

**Zelluläre Grundlagen von Adhäsion und Migration:
Saltatorischer Bewegungsmodus Laminin 5 defizienter
humaner Keratinozyten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

vorgelegt von

Benedikt Hartwig

aus

Ahlen (Westfalen)

Bonn 2006

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

1. Referent: Prof. Dr. Volker Herzog

2. Referent: PD Dr. Gregor Kirfel

Tag der Promotion: 12. Juni 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.unibonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr: 2006

Publikationen:

Tscharntke M, Pofahl R, Chrostek A, Smyth N, Niessen C, Hartwig B, Herzog V, Klein HW, Krieg T, Brakebusch C, Haase I (2006) **Impaired epidermal wound healing in vivo upon inhibition or deletion of Rac1.**

In Revision

Buth, H., Wolters, B., Hartwig, B., Meier-Bornheim, R., Veith, H., Hansen, M., Sommerhoff, C. P., Schaschke, N., Machleidt, W., Fusenig, N. E., Boukamp, P., Brix, K. (2004) **HaCaT keratinocytes secrete lysosomal cysteine proteinases during migration.** *Eur J Cell Biol*, 83, 781-795

Abstracts

Hartwig B, Borm B, Kirfel G, Schneider H, Bruckner-Tudermann L, Krieg T, Herzog V, Arin M (2006) **The role of laminin 5 for keratinocyte polarity and its effect on epithelial cell morphology.** *Exp Derm*, 3 (15), Abstract No 203

Hartwig B, Borm B, Kirfel G, Bruckner-Tudermann L, Krieg T, Herzog V, Arin M (2004) **Altered migratory phenotype in laminin 5 deficient keratinocytes.** *Mol Biol Cell*, 15 (suppl.), Abstract No 2223

Hartwig B, Borm B, Kirfel G, Bruckner-Tudermann L, Krieg T, Herzog V, Arin M (2004) **Migration characteristics of laminin 5 deficient keratinocytes.** *J Invest Dermatol*, 2 (123), Abstract No 13

Hartwig B, Herzog V, Brix K: **Keratinocyte migration: contribution of cysteine proteases to ECM remodelling** *Eur J Cell Biol*, 79 (suppl.), Abstract No 89

Posterbeiträge:

Hartwig B, Borm B, Schneider H, Bruckner Tudermann L, Krieg T, Arin M, Kirfel G, Herzog V: **Laminin 5 deficiency results in an adhesion defect in human keratinocytes thereby inducing a saltatory mode of migration** (3rd DFG-Research Group Symposium "Keratinocytes - Proliferation and Differentiation in the Epidermis", April 2006, Bonn)

Hartwig B, Borm B, Kirfel G, Bruckner-Tudermann L, Krieg T, Herzog V, Arin M: **The role of laminin 5 for keratinocyte polarity and its effect on epithelial cell morphology** (33rd Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), März 2006, Aachen)

Hartwig B, Borm B, Kirfel G, Bruckner-Tudermann L, Krieg T, Herzog V, Arin M: **Altered migratory phenotype in laminin 5 deficient keratinocytes** (44th Annual Meeting ASCB, Dezember 2004, Washington)

Hartwig B, Borm B, Kirfel G, Bruckner-Tudermann L, Krieg T, Herzog V, Arin M: **Migration characteristics of laminin 5 deficient keratinocytes** (34th ESDR Annual Meeting, September 2004, Wien)

Hartwig B, Herzog V, Brix K: **Keratinocyte migration: contribution of cysteine proteases to ECM remodelling** (24th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, März 2000, Karlsruhe)

Vorträge:

Saltatorische Migration Laminin 5 defizienter Keratinozyten (33rd Annual Meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), März 2006, Aachen)

Preise:

Posterpreis anlässlich des 3rd DFG-Research Group Symposium "Keratinocytes - Proliferation and Differentiation in the Epidermis", April 2006, Bonn,

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A. bidest	Zweifach destilliertes Wasser
BSA	Rinder Serum Albumin (B ovine S erum A lbumin)
C	Celsius
Ca	cirka
Ca ₂₊	Kalzium-Ion
CO ₂	Kohlendioxyd
EB	Epidermolysis bullosa
ECM	Extrazelluläre Matrix (ex trac ell ular m atrix)
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetat
g	Erdbeschleunigung (1g= 9,81m/s ²)
HRP	Horse raddish peroxidase
IgG	Immunglobulin G
JEB	Junctionale Epidermolysis Bullosa
kDa	Kilodalton
LSM	Laser Scanning Mikroskop
Min	Minuten
NHK	Normale humane Keratinozyten
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
REM	Rasterelektronenmikroskopie
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
R635X	Laminin 5 defiziente Keratinozyten (Mutationsort und –art in der Laminin β3- Kette)
SACED	Stroboscopic analysis of cell dynamic
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Die Basalmembran der Haut.....	1
1.2 Laminin	4
1.2.1 Struktur der Laminine	4
1.2.2 Funktion der Laminine	6
1.2.3 Synthese und Zusammenlagerung von Lamininen	7
1.2.4 Interaktionspartner von Lamininen	7
1.3 Laminin 5	9
1.4 Störung der Verankerung.....	11
1.5 Migration von Keratinozyten bei der Wundheilung	13
1.6 Zellmigration	14
1.6.1 Protrusion der Lamelle	14
1.6.2 Zell-Matrix Adhäsion.....	14
1.6.3 Ablösen des Hinterendes	16
1.7 Die Rolle von Laminin 5 während der Keratinozytenmigration.....	17
1.8 Ziele der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Geräte	20
2.1.2 Sonstige Materialien	21
2.2 Methoden	23
2.2.1 Medium.....	23
2.2.2 Zellkultur	23
2.2.2.1 Normale humane Keratinozyten.....	23
2.2.2.2 Laminin 5 defiziente Zellen	24
2.2.2.3 HaCaT-Zellen.....	25
2.2.2.4 Passagieren und Einfrieren.....	25
2.2.2.5 Beschichtung der Zellkultur-Platten und Beobachtungskammern.....	26
2.2.3 Analysen.....	27
2.2.3.1 SACED Motilitätsassay	27
2.2.3.2 Messung der Translokationsgeschwindigkeit.....	28
2.2.3.3 Ermittlung der Linearität und des Linearitätskoeffizienten.....	29
2.2.3.4 Reflektions-Interferenz Mikroskopie.....	30

2.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz	30
2.2.4.1 Lösungen	30
2.2.4.2 Durchführung	32
2.2.5 Funktionsblockierende Antikörper	32
2.2.6 Rasterelektronenmikroskopie	33
2.2.7 Biochemische Analyse der Matrix Bestandteile von HaCaT-Zellen	34
2.2.7.1 Schonende Ablösung der Zellen.....	34
2.2.7.2 SDS-PAGE	34
2.2.7.3 Western-Blot:	34
2.2.7.4 Immunoblot	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1 R635X Zellen sezernieren kein Laminin 5.....	36
3.2 Die HaCaT-Matrix als natives Substrat	39
3.3 Morphologie Laminin 5 defizienter Zellen während der Migration	39
3.3.1 Einzellzellanalyse	39
3.3.2 Langzeitbeobachtung der migrierenden Zellen	42
3.4 Verändertes Bewegungsmuster der Laminin 5 defizienten Keratinozyten	44
3.4.1 Direktionale Persistenz der Migration	44
3.4.2 Kontinuierliche Messung der Migrationsgeschwindigkeit.....	48
3.5 Zusammenfassung der morphologischen und migratorischen Untersuchung.	50
3.6 Quantitative Analyse der Migration Laminin 5 defizienter Zellen.....	52
3.6.1 Translokationsgeschwindigkeit.....	52
3.6.2 Untersuchung der Lamellendynamik mit Hilfe des SACED Assay.....	53
3.7 Zusammenfassung der quantitativen Analyse der Migration.....	55
3.8 Verringerte Adhäsion bei R635X-Zellen auf Kollagen I und IV.....	56
3.8.1 Reflektions-Interferenz Mikroskopie	57
3.8.2 Vinculin-Markierung.....	60
3.9 Inhibition von Integrin Untereinheiten in R635X-Zellen	63
3.9.1 Inhibition von $\alpha 2$ Integrin auf Kollagen I	63
3.9.2 Induktion des saltatorischen Phänotyps bei R635X-Zellen auf Fibronektin nach Inhibition von $\alpha 5$ Integrin.....	65
3.10 Inhibition von Laminin 5 in NHK	67
3.10.1 Blockierung von Laminin 5 auf Kollagen IV	67
3.10.2 Blockierung von Laminin 5 und $\alpha 5$ Integrin auf Fibronektin	69

3.11 Untersuchung der Migrationsspur	72
3.11.1 Veränderte Migrationsspur von R635X-Zellen.....	72
3.11.2 β 1 Integrin ist in der Migrationsspur von R635X-Zellen vorhanden	73
4. Diskussion	75
4.1 Laminin β 3-defiziente Keratinozyten sezernieren kein Laminin 5	75
4.2 R635X-Zellen migrieren signifikant langsamer als NHK.....	76
4.3 Die geringere Migrationsgeschwindigkeit Laminin 5 defizienter Keratinozyten resultiert aus einer ineffizienten Lamellendynamik.....	77
4.4 R635X-Zellen weisen eine bipolare Morphologie auf Kollagen I und IV auf....	78
4.5 R635X-Zellen migrieren saltatorisch	81
4.6 R635X-Zellen weisen eine geringere Direktionalität der Migration auf Kollagen auf.....	82
4.7 Die Monopolarität von R635X-Zellen auf Fibronektin wurde durch α 5 β 1 Integrin bewirkt.....	83
4.8 R635X-Zellen bilden eine veränderte Migrationsspur	83
4.9 Der saltatorische Migrationsmodus kann durch Blockierung von Laminin 5 induziert werden.....	85
4. 10 Hierarchie der Adhäsionspartner.....	86
5. Zusammenfassung	88
6. Literaturverzeichnis	90
Erklärung	108

1 Einleitung

Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht aus einem komplexen Netzwerk aus Makromolekülen und dient als Strukturgerüst für den Organismus. Es dient in dieser Funktion als Grundlage für Adhäsion und Migration und versorgt assoziierte Zellen mit biologischen Informationen. Die ECM besteht aus verschiedenen Substanzen, die sich je nach Gewebeart in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Die Bestandteile der ECM werden im Wesentlichen von den in ihr eingebetteten Zellen gebildet, dabei bestimmen ECM und Zellen die Beschaffenheit und den Aufbau des Gewebes. Grundsätzlich lassen sich die Bestandteile der ECM in verschiedene Hauptgruppen einteilen. Eine große Gruppe wird von den Kollagenen gebildet, die als Homo- oder Heterotrimere vorkommen und durch die Variation in ihren einzelnen Proteinketten eine große Diversität entfalten (Brown und Timpl., 1995; van der Rest und Garrone, 1991). Häufig liegen sie als faserförmige Strukturen in der ECM vor. Eine weitere große und heterogene Familie bilden Proteoglykane, die aus Glykosaminoglykanen bestehen und kovalent an ein Protein gekoppelt sind. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Perlecan, Agrin, Syndecan und Decorin (Timpl und Brown, 1996). Weitere wichtige Bestandteile der ECM sind Glykoproteine wie z.B. Fibronectin. An der Grenzschicht zwischen der ECM und den Zellen eines Epithels befindet sich eine besondere Struktur, die als Basalmembran bezeichnet wird. Hier befindet sich Kollagen IV, das als ein nicht faserbildendes Kollagen ein flächiges Netz bildet und für Stabilität an der Grenzregion zwischen der ECM und den basalen Zellen sorgt. In der Basalmembran befinden sich auch Glykoproteine der Laminin Familie, die hier eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von basalen Zellen an die ECM erfüllen. Basalmembranen von verschiedenen Geweben sind in ihrem Aufbau ähnlich, in ihrer Zusammensetzung aber den jeweiligen Anforderungen des Gewebes oder Organes angepasst.

1.1 Die Basalmembran der Haut

Die Grenzschicht zwischen den basalen Keratinozyten der Epidermis und der dermalen ECM bildet die Basalmembran. Sie unterteilt sich in die den Keratinozyten zugewandte *Lamina lucida* und der darunter liegenden *Lamina densa*. Hauptankerpunkt in der Basalmembran der Haut sind Hemidesmosomen, die in elektronenmikroskopischen Bildern von Schnitten durch die Haut als

elektronendichte Bereiche zu erkennen sind und in regelmäßigen Abständen in der Basalmembran liegen (Abb. 1.1). Im Bereich der Hemidesmosomen bilden die basalen Keratinozyten eine indirekte Verbindung zwischen den Intermediärfilamenten, speziell Cytokeratin 5 und 14, an die Proteine der Plakin-Familie und dem Komplex der Basalmembran. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Plektin und die epidermale Form des Proteins Bullous Pemphigoid Antigen 1 (BPAG1e), die vermehrt in den hemidesmosomalen Komplexen auftreten (Smith et al., 1996; Ghohestani et al., 2001). Integrine stellen die Verbindung vom intra- zum extrazellulärem Bereich der Zelle her und sind Rezeptoren für Bestandteile der extrazellulären Matrix (Kikkawa et al., 2000). Integrine bilden eine Familie integraler Membranproteine, die jeweils aus einer α - und einer β -Kette bestehen, die nicht kovalent untereinander verbunden sind. Intrazellulär sind sie an das Zytoskelett über Adapterproteine verbunden, extrazellulär über spezielle Domänen an Proteine der extrazellulären Matrix. Bisher sind 18 α - und 8 β Untereinheiten bekannt, die 24 verschiedene Heterodimere bilden können (van der Flier und Sonnenberg, 2001). Durch die Komposition der verschiedenen Isoformen ist bei den Integrinen die Spezifität zu unterschiedlichen Bindungspartnern gegeben. In Hemidesmosomen ist hauptsächlich $\alpha 6 \beta 4$ Integrin vorhanden (Borradori und Sonnenberg, 1999). Die extrazelluläre Domäne dieses Integrins bindet unter anderem an Laminine. Die in der Basalmembran der Haut vorkommenden Laminine sind Laminin 5, 6, und 10 (Ghohestani et al., 2001; Aumailley und Rousselle, 1999), wobei Laminin 5 das vorherrschende Protein ist. Es ist beschrieben, dass Laminin 5 mit Laminin 6 verbunden ist und dadurch verzweigte Komplexe bildet (Champlaud et al., 1996; Cheng et al., 1997). Laminin 6 und 10 binden an Nidogen und indirekt an das Kollagen IV Netzwerk, das unterhalb dieses Bereiches liegt (Aumailley und Rousselle, 1999). Bei in vitro Studien konnte festgestellt werden, dass auch die $\gamma 2$ -Kette von Laminin 5 Nidogen binden kann (Sasaki et al., 2001). Nidogen ist in der Basalmembran ein Verbindungsprotein zu dem Kollagen IV Netzwerk (Hopf et al., 2001; Liddington, 2001). Auch Kollagen VII kann direkt an Laminin 5 binden (Abb. 1.1).

In der Basalmembran der Haut kommen Kollagen IV, VII und XVII vor. Letzteres ist ein transmembranes Molekül, das früher auch als BP180 oder BPAG2 bezeichnet wurde. Auf der zytoplasmatischen Seite ist Kollagen XVII über BPAG1e an die Intermediärfilamente des Zytoskeletts gebunden. Defekte im Gen von Kollagen XVII

können zu der milden Form der junctionalen epidermolysis bullosa führen (McGrath et al., 1995). Daher wird diesem transmembranen Kollagen eine Rolle bei der Verankerung der basalen Keratinozyten an die Basalmembran zugeschrieben. Kollagen IV ist mit dem Laminin 5/6/10 Komplex über Nidogen verbunden (Ghohestanin et al., 2001). Kollagen VII ist vom Matrix-nahen Teil der *Lamina densa* bis zur *Lamina lucida* lokalisiert und bildet halbkreisförmige Trimere mit großen globulären Domänen, die in der *Lamina lucida* liegen. Es gibt Hinweise darauf, dass Kollagen VII direkt an Laminin 5 über die kurzen Arme der $\beta 3$ und $\gamma 2$ -Ketten binden kann (Chen et al., 1999; Chen et al., 1997; Chen et al., 2002).

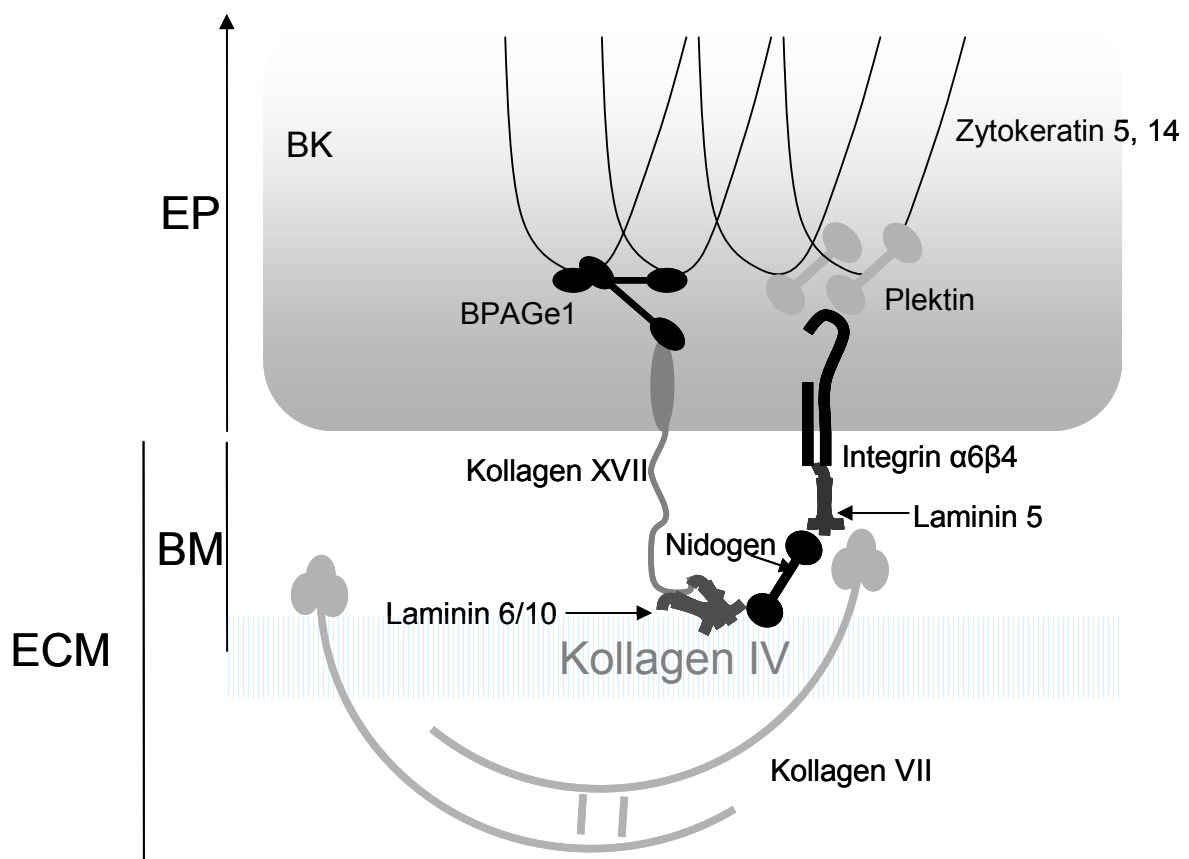


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Basalmembran mit den wichtigsten Proteinen. EP: Epidermis, BM: Basalmembran, ECM: Extrazelluläre Matrix, BK: Basale Keratinozyten. Laminin 5 nimmt hierbei eine zentrale Rolle in der Bindung von Integrinen zu der extrazellulären Matrix ein

1.2 Laminin

1.2.1 Struktur der Laminine

Laminine sind Glykoproteine mit einer molekularen Masse von 400 bis 800 kDa. Sie bestehen aus drei genetisch unterschiedlichen Proteinketten, die als α , β und γ -Kette bezeichnet werden und haben eine charakteristische kreuzförmige Struktur (Burgeson et al., 1994; Beck et al., 1990) (Abb. 1.2). Zuerst wurden sie im Stroma des Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Tumor entdeckt (Timpl et al., 1979). Bis heute sind fünf α , drei β und drei γ Ketten entdeckt worden (Abb. 1.3). Je nach Komposition dieser verschiedenen Isoformen können theoretisch 45 mögliche Heterotrimere entstehen von denen bis jetzt 15 Formen beschrieben wurden (Tabelle 1.1). Die grundlegende Struktur ist bei allen Laminin-Isoformen gleich und wurde zuerst am Laminin 1 Molekül beschrieben, das aus einer 400 kDa großen $\alpha 1$ und zwei je 200 kDa großen $\beta 1$ und $\gamma 1$ Ketten besteht.

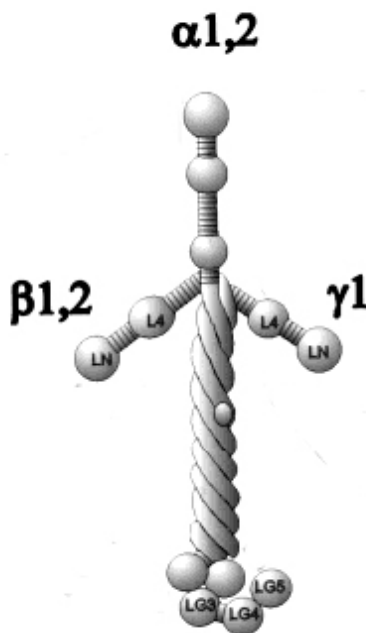


Abbildung 1.2: Schematischer Aufbau von Lamininen. Jedes Heterotrimer besteht aus einer α , β und γ Kette, die eine kreuzförmige Struktur einnehmen. Die N-terminalen Enden befinden sich in den kurzen Armen. Die C-terminalen Enden bilden eine dreifach coiled coil α -Helix. Zusätzlich besitzt die α -Kette fünf globuläre Domänen (LG1-LG5) am C-Terminus. Aus: Colognato et al., 2000

Die kreuzförmige Struktur des Heterotrimers unterteilt sich in kurze Arme mit den N-terminalen Regionen der einzelnen Ketten und dem gemeinsamen langen Arm des Trimers in Form einer dreifach *coiled coil* α -Helix, durch den der Zusammenhalt des Trimers hergestellt wird (Utani et al., 1994; Yurchenco et al., 1997). Die α -Kette besitzt überdies noch fünf globuläre Domänen am Carboxy-Terminus. Grundsätzlich

werden sieben Laminin Domänen unterschieden (Abb.1.3). An den kurzen Armen befinden sich die globulären Domänen IV und VI, die durch die stabförmigen Abschnitte III und V voneinander getrennt sind (Abb. 1.3). Die Domäne VI kommt an allen drei N-terminalen Enden der drei Ketten vor und ist der genetisch am höchsten konservierte Teil der Laminin Ketten. Diese Domäne trägt unter anderem zur Ausbildung von Laminin Netzwerken durch Assemblierung der Heterotrimere bei (Yurchenco et al., 1985, 1992). Die stabförmigen Domänen V und III bestehen aus Sequenzen von EGF-ähnlichen Wiederholungen, wobei das EGF-Motiv mit 6 Cysteinresten um zwei weitere ergänzt ist (Maurer et al., 1996). Domäne IV ist eine globuläre Domäne, die in der α -Kette zweimal auftritt und als IVa und IVb bezeichnet wird. Die Domänen IVa und IVb aus der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ -Kette entsprechen der Domäne IV der γ -Kette. Die Domäne IVb von Laminin $\alpha 3B$, $\alpha 5$ und der β -Ketten besitzt einen anderen Aufbau: In der *coiled coil* Struktur befinden sich die Domäne I und Domäne II, die mit der β und γ Kette über Disulfidbrücken verbunden ist. Am C-Terminus der α -Kette sind fünf globuläre Domänen, die als LG1-5 bezeichnet werden (Abb. 1.3)

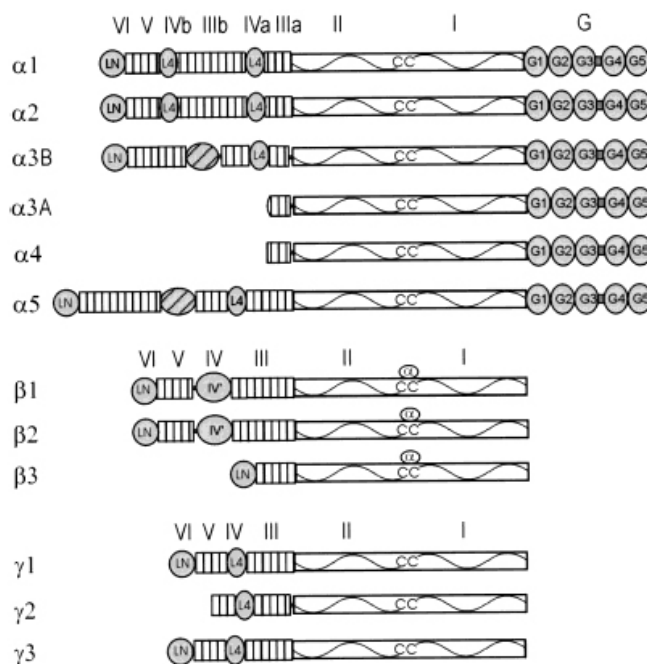


Abbildung 1.3: Motive der einzelnen Laminin Ketten. α -Ketten besitzen am C-Terminus fünf globuläre Domänen (G1-G5). Gemeinsam mit den β und γ -Ketten sind im folgenden Bereich die Domänen I und II, die den dreifach α -helicalen coiled coil Arm bilden. Am N-terminalen Bereich sind die stabförmigen Domänen III und V mit EGF-ähnlichen Wiederholungssequenzen und globuläre Domänen IV und VI. aus: Colognato et al., 2000

Der Grundaufbau der Laminine ist einheitlich, wobei sich die Unterschiede durch die verschiedene Anzahl der beschriebenen Motive ergeben. Zudem gibt es alternative Spleiß-Formen und posttranslationale Modifikationen, die für die Differenzierung der Isoformen sorgen. Zum Beispiel tritt die $\alpha 3$ Kette bei der Maus in zwei verschiedenen Spleißvarianten auf, wobei sich diese beiden Ketten in der Anzahl der Motive am N-

Terminus unterscheiden (Ferrigno et al., 1997). Darüber hinaus finden bei einigen Isoformen auch Modifikationen nach der Sekretion statt. Generell lassen sich die Isoformen in unterschiedliche Gruppen einteilen: Laminin 1 bis 4, sowie Laminin 12 besitzen eine vollständige Übereinstimmung in der Anzahl der Domänen an den N-terminalen kurzen Armen. Die Laminine 6 bis 9 weisen kürzere N-terminale Arme der α -Kette, die Laminine 10 und 12 dagegen einen längeren N-terminalen Arm der α -Kette und Laminin 5 hat verkürzte N-terminale Arme an allen drei Ketten.

Name	Komposition	Literatur
Laminin 1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Timpl. et al., 1979
Laminin 2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Ehring et al., 1990
Laminin 3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	Hunter et al., 1989
Laminin 4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Sanes et al., 1990
Laminin 5	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Rousselle et al., 1991
Laminin 6	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	Marinkovich et al., 1992
Laminin 7	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	Champlaud et al., 1996
Laminin 8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	Miner et al., 1997
Laminin 9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	Miner et al., 1997
Laminin 10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	Miner et al., 1997
Laminin 11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	Miner et al., 1997
Laminin 12	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	Koch et al., 1999
Laminin 13	$\alpha 3\beta 2\gamma 3$	Libby et al., 2000
Laminin 14	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	Libby et al., 2000
Laminin 15	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	Libby et al., 2000

Tabelle 1.1: Bis heute entdeckte Laminin Isoformen. Es sind 15 Laminine beschrieben, die sich in der Komposition der drei Ketten unterscheiden

1.2.2 Funktion der Laminine

Die Vielfalt an möglichen Isoformen ermöglicht den Lamininen in verschiedenen Geweben unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen. Die Expression von Lamininketten ist räumlich und zeitlich reguliert und führt zu Isoformen, die gewebe- und entwicklungsspezifisch sind (Sanes et al., 1990). Laminine kommen in allen Basalmembranen des Organismus vor und sind schon in frühen Phasen der Embryogenese von essentieller Bedeutung. Ein Fehlen der Laminin $\gamma 1$ Kette, die in Laminin 1 vorkommt, führt bei Mäusen zu einem Phänotypen, der am Tag 5,5 *post*

conceptum letal endet, da sich keine Basalmembranen bilden (Smyth et al., 1999). Bei der Entwicklung der neuromuskulären Endknöpfe der peripheren Nerven in Muskeln kommt der Laminin $\beta 2$ Kette eine zentrale Rolle zu und Mäuse mit einer Laminin $\beta 2$ -Defizienz haben eine vielfach verringerte aktive Zone in präsynaptischen Nervenendigungen (Noakes et al., 1995). Auch bei der Entwicklung des Gehirns tragen Laminine wichtige Funktionen. Dabei ist die Laminin $\alpha 2$ Kette bei der Myelinisierung der Nervenzellen *in vitro* beteiligt (Buttery and French Constant, 1999) und eine Expression von Laminin $\alpha 2$ wurde im Gehirn nachgewiesen (Hagg et al., 1997).

1.2.3 Synthese und Zusammenlagerung von Lamininen

Die einzelnen Ketten der Laminine sind unterschiedliche Genprodukte, die zum Teil auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind (Martin und Timpl, 1987; Tryggvason, 1993). Die verschiedenen Ketten werden bereits intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum zusammengesetzt. Dabei bildet sich zuerst ein Dimer aus einer γ und β Kette durch Disulfidbrücken in einer Region der C-Termini beider Ketten (Utani et al., 1994; Yurchenco et al., 1997). Anschließend findet die Anlagerung der α Kette am N-Terminus der Domäne II durch Disulfidbrückenbildung statt (Niimi und Kitagawa, 1997). Diese Zusammenlagerung ist für die spätere Sekretion des Heterotrimers essentiell. Die Translokation des Heterotrimers aus dem endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Komplex, in dem weitere Glykosylierungsschritte vorgenommen werden, finden wahrscheinlich ebenfalls nur bei der richtigen Bindung des Heterotrimers statt (Cooper et al., 1981). Daraus ergibt sich, dass das Fehlen einer Kette oder Mutationen in den Domänen, die für die Zusammenlagerung notwendig sind, auch die Sekretion des Proteins verhindern

1.2.4 Interaktionspartner von Lamininen

In der Basalmembran sorgt in erster Linie das Netzwerk von Kollagen IV für Stabilität (Timpl et al., 1981; Yurchenco und Schittny, 1990). Darüber hinaus können aber auch Laminine ein Netzwerk bilden. So können Laminin 1 Moleküle *In vitro* ein hexagonales Netzwerk durch Interaktion der Domänen VI an den N terminalen kurzen Armen der einzelnen Ketten bilden (Yurchenco et al., 1985, 1992) (Abb. 1.4).

Dieses Assembly ist reversibel und abhängig von zweiwertigen Kationen (Yurchenco et al., 1985, Paulsson, 1988). Laminin 1 besitzt an jedem N terminalen Arm eine Typ VI Domäne (Yurchenco und Chen, 1993). Es ist deswegen davon auszugehen, dass auch bei anderen Isoformen mit drei dieser Domänen ein Assembly stattfinden kann (Cheng et al., 1997).

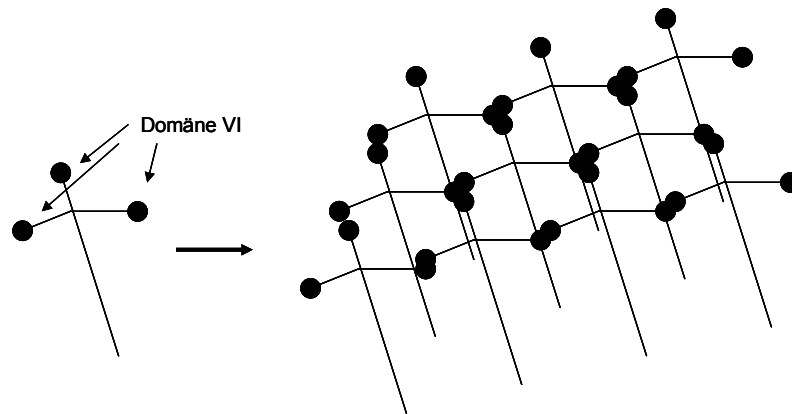


Abbildung 1.4: Assembly von Laminin Heterotrimeren durch Bindung der Domänen VI an den N-terminalen Armen. Durch das Anlagern der Domänen kann sich ein verzweigtes Netz von Laminin-Molekülen bilden

Dieses Modell der Zusammenlagerung kann aber nicht auf Isoformen übertragen werden, denen die Domäne VI fehlt, wie es in Laminin $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\gamma 2$ Ketten der Fall ist (Cheng et al., 1997). Hier wurde ein alternativer Mechanismus der Zusammenlagerung entdeckt. Dabei findet eine Bildung von Disulfidbrücken zwischen den aminoterminalen Armen eines Laminin 5 und 6 Moleküls statt (Champlaud et al., 1996). Das Dimer aus Laminin 5 und 6 besitzt nun wieder drei Domänen VI, wodurch eine Zusammenlagerung zu einem Netzwerk prinzipiell möglich wäre.

Neben der Möglichkeit zur Assemblierung untereinander können Laminine weitere Interaktionspartner binden. Am kurzen Arm der $\gamma 1$ Kette befindet sich eine Bindungsstelle für die Proteine Nidogen 1 und 2, die in der Basalmembran Laminin mit dem Kollagen IV Netzwerk verbinden (Hopf et al., 2001; Liddington, 2001). Für Laminin 5, das eine $\gamma 2$ Kette enthält, ist die Bindung von Nidogen 1 *in vitro* beschrieben worden (Sasaki et al., 2001), nicht hingegen für Nidogen 2. Es ist aber durch die *in vivo* vermutete und *in vitro* bewiesene Netzwerkbildung von Laminin 5 mit Laminin 6 und 10 (Champlaud, et al., 1996) eine Verbindung zu Nidogen 2

möglich. Die $\gamma 2$ Kette von Laminin kann in vitro auch an Fibulin 1 und 2 binden (Utani et al., 1997; Sasaki et al., 2001). Darüber hinaus ist eine Bindung von Laminin 5 an Kollagen VII nachgewiesen worden (Rousselle et al., 1997; Chen et al., 1999).

Zur Verankerung von Zellen an der Basalmembran sind Integrine als Verbindung zwischen den Zellen und der ECM essentiell. Laminin 1 besitzt am N-Terminus der α -Kette Bindungsstellen für $\alpha 1\beta 1$ und $\alpha 2\beta 1$ Integrine (Colognato et al., 1997; Colognato-Pyke et al., 1995; Hall et al., 1990; Languino et al., 1989; Tomaselli et al., 1990). Die G-Domänen am C-Terminus der α -Kette besitzt Bindungsstellen für $\alpha 6\beta 1$ Integrin (Aumailley et al., 1990), $\alpha 6\beta 4$ Integrin (Lee et al., 1992) und $\alpha 7\beta 1$ Integrin (Kramer et al., 1991). Dabei kommt $\alpha 6\beta 4$ Integrin bei der Ausbildung von stabilen Adhäsionen der Zelle zu Lamininen eine wichtige Rolle zu (Carter et al., 1990; Niessen et al., 1997) und ein Fehlen der $\beta 4$ Integrin Kette in Keratinozyten führt zu erhöhter Motilität der Zellen (Niessen et al., 1996).

1.3 Laminin 5

Laminin 5, auch bekannt als Kalinin oder Epiligrin, wurde erstmals 1991 als Adhäsionsprotein beschrieben (Rousselle et al., 1991). Es setzt sich aus einer $\alpha 3$, einer $\beta 3$ und einer $\gamma 2$ Kette zusammen. Dieses Laminin unterscheidet sich von den anderen bisher beschriebenen Lamininen, da es als einziges eine $\gamma 2$ Kette beinhaltet. Durch alternatives Spleißen der α -Kette kommen zwei verschiedene Varianten von Laminin 5 vor, Laminin 5A und B. Laminin 5A hat einen kürzeren N-Terminus der α -Kette, hier fehlen die Domänen IVa, IVb und VI und die entsprechenden stabförmigen Domänen (Abb. 1.5). Neben diesen beiden Spleißvarianten können extrazellulär weitere Modifikationen der Ketten stattfinden: zum Beispiel werden am C-Terminus der α Kette die globulären Domänen LG4 und LG5 proteolytisch abgespalten, was zu einer Verkürzung dieser Kette auf 165 kDa (A-Form), bzw. 280 kDa (B-Form) führt (Tsubota et al., 2000). Die α -Kette der A-Form kann weiter durch proteolytische Prozessierung von 165 kDa auf 145 kDa verkürzt werden, indem Motive am N-Terminus abgespalten werden (Marinkovich et al., 1992; Amano et al., 2000). Auch die γ Kette unterliegt einer Prozessierung: In der Precursor-Form ist die γ Kette 150 kDa groß. Nach der Prozessierung sind das L4-Motiv und die folgenden Bereiche bis zum N-Terminus abgespalten, das Molekül ist danach 105 kDa groß. Die Funktion dieser Modifizierungen ist bis heute nicht

abschließend geklärt. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass durch diese Veränderungen verschiedenen Liganden Bindungen ermöglicht werden. So können $\alpha\beta 1$ und $\alpha\beta 4$ Integrin an die LG1-3 Domänen des C-Terminus der Laminin $\alpha 3$ Kette binden (Carter et al., 1991; Rousselle and Aumailley, 1994), und Syndecane an die LG4 und LG5 Domäne (Utani et al., 2001). Auch die bislang nicht abschließend geklärte Funktion von Laminin 5 bei der Migration von Keratinozyten wird mit diesen Modifikationen in Verbindung gebracht. Das Prozessieren der $\gamma 2$ Kette durch die Matrix Metalloproteinase 2 (MMP2) führt zu einer erhöhten Motilität von Brustkarzinomzellen (Giannelli et al., 1997).

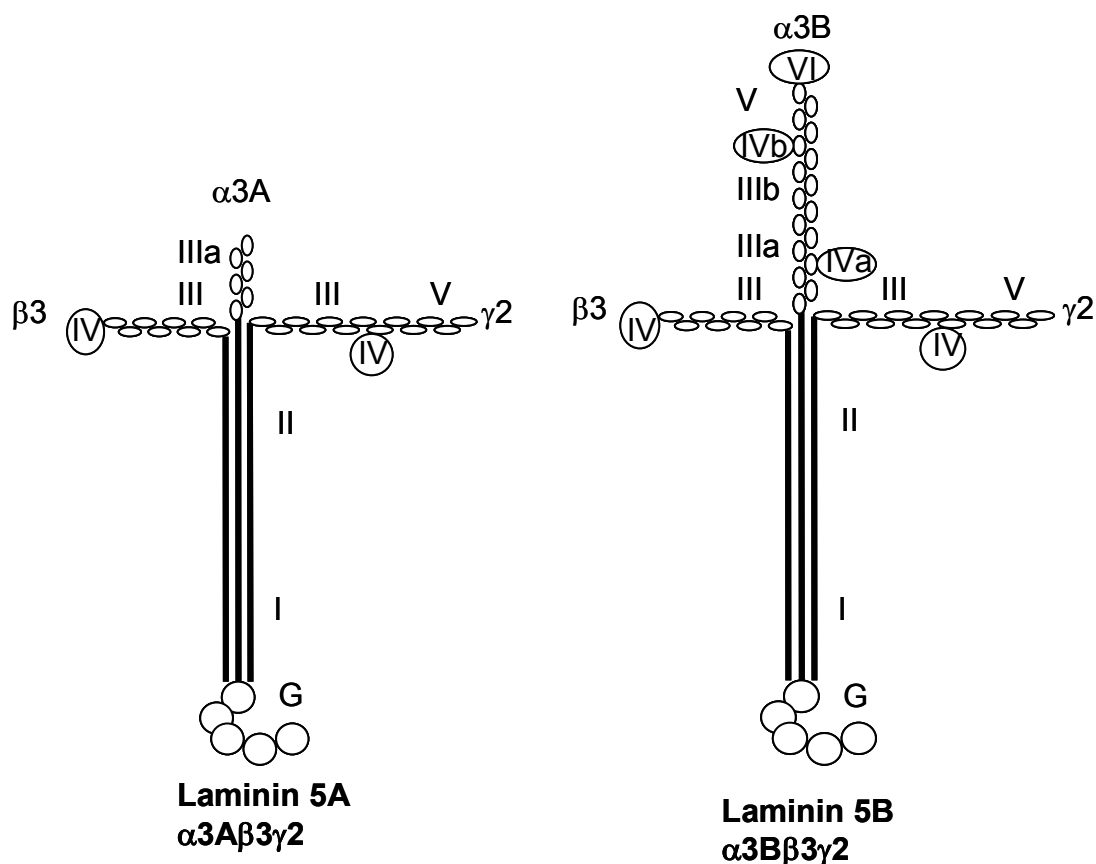


Abbildung 1.5: Schematischer Aufbau der beiden Laminin 5 Isoformen, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die kurzen Arme beinhalten den Aminoterminus der Proteinkette. Hier befinden sich Domänen IV und EGF ähnliche Wiederholungssequenzen (V und III). Am kurzen Arm der α -Kette der B-Form von Laminin 5 befinden sich des Weiteren eine Typ VI Domäne. Die gemeinsame coiled coil α -Helix beinhaltet die Domänen I und II. Am C-Terminus der α -Kette befinden sich fünf globuläre Domänen (LG1 bis LG5). Laminin 5A und 5B unterscheiden sich in der Länge des kurzen Armes der α -Kette. Die globulären Domänen VI, IVb und IVa, sowie die stabförmigen Domänen V und zwei weitere Domänen II fehlen in der Laminin 5A-Form.

1.4 Störung der Verankerung

Die Basalmembran spielt eine zentrale Rolle für die Integrität und den Zusammenhalt der Haut. Deutlich wird dies bei Defekten in Genen, die Proteine der Basalmembran codieren. Daraus resultieren blasenbildende Erkrankungen, die als Epidermolysis Bullosa (EB) bezeichnet werden. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Erbkrankheiten, bei der bereits durch geringe mechanische Einflüsse die Haut Blasen bildet. Generell werden verschiedene Formen von EB unterschieden, je nachdem welche Region der Haut betroffen ist (Tab. 1.2).

1. Epidermolysis bullosa simplex (EBS) ist charakterisiert durch Blasenbildung, die innerhalb der Epidermis auftreten. Hierbei sind die meisten Formen auf einen Defekt in den Genen für Cytokeratin 5 und 14 zurückzuführen. Drei verschiedene EBS-Unterformen sind beschrieben:

EBS-Köbner: diese Form tritt meistens an den Händen, Füßen und den Extremitäten auf. Nägel, Zähne und Mundschleimhaut sind weniger stark betroffen

EBS Weber-Cockayne: Hier tritt die Läsion hauptsächlich an den Handflächen und Fußsohlen nach einer starken Beanspruchung oder einer Verletzung auf

EBS Dowling Meara: Dies ist die schwerste Form der EBS. Es treten Blasen am gesamten Körper während und nach der Geburt auf. Spontane Blasenbildung findet an Torso und den proximalen Extremitäten statt, die Heilung der Blasen erfolgt ohne Narbenbildung.

2. Die junctionale Form von Epidermolysis bullosa (JEB) tritt bei einem Defekt von Proteinen aus dem Bereich der *Lamina lucida* in der Basalmembran auf. Bei dieser Form können die Laminine 5, 6, 10 oder Kollagen XVII betroffen sein (Marinkovich, 1993; Meneguzzi et al., 1992; Jonkman et al., 1995). Auch hier werden mehrere Formen unterschieden, die in ihrem Krankheitsverlauf unterschiedliche Konsequenzen nach sich ziehen.

Die **Herlitz-JEB** ist die schwerste Form der Krankheit. Hier treten Blasen am gesamten Körper bei der Geburt auf. Meist ist die Ursache ein Defekt in einer der drei Ketten des Laminin 5 Heterotrimer. Dabei handelt es sich um Mutationen, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon und somit zu einem Abbruch der Proteinsynthese führen. Es handelt sich um einen autosomal rezessiven Erbgang. Neben der Blasenbildung der Haut sind weitere Epithelien betroffen, darunter der

Gastrointestinaltrakt und das respiratorische System. Diese Form der JEB verläuft für die meisten Patienten innerhalb des ersten Lebensjahres infolge von Sepsis oder Organ-Fehlfunktionen tödlich (Marinkovich et al., 1999). Die Keratinozyten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wiesen diesen Phänotyp auf, die Patienten sind innerhalb der ersten Monate nach der Geburt verstorben.

Die **Non-Herlitz JEB** verläuft milder, es handelt sich hier um einen nicht lethalen Phänotypen. Auch hier treten Blasen am gesamten Körper auf, jedoch mit weniger schweren Folgen. Auch bei dieser Form kommen Mutationen in Laminin-Ketten vor. Hierbei handelt es sich aber um Punktmutationen, die zu trunkierten Formen des Proteins führen (Marinkovich et al., 1999).

Neben diesen beiden Formen gibt es noch die **Generalised Atrophic Benign Epidermoyosis Bullosa (GABEB)**. Auch hier treten Blasen am ganzen Körper nach der Geburt auf (Hashimoto et al., 1976; Hintner und Wolff, 1982). Die Patienten haben eine normale Lebenserwartung und ein normales Größenwachstum. Neben Mutationen in Laminin 5 Genen ist häufig eine Mutation des Gens für Kollagen XVII die Ursache. Bei GABEB wurde auch eine seltene Form der Mosaikbildung beschrieben, bei der normale und von der Mutation betroffene Bereiche auf der Haut nebeneinander vorkamen (Jonkman et al., 1995).

3. Eine weitere Form von EB tritt auf, wenn die Blasen sich in der Dermis bilden, diese Form wird als Dystrophic epidermolysis bullosa (DEB) bezeichnet. Hier ist das Gen, das für Kollagen VII codiert, betroffen (Uitto et al., 1994; Parente et al., 1991). Es gibt dominante und rezessive Formen, die aufgrund ihres Schweregrades der Erkrankung in **dominante** und **milde DEB** unterschieden werden.

Krankheitsgruppe	Blasenbildungsort	Krankheit	Betroffene Proteine
EBS	Intraepidermal	EBS Dowling-Meara EBS-Weber-Cockayne EBS-Koebener	Keratin 5, 14 Keratin 5, 14 Keratin 5, 14
JEB	Lamina Lucida	JEB-Herlitz JEB Non-Herlitz GABEB	Laminin 5 ($\alpha3\beta3\gamma2$) Laminin 5 ($\alpha3\beta3\gamma2$) BP180, Laminin
DEB	Sublamina densa	Dominant DEB Mild DEB	Kollagen VII Kollagen VII

Tabelle 1.2: Klinische Phänotypen von Epidermolysis Bullosa und die betroffenen Proteine. Die in dieser Arbeit untersuchten Keratinozyten stammten von Patienten mit der Herlitz-Form der junktionalen Epidermolysis Bullosa

1.5 Migration von Keratinozyten bei der Wundheilung

Die Haut, das größte Organ des Menschen, erfüllt zahlreiche Aufgaben, die für den Organismus lebensnotwendig sind. Neben der Regulierung des Wärmehaushaltes und der Wahrnehmung von Sinneseindrücken sind es vor allem Aufgaben bei der Abgrenzung zur Außenwelt. Hier ist der Schutz vor Wasserverlust und Austrocknung, die Abwehr von bakteriellen und viralen Angriffen und der mechanische Schutz vor Verletzungen zu nennen. Bei einer Verletzung der Haut ist der schnelle Verschluss dieser offenen Stellen ein vordringliches Ziel. Der in der Epidermis, der obersten Schicht der Haut, hauptsächlich vorzufindende Zelltyp sind Keratinozyten. Diese Zellen bilden ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel, bei dem einige der Basalmembran aufsitzende Keratinozyten proliferieren (epidermale Stammzellen) und Tochterzellen bilden, die für eine begrenzte Anzahl an Zellteilungszyklen ebenfalls noch proliferativ sind („transient amplifying cells“), später dann wie der Rest der Tochterzellen in die Differenzierungsphase übergehen und im Laufe der Zeit in weiter oben liegende Schichten geschoben werden. Dabei verändern sie ihre Morphologie und Physiologie. Diese Zellen werden nach terminaler Differenzierung und einem spezifischen Zelltod als Hornschuppen an der Oberfläche der Haut abgeschilfert.

Bei einer Verletzung der Haut wird die entstandene Lücke durch Reepithelialisierung geschlossen. Dabei ist zum einen die Migration der Zellen in den Bereich der Wunde, zum anderen die vermehrte Proliferation der Keratinozyten notwendig. Zusätzlich wird im weiteren Verlauf der Wundheilung eine neue Basalmembran ausgebildet und die erneute Stratifizierung des Epithels vorgenommen. Wenige Stunden nach der Verletzung setzt diese Reepithelialisierung ein. Dabei werden desmosomale Verbindungen zwischen den einzelnen Keratinozyten abgebaut und periphere cytoplasmatische Aktin-Filamente für die Migration aufgebaut (Goliger und Paul, 1995; Gabbiani et al., 1978). Ebenso werden die hemidesmosomalen Kontakte zwischen den basalen Keratinozyten der Epidermis und der Basalmembran abgebaut, wodurch eine laterale Bewegung der Zellen ermöglicht wird. Expression von anderen Integrin Rezeptoren ermöglicht den Keratinozyten dann die Interaktion mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix, auf denen sich die Zellen bewegen können.

1.6 Zellmigration

Migration ist ein grundlegender Prozess aller Zellen und auf vielfältige Weise zur Erhaltung des Organismus notwendig. Der Vorgang von Zellmigration verläuft in mehreren Schritten ab, die im Folgenden dargestellt werden.

1.6.1 Protrusion der Lamelle

Zuerst muss eine Zelle eine Polarität ausbilden, wodurch nachfolgend ein vorderes Ende mit flächiger Ausbreitung und ein hinteres Ende mit tubulären Ausläufern der Plasmamembran, den so genannten Retraktionsfasern, entstehen. Die Bewegung beginnt mit der Protrusion der Lamelle am vorderen Ende der Zelle, die durch Polymerisation von Aktin bewerkstelligt wird. Hierbei bindet ein Arp2/3-Komplex („actin related protein“) an bereits vorhandene Aktin-Filamente und bewirkt eine Verlängerung eines neuen Aktin-Filamentes in einem 70°-Winkel zu dem bereits bestehenden Filament (Weaver et al., 2003). Der Arp2/3 Komplex ist kontrolliert durch Proteine der WASP/WAVE Familie („Wiskott-Aldrich-syndrome-protein/WASP-family verprolin homologous protein“), die wiederum unter der Kontrolle von kleinen GTPasen RAC, bzw. Cdc42 stehen (Pollard und Borisy, 2003). Diese kurzen Aktin-Filamente werden dann durch Binden von „Capping Proteinen“ an dem wachsenden Plus-Ende an der weiteren Polymerisierung gehindert. Dadurch entsteht ein verzweigtes Netz an kurzen Aktin-Filamenten, das den flächigen Charakter der Lamelle ausmacht und ein Vorschieben der Membran ermöglicht.

Zur Ausbildung von Filopodien, fingerförmigen Ausstülpungen der Membran, am vorderen Ende sind Proteine notwendig, die das capping des Plus-Endes verhindern. Dieses System wird durch Formin und Proteine der VASP-Familie (Ena/vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein) kontrolliert. Es bindet an das Plus-Ende der Aktin-Filamente und ermöglicht lineares Wachsen der Aktin-Filamente (Watanabe und Higashida, 2004).

1.6.2 Zell-Matrix Adhäsion

Die vorgeschobene Membran bildet in dem zweiten Schritt der Migration Kontakte zur unterliegenden Matrix aus. Zell-Matrix Adhäsionen variieren in ihrer Struktur und Zusammensetzung erheblich, in den meisten Fällen ist jedoch das Aktin Zytoskelett der Zelle über Integrine mit der Matrix verbunden. Intrazellulär bindet das Aktin

Zytoskelett über Adapterproteine wie Vinculin und Talin an Integrine, die, wie zuvor für hemidesmosomale Komplexe in der Basalmembran beschrieben, eine zentrale Rolle bei der Adhäsion spielen. Für verschiedene Matrix Konstituenten gibt es unterschiedliche Integrin-Isoformen, die daran binden. Grundsätzlich binden $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 8$, $\alpha 11b$ und αv Integrin Untereinheiten an Proteine der extrazellulären Matrix, die ein Integrin Bindemotiv besitzen. Dieses RGD-Motiv enthält eine Arginin-Glycin-Asparagin (R-G-D) Aminosäuresequenz, die unter anderem in Vitronektin, Laminin und in dem in dieser Arbeit als Matrix verwendete Fibronektin vorkommt. Die flankierenden Bereiche neben der RGD-Sequenz bestimmen hierbei die Spezifität für die Integrin Untereinheiten (Ruoslhati, 1996). $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$ und $\alpha 11$ Integrin besitzen Bindepotential für Kollagene, $\alpha 3$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ Integrin können Laminine binden. Grundsätzlich werden Adhäsionspunkte unterschieden in 2-5 μm große und in der Zellperipherie lokalisierte Fokalkontakte und ca 1 μm große und hauptsächlich direkt hinter dem *leading edge* eines Lamellipodium lokalisierte Fokal-Komplexe. Während der Migration reifen Fokalkomplexe zu Fokalkontakten, in dem sie an Größe zunehmen. Die Veränderung zu Fokalkontakten ist hierbei wieder reguliert durch GTPasen der Rho-Familie (Rottner et al., 1999).

Durch Konformationsänderung der Integrine und folgender Zusammenlagerung mehrerer Dimere wird eine höhere Affinität zu Liganden erreicht und somit eine Reorganisation der mit den Integrinen verbundenen Komponenten auf der intrazellulären Seite. Außerdem können auch Laminine zu Netzwerken polymerisieren. Anhand von extrahiertem Laminin aus Engelbrecht-Holm-Swarm (EHS) Tumoren konnte dies nachgewiesen werden (Yurchenco et al., 1985). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Laminin Polymerisation durch die Domänen an den N-Termini der einzelnen Ketten ermöglicht wird. Diese Polymerisation findet aber nur statt, wenn bereits Rezeptoren, unter anderem Integrine, vorhanden sind. Durch das „Clustering“ der Integrine wird eine Konzentrierung der Laminine erreicht, die über den C-Terminus mit den Integrinen verbunden sind. In der Umkehr konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung der Bindung des C-Terminus von Laminin an Zellrezeptoren die Ausbildung einer Basalmembran verhindert (Cognato et al., 1999, Klass et al., 2000; Li et al., 2002). Da auch die Polymerisation des gebundenen Laminins zu einer Reorganisation der Rezeptoren und des Zytoskeletts führt (Cognato et al., 1999) zeigt sich hier, dass es sich hier um ein hoch plastisches und von einander abhängiges System handelt.

Bei einer unzureichenden Adhärenz der Lamelle löst sich die Membran vom Substrat und wird an der apikalen Seite in Form von „membrane ruffles“ wieder zum Zellzentrum zurückbewegt. Es konnte jüngst gezeigt werden, dass eine ineffektive Lamellenadhäsion in direktem Zusammenhang mit dem Auftreten von „membrane ruffles“ steht (Borm et al., 2005).

1.6.3 Ablösen des Hinterendes

Nachdem am vorderen Ende neue Zell-Matrix Kontakte hergestellt sind, wird der gesamte Zellkörper in diese Richtung bewegt. Dies wird nicht nur durch die Aktin-vermittelte Protrusion bewerkstelligt, sondern auch durch Myosin II vermittelte Reorganisation und –lokalisierung des Zellkernes (Gomes et al., 2005).

Der letzte Schritt in der Translokation einer migrierenden Zelle ist das Lösen von Adhäsionspunkten am hinteren Ende. Dies geschieht sowohl durch mechanische Kräfte als auch durch proteolytische Spaltung der Adhäsionsproteine. Hierbei sind die Zugkräfte des Zytoskelettes höher als die Adhäsionskräfte der Proteine zum Substrat. Dabei werden die tubulären Retraktionsfasern wieder zum Zellkörper gezogen. Die proteolytische Spaltung der Adhäsionsproteine kann sowohl intrazellulär als auch extrazellulär erfolgen. Die Spaltung innerhalb der Zelle wird durch Calpaine übernommen. Es sind nicht-lysosomale Cystein-Proteinasen, die als Substrate u.a. Talin und Paxilin und die intrazellulären Domänen von $\beta 1$ Integrin und $\beta 3$ haben (Du et al., 1995, Cooray et al., 1996; Perrin und Huttenlocher, 2002). Extrazellulär wird die Modifizierung und somit auch die Lösung der Ankerproteine von der ECM durch verschiedene Proteasen übernommen. Hierbei spielen die Matrix Metalloproteinasen (MMP), im besonderen MMP 1, 9 und 10 eine große Rolle. Aber auch Cathepsine sind in der Lage, extrazellulär zu arbeiten, um eine Remodellierung der Matrix zu erreichen (Büth et al., 2004). Die Proteolyse von Integrinen auf der extrazellulären Seite findet durch Sheddasen statt (Wolfsberg et al., 1995). Durch die intra- und extrazelluläre Spaltung kommt es zu dem Verlust von Zellmaterial, das in Form einer Migrationsspur hinter der Zelle zurückgelassen wird. Diese Spur besteht aus Integrin-enthaltenden Makroaggregaten, die membranumhüllt sind (Palecek et al., 1996). Da sie durch ein Abreißen der Plasmamembran entstehen, wurde dieser Vorgang „membrane ripping“ genannt (Bard und Hay, 1975; Chen, 1981; Regen und Horwitz, 1992; Lauffenburger und Horwitz, 1996). Diese Spur wurde zuerst in

langsam migrierenden Zellen wie Fibroblasten nachgewiesen (Chen, 1981). Erst später wurde sie auch hinter schneller wandernden Zellen, wie z.B. Keratinozyten, entdeckt (Kirfel et al., 2003). Die zurückgelassenen Bestandteile der Adhäsionspunkte und der Plasmamembran sind in der Spur in einer charakteristischen Form angeordnet: Sphärische und lang gezogene Elemente mit einem Durchmesser von 50-100 nm, die durch die Fragmentierung der Retraktionsfasern entstehen und in einer „perlschnurartigen“ Anordnung vorliegen. Sie beinhalten β 1-Integrine, die in Fokalkontakten und fokalen Adhäsionspunkten vorkommen. Die zweite Struktur besteht aus kleineren, sphärischen Aggregaten mit einem Durchmesser von 30-50 nm, die zwischen den vorher genannten Strukturen liegen (Kirfel et al., 2003). Sie entstehen durch die Auflösung der hemidesmosomalen Komplexe und enthalten β 4 Integrin (Rigort et al., 2005). Neuerdings gibt es Hinweise darauf, dass diese zurückgelassenen Proteine einen Einfluss auf nachfolgende Zellen haben und ihnen als Leitstruktur bei der Migration dienen können (Kirfel et al., 2003).

1.7 Die Rolle von Laminin 5 während der Keratinozytenmigration

Während der Wundheilung sind Keratinozyten gegenüber anderen Matrix-Bestandteilen exponiert. Sie können durch Modifikation der Integrine, Sekretion von Proteasen und Sekretion weiterer Proteine in das Wundbett wandern und die umgebende Struktur bearbeiten. Die vollständige Verschließung der Wunde durch einen Keratinozytenlayer und die Bildung der neuen Basalmembran sind wichtige Schritte. Die Einflüsse von Integrinen, die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und die Umgestaltung der Matrix sind in vielerlei Hinsicht untersucht worden. Während Laminin 5 in der unverletzten Epidermis eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Basalmembran spielt und das Fehlen von Laminin 5 zu schwerwiegenden Defekten in dieser Zone der Haut spielt, ist auch bekannt, dass dieses Protein bei der Migration von epithelialen Zellen beteiligt ist. In früheren Untersuchungen stellte sich heraus, dass Laminin 5 eine inhibitorische Rolle bei der Migration übernimmt und während der Reepithelialisierung für die Etablierung der neuen Basalmembran sorgt (O'Toole et al., 1997). Aber es wurde auch beobachtet, dass die Blockierung von Laminin 5 auf Fibronectin und Kollagen I die Migration von Keratinozyten inhibiert (Zhang and Kramer, 1997). Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich bei

der näheren Betrachtung von Laminin 5 und der Prozessierung des Heterotrimer. Sowohl die $\alpha 3$ -, als auch die $\gamma 2$ Kette von Laminin 5 unterliegen einer proteolytischen Modifikation nach ihrer Sekretion. Abhängig von der Modifikation wirken die verkürzten Ketten migrationsfördernd oder –hemmend. Für die $\alpha 3$ -Kette ist die Abspaltung der LG Domänen IV und V durch Serin-Proteasen beschrieben worden (Gianelli et al, 1997; Schenk et al., 2003). Diese von 200 kDa auf 160kDa verkürzte Kette kann die Bildung von Hemidesmosomen und somit eine Verringerung der migratorischen Kapazität bewirken (Goldfinger et al., 1998; Ghosh et al., 2000). Die Domänen LG3 und LG4 wurden hingegen als Ligand für $\alpha 3\beta 1$ Integrin und als ein Stimulus für die Migration beschrieben. Eine Prozessierung der $\gamma 2$ Kette von Laminin ist ebenfalls beschrieben worden. Hierbei werden die globuläre Domäne IV und die stabförmigen Domänen am N-Terminus abgespalten, so dass eine 105 kDa große $\gamma 2$ -Kette übrig bleibt. Auch hier findet durch diese Veränderung ein Wandel der Eigenschaften von Laminin 5 von Adhäsion zu Migration hin statt (Salo et al., 1999). Auch das abgespaltene Stück spielt eine Rolle bei der Migration. So kann dieses Fragment an erbB1 binden. ErbB1 gehört zu der Familie der EGF/erbB Rezeptoren, die auf chemotaktische Stimuli reagieren (Schenk et al., 2003).

Generell scheint es bei der Migration von Keratinozyten eine Rolle zu spielen, dass endogenes Laminin 5 zur Verfügung steht. Das Heterotrimer mit der 200 kDa langen $\alpha 3$ -Kette ist bei der Migration notwendig. Die proteolytische Spaltung von Laminin durch Plasmin verhindert Migration und fördert die Ausbildung von Hemidesmosomen (Goldfinger et al., 1998; Marinkovich et al., 1992). Dies geschieht möglicherweise durch die veränderte Affinität zu Integrin $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$. Im Allgemeinen ist neu synthetisiertes und sezerniertes Laminin 5 bei der Wundheilung notwendig, auch wenn bereits die prozessierte Form im Wundbett vorliegt (Kainulainen et al., 1998).

1.8 Ziele der Arbeit

Die zentrale Rolle von Laminin 5 in der Basalmembran der Haut wird durch das Krankheitsbild Epidermolysis Bullosa deutlich, das bei Fehlen dieses Proteins entsteht und in seiner schweren Form letal ist. In der Haut entstehen dabei nach geringer Belastung Blasen, die in Anzahl und Größe so schwerwiegend sind, dass durch den physiologischen Prozess des Wundverschlusses keine Heilung stattfinden kann. Neben der Ankerfunktion scheint Laminin 5 aber auch bei der Keratinozytenmigration und somit auch bei der Wundheilung eine Rolle zu spielen. Der Einfluss von Laminin 5 bei diesem Prozess ist aber bisher noch nicht ausreichend erforscht worden.

In dieser Arbeit wurden deshalb humane Laminin 5 defiziente Keratinozyten mit Hilfe von „live cell imaging“ und dem hochauflösenden SACED Assay auf Motilität und Migrationsverhalten hin untersucht. Die Zellen wurden dabei auf verschiedenen Komponenten der dermalen ECM und der Basalmembran ausgesät um Aussagen über verschiedene Einflüsse des Substrates bei Laminin 5 Defizienz während der Wundheilung treffen zu können. Die Analyse der Migration auf einer Matrix mit Laminin 5 sollte dabei klären, in welchem Umfang exogenes Laminin 5 einen Einfluss auf die Migration von Laminin 5 defizienten Keratinozyten haben kann. Darüber hinaus wurde die Interaktion migrierender Keratinozyten mit Integrinen bei Abwesenheit von Laminin 5 auf den verschiedenen Substraten in Hinsicht auf mögliche kompensatorische Effekte untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Blotkammer	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
CO ₂ Begasungsbrutschränke	Binder (Tuttlingen) Heraeus Instrument (Osterode)
Elektrophorese Power Supplier	BioRad GmbH (München)
Inverses Mikroskop mit Inkubationskammer	Nikon TE2000 (Düsseldorf)
Klimakammer	Temponrol 27-2 digital, Zeiss (Oberkochem)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	LSM 510, Zeiss (Oberkochem)
Laborzentrifuge	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg)
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Pipetten, 10µl, 100µl, 200µl, 1ml, 5ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg)
Rasterelektronenmikroskop (REM)	FEG XL30 S, Fei (Eindhoven, Niederlande)
SDS-PAGE-Kammer	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Sputter Coater	HR 208, Cressington (Watford, UK)
Sterilbank	Heraeus Instrument (Osterode) Nunc
Ultraschallgerät	Dr. Hielscher GmbH (Teltow)
Ultrazentrifuge	Sorvall Evolution RC (Langenselbold)
Vortexer	Scientific Industries (Bohemian, USA)
Wasserbad	Lauda (Lauda-Königshofen)
Western-Blot Kammer	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Zentrifuge	Heraeus Instruments (Osterode)

2.1.2 Sonstige Materialien

Beobachtungskammern	Nunc GmbH (Wiesbaden)
Blotfilter	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Deckgläser	Menzel GmbH (Braunschweig)
Desinfektionslösung für Vorhaut	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Dispase II	Roche Diagnostic GmbH (Mannheim)
Einfrierröhrchen	Nunc (Wiesbaden)
Multiwell-Platten (6, 12, 24, 96)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Nitrozellulose-Membran	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH (Hamburg)
REM-Probenteller	Plano (Wetzlar)
Rinder Serum Albumin (BSA)	Sigma (München)
Röntgenfilm	Kodak Biomax (Cedex, Frankreich)
Skalpelle	PFM AG (Köln)
Sterilfilter; 0,2 µm	Pall (Ann Arbor, MI, USA)
Sterile Plastikpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Trypsin	Cambrex (East Rutherford, NJ, USA)
Trypsin-Inhibitor	Cambrex (East Rutherford, NJ, USA)
Vakuum – Sterilfilter; 500ml; 0,2µm	Renner GmbH (Darmstadt)
Zellkulturschalen, Ø6cm, Ø10cm, Ø15cm	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zählkammer	Bürker Zählkammer (Merck, Darmstadt)
Zellschaber	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zellsiebe, Porengröße 40µm	BD (Franklin Lakes, NJ, USA)

Antikörper

Antikörper	Klon	Herkunft	Arbeitsverdünnung	Verwendung	Bezugsquelle
β 1Integrin	P5D2	Maus, monoklonal	1:100	IF	Chemicon, Temecula, CA, USA
Laminin 5	8LN5	Kaninchen, polyklonal	1:100 (IF), 1:1000 (WB)	IF, WB	Manuel Koch (Köln)
Vinculin	hVIN-1	Maus, monoklonal, IgG1	1:100	IF	Sigma, Taufkirchen
α 2Integrin	P1E6	Maus, monoklonal, IgG1	20 μ g/ml	Blk	Chemicon, Temecula, CA, USA
α 5Integrin	P1D6	Maus, monoklonal IgG3	20 μ g/ml	Blk	Chemicon, Temecula, CA, USA
Laminin 5	P3H9-2	Maus, monoklonal IgG1	20 μ g/ml	Blk	Chemicon, Temecula, CA, USA

Sekundäre Antikörper	Arbeitsverdünnung	Verwendung	Herkunft
DTAF Ziege anti Maus	1:200	IF	Jackson, West Grove, USA
DTAF Ziege anti Kaninchen	1:200	IF	Jackson, West Grove, USA
HRP Ziege anti Maus	1:1000	WB	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
HRP Ziege anti Kaninchen	1:1000	WB	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

Um f-Aktin affinitätszytochemisch zu markieren wurde Phalloidin eingesetzt. Dieses Phallotoxin bindet hochspezifisch an f-Aktin und wurde zur Gegenfärbung des Aktin-Zytoskeletts der Keratinozyten bei immunocytochemischen Markierungen verwendet. Es wurde Alexa-Fluor 546- oder Alexa Fluor-588 konjugiertes Phalloidin (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) verwendet. Die Stammlösung (6,6 μ M) wurde im Verhältnis 1:40 zu dem sekundären Antikörper der immunocytochemischen Markierung beigegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 Medium

Es wurden zwei verschiedene Medien verwendet.

1) Keratinocyte Basal Medium (KBM, Cambrex Biosciences, East Rutherford, NJ, USA) wurde mit folgenden Zusätzen versetzt:

- 100 µg/ml humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)
- 0,1 % Gentamycin/Amphotericin
- 500 ng/ml Hydrocortison
- 0,5 mg/ml Insulin
- 0,4 % Rinderhypophysenextrakt
- 120 µM Calcium

Das Medium wurde dann als KGM (Keratinocyte growth medium) bezeichnet. Dieses Medium wurde zum Wachstum von Keratinocyten nach der Isolation der Zellen aus Vorhaut-Reduktionen und bei der Kultivierung von HaCaT-Zellen verwendet.

2) KGM mit 50 µM Calcium wurde als Medium für die Migrationsstudien eingesetzt.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Normale humane Keratinozyten

Normale humane Keratinozyten (NHK) wurden aus Vorhaut-Reduktionen gewonnen. Hierfür wurde die Haut zuerst für 20 Minuten in eine desinfizierende Lösung (Antibiotic-Antimitotic-Lösung, Invitrogen, Karlsbad, USA) gegeben und anschließend das Fettgewebe von der Dermis entfernt. Die Hautstücke wurden in ca. 1mm³ große Stücke mit einem Skalpell zerteilt und darauf hin über Nacht bei 4°C in 1mg/ml Dispase II in PBS inkubiert. Dispase ist eine neutrale Metalloproteinase aus *Bacillus polymyxa* und spaltet selektiv Proteine des hemidesmosomalen Komplexes, weshalb sie gut zur Trennung von Epidermis und Dermis geeignet ist (Gipson und Grill, 1982). Nach der Inkubation konnte die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis

abgezogen werden. Die Epidermis wurde anschließend in 3 ml Trypsin (Cambrex) für 6 Minuten bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Um die Trypsin-Reaktion abzustoppen wurden 3 ml Trypsin Inhibitor Lösung (Cambrex) zugegeben. Die Suspension wurde dann durch ein Zellsieb gegossen und in einem Reaktionsgefäß gesammelt, wodurch die noch verbliebenen Epidermisstücke von den isolierten Keratinozyten getrennt wurden. Die suspendierten Zellen wurden 3 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in KGM resuspendiert. Anschließend wurden je 200.000 Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät und in KGM-Medium kultiviert. Es wurde alle zwei Tage das Medium gewechselt. Bei ca. 70%iger Konfluenz wurden die Zellen passagiert und in drei neuen Schalen ausgesät, oder in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.2.2 Laminin 5 defiziente Zellen

Keratinozyten von Patienten mit der Erkrankung Epidermolysis Bullosa in der Herlitz Form wurden von Frau Prof. Dr. Bruckner-Tudermann (Universität Freiburg) und Herrn PD Dr. Holm Schneider (Nicolaus Fiebiger Zentrum, Universität Erlangen) bereitgestellt. Die Patienten waren kurz nach der Geburt verstorben. Die Zellen wurden durch Sequenzierung des Genabschnittes auf Mutationen in Genen, die einzelne Ketten von Laminin 5 codieren, untersucht (Nakano et al., 2002). Die ermittelte Punktmutation befand sich an Position 635 des Laminin $\beta 3$ -Gens auf beiden Allelen. Bei dieser Mutation handelt es sich um einen hot-spot, eine bei dieser Krankheit häufig auftretende Mutation, die zu einem frühzeitigen Stop-Codon im Laminin $\beta 3$ -Gen führt (R635X, Abb. 2.1). Der intrazelluläre Zusammenbau des Laminin Heterotrimers findet jedoch nur statt, wenn die α , β und γ -Kette vorhanden ist. Durch das Fehlen der $\beta 3$ -Kette wird kein Laminin 5 zusammengesetzt und sezerniert. Dies wurde in Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen Laminin 5 gezeigt.

Die Zellen wurden aliquotiert und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Zur Verwendung wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut, mit Medium versetzt und bei 1.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in Medium resuspendiert und in 2-Well Beobachtungskammern oder in 10cm Kulturschalen ausgesät.

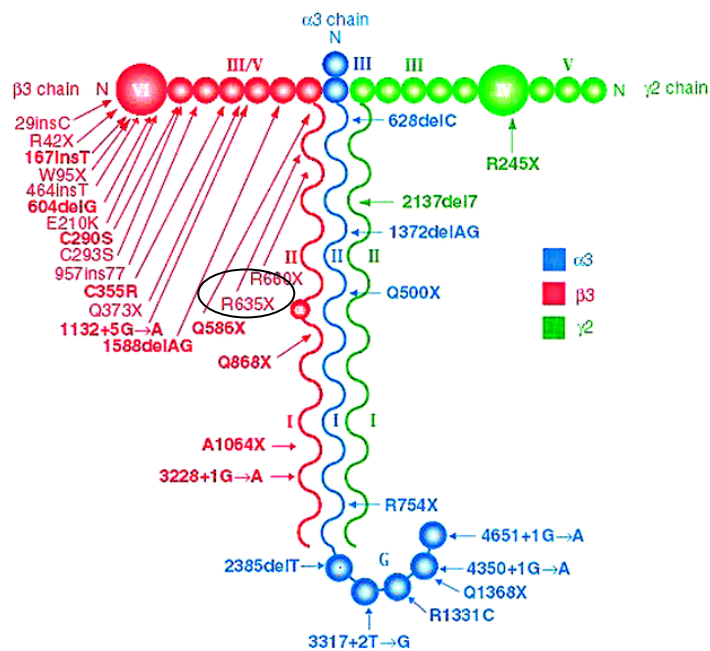


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Laminin- Ketten ($\alpha 3$, $\beta 3$, $\gamma 2$) mit Mutationsstellen. R635X (Kreis) befindet sich in der Laminin $\beta 3$ -Kette und verändert das Basentriplet für Arginin zu einem Stop-Codon (Verändert nach: Nakano et al., 2002)

2.2.2.3 HaCaT-Zellen

Die HaCaT-Zelllinie stammt aus dem Hautgewebe einer Sicherheitsoperation, die nach der Entfernung eines Melanoms von der Kopfhaut durchgeführt wurde. Sie sind spontan immortalisiert (Boukamp et al., 1988). Diese Zellen wurden verwendet, um eine von humanen Keratinozyten gebildete extrazelluläre Matrix zu erzeugen und somit eine native Struktur als Migrationssubstrat verwenden zu können.

2.2.2.4 Passagieren und Einfrieren

Die Passagierung der Zellen erfolgte bei 70%iger Konfluenz. Die Zellen wurden mit 37°C warmen PBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten mit PBS/10 mM EDTA bei 37°C inkubiert. Nach dem Absaugen der Lösung wurde mit Trypsin-Lösung für ca. 3-5-Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend mit Trypsin-Inhibitor (Cambrex) abgestoppt. Die Zellen wurden dann resuspendiert, in einem Reaktionsröhrchen gesammelt, bei 1.200 rpm 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in KGM resuspendiert. Die Zellsuspension

wurde in entsprechender Aussaatdichte in Zellkulturschalen oder Chamber-Slides ausgesät.

Das Einfrieren der Zellen erfolgte in Einfriermedium. Es wurden je 10^6 Zellen in Schraubdeckelröhrchen (Cryotubes, Nunc, Wiesbaden) aliquotiert und für 24 Stunden bei -80°C eingelagert. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.2.5 Beschichtung der Zellkultur-Platten und Beobachtungskammern

Um die Migrationseigenschaften von Keratinozyten auf verschiedenen Bestandteilen der ECM und insbesondere der Basalmembran zu untersuchen, wurden die Zellkulturplatten mit Fibronectin, Kollagen I oder Kollagen IV beschichtet. Ebenso wurden Keratinozyten auf der ECM ausgesät, die von HaCaT-Zellen sezerniert worden war. Sowohl Fibronectin, als auch Kollagen I kommen in der ECM der Dermis vor und dienen migrierenden Keratinozyten bei der Wundheilung als Matrix. Kollagen IV ist Bestandteil der epidermalen Basalmembran und hat zu basalen Keratinozyten über Integrine Kontakt. 1 mg Fibronectin- Lyophilisat (CellSystems, St. Katharinen) wurde in 1 ml 2 M Harnstoff / 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 gelöst und mit KGM in einer Konzentration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ verdünnt auf die Beobachtungskammern und Zellkulturschalen aufgetragen, eine Stunde inkubiert und anschließend abgesaugt. Kollagen I (IBFB GmbH, Leipzig) wurde in 1 M Essigsäure über Nacht bei 4°C gelöst. Anschließend wurde die Lösung bei 20.000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Die Lösung wurde dann mit 0,2 M Essigsäure auf 2 mg/ml verdünnt. Die Stammlösung wurde in KGM verdünnt und zur Beschichtung in einer Konzentration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ eingesetzt. Kollagen IV aus humaner Plazenta (Fluka, Buchs SG, Schweiz) wurde ebenso in Essigsäure angesetzt und in einer Konzentration von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ als Beschichtung eingesetzt. Als Kontrolle wurden die Zellen auf unbeschichteten Nunc-Kammern oder auf 10 cm- Zellkulturplatten ausgesät. Um eine extrazelluläre Matrix zu erhalten, die von Keratinozyten gebildet worden ist, wurden HaCaT-Zellen in Beobachtungskammern oder auf Deckgläsern ausgesät und kultiviert. Bei 100%iger Konfluenz der HaCaT- Zellen wurde das Medium abgesaugt und kurz mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 20-30 Minuten mit 10 mM EDTA in PBS inkubiert. Danach wurden alle Zellen durch auf- und

abpipettieren mit einer 1 ml-Pipette gelöst. Die beschichteten Kammern wurden mit PBS überschichtet und bis zur Aussaat der Zellen bei 4°C steril gelagert.

2.2.3 Analysen

2.2.3.1 SACED Motilitätsassay

Je 30.000 Wildtyp- oder Laminin 5 defiziente Keratinozyten wurden in Beobachtungskammern ausgesät, die entweder mit Fibronectin, Kollagen I, Kollagen IV oder der Matrix von HaCaT-Zellen beschichtet waren. Ebenso wurden unbeschichtete Kammern eingesetzt. Diese Kammern erlaubten eine Analyse mit Hilfe eines inversen Mikroskopes. Vor der Untersuchung wurden die Zellen mit 50 nM humanen epidermalen Wachstumsfaktor (hEGF) inkubiert, um eine Stimulation der Migration zu erreichen. Für die Videomikroskopie wurde ein inverses Laser Scanning Mikroskop mit einem 63 fachem 1,4 NA Plan-Apochromat Öl-Immersionsobjektiv von Zeiss (Oberkochen) eingesetzt. Für die Untersuchung wurde eine Inkubationskammer (Zeiss) verwendet, die eine konstante Umgebungstemperatur von 37° C gewährleistete. Es wurde der HeNe 1 Laser verwendet. Um Zellschädigung durch die Energie des Lasers zu minimieren wurde er bei geringer Transmission betrieben. Die Analysen fanden in einem Zeitraum von 10 Minuten statt, wobei alle zwei Sekunden ein Bild aufgenommen wurde. Die so entstandenen Bilderserien von insgesamt 300 Bildern wurden anschließend in ein anderes Computerformat (.tif) umgewandelt, um sie für die Analyse mit Hilfe des SACED-Assays („stroboscopic analysis of cell dynamic“ (Hinz et al., 1999)) vorzubereiten. Für die Analyse wurde das Computerprogramm Optimas 1.2 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) eingesetzt. Hierbei wurde in dem ersten Bild der Serie ein 1 Pixel breiter Bereich der Zelle markiert, der eine Lamellendynamik vorweist. Das Programm ermittelte dann für alle 300 Bilder die Grauwerte dieses markierten Bereiches. Anschließend wurden diese einzelnen Bereiche ausgeschnitten und in einem Bild, dem so genannten „time-space-plot“, zusammengefasst (Abb. 2.2). Pro Zelle und Serie wurden 8 Bereiche ausgewählt. Zur Ermittlung der Lamellen Protrusionsdauer wurde der „time-space plot“ mit Hilfe des Computerprogrammes Image Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) analysiert. Ebenso die Anzahl der Bildung von „membrane ruffles“ pro

Zeiteinheit, die Ruffelfrequenz, wurde mit Hilfe des „time space plot“ ausgezählt. Pro Ansatz wurden sechs bis zehn Zellen in drei unabhängigen Experimenten gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Die ermittelten Mittelwerte wurden zusammen mit dem 95% Konfidenzintervall grafisch dargestellt. Signifikanzvergleiche wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Wobei $p < 0,05$ als signifikant und $p < 0,01$ als höchst signifikant angenommen wurde

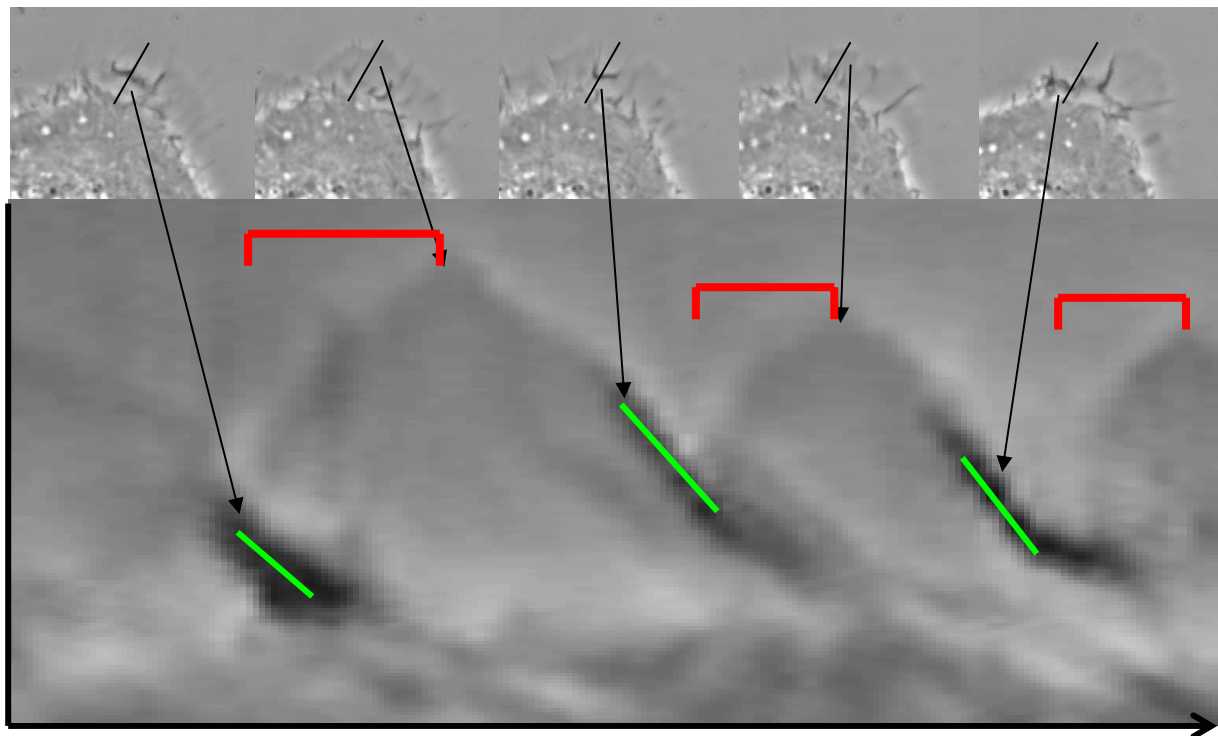


Abbildung 2.2: Darstellung eines „time space plot“, oben: fünf Einzelaufnahmen einer Bilderserie, unten: „time-space-plot“. x-Achse: Zeit, y-Achse: Distanz. Die Aufwärtsbewegungen der Membran stellt im time space plot Lamellipodien Protrusionen, dunklere, abwärts gerichtete Bereiche „membrane ruffles“ dar. Mit Hilfe des „time space plots“ kann so die Dauer einer Lamellen-Protrusion (gerade Linie) und die Häufigkeit von Ruffle-Ereignissen (absteigende Linie) ermittelt werden.

2.2.3.2 Messung der Translokationsgeschwindigkeit

Zur Untersuchung der Migration der Zellen über einen längeren Zeitabschnitt wurden Zeitspannen von zwei bis zu sechs Stunden untersucht. Hierfür wurde das inverse Mikroskop TE2000 (Nikon, Düsseldorf) mit einem 20-fachen Objektiv eingesetzt. Das Mikroskop besitzt neben der Inkubationskammer, die eine konstante Temperatur von 37°C ermöglicht, auch eine Begasungsanlage, bei der eine 5%ige CO₂-Sättigung der

Atmosphäre erreicht wird. Dadurch wird in den längeren Zeiträumen ein konstanter pH-Wert im Medium beibehalten. Die Zellen wurden ebenfalls in Beobachtungskammern ausgesät und eine Stunde vor der mikroskopischen Beobachtung mit 50 nM hEGF stimuliert. Anschließend wurde die Migration für 2 bis 6 Stunden beobachtet. Es wurde alle sechzig Sekunden eine Aufnahme gemacht. Zur Auswertung der Migrationsgeschwindigkeit wurden zwei Bilder in einem zeitlichen Abstand von 15 Minuten mit Hilfe der Software Image-Pro-Plus 4.5 übereinandergelagert und der Zellkern der zu messenden Zellen markiert. Pro Serie wurden alle erkennbar migrierenden Zellen erfasst. Die Strecke, die von einer Zelle in diesem Zeitraum zurückgelegt wurde konnte so ermittelt werden und somit auch die durchschnittliche Geschwindigkeit der Zelle in diesem Zeitraum. Auch hier wurden drei unabhängige Experimente gemessen und mit Hilfe der Statistik-Software SPSS ausgewertet (siehe 2.2.3.1).

2.2.3.3 Ermittlung der Linearität und des Linearitätskoeffizienten

Um über die Migrationsgeschwindigkeit hinaus eine Untersuchung der gerichteten Bewegung einer Zelle zu machen, wurde das Computerprogramm DIAS, Dynamic Image Analysis System (Solltech Inc., Oakdale, IA, USA), verwendet. Hierbei wurden die Umrisse einer Zelle bei aufeinander folgenden Bildern einer Serie markiert. Das Programm erfasste die Strecke und die Richtung der Bewegung, die von einer migrierenden Zelle zurückgelegt wurde. Diese Markierung wurde für definierte Zeitintervalle und Zeitlängen bei weiteren Bildern durchgeführt, wodurch das Computerprogramm die Strecke und die Richtung der Bewegung ermitteln und grafisch darstellen konnte. Zur Quantifizierung der gerichteten Bewegung wurde der Linearitätskoeffizient errechnet. Er ergibt sich aus der Gesamtdistanz zwischen Start- und Endpunkt der migrierenden Zelle und der Gesamtstrecke, die eine Zelle zurückgelegt hat (Distanz: Gesamtstrecke). Bei einer geraden Bewegung zwischen Start und Endpunkt ist der Koeffizient 1,0.

2.2.3.4 Reflektions-Interferenz Mikroskopie

Zur Untersuchung der Kontaktflächen der Zellen zum Untergrund wurden die Zellen wie zuvor beschrieben auf verschiedenen Matrices ausgesät, kultiviert und stimuliert. Mit Hilfe der Reflektions-Interferenz Mikroskopie wurden die Zell Substrat Kontakte untersucht. Bei dieser Technik wird kohärentes, polarisiertes und monochromatisches Licht des LSM eingesetzt. Anschließend wurde eine Einstellung gewählt, bei der der Laserstrahl an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Zelle reflektiert wird. Durch die unterschiedliche Brechung des Lichtes an der Grenzfläche Glas-Medium und Medium-Zellmembran kommt es zu einer Phasenverschiebung des polarisierten Lichtes. Dadurch treten Interferenzeffekte auf, die zu Verstärkung oder Auslöschung des Lichtes kommt. Die Bereiche der Zellen, die unmittelbar Kontakt zu dem Boden haben, erscheinen bei dieser Einstellung als dunklere, die einen weiteren Abstand aufweisen, als hellere Strukturen.

2.2.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf beschichteten Deckgläsern mit einem Durchmesser von 15 mm, oder in beschichteten Nunc-Kammern ausgesät. Die Zellzahl betrug 5.000 Zellen pro cm^2 . Auch hier wurden die Zellen 16-18 Stunden kultiviert und eine Stunde vor der Beobachtung mit hEGF stimuliert. Da die Menge an Laminin 5 defizienten Zellen, die zur Verfügung stand, sehr gering war, wurden teilweise die Beobachtungskammern, die zuvor für die SACED-Analyse eingesetzt wurden, auch für die immuncytochemische Markierung verwendet.

2.2.4.1 Lösungen

Einbettmedium für lichtmikroskopische Präparate

- Fluorosave (Calbiochem, Darmstadt), je ein Tropfen pro Einbettung

G-PBS

- 30 mM Glycin in PBS

Paraformaldehyd 16 % Stammlösung

- 8 g Paraformaldehyd (Fluka, Neu-Ulm) in 45 ml A. bidest bei 60°C im Wasserbad lösen
- 0,1 N Natronlauge tropfenweise zugeben bis die Lösung klar wird
- 1 min im Wasserbad weiterrühren
- Durch Sterilfiltration reinigen und mit A. bidest auf 50 ml auffüllen

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

- 20 mM Na₂HPO₄
- 50 mM NaCl
- pH 7,4

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

- 20 mM TrisHCl
- 145 mM NaCl
- pH 8

Triton X-100

- 10 % Triton X-100 in PBS

Rinder-Serum-Albumin (BSA)

- Stammlösung: 30 % in A. bidest

Zytoskelett-stabilisierender Puffer (CB):

- 150 mM NaCl
- 5 mM MgCl₂
- 5 mM EGTA
- 5 mM Glucose
- 100 mg/l Streptomycin
- 10 mM MES, pH 6,1

2.2.4.2 Durchführung

- kurz waschen mit vorgewärmtem CB
- 30 min bei 37°C in 4 % Paraformaldehyd in CB inkubieren
- 5 min in G-PBS waschen
- 10 min in PBS/0,5 % Triton X-100 Membran extrahieren
- kurz waschen mit PBS/0,1 % Triton X-100
- Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in 3 % BSA/ PBS
- Inkubation mit dem primären Antikörper in PBS für 45 min bei 37°C
- 3 mal 5 min waschen mit PBS
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper in PBS für 45 min bei 37°C
- 2 mal 5 min waschen mit PBS
-

Bei Einbettung:

- waschen mit A. bidest
- Einbettung

2.2.5 Funktionsblockierende Antikörper

Um den Einfluss von Integrin Untereinheiten auf das Migrationsverhalten bei Laminin 5 defizienten Keratinozyten zu untersuchen wurden funktionsblockierende Antikörper gegen $\alpha 2$ Integrin auf Kollagen I beschichteten Kammern und Integrin $\alpha 5$ auf Fibronectin beschichteten Kammern verwendet. Eine Stunde vor Versuchsbeginn wurde mit dem Medienwechsel 50 nM hEGF zugegeben. Gleichzeitig wurde zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen 1% BSA zugesetzt. 30 Minuten vor Versuchsbeginn wurde der funktionsblockierende Antikörper zugegeben. Anschließend erfolgte die SACED-Analyse am konfokalen Mikroskop oder die Langzeitmigrationsstudie am Nikon Mikroskop. Zur Untersuchung des Einflusses von Laminin 5 auf die Migration und Motilität wurde ein funktionsblockierender Antikörper gegen Laminin 5 bei normalen humanen Keratinozyten eingesetzt. Als Kontrolle diente die Inkubation mit BSA ohne Antikörperzugabe.

2.2.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die Migrationsspur von Keratinozyten wurde elektronenmikroskopisch untersucht. Hierfür wurden je 20.000 normale humane oder Laminin 5 defiziente Keratinozyten auf 15mm-Deckgläsern ausgesät und für 16 Stunden kultiviert. Die Deckgläser waren mit Fibronectin beschichtet. Anschließend erfolgte die Stimulation mit 50 nM hEGF für eine Stunde.

Durchführung:

1. Fixierung

- 20 min inkubieren in 2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylat, pH 7,3
- 20 min inkubieren in 0,1 % Tanninsäure
- 2 mal kurz/1 mal 5 min mit A. bidest waschen

2. Kritisch-Punkt Trocknung

Entwässern mit ansteigender Ethanolreihe

- Je 10 min 30; 50; 70; 90 % Ethanol
- 2 mal für 15 min in 100 % Ethanol
- 2 mal für 15 min in 100 % Ethanol, entwässert im Molekularsieb
- 8 mal Ethanol gegen flüssiges Kohlendioxid austauschen

- Kritische-Punkt-Trocknung

Vorbereitung der Probe

- Montage auf Aluminium-Probenteller mit Leitsilber
- Besputterung mit 2 nm Platin/ Palladium im Sputter-Coater (208 HR, Cressington Scientific Instruments Ltd., GB)

2.2.7 Biochemische Analyse der Matrix Bestandteile von HaCaT-Zellen

Zur Bestimmung der von HaCaT-Zellen sezernierten Proteine wurde die gebildete Matrix nach Ablösen der Zellen mit Hilfe von Immunoblots auf Laminin 5 untersucht.

2.2.7.1 Schonende Ablösung der Zellen

HaCaT-Zellen, die konfluent gewachsen waren, wurden mit 10 mM EDTA/PBS-Puffer 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch kräftiges auf- und abpipettieren abgelöst. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde solange gespült, bis alle Zellen abgelöst waren. Auf die Zellkulturplatte wurden dann 200 µl 4fach- Probenpuffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) pipettiert, Mit einem Zellschaber wurden dann die Proteine, die auf der Platte waren, abgeschabt und gesammelt.

2.2.7.2 SDS-PAGE

Die Proteine wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden Bis-Tris-Gradientengele von 4% bis 12% (NuPAGE Bis-Tris Gel, Invitrogen) verwendet. Diese Gele bieten bei Proteinen mit höherem Molekulargewicht eine bessere Auftrennung als Gele mit einer einheitlichen Dichte. Es wurden je 20 µl der Proben verwendet, zu denen zuvor noch 2,5 µl Reducing Agent (Invitrogen) hinzugegeben wurde. Anschließend wurde die Probe bei 80°C für 10 Minuten denaturiert und auf dem Gel aufgetragen. Der Gellauf fand in MES-Puffer (Invitrogen) für 1,5 Stunden bei einer Spannung von 200 Volt statt.

2.2.7.3 Western-Blot:

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden im Elektrobplotverfahren auf Nitrocellulose transferiert. Das Gel wurde luftblasenfrei auf eine in Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt. Neben dem Gel und der Membran befand sich je ein Filterpapier, das ebenfalls in Transferpuffer getränkt war. Der Transfer fand bei 30 Volt statt, die Transferzeit betrug 35 Minuten.

2.2.7.4 Immunoblot

Der Blot wurde für 2 Stunden in 0,1% Tween, 5% Milchpulver in PBS bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde mit dem primären Antikörper in 0,1% Tween/PBS + 5% Milchpulver über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 0,1% Tween/PBS wurde der Blot mit dem sekundären Antikörper für 2 Stunden inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten in 0,1% Tween/PBS wurde der Blot mit einer 1:1 Lösung der Komponenten 1 und 2 des ECL-Kits (Amersham, Freiburg) für eine Minute inkubiert. Danach wurde ein Röntgenfilm auf dem Blot belichtet und entwickelt.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Laminin 5 defiziente Keratinozyten anhand ihrer morphologischen und migratorischen Eigenschaften *in vitro* charakterisiert. Diese Zellen waren von einem Patienten mit der Erkrankung Epidermolysis Bullosa, bei der die Basalmembranzzone der Haut keine Adhärenz zwischen Dermis und Epidermis herstellen kann. Es konnte hier eine Mutation in der β 3-Kette des Laminin Gens festgestellt werden, wodurch ein Basentriplet, das ein Arginin kodierte, in ein Stop-Codon umgewandelt ist (R635X), was zu einem Abbruch der Translation führte. Dadurch fehlt die β 3-Kette und ein Assemblieren des Laminin 5 Heterotrimer findet nicht statt (Nakano et al., 2002). Diese verwendeten Zellen werden im Folgenden als R635X bezeichnet. Als Kontrolle wurden normale humane Keratinozyten (NHK), die aus Vorhautreduktionen gewonnen wurden, eingesetzt. Die Zellen wurden auf verschiedenen Komponenten der dermalen extrazellulären Matrix (ECM) sowie auf Proteinen der epidermalen Basalmembran der Haut kultiviert. Neben dem Vergleiches der Migrationsart und Morphologie wurde auch die Migrationsspur der Zellen analysiert. In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von Integrin - Untereinheiten auf die Migration von Laminin 5 defizienten Keratinozyten auf verschiedenen Matrices untersucht.

3.1 R635X Zellen sezernieren kein Laminin 5

Zum Nachweis der Laminin 5 Defizienz wurde eine Immunmarkierung mit Antikörpern gegen humanes Laminin 5 durchgeführt. Zur Darstellung des filamentösen Aktins wurde gleichzeitig mit Fluorochrom gekoppeltem Phalloidin gefärbt. Die Zellen waren auf einer Fibronectinmatrix ausgesät und eine Stunde vor Fixierung mit hEGF stimuliert worden. Wildtyp-Keratinozyten zeigten ein starkes Signal von Laminin 5 unterhalb der Zelle und in Form einer Migrationsspur hinter der Zelle (Abbildung 3.1a, c). Laminin 5 defiziente Zellen zeigten ein in der Intensität stark verringertes und auf den Bereich des Zellkörpers beschränktes Signal (Abb. 3.1 e, g). Da der verwendete Antikörper polyklonal und gegen alle drei Ketten von Laminin 5 reaktiv war, handelte es sich hierbei wahrscheinlich um die Markierung der α 3 oder γ 2 Kette von Laminin. Die Bildung der α 3 und γ 2 Kette von Laminin ist in den

R635X Zellen durch die Mutation nicht gestört, so dass die einzelnen Ketten in der Zelle vorhanden sein können. Jedoch war außerhalb der Zelle in der Migrationsspur keine Laminin 5 Detektion möglich. Dies war ein Hinweis darauf, dass kein Laminin 5 sezerniert wurde.

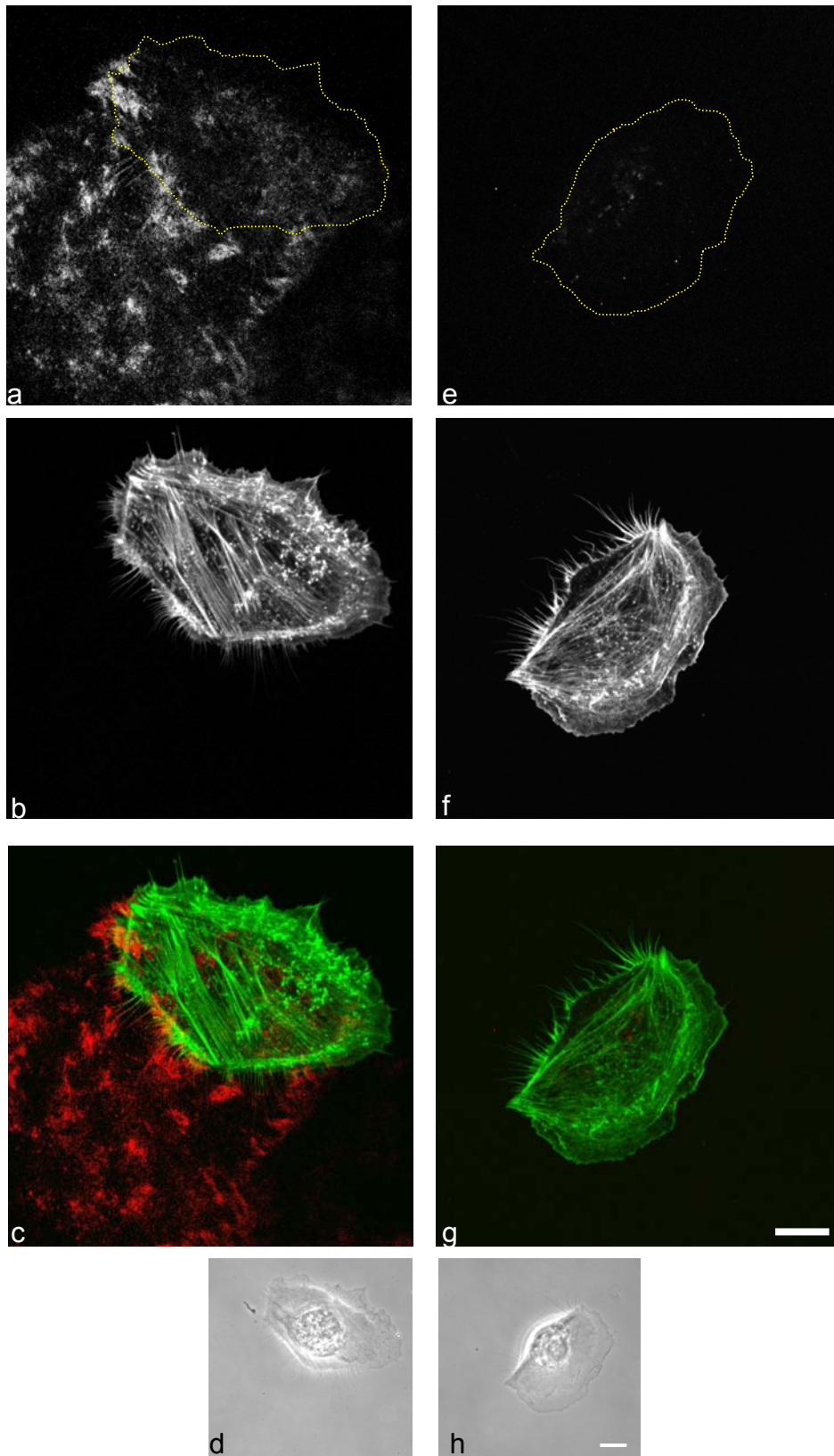


Abbildung 3.1: Immunocytochemische Markierung von Laminin 5 (a, e) und Aktin (b, f) bei NHK (a-d) und R635X Zellen (e-h) auf Fibronektin. NHK sezernierten Laminin 5 und hinterließen es in der Migrationsspur und unterhalb der Zelle (a, c). Defiziente Zellen zeigten dagegen nur eine sehr schwache Markierung im Bereich des Zellkernes (e, g). Gelbe Linie: Umriss der Zelle, Balken: 10 μ m.

3.2 Die HaCaT-Matrix als natives Substrat

Migrierende Keratinozyten sezernieren verschiedene ECM Proteine, die während der Wundheilung als provisorische Matrix für nachfolgende Zellen dienen kann. Die verwendete Matrix der HaCaT-Zellen stellt alle von diesem Zelltyp sezernierten Proteine bereit und diente als native Form einer *in vitro* Matrix. Mit Hilfe von Immunoblot-Analysen der gebildeten Matrix wurden einzelne sezernierte Proteine identifiziert. Neben β 4-Integrin, das einen Bestandteil des hemidesmosomalen Komplexes der basalen Keratinozyten darstellt, konnten auch verschiedene Laminin Komponenten erkannt werden: Sowohl die unprozessierte Form von Laminin α 3 (200 kDa), als auch die Laminin β 3 Kette (145 kDa) wurden detektiert. Die Laminin γ 2-Kette konnte in der prozessierten Form (105 kDa), nicht jedoch in der unprozessierten Form detektiert werden (Abb. 3.2).

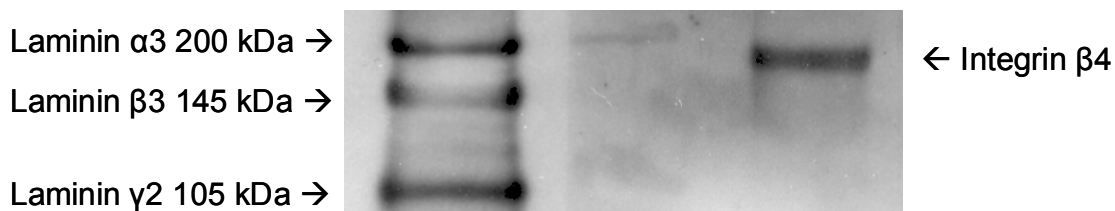


Abbildung 3.2: Immunoblot der von HaCaT-Zellen sezernierten Matrix. Die einzelnen Ketten von Laminin 5 konnten detektiert werden, wobei Laminin γ 2 in der prozessierten Form (105 kDa) vorkam. Ebenso konnte β 4-Integrin detektiert werden.

3.3 Morphologie Laminin 5 defizienter Zellen während der Migration

3.3.1 Einzellzellanalyse

Die Zellen wurden nach der Aussaat in Beobachtungskammern über einen Zeitraum von 16 bis 20 Stunden kultiviert und anschließend eine Stunde vor der Mikroskopie mit 50nM hEGF stimuliert. Die Analyse fand am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) statt. Migrierende NHK wiesen eine charakteristische polarisierte Morphologie auf. Am vorderen Ende der Zelle bildete sich eine Lamelle mit Lamellipodien und Filopodien aus (Abb. 3.3 a). In den Bilderserien konnte deutlich

die vorwärts gerichtete Bewegung der Lamelle, ebenso wie die rückwärts gewandte Bewegung von „membrane ruffles“, die als kontrastreichere, dunklere Strukturen auf der Lamelle erkennbar waren, beobachtet werden (Filme „NHKfn_LSM, NHKhac_LSM, NHKco1_LSM, NHKco4_LSM“.avi). Am hinteren Ende der Zelle traten charakteristische Retraktionsfasern auf. Auf allen verwendeten Matrices war diese Morphologie bei NHK erkennbar (Abb. 3.3 a-e). R635X-Zellen zeigten diese Monopolarität dagegen lediglich auf Fibronectin und der HaCaT-Matrix (Abb. 3.3 f, g, Filme „R635Xfn_LSM.avi“, „R635Xhac_LSM.avi“). Auf Kollagen I und IV war dagegen eine veränderte Morphologie zu erkennen: auf Kollagen I besaßen R635X-Zellen zwei oder mehr Lamellen mit Protrusionsaktivität und Ruffle-Bildung, wobei keine Retraktionsfasern gebildet wurden (Abb. 3.3 h, Film „R635Xco1_LSM.avi“). Auf Kollagen IV waren ebenfalls mehrere Lamellen zu erkennen, aber auch Bereiche, an denen Retraktionsfasern erkennbar waren (Abb. 3.3 i, Film „R635Xco4_LSM.avi“). Auf Glas war eine multipolarität zu beobachten, bei der weder ausgeprägte Lamellen, noch Retraktionsfasern gebildet wurden (Abb. 3.3 j, Film „R635Xgl_LSM.avi“).

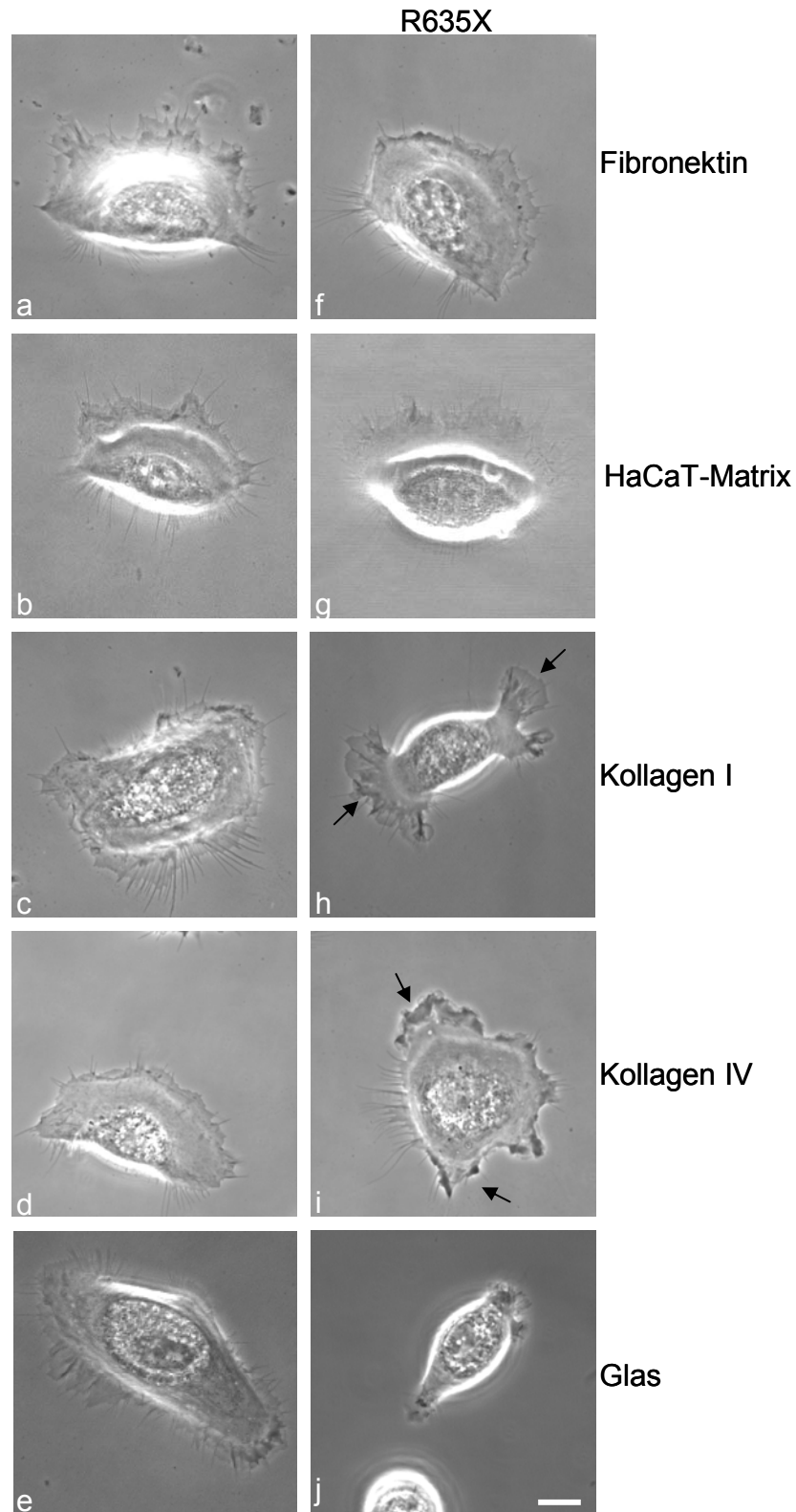


Abbildung 3.3: Phasenkontrastaufnahmen von migrierenden NHK (a-e) und R635X-Zellen (f-j) auf verschiedenen Substraten. NHK zeigten auf allen Substraten eine Polarität mit einem deutlich erkennbaren Vorder- und Hinterende. R635X-Zellen wiesen diese Unipolarität auf Fibronectin und HaCaT-Matrix (f, g) auf. Auf Kollagen I und Kollagen IV zeigten sie dagegen eine Bi-, bzw. Tripolarität mit mehreren Lamellensäumen (schwarze Pfeile) (h, i). Auf Glas hatten R635X-Zellen keine Polarität (j). Balken: 10 μm

3.3.2 Langzeitbeobachtung der migrierenden Zellen

In weiteren Analysen wurden Zellen mit Hilfe eines inversen Mikroskopes mit Inkubationskammer und CO₂ Begasung beobachtet. Dieses Mikroskop ermöglichte eine gleich bleibende Temperatur von 37°C und einen konstanten CO₂ Partialdruck von 5%, womit der pH-Wert des Mediums auf physiologisch optimalem Zustand gehalten wurde. Dadurch konnten Beobachtungszeiträume von mehr als einer Stunde erreicht werden und die Migration der Zellen beobachtet werden. Auch hier konnte sowohl bei NHK als auch bei R635X-Zellen auf Fibronektin und auf der HaCaT-Matrix eine monopolare Form beobachtet werden (Abb. 3.4). Die Bewegung beider Zelltypen erschien deutlich gerichtet und gleichförmig (Film „NHKfn_lang.avi“, „NHKhac_lang.avi“, „R635Xfn_lang.avi“ und „R635Xhac_lang.avi“).

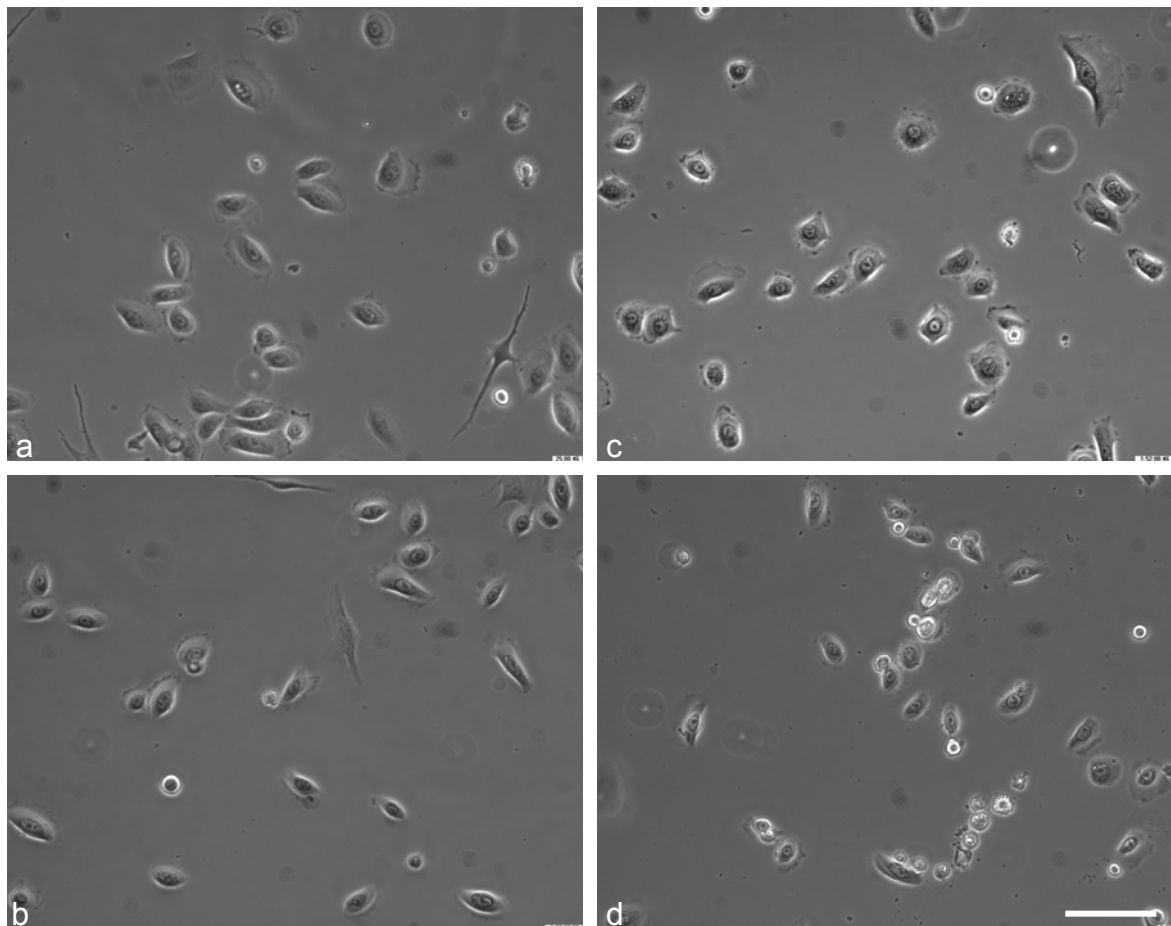


Abbildung 3.4: Übersichtsaufnahmen von migrierenden NHK (a, b) und R635X-Zellen (c, d). Beide Zelltypen zeigten auf Fibronektin (a, c) und HaCaT-Matrix (b, d) eine unipolare Form. Balken: 100 µm

Auf Kollagen I und IV waren bei R635X-Zellen viele bi- oder tripolare Formen vorhanden (Abb. 3.5), wohingegen NHK weiterhin eine monopolare Form zeigten. Auch die Bewegung von NHK erfolgte in einer gleichförmigen und gerichteten Art mit nur geringen Schwankungen der Geschwindigkeit („NHKco1_lang.avi“ und „NHKco4_lang.avi“). R635X-Zellen wiesen dagegen einen deutlichen Unterschied auf: Neben der bi- oder tripolaren Form (Abb. 3.5 c und d) fiel hier ein Wechsel zwischen Phasen sehr geringer Bewegung und nahezu keiner erkennbaren Migration mit sprunghaften Bewegungen auf, die dann auftraten, wenn eines der beiden Zellenden den Kontakt zum Untergrund verlor und in die Richtung des noch adhärenen Endes zog (Film „R635Xco1_lang.avi“ und R635Xco4_lang.avi“).

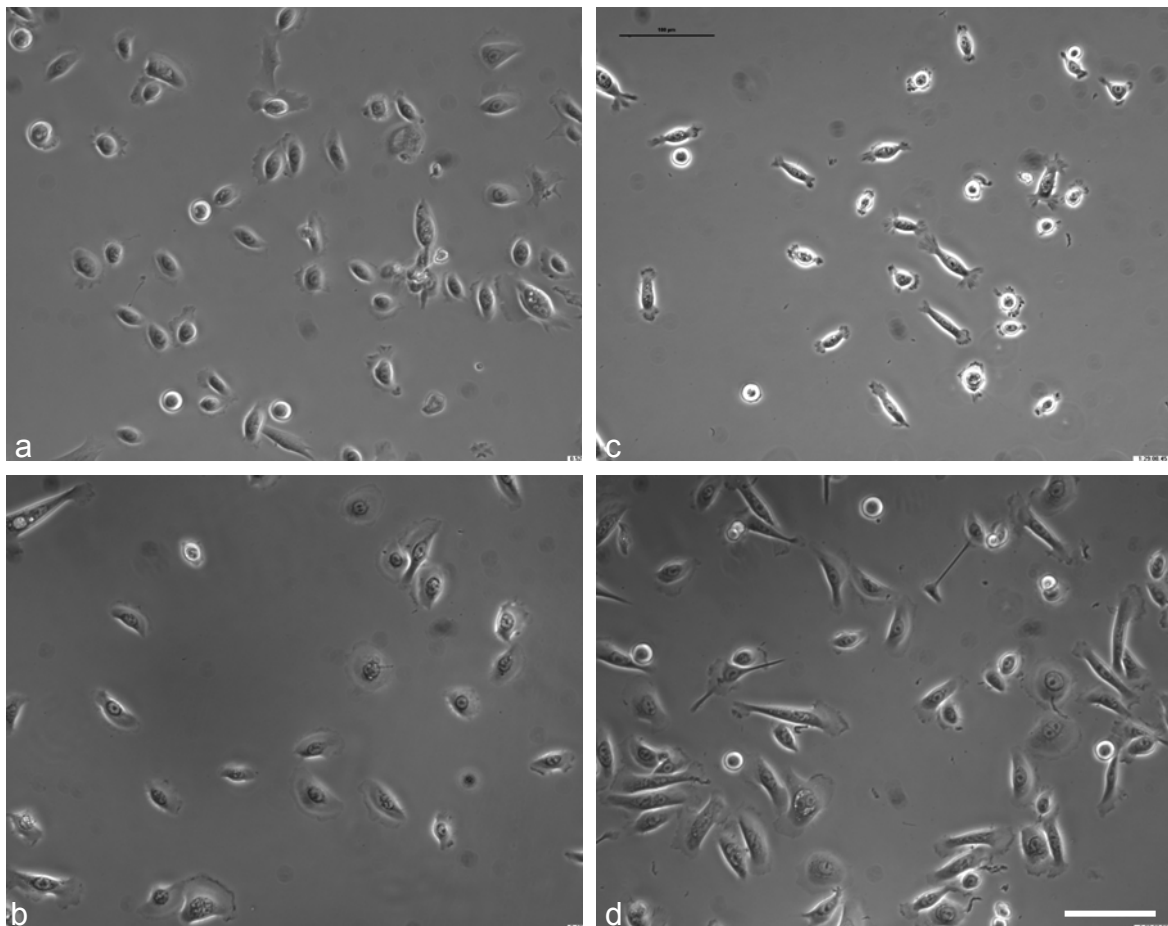


Abbildung 3.5: Übersichtsaufnahmen von migrierenden NHK (a, b) und R635X-Zellen (c, d). NHK zeigten auf Kollagen I (a) und IV (b) eine monopolare Form. R635X-Zellen wiesen auf Kollagen I (c) fast ausschließlich eine lang gestreckte Form mit zwei oder drei Lamellen auf. Auf Kollagen IV (d) sind neben monopolaren viele lang gestreckte und bi- oder tripolar erscheinende Zellen zu erkennen. Balken: 100 μm

3.4 Verändertes Bewegungsmuster der Laminin 5 defizienten Keratinozyten

NHK, sowie R635X-Zellen auf Fibronektin und der HaCaT-Matrix zeigten eine Bewegung, die sich durch geringe Schwankungen in der Migrationsgeschwindigkeit auszeichnete. Ebenso schien die direktionale Persistenz der Migration hoch zu sein, was bedeutet, dass diese Zellen eine Bewegungsrichtung längere Zeit beibehielten. R635X-Zellen auf den beiden Kollagen Matrices zeigten dagegen eher eine sprunghafte und saltatorische Bewegung. Die Direktionale Persistenz der Migration schien geringer. Die Bewegungsform der Zellen wurde nun mit den Parametern der Linearität der Bewegung und der kontinuierlichen Messung der Migrationsgeschwindigkeit quantitativ, bzw qualitativ analysiert.

3.4.1 Direktionale Persistenz der Migration

Die direktionale Persistenz der Migration zeigt die gerichtete Bewegung einer migrierenden Zelle. Mit Hilfe des Direktionalitäts-Koeffizienten kann das Maß angegeben werden, inwieweit Zellen gerichtet migrieren und eine eingeschlagene Richtung beibehielten. Der Koeffizient setzt sich zusammen aus der Distanz vom Startpunkt (D) und der Gesamtstrecke (G), die eine Zelle zurückgelegt hat. Eine Gerade zwischen Start und Endpunkt hat hierbei den Koeffizienten 1 ($D = G$, daraus ergibt sich $D : G = 1$). Migrierende Zellen haben meistens einen Koeffizienten < 1 , da sich Zellen nicht in einer komplett linearen Form bewegen. Die Messungen der zurückgelegten Strecken wurden mit Hilfe des Programmes DIAS (Solltech Inc., Oakdale, IA, USA) durchgeführt. Dazu wurde eine Bilderserie aus der Videomikroskopie, die 60 Minuten umfasste, genutzt. Auf jedem dritten Bild wurde die Position des Zellkernes einer Zelle markiert. Diese Markierungen wurden anschließend von der Software zu einer Linie vervollständigt, um den zurückgelegten Weg zu illustrieren. Ebenso konnte mit dieser Software der Linearitätskoeffizient berechnet werden. In Abbildung 3.6 sind exemplarisch gemessene Strecken von NHK und R35X-Zellen auf Fibronektin und Kollagen I dargestellt. NHK bewegten sich in einer gerichteten Form mit wenigen und in der Intensität geringen Richtungsänderungen (Abb. 3.6 a, b). R635X-Zellen zeigten auf Fibronektin ebenfalls diese Bewegungsform (Abb. 3.6 c). Auf Kollagen I hingegen waren starke

Richtungsänderungen zu erkennen (Abb. 3.6 d). Zum Teil hatten migrierende Zellen am Ende der Messung den Ausgangspunkt vom Anfang der Migrationsbeobachtung fast wieder erreicht.

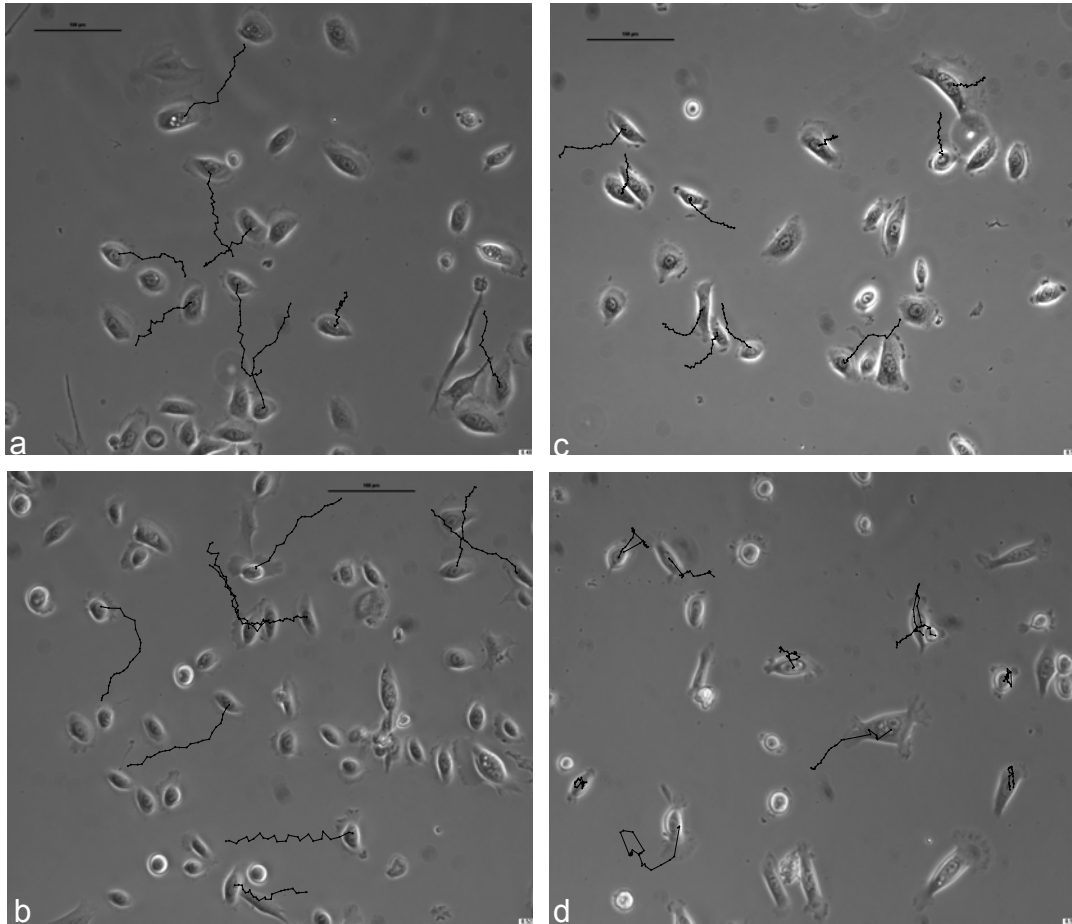


Abbildung 3.6: Exemplarische Darstellung der gemessenen Strecken (schwarze Linien) für NHK (a, b) und R635X-Zellen (c, d) auf Fibronectin (a, c), bzw. Kollagen I (b, d). Die Bilderserie von 74 Bildern umfasste den Zeitraum von einer Stunde. Die Position der Zelle wurde in jedem dritten Bild der Serie markiert. Das Programm „DIAS“ kreierte die Wegstrecken. Die einzelnen Linien repräsentieren die Strecke, die von der markierten Zelle zurückgelegt wurde. Startpunkt ist das hier dargestellte erste Bild der Serie. Balken: 100µm

Abbildung 3.7 zeigt exemplarisch den Wanderungsverlauf einiger Zellen auf den untersuchten Matrices. Bei dieser Abbildung wurden die Anfangspunkte der Strecken auf einen gemeinsamen Startpunkt in der Mitte gelegt. Die zurückgelegten Distanzen lagen bei NHK jeweils in einem Radius von 50 bis 70 µm. Auch die Direktionalität der Migration schwankte nur geringfügig (Abb. 3.7 a-d). Die Strecken, die von R635X-Zellen zurückgelegt wurden, waren auf allen vier untersuchten Matrices kürzer als

die vergleichbaren Strecken der NHK. Die Direktionalität war aber auf Fibronectin und HaCaT-Matrix ähnlich groß (Abb. 3.7 e und f), dagegen auf Kollagen I und IV deutlich reduziert (Abb. 3.7 g und h). Die Zellen änderten häufiger und deutlich stärker ihre Migrationsrichtung. Änderungen von 90° und mehr traten häufig auf. Die quantitative Auswertung des Direktionalitäts-Koeffizienten zeigte, dass R635X-Zellen auf Fibronectin und HaCaT-Matrix keinen signifikanten Unterschied (Mann Whitney U-Test; $p > 0,05$) zu NHK auf den gleichen Matrices aufwiesen. Er betrug hier für R635X-Zellen auf Fibronectin 0,7098 ($\pm 0,17$) im Vergleich zu NHK mit 0,7753 ($\pm 0,1084$). Auf der HaCaT-Matrix war der Koeffizient für R635X-Zellen 0,6908 ($\pm 0,1268$) und für NHK 0,7674 ($\pm 0,096$). Deutliche Unterschiede ergaben sich hier zwischen NHK und R635X-Zellen auf Kollagen I und IV. Auf beiden Matrices war ein höchst signifikant geringerer Koeffizient für R635X-Zellen zu verzeichnen (Mann Whitney U-Test; $p < 0,01$). Während NHK auf Kollagen I einen Wert von 0,8489 ($\pm 0,0752$) hatte, war er bei R635X-Zellen nur noch 0,2735 ($\pm 0,2484$). Auch auf Kollagen IV war dieses Bild zu beobachten. NHK hatten einen Koeffizienten von 0,8501 ($\pm 0,0661$), R635X-Zellen von 0,4286 ($\pm 0,2302$) (Abbildung 3.8).

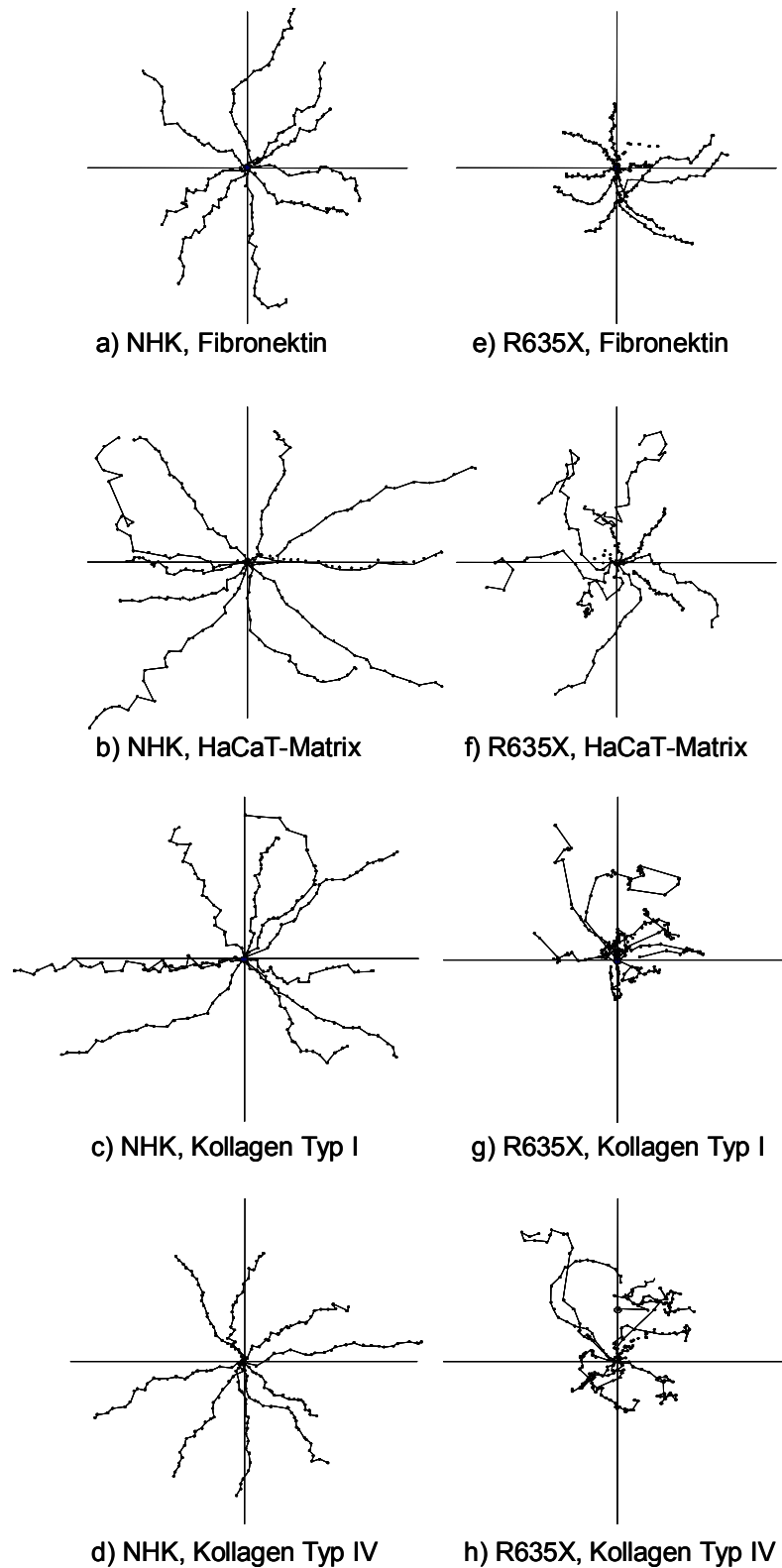


Abbildung 3.7: Exemplarische Darstellung der Wanderungstrecken von NHK (a-d) und R635X-Zellen (e-h). Die Startpunkte der Messung wurden auf die Mitte des Achsenkreuzes gelegt. Die zurückgelegten Distanzen waren bei NHK größer als bei R635X-Zellen, die Richtungspräferenz unterschied sich auf Fibronektin (a, e) und der HaCaT-Matrix (b, f) nicht. Auf Kollagen I (c, g) und IV (d, h) waren sowohl die Distanzen als auch die Richtungspräferenz der Bewegungen bei R635X-Zellen deutlich geringer.

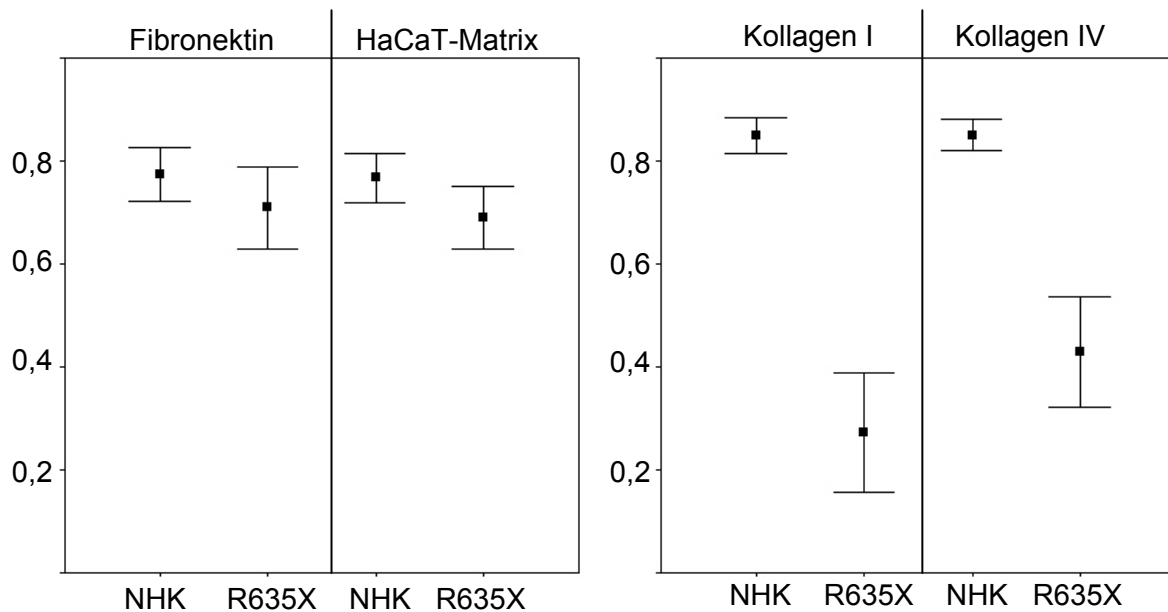


Abbildung 3.8: Direktionalitätskoeffizient von NHK und R635X-Zellen auf Fibronectin und der HaCaT-Matrix (links) sowie Kollagen I und IV (rechts). Es war kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney U Test; $p > 0,05$) auf Fibronectin und der HaCat-Matrix, dagegen ein höchst signifikant geringerer Koeffizient (Mann-Whitney U-Test; $p < 0,01$) auf Kollagen I und IV zu erkennen.

3.4.2 Kontinuierliche Messung der Migrationsgeschwindigkeit

Die zuvor beschriebenen Migrationsphänomene der R635X-Zellen auf den Kollagen Matrices zeigten sich besonders deutlich bei einer kontinuierlichen Messung der Migrationsgeschwindigkeit. Zur Ermittlung der durchschnittlichen Translokationsgeschwindigkeit von Zellen werden normalerweise aus Bilderserien einzelne Bilder mit einem definierten zeitlichen Abstand herangezogen. Der Abstand ist dabei zumeist zwischen 10 und 20 Minuten. Zur genauen Darstellung der sprunghaften Bewegung der R635X-Zellen wurde aber ein engeres Zeitraster gewählt. Hierfür wurde aus den Bilderserien der Langzeitanalysen die zurückgelegte Distanz der Zellen in einem zeitlichen Abstand von einer Minute gemessen. Die Gesamtzeit der Messung umfasste eine Stunde. Es wurde anschließend nicht eine Mittelung der gemessenen Werte durchgeführt, sondern die Geschwindigkeiten einer Zelle

aufgetragen, um die saltatorische Bewegung mit der einhergehenden starken Geschwindigkeitszunahme sichtbar zu machen. Es handelte sich hierbei also um eine Einzelzell-Analyse, bei der die tatsächliche Momentangeschwindigkeit einer Zelle dargestellt wurde. Auch hier ergab sich eine ähnliche Geschwindigkeitcharakteristik bei dem Vergleich von NHK und R635X-Zellen auf Fibronectin und der HaCaT-Matrix (Abbildung 3.9, oben). Auf den beiden Kollagen-Matrices hingegen zeigte sich eine für den Zeitraum von zwei bis fünf Minuten deutlich gesteigerte Geschwindigkeit bei R635X-Zellen (Abb. 3.9 unten). Diese Geschwindigkeitsspitzen erschienen zeitgleich mit dem in den Filmen sichtbaren Ablösen eines Lamellenendes der bipolaren Zellen. In diesem Moment wurde das abgelöste Ende in die Richtung des noch verbliebenen adhärennten Endes gezogen. Dieser Vorgang lief sehr schnell ab, so dass in dem kurzen Zeitraum eine hohe Translokationsgeschwindigkeit entstand.

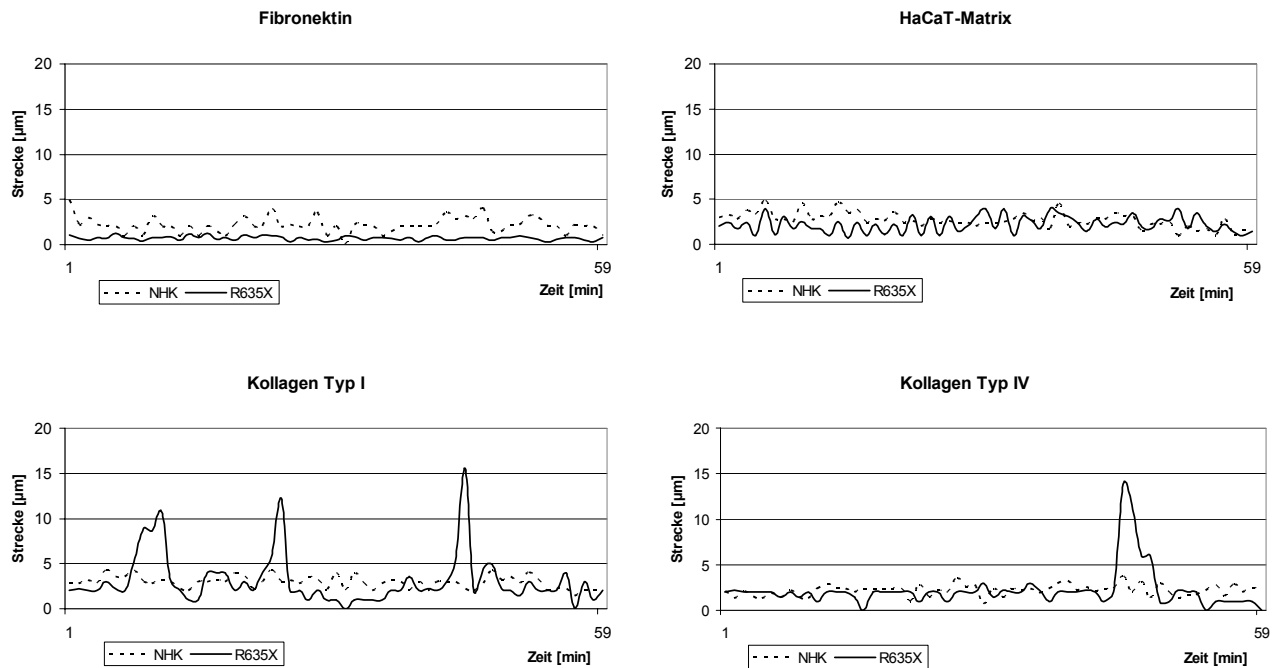


Abbildung 3.9: Zurückgelegte Strecke von NHK und R635X-Zellen innerhalb von 60 Minuten. Auf Fibronektin und der HaCaT-Matrix betrug die zurückgelegte Strecke pro Minute 0 bis 3 μm , für R635X-Zellen zwischen 1 und 5 μm bei NHK. Für NHK war dies auch auf Kollagen I und IV zu erkennen. Für R635X hingegen war die zurückgelegte Strecke pro Minute zwischen 0 und 16 μm auf Kollagen I und 0 bis 14 μm pro Minute auf Kollagen IV. Diese hohen Geschwindigkeiten traten in einem sehr kurzen Zeitraum zwischen 2 und 4 Minuten auf, gefolgt von längeren Phasen mit sehr geringer Geschwindigkeit.

3.5 Zusammenfassung der morphologischen und migratorischen Untersuchung

R635X-Zellen zeigten unterschiedliche Charakteristika in Morphologie und Migrationsform auf den verschiedenen Matrices. Auf Fibronektin entsprach die Morphologie den NHK. Auch in der Direktionalität der Migration ergab sich kein signifikanter Unterschied, die R635X-Zellen bewegten sich ähnlich gerichtet wie NHK. Diese Ergebnisse trafen auch für die HaCaT-Matrix zu. Auch hier war eine mit NHK vergleichbare monopolare Form zu erkennen, die Linearität der Bewegung unterschied sich nicht signifikant. Die Geschwindigkeit der migrierenden Zellen war in allen Fällen konstant und mit geringen Steigerungen oder Verringerungen. Unterschiede in Morphologie und Bewegung waren dagegen auf den beiden untersuchten Kollagen Matrices zu erkennen. Sowohl auf Kollagen I, als auch auf

Kollagen IV besaßen die R635X-Zellen eine lang gestreckte Form. Während NHK auf allen Substraten ein vorderes Ende mit nur einer Lamelle besaßen, hatten R635X-Zellen auf Kollagen I und IV zwei oder mehr Pole mit Lamelle. Das bei NHK klar zu erkennende hintere Ende mit Retraktionsfasern trat bei defizienten Zellen entweder gar nicht auf, oder es zeigten sich mehrere Bereiche an der Zelle, an denen Retraktionsfasern entstanden. Die Migration von R635X-Zellen auf Kollagen I und IV erfolgte in einer saltatorischen Form. Es ergaben sich dabei kurzzeitig sehr hohe Translokationsgeschwindigkeiten, gefolgt von zeitlich längeren Phasen, in denen die Zellen langsam oder gar nicht migrierten. Die Direktionalität der Bewegung war höchst signifikant geringer als bei den vergleichbaren NHK. R635X-Zellen auf Glas zeigten keine Polarität und sie besaßen weder erkennbare Retraktionsfasern, noch deutliche Lamellen. Neben dieser Multipolarität wiesen sich die defizienten Zellen hier durch kaum erkennbare Migration aus, daher war eine Analyse der direktionalen Persistenz der Migration nicht möglich.

Matrix	Polarität	Migrationsform	Direktionalität
Fibronectin	Monopolar	Normal	Normal
HaCaT-Matrix	Monopolar	Normal	Normal
Kollagen I	Bi oder tripolar	Saltatorisch	Verringert
Kollagen IV	Bi oder tripolar	Saltatorisch	Verringert
Glas	Multipolar	Keine Migration	---

Tabelle 3.1: Morphologische und migratorische Veränderungen bei R635X-Zellen im Vergleich zu NHK. Auf Fibronectin und der HaCaT-Matrix war die größte Übereinstimmung zwischen beiden Zelltypen zu erkennen, auf den Kollagen Matrices waren sowohl Morphologie als auch Bewegungsart verändert. Auf Glas waren die größten Unterschiede zu erkennen. Neben der nicht mehr erkennbaren Polarität war nur eine nahezu nicht messbare Migration der Zellen zu erkennen.

3.6 Quantitative Analyse der Migration Laminin 5 defizienter Zellen

3.6.1 Translokationsgeschwindigkeit

Zur Untersuchung der durchschnittlichen Geschwindigkeit der migrierenden Zellen wurden Zellen auf den verschiedenen Matrices in einem Zeitraum zwischen einer und sechs Stunden beobachtet. Es wurde in jeweils drei Ansätzen die Geschwindigkeit der erkennbar migrierenden Zellen ermittelt, indem jeweils die Strecken, die eine Zelle innerhalb von 15 Minuten zurückgelegt hatte, gemessen wurden. NHK zeigten auch bei dieser Langzeitanalyse auf allen Matrices eine polare Morphologie und bewegten sich gleichförmig in einer gerichteten Weise. R635X-Zellen wiesen auch die charakteristische Morphologie auf den unterschiedlichen Matrices auf. Die zuvor beschriebene veränderte Morphologie von R635X-Zellen auf Kollagen I und IV konnte auch hier festgestellt werden. Die Translokationsgeschwindigkeit der defizienten Zellen war auf allen untersuchten Matrices im Vergleich zu NHK geringer. R635X-Zellen, die auf Fibronectin gewandert waren, hatten eine um ca. 50% geringere Migrationsgeschwindigkeit. Während NHK mit einer Geschwindigkeit von $1,07 (\pm 0,54) \mu\text{m}/\text{min}$ migrierten, war die durchschnittliche Geschwindigkeit der defizienten Zellen $0,58 (\pm 0,42) \mu\text{m}/\text{min}$ (Abb. 3.10 a). Auf der von HaCaT Zellen gebildeten Matrix war die Durchschnittsgeschwindigkeit von NHK von allen untersuchten Matrices mit $1,83 (\pm 0,74) \mu\text{m}/\text{min}$ am höchsten. R635X-Zellen hatten hier eine deutlich höhere Geschwindigkeit als auf Fibronectin, waren aber mit $1,16 (\pm 0,6) \mu\text{m}/\text{min}$ um ca. 40% langsamer als NHK (Abbildung 3.10 a). Auch auf Kollagen I und IV waren die Durchschnittsgeschwindigkeiten der defizienten Zellen höchst signifikant (Mann-Whitney, U-Test; $p < 0,01$) niedriger. Sie betrug auf Kollagen I $0,63 (\pm 0,44) \mu\text{m}/\text{min}$ im Vergleich zu $1,23 (\pm 0,76) \mu\text{m}/\text{min}$ bei NHK. Auf Kollagen IV war die geringste Abnahme der Geschwindigkeit zu erkennen. Während NHK mit $1,48 (\pm 0,53) \mu\text{m}/\text{min}$ migrierten, waren R635X-Zellen mit $1,27 (\pm 0,6) \mu\text{m}/\text{min}$ noch höchst signifikant langsamer, die Reduktion der Geschwindigkeit war aber mit ca. 10% am geringsten (Abbildung 3.10 b)

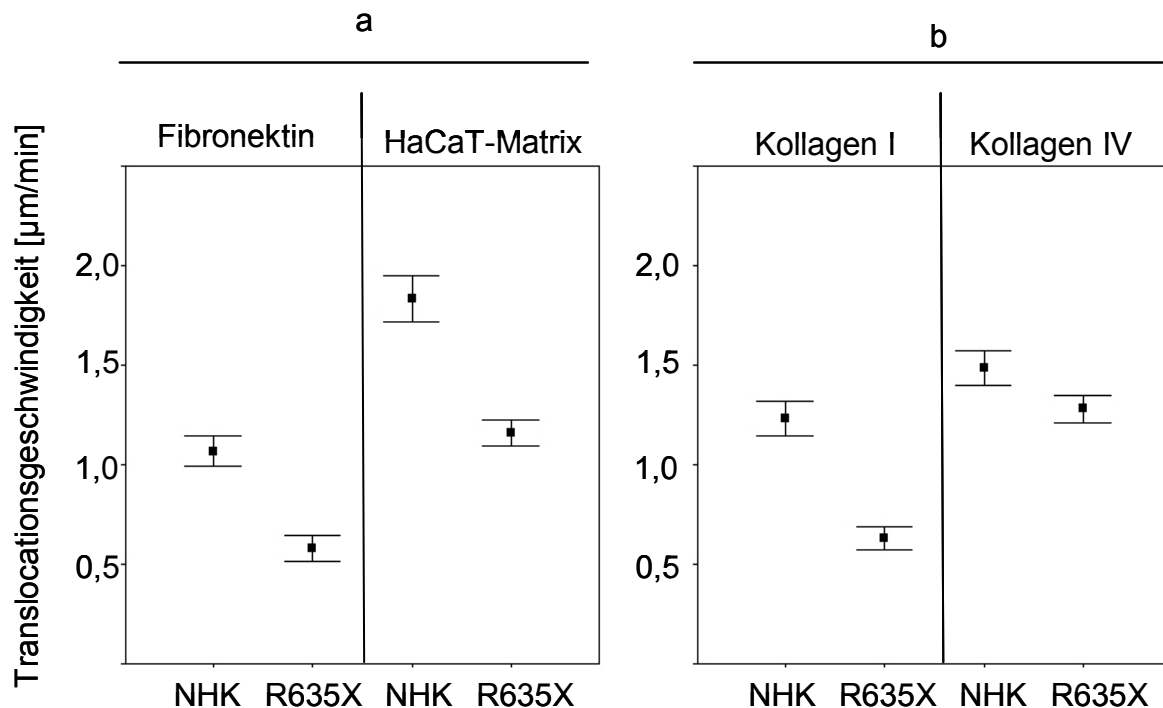


Abbildung 3.10: Durchschnittliche Translokationsgeschwindigkeit von NHK und R635X-Zellen auf Fibronektin und HaCaT-Matrix (a), sowie Kollagen I und Kollagen IV (b). R635X-Zellen waren auf allen Matrices langsamer als NHK und zeigten auf Kollagen I und Fibronektin die geringsten Translokationsgeschwindigkeiten. Auf der HaCaT-Matrix ist ebenso eine höchst signifikant geringere Geschwindigkeit zu erkennen. R635X-Zellen bewegten sich auf dieser Matrix so schnell wie NHK auf Fibronektin oder Kollagen I. Der geringste Unterschied zwischen NHK und R635X-Zellen war auf Kollagen IV zu erkennen, blieb aber höchst signifikant (Mann-Whitney U-Test; $P < 0,01$).

3.6.2 Untersuchung der Lamellendynamik mit Hilfe des SACED Assay

Migrierende Zellen durchlaufen einen Zyklus aus verschiedenen Einzelschritten, die mit der Membranprotrusion am vorderen Ende durch Aktin-Polymerisation beginnt. Diese Lamellenprotrusion, insbesondere die Dauer der Protrusion, ist ein Maß für die Effektivität der Migration. Die retrograde Bewegung der Membran, die auf der Oberseite einer Lamelle als gefaltete Form erscheint wird als „Membrane Ruffle“ bezeichnet. Hierbei werden Teile der Membran wieder Richtung Zellkörper transportiert. Dieser Rücktransport tritt auf, wenn Lamellipodien aufgrund unzureichender Adhäsion vom Substrat abgelöst werden. Die Häufigkeit dieses Ereignisses ist ebenfalls charakteristisch für die Effektivität der Migration. Diese Parameter der Lamellendynamik können mit Hilfe des SACED Assays („stroboscopic analysis of cell dynamic“) quantitativ analysiert werden. Mit Hilfe hochauflösender

Phasenkontrast-Videomikroskopie an einem konfokalen Mikroskop wurden hierfür Bilderserien von migrierenden Zellen in einem Zeitraum von je 10 Minuten erstellt. Die Bilder wurden in einem Intervall von zwei Sekunden aufgenommen. Zur Analyse wurden in den Bilderserien Bereiche markiert, die eine Lamellendynamik aufwiesen. Diese ein Pixel breiten Linien wurden von dem Programm „Optimas“ mit Hilfe von Makroroutinen auf alle Bilder der Serien gelegt und anschließend in einem „time space plot“ aufgereiht, der zur Ermittlung der Parameter herangezogen werden konnte. Es wurden sowohl die Dauer einer Lamellipodien-Protrusion, als auch die Ruffle Frequenz ermittelt. Es wurden je 6 bis 10 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten analysiert. Im Vergleich von NHK und R635X-Zellen war eine geringere Protrusionsdauer der defizienten Zellen auf allen vier untersuchten Matrices zu erkennen. Die größte Protrusionsdauer mit $0,96 (\pm 0,57)$ min trat bei NHK auf der HaCaT-Matrix auf. Auch auf Fibronectin war die Protrusionsdauer mit $0,75 (\pm 0,47)$ min höher als auf den beiden Kollagen Matrices. Hier lag die durchschnittliche Dauer bei $0,69 (\pm 0,61)$ min auf Kollagen IV und $0,79 (\pm 0,51)$ min auf Kollagen I. R635X-Zellen hatten eine Lamellen Protrusionsdauer von $0,74 (\pm 0,36)$ min auf HaCaT-Matrix, $0,54 (\pm 0,36)$ min auf Fibronectin, $0,5 (\pm 0,27)$ min auf Kollagen IV und $0,58 (\pm 0,25)$ min auf Kollagen I. Auf Kollagen Typ I und der HaCaT Matrix war somit eine signifikante Verringerung (Mann-Whitney U Test; $p < 0,03$) auf Kollagen Typ IV und Fibronectin Matrix sogar eine höchst signifikante Verringerung (Mann-Whitney U- Test; $p < 0,01$) der Protrusionsdauer bei defizienten Zellen gegeben.

Auch bei der Ruffle Frequenz war eine deutliche Unterscheidung zwischen NHK und R635X-Zellen erkennbar. NHK hatten auf Fibronectin eine durchschnittliche Ruffle-Frequenz von $0,18 (\pm 0,17)$ /min, während R635X-Zellen $0,235 (\pm 0,16)$ Ruffles /min bildeten. Auf der HaCaT-Matrix waren $0,15 (\pm 0,11)$ Ruffles /min bei NHK und $0,2 (\pm 0,12)$ Ruffles /min bei R635X-Zellen zu verzeichnen. Auf Fibronectin ergab sich so eine höchst signifikante (Mann-Whitney U-Test; $p < 0,01$) und auf der HaCaT Matrix eine signifikante (Mann Whitney U-Test; $p < 0,03$) höhere Ruffle Frequenz bei R635X-Zellen. Auf Kollagen I war eine höchst signifikante, auf Kollagen IV eine signifikante höhere Ruffle Frequenz für NHK ermittelt worden. NHK bildeten auf Kollagen I $0,23 (\pm 0,15)$ Ruffles /min, R635X-Zellen $0,3 (\pm 0,17)$ Ruffles /min. Auf Kollagen IV wurden bei NHK $0,23 (\pm 0,13)$ Ruffles /min, bei R635X-Zellen $0,29 (\pm 0,13)$ Ruffles /min gebildet (Abbildung 3.11)

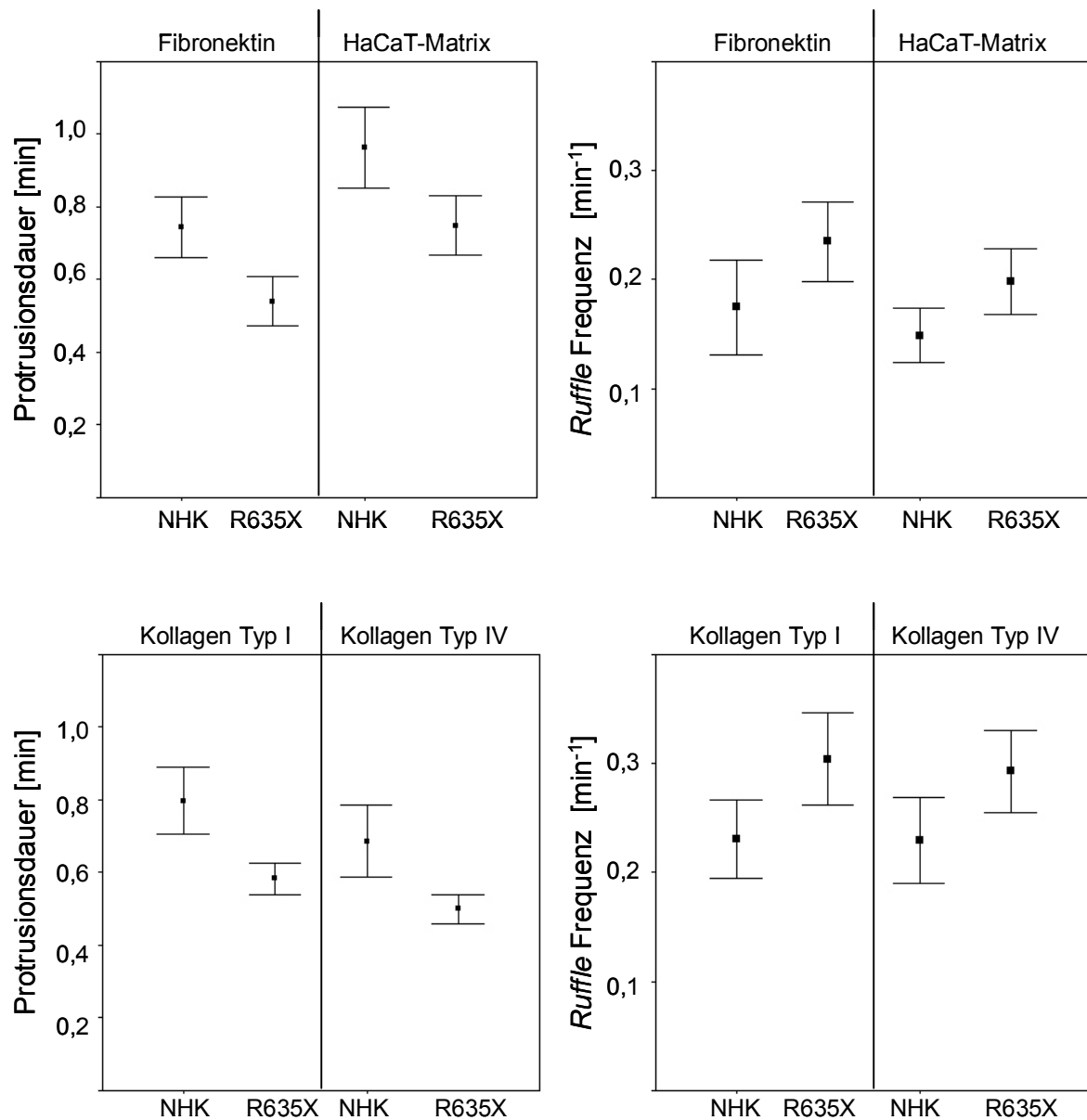


Abbildung 3.11: Statistische Auswertung der Lamellendynamik mit Hilfe des SACED-Assays. Lamellen Protrusionsdauer und Ruffle Frequenz von NHK und R635X-Zellen auf Fibronectin und HaCaT-Matrix (oben), sowie auf Kollagen I und IV (unten). Auf allen Matrices zeigten R635X-Zellen eine hoch, bzw. höchst signifikant geringere Lamellen Protrusionsdauer und eine hoch, bzw. höchst signifikant höhere Ruffle-Frequenz.

3.7 Zusammenfassung der quantitativen Analyse der Migration

R635X-Zellen weisen eine stark verminderte Translokationsgeschwindigkeit im Vergleich zu NHK auf. Dies steht in einer klaren Abhängigkeit zu dem Substrat, auf dem sich die Zellen bewegen: während sich auf Fibronectin und Kollagen I eine um nahezu 50% geringere Geschwindigkeit ergibt, ist sie auf Kollagen IV nur um 10% geringer. Auf der HaCaT-Matrix ist keine komplette Kompensation der

Translokationsgeschwindigkeitsverringering zu erkennen. Die Abnahme war sogar stärker als auf Kollagen IV. Die Lamellendynamik ist auf allen vier Substraten in der gleichen Weise verändert: es treten bei R635X-Zellen signifikant kürzere Lamellenprotrusionsdauern und erheblich häufiger Ruffles auf. Das Fehlen von Laminin 5 führt also zu einer ineffizienteren Lamellendynamik, was in einer geringeren Migrationsgeschwindigkeit resultiert.

Matrix	Translokationsgeschwindigkeit	Lamellen Protrusionsdauer	Ruffle Frequenz
Fibronectin	↓	↓	↑
HaCaT-Matrix	↓	↓	↑
Kollagen I	↓	↓	↑
Kollagen IV	↓	↓	↑

Tabelle 3.2: Vergleich der Motilitätsdaten. Dargestellt sind die Unterschiede der R635X-Zellen im Verhältnis zu NHK auf den jeweiligen Substraten. „↑“: signifikante Steigerung, „↓“: signifikante Verringerung.

3.8 Verringerte Adhäsion bei R635X-Zellen auf Kollagen I und IV

Die Morphologie und Bewegungsform von R635X-Zellen auf Kollagen I und IV wies eine weitere Besonderheit auf, die weder auf Fibronectin oder der HaCaT-Matrix, noch bei NHK auf allen untersuchten Matrices beobachtet werden konnte. So konnten defiziente Zellen auf Kollagen untereinander durchwandern, ohne dass es zu einer Zell-Zell Adhäsion kam. Dabei ließen oben liegende Zellen einen Freiraum unterhalb des Zellkörpers, durch den die unten liegende Zelle migrieren konnte. Die obere Zelle schien in diesem Fall nur an den beiden Enden an dem Untergrund adhären zu sein. In einem Zeitraum von 20 Minuten waren Zellen unter einer anderen Zelle durchgewandert, ohne dass es zu einer dauerhaften Zell-Zell Adhäsion kam (Abb. 3.12).

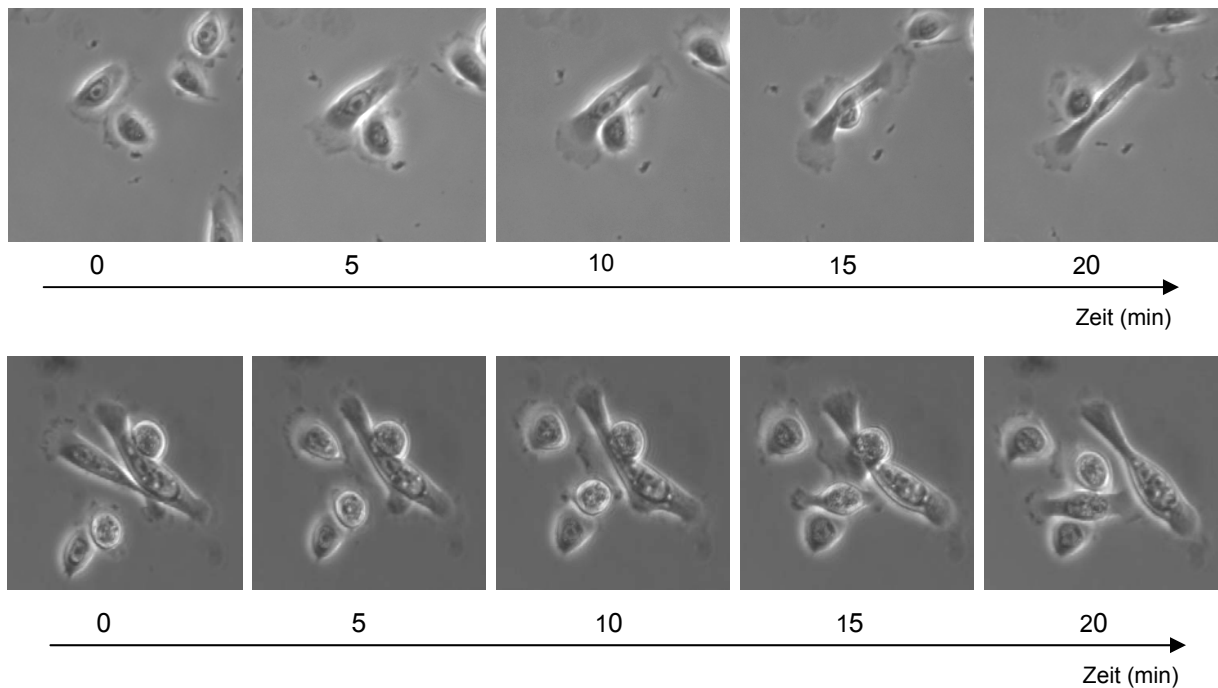


Abbildung 3.12: R635X-Zellen auf Kollagen IV (oben) oder Kollagen I (unten). Bildserien über einen Zeitraum von 20 Minuten. Unter den spindelförmigen Zellen entstand ein Spalt, durch den andere Zellen durchwandern konnten

3.8.1 Reflektions-Interferenz Mikroskopie

Die verminderte Adhärenz des Zellkörpers von R635X-Zellen wurde mithilfe der Reflektions Interferenz Mikroskopie weitergehend untersucht, um die Zell-Matrix Kontakte zu analysieren. Diese Technik, bei der das kohärente, polarisierte und monochromatische Licht eines Lasers eingesetzt wird, nutzt die Interferenzeffekte durch phasenverschobene Lichtstrahlen, die durch unterschiedliche Brechung erreicht wird. Aufgrund der Reflexion der Lichtstrahlen an den Grenzflächen Glas-Medium bzw. Medium-Zelle erfolgt eine Phasenverschiebung des Lichtes, die, abhängig von der Distanz zwischen den Grenzflächen und der verwendeten Wellenlänge, dazu führt, dass das zurück gestreute Licht sich im Bereich von Adhäsionen auslöscht oder in Bereichen größerer räumlicher Distanz verstärkt. Durch diesen Interferenzeffekt erscheinen Bereiche mit Adhäsion dunkler als Bereiche mit größerer Distanz zwischen Zelle und Untergrund.

Zunächst wurden NHK und R635X-Zellen auf Fibronectin untersucht, da hier eine normale Polarität der Zellen und kein Unterwandern anderer Zelle beobachtet werden konnte. Hier waren bei NHK und R635X-Zellen Zell-Matrix Kontakte unter der

gesamten Zelle zu erkennen (Abb.3.13 a, d). Im Bereich der Lamelle traten verstärkt Zell-Matrix-Kontakte auf, aber auch unterhalb des restlichen Zellkörpers zeigten sich diese Kontakte. Auf Kollagen I und IV war bei NHK ebenfalls eine Verteilung der Zell-Matrix Kontakte über die gesamte Breite der Zelle zu erkennen (Abb. 3.13 b, c). Bipolare R635X-Zellen dagegen hatten auf Kollagen I diese distinkten Kontakte beschränkt auf die beiden Lamellenregionen. Der restliche Zellkörper wies keine Zell Matrix Kontakte auf (Abb. 3.13 e). Auch auf Kollagen IV waren die Kontakte nur an den Endpunkten der Zelle vorhanden (Abb. 3.13 f). Auch hier besaß der Zellkörper mit Zellkern zum Teil einen erheblichen Abstand zum Untergrund. Die dunklere Färbung in der Mitte wies keine distinkten Kontakte auf und zeigte den gewölbten Bereich des Zellkernes, der lediglich auf dem Untergrund auflag.

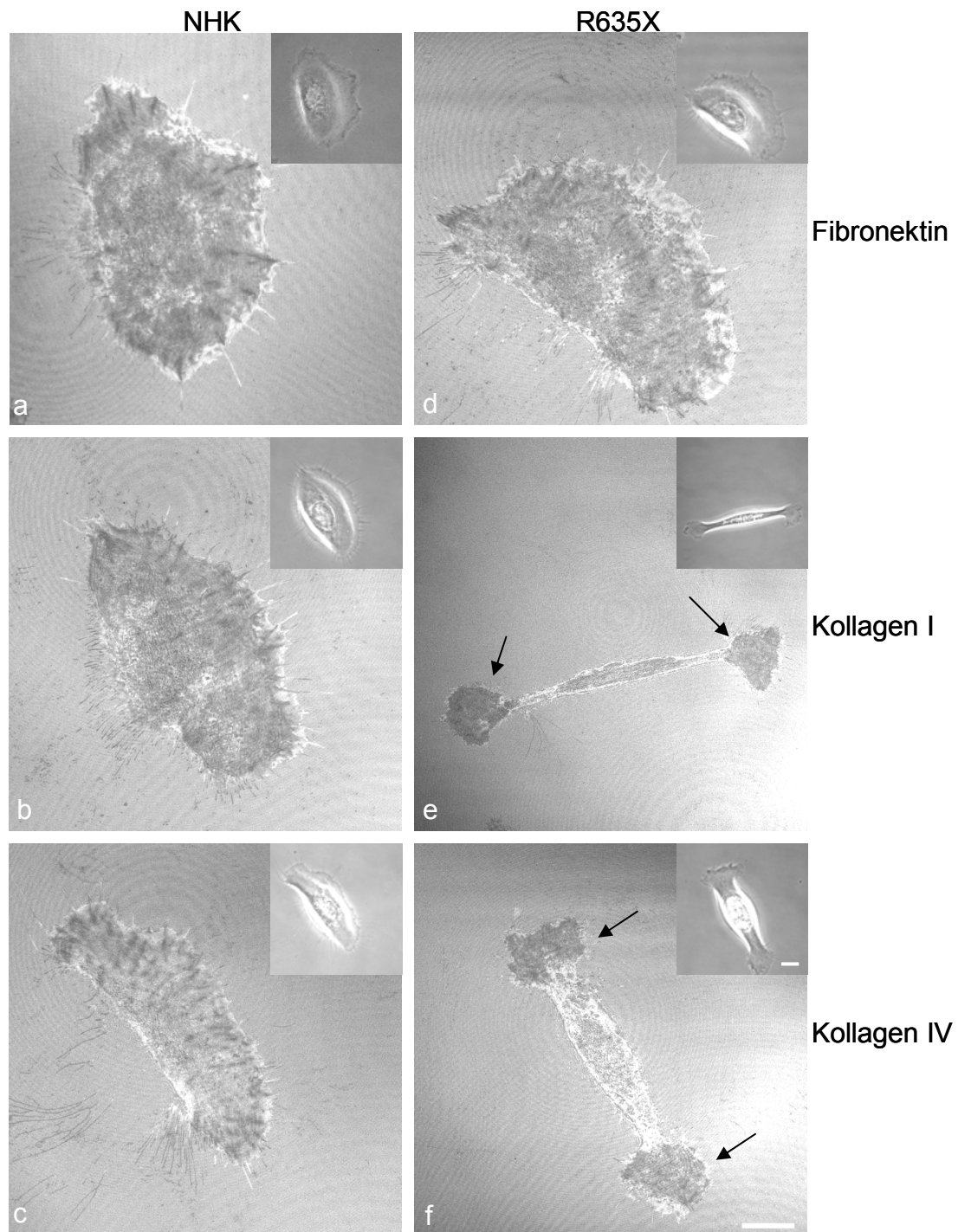


Abbildung 3.13: Reflektions Interferenz Mikroskopie von NHK (a, b, c) und R635X-Zellen (d, e f) und korrespondierende Phasenkontrastbilder (Inserts). Auf Fibronectin (a, d) hatten sowohl NHK als auch R635X-Zellen Zell-Matrix-Kontakte unterhalb der gesamten Zelle. Auf Kollagen I (b, e) und IV (c, f) waren bei R635X-Zellen diese Kontakte auf die Lamellen beschränkt (Pfeile), während NHK eine normale Verteilung aufwies. Der Zellkörper bei R635X-Zellen hatte keine distinkten Zell-Matrix-Kontakte zwischen den polaren Lamellen.

3.8.2 Vinculin-Markierung

Um die Zell-Matrix Kontakte genauer zu untersuchen wurde eine immunocytochemische Markierung von Vinculin durchgeführt, ein Bestandteil des intrazellulären Linker-Komplexes von Fokalkontakten, das das Aktin-Zytoskelett mit den ECM-Rezeptoren aus der Familie der Integrine verbindet. Die Markierung auf Fibronectin zeigte eine Verteilung von Vinculin über die gesamte Unterseite der Zelle (Abb. 3. 14) sowohl bei NHK, als auch R635X-Zellen. Die Vinculin-Färbung trat kolokalisiert mit den Enden der fibrillären Aktinfasern auf, wobei die Verteilung von Zell-Matrix Kontakten mit der Reflektions Interferenz Mikroskopie korrespondierte. (Abb. 3.13). Auf Kollagen IV war dieses Verteilung bei NHK ebenfalls zu erkennen (Abb. 3.15 a-d). Bei R635X-Zellen dagegen waren Vinculin Markierungen auf die beiden Endpole der Zelle beschränkt, während der gesamte Zellkörper zwischen den beiden Polen keine Markierung aufwies (Abb. 3.15 e, g).

Zusammenfassend basiert das hier beschriebene Phänomen der Unterwanderung von Zellen offensichtlich auf der fehlenden Adhärenz des Zellkörpers von R635X-Zellen. Die Adhäsion beschränkte sich, wie bereits in den morphologischen Untersuchungen gezeigt, auf die zwei polaren Endpunkte einer Zelle. Ebenso ist die schnelle Translokation nach Ablösen eines Endes erst durch die fehlende Adhärenz des Zellkörpers möglich, da Zell-Matrix Kontakte verteilt unter der gesamten Zelle dies verhindern würden.

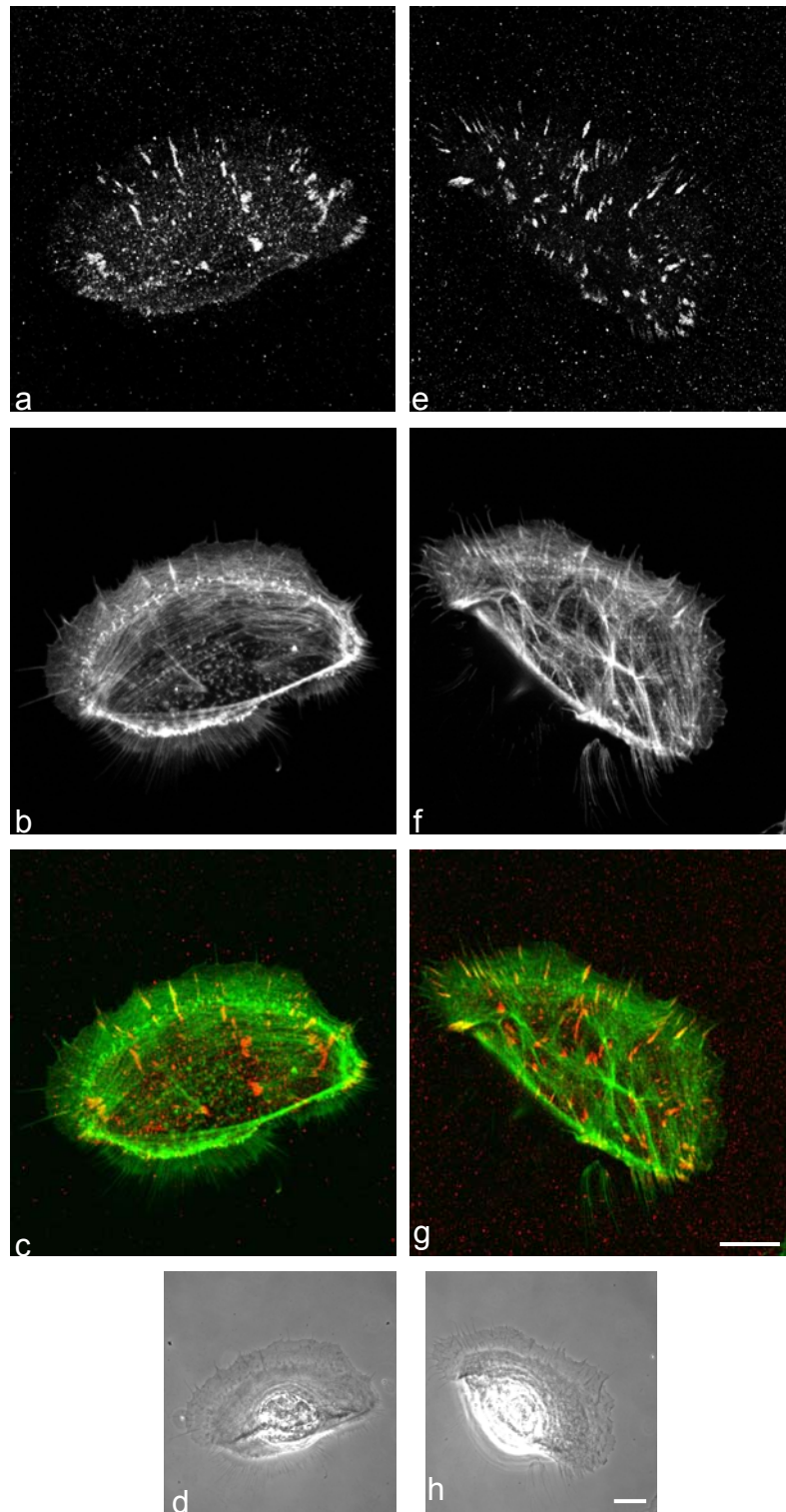


Abbildung 3.14: Detektion von Vinculin in NHK (a) und R635X-Zellen (e) auf Fibronectin und korrespondierende Aktin-Färbung (b, f), sowie Phasenkontrastaufnahmen (d, h). Vinculin war sowohl im Bereich der Lamelle, als auch unter dem gesamten Zellkörper zu erkennen. Die Vinculinmarkierung trat an den Endpunkten von Aktinfasern auf (c, g). Balken: 10 μm

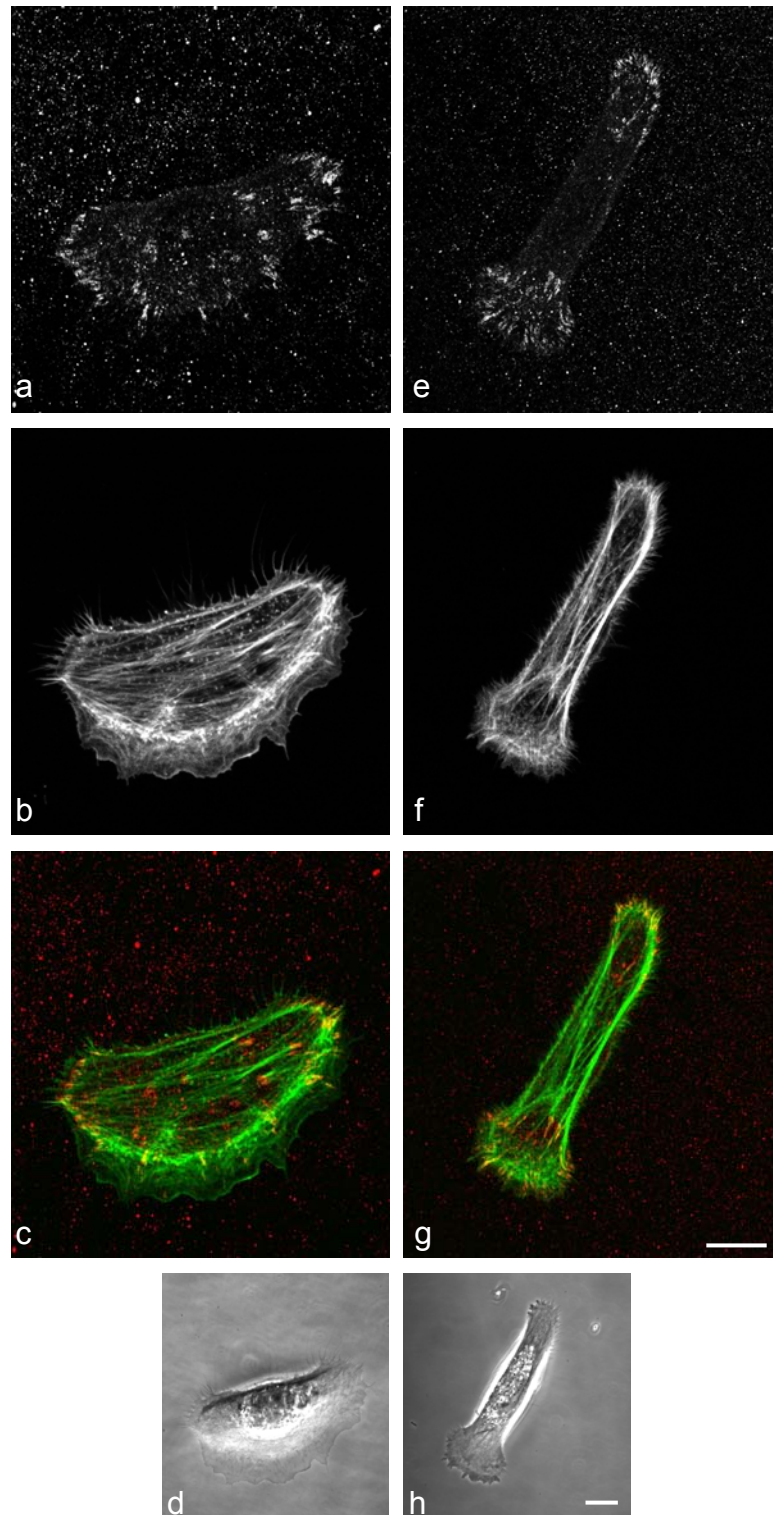


Abbildung 3.15: Detektion von Vinculin in NHK (a) und R635X-Zellen (e) und korrespondierende Aktin-Färbung (b, f), sowie Phasenkontrastaufnahmen (d, h) auf Kollagen IV. NHK hatten auch hier eine Verteilung der Vinculinmarkierung über die gesamte Breite der Zellunterseite. R635X-Zellen wiesen Vinculin nur an den beiden Lamellen auf. Im Mittlere Teil der Zelle war keine Markierung zu erkennen. Balken: 10 μ m

3.9 Inhibition von Integrin Untereinheiten in R635X-Zellen

Die unterschiedliche Morphologie und das veränderte Migrationsverhalten, sowie die verringerte Adhärenz der R635X-Zellen auf Kollagen I und IV führten zu der Annahme, dass in Abhängigkeit vom Substrat unterschiedliche Mechanismen zur Kompensation des Fehlens von Laminin 5 seitens der Zelle verwendet werden konnten. Zur Eingrenzung der möglichen Komponenten in diesem Prozess wurden unterschiedliche Integrine mit Hilfe von funktionsblockierenden Antikörpern inhibiert.

3.9.1 Inhibition von $\alpha 2$ Integrin auf Kollagen I

Da Kollagen I der Hauptligand von $\alpha 2\beta 1$ Integrin ist, wurde dieses Integrin bei NHK und R635X-Zellen blockiert. Hierbei sollte sowohl der Effekt auf Zellen, die Laminin 5 sezernieren konnten und somit möglicherweise eine weitere Kompensationsmöglichkeit besaßen, untersucht werden, als auch die Wirkung auf R635X-Zellen, denen neben dem Fehlen von Laminin 5 eine weitere Komponente zur Adhäsion entzogen wurde.

Hierfür wurden die Zellen über Nacht kultiviert und eine Stunde vor der Videomikroskopie mit hEGF stimuliert. Gleichzeitig wurde BSA dem Medium zugegeben, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. 30 Minuten vor der Videomikroskopie wurde der Antikörper zugegeben. Wie schon zuvor ohne Inhibition von $\alpha 2$ Integrin war bei R635X-Zellen eine lang gestreckte Zellform zu erkennen (Abb. 3.16 c, d und Film „R635Xco1_int2inh.avi“). Auch das Bewegungsmuster entsprach dem von nicht inhibierten Zellen. NHK hingegen zeigten die typische monopolare Morphologie und eine gleichförmige Bewegung (Abb. 3.16 a, b und Film „NHKco1_int2inh.avi“). Eine Kontrolle, bei der die Zellen ausschließlich mit BSA inkubiert wurden, ergab keine Veränderung zu den jeweiligen unbehandelten Zellen. Eine kontinuierliche Geschwindigkeitsmessung ergab eine weitere Abnahme der durchschnittlichen Translokationsgeschwindigkeit bei R635X-Zellen nach der Inhibition von $\alpha 2$ Integrin. Der Migrationsmodus zeigte auch hier deutliche Geschwindigkeitszunahmen innerhalb einer kurzen Zeitspanne, die durch eine stark verlangsamte Bewegung zwischen diesen Ereignissen gekennzeichnet war (Abb.3.17).

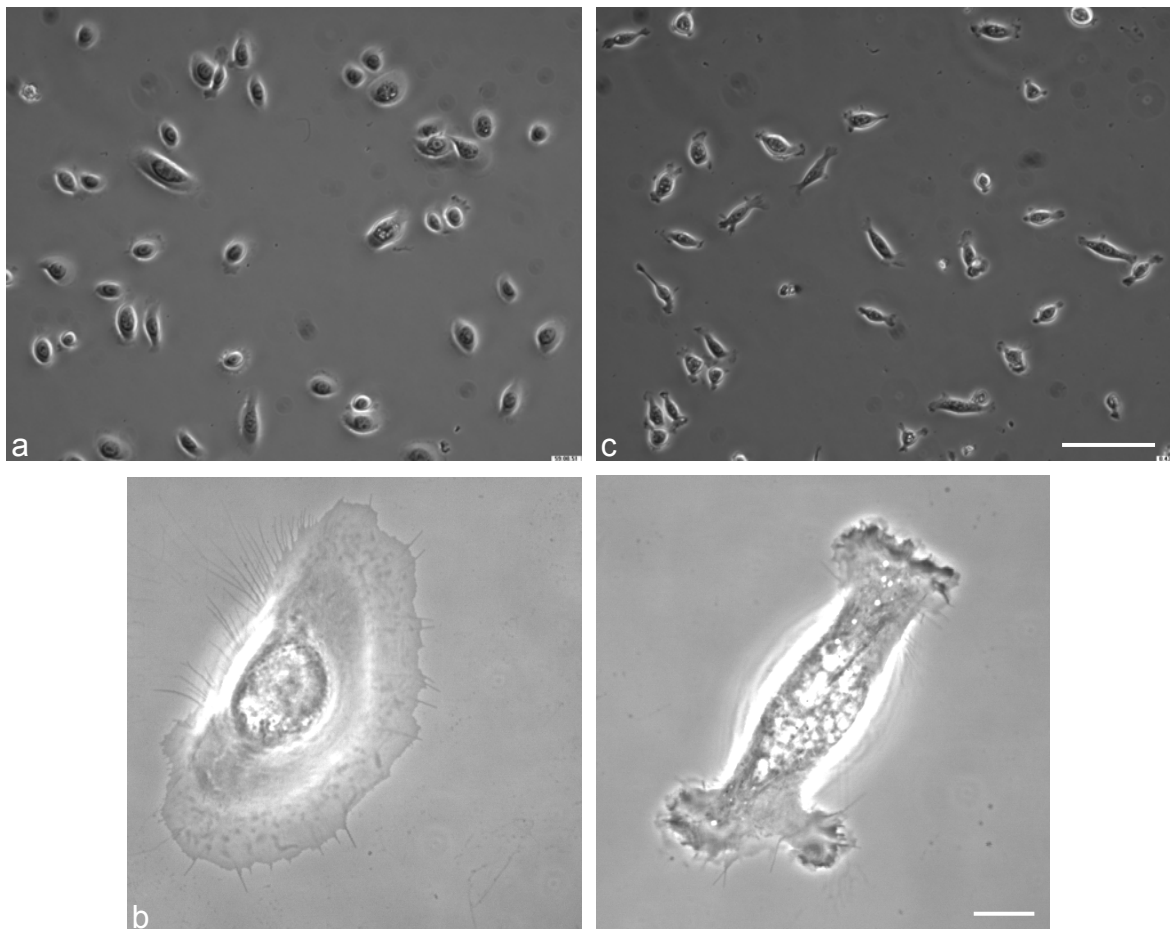


Abbildung 3.16: Phasenkontrastaufnahmen von NHK (a, b) und R635X-Zellen (c, d) auf Kollagen I nach Inhibition von $\alpha 2$ Integrin. Während bei NHK weiterhin die charakteristische monopolare Form zu erkennen war, wiesen R635X-Zellen nach der Inhibition bi- oder tripolare Formen auf. Balken: 100 μm (a, c) und 10 μm (b, d)

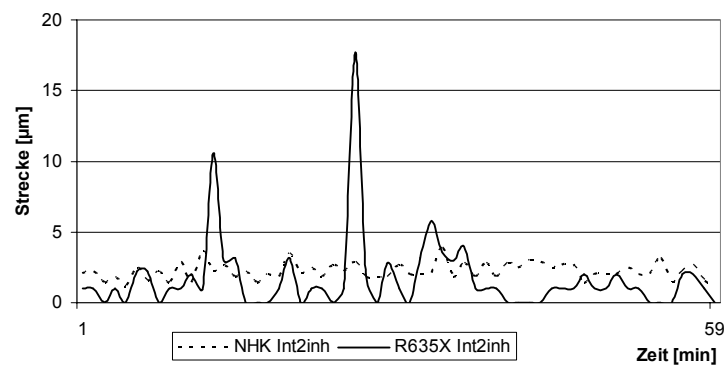


Abbildung 3.17: kontinuierliche Geschwindigkeitsmessung einer migrierenden Zelle auf Kollagen I. Gepunktete Linie: NHK, durchgehende Linie: R635X- Zelle. Nach Inhibition zeigte die Geschwindigkeit von NHK weiterhin nur geringe Schwankungen. R635X-Zellen zeigten eine sprunghafte Geschwindigkeitszunahme und eine sehr geringe Geschwindigkeit zwischen zwei Peaks.

3.9.2 Induktion des saltatorischen Phänotyps bei R635X-Zellen auf Fibronektin nach Inhibition von $\alpha 5$ Integrin

Ein wesentlicher Ligand von $\alpha 5 \beta 1$ Integrin ist Fibronektin. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass Laminin 5 defiziente Zellen sich in einer gerichteten Weise fortbewegten und eine normale monopolare Form aufwiesen. Zur weiteren Klärung wurde deshalb bei R635X-Zellen, die auf Fibronektin ausgesät worden waren, $\alpha 5$ Integrin durch funktionsblockierende Antikörper inhibiert. Auch hier wurde der Antikörper wie bereits beschrieben dem Medium nach Stimulation durch hEGF und BSA-Behandlung zugegeben. Als Vergleich wurden NHK ebenfalls mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen $\alpha 5$ Integrin behandelt. Als Kontrolle der Spezifität der Antikörper-Interaktion dienten NHK und R635X-Zellen, die nur mit BSA und ohne den Antikörper inkubiert wurden.

Durch die Blockierung von $\alpha 5$ Integrin konnte in R635X-Zellen der zuvor beschriebene Phänotyp induziert werden. Die Zellen zeigten eine lang gestreckte Form mit zwei oder drei Lamellen (Abb. 3.18 c und d). Die Analyse des Migrationsmodus ergab jetzt auch hier eine saltatorische Migration (Film „R635Xfn_int5inh.avi“). Es zeigten sich kurze und schnelle Bewegungen gefolgt von langen Phasen mit geringer Migrationsgeschwindigkeit (Abb. 3.19). Dieser Phänotyp trat hingegen nicht bei NHK nach Inhibition von $\alpha 5$ Integrin auf (Abb. 3.18 a, b und Film „NHKfnint5inh.avi“). Hier waren auch keine größeren Schwankungen in der Migrationsgeschwindigkeit erkennbar (Abb. 3.19). Die Inhibition von $\alpha 5$ Integrin hatte keinen Einfluss auf die Morphologie und die Bewegungsform von Zellen, die Laminin 5 sezernieren können. Nur durch das Fehlen von $\alpha 5$ Integrin und Laminin 5 konnte die saltatorische Migrationsform und der morphologische Phänotyp induziert werden. Die Kontrollen mit BSA und ohne Antikörper zeigten weder bei NHK, noch bei R635X den beschriebenen Phänotypen, so dass der beschriebene Effekt auf die inhibitorische Wirkung des funktionsblockierenden Antikörpers zurückzuführen war.

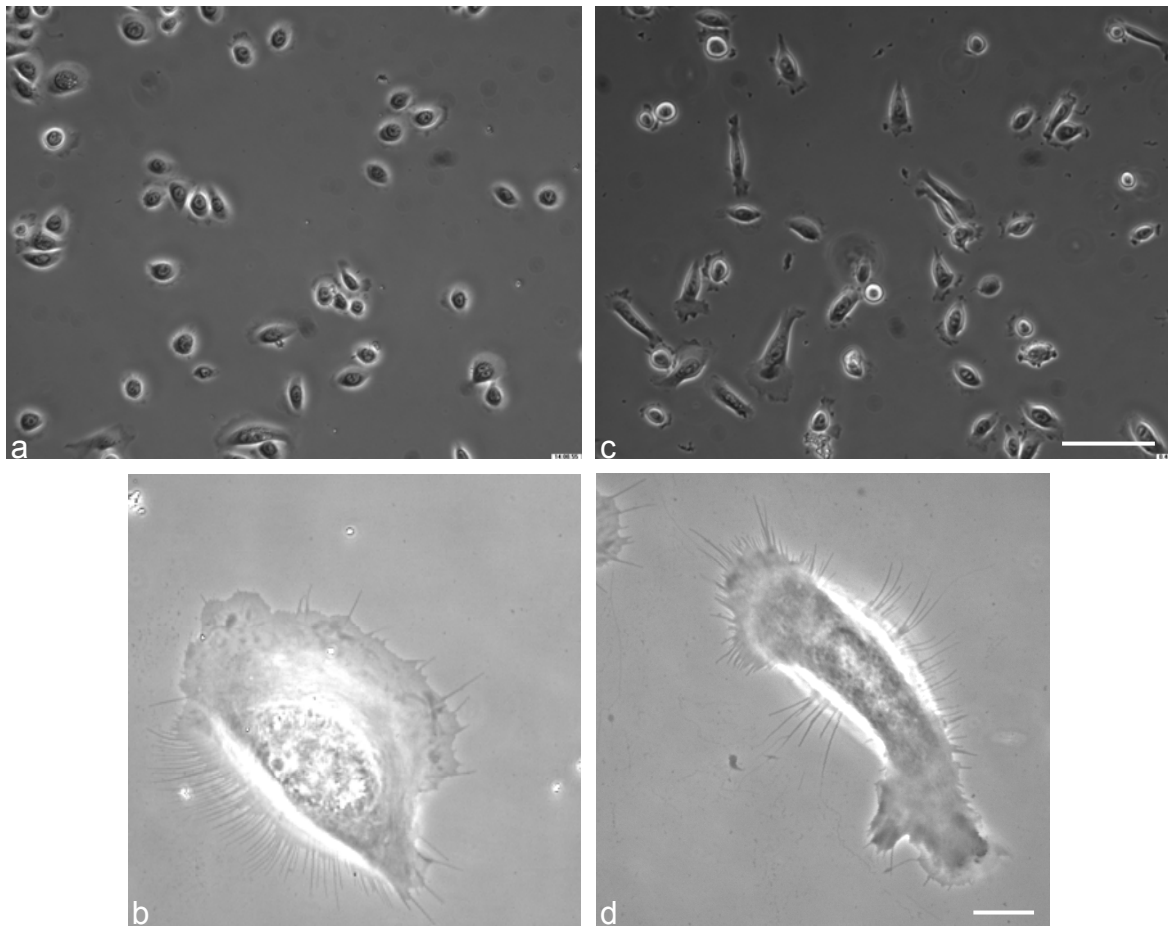


Abbildung 3.18: Phasenkontrastaufnahmen von NHK (a, b) und R635X-Zellen (c, d) auf Fibronektin nach funktionaler Blockierung von $\alpha 5$ Integrin. Bei NHK waren morphologisch keine Unterschiede im Vergleich zu nicht blockierten Zellen zu erkennen, die Zellen waren weiterhin monopolar und bewegten sich in einer kontinuierlichen Art. R635X-Zellen wiesen nach der Blockierung einen bipolaren Phänotyp auf und hatten eine saltatorische Bewegungsform. Balken: 100 μm (a, c) und 10 μm (b, d)

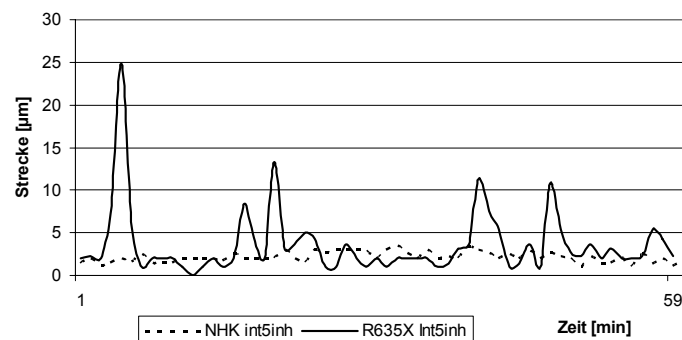


Abbildung 3.19: Kontinuierliche Geschwindigkeitsmessung von NHK (gepunktete Linie) und R635X-Zellen (durchgehende Linie) auf Fibronektin nach Blockierung von $\alpha 5$ -Integrin. Während NHK nach Blockierung von $\alpha 5$ Integrin immer noch eine gleichförmige Geschwindigkeit mit geringen Schwankungen zeigten, wiesen R635X-Zellen zum Teil sehr starke Geschwindigkeitssteigerungen in einem Zeitraum von wenigen Minuten auf.

3.10 Inhibition von Laminin 5 in NHK

3.10.1 Blockierung von Laminin 5 auf Kollagen IV

Um zu klären, ob die zuvor beschriebenen Ergebnisse bei R635X-Zellen auf dem Fehlen von Laminin 5 basieren, wurden NHK mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen Laminin 5 inkubiert. Die Behandlung entsprach den zuvor beschriebenen Ansätzen. Ebenso wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen nur mit BSA inkubiert wurde. Auf Kollagen IV ausgesäte NHK nach Behandlung mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen Laminin 5 zeigten wie R635X-Zellen auf diesem Substrat eine lang gestreckte Zellform mit zwei oder mehr Lamellen (Abb. 3.20 c, d). Die saltatorische Bewegungsform entsprach auch hier der zuvor für defiziente Zellen beschriebenen Art: nach kurzen und sehr großen Translokationsgeschwindigkeiten war die Bewegung zwischen diesen Ereignissen normal schnell oder langsamer als bei unbehandelten NHK (Abb. 3.21 und Film „NHKco4_In5inh.avi“). Diese Bewegungsform resultierte auch hier aus der mangelnden Adhärenz der Zelle. Mit Hilfe der Reflexions-Interferenz Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass der Zellkörper keine wesentlichen Adhäsionspunkte zum Untergrund ausbildete und der Kontakt zum Substrat lediglich an den beiden Zellpolen vorhanden war (Abb. 3.22). Durch die Inhibition von Laminin 5 konnte also der auf mangelnder Adhärenz beruhende morphologische Phänotyp und die veränderte Migrationsart in NHK ausgelöst werden.

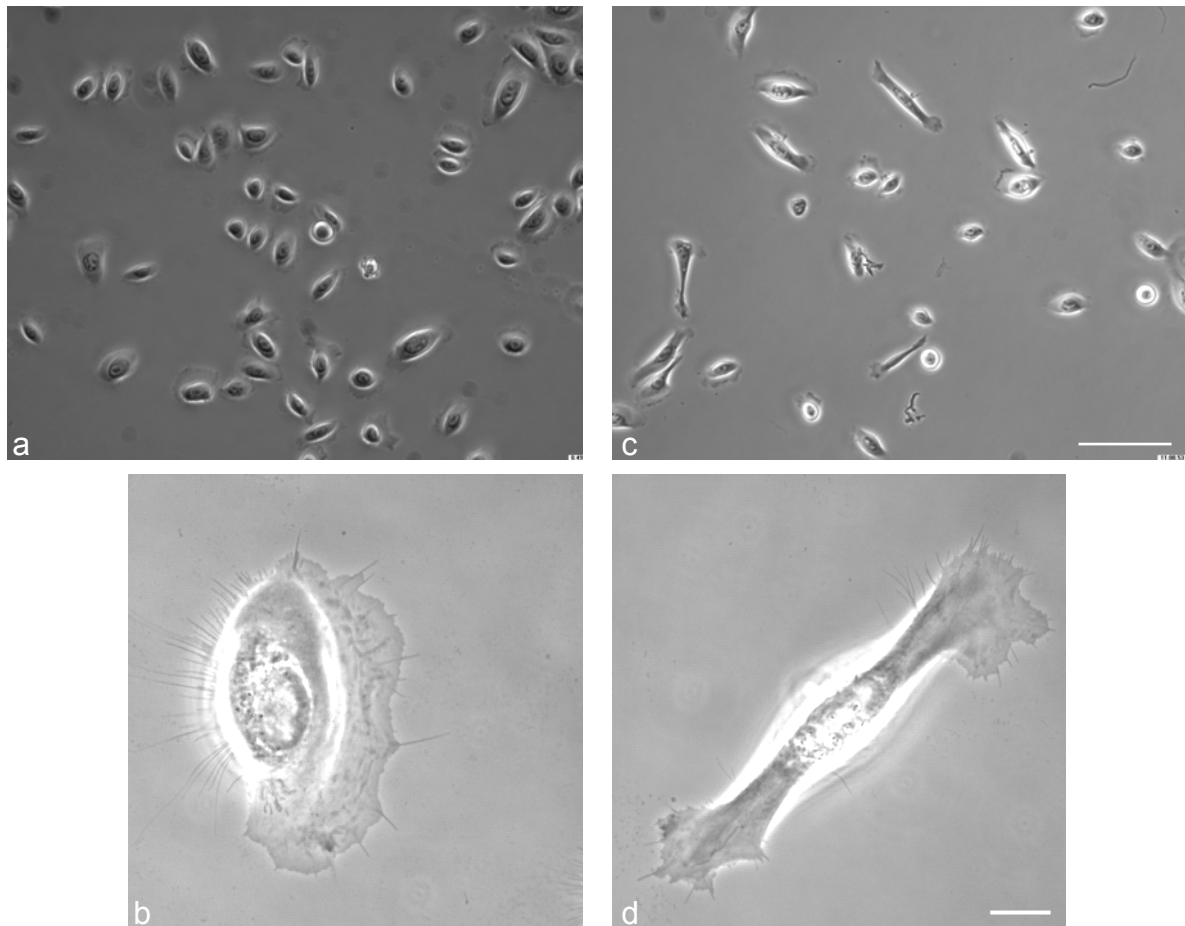


Abbildung 3.20: Phasenkontrastaufnahmen von NHK auf Kollagen IV ohne (a, b) und mit (c, d) funktionaler Blockierung von Laminin 5 durch monoklonale Antikörper nach Stimulation mit EGF. Während ohne Blockierung die monopolare Form der migrierenden Keratinozyten klar vorhanden war, trat nach Blockierung der lang gestreckte und bipolare Phänotyp auf, den auch R635X-Zellen auf dieser Matrix hatten. Balken: 100 µm (a, c) und 10 µm (b, d)

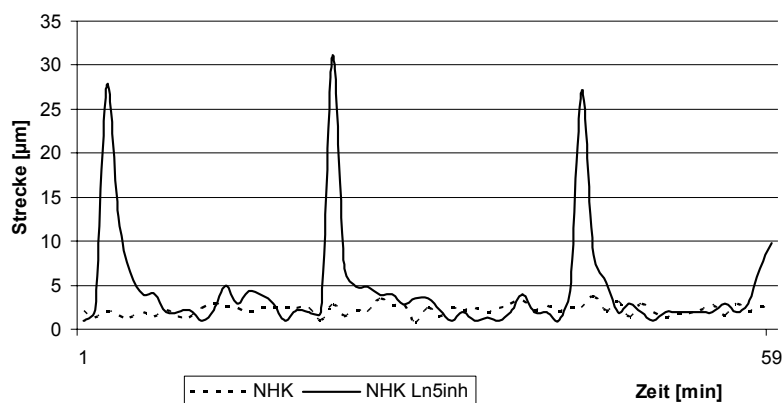


Abbildung 3.21: Kontinuierliche Geschwindigkeitsmessung von NHK ohne (gepunktete Linie) und mit Inhibition von Laminin 5 (durchgehende Linie) auf Kollagen IV. Durch die Inhibition war die gleichförmige Bewegung und die geringen Schwankungen in der Geschwindigkeit aufgehoben. Es tauchten auch hier jetzt die sprunghaften Geschwindigkeitssteigerungen auf.

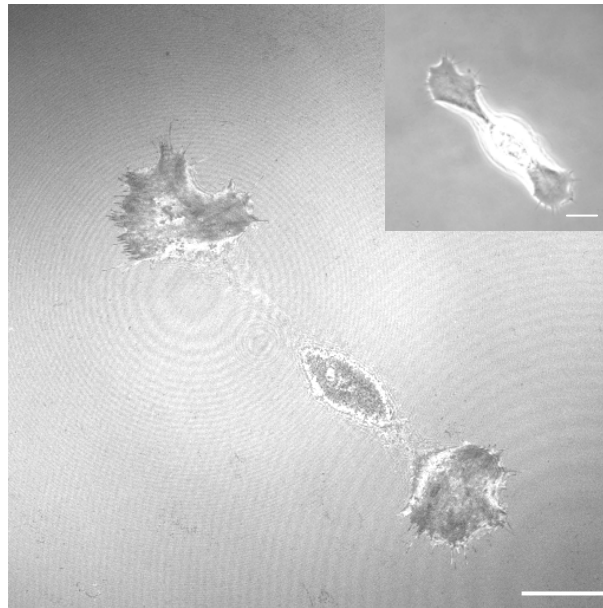


Abbildung 3.22: Reflektions Interferenz mikroskopisches und korrespondierendes Phasenkontrastbild (Insert) von NHK auf Kollagen IV nach funktionaler Blockierung von Laminin 5. An beiden Lamellen der Zelle sind distinkte Kontakte zur Matrix zu erkennen, wohingegen der dazwischen liegende Zellkörper zum Teil keinen Kontakt zum Untergund aufwies. Balken: 10 µm

3.10.2 Blockierung von Laminin 5 und $\alpha 5$ Integrin auf Fibronektin

Um die Rolle von $\alpha 5$ Integrin zur Ausbildung der monopolen Form und einer gerichteten Bewegung bei Laminin 5 Defizienz auf Fibronektin darzustellen, wurden nun NHK mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen Laminin 5 und $\alpha 5$ Integrin behandelt. Zum Vergleich wurde in einem weiteren Ansatz nur Laminin 5 inhibiert. Die alleinige Inhibition von Laminin 5 führte zu keiner Veränderung der Morphologie (Abb. 3.23 a, b) oder einer veränderten Migrationsform (Abb. 3.24 und Film „NHKfn_In5inh.avi“). Nach gleichzeitiger Blockierung von Laminin 5 und $\alpha 5$ Integrin war jedoch, wie zuvor schon bei R635X-Zellen nach der Inhibition von $\alpha 5$ Integrin beobachtet, eine lang gestreckte Form mit zwei oder mehr Zellpolen zu erkennen (Abb. 3.23 c, d). Auch war wieder eine starke Geschwindigkeitszunahme innerhalb weniger Minuten zu erkennen (Abb. 3.24 und Film „NHKfn_In5int5inh.avi“). In der Interferenz Reflektions Mikroskopie zeigte sich bei gleichzeitiger Blockierung von Laminin 5 und $\alpha 5$ Integrin, dass der Zellkörper keine Kontakte zum Substrat besaß und lediglich die Zellpole, an denen kleine Lamellen auftraten, distinkte Kontakte aufwiesen (Abb. 3.25). Das Inhibieren von $\alpha 5$ Integrin und Laminin 5 führte auf Fibronektin also zur Ausbildung einer bipolaren Zellmorphologie und zu einem saltatorischen Bewegungsmuster.

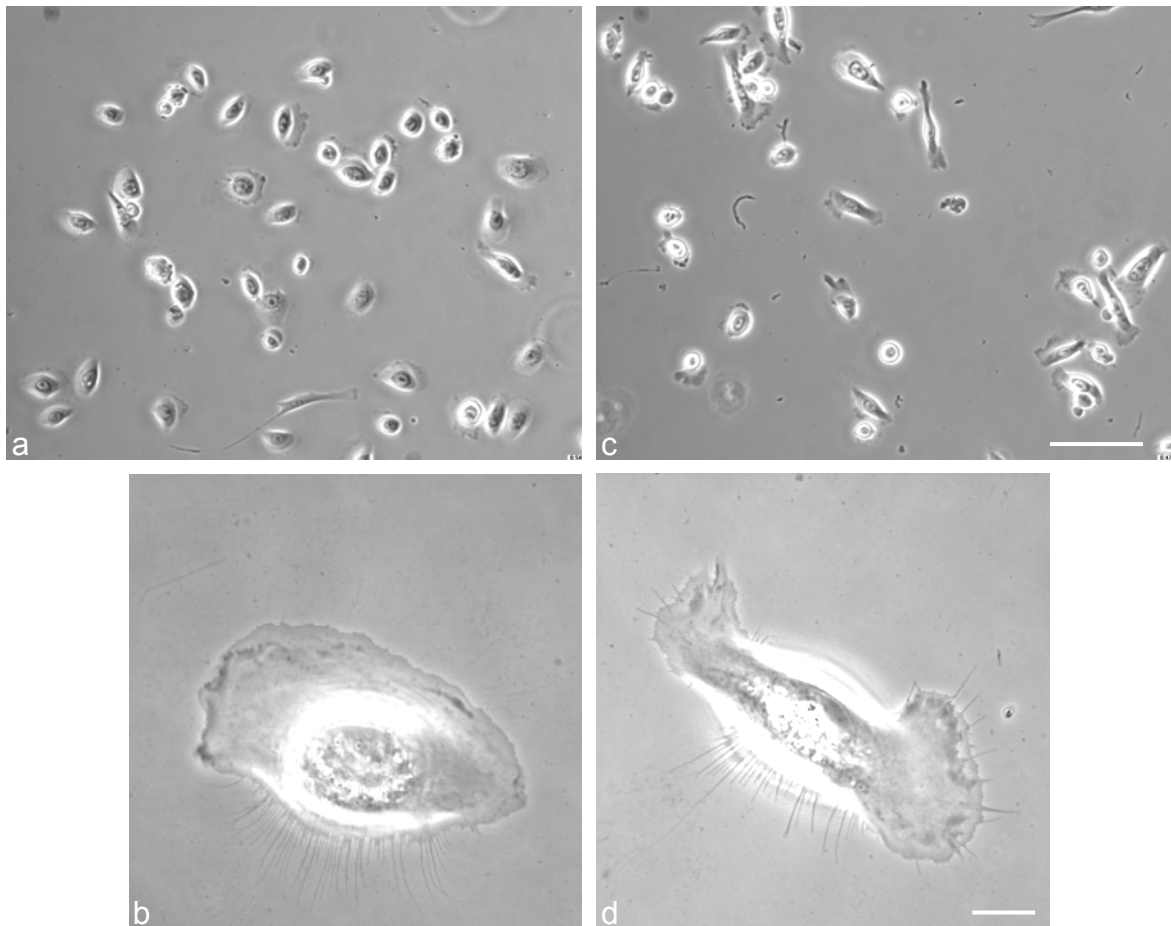


Abbildung 3.23: Phasenkontrastaufnahmen von NHK auf Fibronectin nach funktionaler Inhibition von Laminin 5 (a, b), bzw. gleichzeitiger Inhibition von Laminin 5 und $\alpha 5$ -Integrin (c, d). Blockierung von Laminin 5 führte nicht zu einer veränderten Morphologie, die Bewegungsform war weiterhin kontinuierlich. Gleichzeitige Inhibition von Laminin 5 und $\alpha 5$ Integrin führte aber zu einer lang gestreckten Form mit zwei Lamellen. Die Bewegungsform war saltatorisch. Balken: 100 μm (a, c) und 10 μm (b, d)

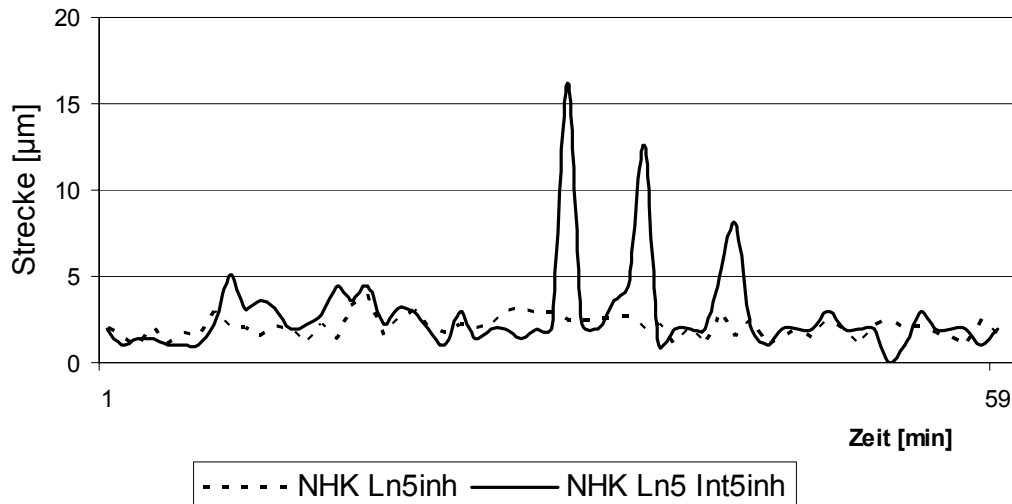


Abbildung 3.24: Kontinuierliche Geschwindigkeitsmessung von migrierenden NHK nach Inhibition von Laminin 5 (gepunktet), bzw. Laminin 5 und $\alpha 5$ Integrin (durchgehende Linie). Durch die Inhibition beider Proteine trat das Bewegungsmuster auf, das R635X-Zellen nach Inhibition von $\alpha 5$ Integrin zeigten. Es trat die saltatorische Migrationsform mit starken Geschwindigkeitssteigerungen in einem sehr kurzen Zeitraum auf, während die Geschwindigkeit sonst in einem normalen Bereich lag.

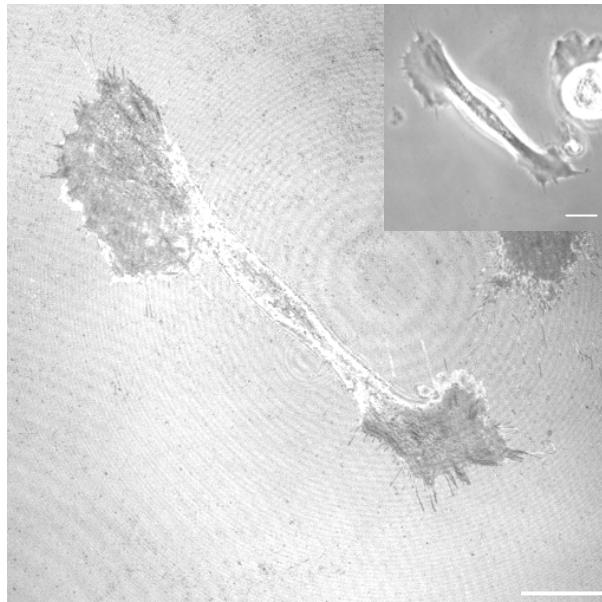


Abbildung 3.25: Reflektions Interferenz mikroskopisches und korrespondierendes Phasenkontrastbild (Insert) von NHK nach Inhibition von Laminin 5 und $\alpha 5$ Integrin. An den beiden Lamellen waren Zell-Matrix Kontakte ausgebildet, während der Zellkörper keine distinkten Kontakte ausbildete. Balken: 10 μm

3.11 Untersuchung der Migrationsspur

Migrierende Keratinozyten zeichnen sich durch einen Verlust von zellulärem Material in Form von sogenannten Makroaggregaten aus (Kirfel et al., 2003; Rigort et al., 2004). Die Makroaggregate entstehen entweder durch Fragmentierung von Retraktionsfasern oder durch das Abreißen hemidesmosomaler Adhäsionen. Grundsätzlich lassen sich zwei Formen der Makroaggregate unterscheiden:

1. Makroaggregate mit einer tubulären und sphärischen Struktur, die innerhalb der Spur in einer „perlschnurartigen“ Form auftreten und durch Fragmentierung der Retraktionsfasern entstehen (Typ I) und
2. Makroaggregate mit einer sphärischen Form, die in Clustern zwischen den Retraktionsfasern und Makroaggregaten Typ I vorkommen (Typ II).

Es ließ sich feststellen, dass Makroaggregate des Typs I große Mengen β 1-Integrin, des Typs II dagegen β 4 Integrin enthielten.

In diesem Zusammenhang wurde die Migrationsspur von R635X-Zellen rasterelektronenmikroskopisch und immunocytochemisch in Hinsicht auf Unterschiede zu NHK untersucht.

3.11.1 Veränderte Migrationsspur von R635X-Zellen

Durch die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Migrationsspur von R635X-Zellen konnten erhebliche Unterschiede zur Spur von NHK festgestellt werden. In der Spur von R635X-Zellen waren keine „perlschnurartig“ aufgereihten Makroaggregate zu erkennen, wie sie bei NHK auftreten (Abb. 3.26 a, b). Stattdessen wurden hier lange Retraktionsfasern ausgebildet, die zum Teil als lange und tubuläre Strukturen hinter den Zellen zurückblieben (Abb. 3.26 c, d). Die sphärischen Strukturen, die bei NHK zwischen den Typ I Makroaggregaten lagen, waren ebenfalls nicht vorhanden.

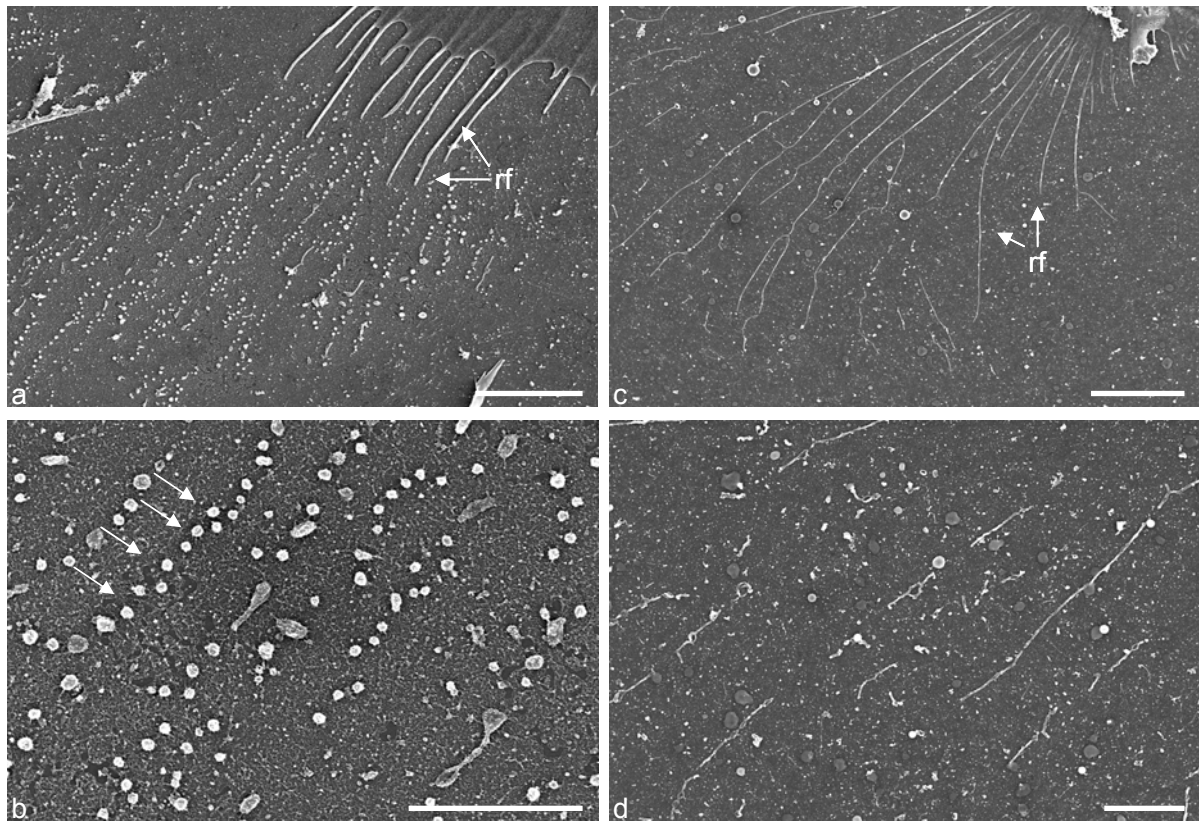


Abbildung 3.26: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von NHK (a, b) und R635X-Zellen (c, d) auf Fibronektin. Globuläre, „perlschnurartig“ organisierte Strukturen (Pfeile in b) waren in der Migrationsspur von NHK zu erkennen (a, b). Zwischen diesen Strukturen befanden sich tubuläre Fragmente. R635X-Zellen wiesen lange Retraktionsfasern (rf) auf, die bei NHK deutlich kürzer waren. Die „perlschnurartigen“ Makroaggregate, die bei NHK vorhanden waren (Pfeile in b), konnten bei R635X nicht beobachtet werden (d). Balken: 5 µm (a, c) und 2 µm (b, d)

3.11.2 $\beta 1$ Integrin ist in der Migrationsspur von R635X-Zellen vorhanden

Das Fehlen von Makroaggregaten in der Spur von R635X-Zellen wurde nun immuncytochemisch auf das Vorkommen von $\beta 1$ Integrin untersucht. NHK zeigten eine Markierung sowohl unterhalb der Zelle, als auch in der Migrationsspur in Form von lang gezogenen Markierungen, die an den Retraktionsfasern begannen und in punktförmigen Strukturen in der Spur sich fortsetzten (Abb. 3.27 a, c). R635X-Zellen zeigten ebenfalls $\beta 1$ Integrin Markierungen unterhalb des Zellkörpers und in der Migrationsspur. Hier zeigte sich jedoch eine mehr kontinuierliche Markierung, die zum Teil mit fibrillärem Aktin kolokalisiert war. In diesem Fall handelte es sich wahrscheinlich nicht um Fragmente, die von der Zelle abgerissen waren, sondern um sehr lange Retraktionsfasern, die zuvor schon in den rasterelektronenmikroskopischen Bildern zu erkennen waren (Abb. 3.27, e-g).

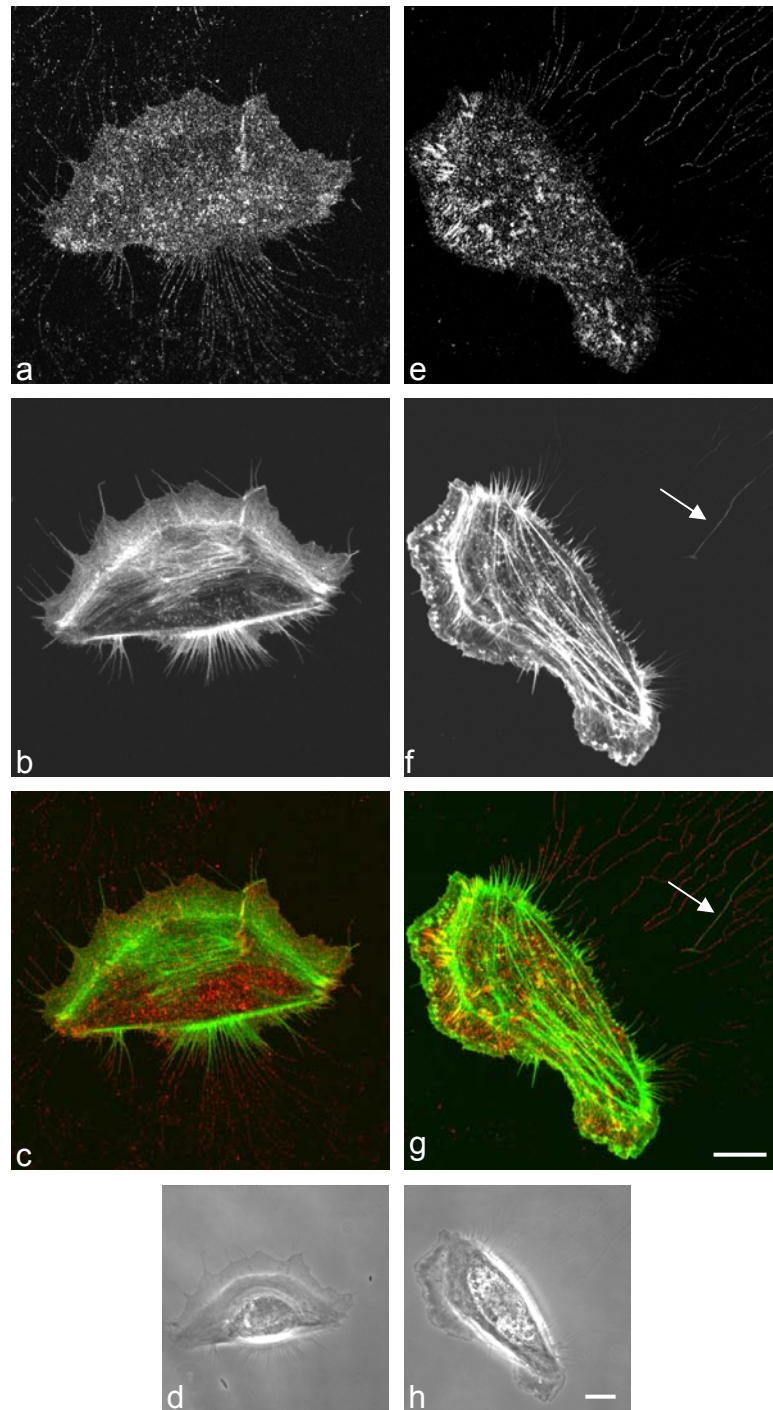


Abbildung 3.27: Immunocytochemische Detektion von $\beta 1$ Integrin (a, e und c, g) in NHK und R635X-Zellen, sowie Aktin-Markierung (b, f) und korrespondierendes Phasenkontrastbild (d, h). In beiden Migrationsspuren ist $\beta 1$ Integrin vorhanden. Die Spur von R635X-Zellen schien weniger fragmentiert und zum Teil noch mit Aktin assoziiert (Pfeil in f und g). Balken: 10 μm

4. Diskussion

Laminin 5, ein wichtiges Ankerprotein in der Basalmembran der Haut, verbindet die basalen Keratinozyten mit der dermalen ECM. Laminin 5 setzt sich wie alle anderen Isoformen von Laminin aus drei genetisch verschiedenen Ketten zusammen, die als α , β und γ Kette bezeichnet werden. Dabei ist die Funktion des Heterotrimers nur gewährleistet, wenn alle drei Ketten vorhanden sind. Tritt ein Defekt in einer der drei Ketten auf, ist die Assemblierung, die Sekretion und die Funktion gestört oder sogar komplett verhindert. Das Fehlen von Laminin 5 in der Haut führt zum dem Krankheitsbild der junktionalen Epidermolysis Bullosa (Eady et al., 1994; Christiano und Uitto, 1996), bei der die Haut bereits nach minimaler mechanischer Beanspruchung Blasen im Bereich der Basalmembran bildet (Pulkkinen et al., 1994a; Aberdam et al., 1994; Pulkkinen et al., 1994b; Kivirikko et al., 1995). Neben der Ankerfunktion in der Basalmembran wird Laminin 5 aber auch eine wichtige Rolle bei der Migration von Keratinozyten während der epidermalen Wundheilung zugeschrieben.

In dieser Arbeit wurden Laminin 5 defiziente Keratinozyten von Patienten untersucht, die an der schweren Herlitz-Form von JEB verstorben waren. Kern dieser Arbeit war die detaillierte Analyse der migratorischen Eigenschaften auf unterschiedlichen Substraten der dermalen ECM und der Basalmembran der Haut. Dabei wurden Morphologie, Dynamik der Migration als auch die Adhäsion der defizienten Keratinozyten untersucht. Es ergaben sich Unterschiede zu normalen Keratinozyten und auch Unterschiede auf den einzelnen gewählten Substraten. Diese Diversität und die möglichen Ursachen dafür wurden nachfolgend analysiert.

4.1 Laminin β 3-defiziente Keratinozyten sezernieren kein Laminin 5

Die Synthese der Laminin Heterotrimere findet im endoplasmatischen Retikulum statt, wobei sich zuerst eine β und γ Kette zusammenlagern (Utani et al., 1994; Yurchenco et al., 1997). Ohne diese Dimerbildung ist der weitere Zusammenbau und der Weitertransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat behindert (Cooper et al., 1981). Die Anlagerung der α -Kette spielt in diesem Vorgang ebenfalls eine zentrale Rolle. Erst durch die korrekte Trimerbildung ist die Glykosylierung im Golgi Apparat und die spätere Sekretion des Proteins möglich. Die Laminin 5

defizienten Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen von Patienten, die einen genetischen Defekt in der β 3-Kette von Laminin besitzen (LAMB3). Es handelt sich um eine Punktmutation, bei der an Position 635 des LAMB3 Genes eine C zu T Transition stattfindet, die eine Veränderung der Codierung eines Basentriplets zur Folge hat. Das Triplet an dieser Position, das für ein Arginin codiert, wird durch die Mutation zu einem Stop-Codon verändert (Kivirikko et al., 1996), wodurch die Translation abgebrochen und somit das Protein nicht gebildet wird. Ohne diese β -Kette ist demnach auch die weitere Bildung des Laminin 5 Heterotrimer unterbrochen. In immuncytochemischen Analysen von NHK und R635X zeigt sich, dass im Gegensatz zu den gesunden Zellen bei R635X-Zellen kein Laminin 5 sezerniert wird. Während bei NHK eine Spur von Laminin 5 hinter der migrierenden Zelle zu erkennen ist, zeigt sich bei R635X-Zellen lediglich eine schwache Markierung im Bereich des Zellkernes. Da der verwendete Antikörper polyklonal ist, der alle drei Ketten von Laminin 5 erkennt (persönliche Mitteilung M. Koch, Köln) kann es sich bei dieser schwachen Färbung um die weiterhin synthetisierten α und γ Ketten handeln, dessen Produktion nicht durch den Gendefekt in der β -Kette behindert wird. Es ist aber bekannt, dass der intrazelluläre Transport und weitere Modifikation im Golgi Komplex nur bei einer korrekten Bindung des Heterotrimeres erfolgt (Cooper et al., 1981).

4.2 R635X-Zellen migrieren signifikant langsamer als NHK

R635X-Zellen weisen bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Migrationsuntersuchungen auf allen verwendeten Matrices signifikant geringere Geschwindigkeiten auf als NHK. Dabei ist auf Fibronectin und Kollagen I die Geschwindigkeit bis zu 40% geringer, während auf Kollagen IV der Unterschied mit einer ca. 10%igen Verringerung am geringsten ausfällt. Laminin 5 ist offensichtlich essentiell für eine effektive Migration. Die Migrationsgeschwindigkeit von R635X-Zellen ist auch auf der HaCaT-Matrix geringer, obwohl in dieser Matrix Laminin 5 enthalten ist. Bereits in früheren Untersuchungen konnte entsprechend festgestellt werden, dass für die Migration von Keratinozyten endogenes Laminin 5 notwendig ist (Kainulainen et al., 1998). Auch die Prozessierung der einzelnen Ketten hat einen großen Einfluss auf die migrationsfördernde Wirkung von Laminin 5. Die Abspaltung der globulären Domänen LG4 und LG5 führt zu einer verstärkten Affinität zum

hemidesmosomalen $\alpha 6\beta 4$ Integrin und somit zur gesteigerten Adhärenz (Goldfinger et al., 1998; Ghosh et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind die Domänen LG3 und LG4 Liganden für $\alpha 3\beta 1$ Integrin und wirken somit migrationsfördernd. Die Abspaltung eines 50 kDa großen Fragmentes am N-terminalen Arm der γ Kette führt ebenfalls zu einer erhöhten Migration von Keratinozyten (Salo et al., 1999). Die Notwendigkeit der Produktion und Sekretion von endogenem Laminin 5 für migrierende Keratinozyten wird somit am Beispiel der hier untersuchten Laminin 5 defizienten Zellen deutlich.

4.3 Die geringere Migrationsgeschwindigkeit Laminin 5 defizienter Keratinozyten resultiert aus einer ineffizienten Lamellendynamik

Die Migration von Zellen ist eine konzertierte Aktion von Protrusion, Adhäsion, Kontraktion und Lösen von Adhäsionen. Dabei bildet die Protrusion der Lamelle den initialen Schritt (Lauffenburger und Horwitz, 1996; Sheetz et al., 1998), während eine effiziente Migration von der Integrin vermittelten Adhäsion der Lamellipodien abhängig ist (DeMali und Burridge, 2003). Bei nicht ausreichender Adhäsion der Lamellipodien werden diese in Form von „Membrane ruffles“ zurückgezogen (Alt, 1995) was der Migration der Zelle entgegenwirkt (DeMali und Burridge, 2003). „Membrane ruffles“ sind aktinreiche Membranbestandteile, die über einen Myosin 2 vermittelten retrograden Transport wieder zum Zellkörper gelangen (Henson et al., 1999; Lin et al., 1996). Das Motorprotein Myosin 2 ist auch für die Akto-myosin vermittelte Kontraktion des Zellkörpers während der Migration verantwortlich (Gomes et al., 2005). Eine Inhibition der Myosin 2 vermittelten Translokation des Zellkörpers führt zu einer geringeren Migrationsgeschwindigkeit (Mitchison und Cramer, 1996; Waterman-Storer und Salmon, 1997). Die Akto-myosin vermittelte Kontraktion des Zellkörpers benötigt Ankerpunkte, um eine Zugkraft aufzubauen. Diese Ankerpunkte werden durch die Integrin vermittelte Adhäsion der Lamelle an der Matrix am vorderen Ende der Zelle hergestellt. Die in Fokalkomplexen an Lamellipodien organisierten Kontakte dienen der Zelle als das entscheidende Widerlager zum Aufbau der Zugkraft. Bei nicht ausreichender Adhäsion fehlt das Widerlager und es findet ein retrograder Transport der Membran zurück zum Zellkörper statt. Somit ist die Stabilität der Lamellipodien ein begrenzender Faktor für die Migrationsgeschwindigkeit. Dies kann eine Erklärung für die geringere Migrationsgeschwindigkeit von R635X-Zellen sein, die deutlich geringere Lamellen-

Protrusionsdauern zeigen und eine viel höhere „Membrane ruffle“ Frequenz haben. Durch mangelnde Adhärenz der Lamelle könnten diese kurzen Protrusionen und die häufigen „Membrane ruffles“ entstehen. Die Interaktion von $\alpha 5 \beta 1$ Integrin mit Fibronektin ist essentiell wichtig für die Migration von Keratinozyten (Wu et al., 1993; Zhang et al., 1993), während auf einer Laminin Matrix $\alpha 3 \beta 1$ Integrin benötigt wird (Watt und Hertle, 1994). Unterschiede in der Lamellendynamik sind jedoch bei R635X-Zellen auf den verschiedenen Substraten in einem nicht signifikanten Bereich. Lediglich auf der von HaCaT-Zellen gebildeten Matrix, die Laminin 5 enthält, ist eine erhöhte Protrusionsdauer zu erkennen, was die Vermutung, dass Laminin 5 einen Einfluss bei der effektiven Lamellendynamik ausübt, noch verstärkt.

4.4 R635X-Zellen weisen eine bipolare Morphologie auf Kollagen I und IV auf

Migrierende NHK weisen eine charakteristische monopolare Morphologie auf, wobei sich in Bewegungsrichtung eine deutliche Lamelle ausbildet, während am hinteren Zellpol lange, tubuläre Retraktionsfasern ausgebildet werden. Die Form der Zelle ist dabei meist elliptisch, der organellreiche Zellkörper und der Zellkern sind im hinteren Teil der Zelle lokalisiert. Wie hier gezeigt, weisen R635X-Zellen diese charakteristische Form jedoch nur auf den Substraten Fibronektin und der HaCaT-Matrix auf, während sie auf den beiden Kollagen Matrices lang gestreckt und bi- oder tripolar sind. An den zwei bis drei schmalen Enden befindet sich jeweils eine Region mit einer kleinen Lamelle, die deutliche Lamellendynamik zeigt. Die Polarisierung von Keratinozyten während der Wundheilung und die Rolle von Laminin 5 in diesem Prozess wird zur Zeit diskutiert. Hier werden im Folgenden zwei Modelle vorgestellt.

1. Zur initialen Ausbildung einer polarisierten Zelle ist $\alpha 3 \beta 1$ Integrin notwendig. Dazu werden die für die stabile Adhäsion beteiligten $\alpha 6 \beta 4$ Integrin-Bindungen durch $\alpha 3 \beta 1$ Integrin-Interaktion mit dem Substrat im Bereich der neu entstehenden Lamelle ersetzt. Die Interaktion mit sezerniertem Laminin 5 ist dabei von essentieller Bedeutung (Choma et al., 2004). Der Einfluss von kleinen Rho-GTPasen wird in diesem Modell herausgestellt: Rac1 ist ein Schlüsselsignal zur Lamellipodienbildung (Nobes und Hall, 1999), wobei wiederum Adhäsion für die Aktivierung von Rac 1 notwendig ist (Berrier et al., 2002; Hirsch et al., 2002; Price et al., 1998). Somit können Integrine die Aktivierung und Lokalisation von Rac 1 beeinflussen (Del Pozo

et al., 2000 und 2002). Transfektion von murinen Keratinozyten mit der dominant negativen Rac Mutante Rac1N17 verhindert die Ausbildung von Lamellipodien. Zusätzlich führt die konstitutive Expression von Rac 1 durch Transfektion mit der Rac1L61 Mutante in $\alpha 3$ Integrin negativen murinen Keratinozyten ebenfalls zur Inhibition der Lamellenbildung (Choma et al., 2004). Die Interaktion von $\alpha 3\beta 1$ Integrin mit Laminin 5 und die Aktivierung des Rac Signaltransduktionsweges scheint essentiell für die Ausbildung einer stabilen Lamelle zu sein (Abb. 4.1).

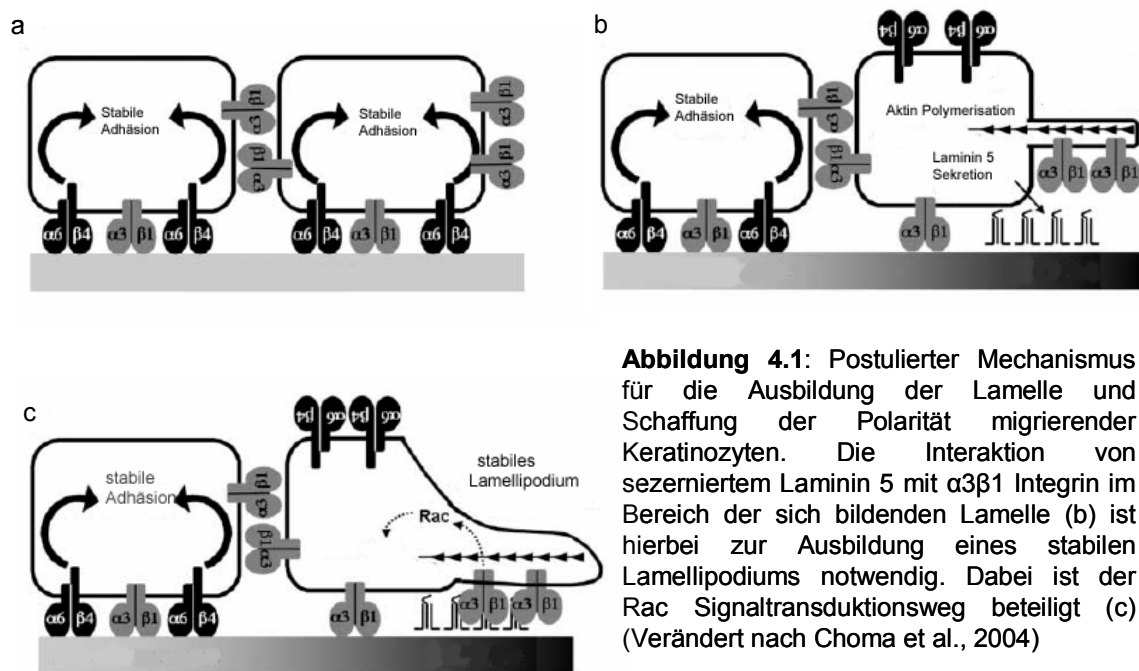


Abbildung 4.1: Postulierter Mechanismus für die Ausbildung der Lamelle und Schaffung der Polarität migrierender Keratinozyten. Die Interaktion von sezerniertem Laminin 5 mit $\alpha 3\beta 1$ Integrin im Bereich der sich bildenden Lamelle (b) ist hierbei zur Ausbildung eines stabilen Lamellipodiums notwendig. Dabei ist der Rac Signaltransduktionsweg beteiligt (c) (Verändert nach Choma et al., 2004)

2. Sezerniertes Laminin 5 ist in Bindung mit $\alpha 3\beta 1$ Integrin am hinteren Ende der migrierenden Zelle für die Polarisierung der Zelle verantwortlich (Abb. 4.2). Die Protrusion und Stabilisierung der Lamelle am vorderen Ende erfolgt durch die Interaktion von $\alpha 2\beta 1$ Integrin mit Kollagen I. Die Positionierung von Laminin 5 und $\alpha 3\beta 1$ Integrin erfolgt an der lateralen und hinteren Seite der Zelle und tritt zusätzlich da auf, wo die Kollagen I Matrix zuvor proteolytisch abgebaut worden ist (Frank und Carter, 2004). Der Proteolyse von Kollagen I durch MMP1, einer Matrix Metalloproteinase, an distinkten Stellen unter der Zelle führt zu einer Verringerung des Kontaktes von $\alpha 2\beta 1$ Integrin zum Substrat im Bereich der Lamelle und sorgt für eine kontinuierliche Migration (Pilcher et al., 1997). Auch der Einfluss von vernetzten

Integrin Dimeren auf die Aktivierung des Rho-GTPasen Signaltransduktionsweges spielt hierbei eine Rolle.

Die Vernetzung von Integrinen bei der Adhäsion ist ein lokaler Stimulus für Rac 1 und fördert die Lamellipodienausbildung (Del Pozo et al., 2000; Del Pozo et al., 2002). Die Bindung von $\alpha\beta1$ Integrin an Laminin 5 ist aber unabhängig von einer Vernetzung der Integrine (Frank und Carter, 2003). Daher wird angenommen, dass die fehlende Quervernetzung der Integrine am Hinterende der Zelle als negativer Stimulus für Rac 1 wirkt und somit die Ausbildung einer weiteren Lamelle verhindert. Dadurch wird die Polarität der Zelle in eine Richtung gefördert (Frank und Carter, 2003). Die in dieser Arbeit untersuchten R635X-Zellen weisen eine geringere Lamellenprotrusionsdauer auf und zeigten erhöhte Frequenz von „Membrane ruffles“, was auf eine geringere Adhäsionsfähigkeit der Lamelle schließen lässt. Geringere Adhäsion und Stabilität der Lamelle führt aber demnach auch zu einer geringeren Aktivierung von Rac1 und zur Destabilisierung von Lamellipodien.

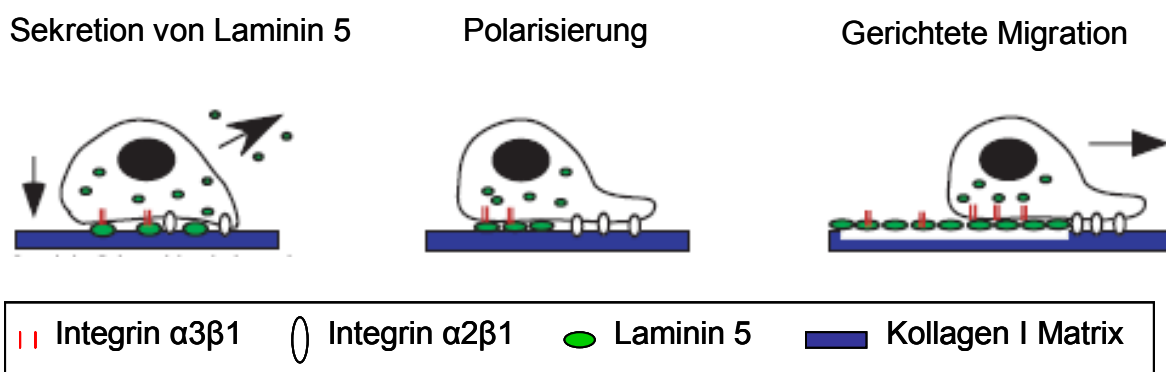


Abbildung 4.2: Postulierte Rolle von Laminin 5 bei der Migration von Keratinozyten. Am vorderen Ende findet eine Interaktion von $\alpha2\beta1$ Integrin (offene Ovale) mit der Kollagen I Matrix statt. Am hinteren Ende wird sezerniertes Laminin 5 (geschlossene Ovale) in Assoziation mit $\alpha3\beta1$ Integrin (Doppelstriche) nach erfolgter Degradation der Kollagen I Matrix positioniert. Bei diesem Modell sorgt Laminin 5 am hinteren Ende der Zelle für die Polarisierung der Zelle (Verändert nach Frank und Carter, 2003)

Da das Fehlen von Laminin 5 aber auch zu einer Störung der Interaktion mit $\alpha3\beta1$ Integrin an der lateralen und hinteren Region der Zelle führt, tritt kein negativer Stimulus für Rac 1 in diesem Bereich auf und die Bildung einer weiteren Lamellenprotrusion ist möglich. Experimente mit konstitutiv Rac1 exprimierenden und

Rac 1 dominant negativen Zellen, die kein Laminin 5 sezernieren, könnten den Einfluss des Signaltransduktionsweges über kleine Rho-GTPasen aufklären. Da diese veränderte Morphologie nicht auf Fibronectin und der HaCaT-Matrix auftritt, müssen hier andere Interaktionen zwischen der Zelle und der Matrix eine Rolle spielen. Dies wird in Kapitel 4.7 diskutiert.

4.5 R635X-Zellen migrieren saltatorisch

Neben ihrer veränderten Morphologie unterscheiden sich R635X-Zellen von NHK auch durch ihren Migrationsmodus. Während NHK sich kontinuierlich mit einer gleichmäßigen Migrationsgeschwindigkeit fortbewegen, zeigen R635X-Zellen eine saltatorische Bewegungsform: Längeren Phasen mit sehr niedrigen Migrationsgeschwindigkeiten folgen kurze, ruckartige Bewegungen mit sehr hohen Geschwindigkeiten. Diese ruckartige Bewegung tritt immer dann auf, wenn eine der beiden adhärennten Lamellen Regionen den Kontakt zum Substrat verliert und die Zelle in die Richtung des noch adhärennten Zellpoles gezogen wird. Dieses Zusammenziehen der Zelle findet innerhalb von wenigen Minuten statt, was bei der Einzelzellanalyse in Bilderserien dokumentiert wird. Nach dieser Kontraktion bildet die Zelle erneut zwei oder drei Kontaktzonen aus. Die schnellen Bewegungen der Zellen bei der Ablösung eines der Lamellenenden resultieren aus der mangelnden Adhärenz der Zelle. Mit Hilfe von Interferenz-Reflektionsmikroskopie kann gezeigt werden, dass R635X-Zellen auf Kollagen I und IV lediglich an den beiden Zellenden, an denen Lamellen vorhanden sind, Kontakte zum Substrat ausbilden. Der zentral gelegene Zellkörper liegt dann entweder dem Substrat locker auf oder hat keinen Kontakt. Da der Zellkörper nicht verankert ist, gibt es in diesem Bereich auch keine Verzögerung der Zugkraft durch Kontakte zum Substrat. Das Zusammenziehen der Zelle ist dann kontinuierlich und gleichförmig. Durch immunocytochemische Färbung von Vinculin können die mit dem Aktin-Zytoskelett verbundenen Fokalkontakte lokalisiert werden. Hier zeigt sich, dass R635X-Zellen an den beiden polaren Enden diese Kontakte ausbilden, während NHK diese Kontakte über die gesamte Breite der Lamelle und somit über die gesamte Breite der migrierenden Zelle bildet. Der Spalt unter dem nicht adhärennten Zellkörper ermöglicht es R635X-Zellen einander zu unterwandern ohne Zell-Zell oder Zell-Matrix Kontakte auszubilden. Patienten mit der JEB weisen Blasenbildung im Bereich der epidermalen Basalmembran durch das

Fehlen von Laminin 5 auf (Pulkkinen und Uitto, 1999) und Laminin 5 defiziente Keratinozyten zeigen reduzierte Adhäsionseigenschaften auf Kollagen IV (Miquel et al., 1996). Insofern hat diese mangelnde Adhärenz einen erheblichen Einfluss auf die Migration der Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die initiale Adhäsion der Zellen auf Kollagen I über $\alpha 2\beta 1$ Integrin läuft und unabhängig von Laminin 5 ist. Die Möglichkeit der Zelle, über verschiedene Signaltransduktionswege über $\alpha 3\beta 1$ und $\alpha 6\beta 4$ Integrin mit Laminin 5 zu interagieren, zeigt möglicherweise eine transdominante Inhibition von Kollagen durch Laminin 5 (Nguyen et al., 2000). Auch konnte in Zellen, denen $\alpha 3\beta 1$ Integrin fehlte, eine erhöhte Interaktion von Integrin $\alpha 2\beta 1$ oder $\alpha 5\beta 1$ beobachtet werden (Hodivala-Dilke et al., 1998). Somit können Laminin 5 defiziente Keratinozyten auf Kollagen I adhären, die Ausbildung der Polarität ist ohne Laminin 5 aber nicht möglich, so dass es zu der Ausbildung des mehrpolaren und saltatorisch migrierenden Phänotypen kommt.

4.6 R635X-Zellen weisen eine geringere Direktionalität der Migration auf Kollagen auf

Der Adhäsionsdefekt von R635X-Zellen mit resultierender Polaritätsveränderung und saltatorischer Migration hat auch Einfluss auf die Direktionalität der Bewegung. Die Direktionalität ist ein Maß für die Geradlinigkeit der Migration. Dabei wird mit Hilfe des Persistenz Koeffizienten die zurückgelegte Strecke vom Startpunkt aus mit der Strecke, die von der Zelle insgesamt zurückgelegt wurde, verglichen. R635X-Zellen auf den beiden Kollagen Matrices zeigen eine signifikant geringere Direktionalität. Die Ursache dafür ist wiederum in der mangelnden Adhärenz der Zelle zu finden. Nach dem Lösen eines der beiden adhären Enden zieht sich die Zelle ruckartig zusammen, um dann erneut die bipolare Form anzunehmen, wobei die neue Ausrichtung nicht immer identisch mit der ursprünglichen ist. Der Zyklus aus Strecken und Zusammenziehen beginnt daraufhin erneut, wobei die Zelle dann ruckartig in eine andere Richtung gezogen wird. Eine direktionale Bewegung wie sie von Fisch-Keratozyten gezeigt wird, setzt das geregelte Lösen von Fokalkomplexen vom Substrat und von lateralen Kontakten, die für Stabilität in der Ausrichtung der Zelle und die Richtung der Bewegung verantwortlich sind, voraus (Lee und Jacobson, 1997; Small et al., 1996). Da R635X-Zellen auf Kollagen keine klare Polarität dieser Art aufweisen, ist auch eine gerichtete Bewegung nicht möglich.

4.7 Die Monopolarität von R635X-Zellen auf Fibronektin wurde durch $\alpha 5\beta 1$ Integrin bewirkt.

Während auf den beiden Kollagen Matrices die Polarität der R635X-Zellen verändert ist, weisen sie auf Fibronektin keine Veränderung im Vergleich zu NHK auf. Sie sind monopolar mit einer deutlichen Lamelle am Vorderende und Retraktionsfasern am Hinterende. Auch die Adhäsion des Zellkörpers zeigt keine Unterschiede zu NHK. Sie weisen zudem eine normale Verteilung von Vinculin über die gesamte Breite der Zellunterseite auf. Weder eine saltatorische Bewegung, noch eine signifikant geringere Direktionalität ist festzustellen. Durch funktionale Blockierung von $\alpha 5$ Integrin mittels inhibitorischer Antikörper zeigen R635X-Zellen auch auf Fibronektin den bi- bzw. tripolaren Phänotyp. Darüber hinaus stellt sich hier auch der saltatorische Bewegungstyp mit kurzen, ruckartigen Bewegungen gefolgt von längeren Phasen mit geringer Geschwindigkeit ein. $\alpha 5\beta 1$ Integrin ist als ein Hauptrezeptor von Fibronektin beschrieben und fördert die Ausbildung von Stressfasern und Fokalkontakten (Gu et al., 2001). Die Migration von Keratinozyten auf einer Fibronektin Matrix wird durch die Interaktion mit $\alpha 5\beta 1$ Integrin hergestellt und eine Blockierung von $\alpha 5\beta 1$ Integrin führt zu einer geringeren Migrationsgeschwindigkeit auf Fibronektin (Kim et al., 1992). Darüber hinaus hat sich jüngst gezeigt, dass eine Blockierung von $\alpha 5$ Integrin oder $\beta 1$ Integrin zu einer geringeren Persistenz der Lamelle und einer geringeren Migrationsgeschwindigkeit führt (Borm et al., 2005). Auch R635X-Zellen weisen eine kürzere Protrusionsdauer der Lamelle, sowie eine geringere Translokationsgeschwindigkeit auf. Der Einfluss von $\alpha 5\beta 1$ Integrin kommt also bei der Ausbildung der Polarität der Zelle zum Tragen, nicht aber bei der Effizienz der Migration. Die Blockierung von $\alpha 5$ Integrin führt zur Aufhebung des kompensativen Effektes bei R635X-Zellen, was in der zuvor auf Kollagen gezeigten Migrationsform und der veränderten Morphologie resultiert.

4.8 R635X-Zellen bilden eine veränderte Migrationsspur

Im Prozess der Migration ist die Ablösung von Adhäsionen am hinteren Ende der Zelle notwendig, um eine Vorwärtsbewegung zu ermöglichen (Huttenlocher et al., 1995; Lauffenburger und Horwitz, 1996). Bei NHK bilden sich am hinteren Ende Retraktionsfasern, die eine tubuläre Form besitzen und aus den noch nicht gelösten Zell-Substrat Adhäsionen resultieren. Diese Fasern werden aber nach der Lösung

der Kontakte nicht komplett zur Zelle hingezogen, Teile dieser Strukturen bleiben hinter der Zelle zurück. Dieser Verlust von Zellmaterial wurde zuerst bei Fibroblasten beobachtet (Bard und Hay, 1975; Chen, 1981; Regen und Horwitz, 1992; Lauffenburger und Horwitz, 1996; Wells et al., 1998) und konnte neuerdings auch bei Keratinozyten beschrieben werden und wurde als Migrationsspur („migration track“) bezeichnet (Penas et al., 2000; Kirfel et al., 2003; Rigort et al., 2004). Migrierende NHK hinterlassen eine Spur von Makroaggregaten, die aus Membranfragmenten und membranassoziierten Proteinen bestehen. Bei normalen humanen Keratinozyten ist diese Spur in einer charakteristischen Form organisiert. Es lassen sich zwei verschiedene Typen unterscheiden:

Typ I Makroaggregate mit tubulären und sphärischen Formen, die in einer perlschnurartigen Form hinter den Retraktionsfasern entstehen. Sie sind das Resultat der Fragmentierung der Retraktionsfasern und enthalten $\beta 1$ Integrin (Kirfel et al., 2003; Rigort et al., 2004).

Typ II Makroaggregate sind sphärisch und clusterförmig zwischen den Typ I Makroaggregaten lokalisiert. Sie enthalten $\beta 4$ Integrin, das in Hemidesmosomen als Integrin $\alpha 6\beta 4$ Heterodimer vorkommt (Mercurio und Rabinovitz, 2001; Mercurio et al., 2001). Diese charakteristische Anordnung der Makroaggregate konnte im Rahmen dieser Arbeit bei NHK bestätigt werden. Bei R635X-Zellen kann diese charakteristische Anordnung der Migrationsspur nicht beobachtet werden. Stattdessen sind extrem verlängerte Retraktionsfasern zu erkennen. Hinter diesen Fasern tritt weder die geordnete perlschnurartige Struktur von Typ I Makroaggregaten auf, noch sind in den Zwischenräumen die Makroaggregate Typ II nachweisbar. Immuncytochemische Färbungen zeigen aber, dass sowohl $\beta 4$ Integrin, als auch $\beta 1$ Integrin in der Spur von R635X-Zellen vorhanden ist. Die deutlich längeren Retraktionsfasern enthalten auch fibrilläres Aktin, was auf den noch nicht begonnenen Fragmentierungsprozess schließen lässt. Retraktionsfasern beinhalten Aktinfasern, während nach der Fragmentierung kein fibrilläres oder globuläres Aktin in der Migrationsspur nachweisbar ist (Kirfel et al., 2003). Die längeren Retraktionsfasern und das Fehlen der Migrationsspur sind ein Hinweis darauf, dass das Fehlen von Laminin 5 auch bei dem Prozess des Lösens von Adhäsionen am hinteren Zellende eine Rolle spielt. Ob es sich um einen aktiven Prozess handelt, oder um ein sekundäres Resultat aufgrund der veränderten Migrationsform konnte noch nicht hinreichend geklärt werden. Da aber die

veränderte Migrationsspur nicht nur auf Kollagen, sondern auch auf Fibronectin auftritt, ist die Ursache nicht in der Kollagen-spezifischen Art der Migration zu suchen, sondern in der allgemeinen Migrationscharakteristik Laminin 5 defizienter Keratinozyten.

4.9 Der saltatorische Migrationsmodus kann durch Blockierung von Laminin 5 induziert werden

Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit lassen die Vermutung zu, dass sowohl der migratorische Modus auf den Kollagen Matrices, als auch die geringere Migrationsgeschwindigkeit auf allen Matrices durch das Fehlen von Laminin 5 verursacht wird. Um dies hinreichend zu klären wurde mit inhibitorischen Antikörpern Laminin 5 in NHK blockiert. Auf den beiden Kollagen Matrices ist nach der Inhibition eine saltatorische Migration zu erkennen. Die Zellen sind lang gestreckt und haben in der Mehrzahl zwei oder drei polaren Enden mit Lamelle. Mit Hilfe der Reflektions-Interferenzmikroskopie lässt sich ein nicht adhärenter Zellkörper beobachten. Somit ist dieser Phänotyp, der jetzt dem der R635X-Zellen gleicht, direkt auf das Fehlen von Laminin 5-Bindung zurückzuführen. Auch die gleichzeitige Blockierung von Laminin 5 und $\alpha 5$ Integrin auf Fibronectin führt in NHK zu diesem Phänotyp, was den Einfluss von $\alpha 5 \beta 1$ Integrin bei der Ausbildung der normalen Polarität bei Laminin 5 Defizienz erhärtet. Untersuchungen von Mäusen, denen die Laminin $\gamma 2$ Kette inaktiviert wird, zeigen Blasenbildung in der Haut. Der beschriebene Phänotyp dieser Tiere gleicht der humanen junctionalen Epidermolysis Bullosa (Meng et al., 2003). Hier liegt also ein Adhäsionsdefekt der Keratinozyten vor, der in dieser Arbeit durch die Inhibition von Laminin 5 in normalen humanen Keratinozyten ebenfalls induziert werden konnte.

4. 10 Hierarchie der Adhäsionspartner

Die in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsproteine und die Interaktion mit dem Substrat führen zu einem Modell, in dem die Abhängigkeit vom Substrat bei Laminin 5 Defizienz deutlich wird. So ist die normale epitheliale Morphologie von migrierenden Keratinozyten auf Fibronektin trotz Laminin 5 Defizienz hergestellt. Auf Kollagen ist die Adhäsion jedoch deutlich geringer und führt zu der Ausbildung eines bipolaren Phänotyps. Auf Glas ist aufgrund mangelnder Adhäsionspartner die Adhärenz am schwächsten, Laminin 5 defiziente Keratinozyten können hier keine Polarität herstellen (Abb.4.3)

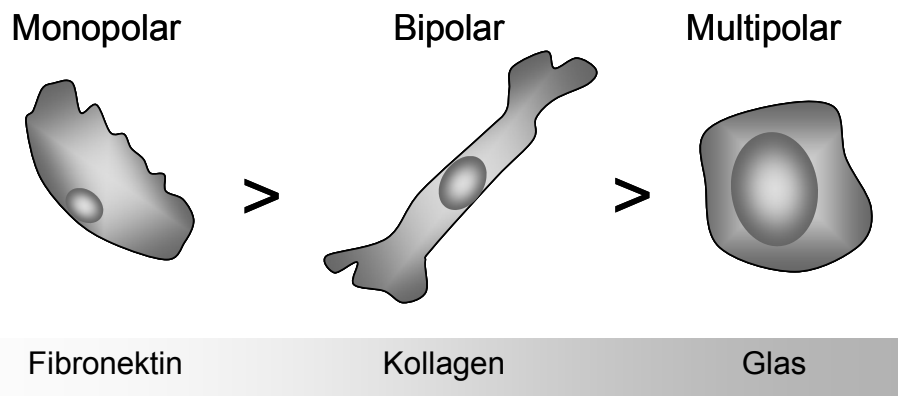


Abbildung 4.3: Hierarchie der Adhäsionspartner bei Laminin 5 Defizienz. Während auf Fibronektin eine für migrierende Keratinozyten normale Polarität vorhanden war, konnte auf Kollagen eine geringere Adhärenz und für Glas eine noch geringere Adhärenz festgestellt werden.

Die normale epitheliale Morphologie Laminin 5 defizienter Keratinozyten auf Fibronektin wird durch die Interaktion von $\alpha 5\beta 1$ Integrin mit Fibronektin hergestellt. Nach Inhibition von $\alpha 5$ Integrin ist die Polarität durch Adhäsionsverlust nicht mehr vorhanden und die Zellen nehmen eine bipolare Morphologie ein, die auch auf Kollagen vorhanden ist. Die Inhibition von $\alpha 5$ Integrin in NHK, die Laminin 5 sezernieren, führt dagegen nicht zu dem bipolaren Phänotyp. So können Laminin 5 und $\alpha 5\beta 1$ Integrin auf Fibronektin teilweise eine kompensatorische Rolle übernehmen.

Eine Inhibition der Interaktion von $\alpha 2\beta 1$ Integrin auf Kollagen I führt zu keiner weiteren Veränderung der Morphologie, was den Schluss nahelegt, dass die Interaktion von $\alpha 2\beta 1$ Integrin mit Kollagen I zwar zur initialen Adhäsion von Keratinozyten essentiell ist, nicht aber während des Prozesses der Migration (Abb. 4.4).






	Substrat		
	Fibronektin	Kollagen	Glas
Blockierung von			
Laminin 5			
Laminin 5 + Integrin	 $\alpha 5\beta 1$	 $\alpha 2\beta 1$	---

Abbildung 4.4: Die Interaktion von $\alpha 5\beta 1$ Integrin ist zur Ausbildung der Polarität von Laminin 5 defizienten Zellen auf Fibronektin essentiell. Die Interaktion von $\alpha 2\beta 1$ auf Kollagen ist während der Migration bei Abwesenheit von Laminin 5 nicht essentiell.

5. Zusammenfassung

Laminin 5 ist ein wichtiges Adhäsionsprotein in der epidermalen Basalmembran, das durch Bindung an Integrin-Rezeptoren auf der Oberfläche der basalen Keratinozyten zentral für deren mechanische Verankerung ist. Entsprechend resultiert Laminin 5 Defizienz in der letalen Herlitz-Form von Epidermolysis Bullosa, einer blasenbildenden Erkrankung der Haut infolge unzureichender Adhärenz zur Basalmembran. Darüber hinaus wird auch eine zentrale Rolle von Laminin 5 bei der Migration von Keratinozyten während der Wundheilung diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit Hilfe von „Live Cell Imaging“-Studien in Kombination mit dem hochauflösenden SACED Assay die Motilität und Migration Laminin 5 defizienter humaner Keratinozyten vergleichend zu normalen humanen Keratinozyten analysiert. Die Laminin 5 defizienten Zellen zeigten dabei unabhängig vom verwendeten Substrat eine signifikant reduzierte Persistenz der Lamellipodien und hieraus resultierend eine deutlich geringere Migrationsgeschwindigkeit. Auffällig war dabei auf Kollagen Substraten eine veränderte Morphologie der defizienten Zellen von einem mono- hin zu einem bi- oder tripolaren Phänotyp. Klar korreliert war der modifizierte Phänotyp dabei mit einem Übergang von der für Keratinozyten charakteristischen kontinuierlichen zu einem saltatorischen Migrationsmodus mit deutlich reduzierter direktonaler Persistenz.

Detaillierte Untersuchungen der Zell-Substrat Adhäsion defizienter Zellen zeigten, dass die veränderte Zellmorphologie auf einem Adhäsions-Defekt im Bereich des Zellkörpers aber auch reduzierter Lamellipodienadhärenz basiert, die ursächlich für die saltatorische Migration sind.

Nur teilweise konnten defiziente Zellen diesen Defekt durch Interaktion von Integrinen mit dem Substrat kompensieren. So führte die Verwendung von Fibronectin als Substrat durch seinen Liganden $\alpha 5 \beta 1$ Integrin zu einer Erhöhung der Adhärenz und damit einhergehend zu der charakteristischen Morphologie epidermaler Zellen, nicht aber zur Kompensation der ineffizienteren Lamellendynamik und Migrationsgeschwindigkeit. Der kompensatorische Effekt wurde durch die Induktion eines bipolaren Phänotyps und eines saltatorischen Migrationsmodus mittels Hemmung der Interaktion von $\alpha 5$ Integrin bei Laminin 5

defizienten Keratinozyten und des daraus resultierenden Adhäsionsdefektes bestätigt.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen somit eindeutig, dass Migrationsmodus und Migrationseffizienz epidermaler Keratinozyten von der Substrat-Adhärenz der Zellen abhängt. Die Adhäsionsproteine Fibronektin und Laminin 5 sowie ihre Rezeptoren aus der Integrin-Familie scheinen dabei essentielle und nur zum Teil redundante Funktionen zu erfüllen. Die Ergebnisse legen zudem nahe, dass das Fehlen von Laminin 5 zu einer Wundheilungsstörung infolge reduzierter Keratinozyten-Migration führt, die Anteil an der Letalität der Herlitz-Form von Epidermolysis Bullosa hat.

6. Literaturverzeichnis

Aberdam, D., Galliano, M. F., Vailly, J., Pulkkinen, L., Bonifas, J., Christiano, A. M., Tryggvason, K., Uitto, J., Epstein, E. H., Jr. und Ortonne, J. P. (1994) Herlitz's junctional epidermolysis bullosa is linked to mutations in the gene (LAMC2) for the gamma 2 subunit of nicein/kalinin (LAMININ-5). *Nat Genet*, 6, 299-304

Alt, W., Brosteanu, O., Hinz, B. und Kaiser, H. W. (1995) Patterns of spontaneous motility in videomicrographs of human epidermal keratinocytes (HEK). *Biochem Cell Biol*, 73, 441-459

Amano, S., Scott, I. C., Takahara, K., Koch, M., Champlaud, M. F., Gerecke, D. R., Keene, D. R., Hudson, D. L., Nishiyama, T., Lee, S., Greenspan, D. S. und Burgeson, R. E. (2000) Bone morphogenetic protein 1 is an extracellular processing enzyme of the laminin 5 gamma 2 chain. *J Biol Chem*, 275, 22728-22735

Aumailley, M., Timpl, R. und Sonnenberg, A. (1990) Antibody to integrin alpha 6 subunit specifically inhibits cell-binding to laminin fragment 8. *Exp Cell Res*, 188, 55-60

Aumailley, M. und Rousselle, P. (1999) Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biol*, 18, 19-28

Bard, J. B. und Hay, E. D. (1975) The behavior of fibroblasts from the developing avian cornea. Morphology and movement in situ and in vitro. *J Cell Biol*, 67, 400-418

Beck, K., Hunter, I. und Engel, J. (1990) Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *Faseb J*, 4, 148-160

Berrier, A. L., Martinez, R., Bokoch, G. M. und LaFlamme, S. E. (2002) The integrin beta tail is required and sufficient to regulate adhesion signaling to Rac1. *J Cell Sci*, 115, 4285-4291

Borm, B., Requardt, R. P., Herzog, V. und Kirfel, G. (2005) Membrane ruffles in cell migration: indicators of inefficient lamellipodia adhesion and compartments of actin filament reorganization. *Exp Cell Res*, 302, 83-95

Borradori, L. und Sonnenberg, A. (1999) Structure and function of hemidesmosomes: more than simple adhesion complexes. *J Invest Dermatol*, 112, 411-418

Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. und Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, 106, 761-771

Brown, J. C. und Timpl, R. (1995) The collagen superfamily. *Int Arch Allergy Immunol*, 107, 484-490

Burgeson, R. E., Chiquet, M., Deutzmann, R., Ekblom, P., Engel, J., Kleinman, H., Martin, G. R., Meneguzzi, G., Paulsson, M., Sanes, J. und et al. (1994) A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol*, 14, 209-211

Buth, H., Wolters, B., Hartwig, B., Meier-Bornheim, R., Veith, H., Hansen, M., Sommerhoff, C. P., Schaschke, N., Machleidt, W., Fusenig, N. E., Boukamp, P. und Brix, K. (2004) HaCaT keratinocytes secrete lysosomal cysteine proteinases during migration. *Eur J Cell Biol*, 83, 781-795

Buttery, P. C. und ffrench-Constant, C. (1999) Laminin-2/integrin interactions enhance myelin membrane formation by oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci*, 14, 199-212

Carter, W. G., Kaur, P., Gil, S. G., Gahr, P. J. und Wayner, E. A. (1990) Distinct functions for integrins alpha 3 beta 1 in focal adhesions and alpha 6 beta 4/bullous pemphigoid antigen in a new stable anchoring contact (SAC) of keratinocytes: relation to hemidesmosomes. *J Cell Biol*, 111, 3141-3154

Carter, W. G., Ryan, M. C. und Gahr, P. J. (1991) Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell*, 65, 599-610

Champlaud, M. F., Lunstrum, G. P., Rousselle, P., Nishiyama, T., Keene, D. R. und Burgeson, R. E. (1996) Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol*, 132, 1189-1198

Chen, W. T. (1981) Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J Cell Biol*, 90, 187-200

Chen, M., Marinkovich, M. P., Veis, A., Cai, X., Rao, C. N., O'Toole, E. A. und Woodley, D. T. (1997) Interactions of the amino-terminal noncollagenous (NC1) domain of type VII collagen with extracellular matrix components. A potential role in epidermal-dermal adherence in human skin. *J Biol Chem*, 272, 14516-14522

Chen, M., Marinkovich, M. P., Jones, J. C., O'Toole, E. A., Li, Y. Y. und Woodley, D. T. (1999) NC1 domain of type VII collagen binds to the beta3 chain of laminin 5 via a unique subdomain within the fibronectin-like repeats. *J Invest Dermatol*, 112, 177-183

Chen, M., Costa, F. K., Lindvay, C. R., Han, Y. P. und Woodley, D. T. (2002) The recombinant expression of full-length type VII collagen and characterization of molecular mechanisms underlying dystrophic epidermolysis bullosa. *J Biol Chem*, 277, 2118-2124

Cheng, Y. S., Champlaud, M. F., Burgeson, R. E., Marinkovich, M. P. und Yurchenco, P. D. (1997) Self-assembly of laminin isoforms. *J Biol Chem*, 272, 31525-31532

Choma, D. P., Pumiglia, K. und DiPersio, C. M. (2004) Integrin alpha3beta1 directs the stabilization of a polarized lamellipodium in epithelial cells through activation of Rac1. *J Cell Sci*, 117, 3947-3959

- Christiano, A. M. und Uitto, J.** (1996) Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone. Revelations from the paradigms of epidermolysis bullosa. *Exp Dermatol*, 5, 1-11
- Colognato, H., MacCarrick, M., O'Rear, J. J. und Yurchenco, P. D.** (1997) The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *J Biol Chem*, 272, 29330-29336
- Colognato, H., Winkelmann, D. A. und Yurchenco, P. D.** (1999) Laminin polymerization induces a receptor-cytoskeleton network. *J Cell Biol*, 145, 619-631
- Colognato, H. und Yurchenco, P. D.** (2000) Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, 218, 213-234
- Colognato-Pyke, H., O'Rear, J. J., Yamada, Y., Carbonetto, S., Cheng, Y. S. und Yurchenco, P. D.** (1995) Mapping of network-forming, heparin-binding, and alpha 1 beta 1 integrin-recognition sites within the alpha-chain short arm of laminin-1. *J Biol Chem*, 270, 9398-9406
- Cooper, A. R., Kurkinen, M., Taylor, A. und Hogan, B. L.** (1981) Studies on the biosynthesis of laminin by murine parietal endoderm cells. *Eur J Biochem*, 119, 189-197
- Cooray, P., Yuan, Y., Schoenwaelder, S. M., Mitchell, C. A., Salem, H. H. und Jackson, S. P.** (1996) Focal adhesion kinase (pp125FAK) cleavage and regulation by calpain. *Biochem J*, 318 (Pt 1), 41-47
- del Pozo, M. A., Price, L. S., Alderson, N. B., Ren, X. D. und Schwartz, M. A.** (2000) Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *Embo J*, 19, 2008-2014
- Del Pozo, M. A., Kiosses, W. B., Alderson, N. B., Meller, N., Hahn, K. M. und Schwartz, M. A.** (2002) Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol*, 4, 232-239

- DeMali, K. A. und Burridge, K.** (2003) Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *J Cell Sci*, 116, 2389-2397
- Eady, R. A., McGrath, J. A. und McMillan, J. R.** (1994) Ultrastructural clues to genetic disorders of skin: the dermal-epidermal junction. *J Invest Dermatol*, 103, 13S-18S
- Ferrigno, O., Virolle, T., Galliano, M. F., Chauvin, N., Ortonne, J. P., Meneguzzi, G. und Aberdam, D.** (1997) Murine laminin alpha3A and alpha3B isoform chains are generated by usage of two promoters and alternative splicing. *J Biol Chem*, 272, 20502-20507
- Frank, G. K., Kaye, W. H., Carter, C. S., Brooks, S., May, C., Fissell, K. und Stenger, V. A.** (2003) The evaluation of brain activity in response to taste stimuli--a pilot study and method for central taste activation as assessed by event-related fMRI. *J Neurosci Methods*, 131, 99-105
- Frank, D. E. und Carter, W. G.** (2004) Laminin 5 deposition regulates keratinocyte polarization and persistent migration. *J Cell Sci*, 117, 1351-1363
- Gabbiani, G., Chaponnier, C. und Huttner, I.** (1978) Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J Cell Biol*, 76, 561-568
- Ghohestani, R. F., Li, K., Rousselle, P. und Uitto, J.** (2001) Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. *Clin Dermatol*, 19, 551-562
- Ghosh, S., Brown, R., Jones, J. C., Ellerbroek, S. M. und Stack, M. S.** (2000) Urinary-type plasminogen activator (uPA) expression and uPA receptor localization are regulated by alpha 3beta 1 integrin in oral keratinocytes. *J Biol Chem*, 275, 23869-23876

Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G. und Quaranta, V. (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*, 277, 225-228

Gipson, I. K. und Grill, S. M. (1982) A technique for obtaining sheets of intact rabbit corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 23, 269-273

Goldfinger, L. E., Stack, M. S. und Jones, J. C. (1998) Processing of laminin-5 and its functional consequences: role of plasmin and tissue-type plasminogen activator. *J Cell Biol*, 141, 255-265

Goliger, J. A. und Paul, D. L. (1995) Wounding alters epidermal connexin expression and gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Biol Cell*, 6, 1491-1501

Gomes, E. R., Jani, S. und Gundersen, G. G. (2005) Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell*, 121, 451-463

Gu, J., Sumida, Y., Sanzen, N. und Sekiguchi, K. (2001) Laminin-10/11 and fibronectin differentially regulate integrin-dependent Rho and Rac activation via p130(Cas)-CrkII-DOCK180 pathway. *J Biol Chem*, 276, 27090-27097

Hagg, T., Portera-Cailliau, C., Jucker, M. und Engvall, E. (1997) Laminins of the adult mammalian CNS; laminin-alpha2 (merosin M-) chain immunoreactivity is associated with neuronal processes. *Brain Res*, 764, 17-27

Hall, D. E., Reichardt, L. F., Crowley, E., Holley, B., Moezzi, H., Sonnenberg, A. und Damsky, C. H. (1990) The alpha 1/beta 1 and alpha 6/beta 1 integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J Cell Biol*, 110, 2175-2184

Hashimoto, I., Schnyder, U. W. und Anton-Lamprecht, I. (1976) Epidermolysis bullosa hereditaria with junctional blistering in an adult. *Dermatologica*, 152, 72-86

- Henson, J. H., Svitkina, T. M., Burns, A. R., Hughes, H. E., MacPartland, K. J., Nazarian, R. und Borisy, G. G.** (1999) Two components of actin-based retrograde flow in sea urchin coelomocytes. *Mol Biol Cell*, 10, 4075-4090
- Hintner, H. und Wolff, K.** (1982) Generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Arch Dermatol*, 118, 375-384
- Hinz, B., Alt, W., Johnen, C., Herzog, V. und Kaiser, H. W.** (1999) Quantifying lamella dynamics of cultured cells by SACED, a new computer-assisted motion analysis. *Exp Cell Res*, 251, 234-243
- Hirosaki, T., Mizushima, H., Tsubota, Y., Moriyama, K. und Miyazaki, K.** (2000) Structural requirement of carboxyl-terminal globular domains of laminin alpha 3 chain for promotion of rapid cell adhesion and migration by laminin-5. *J Biol Chem*, 275, 22495-22502
- Hirsch, E., Barberis, L., Brancaccio, M., Azzolino, O., Xu, D., Kyriakis, J. M., Silengo, L., Giancotti, F. G., Tarone, G., Fassler, R. und Altruda, F.** (2002) Defective Rac-mediated proliferation and survival after targeted mutation of the beta1 integrin cytodomain. *J Cell Biol*, 157, 481-492
- Hodivala-Dilke, K. M., DiPersio, C. M., Kreidberg, J. A. und Hynes, R. O.** (1998) Novel roles for alpha3beta1 integrin as a regulator of cytoskeletal assembly and as a trans-dominant inhibitor of integrin receptor function in mouse keratinocytes. *J Cell Biol*, 142, 1357-1369
- Hopf, M., Gohring, W., Mann, K. und Timpl, R.** (2001) Mapping of binding sites for nidogens, fibulin-2, fibronectin and heparin to different IG modules of perlecan. *J Mol Biol*, 311, 529-541
- Hopf, M., Gohring, W., Ries, A., Timpl, R. und Hohenester, E.** (2001) Crystal structure and mutational analysis of a perlecan-binding fragment of nidogen-1. *Nat Struct Biol*, 8, 634-640

- Hunter, D. D., Shah, V., Merlie, J. P. und Sanes, J. R.** (1989) A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature*, 338, 229-234
- Huttenlocher, A., Sandborg, R. R. und Horwitz, A. F.** (1995) Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 7, 697-706
- Jonkman, M. F., de Jong, M. C., Heeres, K., Pas, H. H., van der Meer, J. B., Owaribe, K., Martinez de Velasco, A. M., Niessen, C. M. und Sonnenberg, A.** (1995) 180-kD bullous pemphigoid antigen (BP180) is deficient in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *J Clin Invest*, 95, 1345-1352
- Kainulainen, T., Hakkinen, L., Hamidi, S., Larjava, K., Kallioinen, M., Peltonen, J., Salo, T., Larjava, H. und Oikarinen, A.** (1998) Laminin-5 expression is independent of the injury and the microenvironment during reepithelialization of wounds. *J Histochem Cytochem*, 46, 353-360
- Kikkawa, Y., Sanzen, N., Fujiwara, H., Sonnenberg, A. und Sekiguchi, K.** (2000) Integrin binding specificity of laminin-10/11: laminin-10/11 are recognized by alpha 3 beta 1, alpha 6 beta 1 and alpha 6 beta 4 integrins. *J Cell Sci*, 113 (Pt 5), 869-876
- Kim, J. P., Zhang, K., Chen, J. D., Wynn, K. C., Kramer, R. H. und Woodley, D. T.** (1992) Mechanism of human keratinocyte migration on fibronectin: unique roles of RGD site and integrins. *J Cell Physiol*, 151, 443-450
- Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., Schulte, C. und Herzog, V.** (2003) Structural and compositional analysis of the keratinocyte migration track. *Cell Motil Cytoskeleton*, 55, 1-13
- Kivirikko, S., McGrath, J. A., Baudoin, C., Aberdam, D., Ciatti, S., Dunnill, M. G., McMillan, J. R., Eady, R. A., Ortonne, J. P., Meneguzzi, G. und et al.** (1995) A homozygous nonsense mutation in the alpha 3 chain gene of laminin 5 (LAMA3) in lethal (Herlitz) junctional epidermolysis bullosa. *Hum Mol Genet*, 4, 959-962

Kivirikko, S., McGrath, J. A., Pulkkinen, L., Uitto, J. und Christiano, A. M. (1996) Mutational hotspots in the LAMB3 gene in the lethal (Herlitz) type of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Mol Genet*, 5, 231-237

Klass, C. M., Couchman, J. R. und Woods, A. (2000) Control of extracellular matrix assembly by syndecan-2 proteoglycan. *J Cell Sci*, 113 (Pt 3), 493-506

Koch, M., Olson, P. F., Albus, A., Jin, W., Hunter, D. D., Brunken, W. J., Burgeson, R. E. und Champlaud, M. F. (1999) Characterization and expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J Cell Biol*, 145, 605-618

Kramer, R. H., Vu, M. P., Cheng, Y. F., Ramos, D. M., Timpl, R. und Waleh, N. (1991) Laminin-binding integrin alpha 7 beta 1: functional characterization and expression in normal and malignant melanocytes. *Cell Regul*, 2, 805-817

Languino, L. R., Gehlsen, K. R., Wayner, E., Carter, W. G., Engvall, E. und Ruoslahti, E. (1989) Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor. *J Cell Biol*, 109, 2455-2462

Lauffenburger, D. A. und Horwitz, A. F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, 84, 359-369

Lee, E. C., Lotz, M. M., Steele, G. D., Jr. und Mercurio, A. M. (1992) The integrin alpha 6 beta 4 is a laminin receptor. *J Cell Biol*, 117, 671-678

Lee, J. und Jacobson, K. (1997) The composition and dynamics of cell-substratum adhesions in locomoting fish keratocytes. *J Cell Sci*, 110 (Pt 22), 2833-2844

Li, S., Harrison, D., Carbonetto, S., Fassler, R., Smyth, N., Edgar, D. und Yurchenco, P. D. (2002) Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol*, 157, 1279-1290

Libby, R. T., Champlaud, M. F., Claudepierre, T., Xu, Y., Gibbons, E. P., Koch, M., Burgeson, R. E., Hunter, D. D. und Brunken, W. J. (2000) Laminin expression in adult and developing retinae: evidence of two novel CNS laminins. *J Neurosci*, 20, 6517-6528

Liddington, R. C. (2001) Mapping out the basement membrane. *Nat Struct Biol*, 8, 573-574

Lin, C. H., Espreafico, E. M., Mooseker, M. S. und Forscher, P. (1996) Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron*, 16, 769-782

Marinkovich, M. P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R. und Burgeson, R. E. (1992) The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol*, 119, 695-703

Marinkovich, M. P., Lunstrum, G. P. und Burgeson, R. E. (1992) The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. *J Biol Chem*, 267, 17900-17906

Marinkovich, M. P., Verrando, P., Keene, D. R., Meneguzzi, G., Lunstrum, G. P., Ortonne, J. P. und Burgeson, R. E. (1993) Basement membrane proteins kalinin and nicein are structurally and immunologically identical. *Lab Invest*, 69, 295-299

Marinkovich, M. P. (1999) Update on inherited bullous dermatoses. *Dermatol Clin*, 17, 473-485, vii

Martin, G. R. und Timpl, R. (1987) Laminin and other basement membrane components. *Annu Rev Cell Biol*, 3, 57-85

McGrath, J. A., Gatalica, B., Christiano, A. M., Li, K., Owaribe, K., McMillan, J. R., Eady, R. A. und Uitto, J. (1995) Mutations in the 180-kD bullous pemphigoid antigen (BPAG2), a hemidesmosomal transmembrane collagen (COL17A1), in generalized atrophic benign epidermolysis bullosa. *Nat Genet*, 11, 83-86

- Meneguzzi, G., Marinkovich, M. P., Aberdam, D., Pisani, A., Burgeson, R. und Ortonne, J. P.** (1992) Kalinin is abnormally expressed in epithelial basement membranes of Herlitz's junctional epidermolysis bullosa patients. *Exp Dermatol*, 1, 221-229
- Meng, X., Klement, J. F., Leperi, D. A., Birk, D. E., Sasaki, T., Timpl, R., Uitto, J. und Pulkkinen, L.** (2003) Targeted inactivation of murine laminin gamma2-chain gene recapitulates human junctional epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 121, 720-731
- Mercurio, A. M. und Rabinovitz, I.** (2001) Towards a mechanistic understanding of tumor invasion--lessons from the alpha6beta 4 integrin. *Semin Cancer Biol*, 11, 129-141
- Mercurio, A. M., Rabinovitz, I. und Shaw, L. M.** (2001) The alpha 6 beta 4 integrin and epithelial cell migration. *Curr Opin Cell Biol*, 13, 541-545
- Miner, J. H., Patton, B. L., Lentz, S. I., Gilbert, D. J., Snider, W. D., Jenkins, N. A., Copeland, N. G. und Sanes, J. R.** (1997) The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform. *J Cell Biol*, 137, 685-701
- Miquel, C., Gagnoux-Palacios, L., Durand-Clement, M., Marinkovich, P., Ortonne, J. P. und Meneguzzi, G.** (1996) Establishment and characterization of cell line LSV5 that retains the altered adhesive properties of human junctional epidermolysis bullosa keratinocytes. *Exp Cell Res*, 224, 279-290
- Mitchison, T. J. und Cramer, L. P.** (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 84, 371-379

- Nakano, A., Chao, S. C., Pulkkinen, L., Murrell, D., Bruckner-Tuderman, L., Pfindner, E. und Uitto, J.** (2002) Laminin 5 mutations in junctional epidermolysis bullosa: molecular basis of Herlitz vs. non-Herlitz phenotypes. *Hum Genet*, 110, 41-51
- Nguyen, B. P., Gil, S. G. und Carter, W. G.** (2000) Deposition of laminin 5 by keratinocytes regulates integrin adhesion and signaling. *J Biol Chem*, 275, 31896-31907
- Niessen, C. M., van der Raaij-Helmer, M. H., Hulsman, E. H., van der Neut, R., Jonkman, M. F. und Sonnenberg, A.** (1996) Deficiency of the integrin beta 4 subunit in junctional epidermolysis bullosa with pyloric atresia: consequences for hemidesmosome formation and adhesion properties. *J Cell Sci*, 109 (Pt 7), 1695-1706
- Niessen, C. M., Hulsman, E. H., Rots, E. S., Sanchez-Aparicio, P. und Sonnenberg, A.** (1997) Integrin alpha 6 beta 4 forms a complex with the cytoskeletal protein HD1 and induces its redistribution in transfected COS-7 cells. *Mol Biol Cell*, 8, 555-566
- Niimi, T. und Kitagawa, Y.** (1997) Distinct roles of mouse laminin beta1 long arm domains for alpha1beta1gamma1 trimer formation. *FEBS Lett*, 400, 71-74
- Noakes, P. G., Gautam, M., Mudd, J., Sanes, J. R. und Merlie, J. P.** (1995) Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature*, 374, 258-262
- Nobes, C. D. und Hall, A.** (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, 144, 1235-1244
- O'Toole, E.A, Marinkovich, M.P., Hoeffler, W.K., Furthmayr, H., Woodley, D.T.** (1997) Laminin-5 inhibits human keratinocyte migration. *Exp cell res*, 233, 330-339

- Palecek, S. P., Schmidt, C. E., Lauffenburger, D. A. und Horwitz, A. F.** (1996) Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts. *J Cell Sci*, 109 (Pt 5), 941-952
- Parente, M. G., Chung, L. C., Ryyanen, J., Woodley, D. T., Wynn, K. C., Bauer, E. A., Mattei, M. G., Chu, M. L. und Uitto, J.** (1991) Human type VII collagen: cDNA cloning and chromosomal mapping of the gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 6931-6935
- Paulsson, M.** (1988) The role of Ca^{2+} binding in the self-aggregation of laminin-nidogen complexes. *J Biol Chem*, 263, 5425-5430
- Penas, P. F., Garcia-Diez, A., Sanchez-Madrid, F. und Yanez-Mo, M.** (2000) Tetraspanins are localized at motility-related structures and involved in normal human keratinocyte wound healing migration. *J Invest Dermatol*, 114, 1126-1135
- Perrin, B. J. und Huttenlocher, A.** (2002) Calpain. *Int J Biochem Cell Biol*, 34, 722-725
- Pilcher, B. K., Dumin, J. A., Sudbeck, B. D., Krane, S. M., Welgus, H. G. und Parks, W. C.** (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol*, 137, 1445-1457
- Pollard, T. D. und Borisy, G. G.** (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112, 453-465
- Price, L. S., Leng, J., Schwartz, M. A. und Bokoch, G. M.** (1998) Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell*, 9, 1863-1871
- Pulkkinen, L., Christiano, A. M., Gerecke, D., Wagman, D. W., Burgeson, R. E., Pittelkow, M. R. und Uitto, J.** (1994) A homozygous nonsense mutation in the beta 3 chain gene of laminin 5 (LAMB3) in Herlitz junctional epidermolysis bullosa. *Genomics*, 24, 357-360

Pulkkinen, L., Christiano, A. M., Airene, T., Haakana, H., Tryggvason, K. und Uitto, J. (1994) Mutations in the gamma 2 chain gene (LAMC2) of kalinin/laminin 5 in the junctional forms of epidermolysis bullosa. *Nat Genet*, 6, 293-297

Pulkkinen, L. und Uitto, J. (1999) Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol*, 18, 29-42

Regen, C. M. und Horwitz, A. F. (1992) Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts. *J Cell Biol*, 119, 1347-1359

Rigort, A., Grunewald, J., Herzog, V. und Kirfel, G. (2004) Release of integrin macroaggregates as a mechanism of rear detachment during keratinocyte migration. *Eur J Cell Biol*, 83, 725-733

Rottner, K., Hall, A. und Small, J.V. (1999) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol*, 9, 640-648.

Rousselle, P., Lunstrum, G. P., Keene, D. R. und Burgeson, R. E. (1991) Kalinin: an epithelium-specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol*, 114, 567-576

Rousselle, P. und Aumailley, M. (1994) Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J Cell Biol*, 125, 205-214

Rousselle, P., Keene, D. R., Ruggiero, F., Champlaud, M. F., Rest, M. und Burgeson, R. E. (1997) Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol*, 138, 719-728

Ruoslahti, E. (1996) RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12, 697-715.

Salo, S., Haakana, H., Kontusaari, S., Hujanen, E., Kallunki, T. und Tryggvason, K. (1999) Laminin-5 promotes adhesion and migration of epithelial cells: identification of a migration-related element in the gamma2 chain gene (LAMC2) with activity in transgenic mice. *Matrix Biol*, 18, 197-210

Sanes, J. R., Engvall, E., Butkowski, R. und Hunter, D. D. (1990) Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol*, 111, 1685-1699

Sasaki, T., Gohring, W., Mann, K., Brakebusch, C., Yamada, Y., Fassler, R. und Timpl, R. (2001) Short arm region of laminin-5 gamma2 chain: structure, mechanism of processing and binding to heparin and proteins. *J Mol Biol*, 314, 751-763

Schenk, S., Hintermann, E., Bilban, M., Koshikawa, N., Hojilla, C., Khokha, R. und Quaranta, V. (2003) Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J Cell Biol*, 161, 197-209

Sheetz, M. P., Felsenfeld, D. P. und Galbraith, C. G. (1998) Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol*, 8, 51-54

Small, J. V., Anderson, K. und Rottner, K. (1996) Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Biosci Rep*, 16, 351-368

Smith, F. J., Eady, R. A., Leigh, I. M., McMillan, J. R., Rugg, E. L., Kelsell, D. P., Bryant, S. P., Spurr, N. K., Geddes, J. F., Kirtschig, G., Milana, G., de Bono, A. G., Owaribe, K., Wiche, G., Pulkkinen, L., Uitto, J., McLean, W. H. und Lane, E. B. (1996) Plectin deficiency results in muscular dystrophy with epidermolysis bullosa. *Nat Genet*, 13, 450-457

Smyth, N., Vatansever, H. S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M. und Edgar, D. (1999) Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol*, 144, 151-160

Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. und Martin, G. R. (1979) Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254, 9933-9937

Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. und Kuhn, K. (1981) A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem*, 120, 203-211

Timpl, R. und Brown, J. C. (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays*, 18, 123-132

Tomaselli, K. J., Hall, D. E., Flier, L. A., Gehlsen, K. R., Turner, D. C., Carbonetto, S. und Reichardt, L. F. (1990) A neuronal cell line (PC12) expresses two beta 1-class integrins-alpha 1 beta 1 and alpha 3 beta 1-that recognize different neurite outgrowth-promoting domains in laminin. *Neuron*, 5, 651-662

Tryggvason, K. (1993) The laminin family. *Curr Opin Cell Biol*, 5, 877-882

Uitto, J., Pulkkinen, L. und Christiano, A. M. (1994) Molecular basis of the dystrophic and junctional forms of epidermolysis bullosa: mutations in the type VII collagen and kalinin (laminin 5) genes. *J Invest Dermatol*, 103, 39S-46S

Utani, A., Nomizu, M., Timpl, R., Roller, P. P. und Yamada, Y. (1994) Laminin chain assembly. Specific sequences at the C terminus of the long arm are required for the formation of specific double- and triple-stranded coiled-coil structures. *J Biol Chem*, 269, 19167-19175

- Utani, A., Nomizu, M. und Yamada, Y.** (1997) Fibulin-2 binds to the short arms of laminin-5 and laminin-1 via conserved amino acid sequences. *J Biol Chem*, 272, 2814-2820
- Utani, A., Nomizu, M., Matsuura, H., Kato, K., Kobayashi, T., Takeda, U., Aota, S., Nielsen, P. K. und Shinkai, H.** (2001) A unique sequence of the laminin alpha 3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4. *J Biol Chem*, 276, 28779-28788
- van der Flier, A. und Sonnenberg, A.** (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 305, 285-298
- van der Rest, M. und Garrone, R.** (1991) Collagen family of proteins. *Faseb J*, 5, 2814-2823
- Watanabe, N. und Higashida, C.** (2004) Formins: processive cappers of growing actin filaments. *Exp Cell Res*, 301, 16-22
- Weaver, A. M., Young, M. E., Lee, W. L. und Cooper, J. A.** (2003) Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 23-30
- Wolfsberg, T. G., Straight, P. D., Gerena, R. L., Huovila, A. P., Primakoff, P., Myles, D. G. und White, J. M.** (1995) ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol*, 169, 378-383
- Wu, C., Bauer, J. S., Juliano, R. L. und McDonald, J. A.** (1993) The alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor, but not the alpha 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem*, 268, 21883-21888
- Yurchenco, P. D., Tsilibary, E. C., Charonis, A. S. und Furthmayr, H.** (1985) Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity. *J Biol Chem*, 260, 7636-7644

Yurchenco, P. D. und Schittny, J. C. (1990) Molecular architecture of basement membranes. *Faseb J*, 4, 1577-1590

Yurchenco, P. D., Cheng, Y. S. und Colognato, H. (1992) Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol*, 117, 1119-1133

Yurchenco, P. D. und Cheng, Y. S. (1993) Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J Biol Chem*, 268, 17286-17299

Yurchenco, P. D., Quan, Y., Colognato, H., Mathus, T., Harrison, D., Yamada, Y. und O'Rear, J. J. (1997) The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 10189-10194

Zhang, Z., Morla, A. O., Vuori, K., Bauer, J. S., Juliano, R. L. und Ruoslahti, E. (1993) The alpha v beta 1 integrin functions as a fibronectin receptor but does not support fibronectin matrix assembly and cell migration on fibronectin. *J Cell Biol*, 122, 235-242

Zhang, K. und Kramer, R.H. (1996) Laminin 5 deposition promotes keratinocyte motility. *Exp cell res*, 227, 309-322

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und dabei nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Von mir verwendete Quellen sind als solche gekennzeichnet

Bonn, 10.12.2006

Ort, Datum

Benedikt Hartwig

Unterschrift