

Untersuchungen zur Adhäsionsdynamik migrierender Keratinozyten

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Christoph Möhl
aus Bonn

Bonn 2009

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Merkel
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Kubitschek

Tag der Promotion: 18. September 2009

Erscheinungsjahr: 2009

Zusammenfassung

Einzelzellen innerhalb eines Gewebes sind über vielfältige Verbindungsstrukturen miteinander verknüpft. Die mechanische Verbindung des Aktin-Zytoskeletts an die extrazelluläre Matrix wird über Proteinkomplexe in der Plasmamembran ermöglicht, die abgegrenzte Adhäsionsbereiche bilden und als Fokaladhäsionen bezeichnet werden. Durch regulierte Bildung und Auflösung solcher Fokaladhäsionen können sich Gewebe reorganisieren bzw. neu bilden, was beispielsweise in Wundheilungsprozessen zum Ausdruck kommt. Vor allem in migrierenden Zellen sind Fokaladhäsionen sehr dynamische Strukturen, die innerhalb von Minuten auf und abgebaut werden. Dabei unterliegen einzelne Proteine einem ständigen kinetischen Austausch, sodass sie teilweise nur wenige Sekunden im Adhäsionskomplex verweilen.

In dieser Arbeit wurde die Austauschdynamik des Fokaladhäsionsproteins Vinculin in migrierenden Keratinozyten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Vinculin in der Fokaladhäsion im Laufe ihres Reifungsprozesses stabilisiert wird. Diese Stabilisierung wird durch die Dephosphorylierung von Vinculin an einem bestimmten Tyrosinrest (TYR1065) reguliert und geht mit einer erhöhten Zugkraftübertragung der Fokaladhäsion einher. Kurz vor Auflösung der Fokaladhäsion kommt es wieder zur Destabilisierung von Vinculin. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die These aufgestellt, dass die Adhäsionsstärke der Zelle über die gezielte Regulation des Vinculinaustausches moduliert werden kann.

Desweiteren wurde der Auf- und Abbau von Fokaladhäsionen im Zusammenhang mit der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und der Polarisierung der Zelle untersucht. Anhand der gewonnenen Ergebnisse wurde ein Modell konstruiert, nach dem die Struktur des Aktin-Zytoskeletts über die Bildung von Fokaladhäsionen organisiert wird.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Evolution der Zelladhäsion	10
1.2	Zelladhäsionsstrukturen	12
1.3	Fokaladhäsionsdynamik bei der Zellmigration	13
1.4	Struktur von Fokaladhäsionen	16
1.5	Reifung von Fokaladhäsionen	19
1.6	Kontraktionskräfte und Aktinfluss	20
1.7	Vinculin als Kraftüberträger und Regulator	23
1.8	Ziele der Arbeit	26
2	Material und Methoden	29
2.1	Methoden zur Lebendzellbeobachtung	29
2.1.1	Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)	30
2.1.2	Fluorescent Speckle Microscopy (FSM)	34
2.1.3	Bildsegmentierung zur Analyse von Fokaladhäsionsdynamik	34
2.1.4	Einzelzell-Kraftmessung auf elastischen Substraten	35
2.2	Präparation der Substrate	36
2.2.1	Herstellung von Silikonkautschuk	36
2.2.2	Herstellung verschiedener Substratoberflächen	37
2.3	Molekularbiologie	40
2.3.1	Konstruktion der Plasmide für Vinculin	41
2.3.2	Vermehrung und Isolation der Plasmid-DNA	41
2.4	Kultivierung und Präparation der Zellen	42
2.4.1	Kultivierung	42
2.4.2	Fluoreszenzmarkierung	43
2.4.3	Stimulierung mit Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF)	44
2.5	Mikroskopie	44
2.5.1	verwendete Mikroskope	44
2.5.2	FRAP am Laser-Scanning-Mikroskop	45
2.5.3	FRAP am TIRF-Mikroskop	47
2.5.4	Polarisierung von adhätierenden Zellen	48
2.5.5	Kraftmessung	48

2.5.6	Aktinfluss	48
2.5.7	Wachstumsdynamik von Fokaladhäsionen	49
2.5.8	Immunfluoreszenz	50
2.6	Bildanalyse und statistische Auswertung	50
2.6.1	FRAP am Laser-Scanning-Mikroskop	50
2.6.2	TIRF-FRAP	52
2.6.3	Ratiometrie von Immunfluoreszenzfärbungen	53
2.6.4	Wachstumsdynamik von Fokaladhäsionen	54
2.6.5	Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit	57
2.6.6	Substratdeformation	57
2.6.7	Messung des Aktinflusses durch zeitintegrierte Kreuzkorrelation	59
2.6.8	Statistische Tests	63
3	Ergebnisse	65
3.1	Polarisierung auf asymmetrischem Substrat	65
3.2	Organisation von Fokaladhäsionen und Aktinskelett	67
3.3	Phosphorylierung von Vinculin	69
3.4	Auf- und Abbau von Fokaladhäsionen	71
3.5	Austauschdynamik von Vinculin	76
3.5.1	In gereiften Fokaladhäsionen sessiler Zellen unterliegt ein Teil des Vinculins einem ständigen Austausch	76
3.5.2	Der Anteil des stabil gebundenen Vinculins nimmt während der Reifung der Fokaladhäsionen zu	80
3.5.3	Der Vinculinaustausch in Fokaladhäsionen ist direkt von der Phosphorylierung von Vinculin an Tyrosinrest 1065 abhängig	80
3.5.4	Kurz vor Auflösung einer Fokaladhäsion erhöht sich die Austauschdynamik von Vinculin	82
3.6	Kraftübertragung von Fokaladhäsionen	85
3.7	Bewegung von Aktinfilamenten	87
3.8	Verifizierung der verwendeten Methoden	91
3.8.1	Messungen zur Austauschkinetik von Vinculin in Fokaladhäsionen werden durch zytoplasmatische Diffusion überlagert	91
3.8.2	Überprüfung der Schädigung von Fokaladhäsionsproteinen durch den Bleichlaser	94
3.8.3	Kontrollexperiment zur Messung des Aktinflusses mittels Kreuzkorrelation	95
4	Diskussion und Ausblick	97
4.1	Regulierte Stabilisierung von Fokaladhäsionen	97
4.2	Adhäsionsabhängige Polarisierung	99

- 4.2.1 Vorschläge für zukünftige Experimente zur Verifizierung des Modells 102
- 4.2.2 Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit Ergebnissen aus mathematischen Modellierungen 102

Kapitel 1

Einleitung

Dem komplexen Aufbau unseres Körpers liegt die hoch organisierte Verknüpfung seiner elementaren Einheiten, den Zellen, zugrunde. Diese Verknüpfung erfolgt über klar abgegrenzte Bereiche in der Plasmamembran der Einzelzellen, welche als Adhäsionen bezeichnet werden. Dabei bestimmt die Organisation der Zelladhäsionen die Struktur des von den Zellen gebildeten Gewebes und somit des gesamten Organismus.

Aus medizinischer Sicht ist die Frage, wie diese Adhäsionen in regulierter Weise auf und abgebaut werden können, aus vielerlei Gründen außerordentlich interessant. So sind Zellen durch die koordinierte Bildung und Auflösung ihrer Fokaladhäsionen in der Lage, sich innerhalb des Gewebes fortzubewegen oder in benachbartes Gewebe einzuwandern. Beispielsweise können Zellen des Immunsystems auf diese Weise den Blutkreislauf verlassen und zu Entzündungsherden vordringen, um dort lebenswichtige Immunantworten einzuleiten. Bei metastasierenden Tumorzellen ist diese Migrationsfähigkeit dagegen außer Kontrolle geraten, was fatale Folgen für den Organismus haben kann. Durch die unkontrollierte Migration und Teilung dieser Zellen können sich im gesamten Körper Metastasen bilden, die das vorhandene Gewebe zerstören. Die Untersuchung von Fokaladhäsionsdynamik kann daher wichtige Erkenntnisse liefern, auf deren Grundlage beispielsweise neue Therapien gegen Infektionskrankheiten und Krebs entwickelt werden können.

Neben der medizinischen Relevanz ist die Frage, wie zelluläre Adhäsionen gebildet werden, von grundlegender Bedeutung zum Verständnis zur Evolution vielzelliger Organismen und auf welchen Mechanismen die Bildung ihres komplexen Körperbauplans beruht.

In der vorliegenden Arbeit wurde der dynamische Auf- und Abbau von Fokaladhäsionen bei migrierenden Hautepithel-Zellen des Menschen (Keratinozyten) untersucht. Dieser spezielle Typ von Substratadhäsionen verbindet das Aktin-Zytoskelett mit Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) und ist aufgrund seiner Eigenschaften als Strukturgeber, Kraftüberträger, Chemosensor und möglicher Mechanosensor der Zelle zur Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Die in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen lassen vermuten, dass die mechanische Stabilität einer Fokaladhäsion direkt

mit dem kinetischen Austausch des Fokaladhäsionsproteins Vinculin in Zusammenhang steht. So sind Fokaladhäsionen mit einem hohen Anteil an stabil eingebautem Vinculin in der Lage, höhere Zugkräfte zu übertragen als Adhäsionen, mit instabil eingebautem Vinculin. Ferner weisen die Untersuchungen darauf hin, dass Zellen über die gezielte Steuerung dieses Vinculin-Austauschs sowohl den Auf- und Abbau von Fokaladhäsionen, als auch ihre Adhäsionsstärke modulieren können.

1.1 Zelladhäsion ermöglicht die Entstehung von vielzelligen Lebewesen

Im Jahre 1858 beschrieb Rudolf Virchow in seinem Buch „Die Cellularpathologie“, dass tierische Zellen in „große Massen sogenannten intercellularen Stoffes“ eingebettet sind, den wir heute als ECM kennen. Eine seiner fundamentalen Erkenntnisse war, dass „die Intercellularsubstanz, wie sie von Zellen gebildet (abgeschieden) wird, so auch in einer bestimmten Abhängigkeit von ihnen bleibt. (...) Demnach ist das Bindegewebe (...) zusammengesetzt aus Zellterritorien, von denen jedes eine Zelle mit dem ihr zugehörigen Anteil von Intercellularsubstanz enthält, und deren Grenzen gänzlich verschmolzen sind“ [78]. Virchow fasste also die Zelle und ihre umgebende Matrix als funktionale Einheit auf, und postulierte, dass diese Matrix ein Sekretionsprodukt der eingebetteten Zellen sei. Trotz seiner eingeschränkten technischen Möglichkeiten, Virchow arbeitete mit einem einfachen Lichtmikroskop und hielt seine Beobachtungen mit Tuschezeichnungen fest, hatte er damit eine grundlegende Eigenschaft biologischer Gewebe erkannt und sehr treffend beschrieben. Wie wir heute wissen, sind Zellen im Gewebe über Substratadhäsionen mechanisch und sensorisch direkt mit der ECM verbunden. Somit kann man die Zelle und ihre umgebende „Intercellularsubstanz“ tatsächlich als eine strukturelle Einheit auffassen. Dabei geben diese Substratadhäsionen dem Gewebe nicht nur Stabilität und Zugfestigkeit, sondern bestimmen auch seine dreidimensionale Struktur und damit letztendlich den Aufbau der Organe und des gesamten Organismus. Darüber hinaus können Zellen über ihre Adhäsionen extrazelluläre Signale detektieren und so miteinander kommunizieren.

Aufgrund ihrer fundamentalen Bedeutung bei der Organisation von Geweben war die Entstehung von Substratadhäsionsstrukturen neben der Zelldifferenzierung einer der Schlüssel zur Entwicklung vielzelliger Organismen. Im Laufe der Evolution schlossen sich zunächst einzellige Lebewesen gleicher Abstammung zu Kolonien zusammen (Abb. 1.1 A). Diese Lebensgemeinschaften waren umhüllt von einem gallertartigen Sekret, das von den Einzellern produziert wurde und als Vorläufer der ECM betrachtet werden kann [71]. Natürlich ist der Übergang von koloniebildenden Einzellebewesen zu einem Gesamtorganismus sehr fließend, und die Frage, ab welchem Punkt viele Individuen ein Einziges ergeben ist eher philosophischer als naturwissenschaftlicher Natur. Es ist jedoch zu vermuten, dass die Entstehung von Substratadhäsionen den Zusammen-

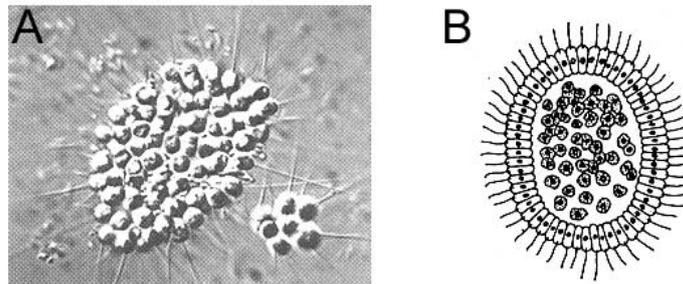


Abbildung 1.1: Entstehung von vielzelligen Organismen durch Zelladhäsion. A: Kolonie von motilen Choanoflagellaten der *Proterospongia*-Spezies. Die Zellen sind von einer gemeinsamen Gallerte umgeben und werden als direkte Vorläufer der *Metazoa* angesehen. B: Schematische Zeichnung des eines Schwammes im Larvenstadium (*Parenchymula*-Typ). Diese ältesten Vertreter der *Metazoa* ähneln noch sehr stark einer Zellkolonie. Die begeißelten Epithelzellen differenzieren sich aus den Zellen des lockeren Innengewebes. Das Fokaladhäsionsprotein Integrin ist bei diesem Organismus bereits vorhanden. Originale: Rolf Siewing, „Lehrbuch der Zoologie, Band 2: Systematik“, Stuttgart 1985 (A); Adolf Remane, „Kurzes Lehrbuch der Zoologie“, Stuttgart 1989 (B)

halt und die Kommunikation der Einzelzellen in der Kolonie begünstigte und so zum Werden einer funktionalen Einheit, dem vielzelligen Organismus, entscheidend beitrug. Die ältesten uns bekannten Metazoen gehören der Gruppe der Schwämme (*Porifera*) an. Bereits für diese einfachsten aller Tiere konnte ein Gen für eine Untereinheit des Adhäsionsproteins Integrin nachgewiesen werden [56]. Dies lässt darauf schließen, dass Substratadhäsionen bei vielzelligen Organismen von Beginn an entwickelt waren. Ob bereits die koloniebildenden Kragengeißler der *Proterospongia*-Species, die als direkter Vorläufer der *Porifera* gehandelt werden [71], Adhäsionsstrukturen besaßen, ist meines Wissens bisher nicht untersucht worden (siehe Abb. 1.1).

Im Jahre 1907, also ca. 40 Jahre nach Rudolf Virchows Theorie der Zellenterritorien, führte der Amerikaner H.V. Wilson ein bemerkenswertes Experiment durch. Er trennte die Zellen eines lebenden Schwammes, indem er ihn durch ein engmaschiges Sieb presste [81]. Anschließend beobachtete er unter dem Mikroskop, wie sich die Einzelzellen aus eigener Kraft bewegten und sich zu einem neuen lebensfähigen Organismus organisierten. Dieses sehr frühe *Live-Cell-Imaging*-Experiment in der Geschichte der biologischen Forschung belegt nicht nur eindrucksvoll die Fähigkeit der Selbstorganisation von Geweben. Es legt außerdem den Schluss nahe, dass Zellen ihre Adhäsionen dynamisch auf- und abbauen können und somit in der Lage sind, ihre Kontakte zum Substrat und benachbarten Zellen den jeweiligen Gegebenheiten anzupassen.

1.2 Zellen sind über unterschiedliche Strukturen mit ihrer Außenwelt verbunden

Die mechanische Verbindung von Zellen untereinander oder mit der ECM verleiht dem Gewebe Zugfestigkeit und Stabilität und ermöglicht es den Zellen, Kräfte auf ihre Umwelt auszuüben bzw. aus ihrer Umwelt zu erfahren. Diese Verbindung erfolgt über spezialisierte Adhäsionsbereiche in der Zellmembran, die Bestandteile des Zytoskeletts über transmembrane Ankerproteine an extrazelluläre Strukturen koppeln. Darüber hinaus besitzen diese Adhäsionsbereiche vielfältige sensorische Funktionen und übertragen beispielsweise chemische Signale aus der ECM in den Zellinnenraum.

Man unterteilt zelluläre Adhäsionsstrukturen in vier Typen, die sich bezüglich ihres Aufbaus und ihrer Funktion unterscheiden [5]:

1. **Desmosomen** verbinden die Intermediärfilamente benachbarter Zellen. Sie dienen in erster Linie der Stabilisierung und treten daher vor allem in mechanisch stark beanspruchtem Gewebe wie z.B. Herzmuskel oder Hautepithel auf. Transmembrane Cadherine dienen bei Desmosomen als Ankerproteine. Diese gehen auf der extrazellulären Seite mit Cadherinen der benachbarten Zelle eine Ca^{2+} -abhängige Verbindung ein. Auf der intrazellulären Seite sind die Cadherine über einen dichten Proteinkomplex (*Zytoplasmatischer Plaque*) an Intermediärfilamente gekoppelt.
2. **Adhäsionsverbindungen** verbinden Aktinfilamente benachbarter Zellen. Die Ankerproteine gehören ebenfalls der Cadherin-Familie an. Die intrazelluläre Kopplung an das Aktinnetzwerk erfolgt über Adapterproteine wie Catenine oder Vinculin. Wird das Aktinnetzwerk durch Myosin kontrahiert, übertragen Adhäsionsverbindungen die resultierende Zugkraft direkt auf benachbarte Zellen.
3. **Hemidesmosomen** verbinden Intermediärfilamente mit der ECM. Sie sind recht ähnlich aufgebaut wie Desmosomen und dienen ebenfalls der Gewebestabilisierung. Die transmembranen Ankerproteine gehören der Integrin-Familie an, die an ECM-Proteine wie z.B. Fibronectin binden können.
4. **Fokaladhäsionen** verbinden Aktinfilamente mit der ECM. Wie bei Hemidesmosomen, fungieren transmembrane Integrine als Ankerproteine. Ansonsten ähneln sie in ihrem Aufbau den Adhäsionsverbindungen. Da Fokaladhäsionen an das Aktinnetzwerk der Zelle gekoppelt sind, übertragen sie die myosinvermittelten Zugkräfte der Zelle direkt auf das Substrat. Darüber hinaus sind Fokaladhäsionen sehr dynamisch und können binnen Minuten auf- und abgebaut werden. Somit sind Zellen in der Lage, die räumliche Verteilung der Krafteinleitung in relativ kurzer Zeit zu verändern, was eine wichtige Rolle bei der Zellmigration spielt (siehe Abschnitt 1.3) .

1.3 Dynamik von Fokaladhäsionen bei der Zellmigration

Wie das in Abschnitt 1.1 beschriebene Experiment von H.V. Wilson veranschaulicht, können sich tierische Gewebe aufgrund der Migration ihrer Einzelzellen regenerieren bzw. im Verlauf der Ontogenese neu bilden. Obwohl viele Zellen mit zunehmendem Differenzierungsgrad ihre Migrationsfähigkeit verlieren, bleiben die meisten Gewebe im adulten Organismus dennoch sehr dynamisch. Dies zeigt sich beispielsweise sehr anschaulich im epidermalen Wundheilungsprozess, bei dem sich Keratinozyten vom Wundrand lösen und in das Wundbett einwandern, um dort anschließend neues Gewebe aufzubauen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Migration von Keratinozyten auf planaren Oberflächen beobachtet und im Hinblick auf ihre Adhäsionsdynamik analysiert. Im Gewebe bewegen sich diese Zellen allerdings durch eine völlig anders geartete Umwelt. Dort sind sie allseitig von einem schwammartigen Geflecht aus ECM-Proteinen umgeben. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass sich Zellen unter diesen Bedingungen deutlich anders verhalten, als auf einem künstlich erzeugten, flachen Substrat. Aus diesem Grunde sollte man sehr vorsichtig sein, die Erkenntnisse, die aus *In-Vitro*-Experimenten mit migrierenden Zellen gewonnen werden, auf spezielle Vorgänge im Gewebe wie z.B. Wundheilung zu übertragen. Dennoch sind auf planaren Oberflächen migrierende Zellen hervorragende Modellsysteme zur Untersuchung des Zusammenspiels von Adhäsions- und Zytoskelett-Dynamik und können so wichtige Erkenntnisse zum grundsätzlichen Mechanismus der Zellmigration und der Gewebebildung liefern.

Anders als beispielsweise die Fortbewegung von Flagellaten, die durch eine schlagende Geißel erzeugt wird, liegt der Zellmigration kein einzelnes Bewegungsorganell zugrunde. Zellmigration ist vielmehr das Ergebnis des konzertierten Zusammenspiels von krafterzeugenden Zytoskelett- und kraftübertragenden Adhäsions-Strukturen und wird daher auch als „physikalisch integrierter globaler Prozess“ bezeichnet [46]. In Abbildung 1.2 A ist der Migrationsprozess einer Zelle auf planarem Substrat schematisch dargestellt. Zur Veranschaulichung ist er in eine Abfolge mehrerer Einzelvorgänge zerlegt worden, welche auch als Migrationszyklus bezeichnet wird [3, 2]:

1. **Migrierende Zelle in polarisierter Form.** Der Migrationszyklus kann nur dann ablaufen, wenn die Zelle eine polarisierte Form mit klar unterscheidbarem Vorder- und Hinterende annimmt. Im vorderen Teil der Zelle befindet sich eine flach ausgebreitete Membranlamelle, die von einem Netzwerk aus Aktinfilamenten ausgefüllt ist (Abb. 1.2 A, grün). Aus der Vorderfront dieses sogenannten Lamellipodiums ragen vereinzelt fingerförmige Membranfortsätze, die als Filopodien bezeichnet werden und mit parallel gebündelten Aktinfilamenten ausgefüllt sind. Sowohl das Lamellipodium als auch die herausragenden Filopodien sind sehr dynamische Strukturen, die sich innerhalb von Minuten auf- und abbauen kön-

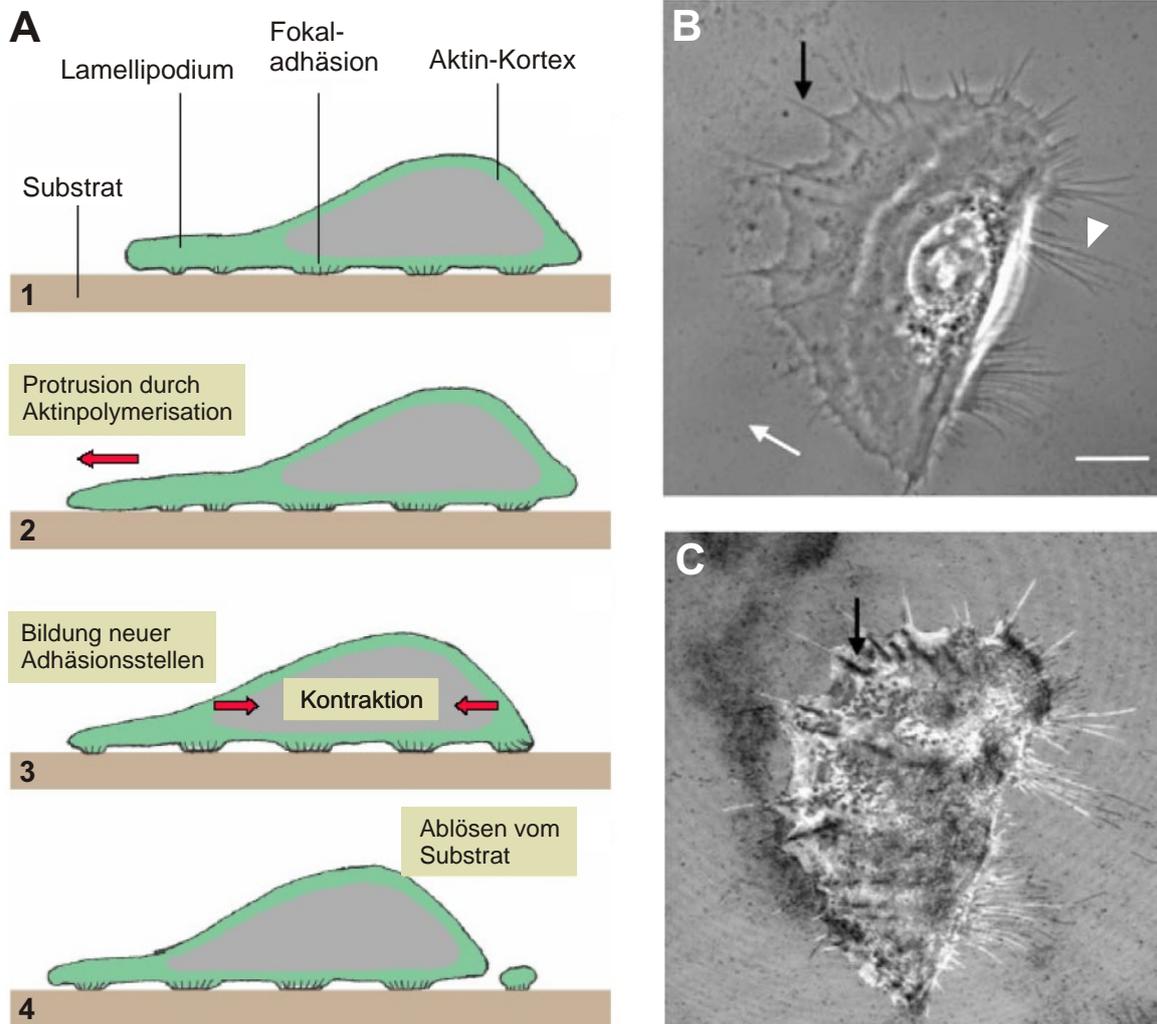


Abbildung 1.2: **Migration von Keratinozyten auf flachem Substrat.** A: Schematische Darstellung des Migrationszyklus. B: Phasenkontrast-Aufnahme einer polarisierten migrierenden Keratinozyte. Das Lamellipodium ist in Migrationsrichtung (weißer Pfeil) ausgebildet. Im dahinterliegenden Zellkörper ist der Kern als größtes Organell zu erkennen. Aus dem Leitsaum des Lamellipodiums entspringen nadelförmige Filopodien (schwarzer Pfeil). Am hinteren Ende der Zelle finden sich Retraktionsfasern, die von einem unvollständigen Ablösungsprozess herrühren (Pfeilspitze). Balken: 10 μm . C: Dieselbe Zelle wie in B mit konfokaler Mikroskopie in Reflektion aufgenommen. Die dunklen Flecken markieren Membranbereiche mit Fokaladhäsionen. Diese bilden sich bevorzugt hinter den Filopodien (schwarzer Pfeil). B und C verändert nach Schäfer et al. 2009.

nen. Hinter dem Lamellipodium befindet sich der Zellkörper, der den Zellkern und andere Organellen beinhaltet (Abb. 1.2 B). Der Zellkörper ist ausgekleidet mit einer Rinde aus Aktinfilamenten. Dieser sogenannte Aktinkortex bestimmt die Form der Zelle und nimmt im Bereich des Lamellipodiums das gesamte Lumen ein. Die Aktinfilamente können einerseits kreuzförmig vernetzte Strukturen bilden, wie es im Lamellipodium hauptsächlich der Fall ist, oder in parallelen Faserbündeln (Stressfasern) organisiert sein. Fokaladhäsionen verbinden die Aktinfilamente mit ECM-Proteinen und verankern somit die Zelle im Substrat. Sie sind an abgegrenzten Membranbereichen lokalisiert, die auf bis zu 15 nm an das Substrat heranreichen [88]. Im Reflektionsbild sind diese Bereiche als dunkle Flecken erkennbar (Abb. 1.2 C).

2. **Protrusion.** Durch Polymerisierung der Aktinfilamente wächst das Lamellipodium nach vorne aus. So erschließt die Zelle neues Territorium.
3. **Adhäsion und Kontraktion.** Durch Bildung von neuen Adhäsionsstellen wird die vorgeschobene Zellfront im Substrat verankert. Diese jungen Fokaladhäsionen können sich bereits in den Filopodien bilden [67]. Durch das Motorprotein Myosin II kontrahiert sich das Aktin-Netzwerk. Die so entstehenden Zugkräfte werden an den Fokaladhäsionen auf das Substrat übertragen, was zu einem Spannungsaufbau in der Zelle führt.
4. **Substrat-Ablösung.** Damit es zu einer effektiven Vorwärtsbewegung kommt, muß der hintere Teil der Zelle vom Substrat abgelöst werden. Gesähe dies nicht, würden sich Adhäsions- und Kontraktionskräfte gegenseitig aufheben und die Zelle würde „festkleben“. Gleichzeitig müssen die Adhäsionen im vorderen Bereich bestehen bleiben, um den kontraktile Strukturen eine mechanische Verankerung zu bieten. Die Ablösung kann prinzipiell durch die Trennung der Verbindungen zwischen Adhäsionsproteinen und Substrat (extrazellulär) oder zwischen Adhäsionsproteinen und Aktin-Filamenten (intrazellulär) erfolgen. Bei Keratinozyten ist bekannt, dass sie im Verlauf ihrer Wanderung eine Spur von Membranresten zurücklassen. Dabei bilden sich zunächst fadenartige Membranausstülpungen (Retraktionsfasern, Abb. 1.2 B, Pfeilspitze), die sich im Verlauf der Vorwärtsbewegung des Zellkörpers vollständig von der Zelle lösen und als perlschnurartig aufgereichte Vesikel zurückbleiben. Diese Vesikel enthalten Integrine, aber kein Aktin [62]. Die Trennung erfolgt daher zumindest teilweise intrazellulär.

Aus dem oben beschriebenen Prozess wird deutlich, dass Zellmigration nur dann möglich ist, wenn mindestens zwei strukturelle Asymmetrien in der Zelle vorliegen:

Asymmetrie der Lamellenprotrusion: Die Protrusion des Lamellipodiums muss in Migrationsrichtung überwiegen. Entgegen der Migrationsrichtung muss dagegen die Retraktion überwiegen.

Asymmetrie der Adhäsion: Vorne müssen neue Fokaladhäsionen aufgebaut werden, während Fokaladhäsionen im hinteren Bereich aufgelöst werden müssen.

Somit bestimmen die räumliche Verteilung der Adhäsionsstärke und der aktinpolymerisations-abhängigen Protrusion die Richtung der Migration. Zieht man in Betracht, dass Zellen beispielsweise entlang chemischer Gradienten navigieren können [60], ist es naheliegend, dass sie ihre Migrationsrichtung über intrazelluläre Signalkaskaden steuern, die unter anderem von Chemorezeptoren in der Zellmembran ausgelöst werden. Die Steuerung der Aktinfilamentorganisation über solche Signalkaskaden ist in vielen Studien bereits gezeigt worden [58]. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Adhäsionsdynamik ähnlichen Steuerungsmechanismen unterliegt, um die Zelle durch koordinierte Regulation ihrer kontraktilen und adhäsiven Strukturen in eine bestimmte Richtung zu lenken.

Diese Signalkaskaden könnten gezielt auf die Aktin- und Adhäsionsdynamik einwirken und so die wandernde Zelle in eine bestimmte Richtung lenken.

1.4 Struktur von Fokaladhäsionen

Als Abercrombie et al. Anfang der 1970er Jahre Fibroblasten-Zellkulturen mit Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) und Interferenzreflektions-Kontrastmikroskopie (RICM¹, vgl. Abb. 1.6) untersuchten, entdeckten sie adhäsive Membranbereiche mit direktem Kontakt zum Substrat [3, 2]. Diese klar abgegrenzten Bereiche sind im RICM-Bild als dunkle Flecken erkennbar, da sie bis auf 15 nm an das Substrat heranreichen können (vgl. Abb. 1.2 C)[57]. Zellen, die auf flachen Substraten kultiviert werden, besitzen typischerweise dutzende bis hunderte solcher Fokaladhäsionen mit einer Fläche von jeweils ungefähr 0,5 bis 4 μm^2 . Dabei kann ihre Anzahl und Größe selbst unter Zellen des selben Typs stark variieren und ist in hohem Maße von der Beschaffenheit des Substrates abhängig [88]. Als Heath und Dunn 1978 nachwiesen, dass Aktinfilamente in Fokaladhäsionen terminieren, kristallisierte sich ihre Funktion als Verankerungsstruktur langsam heraus; allerdings war ihr Aufbau noch völlig ungeklärt [30]. Nachdem bereits die Proteine Vinculin und α -Actinin in Fokaladhäsionen nachgewiesen worden waren [47, 27], entdeckten 1986 Horwitz et al., dass fibronectinbindende Oberflächenrezeptoren, die als Integrine bezeichnet werden, mit dem Zytoskelettprotein Talin interagieren. An diesem wiederum konnten sie eine Bindungsstelle für Vinculin nachweisen, woraus

¹RICM ist eine lichteoptische Methode, mit deren Hilfe man das Höhenprofil eines Objektes über dem Substrat rekonstruieren kann. Das Prinzip beruht darauf, dass polarisiertes Licht, mit dem die Probe bestrahlt wird, an optischen Grenzflächen wie beispielsweise der Zellmembran teilweise reflektiert wird. Variiert der Abstand der Zellmembran zum Substrat, kommt es bei den reflektierten Lichtwellen zu Phasenverschiebungen. Im resultierenden Interferenzmuster erscheinen Membranbereiche dunkel, wenn sie nahe am Substrat liegen bzw. einen Abstand aufweisen, der einem ganzzahligen Vielfachen der halben Wellenlänge entspricht.

man schließen konnte, dass Fokaladhäsionen aus einem Komplex von ECM-bindenden Integrinen aufgebaut sind, die über Adapterproteine wie Talin und Vinculin an Aktinfilamente gekoppelt sind [32]. Inzwischen sind mehr als 100 unterschiedliche Proteine bekannt, die auf der intrazellulären Seite der Fokaladhäsion einen multimolekularen Proteinkomplex (*sub-membrane plaque*) bilden, was auf einen beträchtlichen Funktionsumfang schließen lässt [88, 89].

Tatsächlich sind Fokaladhäsionen nicht nur passive mechanische Verbindungsstrukturen. Sie enthalten eine Vielzahl von Kinasen und anderen Signalproteinen und sind somit in beträchtlichem Maße an zellinternen Signalverarbeitungswegen beteiligt. Beispielsweise dienen Integrine als Chemorezeptoren, die bei Bindung eines extrazellulären Liganden Signalkaskaden im Inneren der Zelle auslösen können [68]. Darüber hinaus werden derzeit Modelle diskutiert, nach denen Fokaladhäsionen mechanische Spannung in chemische Signale übertragen und demnach als Mechanosensoren fungieren können [12, 79]. Diese Modelle stützen sich auf die Beobachtung, dass junge Fokaladhäsionen auf extern applizierten Zugstress mit Größenveränderung reagieren [25, 64]. Der Mechanismus dieser Mechanoperzeption könnte darauf beruhen, dass Proteine im Adhäsionskomplex durch eine anliegende Zugkraft gestreckt bzw. teilweise entfaltet werden. Laut dieser Theorie werden im Zuge dieser Konformationsänderung Bindungsstellen freigelegt, wodurch weitere Proteine an den Adhäsionskomplex binden können, was wiederum eine Signalkaskade auslösen würde. Ein solcher Mechanismus konnte *in vitro* bereits nachgewiesen werden [63]. Hierzu wurde das Fokaladhäsionsprotein Talin auf einem Deckglas immobilisiert und mittels einer magnetischen Pinzette² gestreckt, was zu einer erhöhten Anbindung von Vinculin führte.

Die rezeptorischen Eigenschaften von Fokaladhäsionen ermöglichen es der Zelle, verschiedene Parameter aus ihrer direkten Umwelt zu messen und ihr Verhalten gegebenenfalls anzupassen. Beispielsweise ist bekannt, dass Fibroblastenzellen ihre Stressfasern in einem definierten Winkel zu extern appliziertem Zugstress ausrichten [29]. Da Stressfasern typischerweise an beiden Enden in Fokaladhäsionen münden, ist ihre Orientierung durch die räumliche Verteilung der Fokaladhäsionen festgelegt. Demnach ist es vorstellbar, dass Fokaladhäsionen eine optimale Kraft detektieren können, bei der das Wachstum bzw. die Erhaltung der Fokaladhäsion unterstützt wird, während bei abweichenden Kraftbeträgen die Adhäsion vorzugsweise abgebaut oder aufgebaut wird.

Die molekulare Zusammensetzung von Fokaladhäsionen ist nicht nur sehr komplex, sondern kann, wie auch ihre Größe und Form, unter den einzelnen Adhäsionen einer Zelle stark variieren. Typischerweise sind junge Fokaladhäsionen sehr klein und aus wenigen Proteinen aufgebaut. Im Verlauf ihrer Reifung lagern sich immer mehr Proteine an

²Eine magnetische Pinzette (*magnetic tweezer*) besteht aus einem Elektromagneten und einem magnetischen Partikel, das z.B. an ein Zielprotein gebunden werden kann. Durch die Regelung des Stromes am Elektromagneten können definierte Kräfte auf das gebundene Protein appliziert werden [41].

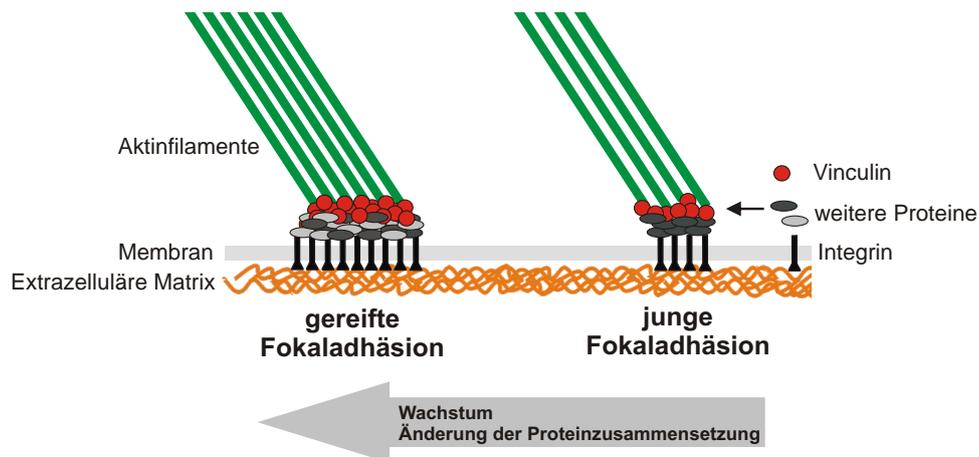


Abbildung 1.3: **Aufbau und Reifung von Fokaladhäsionen.** Fokaladhäsionen verbinden über transmembrane Integrine und intrazelluläre Adapterproteine wie beispielsweise Vinculin, die extrazelluläre Matrix mit dem Aktin-Zytoskelett. Vor allem in migrierenden Zellen durchlaufen Fokaladhäsionen einen Reifungsprozess, bei dem die Fokaladhäsionen wachsen und ihre Proteinzusammensetzung ändern.

den Proteinkomplex an, wodurch die Adhäsion an Fläche zunimmt und sich in ihrer Proteinzusammensetzung verändert (siehe Abb. 1.3).

Es sind bisher viele Versuche unternommen worden, die unterschiedlichen Reifungsstadien einer Fokaladhäsion in Bezug auf Morphologie und Proteinzusammensetzung zu klassifizieren. So spricht man bei sehr jungen Fokaladhäsionen auch von „Fokalkomplexen“, die sich zu „gereiften Fokaladhäsionen“ („*mature focal adhesions*“), „fibrillären Adhäsionen“ („*fibrillar adhesions*“) oder sogar „superreifen Fokaladhäsionen“ („*super-mature focal adhesions*“) entwickeln können [84, 85, 31]. Diese Klassifizierung ist jedoch sehr ungenau, da die Übergänge zwischen den einzelnen Stadien sehr fließend sind, und die Proteinzusammensetzung je nach Zelltyp variieren kann. So enthalten Fokaladhäsionen in Keratinozyten von Anfang an das Protein Zyxin [67], während es in PAE-Zellen (porcine aortic endothelial cells) als Marker für reifere Fokaladhäsionen gilt [84]. Da außerdem einige Autoren z.B. Fokaladhäsionen mit einer Fläche von ungefähr $1 \mu\text{m}^2$ noch als Fokalkomplexe bezeichnen [73], während andere diese schon als junge Fokaladhäsionen („*nascent focal adhesions*“) klassifizieren [11], kommt es in der Literatur oft zu verwirrenden Verwechslungen. Aus diesem Grunde werden hier Fokaladhäsionen im Folgenden nur in Bezug auf ihr Alter klassifiziert, und entweder als junge oder gereifte Fokaladhäsionen bezeichnet.

1.5 Reifung von Fokaladhäsionen

Bei migrierenden Keratinozyten beginnt die Bildung von Fokaladhäsionen bereits an der Spitze der Filopodien in Form eines punktförmigen Proteinkomplexes, der das Adhäsionsprotein VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) enthält. Dieser Komplex kann zu einer jungen Adhäsion auswachsen, die neben VASP aus einer Vielzahl von bekannten Adhäsionsproteinen wie beispielsweise Vinculin, Talin und Paxillin aufgebaut ist [67]. Viele junge Fokaladhäsionen lösen sich binnen kurzer Zeit wieder auf, während einige an Fläche zunehmen und einen Reifungsprozess durchlaufen [84]. Dabei kann sich nicht nur ihre Proteinzusammensetzung sondern auch der Zustand der eingebauten Proteine ändern. So nimmt beispielsweise in PAE-Zellen der Anteil an phosphoryliertem Paxillin mit dem Alter der Adhäsionen ab [87]. Dephosphorylierung scheint ein generelles Phänomen bei der Fokaladhäsionsreifung zu sein und geht unter anderem mit einer verminderten Wachstumsdynamik der Fokaladhäsionen einher [88]. Somit könnte es sein, dass Fokaladhäsionen durch Dephosphorylierung stabilisiert werden. Die Phosphorylierung wird durch Tyrosinkinasen wie die FAK (*focal adhesion kinase*) und c-Src (*cellular sarcoma kinase*) katalysiert, die ebenfalls in Fokaladhäsionen lokalisiert sind. Diese Kinasen werden wiederum von stromaufwärts liegenden Signalproteinen wie den GTPasen Rho und Rac reguliert [86, 15].

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass viele Fokaladhäsionsproteine einem ständigen Austausch unterliegen und teilweise nur Sekunden bis wenige Minuten im Adhäsionskomplex verweilen [49]. Dabei ist die Stärke des Austausches von Paxillin beispielsweise abhängig von der Aktivität der Tyrosinphosphatase *Shp2* [80]. Dies legt den Schluss nahe, dass die Verweildauer von Fokaladhäsionsproteinen im Adhäsionskomplex über ihren Phosphorylierungszustand gesteuert werden kann.

Während die Fokaladhäsionsreifung in etlichen Studien in Bezug auf Phosphorylierungsgrad und Proteinzusammensetzung analysiert wurde, ist über den Abbau von Fokaladhäsionen und dessen Steuerung bisher nur wenig bekannt. Allerdings ist beobachtet worden, dass reife Fokaladhäsionen bei migrierenden Zellen unmittelbar vor ihrer Auflösung mit dem Zellkörper während der Kontraktion nach vorne gezogen werden und sozusagen über das Substrat gleiten (*sliding*), was auf eine Destabilisierung des Proteinkomplexes hindeutet. Diese Destabilisierung kann prinzipiell rein mechanisch durch die Kontraktionskraft der Zelle oder biochemisch erfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung sogenannter Calpain Proteasen die Substratablösung verringert [1]. Da einige Fokaladhäsionsproteine zu den Zielproteinen von Calpain gehören, könnte es sein, dass diese im Zuge des Ablöseprozesses gezielt abgebaut werden. Darüber hinaus ist bekannt, dass die proteolytische Spaltung von ECM-Proteinen bei epidermalen Keratinozyten zur Migration beitragen kann [61]. Proteolyse von Adhäsionsproteinen ist aber nicht der einzige mögliche Mechanismus eines biochemisch gesteuerten Abbaus von Fokaladhäsionen. Wie oben bereits erwähnt, werden Proteine im Adhäsionskomplex ständig ausgetauscht und es ist vorstellbar, dass die Austauschrate durch ihre

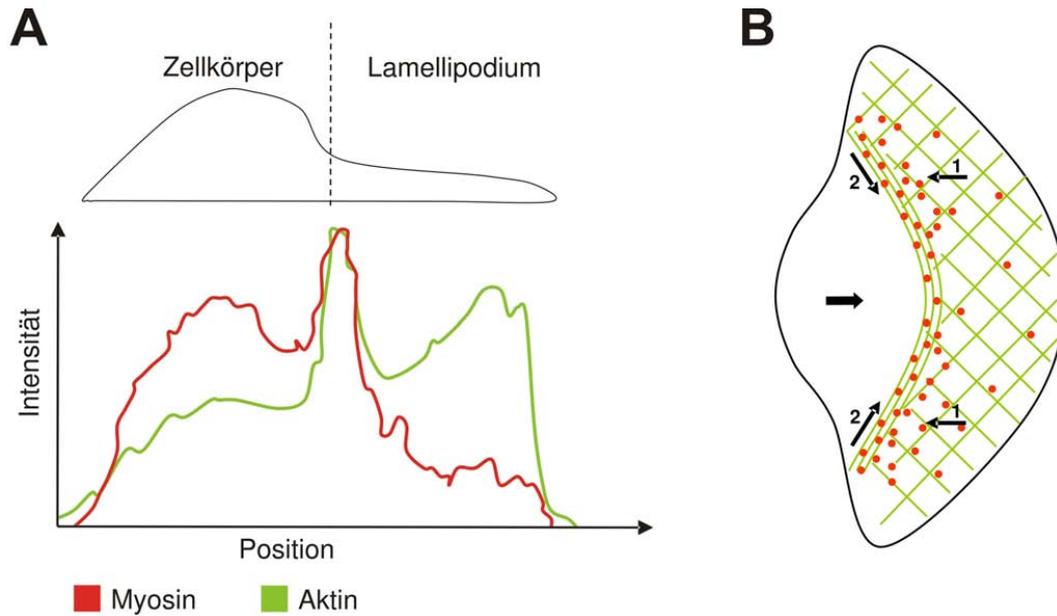


Abbildung 1.4: **Aktin- und Myosionverteilung in migrierenden Keratozyten.** A: Fluoreszenzintensität von markiertem Aktin und Myosin II über die gesamte Länge einer polarisierten Keratozyte [74]. B: Erweitertes *Modell der dynamischen Netzwerkkontraktion*. Im hinteren Teil zieht sich das Aktin-Netzwerk durch die Motoraktivität des Myosins zusammen, was vortreibende Zugkräfte (1) erzeugt. Dies führt zu einer Verdichtung von Aktin und Myosin an der Grenze zum Zellkörper in Form eines lateral orientierten kontraktile Bündels. Diese stressfaserähnliche Struktur übt laterale Zugkräfte (2) aus, die dazu beitragen, dass sich die Zelle vom Substrat ablöst [55].

Phosphorylierung moduliert werden kann. Somit könnte der Adhäsionskomplex durch Erhöhung seines Proteinaustauschs gezielt destabilisiert werden, was in Verbindung mit der anliegenden Zugkraft zur Auflösung der Fokaladhäsion führen würde.

1.6 Übertragung von Kontraktionskräften und Bewegung von Aktinfilamenten bei der Migration

Obwohl zahlreiche Studien belegen, dass die Myosin-II-vermittelte Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts essentiell für die effektive Migration von Zellen ist, ist der Mechanismus auf zellulärer Ebene noch nicht vollständig verstanden. Auf molekularer Ebene beruht die Kontraktion darauf, dass Myosin-Motorproteine die Aktinfilamente zueinander verschieben, wie es auch vom quergestreiften Muskel bekannt ist, wo Aktin und Myosin in hoch geordneten Sarkomerstrukturen organisiert sind. Bei Fisch-Keratozyten, die den in dieser Arbeit untersuchten humanen Keratinozyten morphologisch ähnlich sind, ist die Verteilung und Dynamik von Aktin und Myosin bereits ausführlich untersucht worden. Hier hat man herausgefunden, dass die Dichte von Myosin im Lamellipodium von vorne nach hinten kontinuierlich ansteigt und an der Grenze zwischen

Lamellipodium und Zellkörper maximal ist. Die Aktinfilamentdichte ist am Leitsaum des Lamellipodiums sehr hoch, und nimmt nach hinten hin zunächst ab. Allerdings steigt sie vor dem Zellkörper wieder an und erreicht dort ihr Maximum, wo auch die Myosindichte am höchsten ist. In diesem Bereich der maximalen Aktin-Myosin-Dichte liegen die Aktinfilamente teilweise parallel zueinander und bilden ein bogenförmiges, senkrecht zur Migrationsrichtung orientiertes Bündel. Aufgrund dieser Befunde wurde das *Modell der dynamischen Netzwerkkontraktion* (*dynamic network contraction model*) entwickelt (siehe Abb. 1.4) [74, 55]. Danach fällt im Lamellipodium die Steifigkeit des Aktinnetzwerks aufgrund der sich verringernden Dichte von vorne nach hinten zunächst ab, wobei die Myosin-abhängige Kontraktionskraft stetig ansteigt. In einem kritischen Abstand zum Leitsaum überwiegt schließlich die Motoraktivität des Myosins gegenüber der Steifheit des Aktin-Netzwerks. Dies führt zu einem Zusammenziehen des Netzwerks und könnte ebenfalls die Parallelisierung der Aktinfilamente bewirken. Für dieses Modell spricht unter anderem, dass sich die Aktinfilamente im vorderen Teil des Lamellipodiums nach hinten bewegen, während sich das Aktin im hinteren Bereich der Zelle nach vorne bewegt. Dieses Phänomen bezeichnet man als retrograden bzw. anterograden Aktinfluss [75, 66].

Schaub et al. konnten dies nachweisen, indem sie Zeitreihen von fluoreszent markiertem Aktin in lebenden Zellen aufzeichneten und mittels Kreuzkorrelation die mittlere Bewegung der fluoreszierenden Partikel quantifizierten [66]. Aus den so bestimmten Geschwindigkeitsfeldern ging hervor, dass die Grenze, an der beide Flussrichtungen aufeinandertreffen, mit einer Breite von weniger als $5 \mu\text{m}$ verhältnismäßig scharf ist und in etwa in der Mitte des Lamellipodiums liegt. Aus den Geschwindigkeitsfeldern konnten Schaub et al. den räumlichen Gradienten des Aktinflusses ableiten, welcher die Kompression bzw. die Dehnung des Aktin-Netzwerkes widerspiegelt. Diese Berechnungen ergaben ein Kompressionsmaximum des Aktins, welches sich kurz vor den lateral orientierten Aktinbündeln über die Breite des gesamten Lamellipodiums erstreckte. Die gleichzeitige Analyse des Myosinflusses ergab darüber hinaus, dass sich Aktin- und Myosinstrukturen gegenläufig bewegten. Insgesamt gesehen unterstützen diese Daten das *Modell der dynamischen Netzwerkkontraktion*.

Interessanterweise sind die Zugkräfte, die migrierende Keratozyten auf das Substrat übertragen, hauptsächlich lateral orientiert und kommen wahrscheinlich durch das Zusammenziehen des vor dem Zellkörper befindlichen Aktinbündels zustande. Da aus RICM-Bildern hervorgeht, dass diese Bündel auf der Grenze zwischen vorderen Bereichen starker und hinteren Bereichen schwacher Adhäsion liegen, könnte ihre Kontraktion das Ablösen des Zellkörpers zur Folge haben [55]. Wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, wurde in dieser Arbeit eine ähnliche Kraftverteilung bei humanen Keratinozyten nachgewiesen.

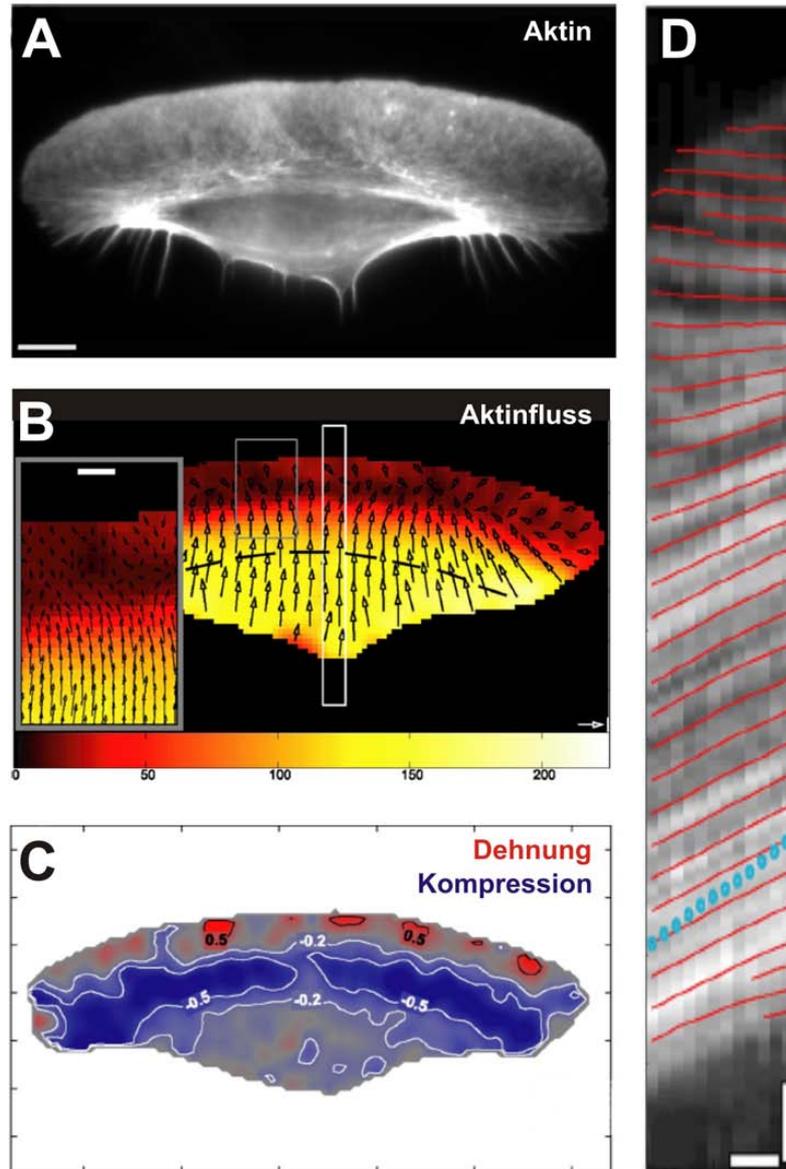


Abbildung 1.5: **Aktinfluss in migrierenden Keratozyten.** A: Verteilung von fluoreszent markiertem Phalloidin, welches in eine migrierende Keratozyte mikroinjiziert wurde. Phalloidin bindet spezifisch an Aktinfilamente. B: Verteilung der Aktinfluss-Geschwindigkeiten derselben Zelle. Die Geschwindigkeiten sind mit Pfeilen dargestellt, der Betrag der Geschwindigkeit ist zusätzlich in Falschfarben angegeben. In der Vergrößerung (grauer Kasten) ist die Grenze zwischen anterogradem und retrogradem Fluss zu erkennen. Einheit der Farbskala: nm/s, weißer Pfeil: 100 nm/s, Balken: 3 μm . C: Falschfarben-Darstellung des Aktinfluss-Gradienten. In roten Bereichen wird das Aktin-Netzwerk gedehnt, in blauen Bereichen wird es komprimiert. Einheit des Geschwindigkeitsgradienten: nm^2/s . D: Raum-zeitliche Darstellung des Fluoreszenzbildes über die gesamte Länge der Zelle, wobei der Raum vertikal und die Zeit horizontal von links nach rechts aufgetragen sind. Der analysierte Bereich ist in B durch einen weißen Rahmen markiert. Die roten Linien stellen simulierte Raum-Zeit-Graphen dar, die aus den gemessenen Geschwindigkeitsdaten zurückgerechnet wurden. Die blaue gepunktete Linie zeigt die Bewegung der gesamten Zelle an. Waagerechter Balken: 10 s, senkrechter Balken: 3 μm . Verändert nach Schaub et al. 2007.

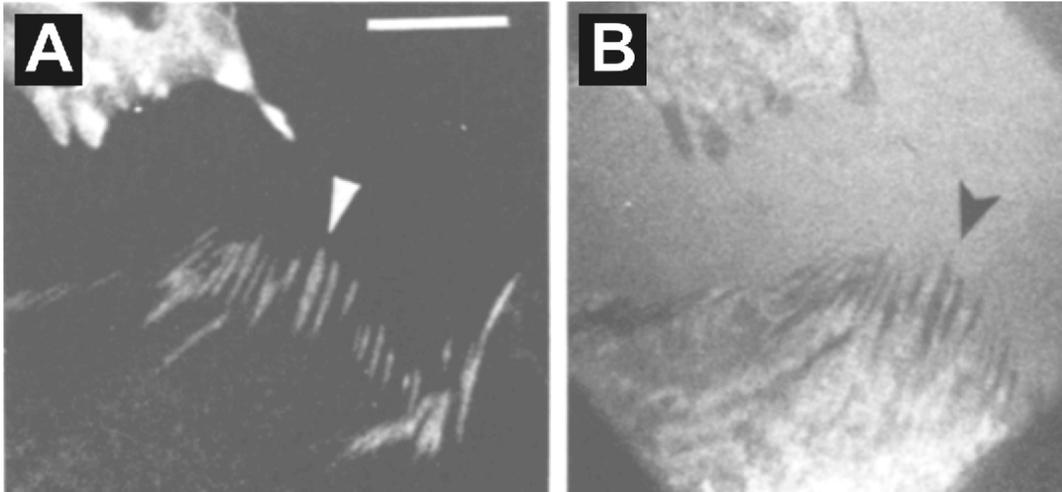


Abbildung 1.6: Erste Lokalisierung von Vinculin im Jahr 1979. A: Immunfluoreszenzaufnahme einer Zelle des Hühnermagens mit Antikörpern gegen Vinculin. B: RICM-Aufnahme derselben Zelle. Vinculin ist in Membranbereichen mit engem Kontakt zum Substrat (dunkle Flecken im RICM-Bild) lokalisiert. Die Pfeile markieren im jeweiligen Bild dieselbe Fokaladhäsion. Balken: 10 μm . Verändert nach Geiger 1979

1.7 Vinculin als Kraftüberträger und Regulator

Im Jahre 1979 extrahierte Benjamin Geiger ein Protein aus Zellen des Hühnermagens, welches er zunächst als 130 kDa-Protein bezeichnete, und dem er in der kurz darauf folgenden Veröffentlichung den Namen Vinculin gab [26, 27]. Es gelang ihm, mit Hilfe des aufgereinigten Proteins spezifische Antikörper zu produzieren, was ihm die Möglichkeit eröffnete, Vinculin in der Zelle zu lokalisieren³. Durch Kombination von RICM und Fluoreszenzmikroskopie konnte er schließlich nachweisen, dass Vinculin in Adhäsionsstrukturen lokalisiert und mit anderen Zytoskelettproteinen wie beispielsweise α -Actinin und Aktin assoziiert ist (siehe Abb. 1.6).

Inzwischen ist neben der Aminosäuresequenz auch die räumliche Struktur von Vinculin aufgeklärt worden, dessen exakte Größe 116 kDa beträgt. Vinculin besteht aus vier Kopfdomänen (D1 bis D4), die über eine prolinreiche Region mit der Schwanzdomäne Vt verbunden sind. Durch die Aufklärung der Struktur konnte gezeigt werden, dass das Protein in einer aktivierten und einer inaktivierten Konformation vorliegen kann, was durch ältere biochemische Analysen unterstützt wird [36, 37]. In Abbildung 1.7 ist die inaktivierte Form dargestellt. Hier bilden die Kopfdomänen eine taschenförmige Struktur in der die Schwanzdomäne eingebettet ist. Wechselwirkungen zwischen Vt und D4 stabilisieren diese eingeklappte Konformation, bei der Bindungsstellen unter anderem für F-Aktin, VASP, Vinexin und Talin [33, 14, 40, 36, 37] maskiert sind. Weitere interessante Bindungspartner von Vinculin sind die Fokaladhäsionsproteine Paxillin

³Lokalisierung von Proteinen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie: Fluoreszenzfarbstoffe werden direkt oder indirekt Antikörper gekoppelt, die spezifisch an das interessierende Protein binden.

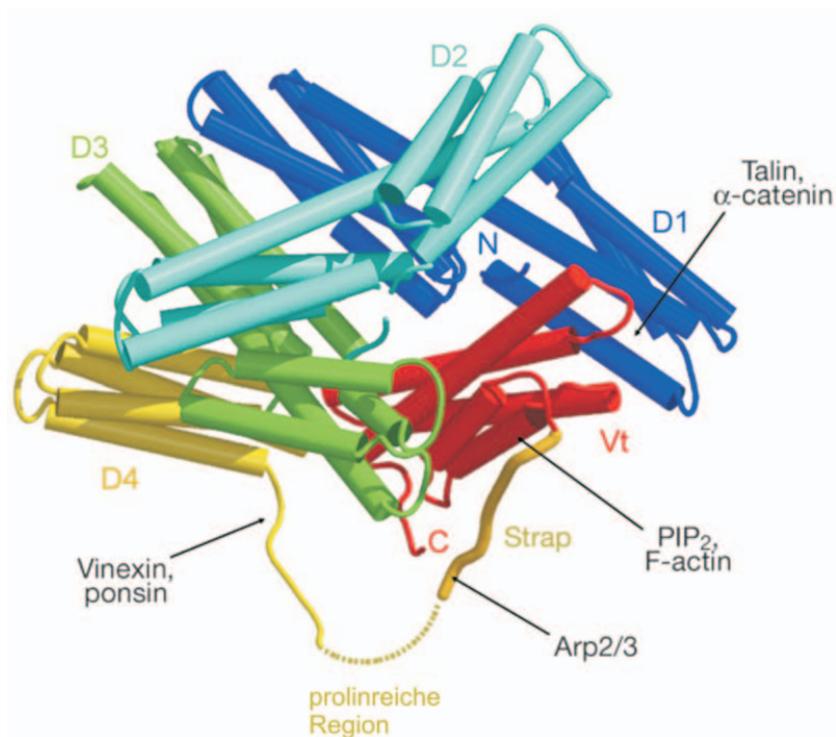


Abbildung 1.7: **Räumliche Darstellung der Tertiärstruktur von Vinculin im inaktivierten Zustand.** Die vier Kopfdomänen D1 bis D4 (mit unterschiedlichen Farben markiert) bilden eine Tasche, in der die Schwanzdomäne Vt (rot) eingeschlossen ist. Auf die prolinreiche Region am Ende der D4-Domäne folgt ein Verbindungsstück (*strap*), das an die Schwanzdomäne anknüpft. Die Bindungsstellen der Liganden sind mit schwarzer Beschriftung gekennzeichnet. Verändert nach Bakolitsa et al. 2004.

und α -Actinin, sowie Arp2/3, welches die Verzweigung von Aktinfilamenten hervorruft. Außerdem konnten Diez et al. nachweisen, dass sich ein Teil der Schwanzregion in Lipidmembranen einbauen kann [21].

Die Vielzahl seiner Bindungspartner lässt vermuten, dass Vinculin eine kreuzvernetzende Funktion im Adhäsionskomplex ausübt und somit erheblich zur Stabilität der Fokaladhäsion beiträgt. Tatsächlich ist bei mutierten Zellen mit ausgeschaltetem Vinculin-Gen (Vinculin-Knockout-Zellen), die Übertragung interner Zugkräfte auf das Substrat im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert [51]. Dass dies nicht auf eine verminderte Aktin-Myosin-Aktivität, sondern vielmehr auf ein vermindertes Adhäsionsvermögen zurückzuführen ist, belegen einerseits Experimente, bei der die Zahl der adhärenierten Knockout-Zellen mit der von Wildtyp-Zellen verglichen wurde [19] und andererseits direkte Adhäsionskraft-Messungen mit magnetischen Pinzetten [51]. Diese Ergebnisse fügen sich sehr gut in die Beobachtungen ein, dass Vinculin-Knockout-Zellen schneller migrieren [82] als ihr Wildtyp-Pendant und außerdem eine erhöhte Auf- und Abbaudynamik ihrer Fokaladhäsionen aufweisen [65]. In diesem Zusammenhang ist nun interessant, inwieweit die kreuzvernetzende Funktion von Vinculin über gezieltes Umschalten zwischen beiden Konformationen moduliert werden kann.

Durch Fluorescence Resonance Energy Transfer⁴ (FRET) konnte vor kurzem erstmals gezeigt werden, dass in Fokaladhäsionen lebender Zellen beide Vinculin-Konformationen vorkommen [17]. Aktiviertes Vinculin konnte vor allem in Fokaladhäsionen mit hoher Wachstumsdynamik nachgewiesen werden, so z.B. in Fokaladhäsionen, welche sich im Auflösungsprozess befinden oder welche beim Spreiten⁵ einer adhärenierenden Zelle neu gebildet werden. Im Gegensatz dazu war in stabilen Adhäsionen ein höherer Anteil an inaktiviertem Vinculin zu finden. Dies ist ein zunächst unerwartetes Ergebnis, da es darauf hindeutet, dass Vinculin vor allem im inaktivierten, also angeblich nicht aktinbindenden Zustand stabilisierende Wirkung hat, und wirft darüber hinaus die Frage auf, welcher Mechanismus hinter der Aktivierung bzw. Inaktivierung von Vinculin steht. In diesem Zusammenhang spielen sehr wahrscheinlich die beiden Phosphorylierungsstellen von Vinculin an den Tyrosinresten 100 und 1065 (Tyr100 und Tyr1065) eine entscheidende Rolle. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphorylierung von Tyr1065 eine verminderte Kopf-Schwanz-Interaktion hervorruft und demnach den aktivierten Zustand begünstigt [90]. Allerdings hat diese Phosphorylierung *in vitro* kei-

⁴Fluoreszenzmikroskopische Methode, die darauf beruht, dass die Energie eines angeregten Fluorophors (Donor) auf einen unmittelbar benachbarten Fluorophor (Rezeptor) übertragen werden kann. So ist es möglich, durch Anregung des Donors mit seiner spezifischen Anregungswellenlänge und Messung des vom Akzeptor emittierten Lichtes, auf die räumliche Nähe der beiden Fluorophore zu schließen. Im oben besprochenen Beispiel wurde der Donor vor der Vinculin-Kopfgruppe und der Akzeptor zwischen der prolinreichen Region und Vt eingebaut. Im inaktivierten Zustand liegen die Fluorophore so nah beieinander, dass bei Anregung des Donors Energieübertragung stattfindet und Licht vom Akzeptor emittiert wird. Im aktivierten Zustand sind die Fluorophore zu weit voneinander entfernt. Der Donor überträgt somit keine Energie und emittiert bei Anregung Licht seiner eigenen spezifischen Wellenlänge.

⁵Adhäsionsprozess, bei dem sich eine Zelle auf flachem Substrat ausbreitet.

nen Einfluss auf die Fähigkeit, Aktin zu binden. Wenn es sich bestätigen sollte, dass Vinculin auch im inaktivierten Zustand an Aktin binden kann, wäre dies eine schlüssige Erklärung für die unerwartete Beobachtung, dass inaktiviertes Vinculin vor allem in stabilen Fokaladhäsionen zu finden ist.

Vieles spricht dafür, dass der dynamische Auf- und Abbau von Fokaladhäsionen über Tyrosinphosphorylierung gesteuert wird. Tyrosinkinase werden durch die Anbindung von Integrin an die ECM aktiviert [23] und Dephosphorylierung ist ein typisches Phänomen für die Stabilisierung und Reifung von Fokaladhäsionen [84]. Desweiteren finden sich im Adhäsionskomplex verschiedene Tyrosinkinase wie FAK (Focal adhesion kinase) und c-Src, von der bekannt ist, dass sie Vinculin an Tyr1065 phosphoryliert [90]. Interessanterweise führt die Aktivität von FAK zu einer Destabilisierung des Vinculins im Adhäsionskomplex [80], was wiederum zu der oben beschriebenen Beobachtung passt, dass aktiviertes Vinculin vor allem in Fokaladhäsionen mit hoher Wachstumsdynamik vorkommt.

Insgesamt gesehen deuten alle diese Studien darauf hin, dass Vinculin die Rolle des Stabilisators und Kreuzvernetzers innerhalb des Adhäsionskomplexes übernimmt, wobei die stabilisierende Wirkung durch Phosphorylierung gezielt reguliert werden könnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigen dieses Modell. Wie in den folgenden Kapiteln beschrieben, wurde der Zusammenhang zwischen Vinculinaustausch, Vinculinphosphorylierung, sowie Wachstumsdynamik und Kraftübertragung von Fokaladhäsionen systematisch mit verschiedenen fluoreszenzmikroskopischen Methoden untersucht.

1.8 Ziele der Arbeit

Die hoch organisierte Struktur vielzelliger Organismen kommt vor allem dadurch zustande, dass jede Einzelzelle innerhalb eines Gewebes spezifische Verbindungen in Form von Adhäsionsstrukturen zu ihrem umgebenden Substrat aufbaut. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, über welche Mechanismen die Zelle solche Adhäsionsstrukturen bilden und auflösen kann. Diese Erkenntnisse sind essentiell, um in Zukunft verstehen zu können, wie Gewebe während der Embryonalentwicklung entstehen und wie die Neubildung von Geweben im adulten Organismus funktioniert. Als Modellsystem wurden migrierende Keratinozyten verwendet, da diese Zellen eine ausgeprägte Fokaladhäsionsdynamik zeigen.

Es sollte insbesondere die Frage geklärt werden, welche Rolle das Fokaladhäsionsprotein Vinculin bei der Reifung von Fokaladhäsionen spielt, und inwieweit sich seine Phosphorylierung auf diesen Reifungsprozess auswirkt. Diese Fragestellung sollte von verschiedenen Perspektiven aus beleuchtet werden, um daraus letztendlich ein schlüssiges Gesamtbild des komplexen Reifungsprozesses zusammensetzen zu können.

So wurde zunächst die Fokaladhäsionsdynamik in Abhängigkeit der Vinculinphosphorylierung auf verschiedenen Zeitskalen analysiert: Neben der Migrationsgeschwin-

digkeit der gesamten Zelle wurden die Lebensdauern, sowie Auf- und Abbauraten ihrer Fokaladhäsionen gemessen. Diese Prozesse spielen sich im Bereich von Minuten bis Stunden ab. Darüber hinaus wurde der schnelle Aus- und Einbau von Vinculin, der innerhalb von einigen Sekunden bis wenigen Minuten erfolgt, mittels *Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)* bei verschiedenen Reifungs- und Phosphorylierungsgraden der Fokaladhäsionen analysiert. Da Fokaladhäsionen über Vinculin mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden sind, wurde außerdem untersucht, wie sich der Reifungsprozess auf ihre Aktinkopplung und Kraftübertragung auswirkt.

Mit Hilfe dieser sehr unterschiedlichen experimentellen Ansätze konnte die Regulation der Vinculin-Bindungskinetik, sowie ihre lokalen und globalen Auswirkungen in Form von beispielsweise Kraftübertragung und Migrationsgeschwindigkeit, analysiert werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Einführung in die verwendeten Methoden zur Lebendzellbeobachtung

Die gezielte Markierung von Proteinen in lebenden Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen hat sich im Lauf der letzten Jahrzehnte als ein zentrales Werkzeug für Zellbiologen etabliert, um die Dynamik einzelner Proteine sichtbar zu machen. Dabei werden entweder fluoreszent markierte Proteine in die Zelle injiziert, oder der genetische Code des entsprechenden Proteins wird um einen fluoreszierenden Abschnitt erweitert, sodass sich die Zelle das markierte Protein selber herstellt. Die Bildgebung erfolgt üblicherweise über ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop¹ (LSM) oder ein konventionelles Lichtmikroskop mit Lichtbogenlampe. An dieser Stelle ist außerdem die etwas seltener angewendete TIRF-Mikroskopie² zu erwähnen. Diese ist vor allem bei der Untersuchung von Fokaladhäsionen interessant, da nur ein sehr dünner optischer Schnitt direkt über dem Deckglas abgebildet wird, welches genau der Bereich ist, in dem Fokaladhäsionen bei kultivierten Zellen lokalisiert sind. Somit ist die Hintergrundstrahlung des darüberliegenden Zytoplasmas minimiert und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis außerordentlich

¹Die Probe wird beim Laser-Scanning-Mikroskop mit einem Laser spezifischer Anregungswellenlänge abgerastert. Das emittierte Licht jedes Rasterpunktes wird mit einem Photomultiplier verstärkt und in elektrische Spannung umgewandelt. Die elektrischen Signale werden anschließend in digitale Information umgewandelt und im Computer zu einem Bild zusammengesetzt. Desweiteren erlaubt die Laser-Scanning-Mikroskopie durch ihren konfokalen Aufbau die Abbildung eines relativ dünnen optischen Schnitts, sodass Hintergrundstrahlung von Fluorophoren außerhalb der Fokusebene minimiert wird. Die Dicke des optischen Schnitts wird durch die Apertur einer Lochblende bestimmt, durch die der Laserstrahl geleitet wird, und beträgt mindestens $1 \mu\text{m}$ [54].

²*Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy* ist eine Methode zur selektiven Anregung von Fluorophoren unmittelbar über der oberen Grenzfläche des Deckglases. Hierzu wird das Anregungslicht in einem flachen Winkel von unten auf das Deckglas geleitet, sodass es zur Totalreflektion an der Grenzfläche kommt. Dabei entsteht eine evaneszente Welle, die in ihrer Intensität exponentiell mit der Entfernung von der reflektierenden Grenzfläche abnimmt und somit die Probe nur bis zu einer Tiefe von ca. 200 nm durchdringt [8, 42].

gut. Während vor einigen Jahren zur Bildaufnahme noch analoge Videomikroskopie das Mittel der Wahl war, hat man heute durch die starke Verbreitung digitaler CCD-Kameras und konfokaler Laser-Scanning-Mikroskope das Bildmaterial normalerweise digital vorliegen. In Verbindung mit der Rechenleistung heutiger Personalcomputer ist es daher sehr einfach geworden, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mittels digitaler Bildverarbeitung quantitativ auszuwerten. Auch wenn in der biologischen Forschung traditionell viele Phänomene qualitativ beschrieben werden, nehmen quantitative Bildanalyseverfahren einen immer höheren Stellenwert ein, und erlauben es, zusätzliche Informationen aus dem aufgenommenen Bildmaterial zu extrahieren bzw. subjektive Eindrücke statistisch zu untermauern.

In dieser Arbeit wurde das Adhäsionsverhalten migrierender Zellen mit verschiedenen quantitativen fluoreszenzmikroskopischen Methoden untersucht, die im Folgenden vorgestellt werden:

2.1.1 Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP)

Bei FRAP-Experimenten werden fluoreszierende Moleküle mit einem Laserstrahl in einer definierten Region irreversibel ausgebleicht. Sind die Proteine in diesem Bereich beweglich, wird die Fluoreszenzintensität im Laufe der Zeit wieder zunehmen, da gebleichte Moleküle den Bereich verlassen und fluoreszierende Moleküle aus angrenzenden Regionen ihren Platz einnehmen. Über den Anstieg der Fluoreszenzintensität im Bleichfeld kann man somit indirekt auf die Bewegung der Moleküle schließen. Mit den ersten FRAP-Experimenten Mitte der 1970er Jahre wurde die laterale Beweglichkeit von Molekülen in Lipidmembranen gemessen [9, 22]. Inzwischen hat sich FRAP als weit verbreitete Methode zur Messung von Proteindynamik etabliert, da die Laser von handelsüblichen Laser-Scanning-Mikroskopen zum Ausbleichen genutzt werden können und somit in vielen Fällen keine Spezialaufbauten nötig sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde das An- und Abbinden von Vinculin im Adhäsionskomplex mittels FRAP gemessen. Zur fluoreszenten Markierung wurde ein Plasmid in die Zelle eingeschleust, welches ein Gen für Vinculin mit einem zusätzlichen fluoreszierenden Teilbereich (GFP: *green fluorescent protein*) enthielt. Für einige Untersuchungen kam außerdem ein Vinculinkonstrukt zum Einsatz, bei dem eine Phosphorylierungsstelle (Tyr1065) nicht mehr vorhanden war. Vinculin liegt in der Zelle entweder gebunden im Adhäsionskomplex oder in gelöster Form vor. Im fluoreszenzmikroskopischen Bild sind daher helle Flecken zu sehen, wo GFP-Vinculin in den Fokaladhäsionen lokalisiert ist, die von einem diffusen Schleier überlagert werden. Dieser Schleier rührt von zytoplasmatischem GFP-Vinculin her, das im gesamten Lumen der Zelle frei beweglich diffundiert (siehe Bilderserie Abb. 2.1). Wird nun ein Bereich gebleicht, an dem sich eine Fokaladhäsion befindet, kann die darauffolgende Erholung der Fluoreszenz durch zwei Prozesse verursacht sein:

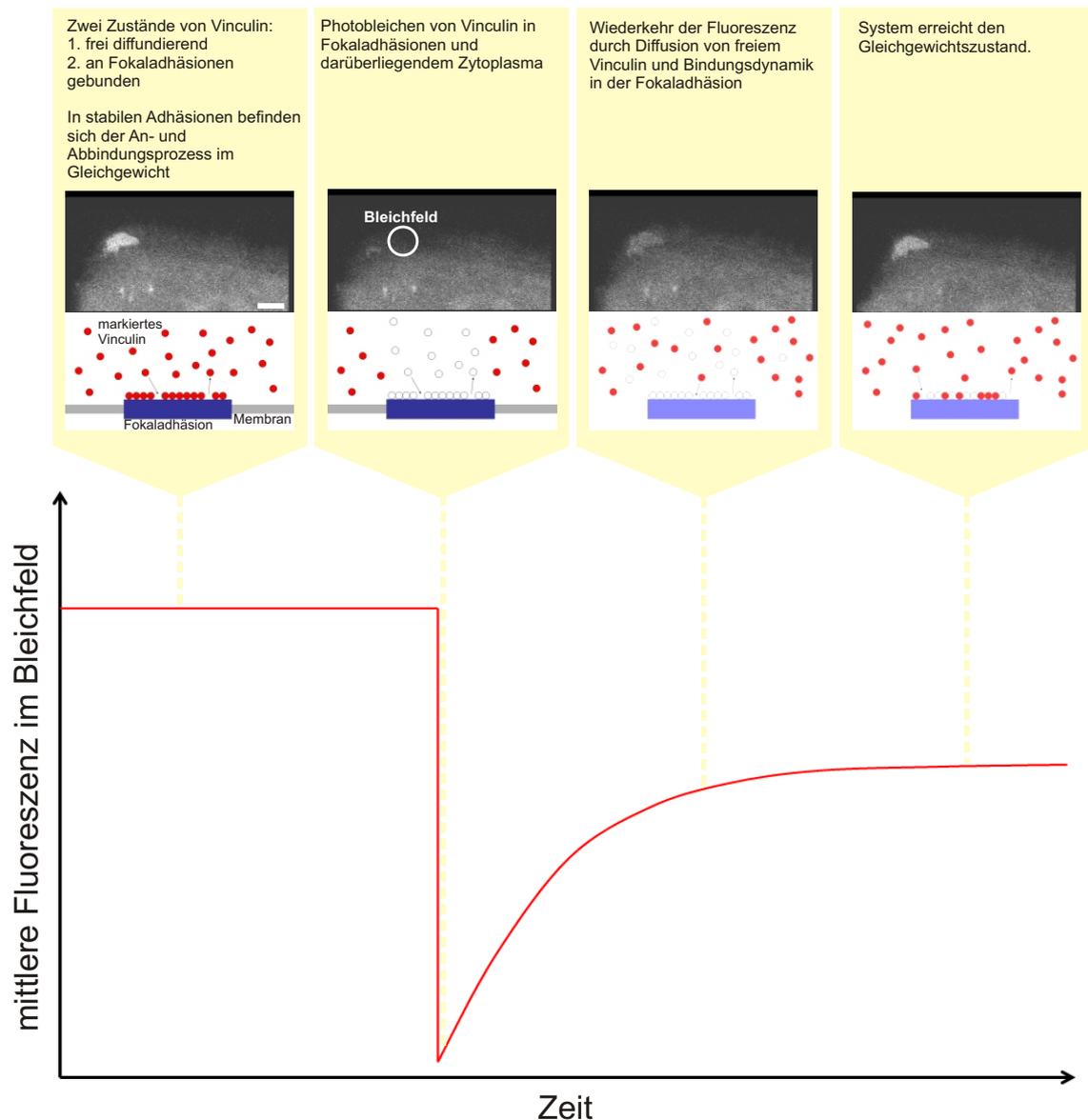


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung eines FRAP-Experiments zum Vinculinaustausch in Fokaladhäsionen. Den Originalbildern eines FRAP-Experimentes (oben, schwarzweiß) sind Schemazeichnungen gegenübergestellt, die die Vorgänge bei der Wiederkehr der Fluoreszenz veranschaulichen. Im unteren Bereich ist eine symbolische Fluoreszenzerholungskurve dargestellt. Die Bilder zeigen GFP-markiertes Vinculin in einer Keratinozyte und wurden mit einem Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Die Fokaladhäsion ist als heller Fleck deutlich zu erkennen. Zytoplasmatisches Vinculin erscheint als diffuser Schleier. Balken: 2 μm

1. **Zytoplasmatische Diffusion:** Im Zytoplasma gelöste Moleküle diffundieren in den gebleichten Bereich während gebleichte Moleküle sich aus dem Bereich herausbewegen.
2. **Kinetischer Austausch:** An den Adhäsionskomplex gebundene Moleküle lösen sich ab und geben somit Bindungsstellen frei. An diese freigewordenen Liganden können nun andere in Lösung befindliche Moleküle anbinden. In Verbindung mit der zytoplasmatischen Diffusion werden im Laufe dieses Prozesses gebleichte gegen fluoreszierende Moleküle ausgetauscht. Geht man von einem unendlich großen Vorrat an gelösten Molekülen aus, sind im stationären Zustand, bei dem die Fluoreszenz eine Sättigung erreicht, alle ausgetauschten Moleküle fluoreszierend.

Die zeitliche Steigung der mittleren Fluoreszenz ist demnach ein Maß für die Geschwindigkeit der Diffusion der gelösten Moleküle bzw. der Rate des kinetischen Austausches. Darüber hinaus entspricht das Verhältnis aus dem Sättigungswert im stationären Zustand und der Intensität vor dem Bleichen dem Anteil der beweglichen Moleküle.

Will man ausschließlich die Austauschkinetik der Moleküle untersuchen, kann die Überlagerung von Diffusionsprozessen problematisch sein, da sie die Dauer der Fluoreszenzerholung und die Höhe des Sättigungswertes stark beeinflussen können. Sind zwei sich überlagernde Fluoreszenzerholungsprozesse in ihrer Geschwindigkeit sehr unterschiedlich, zeigt sich dies in einem zweiphasigen Anstieg der Fluoreszenz. Da die Diffusion von Proteinen in wässriger Lösung meist um ein Vielfaches schneller erfolgt als der kinetische Austausch der Proteine, zeigt sich in der Fluoreszenzerholungskurve ein diffusionsgetriebener kurzer Anstieg innerhalb der ersten Sekunden, gefolgt von einem langsamen Anstieg über Minuten, welcher das An- und Abbinden des Proteins widerspiegelt. In diesem Fall hat man gute Möglichkeiten, die beiden Prozesse aus der Fluoreszenzerholungskurve zu extrahieren und getrennt zu analysieren. Natürlich ist es empfehlenswerter, beide Prozesse bereits bei der Messung zu trennen. Bei der Messung von Austauschkinetik an Fokaladhäsionen ist daher die oben erwähnte TIRF-Mikroskopie eine vorteilhafte Methode, da ein großer Teil der zytoplasmatischen Moleküle nicht abgebildet werden. Verwendet man dagegen ein Laser-Scanning-Mikroskop, so empfiehlt es sich, die optische Schichtdicke durch eine möglichst kleine konfokale Blende gering zu halten.

Um zu prüfen, welcher der oben genannten Prozesse der Fluoreszenzerholung zugrunde liegt, kann man den Umstand ausnutzen, dass ihre Dauer bei Diffusion von der Bleichfeldgröße abhängt, während die Austauschkinetik davon unabhängig ist. Wenn man Austauschkinetik messen will, ist es daher sinnvoll, zunächst FRAP-Experimente mit verschiedenen Bleichfeldgrößen durchzuführen. Liegt ausschließlich Diffusion vor, ist die Halbwertszeit $t_{1/2}$ der Fluoreszenzerholung quadratisch vom Radius des Bleichfeldes abhängig. Beschreibt die Kurve dagegen ausschließlich eine Austauschkinetik, bleibt $t_{1/2}$ konstant [48].

Könnte man auf diese Weise Diffusion ausschließen, bietet es sich an zu prüfen, ob die gemessene Kurve mit einem einfachen kinetischen Modell beschrieben werden kann. In der folgenden Zeichnung ist das Modell skizziert:



Die austauschenden Moleküle (rote Dreiecke) sind entweder an einen Liganden (schwarzes Ypsilon) gebunden oder befinden sich in Lösung. An- und Abbindung erfolgen zufällig mit den Raten k_{on} und k_{off} . Sei nun n der Anteil der besetzten Bindungsstellen und c_c die Konzentration der gelösten Moleküle, welche als konstant angenommen wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein gelöstes Molekül anbindet, hängt neben k_{on} von c_c , sowie dem Anteil der freien Bindungsstellen $1 - n$ ab. Im Gegensatz dazu ist die Wahrscheinlichkeit, ob ein Molekül abbindet, von k_{off} und dem Anteil der besetzten Bindungsstellen n abhängig. Die zeitliche Änderung von n entspricht der Differenz aus angehenden und abgehenden Molekülen pro Zeitschritt und kann daher mit folgender Differenzialgleichung beschrieben werden:

$$\partial n(t) / \partial t = k_{on} c_c (1 - n(t)) - k_{off} n(t) \quad (2.1)$$

Löst man diese Differenzialgleichung, erhält man folgende exponentielle Funktion:

$$n(t) = \alpha (1 - e^{-kt}) \quad (2.2)$$

mit der Austauschrate $k = k_{on} c_c + k_{off}$ und dem Sättigungswert $\alpha = \frac{k_{on} c_c}{k_{on} c_c + k_{off}}$, der dem Anteil der austauschenden Moleküle entspricht. Diese Funktion entspricht der auf die Intensität vor dem Bleichen normierten Fluoreszenzerholungskurve zum Bleichzeitpunkt $t_b = 0$. Dies ist einleuchtend, da der Anteil der Fluoreszenz am Fluoreszenzsignal vor dem Bleichen den Anteil der von Fluorophoren besetzten Bindungsstellen genau widerspiegelt³.

Neben der Überlagerung von mehreren Bewegungsprozessen ist das bildgebungsbedingte Ausbleichen der Fluorophore, welches bei keiner fluoreszenzmikroskopischen Methode gänzlich vermieden werden kann, ein problematischer Nebeneffekt bei FRAP-Experimenten. Dies kann den Verlauf der Fluoreszenzerholungskurve erheblich beeinflussen. Daher ist es empfehlenswert, die Anregungsstrahlung so gering wie möglich zu halten. Glücklicherweise können FRAP-Experimente auch bei relativ niedrigem Signal-zu-Rausch-Verhältnis durchgeführt werden, da alle Helligkeitswerte im Bereich des Bleichfeldes gemittelt werden, sodass man meist mit hohen analogen Signalverstärkungen

³Voraussetzung ist hierbei, dass sich die Fluoreszenzintensität proportional zur Konzentration verhält.

(z.B. am Photomultiplier oder bei EM-CCD-Kameras) und geringem Anregungslicht arbeiten kann. Desweiteren wird das Ausbleichen üblicherweise in Referenzbereichen außerhalb des Bleichfeldes quantifiziert und in die spätere Auswertung mit einbezogen.

2.1.2 Fluorescent Speckle Microscopy (FSM)

Mit dieser Methode wird die Bewegung fluoreszent markierter Proteine in lebenden Zellen mittels Kreuzkorrelation und/oder Einzelpartikelverfolgung berechnet. Sie kann dort verwendet werden, wo sich viele Partikel gleichartig bewegen, wie es beispielsweise beim Aktinfluss im Lamellipodium der Fall ist. Bei diesen Aktinfluss-Experimenten wird fluoreszent markiertes globuläres Aktin über Transfektion oder Mikroinjektion in die Zelle gebracht, wo es zum Teil in Aktinfilamente eingebaut wird. Ein einzelnes markiertes G-Aktin kann normalerweise lichtmikroskopisch nicht abgebildet werden. Treffen jedoch zufällig mehrere Fluorophore aufeinander, kann die Strahlungsenergie ausreichen, sodass ein fluoreszierender Punkt in der Zelle zu erkennen ist, der als Speckle bezeichnet wird. Dieses Speckle bleibt bestehen, solange sich die Fluorophore mit gleicher Geschwindigkeit in die gleiche Richtung bewegen. Sobald ein Fluorophor seine Strahlungsfähigkeit verliert oder sich in eine andere Richtung bewegt, „stirbt“ das Speckle. So stellt sich der Fluss von Aktinfilamenten im mikroskopischen Bild als die gleichgerichtete Bewegung vieler Speckles dar, die zufällig auftauchen und nach einiger Zeit wieder verschwinden. Mit Algorithmen zur Einzelpartikelverfolgung ist es möglich, die Trajektorien, sowie den Geburts- und Todeszeitpunkt der einzelnen Speckles zu bestimmen. Treten die Speckles in hoher Dichte auf, entstehen charakteristische Muster, deren Verschiebung von Bild zu Bild mittels Kreuzkorrelation bestimmt werden kann. Diese Verschiebungsinformation kann dann vom Algorithmus genutzt werden, um die identifizierten Partikel im jeweils nächsten Bild leichter wiederzufinden [35]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Aktinfluss in Keratinozyten mit einem solchen Kreuzkorrelationsverfahren bestimmt, wobei allerdings keine einzelnen Partikel verfolgt wurden. Die in Abb. 1.5 dargestellten Aktinfluss-Messungen basieren ebenfalls ausschließlich auf Kreuzkorrelation und nicht auf Verfolgung von Einzelpartikeln.

2.1.3 Bildsegmentierung zur Analyse von Fokaladhäsionsdynamik

In dieser Arbeit wurde ein Bildanalyseverfahren entwickelt, das aus Zeitreihen fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen die Größe, Form und Position der Fokaladhäsionen extrahiert. Mit Hilfe der gewonnenen Daten konnten beispielsweise Lebensdauer, Wachstumsrate und Gleitgeschwindigkeit von Fokaladhäsionen berechnet werden. So war es möglich, die Langzeit-Wachstumsdynamik von Fokaladhäsionen statistisch zu analysieren und mit dem kurzzeitigen Austausch von Fokaladhäsionsproteinen, der mittels FRAP bestimmt wurde, zu korrelieren. Außerdem wurde durch kombinierte Messung der Fokaladhäsionsdynamik und des Aktinflusses über den Adhäsionen mittels FSM der

Zusammenhang zwischen dem Alter der Fokaladhäsion und ihrer Kopplung an Aktinfilamente untersucht.

Das Verfahren beruht im Wesentlichen darauf, dass über einen Helligkeitsschwellenwert ein binäres Bild erzeugt wird, in dem die Fokaladhäsionen als weiße Segmente vor schwarzem Hintergrund erscheinen. Über einen Flächenschwellenwert können nun besonders kleine Segmente aussortiert werden, da diese im Normalfall keine Fokaladhäsionen markieren. Zuletzt werden über einen zeitlichen Schwellenwert alle Segmente entfernt, deren Lebensdauer deutlich unter der für Fokaladhäsionen erwarteten liegt.

2.1.4 Einzelzell-Kraftmessung auf elastischen Substraten

Wenn adhärenente Zellen kontrahieren, leiten sie über ihre Fokaladhäsionen Zugkräfte in das Substrat ein. Werden Zellen auf einer dünnen Folie kultiviert, die relativ lose mit dem darunterliegenden Deckglas verbunden ist, können die Zellen durch ihre Kontraktionskraft die Folie verziehen. Dies führt zu lokaler Faltenbildung, die lichtmikroskopisch sichtbar ist. Dieses relativ alte Verfahren der Zellkraftmessung zeigt sehr anschaulich, dass man von dem Verzug eines beweglichen Substrates auf die Kräfte zurückschließen kann, die darauf ausgeübt werden [28]. Um das Verzugsfeld einer Zelle möglichst genau bestimmen zu können, verwendet man heute durchsichtige elastische Substrate von ca. 100 μm Dicke aus Silikonkautschuk oder Acrylamid, die bei Verzug keine sichtbaren Falten bilden und mit einer regelmäßigen Oberflächenstruktur versehen bzw. mit fluoreszierenden Mikrokugeln durchsetzt sind. Anhand der Verschiebung der Strukturen bzw. der Mikrokugeln ist es möglich, das Verzugsfeld auf 20 nm genau zu messen [69, 16]. Durch Beimischung von kreuzvernetzenden Stoffen ist die Steifigkeit von Silikonkautschuk und Acrylamid einfach einzustellen und kann somit auf die Kräfte der zu messenden Zellen angepasst werden. Sind die Substratsteifigkeit und die Krafteinleitungsbereiche, in diesem Fall also die Fokaladhäsionen, bekannt, so ist es möglich, aus dem Verzugsfeld die einwirkenden Kräfte zu berechnen. Dabei wird im Prinzip so vorgegangen, dass auf der Grundlage eines mathematischen Modells, das das elastische Verhalten des Substrats beschreibt, mit zunächst beliebig gewählten Kräften künstliche Verzugsfelder berechnet werden. In einem selbstkonsistenten Verfahren⁴ werden die Kraftvektoren nun so angepasst, dass die Differenz aus berechnetem und gemessenem Verzug minimiert wird. Eine robuste Kraftschätzung anhand dieses Verfahrens wird durch die Tatsache erschwert, dass es für ein Verzugsfeld viele Lösungen geben kann, also prinzipiell mehrere Kombinationen von Kraftvektoren möglich sind. Dieses Problem wird mitunter so gehandhabt, dass Lösungen mit sehr großen Kräften, die aufgrund der Materialeigenschaften der Zelle nicht realistisch sind, verworfen werden [16, 50].

In dieser Arbeit wurde der Verzug von PDMS-Substraten durch migrierende Kerati-

⁴Die Kraftvektoren \vec{F}_i sind in Größe und Richtung variabel. Sie werden in der Weise variiert, dass sie möglichst die Bedingung $\sum \vec{F}_i \approx 0$ erfüllen.

nozyten gemessen. Es wurden jedoch keine absoluten Kräfte berechnet, da hauptsächlich die Frage interessierte, inwieweit sich die Zugkräfte im vorderen und hinteren Teil der Zelle unterscheiden.

2.2 Präparation der Substrate

Alle Experimente dieser Arbeit wurden an Keratinozyten durchgeführt, welche auf planaren Oberflächen kultiviert wurden. Als Probengefäß für die Beobachtung lebender Zellen diente eine Petrischale mit kreisförmiger Bodenöffnung (Durchmesser: 15 mm), unter die ein Deckglas (sofern nicht anders beschrieben: $22 \times 22 \text{ mm}^2$, Dicke: $170 \mu\text{m}$ Marienfeld, Lauda-Königshofen) geklebt wurde. Als Klebstoff wurde Silikonkautschuk (siehe Abschnitt 2.2.1) verwendet. In dieser selbst hergestellten Beobachtungskammer konnten adhärente Zellen in ihrem Nährmedium kultiviert und mit einem inversen Lichtmikroskop in hoher Auflösung beobachtet werden. Bei Experimenten zur Kraftmessung wurde eine ca. $100 \mu\text{m}$ dicke Schicht aus Silikonkautschuk auf das Deckglas aufgetragen. Zellen, die für Immunfluoreszenzfärbungen fixiert werden sollten, wurden auf kreisförmigen Deckgläsern (Durchmesser: 15 mm, Dicke: $170 \mu\text{m}$, Menzel GmbH, Braunschweig) in 12-Loch-Platten kultiviert. Um die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten zu gewährleisten, wurden alle Glas- oder Silikonoberflächen mit dem ECM-Protein Fibronectin beschichtet (siehe Abschnitt 2.2.2), welches direkt an Integrine bindet.

2.2.1 Herstellung von Silikonkautschuk

Silikonkautschuk definierter Steifigkeit wurde zur Herstellung von Stempeln und elastischen Substraten verwendet (siehe Abschnitt 2.2.2). Dieses biokompatible, farblose Elastomer wird unter anderem in der Medizin als Baustoff für Implantate eingesetzt und eignet sich hervorragend als Substrat für Säugetierzellen [13]. Außerdem wurde Silikonkautschuk als Klebstoff benutzt, um die Deckgläser unter die Bodenöffnungen der Petrischalen zu kleben.

Zubereitung

Zur Herstellung des Elastomers wurde ein Zwei-Komponenten-System aus zähflüssigem Silikon (PDMS) und Kreuzvernetzer (Sylgard 184, Dow Corning, Midland, USA) verwendet. Durch Zugabe des Kreuzvernetzers in unterschiedlichen Gewichtsanteilen (1:5 oder 1:55) konnten die verschiedenen Elastizitäten des Elastomers eingestellt werden. Dazu wurde der Kreuzvernetzer zunächst mehrere Minuten in die Silikonmasse eingerührt, um eine möglichst homogene Mischung zu erreichen. Aufgrund der dabei entstehenden Luftblasen wurde die Mischung unter Vakuum entgast. Anschließend wurde das immer noch zähflüssige Gemisch je nach Anwendung weiterverarbeitet (siehe Abschnitt 2.2.2) und schließlich bei 60°C ausgehärtet.

Kalibrierung

Zur Charakterisierung der elastischen Eigenschaften des kreuzvernetzten Polymers wurden Kalibrierungsexperimente nach dem Protokoll von Cesa et al. [16] durchgeführt. Alle Kalibrierungen wurden von Nico Hampe vorgenommen und werden hier nur kurz beschrieben. Zur Kalibrierung wurden Zylinder aus Silikonkautschuk mit verschiedenen Mischungsverhältnissen des Kreuzvernetzers gegossen. Die ausgehärteten Polymere wurden um eine definierte Länge gestreckt, und die benötigte Kraft, sowie die Änderung des Zylinderdurchmessers wurden gemessen. Daraus konnten die Poissonzahl und das Elastizitätsmodul des Polymers berechnet werden. Für Silikonkautschuk, der für die Zellkraftmessung verwendet wurde (Mischungsverhältnis 1:55), wurde ein Elastizitätsmodul von 11 kPa und eine Poissonzahl von 0,5 gemessen. An dieser Stelle ist anzumerken, dass für die in dieser Arbeit durchgeführten Kraftverzugexperimente nur ungefähre Werte für Poissonzahl und Elastizitätsmodul bekannt sein mußten, da keine absoluten Zellkräfte berechnet wurden.

2.2.2 Herstellung verschiedener Substratoberflächen

Glas mit Fibronektinbeschichtung

Zur Sterilisation wurden die Glasbodenschalen 10 min mit UV-Licht bestrahlt. Die kreisförmigen Deckgläser für Immunfluoreszenzfärbungen wurden stattdessen in reinen Ethanol (Merck, Darmstadt) getaucht und anschließend kurz über eine Gasflamme gehalten. Zur Beschichtung wurden jeweils 5 μg humanes Fibronektin (Sigma-Aldrich, Hamburg) in 200 μl PBS⁵ gelöst und für 30 min auf den Glasoberflächen bei Raumtemperatur inkubiert. Geht man davon aus, dass das gelöste Fibronektin vollständig adsorbiert, entspricht dies einer Fibronektin-Dichte von 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Mikrostrukturierte Fibronektinbeschichtung auf Glas

Mit der Auftragung von Fibronektinstreifen auf die Glasoberfläche sollten abwechselnde adhäsive und nichtadhäsive Bereiche mit scharfer Grenze erzeugt werden. Hierzu wurde zunächst Rinderserum-Albumin (BSA), welches Zelladhäsion verhindert [20], streifenförmig auf das Deckglas gestempelt und anschließend die gesamte Probe in Fibronektinlösung inkubiert.

Die Stempel bestanden aus Silikonkautschuk und wurden von Silizium-Matrizen abgeformt, die eine regelmäßige Struktur mit kanalartigen Vertiefungen aufwiesen. Die Kanäle hatten einen Abstand von jeweils 100 μm und wiesen Breiten von 2, 5, 10, 25, 50 und 75 μm auf. Die Matrizen wurden von Nico Hampe nach dem Protokoll von Kajzar et al. 2008 hergestellt [38]. Zur Abformung des Stempels wurden die Silizium-Master

⁵Phosphatgepufferte Salzlösung: 137 mM NaCl, 4,2 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ und 1,5 mM KH₂PO₄ in H₂O (pH 7,2).

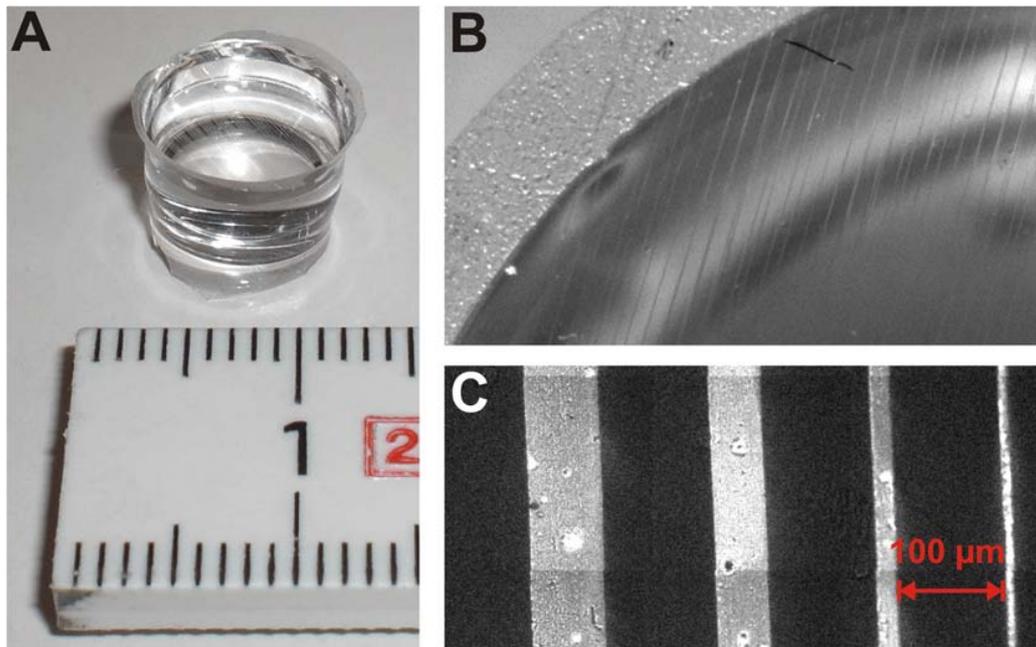


Abbildung 2.2: Stempeln von streifenförmigen Adhäsionsbereichen. A: Stempel aus Silikonkautschuk. Auf der kreisförmigen Stempelfläche sind die Kanäle in Form eines Linienmusters zu erkennen. Millimeterskala im Vordergrund. B: Detailaufnahme der Stempelfläche durch ein Stereomikroskop. Balken: 500 μm . C: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Stempelabdrucks. Hier wurde markiertes BSA auf ein Deckglas gestempelt. Die dunklen Bereiche entsprechen den Kanälen im Stempel und wurden im Anschluß mit Fibronektin beschichtet.

zunächst in Heptan gewaschen und für 10 Minuten auf einer Heizplatte bei 110° C dehydriert. Um das spätere Ablösen des Stempels zu erleichtern, wurden die Matrizen direkt im Anschluss für 15 Minuten mit 1H,1H',2H,2H'-Perfluorooctyl-trichlorosilan [$\text{CF}_3(\text{CF}_2)_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiC}_3$] (Sigma) unter Vakuum silanisiert. Anschließend wurde je ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml; Eppendorf, Hamburg), welchem Deckel und Boden entfernt worden waren, kopfüber auf eine Matrize gesetzt und mit frisch zubereitetem PDMS-Reaktions-Gemisch (Mischungsverhältnis 1:5) aufgefüllt. Zum Aushärten wurde das Gemisch samt Gußform 1 h bei 60° C inkubiert. Nach Abkühlung bei Raumtemperatur wurde der Stempel vorsichtig von der Matrize abgelöst. Dazu wurde teilweise Isopropanol (Merck) zu Hilfe genommen, welches mit Hilfe einer Kanüle vorsichtig zwischen PDMS und Matrize gespritzt wurde. Ein auf diese Weise hergestellter Stempel ist in Abbildung 2.2 A gezeigt. In der Detailaufnahme (Abb. 2.2 B) ist die Kanalstruktur der Stempeloberfläche zu erkennen. Um die Oberfläche hydrophil zu machen, wurde sie für mindestens 1 h in Wasser inkubiert. Die Stempel konnten bei Raumtemperatur mehrere Wochen gelagert werden.

Zur Beschichtung des Stempels wurde das Wasser mit einer Pipette von der Stem-

peloberfläche abgesaugt und durch ca. 50 μl TRITC⁶-BSA-Lösung (0,15 g in 1 l H₂O, Sigma) ersetzt. Um die Adsorption des BSA zu ermöglichen, wurde die Lösung 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die ersten 10 min der Inkubation erfolgten unter Vakuum, um das vollständige Benetzen der Oberfläche zu erleichtern. Nach der Adsorption wurde die Oberfläche mit Stickstoff trockengeblasen. Zum Stempeln wurde die getrocknete Oberfläche für 10 min auf den Glasboden einer sterilisierten Beobachtungskammer gesetzt. Danach wurde der Stempel vorsichtig abgenommen und die gesamte Glasoberfläche mit 200 μl Fibronectin-Lösung (0,1 g in 1 l PBS) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die fertige Oberfläche wurde mit PBS gewaschen. In der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme in Abbildung 2.2 ist die Streifenstruktur des TRITC-BSA zu erkennen. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei diesem Verfahren Fibronectin fast ausschließlich an Bereiche adsorbiert, die nicht von BSA besetzt sind, sodass sich ein abwechselndes Muster aus nichtadhäsiven BSA- und adhäsiven Fibronectinbereichen ergibt. Bei Zelladhäsionsexperimenten bestätigte sich diese Annahme, da sich die Zellen innerhalb von 5 h nur auf Bereichen ohne BSA anheften und ausbreiten konnten.

Silikon-Substrat zur Zellkraftmessung mit Fibronectinbeschichtung

Alle Silikonkautschuk-Substrate wurden von Claudia Schäfer nach dem Protokoll von Cesa et al. [16] hergestellt. Ähnlich wie bei der oben beschriebenen Herstellung der Stempel wurde die Substratoberfläche von einer Silizium-Matrize abgeformt. Diese Matrize wurde analog zu der oben beschriebenen hergestellt und silanisiert, besaß allerdings statt einer Kanalstruktur ein Muster von punktförmigen Erhebungen. Die Erhebungen hatten einen Durchmesser von 2 μm waren in einer regelmäßigen Gitterstruktur mit einer Gitterkonstante von 3,5 μm angeordnet.

Zunächst wurde noch flüssiges PDMS-Reaktions-Gemisch (Mischungsverhältnis 1:55) mit fluoreszierenden Mikrokugeln (FluoSpheres, Invitrogen, Carlsbad, USA; Durchmesser: 100 nm) versetzt. Dazu wurden die Mikrokugeln durch Zentrifugation sedimentiert und zu 5% Volumenanteil in das PDMS eingerührt, sodass eine homogene Verteilung erreicht wurde. Diese Mischung wurde gleichmäßig auf der silanisierten Matrize verteilt und mit einem Papiertuch (Kimwipe, Kimberly-Clark, Mainz) vorsichtig abgewischt, sodass die Dicke der Beschichtung auf ca. 0,5 μm reduziert wurde. Nach Kreuzvernetzung bei 60° C für 1 h wurde eine zweite Silikonschicht aufgetragen und darüber ein Deckglas (Menzel GmbH, Braunschweig; Dicke: 80 μm) gelegt. Um eine definierte Dicke der Silikonschicht von 100 μm zu gewährleisten, wurden Abstandhalter aus Glas am Rand zwischen Matrize und Deckglas platziert. Zur Stabilisierung wurde über das Deckglas ein zurechtgeschnittener Objektträger aus Glas gelegt. Der gesamte *Sandwich*-Aufbau (siehe Abb. 2.3 A) wurde mit zwei Klammern im Bereich der Abstandhalter fixiert und über Nacht bei 60° C zum Aushärten des Elastomers inkubiert. Anschließend wurden die Klammern entfernt und das kreuzvernetzte Silikon vorsichtig von der

⁶Tetramethylrhodamin-Isocyanat

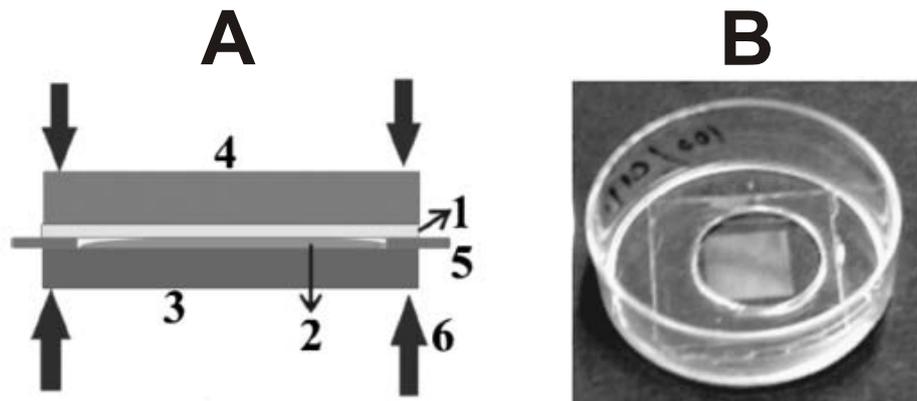


Abbildung 2.3: Herstellung von elastischem Substrat aus Silikonkautschuk zur Kraftverzugs-messung. A: Skizze des *Sandwich*-Aufbaus. Flüssiges Silikongummi (2) wurde auf der Silizium-Matrize (3) verteilt. Darüber wurde ein Deckglas (1) gelegt. Abstandhalter (5) sorgten für eine definierte Dicke der Silikonschicht. Zur Stabilisierung wurde ein zugeschnittener Objektträger (4) auf das Deckglas gelegt. Das *Sandwich* wurde mit Klammern fixiert (6). B: Nach Aus-härten wurde das Elastomer-beschichtete Deckglas in eine durchbohrte Petrischale geklebt. Abbildungen von Cesa et al. 2007.

Matrize abgelöst. So erhielt man eine $100\ \mu\text{m}$ dicke Silikonschicht auf einem Deckglas, deren oberste Schicht von $0,5\ \mu\text{m}$ Dicke mit fluoreszierenden Mikrokugeln durchsetzt war. In die ansonsten glatte Oberfläche war eine regelmäßige Muldenstruktur eingepägt. Das mit Elastomer beschichtete Deckglas wurde wie oben beschrieben unter eine Petrischale mit kreisförmiger Bodenöffnung geklebt, welche später als Beobachtungs-kammer dienen sollte (siehe Abb. 2.3). Die so hergestellten Substrate wurden in PBS inkubiert und konnten mehrere Tage im Kühlschrank gelagert werden. Unmittelbar vor Aussaat der Zellen wurden die Substrate mit Fibronectin beschichtet. Dazu wurden jeweils $10\ \mu\text{g}$ humanes Fibronectin in $400\ \mu\text{l}$ PBS gelöst und für $2\ \text{h}$ bei $37^\circ\ \text{C}$ auf der Elastomer-Oberfläche inkubiert.

2.3 Molekularbiologie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Aktin und Vinculin in lebenden Zellen wurden verschiedene Plasmide mit GFP⁷- und DsRed⁸-Fusionsproteinen verwendet. Es kamen zwei Vinculin-Konstrukte zum Einsatz, die beide N-terminal vor dem Leserahmen des Vinculins eine Sequenz für GFP enthielten. Darüber hinaus wurde ein Vinculin-Konstrukt verwendet, das anstatt GFP ein DsRed-Monomer enthielt. Desweiteren wurde ein käuflich erworbenes GFP-Aktin-Konstrukt (pEGFP-Actin, Clontech Europe, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) verwendet.

⁷green fluorescent protein

⁸red fluorescent protein from *Discosoma*

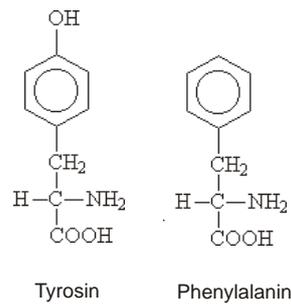


Abbildung 2.4: Strukturformeln der Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin. An die endständige Hydroxylgruppe von Tyrosin kann eine Phosphatgruppe substituiert werden. Phenylalanin unterscheidet sich von Tyrosin nur durch das Fehlen dieser Gruppe. Wie im Text beschrieben, wurde ein Gen für Vinculin konstruiert, bei dem Tyrosin an der Position 1065 gegen Phenylalanin ausgetauscht wurde. Als Resultat erhielt man ein Vinculin-Konstrukt, welches an der Aminosäure 1065 nicht mehr phosphoryliert werden konnte.

Die Konstruktion der Plasmide wurde nicht vom Autor durchgeführt und wird daher im folgenden Abschnitt nur zusammenfassend beschrieben. Zur Vervielfältigung wurden alle Plasmide von Simone Born in den *E.coli*-Stamm *DH5 α* eingebracht.

2.3.1 Konstruktion der Plasmide für Vinculin

Das erste GFP-Vinculin-Konstrukt enthielt ein unverändertes Vinculin-Gen (*Gallus gallus domesticus*), welches in den Vektor pGZ21 eingebaut worden war und zur Expression einen viralen CMV-Promotor enthielt. Es wurde von Benjamin Geiger (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das zweite GFP-Vinculin-Konstrukt enthielt ein modifiziertes Vinculin-Gen (aus *Mus musculus*), bei dem die Phosphorylierungsstelle am Tyrosinrest 1065 inhibiert war. Es wurde von Gerold Diez (Lehrstuhl für Physikalisch-Medizinische Technik, Universität Erlangen-Nürnberg) konstruiert. Zur Inhibierung wurde eine Punktmutation durchgeführt, bei der die Nukleotide TAC (Kodierung für Tyrosin) an der Stelle 1065 gegen TTC (Kodierung für Phenylalanin) ausgetauscht wurden (siehe Abb. 2.4). Das mutierte Konstrukt wurde in das Plasmid pcEGFP-N2 eingebaut.

Das DsRed-Vinculin-Konstrukt wurde von Simone Born angefertigt. Das Vinculin-Gen entsprach dem von Benjamin Geiger zur Verfügung gestellten GFP-Vinculin-Konstrukt und wurde in ein pDsRed-Monomer-C1 mit CMV-Promotor eingebaut.

2.3.2 Vermehrung und Isolation der Plasmid-DNA

Zur Vervielfältigung der DNA wurde zunächst der *E.coli*-Stamm, der mit dem entsprechenden Plasmid transformiert worden war, in LB-Medium mit Ampicillin oder Kana-

mycin als Selektionsfaktor bei 37° C über Nacht vermehrt⁹. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte am nächsten Morgen durch alkalische Lyse mit Hilfe des QIAfilter Midi Plasmid Purification Kit (Qiagen, Hilden), das entsprechend der Herstellerangaben benutzt wurde. Das Prinzip der alkalischen Lyse beruht darauf, dass durch Erhöhung des pH-Wertes die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Strängen der Plasmid-DNA und der chromosomalen DNA gelöst werden. Nach Neutralisation des pH-Wertes können die relativ kleinen Plasmid-DNA-Stränge renaturieren, während die chromosomalen DNA-Stränge verklumpen und somit ausfallen.

Die denaturierten Bestandteile wurden über ein Filter vom Überstand getrennt. Anschließend wurde die gelöste Plasmid-DNA über Ionenaustauschersäulen aufkonzentriert. Nachdem die Konzentration mit Hilfe eines Photometers (NanoDrop ND-1000, Peqlab, Erlangen) bestimmt worden war, konnte die Plasmidlösung mehrere Monate bei -20° C gelagert und bei Bedarf zur Transfektion von Keratinozyten genutzt werden (siehe Abschnitt 2.4.2).

2.4 Kultivierung und Präparation der Zellen

2.4.1 Kultivierung

Normale Humane Epidermale Keratinozyten (NHEK), isoliert aus neonataler Vorhaut, wurden bei Lonza (Verviers, Belgien) erworben. Die Kultivierung erfolgte bei 37° C und 5% CO₂ in speziellem Wachstumsmedium für Keratinozyten mit Serumzusatz (KGM, Lonza), welches alle 2 Tage gewechselt wurde. Zur Vermehrung wurden ca. 250.000 Zellen in eine Zellkulturflasche (T 75, Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät und ungefähr 5 Tage kultiviert. Bei einem Bewuchs von ca. 75% wurden die Zellen zur Subkultivierung oder Kryokonservierung geerntet. Hierzu wurden sie zunächst mit auf 37° C erwärmtem PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0.05% Trypsin und 0.02% EDTA¹⁰ in HBSS¹¹) für ca. 3 min bei 37° C inkubiert. Der Ablöseprozess der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch Klopfen an den Kulturgefäßboden mechanisch unterstützt. Nachdem ca. 90% der Zellen abgelöst waren, wurden 7 ml KGM zur Inaktivierung des Trypsins hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde bei einer Beschleunigung von 200 g für 3 min abzentrifugiert und in frischem KGM aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer wurde die Zellsuspension nach Bedarf verdünnt und ausgesät. Zur weiteren Vermehrung wurden wiederum jeweils 250.000 Zellen in eine Zellkulturflasche gegeben. Für die Mikroskopie lebender Zellen wurden jeweils 20.000 Zellen auf eine Glasbodenschale ausgesät. Die Glasbodenschalen waren zuvor nach den oben beschriebenen Methoden mit Silikonkautschuk

⁹Die Plasmide enthielten neben dem Gen für das jeweilige GFP-Fusionsprotein ein Resistenzgen für Ampicillin bzw. Kanamycin

¹⁰Ethylendiamintetraessigsäure

¹¹*Hank's buffered salt solution*

und/oder Fibronectin beschichtet worden. Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf fibronectinbeschichtete, kreisförmige Deckgläser in 12-Loch-Platten ausgesät. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen nochmals abzentrifugiert und in Einfriermedium (CryoSFM, Promo Cell, Heidelberg) aufgenommen, sodass eine Konzentration von 500.000 Zellen/ml erreicht wurde. Es wurden je 250.000 Zellen in verschließbare Kryoröhrchen gegeben und in einer Einfrierbox (Thermo Fisher Scientific, Rochester, USA) auf -80°C heruntergekühlt. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in einen Stickstofftank umgebettet, wo sie bei -196°C bis -150°C gelagert wurden.

2.4.2 Fluoreszenzmarkierung

Transfektion

Die Transfektion erfolgte nach einem Tag Kultivierung in Glasbodenschalen und ein bis zwei Tage vor der mikroskopischen Analyse. Pro Glasbodenschale wurden $50\ \mu\text{l}$ KGM mit $3\ \mu\text{l}$ des Lipotransfektionsreagenz TransIT (Mirus Bio LLC, Madison, USA) versetzt und ca. 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde $2\ \mu\text{g}$ DNA hinzugegeben und nochmal mindestens 30 min inkubiert, um die Bildung von Lipid-DNA-Komplexen zu ermöglichen. Nach Erneuerung des Kulturmediums wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen aufgetropft und über Nacht bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

Immunfluoreszenzfärbungen

Alle Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen erfolgten nach ein bis zwei Tagen Kultivierung auf runden, fibronectinbeschichteten Deckgläsern in 12-Loch-Schalen. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit CB¹² gewaschen und mit 3,7% Formaldehyd in CB für 20 min bei 37°C fixiert.

Für Färbungen gegen Vinculin und Aktin wurden die fixierten Zellen mit CB gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellmembranen mit 0,2% Triton (Sigma) in CB für 10 min inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen, wurde anschließend eine Milchpulverlösung (5% Milchpulver (Sigma) und 0,2% Tween20 (Sigma) in CB; Prozentangaben: Einwaage/Volumen) für 60 min auf die Proben gegeben. Danach wurden die Proben mit den primären Antikörpern (100-fach verdünnt in Milchpulverlösung) für 45 min bei 37°C inkubiert. Nachdem die Proben 3 mal jeweils 5 min mit Milchpulverlösung gewaschen worden waren, wurden sie mit sekundären Antikörpern und fluoreszenzmarkiertem Phalloidin (Alexa Fluor 488 Phalloidin, Invitrogen, Karlsruhe; ebenfalls 100-fach verdünnt in Milchpulverlösung) für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde wiederum 3 mal für 5 min mit CB gewaschen und mit

¹²Puffer zur Stabilisierung des Zytoskeletts: 150 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA, 5 mM Glukose und 10 mM 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure in H_2O (pH 6,1) [72]

Wasser gespült. Um möglichst trockene Proben zu erhalten, wurden sie mit Zellstofftüchern vorsichtig von Wassertropfen befreit. Zur Einbettung und Konservierung wurden 15 μl Gel Mount (Biomedex, Foster City, USA) mit 0.1% (Einwaage/Volumen) 1,4-Diazabicyklohexan (Sigma) auf die Proben gegeben. Die Deckgläser wurden mit der Probenseite auf Objektträger gelegt, sodass sich die Zellen luftdicht abgeschlossen zwischen Deckglas und Objektträger befanden. Die eingebetteten Proben wurden über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend bei 4° C im Dunkeln gelagert, um das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu minimieren.

Doppelmarkierungen gegen Vinculin und phosphoryliertes Vinculin wurden bis auf folgende Ausnahmen wie oben beschrieben durchgeführt: Anstatt CB wurde PBS als Puffer verwendet. Ferner wurde Milchpulverlösung zum Blockieren unspezifischer Bindungen gegen Ziegen Serum (10% in PBS; Prozentangabe: Volumen/Volumen; Sigma) ersetzt.

Als primäre Antikörper kamen Anti-Vinculin (monoklonal, Klon HVIN-1, Maus, Sigma) und Anti-Phospho-Vinculin (tyr1065, Kaninchen, Chemicon, Hofheim) zum Einsatz. Die Sekundären Antikörper waren an die Fluoreszenzfarbstoffe Cy2 (Ziege gegen Kaninchen, Jackson Immuno Research, Suffolk, Großbritannien) oder Cy3 (Ziege gegen Maus, Jackson Immuno Research) gekoppelt.

2.4.3 Stimulierung mit Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF)

Zur mikroskopischen Analyse migrierender Zellen wurden die Kulturen 1 h vor Beobachtung bzw. Fixierung mit 50 nM epidermalem Wachstumsfaktor (EGF, Sigma) stimuliert. Dieser lösliche Signalstoff erhöht die Motilität von Zellen [10, 18], indem er an einen Membranrezeptor bindet, der die Signalproteine Rho und Rac aktiviert. Diese regulieren ihrerseits die Dynamik des Zytoskeletts [60, 59].

2.5 Mikroskopie

2.5.1 verwendete Mikroskope

Für die hier beschriebenen Einzelzellanalysen wurden drei verschiedene lichtmikroskopische Systeme der Firma Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) verwendet. Alle Mikroskope waren mit einem Inkubator ausgestattet, um die Proben bei 5% CO_2 in einer 37° C warmen Umgebung mit hoher Luftfeuchtigkeit zu halten.

Automatisiertes Epifluoreszenz-Mikroskop (Cell Observer)

Der Cell Observer ist auf der Basis eines konventionellen Epifluoreszenz-Lichtmikroskops mit inversem Strahlengang aufgebaut. Die meisten Komponenten wie Objektivrevolver, Reflektorrevolver, Kondensator und Probentisch sind motorbetrieben und können, eben-

so wie Durchlicht- und Fluoreszenzlampen (Xenonlampe Lambda DG-4, Sutter, USA), mit dem Programm Axiovision (Zeiss) über einen Computer gesteuert werden. Die Bildaufnahme erfolgt über eine Digitalkamera, die ebenfalls von Axiovision gesteuert wird. In dieser Arbeit wurde, je nach Experiment, entweder eine CCD-Kamera (Axio-cam MRm, Carl Zeiss) oder eine besonders lichtempfindliche EM-CCD-Kamera (C9100-02, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) verwendet. Durch die weitreichenden Steuerungsmöglichkeiten sind Zeitreihenaufnahmen in mehreren Kanälen mit diesem Aufbau relativ leicht zu realisieren. Die Motorsteuerung des Probenstisches ermöglicht es außerdem, Übersichtsbilder zu erstellen, indem viele Einzelbilder von benachbarten Bereichen aufgenommen, und im Nachhinein über die Software mosaikartig zusammengesetzt werden (MOSAIX-Funktion von Axiovision).

Laser-TIRF

Der Laser-TIRF Aufbau entsprach im Wesentlichen dem des oben beschriebenen Cell Observers. Allerdings wurde zur Fluoreszenzanregung eine andere Xenonlampe (HXP 120, Zeiss) bzw. im TIRF-Modus ein Argon-Ionen-Laser verwendet, dessen Lichtstrahl über einen Schiebeeinsatz in die Leuchtfeldebene geleitet wurde. Der Winkel des Laserstrahls konnte am Schiebeeinsatz über eine Schraube justiert werden. Intensität und Wellenlänge des Lasers wurden über computergesteuerte Filterräder eingestellt. Zur Bildaufnahme kam eine CCD-Kamera (Axio-cam MRm, Zeiss) zum Einsatz.

Konfokales Laser Scanning Mikroskop LSM 510 Meta

Das LSM 510 Meta besteht aus einem inversen Lichtmikroskop, an dem über den unteren Zugang ein kompaktes Scanmodul angeschlossen ist, in das der Laserstrahl zur Fluoreszenzanregung eingeleitet wird. Bei dem hier verwendeten Aufbau waren ein Argon- sowie zwei Helium-Neon-Laser angeschlossen. Im Scanmodul befinden sich unter anderem die drehbaren Ablenkspiegel zum Abrastern der Probe, mehrere justierbare konfokale Blenden, verschiedene Filter, sowie zwei Photomultiplier zur Detektion des von der Probe emittierten Lichtes. Das Scanmodul wird vollständig mit der sogenannten LSM-Software (Version 3.2 SP2) über den Computer gesteuert. Die Laser und der Strahlengang des Mikroskops können ebenfalls mit der LSM-Software gesteuert werden.

2.5.2 FRAP am Laser-Scanning-Mikroskop

Die FRAP-Experimente wurden an migrierenden und sessilen Keratinozyten durchgeführt, die auf fibronectinbeschichtetem Glas kultiviert wurden und mit GFP-Vinculin oder GFP-VinculinY1065F transfiziert waren. Für alle Experimente wurde ein 63x Öl-Objektiv (1.4 NA, Plan Apochromat DIC, Carl Zeiss) verwendet. Sowohl zum Photo-bleichen als auch zur Bildgebung kam der Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm zum Einsatz, der mit 50% der maximalen Leistung (30 mW) betrieben wurde. Zur

Bildgebung wurde die Intensität des Lasers mit Hilfe eines Akusto-Optischen Modulators auf 1 bis 2,5 % begrenzt, um ein zusätzliches Ausbleichen der Probe so weit wie möglich zu minimieren. Der Laserstrahl wurde über den Hauptfarbteiler HFT488 auf die Probe gelenkt. Das emittierte Licht wurde anschließend über Umlenkspiegel durch den Langpassfilter LP505 auf den Photomultiplier gelenkt. Die Raster-Einheit wurde auf Vergrößerungsstufe 4 mit 512×512 Bildpunkten, unidirektionaler Abtastung und Abtastungsgeschwindigkeit von $1,6 \mu\text{s}/\text{Bildpunkt}$ eingestellt. Die analoge Verstärkung des Photomultipliers wurde je nach Intensität des Fluoreszenzsignals auf 750 bis 850 eingestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Intensität jedes Bildpunktes unterhalb der Sättigung lag.

Analyse der Austauschkinetik in Fokaladhäsionen

Die Aufnahmen zu den in Abschnitt 3.5.3 beschriebenen Experimenten zur Austauschkinetik wurden von Kevin Küpper angefertigt. Alle übrigen Aufnahmen wurden vom Autor angefertigt. Die Aufnahmezeit betrug 0,5 Hz. Zur Analyse der Austauschkinetik wurden zunächst 20 Bilder aufgenommen und anschließend ein Adhäsionsbereich bei voller Intensität mit 20 Iterationen ausgebleicht (Bleichzeit: $1,6 \mu\text{s}/\text{Pixel}$). Die Fläche des Bleichfeldes betrug zwischen 6 und $25 \mu\text{m}^2$ (Pixelfläche $A_{pix} = 0,0049 \mu\text{m}^2$). Somit ergab sich eine gesamte Bleichzeit von 192 bis 800 ms. Nach Bleichen wurde die Zeitreihenaufnahme für mindestens 350 s fortgesetzt. Bei Experimenten an gereiften Fokaladhäsionen migrierender Zellen wurde die Zeitreihenaufnahme bis zur vollständigen Auflösung der Fokaladhäsion fortgesetzt, um die Zeit vom Ausbleichen bis zur Auflösung der Fokaladhäsion bestimmen zu können. Bei allen Fokaladhäsionen, die in der späteren Auswertung als gereift klassifiziert wurden, erfolgte die Auflösung 6 bis 13 min nach Bleichen. Bei Experimenten mit jungen Fokaladhäsionen wurde vor dem Bleichexperiment eine Zeitreihenaufnahme gemacht, um die Entstehung von neuen Fokaladhäsionen zu dokumentieren. Von diesen Fokaladhäsionen wurde jeweils eine für das anschließende FRAP-Experiment ausgewählt. Alle jungen Fokaladhäsionen, die in die spätere Auswertung einbezogen wurden, waren am zum Bleichzeitpunkt zwischen 6 und 15 min alt.

Diffusionsanalyse

Zur Diffusionsanalyse wurden Zeitserien mit einer Rate von 11 Hz aufgenommen. Das rechteckige Bleichfeld erstreckte sich in seiner Länge ($36,5 \mu\text{m}$) über die gesamte Zelle und enthielt mindestens eine Fokaladhäsion. Es wurden insgesamt 52 solcher Experimente an verschiedenen Zellen durchgeführt, wobei die Breite a des Bleichfeldes variiert wurde ($0,3$ bis $4 \mu\text{m}$).

2.5.3 FRAP am TIRF-Mikroskop

Die FRAP-Experimente wurden an migrierenden Zellen durchgeführt, die auf fibronectinbeschichtetem Glas kultiviert wurden und mit GFP-Vinculin oder GFP-VinculinY1065F transfiziert waren. Für alle Experimente wurde ein 100x Öl-Objektiv (1,46 NA, α Plan Achromat, Carl Zeiss) verwendet.

Zur Bildgebung kam ein Argon-Ionen-Laser zum Einsatz, der über optische Filter auf eine Wellenlänge im Bereich von 490 nm und in seiner Intensität auf 25% begrenzt wurde. Zum Ausbleichen wurde ein Diodenlaser (DPL-473, Rapp OptoElectronics, Hamburg) mit der Wellenlänge 473 nm verwendet, der über einen Lichtleiter mit einem Durchmesser von 550 μm in den Strahlengang eingeleitet wurde. Die Intensität des Bleichlasers wurde auf einer Skala von 1 bis 10 auf den Wert 9 eingestellt. Laut Herstellerangaben liegt die Maximalleistung des Bleichlasers bei mindestens 100 mW. Mit Hilfe des sogenannten *Reflected Light Shutters* konnte die Belichtung der Probe durch den Bleichlaser über die AxioVision-Software gesteuert werden. Das Licht des zur Bildgebung verwendeten TIRF-Lasers konnte ebenfalls über AxioVision mit Hilfe eines externen Shutters an- und abgeschaltet werden. Zu Beginn und am Ende jedes Bleichexperimentes wurde jeweils ein zweikanaliges TIRF/DIC-Bild aufgenommen, um die Morphologie der Zelle auf mögliche Schädigungen durch die Laser untersuchen zu können. Demnach setzte sich ein Bleichexperiment aus einer Abfolge von Bildaufnahmen im DIC-, TIRF- und Bleichmodus zusammen. Dieser Ablauf wurde mit Hilfe des AxioVision-Plugins *Smart Experiments* wie folgt programmiert:

1. Einzelbild in 2 Kanälen: TIRF und DIC
2. Zeitreihe im TIRF-Modus, 30 s (0,5 Hz)
3. Einzelbild mit Belichtung durch den Bleichlaser, 800 ms
4. Zeitreihe in TIRF-Modus, 422 s (0,5 Hz)
5. Einzelbild in 2 Kanälen: TIRF und DIC

Der Bleichlaser war bei allen Experimenten in der Bildmitte positioniert. Demnach wurden alle Proben so ausgerichtet, dass sich die zu bleichende Fokaladhäsion ebenfalls in der Bildmitte befand.

Experimente von Kevin Küpper hatten im Vorfeld ergeben, dass das Intensitätsprofil des Bleichlasers im Bleichfeld nicht homogen war, sondern mehrere punktförmige Maxima aufwies. Diese sogenannten *Speckles* sind auf Interferenzen im Lichtleiter zurückzuführen [43]. Um die mittlere Ausleuchtung des Bleichlasers über die Zeit der Probenbelichtung (800 ms) zu homogenisieren, wurde der Lichtleiter mit einer Frequenz von 7 Hz und einer Amplitude von ungefähr 10 mm mit Hilfe eines Laborschüttlers (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA) rhythmisch bewegt.

2.5.4 Polarisierung von adhärierenden Zellen

Bei diesen Experimenten sollte der Adhäsionsvorgang von Einzelzellen an der Grenze zu adhäsivem und nichtadhäsivem Substrat analysiert werden. Dazu wurden 40.000 Keratinozyten mit Zugabe von 50 nM EGF auf eine Glasschale mit abwechselnder streifenförmiger Fibronectin- und BSA-Beschichtung ausgesät. Unmittelbar danach erfolgte die mikroskopische Analyse mit dem automatisierten Epifluoreszenz-Mikroskop über einen Zeitraum von 3 h. Um möglichst viele Zellen gleichzeitig beobachten zu können, wurde mit einer kleinen Vergrößerung (10x Objektiv, PH1, Carl Zeiss) gearbeitet und zusätzlich im MOSAIX-Modus aufgenommen (4x4 Bilder, entspricht einer Fläche von ca. 8,7 mm²). Die Aufnahme eines MOSAIX-Bildersatzes erfolgte alle 2 min im Phasenkontrast und zusätzlich im roten Fluoreszenzkanal, um die gestempelten BSA-Streifen abzubilden.

2.5.5 Kraftmessung

Alle Aufnahmen zur Kraftmessung wurden von Claudia Schäfer am automatisierten Epifluoreszenz-Mikroskop mit einem 40x Öbobjektiv (1.3 NA, PlanNeofluar, PH3, Carl Zeiss) angefertigt. Es wurden Zeitreihenaufnahmen in 2 Kanälen über 1 bis 2 h (alle 20 s) von einzelnen auf PDMS-Substrat migrierenden Zellen angefertigt. Um einerseits die Zellen und andererseits die fluoreszierenden Mikrokugeln im Substrat abbilden zu können, wurde pro Zeitschritt ein Bild im Phasenkontrast und eines in Epifluoreszenz (Anregungswellenlängenbereich: 550 bis 575 nm, Emissionswellenlängenbereich: 605 bis 675 nm) aufgenommen. Das Experiment wurde an insgesamt 3 Zellen durchgeführt.

2.5.6 Aktinfluss

Mit der Messung des Aktinflusses direkt über Fokaladhäsionen sollte die Kopplung von Aktin an junge und an gereifte Fokaladhäsionen gemessen werden. Dazu wurden migrierende Keratinozyten verwendet, die auf Glas kultiviert wurden und mit GFP-Aktin und DsRed-Vinculin transfiziert waren. Die Messungen wurden am Laser-TIRF-Mikroskop mit einem 100x Öl-Objektiv (1,46 NA, α Plan Aplanachromat, Carl Zeiss) durchgeführt. Die Fragestellung erforderte es, den Aktinfluss in hoher zeitlicher Auflösung, sowie die Wachstumsdynamik der Fokaladhäsionen vor und nach der Aktinflussmessung zu quantifizieren. Dazu wurden mehrere Zeitreihenexperimente mit Hilfe des Plugins *Smart Experiments* in folgender Reihenfolge hintereinandergeschaltet:

1. Untersuchung der Fokaladhäsionsdynamik: Beobachtung von DsRed-Vinculin in Epifluoreszenz, 6 min (1 Bild alle 30 s).
2. Einzelbild von GFP-Aktin in Epifluoreszenz.

3. Untersuchung des Aktinflusses: Beobachtung von GFP-Aktin im TIRF-Modus, 84 s (1 Bild alle 4 s).
4. Untersuchung der Fokaladhäsionsdynamik: siehe 1

Anschließend wurden Aktinfluss und Wachstumsdynamik der Fokaladhäsionen quantifiziert (siehe Abschnitt 2.6). Dieses Experiment wurde an insgesamt 12 Zellen durchgeführt.

Zur Verifizierung der verwendeten Methode zur Berechnung des Aktinflusses wurde folgendes Kontrollexperiment durchgeführt: Zunächst wurde eine Zeitreihenaufnahme von einer migrierenden Zelle im TIRF-Modus angefertigt (84 s, 1 Bild alle 30 s). Anschließend wurde die Zelle mit PBS gewaschen und mit Formaldehydlösung (3,7% in PBS) für 20 min fixiert, sodass jegliche Proteindynamik innerhalb der Zelle „eingefroren“ wurde. Danach wurde nochmals mit PBS gewaschen. Unmittelbar danach wurde wiederum eine Zeitreihenaufnahme im TIRF-Modus mit identischen Einstellungen angefertigt. Bei beiden Aufnahmen wurde anschließend mit identischen Einstellungen der Aktinfluss quantifiziert (siehe Abschnitt 2.6).

2.5.7 Wachstumsdynamik von Fokaladhäsionen

Zur Untersuchung des Wachstums und der Lebensdauer von Fokaladhäsionen wurden Langzeitaufnahmen (ca. 1 bis 2 h, alle 30 s) von einzelnen migrierenden Keratinozyten angefertigt, welche mit GFP-Vinculin oder GFP-VinculinY1065F transfiziert waren. Obwohl TIRF-Mikroskopie aufgrund der effektiven Reduktion des zytoplasmatischen Hintergrundes wesentlich bessere Bilder geliefert hätte, wurden diese Experimente aus folgenden Gründen mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop aufgenommen:

1. Es sollte die Wanderung einer Einzelzelle über eine möglichst weite Strecke aufgenommen werden, wozu ein 40x Öbobjektiv (1.3 NA, Plan Neofluar PH3, Carl Zeiss) verwendet wurde. Dies war notwendig, um möglichst viele Fokaladhäsionen über ihre gesamte Lebenszeit hinweg beobachten zu können. Bei TIRF-Mikroskopie ist man auf eine besonders hohe Vergrößerung (100x) angewiesen, sodass die Wanderung nur für kurze Zeit hätte verfolgt werden können.
2. Das Epifluoreszenz-Mikroskop war mit einem stabileren Probentisch als der TIRF-Aufbau ausgestattet. Bei der späteren Auswertung sollte auch das Gleiten der Fokaladhäsionen quantifiziert werden, sodass jegliche Probendrift vermieden werden mußte.

Um Probendrift zu minimieren, wurden die Zeitreihen nur im Fluoreszenzkanal aufgenommen. Auf eine zusätzliche Aufnahme im Phasenkontrast wurde verzichtet. Bei Mehrkanalaufnahmen von Fluoreszenz- und Durchlichtbildern muss bei jedem Zeitschritt der Reflektorrevolver verfahren werden, um den Filter für den entsprechenden

Kanal einzustellen. Diese ruckartige Bewegung von motorgetriebenen Komponenten am Mikroskop erhöht speziell bei langen Zeitreihenaufnahmen die Wahrscheinlichkeit von Probendrift. Aus diesem Grund wurde die Belichtung auch nicht über den *Reflected Light Shutter* am Mikroskop, sondern direkt an der externen Fluoreszenzlampe (Axiovision-Befehl: *Lambda On/Off*) gesteuert.

2.5.8 Immunfluoreszenz

Für alle Immunfluoreszenzaufnahmen wurde das LSM 510 mit einem 63x Öl-Objektiv (1.4 NA, PlanApochromat DIC, Zeiss) verwendet. Zur Anregung von Cy2 und Alexa488 kamen die 488 nm Linie des Argon-Ionenlasers, und zur Anregung von Cy3 der 543 nm Helium-Neon-Laser zum Einsatz.

2.6 Bildanalyse und statistische Auswertung

Sofern nicht anders beschrieben, erfolgte die Auswertung über Routinen, die mit dem Programm Matlab 7 (The MathWorks, Natick, USA) inklusive der Erweiterung *Image Processing Toolbox* erstellt wurden.

2.6.1 FRAP am Laser-Scanning-Mikroskop

Wie im Ergebnisteil beschrieben, erfolgte die Fluoreszenzerholung in Fokaladhäsionen in zwei Phasen. Auf eine kurze Phase mit schnellem Intensitätsanstieg innerhalb der ersten 10 s nach Bleichen folgte eine langsame Erholungsphase über mehrere Minuten. Durch Kontrollexperimente konnte nachgewiesen werden, dass der kurze Anstieg diffusionsabhängig war, während die darauffolgende langsame Fluoreszenzerholung auf kinetische An- und Abbindungsprozesse zurückzuführen war (siehe Abschnitt 3.8.1). Beide Prozesse wurden getrennt analysiert.

Diffusionsanalyse

Zur Messung der zytoplasmatischen Diffusion von GFP-Vinculin wurden Fokaladhäsionsbereiche und zytoplasmatische Bereiche in den rechteckigen Bleichfeldern analysiert (siehe Abb. 2.5). Die Fläche dieser Analysebereiche war von der jeweiligen Bleichfeldbreite a abhängig und betrug $a \cdot 36,5 \mu\text{m}^2$. Um die Fluoreszenzerholungskurven zu normieren, wurde zunächst ein Offset I_{off} von den Rohdaten abgezogen, welcher der mittleren Intensität des jeweiligen analysierten Bereichs im ersten Bild nach Photobleichen ($t = 0 \text{ s}$) entsprach. Die so korrigierten Kurven wurden auf die Intensität am Ende der diffusionsbedingten schnellen Fluoreszenzerholungsphase I_{si} bei $t = 16 \text{ s}$ normiert. Diese Berechnungen ergaben die normierte Intensität I_{ni} und wurden nach folgender

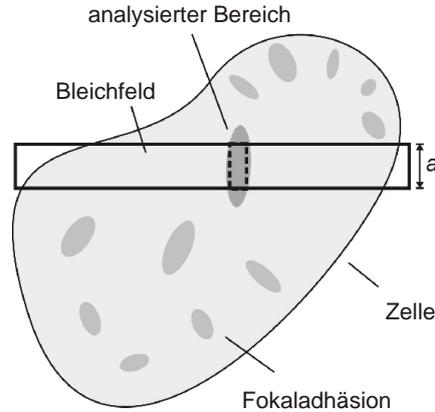


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der FRAP-Experimente zur Analyse der zytoplasmatischen Diffusion von Vinculin über Fokaladhäsionen. Die Experimente wurden an GFP-Vinculin-exprimierenden Keratinozyten durchgeführt. Das rechteckige Bleichfeld beinhaltete mindestens eine Fokaladhäsion. Die Länge des Bleichfeldes betrug bei allen Experimenten $36,5 \mu\text{m}$. Die Breite a wurde zwischen $0,3$ und $4 \mu\text{m}$ variiert. Die gestrichelten Linien markieren den analysierten Bereich.

Formel durchgeführt:

$$I_{ni}(t) = \frac{I(t) - I_{off}}{I_{si} - I_{off}}$$

Bei der Diffusionsanalyse wurde das bildgebungsbedingte Ausbleichen nicht korrigiert, da die Beobachtungszeitspanne nie mehr als 25 s betrug.

Analyse der Austauschkinetik in Fokaladhäsionen

Um den mobilen Anteil von Vinculin in Fokaladhäsionen sowie dessen Austauschrate zu bestimmen, wurde die langsame Erholungsphase analysiert. Da der zytoplasmatische Hintergrund teilweise zeitlich variierte, wurde ein Offset $I_{off}(t)$ von allen Erholungskurven abgezogen. Dieser wurde folgendermaßen berechnet (siehe auch Abb. 2.6):

$$I_{off}(t) = I_{ad}(t_k) + (I_{zp}(t) - I_{zp}(t_k)) \quad (2.3)$$

I_{ad} steht für die Fluoreszenzintensität im Bleichfeld und mit I_{zp} ist die Intensität des Zytoplasmas bezeichnet. Am Zeitpunkt t_k weist die Erholungskurve einen deutlichen Knick auf, der den Übergang von der schnellen zur langsamen Erholungsphase markiert (siehe Abb. 2.6 und Abb. 3.11). Er wurde per Augenmaß bestimmt. Durch den Abzug von I_{off} wurde nicht nur der zytoplasmatische Hintergrund, sondern auch unvollständiges Ausbleichen eliminiert, sodass die resultierenden Kurven ausschließlich die Bindungskinetik von Vinculin widerspiegeln. Über die mittlere Intensität $I_{ref}(t)$ von 3 bis 6 Referenz-Fokaladhäsionen, die außerhalb des Bleichfeldes lagen, wurde das bildgebungsbedingte Ausbleichen der Probe bestimmt. Der Abzug des Offsets, die Korrektur

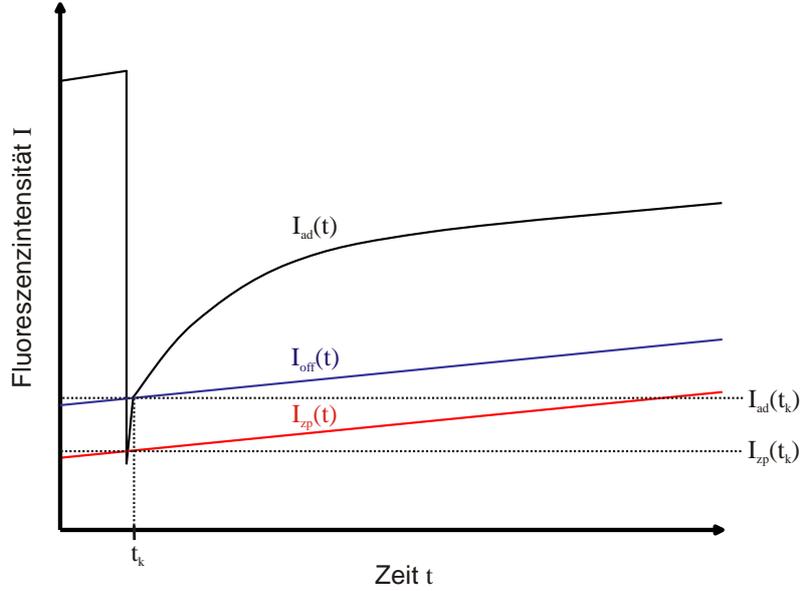


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung von FRAP-Daten zur Veranschaulichung der Berechnung des zeitlich variierenden Offsets $I_{off}(t)$ (siehe Gleichung 2.3)

des Ausbleichens, sowie die Normierung auf die Intensität I_0 vor dem Bleichzeitpunkt wurden anhand folgender Formel durchgeführt:

$$I_n(t) = \frac{I_{ad}(t) - I_{off}(t)}{[I_{ref}(t) - I_{off}(t)] I_0} \quad (2.4)$$

mit

$$I_0 = \left\langle \frac{I_{ad}(t) - I_{off}(t)}{I_{ref}(t) - I_{off}(t)} \right\rangle \quad (2.5)$$

$I_n(t)$ bezeichnet die normierte und korrigierte Fluoreszenzintensität im Bleichfeld und die eckigen Klammern zur Berechnung von I_0 stehen für den Mittelwert aus den letzten 10 Meßpunkten vor dem Bleichzeitpunkt.

Der Sättigungswert α wurde anhand des Mittelwertes von I_n zwischen 290 und 300 s berechnet. Zur Berechnung der Austauschrate k wurde $I_n(t)$ mit der Funktion *fminsearch* aus Matlab das in Abschnitt 2.1.1 beschriebene kinetische Modell (Gleichung 2.2) an die normierten Daten angepasst. Anschließend wurde die Halbwertszeit $t_{1/2}$ nach folgender Formel berechnet¹³:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

2.6.2 TIRF-FRAP

Analyse der Austauschkinetik in Fokaladhäsionen

Die mittleren Intensitätswerte des Bleichfeldes $I_{ad}(t)$, sowie der Referenzadhäsionen $I_{ref}(t)$ wurden aus den Zeitreihenaufnahmen mit Hilfe der Software *ImageJ* extrahiert.

¹³Es gilt $I_n(t_{1/2}) = \frac{1}{2}\alpha$ und $I_n(t) = \alpha(1 - e^{-kt})$; demnach ergibt sich die Formel für $t_{1/2}$ durch Umformung der Gleichung $\frac{1}{2}\alpha = \alpha(1 - e^{-kt_{1/2}})$

Die Referenzadhäsionen wurden dabei anhand der von Kevin Küpper entwickelten Plugins *ROI* und *MM* automatisch detektiert, während das Bleichfeld manuell definiert wurde. Die automatische Detektion der Referenzadhäsionen beruht im Prinzip darauf, dass Adhäsionsbereiche im Fluoreszenzbild über einen Helligkeitsschwellenwert erkannt werden. Das Verfahren wird in Kevin Küppers Diplomarbeit detailliert erläutert [43]. Mit Hilfe des ebenfalls von Kevin Küpper entwickelten Programmes *MyMenue* wurden diejenigen Adhäsionen als Ausbleichreferenzen selektiert, die über den gesamten Beobachtungszeitraum in Bezug auf Form und Position relativ stabil erschienen. In Abbildung 3.13 B ist die mittlere Intensität aller ausgewählten Referenzadhäsionen $I_{ref}(t)$, sowie die Intensität im Bleichfeld $I_{ad}(t)$ beispielhaft dargestellt.

Die Berechnungen zur Korrektur des bildgebungsbedingten Ausbleichens und der Normierung auf die Anfangsintensität wurden analog zu den FRAP-Experimenten am Laser-Scanning-Mikroskop nach den Gleichungen 2.4 und 2.5 in Abschnitt 2.6.1 durchgeführt. Da Fluoreszenzerholung durch Diffusion aufgrund des niedrigen zytoplasmatischen Hintergrundes vernachlässigt werden konnte, wurde $I_{ad}(0s)$ als Offset I_{off} definiert (siehe Abb- 3.13 C).

Zur Bestimmung der Austauschrate k und des Sättigungswertes α wurde die Gleichung 2.2 an $I_n(t)$ im Bereich von 0 bis 50 s mit Hilfe der Funktion *fminsearch* angepasst (siehe Abb. 3.13 C, rote Linie).

Bestimmung des Auflösungszeitpunktes der Fokaladhäsionen

Der Auflösungszeitpunkt einer Fokaladhäsion wurde anhand ihrer normierten Fluoreszenzerholungskurve ermittelt. Dazu wurde die Kurve zunächst mit linearer Gewichtung über jeweils 4 Datenpunkte geglättet. Der Auflösungszeitpunkt wurde als der Wert definiert, an dem die Kurve nach anfänglicher Erholung wieder auf eine Intensität von $I_n = 0,2$ abgefallen war (siehe Abb- 3.13 C, roter Stern).

2.6.3 Ratiometrie von Immunfluoreszenzfärbungen

Durch die Bildanalyse von Doppelfärbungen gegen gesamtes Vinculin (gVin) und phosphoryliertes Vinculin (pVin) wurde der Phosphorylierungsgrad in Fokaladhäsionen quantifiziert. Dazu wurden im pVin-Kanal zunächst die Fokaladhäsionen automatisch detektiert und anschließend das Verhältnis der Intensitäten von pVin zu gVin für jeden Pixel in den Fokaladhäsionsbereichen berechnet.

Zur Detektion der Fokaladhäsionen wurde ein Bildanalyseverfahren von Zamir et al. [88] angewendet. Es wurde zunächst der zytoplasmatische Hintergrund entfernt, indem von jedem Pixel (Position (i, j)) der mittlere Grauwert P in einem definierten quadratischen Bereich um ihn herum (mit der ungeraden Kantenlänge $2b+1$) abgezogen

wurde:

$$P_{ij}^f = P_{ij} - \frac{\sum_{q=i-b}^{i+b} \sum_{w=j-b}^{j+b} P_{qw}}{(2b+1)^2}$$

Bei diesem Verfahren ist entscheidend, dass der quadratische Bereich eine deutlich größere Fläche als die Fokaladhäsionen (ca. 1 bis 2 μm^2 , siehe Abschnitt 3.4) aufweist, damit der Mittelwert in etwa der Intensität des lokalen zytoplasmatischen Hintergrunds entspricht. Hier wurde eine Kantenlänge von 15 μm (entspricht 225 μm^2) gewählt. Zur Segmentierung des gefilterten Bildes wurde der sogenannte *Water-Algorithmus* implementiert, der im Folgenden erläutert wird:

Zunächst werden alle Pixel (i, j) bis zu einem minimalen Grauwert P_{min} in absteigender Reihenfolge in einer Liste sortiert. Die Pixel, die unter diesem Grauwert liegen, werden verworfen. Dann werden mit jedem der Pixel in der Liste folgende Operationen durchgeführt, wobei mit dem hellsten Pixel begonnen, und die Liste dann schrittweise abgearbeitet wird:

1. Der Pixel wird einem neuen Segment zugeordnet, wenn er kein bisher existierendes Segment berührt (4-Pixel-Konnektivität¹⁴).
2. Berührt der Pixel genau ein bereits existierendes Segment, so wird er diesem zugeordnet.
3. Berührt der Pixel mehr als ein bereits existierendes Segment, werden alle Pixel aus diesen Segmenten einem gemeinsamen neuen Segment zugeordnet.

Nachdem alle Pixel in der Liste einem Segment zugeordnet sind, werden die Segmente entfernt, welche die Fläche A_{min} unterschreiten. Bei entsprechend gewählten Parameterwerten sollte nun jedes Segment einer Fokaladhäsion entsprechen. Die gewählten Parameterwerte waren für alle analysierten Bilder identisch. A_{min} wurde auf 0,56 μm^2 gesetzt. Bei normierter Verteilung der Helligkeitswerte wurde für P_{min} der Wert 0,12 gewählt. Alle Bilder wurden mit identischen Einstellungen aufgenommen.

2.6.4 Wachstumsdynamik von Fokaladhäsionen

Zur Quantifizierung der Fokaladhäsionsdynamik wurden Bilderserien von GFP-Vinculin in migrierenden Zellen analysiert, wobei die Fokaladhäsionen in jedem Bild automatisch detektiert wurden. Die Bildverarbeitung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei der Ratiometrie in Abschnitt 2.6.3. Allerdings wurde ein wesentlich schnellerer und ressourcenschonenderer Bildsegmentierungsalgorithmus entwickelt, damit Bilderserien von über 200 Bildern (992 Pixel Kantenlänge) in praxistauglichen Zeiträumen von ca. 20 min berechnet werden konnten. Wäre der oben beschriebene *Water-Algorithmus* verwendet

¹⁴Es werden nur Berührungen über die Kanten der Pixel gezählt, jedoch keine Berührungen über Ecken. Demnach kann ein Pixel höchstes 4 andere berühren.

worden, hätte die Berechnung einer Bilderserie mehrere Stunden bis Tage in Anspruch genommen.

Die verbesserte Leistung wurde dadurch erreicht, dass die Segmentierungsinformation in baumförmig verzweigten Datenstrukturen angelegt wurde, die sehr effektiv durchsucht werden können. Dazu wurde ein Algorithmus implementiert, der im Wesentlichen auf dem von Segewick beschriebenen Prinzip der Vereinigungssuche basiert [70] und weiter unten detailliert beschrieben wird. Zum Entfernen des zytoplasmatischen Hintergrunds wurden alle Bilder einer Zeitreihe zunächst wie in Abschnitt 2.6.3 beschrieben gefiltert. Um das Ausbleichen über die Zeit zu kompensieren, wurde die Grauwertverteilung der Bilder beidseitig um 2% beschnitten und normiert. Anschließend wurde über einen Schwellenwert P_{min} jeweils ein binäres Bild erzeugt, das als vorläufige Maske für die Segmente (Fokaladhäsionen) diente. Im binären Bild wurde Pixeln, die unter dem Schwellenwert lagen, der Wert 0, allen anderen der Wert 1 zugewiesen. Demnach markierten Pixel mit dem Wert 1 Fokaladhäsionsbereiche. Zeitlich und räumlich zusammenhängende Pixel mit dem Wert 1 wurden nun einem gemeinsamen Segment zugeordnet. Der dazu verwendete Algorithmus ist hier für den zweidimensionalen Fall (räumlicher Zusammenhang in einem Einzelbild) erklärt, kann aber auf den dreidimensionalen Fall (zeitlicher und räumlicher Zusammenhang im Bilderstapel) problemlos übertragen werden:

Algorithmus zur Vereinigungssuche

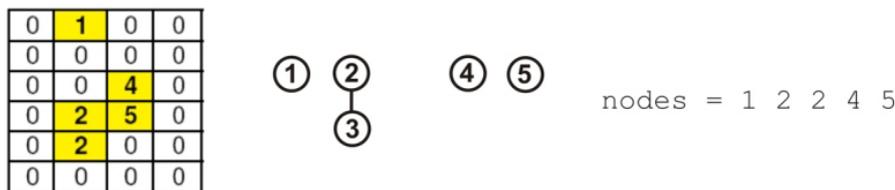
Alle Pixel mit einem Wert ungleich 0 werden spaltenweise von oben links nach unten rechts durchnummeriert. Dies ist hier beispielhaft an einer Matrix aus 4 x 6 Pixeln gezeigt:



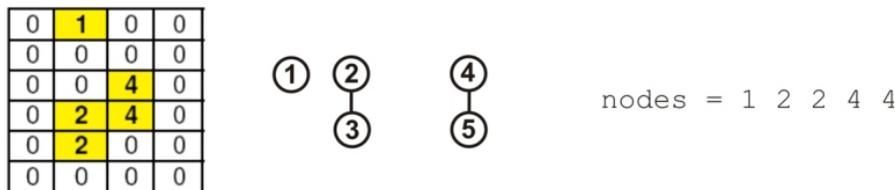
Jeder Pixel ist einem Knoten zugeordnet, wie es in dem Graphen neben der Matrix dargestellt ist. Jeder Knoten stellt einen Verknüpfungspunkt innerhalb einer zusammenhängenden Datenstruktur dar. Im obigen Bild sind die 5 Knoten nicht miteinander verbunden. Demzufolge liegen hier 5 getrennte Datenstrukturen mit je einem Element vor. Ein Knoten kann nach oben mit einem Vater, und nach unten mit mehreren Kindern verbunden sein. Die Verbindungsstruktur der Knoten wird im Zahlenvektor *nodes* gespeichert. Genauer gesagt, kann man den Vater für jeden Knoten über *nodes* abfragen. $nodes(i)$ ist der Vater des i -ten Knotens. Ist ein Knoten sein eigener Vater, spricht man von einer Wurzel. Die Wurzeln repräsentieren die einzelnen Bildsegmente. In diesem Anfangsstadium gibt es keine Verbindungen zwischen den Knoten, weswegen

ausschließlich Wurzeln vorliegen. Jeder Pixel ist demnach einem anderen Segment zugeordnet. Der Algorithmus tastet nun alle durchnummerierten Pixel, beginnend bei 2, der Reihe nach ab und überprüft mit 4-Pixel-Konnektivität, ob Berührungen mit Pixeln vorliegen, die schon abgetastet wurden. Berührung wird also immer nur nach oben und nach links geprüft und es können höchstens 2 Berührungen gleichzeitig auftreten. In diesem Beispiel liegt bei Pixel 2 weder oberhalb, noch linksseitig eine Berührung vor und die Knotenstruktur bleibt unverändert.

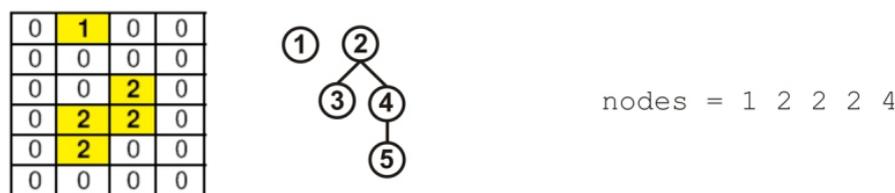
Als nächstes wird Pixel 3 überprüft. Da er Pixel 2 berührt, wird er mit diesem verknüpft. Knoten 2 ist nun der Vater von Knoten 3:



Bei Pixel 4 liegen keine Berührungen vor, es ändert sich also nichts. Pixel 5 berührt sowohl Pixel 4 als auch Pixel 2. Er wird zunächst mit dem oberhalb berührenden Pixel verknüpft:



Anschließend wird die Wurzel von Knoten 5 (in diesem Fall Knoten 4) mit der Wurzel von Knoten 2 (in diesem Fall Knoten 2) verknüpft:



Die Knoten 2, 3, 4 und 5 haben nun als gemeinsame Wurzel den Knoten 2. Wurde der Algorithmus vollständig durchlaufen, besitzen alle räumlich zusammenhängenden Pixel dieselbe Wurzel und können demnach einem gemeinsamen Segment zugeordnet werden. Anhand der Matrix, in der die jeweiligen Wurzeln der Pixel dargestellt sind, kann man erkennen, dass durch den Algorithmus zwei Segmente detektiert wurden. Die Wurzel eines Knotens i ist sehr einfach zu finden, indem man sich beginnend von $nodes(i)$ so lange von Vater zu Vater tastet, bis man an der Wurzel (dort gilt: $nodes(i)=i$) angekommen ist.

Nach der Vereinigungssuche wurden Segmente, die unter einer kritischen Größe ($0,5 \mu\text{m}^2$) und Lebensdauer (5 min) lagen, und meist auf Filterungsartefakte zurückzuführen

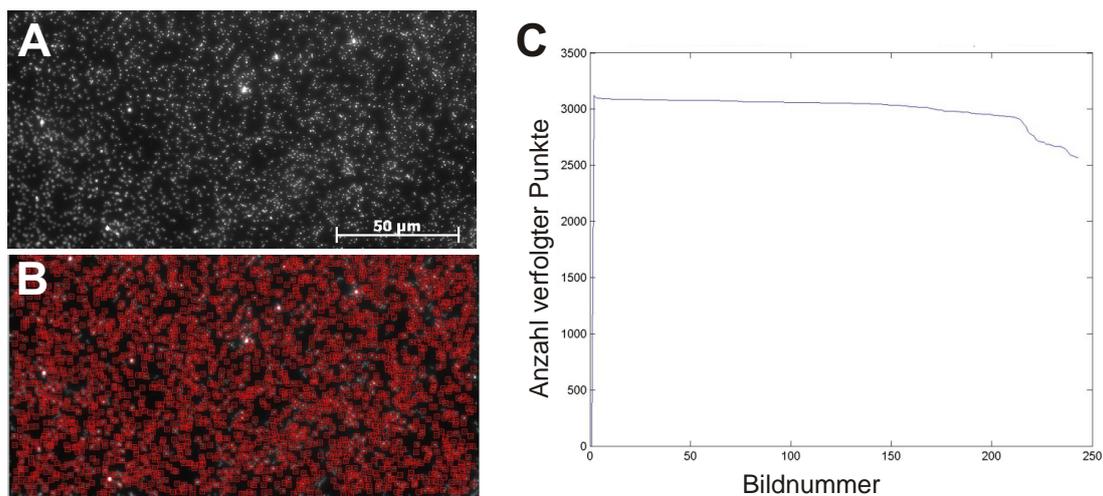


Abbildung 2.7: Automatische Verfolgung der im Substrat eingebetteten Mikrokugeln zur Messung der Substratdeformation. A: Ausschnitt aus dem Fluoreszenzbild der Mikrokugeln im ersten Zeitschritt. B: Über Kreuzkorrelation detektierte Mikrokugeln des Bildes in A. Die roten Quadrate markieren die Schablonen anhand derer die Strukturen über die gesamte Bilderserie verfolgt werden.

waren, entfernt. Als Ergebnis waren nun alle räumlich und zeitlich zusammenhängenden Fokaladhäsionsbereiche einer Fokaladhäsionsnummer zugeordnet. Hierbei ist zu beachten, dass mehrere Fokaladhäsionsbereiche, die im Verlauf ihrer Entwicklung miteinander verschmolzen, von Anfang an als die selbe Fokaladhäsion definiert waren.

2.6.5 Berechnung der Migrationsgeschwindigkeit

Die Migrationsgeschwindigkeit wurde bei den in den Abschnitten 2.5.4 und 2.5.7 beschriebenen Aufnahmen berechnet. Dazu wurde in jedem Zeitschritt die Position des Zellkerns mit dem Programm *ImageJ* manuell bestimmt. Die detektierten Positionen wurden vor der Geschwindigkeitsberechnung über einen Zeitraum von 2,5 min mit linearer Gewichtung geglättet.

2.6.6 Substratdeformation

Um die Deformation des Substrates zu quantifizieren, wurde die Verschiebung der im Substrat eingebetteten fluoreszierenden Mikrokugeln aus den Zeitreihenaufnahmen mit Kreuzkorrelation automatisch extrahiert. Der dazu verwendete Algorithmus wurde von Norbert Kirchgessner entwickelt [16] und wird im Folgenden kurz beschrieben. Die Positionen der Mikrokugeln wurden aus dem ersten Bild der Zeitreihe über ein Kreuzkorrelationsverfahren extrahiert, wobei eine zufällig ausgewählte Mikrokugel als Vorlage (Schablone) diente. Die Schwelle des Korrelationskoeffizienten wurde mit 0,6 auf einen relativ niedrigen Wert gesetzt, um möglichst viele Mikrokugeln zu finden. Anschließend

wurde für alle detektierten Mikrokugeln eine Kreuzkorrelationsanalyse zur Positionsverfolgung in jedem Bild durchgeführt. Genauer gesagt dienten die Bildausschnitte der detektierten Mikrokugeln im ersten Bild als Referenzschablonen (rote Quadrate in Abb. 2.7 B), anhand derer die jeweiligen Positionen in den Folgebildern bestimmt wurden. Dazu wurden die Schablonen jeder Mikrokugel innerhalb einer Suchweite von 20 Pixeln auf dem Bild verschoben und jeweils mit den darunterliegenden Bildausschnitten korreliert. So erhielt man Korrelationskarten, bei denen die Position des Maximums der Position der Mikrokugel entsprach. Um falsche Treffer möglichst auszuschließen, wurde hier die Schwelle des Korrelationskoeffizienten auf 0,8 erhöht. Zur Bestimmung des Maximums im Subpixelbereich wurde durch die Kreuzkorrelationskoeffizienten in einem Bereich von 3×3 Pixeln um den Maximalwert eine Parabel zweiter Ordnung gelegt. Die Position des Maximums dieser Parabel wurde nun als Mikrokugelposition angenommen, sofern das Maximum über dem Schwellenwert lag. Bei langen Zeitreihenaufnahmen im Bereich von 0,5 bis 2 h kam es teilweise zu Fokusdrift, wodurch die Positionen einiger Mikrokugeln im Verlauf der Zeitreihenanalyse verloren gingen. Die mittlere Dichte der von Anfang bis Ende verfolgten Kugeln betrug jedoch nie weniger als 1 Kugel / $14 \mu\text{m}^2$. Die Verschiebungen der Mikrokugeln, und damit die Substratdeformation, wurde aus der Differenz der Kugelpositionen in den Bildern berechnet.

Um Substratdeformationen im Bereich von ca. 10 nm messen zu können, musste außerdem die Drift der Proben korrigiert werden. Dazu wurde die mittlere Verschiebung von Mikrokugeln in mehreren möglichst großen Bereichen detektiert (ca. $20 \times 20 \mu\text{m}^2$), die weit außerhalb des Verzugfeldes der Zelle lagen. Diese Verschiebung wurde von allen ermittelten Positionen der einzelnen Kugeln abgezogen.

Die Verschiebungen der Kugeln, welche vom aktiven Verzug der Zelle herrührten, wurden relativ zu den Positionen des letzten Bildes berechnet, an dem möglichst keine durch Zellen verursachte Deformationen vorlagen. Dazu wurde die Dauer der Messung so gewählt, dass sich die Zelle am Ende außerhalb des analysierten Bereiches befand.

Um die mittlere Substratdeformation über 30 min zu bestimmen, wurde das Deformationsfeld in ein Koordinatensystem übertragen, welches seinen Ursprung im Mittelpunkt des Zellkerns hatte. Dabei wurde das Koordinatensystem in jedem Zeitschritt analog zur Bewegung der Zelle verschoben und rotiert, wobei die y-Achse immer in Migrationsrichtung orientiert war. Dabei wurde die Orientierung anhand des Halos hinter dem Zellkörper manuell festgelegt (siehe Abb. 2.8). Der Mittelpunkt des Zellkerns wurde aus 4 manuell bestimmten Koordinaten am Rand des Zellkerns berechnet, und die Orientierung des Halos wurde ebenfalls durch zwei manuell gewählte Punkte in jedem Zeitschritt bestimmt. Um eine gleichmäßige Verschiebung und Rotation des Koordinatensystems zu erhalten, wurden alle manuell definierten Punkte über 30 Zeitpunkte linear gewichtet geglättet. Bei den automatisch bestimmten Positionen der Mikrokugeln wurde keine Glättung durchgeführt. Zur Berechnung der zeitlich gemittelten Substratdeformationen wurden die rotierten Bilder in quadratische Bereiche mit einer Kanten-

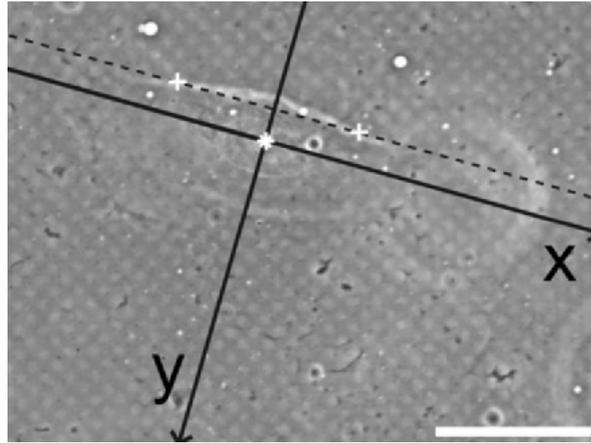


Abbildung 2.8: Koordinatensystem zur Bestimmung des zeitlich gemittelten Substratverzuges relativ zur Zelle. Die Abbildung zeigt ein Phasenkontrastbild einer migrierenden Keratinozyte auf Silikonkautschuk. Der Ursprung des Koordinatensystems liegt im Mittelpunkt des Zellkerns (weißer Stern). Die Orientierung des Koordinatensystems ist anhand des Halos am hinteren Rand des Zellkörpers definiert. Dabei wurde die Orientierung des Halos (gestrichelte Linie) durch zwei manuell gewählte Punkte (weiße Kreuze) festgelegt. Die Zelle migriert in y -Richtung. Balken: $30\ \mu\text{m}$.

länge von $3,6\ \mu\text{m}$ unterteilt. Die mittlere Deformation in einem Bereich wurde anhand der Mittelung der Verschiebungsvektoren aller in dem Bereich enthaltenen Mikrokugeln berechnet. Zur Berechnung der mittleren Zellform wurde zunächst der Umriss der Zelle in jedem Zeitschritt mit 13 Punkten manuell bestimmt (Abb. 2.9 A). Anhand der Koordinaten dieser Punkte wurden Masken erzeugt, deren Pixel außerhalb der Zelle den Wert 0 (schwarz) und innerhalb der Zelle den Wert 1 (weiß) hatten (Abb. 2.9 B). Anschließend wurden alle Masken gemittelt, was in einer Maske mit unscharfer Grenze resultierte. Den mittleren Zellumriss erhielt man nun durch Auswahl aller Pixel mit dem Wert 0,5 (pixelweiser Mittelwert, Abb. 2.9 C, rote Linie). Zur Angabe des Fehlers wurden die Viertelquantile (Pixel des Wertes 0,25 bzw. 0,75) benutzt.

2.6.7 Messung des Aktinflusses durch zeitintegrierte Kreuzkorrelation

Zur Messung des Aktinflusses wurde ein zeitlich integriertes Kreuzkorrelationsverfahren mit dynamischer Schablonengröße implementiert, welches von Ji und Danuser entwickelt wurde [35]. Bei den zu analysierenden Daten handelte es sich um Bilderserien von GFP-Aktin in migrierenden Keratinozyten, wobei für jedes Einzelexperiment 20 TIRF-Bilder in einem Abstand von jeweils 4 s aufgenommen worden waren (siehe Abschnitt 2.5.6).

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurde die mittlere Bewegung von Strukturen in den aufgenommenen Bilderserien erfasst. Dazu wurde zunächst ein manuell gewählter Bildausschnitt gleichmäßig in quadratische Teilbereiche (Schablonen) der Kantenlänge 7

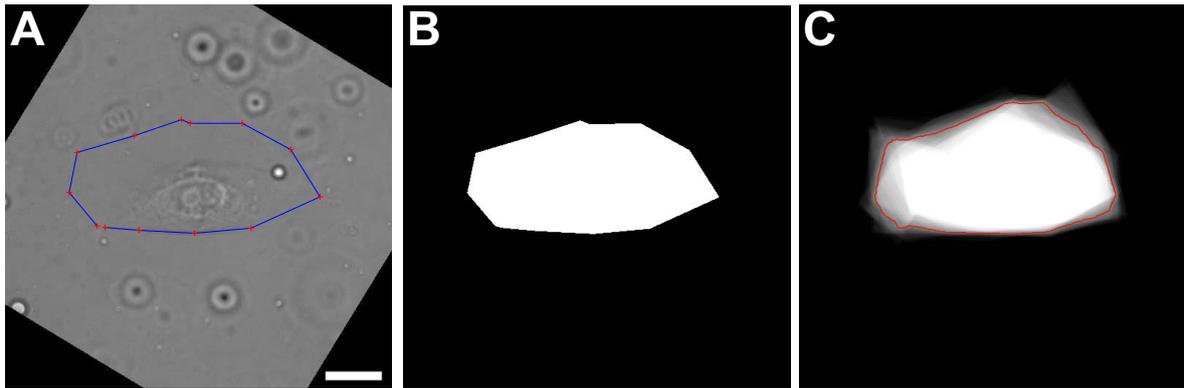


Abbildung 2.9: Bestimmung der mittleren Zellform im Zellkoordinatensystem. A: Phasenkontrastbild der Zelle. Das Bild wurde in jedem Zeitschritt so verschoben und rotiert, dass der Zellkern im Bildmittelpunkt lag und die Zelle nach oben orientiert war. Die Zellform (blau) wurde in jedem Bild mit 13 Punkten (rote Kreuze) bestimmt (siehe Abb. 2.8). B: Maske der Zellform aus Bild A. C: Mittlere Maske aus allen Zellformen der Zeitreihe. Die rote Linie beschreibt die mittlere Zellform. Die Helligkeit der Pixel auf dieser Linie entspricht genau der Hälfte des Maximalwerts. Balken: 15 μm .

Pixel (entspricht 0,45 μm) aufgeteilt. Über Kreuzkorrelation wurde nun versucht, die mittlere Verschiebung der Strukturen über die gesamte Zeitspanne für jede Schablone zu ermitteln. Dabei wurde die Verschiebung nicht von Einzelbild zu Einzelbild, sondern mit einem zeitlich integrierenden Verfahren ermittelt (*multi-frame-correlation*). Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass es auch bei sehr kleinen Schablonengrößen (hier 0,45 μm) gute Ergebnisse liefert. Die räumliche Auflösung wird somit auf Kosten der zeitlichen (hier 80 s) erhöht.

Zeitintegrierte Kreuzkorrelation

Zur zeitintegrierten Kreuzkorrelation wurde ein Bilderstapel der Zeitschritte 1 bis $n - 1$ mit einem um $(\Delta x, \Delta y) = (s_1, s_2)$ örtlich verschobenen Bilderstapel der Zeitschritte 2 bis n korreliert ($n = 20$). Die verwendeten Schablonen waren demnach dreidimensional.

Die Kreuzkorrelation wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$F_{corr}(s_1, s_2) = \frac{\sum_{f=1}^{n-1} \sum_{i,j=-b}^b I(f, i, j) I(f+1, i+s_1, j+s_2)}{\sqrt{\sum_{f=1}^{n-1} \sum_{i,j=-b}^b I^2(f, i, j)} \sqrt{\sum_{f=1}^{n-1} \sum_{i,j=-b}^b I^2(f+1, i+s_1, j+s_2)}} \quad (2.6)$$

F_{corr}	normierter Kreuzkorrelationskoeffizient
$s = (s_1, s_2)$	örtliche Verschiebung des Schablonenmittelpunktes p
n	Anzahl der Bilder in der Zeitreihe
$2b + 1$	Kantenlänge der Schablone
$I(f, i, j)$	Grauwert des Pixels mit der Position (i, j) im f -ten Bild der Zeitreihe

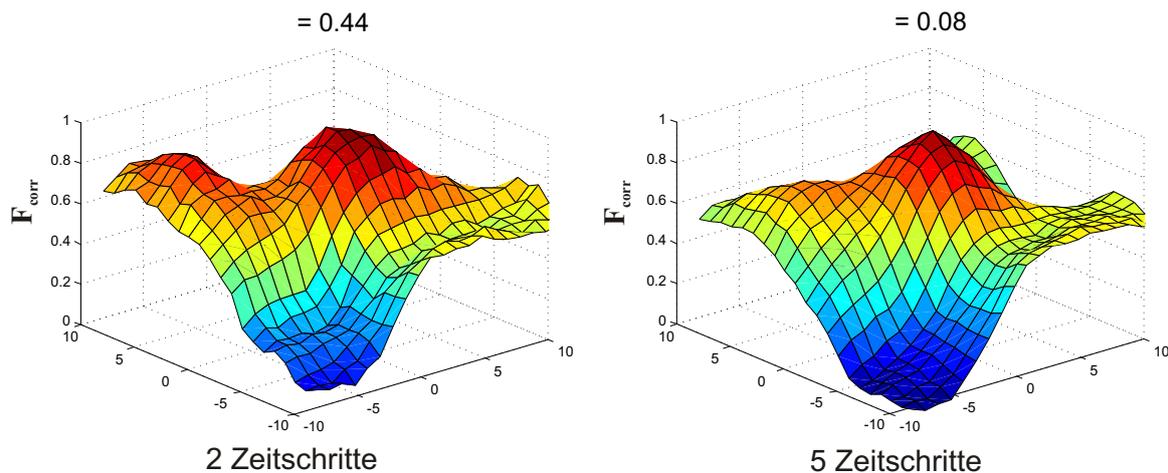


Abbildung 2.10: Einfluss der Zeitintegration auf die Korrelationskarten. Beide Korrelationskarten wurden anhand eines beliebig gewählten Bildausschnittes der Kantenlänge 15×15 Pixel mit verschiedenen Zeitintegrationsstufen erstellt (Erläuterungen im Text). γ zeigt die Signifikanz des Hauptmaximums zwischen 0 und 1 an, wobei Werte nahe 0 hohe Signifikanz bedeuten.

Durch die Berechnung von F_{corr} für alle räumlichen Verschiebungen (s_1, s_2) in einem Bereich von 10×10 Pixeln (entspricht $0,65 \times 0,65 \mu\text{m}^2$) ergab sich eine Korrelationskarte. Das Prinzip der Methode zur Quantifizierung des Aktinflusses bestand nun darin, diejenige Verschiebung s_{max} zu bestimmen, an der F_{corr} maximal war.

In Abbildung 2.10 ist der Einfluss der Zeitintegration auf die Korrelationskarte illustriert. Zur Erstellung der Karten wurde ein beliebiger Bildausschnitt (Kantenlänge 15×15 Pixel) gewählt und mit verschiedenen Zeitintegrationsstufen analysiert. Bei der Integration von nur 2 Bildern (links) ist die Korrelationskarte stärker verrauscht. Außer dem Hauptmaximum in der Mitte ist ein deutliches Nebenmaximum zu erkennen. Bei höherer Integration (5 Bilder, rechts) sticht das Hauptmaximum in der Mitte deutlicher hervor, und ist somit durch statistische Tests leichter zu ermitteln.

Detektion eines signifikanten Maximums in der Korrelationskarte

Zunächst wurden die Positionen aller lokalen Maxima der Korrelationskarte pixelgenau mit der Matlab-Funktion *imregionalmax* detektiert. Anschließend wurde das globale Maximum (Maximum mit dem höchsten Wert F_{corr}) einem statistischen Test unterzogen, mit dem geprüft werden sollte, ob es sich signifikant von allen übrigen regionalen Maxima (Nebenmaxima) abhob (siehe Abb. 2.11). Dazu wurde jedem lokalen Maximum ein Signifikanzwert zugewiesen, der als Differenz aus seinem Korrelationskoeffizienten und eines Referenzwertes definiert ist. Der Referenzwert ist seinerseits als der mittlere Korrelationskoeffizient in einem kreisförmigen Bereich (Radius: 5 Pixel, entspricht 300 nm) um das globale Maximum definiert. Anschließend wurde für jedes Nebenmaximum

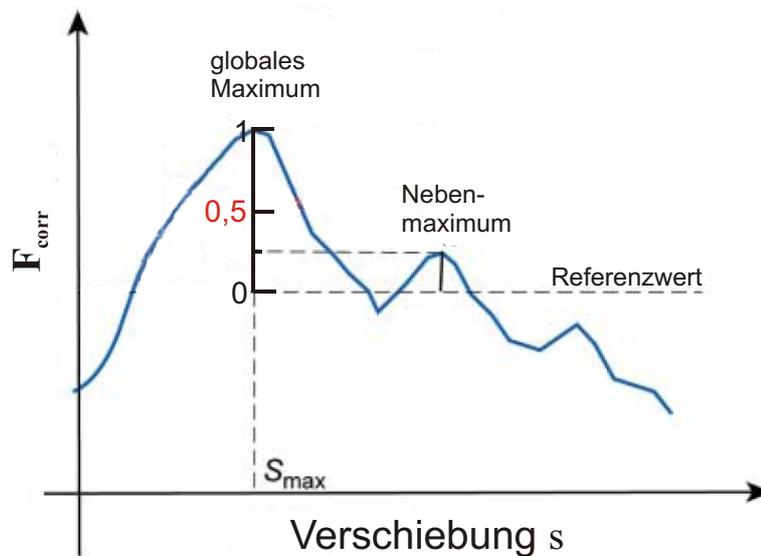


Abbildung 2.11: Test zur Signifikanz des Hauptmaximums. Verändert nach Ji und Danuser 2005 (Erläuterungen im Text).

das Verhältnis γ aus dem Signifikanzwert des jeweiligen Nebenmaximums mit dem Referenzwert des Hauptmaximums berechnet. Zum Bestehen des Signifikanztests durfte γ für alle Nebenmaxima nicht mehr als 0,5 betragen. Wurde der Signifikanztest nicht bestanden, konnte für die entsprechende Schablone kein Aktinfluss bestimmt werden. War der Test dagegen erfolgreich, wurde die Position des globalen Maximums s_{max} noch einmal mit höherer räumlicher Auflösung bestimmt. Dazu wurde die Korrelationskarte mit der Funktion *interp2* im *spline*-Modus interpoliert, sodass Datenpunkte in einem Abstand von 0,1 Pixeln erzeugt wurden. Die Position des globalen Maximums wurde daraufhin nochmals mit *imregionalmax* detektiert.

Dynamische Anpassung der Schablonengröße

Bei Nichtbestehen des Signifikanztests wurde die Kantenlänge der Schablone um 2 Pixel vergrößert und eine neue Korrelationskarte berechnet, bei der wiederum das globale Maximum dem Signifikanztest unterzogen wurde. Die schrittweise Vergrößerung der Schablone wurde so lange fortgesetzt, bis der Signifikanztest bestanden wurde oder eine maximale Schablonengröße (Kantenlänge $2b+1 = 20$ Pixel, entspricht $1,29 \mu\text{m}$) erreicht war. Die minimale Kantenlänge betrug 7 Pixel (entspricht $0,45 \mu\text{m}$).

Berechnung des Aktinflusses über Fokaladhäsionen

Wie in Abschnitt 2.5.6 beschrieben, wurden unmittelbar vor und nach jeder Aktinflussmessung Aufnahmen zur Erfassung der Fokaladhäsionsdynamik angefertigt. Dies war möglich, da die Zellen gleichzeitig mit GFP-Aktin und DsRed-Vinculin transfiziert worden waren. Die Fläche und Position der einzelnen Fokaladhäsionen wurde in jedem

Zeitschritt mit dem in Abschnitt 2.6.4 erläuterten Segmentierungsalgorithmus ermittelt. Mit Hilfe dieser Daten sowie der Ergebnisse der Aktinflussmessung konnte der mittlere Aktinfluss über jeder Fokaladhäsion berechnet werden. Von Fokaladhäsionen, die sich im Verlauf der Adhäsionsdynamik-Aufnahmen neu bildeten, konnte außerdem das Alter zu Beginn der Aktinflussmessungen berechnet werden. Analog dazu ergab sich für „sterbende“ Fokaladhäsionen die verbleibende Lebenszeit ab dem Beginn der Aktinflussmessungen.

2.6.8 Statistische Tests

Vergleich des Vinculinphosphorylierungsgrades zwischen verschiedenen Populationen von Fokaladhäsionen

Fokaladhäsionen aus stationären Zellen wurden bezüglich ihres Phosphorylierungsgrades mit verschiedenen Populationen von Fokaladhäsionen aus migrierenden Zellen verglichen (siehe Abb. 3.4). Diese Populationen unterschieden sich untereinander im Hinblick auf ihren Abstand zum Leitsaum der Zelle. Da die Stichprobenanzahl der einzelnen Populationen mit 69 bis 237 (migrierende Zellen) und 2014 (Sessile Zellen) relativ hoch war, wurde der T-Test [39] zum statistischen Nachweis von signifikanten Unterschieden verwendet.

Vergleich des Vinculinaustauschs zwischen verschiedenen Populationen von Fokaladhäsionen

Signifikanztests zu den in Abbildung 3.12 gezeigten Daten wurden nach einem Verfahren von Kesel et al. durchgeführt [39]. Mit Hilfe des David-Tests, sowie des Kolmogoroff-Smirnow-Tests wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Die Homogenität der Varianzen wurde anhand des F-Tests geprüft. Alle Daten waren laut Testergebnis normalverteilt, wiesen jedoch heterogene Varianzen und geringe Stichprobengrößen ($n=11$ bis $n=14$) auf. Aufgrund dieses Befundes wurde der Weir-Test ($p=0,05$) gewählt, der von Kesel et al. zur Detektion signifikanter Unterschiede zwischen normalverteilten Daten geringer Stichprobengröße empfohlen wird.

Kapitel 3

Beschreibung und Interpretation der Ergebnisse

3.1 Gezielte Polarisierung von Einzelzellen durch asymmetrische Adhäsivität des Substrates

Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben wurde, kann eine Zelle nur dann migrieren, wenn sie ein asymmetrisches Adhäsionsverhalten aufweist: Vorne werden neue Fokaladhäsionen gebildet und hinten alte aufgelöst, während der Zellkörper nach vorne gezogen wird. Bisher ist ungeklärt, wie diese Asymmetrie erzeugt und aufrechterhalten wird. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Zellen spontan polarisieren können bzw. dass die Polarisierung durch mechanische Reize ausgelöst werden kann [76, 83].

Bei den hier beschriebenen Experimenten wurde das Adhäsionsverhalten von humanen Keratinozyten untersucht, die genau auf der Grenze zwischen einem adhäsiven und einem nichtadhäsiven Substrat lagen. So war eine Asymmetrie der Adhäsion von außen vorgegeben. Dazu wurden die Zellen auf eine abwechselnd mit Fibronectin und BSA streifenförmig beschichtete Glasoberfläche ausgesät. Da Integrine an das ECM-Protein Fibronectin binden können, kommt es hier bevorzugt zur Ausbildung von Fokaladhäsionen, während BSA die Zelladhäsion erschwert. Zellen, die zufällig auf den Grenzbereich zwischen BSA und Fibronectin fielen, wurden unmittelbar nach der Aussaat über einen Zeitraum von 3 h mikroskopisch analysiert. Es konnten zwei unterschiedliche Typen von Adhäsionsverhalten auf der Substratgrenze beobachtet werden, welche in Abbildung 3.1 beispielhaft dargestellt sind. Bei beiden Typen kam es zunächst zur symmetrischen Ausbreitung des Lamellipodiums und zu einer kurz darauf folgenden Brechung der Symmetrie, wobei sich eine breite Membranlamelle auf der adhäsiven Seite ausbildete (0 bis 30 min). Anschließend wurde der Zellkörper in Richtung des gebildeten Lamellipodiums nachgezogen (30 bis 60 min). Alle beobachteten Zellen polarisierten sich also und bewegten sich auf die adhäsive Seite. Die Zellen des ersten Typs depolarisierten sich in der nunmehr gleichmäßig adhäsiven Umgebung unmittelbar nachdem

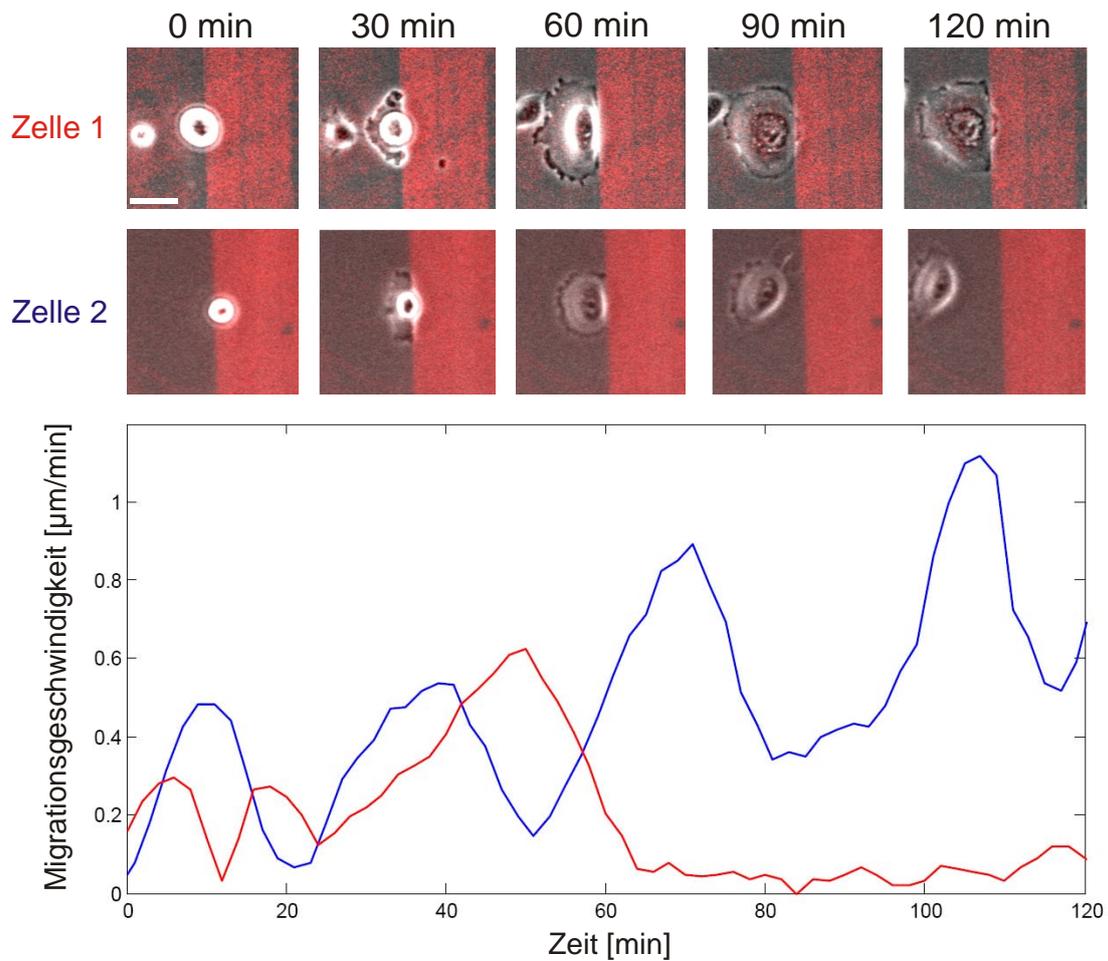


Abbildung 3.1: Polarisierung von Zellen auf der Grenze zwischen adhäsivem und nichtadhäsivem Substrat. Das nichtadhäsive Substrat (BSA) ist rot gefärbt. Beide Zellen polarisieren sich und wandern auf die adhäsive Seite. Während Zelle 1 (rote Linie) sich dort depolarisiert, behält Zelle 2 (blaue Linie) ihre Polarisierung bei und wandert von der Substratgrenze weg. In der zeitlichen Auftragung der Migrationsgeschwindigkeit ist bei beiden Zellen eine ruckartige Fortbewegung zu erkennen, wie sie für Keratinozyten typisch ist [53].

sie sich von der Grenzregion entfernt hatten, indem sie ihr Lamellipodium gleichmäßig in alle Richtungen ausbildeten, und beendeten die Migration (Zelle 1, 60 bis 120 min). Die Zellen des zweiten Typs behielten dagegen ihre polare Struktur bei und wanderten von der Adhäsionsgrenze weg (Zelle 2, 60 bis 120 min).

Diese Experimente befinden sich noch im Anfangsstadium, weswegen bisher noch keine statistischen Analysen vorliegen. Dennoch zeigen diese einfachen qualitativen Beobachtungen sehr anschaulich, dass die Polarität einer Zelle durch ihre Adhäsion determiniert wird. Dabei sind anscheinend einige Zellen unter bestimmten Bedingungen in der Lage, ein extern ausgelöstes asymmetrisches Adhäsionsverhalten intern weiter aufrechtzuerhalten, wie es im oben gezeigten Beispiel bei Zelle 2 der Fall war. Mit den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte vor allem der Frage nachgegangen werden, durch welche Steuerungsmechanismen Zellen ihr Adhäsionsverhalten räumlich differenziert modulieren können, und somit gegebenenfalls ihre Polarisierung und Migrationsrichtung beeinflussen.

3.2 Organisation von Fokaladhäsionen und Aktinskelett

Fokaladhäsionen sind direkt mit dem Aktin-Netzwerk der Zelle verbunden und koppeln es mechanisch an das Substrat. Die Organisation der Aktinskeletts, welche beispielsweise in der Ausrichtung von Stressfasern zum Ausdruck kommt, ist daher unter anderem durch die räumliche Verteilung der Fokaladhäsionen innerhalb der Zelle determiniert. Umgekehrt können nur dort Fokaladhäsionen gebildet werden, wo Aktinfilamente vorhanden sind [24]. Diese gegenseitige Abhängigkeit macht deutlich, dass die Struktur und Funktion einer Fokaladhäsion immer im Zusammenhang mit der Organisation der Aktinfilamente betrachtet werden muss. Aus diesem Grund wurden mittels Immunfluoreszenz Doppelfärbungen von Fokaladhäsionen und Aktinfilamenten in fixierten Zellen angefertigt. Als Fokaladhäsions-Indikator wurde Vinculin verwendet.

Migrierende Zellen zeichneten sich durch eine starke Polarität mit einem Lamellipodium in Migrationsrichtung aus. Das gesamte Lamellipodium war mit einem lockeren Netzwerk aus Aktinfilamenten ausgefüllt (siehe Abb. 3.2 A und B). An der Grenze zwischen Lamellipodium und Zellkern war das Netzwerk verdichtet und in parallelen Bündeln organisiert, die senkrecht zur Migrationsrichtung lagen. Hinter dem Zellkern befanden sich ebenfalls senkrecht verlaufende Aktinbündel. Die parallelen Aktinfasern um den Zellkern sind auch bei Fisch-Keratozyten vorhanden und wurden dort aufgrund des sakomerartig eingebauten Myosins in mehreren Arbeiten als Stressfasern bezeichnet [74].

Junge Fokaladhäsionen waren unmittelbar hinter dem Leitsaum lokalisiert und hatten meist eine längliche Struktur. Sie waren mit dem lockeren Aktin-Netzwerk des Lamellipodiums verknüpft (siehe Abb. 3.2 A, Detailansicht). Gereifte Fokaladhäsionen im

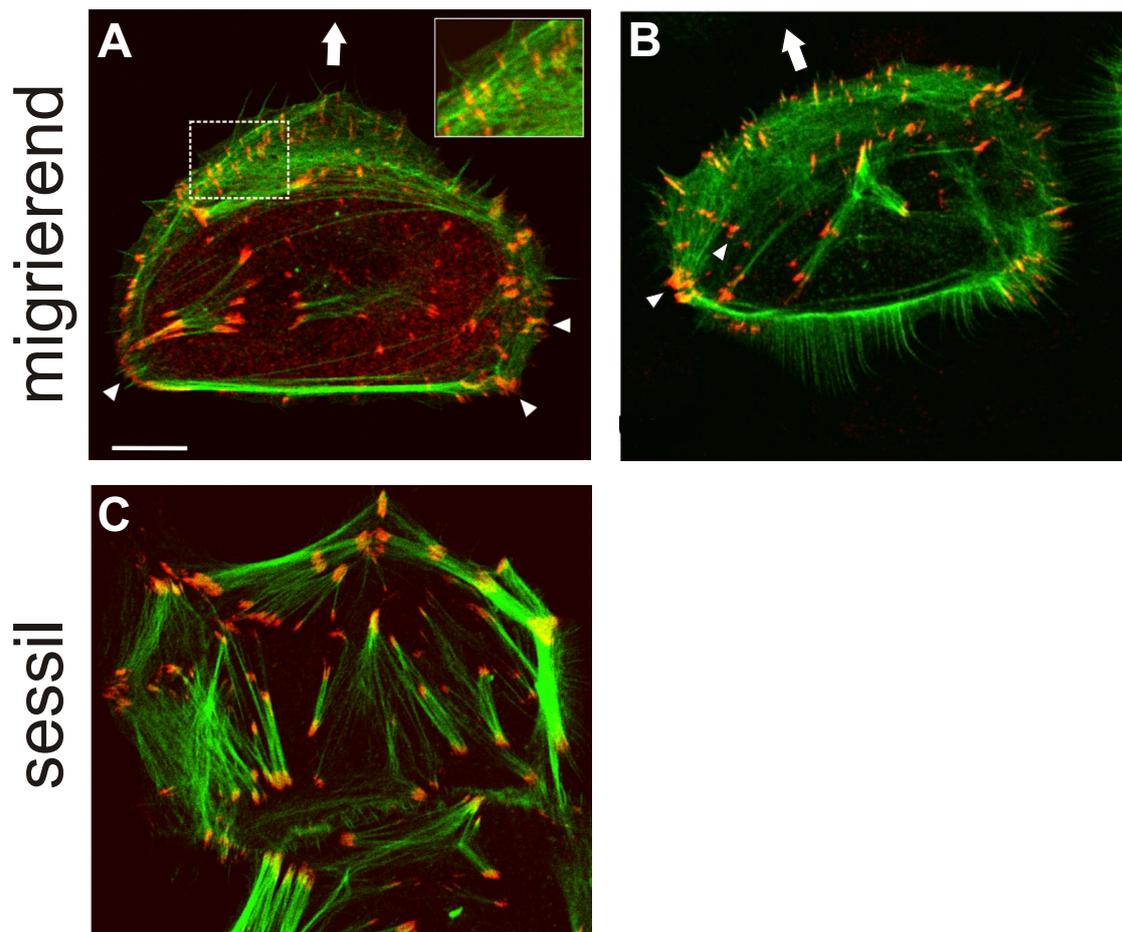


Abbildung 3.2: Organisation von Aktinfilamenten (grün) und Fokaladhäsionen (Vinculin, rot) in migrierenden (A, B) und sessilen (C) Keratinozyten. Pfeilspitzen: Gereifte Fokaladhäsionen in migrierenden Zellen. Große Pfeile in A und B: Migrationsrichtung. Balken: 10 μm

hinteren Bereich der Zelle waren größer und hatten eine rundere Form. Meist befanden sie sich an den Enden der Aktinfaserbündel (Pfeilspitzen).

Bei differenzierten sessilen Zellen waren die Aktinfilamente fast ausschließlich in Stressfasern organisiert. Ihre Fokaladhäsionen waren mit den gereiften Adhäsionen in migrierenden Zellen vergleichbar, hatten ebenfalls eine eher runde Morphologie und befanden sich meist an den Enden der Stressfasern.

3.3 Phosphorylierung von Vinculin in jungen und gereiften Fokaladhäsionen

Migrierende Zellen zeichnen sich durch eine fortlaufende Bildung und Auflösung von Fokaladhäsionen aus, wobei vorne bevorzugt Adhäsionen auf- und hinten abgebaut werden. Die Steuerung dieses Prozesses ist bislang noch ungeklärt. Da sich im Adhäsionskomplex Proteinkinasen wie FAK und c-SRC befinden, spielen Phosphorylierungsreaktionen jedoch wahrscheinlich eine wichtige Rolle beim Auf- und Abbauprozess.

Um dies näher zu untersuchen, wurde mittels quantitativer Immunfluoreszenzexperimente der Phosphorylierungsgrad von Vinculin in jungen und gereiften Fokaladhäsionen gemessen. Dazu wurden die Zellen fixiert und mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen Vinculin gefärbt (siehe Abb. 3.3). Ein Antikörper markierte den phosphorylierten Tyrosinrest an Stelle 1065 des Proteins (pVin), während der andere sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes Vinculin markierte (Vin). Da beide Antikörper indirekt an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt wurden, konnte im mikroskopischen Bild aus dem Verhältnis der beiden Farbkanäle der Phosphorylierungsgrad des Vinculins für jeden Bildpunkt bestimmt werden. Es ist hier zu beachten, dass das Verhältnis der beiden Kanäle den Anteil des phosphorylierten Vinculins nicht direkt angibt, da davon ausgegangen werden muss, dass sich erstens die Bindungsaffinitäten der beiden Antikörper gegen ihren Liganden unterscheiden, und zweitens die beiden Fluoreszenzkanäle nicht zueinander kalibriert wurden. Dennoch erlaubt es diese Technik, räumliche Unterschiede im Phosphorylierungsgrad der Proteine sichtbar zu machen.

Mit Hilfe eines Segmentierungsalgorithmus (siehe Abschnitt 2.6.3) wurden die Fokaladhäsionen anhand der Bilder der Gesamt-Vinculin-Färbung automatisch detektiert, sodass der mittlere Phosphorylierungsgrad von jungen und gereiften Adhäsionen miteinander verglichen werden konnte. Aufgrund der vorherigen Fixierung konnte der Reifegrad der einzelnen Fokaladhäsionen nicht über ihr Alter bestimmt werden. Stattdessen wurde der Abstand zum Leitsaum als indirektes Maß für die Reifung verwendet, da sich neue Fokaladhäsionen typischerweise an der Zellfront ausbilden und sich im Zuge der Migration relativ zur Zelle nach hinten bewegen.

In Abbildung 3.3 ist oben rechts der Phosphorylierungsgrad von Fokaladhäsionen einer migrierenden Zelle in Falschfarben dargestellt, wobei hohe Phosphorylierung rot und schwache Phosphorylierung blau erscheint. Die jungen Fokaladhäsionen direkt hin-

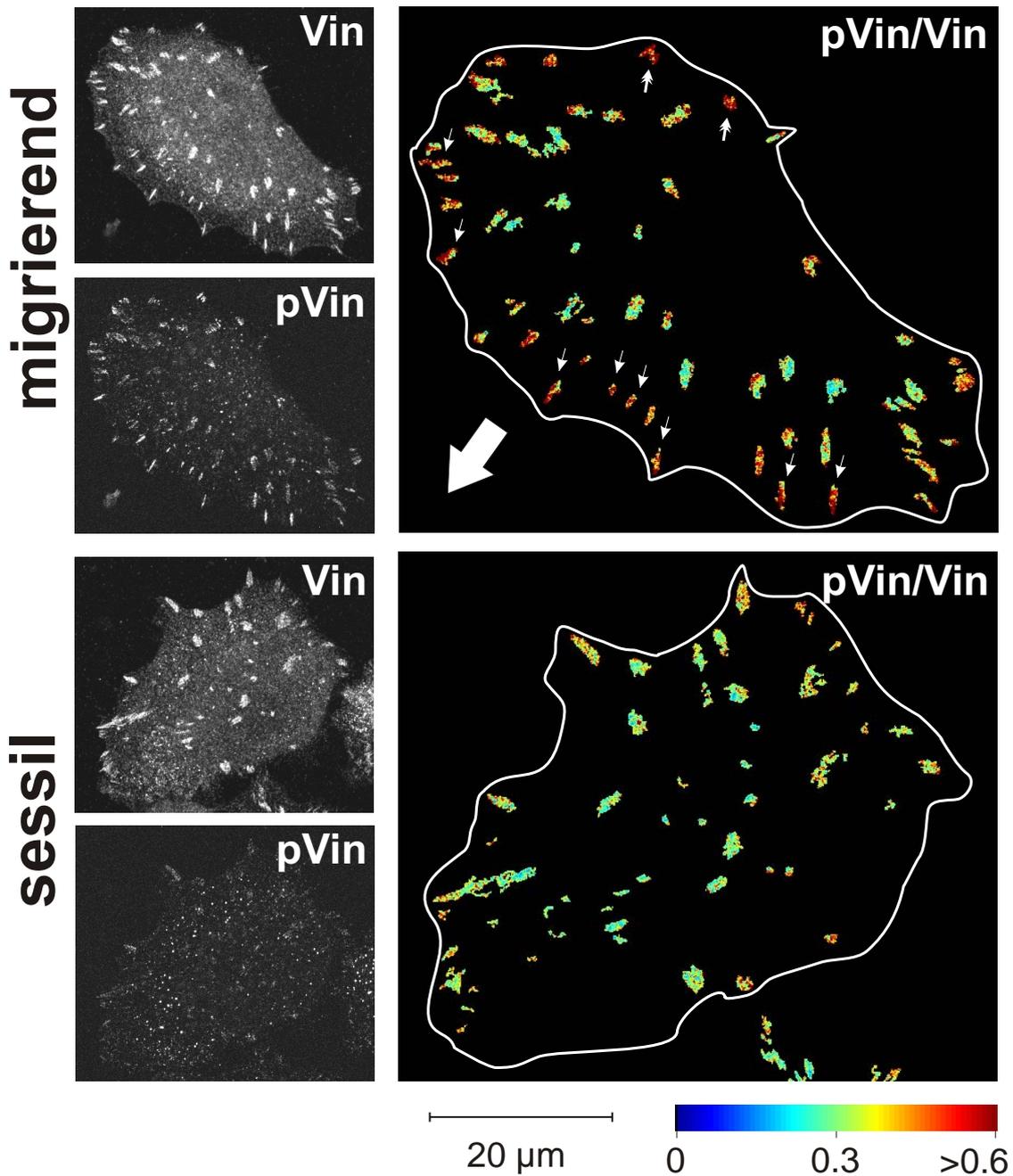


Abbildung 3.3: Phosphorylierung von Vinculin bei migrierenden und sessilen Keratinozyten. Fixierte Zellen wurden gegen Vinculin (Vin) und phosphoryliertes Vinculin (pVin) gefärbt. Die Falschfarbenbilder auf der rechten Seite zeigen das Verhältnis von pVin und Vin im Bereich der Fokaladhäsionen. Junge Fokaladhäsionen hinter dem Leitsaum (kleine Pfeile) und Fokaladhäsionen, die kurz vor der Auflösung stehen (Doppelpfeile), sind besonders stark phosphoryliert. Die automatische Erkennung der Fokaladhäsionen wurde nach einem Algorithmus von Zamir et al. durchgeführt [88]. Die Umrisse der Zellen sind mit weißen Linien gekennzeichnet.

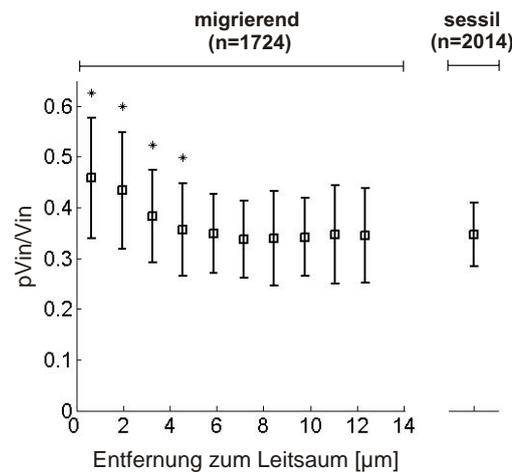


Abbildung 3.4: Mittlere Vinculinphosphorylierung ($p\text{Vin}/\text{Vin}$, siehe Abb. 3.3) von Fokaladhäsionen in migrierenden Zellen bezogen auf ihren Abstand zum Leitsaum und in sessilen Zellen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung σ an. Die Sterne markieren signifikant unterschiedliche Verteilungen bezogen auf die Verteilung der sessilen Zellen (T-Test). n: Anzahl der analysierten Fokaladhäsionen in 38 migrierenden und 21 sessilen Zellen.

ter dem Leitsaum waren bei dieser Zelle deutlich stärker phosphoryliert als die dahinter befindlichen reiferen Fokaladhäsionen. Wie aus Abbildung 3.4 hervorgeht, ist dieser Befund typisch für migrierende Zellen. Hier ist zu erkennen, dass die mittlere Vinculin-Phosphorylierung in Fokaladhäsionen migrierender Zellen mit steigendem Abstand zum Leitsaum abnahm (1724 Fokaladhäsionen von 38 Zellen).

Interessanterweise waren einzelne gereifte Fokaladhäsionen, die rechts und links hinter dem Zellkörper lagen, oftmals genauso stark phosphoryliert wie junge Fokaladhäsionen. Aufgrund ihrer Lage in der hinteren Zellperipherie ist zu vermuten, dass sie sich im Abbauprozess befanden (siehe Abb. 3.3, Doppelpfeile).

Wie bereits erwähnt, befinden sich Fokaladhäsionen sessiler Zellen meist im gereiften Stadium und wurden daher als Kontrollen verwendet. Sie wiesen untereinander eine geringere Varianz im Phosphorylierungsgrad auf und waren im Mittel schwach phosphoryliert (siehe Abb. 3.3 und 3.4). Die Sterne in Abbildung 3.4 markieren signifikante Unterschiede zur Verteilung des Phosphorylierungsgrades in den sessilen Kontroll-Zellen. Dabei konnten nur zu den jungen Fokaladhäsionen, welche 0 bis 5 μm hinter dem Leitsaum lokalisiert waren, signifikante Unterschiede festgestellt werden.

3.4 Die Phosphorylierung von Vinculin beeinflusst den Abbau von Fokaladhäsionen

Der Befund, dass sich junge und gereifte Fokaladhäsionen in ihrem Phosphorylierungsgrad unterscheiden, gab Grund zu der Annahme, dass ihr Auf- und Abbau über die

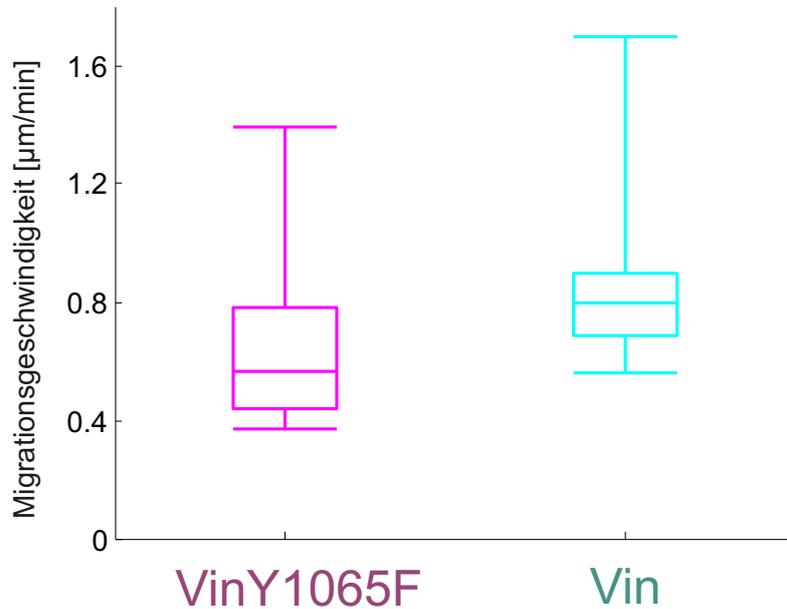


Abbildung 3.5: Verteilung der durchschnittlichen Migrationsgeschwindigkeiten von Keratinozyten über 50 bis 150 min. VinY1065F: Mit GFP-Vinculin-Y1065F transfizierte Zellen ($n=7$), Vin: Mit GFP-Vinculin transfizierte Zellen ($n=8$). Die Y1065F-Mutante ist am Tyrosinrest 1065 nicht phosphorylierbar. Die Boxplots zeigen die Minimal- und Maximalwerte, sowie die 0,25-, 0,5 und 0,75-Quantilen der Verteilungen an.

Phosphorylierung von Vinculin gesteuert werden kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Vinculinphosphorylierung in lebenden Zellen teilweise inhibiert und ihre Fokaladhäsionsdynamik und ihr Migrationsverhalten analysiert. Hierzu wurden die Zellen mit einem Vinculinkonstrukt transfiziert, welches eine GFP-Sequenz enthielt und an einer Phosphorylierungsstelle (TYR1065) blockiert war. Da die Zellen neben dem durch Transfektion eingebrachten Vinculin auch endogenes Vinculin exprimierten, war die Inhibierung allerdings unvollständig¹. Die inhibierten Zellen wurden mit einer komplementären Zellpopulation verglichen, die mit nicht-inhibiertem GFP-Vinculin transfiziert war. Die mit dem inhibierten Konstrukt transfizierten Zellen werden im folgenden mit VinY1065F, und die nicht-inhibierten Kontrollzellen mit Vin gekennzeichnet. Zur Analyse der Fokaladhäsionsdynamik sowie der Migrationsgeschwindigkeit wurden einzelne transfizierte Zellen 50 bis 150 min unter dem Mikroskop beobachtet und ihre Fokaladhäsionen über Fluoreszenzanregung abgebildet.

VinY1065F-Zellen migrierten im Mittel etwas langsamer als Vin-Zellen (VinY1065F: $0,68 \mu\text{m}/\text{min}$, Standardfehler²: $0,14 \mu\text{m}/\text{min}$; Vin: $0,87 \mu\text{m}/\text{min}$, Standardfehler: $0,12 \mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 3.5). Allerdings konnten aufgrund der hohen Streuung keine eindeu-

¹Western-Blot Analysen, die von Simone Born durchgeführt worden waren, hatten ergeben, dass durch Transfektion eingebrachtes Vinculin ungefähr 3 Mal höher konzentriert in der Zelle vorlag als endogenes Vinculin [52].

²Standardabweichung des Mittelwerts: σ/\sqrt{n}

tigen Unterschiede nachgewiesen werden, weshalb hier noch mehr Messwerte erhoben werden sollten. Eine signifikant niedrigere Migrationsgeschwindigkeit der VinY1065F-Zellen würde auf eine Verringerung der Fokaladhäsionsdynamik bei Inhibierung der Phosphorylierung hindeuten.

Durch automatische Bildsegmentierung konnten Größe, Form und Position der Fokaladhäsionen aus den Zeitreihenaufnahmen extrahiert werden (siehe Abb. 3.6 A und B). Anhand dieser Daten ließ sich für jede Fokaladhäsion ein Größenprofil über den gesamten Beobachtungszeitraum erstellen (siehe Abb. 3.6 C). Daraus konnte neben der mittleren Größe die Auf- und Abbaurate³, sowie die Lebensdauer⁴ der Fokaladhäsionen berechnet werden. Dieses Verfahren erlaubte die Analyse einer großen Anzahl von Fokaladhäsionen, sodass es möglich war, auch marginale Unterschiede der beiden Zellpopulationen über den Vergleich ihrer Häufigkeitsverteilungen aufzudecken. In den Histogrammen der Abbildungen 3.7, 3.8, 3.9 und 3.10 sind neben den relativen jeweils auch die kumulativen Häufigkeiten abgebildet, da hier Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede deutlicher hervortreten.

Die Lebensdauer der Fokaladhäsionen war bei VinY1065F-Zellen leicht erhöht. Obwohl hier der Mittelwert dem der Vin-Zellen recht ähnlich ist (VinY1065F: 12,4 min, Vin: 11,2 min) wird in der kumulativen Auftragung der Häufigkeiten deutlich, dass besonders hohe Lebensdauern zwischen 30 und 60 min vor allem bei VinY1065F-Zellen auftraten (siehe Abb. 3.7). Die Streuung der Lebensdauern ist bei den VinY1065F-Zellen dementsprechend größer (VinY1065F: $\sigma = 15,3$ min, Vin: $\sigma = 8,6$ min) Diese Ergebnisse zeigen, dass der durch fortwährenden Auf- und Abbau getriebene Umsatz der Fokaladhäsionen bei VinY1065F-Zellen gehemmt war. Im Gegensatz dazu waren die mittleren Flächen der Fokaladhäsionen bei beiden Populationen sehr ähnlich verteilt (siehe Abb. 3.8). Die mittlere Fläche betrug bei VinY1065F-Zellen $1,72 \mu\text{m}^2$ ($\sigma = 1,77 \mu\text{m}^2$) und bei Vin-Zellen $1,59 \mu\text{m}^2$ ($\sigma = 1,30 \mu\text{m}^2$). Auch beim der mittleren Gleitgeschwindigkeit der Fokaladhäsionen ließen sich keine Unterschiede feststellen (siehe Abb. 3.9). Hier betrug die mittlere Geschwindigkeit bei VinY1065F-Zellen und Vin-Zellen $0,39 \mu\text{m}/\text{min}$ (VinY1065F: $\sigma = 0,27 \mu\text{m}/\text{min}$, Vin: $\sigma = 0,23 \mu\text{m}/\text{min}$).

Interessanterweise zeigte sich beim Auf- und Abbau der Fokaladhäsionen ein heterogenes Bild. Während sich bei der Aufbaurrate (Wachstumsrate vorne) keine Unterschiede zwischen Vin- und VinY1065F-Zellen feststellen ließen, war die Abbaurate (Wachstumsrate hinten) bei VinY1065F-Zellen deutlich erhöht (siehe Abb. 3.10).

Dass die Fokaladhäsionen von VinY1065F-Zellen einerseits eine längere Lebenszeit aufwiesen, ihre Abbaurate jedoch andererseits viel höher als die der Vin-Zellen war, erscheint zunächst widersprüchlich. Wahrscheinlich sind Fokaladhäsionen in VinY1065F-Zellen im Mittel stabiler, bleiben daher länger bestehen, bis sie schließlich abrupt abge-

³Mittlere Steigung der Fokaladhäsionsfläche in den ersten 2,5 min nach ihrer „Geburt“ bzw. in den letzten 2,5 min vor ihrem „Tod“

⁴Die Lebensdauer einer Fokaladhäsion wurde als die Zeitspanne definiert, in der die Fläche der Fokaladhäsion größer als 0 war.

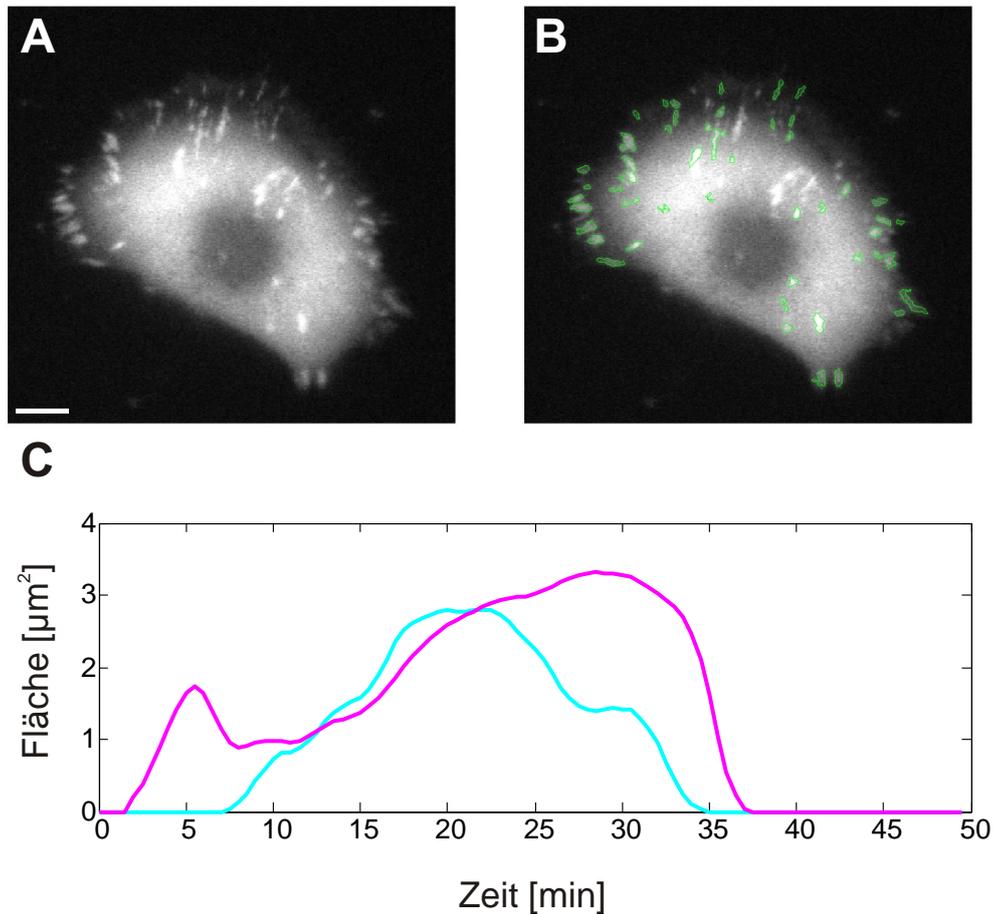


Abbildung 3.6: Erstellung von Größenprofilen einzelner Fokaladhäsionen durch Bildsegmentierung von Zeitreihenaufnahmen. A: Einzelbild aus einer Zeitreihenaufnahme einer migrierenden Keratinotzyte, welche mit GFP-Vinculin transfiziert wurde (Epifluoreszenz). Balken: 10 µm. B: Die durch automatische Bildsegmentierung detektierten Fokaladhäsionen des Bildes aus A sind grün markiert. Aufgrund des zytoplasmatischen Hintergrundes konnten nicht alle Fokaladhäsionen detektiert werden. C: Beispielhafte Größenprofile je einer Fokaladhäsion einer VinY1065F- (violett) und einer Vin-Zelle (blaugrün). Die Größenprofile wurden aus den detektierten Bildsegmenten einer Zeitreihenaufnahme berechnet. Aus ihnen ergibt sich die mittlere Größe, sowie die Lebensdauer und Auf- und Abbaurate der Fokaladhäsionen.

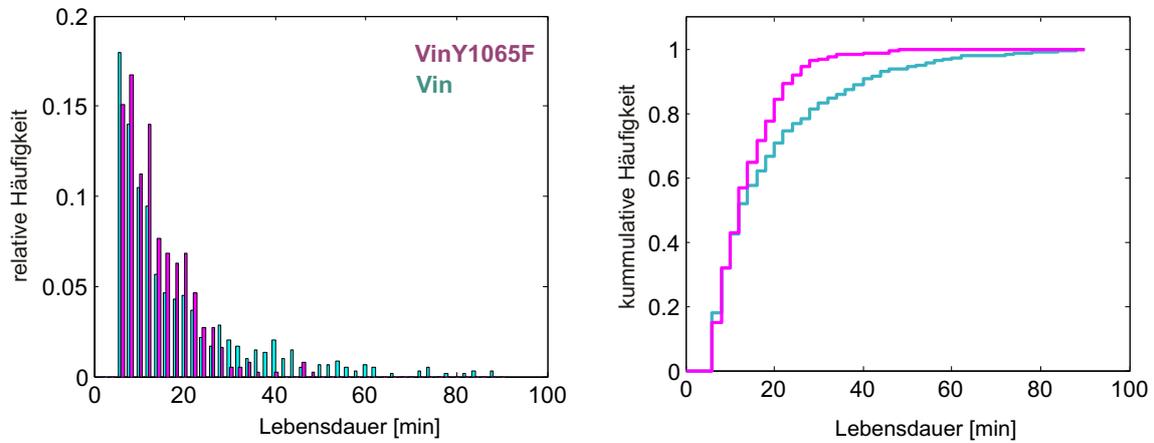


Abbildung 3.7: Verteilung der Lebensdauer von Fokaladhäsionen bei migrierenden Zellen. VinY1065F: GFP-Vinculin-Y1065F transfizierte Zellen ($n = 601$ Fokaladhäsionen in 7 Zellen), Vin: Mit GFP-Vinculin transfizierte Zellen ($n = 365$ Fokaladhäsionen in 4 Zellen).

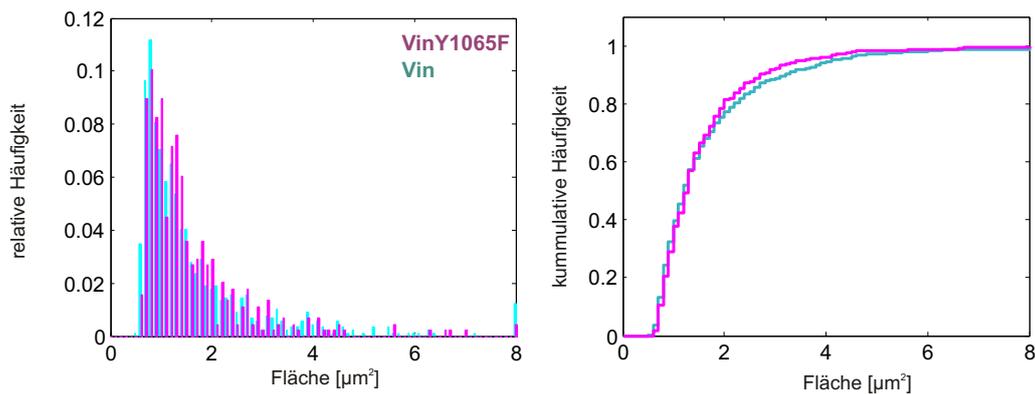


Abbildung 3.8: Verteilung der zeitlich gemittelten Fläche von Fokaladhäsionen bei migrierenden Zellen. VinY1065F: Mit GFP-Vinculin-Y1065F transfizierte Zellen ($n = 893$ Fokaladhäsionen in 7 Zellen), Vin: Mit GFP-Vinculin transfizierte Zellen ($n = 447$ Fokaladhäsionen in 4 Zellen).

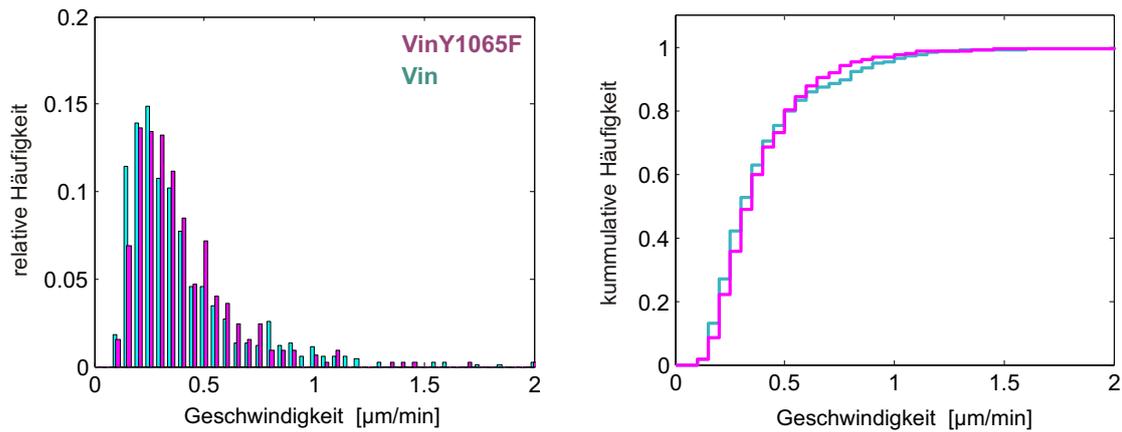


Abbildung 3.9: Verteilung mittleren Geschwindigkeit von Fokaladhäsionen bei migrierenden Zellen. VinY1065F: Mit GFP-Vinculin-Y1065F transfizierte Zellen ($n = 893$ Fokaladhäsionen in 7 Zellen), Vin: Mit GFP-Vinculin transfizierte Zellen ($n = 447$ Fokaladhäsionen in 4 Zellen).

rissen werden. Fokaladhäsionen von Vin-Zellen lösen sich dagegen frühzeitig wieder auf. Die Beobachtung, dass der Fokaladhäsionsaufbau bei beiden Populationen ähnlich verlief würde darüber hinaus erklären, warum in der Verteilung der Fokaladhäsionsgrößen ebenfalls keine Unterschiede zu sehen sind.

Zusammengenommen bekräftigen diese Ergebnisse den direkten Zusammenhang zwischen Vinculinphosphorylierung und Fokaladhäsionsdynamik, lassen aber keine direkten Rückschlüsse auf den Mechanismus zu, mit dem der Auf- und Abbau über Vinculinphosphorylierung gesteuert wird. Da mehrere Studien gezeigt haben, dass die Bindungseigenschaften von Vinculin durch Phosphorylierung beeinflusst werden (siehe Abschnitt 1.7), wurde in den nachfolgend beschriebenen Experimenten das Bindungsverhalten von Vinculin in Fokaladhäsionen analysiert.

3.5 Messung der Austauschdynamik von Vinculin in Fokaladhäsionen

3.5.1 In gereiften Fokaladhäsionen sessiler Zellen unterliegt ein Teil des Vinculins einem ständigen Austausch

Um das Bindungsverhalten von Vinculin in Fokaladhäsionen zu untersuchen, wurden zunächst FRAP-Experimente an gereiften Fokaladhäsionen in sessilen, GFP-Vinculin exprimierenden Zellen durchgeführt. Wie in den Abschnitten 3.2 und 3.3 beschrieben, hatten diese Fokaladhäsionen eine runde Form und waren verhältnismäßig schwach phosphoryliert. Im fluoreszenzmikroskopischen Bild waren die Fokaladhäsionen als helle Flecken zu erkennen, da dort eine hohe Vinculinkonzentration vorlag. Zytoplasmatisches Vinculin erschien dagegen als diffuser „Schleier“, der relativ gleichmäßig über die Zel-

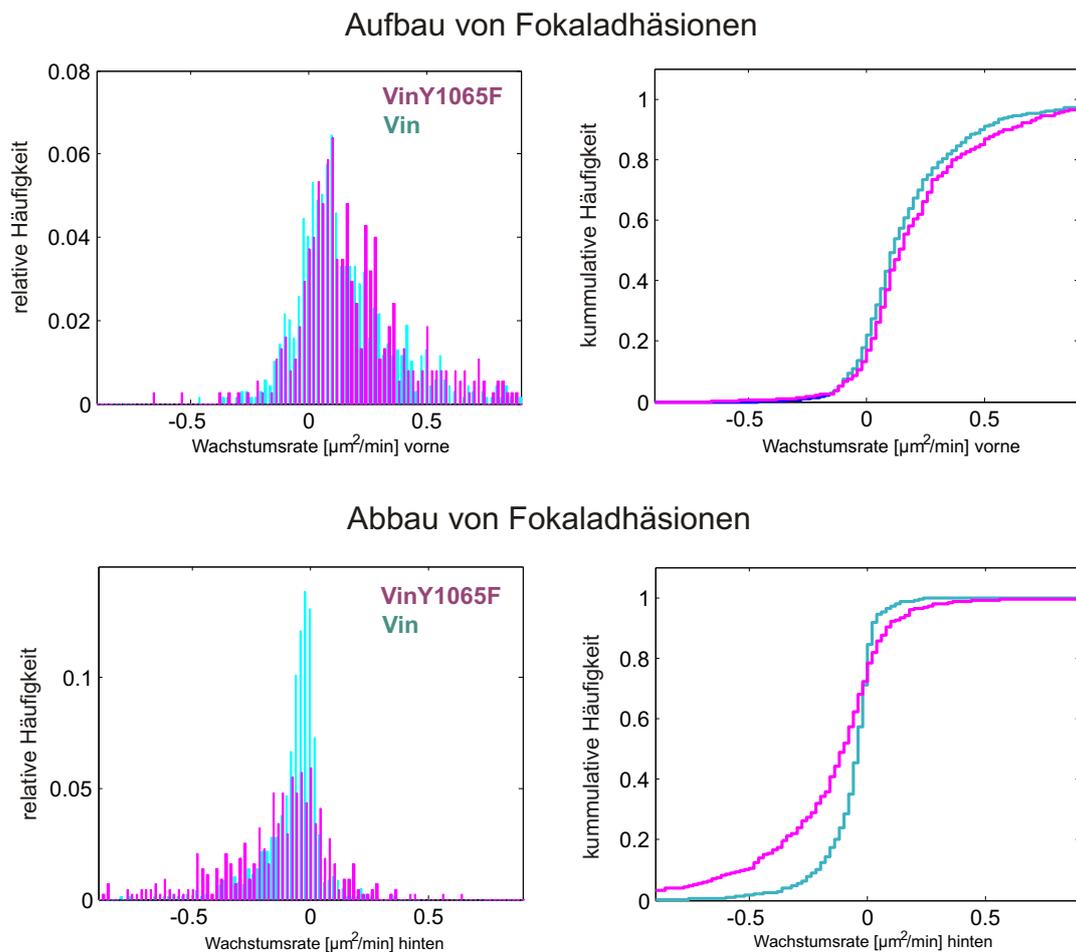


Abbildung 3.10: Verteilung der Wachstumsrate von Fokaladhäsionen bei migrierenden Zellen. Wachstumsrate vorne: Mittlere Steigung der Adhäsionsfläche in den ersten 2,5 min nach Entstehung der Fokaladhäsion. Wachstumsrate hinten: Mittlere Steigung der Adhäsionsfläche in den letzten 2,5 min vor Auflösung der Fokaladhäsion. VinY1065F: Mit GFP-Vinculin-Y1065F transfizierte Zellen ($n = 601$ Fokaladhäsionen in 7 Zellen), Vin: Mit GFP-Vinculin transfizierte Zellen ($n = 365$ Fokaladhäsionen in 4 Zellen).

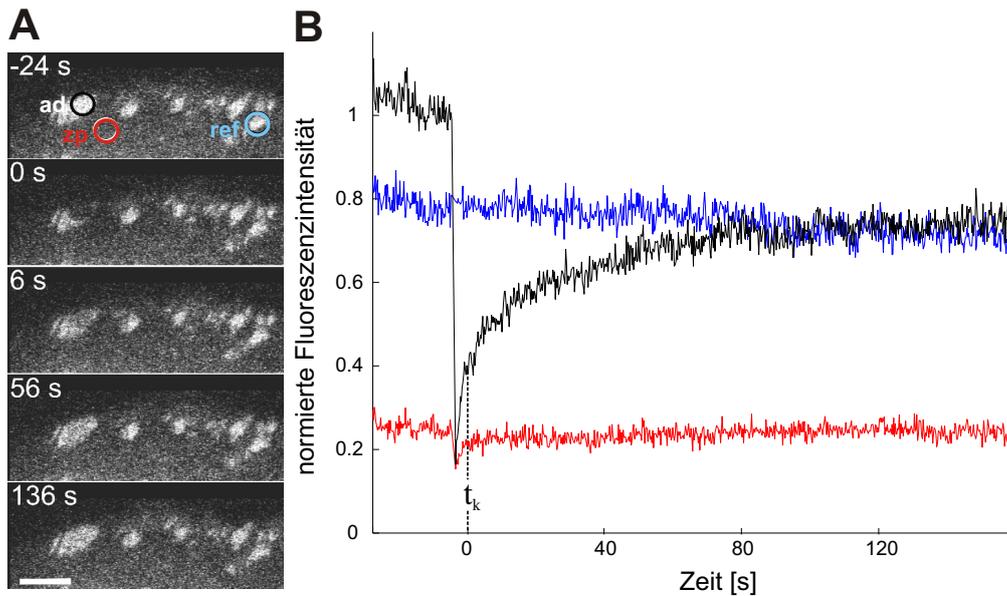


Abbildung 3.11: Rohdaten eines repräsentativen FRAP-Experiments. Die Fokaladhäsion einer sessilen, GFP-Vinculin exprimierenden Keratinozyte wurde mit einem starken Laserstrahl bei 0 s ausgebleicht. Anschließend wurde die Erholung der Fluoreszenz gemessen, um den kinetischen Austausch von Vinculin in der Fokaladhäsion zu quantifizieren. A: Die fluoreszenzmikroskopische Abbildung zeigt die Verteilung von GFP-Vinculin innerhalb eines Teilbereichs der Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten. Je ein zytoplasmatischer (zp, rot) und ein Fokaladhäsionsbereich (ad, schwarz) wurden zum Zeitpunkt 0 s ausgebleicht. Zusätzlich wurde ein Referenzbereich (ref) über einer ungebleichten Fokaladhäsion ausgewählt, um das bildgebungsbedingte Photobleichen der Probe zu quantifizieren (siehe Abschnitt 2.6.1). Radius der Bleichbereiche: $1 \mu\text{m}$, Balken: $5 \mu\text{m}$. B: Mittlere Fluoreszenzintensitäten I der in A markierten Bereiche (I_{ad} : Bleichfeld über der Foklaadhäsion, schwarz; I_{zp} : Bleichfeld im Zytoplasma, rot; I_{ref} : ungebleichter Referenzadhäsionsbereich, blau). Bei I_{ad} ist eine zweiphasige Fluoreszenzerholung mit einem sichtbaren Knick bei $t_k = 3,5 \text{ s}$ zu erkennen. Die Aufnahmerate betrug 1 Hz.

le verteilt war (siehe Abb. 3.11 A). Um Rate und Stärke des Vinculinaustauschs in einer Fokaladhäsionen zu bestimmen, wurde diese mit einem starken Laserstrahl ausgebleicht. Im Laufe der der Zeit kehrte die Fluoreszenz im Bleichfeld zurück, bis schließlich ein Sättigungswert erreicht war (I_{ad} , schwarze Linie in Abb. 3.11). Dieser Wert lag unter der ursprünglichen Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen. Um das bildgebungsbedingte Ausbleichen der Proben zu quantifizieren, wurde die mittlere Intensität von Referenzadhäsionen (I_{ref} , blaue Linie in Abb. 3.11) außerhalb des Bleichfelds ebenfalls erfasst (siehe Abschnitt 2.6.1). Da im dargestellten Experiment die Intensität von I_{ref} über den Beobachtungszeitraum relativ stabil blieb, konnte der erniedrigte Sättigungswert von I_{ad} nur teilweise auf bildgebungsbedingtes Ausbleichen zurückzuführen sein. Weitere Kontrollexperimente zeigten außerdem, dass die unvollständige Fluoreszenzerholung nicht durch Schädigung der fluoreszierenden Proteine zustandekam (siehe Abschnitt 3.8.2). Daher konnte angenommen werden, dass eine Fraktion von Vinculin stabil in den Fokaladhäsionen eingebaut war, und während des Beobachtungszeitraums nicht ausgetauscht wurde.

Bei genauerer Betrachtung der Daten war eine zweiphasige Erholung der Fluoreszenz mit einem schnellen Anstieg in den ersten 10 s nach Bleichen und einem darauffolgenden langsamen Anstieg zu erkennen. Durch systematische Analyse des schnellen Anstiegs konnte nachgewiesen werden, dass dieser auf die Diffusion von zytoplasmatisch gelöstem Vinculin über der Fokaladhäsion zurückzuführen war (siehe Abschnitt 3.8.1). Somit war die Erholung der Fluoreszenz auf zwei sich überlagernde Prozesse, einen schnellen Diffusionsprozess und einen langsamen kinetischen Austauschprozess, zurückzuführen. Da sich die beiden Prozesse in ihrer Geschwindigkeit um mehr als eine Größenordnung unterschieden⁵, war in der Fluoreszenzerholungskurve ein deutlicher Knick zu erkennen (Abb. 3.11 B, Zeitpunkt t_k), der den Übergang der Diffusion zum kinetischen Austausch markierte. Dies erlaubte die näherungsweise Eliminierung der Diffusion durch Abschneiden der Fluoreszenzerholungskurven auf Höhe des Knicks.

Nachdem mit Hilfe der Referenzadhäsionen das bildgebungsbedingte Photobleichen ebenfalls aus den Kurven eliminiert worden war (siehe Abschnitt 2.6.1), konnte die Fraktion an austauschendem Vinculin in Fokaladhäsionen anhand des Sättigungswertes α bestimmt werden. Darüber hinaus konnte über eine Regression des kinetischen Modells aus Gleichung 2.2 die Austauschrate k und somit die Halbwertszeit $t_{1/2}$ ermittelt werden (siehe Abschnitt 2.6.1).

In Abbildung 3.12 A ist die mittlere Fluoreszenzerholungskurve aus 14 FRAP-Experimenten, die an 10 unterschiedlichen sessilen Zellen durchgeführt wurden, abgebildet (blau). Der mittlere Sättigungswert α betrug 0,52 (Standardfehler⁶: 0.02).

⁵Die mittleren Halbwertszeiten durch kinetischen Austausch lagen je nach Typ und Phosphorylierungsgrad der Fokaladhäsion zwischen 35 und 60 s (siehe Abb. 3.12 B). Die Fläche der Bleichfelder betrug dabei im Mittel 10 μm . Die Halbwertszeiten der diffusionsgetriebenen Fluoreszenzerholung lagen dagegen unter 2,5 s (siehe Abb. 3.20)

⁶Standardabweichung des Mittelwerts: σ/\sqrt{n}

Dies bedeutet, dass ca. 52% der Proteine stabil in der Fokaladhäsion gebunden waren, während ca. 48% ständig ausgetauscht wurden. Die darübergelegte schwarze Linie beschreibt die angepasste Kurve des kinetischen Modells. Die daraus geschätzte mittlere Halbwertszeit $t_{1/2}$ betrug 57 s (Standardfehler: 5 s).

3.5.2 Der Anteil des stabil gebundenen Vinculins nimmt während der Reifung der Fokaladhäsionen zu

Die in Abschnitt 3.3 beschriebenen Experimente hatten gezeigt, dass Vinculin im Verlauf der Fokaladhäsionsreifung dephosphoryliert wird. In vergleichenden FRAP-Experimenten an jungen und gereiften Fokaladhäsionen migrierender Zellen wurde nun untersucht, ob diese Dephosphorylierung mit veränderten Bindungseigenschaften des Vinculins in Zusammenhang steht.

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, sind junge Fokaladhäsionen im Lamellipodium direkt hinter dem Leitsaum lokalisiert. Alle als jung klassifizierten Fokaladhäsionen, die für Bleichexperimente ausgewählt wurden, waren 6 bis 15 min alt und relativ stabil in ihrer Form und Fluoreszenzintensität. Gereifte Fokaladhäsionen befanden sich dagegen im hinteren Teil der Zelle. Um als gereift klassifiziert zu werden, mussten sie sich innerhalb von 6 bis 13 min nach dem Bleichzeitpunkt auflösen. Alle Experimente, bei denen die Auflösung früher erfolgte, wurden verworfen, da ansonsten kein stabiles Plateau zur Bestimmung des Sättigungswertes vorhanden war.

In jungen Fokaladhäsionen lag der mittlere Sättigungswert bei 0,7 (Standardfehler: 0,04, $n = 14$ Fokaladhäsionen von 9 Zellen). In gereiften Fokaladhäsionen war der Sättigungswert mit 0,5 (Standardfehler: 0,05, $n = 11$ Fokaladhäsionen von 11 Zellen) signifikant niedriger, was auf einen erhöhten Anteil an stabil eingebautem Vinculin schließen lässt (siehe Abb. 3.12).

Die mittlere Halbwertszeit betrug in jungen Fokaladhäsionen 36 s (Standardfehler: 5 s) und in gereiften Fokaladhäsionen 42 s (Standardfehler: 6 s). Hier konnten mit Hilfe statistischer Tests (siehe Abschnitt 2.6.8) keine signifikanten Unterschiede untereinander gezeigt werden. Allerdings waren die Halbwertszeiten in jungen und gereiften Fokaladhäsionen migrierender Zellen interessanterweise signifikant niedriger als in Fokaladhäsionen sessiler Zellen.

3.5.3 Der Vinculinaustausch in Fokaladhäsionen ist direkt von der Phosphorylierung von Vinculin an Tyrosinrest 1065 abhängig

Die Korrelation zwischen Vinculinphosphorylierung (siehe Abschnitt 3.3) und Vinculinaustausch während der Fokaladhäsionsreifung legt nahe, dass die Bindungseigenschaften von Vinculin über die Phosphorylierung an Tyrosinrest 1065 moduliert werden können.

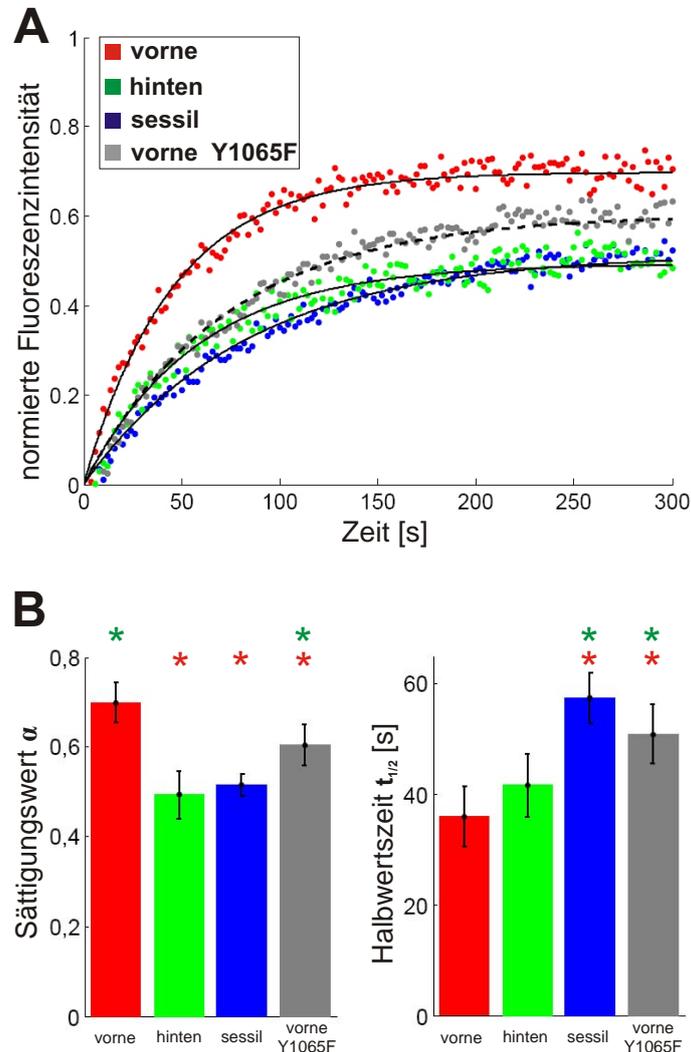


Abbildung 3.12: Abhängigkeit des Vinculinaustausches vom Reifungsgrad der Fokaladhäsionen bzw. von der Vinculinphosphorylierung. A: Mittlere Fluoreszenzerholung von GFP-Vinculin (rot, grün, blau) und GFP-VinculinY1065F (grau) in Fokaladhäsionen migrierender und sessiler Zellen. Ein kinetisches Modell (siehe Gleichung 2.2) wurde an die Daten mittels Regression angepasst. B: Mittlere Sättigungswerte und Halbwertszeiten der Einzelkurven. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler (Standardabweichung des Mittelwertes) an. Rot: Junge Fokaladhäsionen im vorderen Bereich migrierender Zellen ($n = 14$). Grün: Gereifte Fokaladhäsionen im hinteren Bereich migrierender Zellen ($n = 11$). Blau: Gereifte Fokaladhäsionen sessiler Zellen ($n = 14$). Grau: Junge Fokaladhäsionen im vorderen Bereich migrierender Zellen mit phosphorylierungsinhibiertem GFP-VinculinY1065F ($n = 13$). Die Sterne markieren signifikante Unterschiede zu jungen (rot) bzw. gereiften Fokaladhäsionen (grün) migrierender Zellen.

Um die direkte Abhängigkeit von Phosphorylierung und Austauschdynamik zu untersuchen, wurden FRAP-Experimente an jungen Fokaladhäsionen durchgeführt, wobei die Zellen mit einem GFP-Vinculin-Konstrukt transfiziert worden waren, welches am Tyrosinrest 1065 nicht phosphoryliert werden konnte (VinY1065F-Zellen, vgl. Abschnitt 3.4). Dabei zeigte sich ein signifikant geminderter Vinculinaustausch in phosphorylierungs-inhibierten, jungen Fokaladhäsionen: Der Sättigungswert betrug hier 0,6 (Standardfehler: 0.05, $n = 13$ Fokaladhäsionen von 9 Zellen, siehe Abb. 3.12) und lag somit zwischen den Werten für junge und gereifte Fokaladhäsionen in Vin-Zellen. Die mittlere Halbwertszeit betrug 51 s (Standardfehler: 5 s) und war im Vergleich zu Vin-Zellen signifikant erhöht.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Vinculin im Mittel stabiler in den Fokaladhäsionskomplex eingebaut wird, wenn es am Tyrosinrest 1065 nicht phosphoryliert ist.

3.5.4 Kurz vor Auflösung einer Fokaladhäsion erhöht sich die Austauschdynamik von Vinculin

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Vinculin im Verlauf des Reifungsprozesses durch Dephosphorylierung im Fokaladhäsionskomplex stabilisiert wird. In den in Abschnitt 3.3 erläuterten Immunfluoreszenzfärbungen war allerdings erkennbar, dass vereinzelte gereifte Fokaladhäsionen, die sich ihrer peripheren Lage nach zu urteilen vermutlich im Auflösungsprozess befanden, verhältnismäßig stark phosphoryliert waren. Dieser Befund lässt vermuten, dass Fokaladhäsionen kurz vor ihrer Auflösung wieder eine erhöhte Vinculin-Austauschdynamik aufweisen.

Um dies zu überprüfen, wurden FRAP-Experimente an Fokaladhäsionen migrierender Zellen durchgeführt, wobei zusätzlich zur Austauschdynamik ihr Auflösungszeitpunkt bestimmt wurde. Dies ermöglichte es, den Vinculinaustausch einer Fokaladhäsion direkt mit ihrer verbleibenden Lebenszeit zu korrelieren. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen FRAP-Experimenten wurde anstatt des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes ein TIRF-Aufbau verwendet. Bei der TIRF-Mikroskopie werden nur Fluorophore unmittelbar über dem Deckglas angeregt, sodass nur jene Zellstrukturen abgebildet werden, die engen Kontakt zum Substrat haben. Dies hatte den Vorteil, dass der zytoplasmatische Hintergrund im Gegensatz zu den Fokaladhäsionen nur sehr schwach abgebildet wurde, und somit der Anteil der Diffusion in der Fluoreszenzerholungskurve vernachlässigt werden konnte (siehe Abb. 3.13 A). So musste der Versatz nicht über die manuelle Detektion eines Knicks in der Kurve festgelegt werden, wodurch vor allem die Fluoreszenzerholung in den ersten Sekunden nach Bleichen wesentlich genauer gemessen werden konnte (siehe 3.13 B, vgl. 3.11). Da alle gemessenen Fokaladhäsionen zum Bleichzeitpunkt kurz vor dem Auflösungsprozess standen, war meist kein stabiles Plateau in der Fluoreszenzerholung detektierbar. Daher wurden sowohl die Halbwertszeit $t_{1/2}$ als auch der Sättigungswert α über eine Regression des zuvor beschriebenen kinetischen Modells (Gleichung 2.2) an die normierten und korrigierten Intensitäten innerhalb

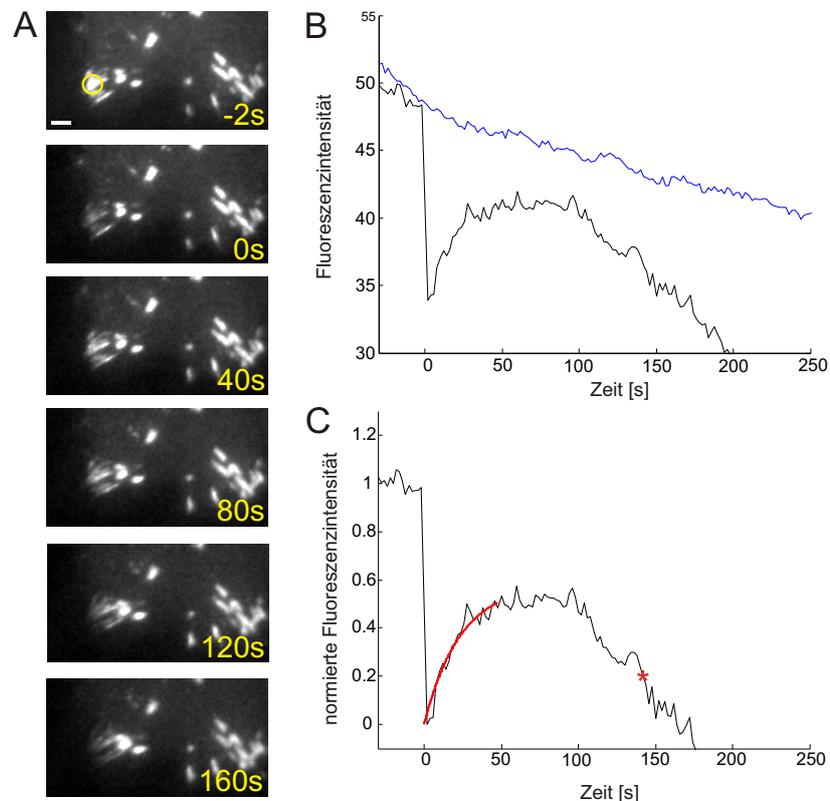


Abbildung 3.13: Rohdaten eines repräsentativen FRAP-Experiments zur Untersuchung von Fokaladhäsionen im Auflösungsprozess. Die Daten wurden mittels TIRF-Mikroskopie erhoben. Die Fokaladhäsion einer migrierenden, GFP-Vinculin exprimierenden Keratinozyte wurde mit einem starken Laserstrahl bei 0 s ausgebleicht. Anschließend wurde die Erholung der Fluoreszenz gemessen, um den kinetischen Austausch von Vinculin in der Fokaladhäsion zu quantifizieren. A: Die fluoreszenzmikroskopische Abbildung zeigt die Verteilung von GFP-Vinculin innerhalb eines Teilbereichs der Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten. Ein Fokaladhäsionsbereich (gelb) wurde zum Zeitpunkt 0 s ausgebleicht. Es ist zu erkennen, dass sich die Fokaladhäsion im Bleichfeld nach 160 s fast vollständig aufgelöst hat. Radius des Bleichbereichs: $5 \mu\text{m}$, Balken: $2 \mu\text{m}$. B: Mittlere Fluoreszenzintensität des in A markierten Bereiches (schwarz), sowie die mittlere Fluoreszenz von automatisch detektierten Referenzadhäsionen außerhalb des Bleichfeldes (blau). Der nach anfänglicher Erholung erfolgende Abfall der Fluoreszenz ist sowohl auf bildgebungsbedingtes Ausbleichen als auch auf die Auflösung der Fokaladhäsion zurückzuführen. Die Aufnahmezeit betrug $0,5 \text{ Hz}$. C: Normierte und gegen Ausbleichen korrigierte Fluoreszenz im Bleichfeld. Zur Quantifizierung der Austauschdynamik wurde ein kinetisches Modell (Gleichung 2.2) mit zwei freien Parametern (Sättigungswert α und Austauschrate k) an die Daten innerhalb der ersten 50 s nach Bleichen durch Regression angepasst (rote Linie). Als Auflösungszeitpunkt der Fokaladhäsion wurde der Wert definiert, an dem die Intensität nach anfänglicher Fluoreszenzerholung wieder auf 0,2 abgefallen war (roter Stern).

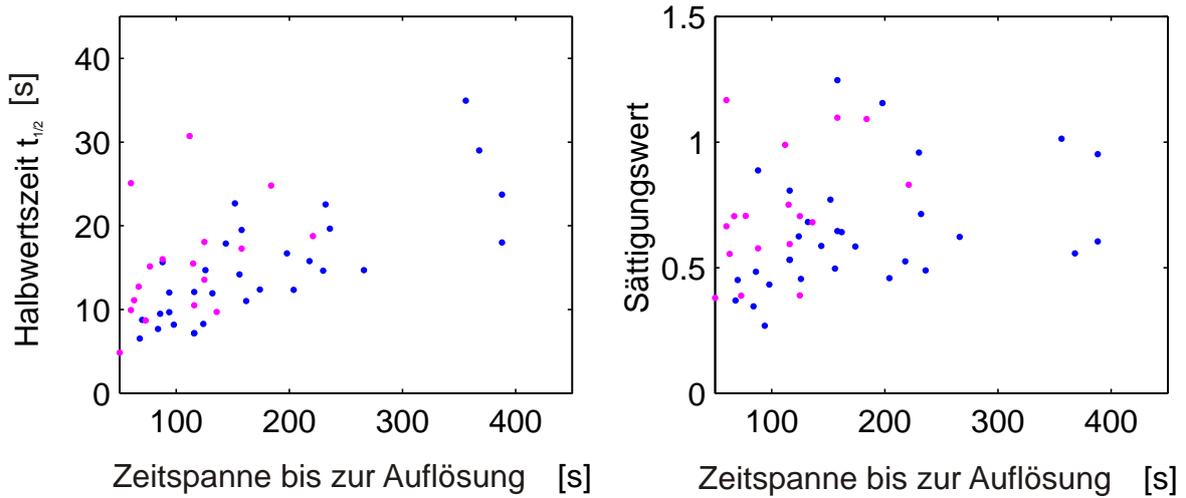


Abbildung 3.14: Austauschdynamik von Vinculin in Fokaladhäsionen in Abhängigkeit ihrer verbleibenden Lebensdauer. Jeder Punkt entspricht einem einzelnen FRAP-Experiment. blau: Vin ($n = 34$, violett: VinY1065F ($n = 15$))

der ersten 50 s nach Bleichen bestimmt (siehe Abb. 3.13 C). Bei einer Aufnahme­rate von 2 Hz lagen in diesem relativ kurzen Zeitraum nur 25 Datenpunkte. Die Messdaten kurz nach dem Bleichzeitpunkt mußten also besonders verlässlich sein, weshalb die TIRF-Methode der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie vorgezogen wurde.

Die verbleibende Lebensdauer τ der Fokaladhäsionen wurde anhand der Fluoreszenzerholungskurve ermittelt. Dabei wurde der Auflösungszeitpunkt als die Zeit definiert, an der die normierte und korrigierte Fluoreszenz auf 0.2 abgefallen war. Diese Intensitätsschwelle wurde unter Abwägung folgender Faktoren willkürlich gewählt: Einerseits kann man erst bei einer Intensität von 0 davon ausgehen, dass sich die Fokaladhäsion vollständig aufgelöst hat. Andererseits wird die Bestimmung des Auflösungszeitpunktes mit steigendem Abstand zum Bleichzeitpunkt immer ungenauer, da der durch Ausbleichkorrektur bedingte Fehler immer größer wird [43]. Ein Schwellenwert von 0.2 stellt somit einen guten Kompromiss dar, da sich hier die Fokaladhäsion mit hoher Wahrscheinlichkeit im Auflösungsprozess befindet und gleichzeitig der Abstand zum Bleichzeitpunkt möglichst gering gehalten wird.

In den Streudiagrammen in Abbildung 3.14 sind die Halbwertszeiten $t_{1/2}$ und Sättigungswerte α einzelner Fokaladhäsionen gegen ihre verbleibende Lebensdauer τ aufgetragen. Die Experimente wurden mit Vin-Zellen (blau, $n = 34$) und phosphorylierungs-inhibierten VinY1065F-Zellen (violett, $n = 15$) durchgeführt. Die Daten der Vin-Zellen deuten trotz einer relativ großen Streuung darauf hin, dass sich $t_{1/2}$ und τ proportional zueinander verhalten. Der Korrelationskoeffizient⁷ $\text{corr}_{wt}(t_{1/2}, \tau)$ beträgt 0.33. Eine positive Korrelation der Daten bedeutet, dass die Austauschrate von Vinculin zunimmt,

⁷ $\text{corr}(x, y) = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$

je näher der Auflösungszeitpunkt der Fokaladhäsion rückt. Demgegenüber ist keine Abhängigkeit zwischen α und τ zu erkennen ($corr_{wt}(\alpha, \tau) = 0,07$). Interessanterweise liegt α im Mittel bei 0,69 (Standardfehler: 0,07), also in etwa im Bereich von jungen Fokaladhäsionen. Hier sollte man jedoch vorsichtig mit der Interpretation sein, da Experimente am TIRF-Aufbau aufgrund der unterschiedlichen Berechnung des Offsets unter Umständen nicht direkt mit denen am Laser-Scanning-Mikroskop vergleichbar sind.

Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl und hohen Streuung ist bei den VinY1065F-Zellen keine verlässliche Aussage über die Abhängigkeit zwischen τ und $t_{1/2}$ bzw. α zu treffen. Die Werte der Korrelationskoeffizienten betragen hier $corr_{yf}(t_{1/2}, \tau) = -0,13$ bzw. $corr_{yf}(\alpha, \tau) = -0,10$, und α beträgt im Mittel 0,81 (Standardfehler: 0,23). Hier ist es empfehlenswert, weitere Experimente durchzuführen, um die Stichprobenanzahl zu erhöhen und so mögliche Unterschiede zwischen Vin1065-Zellen und Vin-Zellen ermitteln zu können. Vor allem die in Abschnitt 3.4 beschriebenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Fokaladhäsionen von Vin1065-Zellen kurz vor der Auflösung stabiler sind und demnach einen geringeren Vinculinaustausch zeigen, als Vin Zellen.

3.6 Die Kraftübertragung von Fokaladhäsionen nimmt mit ihrem Reifungsgrad zu

Wie in Abschnitt 1.7 erläutert wurde, trägt Vinculin innerhalb des Fokaladhäsionskomplexes dazu bei, die Zelle mechanisch an ihr Substrat zu koppeln und Zugkräfte zu übertragen. Da aus den oben beschriebenen Untersuchungen hervorgeht, dass Vinculin im Laufe der Fokaladhäsionsreifung immer stabiler in den Adhäsionskomplex eingebaut wird, war es interessant zu wissen, ob sich die Kraftübertragungseigenschaften der Fokaladhäsionen während dieses Prozesses ebenfalls verändern.

Aus diesem Grunde wurden migrierende Keratinozyten auf flexiblen fibronektinbeschichteten Silikonsubstraten kultiviert und mikroskopisch beobachtet. Das weiche Substrat wurde durch die kontraktilen Kräfte der Zellen elastisch verformt. Diese Substratdeformationen konnten über fluoreszierende Mikrokugeln, welche in die oberste Schicht des durchsichtigen Substrats eingebettet waren, quantifiziert werden. Als Ergebnis erhielt man ein durch die Zelle erzeugtes Verzugsfeld, welches sich im Laufe des Migrationsprozesses dynamisch änderte, und das Rückschlüsse auf die räumliche und zeitliche Verteilung der zellulären Zugkräfte zuließ. In einem ersten relativ einfachen Ansatz, wurde der Betrag der mittleren Substratdeformation in definierten rechteckigen Feldern gemessen, über die sich die Zelle hinweg bewegte (siehe Abb. 3.15 A). Erreichte das Lamellipodium der Zelle eines dieser Felder, war die Substratdeformation zunächst gering, nahm aber stetig zu, und erreichte einen Maximalwert, wenn der hintere Teil der Zelle im Feld angekommen war (siehe Abb 3.15 B).

Bei der Analyse von zweidimensionalen Verzugfeldern eines Zeitpunktes fiel auf, dass der stärkste Verzug in den rechten und linken hinteren Außenbereichen der Zelle lokali-

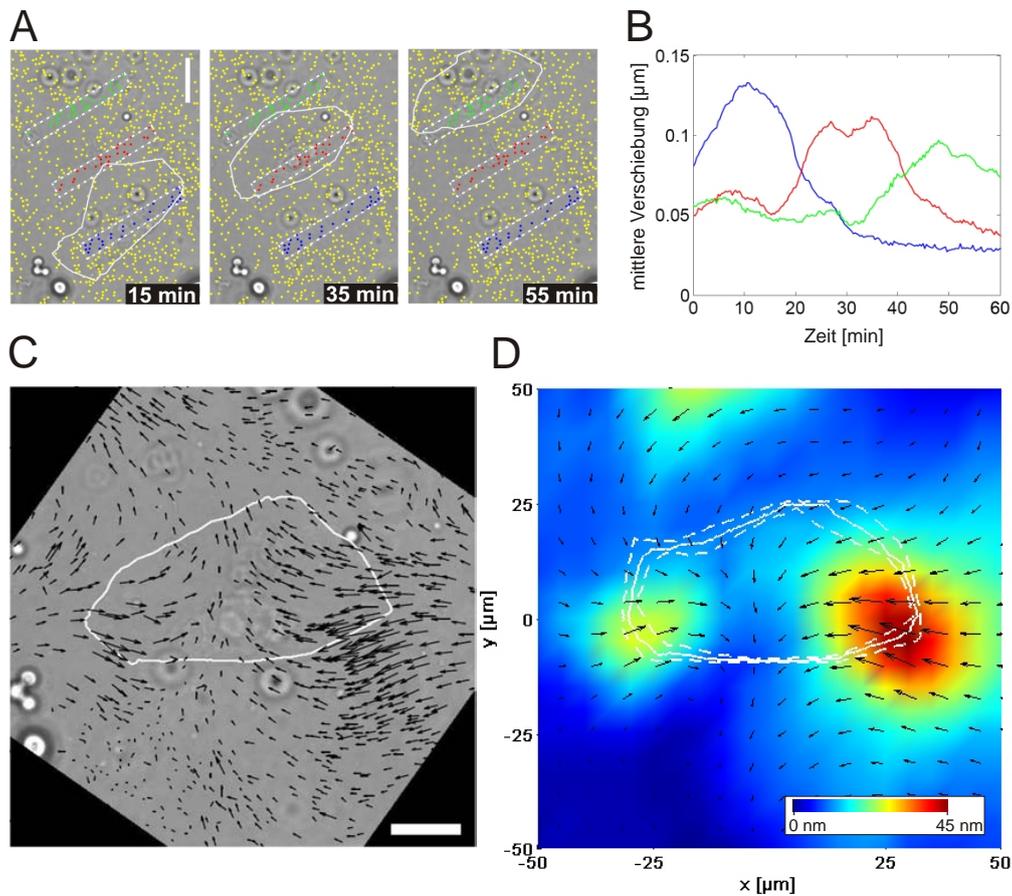


Abbildung 3.15: Verzug von flexiblem Silikonsubstrat durch Kontraktionskräfte migrierender Zellen. A: Phasenkontrastbild einer auf Silikonsubstrat migrierenden Keratinozyte. Aufgrund der unscharfen Abbildung ist die Zellform durch eine weiße Linie gekennzeichnet. Die Unschärfe kommt dadurch zustande, dass auf die im Substrat eingebetteten fluoreszierenden Mikrokugeln fokussiert wurde. Die farbigen Punkte markieren die Positionen der Mikrokugeln. Die blau, rot und grün markierten Mikrokugeln befinden sich in drei Analysebereichen, deren mittlerer Verzug in B aufgetragen ist. Balken: 20 μm . B: Mittlerer Betrag des Verzuges in den in A abgebildeten Analysebereichen über einen Zeitraum von 60 min. C: Phasenkontrastbild derselben Zelle zum Zeitpunkt 30 min. Die Zellform ist durch eine weiße Linie gekennzeichnet. Das Bild wurde so verschoben und rotiert, dass sich der Zellkern im Bildmittelpunkt befindet und die Zelle nach oben orientiert ist. Die Pfeile zeigen die Verschiebungen der einzelnen Mikrokugeln mit 150-facher Vergrößerung an. Balken: 15 μm . D: Mittlerer Substratverzug der Zelle über 30 min. Um die Zelle über den gesamten Beobachtungszeitraum im Bild zu zentrieren, wurde jedes Einzelbild entsprechend Abb. C verschoben und rotiert. Die weiße Linie beschreibt die mittlere Zellform (Median) über den analysierten Zeitraum. Die gestrichelten Linien zeigen die zugehörige Streuung in Form des 0,25- und 0,75-Quantils an. Die schwarzen Pfeile zeigen den mittleren Verzug mit 200-facher Vergrößerung an. Der Verzug ist zusätzlich in Falschfarben abgebildet. Im Referenzbild war wahrscheinlich noch ein geringer Anteil an Substratverzug durch die Zelle vorhanden. Daher hebt sich der Verzug in seiner Gesamtheit betrachtet nicht auf.

siert, und rechtwinklig zur Migrationsrichtung orientiert war (siehe Abb. 3.15 C). Wie in Abbildung 3.2 zu erkennen ist, sind in diesen Bereichen typischerweise gereifte Fokaladhäsionen lokalisiert (Pfeilspitze). Diese Beobachtung wurde durch die Kalkulation des zeitlich gemittelten Verzuges über 30 min bestätigt (siehe Abb. 3.15 D). Der Verzug in der Lamelle, wo sich normalerweise junge Fokaladhäsionen befinden (vgl. Abb. 3.2), war dagegen wesentlich schwächer ausgeprägt und entgegengesetzt zur Migrationsrichtung orientiert.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass die stärksten Zugkräfte während des gesamten Migrationsprozesses von gereiften Fokaladhäsionen übertragen werden. Dies konnte inzwischen durch Experimente von Claudia Schäfer bestätigt werden, bei denen die Zugkräfte einzelner Fokaladhäsionen gemessen wurden [52].

Wahrscheinlich werden diese starken Zugkräfte durch die Kontraktion senkrecht zur Migrationsrichtung verlaufender Stressfasern erzeugt, die typischerweise am hinteren Ende der Zellen lokalisiert sind (siehe Abb. 3.2 A und B).

3.7 Bewegung von Aktinfilamenten in migrierenden Keratinozyten

Zelluläre Zugkräfte werden durch myosinvermittelte Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts erzeugt. Vinculin bindet direkt an Aktinfilamente und koppelt somit die kontraktile Maschine der Zelle an den Adhäsionskomplex, wodurch Zugkräfte auf das Substrat übertragen werden können (siehe Abschnitt 1.7). Bei geringer Substratkopplung führt die Kontraktion des Netzwerks zu einer messbaren Bewegung der einzelnen Aktinfilamente. Dieses Phänomen wird als myosinabhängiger Aktinfluss bezeichnet [83]. Im Bereich von Fokaladhäsionen wird dieser Fluss aufgrund der stärkeren Kopplung an das Substrat abgebremst [34]. Hier liegt also eine erhöhte Substratreibung vor, wodurch die kontraktile Kräfte effektiv auf das Substrat übertragen werden. Somit lassen sich anhand des Bewegungsprofils von Aktinfilamenten Rückschlüsse auf die räumliche Verteilung der Einleitung kontraktile Kräfte in das Substrat ziehen.

Die in den vorherigen Abschnitten erläuterten Ergebnisse zeigen, dass Vinculin im Verlauf der Fokaladhäsionsreifung stabiler in den Adhäsionskomplex eingebaut wird und die Kraftübertragung der Fokaladhäsionen gleichzeitig zunimmt. Dies lässt vermuten, dass durch den stabileren Einbau von Vinculin im Verlauf des Reifungsprozesses eine effektivere Substratkopplung der Aktinfilamente erreicht wird. Dies würde wiederum bedeuten, dass der Aktinfluss über jungen Fokaladhäsionen aufgrund verminderter Substratkopplung höher sein müsste als über gereiften Fokaladhäsionen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden gleichzeitig Aktinfluss in Substratnähe und Fokaladhäsionsdynamik in migrierenden Zellen analysiert. Dazu wurden die Zellen mit DsRed-Vinculin und GFP-Aktin transfiziert.

Bei jedem Einzelzellexperiment wurde zunächst die Fokaladhäsionsdynamik über

Epifluoreszenzanregung von DsRed für 6 min aufgezeichnet. Anschließend wurde eine Zeitreihenaufnahme des Aktinflusses über 84 s angefertigt. Um nur jene Aktinfilamente abzubilden, die sich in Substratnähe (bis zu 200 nm über dem Deckglas), und dementsprechend unmittelbar über den Fokaladhäsionen befanden, wurde hierbei TIRF-Mikroskopie verwendet. Nach der Aktinflussmessung wurde nochmals die Fokaladhäsionsdynamik für 6 min aufgezeichnet.

In Abbildung 3.16 ist die Aktinverteilung von zwei migrierenden Zellen in Epifluoreszenz (A1, A2) und TIRF (B1, B2) abgebildet. Die Vinculinverteilung der entsprechenden Zellen ist in Abbildung 3.17 (A1, A2) dargestellt. Es ist erkennbar, dass Aktin im TIRF-Bild vor allem dort konzentriert ist, wo sich Fokaladhäsionen befinden. Wie TIRF-Aufnahmen von ausschließlich mit GFP-Aktin transfizierten Zellen bestätigen, ist dies kein Artefakt, welches vom Durchbluten des roten Vinculinsignals herrühren könnte.

Mittels eines zeitintegrierten Kreuzkorrelationsverfahrens wurde ein Profil des mittleren Aktinflusses über einen Zeitraum von 80 s erstellt. In Abbildung 3.16 ist das Profil mit grünen Pfeilen, welche Geschwindigkeit und Richtung des Flusses angeben (C1, C2), und in Falschfarben (D1, D2) dargestellt. Es fällt auf, dass der Aktinfluss im hinteren Bereich, wo sich die Zelle im Ablösungsprozess befindet, mit ca. 3 bis 6 $\mu\text{m}/\text{min}$ am stärksten ist.

Somit spiegelt sich das asymmetrische Adhäsionsverhalten der Zellen auch im Aktinfluss wider: Dort, wo die Fokaladhäsionen aufgelöst werden und die Aktin-Substrat-Kopplung somit gelöst wird, ist der Aktinfluss besonders hoch. Interessanterweise ist eine scharfe Grenze dieses anterograden Aktinflusses genau dort erkennbar, wo typischerweise senkrecht zur Migrationsrichtung orientierte Stressfasern verlaufen (vgl. Abb. 3.2).

Anhand der Abbildung 3.17 ist erkennbar, dass der Aktinfluss über Fokaladhäsionen verlangsamt ist. Er liegt hier im Mittel bei 0,34 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Standardfehler: 0,012 $\mu\text{m}/\text{min}$). Es ließen sich allerdings keine Unterschiede im Aktinfluss über jungen und gereiften Fokaladhäsionen feststellen. Wie in der Falschfarbendarstellung in Abbildung 3.17 (B1, B2), war die gemessene Aktinbewegung über den meisten Fokaladhäsionen im Bereich des Mittelwerts.

Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei der Analyse der mittleren Aktingeschwindigkeit über Fokaladhäsionen in Abhängigkeit ihres Alters bzw. ihrer verbleibenden Lebenszeit. Dazu wurden insgesamt 12 der oben beschriebenen Einzelzelleexperimente durchgeführt und Geburts- bzw. Todeszeitpunkt der Fokaladhäsionen anhand der Zeitreihenaufnahmen bestimmt. Der gemessene Aktinfluss war in Bezug auf Alter und verbleibender Lebenszeit der Fokaladhäsionen gleichförmig verteilt (siehe Abb. 3.18). Somit konnten über den Aktinfluss keine Unterschiede in der Aktinkopplung bei jungen und gereiften Fokaladhäsionen nachgewiesen werden.

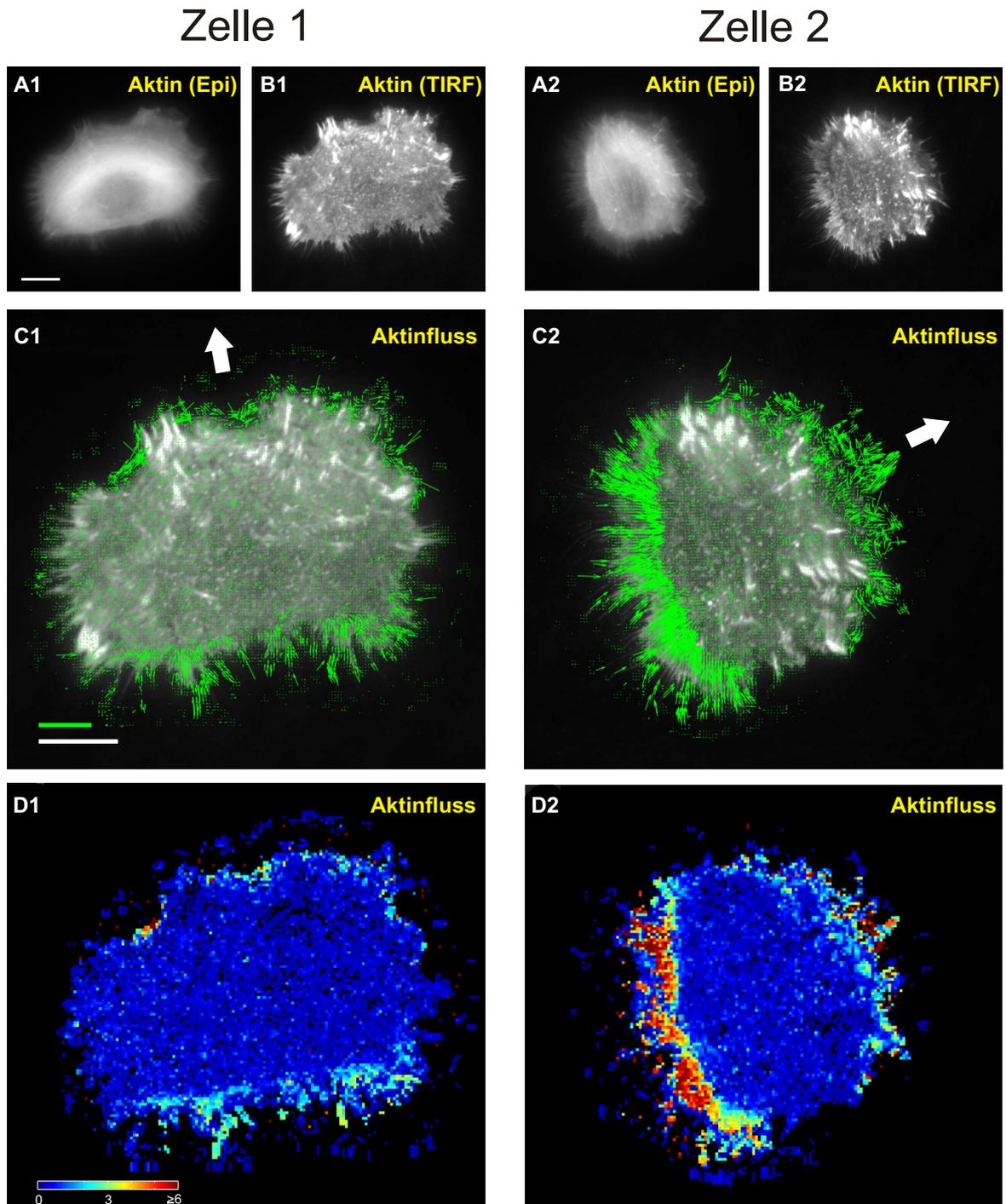


Abbildung 3.16: Fluss von Aktinfilamenten in Substratnähe bei migrierenden Zellen (Substratabstand: 0 bis ca. 200 nm). A: Aktin in Epifluoreszenz. B: Aktin in TIRF. C: Abbildung aus B. Die grünen Pfeile zeigen die Geschwindigkeit und Richtung des mittleren Aktinflusses über 80 s an. Weiße Pfeile: Migrationsrichtung. Geschwindigkeitsskala (grün): $20 \mu\text{m}/\text{min}$, Längenskala: $10 \mu\text{m}$ (weiß). D: Aktinfluss aus B in Falschfarbendarstellung. Einheit der Skala: $\mu\text{m}/\text{min}$

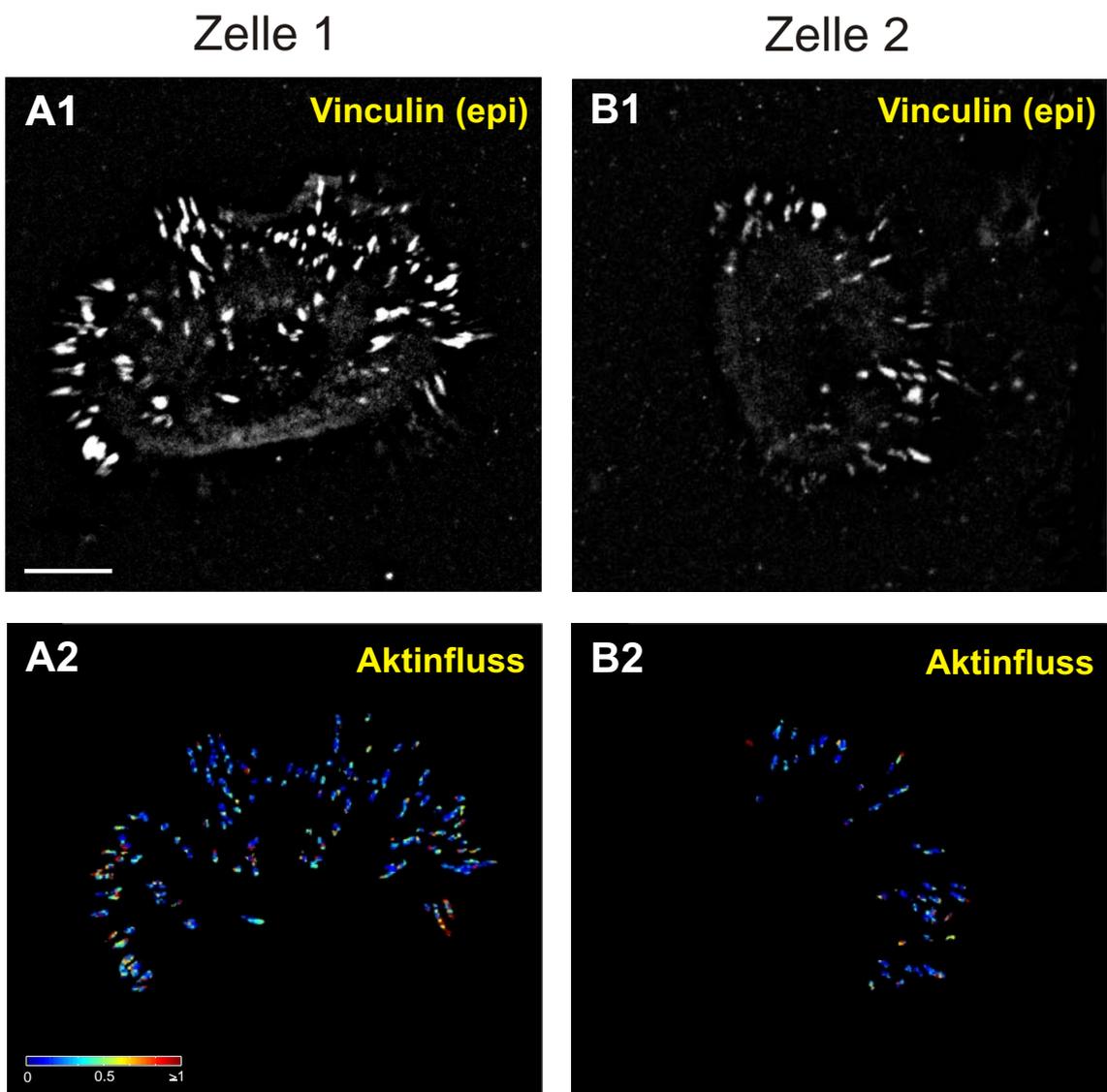


Abbildung 3.17: Fluss von Aktinfilamenten über Fokaladhäsionen in migrierenden Zellen. A: Vinculin in Epifluoreszenz. B: Aktinfluss über Fokaladhäsionen in Falschfarbendarstellung. Einheit der Skala: $\mu\text{m}/\text{min}$.

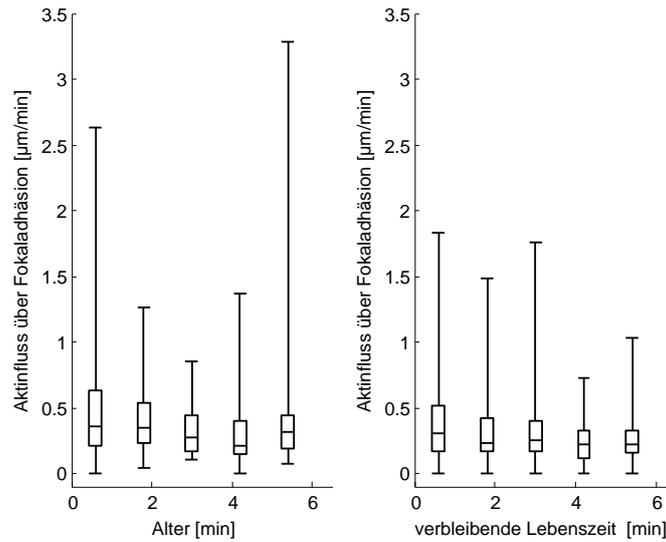


Abbildung 3.18: Mittlerer Aktinfluss über Fokaladhäsionen in Abhängigkeit ihres Alters bzw. ihrer verbleibenden Lebensdauer. Die Boxplots zeigen die Minimal- und Maximalwerte, sowie die 0,25-, 0,5 und 0,75-Quantile der Verteilungen an. Es wurden insgesamt 492 Fokaladhäsionen von 12 Zellen analysiert.

3.8 Untersuchungen zur Verifizierung der verwendeten Methoden

3.8.1 Messungen zur Austauschkinetik von Vinculin in Fokaladhäsionen werden durch zytoplasmatische Diffusion überlagert

Bei den in Abschnitt 3.5 beschriebenen FRAP-Experimenten wurde der kinetische Austausch von Vinculin in Fokaladhäsionen gemessen. Dabei zeigten die normierten Fluoreszenzerholungskurven bei allen Experimenten, die mit dem Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen worden waren, einen zweiphasigen Anstieg, was darauf hindeutete, dass der kinetische Austausch von einem relativ schnellen Diffusionsprozess zytoplasmatisch gelösten Vinculins überlagert wurde. Demnach würden sich die gemessenen Erholungskurven mit einem gekoppelten Gleichungssystem aus dem in Abschnitt 2.1.1 erläuterten Modell zur Austauschkinetik (Gleichung 2.2) und folgendem Diffusionsmodell beschreiben lassen:

$$\partial c_c(\vec{x}, t) / \partial t = D \Delta c_c(\vec{x}, t) \quad (3.1)$$

D steht für die Diffusionskonstante, Δ für den Laplace Operator und c_c für die Konzentration von zytoplasmatisch gelöstem fluoreszierendem Vinculin. Im Gegensatz zur Austauschkinetik ist die diffusionsgetriebene Fluoreszenzerholung direkt von der Größe des Bleichfeldes abhängig [48]. Um zu überprüfen, ob der schnelle Anstieg der Fluoreszenz unmittelbar nach dem Ausbleichen durch Diffusion hervorgerufen wird, wurden

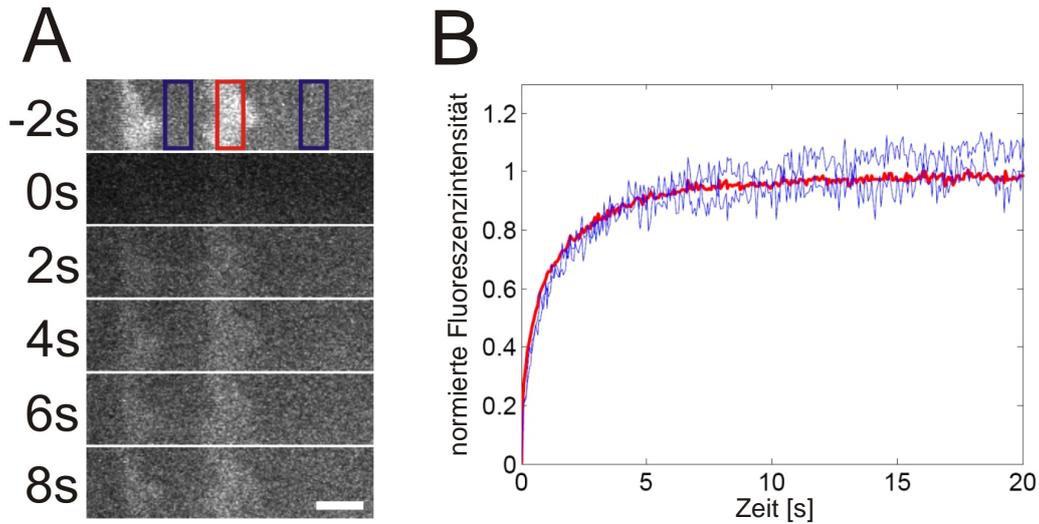


Abbildung 3.19: Schnelle Fluoreszenzerholung von GFP-Vinculin durch Diffusion. Ein balkenförmiger Bereich einer GFP-Vinculin exprimierenden Zelle wurde bei 0 s ausgebleicht (Vgl. Abb. 2.5). A: Zwei zytoplasmatische Bereiche (blau) und ein Adhäsionsbereich (rot) mit identischer Größe wurden über die Zeit analysiert. Balken: $2 \mu\text{m}$. B: Mittlere Intensitäten der drei in A dargestellten Bereiche. Die Intensitätsverläufe wurden auf den Wert bei 16 s normiert.

daher viele Bleichexperimente mit systematisch variiertem Bleichfeldgröße durchgeführt. Dabei wurden rechteckige Bleichfelder mit einer Bleichfeldbreite a zwischen $0,3$ und $4 \mu\text{m}$ verwendet, deren Länge mit $36,5 \mu\text{m}$ näherungsweise als unendlich angenommen wurde (siehe Abb. 2.5). So war es möglich, den Diffusionsprozess in einer Dimension zu beschreiben, was dem Intensitätsprofil des Bleichfeldes über die Breite a entsprach. Dieses Profil wurde von Rudolf Merkel mit Hilfe der Green-Funktion der Diffusionsgleichung [45] theoretisch berechnet und über a integriert, woraus sich folgende Lösung für die normierte Fluoreszenzerholung ergab :

$$I(z) = 1 + \frac{2\sqrt{z}}{\sqrt{\pi}} \cdot \left(1 - e^{-\frac{1}{4z}}\right) - \operatorname{erf}\left(\frac{1}{2z}\right) \quad (3.2)$$

mit der dimensionslosen Variable $z = \frac{Dt}{a^2}$ und der Fehlerfunktion erf [4]. Aus Gleichung 3.2 ergibt sich folgende Abhängigkeit zwischen Halbwertszeit $t_{1/2}$ und der Bleichfeldbreite a :

$$t_{1/2} \approx 0,231 \frac{a^2}{D} \quad (3.3)$$

In Abbildung 3.19 ist die schnelle Fluoreszenzerholung in zwei zytoplasmatischen Bereichen (blau) und einem Fokaladhäsionsbereich (rot) dargestellt. Um die Kurven besser vergleichen zu können, wurden sie auf den Wert bei 16 s nach Bleichen normiert, was den erhöhten Rauschanteil der beiden zytoplasmatischen Kurven erklärt: Da die zytoplasmatischen Bereiche im Mittel dunkler sind, tritt hier das Rauschen des Photomultipliers deutlicher hervor. Dennoch ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzerholung über der Fokaladhäsion in diesen ersten 16 s nach Bleichen analog zu

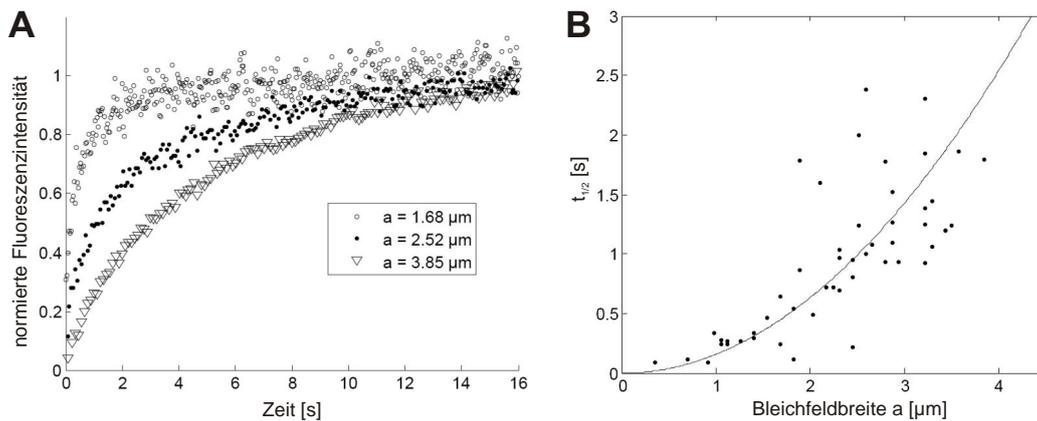


Abbildung 3.20: Abhängigkeit der schnellen Fluoreszenzerholung von der Bleichfeldgröße. A: Typische Fluoreszenzerholungskurven bei verschiedenen Bleichfeldbreiten a . Die Fluoreszenzerholung verlangsamte sich mit steigender Bleichfeldbreite. Gleichzeitig ist ein verringerter Rauschanteil in Kurven mit größerer Bleichfeldbreite zu erkennen, da der analysierte Bereich hier größer ist. Die analysierten Bereiche lagen alle über Fokaladhäsionen (vgl. blauer Rahmen in Abb. 3.19 A und Abb. 2.5). Die Intensitätsverläufe wurden auf den Wert bei 16 s normiert. B: Das Streudiagramm bestätigt den Zusammenhang zwischen der Halbwertszeit $t_{1/2}$ und der Bleichfeldbreite a ($n = 52$). Die durchgezogene Linie beschreibt Gleichung 3.8.1 und illustriert die quadratische Abhängigkeit von Halbwertszeit und Bleichfeldbreite.

den zytoplasmatischen Bereichen verläuft. Geht man davon aus, dass in den zytoplasmatischen Bereichen Vinculin ausschließlich im gelösten Zustand vorliegt, spricht dieses Ergebnis dafür, dass die schnelle Fluoreszenzerholung über der Fokaladhäsion ebenfalls durch Diffusion zustandekommt.

Die Ergebnisse in Abbildung 3.20, die die Abhängigkeit der schnellen Fluoreszenzerholung von der Bleichfeldbreite zeigen, bestätigen diese Vermutung. In diesen Experimenten wurden nur Fokaladhäsionsbereiche analysiert. Anhand der drei beispielhaft ausgewählten Kurven in Abbildung 3.20 A ist zu erkennen, dass sich die Fluoreszenzerholung mit steigender Bleichfeldbreite verzögert. Dies spricht für einen diffusionsgetriebenen Prozess, da kinetischer Austausch unabhängig von der Bleichfeldbreite ist. Im Streudiagramm in Abbildung 3.20 B ist die Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 52 solcher Fluoreszenzerholungskurven in Abhängigkeit der jeweiligen Bleichfeldbreite a aufgetragen. Anhand dieser Daten konnte über Gleichung 3.3 eine mittlere Diffusionskonstante von $1,9 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Standardfehler: $0,15 \mu\text{m}^2/\text{s}$) berechnet werden. Die durchgezogene Linie beschreibt diese Gleichung mit der berechneten Diffusionskonstante und illustriert die quadratische Abhängigkeit von Halbwertszeit und Bleichfeldbreite in den ersten Sekunden nach dem Bleichzeitpunkt.

Zusammengenommen zeigen diese Untersuchungen, dass die schnelle Fluoreszenzerholung über den Fokaladhäsionen bei FRAP-Experimenten mit dem Laser-Scanning-Mikroskop zu einem überwiegenden Teil auf Diffusion zytoplasmatisch gelösten GFP-

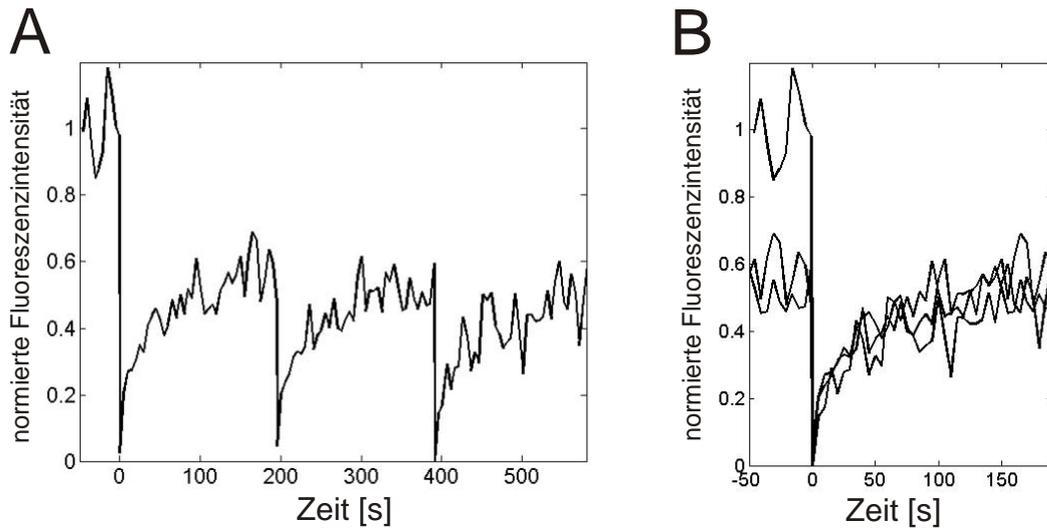


Abbildung 3.21: Mehrmaliges Ausbleichen einer Fokaladhäsion zur Kontrolle der Schädigung durch den Bleichlaser. Eine stabile Fokaladhäsion einer GFP-Vinculin exprimierenden sessilen Zelle wurde drei Mal hintereinander ausgebleicht. A: Fluoreszenzerholungskurve des Bleichexperiments. B: Daten aus A, wobei alle Bleichzeitpunkte auf 0 s gesetzt wurden, um die einzelnen Fluoreszenzerholungsverläufe besser vergleichen zu können. Um das bildbegungsbedingte Photobleichen zu minimieren, wurde die das Zeitintervall der einzelnen Bilder auf 5 s gesetzt. Ein Offset I_{off} wurde bei diesen Experimenten nicht berechnet, da aufgrund des erhöhten Zeitintervalls kein Kurvenknick zum Zeitpunkt t_k detektiert werden konnte (siehe Abschnitt 3.5.1). Dennoch wurde die Kurve in Bezug auf bildgebungsbedingtes Photobleichen und zytoplasmatischen Hintergrund korrigiert.

Vinculins zurückzuführen ist.

3.8.2 Überprüfung der Schädigung von Fokaladhäsionsproteinen durch den Bleichlaser

Um auszuschließen, dass die unvollständige Fluoreszenzerholung bei den in Abschnitt 3.5 beschriebenen FRAP-Experimenten nicht aufgrund der irreversiblen Schädigung der fluoreszierenden Proteine durch den Bleichlaser zustandekommt, wurde folgendes Kontrollexperiment durchgeführt: Eine stabile Fokaladhäsion einer sessilen, GFP-Vinculin exprimierenden Zelle wurde drei Mal hintereinander mit einem zeitlichen Abstand von jeweils 196 s ausgebleicht, sodass die Fluoreszenzerholung wiederholt gemessen werden konnte (siehe Abb. 3.21). Da die Fluoreszenz nach jedem Ausbleichen auf einen vergleichbaren Sättigungswert von ca. 0,5 bis 0,6 anstieg, ist davon auszugehen, dass die irreversible Schädigung der fluoreszierenden Proteine für die in Abschnitt 3.5 beschriebenen Experimente vernachlässigbar ist.

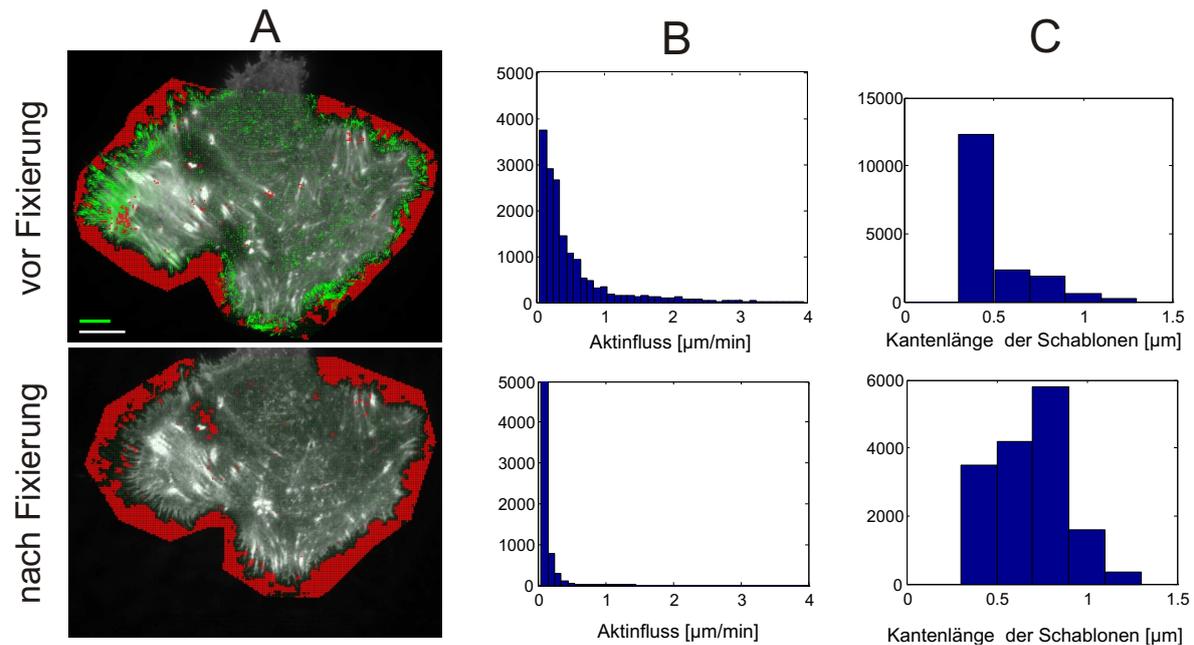


Abbildung 3.22: Aktinfluss einer Zelle im lebendigen Zustand und kurz nach ihrer Fixierung. A: GFP-Aktin in TIRF. Die grünen Pfeile zeigen die Geschwindigkeit und Richtung des mittleren Aktinflusses über 80 s an. Die roten Punkte markieren die Felder, in denen kein Fluss detektiert werden konnte. Zur Verkürzung der Rechenzeit wurde die Berechnungen nur in einem manuell selektierten Bereich durchgeführt. Zur Erläuterung der Bildanalyse siehe Abschnitt 2.6.7. Geschwindigkeitsskala (grün): $20 \mu\text{m}/\text{min}$, Längenskala: $10 \mu\text{m}$ (weiß). B: Verteilung der gemessenen Aktinfluss-Geschwindigkeiten. C: Verteilung der Schablonengrößen. Die Größe der analysierten Bildbereiche (Schablonen) wurden von dem verwendeten Algorithmus anhand der Signifikanz der detektierten Kreuzkorrelation automatisch angepaßt.

3.8.3 Kontrollexperiment zur Messung des Aktinflusses mittels Kreuzkorrelation

Um zu überprüfen, ob mit der in Abschnitt 2.6.7 beschriebenen Methode die Bewegung von Aktin robust quantifiziert werden konnte, wurde folgendes Experiment durchgeführt:

Bei einer GFP-Aktin transfizierten Zelle wurde der der Aktinfluss mittels TIRF-Mikroskopie über 84 s aufgenommen. Anschließend wurde die Zelle mit Formaldehyd fixiert. Die Fixierung führt zum Tod der Zelle, wobei ihre Morphologie jedoch erhalten bleibt. Durch die kreuzvernetzende Wirkung des Formaldehyds werden alle intrazellulären Bestandteile, und somit auch die Aktinfilamente, in ihrer Bewegung „eingefroren“. Nach der Fixierung wurde nochmals eine Zeitreihenaufnahme des selben Bildausschnittes angefertigt. Im Gegensatz zur ersten Aufnahme war hier durch die bloße Betrachtung des Films im Zeitraffer keine Bewegung mehr zu erkennen. Anschließend wurden beide Zeitreihenaufnahmen mit dem Kreuzkorrelationsalgorithmus analysiert, wobei identische Parameter gewählt wurden. Für die Zelle im lebenden Zustand wurde

eine mittlere Flussgeschwindigkeit von $0,49 \mu\text{m}/\text{min}$ ($\sigma = 0,83 \mu\text{m}/\text{min}$) gemessen. Die Flussgeschwindigkeit der fixierten Zelle lag dagegen bei $0,05 \mu\text{m}/\text{min}$ ($\sigma = 0,09 \mu\text{m}/\text{min}$) und somit nahe 0. Daraus konnte geschlossen werden, dass der Algorithmus die Bewegung von Aktinfilamenten detektieren konnte. Die Größe der einzelnen Bildbereiche (Schablonen), in denen der Akinfluss gemessen wurde, wurde je nach Signifikanz der Kreuzkorrelation dynamisch angepaßt. In Abbildung 3.22 ist die Größenverteilung der Schablonen für beide Messungen dargestellt. Sie sind näherungsweise exponentiell verteilt und liegen zwischen $0,45$ und $1,29 \mu\text{m}$ Kantenlänge. Die Grenzen der Schablonengrößen sind durch Parameter festgelegt. Es fällt auf, dass die Schablonen bei der fixierten Zelle im Mittel größer sind. Die Signifikanz der einzelnen Kreuzkorrelationen scheint hier also insgesamt niedriger zu sein (siehe Abschnitt 2.6.7). Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Aufnahme der fixierten Zelle aufgrund des fortgeschrittenen Photobleichens dunkler war als die erste Aufnahme.

Kapitel 4

Diskussion und Ausblick

Durch den gezielten Auf- und Abbau von Adhäsionen sind tierische Zellen in der Lage, ihre Verbindungen zu benachbarten Zellen und zur ECM den jeweiligen Gegebenheiten anzupassen. Innerhalb des Gewebeverbandes definiert die Organisation dieser Verbindungen der Einzelzellen die Struktur und somit auch die Funktion des Gewebes. In dieser Arbeit wurde der Mechanismus des Auf- und Abbaus von Fokaladhäsionen bei migrierenden Keratinozyten untersucht. Diese Zellen eignen sich dazu in hervorragender Weise, weil im Verlauf des Migrationsprozesses fortwährend neue Fokaladhäsionen gebildet und alte abgebaut werden. Für eine effektive Vorwärtsbewegung der Zelle muß dieser Auf- und Abbau zudem koordiniert erfolgen: Neue Fokaladhäsionen müssen vorne gebildet werden, während Fokaladhäsionen am hinteren Ende der Zelle aufgelöst werden müssen.

Auf Grundlage der zuvor besprochenen Ergebnisse werden im Folgenden zwei Modelle zur Regulation der Fokaladhäsionsdynamik, sowie deren Auswirkung auf die Polarität der Zelle vorgestellt. Das erste Modell bietet eine Erklärung für die regulierte Bildung, Stabilisierung und Auflösung von Fokaladhäsionen während ihres Reifungsprozesses und ist sehr nah an den Ergebnissen dieser Arbeit orientiert. Das zweite Modell ist wesentlich spekulativer und beschreibt einen Mechanismus zur adhäsionsabhängigen Polarisierung der Zelle. Es beruht auf den in den Abschnitten 3.1 und 3.7 beschriebenen Experimenten, sowie auf Studien zur mathematischen Modellierung von Adhäsions- und Zytoskelettdynamik, die außerhalb dieser Arbeit durchgeführt wurden [6, 53]. Es ist vor allem als Arbeitshypothese für mögliche Folgeexperimente zu verstehen.

4.1 Modell zur regulierten Stabilisierung von Fokaladhäsionen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Austausch von Vinculin in jungen Fokaladhäsionen deutlich höher ist als in gereiften Fokaladhäsionen (siehe Abschnitt 3.5.2). Dies bedeutet, dass Vinculin im Verlauf des Reifungsprozesses im Adhäsionskomplex

stabilisiert wird. Kurz vor Auflösung kommt es wiederum zu einer Destabilisierung durch Erhöhung des Vinculinaustauschs (siehe Abschnitt 3.5.4). Ferner konnte gezeigt werden, dass Vinculin, wenn es an einem bestimmten Tyrosinrest (TYR1065) nicht phosphoryliert ist, stabiler in den Adhäsionskomplex eingebaut wird (siehe Abschnitt 3.5.3). Der Befund, dass vor allem junge und kurz vor der Auflösung stehende Fokaladhäsionen einen besonders hohen Vinculinaustausch aufweisen, kann somit über ihren großen Anteil an phosphoryliertem Vinculin erklärt werden (siehe Abschnitt 3.3). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Proteinkinase c-Src für die Phosphorylierung von Vinculin am besagten Tyrosinrest verantwortlich ist, welche ihrerseits von den GTPasen Rho und Rac reguliert wird [15]. Somit kann der Einbau von Vinculin in den Fokaladhäsionskomplex wahrscheinlich über intrazelluläre Signalkaskaden gezielt moduliert werden.

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, wie sich diese Modulation in der Fokaladhäsion auswirkt bzw. welche Funktion Vinculin dort überhaupt ausübt. Ein besonderes Merkmal von Vinculin ist seine hohe Anzahl an Bindungspartnern im Fokaladhäsionskomplex bzw. zum angrenzenden Aktin-Zytoskelett. Als Beispiele seien hier Talin, Paxillin, VASP, Vinexin, Arp2/3, α -Actinin und Aktin genannt (siehe Abschnitt 1.7). Dies spricht dafür, dass Vinculin im Adhäsionskomplex eine kreuzvernetzende und somit stabilisierende Funktion ausübt. Über die Dephosphorylierung von Vinculin könnte demnach der Fokaladhäsionskomplex stabilisiert werden, womit er in der Lage wäre, hohe Zugkräfte zu übertragen (siehe Abb. 4.1 rechts). Diese These wird durch die Beobachtung gestützt, dass gereifte Fokaladhäsionen höhere Zugkräfte übertragen als junge Fokaladhäsionen (siehe Abschnitt 3.6). Ferner könnte der Adhäsionskomplex über Phosphorylierung gezielt destabilisiert werden. Liegen hohe Zugkräfte an, wie es meist bei gereiften Fokaladhäsionen der Fall ist, würde dies zu einer Auflösung der Adhäsion führen. Liegen an der Fokaladhäsion dagegen geringe Zugkräfte an, könnte die Destabilisierung des Proteinkomplexes dazu führen, dass zusätzliche Proteine eingebaut werden. Die Folge wäre das Wachstum des Proteinkomplexes, wie es bei jungen Fokaladhäsionen beobachtet werden kann (siehe Abb. 4.1 links).

In Abbildung 4.1 ist dieses Modell zur Stabilisierung von Fokaladhäsionen über die Regulation der Austauschdynamik von Vinculin schematisch dargestellt.

Nach diesem Modell wäre die Zelle in der Lage, durch die Steuerung des Vinculinaustauschs ihre Adhäsionsstärke, sowie den Auf- und Abbau von Fokaladhäsionen gezielt zu modulieren. Dephosphorylierung von Vinculin würde zu erhöhter Kraftübertragung führen, während Phosphorylierung eine erhöhte Fokaladhäsionsdynamik zur Folge hätte. Passend dazu zeigen Zellen mit inhibierter Vinculinphosphorylierung im Mittel eine längere Lebensdauer und eine veränderte Abbaurate ihrer Fokaladhäsionen (siehe Abschnitt 3.4). Entgegen der Aussage des Modells bleibt die Aufbaurate der Fokaladhäsionen bei Inhibierung der Vinculinphosphorylierung allerdings unverändert. Dieses unerwartete Ergebnis deutet darauf hin, dass Auf- und Abbau von Fokaladhä-

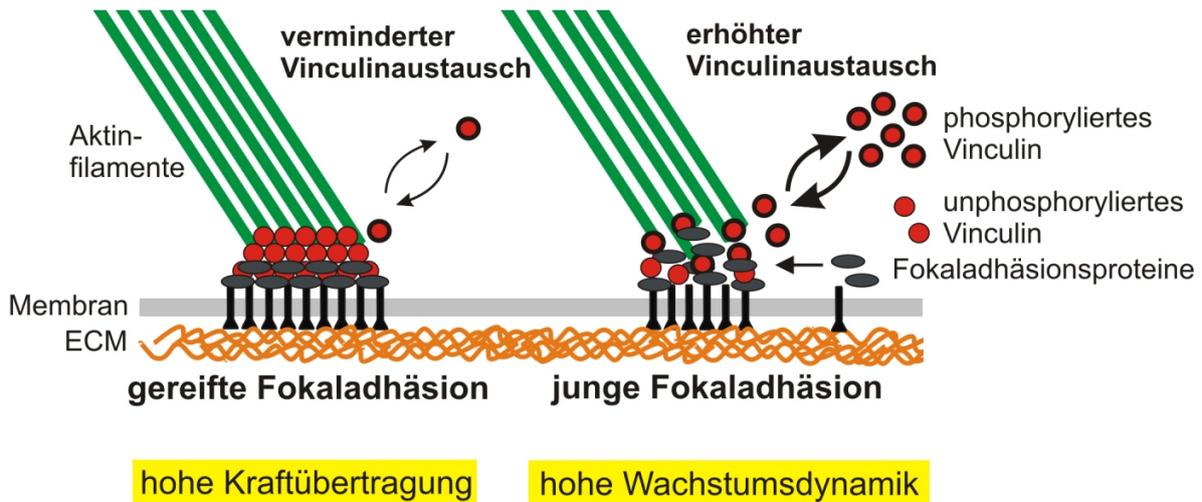


Abbildung 4.1: Modell zur Stabilisierung von Fokaladhäsionen über die Regulation des Vinculinaustauschs. In jungen Fokaladhäsionen ist hauptsächlich phosphoryliertes Vinculin vorhanden, welches durch eine hohe Austauschdynamik gekennzeichnet ist (rechts). Durch diese Dynamik ist der gesamte Adhäsionskomplex relativ instabil, was den Aus- und Einbau von weiteren Proteinen ermöglicht. So kann sich die Fokaladhäsion über Wachstumsprozesse den jeweiligen Bedingungen dynamisch anpassen. Gereifte Fokaladhäsionen sind dagegen sehr stabil und somit in der Lage, starke Zugkräfte zu übertragen. Hier sind die meisten Vinculinmoleküle dephosphoryliert und daher fest im Adhäsionskomplex eingebaut.

sionen über unterschiedliche Regulationsmechanismen, und demnach unabhängig voneinander, gesteuert werden. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, die Rolle der zweiten Phosphorylierungsstelle von Vinculin (Tyr100) näher zu untersuchen.

4.2 Modell zur adhäsionsabhängigen Polarisierung der Zelle

Migrierende Zellen zeichnen sich durch eine polare Struktur mit klar unterscheidbarem Vorder- und Hinterende aus. Vorne befindet eine flache, mit einem lockeren Aktin-Netzwerk ausgefüllte Membranlamelle, während die Zelle hinten mit einer senkrecht zur Migrationsrichtung verlaufenden Stressfaser abschließt (siehe Abschnitt 3.2). Dabei entstehen junge Fokaladhäsionen vor allem vorne am Leitsaum des Lamellipodiums, während die alten Fokaladhäsionen hinten abgebaut werden. Wie das in Abschnitt 3.1 beschriebene Experiment zeigt, führt alleine solch ein asymmetrisches Adhäsionsverhalten zur vollständigen Polarisierung der Zelle. Hier wurde die Asymmetrie von außen vorgegeben, indem die Zellen genau auf die Grenze zwischen einer adhäsiven und einer nichtadhäsiven Oberfläche aufgebracht wurden. Es konnten sich demnach nur auf einer Seite Fokaladhäsionen bilden. Alle beobachteten Zellen, die sich im Adhäsionsprozess befanden, polarisierten sich in Richtung des adhäsiven Substrates durch Bildung eines

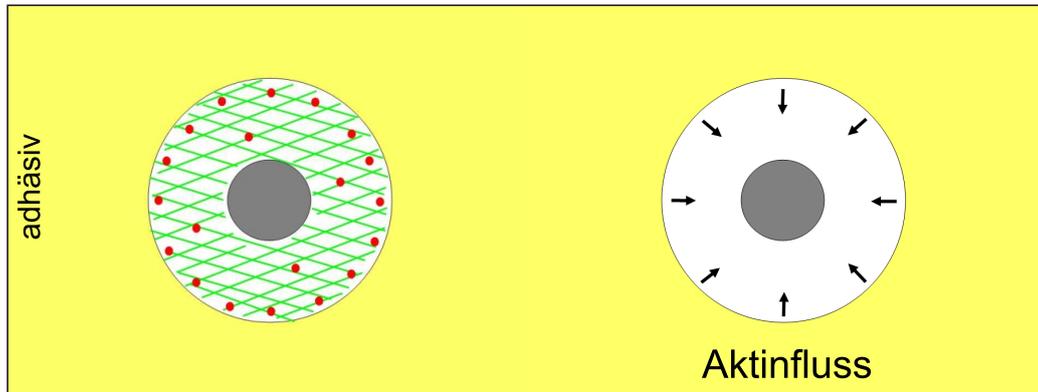
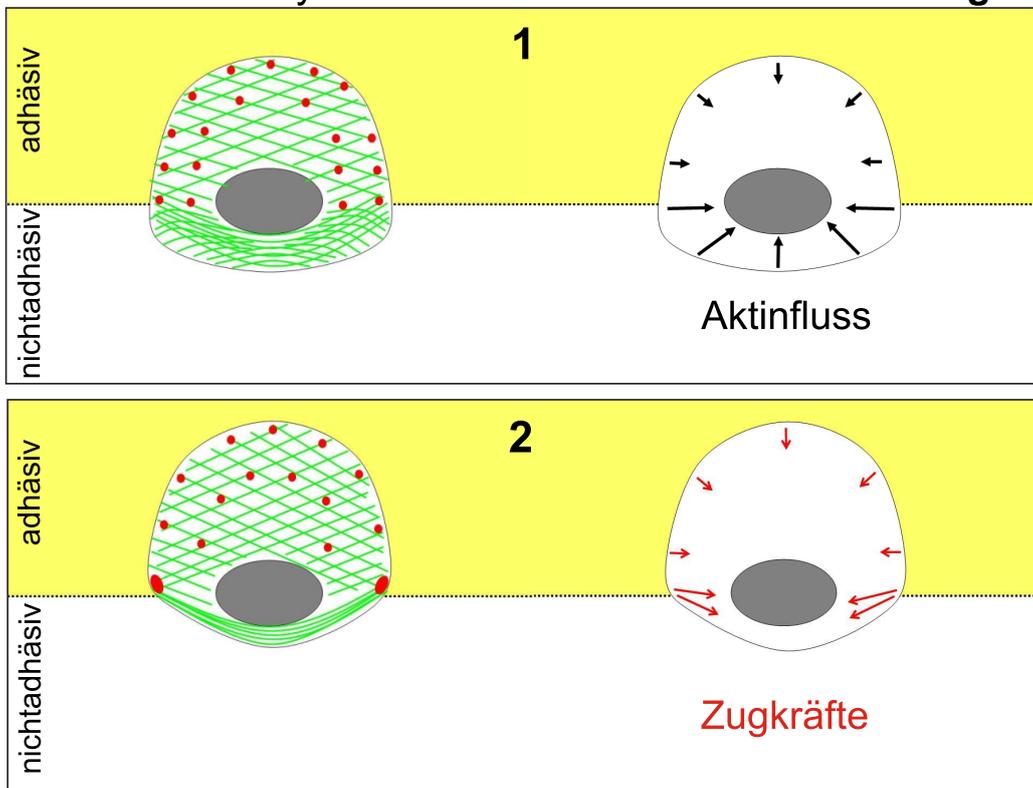
Lamellipodiums und bewegten sich darauf zu. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass die Bewegungsrichtung nicht nur von der Adhäsion, sondern auch von der Organisation des kontraktilen Aktin-Myosin-Netzwerks bestimmt sein muss. Daraus folgt, dass nicht nur die Fokaladhäsionen, sondern auch die kontraktilen Strukturen infolge der asymmetrischen Adhäsion so organisiert wurden, dass effektive Lokomotion in Richtung des adhäsiven Substrates ermöglicht wurde.

Bei Fisch-Keratozyten ist bekannt, dass die Kraft, die zur Vorwärtsbewegung der Zelle führt, durch die Kontraktion senkrecht zur Migrationsrichtung verlaufender Stressfasern erzeugt wird. Dies konnte in dieser Arbeit auch für Keratinozyten gezeigt werden. Solche Stressfasern liegen bei migrierenden Keratinozyten und einer Reihe anderer Zelltypen [77] typischerweise hinter dem Zellkern und formen dort das hintere Ende der Zelle (siehe Abb. 3.2 A und B). Wie Vincente-Manzanares et al. zeigen konnten, sind sie für die Lokomotion der Zelle essentiell [77].

Auch wenn es bei den hier beschriebenen Experimenten nicht direkt gezeigt wurde, bildete sich bei den auf asymmetrischem Substrat adhätierenden Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls eine solche Stressfaser, die die gerichtete Lokomotion auf das adhäsive Substrat schließlich ermöglichte.

Wie aber könnte der Mechanismus aussehen, mit dem eine solche Stressfaser gebildet wird? Aktinflussmessungen an Fisch-Keratozyten haben gezeigt, dass polymerisierende Aktinfilamente von der Peripherie durch kontraktile Kräfte ständig nach innen gezogen werden [66, 83]. Überwiegt die Polymerisation, kommt es zur Protrusion des Lamellipodiums, überwiegt dagegen der retrograde Fluss, bildet sich das Lamellipodium zurück. Die in Abschnitt 3.7 beschriebenen Aktinflussmessungen zeigen, dass bei migrierenden Keratinozyten der Aktinfluss dort am stärksten ist, wo Fokaladhäsionen abgebaut werden (siehe Abb. 3.16 B und C). Dies erscheint logisch, da durch die fehlende Substratkopplung den kontraktilen Kräften keine Reibung entgegengesetzt wird und die Aktinfilamente so mit erhöhter Geschwindigkeit nach innen gezogen werden. So spiegelt sich die asymmetrische Adhäsion der migrierenden Zelle auch in einem asymmetrischen Aktinfluss wider, mit geringem retrograden Fluss vorne und hohem anterogradem Fluss hinten. Durch den hohen anterograden Fluss kommt es hinter dem Zellkern zu einer Verdichtung des Aktins, wodurch schließlich die Stressfaser gebildet wird (siehe Abb. 4.2). Dies würde unter anderem erklären, warum in diesem Bereich solch eine scharfe Grenze erkennbar ist, an der der Fluss abrupt zu erliegen kommt (siehe Abb. 3.16 B und C). Geht man davon aus, dass die Stärke der Aktinpolymerisation zu allen Seiten der Zelle mehr oder weniger gleich verteilt ist, erklärt sich die Bildung des Lamellipodiums im Bereich hoher Substratadhäsion folgendermaßen: Hier führt die hohe Substratreibung zu verlangsamtem Aktinfluss. Aus diesem Grund überwiegt dort das polymerisationsgetriebene Wachstum der Aktinfilamente, wodurch der Leitsaum nach vorne geschoben wird. Bei niedriger Adhäsion ist dagegen der Aktinfluss aufgrund verminderter Substratreibung so stark, dass das Wachstum der Aktinfilamente vollständig durch ihre

Adhäsion auf symmetrischem Substrat

Adhäsion auf asymmetrischem Substrat: **Polarisierung**

- Fokaladhäsion
- Aktinfilament

Abbildung 4.2: Modell zur Zellpolarisierung. Ist das Substrat symmetrisch, bilden sich Fokaladhäsionen gleichmäßig verteilt um den Zellkern. Die Zelle behält ihre symmetrische Form, da der Aktinfluss nach allen Seiten gleich ist (Bild oben). Befindet sich die Zelle auf der Grenze zwischen adhäsivem und nichtadhäsivem Substrat, bilden sich nur auf einer Seite Fokaladhäsionen (Bild unten; 1 und 2). Der Aktinfluss ist auf der nichtadhäsiven Seite stärker, weshalb dort das Aktin-Netzwerk komprimiert wird (1). Dies führt zur Ausbildung einer Stressfaser, welche starke Zugkräfte erzeugt (2).

Bewegung in Richtung Zellkern kompensiert wird.

4.2.1 Vorschläge für zukünftige Experimente zur Verifizierung des Modells

Um dieses spekulative Modell zu überprüfen, bietet es sich an, die in Abschnitt 3.1 vorgestellten Experimente (Zellpolarisierung auf asymmetrischem Substrat) weiterzuführen und mit Immunfluoreszenzfärbungen, sowie Kraft- und Aktinflussmessungen zu kombinieren. Im einzelnen schlage ich dazu folgende Experimente vor:

1. Immunfluoreszenzfärbungen von fixierten Zellen auf asymmetrischem Substrat gegen Aktin und Myosin. Hypothese: Stressfasern liegen bevorzugt hinter dem Zellkern und verlaufen entlang der Substratgrenze.
2. Gleichzeitige Analyse des Aktin- und Myosinflusses bei adhätierenden Zellen auf asymmetrischem Substrat. Hypothese: Der Fluss von Aktin und Myosin überwiegt auf der nichtadhäsiven Seite. Entlang der Substratgrenze bildet sich eine Stressfaser.
3. Kraftmessung bei adhätierenden Zellen auf flexiblem, asymmetrischem Substrat. Hypothese: Im Laufe der Polarisierung baut die Zelle entlang der Substratgrenze starke nach innen gerichtete Zugkräfte auf (siehe Abb. 4.2, Bild unten rechts). Kurz nach Ausbildung dieser Kräfte schiebt sich der Zellkörper nach vorne.

4.2.2 Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit Ergebnissen aus mathematischen Modellierungen

Die Ergebnisse aus den Abschnitten 3.1 und 3.7 dieser Arbeit zeigen deutliche Parallelen zu Studien mit dem so genannten Zwei-Phasen Flussmodell, welches unter anderem in meiner Diplomarbeit untersucht wurde [53]. Dieses Modell geht ursprünglich auf eine Arbeit von Alt und Dembo zurück und beschreibt das Aktin-Myosin-Netzwerk der Zelle als kontraktiles und polymerisierendes Gel [7]. Kontrahiert das Netzwerk, führt dies zu einem gerichteten Fluss der Filamente. Erhöhte Substratkopplung, welche durch die dynamische Bildung von Adhäsionsbereichen modelliert wird, führt lokal zu einer Verminderung des Flusses und zu einer Übertragung der kontraktilen Kräfte auf den Untergund. Die Bildung der Adhäsionsbereiche ist dabei abhängig von der Dichte des Substrates und des Aktin-Myosin-Netzwerks. Abbildung 4.3 zeigt das Ergebnis einer numerischen Simulation des Modells für den zweidimensionalen Fall. Es ist ein polarisiertes, nach rechts migrierendes Zellfragment mit Lamellipodium zu erkennen. Im linken Bild ist die Filamentdichte des Netzwerks in Falschfarben, sowie der Fluss des Netzwerks mit Pfeilen dargestellt. Die Filamente polymerisieren hauptsächlich in der

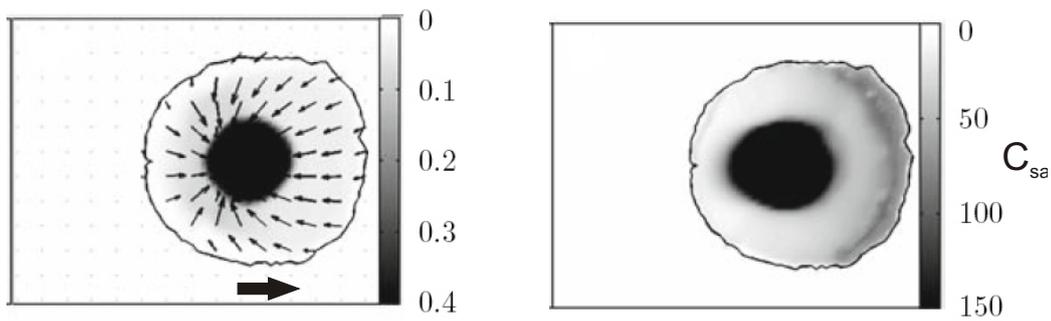


Abbildung 4.3: Simulation des Aktin-Myosin-Flusses und der Adhäsionsdynamik eines migrierenden Zellfragments. Links: Falschfarbendarstellung des Volumenanteils θ des Aktin-Myosin-Netzwerks. Das Bewegungsprofil des Netzwerks ist mit Pfeilen dargestellt. Rechts: Falschfarbendarstellung der Dichte aktin- und substratgebundener Integrine C_{sa} [μm^{-2}]. Die Breite der gezeigten Region beträgt $22 \mu\text{m}$. Eine Skalierung der Pfeile ist für die Originalabbildung nicht angegeben. Der große Pfeil zeigt die Migrationsrichtung an. Verändert nach Kuusela und Alt 2009. Erläuterungen im Text.

Zellperipherie (nicht dargestellt), werden durch Kontraktion in Richtung Zentrum gezogen und sammeln sich dort an. Infolgedessen ist im Zentrum die Dichte des Netzwerks maximal [44, 6]. Dies ist bei realen Zellen nicht der Fall, da der Zellkern als Barriere im Weg steht. Allerdings ist das Bewegungsmuster der Filamente durchaus mit den Aktinfluss von migrierenden Zellen zu vergleichen (siehe Abb. 3.16). Sowohl im Modell, als auch im realen System, ist niedriger retrograder Aktinfluss vorne im Bereich des Lamellipodiums, und hoher anterograder Aktinfluss im hinteren Bereich der Zelle zu sehen. Im rechten Bild ist die Adhäsionsstärke in Falschfarben illustriert. Es ist eine asymmetrische Verteilung der Adhäsionsbereiche zu erkennen. Neue Fokaladhäsionen werden bevorzugt in Migrationsrichtung direkt hinter dem Leitsaum ausgebildet. Im Zentrum ist die Adhäsion am stärksten. Hier liegt eine hohe Aktin-Myosin-Dichte vor, die die Bildung von Adhäsionsbereichen begünstigt. Dieser zentrale Adhäsionsbereich ist zeitlich betrachtet relativ stabil und kann daher als gereifte Fokaladhäsion interpretiert werden.

Aufgrund der guten Übereinstimmungen von Modell und realem System schlage ich vor, analog zu den oben empfohlenen Experimenten Polarisierungsstudien am Zwei-Phasen-Flussmodell durchzuführen, wobei ebenfalls eine Asymmetrie in die Verteilung der Substratdichte eingeführt werden sollte. Ebenfalls ist zu überlegen, ob ein „Zellkern“ als passive Barriere für das kontraktile Netzwerk in das Modell eingebracht werden sollte, um Studien am realen System und am theoretischen Modell besser vergleichen zu können.

Literaturverzeichnis

- [1] A. HUTTENLOCHER, A., S.P. PALECEK, Q. LU, W. ZHANG, R.L. MELLGREN, D.A. LAUFFENBURGER, M.H. GINSBERG und A.F. HORWITZ: *Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain*. The Journal of Biological Chemistry, 272:32719–32722, 1997.
- [2] ABERCROMBIE, M. und G. A. DUNN: *Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy*. Exp. Cell Res., 92:57–62, 1975.
- [3] ABERCROMBIE, M., J. E. HEAYSMAN und S. M. PEGRUM: *The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella*. Exp. Cell Res., 67:359–367, 1971.
- [4] ABRAMOWITZ, M. und I. STEGUN: *Handbook of Mathematical Functions*. Dover Publ Inc, 1965.
- [5] ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF und J.D. ROBERTS, K. AND WATSON: *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, 2004.
- [6] ALT, W., M. BOCK und C. MÖHL: *Coupling of cytoplasm and adhesion dynamics determines cell polarization and locomotion*. Unveröffentlichte Arbeit. Geplantes Erscheinungsdatum: Oktober 2009.
- [7] ALT, W. und M. DEMBO: *Cytoplasm dynamics and cell motion: two-phase flow models*. Math Biosci, 156:207–228, 1999.
- [8] AXELROD, D.: *Total internal reflection fluorescence microscopy*. Methods Cell Biol., 30:245–270, 1989.
- [9] AXELROD, D., P. RAVDIN, D. E. KOPPEL, J. SCHLESSINGER, W. W. WEBB, E. L. ELSON und T. R. PODLESKI: *Lateral motion of fluorescently labeled acetylcholine receptors in membranes of developing muscle fibers*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73:4594–4598, 1976.
- [10] BARRANDON, Y. und H. GREEN: *Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor*. Cell, 50:1131–1137, 1987.

- [11] BENINGO, K. A., M. DEMBO, I. KAVERINA, J. V. SMALL und Y. L. WANG: *Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts*. J. Cell Biol., 153:881–888, 2001.
- [12] BERSHADSKY, A. D., N. Q. BALABAN und B. GEIGER: *Adhesion-dependent cell mechanosensitivity*. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 19:677–695, 2003.
- [13] BÉLANGER, M. C. und Y. MAROIS: *Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and in vivo studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: a review*. J. Biomed. Mater. Res., 58:467–477, 2001.
- [14] BRINDLE, N. P., M. R. HOLT, J. E. DAVIES, C. J. PRICE und D. R. CRITCHLEY: *The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin*. Biochem. J., 318:753–757, 1996.
- [15] BURRIDGE, K. und K. WENNERBERG: *Rho and Rac take center stage*. Cell, 116:167–179, 2004.
- [16] CESA, C. M., N. KIRCHGESSNER, D. MAYER, U. S. SCHWARZ, B. HOFFMANN und R. MERKEL: *Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns*. Rev Sci Instrum, 78:034301, 2007.
- [17] CHEN, H., D. M. COHEN, D. M. CHOUDHURY, N. KIOKA und S. W. CRAIG: *Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells*. J. Cell Biol., 169:459–470, 2005.
- [18] CHEN, P., K. GUPTA und A. WELLS: *Cell movement elicited by epidermal growth factor receptor requires kinase and autophosphorylation but is separable from mitogenesis*. J. Cell Biol., 124:547–555, 1994.
- [19] COLL, J. L., A. BEN-ZE'EV, R. M. EZZELL, J. L. RODRÍGUEZ FERNÁNDEZ, H. BARIBAUT, R. G. OSHIMA und E. D. ADAMSON: *Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92:9161–9165, 1995.
- [20] CUVELIER, D., O. ROSSIER, P. BASSEREAU und P. NASSOY: *Micropatterned adherent/repellent"glass surfaces for studying the spreading kinetics of individual red blood cells onto protein-decorated substrates*. Eur. Biophys. J., 32:342–354, 2003.
- [21] DIEZ, G., F. LIST, J. SMITH, W. H. ZIEGLER und W. H. GOLDMANN: *Direct evidence of vinculin tail-lipid membrane interaction in beta-sheet conformation*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 373:69–73, 2008.
- [22] EDIDIN, M., Y. ZAGYANSKY und T. J. LARDNER: *Measurement of membrane protein lateral diffusion in single cells*. Science, 191:466–468, 1976.

- [23] FELSENFELD, D. P., P. L. SCHWARTZBERG, A. VENEGAS, R. TSE und M. P. SHEETZ: *Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase Src*. Nat. Cell Biol., 1:200–206, 1999.
- [24] GALBRAITH, C. G., K. M. YAMADA und J. A. GALBRAITH: *Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites*. Science, 315:992–995, 2007.
- [25] GALBRAITH, C. G., K. M. YAMADA und M. P. SHEETZ: *The relationship between force and focal complex development*. J. Cell Biol., 159:695–705, 2002.
- [26] GEIGER, B.: *A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells*. Cell, 18:193–205, 1979.
- [27] GEIGER, B., K. T. TOKUYASU, A. H. DUTTON und S. J. SINGER: *Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:4127–4131, 1980.
- [28] HARRIS, A. K., P. WILD und D. STOPAK: *Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion*. Science, 208:177–179, 1980.
- [29] HAYAKAWA, K., A. HOSOKAWA, K. YABUSAKI und T. OBINATA: *Orientation of Smooth Muscle-Derived A10 Cells in Culture by Cyclic Stretching: Relationship between Stress Fiber Rearrangement and Cell Reorientation*. Zool. Sci., 17:617–624, 2000.
- [30] HEATH, J. P. und G. A. DUNN: *Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study*. J. Cell. Sci., 29:197–212, 1978.
- [31] HINZ, B., V. DUGINA, C. BALLESTREM, B. WEHRLE-HALLER und C. CHAPONNIER: *Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts*. Mol. Biol. Cell, 14:2508–2519, 2003.
- [32] HORWITZ, A., K. DUGGAN, C. BUCK, M. C. BECKERLE und K. BURRIDGE: *Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin—a transmembrane linkage*. Nature, 320:531–533, 1986.
- [33] HÜTTELMAIER, S., O. MAYBORODA, B. HARBECK, T. JARCHAU, B. M. JOCKUSCH und M. RÜDIGER: *The interaction of the cell-contact proteins VASP and vinculin is regulated by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*. Curr. Biol., 8:479–488, 1998.
- [34] HU, K., L. JI, K. T. APPLGATE, G. DANUSER und C. M. WATERMAN-STORER: *Differential transmission of actin motion within focal adhesions*. Science, 315:111–115, 2007.

- [35] JI, L. und G. DANUSER: *Tracking quasi-stationary flow of weak fluorescent signals by adaptive multi-frame correlation*. J Microsc, 220:150–167, 2005.
- [36] JOHNSON, R. P. und S. W. CRAIG: *An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding*. J. Biol. Chem., 269:12611–12619, 1994.
- [37] JOHNSON, R. P. und S. W. CRAIG: *F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains*. Nature, 373:261–264, 1995.
- [38] KAJZAR, A., C. M. CESA, N. KIRCHGESSNER, B. HOFFMANN und R. MERKEL: *Toward physiological conditions for cell analyses: forces of heart muscle cells suspended between elastic micropillars*. Biophys. J., 94:1854–1866, 2008.
- [39] KESEL, A. B., M. M. JUNGE und W. NACHTIGALL: *Einführung in die angewandte Statistik für Biowissenschaftler*. Birkhäuser Verlag, 1999.
- [40] KIOKA, N., S. SAKATA, T. KAWAUCHI, T. AMACHI, S. K. AKIYAMA, K. OKAZAKI, C. YAEN, K. M. YAMADA und S. AOTA: *Vinexin: a novel vinculin-binding protein with multiple SH3 domains enhances actin cytoskeletal organization*. J. Cell Biol., 144:59–69, 1999.
- [41] KOLLMANNSSBERGER, P. und B. FABRY: *High-force magnetic tweezers with force feedback for biological applications*. Rev Sci Instrum, 78:114301, 2007.
- [42] KRAMER, M.: *Evaneszente Wellen in der Mikroskopie*. Photonik, 2:42–44, 2004.
- [43] KÜPPER, K.: *Vinculin-Austauschdynamik in lebenden Zellen*. Diplomarbeit, Universität Bonn (In Vorbereitung), 2009.
- [44] KUUSELA, E. und W. ALT: *Continuum model of cell adhesion and migration*. J Math Biol, 58:135–161, 2009.
- [45] LANDAU, L. D. und L. M. LIFSHITZ: *Course of Theoretical Physics, Vol 6: Fluid Mechanics*. Butterworth Heinemann, 1987.
- [46] LAUFFENBURGER, D. A. und A.F. HORWITZ: *Cell Migration: A physically integrated molecular process*. Cell, 84:359–369, 1996.
- [47] LAZARIDES, E. und K. BURRIDGE: *Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells*. Cell, 6:289–298, 1975.
- [48] LELE, T., P. OH, J. A. NICKERSON und D. E. INGBER: *An improved mathematical approach for determination of molecular kinetics in living cells with FRAP*. Mech Chem Biosyst, 1:181–190, 2004.

- [49] LELE, T. P., C. K. THODETI, J. PENDSE und D. E. INGBER: *Investigating complexity of protein-protein interactions in focal adhesions*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 369:929–934, 2008.
- [50] MERKEL, R., N. KIRCHGESSNER, C. M. CESA und B. HOFFMANN: *Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness*. Biophys. J., 93:3314–3323, 2007.
- [51] MIERKE, C. T., P. KOLLMANNSSBERGER, D. P. ZITTERBART, J. SMITH, B. FABRY und W. H. GOLDMANN: *Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain*. Biophys. J., 94:661–670, 2008.
- [52] MOEHL, C., N. KIRCHGESSNER, C. SCHAEFER, K. KUEPPER, S. BORN, G. DIEZ, W. H. GOLDMANN, R. MERKEL und B. HOFFMANN: *Becoming stable and strong: The interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site locomotion*. Unveröffentlichte Arbeit., 2009.
- [53] MÖHL, C.: *Modellierung von Adhäsions- und Cytoskelett-Dynamik in Lamellipodien migratorischer Zellen*. Diplomarbeit, Universität Bonn, 2005.
- [54] MURPHY, D. B.: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. Wiley John and Sons, 2001.
- [55] OLIVER, T., M. DEMBO und K. JACOBSON: *Separation of propulsive and adhesive traction stresses in locomoting keratocytes*. Journal of Cell Biology, 145:589–604, 1999.
- [56] PANCER, Z., M. KRUSE, I. MÜLLER und W.E.G. MÜLLER: *On the origin of Metazoan adhesion receptors: cloning of integrin alpha subunit from the sponge Geodia cyrodium*. Mol. Biol. Evol., 14:391–398, 197.
- [57] PETERSON, P. und K. BURRIDGE: *Cell Adhesion*. Oxford University Press, 1982.
- [58] POLLARD, T. D. und G. G. BORISY: *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, 112:453–465, 2003.
- [59] RIDLEY, A. J.: *Rho family proteins: coordinating cell responses*. Trends Cell Biol., 11:471–477, 2001.
- [60] RIDLEY, A.J., M.A. SCHWARTZ, K. BURRIDGE, R.A. FIRTEL, M.H. GINSBERG, G. BORISY, J.T. PARSONS und A.R. HORWITZ: *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 302:1704–1709, 2003.
- [61] RIGORT, A.: *Migrationsspuren epidermaler Keratinozyten*. Doktorarbeit, Universität Bonn, 2005.

- [62] RIGORT, A., J. GRÜNEWALD, V. HERZOG und G. KIRFEL: *Release of integrin macroaggregates as a mechanism of rear detachment during keratinocyte migration*. European Journal of Cell Biology, 83:725–733, 2004.
- [63] RIO, A. DEL, R. PEREZ-JIMENEZ, R. LIU, P. ROCA-CUSACHS, J. M. FERNANDEZ und M. P. SHEETZ: *Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding*. Science, 323:638–641, 2009.
- [64] RIVELINE, D., E. ZAMIR, N. Q. BALABAN, U. S. SCHWARZ, T. ISHIZAKI, S. NARUMIYA, Z. KAM, B. GEIGER und A. D. BERSHADSKY: *Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism*. J. Cell Biol., 153:1175–1186, 2001.
- [65] SAUNDERS, R. M., M. R. HOLT, L. JENNINGS, D. H. SUTTON, I. L. BARSUKOV, A. BOBKOV, R. C. LIDDINGTON, E. A. ADAMSON, G. A. DUNN und D. R. CRITCHLEY: *Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover*. Eur. J. Cell Biol., 85:487–500, 2006.
- [66] SCHAUB, S., S. BOHNET, V. M. LAURENT, J. J. MEISTER und A. B. VERKHOVSKY: *Comparative maps of motion and assembly of filamentous actin and myosin II in migrating cells*. Mol. Biol. Cell, 18:3723–3732, 2007.
- [67] SCHÄFER, C., B. BORM, S. BORN, C. MÖHL, E. M. EIBL und B. HOFFMANN: *One step ahead: Role of filopodia in adhesion formation during cell migration of keratinocytes*. Exp. Cell Res., 2008.
- [68] SCHLAEPFER, D. D. und T. HUNTER: *Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?* Trends Cell Biol., 8:151–157, 1998.
- [69] SCHWARZ, U. S., N. Q. BALABAN, D. RIVELINE, A. BERSHADSKY, B. GEIGER und S. A. SAFRAN: *Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization*. Biophys. J., 83:1380–1394, 2002.
- [70] SEDGEWICK, R.: *Algorithmen in C*. Addison-Wesley, 1992.
- [71] SIEWING, R.: *Lehrbuch der Zoologie, Band 2: Systematik*. Gustav Fischer Verlag, 1985.
- [72] SMALL, J. V.: *Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks*. J. Cell Biol., 91:695–705, 1981.

- [73] SMALL, J. V., K. ROTTNER, I. KAVERINA und K. I. ANDERSON: *Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement*. Biochim. Biophys. Acta, 1404:271–281, 1998.
- [74] SVITKINA, T. M., A. B. VERKHOVSKY, K. M. MCQUADE und G. G. BORISY: *Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation*. J. Cell Biol., 139:397–415, 1997.
- [75] VALLOTTON, P., G. DANUSER, S. BOHNET, J. MEISTER und A.B. VERKHOVSKY: *Tracking retrograde flow in keratocytes: news from the front*. Molecular Biology of the Cell, 16:1223–1231, 2005.
- [76] VERKHOVSKY, A.B., T.M. SVITKINA und G.G. BORISY: *Self-polarization and directional motility of cytoplasm*. Current Biology, 9:11–20, 1999.
- [77] VICENTE-MANZANARES, M., M. A. KOACH, L. WHITMORE, M. L. LAMERS und A. F. HORWITZ: *Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells*. J. Cell Biol., 183:543–554, 2008.
- [78] VIRCHOW, R.: *Die Cellularpathologie*. Verlag von August Hirschwald, 1858.
- [79] VOGEL, V. und M. SHEETZ: *Local force and geometry sensing regulate cell functions*. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7:265–275, 2006.
- [80] WICHERT, G. VON, B. HAIMOVICH, G. S. FENG und M. P. SHEETZ: *Force-dependent integrin-cytoskeleton linkage formation requires downregulation of focal complex dynamics by Shp2*. EMBO J., 22:5023–5035, 2003.
- [81] WILSON, H. V.: *On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges*. J. Exp. Zool., 5:245–258, 1907.
- [82] XU, W., H. BARIBAUT und E. D. ADAMSON: *Vinculin knockout results in heart and brain defects during embryonic development*. Development, 125:327–337, 1998.
- [83] YAM, P.T., C.A. WILSON, L. JI, B. HEBERT, E.L. BARNHART, N.A. DYE, P.W. WISEMAN, G. DANUSER und J.A. THERIOT: *Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility*. J. Cell Biol., 178:1207–1221, 2007.
- [84] ZAIDEL-BAR, R., C. BALLESTREM, Z. KAM und B. GEIGER: *Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells*. J. Cell. Sci., 116:4605–4613, 2003.
- [85] ZAIDEL-BAR, R., M. COHEN, L. ADDADI und B. GEIGER: *Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes*. Biochem. Soc. Trans., 32:416–420, 2004.

- [86] ZAIDEL-BAR, R., Z. KAM und B. GEIGER: *Polarized downregulation of the paxillin-p130CAS-Rac1 pathway induced by shear flow.* J. Cell. Sci., 118:3997–4007, 2005.
- [87] ZAIDEL-BAR, R., R. MILO, Z. KAM und B. GEIGER: *A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions.* J. Cell. Sci., 120:137–148, 2007.
- [88] ZAMIR, E. und B. GEIGER: *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions.* J. Cell. Sci., 114:3583–3590, 2001.
- [89] ZAMIR, E. und B. GEIGER: *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions.* J. Cell. Sci., 114:3583–3590, 2001.
- [90] ZHANG, Z., G. IZAGUIRRE, S. Y. LIN, H. Y. LEE, E. SCHAEFER und B. HAIMOVICH: *The phosphorylation of vinculin on tyrosine residues 100 and 1065, mediated by SRC kinases, affects cell spreading.* Mol. Biol. Cell, 15:4234–4247, 2004.

Danksagung

Ich möchte allen Mitarbeitern des Instituts für Bio- und Nanosysteme 4 sehr herzlich danken. Die gute Atmosphäre und die außergewöhnlich gute Organisation des gesamten Laborbetriebs haben erheblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Mein spezieller Dank gilt folgenden Personen:

Professor Rudolf Merkel danke ich für die sehr gute Betreuung und die Möglichkeit, an seinem Institut zu arbeiten. Aufgrund der guten Finanzierung konnte ich mich drei Jahre vollständig auf meine Arbeit konzentrieren.

Professor Ulrich Kubitschek danke ich für die Übernahme des Koreferates, sowie die mehrmalige Möglichkeit, die Fortschritte meiner Arbeit in seinem Seminar zu vorzustellen.

Dr. Bernd Hoffmann danke ich für die außergewöhnlich gute Betreuung meiner Arbeit und den selbstlosen Einsatz, den er jeden Tag für das reibungslose Funktionieren aller Abläufe im gesamten Institut an den Tag legt.

Bei Claudia Schäfer bedanke ich mich für die Durchführung der Experimente zur Kraftanalyse, und für die gute Atmosphäre bei vielen gemeinsamen Stunden auf der Autobahn zwischen Bonn und Jülich.

Ich möchte mich bei Norbert Kirchgessner und Sebastian Houben für die vielen Matlab-Funktionen bedanken, die mir oft das Leben vereinfacht haben. Außerdem bedanke ich mich sehr für die geduldige Beantwortung aller Matlab-Fragen (werktags zwischen 10:30 Uhr und 13:30).

Ebenso möchte ich mich bei Simone Born für alle molekularbiologischen Arbeiten bedanken. Ohne die konstruierten Plasmide wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Gerold Diez danke ich sehr für die Bereitstellung seines phosphorylierungsinhibierten Vinculin-Plasmids.

Nico Hampe danke ich für die Anfertigung der Silizium-Matrizen, sowie seinen sachverständigen Rat bei der Herstellung der Stempel.

Nils Hersch möchte ich für die tatkräftige Hilfe bei allen Angelegenheiten zur Zellkultivierung, sowie für tolle Karnevalspartys danken.

Ebenso danke ich David Kirchenbüchler für seine ständige Hilfsbereitschaft bei allen Dingen, die man sich vorstellen kann.

Ovidiu Gordan danke ich für seine Hilfe bei allen Fragen zur Beschichtung der Stempel, sowie für die gute Nachbarschaft im Büro.

Kevin Küpper danke ich für die gute Zusammenarbeit und für die sehr solide Etablierung der FRAP-Experimente am TIRF-Aufbau.

Wolfgang Rubner danke ich für den Reibungslosen Ablauf im Bestellwesen und für seinen Rat und ständige Hilfsbereitschaft bei organisatorischen Dingen.

Außerdem möchte ich Sabine Dieluweit, Susanne Fenz, Cornelia Monzel, Thorsten Jonas und meinem Vater Bernhard Möhl sehr herzlich für die Durchsicht meines Manuskripts danken.

Ganz besonders möchte ich mich außerdem bei meinen Eltern, meinen Brüdern und meiner Freundin Melanie Dörpelkus für ihre immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken.