oberflächenwellen	27
3.1.1. Herstellung von SAW-Chips	27
3.1.2. Eigenschaften der SAW-Chips	28
3.2. Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung	30
3.2.1. HAEC-Zelllinie	30
3.2.2. B35-Zelllinie	31
3.2.3. MDCK-II-Zelllinie	31
3.2.4. HEK-293-Zelllinien	31
3.3. <i>Particle Image Velocimetry</i> zur Charakterisierung von Strömungsfeldern	33
3.4. Methoden zur Untersuchung des Zytoskeletts von Endothelzellen	34
3.4.1. Versuchsaufbau <i>Aorta-on-a-SAW-chip</i>	34
3.4.2. Analyse von Aktinfilament- und Zellkern-Eigenschaften in Endothelzellen aus humanen Aorten	35
3.5. Methodik zur Analyse von Neuritenwachstum in akustischen Stehwellenfeldern	37
3.5.1. Versuchsaufbau zum Zell-Patterning	37
3.5.2. Analysemethodik zu SAW-gerichtetem Neuritenwachstum	38
3.6. Methodik zur Charakterisierung von Zellmechanismen im Wundheilungsmodell	40
3.6.1. Versuchsaufbau von Wundheilungsassays auf SAW-Chips	40
3.6.2. Datenanalyse mittels Deep-Learning-Algorithmus zur automatisierten Charakterisierung der Wundheilungsgeschwindigkeit	41
3.6.3. Analyse von Zytoskelett- und Zellkern-Eigenschaften	43

3.6.4. Analyse von mechanosensitiven Proteinen	45
4. Ergebnisse	47
4.1. <i>Aorta-on-a-SAW-Chip</i> : Endothelzellen in akustischen Strömungsfeldern	49
4.2. Gerichtetes Neuritenwachstum in akustischen Stehwellenfeldern	61
4.3. Stimulation von Wundheilung in dynamisch modulierten akustischen Kraftfeldern	66
4.4. Intrazelluläre Mechanismen in der SAW-stimulierten Wundheilung	79
4.4.1. Die Rolle von SPPL3-Membranproteasen bei der SAW-stimulierten Wundheilung	79
4.4.2. Einfluss der SAW-Stimulation auf die mechanosensitiven Proteine YAP, MRTF und Notch	86
4.4.3. Einfluss der SAW-Stimulation auf Eigenschaften von Aktinfilamenten und Zellkernen in der Wundheilung	90
5. Zusammenfassung und Ausblick	109
A. Ergänzende Messergebnisse	114
B. Reagenzien und Materialien	123
C. Protokolle	127
D. Abkürzungsverzeichnis	136
Literatur	138
Danksagung	164

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Übersicht zum Zellwachstum und intrazellulären Mechanismen in akustischen Kraftfeldern	3
2.1.	Propagation einer Rayleigh-Welle	7
2.2.	Propagation einer Scherwelle	8
2.3.	Slowness-Kurve am Beispiel von LiNbO_3 128° rot Y-Cut	9
2.4.	Erzeugung akustischer Oberflächenwellen	10
2.5.	Entstehung einer stehenden Welle	12
2.6.	Aufbau einer tierischen Zelle	13
2.7.	Veranschaulichung von Zellzyklus und Zelltod	16
2.8.	Prozess der Zelladhäsion	18
2.9.	Veranschaulichung der mesenchymalen Zellmigration	19
2.10.	Entstehung akustischer Strömung	22
2.11.	Anordnung von Objekten in einem akustischen Stehwellenfeld	25
3.1.	Herstellung von SAW-Chips mittels Fotolithografie	28
3.2.	Charakterisierung eines SAW-Chips	29
3.3.	Übersicht aller verwendeten Zelllinien	30
3.4.	<i>Aorta-on-a-SAW-Chip</i> -Versuchsaufbau zur Untersuchung von Zellen in akustischen Strömungsfeldern	35
3.5.	Analyseschema von Aktinfilament- und Zellkerneigenschaften in HAEC-Zellen .	36
3.6.	Versuchsaufbau und Analyseschematik zu Neuritenwachstum in akustischen Stehwellenfeldern	37
3.7.	Versuchsaufbau zu Wundheilungsassays auf SAW-Chips	40
3.8.	Analysemethodik zur Deep-Learning-gestützten Ermittlung der Stimulationseffizienz bei der SAW-stimulierten Wundheilung	42
3.9.	Analyseschematik von Aktin- und Zellkerneigenschaften bei der SAW-stimulierten Wundheilung von MDCK-II-Zellen	44
3.10.	Schematik zur Analyse von mechanosensitiven Proteinen in Wundheilungsassays	46
4.1.	Charakterisierung des Strömungsprofils und qualitative Betrachtung des Strömungseinflusses auf die Morphologie von HAEC-Zellen	51
4.2.	Ausprägung des Aktin-Zytoskeletts unter akustischen Strömungen	53
4.3.	Länge und Breite von Aktinfilamenten unter akustischer Strömung	55
4.4.	Lokale Aktinfilament- und Zellkernausrichtungen unter akustischer Strömung .	57
4.5.	Gerichtetes Neuritenwachstum in SAW-Stehwellenfeldern	63
4.6.	Zusammenfassung des zeitabhängigen gerichteten Neuritenwachstums in SAW-Stehwellenfeldern	64
4.7.	Ergebnisse der Wundheilungsstimulation unter Variation der SAW-Leistung . .	68
4.8.	Ergebnisse der Wundheilungsstimulation unter Variation der Pulsbreite	69

4.9.	Ergebnisse der absoluten Wundheilungsgeschwindigkeiten unter Leistungs- und Pulsbreitenvariation	71
4.10.	Ergebnisse der Wundheilungsstimulation der HEK-293-Zelllinien	81
4.11.	Ergebnisse der absoluten Wundheilungsgeschwindigkeiten der HEK-293-Zelllinien	83
4.12.	Antikörper-Analyse von YAP, MRTF und Notch in SAW-stimulierten Wundheilungsassays	88
4.13.	Breite von Aktinfilamenten nach 18 h in SAW-stimulierten Wundheilungsassays	92
4.14.	Orientierung von Aktinfilamenten und Zellkernen nach 18 h in SAW-stimulierten Wundheilungsassays	95
4.15.	Orts- und Zeitabhängigkeit von Zellkern- und Filamentorientierungen unter SAW-Stimulation anhand von Einzeldaten	100
4.16.	Zusammenfassung der orts- und zeitabhängigen Filament- und Zellkernorientierungen unter SAW-Stimulation	102
4.17.	Korrelationsanalyse von Zellkern- und Filamentorientierungen nach 3 h SAW-Stimulation	104
4.18.	Korrelationsanalyse von Zellkern- und Filamentorientierungen nach 18 h SAW-Stimulation	105
4.19.	Zeitabhängige Zellorientierungen im Wund-Monolayer unter SAW-Stimulation .	107
5.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	110
A.1.	Charakterisierung der Temperatur im <i>Aorta-on-a-SAW-Chip</i> -Aufbau	114
A.2.	Ergänzungen zur lokalen Zellkern- und Filamentorientierung unter akustischer Strömung	115
A.3.	Ergänzungen zum gerichteten Neuritenwachstum in SAW-Stehwellenfeldern . .	116
A.4.	Temperaturanalyse eines SAW-Chips bei 21 dBm und 10 % Tastgrad	117
A.5.	Charakterisierung der akustischen Strömung auf einem SAW-Chip	117
A.6.	Charakterisierung des Einflusses verschiedener Zellkulturmedien auf die Stimulierbarkeit von HEK-293-Zellen	118
A.7.	Ergänzungen zur Analyse der YAP-Antikörper-Intensitäten	118
A.8.	Zusammenfassung der Signifikanztests der Proteinanalysen	119
A.9.	Ergänzungen zu Aktin- und Zellkerneigenschaften in SAW-stimulierten Wundheilungsassays	120
A.10.	Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse der Aktin- und Zellkernorientierungen nach 18 h SAW-Stimulation	121
A.11.	Beispielbilder des Aktin-Zytoskeletts und der Filamentdetektion in SAW-stimulierter Wundheilung	121
A.12.	Zusammenfassung der Signifikanztests zur Orts- und Zeitabhängigkeit von Aktin- und Zellkernorientierungen	122
A.13.	Ergänzungen zur zeitabhängigen Zellorientierung in der SAW-stimulierten Wundheilung	122

Tabellenverzeichnis

1. Eigenschaften häufig verwendeter Substrate für SAW-Chips	9
2. Mittlere Wundheilungsgeschwindigkeiten der HEK-293-Zelllinien	84
3. Zur Normierung der Aktinfilament- und Zellkerneigenschaften von HAEC-Zellen verwendete Daten	114
4. Zusammenfassung der Signifikanztests zum SAW-gerichteten Neuritenwachstum . .	116

1. Einführung

Menschen sind im Alltag vielen verschiedenen akustischen Reizen ausgesetzt, wie zum Beispiel Straßenlärm, Musik, Katzenschnurren, menschlichen Stimmen oder Warngeräuschen. Akustische Wellen können jedoch nicht nur im hörbaren sondern auch außerhalb des hörbaren Frequenzbereichs Auswirkungen auf den menschlichen Körper haben. Wie im Folgenden dargestellt wird, werden besonders im Bereich der regenerativen Medizin positive Effekte akustischer Kraftfelder mit Frequenzen im kHz- bis MHz-Bereich genutzt und gezielt zur Stimulation von Gewebe eingesetzt.

In den letzten Jahrzehnten hat die Bedeutung von akustischen Wellen zur Stimulation der Geweberegeneration erheblich zugenommen. Chronische Wunden ausgelöst durch Funktionsstörungen wie Diabetes, Ischämie oder reduzierte Wachstumsfaktoren stellen weltweit eine der Hauptursachen für längere Krankenhausaufenthalte und eine große Belastung für Gesundheitssysteme und Patienten dar [3–6]. Dysfunktionale oder langsame Heilungsprozesse erhöhen nach chirurgischen Eingriffen darüber hinaus die Wahrscheinlichkeit für postoperative Komplikationen wie Entzündungen und die allgemeine Anfälligkeit der Patienten für Erkrankungen [7–9]. Etablierte Methoden zur Förderung von Geweberegeneration sind unter anderem die Ultraschalltherapie und die extrakorporale Stoßwellentherapie [10–12]. Therapeutischer Ultraschall mit gepulsten Signalen und niedrigen Intensitäten in einer Größenordnung von bis zu 100 mW/cm^2 kann beispielsweise Regenerationsprozesse bei der Heilung von Knochenbrüchen und Wunden positiv beeinflussen [10, 13–17]. Die Komplexität von Geweberegenerationsprozessen *in vivo* erfordert jedoch eine vertiefte Grundlagenforschung, um die Entwicklung neuer, kostengünstiger Technologien voranzutreiben [3, 18]. Insbesondere ist zur Entwicklung standardisierter und dennoch an den Patienten anpassbarer Behandlungsmethoden ein detailliertes Hintergrundwissen über den Mechanismus, über den die Stimulation auf das Gewebe wirkt, erforderlich [3, 17].

Wachstumsprozesse von Zellen, besonders die Migration und Proliferation, sind ein wesentlicher Bestandteil der Geweberegeneration *in vivo* [8]. In der Grundlagenforschung werden häufig Standardmodelle zur *in vitro*-Untersuchung dieser Prozesse und ihrer Stimulierbarkeit in kontrollierbaren Umgebungen herangezogen, wie zum Beispiel Wundheilungsassays, die eine Analyse des Wachstumsverhaltens von Zellmonolagen ermöglichen [19]. In den letzten Jahren wurde eine neue Plattform zur Stimulation von Wundheilungsassays entwickelt, bei der akustische Oberflächenwellen (*surface acoustic waves*, SAW) zur Beschleunigung von Zellwachstum auf piezoelektrischen Substraten, den sogenannten *SAW-Chips*, eingesetzt werden [1, 20, 21]. In diesem Aufbau konnten durch Stimulation mit fortlaufenden akustischen Oberflächenwellen bereits mehr als zweifach erhöhte Wundheilungsgeschwindigkeiten erreicht und eine beschleunigte Zellmigration als der dabei hauptsächlich stimulierte Prozess identifiziert werden.

ziert werden [1]. Auch akustische Stehwellenfelder können das Zellwachstum auf SAW-Chips beeinflussen, indem sie zu einer gerichteten Ausdifferenzierung neuronaler Fortsätze führen [22]. In der Grundlagenforschung werden akustische Oberflächenwellen darüber hinaus als sogenannte *akustische Pinzetten* zur Manipulation von Zellen [22–25], zur Zellsortierung [26, 27] und als Sensoren [28–30] eingesetzt, was ihr vielfältiges Anwendungsspektrum über den physikalischen Bereich hinaus zeigt. Die SAW-Technologie hat somit das Potential, sich zu einer standardisierten, flexibel einsetzbaren und kosteneffizienten Methode zur Verbesserung von Geweberegenerationsprozessen in den Biowissenschaften zu entwickeln.

Das Verhalten von Zellwachstum in statischen und dynamisch modulierten Kraftfeldern, die durch akustische Oberflächenwellen erzeugt werden, bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Bisher wurden nur wenige Parametervariationen akustischer Kraftfelder und deren Auswirkungen auf die Stimulierbarkeit der Wundheilung *in vitro* erforscht. Besonders Variationen des die Wellen erzeugenden Signals wie dessen Amplitude in Kombination mit einer zeitlich gepulsten Applikation wären vor dem Hintergrund der erfolgreichen Anwendung gepulster Signale in der Ultraschalltherapie ein vielversprechender Ansatz zur Erhöhung der Stimulationswirksamkeit im Vergleich zu Vorarbeiten [1]. Neben direkten mechanischen Einflüssen durch die Vibration des Substrats können akustische Wellen in Flüssigkeiten auch Strömungen und somit indirekt auf Zellen wirkende Kraftfelder erzeugen. Solche akustisch generierten Strömungen bilden die Basis der Akustofluidik [31]. Der Einfluss von akustischen Strömungsfeldern auf Zellen und ihre intrazelluläre Struktur könnte somit spannende Einblicke in indirekte Auswirkungen akustischer Kraftfelder auf zelluläre Mechanismen geben.

Aktuelle Erkenntnisse zur Sonomechanobiologie von Zellen zeigen mögliche globale Mechano-transduktionswege auf, die an der Reaktion der Zellen auf akustische Wellen beteiligt sein können, wie beispielsweise die Öffnung von Ionenkanälen durch Abberationen der Zellmembran und eine erhöhte Aufnahme von extrazellulärem Kalzium [32]. Bisher wurde jedoch kein Fokus auf zugrundeliegende intrazelluläre Mechanismen der SAW-stimulierten Wundheilung gelegt. Untersuchungen von Mechanismen, die bekanntermaßen in den Prozess der Zellmigration involviert sind, wie zum Beispiel das Zytoskelett, könnten entscheidende Hinweise auf intrazelluläre Reaktionen liefern [33]. Die weitere Erforschung des Phänomens des akustisch stimulierten Zellwachstums und der dabei auftretenden intrazellulären Veränderungen könnten die Lücken im aktuellen Forschungsstand auf diesem Gebiet schließen sowie mögliche zukünftige Angriffspunkte und damit neue therapeutische Ansätze zur Stimulation der Geweberegeneration aufzeigen.

In der heutigen Zeit gewinnt die interdisziplinäre Forschung zunehmend an Bedeutung, um komplexe Herausforderungen bewältigen zu können. Die hier vorliegende Arbeit basiert daher auf stark interdisziplinären Forschungsansätzen am Schnittpunkt zwischen Physik, Biologie, Chemie und Medizin. Das Ziel der Arbeit ist es, das Phänomen des durch dynamisch modulierbare akustische Kraftfelder stimulierten Zellwachstums weiter aufzuklären sowie dessen

zugrundeliegenden intrazellulären Mechanismen zu identifizieren. Dabei sollen die folgenden Forschungsfragen beantwortet werden:

- 1) Wie wirken sich durch akustische Strömung erzeugte dynamische Kraftfelder auf die Struktur von Endothelzellen aus?
- 2) Wie beeinflussen statische und dynamisch modulierte akustische Kraftfelder das Wachstumsverhalten verschiedener Zelllinien insbesondere im Wundheilungsmodell?
- 3) Was sind zugrundeliegende intrazelluläre Mechanismen des Phänomens der durch akustische Kraftfelder stimulierten Wundheilung?

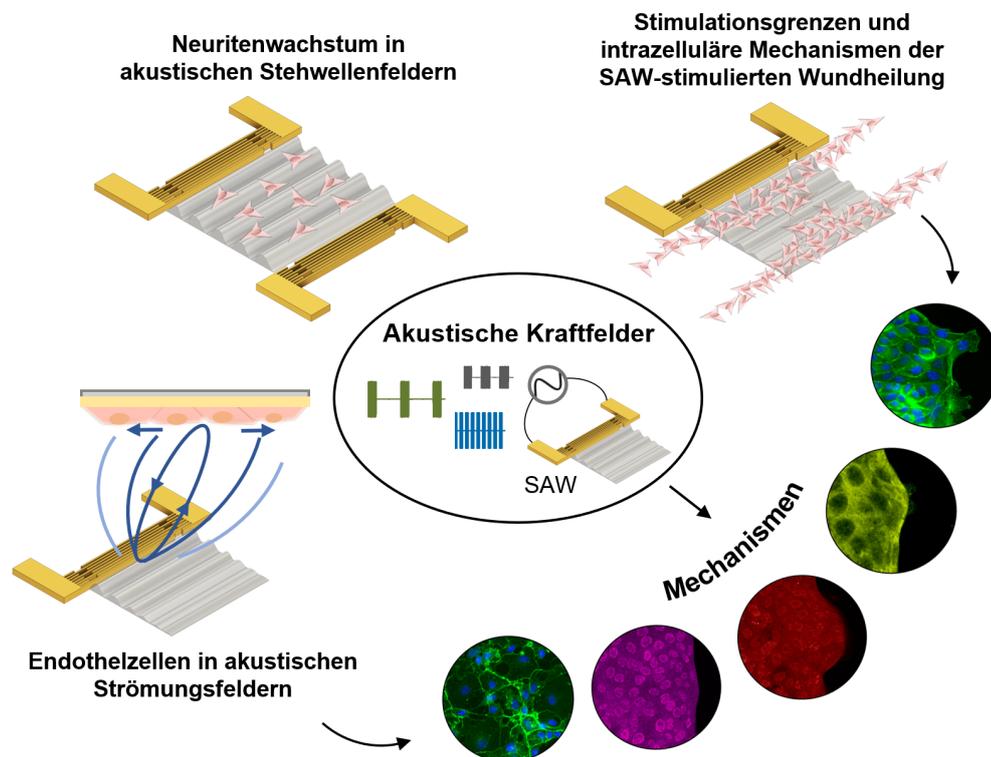


Abbildung 1.1: Übersicht der vielfältigen Möglichkeiten zur Beeinflussung von Zellwachstum mit dynamisch modulierbaren akustischen Kraftfeldern. Weitere Einblicke in das Phänomen der Zellstimulation, insbesondere in das Verhalten von Membranproteasen, mechanosensitiven Proteinen oder das Zytoskelett, ermöglichen eine Identifikation der zugrundeliegenden intrazellulären Mechanismen.

Im Rahmen der Ermittlung intrazellulärer Mechanismen wird insbesondere die Rolle von Membranproteasen, mechanosensitiven Proteinen und des Zytoskeletts für das Phänomen des akustisch stimulierten Zellwachstums untersucht. Eine Übersicht mit Einblicken in die hierzu durchgeführten Kernstudien ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchungen sollen ein vertieftes Verständnis zellulärer Reaktionen auf akustische Kraftfelder durch Ergänzung des oben aufgeführten Forschungsstands schaffen und so den Weg zur Weiterentwicklung der SAW-Technologie für medizinische Anwendungen ebnen.

2. Grundlagen

Um eine theoretische Grundlage für die später dargestellten experimentellen Untersuchungen zu schaffen, werden in diesem Kapitel zunächst Hintergründe der zur Erzeugung der akustischen Kraftfelder verwendeten Technologie der akustischen Oberflächenwellen sowie der Zellbiologie aufgeführt.

2.1. Akustische Oberflächenwellen

Das mathematische Prinzip der Ausbreitung akustischer Wellen auf der Oberfläche von elastischen Festkörpern wurde 1885 erstmals von John William Strutt (3. Baron zu Rayleigh) beschrieben [34]. In den 1970er Jahren wurden akustische Oberflächenwellen durch die Entwicklung der interdigitalen Schallwandler (engl. *interdigital transducers*, IDTs) zur Anwendung in elektronischen Bauteilen etabliert. Das Funktionsprinzip basiert dabei auf dem inversen piezoelektrischen Effekt, bei dem eine gepulste elektrische Spannung am IDT in mechanische Schwingungen mit einer bestimmten Frequenz umgewandelt wird und gegebenenfalls von einem weiteren IDT detektiert werden kann [35]. Die Schwingungen setzen sich entlang der Oberfläche des sogenannten SAW-Chips mit einer bestimmten Ausbreitungsgeschwindigkeit fort. Durch Variation von Materialien und Chip-Geometrie können verschiedene Wellenmoden generiert und viele Anwendungen ermöglicht werden. Heute werden akustische Oberflächenwellen in der Industrie hauptsächlich als Filter und Resonatoren eingesetzt. Durch ihr breites Anwendungsspektrum kommen sie aber auch in der Forschung zum Einsatz, beispielsweise als Sensoren oder Manipulatoren in der Mikrofluidik, und können sogar das Wachstum von lebenden Zellen beeinflussen. Um eine theoretische Basis für solche Anwendungen zu schaffen, werden im Folgenden zunächst die Grundlagen zur Ausbreitung, Erzeugung und verschiedener Moden akustischer Oberflächenwellen beschrieben. Für weiterführende Informationen sei auf grundlegende Literatur zu diesem Thema verwiesen [36–40].

2.1.1. Ausbreitung akustischer Wellen in Festkörpern

Um die Ausbreitung akustischer Wellen in Festkörpern zu beschreiben, werden im Folgenden Begriffe und Relationen aus der Kontinuumsmechanik herangezogen. Die folgenden Gleichungen und Beschreibungen sind an vorhergehende Arbeiten angelehnt [2, 41–44].

Der Spannungstensor \mathbf{T} und der Deformations- oder Verzerrungstensor \mathbf{S} sind Tensoren 2. Stufe, die Spannungen beziehungsweise Änderungen der Auslenkung von Volumenelementen dV mit Koordinaten x_i in einem Festkörper beschreiben. Die Newton'sche Bewegungsgleichung $\vec{F} = m\vec{a}$ in einem solchen homogenen Festkörper lässt sich dann schreiben als [45] (S. 16):

$$\sum_{j=1}^3 \frac{\partial T_{ij}}{\partial x_j} = \rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2}, \quad (2.1)$$

wobei T_{ij} symmetrisch ist und seine Nicht-Diagonalelemente ($i \neq j$) die Scherspannung beschreiben, während die Diagonaleinträge ($i = j$) der Druck- bzw. Zugspannung entlang der Koordinatenachsen entsprechen. Der symmetrische Anteil des Tensors \mathbf{S} kann durch die Änderung der Auslenkungen $u_{k,l}$ der Massenelemente entlang der Raumrichtungen k, l beschrieben werden:

$$S_{kl} = \frac{1}{2} \left(\frac{\partial u_l}{\partial x_k} + \frac{\partial u_k}{\partial x_l} \right) \quad (2.2)$$

Der nach dem Hooke'schen Gesetz lineare Zusammenhang zwischen der Deformation der Volumenelemente in Gleichung (2.2) und der Spannung T_{ij} ist durch einen Tensor 4. Stufe c_{ijkl} gegeben:

$$T_{ij} = c_{ijkl} S_{kl}. \quad (2.3)$$

Unter Verwendung von (2.2) und unter Berücksichtigung der Symmetrien von T_{ij} und S_{kl} liefert das Einsetzen von (2.3) in (2.1) zunächst die Bewegungsgleichung für die Wellenausbreitung in einem nicht-piezoelektrischen Festkörper [46] (S. 134):

$$\rho \frac{\partial^2 u_i}{\partial t^2} = \sum_{j,k,l=1}^3 c_{ijkl} \frac{\partial^2 u_k}{\partial x_j \partial x_l} \quad (2.4)$$

Für einen piezoelektrischen Festkörper müssen das Hooke'sche Gesetz (2.3) und damit auch die Bewegungsgleichungen erweitert werden. Die Ladungstrennung durch Deformation eines Körpers führt aufgrund des piezoelektrischen Effekts zu einer geringeren mechanischen Spannung. Um dies zu beschreiben, werden ein zusätzliches elektrisches Feld \mathbf{E} sowie der piezoelektrische und dielektrische Tensor p_{kij} und ϵ_{ij} eingeführt:

$$T_{ij} = c_{ijkl} S_{kl} - p_{kij} E_k \quad (2.5)$$

$$D_i = \epsilon_{ij} E_j + p_{ijk} S_{jk}, \quad (2.6)$$

wobei \mathbf{D} das durch die Ladungsverschiebung auftretende dielektrische Verschiebungsfeld der permanenten Dipolmomente beschreibt. E_j ist die elektrische Feldstärke, die sich aus dem elektrischen Potential Φ ergibt: $\mathbf{E} = -\vec{\nabla}\Phi$. Setzt man die Ausdrücke (2.5) und (2.6) wiederum in das Newton'sche Gesetz (2.1) ein, so ergibt sich ein gekoppeltes Differentialgleichungssystem aus drei Gleichungen für die Auslenkungen u_j in piezoelektrischen Festkörpern:

$$\rho \frac{\partial^2 u_j}{\partial t^2} - c_{ijkl} \frac{\partial^2 u_k}{\partial x_i \partial x_l} - p_{kij} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x_k \partial x_i} = 0. \quad (2.7)$$

Unter der Voraussetzung, dass keine freien Ladungen im Material vorhanden sind (Quellenfreiheit der Maxwell-Relation $\vec{\nabla} \cdot \mathbf{D} = 0$), erhält man eine vierte Gleichung für das Potential Φ :

$$p_{ikl} \frac{\partial^2 u_k}{\partial x_i \partial x_l} - \epsilon_{ik} \frac{\partial^2 \Phi}{\partial x_i \partial x_k} = 0. \quad (2.8)$$

Bei der Betrachtung eines Festkörpers ohne Grenzflächen sind die Lösungen dieser Differentialgleichungen akustische Volumenwellen (BAW, engl. *bulk acoustic waves*). Akustische Oberflächenwellen ergeben sich als Lösung, sobald eine Grenzfläche zum Vakuum auftritt und entsprechende Randbedingungen berücksichtigt werden. In der Richtung einer Grenzfläche, zum Beispiel $x_3 = 0$, verschwinden dann die entsprechenden Einträge von T_{ij} :

$$T_{31} = T_{32} = T_{33} = 0, \quad x_3 = 0. \quad (2.9)$$

Aus (2.7) und (2.8) ergeben sich Lösungen für Wellen, die parallel zu dieser Grenzfläche mit einer bestimmten Phasengeschwindigkeit v_{SAW} propagieren. Das Potential und die Auslenkung der akustischen Oberflächenwellen klingt im Material dabei innerhalb weniger Wellenlängen ab, sodass ihre Energie hauptsächlich auf die Oberfläche beschränkt ist.

2.1.2. Moden akustischer Oberflächenwellen

Welche Wellenmoden in einem anisotropen Festkörper auftreten, ist stark abhängig von seinem Material und den resultierenden spezifischen Randbedingungen. Bei akustischen Oberflächenwellen wird zwischen Rayleigh- und SH-Moden (auch Scherwellen, engl. *shear horizontal*) unterschieden, wobei es in der Anwendung häufig zu einer Überlagerung beider Wellentypen kommt [47]. Die Erzeugung reiner Moden kann durch die Wahl von Kristallschnitt und Ausbreitungsrichtung \vec{b} der Welle erreicht werden, wie unter 2.1.3 beschrieben wird. Im Folgenden soll zunächst näher auf die Eigenschaften der beiden Wellenmoden eingegangen werden.

Rayleigh-Wellen

Die Rayleigh-Wellen sind nach ihrem Entdecker Lord Rayleigh benannt und oszillieren in der Sagittalebene des piezoelektrischen Kristalls. Sie besitzen somit einen longitudinalen und transversalen Anteil, sodass sich die Oberflächenelemente des Materials elliptisch und retrograd bewegen (vgl. Abbildung 2.1).

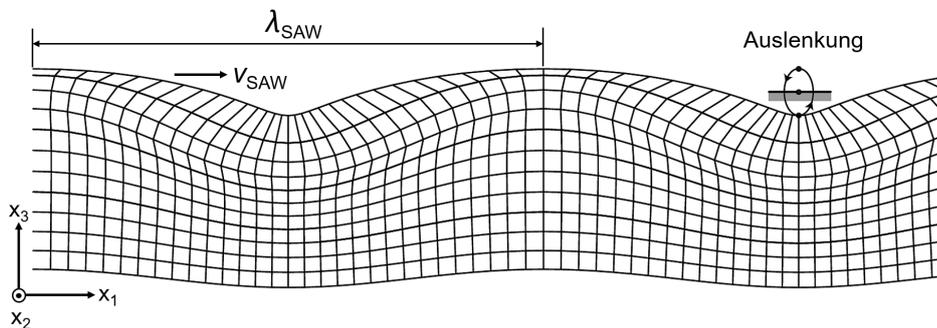


Abbildung 2.1: Veranschaulichung einer Rayleigh-Welle, die in x_1 -Richtung propagiert und das Gitter in der Sagittalebene verzerrt. Der elliptische, retrograde Verlauf eines Gitterpunkts wird hier ebenfalls sichtbar (modifiziert aus: [41]).

Die Bedingungen für eine reine Rayleigh-Mode sind, dass keine Kraft senkrecht zur Kristalloberfläche wirkt und ein Kurzschluss bzw. eine freie Ausbreitung des elektrischen Feldes gegeben ist [48]. Das elektrische Potential Φ , das mit der Welle einhergeht, besitzt dann die Form:

$$\Phi = \Phi_0 e^{k b x_3} e^{i k (x_1 - v_{\text{SAW}} t)}, \quad (2.10)$$

wobei b eine komplexe Zahl mit $\text{Re}(b) > 0$ und $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ die Wellenzahl ist. Das elektrische Feld \mathbf{E} liegt bei einer Wellenlänge zwischen $\lambda = 10 - 100 \mu\text{m}$ und Auslenkungen der Oberfläche im Nanometerbereich typischerweise in Größenordnungen von 10^6 bis $10^7 \frac{\text{V}}{\text{m}}$. In dieser Arbeit werden hauptsächlich reine Rayleigh-Moden verwendet; dennoch soll im Folgenden auch kurz auf die Eigenschaften von SH- bzw. Scherwellen eingegangen werden.

SH-Wellen

Scherwellen besitzen im Gegensatz zu Rayleigh-Wellen keine longitudinale Komponente und sind somit rein transversale Moden, wie in Abbildung 2.2 veranschaulicht ist. Sie sind senkrecht zu ihrer Ausbreitungsrichtung polarisiert und sind im Allgemeinen Volumenwellen. Eine Unterart der SH-Mode sind Love-Wellen, bei denen die akustische Energie an die Kristalloberfläche gebunden ist. Sie weisen einen exponentiellen Abfall des elektrischen Feldes in den Kristall hinein auf [43, 49].

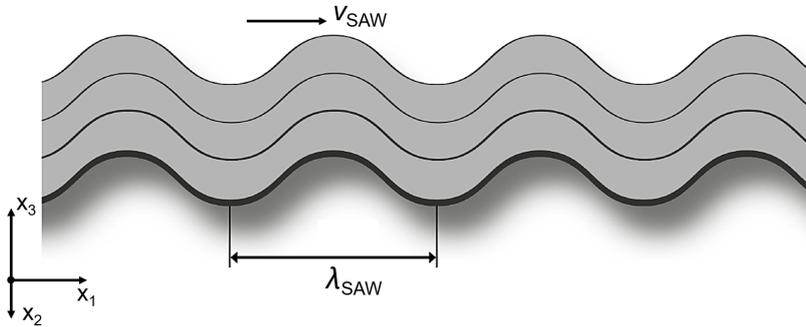


Abbildung 2.2: Darstellung einer Scherwelle, die in der x_1 - x_2 -Ebene in x_1 -Richtung propagiert. Die Auslenkung der Volumenelemente ist in x_2 -Richtung (modifiziert aus: [2]).

Die Phasengeschwindigkeiten v_{SAW} von akustischen Oberflächenwellen sind abhängig vom Winkel zwischen der Hauptausbreitungsrichtung X eines Kristalls und der Propagationsrichtung \vec{b} der Welle [50]. Sie erreicht ein Maximum, wenn \vec{b} entlang der Hauptausbreitungsrichtung X des Kristalls liegt [51]. Allerdings ist die Richtung des Energieflusses \vec{W} nicht automatisch parallel zu der durch den IDT vorgegebenen Richtung \vec{b} . Es kann nur bei einem Winkel (engl. *Power Flow Angle*) von $\Psi = 0$ zwischen \vec{W} und \vec{b} eine reine Oberflächenwellenmode erzeugt werden. In Abbildung 2.3 ist dies anhand einer sogenannten Slowness-Kurve veranschaulicht, in der die Inverse der Phasengeschwindigkeit $\frac{1}{v_{\text{SAW}}}$ in einem Polardiagramm mit \vec{W} und \vec{b} aufgetragen wird. Der Winkel Ψ befindet sich gemäß Abbildung 2.3 zwischen

der Ausbreitungsrichtung und der Normalen auf der Kurve. In dem hier dargestellten Kristall LiNbO_3 mit dem Schnitt 128° rot Y-Cut werden beispielsweise nur für die markierten Stellen (entlang der Hauptausbreitungsrichtung X , senkrecht zu X und für $\theta \approx 52^\circ$) reine Rayleigh-Moden erzeugt. In allen anderen Richtungen kommt es zur Überlagerung verschiedener Oberflächenwellenmoden [47].

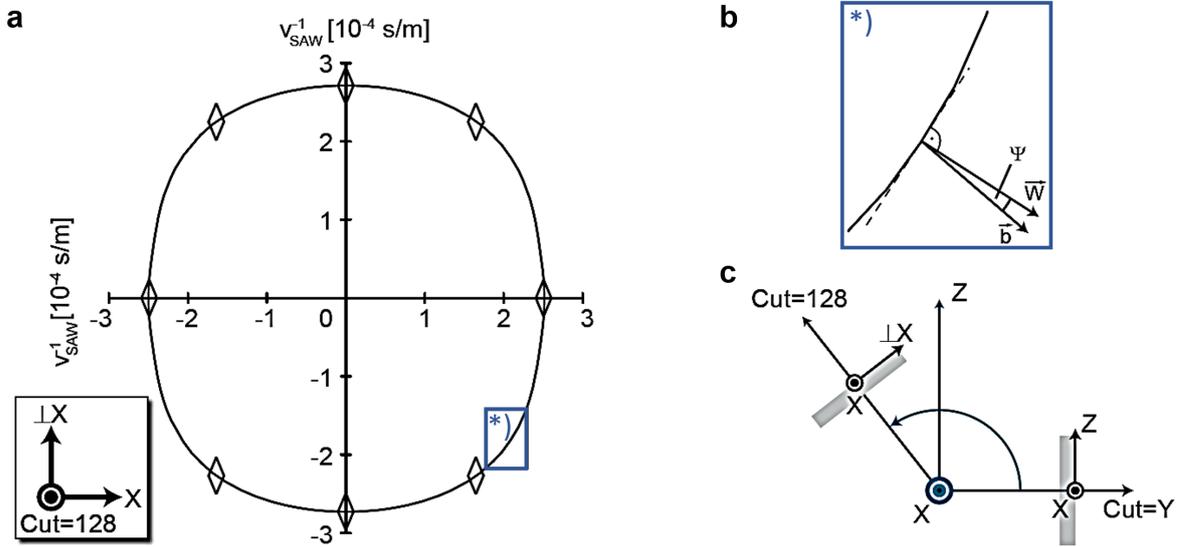


Abbildung 2.3: a) Slowness-Kurve am Beispiel von LiNbO_3 128° rot Y-Cut mit durch Rauten markierten Richtungen, in denen reine Moden angeregt werden können (X , $\perp X$ und bei $\theta \approx 52^\circ$), b) vergrößerter Ausschnitt der Kurve zur Darstellung des Winkels Ψ zwischen den Vektoren \vec{b} und \vec{W} , c) Veranschaulichung der Kristallschnittachse (modifiziert aus: [41]).

In Tabelle 1 sind ausgewählte Schnitte häufig verwendeter Kristalle, hierauf erzeugter Oberflächenwellenmoden und deren Phasengeschwindigkeiten zusammengefasst. In dieser Arbeit wird hauptsächlich das Substrat LiNbO_3 128° rot Y-Cut mit Ausbreitungsrichtung X verwendet, auf dem reine Rayleighmoden erzeugt werden.

Kristall	LiNbO_3	LiTaO_3	LiNbO_3
Kristallschnitt	128° rot Y-Cut	36° rot X-Y-Cut	128° rot Y-Cut
\vec{b}	X	X	45°
Mode	Rayleigh	SH	Rayleigh/SH
v_{SAW} [m/s]	3989	4150	3547

Tabelle 1: Eigenschaften häufig verwendeter Substrate mit ausgewählten Kristallschnitten bzw. Ausbreitungsrichtungen und darauf erzeugten Wellenmoden. (entnommen aus: [2, 41, 43, 51, 52]).

2.1.3. Erzeugung akustischer Oberflächenwellen

Das Prinzip der Wellenerzeugung basiert auf dem inversen piezoelektrischen Effekt, bei dem durch Anlegen einer Spannung bzw. eines elektrischen Feldes am piezoelektrischen Kristall

und der sich dadurch ausbildenden Dipole eine Verzerrung der Gitterstruktur hervorgerufen wird. Die akustischen Oberflächenwellen wurden in dieser Arbeit mittels interdigitalen Schallwandlern (IDTs) erzeugt. Für weiterführende Literatur hierzu sei auf die Arbeiten [35, 45, 50, 53, 54] verwiesen, auf denen die hier aufgeführten Beschreibungen basieren.

Interdigitale Schallwandler

Durch Anlegen einer Wechselspannung mit einer Frequenz f_{res} am IDT kommt es zu alternierenden Gitterverzerrungen, die sich vom Ort der Deformation x_0 als Oberflächenwelle mit einer materialspezifischen Schallgeschwindigkeit v_{SAW} ausbreiten. Die ineinandergreifenden, fingerartigen Elektroden des IDT, die in Abbildung 2.4a gezeigt sind, führen zur Verstärkung der Oberflächenwelle. Die Breite der symmetriebedingt auf beiden Seiten des IDT entstehenden Wellenfront W wird durch die Länge der Fingerelektroden, der sogenannten Apertur, festgelegt, wie in Abbildung 2.4a gezeigt ist. Der periodische Abstand p bestimmt dabei die Wellenlänge λ_{SAW} und damit auch die Resonanzfrequenz f_{res} , die zur Erzeugung der Oberflächenwelle am IDT anzulegen ist. Die Elektroden müssen sich somit auf den Positionen $x_n = x_0 + n\lambda_{\text{SAW}}$ befinden. Es gilt mit der Periodendauer $T_{\text{SAW}} = \frac{1}{f_{\text{res}}}$ der Zusammenhang:

$$\lambda_{\text{SAW}} = \frac{v_{\text{SAW}}}{f_{\text{res}}} \quad (2.11)$$

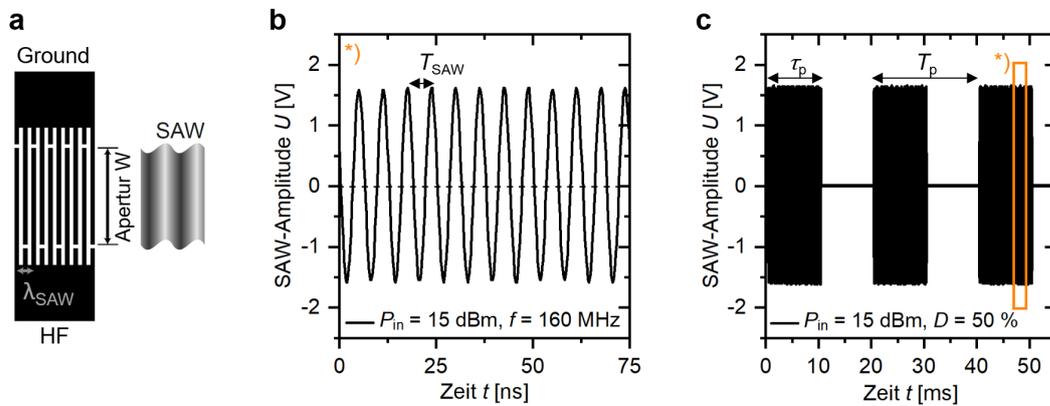


Abbildung 2.4: Erzeugung von akustischen Oberflächenwellen: a) Aufbau eines IDT mit Apertur W und doppeltem Fingerabstand $2p = \lambda_{\text{SAW}}$ (modifiziert aus: [41]), b) beispielhafte Oszilloskop-Aufnahme eines am IDT angelegten Hochfrequenzsignals bei $f = 160 \text{ MHz}$ und einer Leistung $P_{\text{in}} = 15 \text{ dBm}$ zur Veranschaulichung der SAW-Periode (modifiziert aus: [21]), c) Oszilloskopaufnahme eines gepulsten SAW-Signals mit Tastgrad $D = 50 \%$ (vgl. Gleichung 2.12) und $P_{\text{in}} = 15 \text{ dBm}$ zur Veranschaulichung der Pulsperiode T_p und Pulsdauer τ_p (modifiziert aus: [21]).

Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 2.4b graphisch für einen Standard-IDT auf LiNbO_3 128° rot Y-Cut mit einer Resonanzfrequenz von $f_{\text{res}} \approx 160 \text{ MHz}$ ($T_{\text{SAW}} \approx 6,25 \text{ ns}$) bzw. einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{SAW}} \approx 25 \mu\text{m}$ veranschaulicht, welcher in der hier vorliegenden Arbeit hauptsächlich verwendet wurde. Neben dem hier gezeigten Standard-IDT (SIDT) gibt es

abhängig vom Verwendungs- oder Forschungszweck noch weitere IDT-Strukturen, wie zum Beispiel *Chirped* oder *Tapered* IDTs (CIDT, TIDT), auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden soll.

Grundlegende Größen bei der SAW-Erzeugung

Akustische Oberflächenwellen können auch unter Einstellung einer Pulsmodulation erzeugt werden. Dabei wird ein zusätzliches Rechtecksignal mit einer bestimmten Pulsdauer τ_p über das in Abbildung 2.4b gezeigte periodische Anregungssignal gelegt. Eine Darstellung des resultierenden Signalverlaufs ist am Beispiel eines Rechtecksignals mit $T_p = 20 \text{ ms} \gg T_{\text{SAW}}$ in Abbildung 2.4c gezeigt. Das Verhältnis der Pulsdauer τ_p zur Pulsperiode T_p wird als Tastgrad D bezeichnet:

$$D = 100 \% \frac{\tau_p}{T_p} \quad (2.12)$$

Die Leistung P_{in} des an den IDT angelegten Signals wird in der logarithmischen Einheit [dBm] angegeben und ist definiert als:

$$P_{\text{in}}[\text{dBm}] = 10 \log_{10} \left(\frac{P_{\text{in}}[\text{W}]}{1 \text{ mW}} \right) \quad (2.13)$$

Im Bereich der SAW-Sensorik werden ein Sende- und ein Empfangs-IDT in einer sogenannten Verzögerungsleitung angeordnet, sodass hier beispielweise auch die Transmission T eines IDT eine tragende Rolle spielt:

$$T[\text{dB}] = 10 \log_{10} \left(\frac{P_2[\text{W}]}{P_1[\text{W}]} \right). \quad (2.14)$$

Hier ist P_2 die transmittierte Leistung und P_1 die Eingangsleistung. Die Anzahl N der Fingerelektroden, die zu einer möglichst effizienten SAW-Erzeugung notwendig sind, richten sich nach der Impedanzanpassung des IDT sowie nach dem Material des Substrats: Für starke Piezoelektrika wie LiNbO_3 sind $N = 40\text{-}50$ Fingerpaare ausreichend [41], wobei N auch die Kapazität des IDT $C_{\text{ges}} = C_0 N W$ mitbestimmt. W ist hierbei die Breite der Apertur und C_0 die Kapazität eines Elektrodenpaars pro Längeneinheit. Hieraus lässt sich dann näherungsweise die Impedanz Z eines Standard-IDTs berechnen:

$$Z = \frac{1}{8K_{\text{eff}}^2 f_{\text{res}} N C_{\text{ges}}} \quad (2.15)$$

K_{eff} bezeichnet dabei den elektromechanischen Kopplungskoeffizienten, der von der SAW-Phasengeschwindigkeit v_{SAW} auf dem Material abhängt. Für weiterführende Literatur zur in Gleichung (2.15) verwendeten Berechnung der Impedanz durch Querfeldnäherung und zur Berechnung des Kopplungskoeffizienten K_{eff} sei auf die Arbeiten [55, 56] verwiesen.

Die in dieser Arbeit verwendeten HF-Komponenten haben eine standardisierte Impedanz von $Z = 50 \Omega$. Eine Impedanzanpassung des IDT ist bei Hochfrequenzsignalen somit notwendig,

um Reflexionen an den Übergängen der verwendeten Bauteile aufgrund von unterschiedlichen komplexen Widerständen zu vermeiden.

Überlagerung akustischer Oberflächenwellen

Wird an zwei gegenüberliegenden IDTs jeweils ein HF-Signal angelegt, kommt es zu einer Überlagerung beider Oberflächenwellen. Bei gleicher Frequenz können so akustische Stehwellenfelder mit ortsfesten Knotenpunkten und Bäuchen erzeugt werden [57]. Bei gleicher Amplitude A von zwei in x -Richtung gegenläufigen Wellen mit Gangunterschied Δs und daraus resultierender Phasenverschiebung $\delta = \frac{2\pi\Delta s}{\lambda}$ lässt sich die Interferenz durch Addition berechnen:

$$\begin{aligned}\Phi_1(t, x) &= A \sin(\omega t - kx), & \Phi_2(t, x) &= A \sin(\omega t - kx + \delta) \\ \Phi_{12}(t, x) &= y_1 + y_2 = 2A \sin\left(\omega t + \frac{\delta}{2}\right) \cos\left(kx - \frac{\delta}{2}\right).\end{aligned}\tag{2.16}$$

Hierbei ist $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ die Wellenzahl und es wurde das Additionstheorem $\sin(a) + \sin(b) = 2 \sin\left(\frac{a+b}{2}\right) \cos\left(\frac{a-b}{2}\right)$ verwendet. Die so entstehenden Bäuche von Φ_{12} weisen maximale Amplituden auf, während es in den Knotenpunkten zu einer Auslöschung der Welle kommt. In Abbildung 2.5 ist das Prinzip der Stehwellenbildung veranschaulicht.

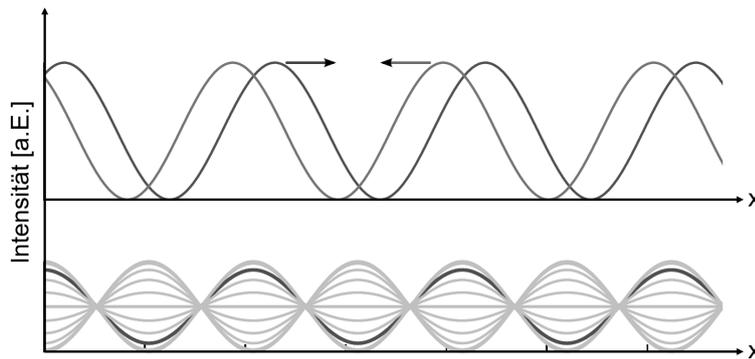


Abbildung 2.5: Bildung einer stehenden Welle durch Überlagerung von zwei gegenläufigen Wellen. Oben: beide Wellen zum Zeitpunkt t_1 , unten: resultierende stehende Welle zum Zeitpunkt t_1 (dunkler Verlauf) sowie zu verschiedenen Zeitpunkten t (heller Verlauf), modifiziert aus: [42].

Durch Anlegen eines HF-Signals an zwei weitere IDTs, die dadurch eine zusätzliche stehende Welle in y -Richtung generieren, können auch zweidimensionale Stehwellenfelder auf einem SAW-Chip erzeugt werden. Auf die Anwendungsmöglichkeiten und Charakteristika solcher ein- oder zweidimensionaler Potentiallandschaften, beispielsweise zur Manipulation von Objekten wie lebenden Zellen, soll unter Abschnitt 2.3.2 näher eingegangen werden. Im Folgenden werden zunächst einige Grundlagen von Zellen beschrieben.

2.2. Grundlagen von Zellen

Die folgenden Kapitel beschäftigen sich mit den grundlegenden Einheiten des Lebens auf unserem Planeten: den Zellen. Alle Lebewesen sind aus Zellen aufgebaut, die eine Vielzahl komplexer Eigenschaften und Funktionen erfüllen müssen. Um das Verhalten von Zellen im Rahmen dieser Arbeit beschreiben zu können, werden im Folgenden einige zellbiologische Grundlagen erklärt.

2.2.1. Aufbau einer Zelle

Zunächst soll auf den grundlegenden Aufbau einer tierischen Zelle eingegangen werden. Hierzu werden die Hauptbestandteile der Zelle und insbesondere die Zelle umgebende äußere Membran beschrieben sowie für diese Arbeit wichtige Eigenschaften des Zytoskeletts aufgezeigt.

Hauptmerkmale einer Zelle und ihrer Zellmembran

In Abbildung 2.6 ist der Aufbau einer eukaryotischen Zelle mit ihren Hauptmerkmalen skizziert. Neben der äußeren Plasmamembran besitzen eukaryotische Zellen in ihrem Inneren weitere Membranen, die die Organellen umgeben und der Zelle ihre Kompartimentalisierung ermöglichen.

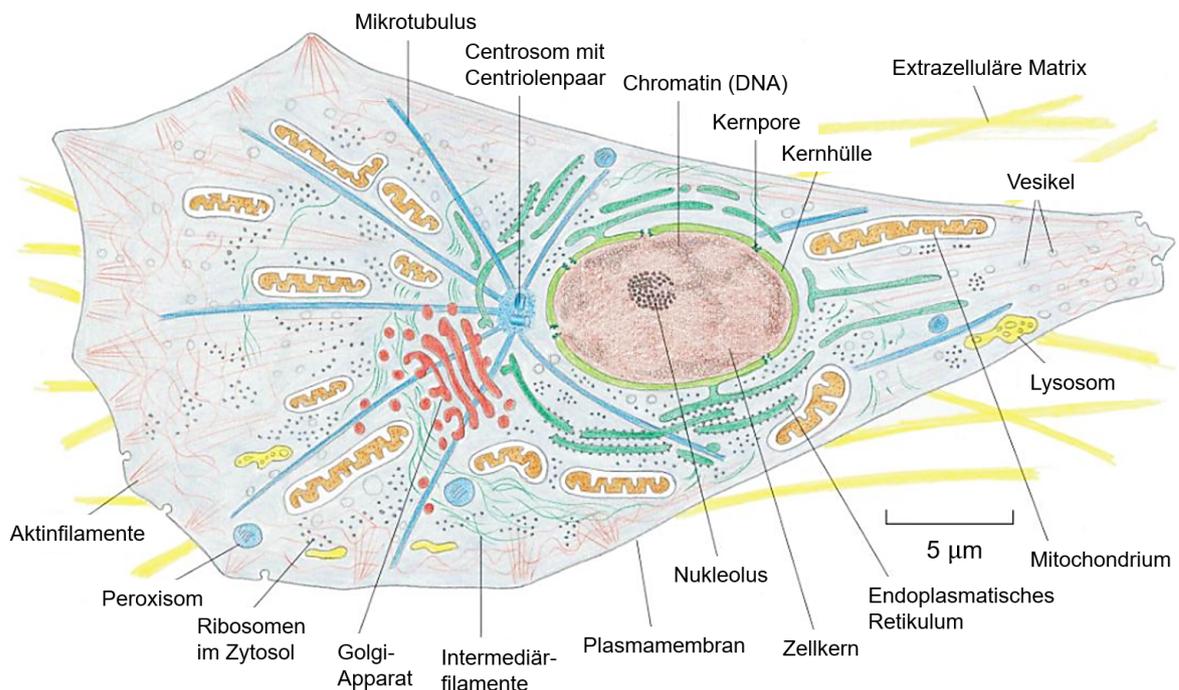


Abbildung 2.6: Aufbau einer tierischen Zelle (modifiziert aus: [58]) mit ihren Hauptmerkmalen. Unter anderem zeichnen sich eukaryotische Zellen durch ein ausgeprägtes Zytoskelett aus, das sich durch das Zytoplasma zieht, sowie durch eine Vielzahl von Membranen, die innerhalb der Zelle Kompartimente bilden. Die DNA befindet sich im Zellkern.

Einen Großteil des Zellvolumens nimmt das Zytosol ein, das maßgeblich in den Metabolismus, Transport und die Translation von Proteinen einer Zelle involviert ist [59]. Zu den Organellen im Zytoplasma gehören beispielsweise die Peroxisomen, die durch ihre Fähigkeit, langkettige Fettsäuren abzubauen zu können und zur Entgiftung der Zelle beizutragen, ebenfalls eine wichtige Rolle für den Metabolismus der Zelle spielen [60]. Die DNA befindet sich bei Eukaryotenzellen im Zellkern (*Nucleus*), der von einer Kernhülle aus einer Doppelschichtmembran umgeben ist [58]. Im Zellkern ist der Großteil der genetischen Information lokalisiert. Ein kleiner Teil der Gene ist allerdings auch in Mitochondrien zu finden, die unter anderem aus der Oxidation von Nährstoffen ATP erzeugen [58]. Im Nukleolus werden die Ribosomen hergestellt [61]. Deren Aufgabe ist es, Proteine, die aus Aminosäuren bestehen, durch Translation der mRNA in Aminosäuresequenzen zu synthetisieren [62, 63]. Das endoplasmatische Retikulum (ER) und der Golgi-Apparat sind Teile des sekretorischen Wegs, durch den unter anderem Proteine an die Zelloberfläche und in den extrazellulären Raum transportiert werden. Am ER werden darüberhinaus auch Lipide für biologische Membranen neu gebildet [59]. Der Golgi-Apparat besteht aus mehreren Stapeln, den sogenannten Zisternen, und erfüllt eine Vielzahl komplexer Funktionen wie beispielsweise das Empfangen, die Modifikation und Sortierung von solchen Proteinen und neu synthetisierten Membranen [64, 65]. Das Centrosom wiederum ist maßgeblich an der Zellteilung beteiligt [66], auf den unter Abschnitt 2.2.2 näher eingegangen wird. Lysosome sind von einer Membran umschlossene Organellen, die unter anderem Makromoleküle abbauen, die aus dem Extrazellulärraum aufgenommen werden [67]. Sie sind auch am Prozess der Autophagie beteiligt, der ebenfalls unter 2.2.2 beschrieben wird.

Die Plasmamembran, die die Zelle von außen umgibt, erfüllt neben dem Schutz der inneren Kompartimente weitere überlebenswichtige Funktionen. Zusätzlich zu Phospholipiden, Glykolipiden und Cholesterinderivaten enthält die Membran eine Vielzahl von Transmembranproteinen und Proteinen mit in der Membran verankerten Domänen [68]. Transportprozesse von Molekülen durch die Membran erfolgen hauptsächlich über Transmembrankanäle und Poren [68], daneben gibt es aber auch membranverlagernde Mechanismen wie beispielsweise Endozytose [69].

Auch bei der Bewegung von Zellen in ihrer Umgebung spielt die Plasmamembran eine große Rolle [68]. Wechselwirkungen von Membranproteinen mit der extrazellulären Matrix (EZM) und damit das Migrationsverhalten der Zelle kann beispielsweise über Protein-Glykosylierung beeinflusst werden [70]. Die Intramembranprotease SPPL3 (*signal peptide peptidase-like 3*) wiederum kann die Glykosylierungsmuster einer Zelle über Spaltung von Glykosidasen und Glykosyltransferasen regulieren [71, 72]. Die Plasmamembran verknüpft über Membranproteine wie Integrine auch die EZM mit Filamenten bzw. Proteinstrukturen im Inneren der Zelle. Die Intermediärfilamente, Mikrotubuli und insbesondere Aktinfilamente gehören dabei zum sogenannten Zytoskelett der Zelle [59, 73], auf das aufgrund der Relevanz für diese Arbeit im folgenden Abschnitt detailliert eingegangen werden soll.

Das Zytoskelett

Das Zytoskelett besteht aus einem Netzwerk von Proteinfilamenten, das sich durch das Zytoplasma von eukaryotischen Zellen streckt und maßgeblich ihre Form, mechanischen Eigenschaften und Bewegungen bestimmt [74]. Die drei Hauptbestandteile des Zytoskeletts sind Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Die Architektur dieser Polymerstrukturen wird durch verschiedene regulatorische Proteine geregelt [75, 76]. Im Folgenden werden einige Eigenschaften dieser Bestandteile erklärt:

1. **Aktinfilamente** haben einen Durchmesser von etwa $d = 5-9$ nm und werden zunächst aus G-Aktin-Monomeren (globuläres Aktin) aufgebaut [59]. G-Aktin wiederum polymerisiert in lange Filamente aus F-Aktin (filamentöses Aktin), das eine Helix aus zwei umeinander gewundenen Strängen bildet [77]. In Muskelzellen bindet und bewegt sich das filamentöse Protein Myosin unter der Hydrolyse von ATP entlang eines Aktin-Strangs und bildet so die Basis für Muskelkontraktionen. In nicht-muskulären Zellen bildet Aktin durch Wechselwirkung mit verschiedenen Bindungsproteinen Bündel und dichte Netzwerke und bestimmt so maßgeblich Form und Bewegungsverhalten einer Zelle [59, 77].
2. **Mikrotubuli** sind etwa 25 nm dicke Polymere, die aus α - und β -Tubulin-Dimeren bestehen. Diese sind in hohle Röhren mit definierter Polarität (+ oder -) aufgereiht, wobei sich das (-)-Ende im Centrosom (oder MTOC: *microtubule organizing center*) nahe des Zellkerns befindet und das (+)-Ende auf verschiedene Stimuli in der Zelle hin verlängert oder verkürzt werden kann [59]. Mikrotubuli sorgen unter anderem für mechanische Stabilität während der Zellteilung [78, 79] und dienen als Bahnen für die Bewegung von molekularen Motorproteinen [80].
3. **Intermediärfilamente** liegen mit ihrem Durchmesser von etwa $d = 10$ nm zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli und vermitteln der Zelle hauptsächlich ihre Zugkraft und Widerstandsfähigkeit unter mechanischen Belastungen. Die Klasse der Intermediärfilamente beinhaltet eine große Vielfalt von Proteinen, zum Beispiel Vimentin, Lamin und Desmin [59].

Veränderungen der Zytoskelett-Struktur wie die Ausbildung von Aktin-Stressfasern oder Spannungen im äußeren Aktin-Kortex der Zelle, ausgelöst durch z.B. äußere Stimuli, können wiederum Auswirkungen auf weitere Proteine und Signalwege haben, wie beispielsweise auf die Lokalisation der Proteine YAP (*Yes-associated protein 1*) und TAZ (*Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif*) im Zellkern [81]. Diese Proteine agieren über den Hippo-Signalweg als Regulatoren der Zellproliferation [82]. Dieses Beispiel zeigt, dass das Zytoskelett in Wechselwirkung mit vielen weiteren zellulären Mechanismen und Bestandteilen steht und welche große Rolle es beim Wachstumsverhalten eukaryotischer Zellen einnimmt.

2.2.2. Zellzyklus und Zelltod

Das Leben wird maßgeblich durch das Wachsen und Sterben von Zellen bestimmt. Zellen vermehren sich durch Zellteilung (Mitose). Bevor es jedoch zur Teilung kommt, durchlaufen sie mehrere Phasen, die schematisch in Abbildung 2.7a gezeigt sind. Das Durchlaufen dieser Proliferationsprozesse (lat. *proles*: Sprössling, *ferre*: tragen) wird als Zellzyklus bezeichnet und kann bei eukaryotischen Zellen zwischen $t = 20 - 24$ h dauern [83]. Die eigentliche Phase der Zellteilung (M-Phase) nimmt dabei nur etwa $t = 1$ h ein und lässt sich wiederum in mehrere Phasen unterteilen: die Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase [83–85]. Während dieser Schritte werden unter anderem die Chromosomen verdoppelt und auf die Tochterzellen verteilt [86, 87].

Zwischen zwei Zellteilungen werden die G_1 -, G_2 - und S-Phase sowie mehrere Kontrollpunkte (K_i in Abb. 2.7a) durchlaufen [83, 88]. In der postmitotischen G_1 -Phase vergrößert sich die Zelle und es werden Proteine und Enzyme wie Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) für die als nächstes einsetzende Synthese(S)-Phase produziert [89]. In der S-Phase findet eine Replikation der DNA statt. Wie in Abbildung 2.7a veranschaulicht, bestehen die im Zellkern lokalisierten Chromosomen nach der S-Phase aus zwei Chromatiden [83, 90]. In der post-synthetischen Phase, der G_2 -Phase, wird die Zellteilung vorbereitet, indem die Zelle unter anderem zellteilungsspezifische Proteine produziert und weiter an Größe zunimmt [90].

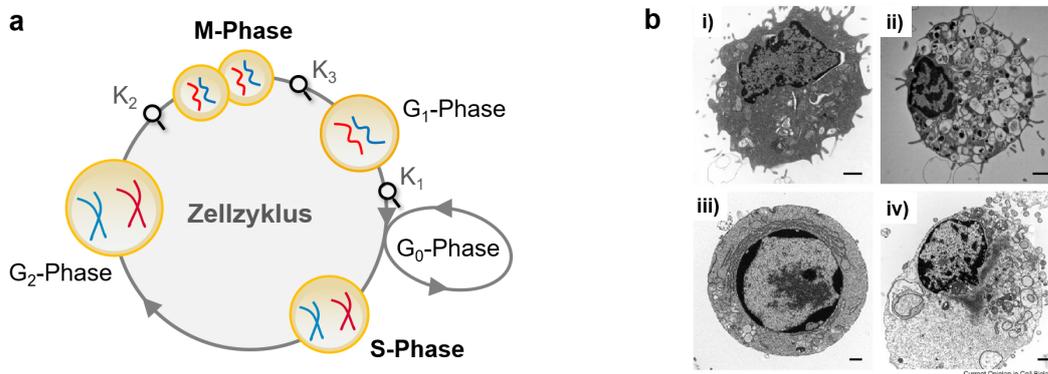


Abbildung 2.7: Veranschaulichung von Zellzyklus und Zelltod: a) Zyklus einer eukaryotischen Zelle bestehend aus der Mitose(M)-Phase (Dauer ca. 1 h) sowie der Interphase (Dauer ca. 23 h), zu der die G_1 - und G_2 -Wachstumsphasen sowie die S-Phase (DNA-Synthese) gehören (in Anlehnung an: [83, 91]), b) Vergleich der Morphologie i) einer normalen Zelle, ii) einer autophagischen Zelle, iii) einer apoptotischen sowie iv) einer nekrotischen Zelle (aus: [92]). Die Skalenelemente entsprechen $\Delta x = 1 \mu\text{m}$.

Werden durch bestimmte externe oder interne Faktoren in der Zellumgebung antiproliferative Signale erzeugt, können Zellen in einen Ruhezustand (G_0 -Phase) eintreten [93, 94]. Ein Zellzyklusarrest kann beispielsweise durch Kontakthemmung bei einer hohen Anzahl von Nachbarn, fehlende Nährstoffversorgung, zu geringe Zellgröße oder bei Feststellung von DNA-Schädigungen initiiert werden [83]. Bei Krebszellen sind die Kontrollmechanismen des

normalen Zellzyklus' häufig verändert oder inaktiv, wodurch es zu einer unkontrollierten Proliferation kommen kann [95].

Bei irreparablen DNA-Schäden kann eine Zelle durch Aktivierung von Caspasen die sogenannte Apoptose einleiten [96]. Dies ist ein genetisch gesteuerter Tod, der beispielsweise die Weitergabe von genetischen Schäden verhindert. Die Nekrose ist im Gegensatz zur Apoptose ein unkontrollierter Zelltod, der zum Beispiel durch externe Einflüsse wie Vergiftung, Hitze oder mechanische Beschädigungen hervorgerufen wird [83, 97]. Zellen können auch in einen autophagischen Zustand eintreten, in der sie ihre eigenen Bestandteile teilweise abbauen und zur Energiebereitstellung verwerten [98]. In der Literatur wird die Autophagie dabei in manchen Fällen als zusätzlicher Mechanismus für einen programmierten Zelltod interpretiert [92, 99–101]. Im biologischen Kontext wird sie jedoch meistens als Überlebensstrategie klassifiziert [92, 102]. In Abbildung 2.7b sind morphologische Unterschiede zwischen den Prozessen gezeigt [92]. Die Apoptose lässt sich von der Nekrose durch Betrachtung der morphologischen Veränderungen klar abgrenzen: Während bei apoptotischen Zellen die Zellmembran bei der Zellfragmentierung intakt bleibt, kommt es bei nekrotischen Zellen zur Lyse und Freisetzung der intrazellulären Bestandteile [83].

2.2.3. Zelladhäsion

Die Zelladhäsion stellt einen wichtigen Beitrag zur Funktionsfähigkeit von Gewebe und zum Verhalten von Zellen auf Oberflächen dar [73]. Zellen gehen bei der Adhäsion über ihre Adhäsionsproteine (ZAM) Wechselwirkungen mit der EZM ein [103]. *In vitro* kann das Substrat, auf dem die Zellen wachsen, als EZM angesehen werden. Über das Schlüssel-Schloss-Prinzip können spezifische Kopplungen von ZAM mit weiteren ZAM oder mit der EZM, also zwischen einem Rezeptor und einem Ligand, entstehen [103, 104]. Es können aber auch Van-der-Waals- oder elektrostatische Wechselwirkungen sowie repulsive Kräfte auftreten [105]. In Abbildung 2.8 ist der Adhäsionsprozess einer Zelle mit ZAM auf einem Substrat mit EZM sowie die Verformung der Zelle während dieses Prozesses schematisch gezeigt [73, 106]. Die EZM besteht dabei aus Makromolekülen wie beispielsweise Proteoglykanen und Faserproteinen [107].

Der gezeigte Prozess folgt dem Modell der weichen Schale (engl. *soft shell adhesion*) [108] und kann in die hier veranschaulichten drei Phasen unterteilt werden [106]: In der ersten Phase kommt es durch Sedimentation der Zelle auf dem Substrat zum ersten Kontakt zwischen Zellen und EZM. Anschließend binden in Phase II die Integrine, die eine wichtige Gruppe der ZAM darstellen [109], an die Moleküle der EZM. Die Zelle spreitet auf dem Substrat über die initiale Projektionsfläche hinaus und flacht ab. In Phase III werden fokale Adhäsionspunkte ausgebildet und es kommt zu einer strukturellen Reorganisation der Aktinfilamente in der Zelle, die sich mit den Adhäsionspunkten verankern [73, 110].

Mit der Zeit wird eine immer stabilere Adhäsion sowie weitere Spreitung und Abflachung erreicht, solange die notwendige Energie zur Deformation der Zelle kleiner ist als die Adhäsions-

energie [105]. Je nach Eigenschaft der EZM bzw. der Beschichtung des Substrats, beispielsweise mit Fibronektin oder Kollagen, kann der Adhäsionsprozess auf molekularer Ebene unterschiedlich ablaufen und die Zellfunktion beeinflussen [111].

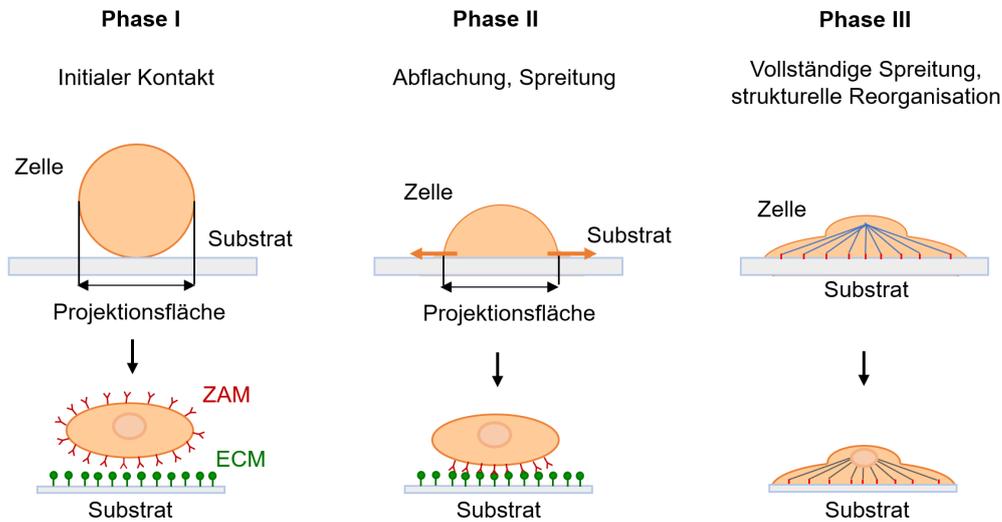


Abbildung 2.8: Der Prozess der Zelladhäsion unterteilt in drei Phasen (in Anlehnung an: [73, 106]): In Phase I findet der erste initiale Kontakt der Zelladhäsionsmoleküle (ZAM) mit der EZM durch Sedimentation der Zelle auf dem Substrat statt. In Phase II kommt es zur Abflachung und Spreitung des Zellkörpers durch Bindung an Integrine. Erst in Phase III hat sich die Adhäsion stabilisiert und es bilden sich fokale Adhäsionspunkte aus. In der oberen Darstellung liegt der Fokus auf der Veränderung der Zellform, während in der unteren Schematik die Wechselwirkung der ZAM mit der EZM im Vordergrund steht.

2.2.4. Zellmigration

Zellmigration ist essentiell für die Erhaltung und Funktion von Organismen und des Immunsystems [112]. Eine Zelle kann sich über den Prozess der Lokomotion bzw. Migration in 2D- oder 3D-Umgebungen fortbewegen [113]. In Abbildung 2.9 ist das in der hier vorliegenden Arbeit relevante Prinzip der mesenchymalen Kriechbewegung gezeigt, die beispielsweise Stamm- oder Krebszellen zur Fortbewegung nutzen [114]. Diese Art der Bewegung beruht auf einer Modifikation des Zytoskeletts, insbesondere auf der Polymerisation von Aktin, wie im Folgenden beschrieben werden soll. Neben der mesenchymalen Fortbewegung gibt es je nach Zelltyp noch weitere Arten der Zellbewegung, auf die hier aufgrund der fehlenden Relevanz für diese Arbeit nicht näher eingegangen wird.

Bei der mesenchymalen Fortbewegung werden verschiedene voneinander abhängige Schritte durchlaufen [113–116]: Bei der Polarisation wird zunächst die Bewegung initiiert und es kommt zur Depolymerisation von Aktin an dem der Bewegung entgegengesetzten Ende der Zelle. An der in Richtung der Bewegung liegenden Zellseite polymerisieren Aktinfilamente zu sogenannten Filopodien und Lamellipodien (auch Pseudofüßchen genannt) [117]. Die Zelle bildet bei der anschließenden Translation durch diese Ausstülpungen neue Adhäsionspunkte

mit der EZM an der Zielposition (vgl. Abschnitt 2.2.3). Es findet eine Streckung nach vorne statt. Myosin-II-gesteuerte Kontraktionen der Aktin-Spannungsfasern bewirken die endgültige Bewegung des Zellkörpers in die gewünschte Richtung. Zuletzt wird durch Kontraktion und fokale Proteolyse der hintere Teil der Zelle nachgezogen, wobei sich auch der Schwerpunkt verschiebt.

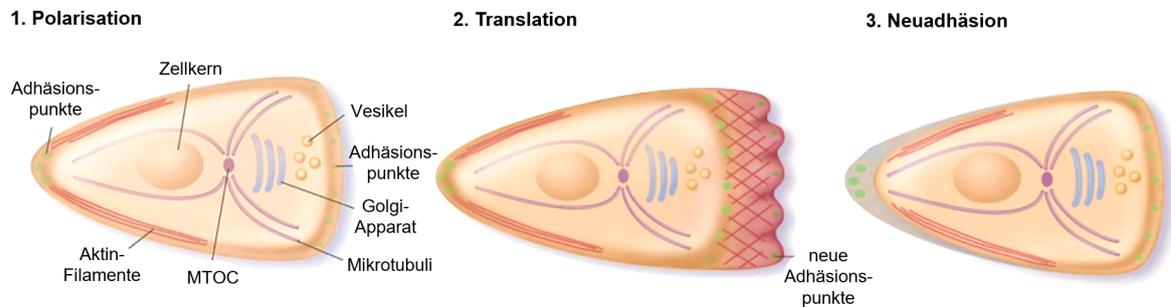


Abbildung 2.9: Veranschaulichung eines mesenchymalen Zellmigrationsprozesses: Zunächst wird die Bewegung durch Polarisation der Zelle vorbereitet, wobei sich der Golgi-Apparat vor der Zelle ausrichtet und ein gerichteter Transport von Vesikeln zum vorderen Ende stattfindet. MTOC bezeichnet hier das Mikrotubulus-Organisationszentrum. Bei der Translation kommt es zur Zellstreckung und es werden neue fokale Adhäsionspunkte mit der EZM ausgebildet. Im letzten Schritt wird der Zellkörper nachgezogen und es kommt zur Adhäsion an der neuen Position (in Anlehnung an: [118]).

Die Migration von Zellen kann durch äußere Stimuli oder Stressoren beeinflusst werden: Bekannte Mechanismen zur externen Richtungsbestimmung von Zellmigration sind beispielsweise die Chemotaxis (durch chemische Gradienten) [119], die Durotaxis (durch Substratsteifigkeit) [120] oder auch die Elektrotaxis (durch elektrische Felder) [121].

Komplexe Migrationsprozesse *in vivo*, wie beispielsweise bei der Wundheilung, können durch Mechanismen der oben dargestellten Einzelzellmigration nicht ausreichend beschrieben werden. Hierfür ist ein Verständnis von kollektiven Migrationsmechanismen notwendig, bei denen auch kooperative Effekte durch mechanische oder biochemische Kommunikation zwischen den migrierenden Zellen zum Tragen kommen [112, 122]. So können sich beispielsweise in der Wundheilung sogenannte *leading cells* (dt. Führungszellen) ausbilden, die über mechanische Spannungen und mechanosensitive Biomoleküle (wie z.B. Merlin) die Bewegung nachfolgender Zellen in ihre Richtung vorantreiben [122].

2.3. Interaktion akustischer Oberflächenwellen mit Materie

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln die Grundlagen zu akustischen Oberflächenwellen sowie zu lebenden Zellen zunächst getrennt erläutert wurden, sollen diese Grundlagen nun miteinander verknüpft werden. Im Folgenden wird daher auf einige wichtige Aspekte der Wechselwirkung von SAW mit Materie eingegangen, die in dieser Arbeit zum Tragen kommen.

2.3.1. Interaktion akustischer Oberflächenwellen mit Flüssigkeiten

In der experimentellen Arbeit mit Zellen und biologischen Materialien ist die Verwendung von Flüssigkeiten meist unabdingbar. Wenn Flüssigkeiten wie Zellkulturmedium notwendigerweise in Kontakt mit akustischen Oberflächenwellen kommen, müssen einige Effekte berücksichtigt werden.

Dämpfung

Ist die Dicke eines Oberflächenbelags nicht mehr vernachlässigbar gering im Vergleich zur SAW-Wellenlänge, treten Dämpfungseffekte der Welle auf [41]. Wie der Belag die eingekoppelte akustische Energie beeinflusst, ist abhängig von seinen Materialeigenschaften sowie von den Bewegungskomponenten und Charakteristika der Welle. Man unterscheidet zwischen einer *in-plane*- und einer *out-of-plane*-Dämpfung (α_{ip} bzw. α_{op}), die sich wie folgt abschätzen lassen [123]:

$$\alpha_{ip} = \left(\frac{\eta \rho_F}{4\pi \rho_{SAW}^2 v_{SAW}} \right)^{1/2} \lambda_{SAW}^{-2/3} \quad (2.17)$$

$$\alpha_{op} = \frac{\rho_F v_F}{\rho_{SAW} v_{SAW} \lambda_{SAW}} \quad (2.18)$$

Mit diesen Zusammenhängen wird der Energieverlust durch die Abstrahlung der Welle in die Flüssigkeit beschrieben, wobei ρ_F , v_F und η die Dichte, Schallgeschwindigkeit und Viskosität des Mediums bezeichnen. ρ_{SAW} und v_{SAW} stellen die Dichte und Schallgeschwindigkeit des Piezoelektrikums da, auf dem die Welle mit λ_{SAW} propagiert.

Die unterschiedlichen Energieverluste α_{ip} und α_{op} kommen dadurch zustande, dass transversale Komponenten eine longitudinale Welle im Oberflächenbelag erzeugen (*out-of-plane*-Dämpfung), während durch viskose Kopplung aus transversalen und longitudinalen Komponenten Scherwellen im Medium entstehen (*in-plane*-Dämpfung) [41]. Aus dem Zusammenhang $\alpha^{-1} = l_{calc}$ lassen sich 1/e-Abklinglängen der SAW berechnen [2]. Mit $\rho_F = 1 \text{ g/ml}$, $c_F = 1480 \text{ m/s}$ und $\eta = 1 \text{ mPa}$ als Schätzungswerte für Wasser ergeben sich beispielsweise für das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Substrat LiNbO₃ 128° rot Y-Cut in X-Richtung eine *out-of-plane*-Abklinglänge $l_{calc,op} = 12,5 \lambda_{SAW}$ und eine *in-plane*-Abklinglänge $l_{calc,ip} = 1,03 \times 10^6 \lambda_{SAW}$ [2]. Da $l_{calc,ip}$ so hoch ist, kann sie im Vergleich zu $l_{calc,op}$ vernachlässigt

werden. Die Abklinglänge $l_{\text{calc,op}}$ ist dagegen relevant für diese Arbeit, da die Rayleighwelle somit nur eine begrenzte Propagationslänge in der Flüssigkeit hat, bevor ihre Amplitude auf unter $1/e$ des ursprünglichen Wertes abklingt.

Abklinglänge des elektrischen Feldes

Akustische Oberflächenwellen erzeugen elektrische Felder auf dem piezoelektrischen Substrat. Befindet sich eine Schicht von Ladungsträgern darauf, wie beispielsweise eine Elektrolytlösung, kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den darin gelösten Ionen und dem elektrischen Feld. Die komplexe Permittivität einer konzentrierten Elektrolytlösung kann anhand des klassischen Debye-Drude-Modells ermittelt werden [124, 125]:

$$\epsilon_r(\omega) = \epsilon_r^{\text{Debye}} + \epsilon_r^{\text{Drude}} \quad (2.19)$$

In vorherigen Arbeiten wurden die Beiträge von Debye und Drude zur komplexen relativen Permittivität des Nährmediums von MDCK-II-Zellen *MEM Earle's M0325* (SA) für eine Arbeitsfrequenz eines SAW-Chips von $f_{\text{res}} = 205$ MHz berechnet: $\epsilon_r(\omega_{\text{res}}) = 79,64 + i124,86$ [2]. Aus der Permittivität lässt sich unter Heranziehen der Debye-Hückel-Theorie die Abschirmlänge λ_D des o.g. Nährmediums ermitteln, nach der das elektrische Potential auf $\frac{1}{e}$ des ursprünglichen Wertes abklingt:

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T}{2e^2 N_A I}}, \quad (2.20)$$

wobei T die Temperatur, e die Elementarladung, N_A die Avogadrokonstante, k_B die Boltzmann-Konstante und ϵ_0 die relative Permittivität des Vakuums sind [126, 127]. Es wurde zudem der Ausdruck für die Ionenstärke $I = \sum \frac{1}{2} c_i z_i^2$ verwendet, die nach der Berechnung von *Brugger* für die Ionen im hier verwendeten Nährmedium $I = 158,93 \frac{\text{mol}}{\text{m}^3}$ beträgt [2]. Unter Einsetzen des Realteils von ϵ_r kann die Größenordnung der Debye-Länge näherungsweise auf $\lambda_D \approx 0,8$ nm abgeschätzt werden. Das elektrische Potential klingt somit bereits im niedrigen Nanometerbereich auf $\frac{1}{e}$ des ursprünglichen Potentials ab. Detaillierte Informationen zur Zusammensetzung des Nährmediums und genauen Berechnung der Permittivitäten und der elektrischen Leitfähigkeit können in der weiterführenden Literatur nachgelesen werden [2, 125, 128].

Akustische Strömungen

In realen Flüssigkeiten kommt es bei der Einkopplung einer akustischen Oberflächenwelle in das Medium durch viskose Dämpfung zu globalen Strömungen (*acoustic streaming*) [129, 130]. Die Geschwindigkeit und Form der Strömung sind dabei abhängig von der Dicke des Flüssigkeitsbelags, der Wellenlänge der einkoppelnden SAW und der dabei auftretenden Dämpfung [130].

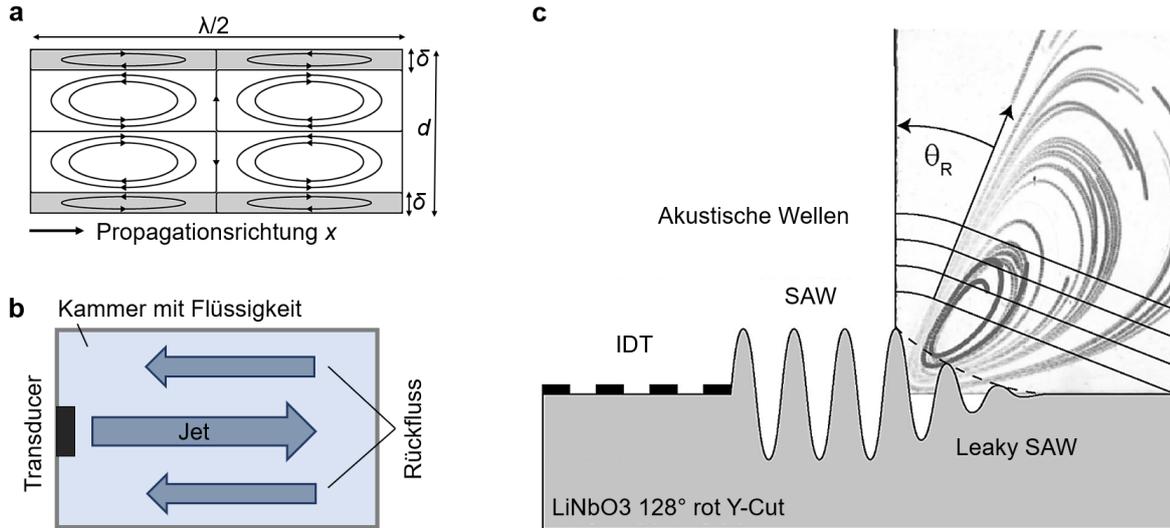


Abbildung 2.10: Akustische Strömungen in Flüssigkeiten: a) gegenläufige Vortices der Rayleigh-Strömung (und Schlichting-Strömung im δ -Bereich), erzeugt durch eine stehende Welle in x -Richtung (modifiziert aus [130]), b) Skizze einer Eckart-Strömung in einer abgeschlossenen Kammer in Anlehnung an [130], c) Veranschaulichung der Abstrahlung einer Rayleigh-Welle in eine Flüssigkeit unter dem Rayleigh-Winkel und Entstehung einer Leaky SAW (modifiziert aus [131]).

Ist die Schichtdicke d der Flüssigkeit gering verglichen mit der SAW-Wellenlänge, aber größer als die viskose Eindringtiefe δ ($\delta \ll d \ll \lambda_{\text{SAW}}$) [132], so kommt es zu Rayleigh-Strömungen (vgl. Abbildung 2.10a). Die Strömungsbewegung dieser Art der akustischen Strömung in Form von lokalisierten entgegengesetzten Wirbeln (Vortices) bildet sich hauptsächlich an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Festkörper aus [130]. Wenn die Schichtdicke der Flüssigkeit wesentlich größer ist als die Wellenlänge ($d \gg \lambda_{\text{SAW}}$), wird Eckart-Strömung erzeugt [133]. Bei der Eckart-Strömung findet ein Übertrag der akustischen Energie in kinetische Energie im Flüssigkeitsvolumen statt [132]. Aufgrund der Absorption in der Flüssigkeit zerstreut sich die Energie in Form eines Flüssigkeitsstrahls (*Jets*), der sich parallel zum Schallpfad ausbreitet (vgl. Abbildung 2.10b). In abgeschlossenen Flüssigkeitsbehältnissen treten daher zirkulare Strömungen auf [130].

In realen Anwendungen kann oft nicht klar zwischen diesen beiden Strömungsarten unterschieden werden. Vielmehr kommt es beispielsweise bei der Einkopplung von einer Rayleigh-Mode in eine Flüssigkeit zu einer Überlagerung beziehungsweise mit steigender Schichtdicke zu einem Übergang zwischen den Strömungen [134]. Die so entstehende SAW wird im Fall einer in Flüssigkeit einkoppelnden Rayleigh-Welle *Leaky SAW* genannt (vgl. Abbildung 2.10c). Dabei ist der sogenannte Rayleighwinkel, unter dem die Energie der Welle in die Flüssigkeit abgestrahlt wird, abhängig von den Schallgeschwindigkeiten des Substrats v_S sowie der Flüssigkeit v_F [131]:

$$\theta_R = \arcsin \frac{v_F}{v_S}. \quad (2.21)$$

Mit diesem Zusammenhang ergibt sich beispielsweise ein Winkel von $\theta_R = 21,8^\circ$ für den

Übergang von LiNbO_3 ($v_S = 3978 \text{ m/s}$) zu Wasser ($v_F = 1480 \text{ m/s}$) [2].

2.3.2. Interaktion akustischer Oberflächenwellen mit Objekten

Im Rahmen dieser Arbeit werden Einflüsse von akustischen Oberflächenwellen auf lebende Zellen untersucht. Neben der Interaktion von SAW mit Flüssigkeiten spielen dabei auch Wechselwirkungen mit Objekten eine tragende Rolle. Im Folgenden werden daher die zum Verständnis dieser Wechselwirkung notwendigen grundlegenden Konzepte erläutert, die auch weiterführenden Arbeiten entnommen werden können [129, 130, 135–138].

Akustischer Druck und akustische Kräfte

Befindet sich ein Objekt mit kleinem Radius $r \ll \lambda_{\text{SAW}}$ in einer Flüssigkeit, erfährt es durch eine in x -Richtung propagierende SAW einen Druck. In Näherung zweiter Ordnung besitzt das zeitliche Mittel des Drucks $\langle p(x) \rangle$ die Form:

$$\langle p(x) \rangle = p_0 - \frac{1}{2} \rho_F v_0^2, \quad (2.22)$$

wobei p_0 der statische Druck, ρ_F die Dichte der Flüssigkeit und v_0 die Geschwindigkeit eines Volumenelements ist. Mit zunehmender Geschwindigkeit v_0 verringert sich also der statische Druck um den Term $p_{\text{dyn}} = \frac{1}{2} \rho_F v_0^2$, der als akustischer Strahlungsdruck bezeichnet wird.

Objekte, die sich in einem Stehwellenfeld befinden, können in die Druckminima der Welle gebracht werden [139]. Die hierfür notwendige Kraft auf ein sphärisches Objekt in einer Flüssigkeit setzt sich dabei aus einer primären und einer sekundären Kraft zusammen: Die Wechselwirkung des Objektes mit der stehenden Welle wird durch die primäre Kraft F_R beschrieben, während die sekundäre Kraft F_B (Bjerknes-Kraft) auf die Wechselwirkung mit anderen Objekten zurückzuführen ist. Die im folgenden zusammengefassten Relationen zu den akustischen Kräften und ihre Herleitungen können im Detail in den grundlegenden Werken nachgelesen werden [53, 135, 136].

Für die primäre akustische Kraft F_R kann zunächst ein sphärisches Objekt mit Volumen $V = \frac{4}{3} \pi r^3$ angenommen werden, für das sich durch eine in x -Richtung propagierende Stehwelle ein zeitlich gemitteltes Potential U ergibt [136]:

$$U = V \left(f_1 E_{\text{pot}} - \frac{3}{2} f_2 E_{\text{kin}} \right). \quad (2.23)$$

Mit der Relation $F_R = -\nabla U$ kann die primäre akustische Kraft wie folgt beschrieben werden:

$$F_R(x) = -\frac{\partial U}{\partial x} = -\left(\frac{\pi V p_F^2 \beta_F v}{2 c_F} \right) \Phi(\beta, \rho) \sin(2kx), \quad (2.24)$$

Die akustische Kraft nimmt durch ihre Abhängigkeit von p_F^2 mit zunehmender Intensität der

Stehwelle zu [137]. $\Phi(\beta, \rho)$ stellt dabei den akustischen Kontrastfaktor dar:

$$\Phi(\beta, \rho) = \frac{5\rho - 2\rho_F}{2\rho + \rho_F} - \frac{\beta}{\beta_F}. \quad (2.25)$$

In diesen Relationen beschreiben c bzw. c_F die Schallgeschwindigkeit und ρ bzw. ρ_F die Dichten des Objektes bzw. des umgebenden Mediums. Wie in der Literatur näher erläutert wird, führt der Zusammenhang 2.23 die gemittelten potentiellen und kinetischen Energiedichten E_{pot} und E_{kin} ein, die wiederum die Druck- und Geschwindigkeitsfluktuationen $\langle p^2 \rangle$ und $\langle v^2 \rangle$ des Objektes enthalten [136]. Des Weiteren beschreiben die Korrekturfaktoren f_1 und f_2 unter anderem die Kompressibilität des Objektes und nehmen in der Summe beispielsweise einen Wert von $f_1 + f_2 = 1$ für ein steifes Objekt an. Für die Kompressibilität in 2.24 gilt die Relation $\beta = \frac{1}{\rho c^2}$. Das Vorzeichen des akustischen Kontrastfaktors 2.25 wird durch die Differenz der Medium- und Objektdichte sowie über das Kompressibilitätsverhältnis bestimmt und beschreibt somit die Krafrichtung, in der die Objekte bewegt werden. Feste Objekte wandern somit entlang des Kraftgradienten in die Richtung des Druckminimums (bzw. Geschwindigkeitsmaximums, Wellenknoten).

Die sekundäre Kraft F_B einer Schallwelle in einer Flüssigkeit mit Objekten wurde erstmals 1909 durch V. Bjerknes beschrieben und resultiert aus der Wechselwirkung der Welle mit anderen Objekten durch Streuung [140]. Es lässt sich für Wellenlängen $\lambda_{\text{SAW}} \gg r$, die zudem größer sind als der Abstand d zwischen zwei sphärischen Objekten, eine vereinfachte Beschreibung der Bjerknes-Kraft aufstellen [141]:

$$F_B = 4\pi r^6 \left[\frac{(\rho - \rho_F^2)(3\cos^2\theta - 1)}{6\rho_F d^4} v^2(x) - \frac{\omega^2 \rho_F (\beta - \beta_F)^2}{9d^2} p^2(x) \right]. \quad (2.26)$$

Hier ist θ der Winkel zwischen der Mittellinie der zwei Objekte und der Ausbreitungsrichtung der Welle. Beispielsweise wird der erste geschwindigkeitsabhängige Term von 2.26 positiv und damit repulsiv, wenn sich die Objekte in einer Linie mit der Propagationsrichtung $\theta = 0^\circ$ befinden. Für $\theta = 90^\circ$ wird der Term dagegen negativ und somit attraktiv. Der zweite druckabhängige Term der Bjerknes-Kraft wirkt dagegen aufgrund seiner Winkelunabhängigkeit attraktiv, sodass die resultierende Kraft F_B auf Objekte im Stehwellenfeld meist attraktiv in Richtung eines Wellenknotens wirkt [2].

Anordnung von Objekten im akustischen Stehwellenfeld

Die im vorherigen Abschnitt aufgeführten Relationen zeigen, dass es möglich ist, Objekte in die Druckknotenpunkte einer stehenden akustischen Welle zu bringen. Dabei häufen sich Objekte, die im Vergleich zur Wellenlänge sehr klein sind ($D \ll \lambda$), meist in einem einzelnen Knotenpunkt, wie in Abbildung 2.11a veranschaulicht ist. Häufen sich mehrere Objekte in einem Punkt mit geringem Abstand d , kommt es zu zusätzlichen attraktiven Anziehungen zwischen ihnen durch die sekundäre akustische Kraft, wie die Relation 2.26 zeigt. Ziel von

experimentellen Untersuchungen ist es jedoch oft, Objekte wie beispielsweise lebende Zellen einzeln zu untersuchen und dafür räumlich voneinander zu trennen. Dies ist mit einer sogenannten „Eine Zelle pro Knotenpunkt“ (EZPK)-Falle möglich [138]. Dabei wird ein einzelnes Objekt pro Druckknotenpunkt angeordnet. Die Bedingung hierfür ist, dass die angelegte akustische Stehwelle eine Wellenlänge in der Größenordnung des Objektdurchmessers besitzt ($D \approx \lambda$), wie in Abbildung 2.11b gezeigt ist.

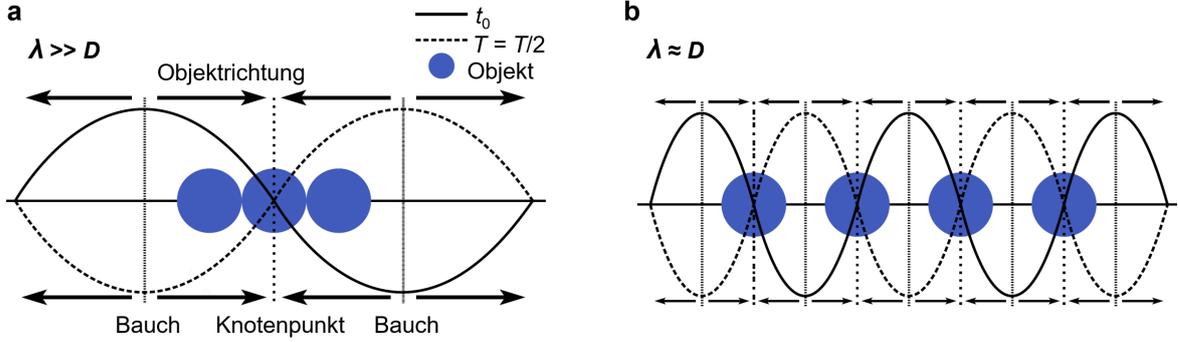


Abbildung 2.11: Schematik zur Anordnung von Objekten in einem akustischen Stehwellenfeld: a) für $D \ll \lambda$ werden mehrere Objekte in einen Knotenpunkt der Welle gebracht, b) für Wellenlängen λ im Bereich der Objektgröße können einzelne Objekte voneinander getrennt angeordnet werden (modifiziert aus: [138]).

Aufgrund von nicht-linearen Effekte in akustischen Stehwellenfeldern wie Wirbelströmen [142], gibt es auch eine kritische Mindestgröße zur Positionierbarkeit von Objekten, die beispielsweise bei Polystyrolkugeln im Bereich von $D_c \approx 200 \text{ nm}$ liegt [143]. Neben dem Durchmesser D beeinflusst auch die Kompressibilität β der Objekte ihre Positionierbarkeit im Stehwellenfeld. Da beispielsweise Zellen und andere biologische Objekte meist sehr kompressibel sind, erfahren sie eine schwächere sekundäre Kraft F_B . Für sie existiert dadurch ein größerer Bereich von D bzw. λ , in dem sie einzeln positionierbar sind [138].

Experimentell lässt sich die auf Objekte wirkende primäre akustische Kraft F_R mithilfe von Gleichung 2.24 aus dem zeitlichen Geschwindigkeitsverlauf der in die Knotenpunkte wandernden Objekte bestimmen [2, 25]. Am Geschwindigkeitsmaximum wird dabei die Aufhebung der akustischen Kraft F_R mit der Stoke'schen Reibungskraft F_r angenommen. Durch Berechnung der Steigung ergibt sich die primäre akustische Kraft F_R am Beispiel eines ein-dimensionalen Stehwellenfeldes mit $\lambda_{\text{SAW}} = 50 \mu\text{m}$ und unter Annahme einer Zellgröße in Suspension von $D \approx 10 \mu\text{m}$ [2]:

$$F_R(P_{\text{in}}, \Phi) = 14,03 \frac{\text{nN}}{\text{mW}} P_{\text{in}} \Phi \sin(2kx). \quad (2.27)$$

In der Literatur werden dabei Kontrastfaktoren für Zellen von etwa $\Phi \in [0, 14; 0, 25]$ angegeben [144]. Anhand von 2.27 lässt sich die primäre akustische Kraft auf Zellen in Abhängigkeit von der angelegten SAW-Leistung P_{in} berechnen.

3. Methoden und Materialien

Im Folgenden werden die für die Durchführung und Evaluation der Experimente verwendeten Methoden und Materialien aufgeführt. Unter Anhang B findet sich das Abkürzungsverzeichnis sowie Details zu den verwendeten Reagenzien und Materialien. Zunächst soll hier auf das Herstellungsverfahren und allgemeine Eigenschaften der verwendeten SAW-Chips eingegangen sowie grundlegende Methoden zur Zellkultivierung aufgeführt werden. Anschließend werden die für die jeweiligen spezifischen Fragestellungen dieser Dissertation entwickelten Versuchsaufbauten und Analysemethoden vorgestellt.

3.1. SAW-Chips zur Erzeugung akustischer Oberflächenwellen

3.1.1. Herstellung von SAW-Chips

Zur Erzeugung von akustischen Oberflächenwellen werden in dieser Arbeit SAW-Chips basierend auf einem LiNbO_3 -Substrat mit dem Kristallschnitt 128° rot Y-Cut verwendet. Das Herstellungsverfahren der SAW-Chips lässt sich in dieser Arbeit in drei Hauptverfahren gliedern: 1. die Fotolithografie (die Aufbringung eines UV-sensitiven Fotolacks und dessen Belichtung durch eine Maske), 2. die Metallisierung der IDT-Strukturen durch Elektronenstrahlverdampfung, 3. das thermische Verdampfen (oder Sputtern) zur Aufbringung einer SiO_2 -Glasschicht zum Schutz der Elektroden. Details und Zwischenschritte zwischen den Verfahren sind unter Anhang C.1 aufgeführt.

Auf den gereinigten LiNbO_3 -Substraten ($l \times b \times d$: $17,5 \times 17,5 \times 0,5$ mm, RI) wird bei der Fotolithografie wie in Abbildung 3.1a dargestellt zunächst eine dünne, gleichmäßige Lackschicht (AZ-Mir 701 Photoresist MC) durch Schleuderbeschichtung (engl. *spin coating*) aufgebracht. Danach wird der Lack wie in Abbildung 3.1b gezeigt durch Kontaktbelichtung am Maskaligner (Standard Mask Aligner MJB 3, SM) mit dem UV-Licht einer He/Xe-Lampe belichtet ($I \approx 4,2 \text{ mJ/cm}^2\text{s}$). Alternativ kann die Belichtung auch kontaktlos durch eine Digitalmaske (vgl. Abbildung 3.2a) am Smartprint (ST) ohne Kontakt erfolgen. Nach der Entwicklung (AZ 726 MIF Developer, MP) verbleiben die unbelichteten Regionen.

Die Metallisierung der IDT-Strukturen mit $d(\text{Ti}/\text{Au}/\text{Ti}) = 10/50/10$ nm Titan und Gold erfolgt in der Sputteranlage ESTHER (Electronbeam-RF-Sputtering and Thermal Evaporation, Auto 500 Thin Film Coating System, BO). Anschließend wird ein Lift-Off unter Verwendung von Isopropanol, DMSO (*Techni Strip Micro D350*, MC) und Ultraschall durchgeführt, wodurch die Lackschicht an den belichteten Stellen abgelöst wird und nur die Metallstruktur des IDTs verbleibt. Die Aufbringung der Glasschicht $d(\text{SiO}_2) = 200$ nm wurde in dieser Arbeit zum Teil ebenfalls an der ESTHER durch thermisches Verdampfen und zum Teil an der Sputteranlage des Lehrstuhls für Experimentalphysik IV unter Unterstützung von Andreas Spörhase und Dr. Andreas Hörner realisiert.

Der letzte Schritt der SAW-Chip-Herstellung ist die Feststellung der Funktionsfähigkeit

durch Charakterisierung der Resonanzfrequenz, wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird.

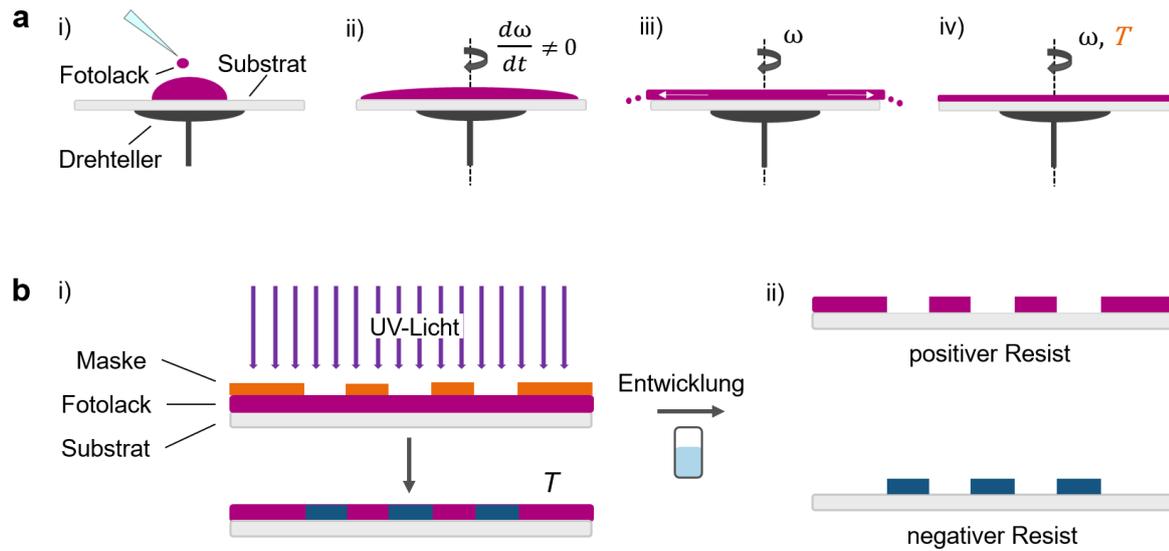


Abbildung 3.1: Schematik des Fotolithografie-Verfahrens als erster Schritt zur Herstellung von SAW-Chips. a) Schleuderbeschichtung (engl. *spin coating*) eines LiNbO_3 -Substrats mit einer dünnen Fotolack-Schicht: i) Aufpipettieren des Lacks auf das Substrat auf dem Drehteller, ii) Beschleunigung des Drehtellers zur Benetzung der gesamten Substratoberfläche, iii) konstante Drehzahl zur Entfernung von überschüssigem Lack und zur gleichmäßigen Verteilung, iv) weitere Rotation zur Verdampfung der flüchtigen Inhaltsstoffe, b) Belichtung der IDT-Strukturen: i) Kontaktbelichtung durch Positionierung einer Chrommaske auf dem mit Lack beschichteten Substrat, ii) nach der Entwicklung bleiben entweder unbelichtete Regionen zurück (*positive resist*) oder belichtete Regionen werden entfernt (*negative resist*). In Anlehnung an: [145, 146].

3.1.2. Eigenschaften der SAW-Chips

Auf den in dieser Arbeit verwendeten SAW-Chips werden wie in 2.1 beschrieben hauptsächlich Rayleigh-Wellen erzeugt, deren Wellenlängen bzw. Resonanzfrequenz durch den periodischen Abstand der Elektroden des interdigitalen Schallwandlers (IDT) festgelegt sind. Im Folgenden finden hauptsächlich SAW-Chips zur Stimulation von Wundheilungsassays mit einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{SAW}} \approx 25 \mu\text{m}$ Verwendung, bei denen der IDT und damit die Ausbreitungsrichtung der Welle entlang der Kristallachse orientiert sind. Daneben kommen zur Erzeugung von Stehwellenfeldern auch SAW-Chips mit IDTs in 45° -Winkel zur Kristallachse und einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{SAW}} \approx 50 \mu\text{m}$ zum Einsatz, die aufgrund des 45° -Winkels der Propagationsrichtung neben Rayleigh-Moden auch SH-Moden erzeugen. In Abbildung 3.2a ist die hier verwendete IDT-Struktur dargestellt.

Die Zeichnung basiert auf einer Inkscape-Maske, die in dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Stephan Eberle (MSc.) entworfen und zur Fotolithografie verwendet wurde. Zur Charakterisierung der SAW-Chips und der Sicherstellung der Funktionsfähigkeit werden nach der Chip-Herstellung sowie vor jedem Versuch S_{11} -Messungen mit einem Netzwerkanalysator durchgeführt. Ein exemplarischer Verlauf einer solchen Reflexionsmessung an einem Chip

mit Resonanzfrequenz von $f_{\text{res}} \approx 163$ MHz ist in Abbildung 3.2b gezeigt.

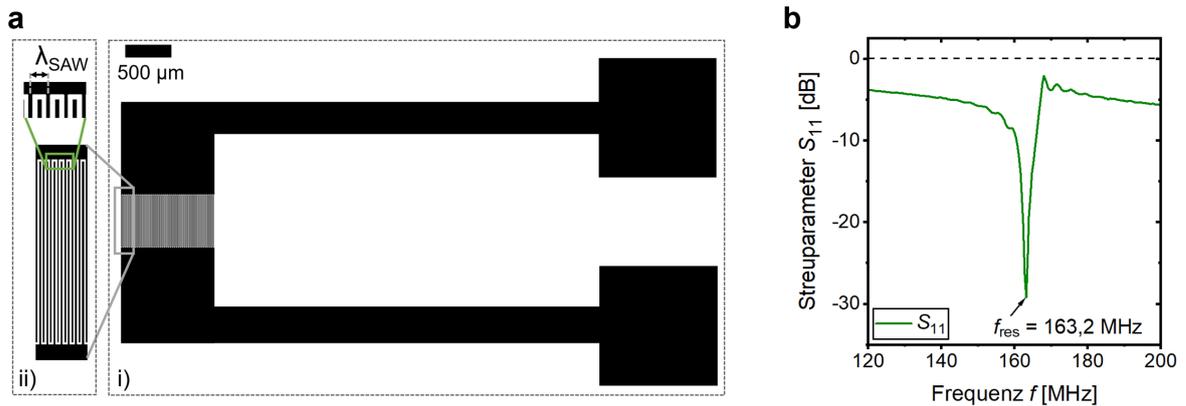


Abbildung 3.2: Charakterisierung der hier verwendeten SAW-Chips: a) technische Zeichnung des IDT, basierend auf i) der zur Fotolithografie verwendeten Maske mit ii) vergrößerten Darstellungen der Fingerstrukturen, b) exemplarischer Verlauf des Streuparameters S_{11} zur Charakterisierung der Resonanzfrequenz f_{res} dieser Chips und Überprüfung der Funktionsfähigkeit.

In dieser Arbeit werden drei verschiedene Versuchsaufbauten mit jeweils einem der oben beschriebenen SAW-Chips als Kernkomponente verwendet, um (intra-)zelluläre Eigenschaften unter dem Einfluss dynamisch modulierter akustischer Kraftfelder zu untersuchen:

1. Aufbau zur Untersuchung von gerichtetem Neuritenwachstum in dynamischen und statischen akustischen Potentiallandschaften
2. Aufbau zur Untersuchung der Grenzen anwendbarer Parameter der SAW und von intrazellulären Mechanismen bei der SAW-stimulierten Wundheilung
3. Aufbau zur Untersuchung der intrazellulären Struktur von Endothelzellen aus humanen Aorten unter dem Einfluss akustisch erzeugter Strömungsfelder,

wobei das zweite Thema den Kernteil der Arbeit darstellt. Auf den SAW-Chips zur Stimulation von Zellen werden dabei fortlaufende akustische Oberflächenwellen (engl. *travelling SAW*) erzeugt, die nach einer Länge von $l \approx 12,5 \lambda_{\text{SAW}}$ auf $1/e$ abklingen (vgl. Abschnitt 2.1.3). Auf Chips mit mehreren gegenüberliegenden IDTs können dagegen durch gleichzeitiges Anlegen eines HF-Signals an zwei oder vier gegenüberliegende Elektroden auch ein- oder zweidimensionale Stehwellenfelder erzeugt werden. Durch die dynamische Modulierbarkeit solcher Potentiallandschaften eignen sich letztere SAW-Chips besonders zur Manipulation von Objekten, wie lebenden Zellen, wie in Abschnitt 2.3 beschrieben wird. Durch die Verwendung eines Mikrokanals kann zudem zur verbesserten Manipulation die bei Rayleigh-Wellen auftretende akustische Strömung unterdrückt werden. Im Folgenden werden zunächst die allen drei Versuchsaufbauten zugrundeliegenden Methoden zur Zellkultivierung beschrieben. Anschließend werden in Kapitel 3.5 bis 3.4 die oben aufgeführten drei Versuchsaufbauten sowie die nach der Datenakquisition angewendeten Analysemethoden vorgestellt.

3.2. Verwendete Zelllinien und deren Kultivierung

In dieser Arbeit wurden zur gezielten Beantwortung der Fragestellungen verschiedene Zelllinien (vgl. Abbildung 3.3) verwendet, die unter bestimmten Bedingungen kultiviert werden müssen. Im Folgenden werden die für die jeweiligen Zelllinien spezifischen Eigenschaften und Materialien beschrieben. Ein detailliertes Standardprotokoll zur Zellpassage am Beispiel von MDCK-II-Zellen ist zudem unter Anhang C.2 aufgeführt.

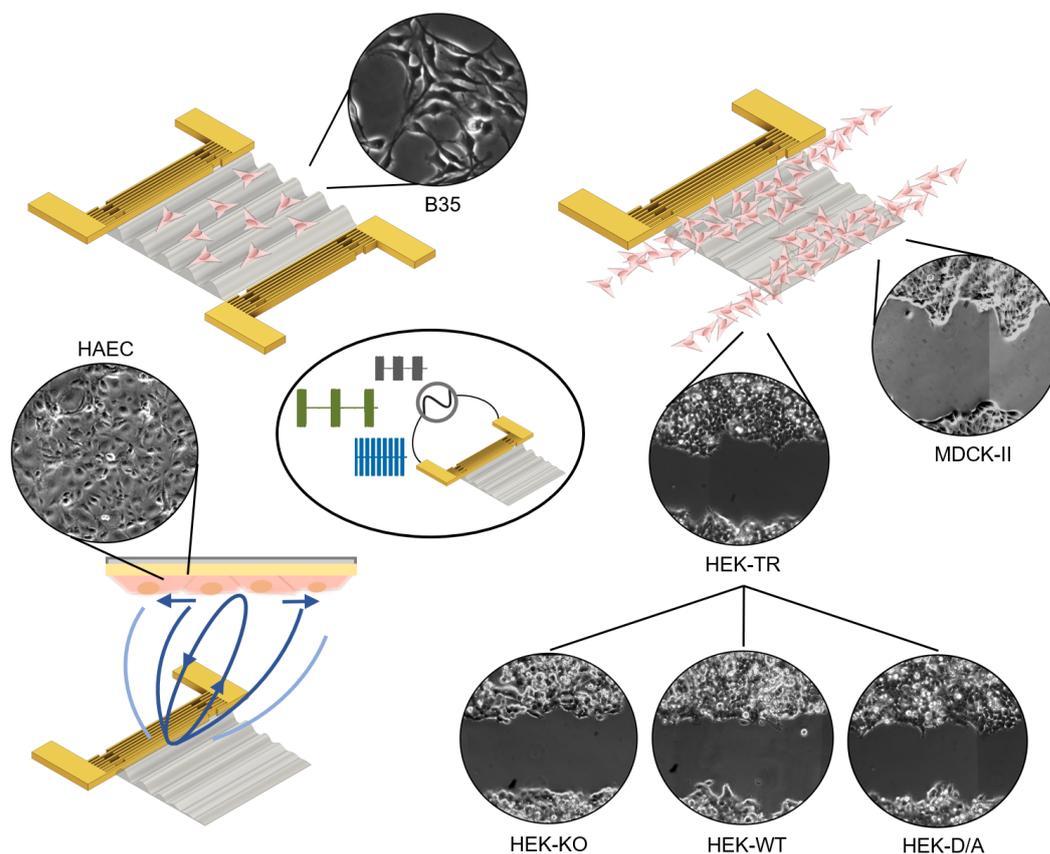


Abbildung 3.3: Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, dargestellt als Phasenkontrast-Aufnahmen in den jeweiligen Versuchsaufbauten, in denen sie eingesetzt wurden.

3.2.1. HAEC-Zelllinie

Zur Untersuchung von Aktinfilament- und Zellkerneigenschaften von Endothelzellen in akustischen Strömungsfeldern wird hier die HAEC-Zelllinie (engl. *Human Aortic Endothelial Cells*, TF) verwendet, die durch den Hersteller am Ende der Tertiärkultivierung kryokonserviert wurde. Nach dem Auftauen werden die Zellen in Basalmedium für Endothelzellen (*Human Large Vessel Endothelial Cell Basal Medium*, TF) angereichert mit dem Supplement LVES (*Large Vessel Endothelial Supplement*, TF) kultiviert. Zur Ablösung der Zellen bei der Passage werden die Zellen für $t = 6$ min bei Raumtemperatur mit einer 0,05 %igen Trypsin/EDTA-Lösung (BC) inkubiert. Anschließend wird das Trypsin unter Zugabe eine

Neutralisationslösung (1X *Trypsin Neutralizer Solution*, TF) neutralisiert und die Zellen für $t = 7$ min bei $a = 180$ g zentrifugiert. Die Resuspension und Überführung der Zellen in den Versuchsaufbau beziehungsweise in eine neue Zellkulturflasche erfolgt mit dem supplementierten Zellkulturmedium. Wie andere Endothelzellen zeichnen sich HAEC-Zellen in ihrer Morphologie durch flache, längliche Zellkörper aus, die sich nach mehreren Tagen bei konfluenter Kultivierung unter Fluss nach der Strömungsrichtung ausrichten können [147].

3.2.2. B35-Zelllinie

Zur Analyse von SAW-gerichtetem Neuritenwachstum wurde die B35-Zelllinie (AT) verwendet. Diese Zelllinie stammt aus einem Neuroblastom im zentralen Nervensystem einer BDIX-Ratte aus dem Jahr 1974 und zeichnet sich morphologisch vor allem durch die neuronähnliche Ausbildung von Fortsätzen aus dem sonst runden Perikaryon (Zellkörper) aus [148]. Für den Einsatz dieser Zellen auf SAW-Chips ist aufgrund der schwachen Zelladhäsion an der Chip-Oberfläche eine Beschichtung von Vorteil, beispielsweise mit PLL(Poly-L-Lysin, 0,1 % w/v, SA). Die B35-Zellen werden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, AT) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FBS Superior stabil[®], BS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep, SA) kultiviert. Zur Ablösung aus der Kulturflasche während der Zellpassage (vgl. Anhang C.2) werden die Zellen für $t = 1$ min mit einer Accutase[®]-Lösung (SA) bei Raumtemperatur inkubiert. Unter Serumentzug oder durch Zugabe von DcAMP (Dibutyl Adenosin-3,5-Monophosphat, SA) können die Zellen reversibel unter Ausbildung langer Neuriten ausdifferenzieren und eignen sich daher zur Erforschung von Grundlagen des zentralen Nervensystems [149].

3.2.3. MDCK-II-Zelllinie

Die Stimulation von Wundheilung und die dabei aktivierten zellulären Mechanismen wurden hauptsächlich anhand von MDCK-II(*Madin-Darby Canine Kidney*)-Zellen (SA) untersucht. Diese Zellen stammen aus einer Hundeniere und wurden erstmals im Jahr 1966 charakterisiert [150]. Sie besitzen eine hohe Zellteilungsrate, eine apico-basolaterale Polarität und bilden definierte Zell-Zell-Kontakte aus [151]. Die Zellen werden in MEM-Medium mit Earls Salzen (SA) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FBS Superior stabil[®], BS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (SA) kultiviert. Zur Ablösung während der Zellpassage wird eine 0,25 %ige Trypsin/EDTA-Lösung (SA) verwendet, mit der die Zellen für $t \approx 10$ min bei $T = 37^\circ\text{C}$ und $c(\text{CO}_2) = 5\%$ inkubiert werden. Bei Konfluenz bilden die MDCK-II-Zellen einen zusammenhängenden Zellrasen mit Kopfsteinpflaster-ähnlichem Muster aus.

3.2.4. HEK-293-Zelllinien

Zur Untersuchung der Wundheilungsstimulation von menschlichen Zellen sowie des Einflusses von SPPL3-Proteasen auf die Wundheilungsgeschwindigkeit werden in dieser Arbeit vier

verschiedene gentechnisch veränderte HEK(engl. *Human Embryonic Kidney*)-293-Zelllinien verwendet, deren Eigenschaften und spezifische Behandlung hier kurz erläutert werden sollen. Die HEK-293-Zelllinie wurde ursprünglich 1977 durch Modifikation von primären HEK-Zellen mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5 verändert und enthält die Nucleotide 1-4344 des Ad5 [152, 153]. Die Zellen besitzen eine hohe Zellteilungsrate, sind sehr suszeptibel für weitere Transfektionen und gehören zu einer der am häufigsten verwendeten Zelllinien zur Produktion von biotherapeutischen Proteinen [154]. In dieser Arbeit werden genetisch weiter modifizierte Zelllinien der HEK-T-RExTM-293-Grundzelllinie (InvitrogenTM, TF) verwendet, die im Rahmen eines Kooperationsprojektes durch den Lehrstuhl für Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Regina Fluhner erworben und wie im Folgenden beschrieben weiter modifiziert wurde. Das Grundmedium zur Kultivierung dieser Zellen ist GlutaMAXTM-Medium (GibcoTM, TF) unter Zugabe von 1 % L-Glutamin (200 mM, TF), 1 % PenStrep (TF) und 10 % FBS (Fetal Bovine Serum, SA). Durch Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin zum Medium können in den HEK-T-RExTM-293-Zellen spezifische Gene, eingebracht auf dem Vektor pcDNA 4TO/myc/his, exprimiert werden [155].

HEK-T-RExTM-293 (HEK-TR)

Die HEK-TR-Zelllinie ist mit dem T-RExTM-System (engl. *Tetracycline-Regulated Expression*) versehen [156], sodass sie den Tet-Repressor des Plasmids pcDNATM (Vektor) stabil exprimiert. Sie wird im Grundmedium unter Zugabe von $c_{\text{Blast}} = 5 \mu\text{g/ml}$ Blastocidin (GibcoTM, TF) kultiviert, wird im Folgenden mit *HEK-TR* abgekürzt und dient als Kontrollzelllinie für die im Folgenden aufgeführten Zelllinien mit modifizierter SPPL3-Expression.

HEK-293-TR-SPPL3-KO (HEK-KO)

Die HEK-293-TR-SPPL3-KO-Zellen, im Folgenden abgekürzt mit *HEK-KO* (engl. KO: *knock-out*), wurden wie oben erwähnt durch den Lehrstuhl für Biochemie mittels CRISPR/Cas9 (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9*) mit dem Vektor pCMV-Cas9-GFP und entsprechenden Guide-RNAs so verändert, sodass sie keine SPPL3-Proteasen exprimieren. Dies führt zu einer Hyperglykosylierung der Proteine und Glykolipide in der Zellmembran [71, 157]. Auch die HEK-KO-Zellen werden im HEK-293-Grundmedium unter Zusatz von Blastocidin kultiviert.

HEK-293-TR-SPPL3-WT-HA (HEK-WT)

Die HEK-293-TR-SPPL3-WT-HA-Zellen, im Folgenden abgekürzt mit *HEK-WT* (engl. WT: *wild type*), sind mittels des Vektors pcDNA4 TO myc/his A genetisch so verändert, dass sie die SPPL3-Protease mit einem C-terminalen Hämagglutinin(HA)-Tag überexprimieren, was zu einer Hypoglykosylierung führt [71]. Sie werden in dem Grundmedium unter Zusatz von

Blasticidin und $c_{Zeo} = 200 \mu\text{g/ml}$ Zeocin (ZeocinTM Selection Reagent, GibcoTM, TF) gehalten. Die Induktion der SPPL3-Proteasen erfolgt unter Zugabe von $c_{Dox} = 1 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin (TB) für mindestens $t = 24 \text{ h}$ vor Beginn des Experiments zum Kulturmedium.

HEK-293-TR-SPPL3-D/A-HA (HEK-D/A)

Die HEK-293-TR-SPPL3-D/A-HA-Zellen, im Folgenden abgekürzt mit *HEK-D/A*, sind mittels des Vektors pcDNA4 TO myc/his A genetisch so verändert, dass sie eine katalytisch inaktive Mutante der SPPL3-Proteasen überexprimieren und somit keine Hypoglykosylierung der Membranproteine und Glykolipide entsteht [71]. Die HEK-D/A-Zelllinie besitzt ebenfalls einen HA-Tag. Auch die Überexpression der inaktiven SPPL3-Mutante wird durch Zugabe von Doxycyclin im Zellkulturmedium induziert und das Kultivierungsmedium ist ebenfalls das Grundmedium unter Zugabe von Zeocin und Blasticidin.

3.3. Particle Image Velocimetry zur Charakterisierung von Strömungsfeldern

Im Laufe dieser Arbeit wurden zur Charakterisierung der verwendeten Versuchsaufbauten auch akustisch generierte Strömungsfelder auf den SAW-Chips untersucht. Hierfür eignet sich die Methode der *Particle Image Velocimetry* (PIV), einem nicht-invasiven optischen Verfahren, mit dem Geschwindigkeitsfelder bestimmt werden können. Dazu wurde in dieser Arbeit eine Hochgeschwindigkeitskamera (Photron FASTCAM Mini UX 50, PH) eingesetzt, um Carboxylat-Polystyrol-Mikrokugeln (engl. *carboxylate polystyrene microspheres*, PS) mit einem Durchmesser $d = 3 \mu\text{m}$ auf verschiedenen Ebenen der SAW-generierten Strömung nachzuverfolgen. Für die Suspension werden $V = 10 \mu\text{l}$ der Mikrokugel-Lösung mit $V = 150 \mu\text{l}$ OptiPrepTM-Medium (SA), durch das ein Absinken der Kugeln verhindert wird und $V = 840 \mu\text{l}$ destilliertem Wasser vermischt. Die Analyse der Hochgeschwindigkeitsaufnahmen erfolgt mittels eines von Dominik Breyer entwickelten Matlab-Skripts basierend auf der Open-Source-Software *PIVlab* von Thielicke [158, 159]. Damit können beispielsweise die Schergeschwindigkeit $\dot{\gamma}$ und die Schubspannung τ der akustischen Strömung am Ort Zellen ermittelt werden. Manuell kann $\dot{\gamma}$ aus dem Unterschied Δv der Geschwindigkeitsbeiträge $|\vec{v}| = \sqrt{v_x^2 + v_y^2}$ zwischen zwei Ebenen mit sehr kleinem Abstand (z.B. $\Delta z = 50 \mu\text{m}$) näherungsweise bestimmt werden: $\dot{\gamma} \approx \frac{\Delta v}{\Delta z}$. Die Schubspannung τ wird berechnet durch:

$$\tau = \eta \dot{\gamma}, \quad (3.1)$$

wobei η die Viskosität ist (z.B. Wasser bei $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$: $\eta \approx 0,89 \text{ mPa s}$ [160]).

3.4. Methoden zur Untersuchung des Zytoskeletts von Endothelzellen

Zur Beantwortung der Fragestellung, wie sich die Eigenschaften von Endothelzellen aus humanen Aorten unter Einfluss akustisch erzeugter Strömungsfelder verändern, wurde in dieser Arbeit ein *Aorta-on-a-SAW-Chip*-Versuchsaufbau basierend auf dem in 3.1 vorgestellten SAW-Chip-Design entwickelt.

3.4.1. Versuchsaufbau Aorta-on-a-SAW-chip

Eine technische Zeichnung des hier vorgestellten Versuchsaufbaus zur Untersuchung von Endothelzellen aus humanen Aorten unter dem Einfluss akustischer Strömung ist in Abbildung 3.4 zu sehen. Hierfür werden im ersten Schritt nach dem allgemeinen Protokoll in Anhang C.2 und den unter 3.2 aufgeführten Spezifikationen HAEC-Zellen aus der Zellkulturflasche abgelöst und konfluent auf einem mit aus Rattenschwanz-Sehnen gewonnenen Kollagen-I (IB) beschichteten Deckglas ($l \times b \times d = 17,5 \times 17,5 \times 0,16$ mm, PM) mit einer Zelldichte von $\rho_Z \approx 3 \times 10^5$ 1/cm² ausgesät, wo sie zunächst statisch für $t \approx 20$ h bei $T = 37^\circ\text{C}$ und $c(\text{CO}_2) = 5\%$ inkubiert werden. Als Behältnis für das Zellkulturmedium wird eine runde PDMS-Kammer verwendet, die mit einer Silikonpaste (Korasilon[®], KO) auf dem Deckglas befestigt wird. Die benötigte Konzentration von Kollagen-I wurde nach den Herstellerangaben mithilfe der Fläche der PDMS-Kammer $A_{\text{PDMS}} = \pi r^2 = \pi(0,8 \text{ cm})^2 \approx 2,0 \text{ cm}^2$, des Volumens $V_M = 100 \mu\text{l}$ des Zellkulturmediums in der Kammer und der empfohlenen Dichte des Kollagens $\rho_C = 5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ berechnet [161].

$$C_C = \frac{A_{\text{PDMS}} \cdot \rho_C}{V_M} \approx 100 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}. \quad (3.2)$$

Die Vorratslösung wird daraufhin mit Essigsäure ($c_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 17,5 \text{ mM}$) auf die Zielkonzentration verdünnt.

Im nächsten Schritt wird der über Nacht konfluent gewachsene HAEC-Zellrasen zweimal mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gespült und die PDMS-Kammer mit $V = 120 \mu\text{l}$ frischem Zellkulturmedium aufgefüllt. Anschließend wird das Deckglas in eine 3D-gedruckte Halterung gelegt und der SAW-Chip mithilfe von Schrauben auf dem Versuchsaufbau befestigt, sodass die Kammer geschlossen ist. Im Mikroskop-Stageinkubator (IB) wird anschließend mit einem SML01-Signalgenerator (RS) ein kontinuierliches SAW-Signal mit einer Leistung von $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$ angelegt. In Abbildung 3.4 ist das Schema des *Aorta-on-a-SAW-chip*-Aufbaus gezeigt. Der Mikroskopinkubator ist dabei so eingestellt, dass die Temperatur in der PDMS-Kammer stets den normalen Kultivierungsbedingungen der Zellen ($T = 37^\circ\text{C}$, $c_{\text{CO}_2} = 5\%$) entspricht. Nach $t = 3$ h Behandlung der Zellen mit akustischer Strömung bei $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$ bzw. $P_{\text{in}} = 21 \text{ dBm}$ werden die Zellen mit 4% methanolfreiem Formaldehyd (TF) fixiert und es wird anschließend die Markierung der Aktinfilamente und der Zellkerne mit Fluoreszenzfarbstoffen nach den unter 3.6.3 und Anhang C.5 beschriebenen Schritten durchgeführt. Mit den Mikroskopen Zeiss Axiovert 200M und Zeiss Axio Observer 7 (CZ) werden unter

Verwendung eines 20x-Objektivs (UCPlan FL N, OL) und einer CMOS-Kamera (Orca 5G, HP) verschiedene Bereiche im akustischen Strömungsfeld aufgenommen. Das Strömungsfeld wurde zuvor mittels *Particle Image Velocimetry* charakterisiert (vgl. 3.3).

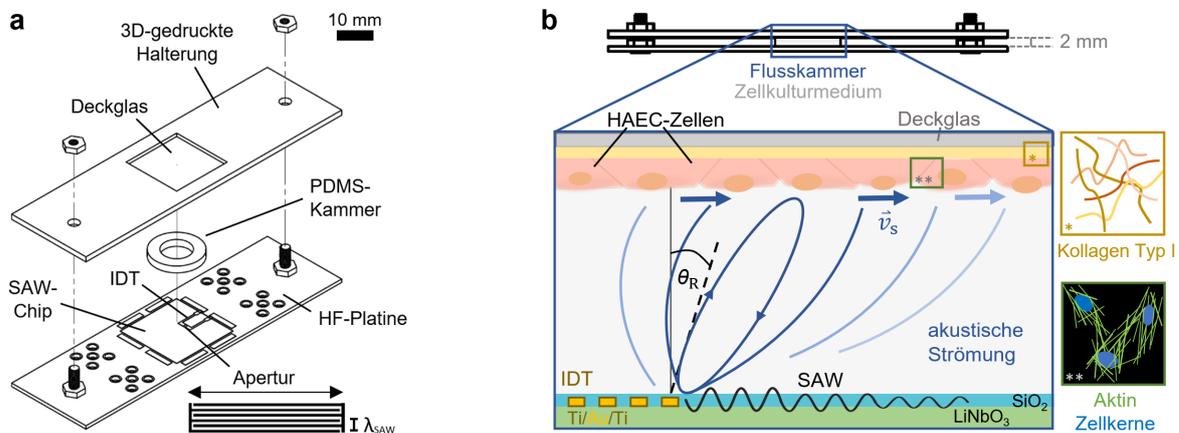


Abbildung 3.4: *Aorta-on-a-SAW-Chip*-Aufbau als Modell zur Untersuchung von Endothelzellen aus humanen Aorten unter dem Einfluss von akustisch erzeugter Strömung: a) Explosionsdarstellung des Versuchsaufbaus, b) Seitenansicht des Aufbaus mit schematisch vergrößerter Darstellung der Flusskammer auf dem SAW-Chip und der dort erzeugten akustischen Strömung.

3.4.2. Analyse von Aktinfilament- und Zellkern-Eigenschaften in Endothelzellen aus humanen Aorten

Die Analyse der Aktinfilament- und Zellkerneigenschaften der Endothelzellen erfolgt grundsätzlich analog zu den unter Kapitel 3.6.3 beschriebenen Auswertungsmethoden.

In den Auswertungsskripten *Filament Analyzer* bzw. *Nuclei Analyzer*, die unter 3.6.3 vorgestellt werden, wird dabei berücksichtigt, dass sich aufgrund der verschiedenen Positionen der Bildaufnahmen im Strömungsfeld verschiedene Bezugsrichtungen der Filament- und Zellkernorientierung relativ zur Strömungsrichtung ergeben. So wird die im jeweiligen Bereich herrschende Richtung der Strömung auf $\alpha_0 = 0^\circ$ gesetzt und die Orientierungen der Zellkerne und Filamente relativ zu diesem Winkel analysiert. In Abbildung 3.5 ist das Analyseschema von F-Aktinfilamenten und Zellkernen in HAEC-Zellen grafisch dargestellt. Neben der Winkelverteilung werden auch die Filamentdichte pro Zelle $\rho_F = N_F/N_N$, Breite b_F und Länge l_F der Filamente sowie die Elliptizität C_N der Zellkerne gemäß Formel 3.6.3 untersucht.

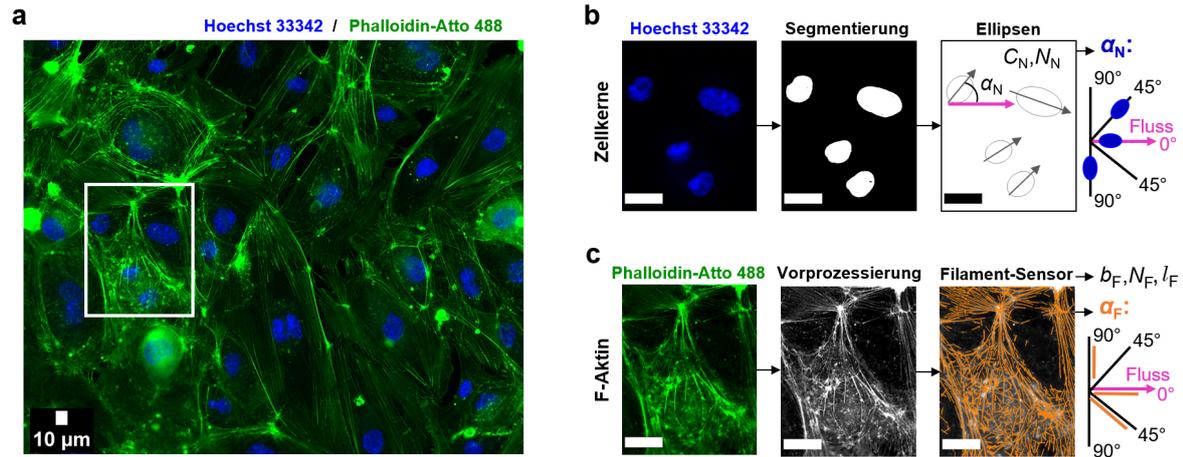


Abbildung 3.5: Analysemethodik zur Evaluation der Aktinfilament- und Zellkerneigenschaften in HAEC-Zellen: a) Überlagertes Fluoreszenzbild eines konfluenten HAEC-Zellrasens mit den Farbstoffen Hoechst 33342 (Zellkerne) und Atto-Phalloidin 488 (F-Aktin), b) Vorgehensweise bei der Zellkernanalyse anhand einer vergrößerten Darstellung des gekennzeichneten Bereichs aus a): das Rohbild wird zunächst mittels Ilastik segmentiert und die Zellkerne anschließend in ImageJ durch Ellipsenfitting angenähert, woraus sich die Orientierung α_N , Anzahl N_N und die Elliptizität C_N der Zellkerne ergeben, c) Vorgehensweise bei der Aktin-Analyse: das Rohbild wird mit dem Filament-Sensor vorprozessiert und die Filamente detektiert, woraus die Filamentbreite b_F , -länge l_F , -anzahl N_F und der Filamentwinkel α_F ermittelt werden können. Alle Skalenbalken entsprechen $x = 10 \mu\text{m}$.

3.5. Methodik zur Analyse von Neuritenwachstum in akustischen Stehwellenfeldern

3.5.1. Versuchsaufbau zum Zell-Patterning

Der Versuchsaufbau zum Zell-Patterning wurde von Dr. Manuel Brugger entwickelt [2] und die Experimente zum SAW-geführten Neuritenwachstum von Sebastian Angermann (MSc.) und Dr. Brugger durchgeführt [162]. Die Datenanalyse wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und optimiert, wie unter 3.5.2 aufgeführt wird. Das Messverfahren zur Untersuchung von SAW-gerichtetem Neuritenwachstum basiert dabei auf der Methode des Zell-Patterning, dessen Versuchsaufbau in Abbildung 3.6 gezeigt ist.

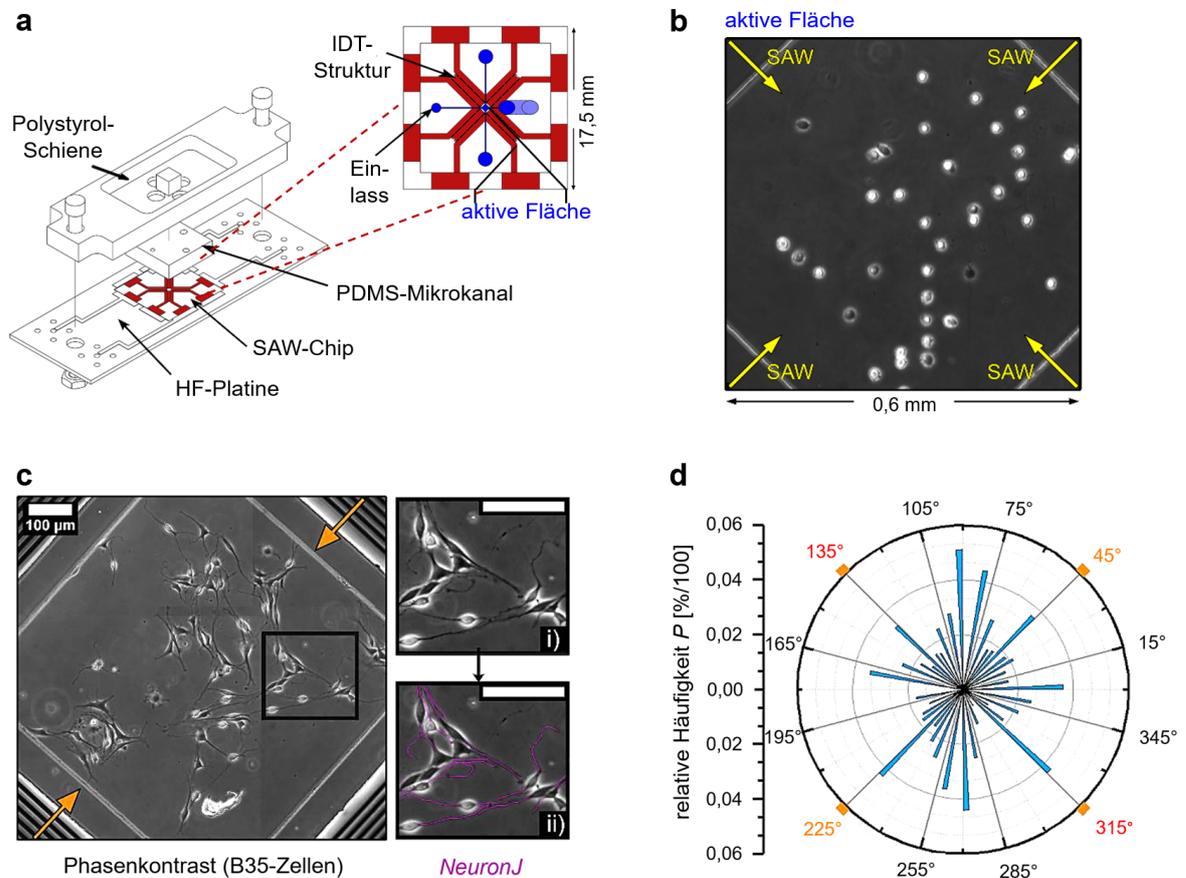


Abbildung 3.6: Versuchsaufbau und Analyseschematik zur Untersuchung von Neuritenwachstum im SAW-Stehwellenfeld: a) technische Zeichnung des Versuchsaufbaus zum Zell-Patterning im Mikrokanal auf einem SAW-Chip (entnommen und angepasst aus [2]), b) Phasenkontrastaufnahme des Zell-Patternings auf der aktiven Fläche des Chips mit B35-Zellen während des Adhäsionsprozesses in einem zweidimensionalen SAW-Stehwellenfeld (entnommen und angepasst aus [25]), c) Phasenkontrastbild der aktiven Fläche eines mit B35-Zellen bewachsenen Chips nach $t = 10$ h Neuritenwachstum unter Inkubation mit DcAMP (ohne SAW-Behandlung) und vergrößertes Beispiel für die Nachverfolgung der Neuritenausrichtung mit NeuronJ (angepasst aus [162]), d) entsprechende relative Häufigkeitsverteilung der Neuritenausrichtung in der unbehandelten Kontrollprobe, wobei die theoretischen SAW-Vorzugsrichtungen orange markiert sind (angepasst aus [25]).

Das Prinzip der Objektorientierung in akustischen Stehwellenfeldern wird in 2.3.2 beschrieben. Wie in Abbildung 3.6a gezeigt, besteht der Kern des Versuchsaufbaus aus einem SAW-Chip mit vier gegenüberliegenden IDTs, auf dem ein Mikrokanal aus Polydimethylsiloxan (PDMS, MV) aufgebracht wird. Durch seine hohe Biokompatibilität ist PDMS für mikrofluidische Anwendungen mit Zellkulturen geeignet [163]. Der Kanal ($h = 37 \pm 1 \mu\text{m}$, $V_K \approx 0,013 \mu\text{l}$) wurde dabei zuvor durch Aufgießen des Elastomers (Verhältnis 9:1 der Basiskomponente zu Linker-Komponente) in eine Negativ-Form und Aushärten bei $T = 70^\circ\text{C}$ hergestellt und besitzt einen Ein- und einen Auslass für die Zellsuspension. Durch Aufbringen des Kanals wird die bei Rayleigh-Wellen auftretende akustische Strömung unterdrückt. Die aktive Fläche in der Mitte des Chips ist mit PLL (Poly-L-Lysin, SA) beschichtet. Hier wird mithilfe eines Eigenbau-Multifunktionsgenerators (Dr. Manuel Brugger, vgl. [2]) ein zweidimensionales SAW-Stehwellenfeld mit $f_{\text{res}} \approx 71 \text{ MHz}$ und $\lambda_{\text{SAW}} \approx 50 \mu\text{m}$ erzeugt. Mittels einer 250 μl -Spritze (HB) und einer Spritzenpumpe (neMESYS, CE) wird die Suspension aus B35-Zellen (Konzentration: $c_{\text{B35}} \approx 10^6 \text{ ml}^{-1}$) durch den Einlass in den Mikrokanal gepumpt und in den Knotenpunkten des SAW-Stehwellenfeldes bei $P_{\text{in}} = 18 \text{ dBm}$ angeordnet, wo die Zellen nach $t \approx 1 \text{ min}$ adhären (vgl. Abbildung 3.6b). Zur Stabilisierung des Aufbaus und zur Versorgung der Zellen mit Nährstoffen ist eine Polystyrol-Schiene mit einem Behälter für frisches Zellkulturmedium auf dem Mikrokanal angebracht, sodass frisches Medium durch Diffusion in den Kanal gelangt. Nach der Adhäsion der Zellen wird $V = 1 \text{ ml}$ Zellkulturmedium versetzt mit $n = 2 \text{ mM}$ DcAMP (Dibutyryl Adenosin-3,5-Monophosphat, SA) in das Behälter gegeben und dadurch die Ausdifferenzierung der B35-Zellen eingeleitet. Anschließend werden die B35-Zellen bis zu $t = 40 \text{ h}$ in einem eindimensionalen Stehwellenfeld inkubiert. Der Wachstumsprozess der Neuriten wird mittels *Live Cell Imaging* in einem Stageinkubator (IB) bei $T = 37^\circ\text{C}$ und $c(\text{CO}_2) = 5\%$ auf einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss Axiovert 200M, CZ) und einer CMOS-Kamera (Orca 5G, HP) aufgezeichnet.

3.5.2. Analysemethodik zu SAW-gerichtetem Neuritenwachstum

Die Analyse der Phasenkontrastbilder wurde von Sebastian Angermann (MSc.) initiiert [162] und im Rahmen dieser Arbeit fortgeführt und optimiert. Wie in Abbildung 3.6c und d gezeigt, basiert die Analyse des Neuritenwachstums auf dem ImageJ-Plugin *NeuronJ* [164, 165]. Dabei werden die Neuriten in den Phasenkontrastbildern halbautomatisiert in kleine Segmente unterteilt ($L = 3\text{-}4 \mu\text{m}$) und deren Winkelverteilung ($0\text{-}360^\circ$) bestimmt. Mittels eines Python-Skripts wird anschließend die relative Häufigkeit P der Neuritensegmentorientierung bestimmt und zusammengefasst. Dabei werden die Winkel in Klassen mit einer Breite von $\Delta\alpha = 3^\circ$ aufgeteilt. Bei der Berechnung der relativen Häufigkeit wurden aufgrund der Winkelabhängigkeit der detektierten Neuritensegmentlänge die Skalierungsfaktoren $g_\alpha = \frac{1}{\cos\alpha}$ bzw. $g_\alpha = \frac{1}{\sin\alpha}$ definiert, die durch Multiplikation mit der detektierten Anzahl der Neuritensegmente $N(\alpha)$ in der Häufigkeit der Klasse miteingehen. Dies führt zu der relativen Häufigkeitsverteilung P , die in Abbildung 3.6d am Beispiel einer nicht mit SAW behandelten

Probe exemplarisch gezeigt ist. Um die Auswirkung der SAW-Ausbreitungsrichtung auf die Orientierung der Neuriten zu untersuchen, wird die Klassenbreite im Python-Skript anschließend auf $\Delta\alpha = 30^\circ$ erhöht. So können separat beispielsweise die Häufigkeiten der Richtungen entlang und senkrecht zur Ausbreitungsrichtung der Welle $\alpha_p = (45^\circ \pm 15^\circ, 225^\circ \pm 15^\circ)$ und $\alpha_s = (135^\circ \pm 15^\circ, 315^\circ \pm 15^\circ)$ analysiert und miteinander verglichen werden.

3.6. Methodik zur Charakterisierung von Zellmechanismen im Wundheilungsmodell

3.6.1. Versuchsaufbau von Wundheilungsassays auf SAW-Chips

Zur Vermessung von Wundheilungsassays auf SAW-Chips wird in dieser Arbeit die Methodik der Zellexklusion (engl. *cell exclusion*) angewendet [19]. Dabei wird durch eine künstliche Barriere zwischen zwei konfluent mit Zellen bewachsenen Flächen eine zellfreie Fläche geschaffen. Ein detailliertes Protokoll zu der Vorgehensweise ist in Anhang C.4 zu finden. Als Barrieren werden in dieser Arbeit Culture Inserts von Ibidi® (IB) verwendet, wie der technischen Zeichnung des Versuchsaufbaus in Abbildung 3.7a zu entnehmen ist. Die Culture Inserts werden am ersten Versuchstag mit einem Abstand von $\Delta x = 50 \pm 10 \mu\text{m}$ der Barriere vom IDT manuell auf den Chips aufgebracht und anschließend mit Zellsuspension befüllt. Eine PDMS-Kammer, die ebenfalls auf den Chips aufgebracht und mittels einer Silikon-Paste (KO) abgedichtet wurde, wird zusätzlich mit $V = 1 \text{ ml}$ Zellkulturmedium zur Gewährleistung der Nährstoffversorgung der Zellen befüllt. Nach einer Anwachszeit der Zellen von $t = 24 \text{ h}$ wird das Culture Insert am zweiten Versuchstag entfernt und dadurch der Wundheilungsprozess durch das Einsetzen des natürlichen Zellwachstums in den zellfreien Bereich hinein initiiert.

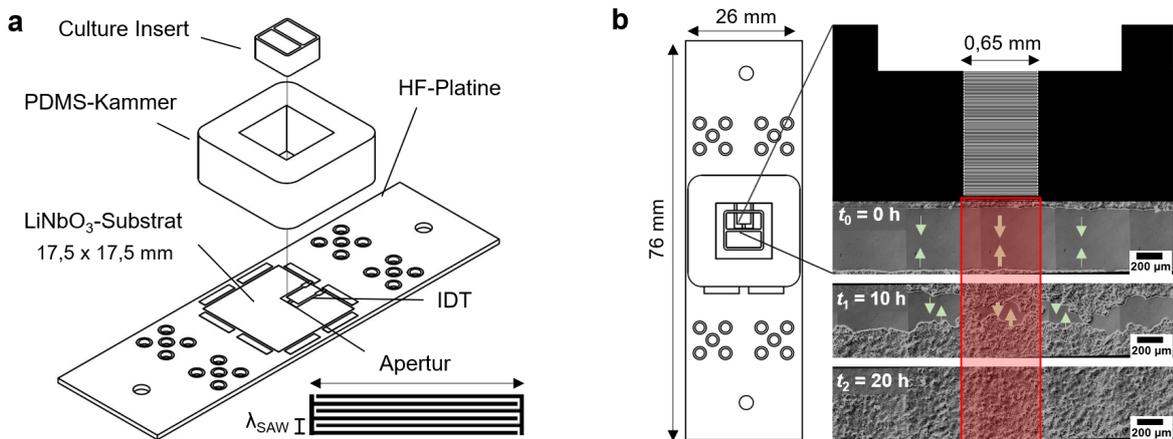


Abbildung 3.7: Versuchsaufbau zur Messung von Wundheilungsassays auf SAW-Chips (angepasst aus [21]). a) Explosionsdarstellung des Aufbaus, b) Draufsicht des Aufbaus mit Abmessungen der Platine und der Apertur sowie exemplarischen Phasenkontrast-Scans eines SAW-stimulierten Wundheilungsprozesses.

Der Wundheilungsprozess kann somit als Abnahme der zellfreien Fläche A mit der Zeit beschrieben werden. Die Fläche A , die im Folgenden auch als „Wunde“ bezeichnet werden soll, wird mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops (Zeiss Axiovert 200M, CZ) mit automatisierter Positionssteuerung des Mikroskoptischs (LE) und einer CMOS-Kamera (Orca 5G, HP) innerhalb der Proben überwacht. Dabei befinden sich die SAW-Chips während der gesamten Messzeit im Stageinkubator auf dem Mikroskop, der die für die Zellkultur optimalen Bedin-

gungen $T = 37^\circ\text{C}$ und $c(\text{CO}_2) = 5\%$ aufrecht erhält. In Abbildung 3.7b ist der Versuchsaufbau sowie ein exemplarischer SAW-stimulierter Wundheilungsprozess anhand ausgewählter Phasenkontrast-Scans zu den Zeitpunkten $t_1 = 0\text{ h}$, $t_2 = 10\text{ h}$ und $t_3 = 20\text{ h}$ skizziert. Die vollständige Schließung der künstlichen Wunde nach $t_3 = 20\text{ h}$ entspricht dem Abschluss der Messung. In den Scans ist der Schallpfad vor der Apertur markiert, in dem die Zellen unter direktem Einfluss der akustischen Oberflächenwelle stehen und zu schnellerem Zellwachstum stimuliert werden sollen.

3.6.2. Datenanalyse mittels Deep-Learning-Algorithmus zur automatisierten Charakterisierung der Wundheilungsgeschwindigkeit

Die Quantifizierung der Wundheilungsgeschwindigkeit erfolgt in dieser Arbeit automatisiert mithilfe des Deep-Learning-basierten Algorithmus NeuCED (Neural Cell Edge Detector) und soll im Folgenden beschrieben werden. Der Deep-Learning-Algorithmus basiert auf SegFormer, einem semantischen Gerüst zur Bildsegmentierung [166], und wurde in dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Michelle Lienhart (MSc.) und Prof. Dr. Rainer Lienhart zur Anwendung auf SAW-stimulierte Wundheilungsassays angepasst, trainiert und optimiert. Der Trainingsdatensatz basierte dabei zum Teil auf manuell mit ImageJ segmentierten Bildern von Dr. Manuel Brugger [2]. Eine detaillierte Beschreibung von SegFormer bzw. NeuCED ist in [166] bzw. [21] zu finden.

Zur Analyse der Wundheilungsgeschwindigkeit und damit der Stimulationseffizienz E einer Probe wird die mit Zellen bewachsene Fläche auf jedem Bild automatisch durch NeuCED erkannt und das Bild binarisiert. Die zellfreie Fläche A wird weiß und der Rest des Bildes schwarz segmentiert. Dabei werden zwei Hauptmodule durchlaufen: Zuerst generiert ein hierarchischer Transformer-Enkodierer hoch aufgelöste, grobe Merkmale und niedrig aufgelöste, feine Merkmale [167–171]. Anschließend vereint ein leichtgewichtiger MLP-Dekodierer (MLP: engl. *multilayer perceptron*) diese mehrstufigen Merkmale und erstellt eine finale semantische, segmentierte Maske des initialen Phasenkontrastbildes. Eine Übersicht über die Architektur von NeuCED ist in Abbildung 3.8a dargestellt. Im Anschluss an die Segmentierung wird die zellfreie Fläche A über die Anzahl weißer Pixel in jedem Bild bestimmt. Eine Analyse-Schematik zur Bestimmung der Wundheilungsgeschwindigkeit ist anhand eines exemplarischen SAW-stimulierten Wundheilungsprozesses in den Abbildungen 3.7b-d dargestellt. In Abbildung 3.7d ist der Verlauf der auf die Anfangszellfläche $A_{i,0}$ normierten zellfreien Fläche A als Funktion der Zeit für drei entlang der Wunde positionierten Analysebereiche (linker Kontrollbereich, Aperturbereich und rechter Kontrollbereich) aufgetragen. Die Fläche $A_{i,0}(t_0) = 1,0$ bezeichnet dabei die zellfreie Fläche im ersten Bild direkt nach Entfernen des Culture Inserts, während $A_e(t_e) = 0,0$ einer vollständig geschlossenen Wunde entspricht. Der Verlauf einer Kurve kann mittels linearer Regression angenähert werden. Wie aus Abbildung 3.7d hervorgeht, weicht $A(t)$ bei allen Kurven zu Beginn und am Ende des Wundheilungsprozesses von einem linearen Verlauf ab. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die

Zellen unmittelbar nach Entfernen des Culture Inserts noch nicht in die Richtung der Wunde polarisiert sind. Zudem kann die Wundschließung am Ende durch inhomogene Kollisionen der Zellfronten entlang der Wunde verlangsamt sein. Aus diesen Gründen wird die folgende lineare Approximation für alle Proben in dem Intervall $A \in [0,8; 0,2]$ durchgeführt:

$$A_i = v_i t + A_{i,0}, \quad (3.3)$$

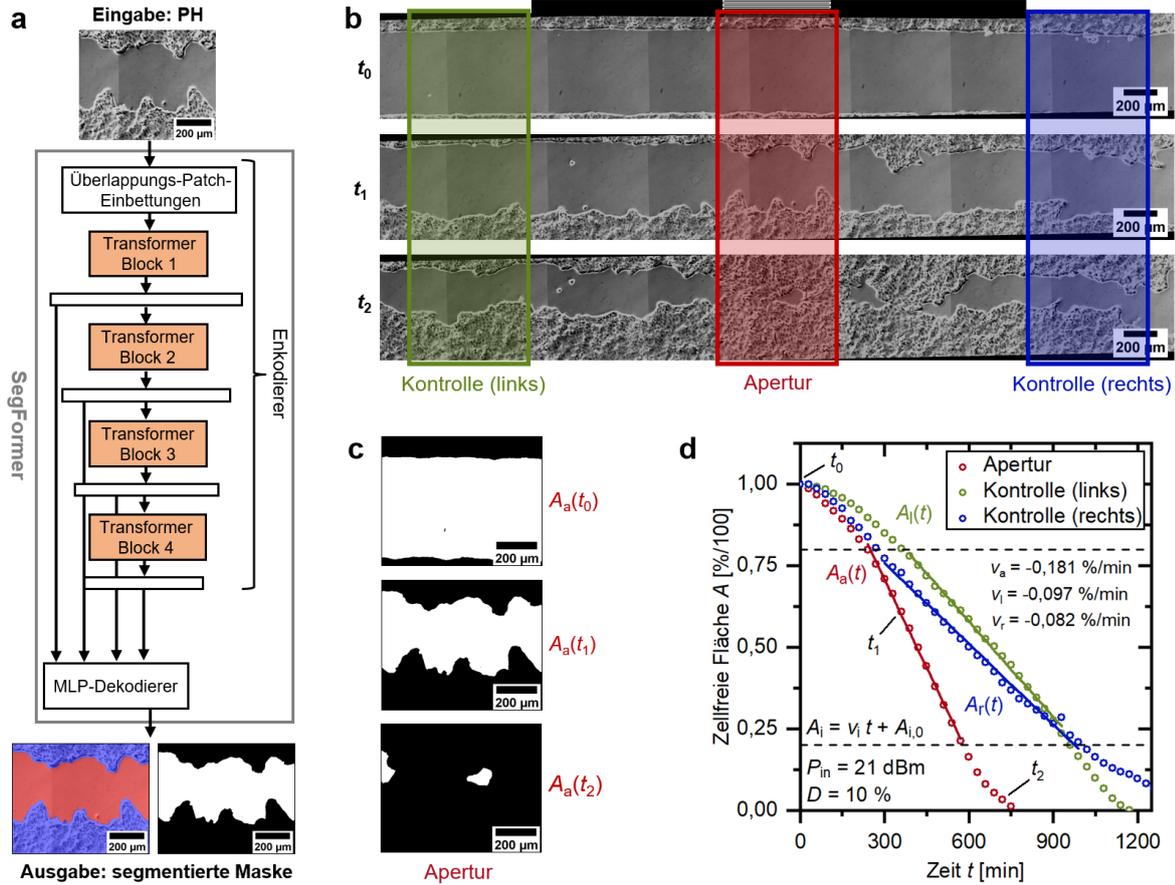


Abbildung 3.8: Analysemethodik zur automatisierten Ermittlung der Stimulationseffizienz von Wundheilungsassays mittels Deep Learning (angepasst aus [21]). a) Architektur des auf SegFormer basierenden Deep-Learning-Algorithmus NeuCED zur automatisierten Segmentierung von Phasenkontrastbildern einer Wunde, b) exemplarische Phasenkontrast-Scans einer Wunde zu den Zeitpunkten $t_0 = 0$ h, $t_1 = 6$ h und $t_2 = 12$ h während des Wundheilungsprozesses, in denen die drei zu analysierenden Bereiche (ROIs, engl. *regions of interest*) markiert sind, c) binarisierte Bilder im Aperturbereich zu den jeweiligen Zeitpunkten, d) Verlauf der zellfreien Fläche A während des hier gezeigten Wundheilungsprozesses, wobei der Index i in $A_i(t)$ für Apertur (a), Kontrolle links (l) oder Kontrolle rechts (r) steht und die Steigung der linearen Fits die Wundheilungsgeschwindigkeit v_i beschreibt.

Die Steigung v_i der linearen Approximation liefert die Wundheilungsgeschwindigkeit in dem jeweiligen Bereich mit der Einheit $[v_i] = \frac{1}{\text{min}}$.

Die Stimulationseffizienz E der Wundheilung ergibt sich durch:

$$E = \frac{v_a}{\frac{1}{2}(v_r + v_l)}. \quad (3.4)$$

Eine Stimulationseffizienz von $E \approx 1,0$ bedeutet beispielsweise, dass keine Stimulation vorliegt, da sich die Wunde im Aperturbereich mit der gleichen Geschwindigkeit schließt wie die Kontrollbereiche. Proben mit $E > 1,0$ weisen dagegen eine Stimulation auf. Um statistische Schwankungen von E bei der Evaluation der Experimente zu berücksichtigen, werden in den Versuchsreihen in dieser Arbeit stets externe Kontrollen ohne angelegtes HF-Signal zum Vergleich hinzugezogen, die unter sonst gleichen Bedingungen hergestellt und vermessen wurden wie SAW-Proben.

3.6.3. Analyse von Zytoskelett- und Zellkern-Eigenschaften

Zytoskelett- und Zellkerndetektion mittels Fluoreszenzmikroskopie

Zur Charakterisierung von Zytoskelett- und Zellkern-Eigenschaften bei der SAW-stimulierten Wundheilung werden die Zellbestandteile F-Aktin und Zellkerne mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Dabei werden die Zellen mit spezifischen Farbstoffen markiert, die durch das durch Fluoreszenzfilter gefilterte Licht einer Quecksilberdampfampe mit einer Anregungswellenlänge λ_{ex} auf ein höheres Energieniveau angeregt werden und bei der Relaxation Licht mit einer Emissionswellenlänge λ_{em} emittieren.

Die Wundheilungsassays werden zunächst, wie in 3.6.1 und Anhang C.4 beschrieben, vorbereitet und anschließend bei $T = 37^\circ\text{C}$ und $c(\text{CO}_2) = 5\%$ für verschiedene Zeiten t unter SAW-Behandlung inkubiert. Anschließend wird die Messung beendet und die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, um Aktinfilamente und Zellkerne zu untersuchen. Der Farbstoff Phalloidin-Atto 488 (SA) bindet an F-Aktin und wird unter dem FITC-Fluoreszenzfilter ($\lambda_{\text{ex}} = 470 \pm 11 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 510 \pm 21 \text{ nm}$) sichtbar. Der Kernbestandteil des Farbstoffs, das Phalloidin, ist ein bizyklisches Heptapeptid, das aus dem hochgiftigen Knollenblätterpilz *Amanita phalloides* gewonnen wird und filamentöses F-Aktin bindet [172, 173]. Da Phalloidin nicht durch intakte Zellmembranen dringt [174], werden die Zellen vor der Zugabe des Farbstoffs zunächst mit 4% methanolfreiem Formaldehyd (TF) fixiert und anschließend mit Triton X-100 (SA) permeabilisiert. Zudem werden unspezifische Bindungen des Farbstoffs verhindert, indem die Probe zuvor mit einer 1%igen BSA-Lösung (Bovines Serumalbumin, SA) inkubiert wird. Ein detailliertes Protokoll zur Markierung der Wundheilungsassays mit Fluoreszenzfarbstoffen ist in Anhang C.5 zu finden. Um die Zellkerne zu untersuchen, wird nach der Markierung der Zellen mit Phalloidin-Atto 488 zusätzlich der Farbstoff Hoechst 33342 (NucBlueTM, TF) hinzugegeben, der an Adenin-Thymin-reiche Regionen der DNA bindet und unter dem DAPI-Filter ($\lambda_{\text{ex}} = 357 \pm 22 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 447 \pm 30 \text{ nm}$) sichtbar wird. Nach der Markierung der Zellen wird eine Fluoreszenzmessung am Mikroskop Zeiss Axio-

vert 200 M unter Verwendung eines 20x-Objektivs (UCPlanFL N, OL) durchgeführt. Hierzu werden Phasenkontrast- und Fluoreszenzbilder in den entsprechenden drei Bereichen (Kontrolle links, Apertur, Kontrolle rechts) entlang der Wunde aufgenommen, die bereits in Abbildung 3.8b gezeigt sind. Zur Vermeidung von Doppelbrechung aufgrund der Dicke des LiNbO₃-Substrats der SAW-Chips werden bei der Fluoreszenzmikroskopie Deckgläser ($l \times b = 24 \times 24$ mm, $h = 0,16$ mm, PM) von oben auf die Wundheilungsassays gelegt und alle Proben invertiert mikroskopiert. Zur genaueren Überprüfung der Filamentdicke wurden auch hochauflösende Messungen am Konfokalmikroskop Leica Stellaris 5 (LM) durchgeführt.

Datenanalyse zur Quantifizierung von Aktinfilament- und Zellkerneigenschaften

Nach Aufnahme der Aktinfilament- und Zellkern-Bilder können durch gezielte Datenanalyseverfahren Informationen zu verschiedenen Eigenschaften des Zytoskeletts und der Zellkerne extrahiert werden. Wie in Abbildung 3.9a dargestellt, wird 1) zur Vorprozessierung sowie 2) zur Erkennung von Liniensegmenten und Filamenten die halb-automatische Open Source-Software *Filament Sensor* (Version 2.0) verwendet, die auf einem KNN(engl. *K-Nearest Neighbors*)-Algorithmus basiert [175, 176]. Das in dieser Arbeit entwickelte Python-Skript *Filament Analyzer* dient anschließend zur Nachprozessierung der Daten und fasst für jedes Bild die mittlere Länge, die mittlere Breite sowie die Winkelverteilung der Filamente in variabel festlegbaren Klassenbreiten zusammen.

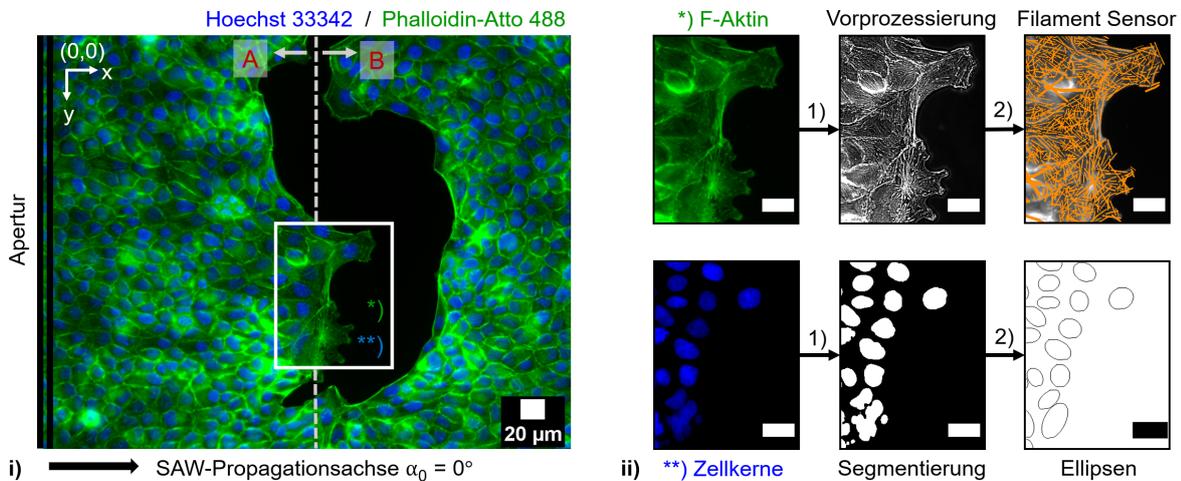


Abbildung 3.9: Analyseschematik der Aktinfilament- und Zellkerneigenschaften bei der SAW-stimulierten Wundheilung von MDCK-II-Zellen: i) exemplarische Fluoreszenzaufnahme vor der Apertur einer Probe nach $t = 18$ h Wundheilung, ii) Veranschaulichung der Schritte zur Bildprozessierung und Erkennung der Filamente eines vergrößerten Aktin- und Zellkernausschnitts.

In dieser Arbeit wird die Orientierung $\alpha \in [0^\circ, 90^\circ]$ der Filamente relativ zur SAW-Propagationsrichtung α_0 bestimmt und die Klassenbreite auf $\Delta\alpha = 30^\circ$ festgelegt. Daraus ergeben sich drei Klassen mit $\alpha = \alpha_m \pm \frac{\Delta\alpha}{2}$: $\alpha_p = 15^\circ \pm 15^\circ$ für Filamente parallel, $\alpha_d = 45^\circ \pm 15^\circ$ für Filamente diagonal und $\alpha_p = 75^\circ \pm 15^\circ$ für Filamente senkrecht zur SAW-Ausbreitungsrichtung,

wie später gezeigt wird. Das Bild der Zellkerne wird zunächst mithilfe der Machine-Learning-gestützten Software *Ilastik* vorprozessiert, indem eine halb-automatisierte Segmentierung der Zellkerne vorgenommen wird (vgl. Abbildung 3.9a) [177]. Mithilfe eines ImageJ-Macros wird anschließend eine Maske erstellt und die Umrisse der einzelnen Zellkerne durch Ellipsen approximiert. Anschließend werden die Daten mittels eines zum *Filament Analyzer* analogen Python-Skripts, dem *Nuclei Analyzer*, nachprozessiert. Die Ausgabe des Programms liefert die Winkelverteilung der langen Halbachsen der Ellipsen in Klassen sowie die mittlere Zirkularität C_N der Zellkerne, die definiert ist durch:

$$C_N = \frac{4\pi A_N}{p_N}, \quad (3.5)$$

wobei A_N und p_N die Fläche und den Umfang der Ellipse bzw. des Zellkerns bezeichnen. Die Analyse der Winkelverteilung der Zellkerne erfolgt analog zu den oben beschriebenen Filamentorientierungen. Bei der späteren Präsentation der Aktin- und Zellkern-Ergebnisse in Kapitel 4.4.3 zwischen einem IDT-nahen Bereich A ($x = 0-200 \mu\text{m}$) mit hoher SAW-Intensität und einem weiter entfernten Bereich B ($x \geq 200 \mu\text{m}$) mit niedrigerer SAW-Intensität unterschieden werden, wie in Abbildung 3.9 i) eingezeichnet ist.

3.6.4. Analyse von mechanosensitiven Proteinen

Das Verfahren zur Analyse von mechanosensitiven Proteinen im SAW-stimulierten Wundheilungsmodell basiert auf der Detektion von protein-spezifischen Antikörpern mittels Fluoreszenzmikroskopie. Hierzu werden zunächst Wundheilungsassays in dem unter 3.6.1 beschriebenen Versuchsaufbau angesetzt. Nach Entfernen des Culture Inserts wird der Wundheilungsprozess für verschiedene Zeiten t mit SAW stimuliert und die Zellen werden anschließend in 4% Formaldehyd fixiert. Die Markierung der Zellen mit Antikörpern und Hoechst 33342 sowie die Aufnahme der Fluoreszenz- bzw. Konfokalbilder erfolgten teilweise an der Universität Graz (Institut für Pharmazeutische Wissenschaften, Pharmazeutische Chemie) durch Prof. Dr. Hanna Engelke und Anderson Massahiro de Campos (MSc.). Unter Anhang C.6 ist ein Protokoll mit den detaillierten Schritten zum Markierungsverfahren zu finden. Eine 3D-gedruckte Probenhalterung zum sicheren Versand der auf den Chips fixierten Zellen nach Graz sowie die Analysemethodik mittels der Programme ImageJ und Python wurden im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Letztere ist in Abbildung 3.10 gezeigt.

Von den Zellkern- und Antikörper-Aufnahmen, wie beispielhaft in i) bzw. ii) für das Protein YAP gezeigt, wird in ImageJ zunächst der Hintergrund abgezogen und dann die Zellkern-Bilder mithilfe des Open Source-Programms Cellpose [178] binarisiert. Aus der so entstandenen Maske wird zusätzlich eine invertierte Maske erstellt und beide Masken werden anschließend in ImageJ jeweils einmal von dem Antikörper-Bild abgezogen, wie in iii) dargestellt. Ein Python-Skript ermittelt aus den so entstandenen Bildern für jeden Bereich entlang der

künstlichen Wunde separat die mittleren Antikörper-Intensitäten in den Zellkernen I_N sowie im Zytosol I_Z . Durch Vergleich der Intensitäten zwischen den in Abbildung 3.8b gezeigten Regionen kann die Auswirkung der SAW-Stimulation auf mechanosensitive Proteine quantifiziert werden.

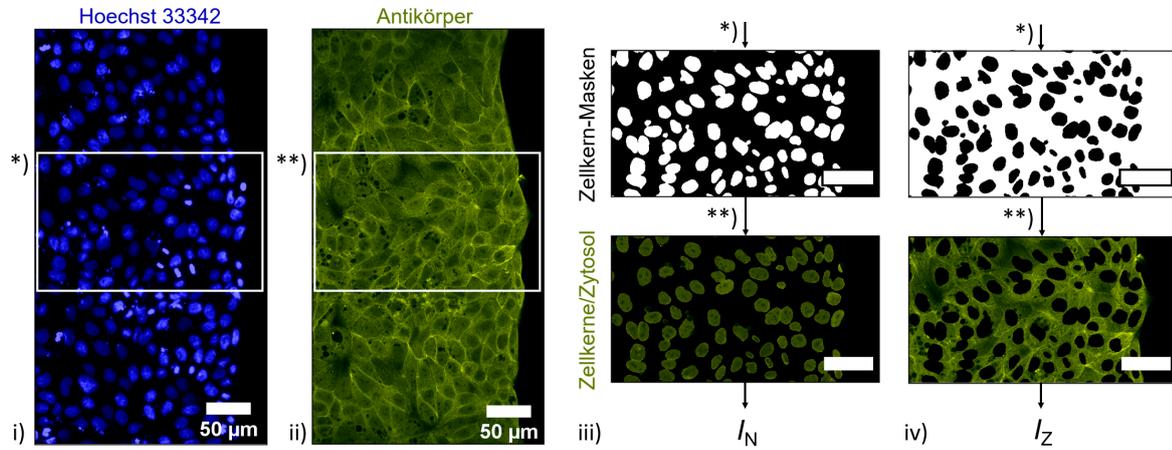


Abbildung 3.10: Analyse von mechanosensitiven Proteinen in Wundheilungsassays durch Antikörper-Konfokalaufnahmen am Beispiel des Proteins YAP: i) Konfokalaufnahmen des Aperturbereichs einer Kontrollprobe markiert mit dem Farbstoff Hoechst 33342 zum Zeitpunkt $t = 3$ h der Wundheilung, ii) entsprechende Aufnahme von YAP-Antikörpern. iii) Aus dem mit Hoechst 33342 markierten Bild werden Masken der Zellkerne erstellt, die von dem Bild der YAP-Antikörper abgezogen werden. Aus den verbliebenen Bildern der Zellkerne bzw. des Zytosols werden die mittleren Intensitäten I_N bzw. I_Z bestimmt.

4. Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der in den unter Kapitel 3 beschriebenen Versuchsaufbauten durchgeführten Experimente präsentiert werden. Alle Unterkapitel beschäftigen sich mit der grundlegenden Thematik, wie sich externe dynamisch modulierte Kraftfelder auf das Wachstumsverhalten von Zellen und die damit verbundenen intrazelluläre Mechanismen auswirken. Innerhalb der Abschnitte 4.1-4.4 sollen durch Prüfung spezifischer Hypothesen die folgenden drei Forschungsfragen beantwortet werden:

- 1) **Wie wirken sich durch akustische Strömung erzeugte dynamische Kraftfelder auf die Struktur von Endothelzellen aus?**
- 2) **Wie beeinflussen statische und dynamisch modulierte akustische Kraftfelder das Wachstumsverhalten verschiedener Zelllinien insbesondere im Kontext der Wundheilung?**
- 3) **Was sind zugrundeliegende intrazelluläre Mechanismen des Phänomens der durch akustische Kraftfelder stimulierten Wundheilung?**

Zur Beantwortung der ersten Frage werden im ersten Unterkapitel 4.1 Veränderungen der Zellstruktur unter dem Einfluss von akustisch erzeugten Strömungsfeldern analysiert. Dabei wird mithilfe einer im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Flusskammer (*Aorta-on-a-SAW-Chip*) untersucht, wie sich verschiedene Strömungsbedingungen auf das Aktin-Zytoskelett von Endothelzellen aus humanen Aorten auswirken.

Im zweiten Unterkapitel 4.2 wird das Wachstumsverhalten von Zellen in dynamisch modulierten akustischen Kraftfeldern ohne den Einfluss von Strömungen isoliert betrachtet. Dies gelingt durch Unterdrückung der akustischen Strömung in einem Mikrokanal. Anschließend werden die Wachstumsrichtungen von Neuriten in Abhängigkeit der auf dem SAW-Chip erzeugten Potentiallandschaften analysiert.

Das dritte und vierte Unterkapitel 4.3 und 4.4 beschäftigen sich mit dem Hauptfokus dieser Arbeit. Dabei sollen intrazelluläre Mechanismen bei der Stimulation von Wundheilung in dynamisch modulierten akustischen Kraftfeldern untersucht werden. Zunächst wird durch eine phänomenologische Herangehensweise das Wundheilungsverhalten von MDCK-II-Zellen unter Applikation verschiedener SAW-Parameter bei fortlaufenden akustischen Oberflächenwellen betrachtet und dabei auf biologische und physikalische Grenzen der zellulären Stimulierbarkeit eingegangen. Ebenfalls phänomenologisch wird im nächsten Schritt die Rolle der Zellmembran, spezifisch der Membranprotease SPPL3, bei der Wundheilung untersucht. Dabei werden vier verschiedene, teilweise genetisch modifizierte HEK293-Zelllinien und ihr Wundheilungsverhalten unter optimalen Stimulationsbedingungen analysiert, wobei Stimulationsbedingungen gewählt wurden, die in Vorarbeiten an anderen Zelllinien die maximale Stimulationseffizienz zur Folge hatten. Ein Blick weiter ins Zellinnere ermöglicht anschließend eine Analyse von mechanosensitiven Proteinen bei der Wundheilungsstimulation. Das

Verständnis der intrazellulären Mechanismen wird schließlich durch Untersuchungen der zeitlichen und örtlichen Veränderungen der Zellkerneigenschaften und des Aktin-Zytoskeletts sowie der Zellorientierung bei der SAW-stimulierten Wundheilung von MDCK-II-Zellen ergänzt und abgerundet. Dadurch ergibt sich ein stimmiges Gesamtbild, das die oben aufgeführten Forschungsfragen dieser Arbeit beantwortet.

Die folgenden Unterkapitel sind dabei in weiten Teilen auf Basis der folgenden Publikationen entstanden:

1. Baumgartner et al. (2022): *One-dimensional acoustic potential landscapes guide the neurite outgrowth and affect the viability of B35 neuroblastoma cells* [25]
2. Baumgartner and Westerhausen (2023): *Recent advances of surface acoustic wave-based sensors for noninvasive cell analysis* [30]
3. Baumgartner et al. (2024): *Pulsed surface acoustic waves accelerate wound healing and reveal new parameter limits for cell stimulation in vitro* [21]
4. Baumgartner et al. (eingereicht 2024): *Actin filament and cell orientation align with surface acoustic wave propagation and cell migration in vibration-enhanced wound healing* [179]
5. Baumgartner et al. (in Vorbereitung): *Aorta-on-a-SAW-Chip: Acoustic streaming generated by surface acoustic waves affects human endothelial cells as an in vitro aorta model* [180]

Der Beitrag der Autorin zu diesen Publikationen ist in den jeweiligen Abschnitten enthalten und spezifiziert.

4.1. Aorta-on-a-SAW-Chip: Endothelzellen in akustischen Strömungsfeldern

In diesem Abschnitt soll die Wirkung von durch akustische Strömung erzeugten Kraftfeldern auf die Struktur lebender Zellen untersucht werden. Besonders in Blutgefäßen kommt dem Einfluss von Strömung auf Zellen eine große physiologische Bedeutung zu. Viele pathophysiologische Prozesse wie der Transport von Makromolekülen durch die endotheliale Barriere, Veränderungen der Genexpression, Verkalkungen oder Entzündungen basieren auf strömungsbedingten biomechanischen Faktoren und sind beispielsweise in Erkrankungen wie Herzklappenstenosen oder Aortenaneurysmen involviert [181]. In der Aorta kommt es zu besonders starken Strömungen, sodass die die Aortenwand auskleidenden Endothelzellen hohen Schubspannungen ausgesetzt werden. Im Folgenden erfolgt die Umrechnung der Einheit Pascal (Pa) in die im Fachgebiet dieser Arbeit übliche Einheit dyn/cm^2 , wobei gilt: $1 \text{ dyn}/\text{cm}^2 = 0,1 \text{ Pa}$. In einer gesunden menschlichen thorakalen Aorta werden im zeitlichen Mittel Wandschubspannungen in einer Größenordnung von $\tau = 3 - 4 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ [182] erreicht, die sich unter Anstrengung vervielfachen können [181, 183]. In der Literatur konnten in verschiedenen Aortenabschnitten mittels *magnetic resonance imaging* (MRI)-Geschwindigkeitsmessungen *in vivo* maximale Wandschubspannungen von $\tau_{\max} \approx 8 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ (*aorta renalis*) [184], $\tau_{\max} \approx 16 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ (*aorta ascendens*) [185] und bis zu $\tau_{\max} \approx 33 \text{ dyn}/\text{cm}^2$ (*aorta descendens*) [186] nachgewiesen werden. Herzklappenfehler können die normalen physiologischen Strömungsbedingungen verändern und die Belastung auf Endothelzellen erhöhen: Farag et al. konnten beispielsweise zeigen, dass biskupide Herzklappenstenosen (BAV-Stenosen) zu einer Erhöhung der lokalen Wandschubspannungen um bis zu 40 % in der *aorta ascendens* im Vergleich zu gesunden Herzklappen führen können [187]. In einer weiteren Studie konnte bei Patienten vor einer Herzklappenersatz (AVR)-Operation aufgrund von BAV-Stenosen eine starke Korrelation zwischen dem systolischen Strömungsmuster durch die Herzklappe und asymmetrischen proximalen Aortenwandveränderungen beobachtet werden [188]. Es ist wichtig, dass strukturelle Veränderungen der Aortenwand frühzeitig quantifiziert oder vorhergesagt werden können, um Folgeerkrankungen zu vermeiden [189].

Um Auswirkungen von durch Strömung erzeugten Kraftfeldern auf die Struktur von Endothelzellen aus humanen Aorten an einem *in vitro*-Modell untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Versuchsaufbau *Aorta-on-a-SAW-Chip* entwickelt [180]. Eine Inspiration zu diesem Aufbau stellte die *DANI*-Kammer (*De-Adhesion Number Investigator*) dar, mittels der in Vorarbeiten die Ablösungsrate von Zellen unter starken akustischen Strömungen untersucht wurde [190]. Die Kernkomponente des Aufbaus bildet ein SAW-Chip, auf dem durch Einkopplung einer akustischen Oberflächenwelle in die darauf befindliche Flüssigkeitsschicht eine akustische Strömung entsteht (vgl. Kapitel 2.3.1). Durch Variation von SAW-Parametern wie der Leistung P_{in} und Tastgrad D (vgl. 2.1.3, Gl. 2.12) können verschiedene Strömungsbedingungen modelliert und ihr Einfluss auf lebende Zellen, die auf einem Deckglas oberhalb des Chips wachsen, quantifiziert werden. Details zum Ver-

suchsaufbau und zur Methodik sind unter Kapitel 3.4 aufgeführt. Im Folgenden sollen der hier entwickelte Aufbau charakterisiert und die folgende Hypothese geprüft werden:

Hypothese 1.1: Dynamisch modulierte Kraftfelder durch akustisch erzeugte Strömungen können in dem hier entwickelten *Aorta-on-a-SAW-Chip*-Aufbau die Eigenschaften des Aktin-Zytoskeletts von Endothelzellen aus humanen Aorten verändern.

Zur Quantifizierung möglicher Veränderungen des Zytoskeletts werden dabei Eigenschaften wie die Anzahl, Länge, Breite und Orientierung der anhand von Fluoreszenzmikroskopie detektierten Aktinfilamente betrachtet. Die Strömungseigenschaften des SAW-Chip-basierten Flussaufbaus wurden bei der höchsten hier technisch anwendbaren SAW-Leistung $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$ (512 mW) charakterisiert. Zur Charakterisierung des Strömungsprofils über einen größeren Bereich ($l \times b = 5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$) wurden *scanning Particle Image Velocimetry* (sPIV)-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 4.1 zu sehen. Das Strömungsfeld wurde am Ort der Zellen auf einer Höhe von $\Delta z = 10 \mu\text{m}$ unterhalb der Deckglasoberfläche quantifiziert, wobei sich das Deckglas wie in Abbildung 3.4 dargestellt auf einer Höhe von $z = 1,6 \pm 0,1 \text{ mm}$ über dem SAW-Chip befindet. Das resultierende Strömungsfeld ist anhand von Pfeilen in 4.1a dargestellt, wobei die Länge der Pfeile den an diesem Ort gemessenen Geschwindigkeitsbetrag $|\vec{v}| = \sqrt{v_x^2 + v_y^2}$ repräsentiert. Die z -Komponente wird hier nicht erfasst, nimmt aber oberflächennah auch nur einen geringen Beitrag an. Wie aus dem Graph hervorgeht, wird die Fläche für spätere lokale Analysen der Zellen in mehrere Bereiche aufgeteilt, an denen verschiedene Strömungsbedingungen herrschen. Während im Aperturbereich (A) beispielsweise die Strömung parallel zur x -Achse verläuft, sind die Stromlinien in den Nebenbereichen (S) diagonal ausgerichtet. Zudem ist ausgehend von der Apertur eine Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit in x -Richtung von Bereich 0 zu Bereich 1 zu erkennen, da die Strömung aufgrund der Abstrahlung der akustischen Oberflächenwelle unter dem Rayleighwinkel θ_R (vgl. Gleichung 2.21) in Bereich 0 zunächst von unten auf die Zellen trifft und erst ab Bereich 1 entlang der mit Zellen bewachsenen Oberfläche verläuft. Die Strömungsgeschwindigkeit nimmt für weitere Entfernungen von der Apertur wieder ab, wie auch aus Abbildung 4.1b ersichtlich wird. Hier sind die Strömungsgeschwindigkeitsfelder i) v_x und ii) v_y über die gesamte Fläche aufgetragen. Das hier beobachtete Verhalten der Strömung wird in Abbildung 4.1c durch eine Ermittlung der Schubspannungen τ_s (vgl. Gleichung 3.1, Kapitel 3.3) in den jeweiligen Bereichen aus Abbildung 4.1a ergänzt. Während in den Nebenbereichen (S) die Schubspannung mit $\tau_{s,\text{max}}(\text{S0}) = 10,1 \text{ dyn/cm}^2$ zu Anfang hoch ist und anschließend näherungsweise linear mit zunehmender Entfernung zum IDT abnimmt, erreicht die Strömung im Aperturbereich (A) aufgrund des oben erklärten Rayleighwinkels erst in Region 1 ihr Maximum $\tau_{s,\text{max}}(\text{A1}) = 8,1 \text{ dyn/cm}^2$, bevor sie wieder abnimmt. Für die spätere lokale Analyse der Aktineigenschaften liegt der Hauptfokus auf den Apertur- und Nebenbereichen in Region 1. Die maximal gemessene

Strömungsgeschwindigkeit am Ort der Zellen in diesem Aufbau beträgt $|\vec{v}|(27 \text{ dBm}) = 5,5 \text{ cm/s}$ im Bereich A1 und der Mittelwert der Schubspannungen aller Bereiche ist in dieser Region maximal mit $\bar{\tau}_s(27 \text{ dBm}) = 7,1 \pm 1,3 \text{ dyn/cm}^2$.

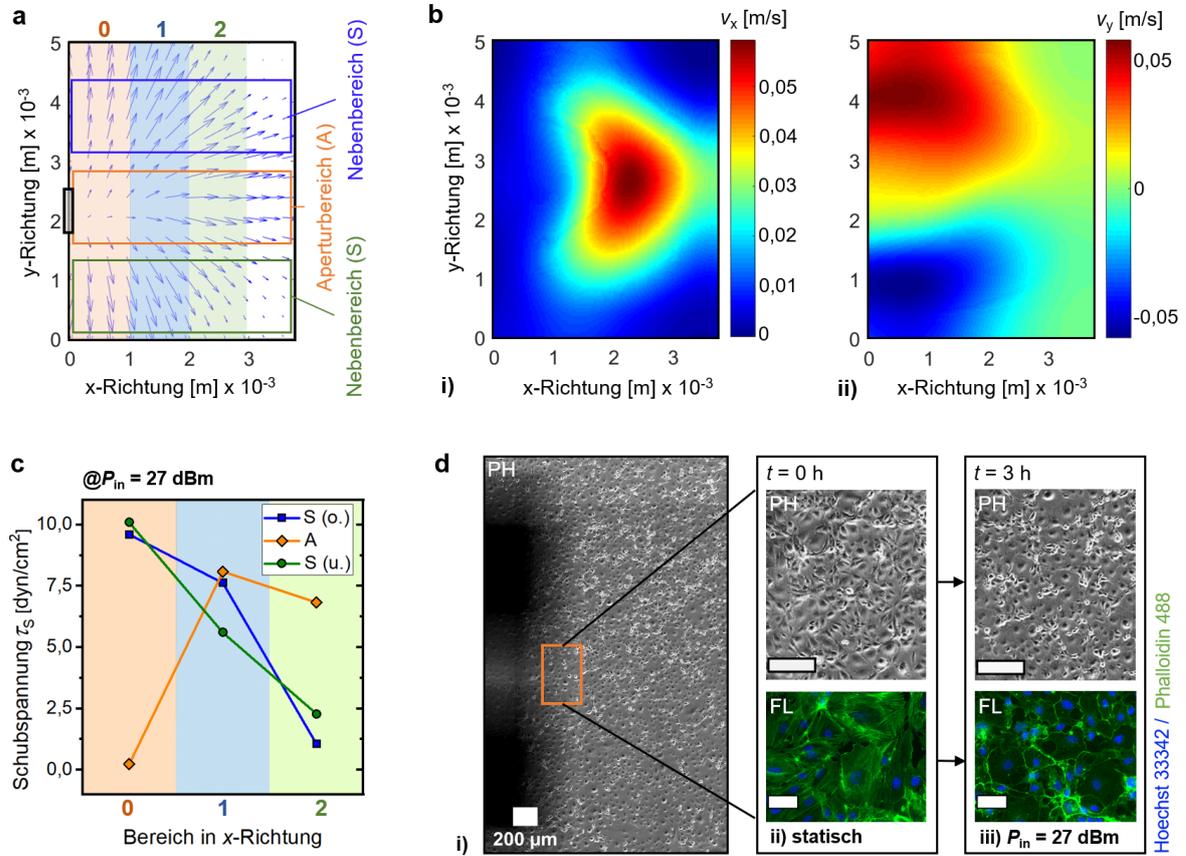


Abbildung 4.1: Charakterisierung des Strömungsprofils über dem SAW-Chip bei einer SAW-Leistung von $P_{in} = 27 \text{ dBm}$ und qualitative Betrachtung des Strömungseinflusses auf HAEC-Zellen. a) Ergebnis des mittels *scanning Particle Image Velocimetry* (sPIV) charakterisierten Strömungsfelds auf einer Höhe von $z \approx 1,6 \text{ mm}$ über dem SAW-Chip mit Unterteilung der vermessenen Fläche in lokale Analysebereiche. Am linken Rand bei ca. $(x,y) = (0,2) \text{ mm}$ ist die Apertur eingezeichnet. b) Charakterisierung der Geschwindigkeitsfelder in x - und y -Richtung: ii) v_x , ii) v_y . c) Ergebnis der ermittelten Schubspannungen τ_s in den unter a) gezeigten Bereichen als Referenz für die spätere lokale Zellanalyse. d) Qualitative Betrachtung von statisch kultivierten und unter starker Strömung kultivierten HAEC-Zellen: i) Phasenkontrast(PH)-Scan von HAEC-Zellen vor Beginn der Kultivierung unter akustischer Strömung. Am linken Rand ist der Schatten des IDT auf der Chipoberfläche zu sehen, der sich unterhalb ($z \approx 1,6 \text{ mm}$) des mit Zellen bewachsenen Deckglases befindet, ii) ausgewählte Phasenkontrast(PH)- und Fluoreszenz(FL)-Nahaufnahmen von HAEC-Zellen im Aperturbereich vor der Messung (PH, $t = 0 \text{ h}$) bzw. nach $t = 3 \text{ h}$ Messung unter statischen Bedingungen (FL). Das Aktin-Zytoskelett und die Zellkerne sind mit den Farbstoffen Phalloidin-Atto 488 und Hoechst 33342 markiert, iii) entsprechende Aufnahmen von HAEC-Zellen nach $t = 3 \text{ h}$ Behandlung mit akustischer Strömung bei $P_{in} = 27 \text{ dBm}$ (PH und FL). Die Skalenbalken entsprechen $\Delta x = 200 \mu\text{m}$ (PH) bzw. $\Delta x = 50 \mu\text{m}$ (FL).

Die Applikation hoher SAW-Leistungen geht meist mit Temperatureffekten einher, die sich in einer Temperaturerhöhung im Flüssigkeitsvolumen V_M äußern. Vor der Verwendung des

Versuchsaufbaus mit lebenden Zellen wurde die Temperaturerhöhung ΔT_{SAW} bei der hier verwendeten SAW-Leistung $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$, einem Tastgrad $D = 50 \%$ und einer Pulsbreite $\tau_p = 500 \text{ ms}$ charakterisiert ($\Delta T_{\text{SAW}} = 11,3 \text{ K}$). Die Temperatur des Mikroskop-Stage-Inkubators wurde entsprechend eingestellt, sodass im Zellkulturmedium eine Kultivierungstemperatur von $T = 37^\circ\text{C}$ erreicht wird. Die Ergebnisse der Temperaturmessung sind in Anhang A.1, Abb. A.1 gezeigt. Die SAW-Parameter $D = 50 \%$ und $\tau_p = 500 \text{ ms}$, unter denen die Temperaturmessungen durchgeführt wurden, werden in allen folgenden Versuchsreihen verwendet, um physiologische Bedingungen einer gepulsten Strömung bei einer „Herzfrequenz“ von ca. 60 bpm in der Aorta zu modellieren. Für die Untersuchungen von lebenden Endothelzellen aus humanen Aorten unter einer solchen bei $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$ generierten starken akustischen Strömung mit $\tau_{\text{s,max}} = 10,1 \text{ dyn/cm}^2$ kam die HAEC-Zelllinie zum Einsatz, die unter Kapitel 3.2.1 beschrieben wird. Zwischen dem Aussäen der Zellen und dem Start der SAW-Behandlung wurden alle Proben für $t = 18 \text{ h}$ über Nacht im Inkubator bei $T = 37^\circ\text{C}$ und $c(\text{CO}_2) = 5 \%$ inkubiert, sodass sich ein konfluenter Zellrasen bilden konnte. Die Behandlungszeit der HAEC-Zellen mit akustischer Strömung wurde in den im Folgenden beschriebenen Versuchen auf $t = 3 \text{ h}$ beschränkt, um eine Erhaltung der Zellviabilität zu garantieren und mögliche auftretende Effekte auf das Aktin-Zytoskelett zunächst auf kurzen Zeitskalen zu untersuchen. In Abbildung 4.1d sind Phasenkontrast(PH)- und Fluoreszenz(FL)-aufnahmen von HAEC-Zellen und ihrem Aktin-Zytoskelett unter dem Einfluss der akustischen Strömung anhand ausgewählter Proben gezeigt. Wie aus diesen Beispielbildern ersichtlich wird, können HAEC erfolgreich in dem *Aorta-on-a-SAW-Chip*-Aufbau kultiviert werden und überleben die dreistündige Behandlung mit starker Strömung. Allerdings zeigen die Bilder auch, dass die akustische Strömung zu starken morphologischen Veränderungen führen kann: Während die Zellen vor Behandlungsbeginn deutlich gespreitete und runde Zellkörper besitzen (i) PH), ziehen sie sich während der Behandlung mit $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$ zusammen und wirken nach $t = 3 \text{ h}$ stark abgeflacht. Auch anhand der Fluoreszenzbilder (FL) lassen sich qualitative Unterschiede zwischen der Aktin-Ausprägung einer i) statisch inkubierten Kontrolle und ii) der Probe unter starker Strömung erkennen: Die Aktinfilamente weisen im statischen Fall lange Stressfasern über den gesamten Zellkörper auf, während bei der Probe mit $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$ keine definierten Stressfasern sondern teilweise nur der Aktin-Kortex zu sehen sind.

Nicht alle mit starker Strömung behandelten Proben, die im Rahmen dieser Versuchsreihen vermessen wurden, zeigten Effekte dieser Deutlichkeit. Dennoch deutet das Beispiel stark auf eine Beeinflussbarkeit von HAEC-Zellen und ihres Aktin-Zytoskeletts durch akustische Strömung hin, was im weiteren Verlauf dieses Abschnitts quantitativ untersucht werden soll. Hierzu werden die Daten zu den Aktineigenschaften aller Proben im Rahmen der hier durchgeführten Messreihen zusammengefasst und die Ergebnisse statistisch auf Signifikanz untersucht. Zusätzlich zu den statischen Kontrollen und den bei $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$ behandelten Proben werden Kontrollproben bei $P_{\text{in}} = 21 \text{ dBm}$ vermessen, um moderate physiologische Flussbedingungen zu modellieren ($\tau_{\text{max}}(21 \text{ dBm}) \approx 2,5 \text{ dyn/cm}^2$, linear approximiert auf Basis der

durch die vierfache Leistung erzeugten Schubspannung $\tau_{\max}(27 \text{ dBm}) = 10,1 \text{ dyn/cm}^2$). In jeder Probe werden Fluoreszenzbilder des Aktin-Zytoskeletts in sechs verschiedenen Bereichen aufgenommen: im Aperturbereich jeweils in Region 1 und 2 (A1/A2) sowie in beiden Nebenbereichen jeweils in Region 1 und 2 (S1/S2), wie in Abbildung 4.1a skizziert wurde. Aus diesen sechs Analysebereichen kann sowohl ein globaler Mittelwert repräsentativ für die gesamte Probe ermittelt werden oder es können lokale Ergebnisse bestimmt und unter verschiedenen Strömungsbedingungen separat verglichen werden.

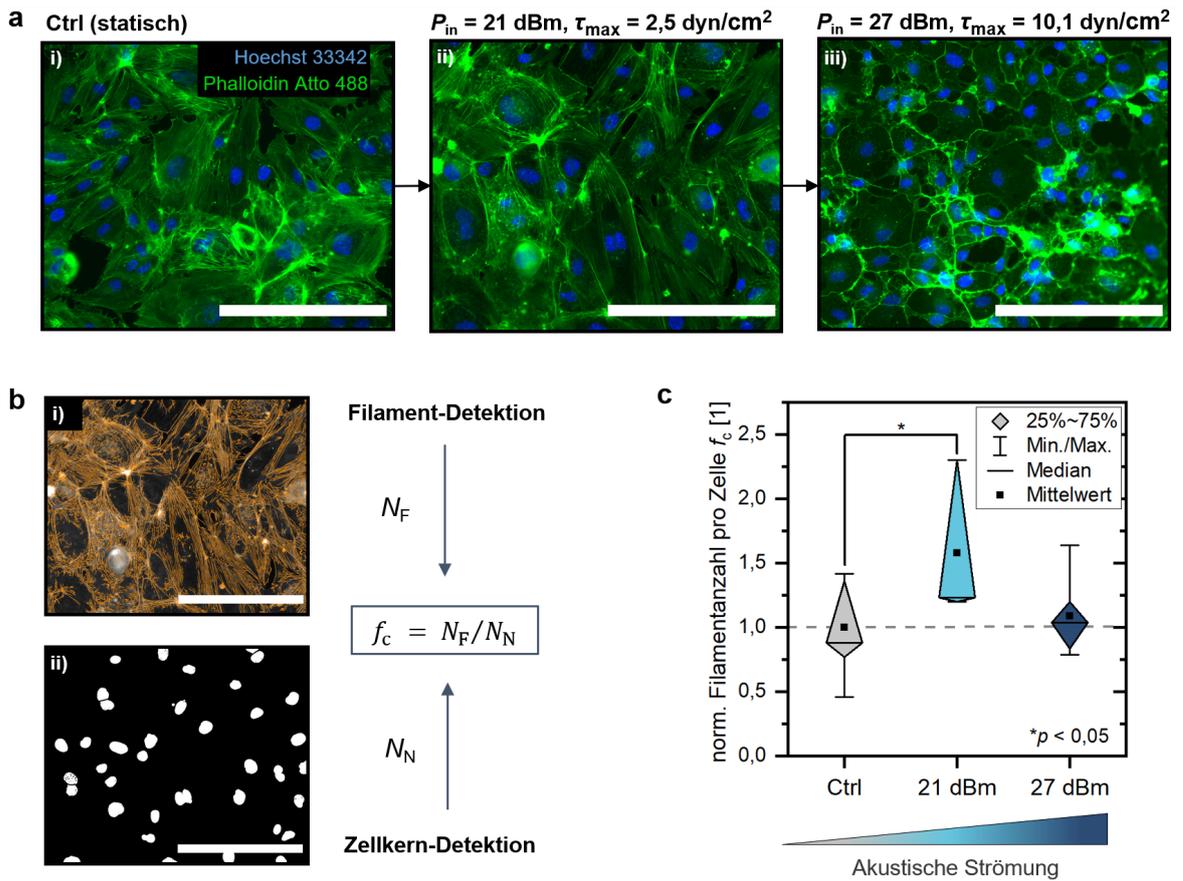


Abbildung 4.2: Quantitative Analyse der Ausprägung des Aktin-Zytoskeletts von HAEC-Zellen nach $t = 3 \text{ h}$ Kultivierung mit akustischer Strömung: a) Exemplarische Fluoreszenzbilder von Aktinfilamenten und Zellkernen in i) einer statisch kultivierten Probe (Ctrl), ii) einer bei moderater Strömung ($P_{\text{in}} = 21 \text{ dBm}$) kultivierten Probe, iii) einer bei starker Strömung ($P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$) kultivierten Probe. b) Schematik der Filament- und Zellkerndetektion: i) vom Filamentsensor erkannte Filamente mit der Anzahl N_F , ii) mittels Ilastik und ImageJ erkannte Zellkerne mit der Anzahl N_N , woraus die mittlere Filamentanzahl pro Zelle f_c als Maß für die Ausprägung des Zytoskeletts ermittelt wird. c) Auftragung der auf die statische Kontrolle normierten Filamentanzahl pro Zelle f_c mit nach rechts steigender akustischer Strömung. Ein t-Test für unabhängige Proben ergibt einen signifikanten Unterschied ($p = 0,031 < \alpha = 0,05$) der Ausprägung des Aktin-Zytoskeletts zwischen statisch kultivierten und unter moderater Strömung kultivierten Proben. Alle Skalenbalken entsprechen $\Delta x = 200 \mu\text{m}$.

In Abbildung 4.2 soll die qualitative Beobachtung der Aktin-Ausprägung unter den verschiedenen Flussbedingungen quantitativ durch Detektion der Filamentanzahl pro Zelle f_c

bestimmt werden. Hierzu wird ein globaler Analyseansatz herangezogen, bei dem für jede Probe ein repräsentativer Mittelwert der Filamentanzahl aus den sechs Fluoreszenzaufnahmen gebildet wird.

In Abbildung 4.2a sind exemplarische Bilder des Aktin-Zytoskeletts nach $t = 3$ h Inkubation unter den drei verschiedenen Bedingungen gezeigt. Eine qualitative Betrachtung der Aufnahmen lässt vermuten, dass die Aktinfilamente der bei moderater Strömung behandelten Probe ($P_{\text{in}} = 21$ dBm) deutlicher ausgeprägt sind als die der Probe unter starken Strömungsbedingungen ($P_{\text{in}} = 27$ dBm) sowie der statischen Kontrolle (Ctrl). Die Schematik in Abbildung 4.2b illustriert die Bestimmung der Filamentanzahl pro Zelle f_c : i) Die Anzahl der Filamente N_F ergibt sich aus den anhand des Filamentsensors detektierten Filamenten und ii) die Zellkernanzahl N_N aus dem segmentierten Bild der Zellkerne nach der ImageJ-Analyse. Hieraus lässt sich die Filamentanzahl pro Zelle $f_c = \frac{N_F}{N_N}$ für jedes Bild ermitteln. Da zwischen den Versuchstagen aus technischen Gründen verschiedene Mikroskope zum Einsatz kamen und dadurch verschiedene Einstellungen und Bildqualitäten für die Aufnahme zur Verfügung standen, wurden alle Ergebnisse der Proben unter Fluss auf die Ergebnisse der mit dem entsprechenden Mikroskop aufgenommenen statischen Kontrollen normiert. Unter Anhang A.1, Tabelle 3 sind die zur Normierung verwendeten Daten der Kontrollproben zusammengefasst. Daraus ergibt sich die in Abbildung 4.2c dargestellte normierte Darstellung von f_c als Boxplot, anhand derer ein quantitativer Vergleich der Ausprägung der Aktinfilamente zwischen den Kultivierungsbedingungen möglich ist.

Ein einseitiger t-Test für unabhängige Proben (*student's t test*) auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zeigt, dass die mittlere Erhöhung von der statischen Kontrolle zu den bei moderater Strömung behandelten Proben um $\Delta f_c(\text{Ctrl}, 21 \text{ dBm}) = 0,58 \pm 0,39$ in Abbildung 4.2c signifikant ist ($p = 0,048 < \alpha$). Zwischen den bei starker Strömung behandelten Proben ($P_{\text{in}} = 27$ dBm) und der statischen Kontrolle ist dagegen kein signifikanter Unterschied feststellbar. Aus den Ergebnissen in Abbildung 4.2c lässt sich schlussfolgern, dass für die in den Abbildungen 4.1d und 4.2a optisch deutlich erkennbaren Unterschiede zwischen statischen Kontrollen und Proben unter starken Strömungsbedingungen offensichtlich nicht die Filamentanzahl pro Zelle f_c ausschlaggebend ist. Für ein ganzheitlicheres Verständnis der Veränderung von Aktinfilamenten in diesem Versuchsaufbau ist offensichtlich die Analyse weiterer Filamenteigenschaften notwendig. Im Folgenden werden daher zusätzlich die detektierte Breite w , Länge l sowie die Orientierungen α_F der Filamente bestimmt. Die Ergebnisse der Breiten- und Längenauswertungen sind in Abbildung 4.3 zusammengefasst. Zunächst sind die absoluten mittleren Breiten w und Längen l in Abbildung 4.3a aufgetragen. Es lässt sich ein leicht abnehmender Trend der Filamentbreite mit zunehmender akustischer Strömung erkennen, während die Filamentlänge leicht zunimmt. Allerdings sind die Unterschiede gering und nicht signifikant ($p > \alpha$). Die mittlere Filamentlänge aller hier vermessenen Proben beträgt behandlungsunabhängig $\bar{l} = 5,6 \pm 0,8 \mu\text{m}$, die mittlere Filamentbreite $\bar{w} = 524 \pm 31 \text{ nm}$. Die minimale detektierte Filamentbreite ergibt sich für eine mit $P_{\text{in}} = 21$ dBm behandelte Probe

mit $w_{\min} \approx 461$ nm.

In Abbildung 4.3b sind die Ergebnisse der auf die statische Kontrolle normierten Filamentbreite w einer lokalen Analyse in den Nebengebieten S1 gezeigt. Anhand eines zweiseitigen t-Tests kann festgestellt werden, dass sich die Breite hier unter dem Einfluss moderater Strömung im Vergleich zur Kontrolle um $\Delta w(\text{Ctrl}, 21 \text{ dBm}) = 0,08 \pm 0,03$ signifikant verringert ($p = 0,048 < \alpha$). Ähnlich wie in Abbildung 4.2c bilden sich somit signifikante strömungsinduzierte Veränderungen der Aktin-Struktur nur in den mit $P_{\text{in}} = 21 \text{ dBm}$ behandelten Proben aus.

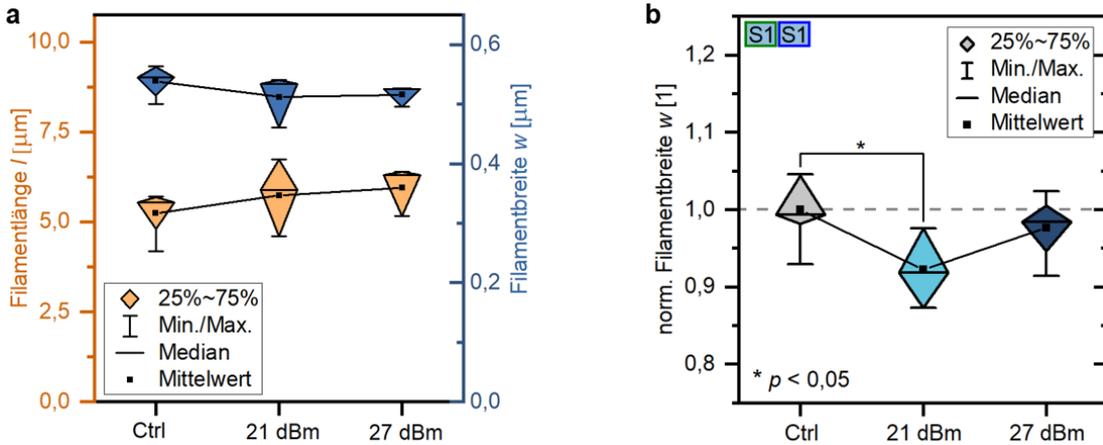


Abbildung 4.3: Ergebnisse der Längen- und Breitenanalyse von Aktinfilamenten im *Aorta-on-a-SAW-chip*-Aufbau nach $t = 3$ h Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen: a) global ermittelte Veränderung der mittleren absoluten Länge l und Breite w der in den Proben detektierten Aktinfilamentbündel mit nach rechts zunehmender Strömung, b) Ergebnisse der lokalen Analyse der normierten Filamentbreite w in den Nebengebieten S1 (vgl. Abb. 4.1a). Ein t-Test für unabhängige Proben zeigt eine signifikante Abnahme der Filamentbreite zwischen statisch kultivierten und mit moderater Strömung ($P_{\text{in}} = 21 \text{ dBm}$) behandelten Proben ($p = 0,048$).

Proben unter dem Einfluss starker Schubspannungen bei $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$ zeigen quantitativ dagegen ein ähnliches Verhalten der ausgebildeten Filamentanzahl f_c , Länge l und Breite w wie unter statischer Kultivierung. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass sowohl die statische Kultivierung als auch die Aussetzung zu starker Strömungen keine geeigneten Kultivierungsbedingungen für Endothelzellen wie HAEC-Zellen darstellen. Es wäre naheliegend, dass die bei $P_{\text{in}} = 21 \text{ dBm}$ erzeugten akustischen Strömungen mit $\tau_{\text{max}} = 2,5 \text{ dyn/cm}^2$ von allen drei Versuchsparametern dagegen die optimalste Kultivierungsumgebung für Endothelzellen in diesem Versuchsaufbau schaffen. Zhao et al. beobachteten ein ähnliches Verhalten bei BAEC-Zellen, die bereits bei moderaten Strömungen mit $\tau = 2\text{-}3 \text{ dyn/cm}^2$ lange und dichte Stressfaserbündel teilweise über mehrere Zellen hinweg ausbildeten, während unter statischer Kultivierung eher kleine und kurze Aktinfilamente auftraten [191]. In einer weiteren Studie wurden BAEC-Zellen bei $\tau = 20 \text{ dyn/cm}^2$ für $t = 6\text{-}24$ h kultiviert und qualitativ beobachtet, dass die Zellen bei diesen hohen Schubspannungen dicke Aktinfilamente parallel zur Strömungsrichtung ausbildeten [192]. Auch *in vivo* wurde nach $t = 24\text{-}48$ h eine

Verdickung von Aktinfilamenten nach Verdopplung der Schubspannungen durch eine Aortenkoarktation in der abdominalen Aortenwand in Hasen beobachtet, die sich bei wieder verringerten Schubspannungen wieder zu dünneren und längeren Filamenten zurückbildete [193]. Passend zu diesen Arbeiten ist auch in den anhand von Abbildungen 4.2 und 4.3 gezeigten Daten eine höhere Dichte von Aktinfilamenten (f_c) bei moderater Strömung sowie eine geringere Filamentbündeldicke bei niedrigeren im Vergleich zu höheren Schubspannungen zu sehen. Anhand der Literaturergebnisse wäre zu erwarten, dass die Aktinfilamente unter dem Einfluss moderater Strömung länger werden. Die Abwesenheit von signifikanten Effekten bei der Filamentlänge könnte jedoch auf ein Artefakt beim Auswertungsverfahren mit dem Filament Sensor [176] zurückzuführen sein, da der Algorithmus bei der Detektion der Filamente eine Unterteilung in gerade Segmente vornimmt und der dabei entsprechend eingestellte Wert (*length of straight pieces*) möglicherweise die detektierte Länge der Filamente von vornherein beeinflusst. Hier liegt somit eventuell eine Detektionsgrenze durch die Einstellungen des Algorithmus vor, sodass die Ergebnisse zur Filamentlänge mit Vorsicht interpretiert werden sollten. Andererseits treten die in der Literatur beobachteten Effekte meist auch erst nach einem wesentlich längeren Zeitraum als die hier angewandte Behandlungszeit von $t = 3$ h auf, sodass Unterschiede in der bisher analysierten Filamentdichte f_c , Länge l und Breite w vermutlich erst nach längerer Kultivierung auftreten oder zumindest deutlicher werden.

Im Allgemeinen ist in der Literatur bekannt, dass sich physiologische Strömungen auf die Morphologie von Endothelzellen auswirken, indem sie zu einer Streckung der Zellen und Orientierung ihrer langen Achse in Richtung der Strömung führen [194–198]. Auch in HAEC-Zellen konnte eine solche Elongation bei Schubspannungen im physiologischen Bereich ($\tau = 6 \text{ dyn/cm}^2$) nachgewiesen werden [199]. Des Weiteren konnte sowohl *in vivo* [193] als auch mittels eines mikrofluidischen Setups *in vitro* [200] gezeigt werden, dass sich die Aktinfilamente in Endothelzellen unter Fluss ebenfalls vermehrt in Richtung der Strömung ausrichten. Um mögliche bereits nach kurzer Zeit auftretende Effekte der Ausrichtung im *Aorta-on-a-SAW-Chip*-Aufbau zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit ebenfalls Orientierungsanalysen für die Aktinfilamente und Zellkerne durchgeführt, wie in den Abschnitten 3.4.1-3.4.2 und Abbildung 3.5 beschrieben wird. Die Ergebnisse für die Analysebereiche, in denen ein ANOVA-Test Signifikanz zeigt, sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Das Orientierungsverhalten der nicht signifikanten Analysebereiche ist zudem unter Anhang A.1, Abb. A.2 gezeigt. Analog zu den Abbildungen 4.2 und 4.3 wurden die relativen Häufigkeiten $P(\alpha)$ der detektierten Winkel $\alpha_p = 15 \pm 15^\circ$ (parallel zur Strömungsrichtung), $\alpha_d = 45 \pm 15^\circ$ (diagonal) und $\alpha_s = 75 \pm 15^\circ$ (senkrecht zur Strömungsrichtung) auf den entsprechenden globalen Mittelwert der relativen Häufigkeiten der statischen Kontrollen (Ctrl) normiert. Ein Tukey-t-Test wurde post-hoc auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ durchgeführt, um die Unterschiede zwischen verschiedenen Winkeln innerhalb gleich behandelter Proben sowie zwischen gleichen Winkeln aber verschiedenen Kultivierungsbedingungen auf Signifikanz zu prüfen. Abbildung 4.4 zeigt

somit einerseits die Filamentorientierung bei unterschiedlicher Behandlung in den Bereichen A1, S1 und S2 (a,c,d) sowie die Zellkernausrichtung (b). Die y-Achse ist unterteilt in die genannten drei Winkelbereiche relativ zur Strömung.

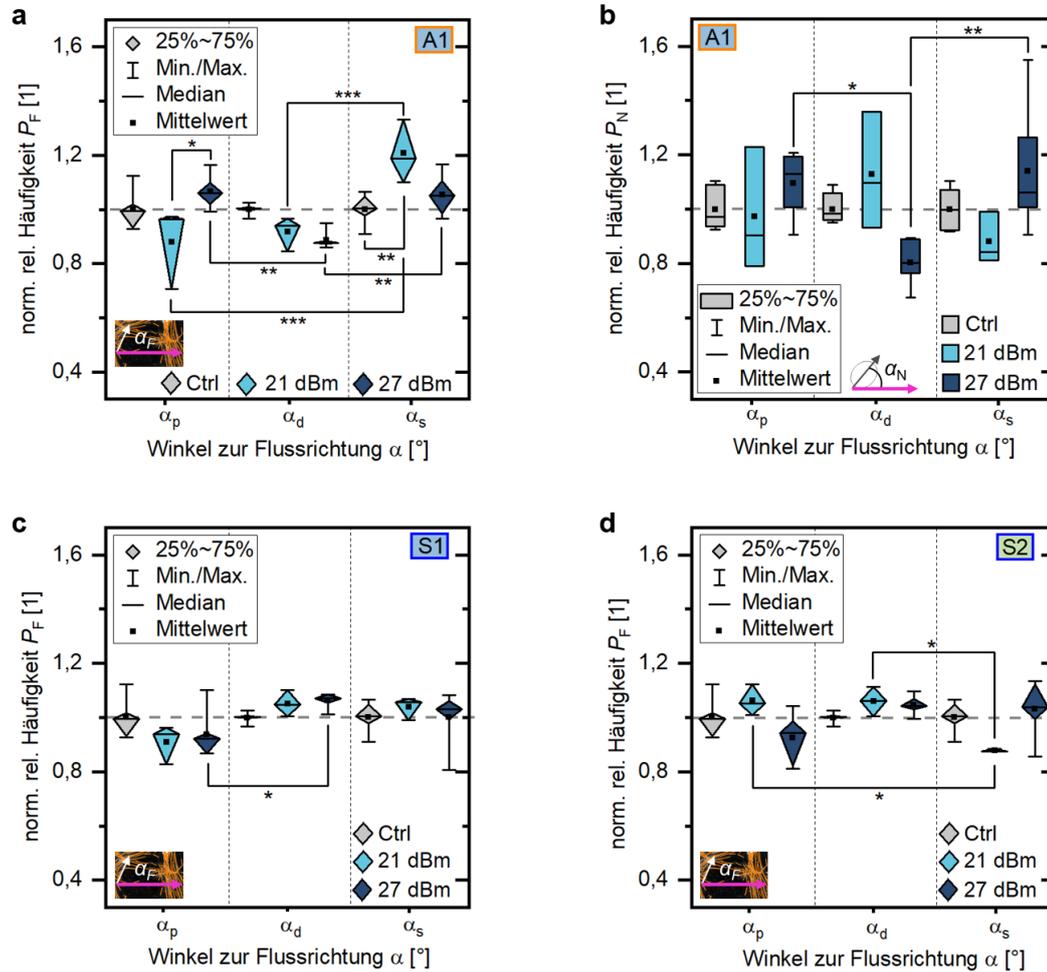


Abbildung 4.4: Ergebnisse der lokalen Analyse von Aktinfilament- und Zellkernausrichtungen relativ zur Strömungsrichtung α im *Aorta-on-a-SAW-chip*-Aufbau nach $t = 3$ h Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen: a) relative Häufigkeit P_F der Filamentausrichtungen parallel (α_p), diagonal (α_d) und senkrecht (α_s) zur Flussrichtung im Analysebereich A1 (Aperturbereich nahe des IDT, vgl. Abb. 4.1c), normiert auf die statischen Kontrollen, b) entsprechende normierte relative Häufigkeit P_N der Zellkernausrichtungen im Bereich A1, c) Ergebnisse der Filamentausrichtungen im Analysebereiche S1 (Nebenbereiche nahe des IDT) d) Ergebnisse der Filamentausrichtungen im Analysebereich S2 (Nebenbereiche mit größerem Abstand zum IDT). Die Anzahl unabhängiger Proben, aus der sich jede Box zusammensetzt, sind $N(\text{Ctrl}) = 7$, $N(21 \text{ dBm}) = 3$ und $N(27 \text{ dBm}) = 6$. Für jeden Analysebereich wurde ein ANOVA-Test durchgeführt, der Signifikanz auf dem Niveau $\alpha = 0,05$ lieferte (a) $p < 0,001$, b) $p = 0,019$, c) $p = 0,028$, d) $p = 0,005$). Ein Tukey-t-Test für unabhängige Proben zeigte post-hoc auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ Signifikanzen zwischen den einzelnen in den Graphen gekennzeichneten Wertepaaren von: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Wie aus 4.4a und 4.4b hervorgeht, zeigen die Filament- und Zellkernausrichtungen für hohe Schubspannungen bei $P_{\text{in}} = 27 \text{ dBm}$ im Analysebereich A1 ähnliche Tendenzen durch

eine Abnahme der diagonalen Ausrichtung zugunsten der anderen Orientierungsrichtungen. Hierbei liegen die Werte der normierten relativen Häufigkeit P sowohl der parallel (α_p) als auch der senkrecht (α_s) zur Strömungsrichtung orientierten Filamente und Zellkerne deutlich über $P = 1.0$ und sind damit in diesen Richtungen nicht nur stärker ausgeprägt als die entsprechenden Häufigkeiten der Kontrollproben, sondern auch probenintern signifikant höher als die entsprechende Häufigkeit in α_d -Richtung ($p_{p,d} = 0,028$, $p_{s,d} = 0,006$). Im Gegensatz zu den Zellkernen zeigen die Aktinfilamente nicht nur zwischen den Winkelverteilungen innerhalb der mit $P_{in} = 27$ dBm behandelten Proben signifikante Unterschiede, sondern auch zwischen den verschiedenen SAW-Leistungen sowie auch innerhalb bei $P_{in} = 21$ dBm kultivierten Proben. Interessanterweise weisen die Aktinfilamentausrichtungen in den mit moderater Strömung behandelten Proben dabei ein entgegengesetztes Verhalten zu den Proben unter starker Strömung auf: Die Häufigkeit $P_F(\alpha_p)$ der Filamente parallel zur Strömungsrichtung ist bei $P_{in} = 21$ dBm auf $P_F(\alpha_p) = 0,88 \pm 0,15$ signifikant reduziert sowohl innerhalb der gleichen Proben im Vergleich zur Richtung α_s ($p < 0,001$) als auch gegenüber der Häufigkeit $P_F(\alpha_p)$ bei der höheren Leistung $P_{in} = 27$ dBm ($p = 0,018$). Allerdings ist die Häufigkeit $P_F(\alpha_s)$ der Filamente senkrecht zur Strömungsrichtung bei $P_{in} = 21$ dBm dagegen stark erhöht und weist mit $P_F(\alpha_s) = 1,21 \pm 0,12$ den höchsten beobachteten signifikanten Mittelwert auf.

Im Nebenbereich S1 in Abbildung 4.4c ist ein anderes Verhalten der Filamentorientierungen zu sehen als im Bereich A1: Innerhalb der Proben ist bei starker Strömung die relative Häufigkeit in α_p -Richtung signifikant gegenüber der Richtung α_d reduziert ($p = 0,048$), während die anderen Proben bzw. Winkel keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Im Nebenbereich mit größerem Abstand zum IDT und entsprechend schwächerer Strömung (vgl. Abb. 4.1b) ergeben sich nach Abbildung 4.4d wiederum nur signifikante Unterschiede innerhalb der Proben mit $P_{in} = 21$ dBm, wobei die Häufigkeit der Filamente in α_s -Richtung hier gegenüber der anderen beiden Richtungen reduziert ist ($p_{p,s} = 0,039$, $p_{d,s} = 0,044$).

Anhand der oben genannten Literaturergebnisse wäre zu erwarten gewesen, dass sich die Aktinfilamente entlang der Strömungsrichtung α_p orientieren. Wie aus 4.9 hervorgeht, ist eine signifikante Ausrichtung der Filamente (und Zellkerne) in α_p -Richtung jedoch nur im Analysebereich A1 bei $P_{in} = 27$ dBm zu sehen und geht in diesem Leistungsbereich interessanterweise mit einer ebenfalls signifikant höheren relativen Häufigkeit in α_s -Richtung einher. In den anderen Analysebereichen ist dagegen keine Filament- oder Zellkernausringung in Strömungsrichtung zu beobachten. Für die Proben bei $P_{in} = 21$ dBm lässt sich sogar eher eine gegenteilige Tendenz beobachten, da hier eine signifikanter Rückgang von Filamenten in α_p -Richtung und dafür eine Zunahme in α_s -Richtung vorliegt. Eine naheliegende Erklärung für die Abwesenheit der Ausrichtung in Strömungsrichtung ist die oben bereits erwähnte kurze Behandlungszeit: In den oben genannten Arbeiten werden Änderungen der Zellmorphologie und Filamentausrichtung im Allgemeinen erst nach längerer Kultivierung unter Fluss beobachtet [193, 199, 200]. In der Literatur finden sich außerdem Hinweise auf zusätzlich zur

Schubspannung auftretende Einflüsse auf die Ausrichtung von Aktinfilamenten bei der Kultivierung mit pulsatilem Fluss. Dabei wird häufig der Aspekt der zyklischen Umfangsdehnung (*cyclic circumferential strain*) genannt, welche bekanntermaßen *in vivo* aufgrund der kontinuierlichen pulsatischen Dehnung der Arterien auftritt und deren resultierende mechanische Spannung Auswirkungen auf die Morphologie und Struktur der Gefäßwand haben kann [201]. In der Literatur konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die morphologische Anpassung von BAEC-Zellen *in vitro* unter pulsatilem Fluss langsamer stattfindet als unter kontinuierlicher Strömung und dass sich die Zellen unter Applikation eines pulsatischen Drucks bei $f = 1$ Hz und der dadurch entstehenden zyklische Umfangsdehnung senkrecht zur Dehnungsrichtung ausrichten [191]. Dieses Verhalten wird durch Kemeny et al. bestätigt, die zudem eine Ausrichtung von Aktinfilamenten senkrecht zur zyklischen Dehnung in PAEC-Zellen beobachten konnten [202]. Dies zeigt, dass sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zusätzlich zur Schubspannung auftretende Kräfte das Zellverhalten unterschiedlich beeinflussen können. Im *Aorta-on-a-SAW-Chip*-Aufbau ist zwar kein dehnbare Substrat vorhanden, das eine zyklische Dehnung wie *in vivo*-Bedingungen erzeugen könnte. Aber die von der Apertur abgestrahlte pulsatile akustische Strömung könnte dennoch zusätzlich zur reinen Scherspannung auftretende Effekte im konfluenten Zellrasen hervorrufen.

Zusammenfassend kann die oben aufgestellte Hypothese 1.1, dass dynamisch modulierte Kraftfelder durch akustisch erzeugte Strömungen in dem hier entwickelten Aufbau die Eigenschaften des Aktin-Zytoskeletts von Endothelzellen aus humanen Aorten verändern, auf Grundlage der Ergebnisse in den Abbildungen 4.2 bis 4.4 aufrechterhalten werden. Die Daten zeigen zudem, dass es Unterschiede zwischen den lokalen Analysebereichen gibt: Während die Filamentdicke beispielsweise im Aperturbereich A1 keine signifikanten Unterschiede aufweist, ist sie in den Seitenbereichen S1 für $P_{\text{in}} = 21$ dBm signifikant verringert (Abb. 4.3). Auch die Orientierungsanalyse zeigt verschiedene Tendenzen der Filament- und Zellkernausrichtungen zwischen den Bereichen (Abb. 4.4). Der Hauptunterschied zwischen den Analysebereichen liegt darin, dass die vor der Apertur abgestrahlte Flüssigkeit in den Aperturbereichen A0 bis A2 zunächst von unten auf die Zellen trifft, bevor sie an der Zelloberfläche entlang seitlich wegfließt. Somit wird zusätzlich zum Scherfluss in diesen Bereichen ein Druck von unten auf die Zellen ausgeübt, was qualitativ anhand der Strömungsfelder in Abbildung 4.1a deutlich wird. In den Seitenbereichen S0 bis S2 verläuft die Strömung dagegen hauptsächlich entlang der Zelloberfläche. Um die z -Komponente der akustischen Strömung im *Aorta-on-a-SAW-Chip*-Aufbau genau zu quantifizieren und ein ganzheitliches Bild des Strömungsverlaufs in der Flusskammer zu erhalten, müssen für zukünftige Anwendungen zusätzlich zu den hier charakterisierten Strömungsfeldern am Ort der Zellen auch mehrere Ebenen in z -Richtung mittels sPIV-Messungen analysiert werden. Als Vergleich wäre zudem das Verhalten von HAEC-Zellen unter kontrolliertem laminarem Fluss in eine Richtung von Interesse, das anhand zusätzlicher Kontrollproben beispielsweise in kommerziell verfügbaren Kanälen (z.B. von ibidi, IB) vermessen werden könnte.

Wie anhand der Charakterisierungen und Ergebnisse in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, bietet der hier entwickelte Aufbau aufgrund der verschiedenen Strömungsbedingungen in den einzelnen Analysebereichen eine vielseitige Plattform, um verschiedene Bedingungen in einem Aortenmodell nachzustellen. Die verschiedenen Auswirkungen der durch die akustische Strömung erzeugten Kraftfelder auf die Struktur von Endothelzellen aus humanen Aorten konnten in diesem Unterkapitel qualitativ anhand von Fluoreszenzaufnahmen sowie quantitativ anhand der Analyse von Aktin-Zytoskelett-Veränderungen untersucht und so die Funktionalität und Eignung des Aufbaus für die Kultivierung von Endothelzellen in akustisch erzeugten Strömungsfeldern demonstriert werden.

Die zu Beginn von Kapitel 4 gestellte **Forschungsfrage 1)** nach den Auswirkungen dynamischer Kraftfelder durch akustische Strömungen auf die Struktur von Zellen, kann auf Basis der hier vorgestellten Ergebnisse beantwortet werden: In starken akustischen Strömungsfeldern zeigen die Endothelzellen in dem hier entwickelten *Aorta-on-a-SAW-Chip*-Aufbau teilweise bereits nach $t = 3$ h morphologische Veränderungen, die qualitativ auf eine durch starke Schubspannungen beschädigte Zellstruktur schließen lassen. Auf intrazellulärer Ebene kommt es zu lokalen Unterschieden in der Ausprägung, Filamentbreite und Filamentorientierung des Aktin-Zytoskeletts zwischen Proben, die in moderaten akustischen Strömungsfeldern im Vergleich zu starken Strömungsfeldern bzw. unter statischen Bedingungen inkubiert werden.

4.2. Gerichtetes Neuritenwachstum in akustischen Stehwellenfeldern

In diesem Unterkapitel sollen die Auswirkungen von statischen und dynamisch modulierten akustischen Potentiallandschaften ohne Einfluss von akustischen Strömungen auf das Wachstumsverhalten von lebenden Zellen näher untersucht werden. Dabei wird insbesondere die Fragestellung aus früheren Arbeiten aufgegriffen, ob sich die Wachstumsrichtung von Neuriten in akustischen SAW-Stehwellenfeldern modulieren lässt. Der Datensatz, auf den die hier durchgeführten Analysen beruhen, wurde von Dr. Manuel Brugger und Sebastian Angermann (M.Sc.) akquiriert [2, 162]. Deren Vorarbeiten werden hier durch detailliertere Analysen zum Richtungsverhalten des Neuritenwachstums von B35-Zellen als Modellzellen für Neuronen ergänzt, was die gemeinsame Veröffentlichung *One-dimensional acoustic potential landscapes guide the neurite outgrowth and affect the viability of B35 neuroblastoma cells* (Baumgartner et al., 2022) ermöglichte [25].

Die kontrollierte Ausbildung von neuronalen Zellnetzwerken *in vitro* ist ein wichtiger Schritt, um Untersuchungen von Signalweiterleitung, Zell-Zell-Wechselwirkungen oder Stimulation von Neuronen zu ermöglichen [22, 203, 204]. Akustische Oberflächenwellen haben sich in vorhergegangenen Arbeiten als nützliches Werkzeug zur Gewährleistung einer kontrollierten Umgebung mit lebenden Zellen herausgestellt: Durch die Kombination von stehenden akustischen Oberflächenwellen und mikrofluidischen Methoden, wie beispielsweise Mikrokanälen, lässt sich beispielsweise eine definierte Strukturierung von Zellnetzwerken auf einem Chip erreichen [2, 22, 24, 205, 206]. Der zur Durchführung der hier evaluierten Experimente verwendete Versuchsaufbau zum *Zell-Patterning* wurde detailliert in Abschnitt 3.5.1 beschrieben. Die B35-Zellen werden dabei mithilfe einer Spritzenpumpe in einen mikrofluidischen Kanal auf die aktive Fläche eines SAW-Chips gebracht und dort in den Druckminima eines zweidimensionalen Stehwellenfeldes angeordnet. Nach der Adhäsion werden alle Proben für maximal $t = 40$ h mit einem eindimensionalen SAW-Stehwellenfeld (engl. *Standing SAW*, SSAW) bei einer gleichbleibenden Resonanzfrequenz $f_{\text{res}} = 71$ MHz sowie verschiedenen Leistungen P_{in} und Tastgraden D behandelt. Die Zellen bilden währenddessen neuronale Fortsätze aus, deren Winkelverteilung bei der Auswertung der Phasenkontrastbilder mit dem ImageJ-Plugin *NeuronJ* und einem Python-Skript bestimmt wird (vgl. Abschnitt 3.5.2). Dabei soll die folgende Hypothese geprüft werden:

Hypothese 2.1: Die auf die B35-Zellen wirkenden akustischen Kräfte in eindimensionalen akustischen Potentiallandschaften begünstigen das Wachstum von neuronalen Fortsätzen entlang der Druckminima der stehenden SAW.

Zunächst wird hier die zeitliche Entwicklung der Neuritenlänge in den Proben in Abhängigkeit von der auf die B35-Zellen einwirkenden mittleren akustischen Kraft \bar{F} analysiert. Dazu ist in Abbildung 4.5a die mittels *NeuronJ* detektierte Anzahl von Neuritensegmenten N (normiert

auf die initial detektierte Anzahl zum Zeitpunkt $t = 10$ h) als Funktion der Inkubations- bzw. Behandlungszeit t für Kontrollproben sowie alle mit SAW behandelten Proben aufgetragen. Die maximale akustische Kraft, die die Zellen in den Druckknoten erfahren, wurde aus der angelegten Leistung P_{in} und dem Tastgrad D des SAW-Signals ermittelt (vgl. Gleichungen 2.13 und 2.12). Nach der unter Abschnitt 2.3.2 aufgestellten Relation 2.27 und unter Annahme eines mittleren akustischen Kontrastfaktor von $\Phi = 0,2$ [144] für Zellen ergibt sich eine akustische Kraft \bar{F} von

$$\bar{F} = F_{\text{R}} \frac{D}{100} = 8,32 \frac{\text{nN}}{\text{mW}} P_{\text{in}} \frac{D}{100}, \quad (4.1)$$

die auf Zellen im zeitlichen Mittel eines gepulsten SAW-Signals einwirkt [2, 25]. Aus Abbildung 4.5a geht hervor, dass nach $t = 20$ h noch 75 % aller Proben eine gleiche oder im Vergleich zum Startzeitpunkt höhere Anzahl von Neuritensegmenten N aufweisen. In Proben mit $\bar{F} > 50$ nN kommt es dagegen zu einer Abnahme der Segmentanzahl und nach $t = 30$ -40 h fällt N auch in Proben mit geringeren akustischen Krafteinwirkungen verstärkt ab. Diese Abnahme der Neuritenlänge kann darauf hindeuten, dass die Zellviabilität sowohl in Proben mit stärkeren akustischen Kräften als auch mit zunehmender Inkubationszeit abnimmt. Für die folgenden Analysen wird daher der Zeitpunkt $t = 10$ h gewählt, zu dem keine Beeinträchtigung des Neuritenwachstums zu beobachten ist. Auf den Aspekt der Zellviabilität, die in Vorarbeiten für diesen Versuchsaufbau bereits quantifiziert wurde, soll später im Rahmen der Diskussion genauer eingegangen werden.

Die in Abschnitt 3.5.1, Abb. 2.11d gezeigte beispielhafte Häufigkeitsverteilung $P(\alpha)$ konnte bereits erwartungsgemäß zeigen, dass nach $t = 10$ h Inkubation der Zellen ohne SAW-Behandlung keine sichtbare Wachstumstendenz der Neuriten in eine bestimmte Richtung vorhanden ist. Im Vergleich hierzu sind in den Abbildungen 4.5b und c Proben unter Einfluss eines SAW-Stehwellenfelds dargestellt. Hier können nach $t = 10$ h Behandlungszeit deutliche Unterschiede zur Kontrolle ohne SAW beobachtet werden: Für Neuriten unter dem Einfluss einer SSAW bei $P_{\text{in}} = 12$ dBm und $D = 100$ % bildet sich eine Vorzugsrichtung α_{s} entlang der Druckminima der Potentiallandschaft aus (Abb. 4.5b). Durch Behandlung mit $P_{\text{in}} = 21$ dBm und $D = 30$ % treten dagegen erhöhte relative Häufigkeiten P sowohl senkrecht als auch parallel zur SAW-Propagationsachse auf. Die Neuriten überqueren also in ihrem Wachstum vermehrt die Druckmaxima, was auf die bei höheren SAW-Leistungen verstärkt auftretende akustische Strömung im Mikrokanal entlang der Propagationsachse der SAW in α_{p} -Richtung zurückzuführen sein könnte [25, 207]. Eine Ausrichtung der Neuriten entlang der Strömungsachse könnte durch den geringeren Strömungswiderstand möglicherweise einen Wachstumsvorteil bieten. Zur Prüfung der oben aufgestellten Hypothese 2.1, dass Neuriten bevorzugt entlang der Druckminima wachsen, wird im weiteren Analyseverfahren die Binbreite der Winkelverteilung auf $\Delta\alpha = 30^\circ$ erhöht und es werden die relativen Häufigkeiten $P(\alpha_{\text{p}}, \alpha_{\text{s}})$ der beiden beobachteten Vorzugsrichtungen $\alpha_{\text{p}} = (45^\circ \pm 15^\circ, 225^\circ \pm 15^\circ)$ und $\alpha_{\text{s}} = (135^\circ \pm 15^\circ, 315^\circ \pm 15^\circ)$ anhand des gesamten vorliegenden Datensat-

zes ermittelt. Die resultierenden Einzelergebnisse der SAW-Proben in Abhängigkeit der darin wirkenden mittleren akustischen Kraft \bar{F} sowie die gemittelte relative Häufigkeit $\bar{P}(\alpha_p, \alpha_s)$ der Kontrollproben mit eingezeichnetem Konfidenzintervall (KI) sind in Abbildung 4.5d dargestellt.

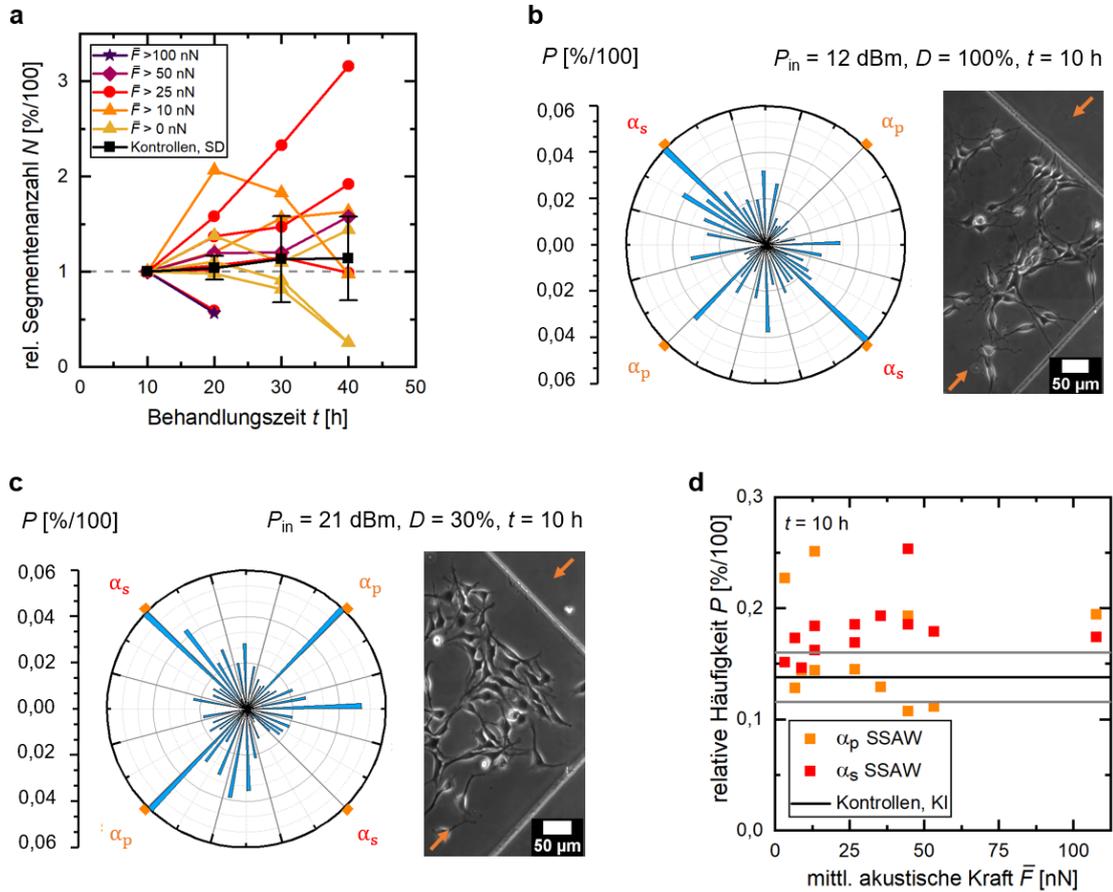


Abbildung 4.5: Ergebnisse des SSAW-gerichteten Neuritenwachstums mit unterschiedlichen SAW-Signalen (modifiziert aus [25]): a) Verlauf der durch *NeuronJ* detektierten Anzahl von Neuritensegmenten in allen vermessenen Proben als Funktion der Behandlungszeit t , b) exemplarische Ausbildung von Vorzugsrichtungen α_s (dargestellt als relative Häufigkeiten P) senkrecht zur SAW-Ausbreitungsrichtung in einer Probe nach einer Behandlungszeit von $t = 10$ h. Die Richtung des eindimensionalen SAW-Stehwellenfelds mit Eingangsleistung $P_{\text{in}} = 12$ dBm und Tastgrad $D = 100\%$ ist im Phasenkontrastbild durch Pfeile gekennzeichnet. c) Exemplarische Ausbildung von Vorzugsrichtungen senkrecht und parallel (α_s , α_p) zur SAW-Ausbreitungsrichtung in einer für $t = 10$ h in einem SAW-Stehwellenfeld mit $P_{\text{in}} = 21$ dBm und $D = 30\%$ behandelten Probe, d) exemplarische Häufigkeitsverteilung der Neuritenrichtungen aller Proben nach einer Behandlungszeit von $t = 10$ h in Abhängigkeit von der angelegten mittleren akustischen Kraft \bar{F} . Zum Vergleich ist hier der Mittelwert der Kontrollproben mit Konfidenzintervall (KI) eingezeichnet.

In Graph 4.5d liegen $f_s = 83,3\%$ aller $P(\alpha_s)$ -Werte auf SAW-Proben oberhalb des Konfidenzintervalls der Kontrollproben. Die Werte $P(\alpha_p)$ in Richtung der Propagationsachse der SAW sind nicht erhöht. Obwohl die Einzeldaten in Graph 4.5d insgesamt zwischen $P_{\text{min}} = 0,107$ und $P_{\text{max}} = 0,253$ verteilt sind, folgen sie keinem sichtbaren Trend in Abhängigkeit

von \bar{F} . Für Behandlungszeiten $t > 10$ h trifft diese Beobachtung ebenfalls zu, wie die ergänzenden Graphen A.3a-c in Anhang A.2 zeigen. Aus diesen Ergebnissen können zunächst zwei Schlussfolgerungen gezogen werden: 1) B35-Zellen in einem eindimensionalen SAW-Stehwellenfeld weisen eine erhöhte Neuritenausrichtung entlang der Druckminima auf. 2) Zudem hat der hier angewendete Bereich der mittleren akustischen Kraft $\bar{F} \in [3, 36; 107, 76]$ nN keinen zusätzlichen leistungsabhängigen Einfluss auf das Richtungsverhalten der Neuriten. Die Richtungsverteilung parallel und senkrecht zum SAW-Stehwellenfeld ändert sich somit nicht mit steigender akustischer Kraft bzw. steigender SAW-Leistung.

Aufgrund ihrer Unabhängigkeit von der akustischen Kraft (Schlussfolgerung 2)) werden zur weiteren Analyse die mittleren relativen Häufigkeiten $\bar{P}(\alpha_p, t)$ und $\bar{P}(\alpha_s, t)$ (im Folgenden bezeichnet als \bar{P}_s bzw. \bar{P}_p) und ihre Standardabweichungen (SD) aller mit SAW behandelten Proben pro Zeitschritt t zusammengefasst und mit den entsprechenden Mittelwerten der Kontrollproben verglichen. Die resultierenden Ergebnisse sind in den Graphen in Abbildung 4.6a und b zu finden.

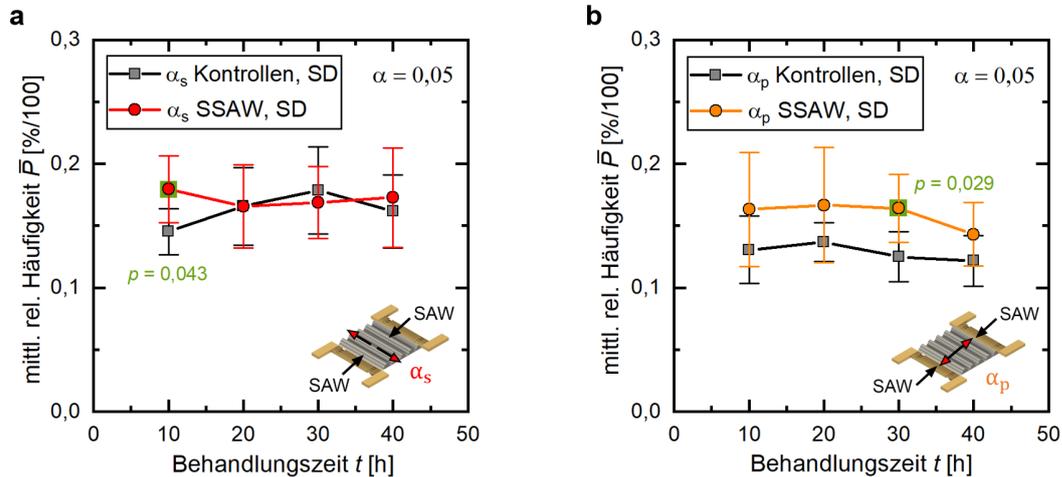


Abbildung 4.6: Zusammenfassung der Ergebnisse des SSAW-gerichteten Neuritenwachstums unabhängig von der angelegten SAW-Leistung als Funktion der Behandlungszeit t : a) Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Häufigkeiten der in α_s ausgerichteten Neuritensegmente für mit SAW behandelte Proben sowie Kontrollproben als Funktion von t , b) entsprechende Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Häufigkeiten der in α_p ausgerichteten Neuritensegmente.

Aus den Graphen 4.6a und b wird sichtbar, dass die Mittelwerte der mit SAW behandelten Proben besonders für kürzere Behandlungszeiten hauptsächlich oberhalb der entsprechenden Mittelwerte der Kontrollen liegen. Ein Zweistichproben-t-Test wird durchgeführt, um die mit SAW behandelten Proben mit den entsprechenden Kontrollproben zum Zeitpunkt t auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zu vergleichen. Für signifikante Unterschiede $p < \alpha$ zwischen zwei Wertepaaren wurde der entsprechende SAW-Mittelwert im Graph markiert und der p -Wert beigefügt. Eine Zusammenfassung aller Testparameter ist in Anhang A.2, Tabelle 4 zu finden. Wie anhand der Einzeldaten in Abbildung 4.5d bereits ersichtlich wurde, bestätigt der

Signifikanztest zu Graph 4.6a das Vorliegen einer signifikanten ($p = 0,043$) Vorzugsrichtung der Neuriten entlang der Druckminima um bis zu $\frac{\Delta\bar{P}_s}{\bar{P}_{s,\text{Ctrl}}} \approx 23,5\%$ mit $\Delta\bar{P}_s = \bar{P}_{s,\text{SAW}} - \bar{P}_{s,\text{Ctrl}}$. Für längere Behandlungszeiten $t > 10$ h verschwindet dieser Effekt. Die Ergebnisse für die Richtung α_p in Graph 4.6b zeigen dagegen ein umgekehrtes Verhalten der Wachstumsrichtung: Zum Zeitpunkt $t = 30$ h führt die SAW-Behandlung zu einer signifikanten Erhöhung in die Richtung parallel zur Propagationsrichtung um bis zu $\frac{\Delta\bar{P}_p}{\bar{P}_{p,\text{Ctrl}}} \approx 31,3\%$ ($p = 0,029$). Wie oben bereits bemerkt wurde, könnte dieser Effekt auf die Richtung der akustischen Strömung im Mikrokanal zurückzuführen sein und könnte in zukünftigen Arbeiten beispielsweise durch Verwendung eines noch niedrigeren Kanals unterdrückt werden. Unter Berücksichtigung der Möglichkeit, dass akustische Strömung die Neuritenausrichtung zusätzlich beeinflusst, fällt die durch die akustische Potentiallandschaft bewirkte signifikante Ausrichtung der Neuriten entlang der Druckmaxima entgegengesetzt zur Strömungsrichtung umso mehr ins Gewicht. Zusammenfassend kann die oben aufgeführte Hypothese 2.1 unter der Einschränkung, dass eine SAW-Behandlungszeit von $t = 10$ h nicht überschritten wird, aufrechterhalten werden. Wie oben bereits anhand von Graph 4.5a festgestellt wurde, wirken sich längere Behandlungszeiten der Zellen mit SAW in diesem Versuchsaufbau offenbar negativ auf die Ausbildung der Neuriten aus, was auf eine reduzierte Zellviabilität zurückzuführen sein könnte. Dies könnte auch erklären, dass die Ergebnisse in 4.6a und b für $t = 40$ h keine signifikante Präferenz des Neuritenwachstums in eine der Vorzugsrichtungen zeigen. Die Viabilität von Zellen und der damit einhergehende anwendbare SAW-Leistungsbereich für diesen Versuchsaufbau wurden in Vorarbeiten eingängig untersucht und stellen die Basis der hier durchgeführten Analysen dar [2, 25, 91]. Bei der Wahl der SAW-Parameter ist in diesem Versuchsaufbau vor allem die Temperaturentwicklung im Mikrokanal ein limitierender Faktor [2, 25]. Die Anwendung gepulster Signale ermöglicht jedoch bei hohen SAW-Leistungen bis zu $P_{\text{in}} = 21$ dBm eine längere Aufrechterhaltung der Viabilität P_{in} im Vergleich zu kontinuierlichen SAW-Signalen derselben Leistung [25]. Weitere Arbeiten zeigen, dass bereits eine kurze Exposition von Zellen an externe mechanische Kräfte, beispielsweise durch ein Ultraschall-Stehwellenfeld [208] oder durch Rasterkraftmikroskopie [209], Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung beeinflussen kann [210, 211]. In dem hier gezeigten Versuchsaufbau war es bisher möglich, SaOs2-Zellen, B35-Zellen sowie primäre Neuronen für mehrere Stunden unter Einwirkung eines SAW-Stehwellenfeldes unter Erhaltung der Viabilität zu inkubieren [2]. Die in der hier vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zum gerichteten Neuritenwachstum von B35-Zellen in SAW-Stehwellenfeldern ebnet weiter den Weg für zukünftige Studien zu akustisch kontrolliertem neuronalem Zellwachstum und Signalweiterleitungen. Im folgenden Kapitel sollen die hier erarbeiteten Ergebnisse zum Zellwachstum in akustischen Stehwellenfeldern durch Untersuchungen zum akustisch stimulierten Zellwachstum im Wundheilungsmodell mit dynamisch modulierten akustischen Kraftfeldern ergänzt werden.

4.3. Stimulation von Wundheilung in dynamisch modulierten akustischen Kraftfeldern

Im vorherigen Unterkapitel 4.2 basierend auf Baumgartner et al. (2022) wurde bereits gezeigt, dass sich dynamisch modulierte akustische Kraftfelder zur Manipulation von Zellwachstum *in vitro* eignen: Die Verwendung von gepulsten SAW-Signalen eröffnet dabei durch die im zeitlichen Mittel reduzierte eingekoppelte Wärme ein größeres anwendbares Leistungsspektrum für die Behandlung lebender Zellen [25]. Akustische Wellen bilden die Grundlage für bereits etablierte Behandlungsmethoden in der Physiotherapie, in denen die Stimulation von Zellwachstum im Vordergrund steht: Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass gepulste Ultraschall-Signale die Heilung von Knochenbrüchen stimulieren [15], die Rehabilitation von Patienten nach Knieersatz-Operationen verbessern [16] und im Tiermodell mit Ratten die Wundheilung beschleunigen können [212]. Allerdings sind die genauen Mechanismen, die der Zellstimulation mit akustischen Wellen zugrundeliegen, noch nicht ergründet. *In vitro*-Studien können dabei helfen, die zellulären Mechanismen zu verstehen und neue und effizientere Stimulationsmethoden zu finden [17]. Das folgende Unterkapitel beschäftigt sich insbesondere mit der Frage, inwiefern dynamisch modulierte akustische Kraftfelder, generiert durch gepulste akustische Oberflächenwellen, das Wachstum von Zellen in einem Wundheilungsmodell stimulieren können. Die Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Paul Täufer (BSc.) [213] erarbeitet und basieren auf der Publikation *Pulsed surface acoustic waves accelerate wound healing and reveal new parameter limits for cell stimulation in vitro* (Baumgartner et al., 2024) [21].

Mit akustischen Kraftfeldern konnte in der Vergangenheit bereits das Wachstum von Zellen in dem unter Abschnitt 3.6.1 beschriebenen Wundheilungsmodell stimuliert werden: Während Stamp et al. (2016) für die SaOs2-Zelllinie durch Behandlung mit einer kontinuierlichen fortlaufenden akustischen Oberflächenwelle bei einer Resonanzfrequenz $f_{\text{res}} = 160$ MHz bereits eine Stimulation von bis zu $E = 117\%$ nachgewiesen hatten, erreichten Brugger et al. (2020) mit dem gleichen Versuchsaufbau den bisher stärksten bei Zellwachstum beobachteten SAW-Stimulationseffekt von $E = 235\%$ in einem Stimulationsleistungsbereich $P_{\text{in}} = 6 - 12$ dBm (4 - 16 mW) für die Zelllinie MDCK-II [1]. Der folgende Abschnitt knüpft an die Ergebnisse dieser Vorarbeiten an und prüft die folgenden Hypothesen durch eine phänomenologische Analyse des Wundheilungsverhaltens unter Variation der SAW-Amplituden und -Pulsbreiten:

Hypothese 3.1: Der Stimulationseffekt der Wundheilung von MDCK-II-Zellen kann durch Verwendung gepulster Signale bei hohen SAW-Leistungen im Vergleich zur Verwendung kontinuierlicher Signale in früheren Arbeiten maximiert werden.

Hypothese 3.2: Der Stimulationseffekt bleibt unter Variation der hier gewählten SAW-Parameter, der Leistung P_{in} , dem Tastgrad D und der Pulsbreite τ_p , erhalten.

Zur Untersuchung des Wundheilungsverhaltens in dynamisch modulierten akustischen Kraftfeldern wurden mehrere Experimentreihen in dem unter Kapitel 3.6.1 und Abbildung 3.7 beschriebenen Versuchsaufbau durchgeführt. Die Auswertung des Wundheilungsprozesses sowie die Ermittlung der Stimulationseffizienz erfolgte unter Verwendung von Gleichung 3.4 und mittels der unter 3.6.2 aufgeführten Machine Learning-gestützten Analysemethodik. In Abbildung 3.8b ist der Verlauf eines exemplarischen SAW-stimulierten Wundheilungsprozesses mit MDCK-II-Zellen unter Behandlung mit einer SAW-Leistung $P_{\text{in}} = 21 \text{ dBm}$ (128 mW) und Tastgrad $D = 10 \%$ (vgl. Gleichung 2.12) veranschaulicht, die in der hier dargestellten Wunde zu einer Stimulationseffizienz von $E = 201 \%$ führt. Das Vorergebnis anhand dieser einzelnen Probe deutet bereits darauf hin, dass sich unter Verwendung von gepulsten SAW-Signalen ein Stimulationseffekt der Wundheilung in der Größenordnung der in Vorarbeiten beobachteten Ergebnisse [1] reproduzieren lässt. Diese Vorbeobachtung soll im Folgenden durch die Ergebnisse ausführlicher Experimentreihen untermauert und ergänzt werden.

Im Allgemeinen ist es möglich, dass Abweichungen in der Wundheilungsgeschwindigkeit entlang der Wunde ohne Einfluss von akustischen Kraftfeldern aufgrund von ungleichmäßiger Zelldichtenverteilung oder Polarisation der Zellen auftreten und zu statistischen Variationen führt [21]. In den im Folgenden aufgeführten Experimenten zur Untersuchung des Wundheilungsverhaltens unter Variation verschiedener SAW-Parameter wurden zusätzlich zu den mit SAW stimulierten Proben als Referenz stets externe Kontrollproben ohne angeschlossenes SAW-Signal vermessen. Insgesamt liegt der Median der Stimulationseffizienz aller Kontrollproben ($N = 24$) bei $E_{\text{m,Ctrl}} = 1,04$, was erwartungsgemäß auf keinen Stimulationseffekt ohne SAW-Behandlung schließen lässt. Für die folgenden Untersuchungen wurden mindestens $N = 6$ Proben pro SAW-Parameter-Kombination vermessen und die resultierenden Stimulationseffizienzen E statistisch auf Signifikanz gegenüber der Kontrollproben geprüft. Der Median aller mit SAW behandelten Proben (unabhängig von den eingestellten Parametern), die einen signifikanten Stimulationseffekt aufweisen, liegt bei $E_{\text{m,SAW}} = 1,54$ ($N = 24$). Ein vollständiger Wundschluss wurde in Kontrollproben nach einer Zeit $t_{\text{m}} \approx 17 \text{ h}$ beobachtet. Der Median der absoluten Wundheilungsgeschwindigkeiten v in den Aperturbereichen der Proben beträgt mit einer initialen Wundbreite von $\Delta x \approx 500 \mu\text{m}$ in SAW-Proben $v_{\text{a,SAW}} = 0,16 \%$ $\text{min}^{-1} = 48 \mu\text{m h}^{-1}$ beziehungsweise $v_{\text{a,Ctrl}} = 0,10 \%$ $\text{min}^{-1} = 30 \mu\text{m h}^{-1}$ in Kontrollproben. Der Stimulationseffekt wird somit auch anhand der absoluten Wundheilungsgeschwindigkeiten erkennbar, worauf später näher eingegangen werden soll.

Im Detail wird nun zunächst der Einfluss von gepulsten SAW-Signalen auf das Wundheilungsverhalten unter Variation der SAW-Leistung P_{in} analysiert. Dabei soll die Bedingung gelten, dass die mittlere Leistung \bar{P}_{p} des gepulsten SAW-Signals konstant bleibt:

$$\bar{P}_{\text{p}} = P_{\text{in}} \frac{D}{100 \%} = \text{const.}, \quad (4.2)$$

Bei einer Verdopplung der Leistung, beispielsweise von $P_{\text{in},1} = 15 \text{ dBm}$ (32 mW) auf $P_{\text{in},2} =$

18 dBm (64 mW) muss nach Gleichung 4.2 für eine konstante eingekoppelte mittlere Leistung der Tastgrad D um die Hälfte reduziert werden, zum Beispiel von $D_1 = 50\%$ auf $D_2 = 25\%$. Diese Bedingung stellt unter anderem sicher, dass bei der Leistungsvariation keine zusätzlichen Temperatureffekte auftreten: Die Temperaturänderung ΔT im Zellkulturmedium bei der höchsten hier verwendeten SAW-Leistung $P_{\text{in}} = 21$ dBm bleibt durch die hier aufgestellte Bedingung auf maximal $\Delta T = 0,2$ K beschränkt [21], wie in Anhang A.3, Abbildung A.4a gezeigt ist. Das Wärmebild in Abbildung A.4b veranschaulicht außerdem die Temperaturverteilung direkt auf dem Substrat des SAW-Chips, die um den IDT herum und auf der gesamten Oberfläche homogen ist.

Ein Vergleich der für die Leistungsvariation verwendeten SAW-Signale bei einer Resonanzfrequenz $f_{\text{res}} \approx 160$ MHz mit den Parameter-Kombinationen ($P_{\text{in},i}, D_i, i = 1,2,3$) ist in Abbildung 4.7a anhand von Oszilloskop-Messungen zu sehen.

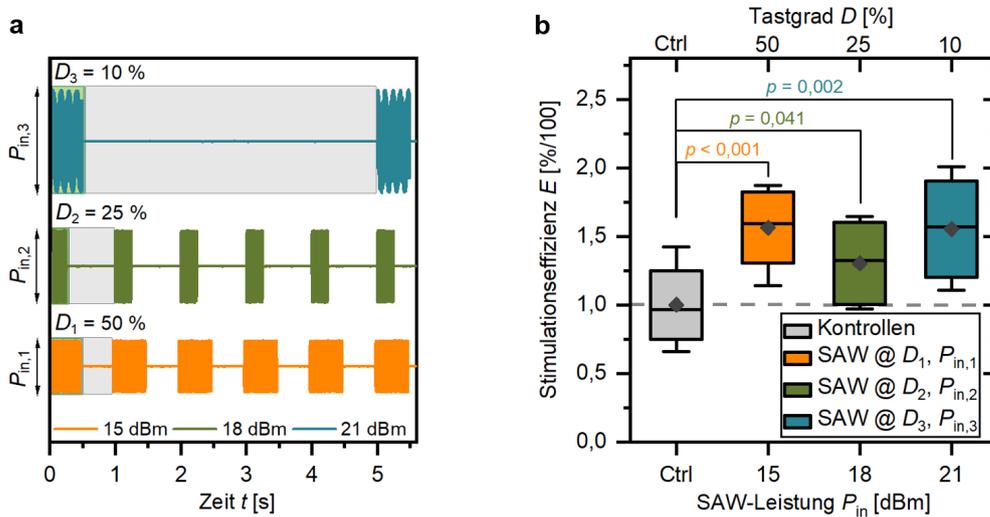


Abbildung 4.7: Ergebnisse der Wundheilungsstimulation unter Variation der SAW-Leistung. a) Oszilloskop-Aufnahmen der verwendeten SAW-Signale bei verschiedenen Eingangsleistungen $P_{\text{in},1}$ bis $P_{\text{in},3}$ unter der Bedingung $P_{\text{in},i} D_i \approx \text{const}$, b) Box-Plot der Stimulationseffizienzen E der Wundheilungsassays bei Behandlung mit den in a) dargestellten SAW-Signalen. Jede Box der mit SAW behandelten Wunden besteht aus $N = 6$ (externe Kontrolle : $N(\text{Ctrl}) = 11$) unabhängigen Proben; die Whisker zeigen den jeweils maximalen und minimalen Wert. Die Höhe der Box repräsentiert die Standardabweichung (SD) und innerhalb der Box sind der Median und der Mittelwert gekennzeichnet. Ein ANOVA-Test zeigt Signifikanz auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ mit $p = 0,001$. Mittels eines Zweistichproben-t-Test mit Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ wurden post-hoc alle Ergebnisse der SAW-Proben gegen das Ergebnis der externen Kontrollproben geprüft. Alle hier vermessenen SAW-Parameter-Paare ($P_{\text{in},i}, D_i$) weisen einen signifikanten Stimulationseffekt mit $p < \alpha$ auf.

In Abbildung 4.7b sind die Ergebnisse der durch diese SAW-Signale bewirkten Stimulationseffizienzen E der Wundheilung gezeigt. Die mittlere Stimulationseffizienz der in dieser Versuchsreihe vermessenen Kontrollproben ($N = 11$) beträgt $E = 1,00 \pm 0,24$. Erwartungsgemäß tritt in nicht-stimulierten Wunden somit kein Stimulationseffekt auf, da der Aperturbereich ebenso schnell zusammenwächst wie in den internen Kontrollbereichen. Für alle mit SAW be-

handelnden Proben können allerdings von $P_{in,1}$ bis $P_{in,3}$ höhere Stimulationseffizienzen E beobachtet werden als in den Kontrollproben. Die maximale mittlere Stimulationseffizienz ergibt sich für $P_{in} = 15$ dBm mit $D = 50\%$ mit $E = 1,56 \pm 0,24$. Ein Zweistichproben-t-Test wurde auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ durchgeführt, um zu prüfen, dass die Wundheilung bei allen hier verwendeten gepulsten Signalen signifikant stimuliert wurde. Die Normalverteilung des Datensatzes sowie die Gleichheit der Varianzen wurde zuvor mithilfe des Shapiro-Wilk- und des Levene-Tests geprüft. Der t-Test bestätigt das Vorliegen eines signifikanten Stimulationseffektes für alle verwendeten SAW-Parameter-Paare $(P_{in,i}, D_i)$ mit $p < \alpha$ im Vergleich zu den Kontrollproben. Zwischen den drei verschiedenen Stimulations-Parameterpaaren ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Dies zeigt, dass unter $\bar{P}_p = const.$ in dem hier geprüften Bereich gepulster SAW-Signale der Stimulationseffekt leistungsunabhängig auftritt. Die oben aufgestellte Hypothese 3.1, dass gepulste Signale mit höheren Leistungen die Stimulationseffizienz im Vergleich zu den in Vorarbeiten verwendeten kontinuierlichen Signalen maximieren, muss jedoch abgelehnt werden, da eine maximale Stimulationseffizienz von nur $E = 201\%$ beobachtet werden konnte und auch die mittleren Stimulationseffizienzen unter dem höchsten bisher beobachteten Mittelwert $E = 235\%$ der Vorarbeiten liegen [1].

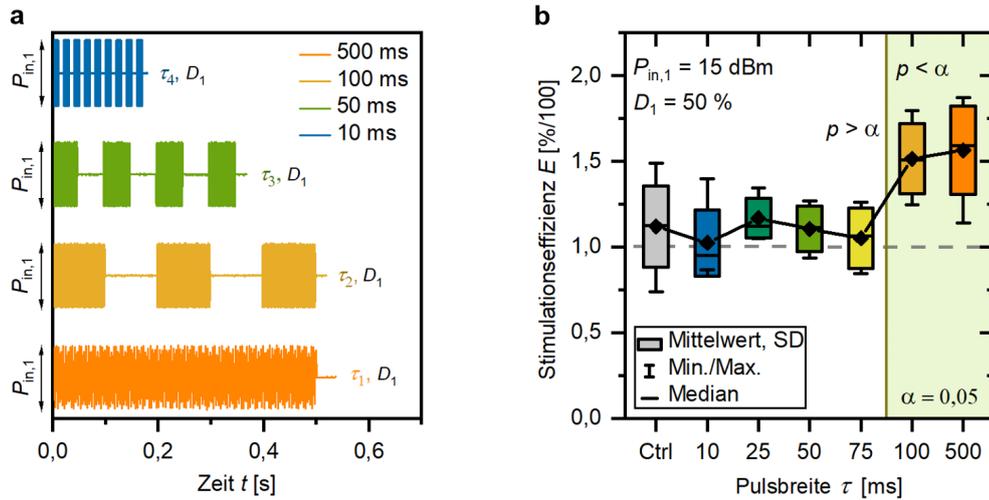


Abbildung 4.8: Ergebnisse der Wundheilungsstimulation unter Variation der Pulsbreite τ_p und konstanter SAW-Leistung und Tastgrad $P_{in} = const.$, $D = const.$. a) Oszilloskop-Aufnahmen von ausgewählten hier verwendeten SAW-Signalen unter Variation von τ_p bei konstanter SAW-Leistung $P_{in,1} = 15$ dBm und $D_1 = 50\%$, b) Stimulationseffizienzen E als Funktion der Pulsbreite τ_p . Jede Box besteht aus $N = 6$ (externe Kontrollen: $N(\text{Ctrl}) = 13$) unabhängigen Proben. Die Whisker zeigen die minimale und maximale Effizienz, die Boxhöhe die Standardabweichung und die horizontale Linie den Median. Ein ANOVA-Test zeigt Signifikanz auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ mit $p < 0,001$. Ein Zweistichproben-t-Test zeigt post-hoc, dass nur Pulsbreiten ab $\tau_{p,c} = 100$ ms zu einem signifikanten Stimulationseffekt im Vergleich mit den externen Kontrollproben führen.

Die zweite Experimentreihe dient zur Untersuchung der Frage, ob zusätzlich zur Erhaltung der mittleren Leistung \bar{P}_p noch andere Bedingungen für den Stimulationseffekt vorliegen. Da in der zuvor durchgeführten Analyse ein maximaler mittlerer Stimulationseffekt von $E =$

$1,56 \pm 0,24$ für $(P_{in,1}, D_1)$ beobachtet wurde, wurden für dieses Parameterpaar zusätzliche Versuche unter Variation der Pulsbreite τ_p durchgeführt. Einige der dabei verwendeten SAW-Signale sind als Oszilloskop-Aufnahmen in 4.8a und die Ergebnisse der Wundheilungsanalysen als Box-Plot in Abbildung 4.8b zu sehen. Jede Box repräsentiert dabei eine Gesamtheit von $N = 6$ Proben pro Pulsbreite, die Kontroll-Stichprobengröße (Ctrl) ist $N = 13$. Es kann beobachtet werden, dass sich die Stimulationseffizienz E für niedrige Pulsbreiten ähnlich der externen Kontrollproben verhält und für höhere Pulsbreiten deutlich zunimmt. Ein Zweistichproben-t-Test mit $\alpha = 0,05$ zeigt, dass in den hier gemessenen Proben unterhalb einer Pulsbreite $\tau_p < 100$ ms kein signifikanter Stimulationseffekt auftritt ($p > \alpha$). Die oben aufgestellte Hypothese 3.2, dass der Stimulationseffekt unabhängig von der Wahl der SAW-Parameter erhalten bleibt, muss somit abgelehnt werden. Für Pulsbreiten oberhalb einer kritischen Pulsbreite $\tau_{p,c}$ ergibt sich dagegen ein signifikanter Stimulationseffekt ($p < \alpha$) mit einer Effizienz von mindestens $E(100 \text{ ms}) = 1,51 \pm 0,19$.

Zur Ergänzung der Ergebnisse werden nun auch die absoluten Wundheilungsgeschwindigkeiten v aller im Rahmen der Leistungs- und Pulsbreitenvariation vermessenen Proben betrachtet. Wie anhand von Abbildung 4.9a und b ersichtlich wird, weisen die Zellen im Aperturbereich der Chips unter SAW-Behandlung keine signifikant höhere Wachstumsgeschwindigkeit auf als in den Aperturbereichen der entsprechenden Kontrollproben (4.9a). Die Zellen in den internen Kontrollbereichen der Wunde wachsen ebenfalls mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Zellen in den externen Kontrollproben (4.9b). ANOVA-Tests ergeben Werte von $p = 0,069$ (a) und $p = 0,294$ (b). Somit kann der in Graph 4.7b beobachtete Stimulationseffekt für die SAW-Leistungen nicht anhand der absoluten Geschwindigkeitswerte nachgewiesen werden, sondern ergibt sich erst unter Normierung auf die entsprechenden internen Kontrollbereiche jeder Probe.

Die Ergebnisse der Pulsbreitenvariation zeigen ein anderes Verhalten. Sowohl für Abbildung 4.9c als auch d zeigen ANOVA-Tests, dass hier Signifikanz vorliegt ($p < \alpha = 0,05$). Obwohl die Stimulationseffizienz E unterhalb der Pulsbreite $\tau_{p,c}$ nicht signifikant erhöht ist und somit nach dem hier verwendeten Analyseverfahren kein Stimulationseffekt vorliegt, können dennoch signifikante Unterschiede der absoluten Wundheilungsgeschwindigkeiten v_{SAW} im Vergleich zu v_{Ctrl} festgestellt werden: Für Pulsbreiten $\tau_p < \tau_{p,c}$ sind einige Wundheilungsgeschwindigkeiten vor der Apertur v_a im Vergleich zur externen Kontrolle unter Prüfung post-hoc durch einen t-Test signifikant erhöht (4.9c). Allerdings ist die Geschwindigkeit auch in den entsprechenden internen Kontrollregionen dieser Proben erhöht (4.9d). Dies erklärt das Zustandekommen der Stimulationseffizienz von $E \approx 1.0$ für diese Pulsbreiten in Abbildung 4.8b. Die Ergebnisse der absoluten Geschwindigkeiten lassen folglich vermuten, dass bei diesen Pulsbreiten τ_p die Wundheilung in den gesamten Proben durch SAW-Behandlung erhöht wird, also ein globaler statt lokaler Stimulationseffekt vorliegt.

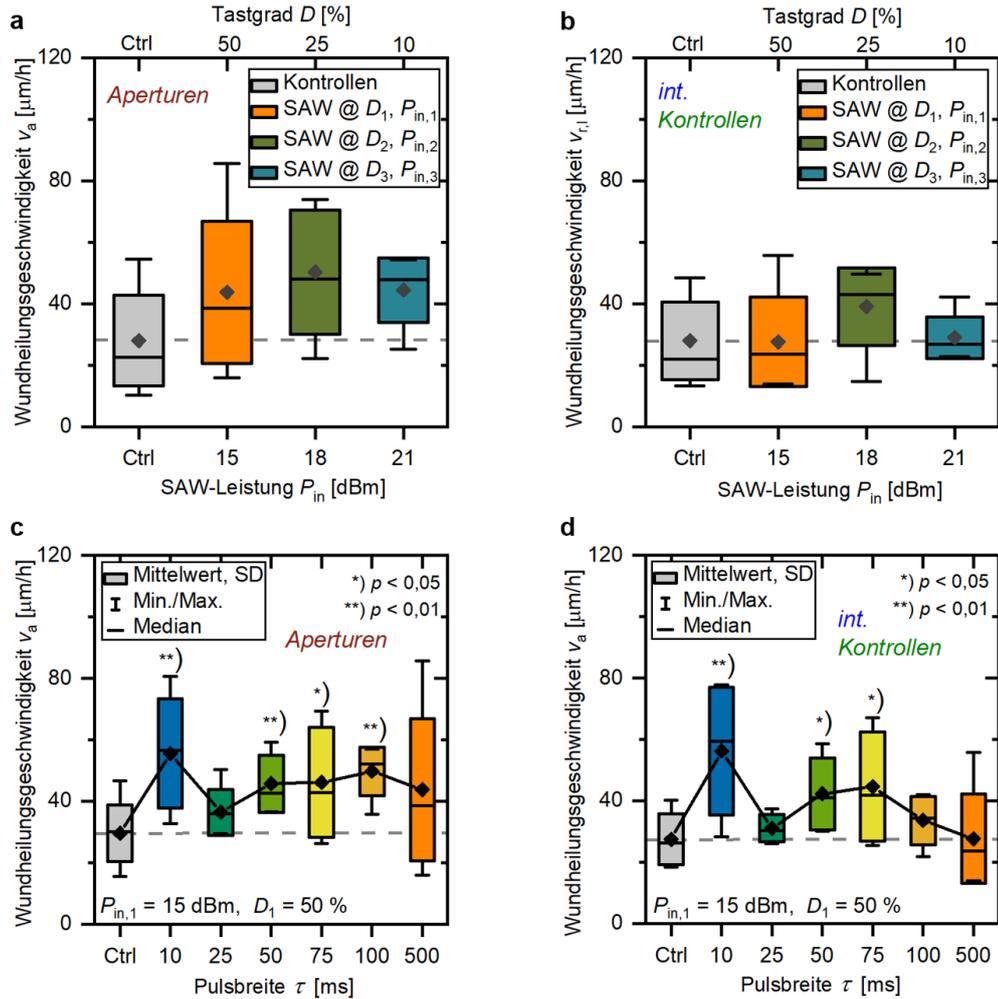


Abbildung 4.9: Absolute Wundheilungsgeschwindigkeiten v in den drei für die Auswertung der Stimulationseffizienz betrachteten Regionen auf dem Chip, zusammengefasst als Box-Plots. a) Geschwindigkeiten v_a in den Aperturbereichen als Funktion der SAW-Leistung P_{in} und der entsprechenden Tastgrade D , b) entsprechende Geschwindigkeiten $v_{1,r}(\tau_p)$ in den jeweils linken und rechten internen Kontrollbereichen, c) Geschwindigkeiten v_a als Funktion der eingestellten SAW-Pulsbreiten τ_p bei konstanter Leistung P_{in} , entsprechende Geschwindigkeiten $v_{1,r}(\tau_p)$ der internen Kontrollbereiche. Ein ANOVA-Test zeigt Signifikanz für c)-d) auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (a) $p = 0,069$, b) $p = 0,294$, c) $p = 0,04$, d) $p = 0,003$). Zur Prüfung der Signifikanz gegen die externen Kontrollproben ohne SAW wurde in c)-d) post-hoc für jede Box ein Zweistichproben-t-Test auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ durchgeführt, wobei die Anzahl unabhängiger Proben für jede Box $N = 6$ beträgt.

Die Interpretation der absoluten Wundheilungsgeschwindigkeiten ist jedoch nicht in allen Fällen ideal. Denn mit den Absolutwerten werden mögliche probeninterne Abweichungen im Zellverhalten, der Chipoberflächen oder der manuellen Behandlung von verschiedenen Proben an verschiedenen Tagen der Versuchsdurchführung nicht berücksichtigt. Solche Variationen können auch bei genauer Einhaltung des Versuchsprotokolls auftreten. Durch Bildung der relativen Werte innerhalb einer Probe können diese Fehlerquellen größtenteils eliminiert werden, weswegen die Berechnung der Stimulationseffizienz E eine stabilere und zuverlässigere

Analysemethodik darstellt als die reine Betrachtung der absoluten Wundheilungsgeschwindigkeiten [21]. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Ergebnisse in Abbildung 4.9c und d einen zusätzlich auftretenden globalen Effekt zeigen, der auf die SAW-Behandlung zurückzuführen sein könnte und in diesen Proben alle Bereiche entlang der Wunde betrifft. Dies soll im Folgenden diskutiert werden.

Aus den obigen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass eine erfolgreiche Stimulation mit SAW von energetischen und zeitlichen Parametern abhängig ist (\bar{P}_p und τ_p). In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass die Eingangsleistung eine wichtige Rolle für die Wundheilungsstimulation mit kontinuierlicher SAW spielt: In Brugger et al. wurde die Stimulationseffizienz $E(P_{in})$ von MDCK-II-Zellen unter Behandlung mit verschiedenen SAW-Leistungen zwischen $P_{in} = 3 - 21$ dBm verglichen und beobachtet, dass nur innerhalb des Bereichs $P_{in} = 6 - 12$ dBm (4 - 16 mW) ein signifikanter Effekt vorliegt [1]. Dies zeigt, dass der SAW-Stimulationseffekt unter Variation der Leistung bzw. Energie nicht erhalten bleibt. Vielmehr nimmt er ein Maximum innerhalb eines optimalen Stimulationsbereichs an. Die der hier vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Versuche wurden bei einer mittleren Leistung $\bar{P}_p \approx 16$ mW durchgeführt, die einem kontinuierlichen SAW-Signal bei $P_{in} = 12$ dBm entspricht. Dadurch konnte unter energetisch optimalen Stimulationsbedingungen die Existenz weiterer möglicher Parametergrenzen der SAW-Stimulation geprüft werden.

Auf Basis aller bisher beobachteten Ergebnisse kann geschlossen werden, dass die Behandlung von Wundheilungsassays mit kontinuierlichen Signalen sowie mit Signalen mit langen Pulsbreiten $\tau_p = 250$ ms und 500 ms einen signifikanten Stimulationseffekt auf bis zu $E = 235\%$ [1] bzw. $E = 201\%$ [21] hervorrufen. Für kürzere Zeitskalen ($\tau_p < 100$ ms = $\tau_{p,c}$) kann keine signifikante Stimulation mehr beobachtet werden, wobei hier dennoch die absolute Wundheilungsgeschwindigkeit v in der gesamten Probe signifikant erhöht sein kann. Hieraus wird eine Abhängigkeit des Wundschließungsverhaltens von der Pulsfrequenz der das SAW-Signal überlagernden Rechteckwelle $f_p = \frac{1}{\tau_p}$ ersichtlich. Dies könnte auf folgende Erklärungen zurückzuführen sein: 1) auf Zeitskalen der Mechanotransduktionsprozesse von Zellen als Reaktion auf den mechanischen Stimulus (beispielsweise Membranveränderungen oder Kalzium-Mobilisation), 2) auf die viskoelastischen Eigenschaften der Zell-Monolage, die ebenfalls eine wichtige Rolle für die Reaktion von Epithelzellen auf externe mechanische Einwirkungen spielen [214]. Bevor die Wirkung des durch SAW erzeugten mechanischen Kraftfeldes diskutiert wird, soll im Folgenden zunächst auf andere mögliche Nebenwirkungen der SAW-Behandlung wie elektrische Felder und akustische Strömungen eingegangen werden, die ebenfalls das Zellverhalten beeinflussen könnten.

Mechanische Vibration als treibende Kraft des Stimulationseffektes

Neben der mechanischen Vibration kann die Applikation von akustischen Oberflächenwellen ein elektrisches Feld, akustische Strömungen und Temperaturerhöhungen erzeugen. Obwohl

in der Literatur gezeigt wurde, dass elektrische Felder Zellmigration lenken können [215], konnten Brugger et al. eine Beeinflussung der Wundheilungsstimulation durch das bei der hier verwendeten Spannung generierte elektrische Feld ausschließen [1]. Somit wird für die hier vorliegenden Ergebnisse das elektrische Feld ebenfalls als Grund für den Stimulationseffekt ausgeschlossen.

Die bei kontinuierlicher SAW-Behandlung auftretenden Schubspannungen τ der akustischen Strömung wurden in Vorarbeiten bereits für das hier verwendete SAW-Chip-Design und den Stimationsleistungsbereich quantifiziert und betragen zwischen $\tau \approx 0,1 - 0,3 \text{ dyn/cm}^2$ [1]. Die Größenordnung der Schubspannungen konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand von PIV-Messungen reproduziert und verifiziert werden, wie Abbildung A.5 unter Anhang A.3 zeigt. Hier ist auch die Geschwindigkeit von Polystyrol-Mikrokügelchen über die Zeitspanne eines SAW-Pulses bei $P_{\text{in}} = 15 \text{ dBm}$ und $D = 50\%$ dargestellt (Abb. A.5b). Bei einer Stimulation mit gepulsten Signalen und dementsprechend gepulster akustischer Strömung könnten Mikro-Luftblasen (engl. *microbubbles*) auftreten. Untersuchungen mittels akustischer Pinzetten-Zytometrie (engl. *acoustic tweezing cytometry*) haben gezeigt, dass Zellen durch Integrin-verankerte Mikroblasen untersucht und auch mechanisch stimuliert werden können [216, 217]. Allerdings ist ein Einfluss solcher Luftbläschen bei den hier durchgeführten Wundheilungsexperimenten unwahrscheinlich. Es konnten weder bei der Analyse der Phasenkontrastbilder im *Live Cell Imaging* keine Mikroblasen beobachtet noch Veränderungen im Strömungsmuster durch sekundäre Strömungen in den *Particle Image Velocimetry*(PIV)-Messungen gemessen werden. Wie aus der Literatur hervorgeht, ist eine strömungsinduzierte Stimulation von Wundheilung und Zellmigration allerdings erst für höhere Schubspannungen möglich: Bei $\tau > 0,5 \text{ dyn/cm}^2$ wurde beispielweise ein höheres Level von Jun-Kinasen und extrazellulärer Kinasenaktivität in Endothelzellen beobachtet [218]. Diese Proteine gehören zu den Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK), die eine wichtige Rolle bei der Zellmigration spielen [219, 220]. Eine Aktivierung dieser Kinasen führte beispielsweise auch zur beschleunigten Wundheilung in Knochenstammzellen [221]. Bei wesentlich höheren Schubspannungen $\tau = 17 \text{ dyn/cm}^2$ konnte eine beschleunigte Zellmigration in Abhängigkeit des Strömungsmusters festgestellt werden [222]. Diese Schubspannungen sind höher als bei der durch SAW erzeugten Strömung in dem hier verwendeten Leistungsbereich. Natürlich kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die Nebenwirkungen der SAW durch die hier verwendeten gepulsten Signale andere Effekte auf das Zellverhalten haben als bei den in den Vorarbeiten verwendeten kontinuierlichen Signalen.

Bei hohen SAW-Leistungen kommt es zu Temperaturerhöhungen in der Probe. Wie bereits in Abschnitt 4.2 erwähnt wurde, kann eine starke Erhöhung der Temperatur im Nährmedium durch die Verwendung von gepulsten im Vergleich zu kontinuierlichen SAW-Signalen jedoch weitestgehend vermieden werden [25]. Im Bereich der Wundheilungsstimulation wurde gezeigt, dass kontinuierliche Signale bei $P_{\text{in}} = 21 \text{ dBm}$ die Proliferationsrate der Zellen verringern [1]. Mit gepulsten Signalen kann dagegen die Zellviabilität bei gleichzeitiger Erhaltung

der SAW-Amplitude aufrechterhalten werden [25]. Wie oben bereits erwähnt, zeigt Abbildung A.4a unter Anhang A.3, dass selbst bei der höchsten im Rahmen dieser Arbeit verwendeten SAW-Leistung $P_{\text{in}} = 21$ dBm die Temperaturerhöhung auf $\Delta T \leq 0,2$ K beschränkt bleibt. Zudem treten neben der Erwärmung des Nährmediums auch keine lokalen Effekte auf dem Substrat im Bereich der Wunde auf, wie Abbildung A.4b zeigt. Es kann somit geschlossen werden, dass SAW-induzierte Temperatureffekte für die hier durchgeführten Experimente keine Rolle spielen. Durch Ausschluss der Temperatur, der elektrischen Felder und der akustischen Strömungen kann davon ausgegangen werden, dass der Stimulationsmechanismus wie in den Vorarbeiten ebenfalls durch die mechanische Vibration und den damit einhergehenden mechanischen Kraftfeldern hervorgerufen wird.

In den folgenden zwei Abschnitten soll näher auf mögliche treibenden Kräfte und zelluläre Mechanismen eingegangen werden, die die oben dargestellten Ergebnissen der SAW-Stimulation durch dynamisch modulierte mechanische Kraftfelder erklären könnten.

Grenzen der Stimulierbarkeit durch Zeitskalen der Mechanotransduktion

Mechanische Stimuli können eine große Bandbreite an Reaktionen in Zellen auslösen. Wie *Ambattu und Yeo* im kürzlich erschienenen Review-Artikel herausarbeiten konnten, könnten die Mobilisierung von Kalzium und Veränderungen der Zellmembran universale Schlüsselfunktionen im Mechanotransduktionsprozess bei der akustischen Stimulation von Zellen darstellen [32]: Wird die Membranspannung durch hochfrequenten mechanischen Druck oder durch Schubspannungen der akustischen Strömung verändert, können Zellen Transmembranproteine wie Piezo-Kanäle aktivieren sowie Vakuolen- oder Vesikel-ähnliche Ausstülpungen bilden, um der Deformation entgegenzuwirken [223]. Dadurch kann die Transmission von mechanischen Kräften durch die Zelle besser reguliert werden [224]. Mit mechanischer Kompression kann der Zufluss von Kalzium (Ca^{2+}) als sekundärer Botenstoff erhöht werden [225], wobei die Kalzium-Mobilisierung von der SAW-Frequenz und der Dauer der Aussetzung abhängt und wiederum eine Vielzahl weiterer Signalkaskaden hervorrufen kann [32].

Die Transmission der Kraft in der Zelle erfolgt in erster Linie durch das Zytoskelett. Die Dynamik von Aktinfilamenten sowie die Bildung und der Umbau von fokalen Adhäsionspunkten, die die Zelle mit dem Substrat verankern, spielen eine Schlüsselrolle für Zellmigration [226, 227]. Dies lässt vermuten, dass eine Stimulation mit akustischen Oberflächenwellen, durch die nach Brugger et al. Zellmigration beschleunigt wird [1], vermutlich auch die Bildung fokaler Adhäsionspunkte auf der Oberfläche beeinflusst. Allerdings findet die Bildung fokaler Adhäsionen auf längeren Zeitskalen statt als die hier eingestellten Pulsbreiten der SAW. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die fokalen Adhäsionspunkte in den vorstehenden Regionen von Fibroblasten über einen Zeitraum von mehreren Minuten gebildet werden [226]. Somit ist es unwahrscheinlich, dass sich der Übergang in Abb. 4.8b von keiner Stimulation zu erfolgreicher Stimulation bei der kritischen Pulsbreite $\tau_{p,c} = 100$ ms durch Mechanismen bei der Bildung von Adhäsionspunkten erklären lässt. Es gibt jedoch weitere Mechanismen

des Zytoskeletts, die auf kürzeren Zeitskalen auftreten können: Mazrahi et al. konnten beispielsweise zeigen, dass die Fluidisierung des Zytoskeletts (engl. *cytoskeletal fluidization*) und sein Wiederaufbau durch akustische Stimulation mit gepulstem Ultraschall bei niedrigen Intensitäten im Verlauf von Sekunden stattfinden kann [228]. Der dadurch stattfindende Prozess der Re-Solidifikation (engl. *re-solidification*) kann auch zu Heilungsprozessen beitragen [229]. Eine Untersuchung der Zytoskelett-Struktur und ihrer Dynamik könnte Hinweise auf die zugrundeliegenden Mechanismen des Stimulationseffekts geben. Zur Untersuchung dieses Phänomens im Kontext von SAW-stimulierter Wundheilung sind jedoch weiterführende Experimente notwendig. Eine detaillierte Quantifizierung der Eigenschaften des Aktin-Zytoskeletts unter SAW-Einfluss ist im weiteren Verlauf dieser Arbeit unter Abschnitt 4.4.3 zu finden.

Alle von *Ambattu und Yeo* zusammengefassten Studien setzen die Zellen der SAW-Behandlung eher für längere Zeiten im Bereich von mehreren Minuten bis Tagen aus [32]. Hier ist somit kein Hinweis auf eine untere zeitliche Grenze der Stimulierbarkeit von Zellen durch Zeitskalen der Stimulationsparameter gegeben, wie sie in der hier vorliegenden Arbeit für Pulsdauern unterhalb $\tau_{p,c}$ beobachtet wurde. Dies bekräftigt die Vermutung, dass der Mechanismus der SAW-Stimulation erst bei einer solchen längeren Aussetzung aktiviert wird. Die oben beobachteten Ergebnisse der Pulsdauervariation zeigen, dass Pulsdauern unterhalb von $\tau_{p,c} = 100$ ms keine erhöhte Stimulationseffizienz der Zellen hervorrufen. Dies wäre ein Widerspruch zu der Vermutung von *Ambattu und Yeo*, dass der Mechanismus der SAW-Stimulation universal und somit unabhängig von den Eigenschaften des verwendeten SAW-Signals ist [32]. Denn die obigen Ergebnisse zeigen anhand der kritischen Pulsbreite $\tau_{p,c}$ eine bisher unbekannte untere Parametergrenze der Stimulation mit dynamisch modulierten SAW-Kraftfeldern. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass trotz der Abwesenheit des Stimulationseffekts die absolute Wundheilungsgeschwindigkeit in der gesamten Probe für die meisten Pulsbreiten $\tau_p < \tau_{p,c}$ signifikant gegenüber der Kontrollproben erhöht ist (vgl. Abb. 4.9c und d). Wie oben bereits erwähnt, können die nicht behandelten Proben nur als externe Kontrolle gewertet werden und dienen nicht als Referenz für interne Probenunterschiede. Allerdings reflektieren sie dennoch tagesspezifische Unterschiede im Zellverhalten. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete signifikante Erhöhung der Wundheilungsgeschwindigkeiten bei $\tau_p < \tau_{p,c}$ ebenfalls ein SAW-induzierter Stimulationseffekt sein könnte, der durch die Normierung bei der Stimulationseffizienz nicht sichtbar wird. Dies würde bedeuten, dass die Behandlung mit SAW bei kleineren Pulsbreiten die gesamte Wunde stimulieren kann. Möglicherweise werden hier sekundäre Signalwege der Mechanotransduktion im Zellrasen von der stimulierten Aperturregion aus in die Richtung der internen Kontrollbereiche aktiviert oder beschleunigt, die dann auch weiter außen zu einer indirekten Stimulation führen können. Um dies weiter zu ergründen und die Vermutung zu bestätigen, müssten jedoch weitere Versuche zu Mechanotransduktionsprozessen und Signalkaskaden im Zellrasen durchgeführt werden, was nicht Bestandteil dieser Arbeit war.

Grenzen der Stimulierbarkeit durch viskoelastische Eigenschaften des Zellrasens

Die Wellenlänge der hier verwendeten akustischen Oberflächenwellen liegt in der Größenordnung einer Zelle. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die mechanische Kraft auf die im Vergleich sehr kleinen fokalen Adhäsionspunkte oder andere Oberflächenproteine direkt einwirken und diese verändern kann. Alternative Erklärungsansätze für den SAW-Stimulationseffekt wurden anhand komplexerer Mechanotransduktionsprozesse im letzten Abschnitt bereits diskutiert. Es gibt jedoch noch andere physikalische zelluläre Eigenschaften, die durch das auf den kollektiv migrierenden Zellrasen einwirkende Kraftfeld beeinflusst werden könnten. Dabei geben Vorarbeiten bereits einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Stimulationseffizienz und der Fähigkeit von Zellen, im Kollektiv zu migrieren: SaOs2-Zellen, die in einer Wundkonstellation auf dem SAW-Chip eher einzeln migrieren, weisen mit bis zu $E = 117\%$ [20] eine deutlich geringere Stimulationseffizienz auf als die kollektiv migrierenden MDCK-II-Zellen. Dabei liegt der größte Unterschied zwischen Einzelzell- und Kollektivmigration in der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (engl. *Adherens Junctions*, AJ), zu denen vor allem Proteine aus der Familie der Cadherine gehören [230]. Durch Feinabstimmung dieser Kontakte können Zell-Zusammenschlüsse während der Migration ihre Viskoelastizität anpassen [231]. Epithelzellen bei der Wundheilung behalten die Expression von E-Cadherin bei, da dieses Protein eine wichtige Rolle bei der Transmission von Traktionskräften durch den Aktomyosin-Ring spielt [232, 233]. In der Kollektivmigration kommen hauptsächlich längere Zeitskalen (Minutenbereich und länger) zum Tragen, die zur Anpassung der Cadherin-Mechanismen bei mechanischer Deformation notwendig sind und zu einer langfristigen Anpassung der viskoelastischen zellulären Reaktionen auf den mechanischen Reiz beitragen können [231, 234, 235]. Im Folgenden soll daher besonders die Viskoelastizität als physikalische Eigenschaft der migrierenden Zellen und als möglicher Angriffspunkt der mechanischen SAW-Stimulation näher diskutiert werden.

Die durch die Pulsbreite $\tau_{p,c}$ gesetzte untere Grenze der Stimulierbarkeit der Wunden deutet darauf hin, dass viskoelastische Eigenschaften des Zellrasens eine Rolle spielen könnten. In der Literatur wurde die Abhängigkeit der elastischen und viskosen Moduln G' und G'' von der Frequenz eingehend untersucht, wobei häufig experimentelle Methoden wie optische Pinzetten (engl. *Optical Tweezer*, Mikrorheologie, MTC (engl. *Magnetic Twisting Cytometry*) oder Rasterkraftmikroskopie (AFM) in Kombination mit Zellen angewendet werden. So demonstrierten beispielsweise Ayala et al. mit optischen Pinzetten, dass sowohl G' als auch G'' bei Fibroblasten in einem Frequenzbereich von $f = 1-14$ Hz ansteigen, wobei sie sich in einem Bereich von $G = 10-100$ Pa bewegen [236]. Fabry et al. untersuchten das viskoelastische Verhalten von fünf verschiedenen Zelllinien (beispielsweise auch von Epithel-ähnlichen F9-Zellen und menschlichen bronchialen Epithelzellen) anhand von MTC-Versuchen, wobei magnetische Beads durch Integrine direkt an das Zytoskelett gekoppelt werden [237]: Bis zu einer Frequenz von $f = 10$ Hz folgen G' und G'' dabei der strukturellen Dämpfungsgleichung

(engl. *structural damping equation*) bzw. dem Gesetz der schwachen Wechselwirkung [238]. Für $f > 10$ Hz weist G'' eine stärkere Frequenzabhängigkeit auf und nähert sich für sehr hohe Frequenzen dem Verhalten einer Newton'schen Flüssigkeit an [237].

Die Ergebnisse in Abbildung 4.8 zeigen eine kritische Frequenz des einhüllenden Rechtecksignals bei $f_{p,c} = 10$ Hz ($\tau_{p,c} = 100$ ms) für die Stimulierbarkeit der Wundheilung. Der Vergleich mit den Ergebnissen von Fabry et al. könnte bestätigen, dass es einen Wendepunkt im Zellverhalten um diese kritische Frequenz herum gibt. Unter der Annahme, dass die gepulste SAW-Behandlung für $f_{p,c} > 10$ Hz eine ähnliche Zellreaktion hervorruft wie MTC bei derselben Frequenz, könnte sich das daraus resultierende dominierende viskose Verhalten der Zellen unvorteilhaft für die Migration herausstellen. Diese Vermutung wird gestützt durch die Arbeit von Kole et al., die intrazelluläre Mikrorheologie-Versuche mit migrierenden und ruhenden Fibroblasten durchführten [239]. Migrierende Zellen wiesen hierbei eine höhere Elastizität des Zytoskeletts auf als ruhende Zellen und zeigten ein viskoelastisch-flüssiges Verhalten ab einer Frequenz-Grenze von $\tau > 200$ ms, was in derselben Größenordnung ist wie die kritische Pulsbreite $\tau_{p,c}$. Eine weitere mögliche Schlussfolgerung wäre somit, dass auch die in der gesamten Probe beobachtete höhere Wundheilungs- bzw. Migrationsgeschwindigkeit für $\tau_p < \tau_{p,c}$ aufgrund der frequenzabhängigen viskoelastischen Eigenschaften des Zellrasens auftritt. Für niedrige Pulsbreiten, und damit höhere Frequenzen des Rechtecksignals, könnte die erhöhte Viskosität des konfluenten Zellrasens via Zell-Zell-Kontakte den Stimulus von der Apertur hin zu den internen Kontrollbereichen übermitteln.

Viele Studien zeigen lokale Unterschiede innerhalb von Zellen auf und betonen, dass das viskoelastische Verhalten aus dem Beitrag des Zytoskeletts und des Zellkerns besteht. Während das Zytoskelett im viskoelastischen Kontext als weiches glasartiges Material behandelt wird [240], zeigen Mikropipetten-Aspirationsmessungen von isolierten Zellkernen, dass Zellkerne sich eher wie ein viskoelastischer Festkörper verhalten und drei- bis vierfach höhere elastische Moduli G' aufweisen als intakte Zellen [241]. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass der Nukleus und Perinukleus von retinalen pigmentierten Epithelzellen unterschiedlich auf oszillatorische Mikrorheologie-Behandlungen im Bereich von $f = 1-300$ Hz reagieren [242]. Die Zellen wurden hierbei mit einem AFM-Cantilever im Nanometerbereich zusammengedrückt und die beobachteten Unterschiede in der Zell-Steifigkeit auf die Aktinbündel im perinuklearen Bereich der Zellen zurückgeführt. Auch bei der SAW-Behandlung findet eine mechanische Deformation an der Substratoberfläche im Nanometerbereich statt. Basierend auf der Literatur kann daher angenommen werden, dass es auch hier verschiedene Beiträge von Zytoskelett und Zellkernen gibt. Wie sich die Eigenschaften dieser beiden Zellkomponenten unter SAW-Stimulation verändern, wird unter Abschnitt 4.4.3 im Detail untersucht.

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuchsreihen und die hier gefundenen Parametergrenzen zur Stimulation von Wundheilungsassays geben spannende Einblicke in die Stimulierbarkeit von Zellwachstum unter dem Einfluss dynamisch modulierter Kraftfelder. Anhand

der Diskussion wurden mögliche Gründe für das Verhalten der Zellen erörtert, von denen beispielsweise die Viskoelastizität des Zellrasens eine mögliche Erklärung für die fehlende Stimulierbarkeit unterhalb einer kritischen Pulsbreite τ_c darstellen könnte. Auch Zeitskalen von Mechanotransduktionsprozessen könnten eine Rolle spielen. Allerdings stößt die im Rahmen dieses Unterkapitels und in Vorarbeiten verfolgte phänomenologische Herangehensweise beim Verständnis des genauen intrazellulären Mechanismus von akustisch stimulierter Wundheilung an ihre Grenzen. Das folgende Unterkapitel soll daher dazu dienen, einen Blick in das Zellinnere und auf dort möglicherweise veränderte Mechanismen beim Zellwachstum unter dem Einfluss akustischer Kraftfelder zu ermöglichen.

Die zu Beginn von Kapitel 4 aufgestellte **Forschungsfrage 2**), wie statische und dynamische akustische Kraftfelder das Wachstumsverhalten von Zellen beeinflussen, kann anhand der in den Unterkapiteln 4.2 und 4.3 dargestellten Ergebnisse beantwortet werden: Dynamisch modulierte akustische Kraftfelder durch Verwendung gepulster Signale ermöglichen in beiden hier gezeigten Versuchsaufbauten sowohl für stehende als auch für fortlaufende akustische Wellen einen höheren anwendbaren SAW-Amplitudenbereich zur Beeinflussung des Zellwachstums als statische Kraftfelder bzw. kontinuierliche Signale. Unter 4.2 konnte phänomenologisch gezeigt werden, dass das Wachstum von Neuriten in den hier verwendeten eindimensionalen dynamischen und statischen Potentiallandschaften signifikante Vorzugsrichtungen entlang der Druckminima sowie senkrecht dazu annimmt. Im Wundheilungsmodell mit MDCK-II-Zellen bleibt die Stimulationswirksamkeit des Zellwachstums unter Verwendung dynamisch modulierter akustischer Kraftfelder unter Erhaltung der mittleren SAW-Leistung sowie oberhalb einer kritischen Pulsbreite ebenfalls erhalten.

4.4. Intrazelluläre Mechanismen in der SAW-stimulierten Wundheilung

In diesem Abschnitt sollen zugrundeliegende Mechanismen des Phänomens der Wundheilungsstimulation mit akustischen Oberflächenwellen identifiziert werden. Die Beantwortung der Frage nach intrazellulären Mechanismen erfordert dabei ein hohes Maß an Interdisziplinarität, sodass die den folgenden Abschnitte zugrundeliegenden Versuchsreihen und Ergebnisse unter anderem auf biochemischen und biologischen Ansätzen basieren.

Im Folgenden wird zunächst der Einfluss von SPPL3-Membranproteasen und der damit verbundenen Veränderung der Glykosylierung der Zellmembran auf die Wundheilungsgeschwindigkeit anhand verschiedener genetisch veränderter Zelllinien quantifiziert. Anschließend wird die Aktivität der mechanosensitiven Proteine YAP, MRTF und Notch bei der SAW-stimulierten Wundheilung untersucht. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse werden zuletzt durch eine Analyse der Zellkern- und Aktin-Zytoskelett-Eigenschaften unter SAW-Einfluss erweitert, wodurch sich mögliche Mechanismen der Mechanotransduktion bei der SAW-stimulierten Wundheilung ergeben. Die Ergebnisse der folgenden Unterkapitel wurden in enger Zusammenarbeit mit Theresa Maresch (BSc.) [243], Manuel Schleicher (MSc.) [244] und Paul Täufer (BSc.) erarbeitet und basieren zum Teil auf der eingereichten Publikation *Actin filament and cell orientation align with surface acoustic wave propagation and cell migration in vibration-enhanced wound healing* [179].

4.4.1. Die Rolle von SPPL3-Membranproteasen bei der SAW-stimulierten Wundheilung

Die Glykosylierung von Proteinen in der Zellmembran beeinflusst wichtige zelluläre Prozesse wie die interzelluläre Adhäsion, Zell-Zell-Erkennung sowie Wege der Signalübertragung [245–249]. Dies kann sich auch auf die Zellmigration auswirken, die der wichtigste Prozess bei der SAW-stimulierten Wundheilung ist [1]. Insbesondere die intrazelluläre Expression der *Signalpeptidpeptidase like 3* (SPPL3)-Protease bestimmt dabei das Glykosylierungsmuster einer Zelle: In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der SPPL3-Expression zu einer verstärkten (Hyper-)Glykosylierung führt, während eine erhöhte Expression eine verringerte (Hypo-)Glykosylierung hervorruft [71]. Auf Basis dieser Hintergründe soll nun der Frage nachgegangen werden, ob die Wundheilungsbeschleunigung durch SAW auf eine Veränderung der Aktivität von SPPL3 in den behandelten Zellen zurückzuführen ist. Zudem soll im Rahmen des folgenden Abschnitts die Übertragung der SAW-Behandlung auf eine menschliche Zelllinie untersucht werden, was einen weiteren Schritt hin zur Anwendung der SAW-Stimulation *in vivo* darstellt. Es werden die folgenden Hypothesen geprüft:

Hypothese 4.1: Die kollektive Migrationsgeschwindigkeit und somit das Wundheilungsverhalten von HEK-293-Zellen lassen sich mit akustischen Oberflächenwellen stimulieren, wobei sich eine Veränderung der SPPL3-Expression auf die Stimulationseffizienz auswirkt.

Hypothese 4.2: Die absolute Wundheilungsgeschwindigkeit von HEK-293-Zellen wird durch akustische Oberflächenwellen verändert.

Wie unter Abschnitt 2.2.1 erwähnt, regulieren SPPL3-Proteasen die N-Glykosylierung der Zellmembran über Spaltung von Glykosidasen und Glykosyltransferasen [71, 72]. Zur Untersuchung des Einflusses der SPPL3-Expression und der daraus resultierenden Glykosylierung auf die Stimulierbarkeit von HEK-293-Zellen wird die Zelllinie HEK-T-RExTM-293 verwendet, wie unter Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Diese Zellen weisen einen Tetracyclin-Repressor auf, der ein induzierbares System für die Expression von SPPL3 basierend auf der Präsenz von Doxycyclin im Zellkulturmedium schafft [250–252]. In dieser Arbeit werden drei verschiedene genetische Modifikationen auf das T-REx-System angewendet, sodass insgesamt vier verschiedene Zelllinien zum Einsatz kommen: 1) die HEK-293-TR-Zelllinie (HEK-TR), die einen stabilen Tetracyclin-Repressor ohne weitere Modifikation exprimiert und somit als Kontroll-Zelllinie verwendet wird, 2) die HEK-293-TR-KO-Linie (HEK-KO) mit einem durch CRISPR/Cas9-induzierten Knock-Out des SPPL3-Gens, was zu einer Hyperglykosylierung führt, 3) die HEK-293-TR-WT-Linie (HEK-WT), bei der durch Zugabe von Doxycyclin eine Überexpression von SPPL3 und somit Hypoglykosylierung induziert wird und 4) die HEK-293-WT-D/A-Linie (HEK-D/A), die eine überexprimierte, aber inaktive Mutante von SPPL3 besitzt und dadurch als Kontrolle für die Aktivität der Protease verwendet wird. Phasenkontrastbilder aller verwendeten Zelllinien während der Wundheilung auf SAW-Chips sind in Abbildung 4.10b gezeigt. Der Versuchsaufbau und die Auswertung zur Stimulation der Zellen in Wundheilungsassays mit SAW erfolgte analog zu den unter den Abschnitten 3.6.1, 3.6 und 3.6.2 beschriebenen Methoden für MDCK-II-Zellen. Zur Gewährleistung von Konfluenz aller HEK-293-Zelllinien unter Erhaltung einer Anwachszeit von $t \approx 24$ h in den Kammern des Culture Inserts wurden die Zelldichten zum Zeitpunkt des Aussäens auf $\rho_{\text{TR,KO}} = 8 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ bzw. $\rho_{\text{WT,DA}} = 12,5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ angepasst. Zur Induktion der Proteasen wurden die Zellen über Nacht in $V = 1$ ml des zelllinienspezifischen Kultivierungsmediums unter Zusatz von $c_{\text{Dox}} = 1 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin inkubiert.

Die Stimulierbarkeit der HEK-293-Zellen mit SAW wird hier zunächst anhand der unveränderten Kontrollzelllinie HEK-TR untersucht. Hierzu wurden Wundheilungsassays innerhalb eines SAW-Leistungsbereichs $P_{\text{in}} = 6 - 15$ dBm stimuliert und analysiert, welcher sich nach Vorarbeiten zur Stimulation lebender Zellen eignet [1]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.10a graphisch aufgetragen. Die maximal erreichte Stimulationseffizienz ergibt sich mit $E(12 \text{ dBm}) \approx 1,29$ für eine einzelne Probe, wobei die Mittelwerte aller Effizienzen leistungsunabhängig einen Wert von $E \approx 1,0$ annehmen. Ein ANOVA-Test zum Vergleich der SAW-Leistungen untereinander liefert erwartungsgemäß mit $p = 0,974$ keine signifikanten Unterschiede ($\alpha = 0,05$). Im Gegensatz zu den Vorarbeiten mit MDCK-II-Zellen kann in diesem Leistungsbereich also kein signifikantes Maximum der mittleren Stimulationseffizienz aller Proben beobachtet werden. Vielmehr weist die Zelllinie HEK-TR offenbar keine signi-

fikante Stimulierbarkeit innerhalb des aus Vorarbeiten bekannten Bereichs der auf Zellen anwendbaren SAW-Leistungen [1, 2, 25].

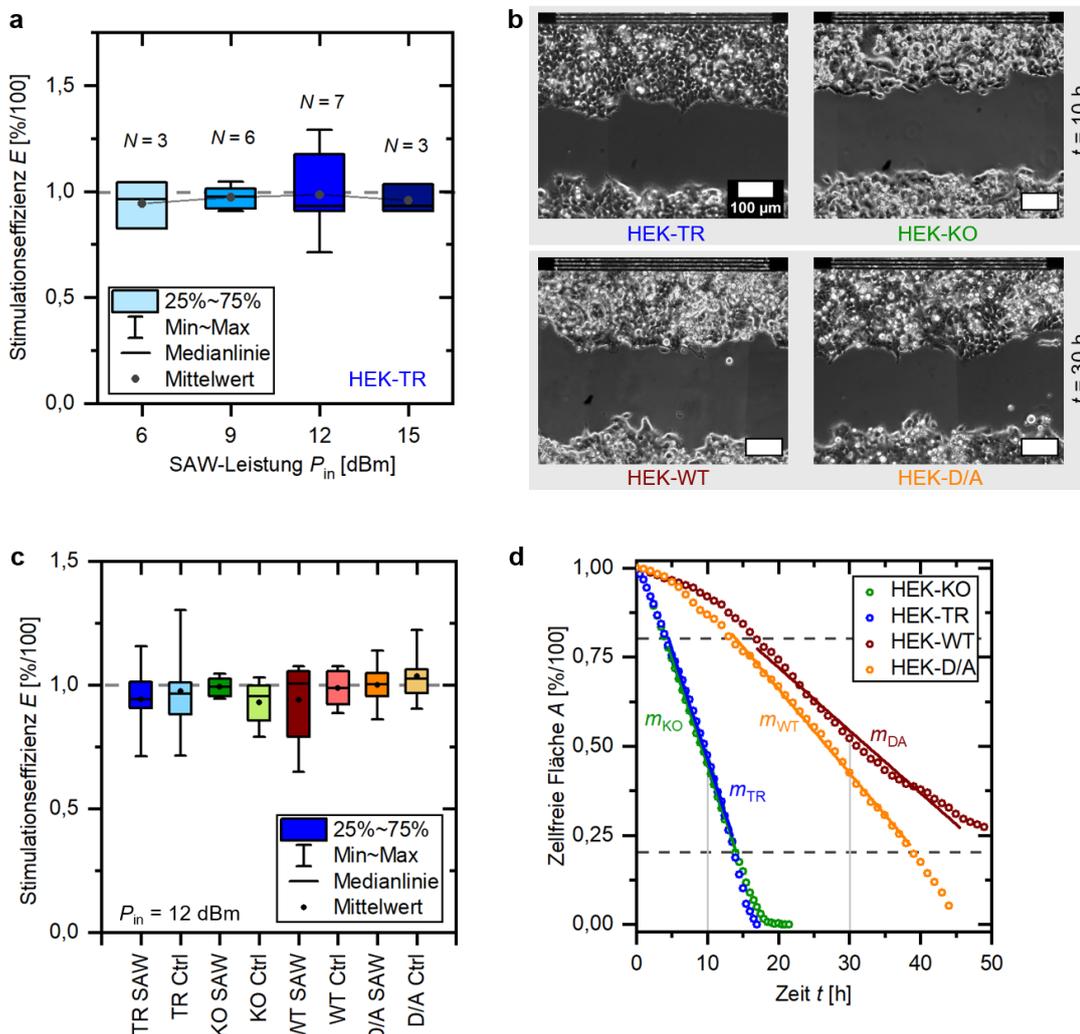


Abbildung 4.10: Ergebnisse der Wundheilungsstimulation mit verschiedenen HEK-293-Zelllinien: a) Stimulationseffizienzen E der unveränderten Zelllinie HEK-TR als Funktion der anliegenden SAW-Leistung P_{in} , b) Phasenkontrastaufnahmen der Aperturbereiche von allen verwendeten Zelllinien mit zu ca. 50 % geschlossener Wunde: HEK-KO bezeichnet die Zelllinie mit unterdrückter SPPL3-Expression, HEK-WT besitzt überexprimiertes SPPL3 und HEK-D/A eine überexprimierte, aber inaktive Mutante von SPPL3. Die Skalenbalken entsprechen $x = 100 \mu\text{m}$ c) Stimulationseffizienzen E aller verwendeten Zelllinien ohne und mit SAW-Stimulation bei $P_{in} = 12$ dBm, d) Abnahme der zellfreien Fläche A als Funktion der Zeit für die in b) gezeigten Aperturregionen zur Veranschaulichung der verschiedenen Wundheilungsgeschwindigkeiten m bzw. v_{WH} . ANOVA-Tests zum Vergleich der Stimulationseffizienzen zeigten keine Signifikanz auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ (a) $p = 0,974$, c) $p = 0,737$).

Um zu prüfen, ob sich die Stimulierbarkeit von HEK-Zellen unter genetisch modifizierter SPPL3-Expression verändert, wurden anschließend Versuchsreihen mit HEK-KO-, HEK-WT- und HEK-D/A-Zelllinien durchgeführt. Diese genetisch modifizierten Zelllinien wur-

den einheitlich bei einer SAW-Leistung $P_{\text{in}} = 12 \text{ dBm}$ vermessen, da sich diese Leistung in Vorarbeiten als geeignet zur Stimulation anderer Zellen erwiesen hat [1, 2, 20, 21]. Exemplarische Phasenkontrastbilder aller verwendeten Zelllinien während des Wundheilungsprozesses im Aperturbereich sind in Abbildung 4.10b dargestellt. In Abbildung 4.10c sind die Stimulationseffizienzen E aller in diesen Versuchsreihen vermessenen Zelllinien zusammengefasst, wobei jede Box $N = 5 - 10$ unabhängige Wundheilungsassays repräsentiert. Analog zu den vorherigen Abschnitten wurden an jedem Tag zusätzlich Kontrollproben ohne SAW-Behandlung vermessen (als *Ctrl* bezeichnet). Aus dem Graph geht hervor, dass auch hier die Mittelwerte sowohl bei Kontroll- als auch bei SAW-Proben im Bereich von $E = 1,0$ liegen. Der niedrigste Mittelwert wird für die HEK-KO-Zellen mit $E_{\text{KO,Ctrl}} = 0,93 \pm 0,09$ beobachtet, der höchste Mittelwert für HEK-D/A-Zellen mit $E_{\text{DA,Ctrl}} = 1,03 \pm 0,11$. Ein ANOVA-Test zeigt, dass auch bei den genetisch modifizierten Zelllinien keine signifikanten Unterschiede in der Stimulierbarkeit mit SAW vorliegen ($p = 0,737$). Somit muss die oben aufgestellten Hypothese 4.1 abgelehnt werden: Unabhängig von der SPPL3-Expression zeigten die hier verwendeten HEK-293-Zelllinien in Wundheilungsassays keine signifikante Veränderung ihrer Stimulationseffizienz unter SAW-Einfluss.

Um eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit eines Stimulationseffekts zu finden, wurden weitere Analysen durchgeführt. Im Rahmen von Kontrollexperimenten wurde beispielsweise der Einfluss verschiedener Medienzusammensetzungen auf die Stimulierbarkeit untersucht, wie unter Anhang A.4, Abb. A.6 gezeigt ist. Hierbei ergaben sich anhand eines ANOVA-Tests keine signifikanten Veränderung ($p = 0,970$) der Stimulationseffizienz von HEK-TR-Zellen zwischen antibiotikafreiem (ABF) Medium und dem normalen Kultivierungsmedium (beide enthielten Doxycyclin), sodass ein Einfluss der Antibiotika im Kulturmedium auf die Stimulierbarkeit ausgeschlossen werden kann. Aus Abschnitt 4.3 ging hervor, dass sich neben der Stimulationseffizienz auch die absolute Wundheilungsgeschwindigkeit v bei MDCK-II-Zellen unter SAW-Einfluss verändern kann. Daher soll hier auch für die HEK-293-Zellen eine Analyse der der Effizienz E zugrundeliegenden Geschwindigkeiten aller Wundbereiche durchgeführt und diskutiert werden. Bereits aus den Phasenkontrastbildern in Abbildung 4.10b wird ersichtlich, dass zwischen den Zelllinien Unterschiede der Wundheilungsgeschwindigkeit vorliegen müssen: Eine ungefähr zur Hälfte geschlossene Wunde wird bei den Zelllinien HEK-TR und HEK-KO bereits nach $t = 10 \text{ h}$ erreicht und ähnelt damit der Geschwindigkeit von MDCK-II-Zellen, während die Zelllinien HEK-WT und HEK-D/A erst nach $t = 30 \text{ h}$ eine ähnlich stark bewachsene zellfreie Fläche aufweisen. Diese Unterschiede werden in Abbildung 4.10d quantifiziert, in der die Abnahme der zellfreien Fläche A als Funktion der Zeit für alle in 4.10b gezeigten Aperturbereiche aufgetragen ist. Die Beträge der Steigungen m der linearen Fitfunktionen sind äquivalent zu den Wundheilungsgeschwindigkeiten v und zeigen das Verhalten $v_{\text{DA}} < v_{\text{WT}} < v_{\text{KO}} < v_{\text{TR}}$. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die SPPL3-Expression möglicherweise eine Veränderung in der absoluten Wundheilungsgeschwindigkeit hervorruft. Zur genaueren Untersuchung des Verhaltens dieser Geschwindigkeitsunterschiede

zwischen den Zelllinien mit und ohne SAW-Einfluss ist in Abbildung 4.11 eine Zusammenfassung aller Wundheilungsgeschwindigkeiten zu finden, die den Stimulationseffizienzen in Abbildung 4.10c zugrundeliegen. Zusätzlich sind die mittleren Wundheilungsgeschwindigkeiten sowie die mittlere Zeit bis zur vollständigen Wundschließung t_e der Kontrollproben jeder Zelllinie in Tabelle 2 zusammengefasst.

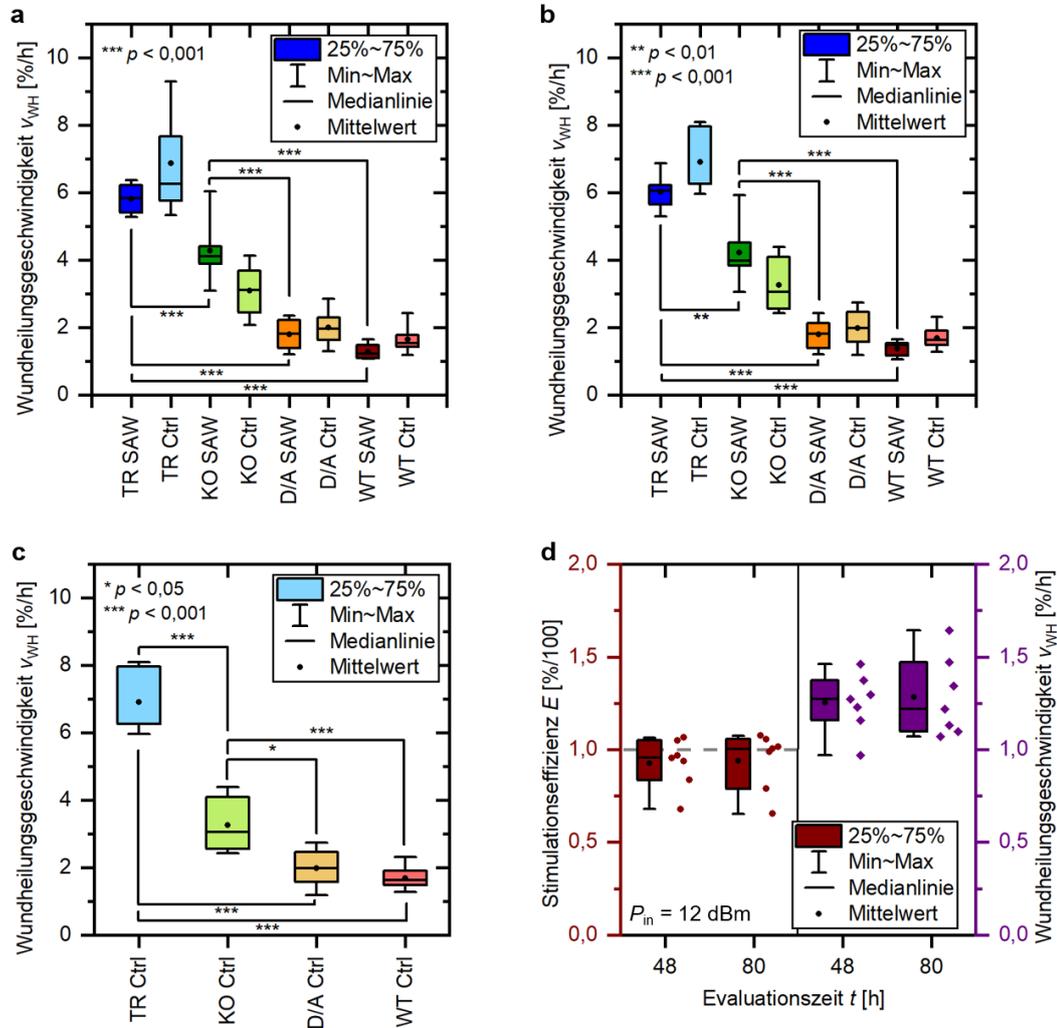


Abbildung 4.11: Ergebnisse der absoluten Wundheilungsgeschwindigkeiten v_{WH} der verschiedenen HEK-293-Zelllinien: a) Wundheilungsgeschwindigkeiten v_{WH} der Aperturbereiche von SAW-stimulierten Proben bei $P_{in} = 12$ dBm und Kontrollproben. Ein ANOVA-Test zeigte Signifikanz mit $p < 0,001$, post-hoc wurde ein t -Test (Tukey-Test) auf dem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zum Vergleich der SAW-stimulierten Proben durchgeführt, b) Vergleich der Wundheilungsgeschwindigkeiten v_{WH} gemittelt über alle drei Bereiche entlang der Wunden (Apertur und interne Kontrollbereiche) mit $p < 0,001$, c) SAW-unabhängiger Vergleich der Wundheilungsgeschwindigkeiten v_{WH} in allen Bereichen der Kontrollproben mit $p < 0,001$, d) Einfluss unterschiedlicher Evaluationszeiten t auf die Stimulationseffizienz E bzw. Wundheilungsgeschwindigkeit v_{WH} von SAW-stimulierten HEK-WT-Zellen bei $P_{in} = 12$ dBm.

Wie das Verhalten der exemplarischen Aperturbereiche in Abbildung 4.10b bereits vermuten

ließ, schließen die HEK-TR-Zellen den Wundbereich am schnellsten, während die HEK-D/A-Zellen ähnlich wie die HEK-WT-Zellen am langsamsten wachsen. Wie in Abb. 4.11a zu sehen ist, sind die Unterschiede in den Wundheilungsgeschwindigkeiten der SAW-stimulierten Aperturbereiche zwischen fast allen Zelllinien außer zwischen HEK-WT- und HEK-D/A-Zellen untereinander signifikant. Ergänzend dazu zeigt Abb. 4.11b, dass auch beim Vergleich der gemittelten Geschwindigkeiten aller Bereiche entlang einer Wunde (Aperturen und interne Kontrollbereiche) die Signifikanz in SAW-stimulierten Proben analog zur separaten Betrachtung der Aperturbereiche erhalten bleibt. Dieser Effekt kann allerdings nicht auf die SAW-Stimulation zurückzuführen sein, da die jeweiligen Kontrollproben ohne SAW in Abbildung 26a und b ähnliche und teilweise sogar größere Unterschiede in der Geschwindigkeit wie bzw. als die SAW-stimulierten Proben aufweisen. Die gemittelten Wundheilungsgeschwindigkeiten aller Wundbereiche in Kontrollproben sind separat in Abbildung 4.11c aufgetragen. Ein ANOVA-Test zeigt, dass die Abnahme der Wundheilungsgeschwindigkeit zwischen allen vermessenen Zelllinien auch ohne SAW-Einfluss signifikant ist ($p < 0,001$). Der größte Unterschied ergibt sich zwischen HEK-TR- und HEK-D/A-Zellen mit bis zu $\Delta v = 26,15 \pm 2,35 \mu\text{m}/\text{h}$, wobei die nicht modifizierte Zelllinie deutlich schneller wächst als die Zelllinie mit SPPL3-Überexpression. Somit muss auch Hypothese 4.2, dass die SAW-Stimulation ähnlich wie bei MDCK-II-Zellen die absolute Wundheilungsgeschwindigkeit beeinflussen kann, abgelehnt werden. Die hier beobachteten signifikanten Effekte sind offensichtlich auf SAW-unabhängige Einflüsse zurückzuführen.

Zelllinie	v [% h ⁻¹]	v [$\mu\text{m h}^{-1}$]	t_e [h]
HEK-TR	6,91	34,55	14
HEK-KO	3,26	16,31	31
HEK-WT	1,98	9,92	50
HEK-D/A	1,68	8,40	60

Tabelle 2: Mittlere Wundheilungsgeschwindigkeiten v und mittlere Wundschließungszeit t_e aller Kontrollproben mit HEK-TR-, HEK-KO-, HEK-WT- und HEK-D/A-Zellen.

In den Vorergebnissen einer hypothesengenerierenden Studie mit geringerem Stichprobenumfang war eine Stimulation von HEK-TR- und HEK-WT-Zellen von bis zu $E_{\text{WT}} = 1,5 \pm 0,3$ möglich, wobei dort die Wundheilungsgeschwindigkeit v von HEK-KO-Zellen am höchsten war [2]. Diese Ergebnisse konnten durch die hier durchgeführten ausführlicheren Messungen mit größerer Probenanzahl und unter Miteinbezug von Kontrollproben sowie der Zelllinie HEK-D/A nicht reproduziert werden. In der Vorarbeit wurden allerdings alle Messungen über einen sehr kurzen Zeitraum evaluiert, in dem besonders die Wunden der HEK-WT- und HEK-D/A-Zellen nur eine sehr geringe Fläche bewachsen waren. Die hier in Abbildung 4.11b gezeigten Ergebnisse für HEK-WT-Zellen wurden daher zur Überprüfung des Einflusses der Evaluationszeit t auf die resultierende Wundheilungsgeschwindigkeit und auf die Stimulationseffizienz nochmals über eine kürzere Wachstumszeit $t = 48 \text{ h}$ statt 80 h analy-

siert. Wie Abbildung 4.11d zeigt, ergibt sich durch die Beschränkung jedoch keine erhöhte Stimulationseffizienz. Auch die Wundheilungsgeschwindigkeit v bleibt erhalten, was zeigt, dass die Wunden über den gesamten Prozess der Wundschließung mit gleichbleibender Geschwindigkeit wachsen.

Für die Geschwindigkeitsunterschiede zwischen den Zelllinien in Abbildung 4.11 kommen zwei Erklärungen in Frage: Zum einen könnte eine Veränderung der SPPL3-Expression und die dadurch veränderte Glykosylierung der Zellmembran die Geschwindigkeit beeinflussen (1). Alternativ (2) könnte aber auch der Grad der genetischen Modifikation selbst ein Grund für die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten unabhängig vom Grad der Glykosylierung darstellen. Erklärung (1) stützt sich dabei hauptsächlich auf die Wirkung der SPPL3-Expression durch die strukturelle Änderung der Zellmembran, was sich beispielsweise auf das Adhäsions- und Migrationsverhalten auswirken könnte. Wie bereits erwähnt, resultiert eine verringerte SPPL3-Expression in einer Hyperglykosylierung der Membranproteine und Glykolipide. In der Literatur konnte gezeigt werden, dass eine Hyperglykosylierung zu verringerter Zell-Zell-Adhäsion in Epithelzellen führt, was eine erhöhte Integrin-gesteuerte Zellmigration zur Folge hat [246]. Aus einer weiteren Arbeit geht hervor, dass die Zellmigration bei mittlerer Stärke von Zell-Zell-Adhäsionen maximal ist [253]. In Abbildung 4.11 konnten für eine normale Glykosylierung (HEK-TR-Zellen) sowie eine Hyperglykosylierung (HEK-KO-Zellen) die höchsten Wundheilungsgeschwindigkeiten gemessen werden. Basierend auf den Literaturergebnissen ist es folglich naheliegend, dass dies auf eine erhöhte Zellmigration aufgrund optimaler Glykosylierungsbedingungen zurückzuführen sein könnte. Eine verringerte Glykosylierung dagegen würde sich demnach in einer langsameren Migration äußern, was die verringerten Wundheilungsgeschwindigkeit der HEK-WT-Zellen erklären könnte. Ein Widerspruch zu dieser Erklärung ist jedoch, dass die Wundheilungsgeschwindigkeit der HEK-D/A-Zellen keinen signifikanten Unterschied zu der der HEK-WT-Zellen aufweist, obwohl die D/A-Zellen aufgrund der Überexpression der inaktiven SPPL3-Mutante keine Hypoglykosylierung aufweisen. Dies deutet darauf hin, dass nach Erklärung (2) nicht die Glykosylierung der Membran, sondern nur die Präsenz bzw. die Menge von SPPL3 in der Zellmembran ausschlaggebend für die veränderten Geschwindigkeiten ist. Hierbei stellt sich die Frage, ob dabei eine veränderte Zellmigration oder Zellproliferation der grundlegende Prozess für die Wundheilungsgeschwindigkeit ist und ob dies durch die genetische Modifizierung der Zelllinien beeinflusst wird. Qualitative Beobachtungen aus der Zellkulturhaltung zwischen den Versuchsreihen weisen darauf hin, dass die Zellteilung bei den Zelllinien mit höherem Grad an genetischer Veränderung (Überexpression) verlangsamt ist, da die HEK-KO- und HEK-TR-Zellen bei der Zellpassage zweimal wöchentlich mit doppelt so großem Verhältnis (1:20) überführt werden mussten wie die HEK-WT- und HEK-D/A-Zellen, um eine Konfluenz von 80-90% nicht zu überschreiten. Der Grad der genetischen Modifikation könnte somit möglicherweise das Zellteilungsverhalten beeinflussen. Die naheliegendste Schlussfolgerung ist demnach, dass der zunehmende Grad an Komplexität der genetischen Veränderung zu

einer Abnahme der Zellteilung und damit der Wundheilungsgeschwindigkeit führt.

Zusammenfassend lassen sich beide zu Beginn aufgestellten Hypothesen ablehnen: Unabhängig vom Vorliegen und der Art ihrer genetischen Modifizierung konnte keine Stimulierbarkeit der HEK-293-Zelllinien bei der Wundheilung festgestellt werden. Stattdessen konnte eine Abhängigkeit der Wundheilungsgeschwindigkeit vom Komplexitätsgrad der genetischen Veränderung beobachtet werden, die SAW-unabhängig auftritt.

Da auf Grundlage dieser Untersuchungen stark vermutet werden kann, dass die Aktivität von SPPL3-Membranproteasen in den Stimulationseffekt der Wundheilung mit akustischen Oberflächenwellen nicht involviert ist, sollen im Folgenden weitere intrazelluläre Proteine untersucht werden.

4.4.2. Einfluss der SAW-Stimulation auf die mechanosensitiven Proteine YAP, MRTF und Notch

Um den intrazellulären Mechanismen der SAW-stimulierten Wundheilung weiter auf den Grund zu gehen, sollen in diesem Abschnitt mögliche Auswirkungen der akustischen Stimulation auf die mechanosensitiven Proteine YAP (*yes-associated protein*), MRTF (*myocardin-related transcription factor*) und Notch identifiziert werden. Dabei soll die Frage beantwortet werden, ob akustische Kraftfelder die Aktivität dieser mechanosensitiven Proteine verändern. Die Versuchsreihen, die diesen Untersuchungen zugrundeliegen, wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Hanna Engelke und Anderson Massahiro de Campos von der Universität Graz durchgeführt und sind Bestandteil der oben genannten gemeinsamen Publikation zur Untersuchung von Aktinfilamenten, Zellkernen und mechanosensitiven Proteinen bei der SAW-stimulierten Wundheilung [179].

Mechanosensitive Proteine sind häufig mit der Dynamik von Zellkernen, Aktomyosinstrukturen und dem Prozess der Zellmigration verbunden. So wird beispielsweise MRTF durch Aktinpolymerisation aktiviert und reguliert seinerseits die mechanische Aktivität von Zellen [254]. Mechanosensitivität ist auch ein wesentliches Merkmal der Signalwege von YAP und Notch [255, 256]. Der Notch-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, sodass eine Erhöhung der Notch-Aktivität ein zukünftiger Angriffspunkt bei der Therapie chronischer Wunden sein könnte [257, 258]. Nach Aktivierung des Notch-Rezeptors wird die intrazytoplasmatische Domäne von Notch in den Zellkern verlagert und reguliert dort die Gentranskription [259, 260]. In Säugetierzellen wurde festgestellt, dass die Aktivität und das nukleozytoplasmatische Shuttling von YAP und TAZ (*Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif*) durch die Elastizität der EZM und die Morphologie der Zelle reguliert werden und damit zelluläre Reaktionen auf mechanische Reize ermöglichen [261, 262]. Darüber hinaus ist die YAP-Aktivierung mit Aktomyosin verbunden und steuert bekanntermaßen wichtige Zellprozesse wie die Proliferation, Differenzierung und Migration. Alle drei hier genannten Proteine, MRTF, Notch und YAP, stehen in Verbindung mit Wundheilungs- oder

Zellmigrationsprozessen und könnten somit als intrazelluläre Mechanismen zum Phänomen der SAW-stimulierten Wundheilung beitragen. Im Folgenden soll die folgende Hypothese geprüft werden:

Hypothese 4.3: Die Aktivität der genannten mechanosensitiven Proteine bei der Wundheilung wird durch SAW-Stimulation erhöht.

Für die Versuchsdurchführung werden Wundheilungsassays mit MDCK-II-Zellen gemäß der Beschreibungen in Abschnitt 3.6.1 vorbereitet und mit einer fortlaufenden SAW behandelt. Anschließend werden die Proben in 4%igem Formaldehyd fixiert und Antikörpermarkierungen zur Detektion von YAP, MRTF und Notch vorgenommen, wie im Protokoll unter Anhang C.6 nachzulesen ist. Auf Basis der Vorerfahrungen der Kooperationspartner wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung dieser Proteine auf einer kurzen Zeitskala stattfindet. Daher liegt der Fokus der im Folgenden vorgestellten Messungen auf Proben, die nach einer Zeit $t = 3$ h des Wundheilungsprozesses bzw. der SAW-Stimulation fixiert wurden. Weitere Zeitschritte wurden unter Verwendung von Epifluoreszenzmikroskopie ebenfalls evaluiert und sind in Anhang A.5, Abb. A.7b zu finden. Sowohl von den bei P_{in} stimulierten SAW-Proben als auch von externen Kontrollproben wurden nach der Antikörpermarkierung mittels Konfokalmikroskopie Fluoreszenzbilder der Antikörper in den Apertur- und internen Kontrollregionen aufgenommen. Die Methodik zur Bildanalyse ist im Detail unter Abschnitt 3.6.4 aufgeführt. Zur Bestimmung der Antikörper-Intensitäten aus den Konfokalbildern wurden hierbei zunächst aus den zugehörigen Aufnahmen der Zellkerne segmentierte Masken erstellt. Wie die Abbildungen 4.12a-c anhand beispielhafter Aufnahmen von YAP, MRTF und Notch zeigen, wurden diese Masken anschließend vom Antikörper-Bild abgezogen. Dadurch lassen sich die mittleren Intensitäten der Antikörper in den Zellkernen (I_N) und im Zytosol (I_Z) separat bestimmen.

Aus den Konfokalaufnahmen der exemplarischen Kontrollprobe in Abb. 4.12a wird ersichtlich, dass die YAP-Intensitäten im Zytosol durchschnittlich höher sind als in den Kernen $I_Z > I_N$, was zu einer relativen Intensität $I_{\text{rel}} = \frac{I_N}{I_Z} < 1,0$ gemittelt über den Zellrasen führt. Wie wir in Anhang A.5, Abb. A.7a zeigen, bleiben die Intensitäten I_Z und I_N über die Wundschicht hinweg konstant und zeigen keine räumliche Abhängigkeit vom Abstand zur Apertur oder zum Wundrand. Eine SAW-unabhängige Verteilung der Intensitäten kann auch für die MRTF- und Notch-Antikörper der Kontrollproben in Abb. 4.12b und c beobachtet werden. Im Gegensatz zu YAP sind die Intensitäten der Notch- und MRTF-Antikörper in den Zellkernen jedoch insgesamt deutlich höher als im Zytosol. Der Notch-Antikörper bindet dabei nur an das im Kern lokalisierte Protein.

Abbildung 4.12d zeigt, dass auch unter SAW-Einfluss bei $P_{\text{in}} = 9$ dBm die meisten Zellen analog zur Kontrollprobe in Abb. 4.12a zytosolisches YAP aufweisen. Allerdings lassen sich an der vorderen Wundfront qualitativ einige Ausnahmen beobachten, in denen YAP vornehm-

lich im Zellkern lokalisiert ist. Bei den in Abbildung 4.12d hervorgehobenen YAP-positiven Zellkernen handelt es sich um Führungszellen (engl. *leader cells*), die gerade anfangen in die Wunde zu migrieren. Da es sich hier jedoch nur um vereinzelte Beobachtungen handelt, reicht die Statistik im Rahmen des hier vorliegenden Stichprobenumfangs nicht für eine quantitative Evaluation von Führungszellen aus.

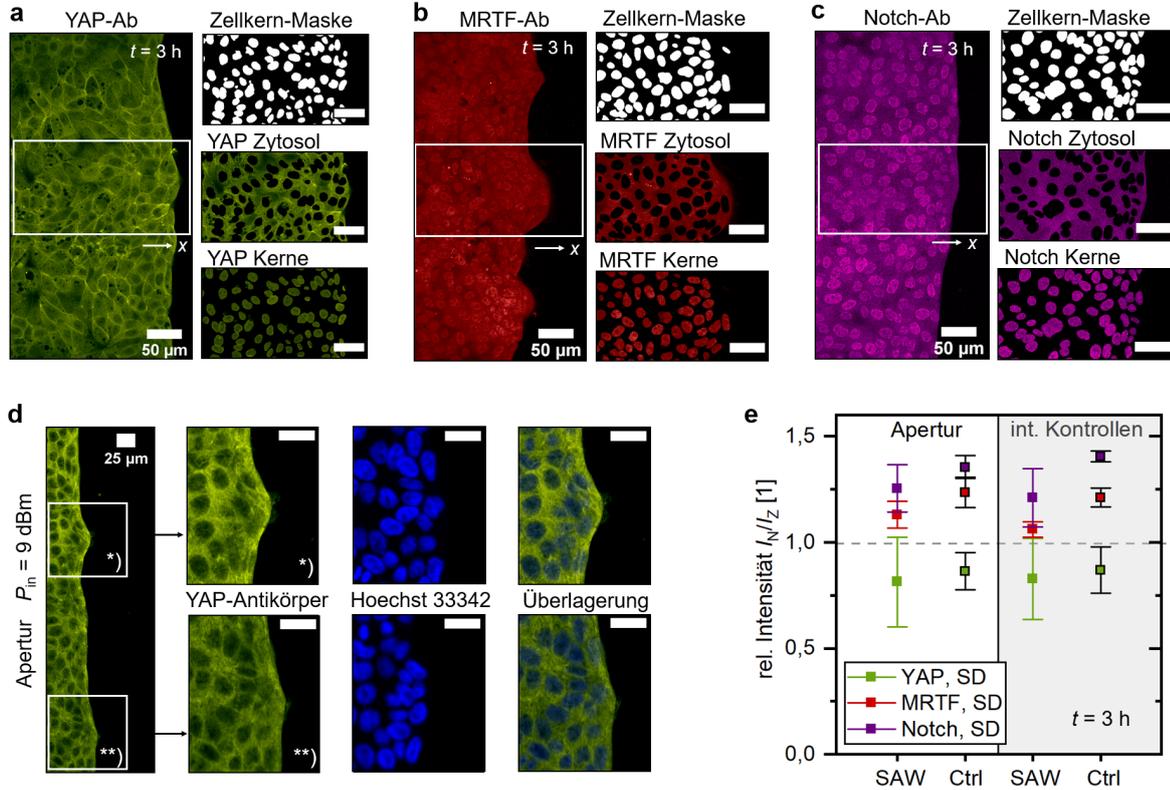


Abbildung 4.12: Ergebnisse der Antikörper-Analysen der mechanosensitiven Proteine in SAW-stimulierten Wundheilungssays nach $t = 3$ h. a) Konfokal-Mikroskopaufnahme von YAP-Antikörpern in der Aperturregion einer Kontrollprobe. Eine binarisierte Maske des entsprechenden Zellkern-Bildes (detektiert mit Hoechst 33342) wird vom Originalbild der Antikörper abgezogen, um die YAP-Intensität im Zytosol (I_Z) und im Zellkern (I_N) separiert zu bestimmen. b) Entsprechende beispielhafte Konfokalaufnahme und Bildprozessierung von MRTF-Antikörpern im Aperturbereich einer Kontrollprobe. c) Entsprechende beispielhafte Konfokalaufnahme und Bildprozessierung von Notch. Die Skalenbalken in a)-c) entsprechen $\Delta x = 50 \mu\text{m}$. d) Exemplarische Aufnahme von YAP-Antikörpern im Aperturbereich einer bei $P_{in} = 9$ dBm stimulierten Probe mit ausgeprägten YAP-positiven Führungszellen (*leader cells*). Die Skalenbalken entsprechen $\Delta x = 25 \mu\text{m}$. e) Zusammenfassung der mittleren relativen YAP-, MRTF- und Notch-Intensitäten $I_{rel} = \frac{I_N}{I_Z}$ nach $t = 3$ h Wundheilung, ermittelt über Aperturbereiche bzw. interne Kontrollbereiche von SAW-stimulierten Proben und Kontrollproben (*Ctrl*). Jeder Mittelwert repräsentiert $N = 3$ unabhängige Proben.

Die resultierenden relativen Intensitäten I_{rel} aller im Rahmen der Versuchsreihen bei $t = 3$ h vermessenen Proben sind in Abbildung 4.12e quantitativ zusammengefasst. Für alle Bilder wurde ein Intensitätsschwellenwert $T = 50$ festgelegt, damit verbleibende Hintergrundsignale und Signale mit geringer Intensität nicht in die Berechnung der mittleren Intensitäten

miteingehen. Jeder der in Abbildung 4.12e dargestellte Mittelwert setzt sich aus $N = 3$ unabhängigen Proben zusammen, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen. Ein t-Test für unabhängige Stichproben zeigt, dass die Unterschiede zwischen den Regionen in SAW-Proben und den entsprechenden Regionen in Kontrollproben nicht signifikant sind. Eine Ausnahme bildet MRTF, wo I_{rel} in den internen Kontrollregionen der SAW-stimulierten Proben signifikant niedriger ist als in den entsprechenden Regionen der Kontrollproben ($p = 0,025$). Eine Zusammenfassung aller statistischen Testergebnisse der Intensitätsanalyse findet sich unter Anhang A.5, Abb. A.8.

Unter Anhang A.5, Abbildung A.7b sind ergänzende Ergebnisse der YAP-Intensitäten nach Wundschließungszeiten $t = 1$ h, 2 h und 9-21 h gezeigt. Die relativen Intensitäten der anderen Zeitschritte wurden dabei aus Epifluoreszenzaufnahmen ermittelt. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die YAP-Intensitäten für die restlichen Zeiten bis auf $t = 3$ h nahe $I_{\text{rel}} \approx 1,0$ liegen, also im Zellkern und Zytoplast etwa die gleichen Intensitäten besitzen ($I_{\text{Z}} \approx I_{\text{N}}$). Der Unterschied der relativen Intensitäten $\Delta I_{\text{rel}} = 26,0 \pm 12,3\%$ zwischen $t = 1$ h und $t = 3$ h ist unter SAW-Behandlung signifikant. Allerdings zeigen die internen Kontrollproben ein ähnliches Verhalten. Da Epifluoreszenzaufnahmen zudem eine geringere Auflösung haben als die auf die Ebene des Zellkerns fokussierten Konfokalbilder, ist es wahrscheinlich, dass dieses Ergebnis ein Artefakt aufgrund der aus vielen Ebenen emittierten Intensitäten der Antikörper im Epifluoreszenzmikroskop ist.

Aus den in Abbildung 4.12 dargestellten Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Aktivität der hier untersuchten mechanosensitiven Proteine, dargestellt durch den Grad ihrer Lokalisierung im Zellkern, durch $t = 3$ h SAW-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollproben nicht direkt verändert wird. Damit muss die oben aufgestellte Hypothese 4.3 abgelehnt werden. Dennoch zeigt die höhere Lokalisierung von MRTF und Notch in den Zellkernen aller Proben (Abb. 4.12b, c und e) eine SAW-unabhängige Aktivität dieser Proteine. Wenn YAP wie MRTF und Notch aktiviert wäre, wäre hier ebenfalls eine höhere Lokalisierung im Zellkern zu beobachten. Unsere Daten zeigen jedoch eine deutlich höhere Lokalisierung von YAP im Zytoplast. Generell kann eine Exklusion von YAP aus dem Zellkern auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen sein: Zu Beginn des Wundheilungsversuchs sind noch keine Zellen vollständig in die Wunde migriert, wie in den Abbildungen 4.12a und d zu sehen ist, und befinden sich daher mit hoher Dichte im Zellrasen. Literaturergebnisse zeigen, dass YAP in dichten Zellmonolayern aufgrund der Kontakthemmung zwischen den Zellen vermehrt zytoplastisch ist [263–265]. Es wurde auch gezeigt, dass eine hohe Zelldichte zu einer erhöhten Spannung im die Zelle umgebenden Aktin-Kortex führt, die die YAP/TAZ-Kernlokalisierung in MDCK-Zellen unterdrücken kann [81]. Dupont et al. beobachteten ein höheres zytoplastisches YAP auf weichen Substraten und auf begrenzten Mikromustern und zeigten, dass die GTPase Rho sowie die Ausbildung von Aktin-Stressfasern für nukleares YAP notwendig sind und die Zellform sowie Kräfte des Zytoplasts die YAP/TAZ-Aktivität beeinflussen können [262]. Ein Ungleichgewicht der Kräfte innerhalb der Zellmonolage kann daher in Einzelzel-

len zu einer Umlokalisation von YAP im Zellkern führen, wie es beispielsweise bei den hier beobachteten Führungszellen der Fall ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Aktivierung von MRTF und Notch unabhängig von SAW erfolgt, während YAP mit Ausnahme weniger Führungszellen hauptsächlich zytosolisch ist. Wir beobachten also keine allgemeinen Veränderungen bei diesen Proteinen, was auf einen von der Aktivierung von YAP, MRTF oder Notch unabhängigen Mechanismus der Stimulation schließen lässt. Aufgrund ihrer zentralen Rolle für Zellmigrations- und Wundheilungsprozesse sollen im Folgenden Einflüsse akustischer Kraftfelder auf Eigenschaften des Aktin-Zytoskeletts und der Zellkerne, wie beispielsweise ihre Orientierung, untersucht werden.

4.4.3. Einfluss der SAW-Stimulation auf Eigenschaften von Aktinfilamenten und Zellkernen in der Wundheilung

In Brugger et al. wurde eine erhöhte Zellmigration als hauptsächlich stimulierter zellulärer Prozess bei der durch SAW beschleunigten Wundheilung identifiziert [1]. Diese Beobachtung gibt wichtige Hinweise für die weitere Untersuchung der intrazellulären Mechanismen, die die Stimulationswirkung verursachen könnten. Aus den obigen Abschnitten 4.4.1-4.4.2 lässt sich schließen, dass SPPL3-Proteasen und mechanosensitive Proteine in dem hier untersuchten Rahmen mit hoher Wahrscheinlichkeit keine treibenden Kräfte der SAW-stimulierten Wundheilung sind. Eine essenzieller Bestandteil der Zellmigration ist jedoch das Zytoskelett: Die Bildung und Dynamik fokaler Adhäsionen und der Aktinfasern spielen Schlüsselrollen für die Kraftübertragung und die Fortbewegung von Zellen [226, 227]. Darüber hinaus finden sich in der Literatur bereits Hinweise, dass sich akustische Wellen durch Veränderungen des Zytoskeletts positiv auf Heilungsprozesse auswirken könnten [228, 229]. Während das Aktin-Zytoskelett unabdingbar zur Wahrnehmung und Übertragung von mechanischen Reizen ist [266–268], können mechanische Kräfte auch die Form des Zellkerns ändern und den nukleozytoplasmatischen Transport von Transkriptionsfaktoren wie YAP modulieren [269–272]. Eine Untersuchung des Zellkerns und des Aktin-Zytoskeletts stellt somit einen Anknüpfungspunkt zu den Ergebnissen des vorherigen Abschnitts dar und hat das Potential, den genauen intrazellulären Stimulationsmechanismus weiter aufzuklären.

Im Folgenden soll im Rahmen von SAW-stimulierten Wundheilungsassays unter den in Vorarbeiten gefundenen optimalen Stimulationsbedingungen untersucht werden, wie sich die Behandlung mit akustischen Oberflächenwellen auf Eigenschaften von Aktinfasern und Zellkernen auswirkt. Zum Schluss werden die hier gewonnenen Ergebnisse durch eine Analyse der Orientierung von gesamten Zellen im Verlauf des Wundheilungsprozesses ergänzt. Diese Ergebnisse sind ein zentraler Bestandteil der oben genannten eingereichten Publikation [179]. Es sollen die folgenden Hypothesen geprüft werden:

Hypothese 4.4: Die Behandlung von Zellen mit SAW verändert Eigenschaften des Aktin-Zytoskeletts und der Zellkerne.

Hypothese 4.5: Die Position der Zellen in der migrierenden Monolage sowie die Wundheilungs- bzw. Stimulationszeit haben Auswirkungen auf das Verhalten von Zellkernen und Aktinfilamenten.

Hypothese 4.6: Die beobachteten intrazellulären Veränderungen äußern sich auch in Veränderungen der Zellmorphologie.

Zur Beantwortung dieser Fragen werden analog zu den vorherigen Abschnitten Experimentreihen auf Basis des unter Kapitel 3.6.1 vorgestellten Versuchsaufbaus durchgeführt. Wie unter 3.6.3 beschrieben, werden die Zellen nach einer Zeit t unter SAW-Behandlung fixiert und die Aktinfasern und Zellkerne mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Es werden Bilder (im Hellfeld- und Fluoreszenzmodus) von dem Aperturbereich sowie den internen Kontrollbereichen der Proben aufgenommen. Die Bildprozessierung der Fluoreszenzaufnahmen der Zellkerne und Aktinfilamente erfolgt wie ebenfalls unter 3.6.3 beschrieben mit den Softwares Ilastik, ImageJ und Filament Sensor. Ein Python-Skript liefert eine Zusammenfassung der Kern- (relative Orientierung $P(\alpha)$ und Zirkularität C_N) und Filamenteigenschaften (Orientierung, Länge l und Breite w). Um die Abklinglänge der akustischen Oberflächenwelle und damit die auf die Zellen wirkende unterschiedlich starke SAW-Intensität im Aperturbereich zu berücksichtigen, werden die Daten der Bilder in zwei Regionen aufgeteilt und separat analysiert: Region A (direkt an den IDT angrenzend) und Region B (mit einem Abstand $\Delta x = 200 \mu\text{m}$ zum IDT). In der im Folgenden gezeigten Versuchsreihe wurde zunächst der Zeitpunkt $t = 18 \text{ h}$ ab Beginn der SAW-Behandlung zur Fixierung der Proben gewählt, da hier ein Stimulationseffekt und damit Veränderungen im Zytoskelett zwischen den Bereichen entlang der Wunde deutlich sichtbar sein sollten. Der hier gewählte Analyseansatz fasst dabei die Filament- und Zellkerneigenschaften aller Zellen in den jeweiligen Bereichen zusammen, um ein ganzheitliches Bild des Filamentverhaltens im kollektiv migrierenden Zellrasen zu erhalten. Von diesem Ansatz wird hier für die hier angestrebte großflächige Wundheilungsstimulation eine bessere statistische Repräsentation des gesamten Zellverhaltens erwartet als von einer hochauflösenden Analyse auf Einzelzellebene, die nur eine sehr geringe Stichprobe der Zellen umfassen würde.

Im Rahmen der im Folgenden gezeigten Versuchsreihen wurden drei verschiedene Probentypen analysiert: Kontroll-Chips ohne angeschlossenes SAW-Signal (*Ctrl*), SAW-stimulierte Proben bei der optimalen Stimulationsleistung $P_{\text{in}} = 9 \text{ dBm}$ sowie Hochkontrollen, die bei der stärkeren SAW-Leistung $P_{\text{in}} = 21 \text{ dBm}$ behandelt wurden und auf Basis der Ergebnisse aus Vorarbeiten keinen Stimulationseffekt der Wundheilung induzieren sollten [1]. Zur Vermeidung von Temperatureffekten durch die starke SAW-Leistung beim der Hochkontrolle

wurde vor den Experimenten die Temperatur im Inkubator angepasst, sodass in der Probe eine Kultivierungstemperatur von $T = 37^\circ\text{C}$ erreicht wird ($\Delta T = 2\text{K}$).

Zunächst sollen die Filamentbreiten und -längen w und l dieser Proben verglichen werden. Die Ergebnisse der Filamentbreite sind in Abbildung 4.13 dargestellt, während die Längenergebnisse unter Anhang A.6, Abb. A.9 zu finden sind. Die Abbildungen 4.13a und b zeigen die mittleren Breiten w der detektierten Filamentbündel in den Bildregionen A und B, wobei jede Box $N = 5$ unabhängige Proben repräsentiert. Eine ANOVA-Analyse der Daten zeigt Signifikanz für die Daten in Abbildung 4.13a auf $\alpha = 0,05$ mit $p \leq \alpha$. Post-hoc wurde ein Mann-Whitney-t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Proben, die mit der optimalen Stimulationsleistung $P_{\text{in}} = 9\text{ dBm}$ stimuliert wurden, weisen im Vergleich zu den anderen Proben in keinem Probenbereich signifikante Unterschiede der Filamentbündelbreite auf. Für Behandlungen mit hoher Intensität bei $P_{\text{in}} = 21\text{ dBm}$ lässt sich jedoch eine signifikante Zunahme der Filamentbündelbreite in der Aperturregion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben um $\Delta w = 7,0 \pm 2,6\%$ erkennen ($p = 0,032 < \alpha$). Interessanterweise verschwindet der Effekt für Region B, die aufgrund der höheren Entfernung von der Apertur unter einem geringeren Einfluss der akustischen Oberflächenwelle steht.

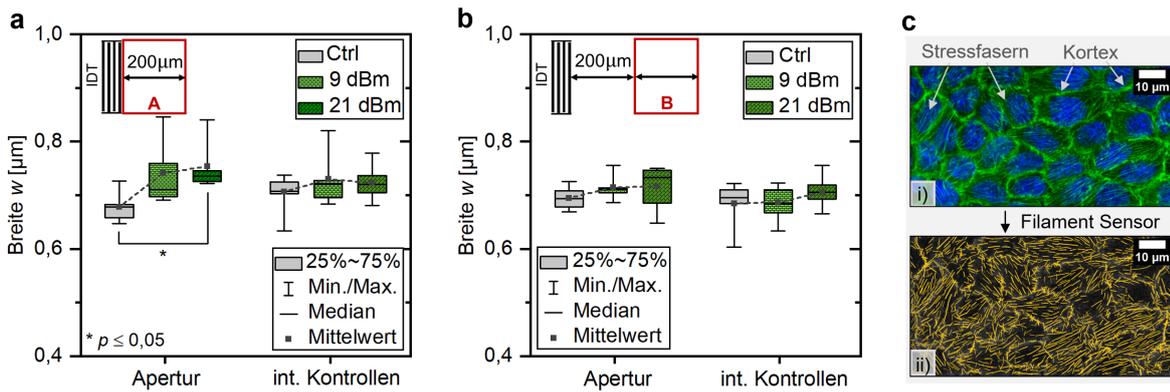


Abbildung 4.13: Ergebnisse der Filamentbreiten-Analyse nach $t = 18\text{h}$ unter SAW-Einfluss. a) Breite w der mit dem Filament Sensor detektierten Aktinfilamentbündel in der IDT-angrenzenden Region A (*Ctrl*: ohne SAW-Behandlung). b) Entsprechende Breite w in der entfernteren Region B. c) Konfokalaufnahme einer Kontrollprobe zur Visualisierung der verschiedenen Filamentarten (Aktin-Kortex und Stressfasern). Jeder Mittelwert in a)-b) besteht aus $N = 5$ unabhängigen Proben, es wurde post-hoc ein unabhängiger Stichproben-t-Test mit $\alpha = 0,05$ durchgeführt.

Aufgrund des Fehlens signifikanter Unterschiede bei der Stimulationsleistung $P_{\text{in}} = 9\text{ dBm}$ kann aus den Ergebnissen zunächst geschlossen werden, dass die Filamentbreite w mit hoher Wahrscheinlichkeit bei der SAW-stimulierten Wundheilung nicht verändert wird. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Daten in Abbildung 4.13a und b aus Standard-Epifluoreszenzbildern extrahiert wurden und die Detektionsgrenze des hier verwendeten optischen Systems bei $d \approx 444\text{ nm}$ liegt (approximiert nach dem Rayleigh-Gesetz für eine Wellenlänge $\lambda_{\text{em}} = 510\text{ nm}$ und eine numerische Apertur $\text{NA} = 0,7$). Die Mittelwerte der Filamentbündelbreiten w sind zwar größer als d und liegen daher deutlich über dem De-

tektionslimit. Allerdings sind die hier beobachteten Unterschiede in der Breite Δw zwischen Kontrollproben und mit SAW behandelten Proben angesichts des hohen Detektionslimits des Mikroskops eher gering. Lässt man diesen Einfluss außer Acht, zeigen die Ergebnisse jedoch, dass starke SAW-Kraftfelder wie bei $P_{\text{in}} = 21$ dBm die Breite von Aktinbündeln besonders unmittelbar vor der Apertur signifikant erhöhen können. Die Filamentlänge wurde analog zur Breite analysiert, allerdings lieferte ein ANOVA-Test keine signifikanten Ergebnisse (vgl. Anhang A.6, Abb. A.9a und b). Da eine wichtige Aufgabe der Aktinfilamente, insbesondere der Stressfasern, die Erhaltung ihrer Länge unter dem Einfluss mechanischer Spannung ist, ist dieses Ergebnis nicht überraschend [273].

Anhand der Fluoreszenzbilder in Abb. 3.9a wird qualitativ bereits deutlich, dass die Stressfaserbündel im Zellinneren weniger deutlich ausgeprägt sind als der die Zellen umgebende Aktin-Kortex. Die Epifluoreszenzbilder wurden daher um Konfokalmikroskopie-Aufnahmen ergänzt, wie in Abbildung 4.13c gezeigt. Es lässt sich feststellen, dass die unterschiedlichen Strukturen von Kortex und Stressfasern bei hoher Auflösung in höherem Detail beobachtbar werden. Um das Verhalten dieser verschiedenen Aktinstrukturen unter SAW-Stimulation weiter zu beleuchten, wurden basierend auf den in Abbildung 4.13a gezeigten Daten als Ergänzung der Ergebnisse die Stressfasern getrennt vom Kortex analysiert. Für diese Analyse wurden die segmentierten Zellkerne mithilfe eines Python-Skriptes erkannt und durch Zentroide approximiert. Dabei konnten im Durchschnitt $N_N = 155 \pm 74$ Kerne pro Bild erkannt werden. Die ursprünglich detektierten Filamentdaten der Bilder wurden dann durch Ausschluss aller Filamente, deren Mittelpunkt außerhalb der Zentroide lag, gefiltert, sodass nur noch die Filamente im Inneren der Zellen berücksichtigt werden. Obwohl die Zentroide für einige Kernformen keine optimale Approximation darstellen und nicht alle Kerne auf den Bildern durch Python erkannt werden, liefert unser Ansatz eine ausreichend große Stichprobe, um Aussagen über das Filamentverhalten im Zentrum der Zellen zu ermöglichen. Die Ergebnisse sind unter Anhang A.6, Abb. A.9c dargestellt. Interessanterweise weisen die Filamente innerhalb der Zellkerne ($f_N = 5,1 \pm 2,6$ Filamente pro Zellkern) eine signifikant höhere Breite von $w_{\text{Sf}}(P_{\text{in}} = 9 \text{ dBm}) = 0,74 \pm 0,04 \mu\text{m}$ für die Stimulationsleistung als in der externen Kontrolle von $w_{\text{Sf}}(\text{Ctrl}) = 0,69 \pm 0,04 \mu\text{m}$ auf ($p = 0,028$ unter der Hypothese, dass $w_{\text{Sf}}(9 \text{ dBm}) > w_{\text{Sf}}(\text{Ctrl})$). Dies führt zu einem Gesamtanstieg von $\Delta w_{\text{Sf}} = 5,0 \pm 2,5 \%$ der Stressfaserbreite unter SAW-Stimulation. Der in Abb. 4.13 beobachtete Unterschied für die Hochkontrolle bleibt ebenfalls signifikant und wird stärker mit $w_{\text{Sf}}(21 \text{ dBm}) = 0,76 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ($p = 0,008$ unter der Hypothese, dass $w_{\text{Sf}}(21 \text{ dBm}) > w_{\text{Sf}}(\text{Ctrl})$). Eine SAW-Behandlung mit hoher Intensität erhöht somit die Breite der Aktinfaserbündel auch innerhalb der Zelle um bis zu $\Delta w_{\text{Sf}} = 7,0 \pm 2,2 \%$. Die Ergebnisse dieser Breitenanalyse sollen im Folgenden kurz unter Miteinbezug von Literaturergebnissen diskutiert werden.

Imashiro et al. konnten zeigen, dass die Dicke der Aktinbündel in einer konfluenten Monolage von 3T3-Fibroblasten unter Stimulation mit akustischen Oberflächenwellen zunimmt und mit der beobachteten Beschleunigung der Zellmigration der Monolage korreliert [274]. Trotz eini-

ger Unterschiede im Versuchsaufbau konnten diese Ergebnisse hier teilweise reproduziert und auf MDCK-II-Zellen in einem SAW-stimulierten Wundheilungsmodell ausgedehnt werden. Zusätzlich konnten unterschiedliche Auswirkungen von SAW auf die Filamentbreite im Zentrum der Zellen und im Aktin-Kortex identifiziert werden. Die separate Stressfaser-Analyse deutet darauf hin, dass Aktinbündel im Inneren der Zelle sowohl auf SAW-Kraftfelder mittlerer als auch hoher Intensität empfindlicher reagieren als bei der Auswertung der Gesamtfilamentdaten. Dies deutet auf eine höhere Mechanosensitivität der Stressfasern hin. In der Literatur ist bekannt, dass Stressfasern mit der Zellkontraktilität korrelieren und somit mechanische Eigenschaften der Zelle widerspiegeln [275, 276]. Peterson et al. untersuchten die räumliche Abhängigkeit der Breite von Stressfasern und ihrer Komponenten. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bänder von α -Aktinin, einem Aktin-Vernetzungsprotein, in den zentralen Bereichen der Zellen ($w = 0,63 \pm 0,12 \mu\text{m}$) breiter sind als in der Peripherie ($w = 0,51 \pm 0,08 \mu\text{m}$). Bei Stimulation der Stressfaserkontraktilität mit Calyculin nimmt die Breite in den zentralen Regionen als Reaktion auf die Stimulation zu, während die Breite in der Peripherie abnimmt [277]. Die Wundheilungsstimulation mit SAW bei $P_{\text{in}} = 9 \text{ dBm}$ könnte einen ähnlichen Effekt hervorrufen, wobei nur die Breite der zentralen Filamente, nicht aber die des umgebenden Aktinürtels zunimmt. Aus der Tatsache, dass die Daten in Abbildung 4.13a auf Bildern mit weniger stark ausgeprägten Stressfasern als Aktin-Kortex beruhen, kann geschlossen werden, dass die Filamentbündelbreite hier vom Verhalten der Kortexfilamente dominiert wird. Im Gegensatz zu den separat analysierten zentralen Filamenten ist die Gesamtbreite nur bei starken akustischen Kräften bzw. möglicherweise auch starken durch die akustische Strömung erzeugten Scherkräften erhöht. Der Aktin-Kortex, ein Aktomyosin-Netzwerk unterhalb der Plasmamembran, und die damit verbundene Kortikalspannung sind auch als wesentliche Regulatoren der Zellform während der Migration und Zellteilung bekannt [278]. Es liegt daher nahe, dass die starke mechanische Vibration oder die starke akustische Strömung bei dieser Leistung eine höhere Kortikalspannung in den Zellen induzieren könnten. In der Literatur werden Zusammenhänge zwischen der kortikalen Spannung und der Kortexdicke vorgeschlagen [279, 280]: Clark et al. beobachteten beispielsweise anhand von mitotischen HeLa-Zellen, dass die durch Cofilin-Abnahme induzierte Zunahme der Kortexdicke die zuvor beobachteten Veränderungen der Kortikalspannung erklären könnte [280, 281]. Es ist auch bekannt, dass die Aktinpolymerisation die Kernlokalisierung von MRTF und YAP beeinflusst [254, 270]. Da jedoch unter Abschnitt 4.4.2 im Mittel kein Einfluss der SAW-Stimulation auf die nukleare Lokalisation von YAP und MRTF beobachtet werden konnte und insbesondere verschiedene Zeitpunkte des Stimulationsprozesses betrachtet werden ($t = 3 \text{ h}$ und 18 h), lässt sich auf Basis der bisher vorgestellten Daten keine Aussage zu einem solchen möglichen Zusammenhang treffen.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Filamentbreitenanalyse deutet stark darauf hin, dass die Behandlung der Wunden mit akustischen Kraftfeldern bestimmte Eigenschaften des Aktin-Zytoskeletts beeinflussen kann. Um den Mechanismus des beobachteten SAW-Stimulations-

effekts, der zu einer erhöhten Migrationsgeschwindigkeit führt, weiter aufzuklären, sollen diese Ergebnisse im Folgenden durch eine Analyse des Orientierungsverhaltens von Aktinfilamenten und Zellkernen nach $t = 18$ h SAW-Stimulation in den an den IDT angrenzenden Regionen A ergänzt werden.

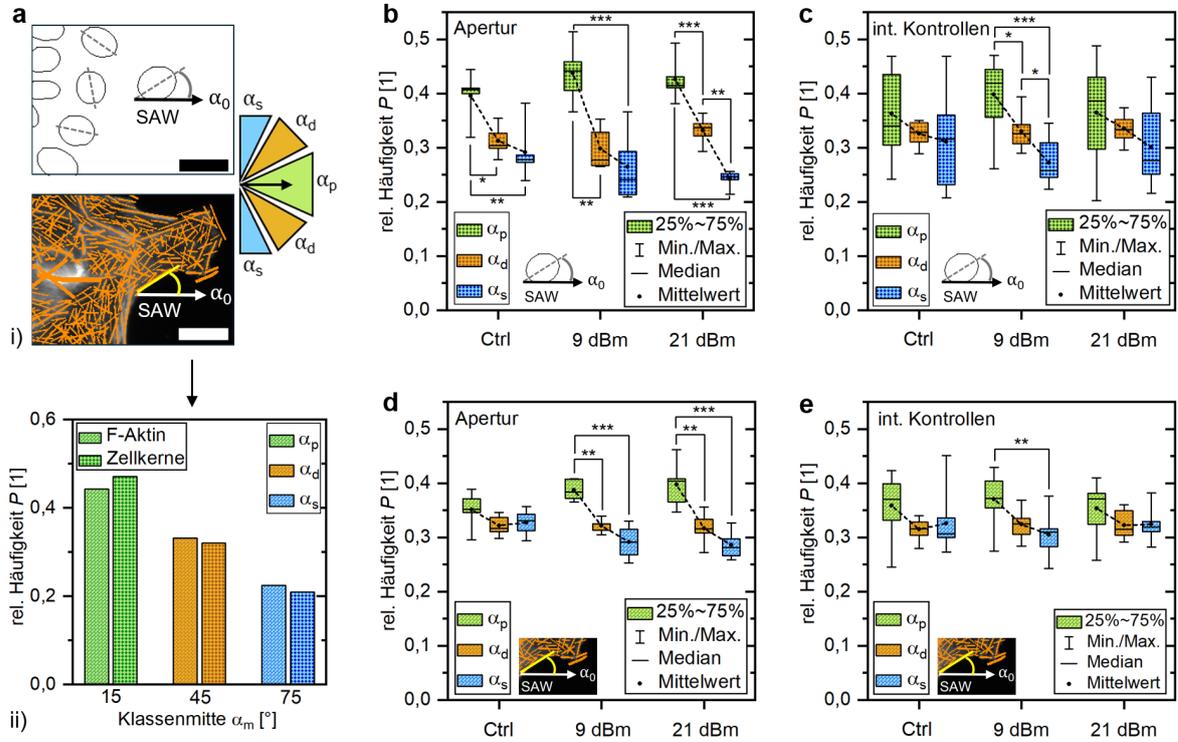


Abbildung 4.14: Ergebnisse der Aktinfilamentorientierungen nach $t = 18$ h Wundheilung in den IDT-nahen Regionen A. a) Visualisierung der Richtungsanalyse: i) Schematische Darstellung der Winkel in Aktin- und Zellkernbildern nach der Bildprozessierung. Die Winkel werden in drei Klassen mit Klassenbreite $\Delta\alpha = 30^\circ$ relativ zur SAW-Propagationsachse $\alpha_0 = 0^\circ$ zusammengefasst. Skalenbalken entsprechen $\Delta x = 20 \mu\text{m}$, ii) Beispielhafte Verteilung von relativen Aktinfilament- und Zellkernorientierungen P des hier gezeigten Bildes (α_p : parallel, α_d : diagonal, α_s : senkrecht zur SAW-Propagationsachse). b) Richtungsverteilung von Zellkernen in den Aperturbereichen von SAW-stimulierten Proben ($P_{\text{in}} = 9 \text{ dBm}$ bzw. 21 dBm) und Kontrollproben (*Ctrl*), dargestellt als relative Häufigkeiten P der drei Winkelklassen. c) Entsprechende Verteilung der Zellkernorientierung in den internen Kontrollbereichen der Proben. d) Richtungsverteilung von Aktinfilamenten in den Aperturbereichen. e) Entsprechende Verteilung der Filamentorientierung in den internen Kontrollbereichen. Jede Box repräsentiert $N = 5$ unabhängige Proben, ein ANOVA-Test war signifikant mit $\alpha = 0,05$ ($p < 0,01$). Ein t-Test für unabhängige Stichproben zeigte post-hoc Signifikanz; die resultierenden signifikanten p -Werte mit $p < \alpha$ sind unterteilt in: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$. Eine Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse ist unter Anhang A.6, Abb. A.10 zu finden.

Zum Vergleich der Filament- und Zellkernorientierungen unter SAW-Stimulation wird analog zu Abschnitt 4.1 und wie in Abbildung 4.14a eine Unterteilung der Winkel in drei Klassen mit Binbreite $\Delta\alpha = 30^\circ$ relativ zur SAW-Propagationsachse vorgenommen. Der Winkel $\alpha_p = 15 \pm 15^\circ$ ist hierbei parallel, $\alpha_s = 75 \pm 15^\circ$ senkrecht und $\alpha_d = 45 \pm 15^\circ$ diagonal zur SAW-Ausbreitungsachse α_0 definiert, die auch der Migrationsrichtung der Zellen in die Wunde

hinein entspricht. Die relativen Häufigkeiten der Winkel in diesen Richtungen werden wie unter 3.6.3 beschrieben bestimmt, wobei analog zur Breitenanalyse zwischen den drei oben genannten Probenotypen unterschieden wird.

Die resultierenden Zellkernorientierungen in den Apertur- und internen Kontrollbereichen sind in den Abbildungen 4.14b und c und die entsprechenden Filamentorientierungen in 4.14d und e dargestellt. Anhand der Aperturregionen in Abb. 4.14b kann festgestellt werden, dass signifikant mehr Zellkerne in Migrationsrichtung bzw. entlang der SAW-Ausbreitungsachse α_p orientiert sind als in die anderen Richtungen. Es ergeben sich dabei Unterschiede um bis zu $\Delta P_{\text{Ctrl}}(\alpha_p, \alpha_s) = 10,4 \pm 3,2\%$ in Kontrollproben und um $\Delta P_{9\text{dBm}}(\alpha_p, \alpha_s) = 17,3 \pm 3,9\%$ in mit SAW stimulierten Proben (bzw. $\Delta P_{21\text{dBm}}(\alpha_p, \alpha_s) = 18,4 \pm 2,0\%$, berechnet mittels Standardfehler der Differenz zweier Mittelwerte).

Obwohl der Effekt der Zellkernorientierung entlang der α_p -Richtung in den mit SAW behandelten Proben stärker ist, zeigt das Verhalten der externen Kontrollproben, dass diese Tendenz unabhängig von der SAW-Stimulation ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass die hier beobachtete Zellkern-Anisotropie durch die allgemeine Migration der Zellen in die Wunde verursacht wird. Die Orientierung des Zellkerns ist im Allgemeinen mit der Zellpolarisation und der Migrationsrichtung verbunden: In der Literatur wird gezeigt, dass sich der Zellkern drehen und nach der Migrationsrichtung der Zellen ausrichten kann sowie dass die Kernorientierung auch die Zellpolarisation und damit die Zellmotilität fördert [282, 283]. Während die internen Kontrollen in Abbildung 4.14c ebenfalls einen signifikanten Unterschied der Kernorientierung bei $P_{\text{in}} = 9\text{ dBm}$ um $\Delta P_{9\text{dBm}}(\alpha_p, \alpha_s) = 12,6 \pm 3,5\%$ zeigen, weisen die externen und die Hochkontrollen eine ähnliche Tendenz auf, die jedoch bei der hier getesteten Stichprobengröße nicht signifikant ist. Zusammenfassend kann aus 4.14b und c geschlossen werden, dass die beobachteten Vorzugsrichtungen der Zellkerne unabhängig von der SAW-Stimulation in allen Proben stärker in Richtung der Zellmigration verlaufen, was die allgemeine Migrationsrichtung der Zellen während des Wundverschlusses zu diesem Zeitpunkt widerspiegelt und zunächst nicht mit dem SAW-Stimulationseffekt zusammenhängt. Da die SAW-Behandlung die Wundheilung beschleunigt, werden in folgenden Analysen auch räumliche und zeitliche Effekte der Zellkern-Orientierung im Fokus stehen. Die Zirkularität C_N der Zellkerne wurde zusätzlich zur Orientierung bestimmt, jedoch ergaben sich hier keine signifikanten Ergebnisse. Unter Anhang A.6, Abb. A.9d sind die Ergebnisse für C_N dargestellt und unter Abb. A.10 ist eine Zusammenfassung aller signifikanten statistischen Tests dieser Versuchsreihe zu finden.

Im Allgemeinen zeigen die Aktin-Daten in Abbildung 4.14d die gleiche Tendenz der verstärkten Orientierung in Migrationsrichtung α_p wie die Zellkerne. Die Unterschiede sind jedoch etwas geringer und bei der hier untersuchten Stichprobengröße weisen nur SAW-behandelte Proben signifikante Unterschiede mit $\Delta P_{9\text{dBm}}(\alpha_p, \alpha_s) = 9,6 \pm 1,7\%$ bzw. $\Delta P_{21\text{dBm}}(\alpha_p, \alpha_s) = 11,1 \pm 2,3\%$ auf. Die allgemeine Tendenz zur Bildung einer anisotropen Orientierungsverteilung ist für die Aktinfilamente und Zellkerne somit recht ähnlich und steht im Einklang

mit der Tatsache, dass die Orientierung der Zellkerne durch Aktinkräfte vermittelt wird [282]. Diese können über LINC-Komplexe (*linker of nucleoskeleton to cytoskeleton*), die den Zellkern mit dem Zytoskelett verbinden, übertragen werden [283]. Darüber hinaus wird hier ein ähnliches Orientierungsverhalten der Filamente unter Behandlung mit der Stimulationsleistung und der Hochleistungs-SAW in den Aperturbereichen beobachtet. In den internen Kontrollregionen ist die Tendenz ebenfalls ähnlich, was auf eine SAW-unabhängige Anisotropie zu diesem Zeitpunkt hindeutet.

Die in mit SAW behandelten Proben beobachteten signifikant bevorzugten Filamentorientierungen könnten jedoch auch eine Folge der SAW-Behandlung sein, sodass die Ausbreitung der sich akustischen Oberflächenwellen in α_p -Richtung eine bevorzugte Orientierung der Filamente entlang dieser Achse bedingt. Im Zusammenhang mit der SAW-stimulierten Wundheilung könnte dies zu einer gerichteteren Migration und damit zu einer schnelleren Wundheilung führen. Es sind allerdings detailliertere Studien mit höherer räumlicher und zeitlicher Auflösung erforderlich, um möglichen Zusammenhängen zwischen der akustisch beschleunigten Zellmigration und den zeitabhängigen Aktinorientierungen weiter auf den Grund zu gehen.

Im Allgemeinen bestätigen Literaturergebnisse, dass die Ausrichtung von Aktinfilamenten mit einer gerichteteren Zellmigration zusammenhängt: In Fibroblasten und mesenchymalen Zellen konnte eine Umorientierung der Stressfaserachse und Ausrichtung in Migrationsrichtung beobachtet werden [284, 285]. In Keratozyten kam es wiederum zu einer Verschiebung der Winkelverteilung der Filamente in Abhängigkeit von der Protrusionsaktivität, was zu einer Ausrichtung der Filamente in Lamellipodien führte [286, 287]. Zudem zeigten Mseka et al., dass Aktinfilamentbündel und Stressfasern in nicht migrierenden Fibroblasten eher zufällig angeordnet waren, während Fibroblasten in der mittleren Zone einer migrierenden Zellschicht in fast 90% der Fälle eine Ausrichtung der Aktomyosin-II-Bündel entlang der vermuteten Migrationsrichtung aufwiesen [288].

Im Zusammenhang mit der Anwendung von akustischen Oberflächenwellen für lebende Zellen müssen neben der mechanischen Vibration auch Nebeneffekte wie akustische Strömungen und elektrische Felder diskutiert werden. Beispielsweise werden die Vorzugsrichtungen in Filamenten und Kernen auch in den Hochkontrollen beobachtet, in denen kein Stimulationseffekt zu erwarten ist [1], in denen aber hohe durch akustische Strömung generierte Scherkräfte entlang der negativen x -Richtung auftreten und auf die Zellen einwirken ($\tau(21 \text{ dBm}) \approx 0,4 \text{ dyn/cm}^2$, vgl. A.3, Abb. A.5) [20, 21]. Es ist bekannt, dass sich beispielsweise in Endothelzellen sowohl die Zellform als auch die Stressfasern nach der Richtung der Strömung ausrichten [194, 289]. Allerdings sind Endothelzellen in der Regel wesentlich höheren Schubspannungen ausgesetzt (vgl. Abschnitt 4.1) als in dem hier verwendeten Versuchsaufbau zur Wundheilungsstimulation. Bei epithelialen MDCK-Zellen richtete sich in einer anderen Studie die Zellform nicht mit der Strömung aus, aber bei Scherströmungen ab $\tau = 0,5 \text{ dyn/cm}^2$ konnte eine Aktin-Reorganisation beobachtet werden, die zu einer Abnahme von Aktinfasern im Zytosol nach t

= 18 h sowie zu einer verstärkten Bildung von Fasern an den Zellkontakten mit zunehmender Schubspannung führte [290]. Dies stimmt mit einem qualitativen Vergleich unserer Fluoreszenzbilder überein, in denen teilweise die bei $P_{\text{in}} = 21$ dBm behandelten Proben einen etwas ausgeprägteren Aktin-Kortex und weniger Stressfasern aufweisen als die externen Kontrollen und die bei $P_{\text{in}} = 9$ dBm stimulierten Proben (vgl. Anhang A.6, Abb. A.11). Zudem wurde gezeigt, dass es in Epithelzellen zu einer Umstrukturierung der fokalen Adhäsionen aufgrund der Aktin-Reorganisation unter einer Strömung von $\tau = 0,7$ dyn/cm² kommt [291].

Interessanterweise kann die Störung von Aktinfilamenten durch Scherkräfte die Aufnahme von Ca²⁺ durch mechanosensitive Kanäle in MDCK-Zellen vermindern und damit die Zellmotilität hemmen [290, 292], was das Fehlen eines Stimulationseffekts und die sogar negativen Auswirkungen auf die Wachstumsgeschwindigkeit bei $P_{\text{in}} = 21$ dBm in Vorarbeiten erklären würde [1]. Akustische Strömungen als SAW-Nebeneffekt könnte jedoch auch das Verhalten der Filamente bei niedrigeren Leistungen beeinflussen. Geringe Scherkräfte, die im Bereich der SAW-Stimulationsleistung erzeugt werden ($\tau < 0,1$ dyn/cm² für $P_{\text{in}} = 6 - 12$ dBm) [1, 21], können laut Literaturangaben unterschiedliche Auswirkungen auf Zellen haben: Bei Hornhautepithelzellen wurde beispielsweise keinerlei Ausrichtung von Filamenten unter Scherkräften beobachtet [293]. In Endothelzellen können jedoch auch niedrige Strömungsbedingungen ab $\tau = 0,05$ dyn/cm² die Bildung von Aktinfasern über dem Zellkern (engl. *perinuclear actin cap*) induzieren [267, 268]. Diese Aktin-Kappe reagiert schneller auf Schubspannung als dickere Filamente wie basale Stressfasern [268] und reguliert nachweislich die Zellkernform in Fibroblasten [294]. Darüber hinaus kann sie den nukleozytoplasmatischen Transport von Transkriptionsfaktoren wie YAP durch Spannungsausübung auf den Zellkern unter mechanischen Kräften beeinflussen [266]. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Aktin-Kappe als dünnes Filamentnetzwerk im Rahmen der hier evaluierten Epifluoreszenzbilder statistisch ins Gewicht fällt. Die hier verwendeten Bilder zeigen, dass das in den Abbildungen 4.13 und 4.14 beobachtete Filamentverhalten hauptsächlich von den dickeren basalen und ventralen Stressfasern sowie vor allem vom Aktin-Kortex dominiert wird, welche von solch geringen Scherkräften mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht beeinflusst werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die durch akustische Strömung erzeugten Scherkräfte zwar die Anisotropie der Filamente und das Fehlen eines Stimulationseffekts bei der hohen SAW-Leistung erklären könnten, allerdings nicht für das bei $P_{\text{in}} = 9$ dBm beobachtete unterschiedliche Verhalten der Filamente verantwortlich sein können. Dieses könnte somit eher durch die mechanische Vibration beeinflusst sein. Neben der akustischen Strömung induziert die Anwendung von SAW auch elektrische Felder. Jedoch konnten Brugger et al. zeigen, dass das elektrische Wechselfeld, das auf dem SAW-Chip erzeugt wird, keine Stimulationseffekte in der Wundheilung hervorruft [1]. Daher werden hier Auswirkungen des elektrischen Feldes auf die Wundheilungsstimulation und damit auf die zugrundeliegenden intrazellulären Mechanismen ausgeschlossen.

Auf Grundlage der Breiten- und Orientierungsanalyse bei $t = 18$ h kann die zu Beginn auf-

gestellte Forschungshypothese 4.4, dass die Behandlung von Zellen mit akustischen Oberflächenwellen Aktin- und Zellkerneigenschaften verändert, zunächst aufrechterhalten werden. Die hier gefundene Anisotropie der Filamentorientierung nach einer SAW-Stimulationsdauer von $t = 18$ h könnte somit ein zugrundeliegender Mechanismus der SAW-Stimulationswirkung sein. Wie oben erwähnt, ist es für ein tieferes Verständnis und eine Bestätigung dieses Mechanismus' jedoch notwendig, zusätzliche räumliche und zeitliche Abhängigkeiten der Zellkern- und Filamentorientierungen mit und ohne SAW-Stimulation genauer zu untersuchen. Aus diesem Grund werden im Folgenden weitere Versuchsreihen vorgestellt, die zur Identifikation des Einflusses der Stimulationsdauer t und der Position x der Zellen im Zellrasen (gemessen als Abstand vom Wundrand bzw. von der Apertur) auf die Filament- und Zellkernorientierung dienen sollen. In Abbildung 4.15 sind zunächst Daten einzelner Proben zur ersten Visualisierung von räumlichen Abhängigkeiten der Orientierungen dargestellt.

Abbildung 4.15a zeigt das Orientierungsverhalten von i) Zellkernen und ii) Filamenten in externen Kontrollproben zu einem Zeitpunkt $t = 3$ h nach Beginn der Wundheilung, zu dem die Zellmigration in die Wunde hinein gerade einsetzt. Für einen ersten Überblick wurden hier Bilder mit verschiedenen Abständen zum Wundrand und damit verschiedener Zellanzahl N pro Bild aufgenommen und die mittlere relative Orientierung in jedem Bild bestimmt.

Aus diesem ersten Ansatz wird bereits deutlich, dass die Ausrichtungen der Zellkerne und Filamente offensichtlich von der Position der Zellen im Zellrasen abhängen. In unpolarisierten Zellen sollten die Orientierungen gleichmäßig verteilt sein, was sich in einer relativen Häufigkeit von $P(\alpha) \approx 0,33$ für alle drei hier dargestellten Winkelklassen α_p , α_d und α_s äußern sollte. Jedoch wird anhand der Daten in Abbildung 4.15a ersichtlich, dass Zellkerne und Filamente in Bildern mit einer geringeren Zellanzahl N , die somit alle nahe am Wundrand liegen, eher in α_s -Richtung und damit senkrecht zur Migrationsrichtung orientiert sind. Diese Tendenz nimmt mit steigender Zellanzahl N , also mit mehr vom Wundrand entfernten Zellen, ab, bis die Orientierungen bei sehr hohem N annähernd gleichverteilt sind. Die Filamentorientierungen in Graph ii) bleiben dabei auch für Bilder mit hohem N vornehmlich in α_s -Richtung orientiert. Sowohl Kerne als auch Filamente zeigen damit zu Beginn des Wundheilungsprozesses teilweise ein zu $t = 18$ h entgegengesetztes Orientierungsverhalten (als Referenz lag der Median der Zellen pro Bild bei den externen Kontrollen in der Aperturregion in Abb. 4.14 bei $N = 329$). Dies deutet auf das Vorhandensein eines Wendepunktes im Orientierungsverhalten während des Wundheilungsprozesses und zudem auf eine Abhängigkeit der Orientierungen vom Zellabstand zum Wundrand ohne SAW-Behandlung hin. Um dies im Detail zu untersuchen, wurden Analysen mit höherer räumlicher Auflösung der Zellkernorientierungen als Funktion des Abstands Δx von der Apertur durchgeführt. In Abbildung 4.15b sind die Ergebnisse einer solchen Analyse für den Aperturbereich einer externen Kontrollprobe und in Abbildung 4.15c die entsprechende Orientierungsverteilung einer mit $P_{\text{in}} = 9$ dBm behandelten SAW-Probe gezeigt. Beide hier analysierten Aperturregionen weisen eine vorstoßende Kante (*leading edge*) von Zellen auf, die zum Zeitpunkt t

= 18 h in die Wunde migriert und ein typisches Merkmal des Wundheilungsprozesses von MDCK-II-Zellen ist. Beginnend an der Position der Apertur, stellt jeder Punkt die mittlere Orientierung der Zellkerne innerhalb einer Bildfläche mit Breite $x = 100$ px dar.

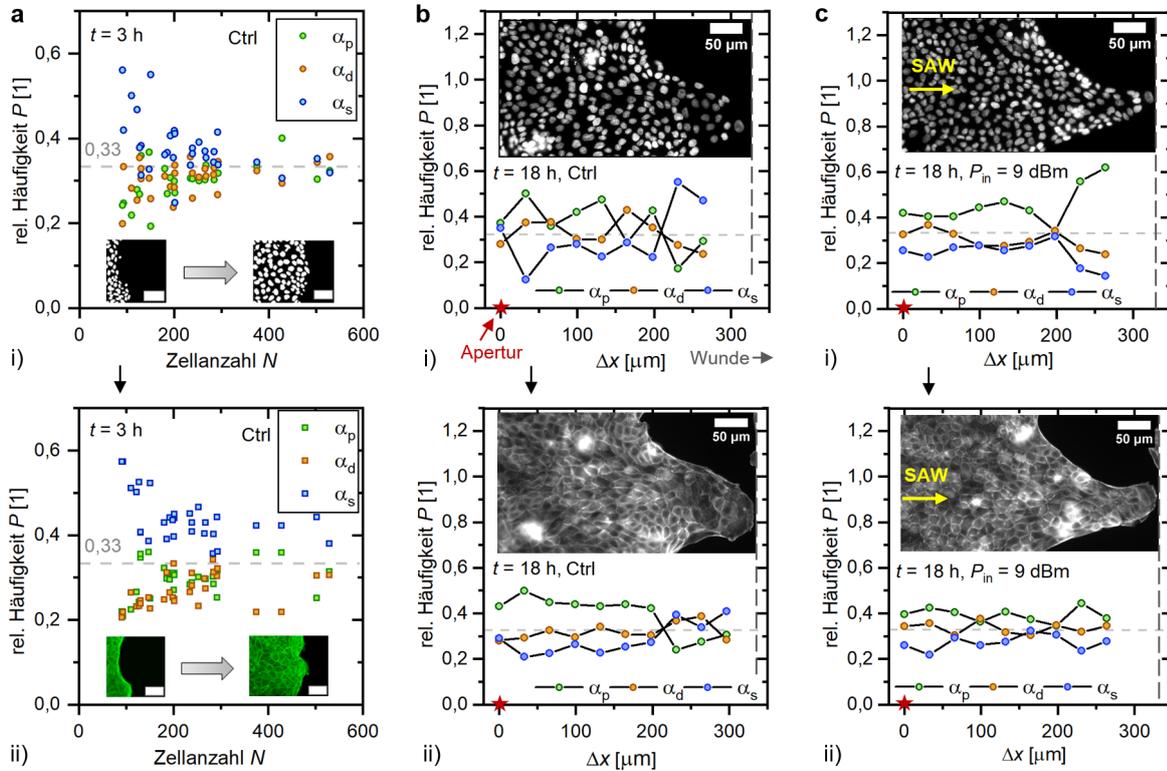


Abbildung 4.15: Visualisierung der Orts- und Zeitabhängigkeit von Zellkern- und Filamentorientierungen. a) Verteilung der i) Zellkernorientierungen und ii) Filamentorientierungen in Kontrollproben zu Beginn des Wundheilungsprozesses $t = 3$ h als Funktion der Zellanzahl N im evaluierten Mikroskopbild. Die Bilder wurden mit verschiedenen Abständen zur Wundkante aufgenommen, sodass die Zellzahl den Abstand zur Wundkante repräsentiert. b) Detaillierte Ortsauflösung der i) Zellkern- und ii) Filamentorientierungen als Funktion des Abstands Δx von der Apertur einer Kontrollprobe ohne angeschlossenes SAW-Signal. c) Entsprechende Ortsauflösung von i) Zellkern- und ii) Filamentorientierungen in einem mit SAW behandelten Aperturbereich bei $P_{in} = 9$ dBm als Funktion von Δx .

In der externen Kontrolle in Abb. 4.15b kann sowohl für i) die Zellkerne als auch ii) die Filamente eine etwas höhere relative Häufigkeit P in α_p -Richtung für $\Delta x \leq 200 \mu\text{m}$ beobachtet werden. Dies stimmt mit der allgemeinen Tendenz der Kontrollproben in Abbildung 4.14 überein, die ebenfalls bis zu einem Abstand $\Delta x = 200 \mu\text{m}$ ausgewertet wurden. Allerdings lässt sich in Abbildung 4.15b für $\Delta x > 200 \mu\text{m}$ eine Umkehr der Orientierung für $x > 200 \mu\text{m}$ erkennen, wo die Zellkerne nahe am Wundrand eine auf bis zu $P(\alpha_s = 0,55)$ stärkere Ausrichtung senkrecht zur Migrationsrichtung aufweisen. Dieser Trend nahe des Wundrandes bestätigt die Beobachtung aus Abbildung 4.15a (für niedriges N). Aus der detaillierten räumlichen Analyse lässt sich schließen, dass sich Zellkerne und Filamente ohne SAW-Einfluss nicht nur bei $t = 3$ h vorzugsweise entlang des Wundrandes ausrichten, son-

dem diese Tendenz auch über längere Zeiträume in der Vorderkante erhalten bleiben kann. In der Probe nach $t = 18$ h SAW-Behandlung in Abb. 4.15c kann ein anderes Verhalten identifiziert werden: Hier ist eine höhere Anzahl von Zellkernen auf bis zu $P(\alpha_p) = 0,62$ entlang der SAW-Ausbreitungsachse ausgerichtet, und zwar nicht nur im Zellrasen nahe der Apertur, sondern auch an der Vorderkante der Wunde. Die jeweiligen Filamentorientierungen in Graph ii) sind unter SAW-Einfluss ebenfalls stark in α_p -Richtung ausgeprägt und im Gegensatz zur Kontrollprobe auch in der Vorderkante bei $\Delta x > 200 \mu\text{m}$ erhöht. Aus der Literatur ist bekannt, dass epitheliale Führungszellen während der Migration in eine Wunde hinein Zugkräfte auf nachfolgende Zellen ausüben. Diese Kräfte können beispielsweise eine Relokalisierung des kortikalen Proteins Merlin als mechanochemischen Transducer auslösen und hängen von der Aktomyosin-basierten Zellkontraktilität ab [122]. Die Ausrichtung von Zellkernen und Filamenten entlang der SAW-Ausbreitungsachse am vorstoßenden Wundrand unter SAW-Einfluss könnte daher eine entscheidende Beobachtung zur Erklärung der schnelleren Zellmigration bei der SAW-stimulierten Wundheilung sein.

Um diese Beobachtung weiter zu verifizieren und neben der räumlichen auch die zeitliche Abhängigkeit der Orientierungen zu untersuchen, wurden weitere Versuchsreihen durchgeführt. Deren Ergebnisse sind in Abbildung 4.16 dargestellt. Anhand von Abbildung 4.16a bzw. c kann das mittlere Orientierungsverhalten der Zellkerne bzw. Filamente aller Proben insbesondere zu Beginn ($t = 3$ h) und im späteren Verlauf ($t = 18$ h) des Wundheilungsprozesses mit und ohne SAW-Stimulation verglichen werden. Ergänzend ist das Verhalten einzelner Proben zwischen diesen beiden Zeitschritten aufgetragen, um ein Gesamtbild des zeitlichen Orientierungsverlaufs zu herzustellen.

Wie bereits durch die vorherigen Ergebnisse angedeutet, lässt sich eine SAW-unabhängige Umkehrung der Orientierungen über die Zeit t des Wundheilungsprozesses erkennen: Ein t-Test für unabhängige Stichproben für Graph i) in Abb. 4.16a (ohne SAW-Behandlung) zeigt, dass der Anstieg der relativen Zellkernorientierung P in α_p -Richtung sowie der entsprechende Rückgang in α_s -Richtung als Funktion der Zeit zwischen $t = 3$ h und $t = 18$ h signifikant sind ($p < 0,05 = \alpha$, $N \geq 5$). Auch der Unterschied zwischen $P(\alpha_p)$ und $P(\alpha_s)$ bei $t = 18$ h ist signifikant, was erneut eine SAW-unabhängige Ausrichtung der Zellkerne in Migrationsrichtung über die Zeit bestätigt. Die Filamentorientierungen in Graph i), Abb. 4.16c zeigen eine ähnliche Tendenz ohne SAW-Behandlung. Unter SAW-Stimulation zeigen sowohl die Zellkerne als auch die Filamente eine wesentlich ausgeprägtere Änderung ihrer Vorzugsrichtungen über die Zeit des Wundheilungsprozesses. Zur Prüfung der Signifikanz wurden die relativen Häufigkeiten gleicher Winkel $P(\alpha_i)$ und $P(\alpha_j)$ ($i = j$) zwischen den Zeitschritten $t_1 = 3$ h und $t_2 = 18$ h sowie verschiedene Winkel ($i \neq j$) innerhalb eines Zeitschrittes verglichen. Da für SAW-Proben beinahe alle Unterschiede signifikant sind, wurden in den Graphen zur Erhaltung der Lesbarkeit die signifikanten Ergebnisse nicht hervorgehoben, sondern in der Tabelle unter Anhang A.6, Abb. A.12 zusammengefasst. Die Vorzugsrichtungen der Filamente und Zellkerne sowohl zu Beginn als auch im Verlauf des Wundheilungsprozesses sind in

den SAW-stimulierten Proben deutlicher zu erkennen: Während in den Kontrollproben bei $t = 3$ h nur bis zu $\Delta P_{\text{Ctrl}}(\alpha_s, \alpha_p) = 10,6 \pm 4,5$ % mehr Filamente senkrecht zur Migrationsrichtung ausgerichtet sind, ist dieser Trend bei $P_{\text{in}} = 9$ dBm mit $\Delta P_{9\text{dBm}}(\alpha_s, \alpha_p) = 39,8 \pm 4,1$ % wesentlich stärker ausgeprägt. Die Orientierungen der Zellkerne in α_s -Richtung werden bei $t = 3$ h mit SAW-Behandlung ebenfalls um bis zu $\Delta P_{9\text{dBm}}(\alpha_s, \alpha_p) = 27,3 \pm 6,4$ % verstärkt, während bei Kontrollproben kein signifikanter Unterschied auftritt.

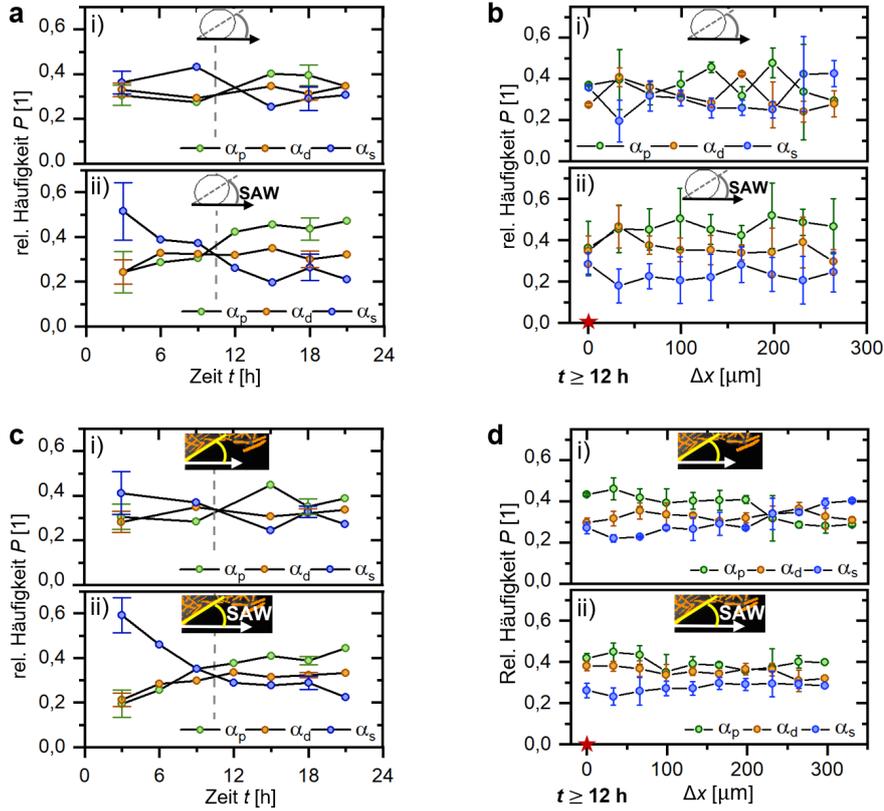


Abbildung 4.16: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zellkern- und Filamentorientierungen mit räumlicher und zeitlicher Auflösung in den Aperturbereichen von Kontrollproben und SAW-Proben ($P_{\text{in}} = 9$ dBm), dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung (SD). a) Mittlere relative Zellkernorientierungen i) ohne und ii) mit SAW-Behandlung zu verschiedenen Zeiten t des Wundheilungsprozesses ($N \geq 5$ für $t = 3$ h und 18 h, sonst $N = 1$). Eingezeichnet ist der Wendepunkt der Orientierungen bei $t \approx 12$ h. b) Entsprechende mittlere Zellkernorientierungen i) mit und ii) ohne SAW als Funktion des Abstands zur Apertur Δx , zusammengefasst für alle Proben nach $t = 12$ -24 h. Jeder Mittelwert besteht aus $N = 2 - 4$ unabhängigen Proben. c) Entsprechende Filamentorientierungen aufgelöst nach der Wundheilungszeit t (analog zu a)), d) entsprechende Filamentorientierungen aufgelöst nach dem Abstand zur Apertur für $t \geq 12$ h (analog zu b)). Für die Unterschiede zwischen $t = 3$ h und $t = 18$ h bzw. zwischen den Winkeln α_p , α_d und α_s in a) und c) ergab ein klassischer ANOVA-Test Signifikanz mit $\alpha = 0,05$ ($p < 0,001$). Die Ergebnisse der Post-hoc-Tests sind unter Anhang A.6, Abb. A.12 aufgeführt.

Die durch SAW erhöhte Orientierung ist bei $t = 3$ h senkrecht zur Migrations- sowie zur SAW-Ausbreitungsrichtung und damit entlang der Wellenbäuche bzw. -berge der akustischen Oberflächenwelle. In Abschnitt 4.2 sowie in früheren Studien wurde gezeigt, dass Neuriten

bevorzugt entlang der Druckminima eines akustischen Stehwellenfeldes wachsen [22, 25]. Obwohl in dem hier verwendeten Versuchsaufbau fortlaufende statt stehende akustische Oberflächenwellen angewandt werden, ist es nicht auszuschließen, dass die höhere Ausrichtung von Filamenten und Zellkernen parallel zu den Bergen bzw. Bächen der Welle zu diesem frühen Zeitpunkt der Wundheilung auf ähnliche Mechanismen wie in den Vorarbeiten mit Neuriten beruht. In diesem Fall wird ein solcher Effekt jedoch im Verlauf des Wundheilungsprozesses durch die Zellmigration in die Richtung α_p umgekehrt: Nahe des Zeitpunktes $t \approx 12$ h lässt sich ein Wendepunkt der Vorzugswinkel beobachten. Danach (bei $t = 18$ h) sind die Orientierungen in α_p -Richtung im Vergleich zu $t = 3$ h um $\Delta P_{9\text{dBm}}(t = 18 \text{ h}, t = 3 \text{ h}) = 19,4 \pm 4,3 \%$ für Zellkerne und um $\Delta P_{9\text{dBm}}(t = 18 \text{ h}, t = 3 \text{ h}) = 9,4 \pm 2,6 \%$ für Filamente signifikant erhöht ($p \leq 0,001$).

Auf der Grundlage des Wendepunktes im Orientierungsverhalten der Filamente und Zellkerne, der in Abbildung 4.16a und b bei $t \approx 12$ h angedeutet wird, wurden abschließend alle Proben für $t \geq 12$ h zusammengefasst und analog zu Abbildung 4.15b und c eine räumliche Orientierungsanalyse hinsichtlich des Abstands der Zellkerne und Filamente zur Apertur durchgeführt. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse sind zur Abrundung der hier durchgeführten räumlichen und zeitlichen Analysen in Abbildung 4.16b und d zusammengefasst. Im Zellrasen der Kontrollproben ist eine Fluktuation der relativen Häufigkeiten aller Zellkern- und Filamentwinkel um $P \approx 0,33$ mit einer leicht höheren Tendenz in α_p -Richtung zu erkennen. Erwartungsgemäß sind nahe des Wundrandes analog zu Abbildung 4.15b für $\Delta x \geq 200 \mu\text{m}$ mehr Kerne und Filamente in α_s -Richtung ausgerichtet, und zwar für Zellkerne um bis zu $\Delta P_{\text{Ctrl}}(\alpha_s, \alpha_d) = 14,7 \pm 6,3 \%$ bzw. um $6,9 \pm 4,5 \%$ im Vergleich zu $P_{\text{Ctrl}}(\alpha_s)$ bei $x_0 = 0 \mu\text{m}$ direkt an der Apertur. Aufgrund der geringen Anzahl von Proben ($N = 2$), deren Zellen weit genug in die Wunde migriert sind, um eine Datenanalyse für $\Delta x \geq 200 \mu\text{m}$ zu ermöglichen, wurden hier keine Signifikanztests durchgeführt. Bei SAW-stimulierten Proben kann, wie ebenfalls bereits in Abb. 4.15c angedeutet, im Gegensatz zu den Kontrollproben eine insgesamt höhere Zellkern-Orientierung entlang der SAW-Ausbreitungs- und Zellmigrationsachse um $\Delta P_{9\text{dBm}}(\alpha_p, \alpha_s) = 22,0 \pm 9,4 \%$ besonders am Wundrand festgestellt werden. Interessanterweise ergibt sich auch ein Anstieg zwischen den relativen Häufigkeiten $P_{9\text{dBm}}(\alpha_p)$ zwischen der Position der Apertur (x_0) und der Vorderkante ($x = 264 \mu\text{m}$) von $\Delta P_{9\text{dBm}}(x_0, x = 264 \mu\text{m}) = 10,4 \pm 10,0 \%$. Dies zeigt, dass die Zellausrichtung in SAW-Ausbreitungsrichtung direkt an der Apertur mit der höchsten SAW-Intensität schwächer ausfällt, was möglicherweise aufgrund des hier stärkeren Einflusses der Wellenknoten und des geringeren Einflusses der migrierenden Front im eher stationären Zellrasen erklärt werden könnte.

Zusammenfassend lässt sich anhand der hier durchgeführten Analysen sagen, dass auch ohne SAW-Behandlung räumliche und zeitliche Abhängigkeiten der Filament- und Zellkernorientierungen bestehen, welche unter SAW-Stimulation jedoch verstärkt werden können. Die oben aufgestellte zweite Hypothese 4.5, dass die Position der Zellen in der Monolage sowie die Zeit der SAW-Stimulation bzw. des Wundheilungsprozesses zusätzliche Auswirkungen

auf das Filament- und Zellkernverhalten haben, kann somit aufrechterhalten werden.

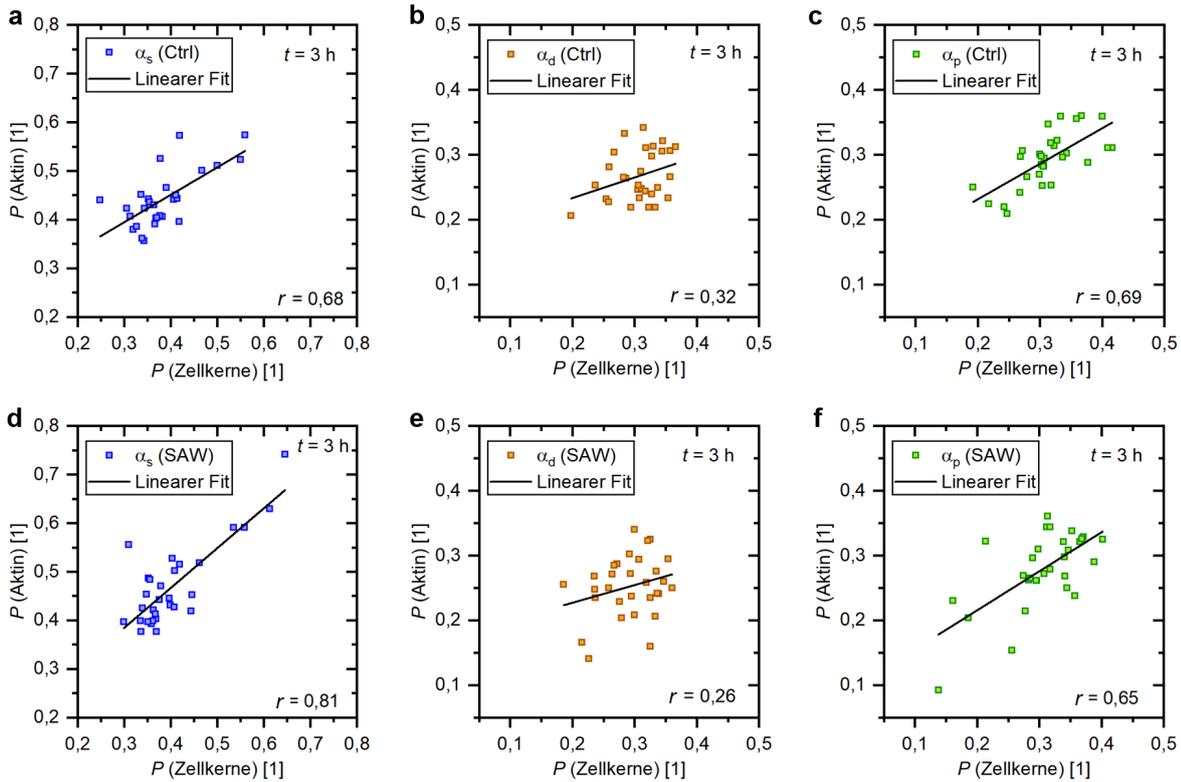


Abbildung 4.17: Korrelationsergebnisse der relativen Filament- und Zellkernorientierungen nach $t = 3$ h mit und ohne SAW-Einfluss. a) Relative Häufigkeit P der mittleren Aktinfilamentorientierung in α_s -Richtung ohne SAW als Funktion der entsprechenden Häufigkeit der Zellkernorientierung. Der Korrelations-Koeffizient nach Pearson r zeigt die Stärke der Korrelation. b)-c) Entsprechende Korrelationen für die Richtungen α_p und α_d in Kontrollproben ohne SAW, d)-f) Entsprechende Korrelationen der analogen Richtungen unter SAW-Einfluss bei $P_{\text{in}} = 9$ dBm.

Wie bereits aus Abbildung 4.16 ersichtlich wird, weisen die Orientierungen der Zellkerne und Filamente meist sehr ähnliche Anisotropien sowohl mit als auch ohne SAW-Behandlung auf. Um Zusammenhänge zwischen diesen Orientierungsverhalten weiter zu beleuchten, wurden die Orientierungen der Zellkerne und Filamente gegeneinander aufgetragen und auf eine mögliche lineare Korrelation durch Berechnung des Pearson-Koeffizienten r geprüft. Eine Zusammenfassung der Korrelationsstudien für den Zeitschritt $t = 3$ h ist in Abbildung 4.17 und für $t = 18$ h in Abbildung 4.18 zu sehen. Hieraus geht zum Einen hervor, dass eine starke Korrelation ($r \geq 0,6$) für beide Zeitpunkte und beide beobachteten Vorzugsrichtungen α_s und α_p während des Wundheilungsprozesses vorliegt. Zum Anderen wird die Korrelation unter SAW-Stimulation in bestimmten Richtungen verstärkt, wie beispielsweise in α_s -Richtung bei $t = 3$ h mit bis zu $r = 0,81$ (Graph 4.17d). Diese Ergebnisse sind eine wichtige Ergänzung und Bestätigung der Beobachtungen aus den Abbildungen 4.14-4.16. Außerdem könnte die hier gezeigte Korrelationsstudie künftige Studien zur Filamentorientierung erleichtern, da die Verfahren zur Markierung, Detektion und Analyse von Zellkernen wesentlich schneller

und einfacher durchzuführen sind als für Aktinfilamente.

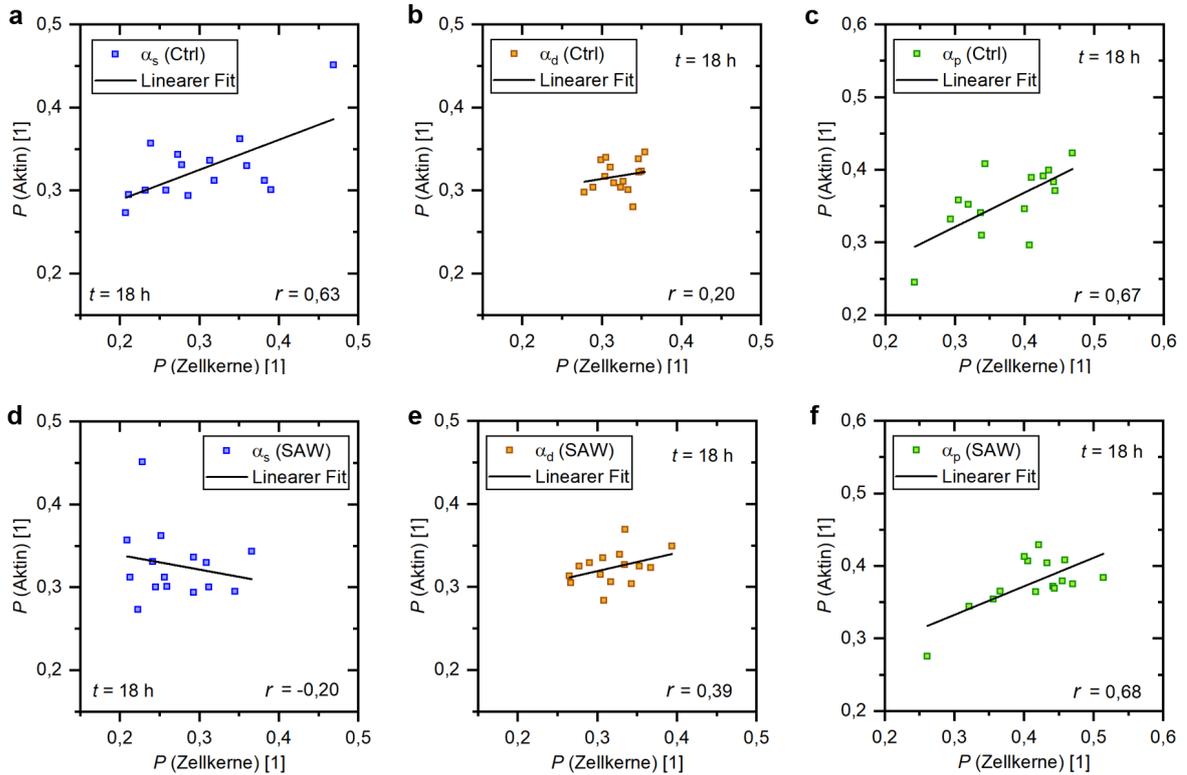


Abbildung 4.18: Korrelationsergebnisse der Filament- und Zellkernorientierungen nach $t = 18$ h mit und ohne SAW-Einfluss. a) Relative Häufigkeit P der mittleren Aktinfilamentorientierung in α_s -Richtung in Kontrollproben als Funktion der entsprechenden Häufigkeit der Zellkernorientierung. Der Korrelations-Koeffizient nach Pearson r zeigt die Stärke der Korrelation. b)-c) Entsprechende Korrelationen für die Richtungen α_p und α_d in Kontrollproben ohne SAW, d)-f) Entsprechende Korrelationen aller Richtungen unter SAW-Einfluss bei $P_{\text{in}} = 9$ dBm.

Es kann geschlussfolgert werden, dass die SAW-Stimulation zu Beginn des Wundheilungsprozesses zunächst die Ausrichtung der Filamente und Kerne senkrecht zur SAW-Ausbreitungsrichtung verstärkt. Anschließend kann eine Umkehrung der Vorzugsrichtungen mit zunehmend fortschreitendem Wundheilungsprozess beobachtet werden, was schließlich zu einer stärkeren Ausrichtung sowohl der Filamente als auch der Zellkerne entlang der SAW-Ausbreitungsachse bei $t = 18$ h im Vergleich zu $t = 3$ h führt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Orientierungen von der Position der Zellen innerhalb des Zellrasens abhängt: Während ohne SAW-Behandlung die Vorzugsrichtung an der Vorderkante senkrecht zur Migrationsrichtung verläuft, kommt es unter SAW-Stimulation zu einer stärkeren Ausrichtung in Migrations- und SAW-Ausbreitungsrichtung sowohl im Zellrasen als auch an der Wundkante. Die zeitliche Umkehrung der Orientierungen und die Ausrichtung in Migrations- und SAW-Ausbreitungsrichtung könnte ein wesentlicher zugrundeliegender Mechanismus der SAW-stimulierten Zellmigration sein. Zudem konnte hier eine starke Korrelation zwischen der Orientierung von Filamenten und Zellkernen festgestellt werden, die durch die SAW-

Stimulation teilweise verstärkt wird. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Filamentorientierung und Zellkernausrichtung beim zugrundeliegenden intrazellulären Mechanismus der SAW-stimulierten Wundheilung eng miteinander zusammenhängen.

Es stellt sich die Frage, ob die mechanische Kraft des externen SAW-Kraftfeldes direkt auf das Aktin-Zytoskelett wirkt und damit die Orientierung verändert oder ob - neben den unter Abschnitt 4.4.2 getesteten mechanosensitiven Proteinen - noch andere Wege der Mechanotransduktion beteiligt sind. Ambattu und Yeo erörterten in ihrem letzten Reviewartikel mögliche Wege der Mechanorezeption und Mechanotransmission von akustisch stimulierter Zellmigration und -proliferation. Sie regten an, dass die Behandlung mit SAW und BAW (*bulk acoustic waves*) bei Frequenzen im MHz-Bereich zu Abberationen in der Zellmembran führen könnte, wobei Ionenkanäle aktiviert werden [32, 295] und ein erhöhter Einstrom von extrazellulärem Kalzium (Ca^{2+}) in das Zytoplasma ermöglicht wird [32]. Da Ca^{2+} auch an der Regulierung des Zytoskeletts und der Zellmigration beteiligt ist, kann dieser Effekt zu Umstrukturierungen des Zytoskeletts führen [296]. Es wurde gezeigt, dass höhere Ca^{2+} -Konzentrationen zu einer schnellen Reorganisation von Aktin-Netzwerken in Epithelzellen führen, um den Wundverschluss durch Ausbildung von Lamellipodien zu fördern [297]. Alternativ können akustische Stimuli auch FA-Proteine wie Vinculin aktivieren, die ebenfalls eine Umstrukturierung des Zytoskelettnetzes anregen [298]. Zhou et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass gepulster Ultraschall mit niedriger Intensität die Bildung von fokalen Adhäsionen und Stressfaser-Adhäsionen über die Aktivierung des Rho-Signalwegs in menschlichen Hautfibroblasten induziert [299]. Therapeutischer Ultraschall induzierte auch eine partielle Auflösung von Stressfasern und deren Reorganisation nach $t = 24$ h Beschallung, was zu einer erhöhten Migrationsrate von Endothelzellen führte [300]. Fokale Adhäsionen sind als Mechanosensoren bekannt sind und nehmen eine Schlüsselrolle bei der Zellmigration und der Verbindung des Aktin-Zytoskeletts mit dem Substrat ein [301, 302]. Daher wäre auf Basis der in der Literatur erörterten möglichen Mechanismen eine naheliegende Schlussfolgerung, dass fokale Adhäsionen in dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau die erste Instanz zur Wahrnehmung und Weiterleitung des SAW-Stimulus an das Aktin-Zytoskelett sind, wo er letztlich die hier beobachteten Veränderungen bewirkt.

Da die Analysen zur Aktinfilament- und Zellkernorientierung stark auf einen Einfluss der SAW-Behandlung auf die Zellorientierung als Ursache für die stimulierte Wundheilung hindeuten, stellt sich zuletzt die Frage, ob die intrazellulären Veränderungen auch anhand der Zellmorphologie erkennbar sind. Auf Basis der in Brugger et al. veröffentlichten Phasenkontrast-Aufnahmen von SAW-stimulierten Wundheilungsassays [1] wurde daher eine zusätzliche Analyse der Orientierung von Zellen in der Wundmonolage mittels des ImageJ-Plugins *OrientationJ* durchgeführt [303]. Diese Analysemethode wird häufig zur Untersuchung der Dynamik von Zellmonolayern eingesetzt und ermöglicht die Auswertung von Phasenkontrast-Zeitrafferaufnahmen ohne weitere Fluoreszenzfärbungen. Da die Zellorientierung, wie oben

anhand der Literatur erörtert, mit der Migrationsrichtung zusammenhängt und durch die Ausrichtung der Aktinfasern und des Zellkerns bestimmt wird, soll diese Analyse zur Bestätigung der bisherigen Ergebnisse dieses Abschnitts dienen. Die Ergebnisse zur Zellorientierung sind in Abbildung 4.19 und unter Anhang A.6, Abb. A.13 dargestellt. Dabei wurde die relative Häufigkeit der Zellorientierung $P_c(\alpha)$ zuvor auf die jeweilige Orientierung im ersten Bild des aufgezeichneten Wundheilungsprozesses bei $t_0 = 0$ h normiert.

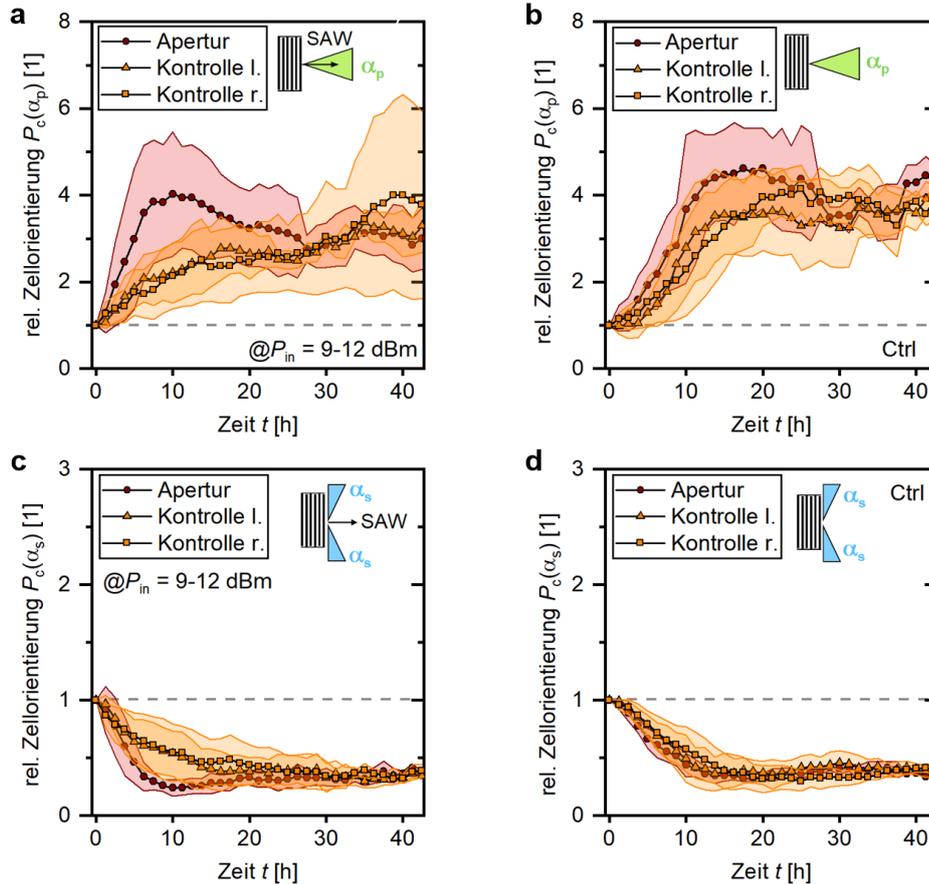


Abbildung 4.19: Relative Zellorientierungen P_c parallel (α_p) und senkrecht (α_s) zur SAW-Ausbreitungsrichtung, ermittelt mittels OrientationJ aus Phasenkontrast-Videos von Wundheilungsprozessen, die bei $P_{in} = 9-12$ dBm stimuliert wurden und Kontrollproben (*Ctrl*) ohne direkten SAW-Einfluss. a) Vergleich der Zellorientierung $P_c(\alpha_p)$ parallel zur SAW-Propagationsachse in SAW-stimulierten Proben (Apertur- und interne Kontrollbereiche), b) entsprechende Zellorientierung $P_c(\alpha_p)$ in Kontrollproben, c) Orientierung der Zellen $P_c(\alpha_s)$ senkrecht zur Propagationsachse in SAW-stimulierten Proben, d) entsprechende Orientierung $P_c(\alpha_s)$ in Kontrollproben. Die Analyse der Phasenkontrastaufnahmen mittels OrientationJ wurde durch Hanna Engelke auf Basis der unter [1] publizierten Zeitrafferaufnahmen durchgeführt.

Das Orientierungsverhalten der Zellen in den migrierenden Monolagen in Abb. 4.19 zeigt eine allgemeine Zunahme der Zellorientierung entlang der Migrationsrichtung bzw. senkrecht zum Wundrand in α_p -Richtung (Abb. 4.19b) sowie eine Abnahme in α_s -Richtung (Abb. 4.19d) unabhängig von der SAW-Stimulation, was sich mit den Ergebnissen zur Aktinfilament- und

Zellkernorientierung in den Abbildungen 4.14-4.16 deckt. Darüber hinaus geht aus Abbildung 4.19a und Abb. A.13a (Anhang A.6) hervor, dass die Zellen vor der Apertur ihre Orientierung in Richtung der Migrationsrichtung schneller ändern als in den inneren Kontrollregionen in SAW-stimulierten Proben und als in den Aperturregionen von externen Kontrollproben. In den externen Kontrollproben ohne SAW-Stimulation ist der Unterschied zwischen Apertur und internen Referenzen zudem deutlich schwächer ausgeprägt, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass dieser Effekt durch die SAW-Stimulation induziert wird. Zugleich nimmt die Orientierung in α_s -Richtung in SAW-stimulierten Proben schneller ab (Abb. 4.19c).

Die schnellere Änderung der Orientierungen durch SAW-Stimulation steht im Einklang mit der Umkehrung der Aktin- und Zellkernorientierungen im Zeitverlauf in Abb. 4.16a und c, allerdings liefert die Analyse zur Zellorientierung zusätzlich eine höhere zeitliche Auflösung bei größerem Probenumfang. Die oben aufgestellte letzte Hypothese 4.6, dass sich die beobachteten intrazellulären Veränderungen auch in der Zellmorphologie widerspiegeln, kann somit ebenfalls aufrechterhalten werden. Da die Migration direkt mit der Orientierung der Zellen innerhalb der Monolage zusammenhängt, ist es plausibel, dass die hier beobachteten schnelleren Veränderungen der Aktinfilament-, Zellkern- und Zellorientierung durch SAW-Stimulation zentrale Mechanismen der beschleunigten Wundheilung sind.

Die zu Beginn von Kapitel 4 gestellte **Forschungsfrage 3)** nach den zugrundeliegenden intrazellulären Mechanismen der durch akustische Kraftfelder stimulierten Wundheilung kann durch die im Unterkapitel 4.4 gesammelten Ergebnisse wie folgt beantwortet werden: Während die Membranprotease SPPL3 (4.4.1) und die mechanosensitiven Proteine YAP, MRTF und Notch (4.4.2) im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen im Wundheilungsmodell keine Beeinflussbarkeit durch akustische Kraftfelder zeigen, werden Eigenschaften des Aktin-Zytoskeletts sowie der Zellkerne, besonders ihr räumliches und zeitliches Orientierungsverhalten, deutlich verändert (4.4.3) Diese Veränderungen äußern sich insbesondere in einer schnelleren Ausrichtung der Zellen in SAW-Ausbreitungsrichtung und damit in einer schneller ausgerichteten Zellmigration, was mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Phänomen der beschleunigten Wundheilung führt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Anhand der in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse konnten die zu Beginn aufgestellten Forschungsfragen dieser Arbeit umfassend beantwortet werden, wie jeweils am Ende der Unterkapitel 4.1, 4.3 und 4.4 gezeigt wird. Im Folgenden sollen die Ergebnisse zusammengefasst und hinsichtlich ihrer Bedeutung für das Gesamtziel der Arbeit eingeordnet werden. Außerdem soll ein Ausblick für zukünftige Untersuchungen gegeben werden, die an diese Arbeit anknüpfen und den weiteren Weg zu einer medizinischen Anwendung der hier behandelten Technologie ebnen könnten.

Wie zu Beginn dieser Arbeit (Kapitel 1) dargestellt wurde, handelt es sich bei der Stimulation von Zellen und Gewebe um ein zentrales aktuelles Ziel der regenerativen Medizin. Akustische Wellen haben sich in den letzten Jahrzehnten, beispielsweise im Rahmen der Ultraschalltherapie, als wichtige Technologie zur Förderung der Geweberegeneration herausgestellt. Die weltweite Belastung von Patienten und Gesundheitssystemen durch Krankheitsbilder, denen eine Störung der Heilungsprozesse zugrundeliegt, sowie durch lange post-operative Genesungszeiten nach chirurgischen Eingriffen zeigen jedoch die Notwendigkeit weiterer Grundlagenforschung zur Verbesserung von Regenerationsprozessen und zur Entwicklung neuer Technologien.

Die Technologie der akustischen Oberflächenwellen, mit der dynamisch modulierbare akustische Kraftfelder erzeugt werden können, hat sich in der Grundlagenforschung der letzten Jahre als vielversprechende Plattform zur Untersuchung und Stimulation von Zellwachstum *in vitro* erwiesen. In Vorarbeiten zur Stimulation von Zellen im Wundheilungsmodell mit fortlaufenden akustischen Oberflächenwellen wurden mittlere Stimulationseffizienzen von bis zu $E_{\max} = 118\%$ für SaOs2-Zellen [20] und bis zu $E_{\max} = 235\%$ für MDCK-II-Zellen [1] erreicht. Durch eine Untersuchung des Proliferationsverhaltens von MDCK-II-Zellen wurde dabei zuletzt die Zellmigration als der hauptsächlich direkt stimulierte Prozess identifiziert [1]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass akustische Stehwellenfelder ein gerichteteres Neuronenwachstum von primären Neuronen entlang der Minima des Kraftfeldes ermöglichen [22]. Diese Studien zeigen eine Beeinflussbarkeit von Zellwachstum durch die auf SAW-Chips erzeugten Kraftfelder und dienen als Basis für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen. Der intrazelluläre Mechanismus, der dem akustisch stimulierten Zellwachstum zugrundeliegt, stellte keinen Teil der bisherigen Untersuchungen dar, ist jedoch für ein tiefreichendes Verständnis des Phänomens und damit für zukünftige Applikationen der Technologie *in vivo* unabdingbar. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit ist es gelungen, das Phänomen des durch akustische Kraftfelder stimulierten Zellwachstums weiter aufzuklären und intrazelluläre Mechanismen der Stimulation zu identifizieren, wie im Folgenden zusammengefasst wird (vgl. auch Abb. 5.1).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von dynamisch modulierten, akustisch generierten Strömungsfeldern auf Zellen und deren Struktur identifiziert. Hierzu wurden aufgrund der (patho-)physiologischen Relevanz Endothelzellen aus humanen Aorten in dem unter 4.1 vorgestellten Aufbau *Aorta-on-a-SAW-Chip* unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen untersucht und qualitativ festgestellt, dass starke akustische Strömungsfelder zu morphologischen Veränderungen der Zellstruktur führen können. Auf intrazellulärer Ebene konnten Unterschiede in der Ausprägung, -breite und -orientierung des Aktin-Zytoskeletts zwischen den verschiedenen Kultivierungsbedingungen quantifiziert werden. Damit konnte nicht nur die Funktionalität und das Potential des Aufbaus als Modell zur Untersuchung von Endothelzellen unter verschiedenen Strömungsbedingungen bestätigt, sondern auch gezeigt werden, dass bereits eine kurze Aussetzung von Zellen an Kraftfelder durch akustische Strömungen sowohl äußere als auch intrazelluläre Merkmale beeinflussen können.

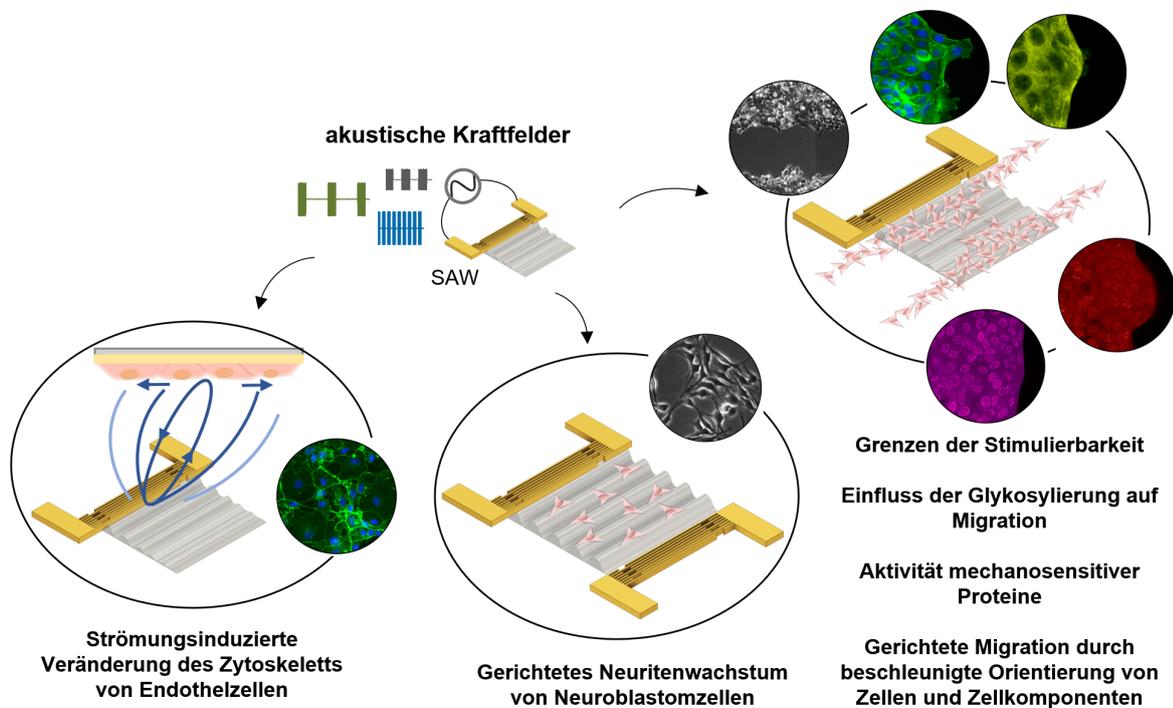


Abbildung 5.1: Übersicht über die Ergebnisse dieser Arbeit.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Auswirkungen statischer und dynamischer akustischer Kraftfelder ohne den Einfluss von akustischer Strömung auf das Wachstumsverhalten von neuronähnlichen B35-Zellen quantifiziert. Dabei konnten die Vorgebnisse zum gerichteten Zellwachstum in akustischen Stehwellenfeldern aus Vorarbeiten untermauert und erweitert werden, indem durch dynamische Modulation der Kraftfelder mit höheren SAW-Amplituden ein gerichteteres Neuritenwachstum erreicht wurde. Die Vorzugsrichtungen des Neuritenwachstums in den erzeugten statischen und dynamischen akustischen Potentialland-

schaften konnten entlang der Minima des Kraftfeldes sowie senkrecht dazu beobachtet werden.

Im Wundheilungsmodell konnte ein erhöhtes Wachstum von MDCK-II-Zellen, das in bisherigen Arbeiten durch kontinuierliche Signale erreicht wurde, durch Applikation von dynamisch modulierten akustischen Kraftfeldern bei höheren Amplituden reproduziert und dabei neue Erkenntnisse über SAW-Parameter Grenzen bei der Zellstimulation gewonnen werden. Unter einer zeitlich konstanten mittleren Leistung blieb dabei die beschleunigte Wundheilung und Größenordnung der Stimulationseffizienz erhalten, allerdings konnte unter weiterer Parametervariation eine kritische untere Pulsbreite von $\tau_c = 100$ ms zur Stimulierbarkeit identifiziert werden. Als mögliche Gründe für die Grenze der Stimulierbarkeit wurden mechanische Eigenschaften von Zellen wie ihre Viskoelastizität erörtert. Da zur weiteren Aufklärung des Phänomens des akustisch stimulierten Zellwachstums die hier verfolgte phänomenologische Herangehensweise jedoch an ihre Grenzen stößt, wurden im nächsten Teil der Arbeit intrazelluläre Mechanismen der Stimulation näher beleuchtet.

Im letzten Teil wurden verschiedene intrazelluläre Mechanismen untersucht, die eng mit dem Prozess der Zellmigration verknüpft sind und damit vielversprechende mögliche Angriffspunkte für die SAW-Stimulation bilden. Zunächst wurde anhand von vier genetisch modifizierten HEK293-Zelllinien der Einfluss der Expression von SPPL3-Membranproteasen und des daraus resultierenden Glykosylierungsmusters der Zelllinien auf die Stimulierbarkeit ihrer Wundheilung untersucht. Im Rahmen der hier durchgeführten Versuchsreihen konnte im Gegensatz zu der MDCK-II-Zelllinie keine Stimulierbarkeit dieser Zelllinien erreicht werden. Stattdessen zeigte sich unabhängig von der Behandlung mit akustischen Kraftfeldern eine Abhängigkeit der Wundheilungsgeschwindigkeit vom Komplexitätsgrad der genetischen Veränderung, die mögliche SAW-induzierte Effekte überschatten könnte und durch zukünftige biochemische Untersuchungen weiter aufgeklärt werden muss. Als zweiter möglicher intrazellulärer Mechanismus wurde die Aktivität der mechanosensitiven Proteine YAP, MRTF und Notch anhand ihrer Lokalisation im Zellkern unter kurzen akustischen Aktivierungszeiten untersucht. Einzelne Befunde deuten darauf hin, dass die Aktivität von YAP in Führungszellen erhöht sein könnte, was im Rahmen zukünftiger Studien verifiziert werden sollte. Im Rahmen der hier durchgeführten Messungen konnten im Mittel jedoch keine Hinweise auf eine Abhängigkeit der Proteinaktivität von der Stimulation mit akustischen Kraftfeldern festgestellt werden. Zuletzt wurden die Auswirkungen akustischer Kraftfelder auf Eigenschaften des Aktin-Zytoskeletts und der Zellkerne charakterisiert. Die Ergebnisse zeigten deutliche Veränderungen von Aktinfilamenten und Zellkernen durch die SAW-Stimulation: Während die Filamentbreite besonders unter dem Einfluss starker akustischer Kraftfelder erhöht war und damit für den Stimulationseffekt mit hoher Wahrscheinlichkeit keine zentrale Rolle spielt, ergaben sich im Orientierungsverhalten der Aktinfilamente und Zellkerne unter SAW-Stimulation deutliche Unterschiede. Die Orientierung unterlag dabei räumlichen und zeitlichen Abhängigkeiten vom Abstand der Zellen zur Apertur bzw. Wun-

drand und von der Stimulationszeit. Besonders im zeitlichen Verlauf wiesen Zellen unter akustischer Stimulation eine deutlichere Anisotropie von Zellkernen und Filamenten in Richtung der Migration und SAW-Ausbreitungsachse auf. Diese intrazellulären Veränderungen äußerten sich auch in der Morphologie der Zellen, wie zusätzliche Analysen des gesamten Zellorientierungsverhaltens innerhalb der migrierenden Monolagen bestätigten: Hier führte die SAW-Stimulation zu einer schnelleren Gesamtorientierung der Zellen in Migrationsrichtung. Eine interessante Beobachtung ist, dass die Beeinflussbarkeit des Orientierungsverhaltens von Zellwachstum durch akustische Kraftfelder im Rahmen dieser Arbeit auch außerhalb des Kontextes der Wundheilung beim Neuritenwachstum in dynamisch modulierten Stehwellenfeldern nachgewiesen werden konnte (4.2). Das durch akustische Kraftfelder gerichtete Zellwachstums könnte somit ein vom Versuchsaufbau unabhängiger Effekt sein und auf ähnlichen Mechanismen beruhen. In diesem Kontext könnte auch die unter 4.3 gefundene Parametergrenze der kritischen Pulsbreite eine Rolle spielen, indem eine Beeinflussung des Orientierungsverhaltens von Zellen und ihres Aktin-Zytoskeletts und damit das beschleunigte Zellwachstum möglicherweise nur auf längeren Zeitskalen der SAW-Pulse erreicht werden kann. Auch viskoelastische Eigenschaften des Zellrasens könnten wie unter 4.3 in diesem Kontext eine Rolle spielen, da die Viskoelastizität von Zellen maßgeblich durch das Zytoskelett und die Zellkerne bestimmt wird [241, 242] und somit Veränderungen der intrazellulären Eigenschaften durch akustische Kraftfelder auch Änderungen im viskoelastischen Verhalten hervorrufen könnten. Eine Quantifizierung der Viskoelastizität des Zellrasens unter verschiedenen Parametern der SAW-Stimulation, beispielsweise durch Rasterkraftmikroskopie in Kombination mit Konfokalaufnahmen des Zytoskeletts, könnte daher ein spannender Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein.

Aus den hier zusammengefassten Ergebnissen und dem bisherigen Forschungsstand lässt sich schließlich für den intrazellulären Mechanismus der SAW-stimulierten Wundheilung ableiten, dass die mechanischen Kräfte der akustischen Oberflächenwellen mit hoher Wahrscheinlichkeit indirekt über fokale Adhäsionen oder direkt auf das Aktin-Zytoskelett einwirken. Es ist wahrscheinlich, dass die Kräfte hier erstens zu einer erhöhten Filamentorientierung in Richtung der Wellenausbreitung und zweitens zu einer Übertragung auf den Zellkern führen, wodurch sich die Orientierung des Zellkerns ebenfalls ändert und sich drittens die gesamte Zelle schneller in Migrationsrichtung ausrichtet. Diese mechanisch durch akustische Kraftfelder induzierte Veränderung der intrazellulären und gesamten Orientierung kann zu einer gerichteteren und somit schnelleren Zellmigration und damit zur beschleunigten Wundheilung führen.

Durch die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse konnten zentrale Mechanismen des durch akustische Oberflächenwellen stimulierten Zellwachstums in einem Modellsystem für Geweberegeneration identifiziert werden. Es ist davon auszugehen, dass das Verhaltensmuster

von Zellen bei der Stimulation *in vivo* an Komplexität wesentlich zunimmt. Bereits beim Übergang vom zweidimensionalen Wundheilungsmodell zur Zellmigration in einer dreidimensionalen Matrix müssen Veränderungen der Zellmechanik berücksichtigt werden: Unter anderem kommt der Rolle von Adhäsionsproteinen und ihrer Modulation der Zell-Beweglichkeit in 3D-Modellen eine größere Bedeutung zu [304]. *In vivo* migrieren die Zellen zudem nicht auf festen Oberflächen, sondern innerhalb einer EZM umgeben von anderen Zellen, sodass es zu komplexeren Wechselwirkungen kommt [305]. Die Anwendung von akustischen Volumenwellen (BAW) stellt eine alternative akustische Stimulationsmethode zu SAW dar, die sich bereits in *in vivo*-Systemen wie Tiermodellen bewährt hat [212]. Aufgrund der limitierten Eindringtiefe akustischer Oberflächenwellen wäre es denkbar, bei der Stimulation von dreidimensionalen Gewebestrukturen zu akustischen Volumenwellen als Stimulationsmethode überzugehen. Die Komplexität der Geweberegeneration *in vivo* erfordert jedoch weitere Grundlagenforschung zum Verständnis grundlegender zellulärer Prozesse zur Entwicklung neuer und kosteneffizienter Technologien für die Geweberegeneration [3, 18]. Ein weiteres Ziel zukünftiger Arbeiten sollte dabei sein, neben den bisher betrachteten Prozessen der Zellmigration, -proliferation und -differenzierung weitere Prozesse der Geweberegeneration und deren Stimulierbarkeit durch akustische Oberflächenwellen unter physiologischen Bedingungen näher zu beleuchten. Ein nächster denkbarer Schritt auf dem Weg zur Applikation akustischer Oberflächenwellen *in vivo* wären beispielsweise Untersuchungen zum Prozess der Gefäßneubildung, der Angiogenese, in pro-inflammatorischen Umgebungen und der damit verbundenen Aktivierung von Endothelzellen unter dem Einfluss akustischer Kraftfelder.

6. Anhang

A. Ergänzende Messergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse ergänzender Auswertungen und Messungen zu den unter Abschnitt 4 aufgeführten Unterkapiteln zu finden.

A.1. Ergänzungen zu Abschnitt 4.1

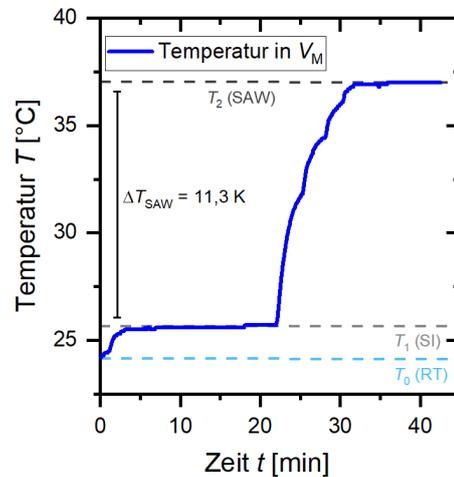


Abbildung A.1: Charakterisierung der Temperatur T im *Aorta-on-a-SAW-Chip*-Aufbau bei $P_{\text{in}} = 27$ dBm, $D = 50\%$ und einer Pulsbreite $\tau_p = 500$ ms. Da die hohe SAW-Leistung P_{in} zu einer Erhöhung von $\Delta T_{\text{SAW}} = 11,3$ °C bzw. K im Zellkulturmedium mit Volumen $V_M = 100$ μl führt, muss der Stage-Inkubator (SI) auf $T_1 = 25,7$ °C eingestellt werden, um eine Kultivierungstemperatur der Zellen im Medium von $T_2 = 37$ °C zu erhalten. Die Raumtemperatur (RT) beträgt hier $T_0 \approx 24,0$ °C.

Mikr.	f_c	l [μm]	w [μm]	$P_F(\alpha_p)$	$P_F(\alpha_d)$	$P_F(\alpha_s)$	$P_N(\alpha_p)$	$P_N(\alpha_d)$	$P_N(\alpha_s)$
A	45,88	19,11	1,97	0,34	0,34	0,31	0,35	0,37	0,28
B	159,64	3,86	0,41	0,33	0,34	0,33	0,33	0,36	0,32

Tabelle 3: Zur Normierung verwendete globale Mittelwerte der statischen Kontrollproben, die auf Grundlage der an zwei verschiedenen Zeiss-Mikroskopen (A: Axiovert 200M und B: Axio Observer 7) aufgenommenen Bildern ermittelt wurden: f_c bezeichnet die Filamentanzahl pro Zelle, l und w die Filamentlängen bzw. -breiten und $P(\alpha)$ die relativen Häufigkeiten der Winkelklassen α_p , α_d und α_s parallel, diagonal und senkrecht zur Flussrichtung für Aktinfilamente (P_F) bzw. Zellkerne (P_N). Es wurde jeweils ein 20x-Objektiv zur Bildaufnahme verwendet; die Umrechnungsfaktoren sind A: $0,62$ μm /px bzw. B: $0,17$ μm /px.

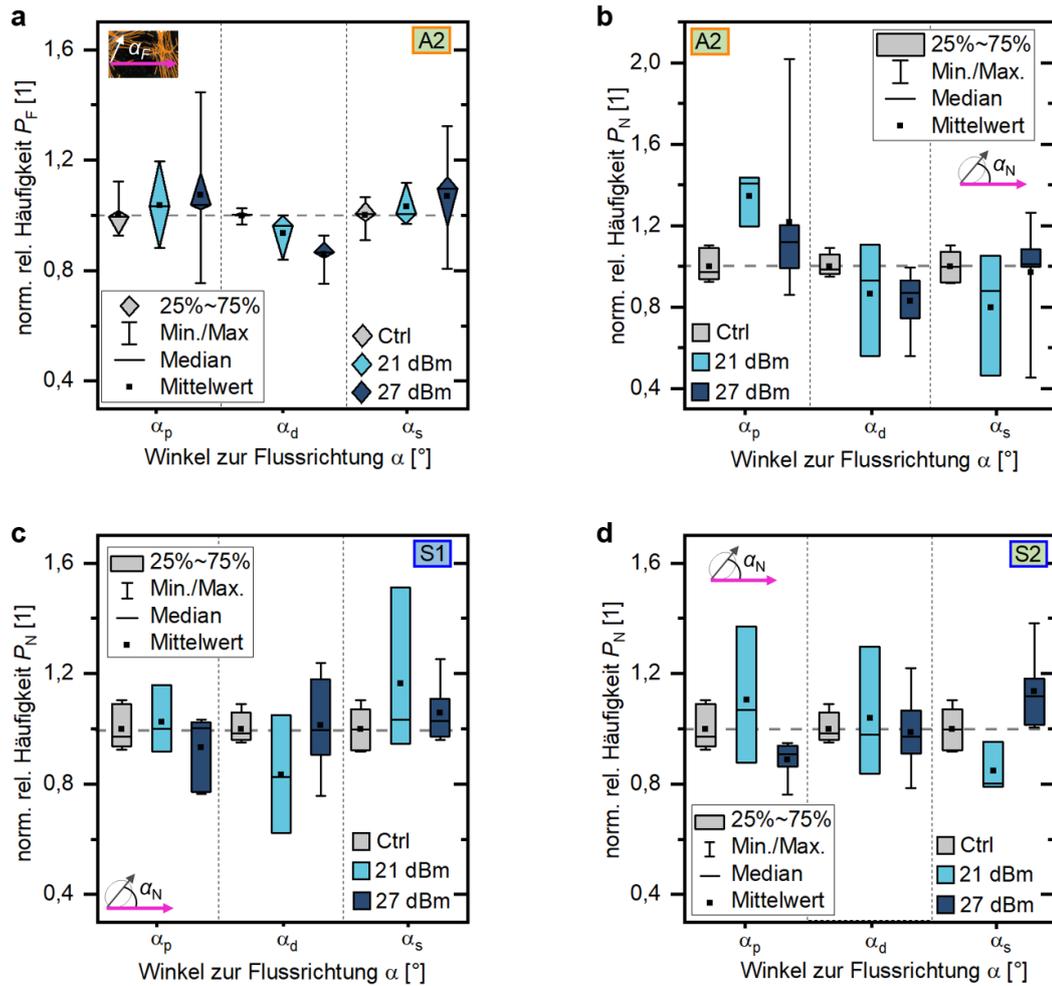


Abbildung A.2: Ergänzende Ergebnisse zur lokalen Orientierungsanalyse von Aktinfilamenten und Zellkernen relativ zur Strömungsrichtung α im *Aorta-on-a-SAW-chip*-Aufbau: a) relative Häufigkeit P_F der Filamentausrichtungen parallel (α_p), diagonal (α_d) und senkrecht (α_s) zur Flussrichtung im Analysebereich A2, normiert auf die statischen Kontrollen, b) entsprechende normierte relative Häufigkeiten P_N für Zellkernausrichungen, c) entsprechende Ergebnisse der Zellkernausrichungen im Analysebereiche S1 (Nebenbereiche nahe des IDT) d) entsprechende Ergebnisse der Zellkernausrichungen im Analysebereich S2 (Nebenbereiche mit größerem Abstand zum IDT). Die Anzahl unabhängiger Proben sind $N(\text{Ctrl}) = 7$, $N(21 \text{ dBm}) = 3$ und $N(27 \text{ dBm}) = 6$. Für jede Region wurde ein ANOVA-Test durchgeführt, der keine Signifikanz lieferte (a) $p = 0,248$, b) $p = 0,079$, c) $p = 0,405$, d) $p = 0,077$).

A.2. Ergänzungen zu Abschnitt 4.2

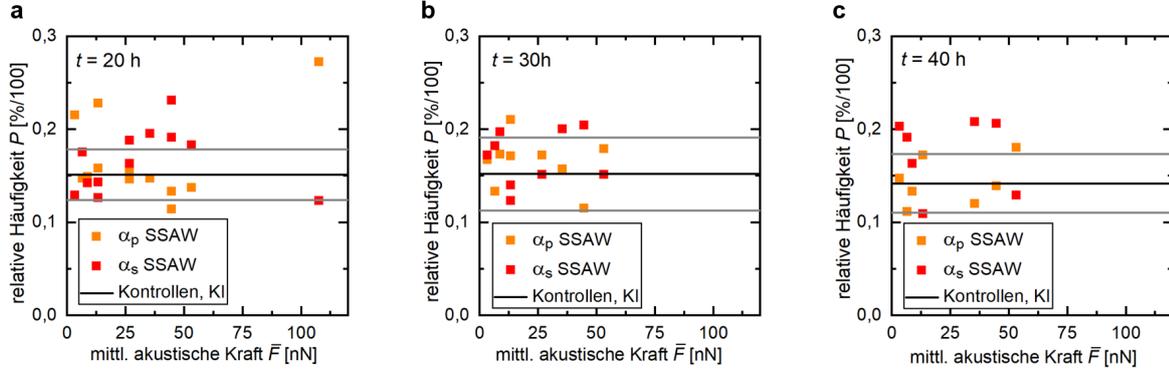


Abbildung A.3: Ergänzende Einzeldaten des SSAW-gerichteten Neuritenwachstums für die Richtungen α_p und α_s als Funktion der mittleren akustischen Kraft \bar{F} für die Zeitpunkte $t = 20$ h, 30 h, 40 h (modifiziert aus [25]): a) $t = 20$ h, b) $t = 30$ h, c) $t = 40$ h.

Zeit t [h]	Freiheitsgrade df	t_p	p_p	t_s	p_s
10	13	1,115	0,149	1,961	0,043
20	13	1,064	0,159	0,004	0,499
30	10	2,208	0,029	0,461	0,672
40	8	1,280	0,118	0,424	0,341

Tabelle 4: Parameter des hier durchgeführten einseitigen Zweistichproben-t-Tests auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$. Ergebnisse mit $p < \alpha$ sind signifikant.

A.3. Ergänzende Ergebnisse zu Abschnitt 4.3

Die folgenden Daten dienen zur Ergänzung des Abschnitt 4.3 zur Stimulation von Wundheilung in dynamisch modulierten akustischen Kraftfeldern. Hauptsächlich werden hier die Ergebnisse zur Charakterisierung des verwendeten Versuchsaufbaus dargestellt, wie die Messung der auf dem Chip auftretenden Temperaturen sowie der anhand von PIV-Messungen (Messmethodik vgl. 3.3) ermittelten akustischen Strömungen.

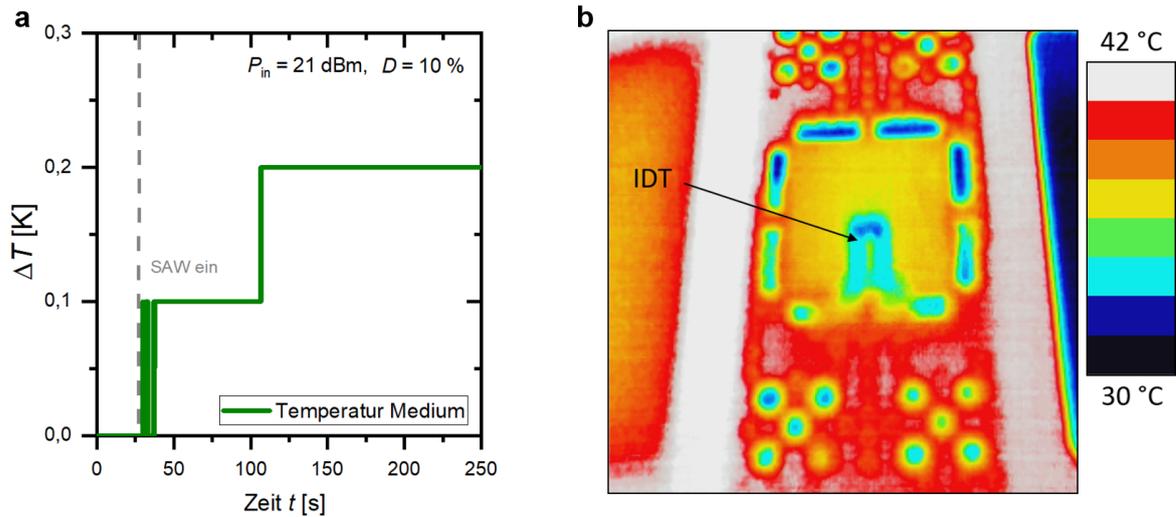


Abbildung A.4: Temperaturanalyse eines SAW-Chips betrieben mit der höchsten hier verwendeten Eingangsleistung ($P_{in} = 21$ dBm, $D = 10$ %). a) Temperaturänderung ΔT (gemessen mit einem PASCO-Tempersensur) als Funktion der Zeit in der PDMS-Kammer befüllt mit $V = 1$ ml Nährmedium, b) Wärmebild (aufgenommen mit einer Seek Shot ProTM-Kamera) von der Oberfläche des SAW-Chips im Mikroskop-Stage-Inkubator nach $t = 5$ min mit eingeschalteter SAW. Die rechts dargestellte Temperaturskala zeigt, dass die Temperatur auf dem Substrat homogen verteilt ist und bei $T = 37 \pm 0,5$ °C liegt.

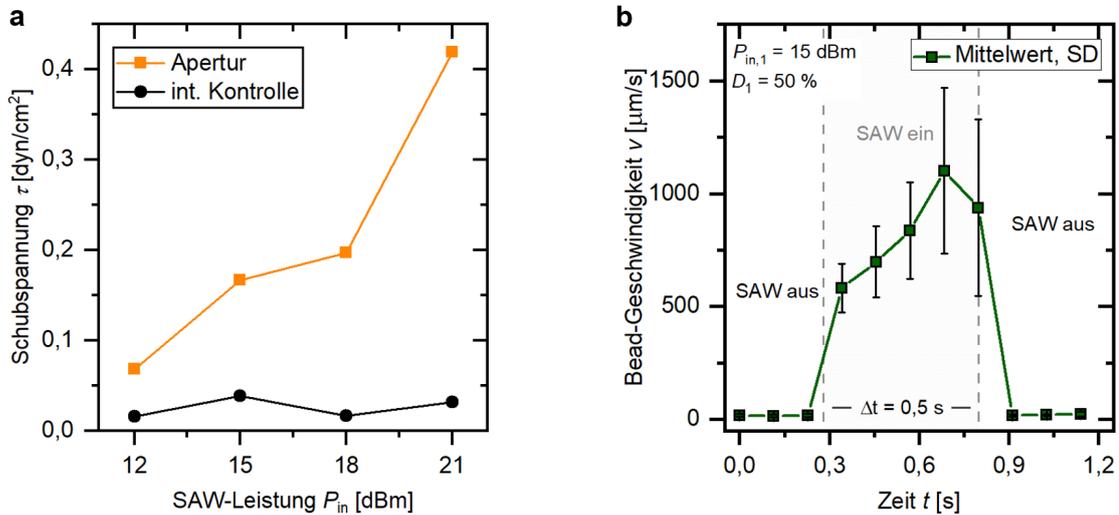


Abbildung A.5: Experimentelle Charakterisierung der akustischen Strömung auf den hier verwendeten SAW-Chips. a) Mittels *Particle Image Velocimetry* (PIV) gemessene Schubspannungen τ im Apertur- und internen Kontrollbereich als Funktion der am Chip angelegten SAW-Leistung P_{in} . Die Ergebnisse wurden unter Verwendung kontinuierlicher SAW-Signale gemessen; somit können die hier dargestellten Ergebnisse als die bei gepulsten Signalen maximal auftretende Schubspannungen τ_{max} interpretiert werden. b) Exemplarische mittlere Strömungsgeschwindigkeit $v(t)$ von Polystyrol-Mikrokügelchen (*Beads*) vor der Apertur eines SAW-Chips mit Eingangsleistung $P_{in} = 21$ dBm und Tastgrad $D = 50$ %.

A.4. Ergänzende Ergebnisse zu Abschnitt 4.4.1

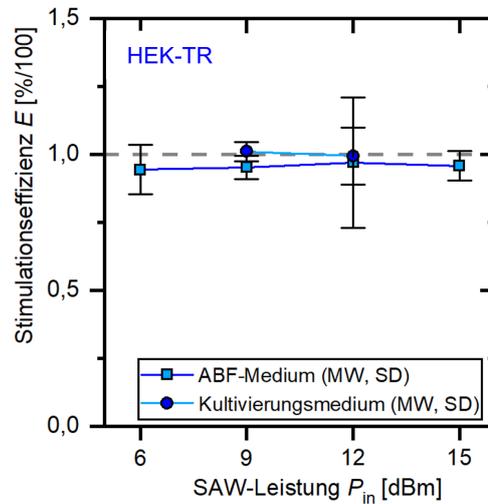


Abbildung A.6: Charakterisierung des Einflusses verschiedener Medienzusammensetzungen auf die Stimulierbarkeit von HEK-293-TR-Zellen bei verschiedenen SAW-Leistungen. Ein ANOVA-Test zeigt, dass zwischen $P_{in} = 9 - 12$ dBm kein signifikanter Unterschied zwischen den Stimulationseffizienzen mit Kultivierungsmedium und antibiotikafreiem Medium (ABF) vorliegt ($p = 0,970$).

A.5. Ergänzende Ergebnisse zu Abschnitt 4.4.2

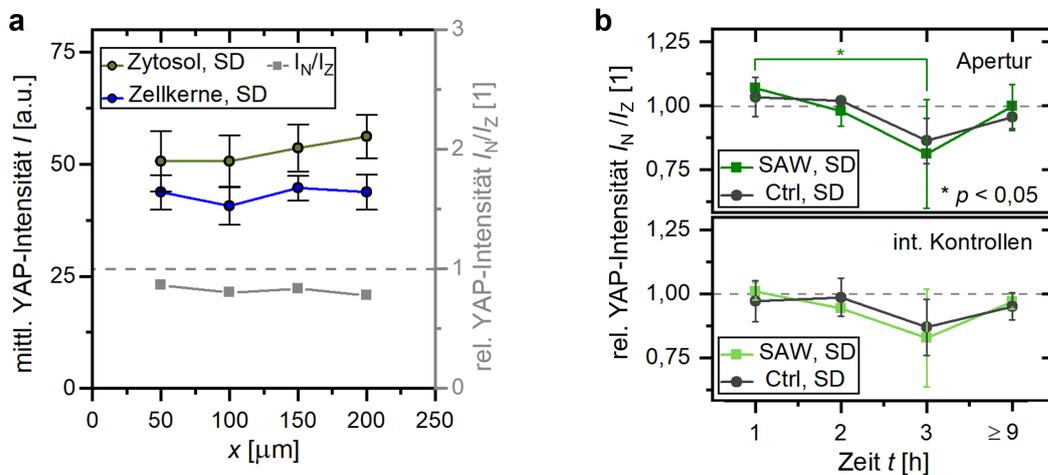


Abbildung A.7: Ergänzende Ergebnisse zur Evaluation der YAP-Intensitäten. a) Beispiel für einen Profil-Plot der YAP-Intensitätsrohwerte in den Zellkernen (I_N und im Zytosol (I_Z) für die Antikörper-Aufnahme in Abbildung 4.12a. Dabei wurden die mittleren Intensitäten I jeweils über Bildschnitte in x -Richtung mit Breite $\Delta x = 50 \mu\text{m}$ ermittelt und für jeden Wert zusätzlich die relative Intensität $I_{rel} = \frac{I_N}{I_Z}$ bestimmt. b) Ergebnisse der relativen YAP-Intensität für die Zeitschritte $t = 1$ h, $t = 2$ h und $t = 9-21$ h als Ergänzung zu $t = 3$ h, wobei die ergänzenden Ergebnisse auf Epifluoreszenz- statt Konfokalaufnahmen basieren. Die dargestellten Mittelwerte repräsentieren jeweils $N = 3$ unabhängige Proben ($N = 2$ für 9 dBm bei $t_{eq} 9$ h). Ein unabhängiger Stichproben-t-Test wurde auf $\alpha = 0,05$ durchgeführt, um Signifikanz zu prüfen.)

Protein	t_1, t_2	Probentyp	Region (1, 2)	N_1	N_2	df	Normalvert.	Varianzhomog.	p
MRTF	3h	Ctrl, SAW	int. Kontrolle	3	3	4	ja	ja	0,025
MRTF	3h	Ctrl	int. Kontrolle, Apertur	3	3	4	ja	ja	0,765
MRTF	3h	Ctrl, SAW	Apertur	3	3	4	ja	ja	0,242
MRTF	3h	SAW	int. Kontrolle, Apertur	3	3	4	ja	ja	0,242
Notch	3h	SAW	int. Kontrolle, Apertur	3	3	4	ja	ja	0,789
Notch	3h	Ctrl	int. Kontrolle, Apertur	3	3	4	ja	ja	0,488
Notch	3h	Ctrl, SAW	Apertur	3	3	4	ja	ja	0,452
Notch	3h	Ctrl, SAW	int. Kontrolle	3	3	4	ja	ja	0,227
YAP	3h	SAW	int. Kontrolle, Apertur	3	3	4	ja	ja	0,904
YAP	3h	Ctrl	int. Kontrolle, Apertur	3	3	4	ja	ja	0,927
YAP	3h	Ctrl, SAW	Apertur	3	3	4	ja	ja	0,47
YAP	3h	Ctrl, SAW	int. Kontrolle	3	3	4	ja	ja	0,309
YAP	1h, 3h	SAW	Apertur	4	3	5	ja	ja	0,016
YAP	1h, 3h	Ctrl	Apertur	2	3	3	ja	NaN	0,068
YAP	1h, 3h	SAW	int. Kontrolle	4	3	5	ja	ja	0,07
YAP	2h, 3h	Ctrl	Apertur	2	3	3	ja	NaN	0,05
YAP	2h, 3h	SAW	Apertur	4	3	5	ja	ja	0,052
YAP	2h, 3h	SAW	int. Kontrolle	4	3	5	ja	ja	0,07
YAP	1h, 3h	Ctrl	int. Kontrolle	2	3	3	ja	NaN	0,282
YAP	2h, 3h	Ctrl	int. Kontrolle	2	3	3	ja	NaN	0,229
YAP	3h, 9h	Ctrl	Apertur	3	3	4	ja	ja	0,084
YAP	3h, 9h	Ctrl	int. Kontrolle	3	3	4	ja	ja	0,342
YAP	3h, 9h	SAW	Apertur	3	2	3	ja	NaN	0,123
YAP	3h, 9h	SAW	int. Kontrolle	3	2	3	ja	NaN	0,159

Abbildung A.8: Zusammenfassung der Post-hoc-Signifikanztests zu den Ergebnissen in Abbildung 4.12e und A.7b. Ein klassischer ANOVA-Test zeigte Signifikanz für die Intensitätsanalyse von YAP, MRTF und Notch auf einem Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ mit $p = 0,002$. Post-hoc wurde ein t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich aller in der Tabelle gezeigten Datenpaare (1,2) durchgeführt.

A.6. Ergänzende Ergebnisse zu Abschnitt 4.4.3

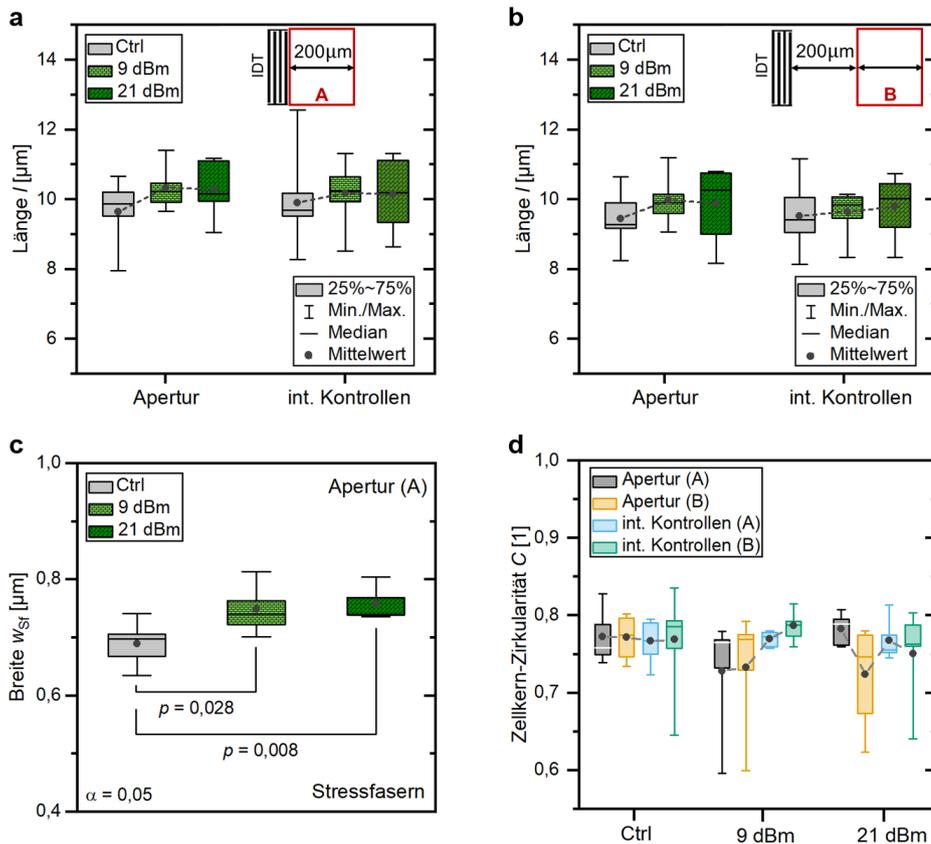


Abbildung A.9: Ergänzende Ergebnisse zu den Aktin- und Zellkerneigenschaften. a) Filamentbündel-Länge l für die IDT-nahe Region A, b) entsprechende Länge l für die IDT-fernere Region B, c) Breite w_{SF} der detektierten Stressfaserbündel im Bereich des Zellkerns für die Aperturbereiche aller Proben. Ein klassischer ANOVA-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede für die Daten in a), b) und d) ($N = 5$). Ein unabhängiger Stichproben-t-Test wurde für c) mit $\alpha = 0,05$ durchgeführt ($N = 5$). SAW-Proben wurden bei $P_{in} = 9$ dBm behandelt.

Bildtyp	α_1, α_2	Probentyp (1,2)	Region (1,2)	N_1	N_2	df	Normalvert.	Varianzhom.	Anova	p
Zellkerne	p, d	Ctrl	Apertur	5	5	8	ja	ja	0,007	0,028
Zellkerne	p, s	Ctrl	Apertur	5	5	8	ja	ja	0,007	0,007
Zellkerne	p, d	9 dBm	Apertur	5	5	8	ja	ja	< 0,001	0,005
Zellkerne	p, s	9 dBm	Apertur	5	5	8	ja	ja	< 0,001	< 0,001
Zellkerne	p, d	21 dBm	Apertur	5	5	8	ja	ja	< 0,001	< 0,001
Zellkerne	p, s	21 dBm	Apertur	5	5	8	ja	ja	< 0,001	< 0,001
Zellkerne	d, s	21 dBm	Apertur	5	5	8	ja	ja	< 0,001	0,001
Zellkerne	p, d	9 dBm	int. Kontrollen	5	5	8	ja	ja	< 0,001	0,011
Zellkerne	p, s	9 dBm	int. Kontrollen	5	5	8	ja	ja	< 0,001	< 0,001
Zellkerne	d, s	9 dBm	int. Kontrollen	5	5	8	ja	ja	< 0,001	0,033
Filamente	p, d	9 dBm	Apertur	5	5	8	ja	ja	< 0,001	0,006
Filamente	p, s	9 dBm	Apertur	5	5	8	ja	ja	< 0,001	< 0,001
Filamente	p, d	21 dBm	Apertur	5	5	8	ja	ja	< 0,001	0,004
Filamente	p, s	21 dBm	Apertur	5	5	8	ja	ja	< 0,001	< 0,001
Filamente	p, s	9 dBm	int. Kontrollen	5	5	8	ja	ja	< 0,001	0,002

Abbildung A.10: Zusammenfassung aller signifikanten Ergebnisse in Abbildung 4.14. Post-hoc wurde ein Tukey-t-Test für unabhängige Stichproben zum Vergleich der in der Tabelle gezeigten Datenpaare (α_1, α_2) durchgeführt.

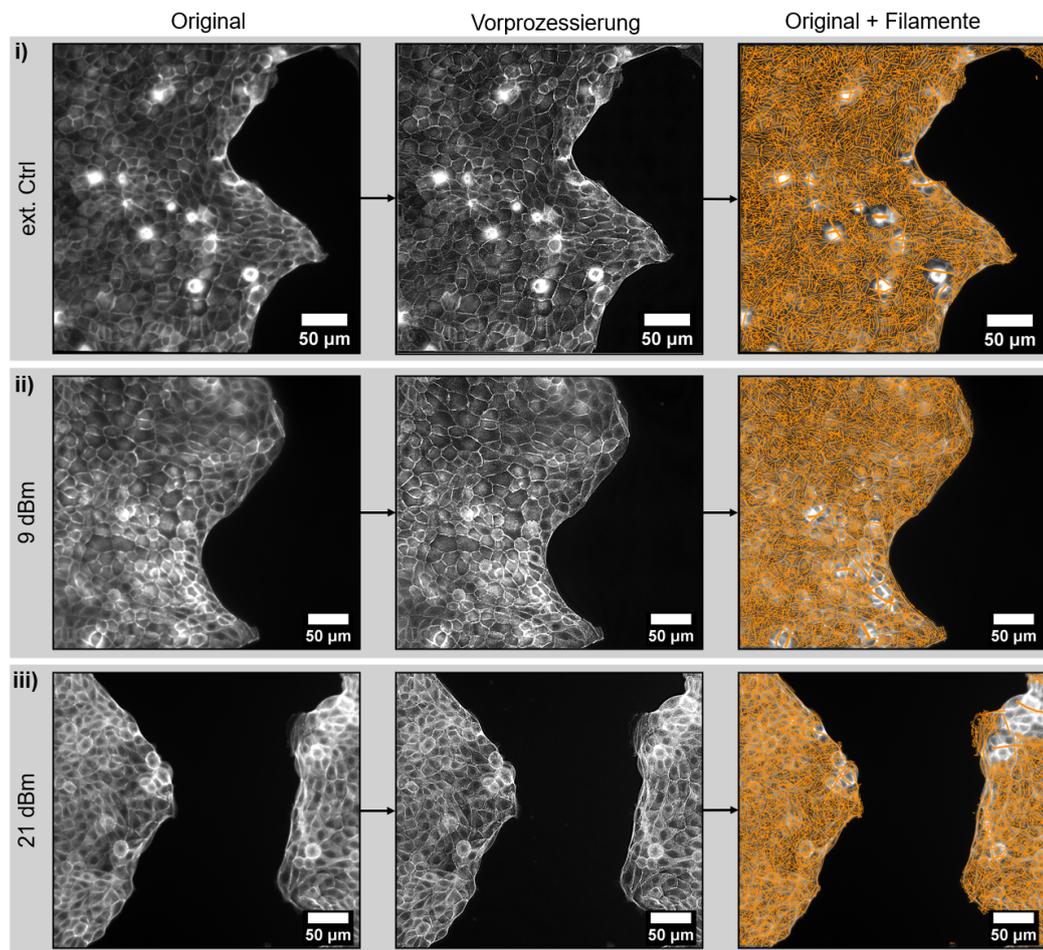


Abbildung A.11: Aufnahmen des Aktin-Zytoskeletts, ihrer Vorprozessierung und Filamentdetektion in exemplarischen Aperturbereichen der hier analysierten drei Probentypen i) externen Kontrollproben, ii) SAW-stimulierten Proben, iii) Hochkontrollen.

Bildtyp	t_1, t_2	Probentyp	α_1, α_2	N_1	N_2	df	Normalvert.	Varianzhom.	p
Filamente	3h	Ctrl	p, s	6	6	10	ja	ja	0,042
Filamente	3h	Ctrl	s, d	6	6	10	ja	ja	0,014
Filamente	3h	SAW	s, p	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Filamente	3h	SAW	s, d	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Filamente	3h, 18h	SAW	p	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Filamente	3h, 18h	SAW	d	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Filamente	3h, 18h	SAW	s	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Filamente	18h	SAW	p, d	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Filamente	18h	SAW	p, s	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Filamente	3h, 18h	Ctrl	p	6	5	9	ja	ja	0,159
Filamente	3h, 18h	Ctrl	d	6	5	9	ja	no	0,247
Filamente	3h, 18h	Ctrl	s	6	5	9	ja	ja	0,09
Filamente	18h	Ctrl	p, d	5	5	8	ja	ja	0,144
Filamente	18h	Ctrl	p, s	5	5	8	ja	ja	0,258
Zellkerne	3h	SAW	s, p	6	6	10	ja	ja	0,002
Zellkerne	3h	SAW	s, d	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Zellkerne	3h, 18h	Ctrl	p	6	5	9	ja	ja	0,01
Zellkerne	3h, 18h	Ctrl	s	6	5	9	ja	ja	0,05
Zellkerne	3h, 18h	SAW	p	6	6	10	ja	ja	0,001
Zellkerne	3h, 18h	SAW	s	6	6	10	ja	ja	0,001
Zellkerne	18h	Ctrl	p, d	5	5	8	ja	ja	0,009
Zellkerne	18h	Ctrl	p, s	5	5	8	ja	ja	0,011
Zellkerne	18h	SAW	p, d	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Zellkerne	18h	SAW	p, s	6	6	10	ja	ja	< 0,001
Zellkerne	3h	Ctrl	s, p	6	6	10	ja	ja	0,066
Zellkerne	3h	Ctrl	s, d	6	6	10	ja	ja	0,213
Zellkerne	3h, 18h	Ctrl	d	6	5	9	ja	ja	0,335
Zellkerne	3h, 18h	SAW	d	6	6	10	ja	ja	0,056

Abbildung A.12: Zusammenfassung der Post-hoc-Signifikanztests zu den Ergebnissen in Abbildung 4.16a und c. Ein klassischer ANOVA-Test ergab sowohl für die Kern- als auch für die Filamentausrichtung einen Wert von $p < 0,001$. Post-hoc wurde die Signifikanz einzeln mit t-Tests für unabhängige Stichproben (Student's t-Test) für die Datenpaare (1, 2) geprüft, wie in der Tabelle aufgeführt. Für inhomogene Varianzen wurde ein Mann-Whitney-U-Test angewendet.

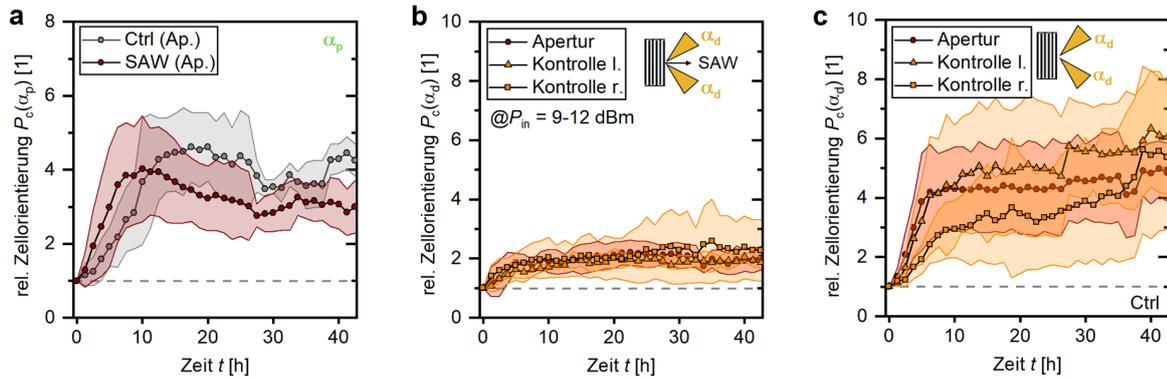


Abbildung A.13: Relative Zellorientierungen P_c parallel (α_p) und diagonal (α_d) zur SAW-Ausbreitungsrichtung, ermittelt mittels OrientationJ aus Phasenkontrast-Videos von Wundheilungsprozessen, die bei $P_{in} = 9-12$ dBm stimuliert wurden und Kontrollproben (*Ctrl*) ohne direkten SAW-Einfluss [1]. a) Vergleich der Zellorientierung $P_c(\alpha_p)$ parallel zur SAW-Propagationsachse in den Aperturbereichen von SAW- und Kontrollproben, b) Vergleich der Zellorientierung $P_c(\alpha_d)$ in SAW-Proben (Apertur- und interne Kontrollbereiche), c) entsprechende Orientierung der Zellen $P_c(\alpha_d)$ in Kontrollproben ohne SAW.

B. Reagenzien und Materialien

Insbesondere unter Kapitel 3 wurden Abkürzungen für Hersteller und Zulieferer im Text verwendet, die im Folgenden alphabetisch aufgeführt sind:

Abkürzung	Zulieferer/Hersteller
AT	ATCC LGC Standards GmbH, Wesel, DE
BC	Biochrom GmbH, Berlin, DE
BE	BANDELIN Electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
BO	BOC Edwards, Guildford, GB
BS	Bio&SELL GmbH, Nürnberg, DE
CB	CB160, Stuart, Staffordshire, UK
CE	Cetoni GmbH, Korbußen, DE
CR	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
CZ	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
HB	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH
HP	Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching am Ammersee, DE
IB	ibidi GmbH, Gräfelfing, DE
KO	Kurt Obermeier GmbH & Co. KG, Bad Berleburg, DE
LE	Ludl Electronic Products Ltd., Hawthorne, New York, US
LM	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE
LO	LOTUS Systems GmbH, Immendingen, DE
MC	MicroChemicals GmbH, Ulm, DE
MP	Merck Performance Materials GmbH, Wiesbaden, DE
MV	Mavom GmbH, Steinfurt, DE
OL	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, DE
PH	Photron Deutschland GmbH, Reutigen, DE
PM	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
PS	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg, DE
RI	The Roditi International Co. Ltd., London, GB
RS	Rohde & Schwarz, München, DE
SA	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE
SM	SÜSS MicroTec Lithography GmbH, Garching, DE
ST	SmartForce Technologies MICROLIGHT 3D, La Tronche, FR
TB	Takara Bio USA Inc., Kalifornien, US
TF	ThermoFisher Scientific Inc., Bremen, DE
TP	Technics Plasma GmbH, Kirchheim, DE

Details zu den verwendeten Reagenzien und Materialien sind im Folgenden aufgeführt:

Bezeichnung	Katalognummer	Zulieferer/Hersteller
HAEC-Zellen		
HAEC-Zelllinie (Gibco™)	C0065C	TF
Human Large Vessel Endothelial Cell Basal Medium (Invitrogen™)	M-200-500	TF
LVES-Supplement	A1460801	TF
Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %)	L2143	BC
Trypsin Neutralizer Solution (Gibco™)	R-002-100	TF
Kollagen Typ I	50201	IB
B35-Zellen		
B35-Zelllinie	CRL-2754	AT
Poly-L-Lysin-Lösung	P8920	SA
DMEM	30-2002	AT
FBS Superior stabil®	0615	BS
Penicillin-Streptomycin	P4333	SA
Accutase®-Lösung	A6964	SA
DcAMP	28745-M	SA
MDCK-Zellen		
MDCK-Zelllinie	00062107	SA
MEM mit Earle's Salzen	M0325	SA
FBS Superior stabil®	0615	BS
Penicillin-Streptomycin	P4333	SA
Trypsin-EDTA-Lösung (0,25 %)	T4049	SA
Phalloidin-Atto 488	49409	SA
16 % Formaldehyd (methanolfrei)	28908	TF
Bovines Serumalbumin	9048-46-8	SA
NucBlue™ Live Ready Probes™ (Invitrogen™)	R37605	TF
Triton™ X-100	T8787	SA
HEK-293-Zellen		
HEK-T-REx™-Zelllinie (Invitrogen™)	R71007	TF
GlutaMAX™ (Gibco™)	61965-026	TF
L-Glutamin	25030-024	TF
Penicillin-Streptomycin (Gibco™)	15070063	TF
Fetal Bovine Serum (FBS)	F7524	SA
Blasticidin (Gibco™)	R21001	TF
Zeocin™ Selection Reagent (Gibco™)	R25001	TF
Doxycyclin	631311	TB

Bezeichnung	Katalognummer	Zulieferer/Hersteller
Mikroskop-Zubehör		
Zeiss Axiovert 200M	k.A.	CZ
Leica Stellaris 5 Konfokal-Mikroskop	k.A.	LM
Zeiss Axio Observer 7	k.A.	CZ
UCPlanFL N 20x-Objektiv	k.A.	OL
Photron FASTCAM Mini UX50	k.A.	PH
Orca 5G CMOS-Kamera	k.A.	HP
motorisierter Mikroskopisch SCAN IM 120x100	k.A.	LE
Stage Top Incubation System, Multiwell Plates, K-Frame, Co2/O2, Blue Line	10726	IB
SAW-Chip-Herstellung		
LiNbO ₃ -Substrate ($l \times b \times d = 17,5 \times 17,5 \times 0,5$ mm)	k.A.	RI
AZ-Mir 701 Photoresist (Fotolack)	k.A.	MC
AZ MIF 726 Developer (Entwickler)	k.A.	MP
Lackschleuder DELTA 10 BM	k.A.	SM
Flowbox	k.A.	LO
Heizplatte CB160	k.A.	CB
Smartprint	k.A.	ST
ESTHER Auto 500 Thin Film Coating System	k.A.	BO
Standard Mask Aligner MJB 3	k.A.	SM
Ultraschallbad Sonorex Super 10 P	k.A.	BE
Plasmaätzer LabAsh 100E	k.A.	TP
Sonstiges		
Culture Inserts	80209	IB
Sylgard 184 Silicone Elastomer (PDMS)	k.A.	MV
Polybead® Microspheres 3.00 µm	17134-15	PS
OptiPrep™ Dichtegradientenmedium	D1556	SA
Korasilon® Paste, hochviskos	0857.1	KO/CR

Die Zellkulturmedien setzen sich wie folgt zusammen:

1. **HAEC-Medium:** Basalmedium mit 10 % LVES
2. **B35-Medium:** DMEM mit 10 % FBS, 1 % Pen/Strep
3. **MDCK-II-Medium:** MEM mit 10 % FBS, 1 % Pen/Strep
4. **HEK-Medium (ABF):** GlutaMAXTM mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin (ABF: antibiotikafrei)
5. **HEK-TR- und HEK-KO-Medium:** GlutaMAXTM mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, 5 µg/ml Blastocidin
6. **HEK-WT- und HEK-D/A-Medium:** GlutaMAXTM mit 10 % FBS, 1 % L-Glutamin, 1 % Pen/Strep, 5 µg/ml Blastocidin, 200 µg/ml Zeocin (die Messungen erfolgen bei allen HEK-Zellen unter Präsenz von 1 µg/ml Doxycyclin im Medium)

C. Protokolle

C.1. Protokoll zur Herstellung von SAW-Chips

Die folgende Protokollierung der Schritte zur Herstellung von SAW-Chips mittels Fotolithografie ist an den Vorerfahrungen von bzw. der Einarbeitung durch Dr. Manuel Brugger und Dr. Lukas Schnitzler orientiert. Details zu Herstellerangaben der verwendeten Materialien sind unter Anhang B zu finden.

Belichtung der IDT-Strukturen

Bei allen im Folgenden aufgeführten Schritten zur Reinigung, Belackung und Belichtung der Substrate dürfen die Chips mit der Pinzette nur an den Seitenrändern gegriffen werden. Alle Schritte finden im Reinraum statt.

1. Markierung der SAW-Ausbreitungsrichtung mittels Diamant-Stift
2. Ablösung der Substrate von der Folie und Spülen mit Aceton
3. Reinigung der Substrate in Aceton für 5 min bei 100 % im Ultraschallbad
4. Abspülen der Substrate mit Isopropanol
5. Reinigung der Substrate in Isopropanol für 5 min bei 100 % im Ultraschallbad
6. Trocknen mit Stickstoff, Ablegen auf Reinraumbuch und Abdecken mit sauberer Glasschale
7. Vorbereitung des Fotolacks: Abfüllen von frischem Lack aus Vorratsbehälter (AZ-Mir 701 Photoresist) in 5 ml-Glas
8. Ausrichtung des Substrats auf Drehteller des *Spin Coaters* und Aufbringen des Fotolacks (durch Tropfen von außen nach innen) bis zur kompletten Benetzung
9. Starten der Lackschleuder (erst: 500 rpm, Rampe 5, 5 s, dann: 5000 rpm, Rampe 9, 30 s)
10. Reinigung der Unterseite der Substrate auf mit Aceton getränktem Reinraumbuch
11. Vorbacken auf Heizplatte (direkt nach Coating) für 1,5 min bei $T = 90^\circ$
12. Abkühlen auf Reinraumbuch unter Glasschale
13. Befestigung der Maske im Maskaligner
14. Ausrichtung der Chips im Maskaligner
15. Belichtung im Maskaligner (15 s)

16. Nachbacken auf Heizplatte für 1 min bei $T = 110^\circ$
17. Abkühlung auf Reinraumbuch unter Glasschale
18. Entwicklung (AZ 726 Developer: 1,5 min, dest. Wasser: 20 s, danach Trocknen mit Stickstoff)

Metallisierung mittels Elektronenstrahlverdampfung

Alle folgenden Schritte bis auf die Plasmareinigung und die Vermessung der Chips finden im Reinraum statt.

1. Plasmareinigung der belackten Substrate
2. Elektronenstrahlverdampfungsanlage (ESTHER): Reinigung der Halterungsplatten, Montierung der Chips auf den Halterungen
3. Reinigung der Anlage, Kontrolle der Tiegel (Gold und Titan), Montierung der Halterungen mit den Chips in der ESTHER und Abpumpen der Anlage gemäß Benutzeranleitung
4. Durchführung des Aufdampfungsprozesses streng nach Benutzeranleitung der ESTHER in der Reihenfolge: 1) 10 nm Titan bei 1 \AA/s , 2) 50 nm Gold bei 1 \AA/s , 3) 10 nm Titan bei 1 \AA/s
5. Belüften der Anlage, Ausbau der Halterungen, Abpumpen nach Benutzeranleitung
6. Lift-Off: Einlegen der Substrate in Bechergläser mit DMSO (D351) über Nacht
7. Herausnehmen des Substrats, wobei DMSO auf der Oberfläche bleibt, und Überführung in ein Becherglas mit frischem DMSO
8. Entfernen der überschüssigen Metallschicht im Ultraschallbad bei 40 % für 2 min
9. Überführung in zweites Becherglas mit frischem DMSO, erneute Behandlung im Ultraschallbad
10. Überführung in drittes Becherglas mit dest. Wasser und erneute Behandlung im Ultraschallbad
11. Abspülen des Substrats mit Isopropanol, Trocknen mit Stickstoff
12. Optische Kontrolle auf Metallrückstände, ggf. Wiederholung der Lift-Off-Schritte ab 7.
13. Prüfung der Chipfunktion und der Resonanzfrequenz durch Vermessung am Network Analyzer

Aufbringen einer Schutzschicht durch thermisches Verdampfen

Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurden die folgenden Schritte an der ESTHER ersetzt durch Besputterung der Chips, durchgeführt durch Andreas Spörhase bzw. Dr. Andreas Hörner an der Sputteranlage des Lehrstuhls für Experimentalphysik IV. Alle folgenden Schritte wurden im Reinraum durchgeführt.

1. Reinigung der SAW-Chips mit Isopropanol im Ultraschallbad bei 40 % für 2 min und Trocknen mit Stickstoff
2. Reinigung im Plasma bzw. LabAsh (800 W für 5 min)
3. Abdeckung der Kontaktstellen der IDTs auf den Chips mit Alufolie und Montierung der Chips auf Probenhalterung
4. ESTHER: Ausbau der Blende, Reinigung der Anlage
5. Überprüfung des Vorrats an SiO im Schiffchen
6. Einbau der Probenhalterungen in ESTHER und Abpumpen nach Benutzeranleitung
7. Thermisches Verdampfen des SiO nach Benutzeranleitung für eine 200 nm-Schicht: Rate ca. $1,2 \text{ \AA/s}$, $I = 50\text{-}60 \text{ A}$, Dauer ca. 40 min
8. Ausbau der Proben und ggf. Schichtdickenmessung als Kontrolle

C.2. Protokoll zur Zellpassage und Zellzählung

Die im Folgenden beschriebenen Schritte zur Zellpassage und Zellzählung sind unter Variation der Ablöselösung und der Inkubationszeiten, die spezifisch für jede Zelllinie unter 3.2 angegeben sind, auf alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien übertragbar.

1. Vorwärmen aller Reagenzien (Zellkulturmedium, Ablöselösung und PBS) im Wärmebad auf 37°C
2. Desinfektion aller Materialien und Auswischen der Sterilwerkbank mit 70 % Ethanol (30 % dH₂O)
3. Entnahme des alten Zellkulturmediums aus der Zellkulturflasche mittels einer serologischen Pipette unter der Sterilwerkbank
4. Zweimaliges Spülen des Zellrasens mit 3 ml PBS
5. Inkubation der Zellen mit 1 ml 0,25 % Trypsin/EDTA im Inkubator für 8-10 min
6. Ablösen der Zellen durch Schwenken der Flasche und Resuspension mit 4 ml frischem Zellkulturmedium unter der Sterilwerkbank

7. Überführung von 250 µl der Zellsuspension in eine mit 5 ml frischem Zellkulturmedium befüllte neue Zellkulturflasche (entspricht Verhältnis 1:20) zur Fortführung der Stammkultur
8. Pipettieren von 250 µl der restlichen Zellsuspension in ein Eppendorf-Tube zur Zellzählung und Überführung der verbliebenen Suspension (ca. 4,5 ml) in ein Zentrifugenröhrchen
9. Abzentrifugieren der Zellsuspension für 7 min bei 180 g, währenddessen Bestimmung der Zellanzahl im Zentrifugenröhrchen mittels einer Neubauer Zellzählkammer (durch Auszählen der Zellen in den Quadranten der Kammer mit 0,1 µl pro Quadrant)
10. Abpipettieren des durch Zentrifugieren entstandenen Überstands im Zentrifugenröhrchen, anschließend Resuspension des Zellpellets mit frischem Zellkulturmedium (Volumen je nach Zielzellichte für das Experiment wählbar, basierend auf der im vorherigen Schritt bestimmte Zellanzahl)
11. Zugabe der Zellsuspension in den jeweiligen Versuchsaufbau (z.B. jeweils 100 µl pro Kammer der Culture Inserts für Wundheilungsassays bei einer im vorherigen Schritt eingestellten Zelldichte von 8×10^5 c/ml)
12. Aufräumen und Auswischen der Sterilwerkbank mit 70/30-Ethanol

C.3. Protokoll zur Vorbereitung und Durchführung von SAW-gestütztem Zell-Patterning

Die Methodik zum SAW-gestützten Zellpatterning geht der in dieser Arbeit durchgeführten Neuritenanalyse voran und soll hier schrittweise beschrieben werden:

Vorbereitung des Aufbaus:

1. Testen der Funktionsfähigkeit mittels NWA und ggf. Nachkontaktierung der Chips
2. Reinigung der Chips mit Isopropanol und dH₂O, Desinfektion mit 70/30-Ethanol
3. Inkubation der Chips unter der Sterilbank mit 100 µl PLL auf der reaktiven Fläche (Vorratslösung verdünnt auf 1 µl/ml) für 1 h
4. Abspülen der Chips mit PBS und Nährmedium, Trocknen mit Stickstoff
5. Aufbringen der Mikrokanäle auf die SAW-Chips, Verschrauben des Aufbaus mit der Polystyrol-Schiene und Abdichtung mit Silikon-Paste
6. Sterilisation der zusammengebauten Chips unter UV-Licht für ca. 1 h

Befüllung des Mikrokanals mit Medium und Zellsuspension:

1. Aufziehen von vorgewärmtem Zellkulturmedium in eine vorgereinigte 250 μl -Hamilton-Spritze unter Vermeidung von Lufteinschlüssen
2. Befestigung der Spritze und einem ca. 30 cm langen Schlauch in der Nemesys-Spritzenpumpe und Befüllung des Schlauchs mit Medium
3. Befestigung des Schlauchs im Einlass des Mikrokanals und Kanalbefüllung mit einer Flussrate von $Q = 0,5 \mu\text{l/s}$
4. Zugabe von 1 ml Medium in das Reservoir der Polystyrol-Schiene und Inkubation des Chips im Inkubator während der Zellpassage
5. Inkubation der mit Medium befüllten Proben bei 37°C , währenddessen Zellpassage gemäß Anhang C.2 und 3.2.2
6. Nach Resuspension der zentrifugierten B35-Zellen: Filterung der Zellsuspension zur Vermeidung von Zellaggregaten mit einem sterilen $20 \mu\text{m}$ -Filter
7. Aufziehen der gefilterten Zellsuspension bei $Q = 0,1 \mu\text{l/s}$ bis zu einem Volumen von ca. $10 \mu\text{l}$
8. Anschließen eines Chips an den Multifunktionsgenerator bei zunächst ausgeschalteter SAW, dann Durchdrücken der Zellsuspension mit der Spritzenpumpe durch den Kanal (ein paar Sekunden bei $Q = 0,05 \mu\text{l/s}$, dann mit $0,005 \mu\text{l/s}$)
9. Zum Patterning der Zellen: Einschalten eines 2D-SAW-Stehwellenfelds bei $P_{\text{in}} = 18 \text{ dBm}$ und Stoppen der Flussrate
10. Ausschalten des Stehwellenfeldes nach ca. 30 s (erste Adhäsion der Zellen in Knotenpunkten erreicht) und Schritte 7.-9. wiederholen, bis Mindestzahl an gefangenen Zellen (≥ 50) erreicht
11. Nach weiteren 3-5 min Adhäsionszeit: Herausziehen des Schlauchs aus dem Einlass, dann zur vollständigen Adhäsion der Zellen Inkubation der Probe im Inkubator für ca. 4 h vor Start des Experiments bzw. vor Zugabe von DcAMP

C.4. Protokoll zur Durchführung und Auswertung von Wundheilungsassays auf SAW-Chips

Die Realisierung von Wundheilungsassays auf SAW-Chips folgt der gleichen Vorgehensweise für alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien. Allein die initial eingestellten Zelldichten beim Befüllen der Culture Inserts unterscheiden sich wie im Folgenden vermerkt.

Vorbereitung des Aufbaus:

1. Testen der Funktionsfähigkeit der SAW-Chips mittels NWA, ggf. Nachkontaktieren der Chips
2. Reinigung der Chips und der PDMS-Kammern durch Abspülen mit dH₂O und Isopropanol, Desinfektion mit 70/30-Ethanol
3. Aufbringen der Culture Inserts auf die Chips am Mikroskop
4. Aufbringen und Abdichten der PDMS-Kammern mit Silikon-Paste unter der Sterilwerkbank
5. Sterilisation der Chips unter UV-Licht für ca. 1 h

Befüllung der Wundheilungsassays mit Zellen:

1. Passagieren und Einstellung der Zelldichte gemäß Anhang C.2
2. Überführung von 100 µl der Zellsuspension in jede Kammer der Culture Inserts mit standardmäßig eingestellter Zelldichte von $\rho = 8 \times 10^5$ c/ml (MDCK-II-, HEK-TR- und HEK-KO-Zellen) bzw. $\rho = 12 \times 10^5$ c/ml (HEK-WT- und HEK-D/A-Zellen)
3. Inkubation der Proben für ca. 1 h im Inkubator zur Adhäsion der Zellen auf dem Substrat
4. Zugabe von 1 ml frischem Zellkulturmedium in die PDMS-Kammern und weitere Inkubation über Nacht (20-24 h) bis zur Bildung eines konfluenten Zellrasens
5. Abpipettieren des Mediums aus der PDMS-Kammer und Entfernen der Culture Inserts durch schnelles Abziehen vom Substrat mit einer Pinzette
6. Viermaliges Spülen der Wunde mit 1 ml vorgewärmtem PBS, dann Zugabe von 1 ml frischem Medium und optische Kontrolle der Wundqualität am Mikroskop

Schritte zur Durchführung von Live Cell Imaging des Wundheilungsprozesses:

1. Anschließen von vier SAW-Chips an den Multifunktionsgenerator im Stageinkubator auf dem Mikroskop Zeiss Axiovert 200M
2. Pipettieren von weiteren 0,5 ml frischem Zellkulturmedium sowie 250 µl Anti-Evaporationsöl auf jede Probe, dann Einschalten aller Geräte (Stage, Stageinkubator, Mikroskop, Generator)
3. Testen der Funktionsfähigkeit und Bestimmung der Resonanzfrequenz aller Chips durch NWA-Messung
4. Einstellen der Resonanzfrequenz und der gewünschten SAW-Parameter am Generator, Einschalten des SAW-Signals

5. Einstellung des Scans: Erstellung aller View-Felder in HCIImage (9 aneinandergereihte überlappende Bilder pro Wunde), Verbindung aller Felder mit der Path-Funktion
6. Starten des Scans mit bestimmter zeitlicher Abtastrate (standardmäßig ein Scan pro 30 min)

Schritte zur Bestimmung der Wundheilungsgeschwindigkeit mit NeuCED:

1. Halbautomatisiertes Zusammensetzen der Einzelbilder eines exemplarischen einzelnen Scans mithilfe eines Matlab-Skriptes (übernommen von Dr. Manuel Brugger) und Erstellung einer Positionsliste
2. Automatisierte Zusammensetzung aller Scans (anhand der Positionsliste) zu einer zeit-aufgelösten Bildsequenz aller Wunden mithilfe eines Python-Skriptes
3. Halb-automatisierte Vorprozessierung der Bilder für NeuCED: Umwandlung in RGB-Format und Halbierung der Pixelanzahl, Erstellung der Bildausschnitte der mit NeuCED zu analysierenden ROIs (*regions of interest*) mithilfe eines ImageJ-Macros (standardmäßig: Apertur, Kontrolle links, Kontrolle rechts)
4. Automatisierte neuronale Bilderkennung und Binarisierung mit NeuCED aller ROIs: Ausführung des Programms *process_images.py* über die Anaconda-Prompt
5. Ausführung des Programms *cell_evaluation.py* zur automatisierten Erstellung der linearen Fits und Ausgabe der Fitparameter zur Bestimmung der Wundheilungsgeschwindigkeit pro ROI

Anmerkung: Aus Effizienzgründen und zum Einsparen von Speicherplatz werden in dieser Arbeit standardmäßig nur die einzelnen ROIs entlang der Wunde binarisiert. Mit NeuCED können prinzipiell aber auch die gesamten Scans der Wunde automatisch binarisiert werden.

C.5. Protokoll zur Markierung von Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen zur Detektion von F-Aktin und Zellkernen

Das folgende Protokoll ist hier am Beispiel von Wundheilungsassays beschrieben, lässt sich jedoch auf andere Versuchsaufbauten unter Änderung der angegebenen Flüssigkeitsvolumina übertragen (beispielsweise aufgrund der kleineren PDMS-Kammern Standardvolumen von 100 μl für den *Aorta-on-a-chip*-Aufbau statt 500 μl). Der Ablauf der einzelnen Schritte bleibt erhalten und ist an den Herstellerangaben orientiert.

1. Inkubation des Wundheilungsassays mit 500 μl einer 4%igen Formaldehyd-Lösung für 15 min im Kühlschrank zur Fixierung der Zellen (unmittelbar nach SAW-Behandlung)
2. Dreimaliges Spülen der Probe mit 500 μl PBS

3. Inkubation der Probe mit 500 μ l 0,5 % Triton X-100 bei RT für 10 min,
4. Dreimaliges Spülen der Probe mit 500 μ l PBS
5. Inkubation der Probe für mindestens 30 min mit 500 μ l frisch hergestellter 3 % BSA-PBS-Lösung im Kühlschrank (zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Farbstoffs), währenddessen lichtgeschütztes Auftauen der Phalloidin-Atto 488-Stammlösung bei RT
6. Herstellung der Farbstofflösung in einem Eppendorf-Tube: 1 μ l/ml Atto-Phalloidin 488 mit einer 1 %igen BSA-PBS-Lösung vermischen (Stammlösung: 10 nmol Farbstoff gelöst in 150 μ l Methanol)
7. Dreimaliges Spülen der Probe mit 500 μ l PBS
8. Zugabe der vorbereiteten Farbstofflösung (500 μ l pro Probe) und lichtgeschützte Inkubation der Proben für 20 min bei RT
9. Dreimaliges Spülen der Probe mit 500 μ l PBS
10. Zugabe von 500 μ l PBS pro Probe, dann zur Zellkernfärbung Zugabe von 2 Tropfen (ca. 60 μ l) NucBlue in das PBS und lichtgeschützte Inkubation bei RT für ca. 15 min, währenddessen Reinigung und Desinfektion von je einem Deckglas (Marienfeld, 24x24 mm, Stärke 170 μ m) pro Probe
11. Entfernung der Farbstofflösung und Spülen mit PBS zur Vermeidung von Hintergrundfluoreszenz
12. Entfernung der Flüssigkeit in der PDMS-Kammer bis auf ca. 100 μ l und vorsichtiges Abziehen der PDMS-Kammer (durch Hochheben an einer Seite und gleichzeitigem Runterdrücken auf der anderen Seite, sonst kann es zur Herauslösung des gesamten SAW-Chips aus der Platine)
13. Auflegen des Deckglases auf die verbliebene Flüssigkeit unter Vermeidung von Luftblasen
14. Für hochauflösende Bilder bei der Mikroskopie der Proben: umgedrehtes Auflegen der Proben mit dem Deckglas zum Objektiv hin

C.6. Protokoll zur Detektion von YAP, MRTF und Notch anhand von Antikörper-Markierung

Nach dem Fixierungsschritt wurde die Antikörperfärbung durch Prof. Hanna Engelke und Anderson Massahiro De-Campos an der Universität Graz nach einem zuvor erarbeiteten

Protokoll durchgeführt [306]. Als primäre Antikörper wurden der polyklonale Kaninchen-Antikörper YAP1 (Invitrogen, PA1-46189), der monoklonale Kaninchen-Antikörper Cleaved Notch1 (Cell Signaling, Val1744) und der monoklonale Maus-Antikörper MRTF-A/MKL1 (G-8) (Santa Cruz, sc-390324) verwendet. Bei den verwendeten Sekundärantikörpern handelte es sich um Alexa FluorTM 647 *goat anti-rabbit* (Invitrogen, A21245) für YAP/NOTCH und Alexa FluorTM 633 *goat anti-mouse* (Invitrogen, A21050) für MRTF.

1. Fixierung der Wundheilungsassays in $V = 500 \mu\text{l}$ 4% methanolfreiem Formaldehyd in PBS für $t = 15 \text{ min}$ bei $T = 4^\circ\text{C}$
2. Dreimaliges Spülen der Probe mit $500 \mu\text{l}$ PBS
3. Permeabilisierung der Probe mit $400 \mu\text{l}$ 0,15% Triton X-100 bei RT für 10 min
4. Dreimaliges Spülen der Probe für $t = 5 \text{ min}$ mit PBS
5. Blockierung der Zellen in einer Lösung aus BSA (ROTH, Nr. 8076.1) in PBS (1% w/v) bei Raumtemperatur für $t = 30 \text{ min}$
6. Verdünnung der primären Antikörper in der BSA-Lösung (1:100, v:v) und Zugabe von $V = 400 \mu\text{l}$ zu jeder Probe ($4 \mu\text{g}$ Antikörper pro Probe)
7. Inkubation der Proben über Nacht bei $T = 4^\circ\text{C}$
8. Dreimaliges Spülen der Probe mit PBS
9. Zugabe der sekundären Antikörper in einer Konzentration von 1:200 (v:v) in $V = 400 \mu\text{l}$ BSA-PBS-Lösung ($4 \mu\text{g}$ Antikörper pro Probe)
10. Inkubation der Proben für $t = 1 \text{ h}$ lichtgeschützt bei Raumtemperatur
11. Dreimaliges Spülen der Proben mit PBS
12. Markierung der Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33342 (abcam, ab228551) in einer Endkonzentration von $c = 50 \mu\text{M}$ pro Probe

Für die Epifluoreszenz-Bildgebung wurde ein invertiertes Eclipse Ti-E-Mikroskop mit pE4000 LED-Lichtquelle (Nikon) und einem Apo 25 \times , 1.1 N.A.- Wasserimmersionsobjektiv (Nikon) verwendet. Für die konfokale Bildgebung wurde ein Leica Stellaris 5 Mikroskop mit einem 25-fachen Objektiv verwendet, um hochauflösende Bilder der Apertur- und internen Kontrollregionen jeder Probe aufzunehmen.

D. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen von Zulieferern und Herstellern, die im Text verwendet werden, sind unter Anhang B zu finden. Bezeichnungen auf Basis chemischer Nomenklatur sowie physikalische Einheiten sind hier nicht eigens aufgeführt.

2D bzw. 3D: zwei- bzw. dreidimensional

ATP: Adenosintriphosphat

AVR: *Aortic Valve Replacement*, Aortenklappenersatz

B35: Neuroblastom-Zelllinie aus Ratten

BAV: *Bicuspid Aortic Valve*, bikuspidale Aortenklappe

BAW: *Bulk Acoustic Wave*, akustische Volumenwelle

CRISPR/Cas9: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9*

Ctrl: externe Kontrollprobe(n)

DANI: *De-Adhesion Number Investigator*

DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol (Fluoreszenz)

DcAMP: Dibutyryl Adenosin-3,5-Monophosphat

(D)MEM: (Dulbecco's) Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: *deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure

ER: Endoplasmatisches Retikulum

ESTHER: Electronbeam-RF-Sputtering and Thermal Evaporation

EZM: Extrazelluläre Matrix

EZPK: Eine-Zelle-pro-Knotenpunkt

F-Aktin: filamentöses Aktin

FITC: Fluorescein-Isothiocyanate (Fluoreszenz)

G-Aktin: globuläres Aktin

HA: Hämagglutinin

HAEC: *Human Aortic Endothelial Cells* (Zelllinie aus einer humanen Aorta)

HEK: *Human Embryonic Kidney*

HeLa: Henrietta Lacks (Gebärmutterhalskrebs-Zelllinie)

HF: Hochfrequenz

IDT: *Interdigital Transducer*, interdigitale Schallwandler

KO: *Knock-Out*

LVES: *Large Vessel Endothelial Supplement*

MDCK-II: *Madine Darby Canine Kidney*, Epithel-Zelllinie

MRI: *Magnetic Resonance Imaging*, Magnetresonanztomographie (MRT)

mRNA: *messenger ribonucleic acid*

MRTF: *myocardin-related transcription factor*
MTOC: *microtubule organizing center*
NeuCED: *Neural Cell Edge Detector*
PDMS: Polydimethylsiloxan
PLL: Poly-L-Lysin
RNA: *ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure
SaOs: *Sarcoma Osteogenic* (Osteosarkom-Zelllinie)
SAW: *Surface Acoustic Waves*, akustische Oberflächenwellen
SSAW: *Standing SAW*, stehende akustische Oberflächenwelle
sPIV: *scanning Particle Image Velocimetry*
SPPL3: *signal peptide peptidase-like 3*, Membranprotease
TAZ: *Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motif*
TR, T-RExTM: *Tetracycline-Regulated Expression*
WT: *Wild Type*, Wildtyp
YAP: *yes-associated protein*
ZAM: Zelladhäsionsmoleküle

Literatur

- [1] M. S. Brugger, K. Baumgartner, S. C. F. Mauritz, S. C. Gerlach, F. Röder, C. Schlosser, R. Fluhrer, A. Wixforth, and C. Westerhausen, "Vibration enhanced cell growth induced by surface acoustic waves as in vitro wound-healing model," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 50, pp. 31603–31613, 2020.
- [2] M. S. Brugger, "Sensorik, Aktorik und Stimulation vitaler Zellen unter Verwendung akustischer Oberflächenwellen," 2021.
- [3] K. G. Harding, "Science, medicine, and the future: Healing chronic wounds," *BMJ*, vol. 324, no. 7330, pp. 160–163, 2002.
- [4] C. K. Sen, "Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates," *Adv. Wound Care*, vol. 10, no. 5, pp. 281–292, 2021.
- [5] K. Raziyeva, Y. Kim, Z. Zharkinbekov, K. Kassymbek, S. Jimi, and A. Saparov, "Immunology of Acute and Chronic Wound Healing," *Biomolecules*, vol. 11, no. 5, p. 700, 2021.
- [6] V. Popescu, V. Cauni, M. S. Petrutescu, M. M. Rustin, R. Bocai, C. R. Turculet, H. Doran, T. Patrascu, A. M. Lazar, D. Cretoiu, V. N. Varlas, and B. Mastalier, "Chronic Wound Management: From Gauze to Homologous Cellular Matrix," *Biomedicines*, vol. 11, no. 9, p. 2457, 2023.
- [7] D. C. Bosanquet and K. G. Harding, "Wound duration and healing rates: Cause or effect?," *Wound Repair Regen.*, vol. 22, no. 2, pp. 143–150, 2014.
- [8] D. Harper, A. Young, and C.-E. McNaught, "The physiology of wound healing," *Surg.*, vol. 32, no. 9, pp. 445–450, 2014.
- [9] M. B. Dreifke, A. A. Jayasuriya, and A. C. Jayasuriya, "Current wound healing procedures and potential care," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 48, pp. 651–662, 2015.
- [10] G. ter Haar, "Therapeutic applications of ultrasound," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 93, no. 1-3, pp. 111–129, 2007.
- [11] C.-J. Wang, "Extracorporeal shockwave therapy in musculoskeletal disorders," *J. Orthop. Surg. Res.*, vol. 7, no. 1, p. 11, 2012.
- [12] C. L. Simplicio, J. Purita, W. Murrell, G. S. Santos, R. G. dos Santos, and J. F. S. D. Lana, "Extracorporeal shock wave therapy mechanisms in musculoskeletal regenerative medicine," *J. Clin. Orthop. Trauma*, vol. 11, pp. S309–S318, 2020.
- [13] C. Uhlemann, B. Heinig, and U. Wollina, "Therapeutic Ultrasound in Lower Extremity Wound Management," *Int. J. Low. Extrem. Wounds*, vol. 2, pp. 152–157, sep 2003.

- [14] V. R. Driver, M. Yao, and C. J. Miller, “Noncontact low-frequency ultrasound therapy in the treatment of chronic wounds: A meta-analysis,” *Wound Repair Regen.*, vol. 19, no. 4, pp. 475–480, 2011.
- [15] S. Bashardoust Tajali, P. Houghton, J. C. MacDermid, and R. Grewal, “Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound Therapy on Fracture Healing,” *Am. J. Phys. Med. Rehabil.*, vol. 91, no. 4, pp. 349–367, 2012.
- [16] J. I. Kang, Y.-N. Kim, and H. Choi, “Effects of Low-intensity Pulsed Ultrasound and Cryotherapy on Recovery of Joint Function and C-reactive Protein Levels in Patients after Total Knee Replacement Surgery,” *J. Phys. Ther. Sci.*, vol. 26, no. 7, pp. 1033–1036, 2014.
- [17] A. Yadollahpour, J. Mostafa, R. Samaneh, and R. Zohreh, “Ultrasound Therapy for Wound Healing: A Review of Current Techniques and Mechanisms of Action,” *J. Pure Appl. Microbiol.*, vol. 8, no. 5, pp. 4071–4085, 2014.
- [18] A. Oliveira, S. Simões, A. Ascenso, and C. P. Reis, “Therapeutic advances in wound healing,” *J. Dermatolog. Treat.*, vol. 33, no. 1, pp. 2–22, 2022.
- [19] W. J. Ashby and A. Zijlstra, “Established and novel methods of interrogating two-dimensional cell migration,” *Integr. Biol. (United Kingdom)*, vol. 4, no. 11, pp. 1338–1350, 2012.
- [20] M. E. M. Stamp, M. S. Brugger, A. Wixforth, and C. Westerhausen, “Acoustotaxis -in vitro stimulation in a wound healing assay employing surface acoustic waves,” *Biomater. Sci.*, vol. 4, no. 7, pp. 1092–1099, 2016.
- [21] K. Baumgartner, P. Täufer, M. Lienhart, R. Lienhart, and C. Westerhausen, “Pulsed surface acoustic waves accelerate wound healing and reveal new parameter limits for cell stimulation in vitro,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 57, no. 15, 2024.
- [22] M. S. Brugger, S. Grunden, A. Doyle, L. Theogarajan, A. Wixforth, and C. Westerhausen, “Orchestrating cells on a chip: employing surface acoustic waves towards the formation of neural networks,” *Phys. Rev. E*, vol. 98, no. 1, p. 12411, 2018.
- [23] F. Guo, P. Li, J. B. French, Z. Mao, H. Zhao, S. Li, N. Nama, J. R. Fick, S. J. Benkovic, and T. J. Huang, “Controlling cell–cell interactions using surface acoustic waves,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 1, pp. 43–48, 2015.
- [24] F. Guo, Z. Mao, Y. Chen, Z. Xie, J. P. Lata, P. Li, L. Ren, J. Liu, J. Yang, and M. Dao, “Three-dimensional manipulation of single cells using surface acoustic waves,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 6, pp. 1522–1527, 2016.

- [25] K. Baumgartner, S. C. F. Mauritz, S. Angermann, M. S. Brugger, and C. Westerhausen, “One-dimensional acoustic potential landscapes guide the neurite outgrowth and affect the viability of B35 neuroblastoma cells,” *Phys. Biol.*, vol. 19, no. 4, p. 046005, 2022.
- [26] T. Franke, S. Braunmüller, L. Schmid, A. Wixforth, and D. A. Weitz, “Surface acoustic wave actuated cell sorting (SAWACS),” *Lab Chip*, vol. 10, no. 6, p. 789, 2010.
- [27] X. Ding, Z. Peng, S.-C. S. Lin, M. Geri, S. Li, P. Li, Y. Chen, M. Dao, S. Suresh, and T. J. Huang, “Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 111, no. 36, pp. 12992–12997, 2014.
- [28] K. Länge, B. E. Rapp, and M. Rapp, “Surface acoustic wave biosensors: A review,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 391, no. 5, pp. 1509–1519, 2008.
- [29] Y. Huang, P. K. Das, and V. R. Bhethanabotla, “Surface acoustic waves in biosensing applications,” *Sensors and Actuators Reports*, vol. 3, no. April, 2021.
- [30] K. Baumgartner and C. Westerhausen, “Recent advances of surface acoustic wave-based sensors for noninvasive cell analysis,” *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 79, p. 102879, 2023.
- [31] H. Bruus, J. Dual, J. Hawkes, M. Hill, T. Laurell, J. Nilsson, S. Radel, S. Sadhal, and M. Wiklund, “Forthcoming Lab on a Chip tutorial series on acoustofluidics: Acoustofluidics—exploiting ultrasonic standing wave forces and acoustic streaming in microfluidic systems for cell and particle manipulation,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 21, p. 3579, 2011.
- [32] L. A. Ambattu and L. Y. Yeo, “Sonomechanobiology: Vibrational stimulation of cells and its therapeutic implications,” *Biophys. Rev.*, vol. 4, no. 2, 2023.
- [33] P. Delsing, A. N. Cleland, M. J. A. Schuetz, J. Knörzer, G. Giedke, J. I. Cirac, K. Srinivasan, M. Wu, K. C. Balam, and C. Bäuerle, “The 2019 surface acoustic waves roadmap,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 52, no. 35, p. 353001, 2019.
- [34] L. Rayleigh, “On Waves Propagated along the Plane Surface of an Elastic Solid,” *Proc. London Math. Soc.*, vol. 17, no. 1, pp. 4–11, 1885.
- [35] R. M. White and F. W. Voltmer, “Direct piezoelectric coupling to surface elastic waves,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 7, no. 12, pp. 314–316, 1965.
- [36] E. Ash, *Rayleigh Wave Theory and Application (Springer Series on Wave Phenomena, Vol 2)*. Springer-Verlag, 1985.
- [37] B. Auld, *Acoustic fields and waves in solids*. John Wiley & Sons, 1973.

-
- [38] I. Viktorov, *Rayleigh and Lamb Waves: Physical Theory and Applications*. Plenum Press, 1967.
- [39] S. Datta, *Surface Acoustic Wave Devices*. Prentice Hall, 1986.
- [40] H. Matthews, *Surface waves filters*. John Wiley & Sons, 1977.
- [41] T. Frommelt, *Mischen und Sortieren mit SAW-Fluidik in Simulation und Experiment*. Dissertation, Universität Augsburg, 2007.
- [42] J. Neumann, *Sensorische und aktorische Anwendungen akustischer Oberflächenwellen*. Dissertation, Universität Augsburg, 2009.
- [43] C. Strobl, *Mikro- und Nanofluidik auf piezoelektrischen Substraten*. Dissertation, LMU München, 2005.
- [44] E. Lifschitz, L. Landau, and H. Schöpf, *Elastizitätstheorie*. Akademie-Verlag, 1975.
- [45] D. S. Ballantine, *Acoustic wave sensors: theory, design, and physico-chemical applications*. Academic Press, 1997.
- [46] D. Royer and E. Dieulesaint, *Elastic waves in solids I: F free and guided propagation*. Springer-Verlag, 2000.
- [47] F. Schülein, *Dynamische Kontrolle optisch aktiver Halbleiter-Quantenpunkte mittels akustischer Oberflächenwellen*. Dissertation, Universität Augsburg, 2014.
- [48] G. Farnell, “Properties of elastic surface waves,” in *Phys. Acoust.*, pp. 109–166, Academic Press, 1970.
- [49] T. Nomura, M. Takebayashi, S. Furukawa, and M. Obana, “Surface acoustic wave sensor for sensing acoustic properties of liquid,” in *1995 IEEE Ultrason. Symp. Proceedings. An Int. Symp.*, vol. 1, pp. 547–550, IEEE, 1995.
- [50] K. Hashimoto, *Surface acoustic wave devices in telecommunications*. Springer-Verlag, 2000.
- [51] G. Kovacs, M. Anhorn, H. Engan, G. Visintini, and C. Ruppel, “Improved material constants for LiNbO₃ and LiTaO₃,” in *IEEE Symp. Ultrason.*, pp. 435–438, IEEE, 1990.
- [52] A. J. Slobodnik, E. D. Conway, and R. T. Delmonico, “Microwave Acoustics Handbook, Vol. 1A, Surface Wave Velocities,” *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 56, no. 4, pp. 1307–1308, 1974.
- [53] G. S. Kino., *Acoustic waves: devices, imaging, and analog signal processing*. Englewood Cliffs, New Jersey, 1987.

- [54] D. Morgan, *Surface Acoustic Wave Filters With Applications to Electronic Communications and Signal Processing*. Elsevier, 2 ed., 2007.
- [55] W. Smith, H. Gerard, J. Collins, T. Reeder, and H. Shaw, "Analysis of Interdigital Surface Wave Transducers by Use of an Equivalent Circuit Model," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 17, pp. 856–864, nov 1969.
- [56] F. Strauß, *Grundkurs Hochfrequenztechnik: Eine Einführung*. Berlin: Vieweg+Teubner Verlag, 2011.
- [57] W. Demtröder, *Experimentalphysik 1: Mechanik und Wärme*. Springer-Lehrbuch, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 5 ed., 2008.
- [58] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, 4 ed., 2002.
- [59] V. Kumar, A. K. Abbas, and J. C. Aster, *Robbins Basic Pathology*. Philadelphia: Elsevier Inc., 10 ed., 2018.
- [60] R. J. Wanders, "Metabolic functions of peroxisomes in health and disease," *Biochimie*, vol. 98, pp. 36–44, 2014.
- [61] L. Montanaro, D. Treré, and M. Derenzini, "Nucleolus, Ribosomes, and Cancer," *Am. J. Pathol.*, vol. 173, no. 2, pp. 301–310, 2008.
- [62] I. G. Wool, "The Structure and Function of Eukaryotic Ribosomes," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 48, no. 1, pp. 719–754, 1979.
- [63] R. Green and H. F. Noller, "Ribosomes and Translation," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 66, no. 1, pp. 679–716, 1997.
- [64] H. Beams and R. Kessel, "The Golgi Apparatus: Structure and Function," *Int. Rev. Cytol.*, vol. 23, pp. 209–276, 1968.
- [65] M. Lowe, "Structural organization of the Golgi apparatus," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 85–93, 2011.
- [66] M. Bornens, "The Centrosome in Cells and Organisms," *Science (80-.)*, vol. 335, no. 6067, pp. 422–426, 2012.
- [67] J. P. Luzio, P. R. Pryor, and N. A. Bright, "Lysosomes: fusion and function," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 8, no. 8, pp. 622–632, 2007.
- [68] K. Keren, "Cell motility: the integrating role of the plasma membrane," *Eur. Biophys. J.*, vol. 40, no. 9, pp. 1013–1027, 2011.

- [69] M. S. Robinson, C. Watts, and M. Zerial, “Membrane Dynamics in Endocytosis,” *Cell*, vol. 84, no. 1, pp. 13–21, 1996.
- [70] M. E. Janik, A. Lityńska, and P. Vereecken, “Cell migration—The role of integrin glycosylation,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1800, no. 6, pp. 545–555, 2010.
- [71] M. Voss, U. Künzel, F. Higel, P. Kuhn, A. Colombo, A. Fukumori, M. Haug-Kröper, B. Klier, G. Grammer, A. Seidl, B. Schröder, R. Obst, H. Steiner, S. F. Lichtenthaler, C. Haass, and R. Fluhner, “Shedding of glycan-modifying enzymes by signal peptide peptidase-like 3 (SPPL3) regulates cellular N-glycosylation,” *EMBO J.*, vol. 33, no. 24, pp. 2890–2905, 2014.
- [72] P.-H. Kuhn, M. Voss, M. Haug-Kröper, B. Schröder, U. Schepers, S. Bräse, C. Haass, S. F. Lichtenthaler, and R. Fluhner, “Secretome Analysis Identifies Novel Signal Peptide Peptidase-Like 3 (SPPL3) Substrates and Reveals a Role of SPPL3 in Multiple Golgi Glycosylation Pathways*,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 14, no. 6, pp. 1584–1598, 2015.
- [73] A. Khalili and M. Ahmad, “A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 8, pp. 18149–18184, 2015.
- [74] D. Bray, “The Cytoskeleton,” in *Cell Movements*, New York: Garland Science, 2 ed., 2000.
- [75] D. A. Fletcher and R. D. Mullins, “Cell mechanics and the cytoskeleton,” *Nature*, vol. 463, no. 7280, pp. 485–492, 2010.
- [76] T. D. Pollard, L. Blanchoin, and R. D. Mullins, “Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells,” *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, vol. 29, no. 1, pp. 545–576, 2000.
- [77] F. Jülicher, K. Kruse, J. Prost, and J. Joanny, “Active behavior of the Cytoskeleton,” *Phys. Rep.*, vol. 449, no. 1-3, pp. 3–28, 2007.
- [78] N. J. Ganem, S. A. Godinho, and D. Pellman, “A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability,” *Nature*, vol. 460, no. 7252, pp. 278–282, 2009.
- [79] A. Hall, “The cytoskeleton and cancer,” *Cancer Metastasis Rev.*, vol. 28, no. 1-2, pp. 5–14, 2009.
- [80] M. J. Shelley, “The Dynamics of Microtubule/Motor-Protein Assemblies in Biology and Physics,” *Annu. Rev. Fluid Mech.*, vol. 48, no. 1, pp. 487–506, 2016.
- [81] K. T. Furukawa, K. Yamashita, N. Sakurai, and S. Ohno, “The Epithelial Circumferential Actin Belt Regulates YAP/TAZ through Nucleocytoplasmic Shuttling of Merlin,” *Cell Rep.*, vol. 20, no. 6, pp. 1435–1447, 2017.

- [82] P. Reddy, M. Deguchi, Y. Cheng, and A. J. W. Hsueh, "Actin Cytoskeleton Regulates Hippo Signaling," *PLoS One*, vol. 8, no. 9, p. e73763, 2013.
- [83] S. Schmitz, *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 3 ed., 2011.
- [84] A. R. Araujo, L. Gelens, R. S. Sheriff, and S. D. Santos, "Positive Feedback Keeps Duration of Mitosis Temporally Insulated from Upstream Cell-Cycle Events," *Mol. Cell*, vol. 64, no. 2, pp. 362–375, 2016.
- [85] W. M. Saxton and J. R. McIntosh, "Interzone microtubule behavior in late anaphase and telophase spindles.," *J. Cell Biol.*, vol. 105, no. 2, pp. 875–886, 1987.
- [86] F. Schrader, *Mitosis*. Columbia University Press, 1953.
- [87] D. Mazia, "Mitosis and the Physiology of Cell Division," in *Cell*, pp. 77–412, Elsevier, 1961.
- [88] D. G. Johnson and C. L. Walker, "Cyclins and cell cycle checkpoints," *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 39, no. 1, pp. 295–312, 1999.
- [89] C. Bertoli, J. M. Skotheim, and R. A. M. de Bruin, "Control of cell cycle transcription during G1 and S phases," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, no. 8, pp. 518–528, 2013.
- [90] K. Nasmyth, "Viewpoint: Putting the Cell Cycle in Order," *Science (80-.)*, vol. 274, no. 5293, pp. 1643–1645, 1996.
- [91] K. Baumgartner, *Einfluss akustischer Oberflächenwellen auf das Wachstum von Zellen*. PhD thesis, Universität Augsburg, 2021.
- [92] A. L. Edinger and C. B. Thompson, "Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 16, no. 6, pp. 663–669, 2004.
- [93] P. A. Hall and D. A. Levison, "Review: assessment of cell proliferation in histological material.," *J. Clin. Pathol.*, vol. 43, no. 3, pp. 184–192, 1990.
- [94] L. Lajtha, "On the concept of the cell cycle," *J. Cell. Comp. Physiol.*, vol. 62, 1963.
- [95] G. Cooper and R. Hausman, *The Cell - A Molecular Approach*. Sunderland: Sinauer Associates, 4 ed., 2000.
- [96] G. M. Cohen, "Caspases: the executioners of apoptosis," *Biochem. J.*, vol. 326, no. 1, pp. 1–16, 1997.
- [97] P. Golstein and G. Kroemer, "Cell death by necrosis: towards a molecular definition," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 32, no. 1, pp. 37–43, 2007.

- [98] B. Levine and D. J. Klionsky, "Development by Self-Digestion," *Dev. Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 463–477, 2004.
- [99] E. H. Baehrecke, "Autophagic programmed cell death in *Drosophila*," *Cell Death Differ.*, vol. 10, no. 9, pp. 940–945, 2003.
- [100] D. Gozuacik and A. Kimchi, "Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism," *Oncogene*, vol. 23, no. 16, pp. 2891–2906, 2004.
- [101] S. Jung, H. Jeong, and S.-W. Yu, "Autophagy as a decisive process for cell death," *Exp. Mol. Med.*, vol. 52, no. 6, pp. 921–930, 2020.
- [102] D. Glick, S. Barth, and K. F. Macleod, "Autophagy: cellular and molecular mechanisms," *J. Pathol.*, vol. 221, no. 1, pp. 3–12, 2010.
- [103] A. L. Berrier and K. M. Yamada, "Cell–matrix adhesion," *J. Cell. Physiol.*, vol. 213, no. 3, pp. 565–573, 2007.
- [104] S. V. Litvinov, M. Balzar, M. J. Winter, H. A. Bakker, I. H. B.-d. Bruijn, F. Prins, G. J. Fleuren, and S. O. Warnaar, "Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) Modulates Cell–Cell Interactions Mediated by Classic Cadherins," *J. Cell Biol.*, vol. 139, no. 5, pp. 1337–1348, 1997.
- [105] R. Simson, *Untersuchung der elastischen und plastischen Eigenschaften von Zellen und Zellmodellen mittels mikro-optischer und mikromechanischer Methoden*. München: Herbert Utz Verlag GmbH, 1 ed., 1998.
- [106] S. Hong, E. Ergezen, R. Lec, and K. A. Barbee, "Real-time analysis of cell–surface adhesive interactions using thickness shear mode resonator," *Biomaterials*, vol. 27, no. 34, pp. 5813–5820, 2006.
- [107] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, "Extracellular matrix structure," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 97, pp. 4–27, 2016.
- [108] E. Sackmann and R. Bruinsma, "Cell Adhesion as Wetting Transition?," in *Phys. biomolecules cells. Phys. des biomolécules des cellules*, pp. 285–309, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002.
- [109] S. Miyamoto, B.-Z. Kathz, R. M. Lafrenie, and K. M. Yamada, "Fibronectin and Integrins in Cell Adhesion, Signaling, and Morphogenesis," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 857, no. 1, pp. 119–129, 1998.
- [110] W. T. Gerthoffer and S. J. Gunst, "Invited Review: Focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle," *J. Appl. Physiol.*, vol. 91, no. 2, pp. 963–972, 2001.

- [111] E. Ruoslahti, E. G. Hayman, and M. D. Pierschbacher, "Extracellular matrices and cell adhesion.," *Arterioscler. An Off. J. Am. Hear. Assoc. Inc.*, vol. 5, pp. 581–594, nov 1985.
- [112] X. Trepast, Z. Chen, and K. Jacobson, "Cell Migration," *Compr. Physiol.*, pp. 2369–2392, 2012.
- [113] P. Friedl and E.-B. Bröcker, "The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 57, no. 1, pp. 41–64, 2000.
- [114] P. Friedl and K. Wolf, "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 5, pp. 362–374, 2003.
- [115] D. A. Lauffenburger and A. F. Horwitz, "Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process," *Cell*, vol. 84, no. 3, pp. 359–369, 1996.
- [116] E. Sackmann and R. Merkel, *Lehrbuch der Biophysik*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH + Co. KG, 2 ed., 2012.
- [117] P. K. Mattila and P. Lappalainen, "Filopodia: molecular architecture and cellular functions," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 446–454, 2008.
- [118] A. J. Ridley, M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons, and A. R. Horwitz, "Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back," *Science (80-.)*, vol. 302, no. 5651, pp. 1704–1709, 2003.
- [119] N. T. Bennett and G. S. Schultz, "Growth factors and wound healing: Biochemical properties of growth factors and their receptors," *Am. J. Surg.*, vol. 165, no. 6, pp. 728–737, 1993.
- [120] E. K. Paluch, C. M. Nelson, N. Biais, B. Fabry, J. Moeller, B. L. Pruitt, C. Wollnik, G. Kudryasheva, F. Rehfeldt, and W. Federle, "Mechanotransduction: use the force(s)," *BMC Biol.*, vol. 13, no. 1, p. 47, 2015.
- [121] T. J. Zajdel, G. Shim, L. Wang, A. Rossello-Martinez, and D. J. Cohen, "SCHEEP-DOG: Programming Electric Cues to Dynamically Herd Large-Scale Cell Migration," *Cell Syst.*, vol. 10, no. 6, pp. 506–514.e3, 2020.
- [122] T. Das, K. Safferling, S. Rausch, N. Grabe, H. Boehm, and J. P. Spatz, "A molecular mechanotransduction pathway regulates collective migration of epithelial cells," *Nat. Cell Biol.*, vol. 17, no. 3, pp. 276–287, 2015.
- [123] K. Dransfeld and E. Salzman, "Excitation, Detection, and Attenuation of High-Frequency Elastic Surface Waves," *Phys. Acoust. Princ. Methods*, vol. 7, pp. 219–271, 1970.

- [124] S. Li, S. Li, S. Anwar, F. Tian, W. Lu, and B. Hou, "Determination of microwave conductivity of electrolyte solutions from Debye-Drude model," *Prog. Electromagn. Res. Symp.*, no. August, pp. 670–673, 2014.
- [125] R. Buchner, J. Barthel, and J. Stauber, "The dielectric relaxation of water between 0°C and 35°C," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 306, no. 1-2, pp. 57–63, 1999.
- [126] P. Debye and E. Hückel, *Zur Theorie der Elektrolyte*. Leipzig: S. Hirzel Verlag, 1923.
- [127] M. M. Kohonen, M. E. Karaman, and R. M. Pashley, "Debye Length in Multivalent Electrolyte Solutions," *Langmuir*, vol. 16, no. 13, pp. 5749–5753, 2000.
- [128] Y. Poo, R.-x. Wu, X. Fan, and J. Q. Xiao, "Measurement of ac conductivity of gold nanofilms at microwave frequencies," *Rev. Sci. Instrum.*, vol. 81, no. 6, 2010.
- [129] W. d. M. Nyborg, "11 - Acoustic Streaming," in *Phys. Acoust.* (W. P. Mason, ed.), pp. 265–331, Academic Press, 1965.
- [130] M. Wiklund, R. Green, and M. Ohlin, "Acoustofluidics 14: Applications of acoustic streaming in microfluidic devices," *Lab Chip*, vol. 12, no. 14, p. 2438, 2012.
- [131] T. Frommelt, D. Gogel, M. Kostur, P. Talkner, P. Hanggi, and A. Wixforth, "Flow patterns and transport in Rayleigh surface acoustic wave streaming: combined finite element method and raytracing numerics versus experiments," *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 55, no. 10, pp. 2298–2305, 2008.
- [132] J. Wu, "Acoustic Streaming and Its Applications," *Fluids*, vol. 3, no. 4, p. 108, 2018.
- [133] C. Eckart, "Vortices and Streams Caused by Sound Waves," *Phys. Rev.*, vol. 73, no. 1, pp. 68–76, 1948.
- [134] L. Y. Yeo and J. R. Friend, "Surface Acoustic Wave Microfluidics," *Annu. Rev. Fluid Mech.*, vol. 46, no. 1, pp. 379–406, 2014.
- [135] K. Yosioka and Y. Kawasima, "Acoustic radiation pressure on a compressible sphere," *Acta Acust. united with Acust.*, vol. 5, no. 3, pp. 167–173, 1955.
- [136] L. Gor'kov, "Forces acting on a small particle in an acoustic field within an ideal fluid," *Dokl. Akad. Nauk Sssr*, pp. 88–92, 1961.
- [137] T. Laurell, F. Petersson, and A. Nilsson, "Chip integrated strategies for acoustic separation and manipulation of cells and particles," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 36, no. 3, pp. 492–506, 2007.

- [138] D. J. Collins, B. Morahan, J. Garcia-Bustos, C. Doerig, M. Plebanski, and A. Neild, “Two-dimensional single-cell patterning with one cell per well driven by surface acoustic waves,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–11, 2015.
- [139] M. Travagliati, R. J. Shilton, M. Pagliuzzi, I. Tonazzini, F. Beltram, and M. Cecchini, “Acoustofluidics and Whole-Blood Manipulation in Surface Acoustic Wave Counterflow Devices,” *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 21, pp. 10633–10638, 2014.
- [140] V. Bjercknes, *Die Kraftfelder*. 1909.
- [141] M. A. Weiser, R. E. Apfel, and E. A. Neppiras, “Interparticle Forces on Red Cells in a Standing Wave Field.,” *Acustica*, vol. 56, no. 2, pp. 114–119, 1984.
- [142] O. Manor, A. R. Rezk, J. R. Friend, and L. Y. Yeo, “Dynamics of liquid films exposed to high-frequency surface vibration,” *Phys. Rev. E*, vol. 91, no. 5, p. 053015, 2015.
- [143] P. B. Muller, R. Barnkob, M. J. H. Jensen, and H. Bruus, “A numerical study of microparticle acoustophoresis driven by acoustic radiation forces and streaming-induced drag forces,” *Lab Chip*, vol. 12, no. 22, p. 4617, 2012.
- [144] D. Hartono, Y. Liu, P. L. Tan, X. Y. S. Then, L.-Y. L. Yung, and K.-M. Lim, “On-chip measurements of cell compressibility via acoustic radiation,” *Lab Chip*, vol. 11, no. 23, pp. 4072–4080, 2011.
- [145] S. Hellstrom, “Basic models of spin coating,” *Submitt. as coursework Phys. 210*, 2007.
- [146] M. Brugger, *Aktorische Anwendung akustischer Oberflächenwellen zur Zellmanipulation*. Masterarbeit, Universität Augsburg, 2016.
- [147] J. T. Morgan, J. A. Wood, N. M. Shah, M. L. Hughbanks, P. Russell, A. I. Barakat, and C. J. Murphy, “Integration of basal topographic cues and apical shear stress in vascular endothelial cells,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 16, pp. 4126–4135, 2012.
- [148] D. Schubert, S. Heinemann, W. Carlisle, H. Tarikas, B. Kimes, J. Patrick, J. Steinbach, W. Culp, and B. Brandt, “Clonal cell lines from the rat central nervous system,” *Nature*, vol. 249, pp. 224–227, 1974.
- [149] C. Otey, M. Boukhelifa, and P. Maness, “B35 Neuroblastoma Cells: An Easily Transfected, Cultured Cell Model of Central Nervous System Neurons,” in *Methods Cell Biol.*, vol. 71, pp. 287–304, 2003.
- [150] C. R. Gauth, W. L. Hard, and T. F. Smith, “Characterization of an Established Line of Canine Kidney Cells (MDCK).,” *Exp. Biol. Med.*, vol. 122, no. 3, pp. 931–935, 1966.
- [151] J. D. Dukes, P. Whitley, and A. D. Chalmers, “The MDCK variety pack: choosing the right strain,” *BMC Cell Biol.*, vol. 12, no. 1, p. 43, 2011.

- [152] W. C. Russell, F. L. Graham, J. Smiley, and R. Nairn, "Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5," *J. Gen. Virol.*, vol. 36, no. 1, pp. 59–72, 1977.
- [153] G. Shaw, S. Morse, M. Ararat, and F. L. Graham, "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells," *FASEB J.*, vol. 16, no. 8, pp. 869–871, 2002.
- [154] J. Dumont, D. Euwart, B. Mei, S. Estes, and R. Kshirsagar, "Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives," *Crit. Rev. Biotechnol.*, vol. 36, no. 6, pp. 1110–1122, 2016.
- [155] Thermofisher_Scientific_GmbH, "<https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/protocols/proteins-expression-isolation-and-analysis/protein-expression-protocol/inducible-protein-expression-using-the-trex-system.html>," *Inducible protein Expr. using T-REx Syst. aufgerufen am 20.02.2024*.
- [156] J. Jones, T. Nivitchanyong, C. Giblin, V. Ciccarone, D. Judd, S. Gorfien, S. S. Krag, and M. J. Betenbaugh, "Optimization of tetracycline-responsive recombinant protein production and effect on cell growth and ER stress in mammalian cells," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 91, no. 6, pp. 722–732, 2005.
- [157] M. L. Jongsma, A. A. de Waard, M. Raaben, T. Zhang, B. Cabukusta, R. Platzner, V. A. Blomen, A. Xagara, T. Verkerk, S. Bliss, X. Kong, C. Gerke, L. Janssen, E. Stickel, S. Holst, R. Plomp, A. Mulder, S. Ferrone, F. H. Claas, M. H. Heemskerk, M. Griffioen, A. Halenius, H. Overkleeft, J. B. Huppa, M. Wuhrer, T. R. Brummelkamp, J. Neefjes, and R. M. Spaapen, "The SPPL3-Defined Glycosphingolipid Repertoire Orchestrates HLA Class I-Mediated Immune Responses," *Immunity*, vol. 54, no. 1, pp. 132–150.e9, 2021.
- [158] F. G. Strobl, D. Breyer, P. Link, A. A. Torrano, C. Bräuchle, M. F. Schneider, and A. Wixforth, "A surface acoustic wave-driven micropump for particle uptake investigation under physiological flow conditions in very small volumes," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 6, pp. 414–419, 2015.
- [159] W. Thielicke and E. J. Stamhuis, "PIVlab – Towards User-friendly, Affordable and Accurate Digital Particle Image Velocimetry in MATLAB," *J. Open Res. Softw.*, vol. 2, 2014.
- [160] L. Korson, W. Drost-Hansen, and F. Millero, "Viscosity of water at various temperatures," *J. Phys. Chem.*, vol. 73, pp. 34–39, 1969.

- [161] Ibidi_GmbH, “https://ibidi.com/img/cms/products/cells_reagents/R.5020X_CollagenI/IN_5020X_CollagenI.05mg.pdf,” *Instr. Collagen Type I, rat tail, 5 mg/ml, aufgerufen am 20.02.2024*.
- [162] S. Angermann, *Stimulation und Manipulation einer neuronalen Zelllinie in einem akustischen Stehwellenfeld*. Masterarbeit, Universität Augsburg, 2021.
- [163] J. C. McDonald and G. M. Whitesides, “Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 491–499, 2002.
- [164] E. Meijering, M. Jacob, J. Sarria, P. Steiner, H. Hirling, and M. Unser, “Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images,” *Cytom. Part A*, vol. 58A, no. 2, pp. 167–176, 2004.
- [165] E. Meijering, “Neuron tracing in perspective,” *Cytom. Part A*, vol. 77A, no. 7, pp. 693–704, 2010.
- [166] E. Xie, W. Wang, Z. Yu, A. Anandkumar, J. M. Alvarez, and P. Luo, “SegFormer: Simple and Efficient Design for Semantic Segmentation with Transformers,” *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, vol. 15, no. NeurIPS, pp. 12077–12090, 2021.
- [167] A. Dosovitskiy, L. Beyer, A. Kolesnikov, D. Weissenborn, X. Zhai, T. Unterthiner, M. Dehghani, M. Minderer, G. Heigold, S. Gelly, J. Uszkoreit, and N. Houlsby, “An Image Is Worth 16X16 Words: Transformers for Image Recognition At Scale,” *ICLR 2021 - 9th Int. Conf. Learn. Represent.*, 2021.
- [168] Z. Liu, Y. Lin, Y. Cao, H. Hu, Y. Wei, Z. Zhang, S. Lin, and B. Guo, “Swin Transformer,” *2021 IEEE/CVF Int. Conf. Comput. Vis.*, pp. 9992–10002, 2021.
- [169] S. Zheng, J. Lu, H. Zhao, X. Zhu, Z. Luo, Y. Wang, Y. Fu, J. Feng, T. Xiang, P. H. Torr, and L. Zhang, “Rethinking Semantic Segmentation from a Sequence-to-Sequence Perspective with Transformers,” *Proc. IEEE Comput. Soc. Conf. Comput. Vis. Pattern Recognit.*, pp. 6877–6886, 2021.
- [170] W. Wang, E. Xie, X. Li, D.-P. Fan, K. Song, D. Liang, T. Lu, P. Luo, and L. Shao, “Pyramid Vision Transformer: A Versatile Backbone for Dense Prediction without Convolutions,” *2021 IEEE/CVF Int. Conf. Comput. Vis.*, pp. 568–578, 2021.
- [171] X. Chu, Z. Tian, Y. Wang, B. Zhang, H. Ren, X. Wei, H. Xia, and C. Shen, “Twins: Revisiting the Design of Spatial Attention in Vision Transformers,” *Adv. Neural Inf. Process. Syst.*, vol. 12, no. NeurIPS, pp. 9355–9366, 2021.
- [172] T. Wieland, H. Faulstich, and L. Fiume, “Amatoxins, Phallotoxins, Phallolysin, and Antamanide: The Biologically Active Components of Poisonous Amanita Mushroom,” *CRC Crit. Rev. Biochem.*, vol. 5, no. 3, pp. 185–260, 1978.

- [173] E. Wulf, A. Deboben, F. A. Bautz, H. Faulstich, and T. Wieland, “Fluorescent phallotoxin, a tool for the visualization of cellular actin.,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 76, no. 9, pp. 4498–4502, 1979.
- [174] J. A. Cooper, “Effects of cytochalasin and phalloidin on actin.,” *J. Cell Biol.*, vol. 105, no. 4, pp. 1473–1478, 1987.
- [175] L. Hauke, A. Primeßnig, B. Eltzner, J. Radwitz, S. F. Huckemann, and F. Rehfeldt, “FilamentSensor 2.0: An open-source modular toolbox for 2D/3D cytoskeletal filament tracking,” *PLoS One*, vol. 18, no. 2, p. e0279336, 2023.
- [176] B. Eltzner, C. Wollnik, C. Gottschlich, S. Huckemann, and F. Rehfeldt, “The filament sensor for near real-time detection of cytoskeletal fiber structures,” *PLoS One*, vol. 10, no. 5, p. e0126346, 2015.
- [177] S. Berg, D. Kutra, T. Kroeger, C. N. Straehle, B. X. Kausler, C. Haubold, M. Schiegg, J. Ales, T. Beier, M. Rudy, K. Eren, J. I. Cervantes, B. Xu, F. Beuttenmueller, A. Wolny, C. Zhang, U. Koethe, F. A. Hamprecht, and A. Kreshuk, “ilastik: interactive machine learning for (bio)image analysis,” *Nat. Methods*, vol. 16, no. 12, pp. 1226–1232, 2019.
- [178] M. Pachitariu and C. Stringer, “Cellpose 2.0: how to train your own model,” *Nat. Methods*, vol. 19, no. 12, pp. 1634–1641, 2022.
- [179] K. Baumgartner, M. Schleicher, A. De-Campos, P. Täufer, H. Engelke, and C. Westerhausen, “Actin filament and cell orientations align with surface acoustic wave propagation and cell migration in vibration-enhanced wound healing,” *submitted*, 2024.
- [180] K. Baumgartner, E. Polat, E. Girdauskas, and C. Westerhausen, “Aorta-on-a-SAW-Chip: Acoustic streaming generated by surface acoustic waves affects human endothelial cells as an in vitro aorta model,” *Prep.*, 2024.
- [181] M. Bäck, T. C. Gasser, J.-B. Michel, and G. Caligiuri, “Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 99, no. 2, pp. 232–241, 2013.
- [182] P. Reymond, P. Crosetto, S. Deparis, A. Quarteroni, and N. Stergiopoulos, “Physiological simulation of blood flow in the aorta: Comparison of hemodynamic indices as predicted by 3-D FSI, 3-D rigid wall and 1-D models,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 35, no. 6, pp. 784–791, 2013.
- [183] C. A. Taylor, C. P. Cheng, L. A. Espinosa, B. T. Tang, D. Parker, and R. J. Herfkens, “In Vivo Quantification of Blood Flow and Wall Shear Stress in the Human Abdominal

- Aorta During Lower Limb Exercise,” *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 30, no. 3, pp. 402–408, 2002.
- [184] J. Moore Jr, C. Xu, S. Glagov, C. Zarins, and D. Ku, “Fluid wall shear stress measurements in a model of the human abdominal aorta: oscillatory behavior and relationship to atherosclerosis,” *Atherosclerosis*, vol. 110, no. 2, pp. 225–240, 1994.
- [185] C. Trenti, M. Ziegler, N. Bjarnegard, T. Ebbers, M. Lindenberger, and P. Dyverfeldt, “Wall shear stress and relative residence time as potential risk factors for abdominal aortic aneurysms in males: a 4D flow cardiovascular magnetic resonance caseâ€“control study,” *J. Cardiovasc. Magn. Reson.*, vol. 24, no. 1, p. 18, 2022.
- [186] A. Frydrychowicz, A. F. Stalder, M. F. Russe, J. Bock, S. Bauer, A. Harloff, A. Berger, M. Langer, J. Hennig, and M. Markl, “Three-dimensional analysis of segmental wall shear stress in the aorta by flow-sensitive four-dimensional-MRI,” *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 30, no. 1, pp. 77–84, 2009.
- [187] E. S. Farag, P. van Ooij, R. N. Planken, K. C. Dukker, F. de Heer, B. J. Bouma, D. Robbers-Visser, M. Groenink, A. J. Nederveen, B. A. de Mol, J. Kluin, and S. M. Boekholdt, “Aortic valve stenosis and aortic diameters determine the extent of increased wall shear stress in bicuspid aortic valve disease,” *J. Magn. Reson. Imaging*, vol. 48, no. 2, pp. 522–530, 2018.
- [188] E. Girdauskas, M. Rouman, K. Disha, T. Scholle, B. Fey, B. Theis, I. Petersen, M. A. Borger, and T. Kuntze, “Correlation between systolic transvalvular flow and proximal aortic wall changes in bicuspid aortic valve stenosis,” *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.*, vol. 46, no. 2, pp. 234–239, 2014.
- [189] S. Sherifova and G. A. Holzapfel, “Biomechanics of aortic wall failure with a focus on dissection and aneurysm: A review,” *Acta Biomater.*, vol. 99, pp. 1–17, 2019.
- [190] M. E. M. Stamp, A. M. Jötten, P. W. Kudella, D. Breyer, F. G. Strobl, T. M. Geislinger, A. Wixforth, and C. Westerhausen, “Exploring the limits of cell adhesion under shear stress within physiological conditions and beyond on a chip,” *Diagnostics*, vol. 6, no. 4, p. 38, 2016.
- [191] S. Zhao, A. Suciu, T. Ziegler, J. E. Moore, E. Buerki, J.-J. Meister, and H. R. Brunner, “Synergistic Effects of Fluid Shear Stress and Cyclic Circumferential Stretch on Vascular Endothelial Cell Morphology and Cytoskeleton,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 15, no. 10, pp. 1781–1786, 1995.
- [192] M. Sato, K. Suzuki, Y. Ueki, and T. Ohashi, “Microelastic mapping of living endothelial cells exposed to shear stress in relation to three-dimensional distribution of actin filaments,” *Acta Biomater.*, vol. 3, no. 3, pp. 311–319, 2007.

- [193] B. L. Langille, J. J. Graham, D. Kim, and A. I. Gotlieb, "Dynamics of shear-induced redistribution of F-actin in endothelial cells in vivo," *Arterioscler. Thromb. A J. Vasc. Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 1814–1820, 1991.
- [194] P. R. Girard and R. M. Nerem, "Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins," *J. Cell. Physiol.*, vol. 163, no. 1, pp. 179–193, 1995.
- [195] C. F. Dewey, S. R. Bussolari, M. A. Gimbrone, and P. F. Davies, "The Dynamic Response of Vascular Endothelial Cells to Fluid Shear Stress," *J. Biomech. Eng.*, vol. 103, no. 3, pp. 177–185, 1981.
- [196] A. Remuzzi, C. F. Dewey, P. F. Davies, and M. A. Gimbrone, "Orientation of endothelial cells in shear fields in vitro," *Biorheology*, vol. 21, no. 4, pp. 617–630, 1984.
- [197] S. Eskin, C. Ives, L. McIntire, and L. Navarro, "Response of cultured endothelial cells to steady flow," *Microvasc. Res.*, vol. 28, no. 1, pp. 87–94, 1984.
- [198] M. J. Levesque and R. M. Nerem, "The Elongation and Orientation of Cultured Endothelial Cells in Response to Shear Stress," *J. Biomech. Eng.*, vol. 107, no. 4, pp. 341–347, 1985.
- [199] G. Silvani, V. Romanov, C. D. Cox, and B. Martinac, "Biomechanical Characterization of Endothelial Cells Exposed to Shear Stress Using Acoustic Force Spectroscopy," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, 2021.
- [200] A. D. van der Meer, A. A. Poot, J. Feijen, and I. Vermes, "Analyzing shear stress-induced alignment of actin filaments in endothelial cells with a microfluidic assay," *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 1, p. 011103, 2010.
- [201] T. Thacher, *Autonome Effekte von Scherung und Dehnung auf die Arterienwand: Wie sich hämodynamische Kräfte auf das Fortschreiten von Gefäßkrankungen auswirken*. Verlag Unser Wissen, 2021.
- [202] S. F. Kemeny, D. S. Figueroa, and A. M. Clyne, "Hypo- and Hyperglycemia Impair Endothelial Cell Actin Alignment and Nitric Oxide Synthase Activation in Response to Shear Stress," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e66176, 2013.
- [203] D. Peng, W. Tong, D. J. Collins, M. Ibbotson, S. Praver, and M. E. Stamp, "Mechanisms and applications of neuromodulation using surface acoustic waves—a mini-review," *Front. Neurosci.*, vol. 15, p. 37, 2021.
- [204] W. Zhou, J. Wang, K. Wang, B. Huang, L. Niu, F. Li, F. Cai, Y. Chen, X. Liu, and X. Zhang, "Ultrasound neuro-modulation chip: activation of sensory neurons in

- Caenorhabditis elegans by surface acoustic waves,” *Lab Chip*, vol. 17, no. 10, pp. 1725–1731, 2017.
- [205] J. Shi, D. Ahmed, X. Mao, S.-C. S. Lin, A. Lawit, and T. J. Huang, “Acoustic tweezers: patterning cells and microparticles using standing surface acoustic waves (SSAW),” *Lab Chip*, vol. 9, no. 20, pp. 2890–2895, 2009.
- [206] A. Ozelik, J. Rufo, F. Guo, Y. Gu, P. Li, J. Lata, and T. J. Huang, “Acoustic tweezers for the life sciences,” *Nat. Methods*, vol. 15, no. 12, pp. 1021–1028, 2018.
- [207] M. F. Schneider, Z. Guttenberg, S. W. Schneider, K. Sritharan, V. M. Myles, U. Pamukci, and A. Wixforth, “An Acoustically Driven Microliter Flow Chamber on a Chip (μ FCC) for Cell–Cell and Cell–Surface Interaction Studies,” *ChemPhysChem*, vol. 9, no. 4, pp. 641–645, 2008.
- [208] J. Hultström, O. Manneberg, K. Dopf, H. M. Hertz, H. Brismar, and M. Wiklund, “Proliferation and viability of adherent cells manipulated by standing-wave ultrasound in a microfluidic chip,” *Ultrasound Med. & Biol.*, vol. 33, no. 1, pp. 145–151, 2007.
- [209] C. J. Cattin, M. Düggelin, D. Martinez-Martin, C. Gerber, D. J. Müller, and M. P. Stewart, “Mechanical control of mitotic progression in single animal cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 36, pp. 11258–11263, 2015.
- [210] M. H. Hsieh and H. T. Nguyen, “Molecular mechanism of apoptosis induced by mechanical forces,” *Int. Rev. Cytol.*, vol. 245, no. 05, pp. 45–90, 2005.
- [211] L. A. Ambattu, A. Gelmi, and L. Y. Yeo, “Short-Duration High Frequency MegaHertz-Order Nanomechanostimulation Drives Early and Persistent Osteogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells,” *Small*, vol. 2106823, p. 2106823, 2022.
- [212] I. Taskan, I. Ozyazgan, M. Tercan, H. Y. Kardas, S. Balkanli, R. Saraymen, U. Zorlu, and Y. Özügül, “A Comparative Study of the Effect of Ultrasound and Electrostimulation on Wound Healing in Rats,” *Plast. & Reconstr. Surg.*, vol. 100, no. Supplement 1, pp. 966–972, 1997.
- [213] P. Täufer, *Gepulste akustische Oberflächenwellen zur Stimulation von in vitro Wundheilung*. Bachelorarbeit, Universität Augsburg, 2022.
- [214] A. Janshoff, “Viscoelastic properties of epithelial cells,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 49, no. 6, pp. 2687–2695, 2021.
- [215] G. Tai, B. Reid, L. Cao, and M. Zhao, “Electrotaxis and Wound Healing: Experimental Methods to Study Electric Fields as a Directional Signal for Cell Migration,” in *Methods Mol. Biol.*, pp. 77–97, 2009.

- [216] D. Chen, Y. Sun, M. S. Gudur, Y.-S. Hsiao, Z. Wu, J. Fu, and C. X. Deng, “Two-Bubble Acoustic Tweezing Cytometry for Biomechanical Probing and Stimulation of Cells,” *Biophys. J.*, vol. 108, no. 1, pp. 32–42, 2015.
- [217] C. Yang, D. Chen, and X. Hong, “Estimation of viscoelastic properties of cells using acoustic tweezing cytometry,” *J. Ultrasound Med.*, vol. 35, no. 12, pp. 2537–2542, 2016.
- [218] H. Jo, K. Sipos, Y. M. Go, R. Law, J. Rong, and J. M. McDonald, “Differential effect of shear stress on extracellular signal-regulated kinase and N-terminal jun kinase in endothelial cells: G(i)2- and G β / γ - dependent signaling pathways,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 2, pp. 1395–1401, 1997.
- [219] C. Huang, K. Jacobson, and M. D. Schaller, “MAP kinases and cell migration,” *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. 20, pp. 4619–4628, 2004.
- [220] S. Tanimura and K. Takeda, “ERK signalling as a regulator of cell motility,” *J. Biochem.*, vol. 162, no. 3, pp. 145–154, 2017.
- [221] M. Zhang, L. Sun, X. Wang, S. Chen, Y. Kong, N. Liu, Y. Chen, Q. Jia, L. Zhang, and L. Zhang, “Activin B promotes BMSC-mediated cutaneous wound healing by regulating cell migration via the JNK-ERK signaling pathway,” *Cell Transplant.*, vol. 23, no. 9, pp. 1061–1073, 2014.
- [222] P.-P. Hsu, S. Li, Y.-S. Li, S. Usami, A. Ratcliffe, X. Wang, and S. Chien, “Effects of flow patterns on endothelial cell migration into a zone of mechanical denudation,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 285, no. 3, pp. 751–759, 2001.
- [223] A. H. Lewis and J. Grandl, “Mechanical sensitivity of Piezo1 ion channels can be tuned by cellular membrane tension,” *Elife*, vol. 4, 2015.
- [224] J. Wang, J. Jiang, X. Yang, G. Zhou, L. Wang, and B. Xiao, “Tethering Piezo channels to the actin cytoskeleton for mechanogating via the cadherin- β -catenin mechanotransduction complex,” *Cell Rep.*, vol. 38, no. 6, p. 110342, 2022.
- [225] S. R. Roberts, M. M. Knight, D. A. Lee, and D. L. Bader, “Mechanical compression influences intracellular Ca²⁺ signaling in chondrocytes seeded in agarose constructs,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 90, no. 4, pp. 1385–1391, 2001.
- [226] D. J. Webb, K. Donais, L. A. Whitmore, S. M. Thomas, C. E. Turner, J. T. Parsons, and A. F. Horwitz, “FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 6, no. 2, pp. 154–161, 2004.
- [227] X. Zhao and J.-L. Guan, “Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 8, pp. 610–615, 2011.

- [228] N. Mizrahi, E. H. Zhou, G. Lenormand, R. Krishnan, D. Weihs, J. P. Butler, D. A. Weitz, J. J. Fredberg, and E. Kimmel, “Low intensity ultrasound perturbs cytoskeleton dynamics,” *Soft Matter*, vol. 8, no. 8, p. 2438, 2012.
- [229] Y. Hu, J. M. Wan, and A. C. Yu, “Cytomechanical Perturbations during Low-Intensity Ultrasound Pulsing,” *Ultrasound Med. Biol.*, vol. 40, no. 7, pp. 1587–1598, 2014.
- [230] D. Leckband and J. de Rooij, “Cadherin Adhesion and Mechanotransduction,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 291–315, 2014.
- [231] E. H. Barriga and R. Mayor, “Adjustable viscoelasticity allows for efficient collective cell migration,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 93, pp. 55–68, 2019.
- [232] A. Brugués, E. Anon, V. Conte, J. H. Veldhuis, M. Gupta, J. Colombelli, J. J. Muñoz, G. W. Brodland, B. Ladoux, and X. Trepast, “Forces driving epithelial wound healing,” *Nat. Phys.*, vol. 10, no. 9, pp. 683–690, 2014.
- [233] T. Zulueta-Coarasa and R. Fernandez-Gonzalez, “Tension (re)builds: Biophysical mechanisms of embryonic wound repair,” *Mech. Dev.*, vol. 144, pp. 43–52, 2017.
- [234] C. M. Niessen, D. Leckband, and A. S. Yap, “Tissue Organization by Cadherin Adhesion Molecules: Dynamic Molecular and Cellular Mechanisms of Morphogenetic Regulation,” *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 2, pp. 691–731, 2011.
- [235] I. Pajic-Lijakovic and M. Milivojevic, “Viscoelasticity of multicellular surfaces,” *J. Biomech.*, vol. 60, pp. 1–8, 2017.
- [236] Y. A. Ayala, B. Pontes, D. S. Ether, L. B. Pires, G. R. Araujo, S. Frases, L. F. Romão, M. Farina, V. Moura-Neto, N. B. Viana, and H. Moysés Nussenzveig, “Rheological properties of cells measured by optical tweezers,” *BMC Biophys.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–11, 2016.
- [237] B. Fabry, G. N. Maksym, J. P. Butler, M. Glogauer, D. Navajas, N. A. Taback, E. J. Millet, and J. J. Fredberg, “Time scale and other invariants of integrative mechanical behavior in living cells,” *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, vol. 68, no. 4, pp. 1–18, 2003.
- [238] J. J. Fredberg and D. Stamenovic, “On the imperfect elasticity of lung tissue,” *J. Appl. Physiol.*, vol. 67, no. 6, pp. 2408–2419, 1989.
- [239] T. P. Kole, Y. Tseng, I. Jiang, J. L. Katz, and D. Wirtz, “Intracellular Mechanics of Migrating Fibroblasts,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 328–338, 2005.
- [240] P. Sollich, “Rheological constitutive equation for a model of soft glassy materials,” *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, vol. 58, no. 1, pp. 738–759, 1998.

- [241] F. Guilak, J. R. Tedrow, and R. Burgkart, “Viscoelastic Properties of the Cell Nucleus,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 269, pp. 781–786, mar 2000.
- [242] D. A. Flormann, C. Anton, M. O. Pohland, Y. Bautz, K. Kaub, E. Terriac, T. E. Schäffer, J. Rheinlaender, A. Janshoff, A. Ott, and F. Lautenschläger, “Oscillatory Microrheology, Creep Compliance and Stress Relaxation of Biological Cells Reveal Strong Correlations as Probed by Atomic Force Microscopy,” *Front. Phys.*, vol. 9, no. August, pp. 1–12, 2021.
- [243] T. Maresch, *Stimulation des Wachstums menschlicher Epithelzellen mittels akustischer Oberflächenwellen*. Bachelorarbeit, Universität Augsburg, 2023.
- [244] M. Schleicher, *Einfluss akustischer Oberflächenwellen auf das Zytoskelett lebender Epithelzellen*. Masterarbeit, Universität Augsburg, 2023.
- [245] Z. Yue, Y. Yu, B. Gao, D. Wang, H. Sun, Y. Feng, Z. Ma, and X. Xie, “Advances in protein glycosylation and its role in tissue repair and regeneration,” *Glycoconj. J.*, vol. 40, no. 3, pp. 355–373, 2023.
- [246] J. Gu and N. Taniguchi, “Potential of N-glycan in cell adhesion and migration as either a positive or negative regulator,” *Cell Adh. Migr.*, vol. 2, no. 4, pp. 243–245, 2008.
- [247] H. Läubli and L. Borsig, “Altered Cell Adhesion and Glycosylation Promote Cancer Immune Suppression and Metastasis,” *Front. Immunol.*, vol. 10, 2019.
- [248] L. Zhang and K. G. Ten Hagen, “The cellular microenvironment and cell adhesion: a role for O-glycosylation,” *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 39, no. 1, pp. 378–382, 2011.
- [249] C. Fernández-Ponce, N. Geribaldi-Doldán, I. Sánchez-Gomar, R. Navarro Quiroz, L. Atencio Ibarra, L. Gomez Escorcia, R. Fernández-Cisnal, G. Aroca Martinez, F. García-Cózar, and E. Navarro Quiroz, “The Role of Glycosyltransferases in Colorectal Cancer,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, no. 11, p. 5822, 2021.
- [250] V. N. Dobrovolsky and R. H. Heflich, “On the use of the T-REx™ tetracycline-inducible gene expression system in vivo,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 98, no. 3, pp. 719–723, 2007.
- [251] W. Hillen and A. Wissmann, “Tet repressor-tet operator interaction,” in *Protein-Nucleic Acid Interact.*, pp. 143–162, London: Macmillan Education UK, 1989.
- [252] A.-L. Luger, B. Sauer, N. I. Lorenz, A. L. Engel, Y. Braun, M. Voss, P. N. Harter, J. P. Steinbach, and M. W. Ronellenfitsch, “Doxycycline Impairs Mitochondrial Function and Protects Human Glioma Cells from Hypoxia-Induced Cell Death: Implications of Using Tet-Inducible Systems,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 5, p. 1504, 2018.

- [253] S. P. Palecek, J. C. Loftus, M. H. Ginsberg, D. A. Lauffenburger, and A. F. Horwitz, “Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness,” *Nature*, vol. 385, no. 6616, pp. 537–540, 1997.
- [254] E. N. Olson and A. Nordheim, “Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 5, pp. 353–365, 2010.
- [255] M. G. Mendez and P. A. Janmey, “Transcription factor regulation by mechanical stress,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 44, no. 5, pp. 728–732, 2012.
- [256] O. M. J. A. Stassen, T. Ristori, and C. M. Sahlgren, “Notch in mechanotransduction – from molecular mechanosensitivity to tissue mechanostasis,” *J. Cell Sci.*, vol. 133, no. 24, 2020.
- [257] S. Chigurupati, T. V. Arumugam, T. G. Son, J. D. Lathia, S. Jameel, M. R. Mughal, S.-C. Tang, D.-G. Jo, S. Camandola, M. Giunta, I. Rakova, N. McDonnell, L. Miele, M. P. Mattson, and S. Poosala, “Involvement of Notch Signaling in Wound Healing,” *PLoS One*, vol. 2, no. 11, p. e1167, 2007.
- [258] N. Sachan, V. Sharma, M. Mutsuddi, and A. Mukherjee, “Notch signalling: multifaceted role in development and disease,” *FEBS J.*, vol. 291, no. 14, pp. 3030–3059, 2024.
- [259] J. Thélou, P. Rossio, and B. Favier, “Notch signalling is linked to epidermal cell differentiation level in basal cell carcinoma, psoriasis and wound healing,” *BMC Dermatol.*, vol. 2, no. 1, p. 7, 2002.
- [260] V. M. Panin and K. D. Irvine, “Modulators of Notch signaling,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 609–617, 1998.
- [261] K.-I. Wada, K. Itoga, T. Okano, S. Yonemura, and H. Sasaki, “Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers,” *Development*, vol. 138, no. 18, pp. 3907–3914, 2011.
- [262] S. Dupont, L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giulitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, and S. Piccolo, “Role of YAP/TAZ in mechanotransduction,” *Nature*, vol. 474, no. 7350, pp. 179–183, 2011.
- [263] B. C. Heng, X. Zhang, D. Aubel, Y. Bai, X. Li, Y. Wei, M. Fussenegger, and X. Deng, “An overview of signaling pathways regulating YAP/TAZ activity,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 78, no. 2, pp. 497–512, 2021.
- [264] N.-G. Kim, E. Koh, X. Chen, and B. M. Gumbiner, “E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 29, pp. 11930–11935, 2011.

- [265] K. E. Worley, D. Shieh, and L. Q. Wan, “Inhibition of cell–cell adhesion impairs directional epithelial migration on micropatterned surfaces,” *Integr. Biol.*, vol. 7, no. 5, pp. 580–590, 2015.
- [266] T. Ma, X. Liu, H. Su, Q. Shi, Y. He, F. Wu, C. Gao, K. Li, Z. Liang, D. Zhang, X. Zhang, K. Hu, S. Li, L. Wang, M. Wang, S. Yue, W. Hong, X. Chen, J. Zhang, L. Zheng, X. Deng, P. Wang, and Y. Fan, “Coupling of Perinuclear Actin Cap and Nuclear Mechanics in Regulating Flow-Induced Yap Spatiotemporal Nucleocytoplasmic Transport,” *Adv. Sci.*, vol. 11, no. 11, 2024.
- [267] D.-H. Kim, A. B. Chambliss, and D. Wirtz, “The multi-faceted role of the actin cap in cellular mechanosensation and mechanotransduction,” *Soft Matter*, vol. 9, no. 23, p. 5516, 2013.
- [268] A. B. Chambliss, S. B. Khatau, N. Erdenberger, D. K. Robinson, D. Hodzic, G. D. Longmore, and D. Wirtz, “The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction,” *Sci. Rep.*, vol. 3, no. 1, p. 1087, 2013.
- [269] T. Panciera, L. Azzolin, M. Cordenonsi, and S. Piccolo, “Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, no. 12, pp. 758–770, 2017.
- [270] A. Elosegui-Artola, I. Andreu, A. E. Beedle, A. Lezamiz, M. Uroz, A. J. Kosmalka, R. Oria, J. Z. Kechagia, P. Rico-Lastres, A.-L. Le Roux, C. M. Shanahan, X. Trepate, D. Navajas, S. Garcia-Manyès, and P. Roca-Cusachs, “Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores,” *Cell*, vol. 171, no. 6, pp. 1397–1410.e14, 2017.
- [271] S. Piccolo, S. Dupont, and M. Cordenonsi, “The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond,” *Physiol. Rev.*, vol. 94, no. 4, pp. 1287–1312, 2014.
- [272] G. Halder, S. Dupont, and S. Piccolo, “Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 13, no. 9, pp. 591–600, 2012.
- [273] J. M. Goffin, P. Pittet, G. Csucs, J. W. Lussi, J.-J. Meister, and B. Hinz, “Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of α -smooth muscle actin to stress fibers,” *J. Cell Biol.*, vol. 172, no. 2, pp. 259–268, 2006.
- [274] C. Imashiro, B. Kang, Y. Lee, Y.-H. Hwang, S. Im, D.-E. Kim, K. Takemura, and H. Lee, “Propagating acoustic waves on a culture substrate regulate the directional collective cell migration,” *Microsystems Nanoeng.*, vol. 7, no. 1, p. 90, 2021.

- [275] Z. Zhang, S. Xia, and P. Kanchanawong, “An integrated enhancement and reconstruction strategy for the quantitative extraction of actin stress fibers from fluorescence micrographs,” *BMC Bioinformatics*, vol. 18, no. 1, p. 268, 2017.
- [276] K. Burridge and E. S. Wittchen, “The tension mounts: Stress fibers as force-generating mechanotransducers,” *J. Cell Biol.*, vol. 200, no. 1, pp. 9–19, 2013.
- [277] L. J. Peterson, Z. Rajfur, A. S. Maddox, C. D. Freel, Y. Chen, M. Edlund, C. Otey, and K. Burridge, “Simultaneous Stretching and Contraction of Stress Fibers In Vivo,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 15, no. 7, pp. 3497–3508, 2004.
- [278] P. Chugh and E. K. Paluch, “The actin cortex at a glance,” *J. Cell Sci.*, vol. 131, no. 14, 2018.
- [279] K. Kruse, J. F. Joanny, F. Jülicher, J. Prost, and K. Sekimoto, “Generic theory of active polar gels: a paradigm for cytoskeletal dynamics,” *Eur. Phys. J. E*, vol. 16, no. 1, pp. 5–16, 2005.
- [280] A. G. Clark, K. Dierkes, and E. K. Paluch, “Monitoring Actin Cortex Thickness in Live Cells,” *Biophys. J.*, vol. 105, no. 3, pp. 570–580, 2013.
- [281] J.-Y. Tinevez, U. Schulze, G. Salbreux, J. Roensch, J.-F. Joanny, and E. Paluch, “Role of cortical tension in bleb growth,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 44, pp. 18581–18586, 2009.
- [282] M. Maninová, M. P. Iwanicki, and T. Vomastek, “Emerging role for nuclear rotation and orientation in cell migration,” *Cell Adh. Migr.*, vol. 8, no. 1, pp. 42–48, 2014.
- [283] P. M. Davidson and B. Cadot, “Actin on and around the Nucleus,” *Trends Cell Biol.*, vol. 31, no. 3, pp. 211–223, 2021.
- [284] R. Rid, N. Schiefermeier, I. Grigoriev, J. V. Small, and I. Kaverina, “The last but not the least: The origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells,” *Cell Motil.*, vol. 61, no. 3, pp. 161–171, 2005.
- [285] T. Vallenius, “Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells,” *Open Biol.*, vol. 3, no. 6, p. 130001, 2013.
- [286] J. Weichsel, E. Urban, J. V. Small, and U. S. Schwarz, “Reconstructing the orientation distribution of actin filaments in the lamellipodium of migrating keratocytes from electron microscopy tomography data,” *Cytom. Part A*, vol. 81A, no. 6, pp. 496–507, 2012.
- [287] S. A. Koestler, S. Auinger, M. Vinzenz, K. Rottner, and J. V. Small, “Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 3, pp. 306–313, 2008.

- [288] T. Mseka, M. Coughlin, and L. P. Cramer, “Graded actin filament polarity is the organization of oriented actomyosin II filament bundles required for fibroblast polarization,” *Cell Motil.*, vol. 66, no. 9, pp. 743–753, 2009.
- [289] M. Inglebert, L. Locatelli, D. Tsvirkun, P. Sinha, J. A. Maier, C. Misbah, and L. Bureau, “The effect of shear stress reduction on endothelial cells: A microfluidic study of the actin cytoskeleton,” *Biomicrofluidics*, vol. 14, no. 2, 2020.
- [290] J. Wang, J. Heo, and S. Z. Hua, “Spatially resolved shear distribution in microfluidic chip for studying force transduction mechanisms in cells,” *Lab Chip*, vol. 10, no. 2, pp. 235–239, 2010.
- [291] D. Verma, F. Meng, F. Sachs, and S. Z. Hua, “Flow-induced focal adhesion remodeling mediated by local cytoskeletal stresses and reorganization,” *Cell Adh. Migr.*, vol. 9, no. 6, pp. 432–440, 2015.
- [292] M. Kim, H. Jang, and Y. Park, “Study on the Expansion Dynamics of MDCK Epithelium by Interstitial Flow Using a Traction Force-Measurable Microfluidic Chip,” *Materials (Basel)*, vol. 14, no. 4, p. 935, 2021.
- [293] U. Hampel, F. Garreis, F. Burgemeister, N. Eßel, and F. Paulsen, “Effect of intermittent shear stress on corneal epithelial cells using an in vitro flow culture model,” *Ocul. Surf.*, vol. 16, no. 3, pp. 341–351, 2018.
- [294] S. B. Khatau, C. M. Hale, P. J. Stewart-Hutchinson, M. S. Patel, C. L. Stewart, P. C. Searson, D. Hodzic, and D. Wirtz, “A perinuclear actin cap regulates nuclear shape,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 106, no. 45, pp. 19017–19022, 2009.
- [295] D. Liao, F. Li, D. Lu, and P. Zhong, “Activation of Piezo1 mechanosensitive ion channel in HEK293T cells by 30 MHz vertically deployed surface acoustic waves,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 518, no. 3, pp. 541–547, 2019.
- [296] X. Li, Y. Cheng, Z. Wang, J. Zhou, Y. Jia, X. He, L. Zhao, Y. Dong, Y. Fan, X. Yang, B. Shen, X. Wu, J. Wang, C. Xiong, L. Wei, X. Li, and J. Wang, “Calcium and TRPV4 promote metastasis by regulating cytoskeleton through the RhoA/ROCK1 pathway in endometrial cancer,” *Cell Death Dis.*, vol. 11, no. 11, p. 1009, 2020.
- [297] F. Lehne, T. Pokrant, S. Parbin, G. Salinas, J. Großhans, K. Rust, J. Faix, and S. Bogdan, “Calcium bursts allow rapid reorganization of EFhD2/Swip-1 cross-linked actin networks in epithelial wound closure,” *Nat. Commun.*, vol. 13, no. 1, p. 2492, 2022.
- [298] P. Atherton, F. Lausecker, A. Harrison, and C. Ballestrem, “Low-intensity pulsed ultrasound promotes cell motility through vinculin-controlled Rac1 GTPase activity,” *J. Cell Sci.*, vol. 130, no. 14, pp. 2277–2291, 2017.

- [299] S. Zhou, A. Schmelz, T. Seufferlein, Y. Li, J. Zhao, and M. G. Bachem, “Molecular Mechanisms of Low Intensity Pulsed Ultrasound in Human Skin Fibroblasts,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 52, pp. 54463–54469, 2004.
- [300] D. Raz, U. Zaretsky, S. Einav, and D. Elad, “Cellular Alterations in Cultured Endothelial Cells Exposed to Therapeutic Ultrasound Irradiation,” *Endothelium*, vol. 12, no. 4, pp. 201–213, 2005.
- [301] A. D. Bershadsky, N. Q. Balaban, and B. Geiger, “Adhesion-Dependent Cell Mechanosensitivity,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 677–695, 2003.
- [302] J. Kuo, “Mechanotransduction at focal adhesions: integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 17, no. 6, pp. 704–712, 2013.
- [303] R. Rezakhaniha, A. Agianniotis, J. T. C. Schrauwen, A. Griffa, D. Sage, C. V. C. Bouten, F. N. van de Vosse, M. Unser, and N. Stergiopoulos, “Experimental investigation of collagen waviness and orientation in the arterial adventitia using confocal laser scanning microscopy,” *Biomech. Model. Mechanobiol.*, vol. 11, no. 3-4, pp. 461–473, 2012.
- [304] S. I. Fraley, Y. Feng, R. Krishnamurthy, D.-H. Kim, A. Celedon, G. D. Longmore, and D. Wirtz, “A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 6, pp. 598–604, 2010.
- [305] A. Stamm, K. Reimers, S. Strauß, P. Vogt, T. Scheper, and I. Pepelanova, “In vitro wound healing assays – state of the art,” *BioNanoMaterials*, vol. 17, no. 1-2, pp. 79–87, 2016.
- [306] B. Illes, A. Fuchs, F. Gegenfurtner, E. Ploetz, S. Zahler, A. M. Vollmar, and H. Engelke, “Spatio-selective activation of nuclear translocation of YAP with light directs invasion of cancer cell spheroids,” *iScience*, vol. 24, no. 3, p. 102185, 2021.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich bei dieser Arbeit und in meiner gesamten Promotionszeit unterstützt haben:

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater **Prof. Dr. Christoph Westerhausen**, der mich glücklicherweise vor einigen Jahren als Bachelorandin in seine Biophysik-Gruppe aufgenommen und seitdem meine akademische und persönliche Entwicklung immer mit größtem Einsatz unterstützt hat. Ich bin sehr dankbar für unsere stets lehrreichen Diskussionen, die ansteckende Begeisterung für Forschung und Lehre, die finanzielle Unterstützung, die Hilfe bei allen Arbeiten, Anträgen, Papern, Vorträgen und Postern, die zahlreichen Empfehlungsschreiben und nicht zuletzt die vielen schönen Momente mit unserer Arbeitsgruppe (immer nach dem Motto „So jung kommen wir nicht mehr zusammen!“).

Ich bedanke mich sehr herzlich bei **Prof. Dr. Regina Fluhrer** für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank auch an **Prof. Dr. Joachim Rädler** für die Übernahme des Drittgutachtens.

Einen sehr großen Dank möchte ich auch **Prof. Dr. Achim Wixforth** aussprechen, der mich 2013 als Schülerin erstmals für die Experimentalphysik begeisterte und ohne den ich vielleicht nie zur Biophysik oder zum EP1-Lehrstuhl gekommen wäre. Danke für deine große Unterstützung - auch im Namen aller Studierenden, für die du stets ein offenes Ohr hast!

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei der **Hanns-Seidel-Stiftung** für die finanzielle und ideelle Förderung während meiner Promotion bedanken, beim **Büro für Chancengleichheit** der Universität Augsburg für die mehrfache finanzielle Unterstützung meiner Reisen sowie beim **CeNS** und der **DPG** für die spannenden Veranstaltungen, an denen ich teilnehmen durfte.

Ein riesiges Dankeschön geht an **Manuel Schleicher**, **Paul Täufer**, **Theresa Maresch** und **Franziska Zwolsky** - danke für die großartige Zusammenarbeit, euren tollen Einsatz für unsere Forschungsprojekte, die spannenden Ideen, Inspirationen und Diskussionen sowie natürlich all die lustigen Momente im Labor!

Ein lieber Dank geht auch an meine lieben Kollegen **Dr. Nicolas Färber**, **Simon Neidinger**, **Manuel Sirch**, **Michael Saule**, **Fabian Haunstetter**, **Antonia Adamo** und **Marina Huber** für den tollen Zusammenhalt, das großartige Arbeitsklima und all die schönen Momente auf Konferenzen, Workshops, Lehrstuhlseminaren, Weihnachtsfeiern, Paperbieren,

in der Lehre, im Labor oder einfach im Büro! Besonders bei **Simon** möchte ich mich für unsere spannenden fachlichen und philosophischen Diskussionen sowie die mentale Unterstützung in schwierigen Phasen bedanken!

Ein großes Dankeschön für die tolle Zusammenarbeit an alle Kooperationspartner, die ich besuchen durfte und die mich inspiriert und mir spannende Dinge über ihre jeweiligen Fachbereiche beigebracht haben: **Christine Schlosser** und **Prof. Dr. Regina Fluhrer** vom Lehrstuhl für Biochemie der Uni Augsburg, **Dr. Laura Rihani** und **Florian Krabichler** vom Lehrstuhl für Anatomie der Uni Augsburg, **Dr. Emre Polat** von der Herz- und Thoraxchirurgie des Uniklinikum Augsburg und besonders an **Prof. Dr. Hanna Engelke** und **Anderson Massahiro de Campos** vom Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie an der Universität Graz. Danke auch an die gesamte Arbeitsgruppe der **Technischen Biologie** für unsere schönen Seminare in Sion und die anregenden Diskussionen (Wie macht der Bär?).

Ein großer Dank gilt auch dem Team vom Lehrstuhl für Experimentalphysik 1, das mich jahrelang bei allen meinen Fragen zu SAW, bei Bestellungen und technischen Problemen unterstützt hat, besonders **Dr. Andreas Hörner**, **Andreas Spörhase**, **Sidonie Lieber** und **Stephan Eberle**. Ein besonderer Dank geht auch an die „vorherige Doktorandengeneration“ **Dr. Manuel Brugger**, **Dr. Lukas Schnitzler**, **Dr. Anna Jötten**, **Dr. Andrej Kamenac** und **Joshua Winkeljann**, deren gute Beispiele, Betreuung und Vorarbeiten diese Arbeit zu großen Teilen mitinspiriert haben - wir vermissen euch und EP1!

Ein großer Dank auch an den gesamten Lehrstuhl für Physiologie, besonders **Prof. Dr. Rudolf Schubert** für seine Unterstützung und den stets lehrreichen Input zu meiner Forschung, **Lauren Jünger-von Beesten** und **Stefanie Kunze** für die Navigation durch den Urwald der Uni-Bürokratie und natürlich **Martin Richtsteig** für seine Zell-Expertise, die Erfüllung meiner Bestellwünsche und die lustigen Gespräche im Labor bzw. an der Kaffeemaschine!

Danke auch an **Michelle Lienhart** und **Prof. Dr. Rainer Lienhart** für ihren Beitrag, der in dieser Arbeit die automatisierte Analyse Hunderter Wundheilungsvideos ermöglicht hat. An **Michelle**, **Sophie Mauritz** und **Nele Weltsch** geht natürlich auch noch ein großes Dankeschön, dass ihr immer für mich da seid, für eure mentale Unterstützung und die Sprachnachrichten, über die ich mich in den Schreibpausen immer sehr gefreut habe! Ein besonderer Dank geht weiterhin an **Baghi** und **Louie** für ihre *paw*-sitive Unterstützung und ihren unermüdlichen Einsatz für eine produktive Arbeitsatmosphäre im Home-Office.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei **meinen Eltern** bedanken (die mir die Begeisterung für das Schreiben vererbt haben) und meinem Mann **Christof Baumgartner**, die immer für mich da sind und mir mit Rat und Tat zur Seite stehen - danke für eure Unterstützung!

Publikationsliste

1. Brugger M.S., Baumgartner K., Mauritz S.C.F., Gerlach S.C., Röder F., Schlosser C., Fluhner R., Wixforth A. and Westerhausen, C.: **Vibration enhanced cell growth induced by surface acoustic waves as in vitro wound healing model.** *PNAS*, 2020. [10.1073/pnas.2005203117](https://doi.org/10.1073/pnas.2005203117)
2. Schnitzler L.G., Baumgartner K., Kolb A., Braun, B. and Westerhausen, C.: **Acetylcholinesterase activity influenced by lipid membrane area and surface acoustic waves.** *Micromachines*, 2022. [10.3390/mi13020287](https://doi.org/10.3390/mi13020287)
3. Baumgartner K., Mauritz S.C.F., Angermann S., Brugger M.S. and Westerhausen C.: **One-dimensional acoustic potential landscapes guide the neurite outgrowth and affect the viability of B35 neuroblastoma cells.** *Physical Biology*, 2022. [10.1088/1478-3975/ac70a1](https://doi.org/10.1088/1478-3975/ac70a1)
4. Baumgartner K. and Westerhausen C.: **Recent advances of surface acoustic wave-based sensors for noninvasive cell analysis.** *Current Opinion in Biotechnology*, 2023. [10.1016/j.copbio.2022.102879](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102879)
5. Baumgartner K., Täufer P., Lienhart M., Lienhart R. and Westerhausen C.: **Pulsed surface acoustic waves accelerate wound healing and reveal new parameter limits for cell stimulation in vitro.** *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2024. [10.1088/1361-6463/ad18fa](https://doi.org/10.1088/1361-6463/ad18fa)
6. Baumgartner K., Schleicher M., De Campos A.M., Täufer P., Engelke H. and Westerhausen C.: **Actin filament and cell orientations align with surface acoustic wave propagation and cell migration in vibration-enhanced wound healing.** *Eingereicht* (2024).
7. Baumgartner K., Polat E., Girdauskas E. and Westerhausen C.: **Aorta-on-a-SAW-Chip: Acoustic streaming generated by surface acoustic waves affects human endothelial cells as an in vitro aorta model.** *In Vorbereitung*.