

**Der Einfluss von Konstituenten der
extrazellulären Matrix und motogener Mediatoren
auf Parameter der epithelialen Migration**

**Dynamik von Lamellipodien und Ausbildung von Filopodien und des
„Migration Track“ in humanen epidermalen Keratinocyten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Gregor Gorojans

aus

Sankt Augustin

Bonn, August 2006

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Volker Herzog
2. Referent: PD. Dr. Gregor Kirfel

Tag der Promotion: 30.10.2006

**Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert**

Meiner Mutter

Meinem Vater

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen erschienen:

Abstracts:

- 2006 Gorojans G., Felthaus O, D. Polaček, Herzog V., Kirfel G.
New Aspects in Filopodiodynamics: The Dependence on Substrates of fingerlike Structures in Migration of Human Keratinocytes.
(3rd DFG-Research Group Symposium on "Keratinocytes - Proliferation and Differentiation in the Epidermis", Bonn, April 2006)
- 2004 Rigort, A, Grünewald, J, Gorojans, G., Herzog, V, Kirfel G.
Biological nanostructures: migration tracks of human epidermal keratinocytes.
(2nd International DFG Symposium Cell Migration in Development and Disease, Karlsruhe)

Posterbeiträge:

- 2006 Gorojans G., Felthaus O., Polaček D., Herzog V., Kirfel G.
Filopodia dynamics of migrating human keratinocytes depend on the substrate composition and are regulated by motogenic growth factors
(3rd DFG-Research Group Symposium on "Keratinocytes - Proliferation and Differentiation in the Epidermis", Bonn, April 2006)
- 2004 Rigort, A., Grünewald, J., Gorojans, G., Herzog V. and G. Kirfel.
Biological nanostructures: migration tracks of human epidermal keratinocytes.
(2nd International DFG Symposium Cell Migration in Development and Disease, Karlsruhe, October 2004)

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a <u>d</u>isintegrin and <u>m</u>etalloprotease</i>
COLL I	Kollagen I
COLL IV	Kollagen IV
CPD	Kritisch Punkt Trocknung (<i><u>c</u>ritical <u>p</u>oint <u>d</u>rying</i>)
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
FN	Fibronektin
g	Gramm
h	Stunde
HD	Hemidesmosomen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAM	Laminin
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
MMP	Matrix-Metallo-Protease
NHK	normale humane Keratinocyten
nm	Nanometer
nM	Nanomol
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i><u>p</u>hosphate <u>b</u>uffered <u>s</u>aline</i>)
PY	Phosphotyrosin
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
RGD	Arg-Gly-Asp
sec	Sekunden

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	4
Veröffentlichungen.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung	10
1.1 Allgemeine Grundlagen der Zellmigration	11
1.2 Biomedizinische Bedeutung der Zellmigration	14
1.2.1 Embryogenese	14
1.2.2 Wundheilung	16
1.2.3 Metastasierung.....	17
1.3 Zelladhäsion.....	19
1.3.1 Integrine	19
1.3.2 Fokalkontakte.....	20
1.3.3 Hemidesmosomen	21
1.3.4 ECM und Signalwege.....	22
1.4 Membranprotrusionen	25
1.4.1 Lamellipodien und „Membrane Ruffles“	25
1.4.2 Filopodien.....	27
1.4.3 Molekulare Grundlagen der Lamellendynamik: Aktin-Polymerisation .	29
1.5 Migrationsspur.....	32
1.6 Motogene Mediatoren	33
1.7 Ziele der Arbeit: Regulation der Migration durch ECM und motogene Mediatoren	36
2. Material und Methoden	38
2.1 Material	38
2.1.1 Lösungen für die Zellkultur	38
2.1.2 Immunfluoreszenzmarkierung und Elektronenmikroskopie.....	39
2.1.3 Matrixproteine und Motogene.....	39
2.1.4 Primäre Antikörper	39
2.1.5 Sekundäre Antikörper	40
2.1.6 Weitere Verbrauchsmaterialien	40
2.1.7 Geräte	40
2.1.8 Software	41
2.2 Methoden	41
2.2.1 Zellkultur.....	41
2.2.2 Beschichtung.....	42
2.2.3 Stimulation mit Wachstumsfaktoren	43
2.2.4 Immunmarkierung	43
2.2.5 REM-Präparation	43
2.2.5.1 Auswertungsmethoden für REM-Bilder	44
2.2.5.2 Ermittlung der Dichte von Filopodien sowie „Retracting Fibers“	45
2.2.5.3 Ermittlung des Durchmesser von Filopodien und „Retracting Fibers“ sowie der relativen und absoluten Filopodienlänge	45
2.2.5.4 Ermittlung der Zellfläche sowie Migrationsspurlängen und -flächen	46
2.3 Quantifizierung der β 1-Integrin-Expression auf verschiedenen ECM-Substraten.....	47
2.3.1 Immunfluoreszenz.....	48
2.4 Längen- und Flächen-Vergleich der β 1-Integrinmarkierung am EM	48

2.5	Lichtmikroskopische Untersuchung zur Expression von ECM-Proteinen auf verschiedenen ECM-Substraten über die Zeit	49
2.5.1	„Live Cell Imaging“	50
2.5.1.1	Stunden-Filme	50
2.5.2	SACED.....	51
2.5.3	Mathematische Analysen	52
3.	Ergebnisse	53
3.1	Einfluss der ECM auf die Lamellendynamik	53
3.1.1	Geschwindigkeit der Lamellipodienprotrusionen	53
3.1.2	Geschwindigkeit der Lamellipodienretraktionen	54
3.1.3	Geschwindigkeit der „Membrane Ruffles“	55
3.1.4	Frequenz der Bildung von„Membrane Ruffles“.....	57
3.1.5	Dauer der Lamellipodienprotrusionen	58
3.1.6	Geschwindigkeit der Migration	59
3.2	Migrationsspuren („Migration Tracks“) als Indikator für die Effizienz der Migration	60
3.2.1	Einfluss von ECM Komponenten auf die Migrationsspur	60
3.2.2	Verlust an β 1-Integrin	61
3.2.3	Verlust an β 1-Integrin im Verhältnis zur Spurlänge	62
3.2.4	Vergleich der Länge und Fläche des „Migration Tracks“ anhand der Immunfluoreszenz und im REM.....	64
3.3	Einfluss des Substrats auf die Synthese und Sekretion von Matrixproteinen.....	66
3.3.1	Fibronectinexpression auf verschiedenen Substraten.....	67
3.3.2	Laminin Expression auf verschiedenen Substraten	69
3.3.3	Kollagen IV Expression auf verschiedenen Substraten.....	70
3.4	Effekte der Mitogene EGF und TGF- β 1 auf die Migration und Motilität	72
3.4.1	Einfluss der Mitogene auf die Migrationsgeschwindigkeit	72
3.4.2	Effekte von EGF und TGF- β 1 auf die Lamellendynamik	74
3.4.2.1	Protrusionsgeschwindigkeiten unter Einfluss der motogenen Mediatoren.....	75
3.4.2.2	Die Persistenz der Lamellipodienprotrusionen unter Einfluss von Motogenen.....	76
3.4.2.3	Der Einfluss motogener Mediatoren auf die Frequenz von „Membrane Ruffles“	77
3.4.2.4	Geschwindigkeit von „Membrane Ruffles“ unter Einfluss der Motogenen.....	79
3.4.3	Der Einfluss von motogenen Mediatoren auf die Migrationsspur	80
3.4.3.1	EGF und TGF- β 1 und deren Einfluss auf die Länge der Migrationsspur	81
3.4.3.2	Abhängigkeit der Fläche des „Migration Track“ von motogenen Mediatoren.....	82
3.4.4	Der Einfluss der Motogene auf die Zellfläche.....	84
3.4.5	Gerichtete Migration von Keratinocyten unter Einfluss verschiedener Konzentrationen der Wachstumsfaktoren.....	85
3.5	Effekte der Wachstumsfaktoren EGF und TGF- β 1 auf Filopodien	86
3.5.1	Filopodiendichte	86
3.5.2	Vergleich der Filopodiendichte mit der Dichte von „Retracting Fibers“	87
3.5.3	Ermittlung der relativen und absoluten Filopodienlänge.....	88
3.5.3.1	relative Filopodienlänge.....	88
3.5.3.2	absolute Filopodienlänge.....	89

3.5.3.3	Vergleich der relativen und absoluten Filopodienlänge	90
3.5.4	Durchmesser unterschiedlicher Filopodientypen sowie der „Retracting Fibers“	91
3.5.4.1	Zusammenfassung der untersuchten Komponenten	92
3.6	Einfluss von Konstituenten der ECM auf Filopodien.....	93
3.6.1	Einfluss einzelner ECM-Konstitution auf die Filopodienlänge	93
3.6.2	Anzahl der FilopodieFilopodienanzahl unter Einfluss der ECM- Konstituenten.....	94
3.6.3	Die Zellfläche in Abhängigkeit der ECM.....	95
3.6.4	Filopodiendichte	96
3.6.5	Länge der „Retraction Fibers“ unter Einfluss der ECM-Konstituenten.	97
3.7	Korrelationsanalyse.....	99
4.	Diskussion	102
4.1	Dynamik von Lamellipodien	103
4.1.1	Einfluss von Konstituenten der ECM.....	103
4.1.2	Einfluss von motogenen Mediatoren	104
4.2	Ausbildung von Filopodien und ihre Abgrenzung gegen „Retracting Fibers“.....	105
4.3	Ausbildung des „Migration Track“	107
4.4	Korrelation der Daten	110
4.5	Zusammenfassung.....	112
5.	Literaturverzeichnis	114

1. Einleitung

Zellmigration ist ein Prozess, bei dem die Zelle eine aktive gerichtete Ortsveränderung vollzieht. Die Zellmigration kommt ubiquitär bei Einzellern und innerhalb vielzelliger Organismen im gesamten Tierreich vor. Grundsätzlich werden zwei unterschiedliche Arten der Zellbewegung unterschieden: 1. die Fortbewegung durch Cilien und 2. die amöboide Bewegung. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Form der zellulären Migration, die zur amöboiden Bewegung gerechnet wird. Diese findet man bereits bei Protozoen, wie z. B. Amöben („amöboide Bewegung“) und bei einfachsten Metazoen, zum Beispiel den Coelenteraten (Hohltieren). Bei vielzelligen Organismen kommt der Migration eine essentielle Bedeutung bei zahlreichen lebenswichtigen Vorgängen zu: Beispiele dafür sind die Embryogenese, bei der während der Gastrulation mesodermale Zellen durch den Urmund in das Blastocoel einwandern und die Organogenese, bei der Vorläuferzellen durch Migration an ihren Bestimmungsort gelangen müssen. Außerdem spielen auch in adulten Organismen migratorische Prozesse von Zellen eine wichtige Rolle: Leukocyten und Makrophagen dringen in inflammatorisches Gewebe ein, um dort Infektionen einzudämmen und pathogene Mikroorganismen zu phagozytieren. Ein weiteres Beispiel, ist die Migration von epidermalen Keratinocyten im Rahmen der Wundheilung der Haut. Ein komplexer, zellulärer Kontrollapparat steuert die Migrationsprozesse, wobei lösliche Mediatoren, Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) und Wechselwirkungen mit benachbarten Zellen (Zell-Zell-Kontakte) regulatorische Effekte ausüben. Dadurch wird gewährleistet, dass die aktive Ortsveränderung von Zellen nur zu bestimmten Zeiten und an definierten Orten stattfindet. Bei einer Fülle pathologischer Veränderungen ist dieser kontrollierte Ablauf jedoch gestört, wodurch sich aus fehlerhaften Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen oder dem Fehlen bestimmter löslicher Mediatoren Störungen in Form unkontrollierter oder stark veränderter Migration ergeben. Eine „loss of function“ Mutation dieser Komponenten kann bei Gewebszellen zur Entstehung von Tumorzellen führen, die den Gewebeverband verlassen können und dazu befähigt werden unter Metastasenbildung in anderes Gewebe einzudringen (siehe Kapitel 1.2.3). Nach Verletzung der Haut ist eine entscheidende Grundlage für ihre Reepithelialisierung und Regeneration das Einwandern von Keratinocyten aus dem Wundrandbereich in das betroffene Wundareal. Die extrazellulären Bestandteile (Substrate), die für den Translokationsprozess der Keratinocyten verantwortlich sind,

deren Einfluss auf verschiedene Parameter der Migration wie Geschwindigkeit, Länge und Fläche der Migrationsspur und der mögliche Einfluss von Differenzierungszuständen, werden in der vorliegenden Dissertation diskutiert. Zunächst werden die allgemeinen Grundlagen der Zellmigration und der dafür notwendigen biologischen Prozesse erläutert.

1.1 Allgemeine Grundlagen der Zellmigration

Zellmigration verstehen wir als den koordinierten Ablauf unterschiedlicher, komplexer Teilprozesse. Voraussetzung für die Zellmigration ist zunächst die morphologische Polarisierung der Zelle und damit einhergehend die Ausbildung einer funktionellen Asymmetrie zwischen Vorder- und Hinterende. Im Frontbereich der Zellen kommt es zur Bildung von Membranprotrusionen in Form flächiger Lamellipodien und fingerförmiger Filopodien und zur Ausbildung neuer adhäsiver Fokalkontakte zwischen der Zelle und der extrazellulären Matrix (Abb. 1.1; 1.2). Die für die Protrusionen der Lamellipodien und Filopodien benötigte Kraft entsteht durch

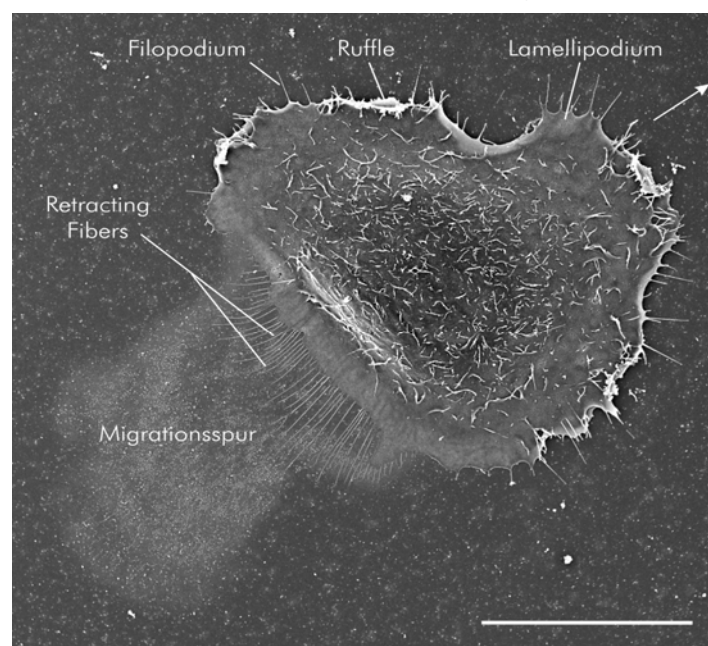


Abb. 1.1: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung eines polarisierten Keratinozyts. An der Zellfront kommt es zur Bildung von Protrusionen, von fingerförmigen Filopodien und den flächigen Lamellipodien. Beim Rückzug der Lamelle bilden sich Membranaufwürfe, so genannte „Membrane Ruffles“. Am rückwärtigen Pol der Zelle sind die „Retracting Fibers“. Dahinter ist die von der Zelle zurückgelassene Migrationsspur zu erkennen. Der Pfeil visualisiert die Bewegungsrichtung. Balken: 20 µm. (Aufnahme Rigort, A., 2002).

Polymerisation von G-Aktin zu Aktinfilamenten und wird über diese Kontaktstellen auf die Umgebung übertragen (Kaverina et al., 2002; Lauffenburger und Horwitz, 1996; Svitkina und Borisy, 1999). Im Anschluss an den Aufbau neuer Fokalkontakte erfolgt eine Myosin-getriebene Kontraktion des Zellkörpers. Synchron zur Kontraktion muss am Hinterende die Ablösung der Zelle von der extrazellulären Matrix (ECM) erfolgen („Rear Detachment“), um eine Netto-Bewegung zu ermöglichen. Für die Ablösung vom Substrat sind sowohl physikalische Kräfte durch Kontraktionen, die durch Aktinfilamente und Myosin II erreicht werden, als auch biochemische Vorgänge wie proteolytische Spaltungen der Adhäsionsproteine notwendig. Diese Spaltung kann 1. extrazellulär durch Lösung der Integrine vom Substrat und 2. durch eine intrazelluläre Spaltung der Adapterproteine von Integrinen zum Aktincyto skelett erfolgen. Morphologisch zeichnet sich das Zellhinterende bei der Migration durch charakteristische „Retracting Fibers“ aus. Es handelt sich dabei um 50-100 nm dünne, meist parallel angeordnete, tubuläre Zellextensionen, die bei Keratinocyten eine Länge von 40 µm erreichen können. Dies kommt physikalisch zustande, wenn die Adhäsionskraft der Substratrezeptoren (dazu gehören Integrine, APP und andere Glykoproteine) höher ist als die von der Zelle aufgewendete Kraft. Bei langsam wandernden Zelltypen, zum Beispiel Fibroblasten, wurde beobachtet, dass es beim Ablösen der Zelle vom Substrat ausgehend vom rückwärtigen Pol zum Verlust von zelleigenem Material kommt und sich dadurch eine Migrationsspur bildet (Bard und Hay, 1975; Chen, 1981; Lauffenburger und Horwitz, 1996). Dieser Vorgang des „Rear Detachment“ wurde auch als „membrane ripping“ beschrieben, weil dabei kleine Membranfragmente zurückbleiben. Diese Membranfragmente wurden als Integrin-Makroaggregate bezeichnet, da sie in hoher Konzentration Membranproteine aus der Familie der Integrine enthielten (Kirfel et al., 2003; Lauffenburger und Horwitz, 1996). Daher sind eine optimale Zell-Substrat-Bindung und eine intakte Lamellendynamik für eine effiziente Migration zwingend erforderlich. Inzwischen wurde aber auch bei schnell wandernden Zelltypen, wie zum Beispiel den Keratinocyten, ein „Migration Track“ beschrieben (siehe Kapitel 1.5).

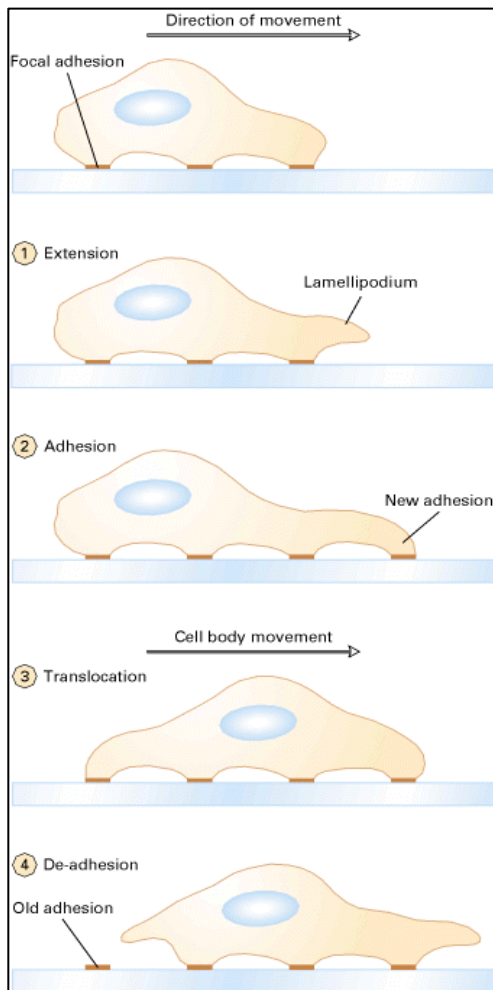


Abb. 1.2: Morphologische Veränderungen bei der Migration sind Voraussetzung für den aktive Ortwechsel. Als erstes erfolgt an der Zellfront in einem aktiven Prozess die Bildung eines Lamellipodiums (1). Am Ende dieser Membranausstülpung bilden sich über Integrine neue Zell-Matrix-Kontakte (2). Darauf und auf Myosin II basierenden Kontraktionen kommt es zu einer Verlagerung des Zellkörpers in Bewegungsrichtung (3). Die nun noch am Zellhinterende befindlichen Kontaktstellen zur Matrix müssen, um eine Netto-Bewegung zu ermöglichen, gelöst werden („De-adhesion = Rear Detachment“) (4). Diese gelösten Zellbestandteile bleiben als, im Mikroskop, sichtbare Fraktionen zurück („Old adhesion“ = „Migration Track“) (Molecular Cellbiology, Lodish et.al, 2002).

1.2 Biomedizinische Bedeutung der Zellmigration

Die Zellmigration ist ein Phänomen, dessen physiologische Konsequenzen sich aus biologischer und medizinischer Sicht positiv oder negativ auf den Organismus auswirken können. Im Folgenden wird dies durch drei Beispiele migratorischer Prozesse belegt.

1.2.1 Embryogenese

Bei voranschreitender Embryogenese vielzelliger Organismen konnte bei vielen Vertebraten und Avertebraten die Migration spezialisierter Zellen beobachtet werden. Bei Vertebraten einschließlich der Säuger kommt es in der frühen embryonalen Differenzierung zum Auswandern von Zellen aus der Neuralleiste. Die Neuralleisten-Zellen entwickeln sich aus dem Ektoderm des Embryos, wenn sich dieses unter Bildung der Neuralrinne einfaltet und sich zum Neuralrohr verschließt. Während aus dem Neuralrohr die Nervenzellen des Rückenmarks hervorgehen, liegen die Zellen der Neuralleiste lateral des Neuralrohrs und wandern von dort in verschiedene Bereiche des Embryos. Die ventrolateral auswandernden Zellen bilden Aggregate, aus denen verschiedene sensible und vegetative Ganglien hervorgehen, zum Beispiel die chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks. Um sich bewegen zu können, müssen die Zellen adhärieren. Man nimmt an, dass die Fibronektin-haltigen Fasern der Matrix wie „Gleitschienen“ wirken, an denen die Zellen entlangwandern. Wenn einem Embryo inhibitorische Antikörper gegen den Fibronektinrezeptor injiziert werden, sind die Neuralleisten-Zellen nicht mehr motil. Dasselbe Ergebnis erzielt man durch Injektion des Tripeptids RGD, die Bindungsdomäne des Rezeptors an Fibronektin, die, im Überschuss zugegeben, die RGD-vermittelte Adhäsion hemmt. Bei Vögeln und Reptilien entstehen die Urkeimzellen aus den Zellen des Epiblasten, die aus der zentralen Region der „Area pelucida“ in einen halbmondförmigen Bereich des endodermalen Abschnitts einwandern (Abb. 1.3 a). Diese Region wird als „Germinal Crescent“ bezeichnet, in der die primordialen Keimzellen proliferieren. Bei Vögeln und Reptilien werden diese Zellen mit Hilfe des Blutstromes transportiert. Zu diesem Zweck ist, ähnlich wie bei der Metastasierung und bei der Ausbreitung der Lymphocyten, die Diapedese der Zellen durch das Endothel erforderlich. Durch diese Form der Migration wird es den Zellen ermöglicht den Embryo zu erreichen. Im

Bereich der späteren Gonaden wechseln die Keimzellen erneut mittels Diapedese in den Embryo über (Abb. 1.3 b).

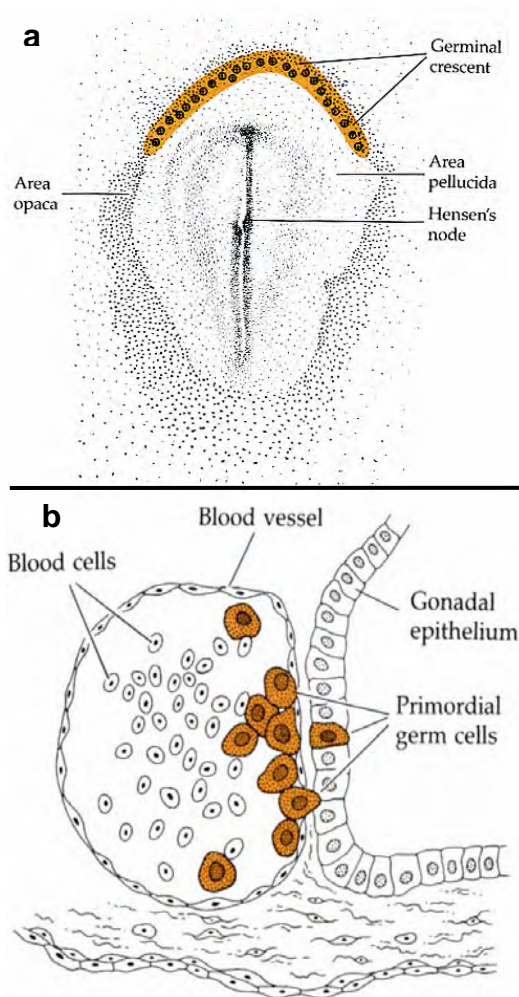


Abb. 1.3: Migration bei der Embryogenese. (a) Dorsale Ansicht eines Primitivstreifen-Stadiums (Stadium 4 nach Hamburger und Hamilton) der Entwicklung des Hühnerembryos, der die halbmondförmige Region zeigt (orange), in der die Keimzellen entstehen. (b) Schematischer Querschnitt zur Verdeutlichung der Diapedese der Keimzellen (orange) von Endothel in den Hühnerembryo (aus *Developmental Biology*, 5th Edition, Abb. 22.7 und 22).

1.2.2 Wundheilung

Eine der wichtigsten Aufgaben der Oberhaut (Epidermis) ist die Barriere-Funktion zwischen Organismus und Außenwelt. Durch diese Barriere wird der Organismus vor schädlicher Strahlung, Dehydratation, toxischen Substanzen und mechanischen Belastungen geschützt.

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges Plattenepithel, das hauptsächlich aus Keratinocyten besteht. Weitere Zelltypen mit spezifischen Aufgaben sind Pigment-Produzierende Melanozyten, immunkompetente Langerhans-Zellen und neuroendokrine Merkel-Zellen. Die basalen Keratinocyten sitzen der Basallamina auf, einer dünnen Lage Laminin- und Kollagen IV-reicher extrazellulärer Matrix (ECM). Sie sind mit dieser über Fokalkontakte (siehe Kapitel 1.3.2) und Hemidesmosomen (siehe Kapitel 1.3.3) verbunden (Borradori und Sonnenberg, 1999). Das Stratum basale (Basalzellschicht) enthält epidermale Stammzellen, die von ihren Tochterzellen, den Transit-Amplifying-Cells, umgeben sind (Potten, 1981), die sich wahrscheinlich noch 3 – 5-mal teilen können. Die gebildeten Keratinocyten durchlaufen während ihrer sukzessiven Wanderung vom Stratum basale zum Stratum corneum (Hornschicht) eine terminale Differenzierung (Adams und Watt, 1990), die in einer speziellen Form des Zelltods mündet und in der Abschuppung der verhornten Zellen ihren Abschluss findet.

Um die Funktion der Epidermis als Barriere aufrechterhalten zu können, muss der Organismus im Falle einer Verletzung zu einem schnellen Wundverschluss fähig sein. Zunächst wird die Wunde provisorisch durch einen Wundpfropf verschlossen (siehe Abb. 1.4), der aus vernetzten Fibrin-Molekülen (Clark et al., 1982) und kleinen Mengen der Zell-Adhäsionsproteine Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin (Bornstein und Sage, 2002) sowie zahlreichen eingebetteten Blutplättchen besteht. Degranulierende Blutplättchen setzen Wachstumsfaktoren und Cytokine frei, die als chemotaktische Signale auch die Migration von Keratinocyten vom Wundrand in das Wundbett induzieren (Martin, 1997). Das Expressionsprofil der stimulierten Keratinocyten für ECM-Rezeptoren aus der Integrin-Familie (s.u.) ändert sich, so dass eine Interaktion mit Adhäsionsproteinen, insbesondere Fibronectin, der freigelegten Unterhaut (Dermis) möglich wird. Die exprimierten Integrine umfassen den Fibronectinrezeptor $\alpha 5\beta 1$ und den Fibronectin- und Vitronectin-Rezeptor $\alpha v\beta 5$

und $\alpha_v\beta_6$ (Martin, 1997). Keratinocyten sind in der Lage, sowohl während ihrer Wanderung in das Wundbett als auch „in vitro“ eine Reihe von ECM-Komponenten wie Laminin, Laminin-5, Fibronektin und Kollagen IV zu synthetisieren und dadurch eine provisorische Basalmembran zu bilden, die die Wanderung nachfolgender Keratinocyten erleichtert (Frank und Carter, 2004; Gailit und Clark, 1994).

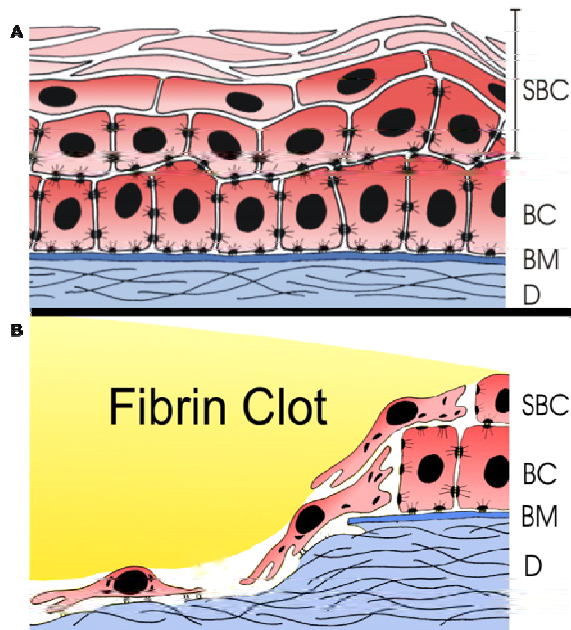


Abb. 1.4: Schematischer Aufbau unverletzter Haut (A) und Darstellung der Vorgänge bei der epidermalen Wundheilung (B). SBC= Suprabasale Zellschicht; BC= Basalzellschicht; BM= Basalmembran; D= Dermis.

Eine Wunde wird zunächst provisorisch mit einem Fibrin-Pfropf (Fibrin Clot) verschlossen. Die anschließende Einwanderung der Keratinocyten in das Wundbett erfolgt ausgehend von den basalen Zell-Lagen der Wundränder. Diese Keratinocyten lösen sich aus dem Zell-Verband und migrieren über die provisorische dermale Matrix unter dem Fibrin-Pfropf in das Wundareal ein.

1.2.3 Metastasierung

Unter dem Prozess der Metastasierung versteht man die Auswanderung von Tumorzellen aus dem Zellverband, ihre Penetration der epithelialen Basalmembran, die Invasion in das benachbarte Gewebe und die nachfolgende Wanderung über das Blut- oder Lymphsystem zu einem entfernten Organ sowie die dortige Etablierung eines sekundären Tumors, der Metastase (Abb. 1.5) (Weigelt et al., 2005). Nach der malignen Transformation einer Epithelzelle, die zur Bildung des primären Karzinoms geführt hat, scheinen bis zur Entstehung einer metastasierungsfähigen Zelle zunächst weitere Mutationen notwendig zu sein. Zur Bildung von Metastasen müssen Tumorzellen die Fähigkeit erlangt haben, sich vom Primärtumor abzulösen, die Basalmembran und das Bindegewebe zu penetrieren und in anderen Organen adhären zu werden. Ein zentrales Adhäsionsmolekül in epithelialen Zellen stellt E-Cadherin dar, das homophile Zell-Zell-Interaktionen vermittelt. Die verminderte

Expression von E-Cadherin führt im Verlauf einer EMT (Epithelialen Mesenchymalen Transition) zu einem Verlust von Zell-Zell-Kontakten und resultiert in einer veränderten Zellmorphologie und invasivem Wachstum (Radisky, 2005; Thiery, 2002). Innerhalb dieses Prozesses lösen sich Epithelzellen voneinander und nehmen das Aussehen von mesenchymalen Zellen (Fibroblasten) an (Behrens et al., 1989). Neben der Lösung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten spielt die Proteolyse der ECM eine zentrale Rolle im Rahmen der Metastasierung. Im Prozess der Proteolyse der ECM ist eine Kaskade von Enzymen involviert, die in Matrixmetalloproteinasen (MMP), Serinproteasen und Cathepsine unterteilt werden können.

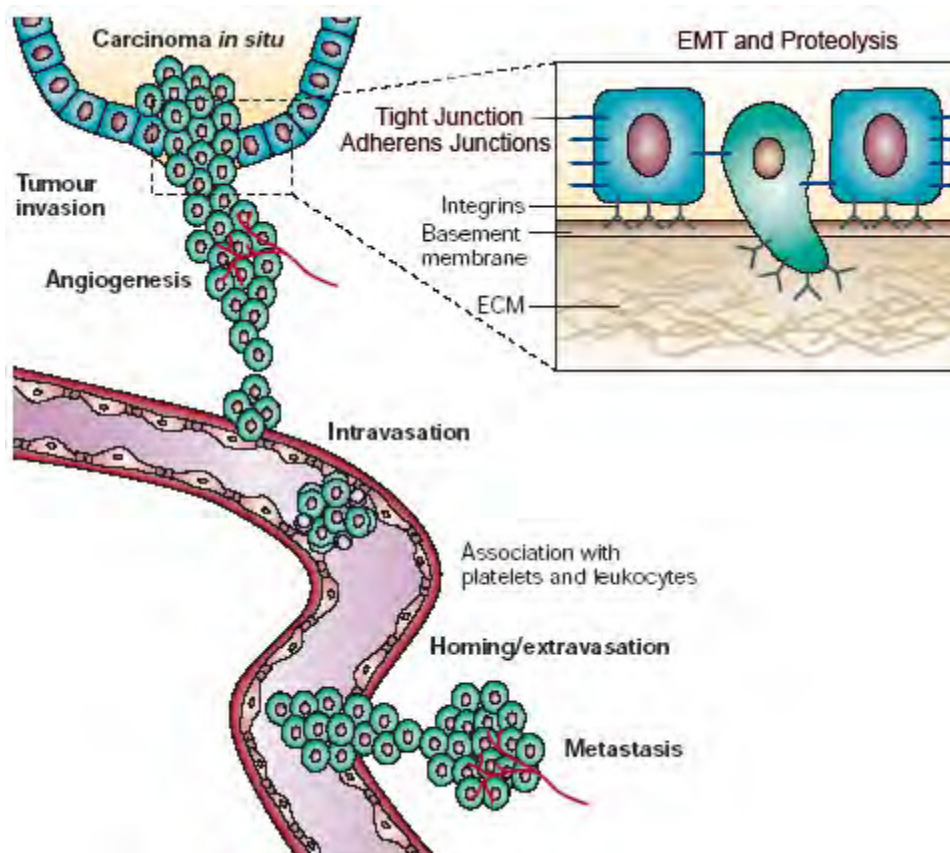


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Metastasierungsprozesses.

Hierbei wird aufgezeigt wie Zellen sich aus dem Verband des Primärtumors lösen, durch Proteolyse der ECM und Migration zum Gefäß-/Lymphsystem gelangen und durch dessen Penetration und des angrenzenden Gewebes eine Translokation bzw. Invasion erfolgt. Entscheidend hierfür ist stets eine ausreichende Angiogenese. (verändert nach (Guo und Giancotti, 2004))

Den membrangebundenen MMP, MT1-MMP und MT2-MMP wird neben ihrer proteolytischen Aktivität gegen Kollagene, Gelatine, Laminin, Fibronectin, Vitronectin und Aggrekan auch eine wichtige regulatorische Funktion zugeschrieben. Sie binden pro-MMP-2 an der Zelloberfläche und aktivieren das Enzym dort durch partielle

Proteolyse, wodurch die lokale ECM-Degradation an der Zelloberfläche noch verstärkt wird (Murphy und Knauper, 1997). Diese Degradation kann „in vitro“ durch Abbau einer künstlichen Matrix und der Bildung eines „Negative Track“ (siehe Kapitel 3.3.3; Abb. 3.16) nachgewiesen werden.

Nach erfolgter Lösung aus dem Zellverband und der proteolytischen Penetration der ECM beginnt der Prozess der Zellmigration. Der erste Schritt einer gerichteten Migration ist hier ebenfalls die Polarisierung der Zelle, um intrazellulär erzeugte Kräfte in eine gerichtete Bewegung des Zellkörpers umzusetzen zu können. Hierfür sind auch wieder eine intakte Adhäsion und Motogene von entscheidender Bedeutung.

1.3 Zelladhäsion

1.3.1 Integrine

Als Adhäsion wird die Verbindung der Zellen an die extrazelluläre Matrix über Glykoproteine bezeichnet. Dabei vermitteln unter anderem Integrine die Verbindung des Cytoskeletts über die Plasmamembran mit der ECM. Integrine bilden eine große Familie transmembraner Zell/Matrix-Adhäsionsrezeptoren. Ein Integrinmolekül besteht aus zwei nicht kovalent miteinander verbundenen Glykoproteine, die als α - und β -Untereinheit bezeichnet werden. Es handelt sich um Typ 1 Transmembranproteine mit einem „single-pass“ Transmembrandomäne. Über die große extrazelluläre Domäne binden Integrine unter anderem an zahlreiche ECM-Proteine wie die Kollagene, Fibronectin und die Laminine. Die intrazelluläre Domäne der β -Integrine bindet über die Ankerproteine Talin, α -Aktinin und Filamin direkt oder über Vinculin an Aktinfilamente und kann darüber Einfluss auf die Zellform und Ausbreitung nehmen (Calderwood et al., 2000; Choquet et al., 1997) und sowohl biochemische Signale als auch mechanische Kraft zur Fortbewegung der Zelle übertragen (siehe auch Abb. 1.12). Die α -Untereinheit ist an der Bindung zum Aktincytoskelett nicht beteiligt (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Die Bindung von Integrinen an ihre Liganden hängt von der extrazellulären Konzentration zweiwertiger Ionen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) ab. Die 24 unterschiedlichen α -Untereinheiten und 9 verschiedenen β -Untereinheiten bilden zahlreiche verschiedene Integrine, von denen wenigstens 8 verschiedene an Fibronectin und mindestens 5 an Laminin binden.

Bindung extrazellulärer Liganden an Integrine ändert die intrazelluläre Interaktion zwischen der α - und der β -Untereinheit. Andererseits hat eine veränderte intrazelluläre Interaktion zwischen der α - und der β -Untereinheit auch eine veränderte Affinität zu den extrazellulären Liganden zur Folge (Leisner et al., 1999).

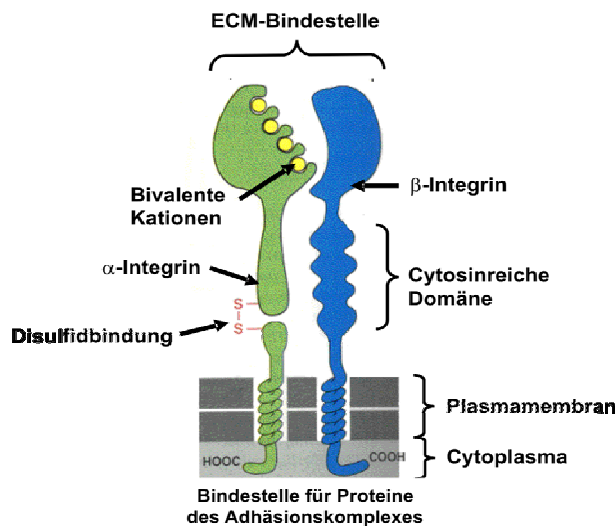


Abb. 1.6: Schematische Darstellung eines Integrin-Rezeptors.

Die Schemazeichnung stellt den Aufbau eines Integrin-Rezeptors mit seinen verschiedenen Domänen dar. (geändert nach Alberts: Molekularbiologie der Zelle, 1996).

1.3.2 Fokalkontakte

Durch die Bindung an ihre Liganden der ECM wird eine lokale Anhäufung der Integrine („Integrin-clustering“) bewirkt. Daraufhin werden Aktinfilamente und Signalproteine zu den Integrinen dirigiert und komplexe Adhäsionsstrukturen gebildet (Brakebusch und Fassler, 2003; Hynes, 2002) (siehe Abb. 1.8). Hierbei handelt es sich um hoch spezialisierte Verankerungspunkte zwischen Aktinfilamenten und der extrazellulären Matrix. In Bezug auf Größe und beteiligte Proteine können diese Strukturen sehr heterogen sein (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Kleinere, gerade gebildete Adhäsionsstrukturen werden meist als Fokalkomplexe bezeichnet. Sie sind punktförmig und von etwa einem μm Durchmesser. Diese können zu größeren Fokaladhäsionen heranreifen. Fokaladhäsionen sind länglich (2-5 μm). Es handelt sich um dynamische Strukturen, die einer aktiven und lokal gesteuerten Regulation unterliegen. An der Vorderseite migrierender Zellen werden durch die Integrin-ECM Interaktion Fokalkontakte gebildet. Diese tragen ihrerseits auch zu den Aktin-abhängigen Membranprotrusionen bei, sind also nicht nur ein der Protrusion nachfolgender Prozess. Am Zellhinterende lösen sich die Integrine vom Substrat und die Adhäsionskomplexe werden aufgelöst (Ballestrem et al., 2001;

Laukaitis et al., 2001) oder es bilden sich durch „Membrane Ripping“ und „Rear Detachment“ Makroaggregate, als Teil des „Migration Track“ (siehe Kapitel 1.5) (Kirfel et al., 2004; Rigort et al., 2004).

1.3.3 Hemidesmosomen

Hemidesmosomen sind Multi-Protein Komplexe, die das Intermediärfilamentsystem basaler Epithelzellen mit den Laminin Bestandteilen der darunterliegenden ECM verbinden (Abb. 1.7) (Borradori und Sonnenberg, 1999). Strukturell bestehen Hemidesmosomen aus mindestens fünf Komponenten. Drei dieser Komponenten sind Transmembranproteine:

1. Integrin $\alpha_6\beta_4$, das als Rezeptor für das ECM-Protein Laminin 5 fungiert (Litjens et al., 2006; Niessen et al., 1994; Stepp et al., 1990).
2. kollagenes BP180 („bullous phosphoigoid antigen“, auch als BPAG2 oder Kollagen Typ XVII bezeichnet) (Giudice et al., 1992; Litjens et al., 2006).
3. CD151, das zur Familie der Tetraspanine gehört (Sterk et al., 2000)

Die beiden anderen Komponenten, BP230 (auch als BPAG1 bezeichnet) (Litjens et al., 2006) und Plectin (Gache et al., 1996; Hieda et al., 1992), sind cytoplasmatische Proteine, die zur Plakin-Familie gehören.

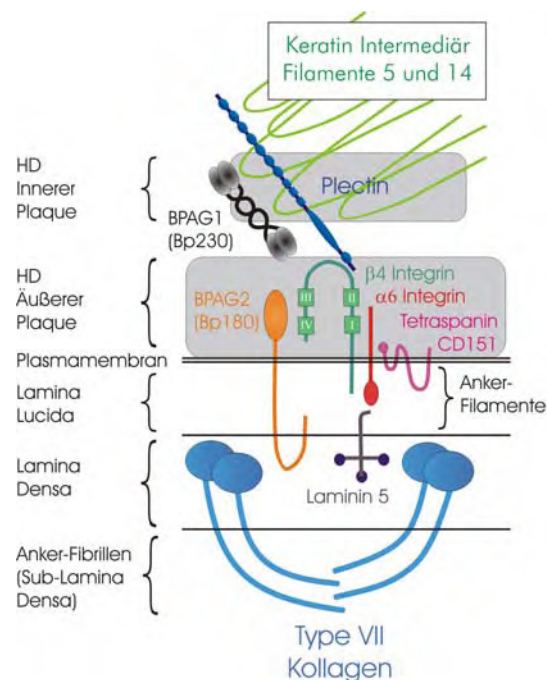


Abb. 1.7: Aufbau des Hemidesmosoms. (nach (Sawamura et al., 2004))

Die große cytoplasmatische Domäne des $\alpha_6\beta_4$ Integrins (> 1000 AS lang) ist für die Bildung der Hemidesmosomen essentiell (Murgia et al., 1998; Nievers et al., 1998). Sie enthält vier Fibronectin Typ III Wiederholungen („FNIII-repeats“), die durch Verbindungssequenzen voneinander getrennt sind. Durch Interaktionen mit dem ersten Paar dieser „FNIII-repeats“ und einem kleinen Teil der Verbindungssequenzen kommt es zu einer Rekrutierung von Plectin an die Hemidesmosomen und einer Konformationsänderung des β_4 Integrins, wodurch Bindungsstellen für weitere hemidesmosomale Proteine freigegeben werden. BP180 und BP230 interagieren mit dem zweiten Paar der „FNIII-repeats“ (Koster et al., 2003; Koster et al., 2004). Weiterhin lassen sich Hemidesmosomen in einen inneren und einen äußeren Plaques unterteilen. Proteine des inneren Plaques (BP230 und Plectin) stellen die Verbindung zu den Cytokeratinen des Intermediärfilamentsystems her, während die Transmembranproteine BP180, CD151 und $\alpha_6\beta_4$ Integrin die Verankerung mit der Basalmembran vermitteln (Litjens et al., 2006).

Die Bedeutung der Hemidesmosomen für die mechanische Festigkeit der Epidermis zeigt sich bei genetischen Defekten, die zum Verlust der α_6 oder β_4 Untereinheit führen können. Bei Patienten mit dem Phänotyp der PA-JEB („pyloric atresia associated with junctional epidermolysis bullosa“), kommt es infolge fehlender Hemidesmosomen zwischen Epidermis und Basalmembran zu Fragilität und Blasenbildung der Haut (Niessen et al., 1996; Ruzzi et al., 1997; Vidal et al., 1995).

1.3.4 ECM und Signalwege

Ein großer Teil des Volumens eines Gewebes wird von der extrazellulären Matrix (ECM) eingenommen. Diese besteht aus sezernierten Proteinen und Polysacchariden. Während es sich im Bindegewebe um eine lockere Anordnung der verschiedenen Matrixbestandteile handelt, bildet die ECM an der Grenze zur Epithelzellschicht eine dichte Basallamina aus. Die Basallamina zwischen Epidermis und Dermis besteht hauptsächlich aus Kollagen IV, Laminin, Perlecan (heparansulfathaltiges Proteoglycan) und Nidogen. Zellen binden mit ihren Oberflächenrezeptoren an die extrazelluläre Matrix, die erheblichen Einfluss auf das Verhalten der umgebenden Zellen nimmt. So führt der Verlust des Kontaktes mit der Basallamina bei Keratinocyten zu deren Differenzierung.

Die Kollagene sind eine Familie faserförmiger Proteine, die in allen vielzelligen Tieren vorkommen. Drei Kollagen-Polypeptidketten (α -Ketten) sind zu einer starren Helikalstruktur umeinander gewunden. Um die dichte Packung dieser Tripelhelix (Durchmesser 1,5 nm) zu ermöglichen, ist jede dritte Aminosäure in der Polypeptidkette ein Glycin. Prolin ist ebenfalls sehr häufig und stabilisiert durch seine Ringstruktur die Helixkonformation der einzelnen α -Ketten, bei denen es sich um eine linksgängige Helix mit 3 Aminosäuren pro Windung handelt. Die etwa 100 Aminosäuren langen α -Ketten bestehen aus der sich wiederholenden Sequenz Gly-X-Y, wobei es sich bei X häufig um Prolin und bei Y häufig um Hydroxyprolin handelt. Die etwa 25 verschiedenen α -Ketten, die jeweils von einem eigenen Gen codiert werden, bilden 20 bekannte verschiedene Tripelhelices aus. Fibrilläre Kollagene vom Typ I, II, III, V und XI lagern sich im extrazellulären Raum zu Kollagenfibrillen (Durchmesser 10-300 nm) zusammen, die sich wiederum zu Kollagenfasern (Durchmesser mehrere μm) verbinden können. Kollagene vom Typ IV und VII sind netzbildend.

Fibronektin ist ein großes Glykoprotein-Dimer, dessen Untereinheiten am C-Terminus über Disulfidbrücken verbunden sind. Es ist modular aufgebaut und enthält zahlreiche Wiederholungseinheiten. Eine etwa 2500 Aminosäuren lange Polypeptidkette besteht aus 12 Typ I Modulen (etwa 45 AS) mit Bindestellen für Kollagen und Fibrin, 2 Typ II Modulen (etwa 60 AS) mit Bindestellen für Kollagen und 15-17 Typ III Modulen (etwa 90 AS) mit Bindestellen für Integrine (RGD-Sequenz).

Laminine bestehen aus 3 Polypeptidketten (α , β und γ), die über Disulfidbrücken zu einem asymmetrischen Kreuz verbunden sind. 5 verschiedene α -Ketten und je 3 verschiedene β - und γ -Ketten bilden insgesamt 15 bekannte Trimere. Laminin enthält Bindestellen für Perlecan, Nidogen und Zelloberflächenrezeptoren. Ähnlich wie Kollagen IV können auch die endständigen Domänen von Laminin miteinander in Wechselwirkung treten und ein Geflecht bilden.

Die verschiedenen Proteine der extrazellulären Matrix nehmen über die Adhäsion Einfluss auf die Aktindynamik in der Zelle. Manche Substrate gestatten der Zelle eine effiziente Migration, während andere Substrate einen negativen Einfluss auf die Migrationsgeschwindigkeit haben. Unklar ist, wie die verschiedenen Motilitäts-Parameter von der Natur der ECM abhängen. Mithilfe gegenwärtig entwickelter Migrationsassays, z.B. des SACED-Assays, erwarten wir präzise Daten zu den Fragen.

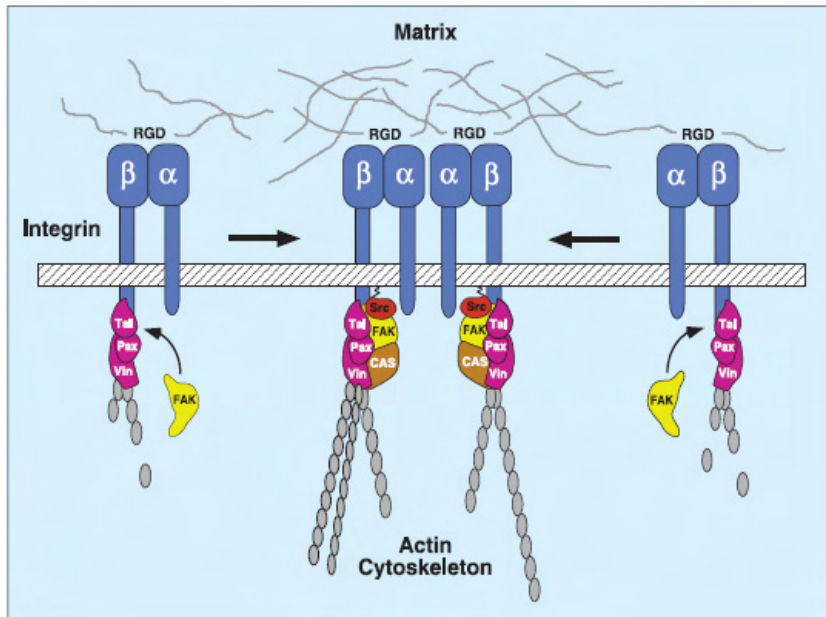


Abb. 1.8: Bindung der Integrine an die extrazelluläre Matrix bewirkt die intrazelluläre Anheftung an das Aktincytoskelett über Ankerproteine. Es kommt zum „Integrin-Clustering“ und zur Ausbildung von Fokalkontakten
 RGD: Arg-Gly-Asp; Tal: Talin; Pax: Paxillin; Vin: Vinculin; CAS: p130CAS
 (Verändert nach(Giancotti und Ruoslahti, 1999))

Im Rahmen von Zell-Matrix-Adhäsionen werden zahlreiche Signalwege aktiviert. Im Zusammenhang mit Proteinen der Rho-Familie und Zellmigration ist die Aktivierung der Fokalkadhäsionskinase (FAK), die verschiedene weitere Signalwege initiiert, von besonderer Bedeutung. FAK phosphoryliert Proteine, die als Effektoren für Rho-Proteine dienen (Bagrodia et al., 1998; Hasegawa et al., 1996; Manser et al., 1998). Integrin-Signalisierung über FAK unterstützt die Bindung von Talin an die PIP Kinase. Diese Komplexbildung aktiviert die PIP Kinase und dirigiert Talin zur Plasmamembran. Die Integrin-Bindedomäne des zur Membran geleiteten Talins wird durch die PIPK vermittelte lokale Produktion von PIP_2 aktiviert. Sowohl die Interaktion von PIPK mit Talin als auch die PIP_2 Produktion werden durch FAK verstärkt. Talin kann daraufhin an die cytoplasmatische Domäne von β -Integrin binden und die Verbindung zum Aktincytoskelett herstellen(Kim et al., 2003; Tadokoro et al., 2003). Weitere Proteine, die für die Bildung der Fokalkomplexe benötigt werden, sind von der durch Talin vermittelten PIP_2 Produktion abhängig. Talin löst darüber hinaus eine intrazelluläre Brücke zwischen α - und β -Untereinheit und verstärkt dadurch die Bindung der Integrine zur ECM (Garcia-Alvarez et al., 2003). Die Aktin bindenden Ankerproteine der durch „integrin-clustering“ gebildeten Fokalkomplexe, bilden eine Plattform für verschiedene Kinasen und ihre Substrate. Die kontraktile Stressfasern aus Aktin- und Myosin II-Filamenten sind über einen Komplex verschiedener Ankerproteine mit den Integrinen verbunden (Abb. 1.8).

In den Lamellipodien migrierender Zellen werden neue Fokalkomplex-Strukturen gebildet (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Diese Strukturen können entweder wieder abgebaut werden, während die Lamelle über sie hinwegwandert oder aber, in langsam wandernden Zellen, Rho-vermittelt zu Fokaladhäsionen reifen (Rottner et al., 1999). Für migrierende Zellen ist es wichtig, dass die Fokalkomplexe und Fokaladhäsionen einem „turnover“ unterliegen, da eine zu starke Adhäsion an das Substrat der Migration entgegenwirkt. Dies spiegelt sich in hoher Rho-Aktivität wider (Cox und Huttenlocher, 1998). Rac wird nicht nur für die Bildung der Fokalkomplexe benötigt (Allen et al., 1997; Nobes und Hall, 1995; Rottner et al., 1999), sondern ist auch an deren "turnover" beteiligt. Dies kann sowohl direkt über PAK (Zhao et al., 2000) als auch indirekt als Antagonist von Rho (Sander und Collard, 1999) geschehen.

1.4 Membranprotrusionen

1.4.1 Lamellipodien und „Membrane Ruffles“

Bei Lamellipodien handelt es sich um blattähnliche Strukturen, deren flächiges, orthogonal vernetztes Aktinfilament-Netzwerk in einer Ebene parallel zum Untergrund liegt. Diese Organisation erlaubt den Lamellipodien, die Membran auf breiter Ebene vorzuschieben (Ridley et al., 2003). In der lebenden Zelle kann in den Lamellipodien ein ähnliches Verhalten wie das Tretmühlenverhalten isolierter Aktinfilamente beobachtet werden. Hier sind die Minus-Enden in der Regel durch den Arp2/3-Komplex gegen Depolymerisation geschützt. Durch Cofilin werden aber bevorzugt die älteren Filamente in der D-Form destabilisiert. Während also am Leitsaum eine kontinuierliche Verlängerung der Aktinfilamente vonstatten geht, werden ältere Filamente wieder abgebaut. Dadurch wird ein Tretmühlenmechanismus des gesamten Filamentnetzwerks aufrechterhalten. Für die eigentliche Protrusion der Membran ist dabei nicht direkt die Aktinpolymerisation verantwortlich. Nach dem „brownian ratchet model“ werden am Leitsaum entstehende Filamente durch thermische Energie gekrümmt und gestaucht, wodurch in ihnen elastische Energie gespeichert wird. Darüber hinaus unterliegt auch die Membran thermischen Bewegungen, so dass neue Monomere angehängt werden, während sich die Membran temporär von der Filamentspitze entfernt. Wenn sich ein inzwischen

verlängertes Filament wieder entspannt, kann die gespeicherte elastische Energie den dauerhaften Vorschub der Membran bewerkstelligen (Pollard und Borisy, 2003; Ridley et al., 2003). Die daraus resultierende Lamellendynamik besteht aus der zyklischen Reihenfolge von Lamellipodien- und Filopodienprotrusion sowie deren Retraktion. Lamellipodien-Retraktion wird in der Regel von der Bildung von „Membrane Ruffles“ begleitet (Abb. 1.9). „Membrane Ruffles“ werden generell als Indikator des retrograden Flusses aktinreichen Materials angesehen, der bei allen motilen eukaryonten Zellen beobachtet wird (Abercrombie et al., 1971; Borm et al., 2005; Hinz et al., 1999b).

Diese kontrastreichen, wellenartigen Strukturen sind im Phasenkontrastmikroskop an der Zellfront und auf der Lamelle erkennbar. Die „Ruffles“ bewegen sich zentripetal in Richtung Zellkörper und verschwinden an der Grenze zwischen der Lamelle und dem Zellkörper. Ihre Struktur und molekulare Komposition wurden in unserem Labor detailliert untersucht und aufgeklärt (Borm et al., 2005). „Membrane Ruffles“ bestehen aus dichtgepackten Aktinfilamenten, die über die Adapterproteine Filamin und Ezrin, sowie den Regulatorkomplex ADF/Cofilin verbunden sind. Es konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit an „Membrane Ruffles“ als Parameter für eine sub-optimale Zelladhäsion verwendet werden kann. Dies resultiert aus der Erkenntnis, dass eine Bildung der „Ruffles“ infolge einer ineffektiven Integrin-Liganden Interaktion am Leitsaum der Lamelle erfolgt und sie daher als Abschnitt der Aktin Reorganisation bezeichnet werden können.

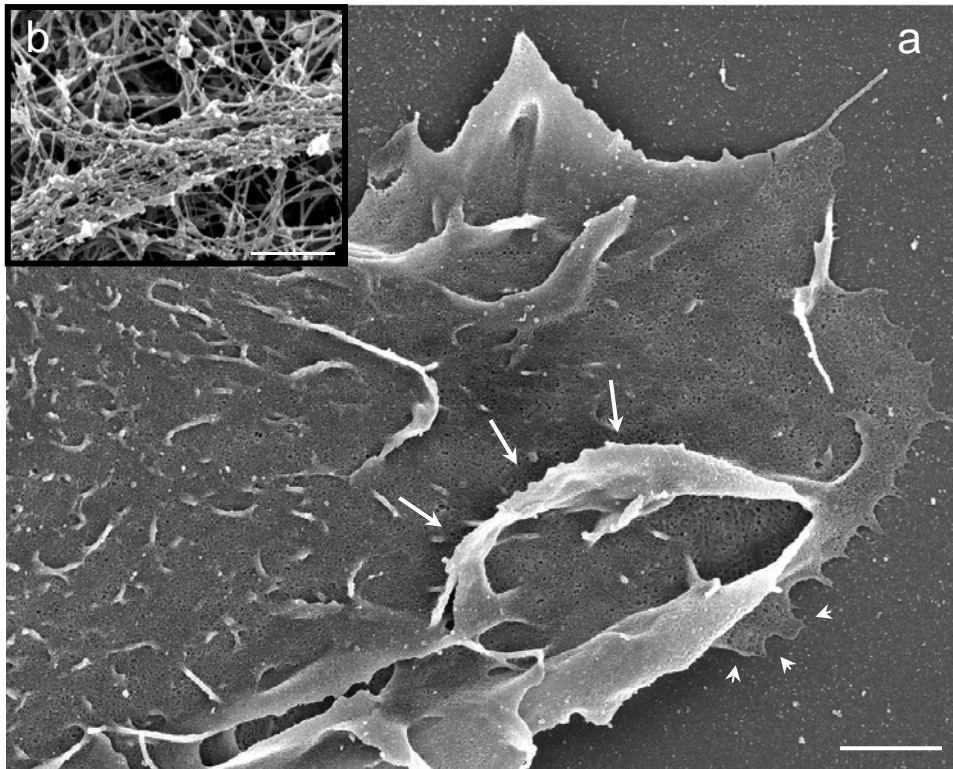


Abb. 1.9: „Membrane Ruffles“ sind bis zu 1 μm aufragende Membranfalten auf der Lamelle (a, Pfeile), an deren Basis bereits häufig neu gebildete Lamellipodien zu beobachten waren (a, Pfeilspitzen). Nach Extraktion mit PEG-GTX zeigten sich dicht gepackte Bündel aus 6 nm dicken Filamenten (b, Inset) auf dem losen Netzwerk der Lamelle. (Balken in a = 1 μm ; in b Inset = 500 nm) (Aufnahme B. Borm, 2002)

1.4.2 Filopodien

Die fingerförmigen Filopodien enthalten Bündel aus 10 – 30 Aktinfilamenten und haben einen Durchmesser von 200-400 nm, können aber, je nach Zelltyp, bis zu 70 μm lang werden (Jacinto und Wolpert, 2001; Mallavarapu und Mitchison, 1999). Ihre Hauptaufgabe scheint darin zu bestehen, Informationen über die unmittelbare Umgebung der Zelle zu erhalten (Dent und Gertler, 2003). An den Spitzen der Filopodien sind die Aktin assoziierten Proteine Fascin und Ena/VASP angereichert. Fascin unterstützt durch die dichte Bündelung der Aktinfilamente den effizienten Vorschub der Membran. Ena/VASP wirkt sowohl der Kappenbildung als auch einer eventuellen Verzweigung entgegen.

Die Funktion der 3 maßgeblich beteiligten Proteinfamilien (Rho, WASP, VASP) und ihre Auswirkungen auf die Aktinpolymerisation legen zwei Modelle der Aktinpolymerisation an der „Leading Edge“ nah. Im dendritischen Nukleationsmodell wird der Arp2/3-Komplex durch WASP-Proteine aktiviert, die der Kontrolle von Rac

und Cdc42 unterliegen. Der aktivierte Arp2/3-Komplex bindet an die Seiten bestehender Filamente und bringt neue Verzweigungen mit freien Plus-Enden hervor. Es entstehen bevorzugt kurze, stark verzweigte Filamente. Ältere Filamente in der D-Form werden durch Cofilin destabilisiert und abgebaut, die freien Aktinmonomere stehen am Leitsaum zur weiteren Polymerisierung zur Verfügung (Svitkina und Borisy, 1999) (Abb. 1.10).

Für die Ausbildung von Filopodien wird ein anderer Komplex benötigt, der die Filamente des Lamellipodiennetzwerkes in eine parallele, gebündelte Anordnung dirigiert (Abb. 1.10 unten; Abb. 1.11). Ena/VASP inhibiert die Kappenbildung und unterstützt dadurch die Bildung langer, unverzweigter Filamente (Schirenbeck et al., 2005). Da der Arp2/3-Komplex verzweigte Filamente generiert und am Lamellipodiennetzwerk verbleibt (Svitkina und Borisy, 1999), könnte ein anderes Keimbildungsprotein für die Entstehung von Filopodien verantwortlich sein. Das Formin mDia2 ist in den Spitzen von Filopodien gefunden worden und ist ein guter Kandidat für die Bildung paralleler Filamente (Pellegrin und Mellor, 2005; Schirenbeck et al., 2005; Zigmond, 2004).

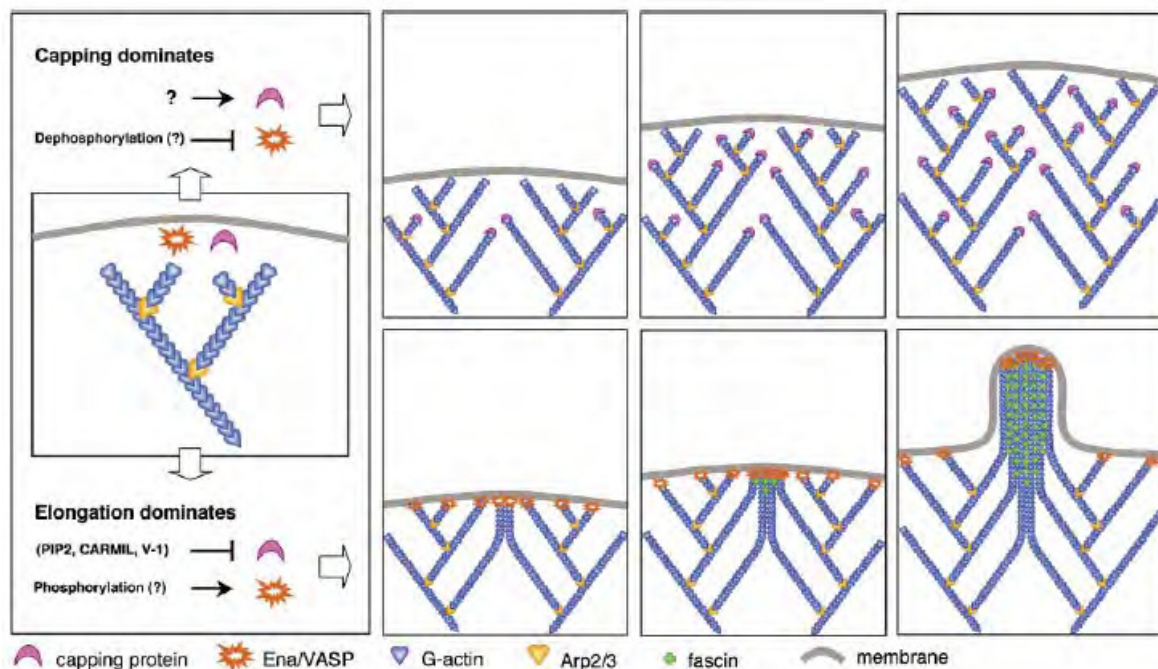


Abb. 1.10: Vereinfachte Darstellung des dendritischen Nukleationsmodell. Durch Capping-Proteine entstehen bevorzugt kurze, stark verzweigte Filamente, durch die die Membran als Lamellipodium auf breiter Ebene vorgeschoben werden kann. Ein Filopodium entsteht, wenn Ena/VASP der Kappenbildung entgegenwirkt und Fascin die Filamente bündelt (verändert nach (Mejillano et al., 2004)).

1.4.3 Molekulare Grundlagen der Lamellendynamik: Aktin-Polymerisation

Mikroinjektionsexperimente zeigten, dass fluorochromiertes G-Aktin in lebenden Zellen zuerst in der Peripherie von Lamellipodien in Aktinfilamente eingebaut wird (Small et al., 1996). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass G-Aktin innerhalb des Lamellipodiums polymerisiert und damit die treibende Kraft der Protrusion darstellt. Im distalen Bereich des Lamellipodiums, der „Leading Edge“, sind die Aktinfilamente mit ihrem schnellwachsenden Plus-Ende nach außen gerichtet (Small, 1995; Small et al., 1978; Svitkina et al., 1997) und die Aktinmonomere bewegen sich, gemäß dem so genannten Tretmühlen-Mechanismus, innerhalb der Filamente von außen nach innen (Wang, 1985). Die Bildung von Filopodien und Lamellipodien ist abhängig von der Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin, da durch Cytochalasin, das zur Depolymerisation von Aktinfilamenten führt, ihre Bildung gehemmt wird (Small et al., 1996).

Die Regulation der Aktindynamik im Lamellipodium erfolgt in der Zelle durch Aktin-assoziierte Proteine. Das dendritische Nukleationsmodell (Abb. 1.10) beschreibt die Dynamik des Aktincytoskeletts im Bereich der „Leading Edge“ eines Lamellipodiums und der daran beteiligten Proteine (Pollard und Borisy, 2003).

Alle Zellen enthalten einen Pool an G-Aktin, der an Profilin oder Thymosin- β 4 gebunden vorliegt und somit nicht für die Polymerisation zu F-Aktin zur Verfügung steht. Profilin bindet an das Plus-Ende des Aktin-Monomers und verhindert dadurch die Anlagerung von G-Aktin an die Minus-Enden von F-Aktin. Außerdem verhindert es die spontane Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin. Thymosin- β 4 verhindert jegliche Polymerisation von F-Aktin (Pollard und Borisy, 2003). Neue Aktinfilamente werden gebildet, wenn durch bestimmte Signale polymerisationsfördernde Proteine aktiviert werden und gleichzeitig der Pool an Thymosin und Profilin gebundenem G-Aktin freigegeben wird. Die Polymerisationsreaktion nutzt dabei den Arp2/3 Komplex als Nukleationspunkt für neue Aktinfilamente. Der Arp2/3-Komplex besteht aus zwei aktinverwandten Proteinen, Arp2 und Arp3 sowie fünf weiteren Untereinheiten (Machesky und Gould, 1999). Immunogold-Markierungen zeigten, dass der Arp2/3-Komplex bevorzugt an den Schnittstellen zwischen zwei Aktinfilamenten lokalisiert ist, die in einer γ -Form

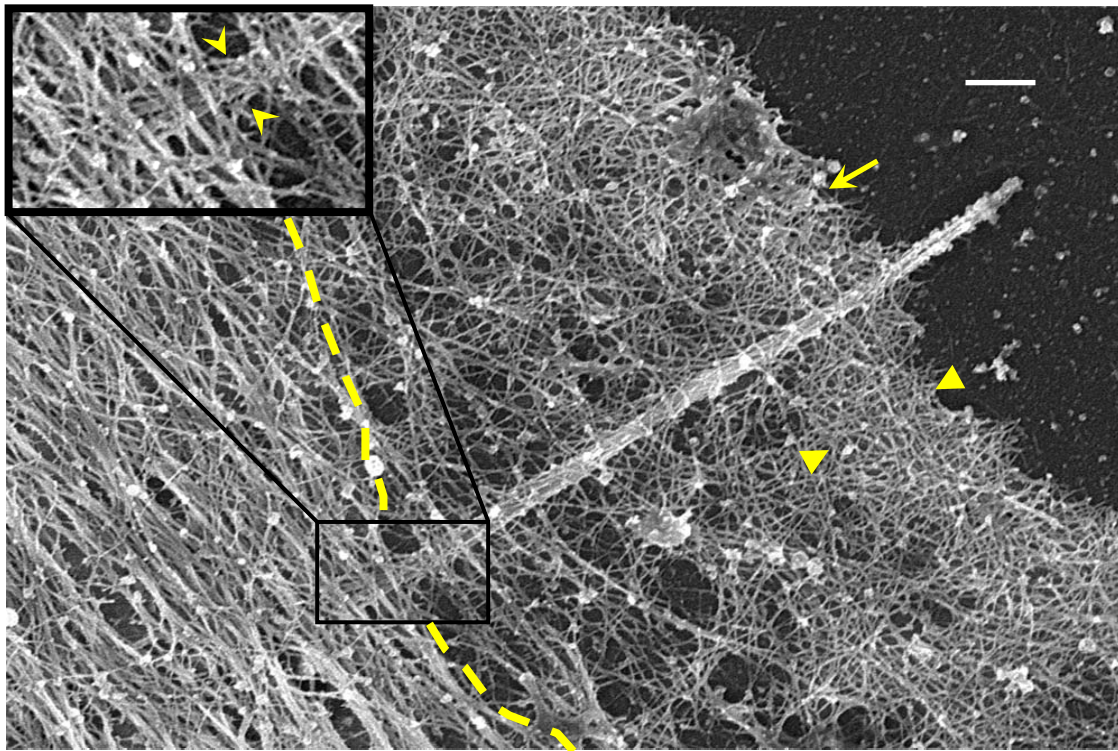


Abb. 1.11: REM Aufnahme der Lamellenregion von Keratinocyten nach Extraktion der Plasmamembran. Lamellipodien (Pfeil) gliedern sich in zwei strukturell unterscheidbare Regionen: Die etwa 1 µm breite „Leading Edge“ (Pfeilspitzen) aus stark verzweigten Filamenten und der sich daran anschließende Bereich aus langen und weniger verzweigten Filamenten, der die „Leading Edge“ mit der Lamelle (Linie) verbindet. Filopodien, die aus einem Bündel parallel angeordneter Aktinfilamente aufgebaut sind, erstrecken sich über das gesamte Lamellipodium bis über den Zellrand hinaus. (Balken = 1 µm). Inset (3fach vergrößert): intrazelluläre Basis eines Filopodiums mit Aufzweigungen in einzelne Aktinfilamente (Pfeilspitzen) (vergleiche schematische Darstellung Abb. 1.10).

miteinander verbunden sind (Svitkina und Borisy, 1999). Die neuen Filamente entstehen bevorzugt in einem 70° Winkel an bereits existierenden Aktinfilamenten, da der Arp2/3 Komplex am Minus-Ende des neuen Filaments gebunden bleibt und lateral an existierende Aktinfilamente bindet (Amann und Pollard, 2001; Weeds und Yeoh, 2001). Aktiviert wird der Arp2/3-Komplex durch Proteine aus der Wiskott-Aldrich-Syndrom-Familie. Diese Familie wird in zwei Gruppen eingeteilt. Die Gruppe WASP mit dem nur von hämatopoetischen Zellen exprimierten WASP und das ubiquitär exprimierte N-WASP und die Gruppe der WASP-homologen Proteine WAVE 1, 2 und 3 (Takenawa und Miki, 2001).

Das Wachstum der Aktinfilamente wird am Plus-Ende durch das Capping-Protein und durch Gelsolin reguliert. Beide Proteine bedecken das Plus-Ende („capping“) und verhindern dadurch die Anlagerung weiterer Aktinmonomere (Pollard und Borisy, 2003). Am Minus-Ende wird die Stabilität der Aktinfilamente durch ADF/Cofilin

reguliert, wo ADP-Aktin den Hauptbestandteil der Aktinfilamente ausmacht. ADF/Cofilin ist im proximalen Bereich der „Leading Edge“ angereichert (Svitkina und Borisy, 1999), wo es an ADP-Aktin bindet und die Depolymerisation von F-Aktin fördert (Bamburg, 1999).

Die Basis des Lamellipodiums, der Bereich hinter der „Leading Edge“ (Abb. 1.11), enthält hauptsächlich lange, unverzweigte Aktinfilamente, die durch die Anlagerung von Tropomyosin stabilisiert werden (Cooper, 2002; DesMarais et al., 2002). Der Bereich der „Leading Edge“ bleibt während der Protrusion eines Lamellipodiums relativ konstant. Das zeigt, dass ein Gleichgewicht zwischen Aktin-Polymerisation an der Front des Lamellipodiums und Depolymerisation im hinteren Bereich des Lamellipodium existiert (Small et al., 2002).

Auf welche Weise verursacht dieses Gleichgewicht den Vorschub des Lamellipodiums?

Das „brownian-ratchet model“ (Mogilner und Oster, 1996) beschreibt die Aktinfilamente innerhalb der „Leading Edge“ als elastische Kabel, die eine laterale Schwingung aufweisen, wie sie auch „in vitro“ in Form von „vibrierenden“ Filamenten beobachtet wurden (Blanchoin et al., 2000). Die Aktinfilamente der „Leading Edge“ sind sehr eng mit der Plasmamembran assoziiert. Durch die Eigenbewegung entsteht ein Freiraum, der den Einbau weiterer Aktinmonomere erlaubt. Die Rückstellkraft des nun verlängerten Filaments schiebt die Membran weiter vor. Durch die Ausbildung des dendritisch-verzweigten Aktin-Netzwerks wird verhindert, dass sich die Filamente durch den mechanischen Widerstand der Membran verbiegen, wodurch die Ausstülpung der Membran verhindert wird (Mogilner und Oster, 1996; Pollard und Borisy, 2003). Die Zelle ist in der Lage, die für die Ausbildung des verzweigten Aktin-Netzwerks erforderlichen Parameter, wie Filamentverzweigung, -verlängerung und „capping“, zu regulieren. VASP (Ena/vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein) verhindert das „capping“ freier Plus-Enden und führt in VASP-defizienten Zellen zu verkürzten Filamenten sowie, durch die Anheftung über die CAAX-Domänen an die Plasmamembran, zu verlängerten Filamenten, so dass in beiden Fällen der Vorschub der Membran ineffizienter verläuft (Bear et al., 2002).

Neben dem Modell der Aktinpolymerisation-abhängigen Lamellipodien-Protrusion wird zusätzlich der Einfluss von Membranfluß und hydrodynamischen mechanischen Eigenschaften der Plasmamembran als weiterer Faktor diskutiert. Der Transport von

Membranmaterial in die „Leading Edge“ Region ist von Bedeutung (Bretscher, 1996), da in polarisierten, wandernden Fibroblasten ein in die „Leading Edge“ Region gerichteter Vesikeltransport und deren Exocytose beobachtet wurde (Schmoranz et al., 2003). Außerdem zeigte sich, dass durch Erhöhung der Membranrigidität die Ausbildung von Protrusionen reduziert wird (Raucher und Sheetz, 2000). Ein weiteres Modell schlägt vor, dass die Bildung von Membranprotrusionen durch osmotischen Druck erfolgt und das Aktin-Filamentsystem nur unterstützende Funktionen hat (Condeelis, 1993). Möglicherweise ist die Bildung von Lamellipodien von beiden Faktoren abhängig, während die Bildung von Filopodien allein von der Polymerisation von Aktinfilamenten abhängig ist (Condeelis, 1993).

1.5 Migrationsspur

Bei langsam wandernden Zellen wie Fibroblasten konnte die Ausbildung einer Migrationsspur beobachtet werden, die durch „membrane ripping“ zustande kommt (Bard und Hay, 1975; Chen, 1981). Bei Hühner-Fibroblasten wird ein Großteil der Integrine, die bei migrierenden Zellen Makroaggregate bilden (Bard und Hay, 1975), auf dem Substrat zurückgelassen, während der Rest der Zelle sich vom Untergrund ablöst und weiter migriert (Regen und Horwitz, 1992). Es wurde angenommen, dass es bei schnell migrierenden Zellen wie Keratinocyten nicht zu einem solchen Verlust an Integrinen kommt, wie es bei Fibroblasten beobachtet wurde (Palecek et al., 1996). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch Keratinocyten eine Migrationsspur bei ihrer Wanderung hinterlassen (Kirfel et al., 2003; Penas et al., 2000). Es handelt sich um membranöse Strukturen oder Makroaggregate, die an zuvor von den Zellen synthetisierten ECM-Proteinen wie Kollagen Typ IV, Fibronectin, Laminin-1 und Laminin-5 gebunden sind (Kirfel et al., 2003). Es lassen sich zwei Typen von Makroaggregaten unterscheiden, Typ I mit sphärischen bis länglichen tubulären Strukturen (Durchmesser 50 - 110 nm), die schnurähnlich aufgereiht sind und anscheinend von fragmentierenden „Retracting Fibers“ abstammen und Typ II Makroaggregate mit sphärischen Strukturen (Durchmesser etwa 50 nm), die zwischen den „Retracting Fibers“ zu finden sind (Kirfel et al., 2003). Außerdem lassen sich diese Typen anhand ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden. Typ I-Makroaggregate enthalten β 1-Integrin während sich in Typ II-Makroaggregaten β 4-Integrin nachweisen lässt (Kirfel et al., 2003). Keratinocyten exprimieren APP und APLP2 (Hoffmann et al., 2000; Kummer et al., 2002). Für das

APP (amyloid precursor protein)-ähnliche Protein APLP2 konnte eine Funktion bei der Zell-Matrix-Adhäsion an Fibronectin und Kollagen IV gezeigt werden (Li et al., 1999), Diese Funktion konnte auf APP ausgeweitet werden, wie Untersuchungen an APP- und APLP2-knockout Mäusen zeigten (Siemes et al., 2006). Daraufhin wurde die Verteilung von APP in der Migrationsspur untersucht, und in der Tat konnten kleine Mengen APP in den äußeren Bereichen der Migrationsspur nachgewiesen werden (Kirfel et al., 2003).

Die Fragmentierung der „Retracting Fibers“, die zur Ausbildung von perlschnurartig aufgereihten Makroaggregaten führt, ist von der graduellen Zerstörung des Aktincytoskeletts abhängig (Bar-Ziv et al., 1999). Daher müssten sich Aktin und andere cytosolische Proteine in den Makroaggregaten nachweisen lassen. Dies ist aber zumindest für Aktin, Talin, Vinculin und Hsp70 nicht zutreffend (Kirfel et al., 2003). Die migrierende Zelle scheint in der Lage zu sein, cytosolische Bestandteile aktiv zurückzuhalten. Es könnte sich bei der Bildung des ECM-Anteils der Migrationsspur um einen Mechanismus handeln, der zur Ausbildung einer provisorischen Basalmembran in der epidermalen Wundheilung beiträgt. Über die mögliche Funktion der Makroaggregate der Migrationsspur ist noch nichts bekannt.

Der Umstand der Spurbildung und das Vorkommen von β 1-Integrin, sowie der Eigenkomposition von ECM-Bestandteilen durch Keratinocyten, wurden in der vorliegenden Arbeit für verschiedene Assays ausgenutzt.

1.6 Motogene Mediatoren

Die der Zellmigration zugrunde liegenden Abläufe erfordern die Polymerisation von monomerem Aktin zu Filamenten, deren Organisation zu Netzwerken und Bündeln sowie die Aktivierung von Myosinmotorproteinen (siehe Kapitel 1.4). Extrazelluläre Signale, wie die Adhäsion an ECM-Moleküle oder lösliche motogene Wachstumsfaktoren beeinflussen diese Prozesse (Abb. 1.12). Die ECM bildet ein unlösliches Netzwerk aus Polysacchariden, wie Glykosaminoglykanen, Faserproteinen wie Kollagen sowie Adhäsionsproteinen wie Laminin und Fibronectin (siehe Kapitel 1.3.4).

Wachstumsfaktoren sind lösliche Polypeptide, die multiple Funktionen als parakrine und/oder autokrine Modulatoren von Zellproliferation und Migration besitzen. Das Verhalten von Zellen, einem Konzentrationsgradienten von Wachstumsfaktoren zu

folgen, wird als Chemotaxis bezeichnet. Die Chemokinese ist dagegen die durch Motogene ausgelöste, ungerichtete Zellbewegung. Motogene Wachstumsfaktoren und Bestandteile der ECM binden mit hoher Affinität an Membranrezeptoren, die Signale via Tyrosinkinasen und „Second Messenger“ Systemen übermitteln und so Prozesse auslösen und steuern, die zur Zellmigration führen.

Bei der epidermalen Wundheilung werden in der Wundregion Wachstumsfaktoren von unterschiedlichen Zelltypen sezerniert. Auch Keratinocyten produzieren zahlreiche verschiedene Wachstumsfaktoren, die für die Wundheilung relevant sind. Drei bedeutende Wachstumsfaktoren sind dabei der „Epidermal Growth Factor“ (EGF) und der „Transforming Growth Factor- β “ (TGF- β) und die lösliche Form des „amyloid precursor proteins“ sAPP α (Herzog et al., 2004; Kummer et al., 2002).

EGF ist ein kleines lösliches Peptidhormon, das hauptsächlich von Blutplättchen in der Wundregion ausgeschüttet wird und an Haut- sowie Bindegewebszellen bindet und deren Proliferation stimuliert. Die Bindung von EGF an den dimeren, transmembranen EGF-Rezeptor führt zu einer Aktivierung und einhergehenden Autophosphorylierung der cytosolischen Rezeptortyrosinkinasen (RTK) der Untereinheiten. Über Adapterproteine kann die aktivierte RTK die kleine GTPase Ras binden, die in ihrer aktiven, GTP-bindenden Form eine Kinase-Kaskade in Gang setzen kann, die mit der Aktivierung einer „mitogen-activated Protein“-Kinase (MAP) ihren Höhepunkt erreicht. MAP-Kinasen bewirken eine Änderung der physiologischen Aktivität der Zelle, wie zum Beispiel den Umbau des Aktincytoskeletts und die Auflösung von Zell-Substrat-Adhäsionen und somit eine Abnahme der Adhäsivität (Xie et al., 1998). Alternativ kann auch der Ras-unabhängige Inositoltriphosphat-Signalweg (IP₃) angeschaltet werden, in dem der Phospholipase C (PLC γ) eine bedeutende Rolle zukommt. Auf diese Weise induziert PLC γ die Mobilisierung und Aktivierung von Aktin assoziierten Proteinen wie Gelsolin, das zu einer Reorganisation des Aktincytoskeletts führt (Chen et al., 1994; Kandzari et al., 1996). Es wird zudem angenommen, dass die EGF Bindung eine Erhöhung der Phosphorylierung der leichten Kette von Myosin (MLC, „Myosin Light Chain“) (Iwabu et al., 2004) und somit eine erhöhte Kontraktilität des Aktomyosin-Netzwerkes zur Folge hat, was für die Zellmigration essentiell ist.

Die TGF- β Superfamilie umfasst eine große Vielfalt von Signalproteinen, die unter anderem von Blutplättchen und Makrophagen produziert werden. TGF- β -Signalwege

sind während der Embryonalentwicklung sowie in adulten Organismen unter anderem für die Wundheilung wichtig. Die TGF- β Superfamilie kontrolliert unter anderem die Proliferation, die Synthese von ECM-Konstituenten und die Differenzierung vieler Zelltypen (Shi und Massague, 2003). TGF- β Liganden initiieren Signalwege durch Bindung an ihren Rezeptor auf der Zelloberfläche. Dieser besteht aus drei Rezeptortypen; Typ I, II und III. Dem Typ III Rezeptor kommt lediglich eine TGF- β präsentierende Funktion zuteil. TGF- β bindet zuerst an die Ektodomäne des Typ II Rezeptors, wodurch eine Bindung des Typ I Rezeptors erlaubt wird. Durch die Dimerisierung des TGF- β Liganden kommt es zur Bildung eines großen Komplexes, der sich aus einem Ligandendimer und zwei Typ II und zwei Typ I Rezeptoren zusammensetzt (Shi und Massague, 2003). Dies ermöglicht dem Typ II Rezeptor eine Phosphorylierung der Serin/Threonin-Kinase des Typ I Rezeptors, die eine Signalweiterleitung durch Phosphorylierung von R-Smad („receptor-regulated Smad“) Proteinen zur Folge hat (Shi und Massague, 2003). Diese dimerisieren mit Co-Smad („co-mediator Smad“) und gelangen so als Heterodimer in den Zellkern und entfalten dort ihre transkriptionsaktivierende Wirkung. Somit aktiviert TGF- β Gene, die für wichtige Bestandteile der ECM und Matrix-regulierende Enzyme kodieren (Schiller et al., 2004; Siegel et al., 2003).

Neben dem Smad-abhängigen Signalweg kann TGF- β auch von Smad unabhängige Signalwege aktivieren, die über verschiedene Effektorproteine unter anderem Einfluss auf das Aktincytoskelett sowie die Apoptose-Maschinerie nehmen kann (Moustakas und Heldin, 2005). TGF- β stimuliert „in vitro“ die Migration von Keratinocyten, während es deren Proliferation inhibiert. (Yue und Mulder, 2001).

Als jüngstes Mitglied dieser Gruppe von Wachstumsfaktoren wurde sAPP α entdeckt (Herzog et al., 2004), das seine Wirkung über Rezeptoren der EGFR-Familie entfaltet. sAPP α wird von basalen Keratinocyten nach proteolytischer Abspaltung an APP oder APLP2 freigesetzt. Inhibitoren dieses proteolytischen Prozesses inhibieren die Proliferation von Keratinocyten und normalisieren die erhöhte Proliferationsrate psoriatischer Keratinocyten (Siemes et al., 2004).

Die für die Migration essentielle Aktindynamik einer Zelle wird unter anderem durch verschiedene motogene Mediatoren beeinflusst. Es ist noch unklar, in dem Ausmaß sich die Konzentration und Art der Wachstumsfaktoren auf verschiedene Parameter der Migration auswirken. Mit Hilfe aktuell entwickelter Methoden erhoffen wir Aufklärung über den Einfluss von EGF, TGF- β und sAPP auf die Lamellendynamik.

1.7 Ziele der Arbeit: Regulation der Migration durch ECM und motogene Mediatoren

Grundkenntnisse über den Einfluss der extrazellulären Matrix und motogener Mediatoren auf die Lamellendynamik, die Bildung von Filopodien und Einfluss der Mediatoren auf den Phänotyp und die Effizienz der Adhäsion und der Migration humaner Keratinocyten wurden von anderen Arbeitsgruppen und unserem Labor erarbeitet (Abb. 1.12). Es fehlten jedoch detaillierte Kenntnisse über die Quantifizierung dieser Prozesse.

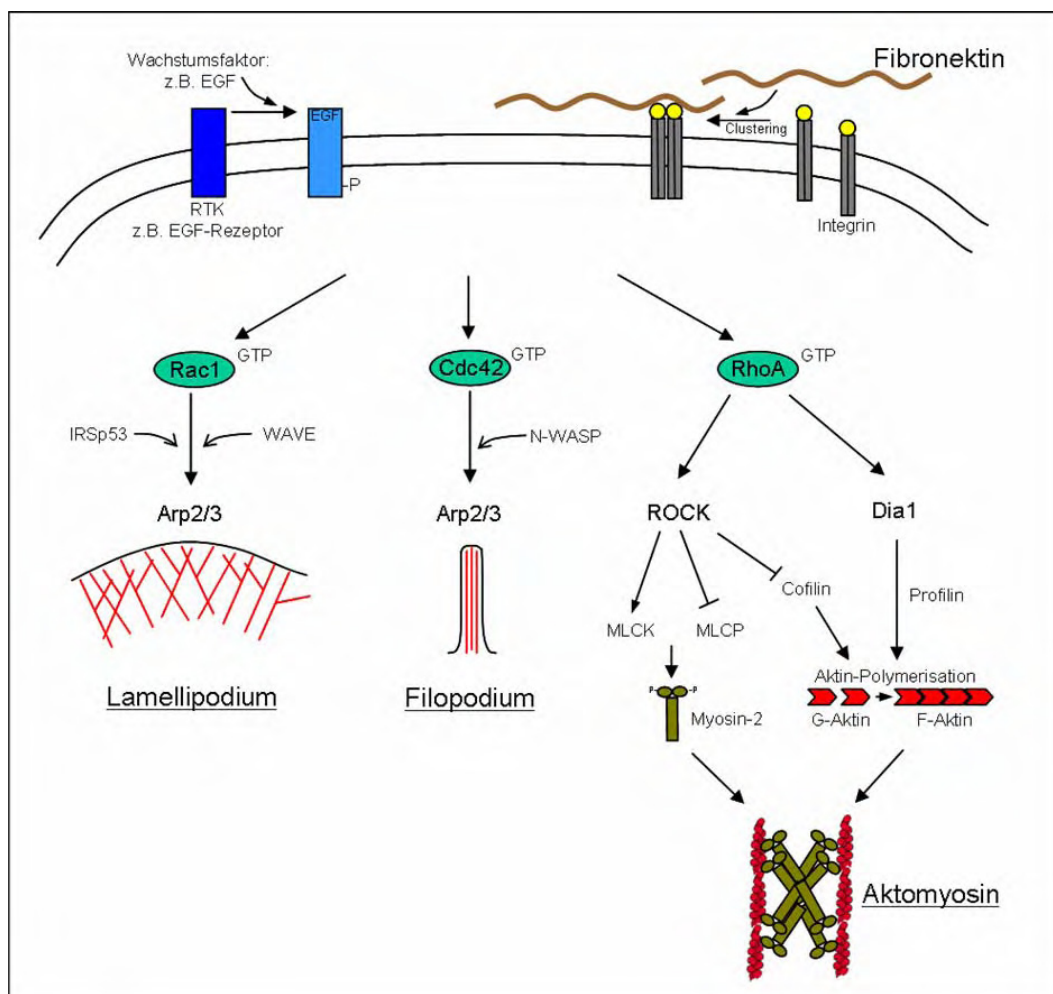


Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Effekte von Motogenen und ECM auf die Bildung von Lamellipodien, Filopodien und den kontraktilem Apparat. Diese wird intrazellulär zentral über die Familie der Rho-GTPasen gesteuert. Daher können diese als Schaltstellen zwischen extrazellulären Stimuli, Motilität und Migration angesehen werden. (RTK = Rezeptor-Tyrosin-Kinase)

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit auf der Grundlage dieser bereits bekannten Aspekte der Zellmigration von Keratinocyten neue Erkenntnisse über die Quantifizierung der Zellmigration insbesondere der Lamellipodien, der Filopodien und der Zelladhäsion am Beispiel der Bildung einer Migrationsspur erarbeitet.

Die Dynamik von Lamellipodien, Filopodien sowie der Bildung der Migrationsspur sowie deren Abhängigkeiten von Substrat und motogenen Mediatoren waren Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit. Insbesondere über Filopodien und ihre Dynamik verfügen wir nur über geringe Kenntnisse. In dieser Arbeit wurde deshalb der Einfluss der Motogene EGF und TGF- β 1, sowie der Konstituenten der Basalmembran auf die Bildung von Filopodien quantifiziert. Außerdem wurden Geschwindigkeit, Migrationsart und Lamellendynamik unter dem Einfluss dieser extrazellulären Mediatoren untersucht. Außerdem wurde die Fähigkeit zur Sekretion von verschiedenen ECM-Konstituenten in Abhängigkeit vom Substrat untersucht. Zur Quantifizierung der Motilitäts- und Adhäsionsparameter wurden der SACED-Assay und „Live Cell Imaging“ verwendet.