

Analyse der Zellwanderung am Beispiel von
Keratinocyten:
Zusammenspiel von Filopodien,
Krafterzeugung und Matrix-Sekretion

Dissertation

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

vorgelegt von
Claudia Schäfer
aus Niederkassel

Bonn 2010

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

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

Tag der Promotion: 09.07.2010

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Schäfer, C., B. Born, S. Born, C. Möhl, E.-M. Eibl und B. Hoffmann: One step ahead: role of filopodia in adhesion formation during cell migration of keratinocytes. *Exp Cell Res*, 315(7):1212–1224, Apr 2009.

Schäfer, C., S. Born, C. Möhl, S. Houben, N. Kirchgeßner, R. Merkel und B. Hoffmann: The key feature for early migratory processes: Dependence of adhesion, actin bundles, force generation and transmission on filopodia. *Cell Adh Migr*, 4(2), Apr 2010.

Hoffmann, B. und C. Schäfer: Filopodial focal complexes direct adhesion and force generation towards filopodia outgrowth. *Cell Adh Migr*, 4(2), Apr 2010.

Zusammenfassung

Das Adhäsionsvermögen von Zellen ist eine essentielle Voraussetzung für viele wichtige Zellfunktionen. Es basiert auf der gezielten Ausbildung von Fokaladhäsionen, die die extrazelluläre Matrix mit dem Aktinzytoskelett der Zellen verbinden. Besonders in mobilen Zellen sind diese Strukturen sehr dynamisch und unterliegen zahlreichen Regulationsmechanismen. So müssen während der Zellwanderung neue Adhäsionsstellen in Migrationsrichtung ausgebildet und alte am hinteren Ende der Zelle wieder abgebaut werden. Dies ist ein hochorganisierter Prozess, welcher zusammen mit der gerichteten Aktinpolymerisation die Zellmigration reguliert.

In dieser Arbeit wurde die Funktion von Filopodien, finger-förmige Membranprotrusionen, für die Adhäsionsbildung migrierender Keratinozyten genauer untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Filopodien bereits kleine, filopodiale Fokalkomplexe enthalten, welche vollständig ausgereift sind. Diese filopodialen Fokalkomplexe werden nach Erreichen des Lamellipodiums nur noch stark vergrößert, sodass die Positionen aller Adhäsionsstrukturen innerhalb des Lamellipodiums durch diese bestimmt werden. Durch Inhibierung der Filopodienbildung wird der Aufbau neuer Adhäsionen vollständig blockiert. Dies führt wiederum zur Reduktion der Zellmotilität. Zusammenfassend konnte klar gezeigt werden, dass die Bildung neuer Adhäsionsstellen und die Motilität in Keratinozyten von Filopodien abhängt.

Weiterführend wurde der genaue Mechanismus und dessen struktureller Aufbau analysiert, der den Übergang von filopodialen Fokalkomplexen zu lamellipodialen Fokaladhäsionen reguliert. In diesem Zusammenhang konnte klar gezeigt werden, dass filopodiale Fokalkomplexe direkt nach ihrer Entstehung mit filopodialen Aktinfasern verbunden sind. Diese Aktinfasern weisen eine räumliche Proteinorganisation auf, über die der Einbau von Myosin II gesteuert wird. Durch diese Einlagerung können filopodiale Aktinfasern kontrahieren, wodurch eine Zugkraft auf filopodiale Fokalkomplexe ausgeübt wird. Dadurch wird wiederum ein kraftinduzierter Reifungsprozess ausgelöst, der dazu führt, dass filopodiale Fokalkomplexe stabilisiert werden, sodass diese die Basis aller lamellipodialen Fokaladhäsionen bilden.

Des Weiteren wurde das Zusammenspiel von Zellkraft und Matrix-Sekretion sowie deren Einfluss auf die Zellmotilität untersucht. Zum direkten Vergleich wurde die Zellkraft und der Anteil der Kraft, der innerhalb der Matrix gespeichert war, für sessile und mobile Keratinozyten analysiert. Dabei zeigte sich, dass sessile Zellen höhere Zellkräfte ausüben und gleichzeitig mehr Kraft in der Matrix speichern als mobile Zellen. Dies ist auf eine erhöhte Fibronektin-Sekretion und auf die Ausbildung von Fibronektin-Fibrillen zurückzuführen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Zellmigration	10
1.1.1	Die biologische Relevanz der Keratinozyten-Migration	11
1.1.2	Essentielle Strukturen der Zellmigration: Lamellipodium und Filopodien	14
1.1.3	Regulation der Zellmotilität	17
1.1.4	Zelluläre Kräfte während der Migration	18
1.2	Die Fokaladhäsion	19
1.2.1	Aufbau und Funktion von Fokaladhäsionen	19
1.2.2	Entstehung und Reifung von Fokaladhäsionen	22
1.3	Die extrazelluläre Matrix	23
1.3.1	Fibronectin: Struktur und Fibrillogenese	23
1.3.2	Matrix-Aufbau und Umgestaltung während der Zellmigration	24
1.4	Ziele dieser Arbeit	27
2	Material und Methoden	29
2.1	Zellkultur	29
2.1.1	Fibronectin-Beschichtung	30
2.1.2	EGF-Stimulation	30
2.1.3	Neomycin-Behandlung	30
2.2	Transfektion und Immunfluoreszenz	31
2.2.1	Transfektion und Plasmidgewinnung	31
2.2.2	Immunfluoreszenz	32
2.3	Präparation elastischer Silikon-Substrate	33
2.3.1	Kreuzvernetztes PDMS	33
2.3.2	Kalibrierung	34
2.3.3	Herstellung der Silikon-Substrate mit/ohne fluoreszenten Kugeln	35
2.4	Mikroskopie	37
2.4.1	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> Mikroskopie (TIRF)	37
2.4.2	Konfokales Laser Scanning Mikroskop (LSM)	37
2.4.3	Automatisiertes Fluoreszenz-Mikroskop (Cell Observer)	38
2.4.4	Reflexionsmikroskopie	39

2.4.5	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i> (FRAP)	40
2.5	Zellanalysen und Auswertung	42
2.5.1	Aspektverhältnis-Bestimmung	42
2.5.2	Untersuchung der Adhäsion von Filopodien	42
2.5.3	Migrationsanalyse	42
2.5.4	Aktinfluss-Messungen	42
2.5.5	Protein-Verhältnisbestimmung (pPax/Pax)	43
2.5.6	Form- und Stabilitätsanalysen von Fokaladhäsionen	44
2.5.7	Kraftmessungen migrierender Zellen	44
2.5.8	Kraftmessungen der Matrix	46
2.5.9	Kontrollexperimente zur Matrix-Analyse	49
2.5.10	Matrix-Analyse bei sessilen und polarisierten Zellen	51
2.5.11	FRAP-Messungen	51
2.6	Statistische Datenauswertung	53
3	Ergebnisse	55
3.1	Rolle der Filopodien während der Adhäsionsbildung	55
3.1.1	Filopodiale Fokalkomplexe verbinden Filopodien mit dem Substrat	58
3.1.2	Das Protein VASP bestimmt die filopodiale Adhäsion	58
3.1.3	Filopodien-Neubildung aus bestehenden Filopodien	60
3.1.4	Filopodien bestimmen Motilität und Adhäsionsbildung	62
3.1.5	Paxillin-Phosphorylierung ist unabhängig von der Filopodienbildung	64
3.1.6	Zusammenfassung	64
3.2	Abhängigkeit der Adhäsionsstabilität von Filopodien	66
3.2.1	Filopodiale Fokalkomplexe sind stabil und koloalisieren mit filopodialen Aktinfilamenten	66
3.2.2	Filopodiale Fokalkomplexe wachsen und sind langlebig	68
3.2.3	Zellanalysen bestätigen den Zusammenhang zwischen filopodialen Aktinbündeln und stabilen Fokaladhäsionen	71
3.2.4	Filopodiale Aktinbündel weisen eine geordnete, sequenzielle Proteinzusammensetzungen auf	72
3.2.5	Filopodiale Aktinbündel bauen Myosin II ein	75
3.2.6	Kopplung von Fokaladhäsionen an filopodiale Aktinbündel reduziert den retrograden Fluss	75
3.2.7	Hohe Krafttransmission korreliert mit Wachstum und Stabilität der Fokaladhäsionen	77
3.2.8	Zusammenfassung	80
3.3	Zusammenspiel von Zellkraft und Matrix-Sekretion	81
3.3.1	Sessile Zellen erzeugen größere Kräfte als migrierende Zellen	82
3.3.2	Sessile Zellen speichern mehr Kraft in ihrer Matrix als Migrierende	82
3.3.3	Migrierende Zellen sekretieren weniger Matrix als Sessile	88

3.3.4	Migrierende Zellen hinterlassen eine Spur aus Matrix-Proteinen . . .	88
3.3.5	Die sekretierte Spur kann Kräfte ausüben	90
3.3.6	Retraktionsfasern beeinflussen die Fibrillen-Bildung	92
3.3.7	Kontrollexperimente zur Matrix-Analyse	95
3.3.8	Zusammenfassung	98
4	Diskussion und Ausblick	99
4.1	Filopodien bestimmen die Lokalisation der Fokaladhäsionen	99
4.2	Filopodien-abhängige Adhäsionsstabilität	102
4.3	Korrelation zwischen Zellkraft und Matrix-Sekretion	105
4.4	Ausblick	107
5	Anhang	109
5.1	Filmunterschriften	109
5.2	Abkürzungen	112

Kapitel 1

Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von Zellen während der Migration untersucht. Dieser Prozess ist einer der wichtigsten Vorgänge in vielzelligen Organismen. Er dominiert während der Embryogenese die Entwicklung von komplexen Organen bis hin zur Bildung des gesamten Embryos. Im adulten Organismus sind viele lebensnotwendige Prozesse von der kontrollierten Organisation der Zellbewegung abhängig. Nahezu alle eukaryotischen Zelltypen sind entweder permanent migratorisch oder können zu bestimmten Zeitpunkten ihrer Entwicklung dazu übergehen. Die Migration von Immunzellen aus dem Blutkreislauf in das entzündete Gewebe ist nur ein Beispiel, welches die elementare Bedeutung der Zellbewegung besonders gut widerspiegelt. Kommt es jedoch im Körper zur unregulierten Zellmigration, hat dies meistens fatale Folgen. Beispielsweise erlangen metastasierende Zellen unkontrolliert ihre Migrationsfähigkeit wieder, sodass diese in gesundes Gewebe eindringen können, um dort Tumore zu bilden.

Zur Regulation der Zellbewegung muss eine Zelle ihre äußere Umgebung wahrnehmen. Dazu sind chemische sowie mechanische Signale aus der unmittelbaren Umwelt von besonderer Wichtigkeit. Chemische Botenstoffe aus einer Wunde treiben beispielsweise die gerichtete Bewegung von Fibroblasten und Hautzellen an, um das beschädigte Gewebe zu erneuern. Mechanische Informationen, wie die Beschaffenheit der extrazellulären Matrix (ECM), werden über Fokaladhäsionen der Zelle wahrgenommen. Solche Adhäsionen stellen eine direkte Verbindung des Zellinneren mit der Umgebung her, sodass sich die Zelle schnell an veränderte Bedingungen anpassen kann. Diese Verbindungen spielen während der Zellmigration eine zentrale Rolle. Sie vermitteln die Kraftübertragung der Zelle auf das umgebende Substrat, sodass die Zelle eine gerichtete Bewegung ausüben kann. Fokaladhäsionen sind hochdynamische Strukturen und unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau. Während der Zellbewegung regulieren sie durch ihren asymmetrischen Aufbau die Migrationsrichtung der Zelle, wobei neue Adhäsionen an der Zellfront aufgebaut und am hinteren Ende der Zelle alte Adhäsionen abgebaut werden. In dieser Arbeit lag ein besonderer Schwerpunkt auf der genauen Analyse der Adhäsionsbildung an der Zellfront während der Migration. Außerdem wurde weiterführend der Einfluss der ECM auf das Migrationsverhalten sowie auf die Krafterzeugung der Zelle genauer untersucht.

1.1 Zellmigration

Zellmigration ist ein komplexer und vielseitiger Prozess, der für alle Zelltypen während bestimmter Entwicklungsphasen eine wesentliche Rolle spielt. Aufgrund morphologischer Unterschiede unterteilt man die Zellbewegung in verschiedene, zellspezifische Migrationsmuster. Grundsätzlich wird zwischen Einzelzell-Migration und kollektiver Migration unterschieden. Bei der kollektiven Migration wandern über Zell-Zell-Kontakte verbundene Zellen gemeinsam als ein Gewebe oder kettenförmig hintereinander [97, 44]. Diese Art der Zellbewegung ist häufig während der Embryonalentwicklung oder bei der Wundheilung zu beobachten. Einzelzell-Migration hingegen ermöglicht es Zellen, eine bestimmte Entfernung schnell zurückzulegen, wie es bei der Immunantwort besonders wichtig ist. Die Einzelzell-Migration kann jedoch nach Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten in ein kollektives Bewegungsmuster übergehen [24]. Man unterscheidet drei verschiedene Einzelzell-Migrationsarten, die amöboide, die mesenchymale und die epitheliale Migration [26]. Diese Einteilung beruht auf Unterschieden im Zytoskelett-Aufbau der Zellen sowie auf unterschiedlichen Adhäsionsstrukturen während der Migration. Leukozyten und dendritische Zellen weisen z.B. ein amöboides Migrationsmuster auf. Diese Zellen wandern mit einer Migrationsgeschwindigkeit von etwa $10 \mu\text{m}/\text{min}$ relativ schnell und bilden dabei nur schwache Adhäsionen zum Substrat aus. Die mesenchymale Migration ist durch eine hohe Kontraktilität sowie durch starke Zell-ECM-Adhäsionen charakterisiert. Die Fortbewegung erfolgt hier eher ruckartig, wie es für spindelförmige Fibroblasten typisch ist. Dabei ist die Migrationsgeschwindigkeit von $0,1 - 1 \mu\text{m}/\text{min}$ sehr langsam. Die epitheliale Migration zeichnet sich hingegen durch eine mittlere Geschwindigkeit von $1-10 \mu\text{m}/\text{min}$ und durch eine ellipsoide Form der Zellen aus. Diese Migrationsart ist charakteristisch für Fischkeratozyten und epidermale Keratinozyten [62, 57], welche sich typischerweise durch ein kontinuierliches Gleiten fortbewegen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Migration an Einzelzellen untersucht. Dieser Prozess wird im Allgemeinen als ein Zyklus aus vier Einzelschritten beschrieben, die durch ständige Wiederholungen die gerichtete Bewegung der Zelle regulieren [111, 56]. Als Grundvoraussetzung der Zellbewegung gilt die Polarisationsfähigkeit der Zelle. Dabei bildet die Zelle eine deutliche Zellfront sowie ein hinteres Ende aus. Dies wird durch aktive Aktinpolymerisation in eine Richtung reguliert, sodass sich an der Zellfront ein weites Lamellipodium mit vielen Filopodien bildet (siehe Abb. 1.1). Zur Fortbewegung der Zelle werden neue Membranprotrusionen am sogenannten Leitsaum der Zelle (*Leading edge*) in Migrationsrichtung ausgebildet (Abb. 1.1: 1). Dort werden nun neue Adhäsionsstrukturen zur Verankerung der Zelle mit dem Substrat aufgebaut (Abb. 1.1: 2). Die Bildung von Adhäsionen, so wurde es bis heute angenommen, geschieht im Lamellipodium. In dieser Arbeit konnte jedoch für Keratinozyten gezeigt werden, dass Filopodien während der Adhäsionsbildung eine wesentlich Rolle spielen. Die Translokation des gesamten Zellkörpers wird durch die Myosin II-vermittelte Kontraktilität der Zelle reguliert (Abb. 1.1: 3). Dabei gleitet das Motorprotein Myosin II entlang der Aktinstressfasern und verkürzt diese, sodass es zur Zellkontraktion kommt. Zell-

kräfte spielen auch bei der Ablösung von alten Fokaladhäsionen am hinteren Ende der Zelle eine wichtige Rolle. Das Auflösen alter Verankerungen ist für eine effektive Fortbewegung der Zelle unbedingt notwendig (Abb. 1.1: 4). Eine ständige Wiederholung dieses gesamten Zyklus führt somit zu einer effizienten Zellmigration.

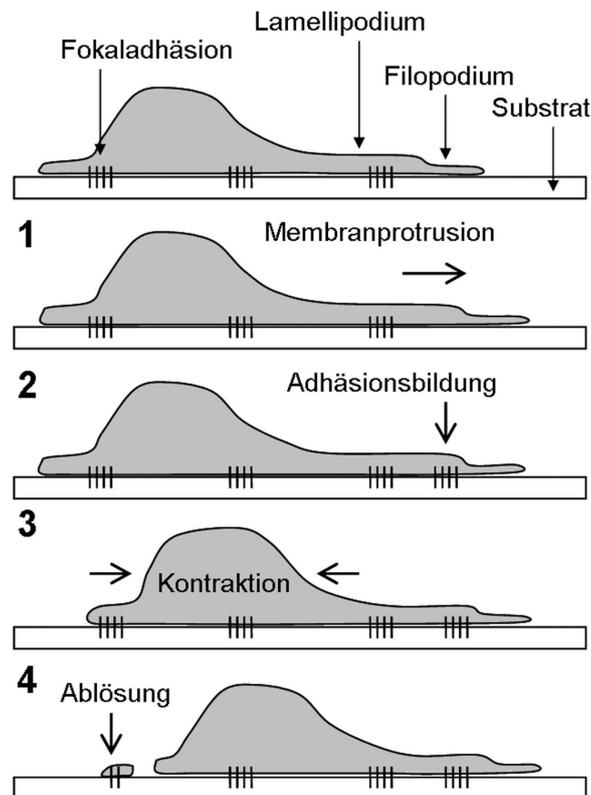


Abbildung 1.1: **Der Migrationszyklus** - Eine migrierende Keratinozyte bildet ein Lamellipodium mit vielen Filopodien (hier nur eins zur Vereinfachung eingezeichnet) in Richtung der Migration aus. Dabei ist sie über Fokaladhäsionen mit dem Substrat verbunden. Der Prozess der Migration wird in vier Einzelschritte unterteilt. (1) Durch Aktinpolymerisation werden Membranprotrusionen in Migrationsrichtung vorgeschoben. (2) Dort kommt es dann zur Bildung von neuen Adhäsionsstrukturen. (3) Durch Kontraktion des Aktinzytoskeletts wird der Zellkörper vorwärts bewegt und (4) es kommt zur Ablösung alter Fokaladhäsionen am hinteren Ende der Zelle.

1.1.1 Die biologische Relevanz der Keratinozyten-Migration

Die Haut ist mit einer Fläche von 1,5 - 2 m² das flächenmäßig größte Organ des menschlichen Körpers. Sie ist ein Epithel, welches aus drei Schichten, der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut (Dermis) und der Unterhaut, aufgebaut ist (siehe Abb. 1.2). Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten. Daneben findet man noch Melanozyten, Langerhans- und Merkelzellen, wobei diese auch in der Dermis anzutreffen sind (Abb. 1.2). Die Keratinozyten bilden über Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte eine effiziente Barriere gegen äußere Einflüsse. Die Regeneration der Epidermis erfolgt durch vertikale Migration der Keratinozyten von unten

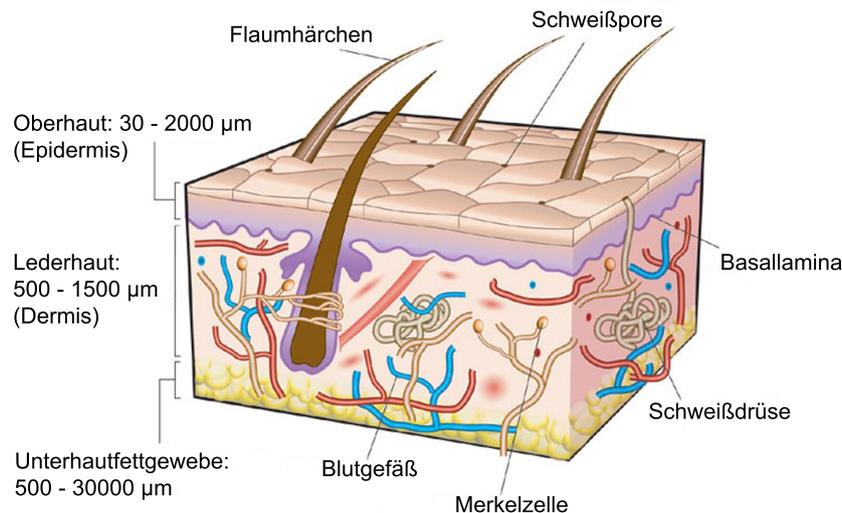


Abbildung 1.2: **Aufbau der Haut** - Die Haut besteht aus drei Schichten, der Oberhaut (Epidermis), der Lederhaut und der Unterhaut. In der Epidermis befinden sich die Keratinozyten, die im Laufe ihrer Differenzierung zur Oberseite der Haut wandern, um dort die Hornhaut zu bilden. Die Epidermis wird durch die Basallamina abgeschlossen. Die Lederhaut umfasst eine 500 - 1500 μm dicke Schicht, die im Wesentlichen aus ortsständigen Fibroblasten und Bindegewebe aufgebaut ist. Sie enthält die Haarwurzeln, Schweißdrüsen, Nervenfasern und Merkelzellen. Die Unterhaut besteht zum größten Teil aus Fettzellen. Außerdem vermittelt sie über dicke Bindegewebsfasern die Verankerung der oberen Schichten mit den tief unten gelegenen Muskeln. Verändert nach Mac Neil, 2007 [65].

nach oben an die Oberseite der Haut. Dabei folgen die Zellen einem Kalzium-Gradienten, der sowohl die Migration als auch die Differenzierung und die Proliferation der Zellen steuert [55]. Die tiefer gelegene Lederhaut besteht zum größten Teil aus ortsfesten Fibroblasten. Diese sind von einer Interzellulärsubstanz umgeben, die hauptsächlich aus Kollagenfasern und Proteoglykanen besteht. Diese Strukturen geben der Haut ihre charakteristische Elastizität und Dehnbarkeit. Des Weiteren besteht die Aufgabe der Haut darin, funktionellen Schutz vor UV-Strahlen, Bakterien und chemischen Belastungen zu gewährleisten. Außerdem reguliert sie den Wasserhaushalt und die Körpertemperatur. Zusätzlich dient die Haut der Wahrnehmung von Schmerz, Temperatur und Druck. Diese Funktionen der Haut sind lebensnotwendig. Daher ist es besonders wichtig nach Verletzungen die verwundete Stelle schnell und effektiv zu reparieren.

Der Prozess der Wundheilung wird in drei Phasen eingeteilt (siehe Abb. 1.3). Die erste Phase wird als inflammatorische Phase bezeichnet. Während dieser Phase wird die verletzte Stelle durch geronnenes Blut verschlossen, sodass sich in der Wunde ein Pfropfen aus Fibrin und Plasma-Fibronektin bildet. Durch Zellfragmente und bakterielle Ausscheidungen werden Immunzellen aktiviert und zur verletzten Stelle rekrutiert. Dort differenzieren die meisten Monozyten zu Makrophagen, um die zerstörte Matrix sowie Zelltrümmer abzubauen. Diese Phase dauert 1-3 Tage nach Verwundung an (Abb. 1.3 A). Anschließend folgt die Phase der Reepithelialisierung, die ca. 3-10 Tage nach Verletzung andauert (Abb. 1.3 B). Sie ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Proliferation von Keratinozyten und durch deren Migration

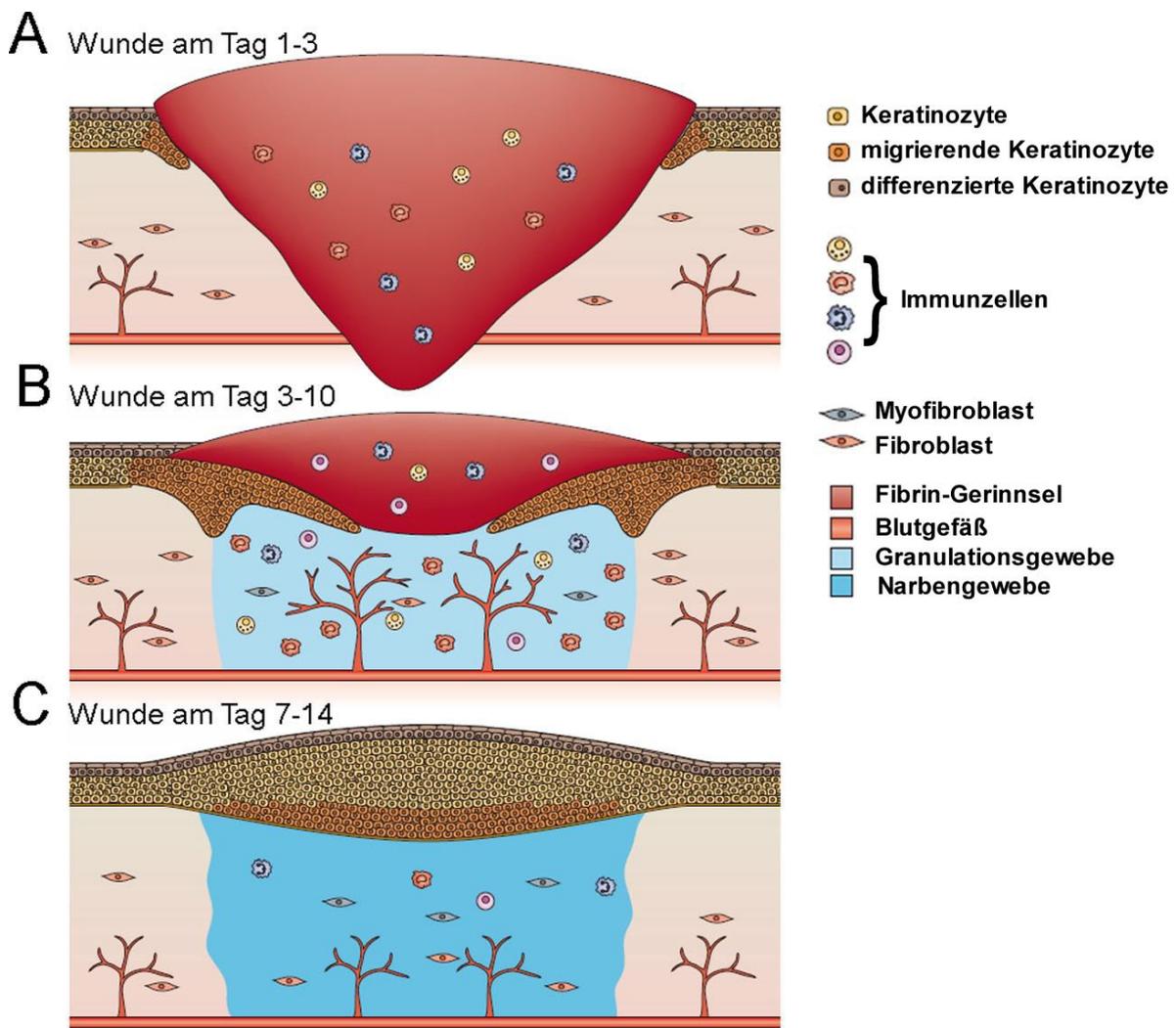


Abbildung 1.3: **Der Vorgang der Wundheilung** - Der Prozess der Wundheilung wird in drei Phasen unterteilt. (A) Die inflammatorische Phase: Sie beginnt sofort nach der Verletzung der Haut und dauert bis zu 3 Tage. Die Wunde wird mit einem Fibrin-Gerinnel verschlossen. Außerdem wandern Immunzellen in das Wundbett ein. (B) Die Phase der Reepithelialisierung: Nach 3 bis 10 Tagen haben sich die Zellen im Bereich der Wunde stark vermehrt. Fibroblasten sind aus der Dermis eingewandert, um teilweise zu Myofibroblasten zu differenzieren und neues Granulationsgewebe zu bilden. Außerdem werden Keratinozyten zur Migration und Proliferation angeregt, sodass die Wunde allmählich verschlossen wird. Zusätzlich werden neue Blutgefäße zur Versorgung des Granulationsgewebes gebildet. (C) Die Phase der Gewebe-Umgestaltung: 1 bis 2 Wochen nach Verwundung beginnt der Umbau des Granulationsgewebes zu Narbengewebe. Die Reepithelialisierung ist vollendet und die Zelldichte sowie die ECM-Sekretion wird normalisiert. Verändert nach Schäfer und Werner, 2008 [103].

aus der Epidermis lateral in das Wundbett. Dabei wandern die Zellen zum Teil kollektiv in die Unterhaut und sekretieren dort bereits eine neue Matrix. Die Zellen an der Gewebefront weisen währenddessen eine Polarisation auf. Diese Zellen sind mit den hinteren Zellreihen über Zell-Zell-Kontakte verbunden und dirigieren so die Reepithelialisierung. Manche Keratinozyten wandern jedoch auch als Einzelzelle in den Fibrin-Pfropfen ein. Dort kontrollieren sie den proteolytischen Abbau der provisorischen Fibrin-Matrix sowie den Aufbau des Granulationsgewebes. Die Aktivierung der Keratinozyten-Migration in das Wundbett wird über Wachstumsfaktoren und Dermis-Proteine, wie Kollagen und Fibronectin, reguliert. Zusätzlich migrieren Fibroblasten aus der Dermis in das Fibrin-Gerinsel ein, die dort teilweise zu Myofibroblasten differenzieren. Diese Zellen sekretieren verstärkt Matrix-Proteine und erhöhen durch ihre Kontraktilität die Spannkraft des Granulationsgewebes. Dies unterstützt das Verschließen der Wunde und führt zur Bildung von Kollagenfasern. Mit der Bildung der Kollagenfasern wird die 3. Phase der Gewebe-Umgestaltung eingeleitet (Abb. 1.3 C). Die Reepithelialisierung ist nun vollendet und aus dem Granulationsgewebe wird durch weitere Modellierung der Matrix das Narbengewebe. Der Prozess der Wundheilung wird mit der Normalisierung der ECM-Sekretion und der Zellanzahl im Gewebe abgeschlossen [103, 110].

1.1.2 Essentielle Strukturen der Zellmigration: Lamellipodium und Filopodien

Die asymmetrische Ausbildung von Membranprotrusionen ist die Voraussetzung für die Initiation des Migrationszyklusses einer Zelle. Das Lamellipodium und die Filopodien stellen dabei die wichtigsten Protrusionsstrukturen der Zelle dar (siehe Abb. 1.4 A). Die Bildung des Lamellipodiums und der Filopodien wird durch Aktinpolymerisation gesteuert [17]. Aktin ist das häufigste Protein in einer eukaryotischen Zelle. Es besteht aus ungefähr 375 Aminosäuren und wird von einer Familie hochkonservierter Gene codiert [63]. Aktinmonomere lagern sich während der Polymerisation zu helikalen Filamenten zusammen. Diese Filamente bilden nur die Grundeinheit, aus der etliche Zellstrukturen aufgebaut werden können, von denen jede eine essentielle Aufgabe innerhalb der Zelle ausübt [14]. Zur Aktinpolymerisation lagern sich während der Nukleationsphase mindestens drei Monomere zusammen. Nach der Keimbildung kann das Filament an beiden Seiten verlängert oder verkürzt werden. Dabei weisen die Aktinfilamente eine Polarisation auf, sodass das Wachstum der Filamente am sogenannten (+)-Ende beschleunigt ist. Alle Aktinstrukturen einer Zellen zeigen einen Fluss von Monomeren innerhalb der Filamente, bei dem Monomere am (+)-Ende angehängt und am (-)-Ende wieder entfernt werden. Dieser sogenannte Tretmühlen-Effekt wird in der Zelle jedoch durch viele Proteine reguliert, die z.B. die Polymerisation beschleunigen oder aber die Depolymerisation der Filamente verhindern können [14]. Im Folgenden soll nun der Aufbau und die Regulationsmechanismen von Filopodien und Lamellipodien beschrieben werden.

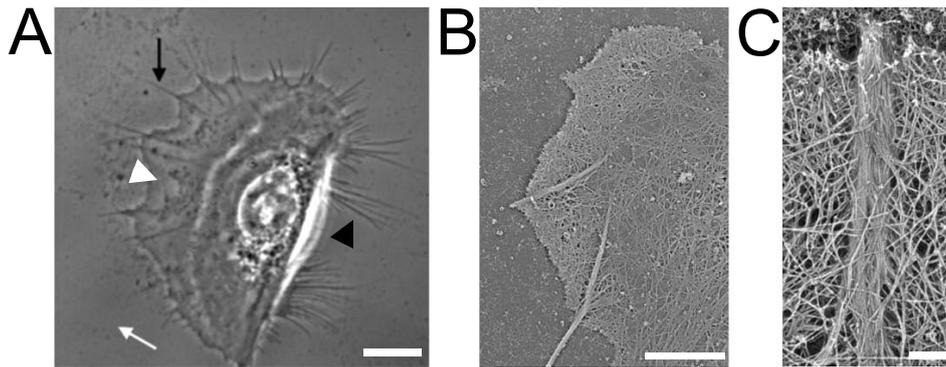


Abbildung 1.4: **Lamellipodiale und filopodiale Strukturen** - Zur effektiven Migration muss eine Zelle polarisiert sein. In (A) ist eine typische, polarisierte Keratinozyte in Phasenkontrast mit einem Lamellipodium (weiße Pfeilspitze) und vielen Filopodien (schwarzer Pfeil) gezeigt. Der weiße Pfeil deutet in die Migrationsrichtung. Am hinteren Ende der Zellen sind Retraktionsfasern mit einer schwarzen Pfeilspitze markiert. Maßstabsbalken = 10 μm . (B) Das Lamellipodium besteht aus einem dichten Netzwerk aus Aktinfilamenten. Hier gezeigt an einer elektronenmikroskopischen Aufnahme nach Extraktion der Plasmamembran an B16F1-Zellen. Maßstabsbalken = 5 μm . (C) Ein Filopodium ist hingegen aus parallel orientierten Aktinfilamenten aufgebaut, die im Netzwerk des Lamellipodiums verankert sind. Maßstabsbalken = 1 μm . Bild (A) verändert nach Schäfer et al., 2009 [101], Bild (B und C) verändert nach Mejillano et al., 2004 [70].

Das Lamellipodium

Das Lamellipodium dient der Zelle zur Erkundung der Umgebung während der Zellbewegung und während der Ausbreitung der Zelle kurz nach dem Aussäen. Der distale Bereich des Lamellipodiums, der sogenannte Leitsaum, wird währenddessen vorgeschoben und ist dabei nicht mehr als 200 nm hoch [14]. Die dazu notwendige Kraft wird durch Aktinpolymerisation am Leitsaum erzeugt [90]. Die schnellwachsenden (+)-Enden der Filamente zeigen dabei in Bezug auf die Zelloberfläche nach außen [114], sodass die Membran nach vorne gedrückt wird. Der Widerstand der Membran sowie die kontraktile Myosin II-Aktivität im Lamellipodium bewirken dabei gleichzeitig einen retrograden Aktinfluss [3, 90].

Das Aktinnetzwerk des Lamellipodiums besteht aus vielen verzweigten Aktinfilamenten, die in mehreren Schichten übereinanderliegen und miteinander verwoben sind (siehe Abb. 1.4 B). Die Dynamik und die Struktur des Aktinnetzwerks wird durch unterschiedliche Aktin-assoziierte Proteine reguliert. Diese Proteine beeinflussen zum einen die Nukleation von neuen Filamenten und zum anderen regulieren sie den Austausch von Monomeren im Filament. Der Arp2/3-Komplex z.B. beschleunigt die Zusammenlagerung von Aktinmonomeren und gilt daher als der Nukleationspunkt für neue Aktinfilamente. Die neuen Filamente entstehen dabei bevorzugt im 70° -Winkel an bereits existierenden Filamenten. Dadurch kommt es zur starken Verzweigung der Filamente im Lamellipodium. Die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes wird durch die Gruppe der WASP- (Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein) sowie durch die Gruppe der WAVE-Proteine (WASP-Familie-Verprolin-homologes Protein) reguliert. Diese Proteine werden lokal am Leitsaum über GTPasen sowie PIP_2 aktiviert und

vermitteln dort die Zusammenlagerung des Arp2/3-Komplexes [88, 89, 17]. Noch unveröffentlichte, tomographische Untersuchungen des Lamellipodiums haben jedoch gezeigt, dass in diesem lange, unverzweigte Aktinfilamente in Schichten übereinander gelagert sind. Diese Anordnung der Filamente wies keine 70°-Verzweigung auf (Vortrag von Victor Small, International Symposium: *Cytoskeletal dynamics and image analysis*, 2009, in Rolduc).

Ein weiterer Regulationsmechanismus ist die Kontrolle des Vorrats an freien Aktinmonomeren im Zytoplasma. Die Aktinpolymerisation kann am Leitsaum der Zelle über die Konzentration der freien Aktinmonomere im Zytoplasma reguliert werden [54]. Dazu binden Proteine wie Profilin oder Thymosin- β 4 Aktinmonomere und verhindern somit deren Anlagerung an Aktinfilamenten. Zusätzlich wird die Verlängerung von bereits existierenden Filamenten durch sogenannte *Capping*-Proteine gesteuert. Gelsolin z.B. bedeckt das (+)-Ende der Filamente und verhindert dadurch den weiteren Einbau von Aktinmonomeren. Das (-)-Ende wird durch ADF (Aktindepolymerisationsfaktor) /Cofilin destabilisiert, sodass dort Aktinmonomere abgetrennt werden. Dieser Prozess wird über die GTPase Rac reguliert, welche PAK (p21-aktivierte Kinase) aktiviert. PAK wiederum kann die Aktivität von ADF/Cofilin regulieren und kontrolliert so die Dynamik des Lamellipodiums [89].

Das Filopodium

Filopodien sind fingerähnliche Membranprotrusionen, die aus parallel orientierten Aktinfilamenten bestehen [123, 66]. Ein Filopodium enthält ca. 15 - 30 einzelne, parallel orientierte Aktinfilamente, welche mit ihrem proximalen Teil in das Aktinnetzwerk des Lamellipodiums eingebettet sind (siehe Abb. 1.4 C). Der distale Bereich ragt währenddessen weit über den Leitsaum der Zelle hinaus [119]. Funktional erfüllen Filopodien eine ganze Reihe wichtiger Aufgaben. In neuronalen Zellen regulieren sie beispielsweise die Wanderung des Wachstumskegels [15]. Außerdem spielen sie eine bedeutende Rolle während der Angiogenese [32]. Besonders interessant ist ihre Funktion bei der Bildung von Zell-Zell-Kontakten. Für die Embryonalentwicklung von Fruchtfliegen konnte gezeigt werden, dass Filopodien den Dorsalschluss (*dorsal closure*) regulieren [74, 68]. Filopodien sind auch an der Bildung von *Adherens Junctions* in Epithelzellen beteiligt. Dabei bilden sie schwache Kontakte zur Nachbarzelle aus, um dort epitheliale Adhäsionen auszubilden [123].

Filopodien können auf zwei unterschiedliche Arten gebildet werden. Diese Mechanismen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Dabei steht die Bildung von parallelen Aktinbündeln bei beiden Mechanismen im Mittelpunkt. Das konvergente Verlängerungsmodell beschreibt den Prozess der Filopodienbildung als eine Zusammenlagerung bereits existierender Aktinfilamente des Lamellipodiums durch den Spitzen-Komplex [119]. Dieses Modell nimmt somit ebenfalls wie für die Entstehung des Lamellipodiums einen Arp2/3-abhängigen Aktinpolymerisationsprozess an (siehe oben). Diese Hypothese wird durch viele weitere Untersuchungen unterstützt, die zeigen, dass die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes zur Bildung Filopodien-ähnlicher Aktinbündel führen kann [51, 43]. Der Spitzen-Komplex befindet sich im vorderen Bereich eines jeden Filopodiums und ist ein Komplex, der aus vielen verschie-

denen Proteinen aufgebaut ist, welche die Aktinpolymerisation des Filopodiums regulieren. So enthält dieser z.B. Ena/VASP-Proteine, die als anti-*Capping* Proteine die Bildung von langen, parallelen Aktinfilamenten regulieren [4]. Essentiell für die Entstehung von parallelen Aktinbündeln aus verzweigten Filamenten ist hier das Aktin-vernetzende Protein Fascin. Es bildet die Grundlage für eine dichte Bündelung und damit für eine effiziente Verlängerung der Filamente [121].

Andere Untersuchungen sprechen jedoch für einen völlig anderen Signalweg zur Ausbildung von Filopodien. Jene Studien haben gezeigt, dass die Bildung von Filopodien vollkommen unabhängig von der Aktivierung des Arp2/3-Komplexes ist [117, 112]. Stattdessen zeigen diese Arbeiten eine wichtige Rolle von Proteinen aus der Gruppe der Formine, da diese Proteine, wie beispielsweise das Formin Dia2 (*Diaphanous-related*), an der Spitze wachsender Filopodien lokalisiert wurden [104, 126]. In vitro initiiert Dia2 die Bildung langer, paralleler Aktinbündel, beschleunigt deren Polymerisation, verhindert hingegen die Aktindepolymerisation und verhält sich wie ein anti-*Capping* Protein [105, 34]. Interessanterweise spielen all diese Vorgänge auch während des konvergenten Verlängerungsmodells eine wesentliche Rolle. Abschließend bleibt jedoch zu klären, ob diese beiden beschriebenen Mechanismen nun gleichzeitig oder alternativ voneinander agieren.

Filopodiale Aktinbündel bilden nicht nur die Grundlage für die Entstehung und das Wachstum von Filopodien, sondern erfüllen auch im Bereich hinter dem Leitsaum der Zelle eine wichtige Aufgabe. So konnte gezeigt werden, dass filopodiale Aktinfilamente in das Aktinnetzwerk des Lamellipodiums lateral und zentripetal eingebaut werden, um dort kontraktile Strukturen zu bilden [69, 77]. Filopodiale Aktinbündel weisen zusätzlich einen retrograden Aktinfluss auf, welcher durch die Polymerisation in der Spitze der Filopodien und den Widerstand der Membran hervorgerufen wird [121, 66]. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen Filopodien und der Bildung von Adhäsionsstrukturen aufgezeigt werden. Dabei wurde die Bildung von kleinen Adhäsionen am Schaft von Filopodien beobachtet [77, 20].

1.1.3 Regulation der Zellmotilität

Die Zellmotilität wird über den asymmetrischen Aufbau von zellulären Strukturen reguliert. Dabei spielen die Asymmetrien der Membranprotrusion sowie der Adhäsionsstrukturen eine wesentliche Rolle. Membranprotrusionen, wie Lamellipodium und Filopodium, werden während der Zellbewegung in Migrationsrichtung ausgebildet. Adhäsionsstrukturen müssen zur Verankerung der Zelle mit dem Substrat an der Zellfront aufgebaut und hinten wieder abgebaut werden. In diesem Zusammenhang ist das Alter der Adhäsionen ein wichtiger Regulationsfaktor, wie in Abschnitt 1.2.2 noch näher erläutert wird. Die Struktur und die Bildung dieser Adhäsionen wird extrazellulär über die ECM sowie über Wachstumsfaktoren geregelt. Beide Signale (d.h. ECM und Wachstumsfaktoren) werden über Rezeptoren innerhalb der Zellmembran wahrgenommen und in die Zelle weitergeleitet. Die Beschaffenheit der ECM bestimmt z.B. die Dimerisierung von Integrinen, die die Interaktion des Zytoskeletts mit der Umgebung und damit das Zellverhalten regulieren (siehe auch 1.2.1). Lösliche

Mediatoren, wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), werden lokal von zellulären Rezeptoren gebunden und lösen dadurch intrazellulär eine Signalkaskade aus, die entscheidend für die Regulation des Zytoskeletts, der Zell-Substrat-Kontakte und der Membranprotrusion ist.

Sowohl die Integrin-Dimerisierung als auch die Bindung von Wachstumsfaktoren stimulieren kleine GTP-bindende Proteine aus der Familie der Rho-GTPasen, wie Rac, Rho und Cdc42. Solche GTPasen sind Proteine, die in der GTP-gebundenen Form aktiv sind. Der Austausch von GTP und GDP wird über verschiedene Proteine reguliert. In ihrer aktiven Form können Rho-GTPasen an Effektormoleküle wie Kinasen oder Strukturproteine binden. Im Allgemeinen aktivieren diese Proteine Signalwege, die das Aktinnetzwerk der Zelle sowie die Zelladhäsion beeinflussen. So begünstigt Rho die Zusammenlagerung von kontraktile Aktin/Myosin-Filamenten über Effektoren wie Dia oder ROCK (*Rho associated kinase*) und den Aufbau von Fokaladhäsionen [79]. Die Aktivierung von Rho am hinteren Ende migrierender Zellen vermittelt dort die Retraktion und das Auflösen von Adhäsionsstrukturen [86, 73]. Rac und Cdc42 regulieren beide die Aktinpolymerisation über WASP- und WAVE-Proteine, die weiterführend den Aufbau des Arp2/3-Komplexes kontrollieren [91], wobei neuere Untersuchungen gezeigt haben, dass Cdc42 auch über Formine Aktinfilamente aufbauen kann [53]. Die wesentliche Aufgabe von Rac stellt die Erzeugung protrusiver Kräfte durch lokale Aktinpolymerisation dar, welche zur Ausbildung eines weiten Lamellipodiums an der Zellfront führen. Hingegen erzeugt die Aktivierung von Cdc42 lange Filopodien an der Zellfront. Weiterführend konnte gezeigt werden, dass Cdc42 und Rac den Aufbau von Fokal-komplexen am Leitsaum stimulieren [79]. Dabei wirken Rho und Rac antagonistisch und werden innerhalb des Lamellipodiums zeitlich und räumlich voneinander getrennt aktiviert [64].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Aktivierung der Rho-GTPasen durch Transmembranrezeptoren nicht nur einen Einfluss auf die direkten Effektormoleküle hat, sondern sich auf das gesamte Aktinnetzwerk sowie die Genexpression der Zelle auswirkt. Dies kann zu morphologischen Veränderungen innerhalb der Zelle führen, die mit dem Übergang von sessilen zum migratorischen Verhalten einhergehen. [106].

1.1.4 Zelluläre Kräfte während der Migration

Wie oben schon beschrieben wurde (Abschnitt 1.1.3), ist der Bruch zellulärer Symmetrien ein wesentlicher Regulationsmechanismus der Zellmigration. Dabei spielen Zellkräfte eine essentielle Rolle. So kann die asymmetrische Ausbildung kontraktile Stressfasern in einer unpolaren Zelle die lokale Kontraktilität erhöhen und so die Protrusions- und Migrationsrichtung bestimmen [125].

Molekulare Motorproteine, wie z.B. Myosin II, sind zur Erzeugung von Zellkräften unbedingt notwendig. Myosin II wird in Aktinbündel eingebaut, die ihrerseits mit FAs verbunden sind. Solche Aktinfasern werden oft als Stressfasern bezeichnet. Zu beachten ist bei dieser Benennung, dass Stressfasern in mobilen und sessilen Zellen unterschiedlich aufgebaut

sind [19]. Viele Proteine werden spezifisch in Stressfasern eingebaut. Palladin, Myosin II und α -Actinin zeigen typischerweise eine gestreifte Verteilung entlang dieser Aktinbündel [38, 82, 22]. Solche gestreiften Stressfasern bilden sich beispielsweise durch Aktinpolymerisation an FAs [23], wobei die Proteine in einer bestimmten Reihenfolge eingebaut werden. Dabei fungiert α -Actinin als eine Art Platzhalter für den späteren Einbau von Myosin II, sodass α -Actinin teilweise durch Myosin II ersetzt wird [38].

Während der Zellmigration sind die zellulären Kräfte an den beiden hinteren Seiten der Zelle konzentriert. Interessanterweise sind diese Kräfte zum Zellmittelpunkt gerichtet. Außerdem konnten Zellkräfte auch innerhalb des Lamellipodiums identifiziert werden, welche ebenfalls zum Zellzentrum zeigen [73, 80].

1.2 Die Fokaladhäsion

Fokaladhäsionen sind spezielle Bereiche der Zelle, die eine Verbindung des Zellinneren mit der äußeren Umgebung herstellen. Solche Zell-Substrat-Adhäsionen wurden erstmals 1971 in elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Lamellipodiums von Fibroblasten entdeckt [1]. Diese Strukturen verbinden das intrazelluläre Aktinzytoskelett der Zelle mit der extrazellulären Matrix. Sie stellen für die Zelle eine wichtige Voraussetzung für die zelluläre Kraftübertragung [6, 7] sowie für die Wahrnehmung externer Informationen dar [31], sodass über diese Adhäsionsstellen das gesamte Zellverhalten reguliert werden kann. So werden beispielsweise während der Embryonalentwicklung des Auges Zellen über die Fibronectin-Matrix zum Auswandern in eine bestimmte Richtung dirigiert. Dabei werden diese extrazellulären Informationen über die Fokaladhäsionen wahrgenommen, welche intrazellulär die gerichtete Migration über verschiedene Signalwege (siehe Abschnitt 1.1.3) regulieren [41].

1.2.1 Aufbau und Funktion von Fokaladhäsionen

Fokaladhäsionen wurden in fast allen adhären Zelltypen entdeckt. Diese großen Multi-Protein-Komplexe stellen die Voraussetzung für wesentliche, biologische Prozesse wie die Zellmigration, Wachstum und Differenzierung dar. Sie bestehen aus den Integrinen und vielen Adapter-Proteinen wie z.B. Vinculin, Paxillin und Zyxin (Abb. 1.5). Die Integrine sind heterodimere Transmembranproteine, welche die Verbindung der Zelle zur Umgebung vermitteln. Solche Heterodimere sind jeweils aus einer α - und aus einer β -Untereinheit aufgebaut (Abb. 1.5). Bis heute sind 18 α - und 8 β -Integrine bekannt, die 24 funktionale Kombinationen ausbilden können. Die Zusammenlagerung der Untereinheiten geschieht über nicht-kovalente Bindungen und führt zu spezifischen Substrat-Bindungseigenschaften [42]. So bindet das Heterodimer aus $\alpha5$ und $\beta1$ ausschließlich an Fibronectin, wohingegen das Integrin $\alpha3\beta1$ an Fibronectin, Kollagen und Laminin binden kann. Die primäre Erkennungssequenz dieser Matrix-Proteine besteht aus drei Aminosäuren, der sogenannten RGD-Sequenz (Arg-Gly-

Asp). Sie dient der initialen Bindung vieler Integrine, wobei die Substrat-Spezifität über die benachbarten Regionen bestimmt wird [41, 58].

Die Integrin-Aktivierung ist der erste Schritt, der zum Aufbau von Fokaladhäsionen führt. Dafür ist das Protein Talin unersetzlich, welches intrazellulär an das Heterodimer bindet und damit eine Konformationsänderung des Integrins hervorruft. Diese Änderung ist essentiell für die Anlagerung weiterer Integrine, sodass die Fokaladhäsion aufgebaut werden kann. Talin vermittelt weiterführend die Bindung von Vinculin, welches selber wiederum viele Proteine wie z.B. Aktin und Paxillin rekrutieren und binden kann [18]. Zusammensetzung und Struktur von Adhäsionen variiert dabei stark in Abhängigkeit von ihrem Alter oder vom Differenzierungszustand der Zelle. Insgesamt sind bis jetzt etwa 150 Proteine bekannt, die in Fokaladhäsionen (FAs) eingebaut werden können [129]. FAs werden aufgrund ihrer Zusammensetzung und Morphologie in drei Kategorien eingeteilt. Fokalkomplexe (FXs) sind klein und punktförmig, haben einen Durchmesser von etwa $1 \mu\text{m}$ und sind innerhalb des Lamellipodiums direkt hinter dem Leitsaum lokalisiert. Fokalkontakte, manchmal auch als Fokaladhäsionen bezeichnet, sind dagegen längliche Strukturen, die eine Ausdehnung von $2\text{-}5 \mu\text{m}$ aufweisen. Solche Fokalkontakte sind meist in der Zellperipherie zu finden. Hingegen sind fibrilläre Adhäsionen in den zentralen Bereichen der Zelle lokalisiert und mit einer Länge von $1\text{-}10 \mu\text{m}$ eher große, stabile Strukturen [30].

Die Proteine innerhalb einer FA sind nicht fest eingebaut, sondern unterliegen einem ständigen Austauschprozess. Diese Dynamik kann mittels Ausbleich-Experimenten von Fluoreszenz-markierten Proteinen sichtbar gemacht werden. Dabei werden die Proteine in Abhängigkeit des FA-Alters unterschiedlich schnell ausgetauscht. Außerdem verändert sich mit der Lebensdauer der FA der Anteil fest eingebauter Proteine. Neueste Untersuchungen an Keratinozyten konnten eine Abhängigkeit der Vinculin-Austauschdynamik vom migratorischen Zustand der Zelle zeigen [73].

Zusätzlich weisen Fokaladhäsionsproteine eine Bewegung innerhalb der Adhäsionsstrukturen auf. Diese Bewegung ist abhängig von der unterschiedlichen Anbindung der FA-Proteine an das Aktinzytoskelett, da die Aktin-bindenden Proteine durch die Aktinpolymerisation innerhalb der FA mitbewegt werden. Solche molekularen Bewegungen korrelieren mit Protrusions- und Retraktionsereignissen während der Zellmigration und stellen daher einen wesentlichen Regulationsmechanismus der Integrin-vermittelten Zellmechanik dar [39]. Nicht nur einzelne Proteine innerhalb der FA weisen eine gewisse Motilität auf, sondern auch die gesamte FA ist beweglich. In sessilen Fibroblasten sind die FAs hoch mobil und bewegen sich linear zum Zellinneren. Diese Beweglichkeit beruht auf der Kontraktion von assoziierten Stressfasern (siehe Abb. 1.5). In migrierenden Zellen sind die FAs meist unbeweglich. Eine Ausnahme stellen dabei die FAs am hinteren Ende der Zelle dar. Solche FAs weisen eine deutliche Gleit-Bewegung in Richtung des Zellmittelpunkts auf [115, 9].

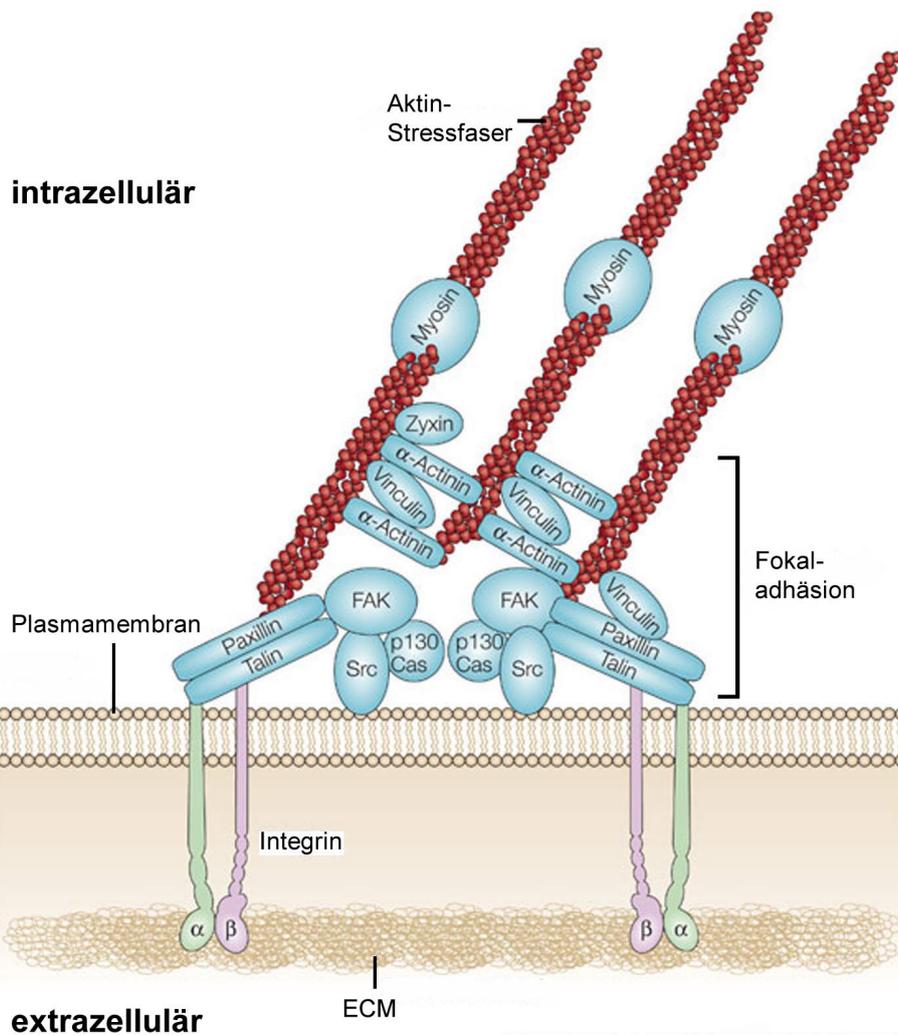


Abbildung 1.5: **Aufbau der Fokaladhäsion** - Die extrazelluläre Matrix (ECM), die Integrine und das Aktinzytoskelett bilden eine dynamische Einheit, die als Fokaladhäsion bezeichnet wird. Dabei vermitteln die Integrine als Transmembranproteine über verschiedene Adapter-Proteine die Verbindung der ECM zu intrazellulären Aktinfasern. Diese Adapter-Proteine sind zum einen strukturgebend und zum anderen regulatorische Proteine. Die Zusammensetzung einer Fokaladhäsion verändert sich ständig in Abhängigkeit von externen Signalen und von der Zellantwort. Verändert nach Mitra et al., 2005 [75].

1.2.2 Entstehung und Reifung von Fokaladhäsionen

Während der Migration müssen FAs an der Zellfront gebildet und am hinteren Ende der Zelle abgebaut werden. Die FAs dienen dabei der Verankerung der Zelle mit dem Substrat, um effektive Kräfte zur Fortbewegung erzeugen zu können. Viele Studien beschreiben das Lamellipodium als Ort der Bildung von FAs [127]. Andere Untersuchungen zeigten jedoch bereits kleine Adhäsionsstrukturen in Filopodien. Diese enthalten Proteine wie β 1-Integrin, Vinculin und Talin [27, 118]. Neuere Experimente unterstützen diese Ergebnisse und zeigen die Lokalisation von FA-Proteinen entlang des Schafts von Filopodien [77]. Doch wie genau Filopodien den Aufbau von FAs regulieren und wie diese die Umwandlung filopodialer Adhäsionen in lamellipodiale Strukturen beeinflussen, konnte in diesen Studien nicht aufgeklärt werden. Mit der Beantwortung solcher Fragen beschäftigt sich ein wesentlicher Teil dieser Arbeit. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse trugen maßgeblich dazu bei, den Mechanismus sowie die zellulären Strukturen, die zur Bildung stabiler FAs verantwortlich sind, detailliert zu bestimmen (siehe Abschnitt 3.1 und 3.2).

Im Allgemeinen durchlaufen FAs direkt nach ihrer Bildung einen Reifungsprozess, der zur Stabilisierung der gesamten FAs sowie der Aktinbindung beiträgt. Kleine FXs werden aufgebaut, welche im Laufe der Zeit zu FAs reifen. Dadurch verändert sich zum einen die Größe der FAs und zum anderen ihre Protein-Zusammensetzung. Manche Proteine sind spezifisch nur in älteren FAs zu finden. So enthalten FXs in Fibroblasten kein Tensin oder Zyxin, welche erst nach und nach in reifende FAs eingebaut werden. Andere Proteinen, wie VASP, verändern während der Reifung ihre Konzentration innerhalb der FAs. Dieser Prozess wird über Tyrosin-Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert [128]. Außerdem beschreiben viele Studien einen Einfluss von kontraktilen Kräften auf die Umgestaltung von kleinen FXs zu gereiften FAs [6]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der GTPase Rho, welche für die Zusammenlagerung von kontraktilen Stressfasern verantwortlich ist, die Bildung von FAs begünstigt. Hingegen führte eine Inhibierung derselben zur Anreicherung von FXs innerhalb des Lamellipodiums [95]. Diese Ergebnisse konnten in Experimenten bestätigt werden, in denen eine externe Kraft auf FXs ausgeübt wurde. Dabei konnte ein Wachstum der FXs festgestellt werden [28, 94]. Andere Studien diskutieren weitere Mechanismen, die zur Bildung und Reifung von FAs beitragen. In diesem Zusammenhang werden der Aktinpolymerisation an FAs und dem anschließenden Einbau von α -Actinin und Myosin II eine Schlüsselrolle zugesprochen [16].

In migrierenden Keratinozyten konnte zum ersten Mal ein direkter Zusammenhang zwischen FA-Alter, Austauschdynamik, Krafttransmission und Phosphorylierungsgrad der FAs gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass junge Adhäsionen am Leitsaum eine erhöhte Vinculin-Austauschdynamik, eine höhere Phosphorylierung sowie geringere Kräfte im Vergleich zu gereiften FAs am hinteren Ende der Zelle aufwiesen. Dies verdeutlicht das direkte Zusammenspiel von Zellkräften und Phosphorylierung auf die Regulation der FA-Reifung [73].

1.3 Die extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (ECM) bildet in tierischen Geweben eine große Zahl unterschiedlicher Strukturen, die jeweils spezielle Funktionen erfüllen. So bildet sie z.B. Knorpelgewebe, Sehnen oder Bindegewebe. Die Matrix selbst besteht aus verschiedenen Kombinationen von Kollagenen, Hyaluronsäure, Proteoglykanen sowie aus Fibronektinen und Lamininen, die gewebespezifisch die mechanischen Eigenschaften der Matrix bestimmen. Das Bindegewebe z.B. ist aus ECM-Proteinen aufgebaut, die den mechanischen Zusammenhalt der einzelnen Organe vermitteln. Es besteht zum einen aus Kollagenen, die die Stabilität und Flexibilität des Gewebes bestimmen, und zum anderen werden die Zwischenräume mit stark hydratisierter Hyaluronsäure und Proteoglykanen ausgefüllt. Diese Proteine verleihen dem Gewebe eine gelartige Konsistenz. Die Basallamina stellt eine weitere, spezielle Struktur der ECM dar. Sie verbindet typischerweise Epithelgewebe und Muskeln mit den Bestandteilen des darunterliegenden Bindegewebes [63].

Die Matrix-Proteine werden von Zellen, vornehmlich Fibroblasten, gebildet und sezerniert. Dabei ist die ECM kein starres Gerüst, das lediglich die Zellen umgibt. Vielmehr unterstützt die Matrix aktiv bestimmte Funktionen der Bindegewebszellen. So kann die Matrix die Differenzierung oder die Wanderung von Zellen beispielsweise während der Wundheilung beeinflussen. Die Zellen stehen währenddessen immer in engem Kontakt mit der ECM und modellieren diese ständig neu [63].

1.3.1 Fibronektin: Struktur und Fibrillogenese

Fibronektin (FN) ist eines der wichtigsten Proteine der ECM. Es ist verantwortlich für eine funktionale Zelladhäsion und Wachstum. Viele Zelltypen synthetisieren FN und sekretieren es als ein globuläres Dimer, welches aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist. Diese Untereinheiten sind über Disulfid-Bindungen miteinander verbunden. Jede Untereinheit besteht aus drei sich wiederholenden Fragment-Typen, Typ I, II und III (siehe Abb. 1.6 A). Diese Fragmente bilden Regionen innerhalb des Moleküls, die für die Interaktionen mit weiteren FN-Dimeren und mit anderen ECM-Proteinen verantwortlich sind [67]. FN wird über ein einzelnes Gen kodiert, welches über alternatives *Splicing* zwei unterschiedliche FN-Formen bilden kann, zelluläres und Plasma-FN. Diese beiden Proteine unterscheiden sich durch einen verschiedenartigen Aufbau der V-Region, sowie der Untereinheiten IIIA und IIIB (Abb. 1.6 A). Plasma-FN kommt gehäuft im Blut vor, hingegen wird zelluläres FN vornehmlich von Fibroblasten und anderen Zelltypen synthetisiert [41].

Während der Fibrillogenese wird das FN so verändert, dass es Detergenz-unlöslich wird und eine stabile Matrix ausbilden kann. Dieser Prozess dauert bis zu 16 h, wie in Zellkultur-Experimenten beobachtet wurde [108]. Zu Beginn bindet das globuläre FN an Integrine, was die Bildung zellulärer Adhäsionsstellen zur Folge hat (Abb. 1.6 B und C). Diese Adhäsionen werden intrazellulär mit dem kontraktilen Aktinnetzwerk der Zelle verknüpft. Durch die Kontraktilität der Zelle wird das globuläre FN entfaltet, sodass etliche Bindungsstellen

für andere ECM-Proteine, wie Kollagen, oder für weitere FN-Moleküle freigelegt werden (Abb. 1.6 D). Der Einfluss der Kontraktionskraft auf die Fibrillogenese wurde in Versuchen deutlich, die die Kontraktilität der Zelle erhöhen oder reduzieren. So stimuliert eine erhöhte Zellkraft die Bildung der Fibrillen, hingegen verringert eine Inhibierung der GTPase Rho den Matrix-Aufbau [67]. Zellkraft-Messungen mit gleichzeitiger Analyse der FN-Fibrillogenese zeigten eine Korrelation zwischen Krafttrichtung und Fibrillen-Ausrichtung. Jedoch konnte kein direkter Zusammenhang zwischen dem Kraftbetrag und der Fibrillen-Größe hergestellt werden. Diese Untersuchungen zeigen aber deutlich den essentiellen Einfluss der Zellkraft auf die Ausbildung einer funktionalen Matrix [60]. Die Zusammenlagerung von FN-Dimeren zu Fibrillen hängt des Weiteren von der Lokalisation der freigelegten Regionen ab, die die FN-FN-Interaktionen regulieren (Abb. 1.6 A). Die Typ I 1-5 Fragmente sind dabei besonders wichtig und üben eine regulatorische Funktion aus. Rekombinates FN, ohne diese Regionen, kann keine Fibrillen bilden [67]. Zusätzlich führt die Überexpression des 70 kDa-Fragments, welches die Typ I 1-5 Sequenz enthält (Abb. 1.6 A), zur vollständigen Blockierung der Fibrillen-Bildung [96]. Zusammenfassend wird deutlich, dass der Prozess, der zur Bildung einer funktionalen Matrix führt, vielen Regulationsmechanismen unterliegt und noch längst nicht vollständig aufgeklärt ist.

1.3.2 Matrix-Aufbau und Umgestaltung während der Zellmigration

Zellmigration über die Grenzen der einzelnen Gewebetypen ist essentiell für viele biologische Prozesse einschließlich Matrix-Umgestaltung und Metastasierung. Um diese Barrieren zu überwinden, produzieren wandernde Zellen Proteasen wie z.B. Matrix-Metalloproteasen (MMPs). Diese MMPs steuern den komplexen Prozess der Proteolyse, welcher die gerichtete Migration und Zelladhäsionsbildung regulieren kann [33].

Während der interstitiellen Migration (Zellwanderung im Zwischenraum von Organen oder Organteilen) wandern Zellen durch eine dreidimensionale ECM. Dabei wird die Matrix abgebaut, sekretiert und wieder neu angeordnet. Zu diesem Zweck werden verschiedene MMPs von der Zelle sekretiert, welche spezifisch die einzelnen Komponenten der Matrix auflösen [81]. Dieser Vorgang ist ein zeitlich und räumlich hoch organisierter Prozess, da die Zelle zur effektiven Migration an eine stabile Matrix adhären muss, um gerichtete Kräfte ausüben zu können. Lebendzelluntersuchungen haben gezeigt, dass migrierende Zellen Kollagen-Fasern aus dem dreidimensionalen Netzwerk der ECM heraus lösen können, um diese weiterführend entlang des Zellkörpers parallel nach hinten auszurichten. Auf diese Art und Weise wird die ECM ständig umgestaltet, sodass ein höher organisierter Matrix-Aufbau erreicht wird. Dieser Prozess ist die Voraussetzung für den funktionalen Aufbau verschiedener Gewebetypen. Zum Beispiel ist die Unterhaut aus vielen parallel geordneten Fasern aufgebaut, die die Festigkeit des Gewebes bestimmen [25].

Bei der Zellwanderung auf zweidimensionalen Substraten, wie z.B. während der Wund-

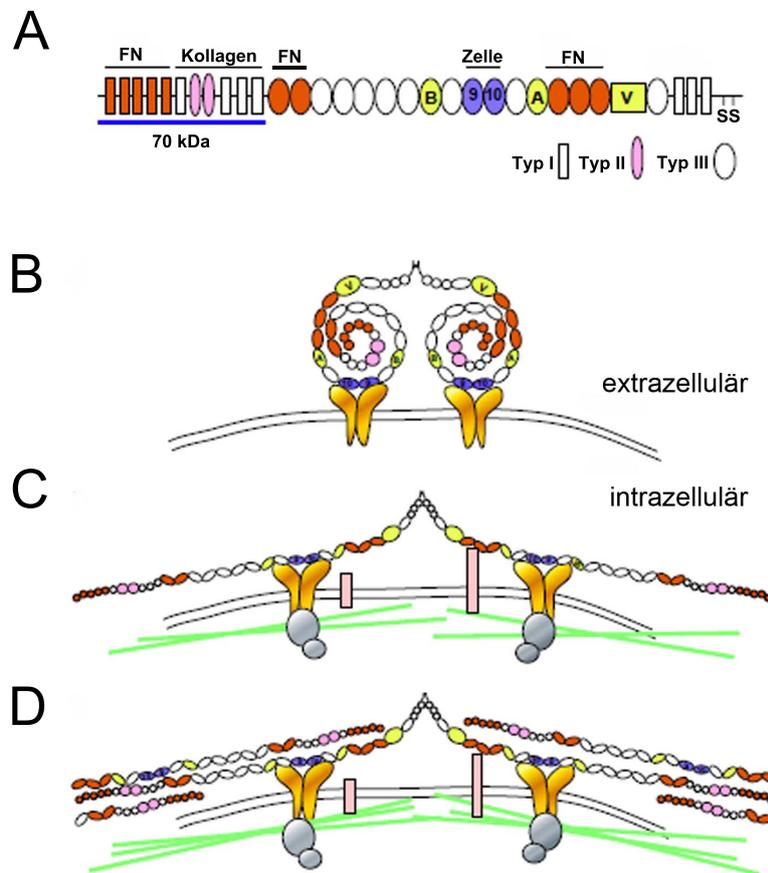


Abbildung 1.6: **Struktur und Fibrillogenese von Fibronectin** - (A) Ein FN-Monomer besteht aus 12 Typ I, aus 2 Typ II und aus 15-17 Typ III-Fragmenten. Die alternativen *Splicing*-Regionen, IIIB, IIIA und die V-Region, sind in hellgrün dargestellt. Die Bindungsdomänen für Kollagene, FN und für die Zelle (d.h. für viele Integrine, RGD-Sequenz) sind eingezeichnet. Über die Cystein-Reste (S-S) bildet sich das FN-Dimer aus. Das 70 kDa-Fragment ist blau unterstrichen. (B)-(D) Der schrittweise Aufbau von FN-Fibrillen: (B) Globuläres, dimeres FN wird von der Zelle sekretiert und bindet extrazellulär über die RGD-Sequenz an Integrine (gelb). (C) Die Bindung an Integrine und an andere Rezeptoren (rosa) bewirkt eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts (grüne Linien) und aktiviert intrazellulär den Aufbau von Adhäsionsstrukturen (graue Kreise). Durch die Zellkontraktilität wird das globuläre FN entfaltet, sodass FN-Bindungsdomänen freigelegt werden. (D) FN-Fibrillen lagern sich durch FN-FN-Wechselwirkungen zusammen. Die Anordnung der Fibrillen hängt von den freigelegten FN-Bindungsdomänen ab. Verändert nach Mao und Schwarzbauer, 2005 [67].

heilung (siehe Abschnitt 1.1.1), erfolgt die Matrix-Umgestaltung durch die Zelle direkt unterhalb des Zellkörpers. Hierbei werden ebenfalls MMPs von der Zelle gebildet und sekretiert, sodass die bereits vorhandene ECM umgestaltet wird [122]. Die Migrationsspur wird jedoch nicht nur durch die Umgestaltung bereits vorhandener ECM-Komponenten aufgebaut, sondern enthält vornehmlich neu sekretierte ECM-Proteine (Abb. 1.7 A) und Makroaggregate aus von der Zelle abgespaltenen Proteinen (Abb. 1.7 B). Diese Makroaggregate werden bei Keratinozyten durch Abschnürung der Retraktionsfasern gebildet. Sie können röhren- oder kugelförmig mit einem Durchmesser von 50-110 nm geformt sein und enthalten neben Membranresten zusätzlich β 1-Integrine. Diese Komplexe liegen in einem dichten Netzwerk aus sekretierten ECM-Proteinen. Die einzelnen ECM-Komponenten sind ihrerseits zu kleinen Fibrillen zusammen gelagert und untereinander stark vernetzt (Abb. 1.7 B, weiße Pfeile). Als Bestandteile der Migrationsspur von Keratinozyten konnten ECM-Proteine wie Fibronectin, Laminin 5 und Kollagen IV nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die Migrationsspur als eine provisorische Matrix für nachfolgende Zellen dient und somit die Migrationsrichtung dieser Zellen beeinflussen kann (vgl. Abb. 1.7 A). Ein solcher Regulationsmechanismus der Zellwanderung ist während der Wundheilung gut vorstellbar [49].

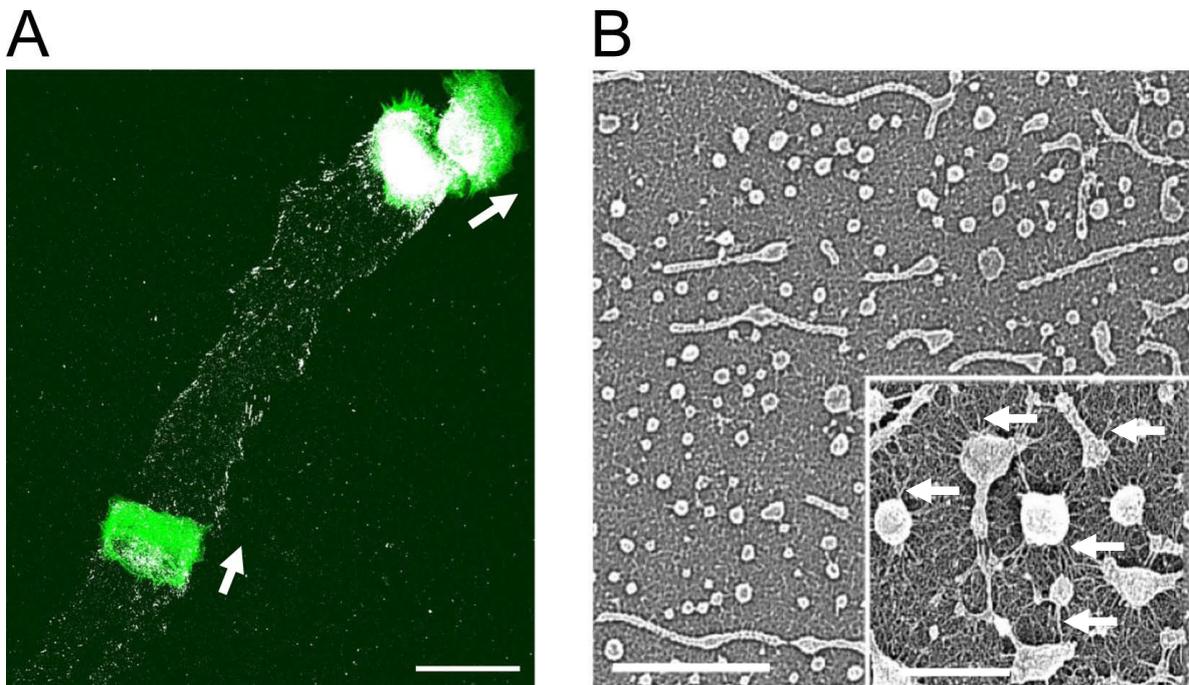


Abbildung 1.7: **Die Migrationsspur von Keratinozyten** - (A) zeigt eine Immunfluoreszenzaufnahme migrierender, polarisierter Keratinozyten (grün, Aktin). Diese Zellen hinterlassen eine Spur aus Fibronectin (weiß), auf der nachfolgende Zellen migrieren. Die weißen Pfeile zeigen die Migrationsrichtungen der Zellen an. Die Aufnahme ist im Rahmen dieser Arbeit entstanden. Maßstabsbalken = 50 μ m. In (B) ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Migrationsspur von Keratinozyten dargestellt. Diese zeigt röhren- und kugelförmige Membranreste, die in einem dichten Netzwerk aus ECM-Proteinen liegen (Vergrößerung: weiße Pfeile). Maßstabsbalken im Übersichtsbild = 1 μ m und in der Vergrößerung = 200 nm. Verändert nach Kirfel et al., 2003 [49].

Pathologische Veränderungen der ECM und der Matrix-Sekretion können das Zellverhalten, wie Wachstum und Migration, beeinflussen. Dabei spielt die Steifigkeit der Matrix eine besondere regulatorische Rolle. In den 1960er Jahren konnte bereits gezeigt werden, dass Veränderungen der mechanischen Gewebeeigenschaften das Wachstum von Tumoren beeinflussen kann. So wurde ein Stück Metall in einen Körper implantiert, welches die Entstehung von Tumoren förderte. Wurde dieses Metall jedoch in Form von Pulver in einen Körper eingebracht, so wurden keine Tumore gebildet [8]. Auch heute noch findet die erste Diagnose von Tumoren über die veränderte Steifigkeit der Tumor-Matrix im Vergleich zum umgebenden Gewebe statt. Dabei führt eine Versteifung der Matrix zur Erhöhung der Kontraktionskraft und einer Vergrößerung der Adhäsionsstrukturen der Tumorzellen [85]. Dies kann z.B. über die Vernetzung von Kollagenen reguliert werden [61]. Ab einem gewissen Grad der Matrix-Verhärtung wird jedoch der Abbau der umgebenden ECM erhöht und gleichzeitig die Sekretion von Matrix-Komponenten reduziert, sodass die Zellen die ECM zerstören und in das anliegende Gewebe auswandern können. Die Fähigkeiten, über physikalische Barrieren zu migrieren, ist ein typisches Merkmal von Tumorzellen [84, 85]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Fibronectin-Sekretion die Zellmotilität reduziert [2]. Es wird somit klar, dass ein Zusammenhang zwischen ECM-Sekretion, Zellkontraktilität und Motilität besteht. Dieses Forschungsgebiet liegt momentan im Fokus vieler Untersuchungen, die sich mit der Entstehung und Metastasierung von Tumorzellen beschäftigen. Die genauen Regulationsmechanismen sind dabei noch nicht eindeutig aufgeklärt und bedürfen weiterer Analysen.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Die Zellmigration ist einer der wichtigsten biologischen Prozesse in vielzelligen Organismen. Sie stellt die Voraussetzung für die Entstehung ganzer Organe bis hin zum vollständig entwickelten Körper dar. Während der gesamten Lebenszeit wird die Aufrechterhaltung lebensnotwendiger Strukturen und die Abwehrmechanismen zur Verteidigung gegen äußere Einflüsse mittels gerichteter Zellmigration koordiniert. In diesem Zusammenhang ist ein spezifischer, genau regulierter Auf- und Abbau von Adhäsionsstrukturen unbedingt notwendig. Die hierbei ablaufenden Prozesse sind bisher nur bruchstückhaft verstanden. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Mechanismus der Adhäsionsbildung am Beispiel von Keratinozyten näher untersucht werden. Zunächst sollte geklärt werden, welche Rolle Filopodien während der Adhäsionsentstehung am Leitsaum von migrierenden Keratinozyten spielen, und inwieweit diese das Migrationsverhalten beeinflussen. Des Weiteren sollte der zugrunde liegende Mechanismus, der zur Adhäsionsreifung führt, und die dazu notwendigen, zellulären Strukturen untersucht werden.

Da mechanische Kräfte der Zelle wichtig für die Umbildung der ECM sind und diese Kräfte über Fokaladhäsionen ausgeübt werden, sollte der Einfluss dieser Kräfte auf Matrix-Sekretion und Migrationsverhalten der Zelle untersucht werden. Dabei stellen Keratinozyten

ein ideales Modellsystem dar. Keratinozyten weisen nämlich sowohl ein sessiles als auch ein migratorisches Verhaltensmuster auf, welche beide ineinander übergehen können, sodass zelluläre Veränderungen direkt an einem Zelltypen beobachtet werden können. Zu diesem Zweck sollte zuerst ein System entwickelt werden, welches die Unterscheidung der Zellkräfte und der Kräfte innerhalb der ECM ermöglicht. In diesem Zusammenhang wird zwischen sessilen und migrierenden Keratinozyten unterschieden, sodass eine direkte Korrelation der Zellkraft mit der Motilität und der ECM-Sekretion möglich wird.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Zellkultur

In der vorliegenden Arbeit wurden für alle zellbiologischen Experimente Normale Humane Epidermale Keratinozyten (NHEK) verwendet. Diese wurden von der Firma Lonza (Verriers, Belgien) bezogen. Zur Vermehrung wurden die Zellen in T75-Flaschen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) ausgesät, bei 37°C und 5% CO₂-Begasung bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert und anschließend geerntet. Als Medium wurde KBM (Keratinozyten Basal Medium, Lonza) mit folgenden Zusätzen verwendet:

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

Nach Zugabe der Supplemente wird das KBM-Medium als KGM (Keratinozyten *Growth Medium*) bezeichnet. Zur Ernte wurden die Zellen zunächst mit 1x PBS (*Phosphate Buffered Salt Solution*: 137 mM NaCl, 4,2 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ und 1,5 mM KH₂PO₄ in H₂O, pH 7,2) gewaschen und danach 3 min mit 5 ml 0,025% Trypsin und 0,01% EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) in *Hank's buffered salt solution* (HBSS, Lonza) inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin mit 5 ml TNS (*Trypsin Neutralization Solution*, Lonza) deaktiviert und die Zellsuspension in ein Zellkulturgefäß (Greiner Bio-One) überführt. Alle Medien wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt. Die Zellen wurden nun bei 200 g für 3 min zentrifugiert und anschließend in KGM resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Kammer (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf) bestimmt. Die Zellen wurden entweder für Experimente weiterverwendet, zur weiteren Vermehrung in neue Kulturflaschen ausgesät oder zur langfristigen Lagerung eingefroren. Dafür wurden die Zellen nach der Zentrifugation direkt in Einfriermedium (CryoSFM, Promo Cell, Heidelberg) mit einer Zellzahl von

1 Mio. oder 500.000 Zellen/ml aufgenommen. Es wurden jeweils 250.000 Zellen in Kunststoffgefäße zur Kryokonservierung aliquotiert. Diese wurden zunächst bei -80°C in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrier-Box (Thermo Fischer Scientific, Rochester, USA) für mindestens 24 h inkubiert und anschließend für längere Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff umgebettet. Bei Bedarf wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut und in KGM kultiviert.

Für Lebendzelluntersuchungen wurden die Zellen in einer Zellzahl von 20.000-30.000 in selbst präparierten Glasbodenschalen (Glasdicke: $170\ \mu\text{m}$, Menzel GmbH, Braunschweig) oder auf selbst hergestellten Silikon-Substraten (siehe Abschnitt 2.3) ausplattiert. Zellen, die für Immunfluoreszenz-Markierungen verwendet wurden, wurden auf kreisförmige Deckgläser (Glasdicke: $170\ \mu\text{m}$, Menzel GmbH) in 12-Loch Platten ausgesät. Für die Zellanalysen wurden ausschließlich Zellen der Passagen 1-4 verwendet. Vor der Aussaat wurden die Substrate sterilisiert. Dazu wurden die Glasbodenschalen sowie die selbst hergestellten Silikon-Substrate für 5-10 min mit der Öffnung nach unten auf einen UV-Tisch gelegt. Die Deckgläser für die Immunfluoreszenzen wurden unter der Sterilbank in 100% Ethanol getaucht und abgeflammt.

2.1.1 Fibronektin-Beschichtung

Zur Untersuchung verschiedener Migrationsprozesse wurden die Substrate vor Aussaat der Zellen mit dem Matrix-Protein Fibronektin (FN) beschichtet. Dazu wurde humanes Plasma-FN aus der Plazenta (BD Bioscience) für Glasoberflächen in einer Konzentration von $2,5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ und für Silikon-Substrate in einer Konzentration von $5\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ verwendet. Die Lösungen wurden vor der Aussaat auf die jeweiligen Substrate gleichmäßig aufgebracht und diese für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Direkt danach wurden die Zellen auf die frisch beschichteten Substrate ausgesät. Für einige Versuche wurde anstatt FN 0,4% Gelatine (Ruf, Quakenbrück) verwendet.

2.1.2 EGF-Stimulation

Zur Untersuchung migrierender Keratinozyten wurden die Zellen 1 h vor Experimentbeginn mit 50 nM EGF (*Epidermal Growth Factor*, Sigma) stimuliert. Dieser Wachstumsfaktor wirkt unter anderem motogen und erhöht somit die Migrationsaktivität.

2.1.3 Neomycin-Behandlung

Neomycin hemmt die lokale Aktinpolymerisation an dem Leitsaum der Zelle [40, 5, 13] und unterbindet dadurch die Bildung von Filopodien in EGF-stimulierten Keratinocyten. Zu diesem Zweck wurden die Zellen (siehe Abschnitt 3.1.4 und 3.1.5) vor der EGF-Stimulierung 4 h mit 10 mM Neomycin (Sigma) unter Zellkulturbedingungen inkubiert.

2.2 Transfektion und Immunfluoreszenz

2.2.1 Transfektion und Plasmidgewinnung

Mittels Transfektion ist es möglich Proteine in einer lebenden Zelle zu untersuchen. Dafür werden Plasmide, die das zu untersuchende Protein mit einem Fluoreszenzmarker fusioniert codieren, in die Zelle eingebracht. Als Fluoreszenzmarker wurden die Proteine GFP (*Green Fluorescent Protein*), YFP (*Yellow Fluorescent Protein*) und DsRed (*Discosoma Red Fluorescent Protein*) verwendet (siehe Tabelle 1). Die Konstruktion der Plasmide (außer der zur Verfügung gestellten) wurde von Simone Born im Institut durchgeführt.

Protein	Stammnr.	Vektor	Resistenz	Quelle
GFP-Palladin	BH28	pEGFP-C1	Kanamycin	S. Born
DsRed-Vinculin	BH325	DsRed-Monomer-C1	Kanamycin	S. Born
DsRed-alpha-Actinin	BH328	DsRed-Monomer-N1	Kanamycin	S. Born
FN-AP-YFP	BH17	pMTX1	Ampicillin	T. Ohashi
GFP-Vinculin	BH20	pGZ21	Ampicillin	B. Geiger
GFP-alpha-Actinin	BH31	pEGFP-N1	Kanamycin	C. Otey
YFP-MLC	BH393	pEGFP-C1	Kanamycin	P. Lappalainen
GFP-Aktin	BH44	pEGFP-C1	Kanamycin	BD Bioscience
GFP-VASP	BH24	pEGFP-C1	Kanamycin	J. Wehland
GFP-Fascin	BH384	pEGFP-C1	Kanamycin	J. C. Adams

Tabelle 1: Plasmide

Für die liposomale Transfektion von Keratinozyten wurde das Transfektionsreagenz TransIT (Mirus, Madison, USA) verwendet. Je Glasbodenschale wurden 50 μ l KGM mit 3 μ l TransIT gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Für Doppeltransfektionen wurden 5 μ l TransIT verwendet. Danach wurden 2 μ g je Plasmid dazugegeben. Nach weiteren 15 min wurde die Lösung zu den Zellen pipettiert und über Nacht unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Transfektionslösung gegen frisches KGM ersetzt. Die Transfektion erfolgte immer einen Tag nach Aussaat der Zellen. Die Zellen wurden ein bis zwei Tage nach einer Transfektion mikroskopisch untersucht.

Für einige FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)-Experimente wurde die Transfektion mittels Fugene6 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) durchgeführt. Dazu wurde das KGM zuvor gegen 1 ml KBM ersetzt. Je Schale wurde ein Ansatz aus 200 μ l KBM, 6 μ l Fugene6 und 2 μ g DNA in einem Glasgefäß für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz auf die Zellen aufgetropft. Nach 2,5 h wurde das Medium erneut gegen KGM ausgetauscht. Die Beobachtung der Zellen fand am darauffolgenden Tag statt.

Die Plasmide wurden von Simone Born in den *E. coli*-Stamm *DH5 α* eingebracht. Zur Vermehrung der Bakterien wurden 25 ml LB-Medium (*Lysogeny Broth*) mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm angeimpft. Das LB-Medium wurde zuvor autoklaviert und mit Antibiotikum (Kanamycin oder Ampicillin, Verdünnung 1:1000) versetzt (siehe Tabelle 1). Die

Bakterienanzucht erfolgte über Nacht bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator. Am nächsten Tag wurde die Plasmid-Isolation durchgeführt. Dazu wurde ein Isolations-Kit der Firma Qiagen (*Midi Plasmid Purification Kit*) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die so gewonnene und aufkonzentrierte Plasmid-DNA wurde in EB-Puffer (*Elution Buffer*, 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt (NanoDrop, Peqlab, Erlangen).

2.2.2 Immunfluoreszenz

Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen an Keratinozyten in Glasbodenschalen, auf Silikon-Substraten sowie auf runden Deckgläsern durchgeführt. Für alle Färbungen wurden die Substrate mit humanem FN oder Gelatine beschichtet. Die Färbungen wurden immer innerhalb von 1-2 Tagen nach der Aussaat durchgeführt. Vor jeder Fixierung wurden die Zellen mit EGF stimuliert (siehe Abschnitt 2.1.2).

primäre Antikörper	Klon	Herkunft	Verdünnung	Quelle
Vinculin	hVIN-1	Maus, monoklonal	1:200	Sigma
Paxillin	5H11	Maus, monoklonal	1:50	Biosource
Phospho-Paxillin (p-Tyr 31)	Tyr31	Ziege, monoklonal	1:50	Santa Cruz
Fascin	55K2	Maus, monoklonal	1:200	Chemicon
Myosin IIa	M8064	Hase, monoklonal	1:200	Sigma
zelluläres Fibronectin	FN-3E2	Maus, monoklonal	1:200	Sigma

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Keratinozyten wurden mittels 3,7% Formaldehyd verdünnt in CB-Puffer (*Cytoskeleton Buffer*, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM Glukose und 10 mM 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure in H₂O, pH 6,1 [113]) für 30 min bei 37°C und 5% CO₂-Begasung fixiert. Für die Fascin-Färbung wurde die Fixierung mit einer 1:1 Mischung aus Methanol und Aceton bei -20°C durchgeführt. Anschließend wurde überschüssiges Formaldehyd mit 30 mM Glycin in CB gewaschen und die Zellmembran mit 0,2% Triton X-100 in 1x CB permeabilisiert. Für die Färbungen von extrazellulärem FN wurde keine Permeabilisierung durchgeführt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurde mit 5% fettfreiem Milchpulver in 1x CB für 60 min bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Diese Block-Lösung wurde ebenfalls als Lösungsmittel für die Antikörper und die nachfolgenden Wasch-Schritte verwendet. Der erste Antikörper wurde bei 37°C für mindestens 45 min inkubiert (siehe Tabelle 2). Danach wurden die Proben mit 0,2% Tween-20 dreimal für 5 min gewaschen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erneut bei 37°C für 45 min. Die Phalloidin-Färbungen wurden zusammen mit dem zweiten Antikörper durchgeführt. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind in Tabelle 3 zu finden. Abschließend wurden überschüssige Antikörperreste mit 0,2% Tween-20 gewaschen. Zur Konservierung wurden die Proben in Gel Mount (Biomedica, Foster City, USA) mit

0.1% 1,4-Diazabicyklooktan (Sigma) eingebettet. Dazu wurden die Proben zuvor mit destilliertem Wasser gespült, um Milchpulverreste und Salze wegzuwaschen. Die so präparierten Proben konnten nun mikroskopiert werden und wurden anschließend bei 4°C gelagert. Die Proben, die mit einem TIRF-Mikroskop (siehe 2.4.1) analysiert wurden, wurden erst nach der Bildaufnahme eingedeckelt.

sekundäre Antikörper/Phalloidin	Herkunft	Verdünnung	Quelle
Cy2 anti-Maus	Ziege	1:200	Dianova
Cy3 anti-Maus	Ziege	1:60 - 1:200	Dianova
Cy2 anti-Hase	Ziege	1:200	Dianova
Alexa Fluor488 anti-Ziege	Esel	1:50	Invitrogen
Phalloidin Alexa Fluor488	-	1:200	Molecular Probes
Phalloidin Alexa Fluor546	-	1:200	Molecular Probes

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

2.3 Präparation elastischer Silikon-Substrate

Adhärente Zellen stehen in ständigem Kontakt mit ihrer Umgebung. Dabei nehmen sie Signale über die Beschaffenheit ihrer Umwelt wahr. Besonders wichtig sind dafür die Verbindungen zu ihrer Oberfläche. Über diese erhalten sie Informationen über die Topographie oder die Steifigkeit des Substrats. Diese Signale sind besonders essentiell und können die Transkription von Genen oder die Zelldifferenzierung steuern [21, 50]. Elastische Silikon-Substrate stellen ein ideales System dar, Zellen unter naturnahen Bedingungen zu untersuchen. Außerdem bieten sie zusätzlich die Möglichkeit zelluläre Kräfte zu messen [36, 6]. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit Silikon-Substrate aus kreuzvernetztem PDMS (**Polydimethylsiloxan**) mit eingebetteten fluoreszierenden Kugeln hergestellt. Außerdem wurden die elastischen Substrate zusätzlich dazu verwendet, die filopodiale Adhäsion zu testen. Im Folgenden wird die Herstellung sowie die Kalibrierung dieser Substrate beschrieben.

2.3.1 Kreuzvernetztes PDMS

Kreuzvernetztes PDMS ist ein elastischer Silikonkautschuk und wird aus zwei Komponenten hergestellt (Sylgard 184, Dow Corning GmbH, Wiesbaden). Es besteht zum einen aus der vinyl-terminierten Grundsubstanz und aus dem Quervernetzer Methylhydroxiloxan-Dimethylsiloxan (siehe Abb. 2.1). Die Quervernetzungsreaktion ist in Abb. 2.1 gezeigt. Diese findet bei 60°C statt und wird mittels eines Platin-Katalysators beschleunigt. Über das Mischungsverhältnis von Grundsubstanz und Quervernetzer kann man die Elastizität des Silikonkautschuks

variieren. Vernetztes PDMS ist transparent und bio-kompatibel, sodass es für mikroskopische Lebendzelluntersuchungen besonders gut geeignet ist.

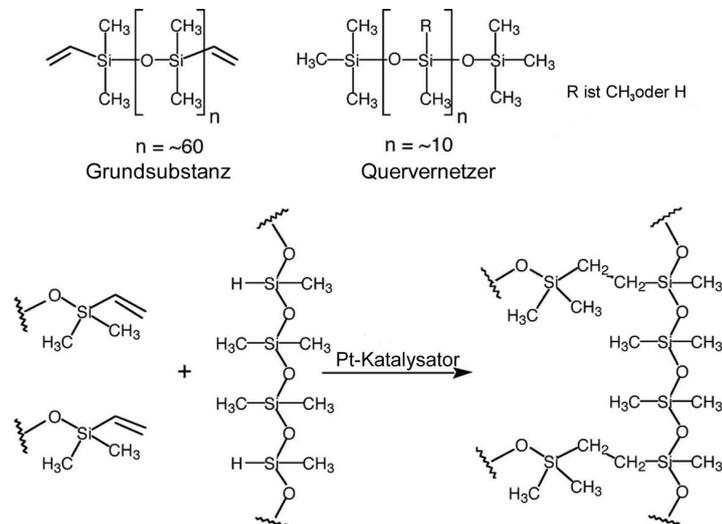


Abbildung 2.1: **Quervernetzungsreaktion** - Unvernetztes PDMS ist ein Gemisch aus Grundsubstanz und Quervernetzer. Die Kreuzvernetzungsreaktion wird mittels eines Platin (Pt)-Katalysators aktiviert. Bildquelle: Universität Wisconsin-Madison: *materials research science and engineering center* (Beschriftung verändert).

2.3.2 Kalibrierung

Um über die Oberflächenverformung des Substrats Zellkräfte berechnen zu können, müssen die elastischen Eigenschaften der Silikon-Substrate charakterisiert werden. Für die Berechnung der Zellkräfte sind zwei Parameter von besonderer Wichtigkeit. Zum einen ist dies die Poissonzahl (ν). Sie gibt an, um welchen Bruchteil der Elongation in Kraftrichtung ein Material in der Richtung senkrecht dazu schrumpft. Und zum anderen ist dies der Young-Modul (E), mit dem man die Steifigkeit eines Materials angibt. Die genaue Definition dieser Parameter basiert auf der Elastizitätslehre und ist im Taschenbuch der Physik [116] näher beschrieben. Für kreuzvernetztes PDMS beträgt die Poissonzahl 0,5. Dies bedeutet, dass kreuzvernetztes PDMS inkompressibel ist. Der Young-Modul sowie die Poissonzahl müssen für jedes Mischungsverhältnis und für jede Charge des Sylgards bestimmt werden. Diese Kalibrierungsmessungen wurden von Nico Hampe für ausgehärtete PDMS-Substrate mit verschiedenen Mischungsverhältnissen nach dem Protokoll von Claudia Cesa [12] durchgeführt. Dazu wurden Silikon-Zylinder aus unterschiedlichen Mischungsverhältnissen in einer Agarose-Form gegossen. Diese Zylinder wurden mit gemörserter Agarose bestreut und in die Messapparatur eingespannt (siehe Abb. 2.2). Nun wurden die Zylinder um eine definierte Länge gezogen, die man anhand der Verfolgung der Agarosekörner berechnen konnte. Die Kraft, die für eine bestimmte Verlängerung benötigt wurde, wurde mit einer Waage gemes-

sen. Außerdem wurde zusätzlich die Änderung des Durchmessers während der Streckung verfolgt. Aus diesen Parametern ließen sich mittels der Formeln in Abbildung 2.2 der Young-Modul (E) sowie die Poissonzahl (ν) berechnen. Dies ergab für ein Mischungsverhältnis von 55:1 bei den hier verwendeten Sylgard-Chargen einen Young-Modul von 8, 9 bzw 11 kPa.

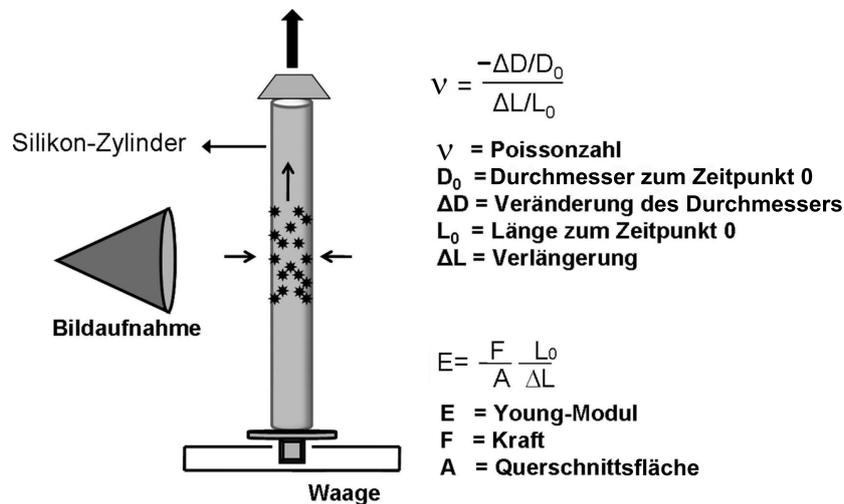


Abbildung 2.2: **Silikon-Kalibrierung** - Zur Bestimmung des Young-Moduls E und der Poissonzahl ν wird ein Silikon-Zylinder mit der Länge L_0 und einer Dicke D_0 um eine definierte Strecke ΔL verlängert. Die dafür nötige Kraft F wird mit einer Waage gemessen. Eine Veränderung des Durchmessers $-D$, sowie der Radius des Zylinders kann mittels Bildaufnahme gemessen werden. Verändert nach Nico Hampe.

2.3.3 Herstellung der Silikon-Substrate mit/ohne fluoreszenten Kugeln

Die Herstellung der Substrate erfolgte gemäß des Protokolls von Claudia Cesa [12, 71]. Kreuzvernetztes PDMS (Sylgard 184) wurde in einem Mischungsverhältnis von 55:1 (Massenverhältnis: Grundsubstanz zu Quervernetzter) hergestellt. Um die Deformation des Substrats mittels Fluoreszenzmikroskopie messen zu können, wurden fluoreszente Kugeln in das Substrat eingegossen. Dazu wurden $25 \mu\text{l}$ der rot fluoreszierenden Mikrokugeln ($0,2 \mu\text{m}$ Durchmesser, Crimson-FluoSpheres, Invitrogen) durch Zentrifugation sedimentiert und in $350 \mu\text{l}$ noch unvernetztes PDMS-Gemisch eingerührt. Diese Kugel/PDMS-Mischung wurde auf einen silanisierten Silizium-Wafer aufgetragen. Die Silanisierung erfolgte durch Inkubation der Wafer zusammen mit wenigen Tropfen Trichloro(1H,1H,2H,2H-Perfluorooctyl)-Silan (Sigma) unter Vakuum im Exsikkator für 15 min. Nach Auftragen der Kugel/PDMS-Mischung wurde diese Schicht durch Abwischen mit einem fussselfreiem Tuch auf eine Dicke von ungefähr $0,5 \mu\text{m}$ reduziert. So wurde gewährleistet, dass die fluoreszenten Kugeln in einer Ebene an der Oberfläche der Substrate lagen. Dies ist eine essentielle Voraussetzung für eine korrekte Kraftberechnung. Die hier verwendeten Wafer wurden von Nico Hampe nach dem Protokoll von Claudia Cesa [12] hergestellt. Sie besaßen eine regelmäßige, quadratische

Gitterstruktur mit im Durchmesser $2\ \mu\text{m}$ großen Erhebungen (Höhe: 300 und 500 nm), die mit einer Gitterkonstante von $3,5\ \mu\text{m}$ angeordnet waren. Auf die dünne Kugel/PDMS-Schicht auf dem Wafer wurde eine weitere Schicht unvernetztes PDMS-Gemisch ohne fluoreszente Kugeln aufgetragen. Um die Dicke dieser Schicht erneut zu definieren, wurden Abstandhalter aus $80\ \mu\text{m}$ dicken Deckgläsern (Menzel GmbH) hergestellt und auf zwei Seiten der Wafer platziert (siehe Abb. 2.3 A). Darüber wurden ein Deckglas (Dicke: $80\ \mu\text{m}$, Menzel GmbH) und ein zugeschnittener Objektträger zur Stabilisierung gelegt und an beiden Seiten mit je einer Klammer fixiert. Zum Aushärten des Elastomers wurde der gesamte *Sandwich*-Aufbau über Nacht bei 60°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die fertigen Substrate mittels Isopropanol von den silanisierten Wafern gelöst und mit 5:1 PDMS-Gemisch unter die vorgebohrten Lochboden-Schalen geklebt (siehe Abb. 2.3 B). Nach 20 min bei 60°C waren die Substrate fest eingeklebt und wurden bis zur Verwendung mit 1x PBS gefüllt bei 4°C gelagert.

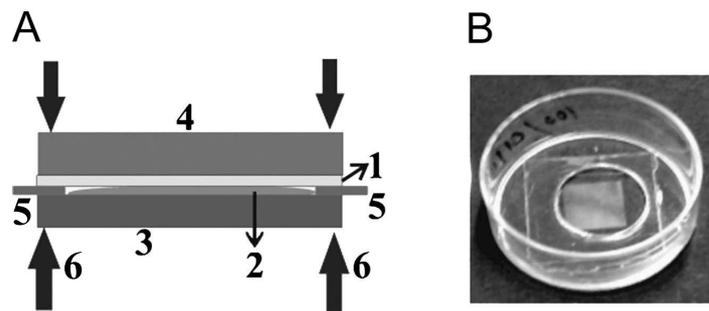


Abbildung 2.3: **Herstellung der elastischen Silikon-Substrate** - (A) zeigt den *Sandwich*-Aufbau zur Herstellung der Elastomer-Substrate: Ein Deckglas (1) wurde auf das unvernetzte PDMS-Gemisch (2) gelegt. Dieses wurde zuvor auf einen Silizium-Wafer (3) pipettiert. Zwei Abstandshalter (5) definieren die Schichtdicke des Silikons. Mittels eines Objektträgers (4) und einer Klammer (6) auf jeder Seite wurde der Aufbau stabilisiert. (B) Die fertigen Silikon-Substrate wurden von unten in selbstgebohrte Lochschalen geklebt. Abbildung aus Cesa et al., 2007 [12].

Zur Herstellung von elastischen Silikon-Substraten ohne fluoreszente Kugeln wurden silanisierter Silizium-Wafer ohne Mikrostruktur verwendet. Hier erfolgte die Herstellung ähnlich wie oben beschrieben. Die ersten Schritte, die der Anfertigung der Elastomer-Schicht mit fluoreszenten Kugeln dienen, wurden hier weggelassen, sodass direkt unvernetztes PDMS im Verhältnis 55:1 (Grundsubstanz zu Quervernetzer) auf die Wafer aufgetragen wurde. Nach dem Aushärten wurden die fertigen, abgelösten Substrate über Nacht in Isopropanol gelegt, um störende, lichtbrechende Einschlüsse im Elastomer herauszuwaschen. Nach dieser Behandlung besaßen die Substrate einen Young-Modul von 28 kPa.

2.4 Mikroskopie

2.4.1 *Total Internal Reflection Fluorescence* Mikroskopie (TIRF)

TIRF Mikroskopie beruht auf dem Prinzip der Totalreflexion. Totalreflexion tritt an Grenzflächen von einem optisch dichteren und einem optisch dünneren Medium auf. Dabei trifft der Lichtstrahl in einem bestimmten Winkel auf die Oberfläche der Probe. Dieser Winkel muss größer sein als der kritische Winkel, der bei einem Übergang von Glas ($n=1,52$) zu Wasser ($n=1,33$) 61° beträgt. Die Totalreflexion löst eine evaneszente Welle aus. Die Amplitude dieser Welle klingt exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche ab, sodass nur Fluorophore in einer Schichtdicke von etwa 200 nm über der Probenoberfläche angeregt werden. Somit erhält man einen optischen Schnitt von 100-200 nm Dicke. Diese Art der selektiven Anregung gewährleistet ein optimales Signal zu Rausch Verhältnis, da Fluorophore, die mehr als ca 150 nm ausserhalb der Grenzfläche liegen, nicht angeregt werden.

Um den Einfluss von Filopodien auf die Form und Stabilität von Fokaladhäsionen zu untersuchen, wurden GFP-Vinculin transfizierte Zellen während der Migration mittels eines TIRF Mikroskops (Observer.Z1, Carl Zeiss, MikroImaging, Jena) unter Zellkulturbedingungen analysiert. Bildsequenzen wurden über einen Zeitraum von 30 min im TIRF Modus gleichzeitig mit DIC (*Differential Interference Contrast*) aufgenommen. Dafür wurde ein 100x/1,46 DIC α -Plan Achromat Öl Objektiv (Zeiss), eine CCD-Kamera (AxioCam MRm, Zeiss) und ein TIRF-Schieber (Zeiss), der den TIRF-Laser in den Strahlengang des Mikroskops einkoppelt, verwendet. TIRF wurde mit der 488 nm Laserlinie eines Argonionen-Lasers angeregt. Für die Aufnahme von Immunfluoreszenzmarkierungen wurde zusätzlich eine Fluoreszenzlampe (Xenon, HXP 120, Zeiss) mit einem 43HE Cy3 Filter (Zeiss) zur Abbildung der roten Fluoreszenz verwendet.

2.4.2 *Konfokales Laser Scanning* Mikroskop (LSM)

Konfokale Laser *Scanning* Mikroskopie bietet den großen Vorteil Objekte mit hoher Auflösung in Z-Richtung abbilden zu können [76]. Dazu dient eine konfokale Lochblende, die das emittierte Licht aus anderen Ebenen der Probe größtenteils ausblendet. Zur Bildgebung wird ein Lichtstrahl mit bestimmter Anregungswellenlänge auf einen dichroitischen Spiegel gelenkt, der das Anregungslicht wiederum auf den Ablenk-Spiegel lenkt. Ein dichroitischer Spiegel ist so konstruiert, dass er Anregungslicht mit bestimmter Wellenlänge reflektiert und emittiertes, langwelligeres Licht der Probe transmittiert. Der Ablenk-Spiegel lenkt das Anregungslicht auf die Probe und rastert diese punktförmig ab. Das emittierte, langwelligere Licht passiert den dichroitischen Spiegel, einen Lang- oder Bandpassfilter sowie die konfokale Lochblende und trifft anschließend auf den Detektor. Der Detektor besteht aus einem Photonenvervielfältiger. Hier wird das emittierte Licht in elektrische Spannung umgewandelt und dadurch verstärkt. Diese Informationen werden anschließend mittels eines bestimmten Programms in ein Bild zusammengesetzt.

In dieser Arbeit wurden das LSM510 (Zeiss) sowie das LSM710 (Zeiss) verwendet. Alle Bildaufnahmen aus Abschnitt 3.1. außer die Sequenzen zur Migrationsanalyse (siehe Abschnitt 2.5.3), sowie die FRAP-Experimente und die Deformationskontrollen (siehe Abschnitt 2.5.9) wurden am LSM510 durchgeführt. Für die Aufnahmen der Zeitserien und der Immunfluoreszenzbilder wurden ein 40x/1,3 Ph3 Plan-Neofluar oder ein 63x/1,2 Ph3 Antiflex Öl Objektiv verwendet. Die Experimente an lebenden Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Die 488 nm Laserlinie des Argonionen-Lasers und der 505-530 nm Bandpassfilter wurden für die Abbildung von GFP und Alexa Fluor488-markierten Antikörpern verwendet. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzen mit Cy3-markierten Antikörpern und der fluoreszenten Kugeln wurden mit der 543 nm Helium/Neon Laserlinie sowie mit einem 560 nm Langpassfilter durchgeführt.

Für die Aufnahmen zur pPaxillin/Paxillin (siehe Abschnitt 2.5.5) Verhältnisbestimmung wurden alle Einstellungen wie z.B. Zoom und Laserleistung gleich gehalten. Die genauen FRAP-Einstellungen sind im Abschnitt 2.4.5 beschrieben.

Für die Bildaufnahmen aus den Abschnitten 3.2.3 - 3.2.6, 3.3.3, 3.3.6 und für die Abbildung 3.23 und 3.29 B wurde das LSM710 verwendet. Dazu wurde das Mikroskop mit einem 63x/1,4 Ph3 Plan Apochromat Öl Objektiv (Zeiss) oder einem 40x/1,3 Ph3 EC Plan-Neofluar (Zeiss) ausgestattet. Alle Zeitserien sowie die Aktinfluss-Messungen (Abschnitt 3.2.6) wurden unter Zellkulturbedingungen durchgeführt. GFP (Absorption: 488 nm/Emission: 509 nm), Alexa Fluor488 (495 nm/519 nm), Phasenkontrast und Reflexion wurden mittels der 488 nm Laserlinie des Argonionen-Lasers angeregt. Die Filterbereiche der Bandpass- sowie Langpassfilter können am LSM710 manuell eingestellt werden. Daher wurden anhand der Absorption/Emission-Maxima der einzelnen Farbstoffe geeignete Mehrkanal-Filter-Einstellungen gewählt. Der Bandpassfilter wurde auf einen Bereich zwischen 490-530 nm eingestellt. DsRed (558 nm/583 nm), Cy3-markierte Antikörper (550 nm/570 nm) und Alexa Fluor546 (556 nm/573 nm) wurden mit der Laserlinie 543 nm des Helium/Neon-Lasers angeregt. Die Emission wurde unter Verwendung eines Langpassfilters ab 546 nm aufgenommen. Das *mosaix-Tool* des LSM-Programms (siehe 2.4.3) wurde für die Aufnahmen zur Analyse der Migrationsspur in Abschnitt 3.3.4 verwendet.

Für die Aufnahmen der ECM-Analyse (siehe Abschnitt 2.5.10) wurden alle Einstellungen gleich gehalten. Die Bleichstreifen zur Messung des retrograden Aktinfluss wurden mit dem LSM-Programm (V.5.0SP1.1, Zeiss) gesetzt und bei 100% Laserleistung der 488 nm Laserlinie des Argonionen-Lasers mit zehn Wiederholungen (40 μ s pro Pixel) gebleicht. Das Avalanche Photodiode System wurde zur Aufnahme der Bilder in Abbildungen 3.10, 3.11 A und C, 3.12 B (nur der rote Kanal) verwendet.

2.4.3 Automatisiertes Fluoreszenz-Mikroskop (Cell Observer)

Das Cell Observer System (Zeiss) ist ein automatisiertes, inverses Fluoreszenzmikroskop. Reflektorrevolver, Fokuspositionen und Durchlicht- oder Fluoreszenzlampe sind über das Programm Axiovision (Zeiss) ansteuerbar. Dadurch ist es möglich Bildserien mit definierter Fre-

quenz als Mehrkanal-Aufnahmen mit einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop aufzunehmen. Außerdem bietet das Programm durch den ansteuerbaren Probenstisch zusätzlich die Möglichkeit sogenannte *mosaix*-Bilder und -Zeitreihen aufzunehmen. Dabei wird das Beobachtungsfeld erweitert, indem durch genaues Verfahren des Probenstichs ein Übersichtsbild aus mehreren Einzelbildern zusammengestellt wird. Diese Anwendungsmöglichkeiten wurden in dieser Arbeit genutzt, um das Migrationsverhalten von Keratinozyten zu charakterisieren.

Die Phasenkontrast-Aufnahmen zur Migrationsanalyse (siehe Abschnitt 3.1.4) wurden mit dem *mosaix-Tool* unter Verwendung des EC Plan-Neofluar 10x/0,30 Ph1 Objektiv (Zeiss) durchgeführt. Für diese Aufnahmen wurden eine EM CCD Kamera (model C9100-02, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) oder eine CCD Kamera (Zeiss, AxioCam MRm) verwendet.

Für die Zellkraftanalysen (siehe Abschnitt 3.2.7) wurden Zeitserien in Phasenkontrast gleichzeitig mit roter und grüner Fluoreszenz von GFP-transfizierten, migrierenden Keratinozyten mit einer CCD Kamera (Zeiss, AxioCam MRm) aufgenommen. Dazu wurden ein 40x/1,3 Ph3 Plan Neofluar Öl Objektiv (Zeiss) und die Filtersätze 43HE und 38HE (Zeiss) verwendet.

Die Aufnahmen zur flächigen Kraftschätzung (Abschnitt 3.3), die Immunfluoreszenzaufnahmen in Abbildung 3.29 A und die Zeitserie in Abbildung 3.22 wurden mit den gleichen Mikroskopeinstellungen, wie zuvor für die Zeitserien zur Zellkraftanalyse migrierender Zellen beschrieben wurde, durchgeführt. Nur wurde hier eine EM CCD Kamera (model C9100-02, Hamamatsu Photonics) verwendet.

Die Analyse der Migrationsspur GFP-transfizierter Zellen (Abb. 3.22) wurde mittels des *mosaix-Tools* unter Verwendung eines EC Plan Neofluar 63x/1,25 Ph3 Öl Antiflex Objektivs (Zeiss) durchgeführt. Auch hier wurde der Filtersatz 38HE (Zeiss) verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mittels einer EM CCD Kamera (model C9100-02, Hamamatsu Photonics).

2.4.4 Reflexionsmikroskopie

Mittels der Reflexionsmikroskopie kann man Höhenprofile eines Objekts rekonstruieren. Dabei treffen Lichtstrahlen auf verschiedene Grenzflächen (z.B. Glas und Medium oder Glas und Zelle) und werden aufgrund unterschiedlicher Brechungsindices abgelenkt und zum Teil in unterschiedlichen Höhen über dem Substrat reflektiert. Jeder reflektierte Strahl schwingt in seiner eigenen Phase. Dies führt aufgrund von Interferenz dazu, dass sich die reflektierten Strahlen in Abhängigkeit ihrer Reflexionshöhe entweder konstruktiv verstärken oder destruktiv auslöschen. Bereiche eines Objekts, die sich nah an der Substratoberfläche befinden, erscheinen dunkel. Die Maxima und Minima sind um eine viertel Wellenlänge voneinander getrennt. Bereiche mit einem viertel Wellenlänge größeren Abstand zur Oberfläche erscheinen daher heller. Dies wird sich bei der Bestimmung von Fokaladhäsionen lebender Zellen zu Nutze gemacht [47, 45]. Dabei erscheinen Adhäsionsstellen als dunkle Bereiche, da hier die Zelle besonders nah mit der Oberfläche verbunden ist [124].

Die Reflexionsaufnahmen in Abschnitt 3.2.6 wurden am LSM710 mit der 488 nm Laserline durchgeführt. Der Bereich des Bandpassfilters wurde von 478 nm-544 nm eingestellt.

2.4.5 *Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP)*

Die FRAP-Experimente wurden nach dem Protokoll von Christoph Möhl [73] am LSM510 durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich die Austauschdynamik und Lateraldiffusionen von Proteinen in einer lebenden Zelle messen. Hier wurde FRAP verwendet um die Austauschkinetik von Proteinen innerhalb einer Adhäsion zu messen [59]. Adhäsionsproteine unterliegen einem ständigen An- und Abbindungsprozess, der je nach Alter der Fokaladhäsion variieren kann. Dieser Prozess ist zum einen abhängig von der Konzentration der gelösten Moleküle sowie von dem Anteil der besetzten Bindungsstellen (n) in einer Adhäsion.

In der vorliegenden Arbeit wurden FRAP-Experimente durchgeführt, um die Austauschdynamik von GFP-Vinculin in Fokaladhäsionen am Leitsaum von Neomycin-behandelten Keratinozyten (siehe Abschnitt 2.1.3) zu bestimmen. Dazu wurden GFP-markierte Proteine innerhalb einzelner Fokaladhäsionen mit einem Laserstrahl ausgebleicht und die Erholung ihrer Fluoreszenzintensität über die Zeit gemessen. Dabei kann die Fluoreszenzerholung durch zwei Prozesse verursacht werden, Diffusion und kinetischer Austausch. Die Diffusion der GFP-markierten Proteine innerhalb des Zytoplasmas stellt einen sehr schnellen Austausch dar. Hingegen ist der kinetische Austausch gebundener Proteine viel langsamer. Hierbei werden die austauschbaren Proteine erneuert, was einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Dieser Austausch ist oft unvollständig, da Adhäsionen immer einen Teil festgebundener Proteine enthalten. Da sich diese beiden Prozesse überlagern, ist es besonders wichtig diese zu trennen, um eine genaue Austauschdynamik bestimmen zu können. Ein weiterer wichtiger Punkt für eine exakte Messung ist die Minimierung des Ausbleichens der Probe durch die Bildaufnahme. Dies wurde zum einen durch eine geringe Laserleistung erreicht, zum anderen wurden bei jeder Messung Referenzadhäsionen aufgenommen, um das Ausbleichen zu quantifizieren und im Nachhinein korrigieren zu können.

Eine solche Austauschdynamik lässt sich mit einem einfachen kinetischen Modell beschreiben:

$$\frac{\partial n(t)}{\partial t} = \kappa_+ c (1 - n(t)) - \kappa_- n(t) \quad (2.1)$$

κ_+ = Anbindungsrate, κ_- = Abbindungsrate, c = Konzentration der gelösten Moleküle, n = Anteil der besetzten Bindungsstellen, $1 - n$ = Anteil der freien Bindungsstellen

Falls die Diffusion im Zytosol viel schneller als der Austausch ist, darf c als Konstante betrachtet werden. Dann hat Gleichung 2.1 folgende Lösung:

$$n(t) = Ae^{-kt} + n_0 \quad (2.2)$$

n_0 ist die stationäre Lösung:

$$n_0 = \frac{\kappa_+ c}{\kappa_+ c + \kappa_-} \quad (2.3)$$

die dem im Gleichgewicht besetzten Anteil der Bindungsstellen entspricht.

Die Lösung 2.2 sagt im Wesentlichen aus, dass jede Abweichung mit der Amplitude A zum Gleichgewichtswert n_0 exponentiell mit der Rate k zerfällt. Eine solche Abweichung wird in der FRAP-Technik durch Photobleichen erzeugt.

k beschreibt die Austauschrate ($\kappa_+ c + \kappa_-$), mit der die Halbwertszeit $t_{1/2}$ wie folgt berechnet wurde:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (2.4)$$

Die gemessene Intensität ist bei Fluoreszenz-markierten Liganden proportional zu $n(t)$ plus einer Hintergrundhelligkeit (z.B. durch die fluoreszierenden, ungebundenen Liganden im Zytoplasma). Wird durch Photobleichen die Intensität I_v (vor dem Bleichen) auf I_B abgesenkt, so wird folgender Intensitätsverlauf nach dem Bleichen gemessen:

$$I(t) = (I_v - I_B)\alpha(1 - e^{-kt}) + I_B \quad (2.5)$$

Für die Messungen wurde das 63x/1,3 Plan Apochromat DIC Öl Objektiv (Zeiss) verwendet. Zum Bleichen sowie für die Bildaufnahme wurde die 488 nm Laserline des Argonionen-Lasers bei 50 % der maximalen Leistung (30 mW) betrieben. Zur Bildgebung wurde die Laserintensität auf 1 % eingestellt. Ein Langpassfilter LP505 wurde zur Aufnahme der Emission verwendet. Der Bildausschnitt wurde auf eine Auflösung von 512x512 Pixel mit 4-facher Vergrößerungsstufe eingestellt. Das Abrastern der Probe erfolgte unidirektional mit einer Geschwindigkeit von 1,6 $\mu\text{s}/\text{Pixel}$. Die Bleichregionen sowie die Referenzadhäsionen wurden mittels dem LSM-Programm (Version 3.2 SP2) definiert und aufgenommen. Das Bleichen erfolgte bei 100 % Laserintensität und mit zehn Wiederholungen.

2.5 Zellanalysen und Auswertung

2.5.1 Aspektverhältnis-Bestimmung

Um das Aspektverhältnis von Fokaladhäsionen im Lamellipodium migrierender (siehe Abschnitt 2.1.2) und Neomycin-behandelter (siehe Abschnitt 2.1.3) Keratinozyten zu bestimmen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen gegen Vinculin ausgewertet. Diese Färbungen sowie die Aufnahme der Bilder am LSM510 wurden von Bodo Borm durchgeführt. Die Messung erfolgte per Hand mittels dem LSM-Programm *Image Browser* (Zeiss).

2.5.2 Untersuchung der Adhäsion von Filopodien

Um zu testen, ob Filopodien an der Oberfläche fest adhären können, wurden Keratinozyten auf gewaschene, elastische Silikon-Substrate ohne fluoreszente Kugeln (Herstellung siehe Abschnitt 2.3.3) ausgesät und mit EGF stimuliert (siehe Abschnitt 2.1.2). Die Bildaufnahmen erfolgten am LSM510. Mittels einer Mikro-Nadel wurde eine externe Deformation des Substrats in unmittelbarer Nähe von Filopodien induziert. Es wurde nachfolgend analysiert, ob Filopodien dieser Deformation folgen oder nicht. Die verwendete Nadel bestand aus Borsilikat-Glas und wurde mit einem Pipetten-Ziehgerät (P-97, Sutter, Novato, USA) hergestellt. Die Nadelspitze besaß einen Durchmesser von ca. $2 \mu\text{m}$. Diese Nadel wurde in einen Mikromanipulator (MHW-3, Narishige, Tokyo, Japan) eingebaut. Dadurch konnte die Spitze genau vor dem Leitsaum neben Filopodien einer einzeln migrierenden Zelle positioniert und eine definierte Deformation des Substrats im 90° -Winkel zur Migrationsrichtung induziert werden. Nach der Deformation wurde die Nadel aus dem Substrat gezogen, sodass das Substrat in die Ausgangsposition zurückkehren konnte.

2.5.3 Migrationsanalyse

Um die Migrationsgeschwindigkeiten von Neomycin-behandelten (siehe Abschnitt 2.1.3) und unbehandelten, EGF stimulierten (siehe Abschnitt 2.1.2) Keratinozyten zu untersuchen, wurden Bildsequenzen von Zellen mit dem *mosaix-Tool* des Cell Observer Systems (siehe Abschnitt 2.4.3) für 2-3 h mit einer Aufnahme Frequenz von 1-3 min aufgenommen. Die Bewegung (μm) einer Zelle pro Zeitschritt (min) wurde mit dem *Point-Tool* des Programms *ImageJ* (Wayne Rasband, U.S. National Institutes of Health) interaktiv bestimmt. Um eine mittlere Geschwindigkeit der Zelle in $\mu\text{m}/\text{min}$ zu ermitteln, wurde die Weglänge durch die Analysendauer geteilt.

2.5.4 Aktinfluss-Messungen

Aktinfluss-Messungen wurden an GFP-Aktin transfizierten (siehe Abschnitt 2.2.1) und EGF-stimulierten Zellen am LSM710 durchgeführt. Dazu wurden Bildsequenzen von GFP-Aktin gleichzeitig mit Phasenkontrast und Reflexion über eine Dauer von 46-240 s aufgenommen.

Um den retrograden Aktinfluss in filopodialen Aktinfilamenten bestimmen zu können, wurden 1-2 μm breite Streifen in GFP-markiertes Aktin im Bereich von Filopodien gebleicht (siehe Abschnitt 2.4.2). Reflexionsbilder wurden verwendet, um stabile Adhäsionen innerhalb der filopodialen Aktinfilamente zu identifizieren. Es wurden nur Aktinfilamente ausgewertet, die deutlich in das Lamellipodium hineinreichten. Zur Berechnung des Aktinflusses wurden die Kanten der Bleichstreifen mittels des *Point-Tools* des Programms *ImageJ* interaktiv verfolgt. Für eine genauere Messung wurden die Bilder für die Auswertung gefiltert. Dazu wurde der Bildhintergrund jedes Bildes mittels eines Mittelwertfilters (Filtergröße mit 30 Pixel Kantenlänge, Pixelgröße: 0,09x0,09 μm) berechnet und vom Originalbild subtrahiert. Dies wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt.

2.5.5 Protein-Verhältnisbestimmung (pPax/Pax)

Zur Bestimmung der Paxillin-Phosphorylierung wurde das Verhältnis von phosphoryliertem Paxillin (pPax) zu Gesamt-Paxillin (Pax) in Fokaladhäsionen innerhalb des Lamellipodiums gemessen. Dafür wurden Doppelfärbungen gegen Pax und pPax von Neomycin-behandelten Keratinozyten und unbehandelten Kontrollzellen am LSM510 in unterschiedlichen Kanälen aufgenommen. Die LSM-Einstellungen wurden für alle Aufnahmen gleich gehalten. Es wurden zunächst die Fokaladhäsionsbereiche im Bild lokalisiert, um die mittlere Fluoreszenz von Pax und pPax für einzelne Fokaladhäsionen zu quantifizieren. Aus dem Verhältnis der beiden Intensitäten ergab sich für jede Fokaladhäsion ein Wert für die mittlere Paxillin-Phosphorylierung. Dieser Wert wurde zur Beschreibung des Phosphorylierungsgrades der Fokaladhäsionen verwendet. Es ist jedoch zu beachten, dass das Fluoreszenzsignal bestenfalls nur proportional zum Phosphorylierungsgrad der FA ist. Zur automatischen Detektion der Fokaladhäsionsbereiche wurde ein Bildsegmentierungsverfahren von Zamir et al. [130] verwendet, welches von Christoph Möhl in Matlab (The Mathworks, Version 7.6, Natick, MA, USA) implementiert wurde. Zur Detektion der Adhäsionen wurden Aufnahmen des Pax-Kanals verwendet. Diese Aufnahmen wurden zuvor mittels eines Hochpass-Filters korrigiert, der die mittlere Intensität innerhalb eines Quadrats (Filtergröße mit 5 μm Kantenlänge) um jeden Pixel herum berechnet und diese vom Originalbild abzieht. Anschließend konnten die Adhäsionen automatisch detektiert werden. Das Verfahren beruht auf dem sogenannten *Water-Algorithmus*. Dieser prüft zunächst die Helligkeit jedes Pixels. Liegt diese unterhalb eines gewählten Schwellenwerts P_{min} , so wird dieser Pixel verworfen. Anschließend werden die Pixel, die über ihre Kanten in Berührung stehen, zu einem Segment zusammengefasst. Nach dieser Segmentierung werden alle Segmente entfernt, deren Fläche kleiner als ein vorher gewählter Flächenschwellenwert A_{min} ist. Für diese Analyse wurde ein Helligkeitsschwellenwert von 8 (auf einer Skala von 0-255) und ein Flächenschwellenwert von 0,35 μm^2 verwendet. In seltenen Fällen wurden zytoplasmatische Bereiche als Adhäsionsstellen fehlmarkiert. Diese wurden anschließend manuell entfernt. Es wurde nun ein Analysebereich innerhalb der Zelle manuell definiert. Für alle Segmente dieses Bereichs wurde das mittlere Verhältnis der Intensitäten von pPax zu Pax bestimmt. Der Analysebereich wurde für diese

Auswertung auf das Lamellipodium begrenzt.

2.5.6 Form- und Stabilitätsanalysen von Fokaladhäsionen

Um die Fläche, das Aspektverhältnis sowie die Lebensdauer von Fokaladhäsionen in Abhängigkeit von Filopodien zu bestimmen, wurden Bildserien von mit GFP-Vinculin transfizierten und gleichzeitig mit EGF-stimulierten Keratinozyten über einen Zeitraum von 30 min mittels TIRF (siehe Abschnitt 2.4.1) aufgenommen. Sequenzen von vier migrierenden Zellen wurden in Form- und Stabilitätsanalysen von Fokaladhäsionen verwendet. Dafür wurden die Bilder wie in Abschnitt 2.5.5 beschrieben gefiltert. Die Filter-Box-Größe betrug hier $2 \mu\text{m}$. Jedoch erfolgte hier die Bildsegmentierung nicht mittels des *Water*-Algorithmus, da diese Berechnung zu zeitaufwendig gewesen wäre. Um die Analyse zu beschleunigen, wurde ein Algorithmus von Christoph Möhl in Matlab implementiert, der im Folgenden kurz erläutert wird. Um das zeitliche Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu korrigieren, wurden zunächst die Helligkeitsverteilungen auf dem Bereich zwischen den 0,02 und 0,98-Quantilen normiert. Anschließend wurden alle Pixel, die über einem Helligkeitsschwellenwert P_{min} (hier: 0,1) lagen, als Fokaladhäsionsbereiche definiert. Um diese Pixel einzelnen Fokaladhäsionen zuordnen zu können, wurde ein von Segewick beschriebener Algorithmus zur Vereinigungssuche verwendet [109], der in der Promotionsarbeit von Christoph Möhl (Abschnitt 2.6.4) ausführlich erläutert ist [72]. Nach der räumlichen und zeitlichen Zusammenfassung wurden Segmente unterhalb eines Flächenschwellenwerts A_{min} von $0,1 \mu\text{m}^2$ entfernt. Um Adhäsionen schon im frühen Stadium ihrer Formation zu finden, wurde A_{min} sehr klein gewählt. Daher wurden manche Bereiche markiert, die außerhalb von Fokaladhäsionen lagen. Diese fehlmarkierten Bereiche wurden manuell entfernt.

So erhielt jede Adhäsion über die Zeit eine eigene Nummer, mit der man die berechneten Werte (Fläche, Aspektverhältnis und Lebensdauer) jeder Adhäsion im Bild zuordnen konnte. Für die folgenden Analysen wurden nur Adhäsionen mit vollständigem Lebenszyklus (vom Entstehungszeitpunkt bis zum Auflösen) verwendet. Fokaladhäsionen, die sich innerhalb von 6 min auflösten, wurden als instabil bezeichnet. Alle Übrigen wurden als stabil klassifiziert. Es wurde nun für jede Adhäsion interaktiv überprüft, ob diese innerhalb des Lamellipodiums oder in Zusammenhang mit einem Filopodium entstanden war, um so Aussagen über stabile und instabile Adhäsionen und über ihren Entstehungsort treffen zu können.

2.5.7 Kraftmessungen migrierender Zellen

Zellkraftmessungen wurden an migrierenden Zellen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden Keratinozyten auf elastischen Silikon-Substraten mit fluoreszierenden Kugeln ausgesät. Da Kräfte pro Fokaladhäsion berechnet werden sollten, wurden die Zellen mit GFP-Vinculin oder GFP-VASP transfiziert, um die Krafteinleitungspunkte für die anschließende Kraftschätzung sichtbar zu machen [107]. Mehrkanal-Bildsequenzen von EGF-stimulierten Zellen wurden mit dem Cell Observer (siehe Abschnitt 2.4.3) unter Zellkulturbedingungen über einen

Zeitspanne von 25 bis 52 min aufgenommen. Mittels der Mehrkanal-Aufnahmen wurden GFP-markierte Fokaladhäsionen, rot-fluoreszierende Kugeln und Zellpositionen im Phasenkontrast gleichzeitig gespeichert. Damit die Sequenzen vom ersten Bild an zur Berechnung der Kraft pro Adhäsion verwendet werden konnten, wurde nach Beendigung der Aufnahme ein Referenzbild erstellt, indem die Substrate mit 20 mM NH_4OH für mindestens 1 h behandelt wurden. Diese Behandlung hatte keine Auswirkungen auf die Silikon-Substrate. Im Referenzbild wirkten keine Zellkräfte auf das Substrat und somit lagen die fluoreszenten Kugeln in ihrer Ausgangsposition vor. Die Kraftschätzung wurde wie zuvor beschrieben [71] durchgeführt. Sie basiert auf Algorithmen von Ulrich Schwarz [107]. Für die Berechnung der Kräfte pro Adhäsion sind neben der Kenntnis der Substratparameter zwei Informationen unbedingt notwendig. Zum einen müssen die Positionen der Krafteinleitungspunkte (Fokaladhäsionen) und zum anderen der Verzug der eingebetteten Kugeln ermittelt werden. Die Positionen der Adhäsionen wurden manuell mit Hilfe des GFP-Kanals bestimmt. Die fluoreszenten Kugeln dienten zur Deformationsbestimmung des Substrats (Abb. 2.4). Hierfür wurde das Referenzbild der fluoreszierenden Kugeln vor die Bildsequenz kopiert. Die laterale Drift wurde aus der Bildsequenz eliminiert, indem für jedes Bild die mittlere Drift in manuell gewählten Bereichen außerhalb des Zelldeformationsfeldes ermittelt und von der Deformation subtrahiert wurde.

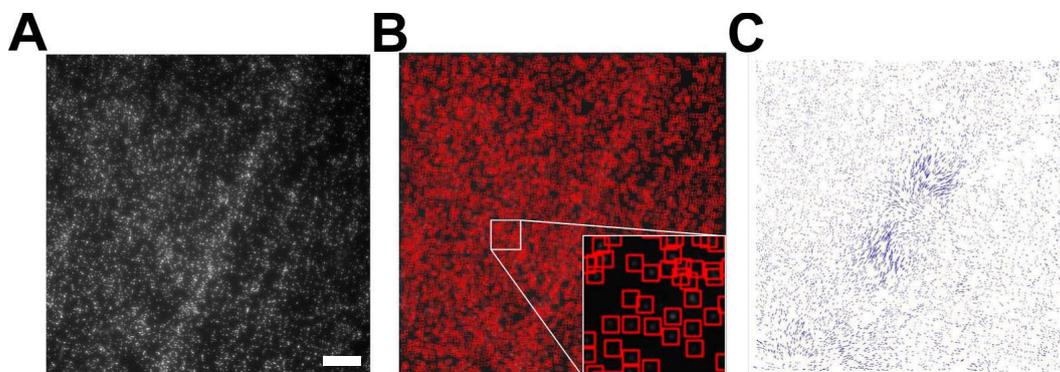


Abbildung 2.4: **Auswertung der Substratdeformation mittels normierter Kreuzkorrelation** - (A) zeigt eine Originalaufnahme der fluoreszenten Kugeln eingebettet in ein elastisches Silikon-Substrat. Die Positionen der fluoreszenten Kugeln wurden mittels Kreuzkorrelation gegen das Referenzbild bestimmt. Maßstabsbalken = 20 μm . (B) Alle gefundenen Kugeln wurden automatisch mit einem roten Kästchen markiert. Kreuzkorrelation ist die Methode, mit der die Kugeln gefunden wurden. (C) Die Verschiebungen der Kugeln ergibt sich aus der Differenz der Kugelpositionen im Bild und im Referenzbild. Die Richtung sowie der Betrag des Verzugs ist mit blauen Pfeilen angedeutet.

Die Kugelpositionen innerhalb des Referenzbildes wurden anhand des Bildausschnitts einer zufällig ausgewählten Kugel über normierte Kreuzkorrelation, ein Ähnlichkeitsmaß zum Vergleich kleiner Bildausschnitte, mit einem minimalen Korrelationskoeffizienten von 0,6 ermittelt (Abb. 2.4 B). Bei vollständiger Übereinstimmung liefert die Kreuzkorrelation einen

Wert von 1. Die Bestimmung der einzelnen Kugelpositionen über die gesamte Bildsequenz erfolgte auch hier über Kreuzkorrelation (Abb. 2.4 C). Diesmal wurde der minimale Korrelationskoeffizient auf 0,8 gesetzt, um eine Fehlbestimmung der Positionen zu minimieren. Für das Ähnlichkeitsmaß wurde eine Schablonengröße von 15 Pixel (Pixelgröße: $0,16 \times 0,16 \mu\text{m}$) verwendet. Bereiche des Verzugfelds, die durch andere Zellen hervorgerufen wurden, wurden für die Kraftberechnung ausgeblendet. Die dazu notwendigen Programme wurden von Norbert Kirchgeßner und Sebastian Houben in einem Matlab-Programm *CellForceAnalysis* zusammengefasst. Zur Kraftberechnung wurde der Ausblenderadius um jede Adhäsion auf $1 \mu\text{m}$ eingestellt. Außerdem wurden folgende Substrateigenschaften zur Kraftberechnung verwendet: Poissonzahl: 0,5 und Young-Modul: 8 oder 11 kPa je nach Kalibrierungsergebnis (siehe Abschnitt 2.3.2) der verwendeten Silikon (Sylgard184) Charge.

2.5.8 Kraftmessungen der Matrix

Adhärente Zellen sekretieren ihre eigene Matrix. Diese Matrix besteht aus den verschiedensten Proteinen, die zum Teil als fibrilläre Strukturen unterhalb der Zelle angelagert werden. Auch migrierende Zellen hinterlassen eine Spur aus ECM-Proteinen. In dieser Arbeit sollte analysiert werden, inwieweit ein Teil der Zellkraft, die die Zelle auf das Substrat ausübt, in der ECM konserviert wird und nach Ablösen der Zellen erhalten bleibt. Es wurde dabei zwischen sessilen und migrierenden Zellen unterschieden. Dafür wurden Keratinozyten auf elastische Silikon-Substrate mit eingebetteten, fluoreszenten Kugeln ausgesät und vor jedem Experiment mit EGF stimuliert. Die Einzelzell-Analysen erfolgten immer nur 1-2 Tage nach dem Aussäen. Um die Zellkraft einer Zelle und die Kraft in ihrer sekretierten ECM unterscheiden zu können, wurde folgendes Protokoll entwickelt:

1. Bildaufnahme der Zelle
2. Zugabe von 1 ml $8 \mu\text{M}$ Cytochalasin B (CytoB) zu 1 ml Medium - Endkonzentration: $4 \mu\text{M}$, 15 min Inkubation
3. Bildaufnahme nach 15 min CytoB
4. Absaugen der Medien, Zugabe 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung, maximal 1 min
5. Wegspülen der Zelle, anschließend sofortige Zugabe von 2 ml TNS
6. Bildaufnahme nach Trypsin
7. Absaugen der Medien, Zugabe 2 ml $20 \text{ mM NH}_4\text{OH} + 0,1 \text{ M NaCl}$, mindestens 40 min Inkubation
8. Bildaufnahme nach NH_4OH (Referenzbild)

Diese Versuche wurden am Cell Observer (Zeiss) bei 37°C durchgeführt. Vor jedem Versuch wurde das KGM-Medium in den Glasbodenschalen auf 1 ml reduziert. Die CytoB-Lösung

(Sigma) wurde in KGM-Medium angesetzt. Das Absaugen sowie das Wegspülen der Zellen erfolgte mittels einer Pasteurpipette ohne die Glasbodenschale zu bewegen. Alle hier verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37°C vorgewärmt.

Es erfolgte zuerst die Bildaufnahme der fluoreszenten Kugeln sowie der Zelle in Phasenkontrast, um die gesamte Zellkraft zunächst bestimmen zu können. Durch die Zugabe von CytoB wurde das kontraktile Aktinnetzwerk der Zelle zerstört, sodass dieses keine Kraft mehr auf das Substrat ausüben konnte. Anschließend wurde ein Bild in Fluoreszenz und Phasenkontrast aufgenommen. Um sicherzugehen, dass der eventuell übrige Verzug nicht doch durch restliche Zytoskelett-Elemente hervorgerufen wurde, wurden die Zellen mittels Trypsin und dem Spülen mit einer Pipette schnell innerhalb von 1 min vom Substrat entfernt. Zur Kontrolle wurde auch hiernach nochmal ein Bild aufgenommen. Abschließend wurden alle ECM-Proteine mit 20 mM NH_4OH + 0,1 M NaCl aufgelöst, sodass man ein Referenzbild komplett ohne Substratdeformationen erhielt. Mittels dieses Bildes wurden alle Deformationen der Zelle vor CytoB, nach CytoB und nach Trypsin berechnet. Diese Berechnungen wurden wie in Abschnitt 2.5.7 bereits beschrieben mittels Kreuzkorrelation durchgeführt. Der minimale Korrelationskoeffizient der Kugelbestimmung von Referenzbild zum Verzugsbild betrug 0,9. Die Schablonengröße wurde auf 41 Pixel (Pixelgröße: 0,19x0,19 μm) eingestellt. Bereiche des Deformationsfeldes, die durch benachbarte Zellen verursacht wurden, wurden für die Berechnung der Kraft ausgeblendet. Da hier zur Ermittlung der Kräfte keine Positionen der Krafteinleitungspunkte zur Verfügung standen, wurde die Kraft mittels flächiger Kraftschätzung nach Sebastian Houben basierend auf [98, 11] durchgeführt. Die dazu notwendigen Algorithmen sowie die Module zur Visualisierung der Kräfte wurden von Sebastian Houben in einem Matlab-Programm *CellForceAnalysis* zusammengefasst. Bei der flächigen Kraftmessung wurden Kraftdichten (Kraft pro Fläche) bestimmt. Dazu wurde ein Raster über die Aufnahmen gelegt und die Kraftdichten innerhalb eines jeden Elements des Gitters berechnet (Abb. 2.5 A). Die Kraftdichten geben die integrierten Kräfte innerhalb eines Gitterelements an, die gleichmäßig auf diesen Bereich wirken. Die Anzahl der Gitterelemente wurde für jede Auswertung angepasst und entsprach ungefähr der Anzahl an gefundenen, fluoreszenten Kugeln im Bild.

Die Fläche der Zellen wurde per Hand mittels der Phasenkontrastaufnahmen markiert. Innerhalb dieser Markierung wurde die Summe aller kontraktile Kräfte der Zelle (im Folgenden nur noch kontraktile Zellkraft genannt) ermittelt. Die für die Berechnung der kontraktile Kraft wesentliche Komponente eines jeden Gitterelements (F_P , Abb. 2.5 B) ergab sich aus der Projektion der Kraftvektoren (\vec{F}_G) auf den Eigenvektor der vom Mittelpunkt des Gitterelements zum Mittelpunkt der Zelle zeigt (schwarzes Kreuz, Abb. 2.5). Die Summe der kontraktile Kraft einer Zelle berechnete sich aus der Addition der Beträge der Kraftprojektionen (F_P) innerhalb der Zellmarkierung. Zur Kraftschätzung wurde die Poissonzahl von 0,5 und ein Young-Modul von 8 bzw. 9 kPa je nach verwendeter Charge des Silikons eingestellt.

Für jedes Experiment wurde ein Schwellenwert, der das Rauschen der Messung angibt, berechnet. Dies wurde für jedes einzelne Experiment durchgeführt, da die Genauigkeit der

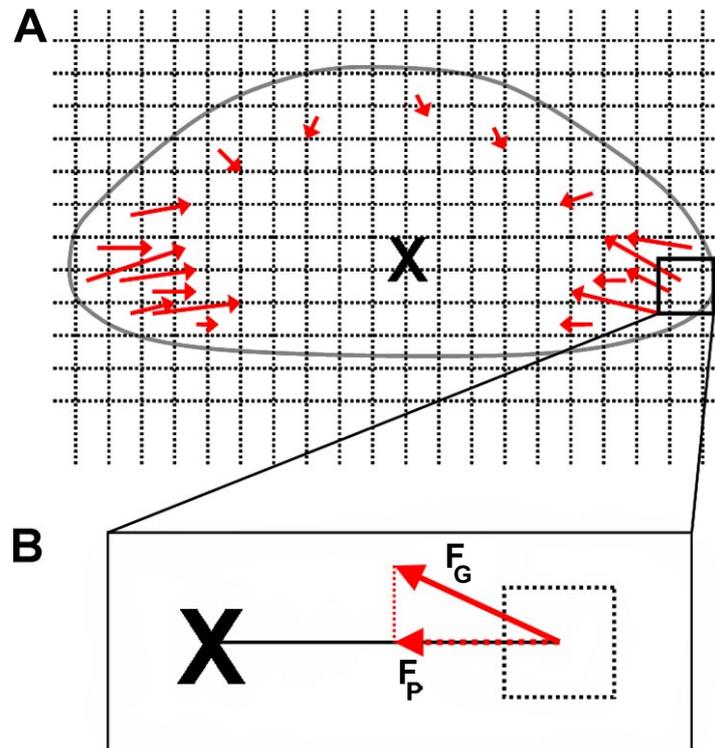


Abbildung 2.5: **Flächige Kraftauswertung und Berechnung der kontraktilen Gesamtkraft** - (A) Bei der flächigen Kraftauswertung wurden Kraftdichten für jedes Gitterelement berechnet. Der Zellrand (grau) wurde manuell bestimmt. Der Schwerpunkt der Zellfläche ist mit einem schwarzen Kreuz markiert. Die roten Kraftvektoren wurden nur beispielhaft in die Zelle als Gesamtkraft für einige Gitterelemente eingezeichnet. In (B) ist die Berechnung der kontraktilen Kraft für einen Kraftvektor innerhalb eines Gitterelements exemplarisch gezeigt. Dafür wurde der Kraftvektor \vec{F}_G auf die Strecke zwischen Schwerpunkt der Zelle und Mittelpunkt des Gitterelements projiziert und man erhielt F_P . Die Summe der Beträge von F_P innerhalb der Zellmarkierung ergab die kontraktilen Gesamtkraft.

Messungen stark von der Güte der Aufnahmen abhing. Eine leichte Fokusveränderung, z.B. durch das Wegspülen der Zellen, kann die Berechnung stark beeinflussen. Zur Ermittlung des Schwellenwerts wurde die Markierung des Zellrands auf einen Bereich ohne signifikante Deformation verschoben, um dort die kontraktile Kraft, die alleine durch experimentelles Rauschen entsteht, zu berechnen. Dieser Wert wurde als Schwellenwert verwendet. Alle Messungen, die diesen Wert nicht überschritten, wurden als 0 nN gewertet. Aber auch Messungen, deren Differenz kleiner oder gleich dem Schwellenwert waren (z.B. nach CytoB und nach Trypsin), wurden im Rahmen der Messungenauigkeit als gleich angenommen. Der Schwellenwert schwankte je nach Messung zwischen 0,01 und 4,8 nN. Im Mittel bedeutet das eine Ungenauigkeit der Messungen von 3,5%.

2.5.9 Kontrollexperimente zur Matrix-Analyse

Das Aktinzytoskelett wurde mittels CytoB-Behandlung zerstört, damit die kontraktile Kräfte innerhalb der ECM analysiert werden konnten. Dazu wurden die Proben für 15 min mit 4 μM CytoB inkubiert. Anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen Aktin und Vinculin angefertigt, um sicherzustellen, dass diese Behandlung alle Strukturen zur Krafterzeugung und Übertragung innerhalb der Zelle effektiv zerstörte.

Die Analysen zur Bestimmung konservierter Kräfte innerhalb der ECM wurden auf elastischen Silikon-Substraten durchgeführt. Um auszuschließen, dass der gemessene Verzug innerhalb der ECM nur auf einen viskoelastischen Effekt des Materials zurückzuführen war, wurde ein Kontrollexperiment angefertigt. Dies wurde anhand eines Silikon-Substrats mit fluoreszenten Kugeln mit der Elastizität von 9 kPa und einer Mikro-Nadel (siehe Abschnitt 2.5.2) getestet, mit der eine externe Deformation auf dem Substrat induziert wurde. Die Mikro-Nadel wurde in einen Mikromanipulator (MHW-3, Narishige, Tokyo, Japan) eingeschraubt und über dem Substrat positioniert. Die Aufnahmen wurden am LSM510 im Phasenkontrast und in Fluoreszenz mit einer Bildfrequenz von 16 s aufgenommen. Die Aufnahme wurde gestartet und die Mikro-Nadel auf dem Substrat aufgesetzt ohne dieses zu beschädigen. Danach wurde die Nadel um ca. 5 μm für 5 Bildaufnahmen verschoben. Anschließend wurde die Nadel schnell aus dem Substrat herausgezogen und die Relaxation des Substrats über einen Zeitraum von ca. 6 min beobachtet. Die Aufnahmen wurden wie in Abschnitt 2.5.7 beschrieben mit normierter Kreuzkorrelation (minimaler Korrelationskoeffizient: 0,8 und Schablonengröße: 41 Pixel, Pixelgröße: 0,14x0,14 μm) ausgewertet. Die Verschiebungen der Kugeln wurden gegen das erste Bild der Sequenz als Referenz ermittelt. Das Aufsetzen der Nadel auf dem Substrat verursachte bereits in einem bestimmten Bereich um die Nadel herum Verschiebungen, bevor die externe Deformation eingeleitet wurde. Dieser Bereich wurde ausgeblendet, um die Bestimmung der mittleren Verschiebungen innerhalb eines Bildes nicht zu verfälschen. Die mittleren Verschiebungen der Kugeln ($n = 2542$) in jedem Bild wurden dann mittels des Programms *Excel* berechnet und über die Zeit aufgetragen. Des Weiteren musste überprüft werden, ob die ECM-Sekretion auf elastischen Substraten mit einer Steifigkeit von 8-9 kPa im Vergleich zu Glasoberflächen verändert ist, denn frühere Untersu-

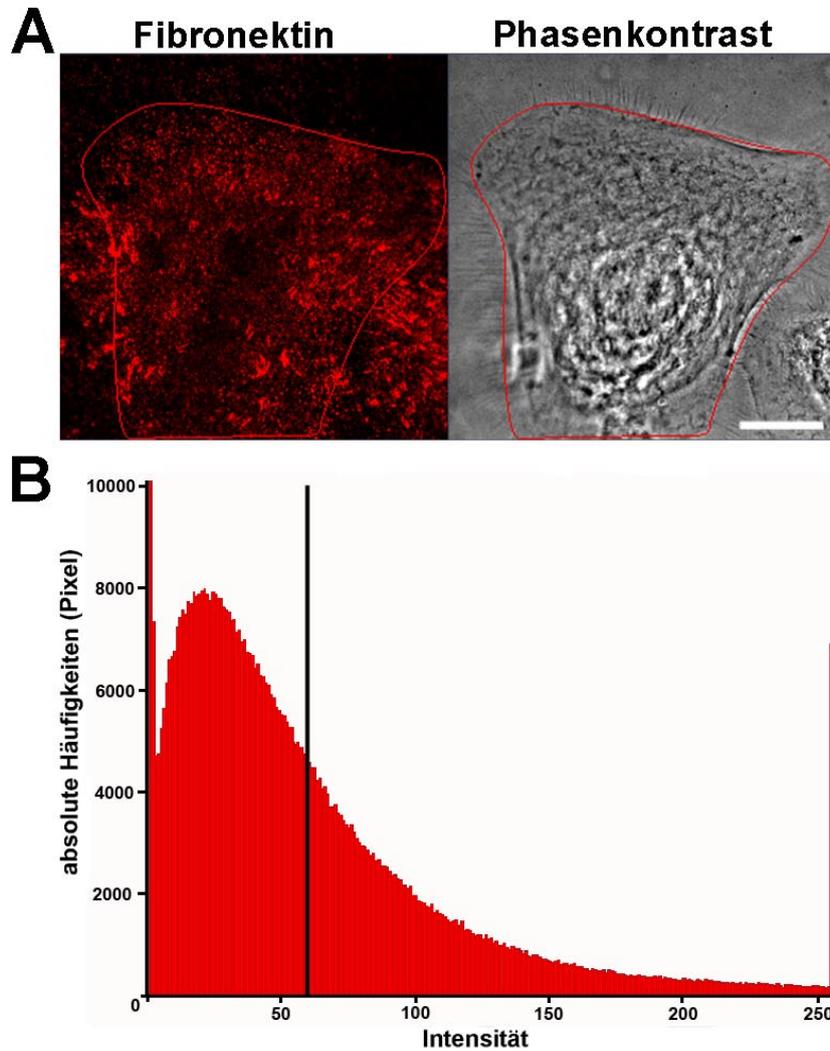


Abbildung 2.6: **ECM-Analyse** - (A) LSM-Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen gegen extrazelluläres Fibronectin in Fluoreszenz und Phasenkontrast. Zur Auswertung der sekretierten ECM wurde der Zellrand (rot) im Phasenkontrastbild markiert. Maßstabsbalken = 10 μm . In (B) ist die Analyse dieses Bereichs für den Fluoreszenzkanal dargestellt. Das Histogramm zeigt die absoluten Intensitätshäufigkeiten in Pixeln. Der Mittelwert der Intensitäten ist mit der weißen Linie angedeutet und wird für die Auswertung verwendet.

chung hatten eine Veränderung der Basallamina in Abhängigkeit von der Substratelastizität gezeigt [85, 10]. Dafür wurden Zellen auf elastischen Silikon-Substraten ausgesät und nach 2 Tagen fixiert. Es wurde eine Immunfärbung gegen extrazelluläres FN (siehe Abschnitt 2.2.2) angefertigt und mit dem Cell Observer analysiert.

Für die Beschichtung der Substrate wurde in den meisten Fällen Plasma-Fibronectin verwendet. Es ist jedoch bekannt, dass Zugabe von exogenem Fibronectin die FN-Sekretion sowie die Fibrillogenese verstärken kann [108]. Daher wurden Kontrollfärbungen gegen extrazelluläres FN an Zellen angefertigt, die auf 0,4% Gelatine ausgesät wurden.

Außerdem musste getestet werden, ob nach der Behandlung mit Trypsin und 20 mM NH_4OH + 0,1 M NaCl kein FN mehr auf dem Substrat nachzuweisen ist, da zur Untersuchung der Kräfte in der ECM ein Referenzbild ohne jegliche Deformationen erstellt werden musste. Auch hierfür wurden Zellen auf Silikon-Substraten ausgesät und nach 2 Tagen mit Trypsin und 20 mM NH_4OH + 0,1 M NaCl, gemäß Abschnitt 2.5.8, behandelt. Anschließend wurden die Proben fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung gegen extrazelluläres FN durchgeführt. Diese Markierungen wurden am Cell Observer ausgewertet.

2.5.10 Matrix-Analyse bei sessilen und polarisierten Zellen

Um die Menge an sekretierter Matrix von polarisierten und sessilen Keratinozyten zu analysieren, wurden Immunfluoreszenz-Markierungen gegen extrazelluläres Fibronectin (siehe Abschnitt 2.2.2) angefertigt. Die Aufnahme der Bilder in Phasenkontrast und Fluoreszenz wurden am LSM710 mit exakt gleichen Einstellungen durchgeführt. Außerdem wurden die Proben parallel gefärbt. Der Zellrand wurde anhand der Phasenkontrastaufnahmen ermittelt und mit dem LSM-Programm (Version V.5.0 SP1.1, Zeiss) markiert (siehe Abb. 2.6). Mittels dieses Programms konnte direkt der Mittelwert der Intensität (Grauwert/Fläche) der Fluoreszenz-Aufnahmen innerhalb des markierten Bereichs bestimmt werden, der ein Maß für die Menge an sekretierter Matrix darstellt. Es wurde zwischen sessilen und polarisierten Zellen unterschieden. Der Einfluss der unterbelichteten Pixel war dabei sehr gering (Abb. 2.6 B). Die in Abb. 2.6 B gezeigten Häufigkeiten der überbelichteten Pixel stellten bereits den maximalen Anteil dar. In diesem Beispiel führten diese zu einer Erhöhung der mittleren Intensität von 56,5 auf 58,7 (Bereich von 0-255). Alle anderen Messungen weisen einen wesentlich geringeren Anteil auf.

2.5.11 FRAP-Messungen

Um den Anteil der mobilen Fraktion sowie die Austauschrate von Vinculin in Neomycin-behandelten Keratinozyten (siehe Abschnitt 2.1.3) zu bestimmen, wurden Zellen auf Glasbodenschalen ausgesät und mittels TransIT oder Fugene6 mit GFP-Vinculin transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.1). Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen 4 h mit Neomycin behandelt und vor jedem Experiment mit EGF stimuliert. Alle FRAP-Untersuchungen fanden unter Zellkulturbedingungen am LSM510 statt. Abbildung 2.7 fasst den Verlauf eines FRAP-

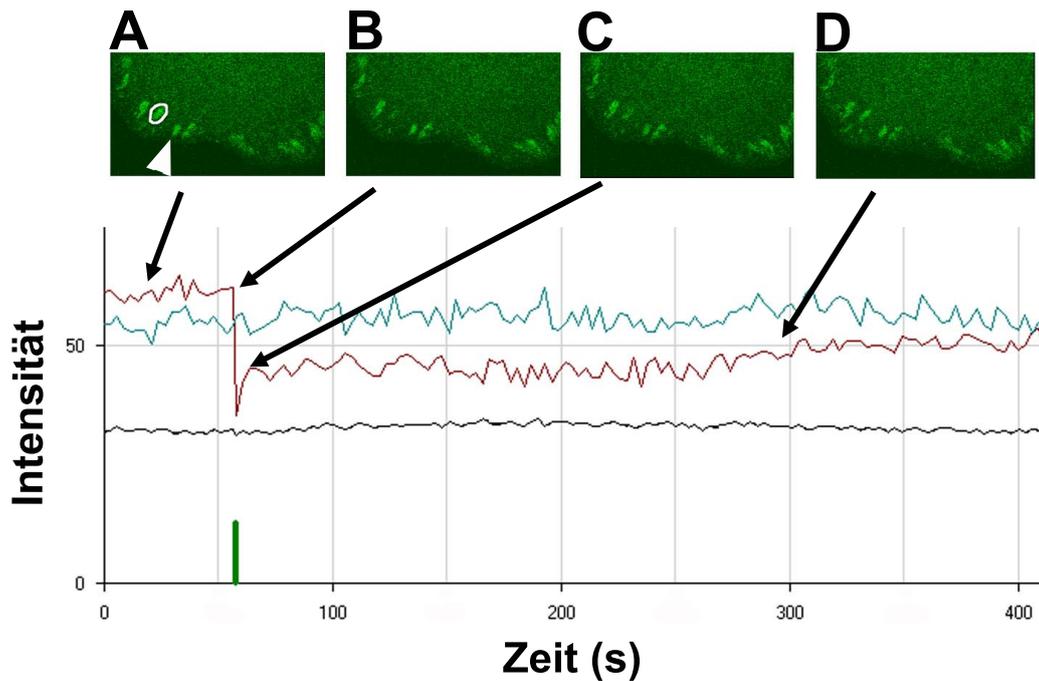


Abbildung 2.7: **Durchführung eines FRAP-Experiments** - In der unteren Grafik ist der zeitliche Verlauf eines FRAP-Experiments am LSM510 gezeigt. Die blaue Linie zeigt exemplarisch den Intensitätsverlauf einer Referenzadhäsion, die in (A) mit einer weißen Pfeilspitze gekennzeichnet wurde. Die untere schwarze Linie stellt den Intensitätsverlauf im Zytoplasma und die obere braune Linie den im Bleichfeld dar. Der grüne Strich markiert den Bleichzeitpunkt. In (A) ist die analysierte Adhäsion (Bleichfeld, braune Linie) weiß umrandet. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die An- und Abbindungsprozesse im Gleichgewicht. (B) zeigt den Zeitpunkt des Bleichens. An dieser Stelle wurde das markierte Vinculin in der Adhäsion sowie im darüberliegenden Zytoplasma gebleicht. Die Intensität sank auf ein Minimum ab. In (C) ist die schnelle Erholung der Fluoreszenz durch Diffusion dargestellt. Hier erkennt man einen Knick der Intensitätserholung, der für die Auswertung manuell entfernt wurde. Nach einiger Zeit erreichten die An- und Abbindungsprozesse einen Gleichgewichtszustand (D).

Experiments zusammen. Die mittleren Intensitäten im Bleichfeld und der entsprechenden Referenzfeldern wurden direkt mit dem LSM-Programm (Version 3.2 SP2) für jeden Zeitschritt aufgezeichnet und gespeichert (siehe Abb. 2.7). Es wurden nur Fokaladhäsionen direkt hinter dem Leitsaum polarisierter Zellen analysiert. Die Auswertung der Erholungskurven wurde von Christoph Möhl durchgeführt. Dafür wurde von allen Erholungskurven ein Offset abgezogen, der der mittleren Intensität des zytoplasmatischen Hintergrunds entspricht. Durch die Überlagerung des Diffusionsprozess und des kinetischen Austauschs zeigten alle Bleichkurven einen Knick direkt nach dem Bleichen (siehe Abb. 2.7 C). Dieser Knick wurde per Augenmaß lokalisiert. Die Intensität zum Zeitpunkt des Knicks wurde von jeder Erholungskurve abgezogen. Danach wurden alle Kurven gegen bildgebungsbedingtes Ausbleichen korrigiert. Dazu wurden die Kurven auf die mittlere Intensität von 3-6 Referenzadhäsionen normiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten vor dem Bleichzeitpunkt auf 1 normiert. Abschließend wurden alle Bleichkurven zusammengefasst und gemittelt, wobei der Bleichzeitpunkt auf 0 s gesetzt wurde. Aus dieser Kurve wurde dann die mittlere Halbwertszeit $t_{1/2}$ und der mittlere Sättigungswert α berechnet. Der Sättigungswert wurde anhand der Mittelwerte der normierten Intensitäten aus den letzten 10 s der Erholungskurven bestimmt. Durch Anpassen des kinetischen Modells (siehe Abschnitt 2.4.5) an die Daten mit Hilfe der Funktion `fminsearch` (Matlab), konnte die Austauschrate k bestimmt werden. Daraus ergab sich die Halbwertszeit $t_{1/2}$ (Gleichung 2.4). Für die genaue Auswertungsmethode siehe [72].

2.6 Statistische Datenauswertung

Die Auswertung, Sortierung sowie die Darstellung aller ermittelten Daten wurden mit dem Programm *Excel* (Microsoft) durchgeführt. Die Boxplots in Abbildung 3.5 und 3.6 wurden mit dem Programm *Origin* (Version 8G, Additive GmbH, Friedrichsdorf) angefertigt. Sofern die Datensätze normalverteilt waren, wurde ein zweiseitiger T-Test verwendet, um auf einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte zu testen.

Als Test auf Normalverteilung wurde der Kolmogoroff-Smirnoff (KS)-Test (DataLab, Evaluierungsversion, Epina GmbH, Pressbaum, Österreich) verwendet. Schlug dieser fehl, so wurde zur Bestimmung eines signifikanten Unterschieds der Mittelwerte ein zweiseitiger U-Test verwendet [93].

Die Standardabweichung (σ) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.6)$$

n = Stichprobenumfang, x_i = der i . Wert der Stichprobe, \bar{x} = Mittelwert

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Rolle der Filopodien während der Adhäsionsbildung

Migrierende Keratinozyten weisen eine starke Polarisierung auf. Sie bilden ein Lamellipodium mit vielen Filopodien in Richtung der Migration aus, wobei nach hinten lange Retraktionsfasern (*Retraction fibers*) ragen. Zur effektiven Migration ist eine asymmetrische Adhäsionsdynamik unbedingt notwendig, da neue Adhäsionsstrukturen vorne am Leitsaum aufgebaut und alte Adhäsion hinten wieder abgebaut werden. Dadurch wird die Migrationsrichtung der Zelle determiniert. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit soll die Rolle der Filopodien bei der Adhäsionsbildung näher untersucht werden, denn bis zum heutigen Zeitpunkt wurde angenommen, dass neue Adhäsionen im Lamellipodium der Zelle entstehen. Die Versuche bauen auf Vorexperimenten auf, die von Bodo Borm während seiner Post-Doc-Zeit in unserem Institut angefertigt wurden.

Zeitserien von GFP-Vinculin transfizierten, mobilen Keratinozyten in Fluoreszenz- und Reflexionsmikroskopie haben gezeigt, dass Adhäsionen innerhalb des Lamellipodiums immer in direkter Verlängerung von stabilen Filopodien lagen (siehe Abb. 3.1 A und C) [101]. Diese Adhäsionen wiesen eine länglichen Form auf und ragten von den Filopodien an dem Leitsaum bis in das Lamellipodium hinein. Bereiche mit instabilen Filopodien, die ständig neu auswuchsen und einklappten, wiesen hingegen weder in Reflexion (siehe Abb. 3.1 B) noch in Fluoreszenz (siehe Abb. 3.1 D) Adhäsionsstellen auf.

Diese Ergebnisse lieferten den ersten Hinweis für einen Zusammenhang zwischen Filopodien- und Adhäsionsbildung in mobilen Zellen. Genauere Untersuchungen zeigten daraufhin bereits kleine Adhäsionsstellen innerhalb von Filopodien [101]. Dazu wurden migrierende Keratinozyten fixiert und Immunfluoreszenzfärbungen gegen unterschiedliche Adhäsionsproteine angefertigt (siehe Abb. 3.2 A, B und C). Zusätzlich wurde die Lokalisierung von weiteren Adhäsionsproteinen mittels GFP-Konstrukten analysiert (siehe Abb. 3.2 D, E und F). Diese neu beschriebenen Adhäsionsstellen innerhalb von Filopodien enthielten alle getesteten Proteine wie Paxillin, Talin, Vinculin, Tensin, VASP und Zyxin. Zyxin stellte in diesem Zusammenhang eine besondere Überraschung dar, da es früheren Untersuchungen nach [128] nur in älteren Adhäsionen innerhalb des Lamellipodiums vorkam. Diese Ergebnis-

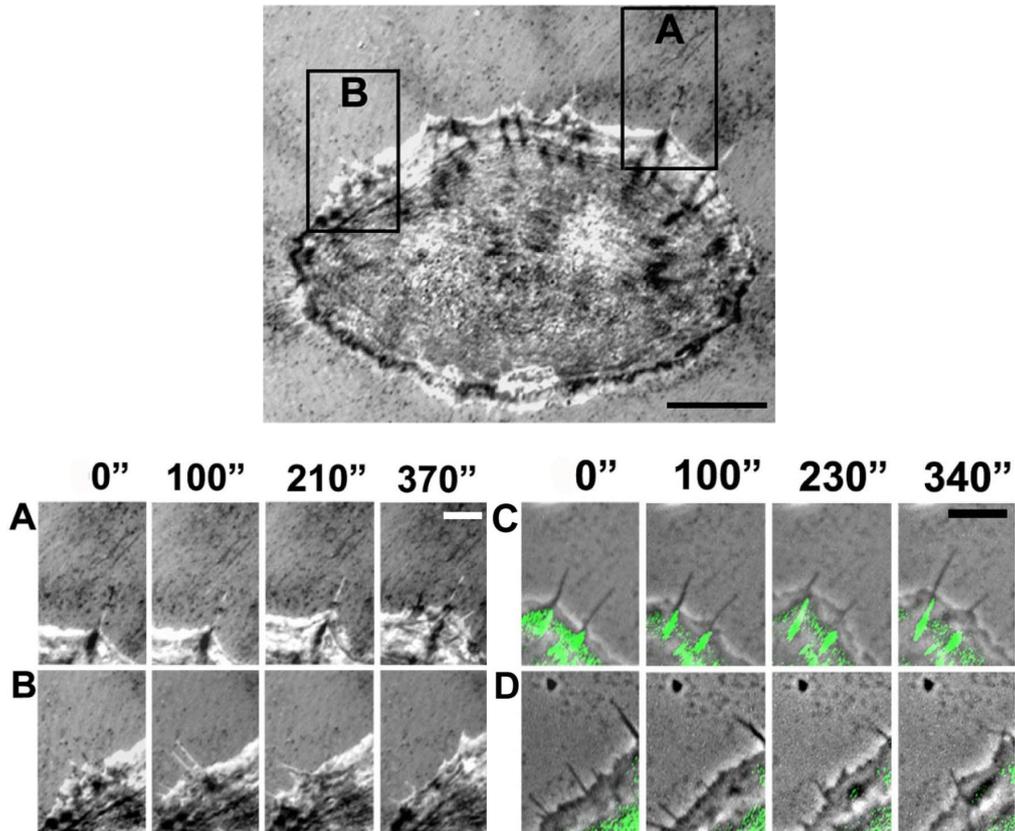


Abbildung 3.1: **Abhängigkeit der Fokaladhäsionen von stabilen Filopodien** - Reflexions- sowie Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen von mobilen, GFP-Vinculin transfizierten Keratinozyten zeigten Bereiche mit stabilen (A und C) und instabilen Filopodien (B und D). Bereiche mit stabilen Filopodien wiesen deutliche Adhäsionsstellen in Reflexion (A) sowie in Fluoreszenz (C) über die Zeit auf. Diese Adhäsionen lagen immer in direkter Verlängerung der Filopodien. Bereiche mit instabilen Filopodien wiesen hingegen keine Fokaladhäsionen innerhalb des Lamellipodiums auf. Die Bereiche (A) und (B) entsprechen nicht den Bereichen in (C) und (D). Diese zeigen die gleiche Zelle zu einem späteren Zeitpunkt. Die Zeitschritte sind in Sekunden angegeben. Das erste Bild jeder Zeitserie wurde auf Zeitpunkt 0 gesetzt. Maßstabsbalken im Übersichtsbild = 10 μm , (A)-(D) = 3 μm . Aufnahmen von Bodo Borm aus Schäfer et al., 2009 [101].

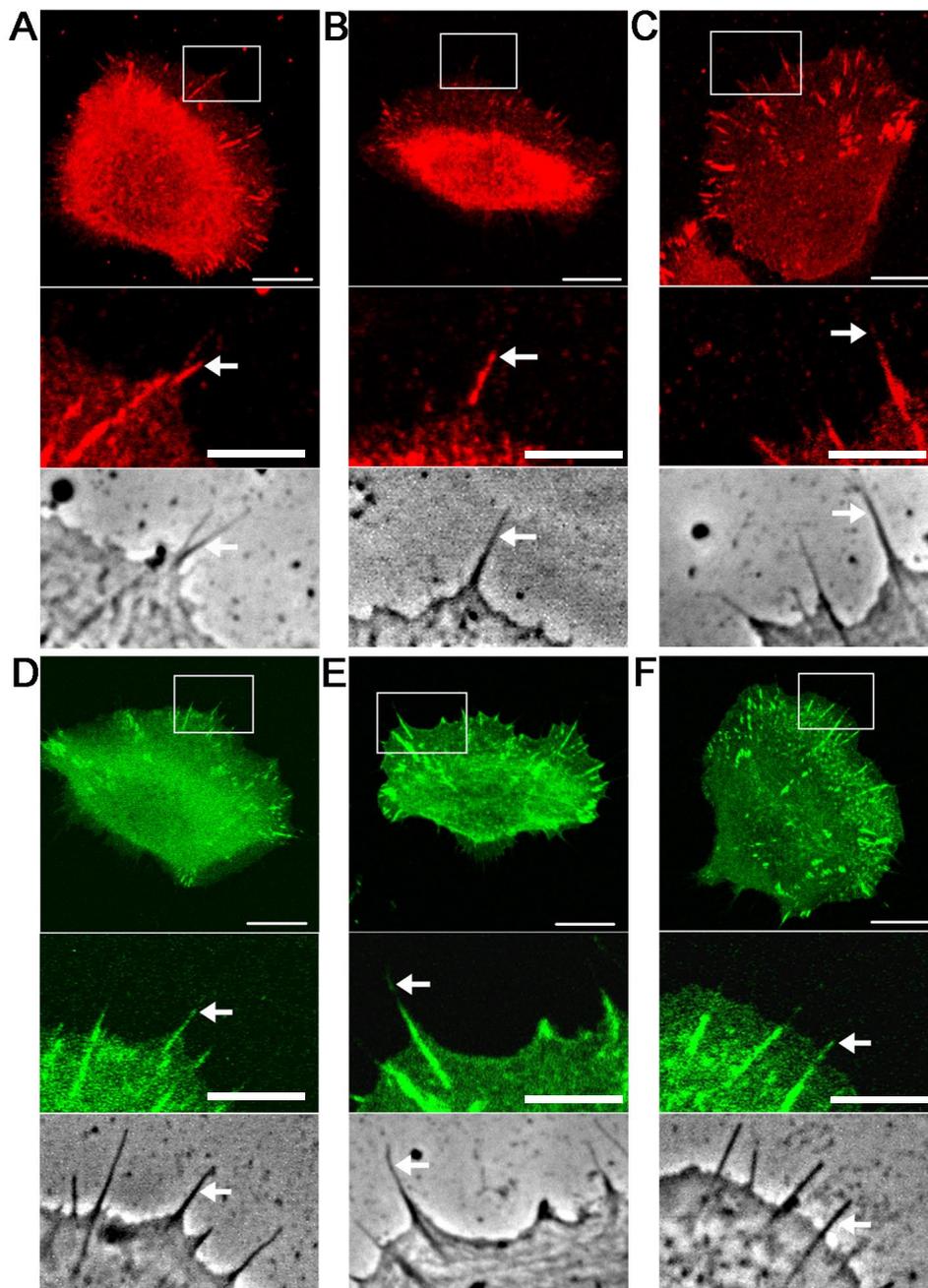


Abbildung 3.2: **Adhäsionsproteine innerhalb von Filopodien** - Die Lokalisation von Adhäsionsproteinen in EGF stimulierten Keratinozyten wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen gegen Paxillin (A), Talin (B) und Vinculin (C), sowie mittels GFP-Konstrukten von Tensin (D), VASP (E) und Zyxin (F) analysiert. Alle Keratinozyten wurden vor der Fixierung EGF-stimuliert und anschließend mit dem LSM510 aufgenommen. Die weißen Rahmen in jedem Übersichtsbild zeigen den vergrößerten Ausschnitt in Phasenkontrast und Fluoreszenz. In den Vergrößerungen wurde der Kontrast zur besseren Darstellung der Filopodien erhöht. Die weißen Pfeile markieren filopodiale Fokalkomplexe. Alle Proteine konnten in Filopodien nachgewiesen werden. Maßstabsbalken in den Übersichtsbildern = 10 μm und in den Vergrößerungen = 5 μm . Aufnahmen von Bodo Borm aus Schäfer et al., 2009 [101].

se zeigten, dass vollständige Adhäsionsstellen bereits in Filopodien aufgebaut werden. Diese Adhäsionen wurden auf Basis der hier beschriebenen Daten als filopodiale Fokalkomplexe (FXs) klassifiziert. Basierend auf diesen Vorexperimenten sollten im Weiteren die Entstehung, Funktion und Eigenschaften der filopodialen FXs analysiert werden.

3.1.1 Filopodiale Fokalkomplexe verbinden Filopodien mit dem Substrat

Aus den oben beschriebenen Vorversuchen ging hervor, dass in Filopodien mobiler Keratinozyten bereits kleine filopodiale Fokalkomplexe (FXs) aufgebaut werden. Fokaladhäsion verbinden grundsätzlich das Zytoskelett der Zelle mit der äußeren Umgebung. Jedoch können Vinculin-haltige Adhäsionen auch lediglich Aktinfasern mit der Zellmembran verbinden, wie dies für manche Bereiche der Costamere des Muskels beschrieben wurde [83]. Deshalb wurde im Folgenden überprüft, ob filopodiale FXs eine stabile Verbindung der Zelle zum Substrat herstellen und damit eine essentielle Rolle bei der Migration der Zelle spielen.

Dafür wurden Keratinozyten auf gewaschene, elastische Silikon-Substrate ohne fluoreszente Kugeln ausgesät und mittels EGF zur Migration angeregt. Mit einer Mikro-Nadel wurde das Substrat in unmittelbarer Nähe von stabilen Filopodien deformiert. Es sollte nun die Bewegung der Filopodien während der Substratdeformation beobachtet werden. Folgten die Filopodien der Verformung des Substrats, so sprach dies für eine stabile Substratverbindung. Dazu wurde die Nadel mittels eines Mikromanipulators genau vor das Lamellipodium einer migrierenden Zelle positioniert (siehe Abb. 3.3). Die Deformation erfolgte senkrecht zur Migrationsrichtung der Zelle. Es zeigte sich, dass stabile Filopodien der Substratverformung folgten (siehe Abb. 3.3 C). Die Verbindung zum Substrat war stark genug, um Filopodien über ihre gesamte Länge zu verbiegen. Nachdem die Deformation gelöst wurde, kehrten die Filopodien in ihre Ausgangsposition zurück (siehe Abb. 3.3 D, Film 1). Außerdem wurde beobachtet, dass wachsende Filopodien noch keine feste oder eine unzureichende Verbindung zum Substrat aufwiesen. Solche Filopodien wuchsen trotz Substratdeformation unbeeinflusst weiter (siehe auch Film 1). Ein solches Filopodium ist in Abb. 3.3 C mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnet. Dieses Verhalten konnte jedoch nur bei noch wachsenden Filopodien beobachtet werden.

3.1.2 Das Protein VASP bestimmt die filopodiale Adhäsion

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass stabile Filopodien eine feste Verbindung über filopodiale FXs zum Substrat herstellen. Darauf aufbauend sollte weitergehend geklärt werden, wie diese Adhäsionsstellen in Filopodien gebildet werden und ob sie den Übergang vom wachsenden zum stabilen Filopodium beeinflussen. Zur Untersuchung der Bildung von filopodialen FXs wurden Keratinozyten mit GFP-VASP transfiziert und mittels EGF zur Migra-

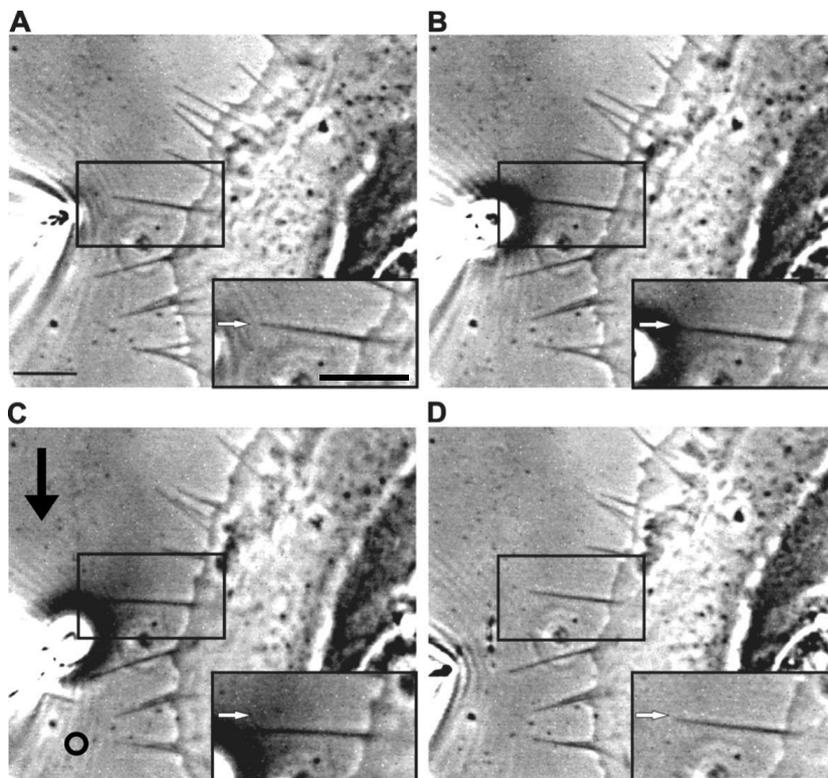


Abbildung 3.3: **Verbindung des filopodialen Fokalkomplexes mit dem Substrat** - Keratinozyten wurden auf elastische Silikon-Substrate ausgesät und EGF stimuliert. Die Experimente fanden am LSM510 statt. Das Substrat wurde mit einer Mikro-Nadel vor einer migrierenden Zelle deformiert und die Positionen der Filopodien im Phasenkontrast verfolgt (A-D). (A) zeigt die Zelle in Phasenkontrast bevor und (B) nachdem die Nadel ins Substrat gestochen wurde. In (C) wurde das Substrat in Richtung des schwarzen Pfeils deformiert und in (D) wurde die Deformation gelöst. Die schwarzen Rahmen umranden den vergrößerten Ausschnitt in jedem Bild. Die weißen Pfeile zeigen die Originalposition des Filopodiums vor dem Einstechen der Nadel. Das Filopodium folgt der Substratdeformation und kehrt nach dem Lösen der Deformation in seine Ausgangsposition zurück. Maßstabsbalken = 5 μm . Der schwarze Kreis markiert ein Filopodium, das während der Verlängerung nicht adhärert. Siehe auch Film 1.

tion angeregt. VASP gehört zur Familie der Ena/VASP-Proteine. Es ist in Fokaladhäsionen sowie im Spitzen-Komplex von Filopodien, einem Protein-Komplex an der Spitze derselben, lokalisiert. Dies konnte mittels Lebendzelluntersuchungen bestätigt werden. Es zeigte sich ein deutliches, grün leuchtendes, punktuell Signal an der Spitze jedes Filopodiums (siehe Abb. 3.4 B, Film 2). In wachsenden Filopodien wanderte das Signal mit der Wachstumsgeschwindigkeit des Filopodiums mit und blieb somit ständig in der Spitze lokalisiert. Adhärierten diese Filopodien stabil, so erkannte man bei diesem Übergang vom wachsenden zum stabilen Filopodium, dass auch das VASP-Signal stoppte. Erreichte nachfolgend der Leitsaum des Lamellipodiums diese Stelle, so wurde eine Adhäsion hinter dem VASP-Signal ausgebildet. Diese Adhäsion wurde im Lamellipodium lediglich zu FAs vergrößert (siehe Abb. 3.4 B, weiße Pfeile, Film 2).

Insgesamt wurde die Entstehung von 30 FAs analysiert. Davon entstanden 75% aus stabil adhärierten VASP-Bereichen. Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Zeitserien von GFP-Vinculin transfizierten Keratinozyten, die von Bodo Borm aufgenommen wurden, zeigten ebenfalls Adhäsionsstellen in Filopodien, die mit dem ersten Kontakt des Lamellipodiums vergrößert wurden. Dies wurde in Experimenten mit weiteren GFP-Konstrukten anderer Adhäsionsproteine wie Tensin und Zyxin bestätigt und im Rahmen einer Veröffentlichung zusammengefasst [101]. Während dieses Prozesses fand die Vergrößerung immer entlang der filopodialen Längsachse statt und spiegelte im Wesentlichen die einstige Form des Filopodiums wider. Diese Verlängerung lässt sich auch in den Immunfluoreszenzaufnahmen erkennen (siehe Abb. 3.2). Vinculin, Tensin und Zyxin konnten jedoch nicht direkt in der Spitze von Filopodien lokalisiert werden.

Zusammengefasst zeigten die Daten, dass die Lage der filopodialen FXs durch das VASP-Signal bestimmt wurde. Die filopodialen FXs wurden nachfolgend nur noch bei Kontakt mit dem Lamellipodium vergrößert.

3.1.3 Filopodien-Neubildung aus bestehenden Filopodien

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Filopodien am Leitsaum der Zelle durch Zusammenlagerung und Verlängerung von bereits polymerisierten Aktinfilamenten des Lamellipodiums entstehen [119]. Dieser Prozess wird über den Spitzen-Komplex gesteuert. Hier konnte in Zeitserien von GFP-VASP transfizierten Zellen jedoch gezeigt werden, dass Filopodien auch durch erneutes Auswachsen eines schon existierenden Filopodiums entstehen konnten (siehe Abb. 3.4 C). Ein erneutes Auswachsen wurde für Filopodien beobachtet, die stabil über einen filopodialen FX adhäriert waren. Das Auswachsen erfolgte entweder zum Zeitpunkt der FX-Vergrößerung noch innerhalb des Filopodiums oder direkt nach Kontakt mit dem Leitsaum des Lamellipodiums (siehe Film 2). Somit kam es zu einer sich wiederholenden Abfolge von FX-Bildung und erneutem Auswachsen des Filopodiums. Mit dieser Beobachtung konnte die gerichtete Aufeinanderfolge von länglichen FAs, die in Keratinozyten typischerweise vom Filopodium bis in die Lamelle auf einer Linie liegen, erklärt werden (siehe Abb. 3.2). Die repetitive Verlängerung der Filopodien konnte in weiteren Versuchen

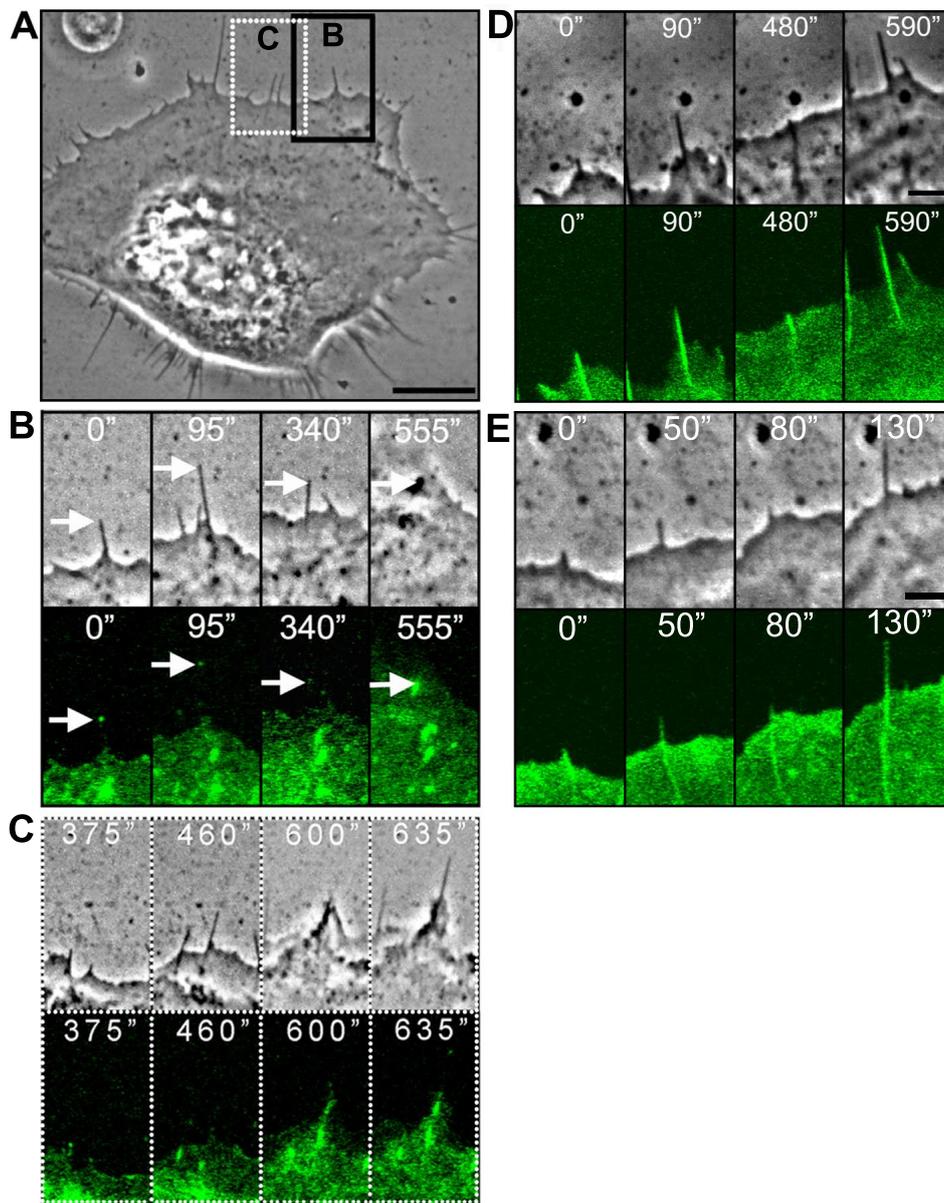


Abbildung 3.4: **Das Protein VASP bestimmt die Lage filopodialeer FXs** - Keratinozyten wurden mit GFP-VASP (A-C), GFP-Fascin (D) oder GFP-Aktin (E) transfiziert und in Phasenkontrast gleichzeitig mit Fluoreszenz analysiert. (A) zeigt die Zelle im Phasenkontrast zum Zeitpunkt 0 der Zeitserie, die in (B) und (C) näher untersucht wurde. Die Umrandungen geben die analysierten Bereiche wieder. In (B) ist die Dynamik des VASP-Signals gezeigt. Die weißen Pfeile markieren die Positionen des Signals. Nach 340 s stoppte das punktförmige VASP-Signal, um nach Kontakt mit dem Lamellipodium eine Fokaladhäsion zu bilden. Siehe auch Film 2. (C-E) zeigen das erneute Auswachsen eines stabilen Filopodiums nach Kontakt mit dem Leitsaum (siehe auch Film 3 und 4). Die Zeitschritte sind in Sekunden gegeben. Maßstabsbalken in (A) = 10 μm und in (D) und (E) = 2 μm . Aufnahmen zu (A-C) wurden zusammen mit Bodo Borm angefertigt.

mittels klassischer, filopodialer Markerproteine wie GFP-Fascin oder GFP-Aktin bestätigt werden (siehe Abb. 3.4 D und E, Film 3 und 4). Auch hier konnte eine erneute Verlängerung der Filopodien nach Kontakt mit dem Leitsaum zum Teil auch ohne diesen beobachtet werden. All dies bestätigte, dass Filopodien, nicht nur durch neue Zusammenlagerung schon existierender Aktinfilamente, sondern auch durch eine wiederholte Verlängerung derselben, gebildet werden konnten. Außerdem zeigten diese Aufnahmen auch ein Abknicken der Aktinfilamente am Schaft von Filopodien, sowie die Einlagerung von Filopodien in das Aktinnetzwerk des Lamellipodiums (siehe Film 4). Diese beiden Beobachtungen stimmten mit Versuchen, die an Filopodien von Fischfibroblasten gemacht wurden, überein [77].

3.1.4 Filopodien bestimmen Motilität und Adhäsionsbildung

Mit den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Filopodien eine essentielle Rolle bei der Bildung der FAs während der Migration spielen. Darauf aufbauend wurde der Einfluss der Filopodien auf das Zellverhalten sowie auf die Adhäsionseigenschaften untersucht. Dazu wurde die Bildung von Filopodien mittels Neomycin (siehe Abschnitt 2.1.3) inhibiert. Neomycin komplexiert PIP_2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat), sodass die Aktivierung von WASP (Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein) am Leitsaum unterdrückt wird und somit keine Arp2/3-abhängige Aktinpolymerisation initiiert werden kann. Diese Behandlung führte bei EGF-stimulierten Keratinozyten zu einer vollständigen Blockierung der Filopodienbildung. Die Polarisierung der Zelle blieb unbeeinflusst. Hingegen zeigten diese Zellen nach Neomycin-Behandlung eine erhöhte Lamellen- und Faltendynamik. Dies war konsistent mit früheren Untersuchungen an Fibroblasten [99].

Die Blockierung der Filopodienbildung führte zu einer deutlichen Reduzierung der Migrationsgeschwindigkeit. Für 78% aller untersuchten Keratinozyten ($n = 338$) bewirkte die Neomycin-Behandlung eine vollständige Inhibierung der Migration, obwohl diese Zellen eine eindeutige Polarisierung aufwiesen. Bei den restlichen 22% der Zellen war die Migrationsgeschwindigkeit um fast 80% signifikant (P -Wert $< 0,001$) reduziert. Diese Zellen wiesen eine durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit von $0,22 \mu\text{m}/\text{min}$ ($\sigma = 0,16 \mu\text{m}/\text{min}$, $n = 74$) auf. Hingegen migrierten Filopodien-bildende Kontrollzellen im Mittel mit einer Geschwindigkeit von $1 \mu\text{m}/\text{min}$ ($\sigma = 0,31 \mu\text{m}/\text{min}$, $n = 62$, siehe Abb. 3.5 A).

Statt des Filopodien-abhängigen Aufbaus von FAs, wurden diese in abgerundeter Form direkt hinter dem Leitsaum Neomycin-behandelter Zellen gebildet. Zusätzlich berührten diese FAs nicht den Leitsaum. Um die Form der FAs genauer zu analysieren, wurde das Aspektverhältnis der FAs direkt hinter dem Leitsaum von Neomycin-behandelten und normalen, fixierten Keratinozyten bestimmt. Dazu wurden nur Zellen verwendet, die eine eindeutige Polarisierung aufwiesen. Diese Analyse ergab ein signifikant (P -Wert $< 0,001$) reduziertes Aspektverhältnis der FAs in Zellen, bei denen die Filopodienbildung blockiert war. Sie wiesen ein Aspektverhältnis von $2,7$ ($\sigma = 0,7$, $n = 64$ FAs aus 5 Zellen) auf. Im Vergleich betrug das Aspektverhältnis der FAs normal migrierender Zellen 7 ($\sigma = 3$, $n = 56$ FAs aus 7 Zellen).

Die reduzierte Migrationsgeschwindigkeit Filopodien-blockierter Zellen lässt auf eine

Störung der Adhäsionsbildung schließen, da eine geordnete Bildung von FAs essentiell für eine effektive Migration ist. Zusätzlich ist eine eher runde Adhäsionsform ein Zeichen für ältere FAs in migrierenden Keratinozyten [73]. Deshalb wurde die Neubildung von FAs in Neomycin-behandelten Zellen analysiert, indem Zeitserien von GFP-Vinculin transfizierten Zellen aufgenommen wurden. Es wurden nur Zellen aufgenommen, die eindeutig polarisiert waren. Diese Aufnahmen zeigten, dass Zellen ohne Filopodien nahezu keine neuen FAs mehr aufbauen konnten. Somit konnte der Zusammenhang zwischen reduzierter Migration und inhibierter FA-Bildung bestätigt werden.

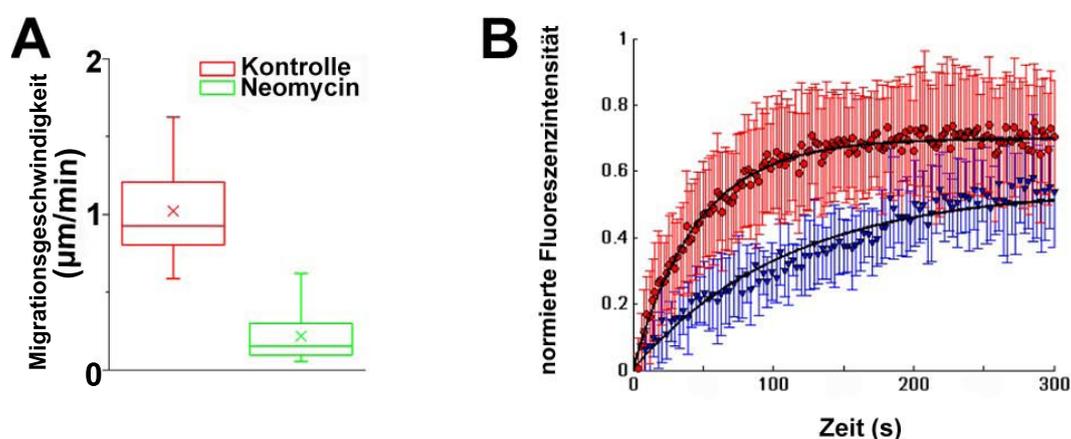


Abbildung 3.5: **Inhibierung von Filopodien hemmt Motilität und FA-Neubildung** - Die Boxplots in (A) zeigen die Verteilungen der Migrationsgeschwindigkeiten von Kontrollzellen (rot, $n = 62$) und Neomycin-behandelten Zellen (grün, $n = 74$). Die Boxen umfassen 50% und die Linien 90% aller Werte. Die Linien innerhalb der Boxen zeigen den Median und das X den Mittelwert. (B) GFP-Vinculin transfizierte Keratinozyten wurden mit Neomycin inkubiert und mit EGF stimuliert. Anschließend wurden die FAs am Leitsaum mittels FRAP analysiert (blaue Kurve). Die Mittelwerte mit entsprechender Standardabweichung zu jedem Zeitpunkt aus 13 Einzelmessungen wurden aufgetragen. Daraus konnte der mittlere Sättigungswert α und die mittlere Halbwertszeit $t_{1/2}$ berechnet werden. Zum besseren Vergleich wurden die Daten aus Möhl et al., 2009 [73] an migrierenden, Neomycin-unbehandelten Zellen mit in die Darstellung eingezeichnet (rote Kurve, $n = 14$). An beide Kurven wurde das selbe kinetische Modell gefittet (siehe Gleichung 2.5). Dieses beschreibt eine einfache An- und Abbindungskinetik.

Zusätzlich wurden FRAP-Experimente an FAs Neomycin-behandelter Zellen durchgeführt, die direkt hinter dem Leitsaum der Zelle lokalisiert waren. Die FRAP-Experimente wurden durchgeführt wie in Abschnitt 2.5.11 beschrieben. Dafür wurden Keratinozyten mit GFP-Vinculin transfiziert und vor jedem Versuch 4 h mit Neomycin inkubiert. Die Auswertung der Erholungskurven ergaben einen mittleren Sättigungswert α von 55% ($\sigma = 18\%$, $n = 13$) und eine mittlere Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 71 s ($\sigma = 26$ s) (siehe Abb. 3.5 B, blaue Kurve). Hingegen enthielten FAs direkt hinter dem Leitsaum normal migrierender Keratinozyten einen austauschbaren Anteil von 70% ($\sigma = 15\%$, $n = 14$) mit einer mittleren Halbwertszeit

$t_{1/2}$ von 36 s ($\sigma = 19$ s, Abb. 3.5 B, rote Kurve, Daten aus Möhl et al., 2009 [73]). Die Daten der FAs Neomycin-behandelter Zellen waren eher vergleichbar mit der Austauschdynamik von FAs in sessilen, unbehandelten Keratinozyten. Diese wiesen einen mittleren Sättigungswert α von 52% ($\sigma = 8\%$, $n = 14$) und eine mittlere Halbwertszeit $t_{1/2}$ von 57 s ($\sigma = 19$ s) auf [73]. Dies deutete erneut daraufhin, dass FAs hinter dem Leitsaum Filopodien-geblockter Zellen bereits älteren Ursprungs waren.

3.1.5 Paxillin-Phosphorylierung ist unabhängig von der Filopodienbildung

Aufgrund der stark reduzierten Migrationsgeschwindigkeit und der verringerten Neubildung von FAs durch Inhibierung der Filopodien wurde das Verhältnis von phosphorylierten Paxillin (pPax) zu Gesamt-Paxillin (Pax) in FAs innerhalb des Lamellipodiums von Neomycin-behandelten und unbehandelten Kontrollzellen bestimmt. Frühere Untersuchungen konnten eine klare Verbindung zwischen Zellmotilität und Phosphorylierungsgrad des FA-Proteins Paxillin aufzeigen [46, 87]. Zur Verhältnisbestimmung wurden Doppelfärbungen gegen pPax und Pax an Neomycin-behandelten und unbehandelten Kontrollzellen durchgeführt. Hierbei ist zu beachten, dass das Fluoreszenzsignal im besten Fall nur proportional zum Phosphorylierungsgrad der FA ist. Im Folgenden wurde dieser Wert des Verhältnisses von pPax zu Pax als Phosphorylierungsgrad verwendet. Die Bilder wurden wie in Abschnitt 2.5.5 beschrieben aufgenommen und ausgewertet. Dazu wurden die FAs innerhalb des Lamellipodiums mit Hilfe der *Water*-Segmentierung identifiziert. Dies ist beispielhaft für eine Paxillin-Färbung einer Kontrollzelle in Abbildung 3.6 A gezeigt. Die Bereiche der FAs sind rot umrandet. Die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades der FAs erfolgte anschließend innerhalb dieser Bereiche. Zur besseren Darstellung wurde der Phosphorylierungsgrad mit einer Farbskala angezeigt. Es wurde klar, dass die FAs innerhalb des Lamellipodiums unterschiedlich stark phosphoryliert waren. Dies ist in Abbildung 3.6 B deutlich zu erkennen. Dabei konnte keine Abhängigkeit des Phosphorylierungsgrades von der Lage der FAs im Lamellipodium festgestellt werden. Außerdem erbrachte der direkte Vergleich des pPax/Pax-Verhältnisses von Neomycin-behandelten und unbehandelten Zellen keinen signifikanten Unterschied. Abbildung 3.6 C zeigt die Boxplots dieser Auswertungen. Die Daten deuten darauf hin, dass die Paxillin-Phosphorylierung in Neomycin-behandelten Keratinozyten unabhängig von der Migrationsgeschwindigkeit und von der Filopodienbildung war (siehe Diskussion, Abschnitt 4.1).

3.1.6 Zusammenfassung

Keratinozyten weisen während der Migration eine deutliche Polarisierung auf. Sie bilden viele Filopodien entlang dem Leitsaum des Lamellipodiums in Migrationsrichtung aus. Diese länglichen, Finger-ähnlichen Membranausstülpungen dienen nicht nur der Erkundung des Substrats, sondern spielen vor allem, wie in diesem Abschnitt gezeigt wurde, eine bedeu-

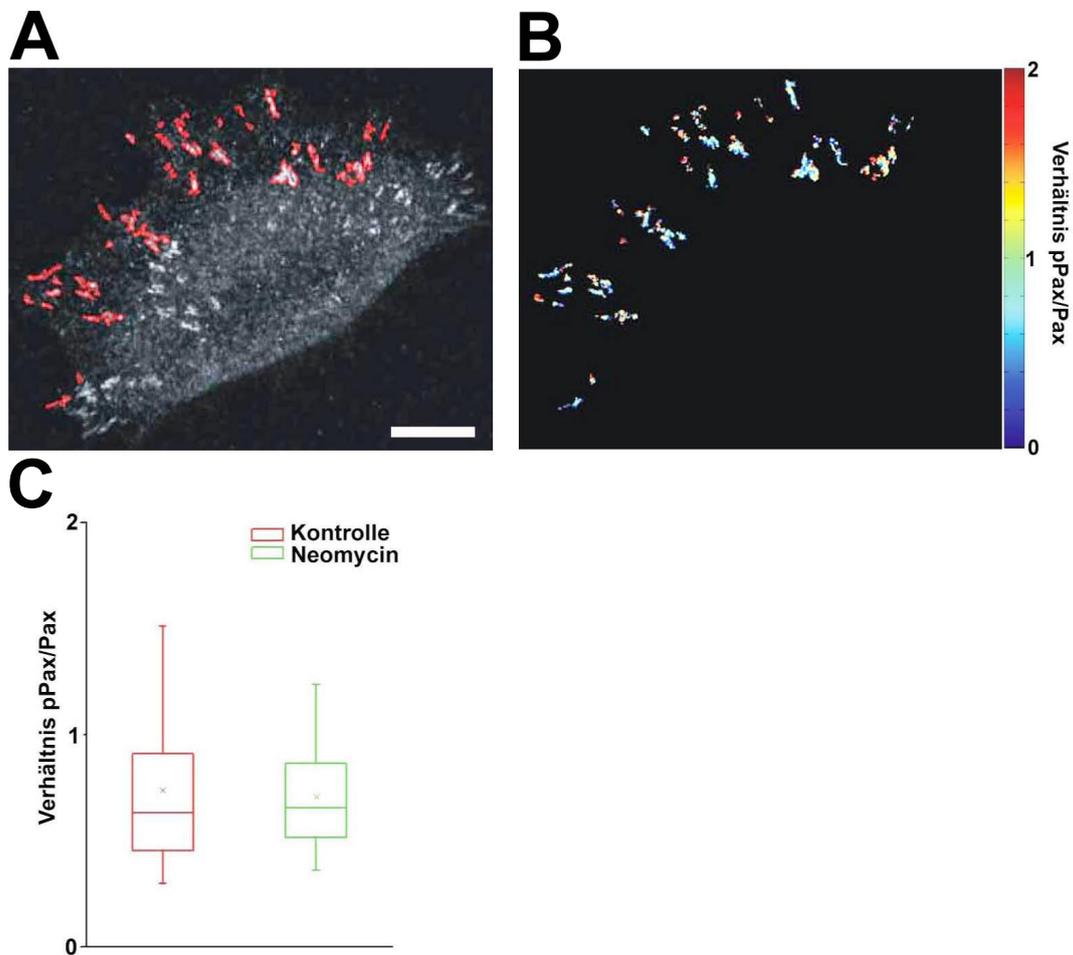


Abbildung 3.6: **Paxillin-Phosphorylierung ist unabhängig von Filopodienbildung** - In (A) ist die *Water*-Segmentierung am Beispiel einer ungefilterten Paxillin-Färbung einer Neomycin-unbehandelten Keratinozyte dargestellt. Die FAs innerhalb des Lamellipodiums sind rot umrandet. Maßstabsbalken = 10 μm . (B) zeigt die entsprechende Verhältnisbestimmung von phosphoryliertem Paxillin (pPax) und Gesamt-Paxillin (Pax) im Bereich der FAs an (A). Das Verhältnis wurde mittels einer Farbskala verdeutlicht. Rote Bereiche stellen eine hohe Paxillin-Phosphorylierung dar. Die Boxplots in (C) zeigen die Verteilungen der Verhältnisbestimmungen von unbehandelten Kontrollzellen (rot, n = 1055 FAs aus 38 Zellen) und Neomycin-behandelten Zellen (grün, n = 410 FAs aus 23 Zellen). Es konnte keine Veränderung der Phosphorylierung festgestellt werden. Darstellung der Boxplots wie in Abb. 3.5.

tende Rolle während der Adhäsionsbildung. So konnte gezeigt werden, dass Filopodien migrierender Keratinozyten bereits kleine Fokalkomplexe enthalten, die mit dem ersten Kontakt des Lamellipodiums lediglich zu klassischen FAs vergrößert werden. Dabei spiegelt die Ausrichtung der Adhäsionen die ursprüngliche Form der Filopodien wider. Die Positionen der filopodialen FXs werden durch das VASP-Protein determiniert. Dieses Protein befindet sich an der Spitze jedes Filopodiums und vermittelt den ersten Kontakt zum unterliegenden Substrat. Nach Adhäsion des Filopodiums werden weitere Adhäsionsproteine in filopodiale Fokalkomplexe eingebaut. Eine Inhibierung der Filopodienbildung reduziert die Motilität und verhindert den Aufbau neuer Adhäsionsstrukturen. Somit wird klar, dass Filopodien eine essentielle Funktion während der Adhäsionsbildung und Migration ausüben, indem sie Position und Form der FAs bestimmen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Filopodien nicht nur durch neue Zusammenlagerung von Aktinfilamenten des Lamellipodiums entstehen können, sondern auch durch Verlängerung bereits gebildeter Filopodien. Diese Daten wurden im Rahmen einer Publikation zusammengefasst [101].

3.2 Abhängigkeit der Adhäsionsstabilität von Filopodien

Filopodien sind essentielle Strukturen der Zellmigration. Sie dienen der Erkundung der Umgebung und regulieren die Adhäsionsstellen der Zelle während der Wanderung. Wie in Abschnitt 3.1 gezeigt wurde, bestimmen sie in Keratinozyten die Ausbildung nahezu aller FAs der Zelle. Eine Blockierung der Filopodienbildung reduziert die Zellmotilität und führt zur vollständigen Inhibierung der Adhäsionsbildung. Im nachfolgendem Abschnitt soll geklärt werden, wie filopodiale Fokalkomplexe (FXs) in das Zytoskelett der Zelle integriert werden und wie die Reifung zu stabilen FAs reguliert wird.

3.2.1 Filopodiale Fokalkomplexe sind stabil und kolokalisieren mit filopodialen Aktinfilamenten

Fokaladhäsionen (FAs) entstehen durch Vergrößerung der filopodialen Fokalkomplexe (FXs), die bereits im Filopodium gebildet werden. Diese werden mit dem ersten Kontakt des Lamellipodiums länglich vergrößert (Abschnitt 3.1). In diesem Abschnitt wurde nun der gesamte Lebenszyklus der filopodialen FXs in migrierenden Keratinozyten analysiert. Dazu wurden Zellen mit GFP-Vinculin transfiziert und EGF-stimuliert. Zeitserien einzelner, migrierender Keratinozyten wurden mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommen. Wie zuvor schon beschrieben wurde, entstanden die meisten FAs innerhalb des Lamellipodiums durch Vergrößerung von filopodialen FXs (siehe Abb. 3.7 A, Film 5: weiße Pfeile). Eine genaue Analyse zeigte, dass 65% aller FAs (120/184, aus 4 Zellen) aus filopodialen FXs entstanden. Diese FAs vergrößerten sich deutlich und waren über die Zeit stabil. Die restlichen 35% bildeten sich inner-

halb des Lamellipodiums ohne Einfluss von Filopodien (siehe Abb. 3.7 B, Film 5: schwarze Pfeile). Diese lamellipodialen FAs zeigten kein weiteres Wachstum und lösten sich bald nach ihrer Entstehung wieder auf.

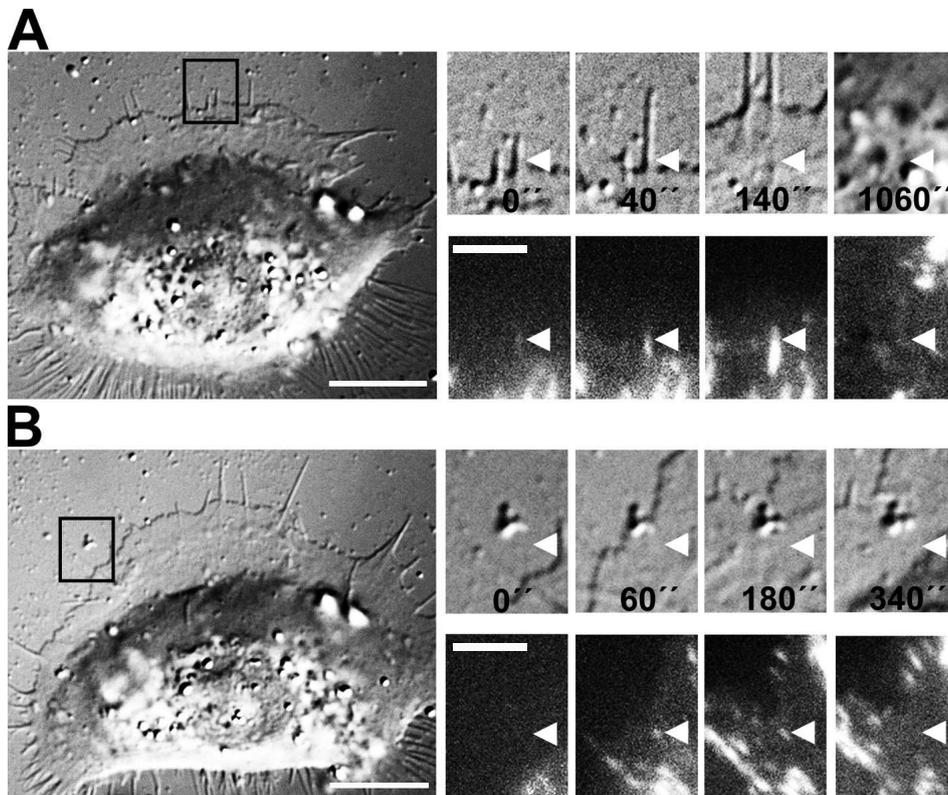


Abbildung 3.7: **Filopodiale FAs sind stabiler als lamellipodiale FAs** - Mobile Keratinozyten wurden mit GFP-Vinculin transfiziert und mittels TIRF und DIC analysiert. Zeitserien zeigten, dass stabile FAs meist aus filopodialen FXs entstanden (A). Hingegen bildeten sich instabile FAs im Lamellipodium typischerweise ohne filopodialen Einfluss (B). Die schwarzen Rahmen in den Übersichtsbildern kennzeichnen die vergrößerten Bereiche der nachfolgenden Zeitserien. Die weißen Pfeile zeigen den Entstehungsort der FAs an. Im letzten Bild der Zeitserie ist der Zeitpunkt des FA-Abbaus dargestellt. FAs, die unabhängig von Filopodien gebildet wurden, lösen sich schneller auf als filopodiale FAs. Die Zeitschritte sind in Sekunden angegeben. Maßstabsbalken im Übersichtsbild = 10 μm und in der Vergrößerung = 3 μm . Siehe auch Film 5.

Da filopodiale FXs innerhalb der Filopodien gebildet werden, weisen diese eine direkte Anbindung zu filopodialen Aktinfilamenten auf. Um den Verlauf dieser Anbindung über die gesamte Lebensspanne eines filopodialen FXs bis in das Lamellipodium hinein zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen Vinculin und Aktin angefertigt (siehe Abb. 3.8). Diese Färbungen bestätigten die Position von filopodialen FXs im direkten Kontakt mit filopodialen Aktin. Des Weiteren wurde die Lokalisation von Aktinfilamenten mit FAs, die aus Filopodien entstammten, und FAs des Lamellipodiums untersucht. Es zeigte sich, dass filopodiale Aktinbündel weit in das Lamellipodium hineinreichten. Außerdem waren FAs

innerhalb des Lamellipodiums, die aus filopodialen FXs entstanden, fast ausschließlich entlang dieser Filamente zu finden (siehe Abb. 3.8, weiße Pfeilspitzen). Da diese FAs entlang filopodiale Aktinfilamente lokalisiert waren, wurden sie im weiteren Verlauf dieser Arbeit als filopodiale FAs klassifiziert. Filopodiale FAs waren im Bereich des Lamellipodiums im Vergleich zu filopodialen FXs deutlich vergrößert. Diese Flächenzunahme fand entlang der filopodialen Aktinbündel statt, sodass diese FAs eine längliche Form aufwiesen (vgl. Abschnitt 3.1.2). Lamellipodiale FAs, die ohne Einfluss von Filopodien entstanden, zeigten keine Übereinstimmung mit derartigen Aktinbündeln (siehe Film 6, rote Pfeilspitze).

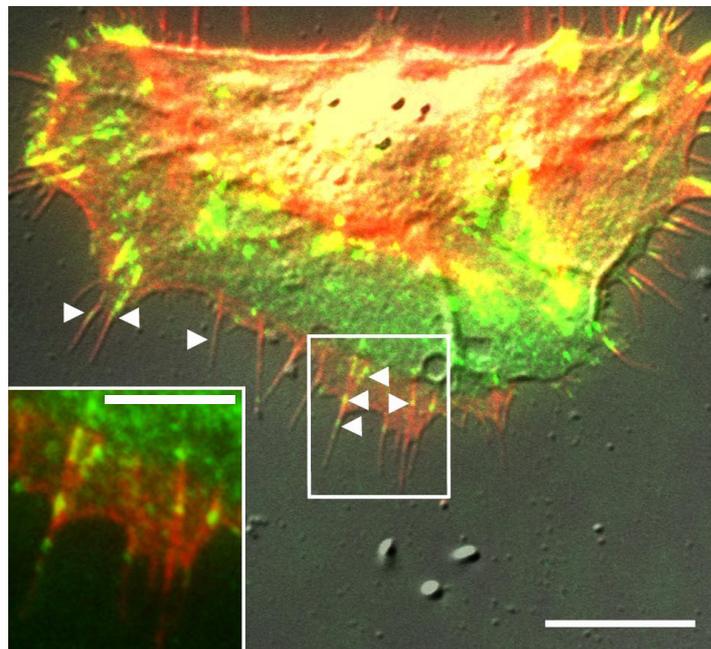


Abbildung 3.8: **Filopodiale FAs kolokalisieren mit filopodialen Aktinbündeln** - Keratinozyten wurden vor Fixierung EGF-stimuliert. Anschließend wurden Vinculin (grün) und Aktin (rot) angefärbt. Vinculin wurde mit TIRF und Aktin mittels Fluoreszenz-Mikroskopie aufgenommen. Das Übersichtsbild wurde zusätzlich mit einer DIC-Aufnahme überlagert. Der weiße Rahmen markiert den vergrößerten Bereich. Die Pfeilspitzen kennzeichnen FAs mit direkter Verbindung zu Aktinbündeln, die aus Filopodien entstammten. Maßstabsbalken im Übersichtsbild = 10 μm und in der Vergrößerung = 5 μm .

3.2.2 Filopodiale Fokalkomplexe wachsen und sind langlebig

Die im Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Ergebnisse lassen auf einen strukturellen Unterschied zwischen filopodialen und lamellipodialen FAs schließen. Dies würde für zwei verschiedene Arten von FAs im Lamellipodium sprechen, die sich in Struktur und Reifung unterscheiden. Um dies zu überprüfen, wurden zuerst alle FAs des Lamellipodiums näher untersucht, indem die Fläche und das Aspektverhältnis einer jeden FA über ihre gesamte Lebensspanne

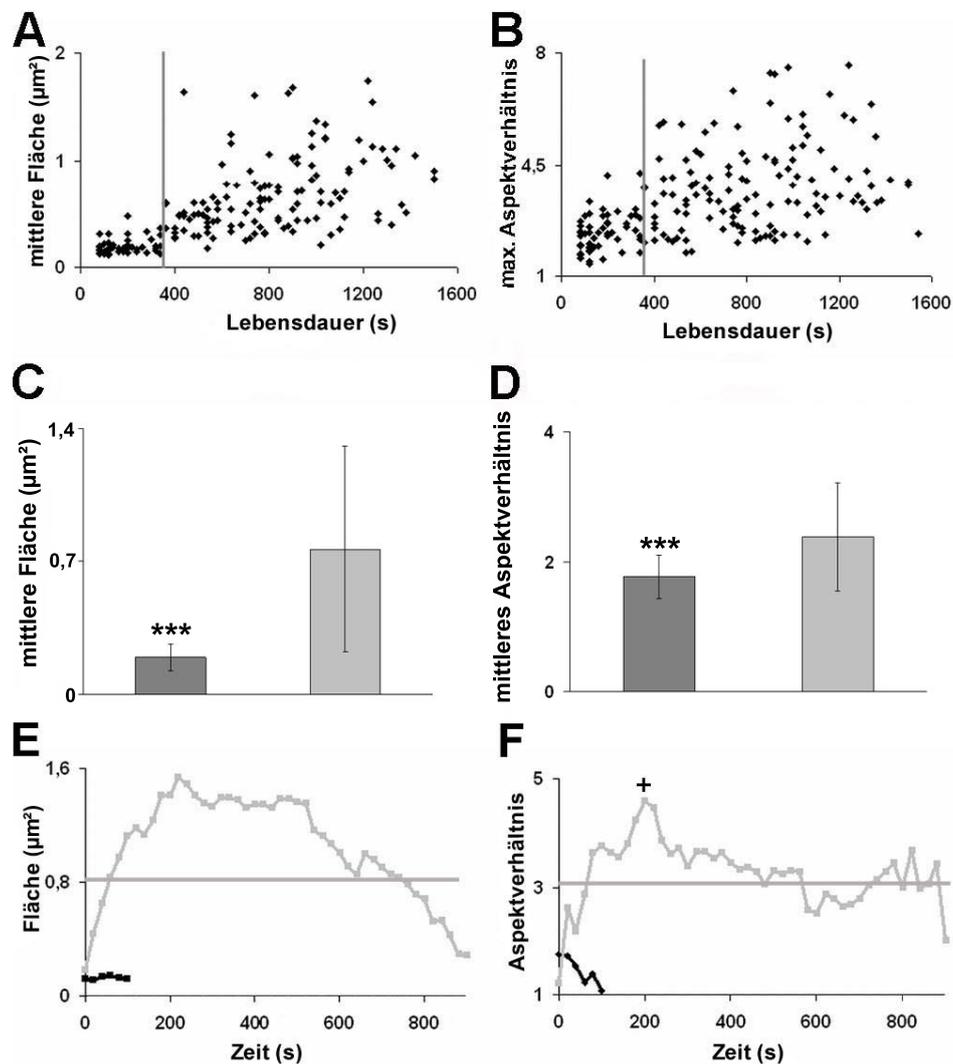


Abbildung 3.9: **Zusammenhang zwischen Wachstum und Stabilität von FAs** - Keratinozyten wurden mit GFP-Vinculin transfiziert und zur Migration angeregt. Zeitserien wurden mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommen und die mittlere Fläche (A) sowie das maximale Aspektverhältnis (B) von FAs ($n = 184$, aus 4 Zellen) ausgewertet und gegen ihre Lebensdauer aufgetragen. Die Größe von FAs (A) sowie ein vergrößertes Aspektverhältnis (B) korrelierten mit langer Lebensdauer. Die graue Linie markiert den Schwellenwert zur Einteilung in instabile und stabile FAs. Mittlere Flächen (C) und mittlere Aspektverhältnisse (D) von instabilen (dunkelgrau, $n = 55$) und stabilen (hellgrau, $n = 129$) FAs wurden miteinander verglichen. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied an (P -Wert $< 0,001$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die zeitliche Änderung der Fläche (E) sowie des Aspektverhältnisses (F) wurden exemplarisch für eine stabile (hellgrau) und eine instabile (schwarz) FA im direkten Vergleich dargestellt. Die Mittelwerte der Einzelmessungen, die für die Auswertung in (A), (C) und (D) verwendet wurden, wurden mit einer grauen Linie am Beispiel der stabilen FA eingezeichnet. Der maximale Wert des Aspektverhältnisses für die Analyse in (B) wurde in (F, stabile FAs) mit einem Kreuz markiert.

analysiert wurden. Die mittlere Fläche sowie das maximale Aspektverhältnis einer jeden FA wurden gegen ihre Lebensdauer aufgetragen (siehe Abb. 3.9 A und B). Daraus ergab sich, dass die Lebensdauer einer FA mit ihrer Größe und Länge korrelierte. Die Fläche und das Aspektverhältnis von nahezu allen FAs mit einer Lebensdauer unter 6 Minuten blieben annähernd konstant, wohingegen FAs mit einer Lebenszeit über 6 Minuten größer und verlängert waren, sodass man diese FAs in zwei Gruppen aufteilen konnte. Deshalb wurde hier ein Schwellenwert gesetzt, der alle FAs in zwei Klassen einteilte. FAs, die sich nach 6 Minuten aufgelöst hatten, wurden als instabil klassifiziert und FAs mit einer Lebensdauer über 6 Minuten galten als stabile Strukturen. Nach dieser Einteilung entstanden 86% (111/129) aller stabilen FAs aus filopodialen FXs. Im Vergleich dazu wurden 84% (46/55) aller instabilen FAs ohne Einfluss von Filopodien innerhalb des Lamellipodiums gebildet. Dies zeigte, dass die Klassifizierung der FAs nach der Lebensdauer eine sinnvolle Einteilung in zwei Gruppen darstellte. Nach dieser Einteilung ergab sich eine mittlere Lebensdauer der stabilen FAs ($n = 129$, siehe auch Tabelle 4) von 13,9 Minuten ($\sigma = 5,2$ min), eine mittlere Fläche von $0,77 \mu\text{m}^2$ ($\sigma = 0,54 \mu\text{m}^2$) und ein mittleres Aspektverhältnis von 2,38 ($\sigma = 0,83$). Instabile FAs wiesen eine mittlere Lebensdauer von 2,9 Minuten ($\sigma = 1,5$ min), eine mittlere Fläche $0,20 \mu\text{m}^2$ ($\sigma = 0,07 \mu\text{m}^2$) und ein mittleres Aspektverhältnis von 1,77 ($\sigma = 0,34$) auf. Die Mittelwerte der Fläche und des Aspektverhältnisses von instabilen FAs waren jeweils im Vergleich zu stabilen FAs (siehe Abb. 3.9 C und D, Tabelle 4) signifikant (P -Wert $< 0,001$) reduziert. Die Flächen einer stabilen als auch einer instabilen FA über ihre gesamte Lebensdauer sind exemplarisch zum direkten Vergleich in Abbildung 3.9 E dargestellt. Abbildung 3.9 F zeigt den zeitlichen Verlauf der Aspektverhältnisse der gleichen FAs. Es wurde deutlich, dass stabile FAs aus filopodialen FXs entstanden und dass diese deutlich wuchsen und sich verlängerten. Hingegen zeigten instabile FAs, die innerhalb des Lamellipodiums ohne Einfluss von Filopodien gebildet wurden, kein Wachstum.

	stabile FA	instabile FA	P -Wert
mittlere Lebensdauer (min)	13,9 ($n = 129$)	2,9 ($n = 55$)	$< 0,001$
σ (min)	5,2	1,5	(T-Test)
mittlere Fläche (μm^2)	0,77 ($n = 129$)	0,20 ($n = 55$)	$< 0,001$
σ (μm^2)	0,54	0,07	(U-Test)
mittleres Aspektverhältnis	2,38 ($n = 129$)	1,77 ($n = 55$)	$< 0,001$
σ	0,83	0,34	(T-Test)

Tabelle 4: Untersuchungen an stabilen und instabilen Adhäsionen - GFP-Vinculin transfizierte, mobile Keratinozyten wurden mittels TIRF-Mikroskopie analysiert. FA-Dynamik wurde in Zeitserien aufgenommen und automatisch ausgewertet. Eine Lebensdauer von 6

min wurde als Schwellenwert zur Einteilung in stabile und instabile FAs verwendet. Es wurden vier, individuell migrierende Zellen analysiert. Aus diesen Daten wurden die mittlere Lebensdauer, die mittlere Fläche sowie das mittlere Aspektverhältnis für instabile ($n = 55$) und stabile ($n = 129$) FAs berechnet. Alle Datensätze wurden mittels des Kolmogoroff-Smirnoff Tests auf Normalverteilung getestet. Der Datensatz der mittleren Flächen von stabilen FAs war nicht normal verteilt. Daher wurde der U-Test zur Bestimmung eines signifikanten Unterschieds verwendet. Für die Analyse der anderen Datensätze wurde der T-Test angewendet.

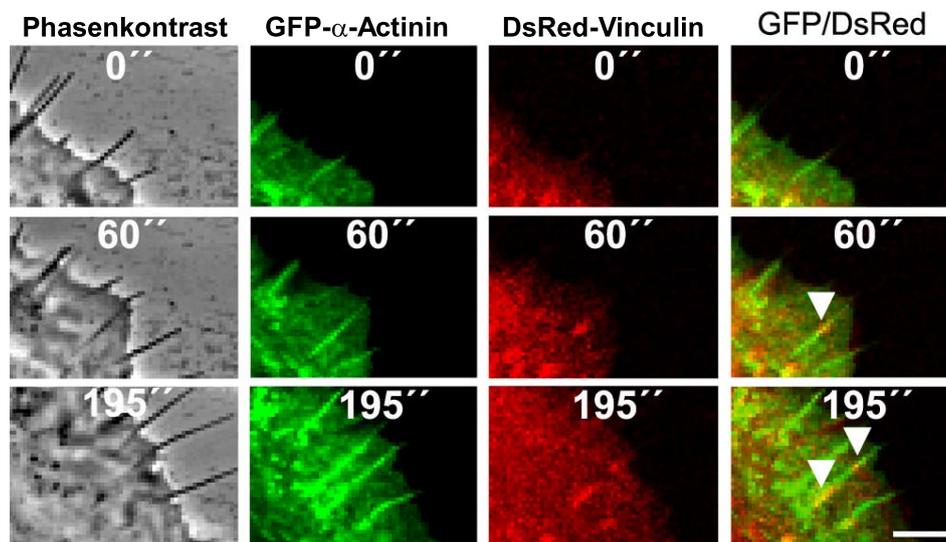


Abbildung 3.10: **Stabile Fokaladhäsionen werden entlang filopodialer Aktinbündel aufgebaut** - Doppeltransfektionen an mobilen Keratinozyten mit DsRed-Vinculin und GFP- α -Actinin wurden angefertigt. Anschließend wurden Zeitserien der Zellen in Phasenkontrast und gleichzeitig in Fluoreszenz aufgenommen. Die weißen Pfeile kennzeichnen FAs (Vinculin), die entlang der filopodialen Aktinbündel (α -Actinin) gebildet wurden und ein deutliches Wachstum zeigten. Die Zeitschritte sind in Sekunden angezeigt. Maßstabsbalken = $5 \mu\text{m}$. Die Aufnahmen wurden mit dem Avalanche-Photodioden-System des LSM710 angefertigt. Da dieses System nur niedrige Zählraten erlaubt, musste jeder Pixel relativ lange belichtet werden. Zum Ausgleich wurde die Auflösung gering gewählt. Siehe auch Film 6.

3.2.3 Zellanalysen bestätigen den Zusammenhang zwischen filopodialen Aktinbündeln und stabilen Fokaladhäsionen

In Abschnitt 3.2.2 zeigte sich ein deutlicher, morphologischer Unterschied zwischen instabilen und stabilen FAs. Stabile Adhäsionen waren viel langlebiger und zeigten ein deutliches Wachstum über die gesamte Lebenszeit. Außerdem wurde belegt, dass nahezu alle stabi-

len FAs aus filopodialen FXs entstanden. Da diese in Immunfluoreszenzen (siehe Abb. 3.8) immer entlang filopodiale Aktinbündel zu finden waren, wurde vermutet, dass diese eine wesentliche Funktion bei der Reifung zu stabilen FAs hatten. Dieser Zusammenhang sollte mittels Lebendzellanalysen bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurden Doppeltransfektionen an mobilen Keratinozyten mit DsRed-Vinculin und GFP- α -Actinin, als Marker für Aktinbündel, durchgeführt. Diese Aufnahmen zeigten deutlich, dass eine Anbindung von FAs zu filopodialen Aktinbündeln unbedingt zur Reifung notwendig war (siehe Abb. 3.10). Stabile FAs wurden innerhalb dieser Filamente gebildet und blieben während des Wachstums ständig mit ihnen in Verbindung (siehe Abb. 3.10, weiße Pfeile, Film 6). Unstabile FAs wurden hingegen innerhalb des Lamellipodiums ohne direkte Verbindung zu erkennbaren Aktinbündeln gebildet (Film 6, rote Pfeilspitze). Interessanterweise lösten sich auch FAs auf, die entlang der Aktinbündel aus Filopodien lokalisiert waren, bei denen jedoch die Filopodien nicht stabil zum Substrat adhären konnten (Film 6, weißer Pfeil). Dies zeigte die Wichtigkeit der filopodialen Aktinbündel für die Reifung von filopodialen FXs zu stabilen FAs.

3.2.4 Filopodiale Aktinbündel weisen eine geordnete, sequenzielle Proteinzusammensetzungen auf

Da die Reifung von filopodialen FXs zu stabilen FAs von der Anbindung zu filopodialen Aktinfilamenten abhing, wurde im Folgenden die genaue Proteinzusammensetzung dieser Aktinbündel analysiert. Dabei wurde ein besonderer Schwerpunkt auf Proteine wie Palladin und α -Actinin gelegt, die typischerweise lamellipodiale Aktinbündel vernetzen. Zu diesem Zweck wurden GFP- α -Actinin transfizierte Keratinozyten fixiert und anschließend mittels Immunfluoreszenz gegen Fascin angefärbt. Fascin vernetzt parallel angeordnete Aktinfilamente sehr dicht und ist daher ausschließlich in Filopodien zu finden [121]. Diese Färbungen zeigten eine deutliche, räumliche Trennung dieser beiden Proteine. Fascin war innerhalb von Filopodien lokalisiert (siehe Abb. 3.11 A) und zeigte kein Signal in filopodialen Aktinbündeln, die bis in das Lamellipodium hineinreichten. Hingegen war hier ein deutliches Signal von α -Actinin erkennbar, welches aber in Filopodien völlig fehlte. Beide Proteine wiesen einen Übergangsbereich am Schaft von Filopodien auf, an dem Fascin gegen α -Actinin ausgetauscht wurde (siehe Abb. 3.11 A, Pfeile). Diese Lokalisation konnte in Lebendzelluntersuchungen bestätigt werden. Sowohl GFP- α -Actinin (Abb. 3.11 B) als auch GFP-Palladin (Abb. 3.11 C) konnten innerhalb des Lamellipodiums in filopodialen Aktinbündeln lokalisiert werden und fehlten völlig in filopodialen Fortsätzen. Beide Proteine wurden während der Verlängerung von filopodialen Aktinfasern kontinuierlich neu eingebaut (siehe Abb. 3.11 B und C, Pfeile, Film 7 und 8). Um sicherzustellen, dass die Lokalisation von α -Actinin und Palladin mit filopodialen Aktinbündeln übereinstimmte, wurden transfizierte Zellen fixiert und gegen Aktin gefärbt. Diese Färbungen bestätigten die Kolo-kalisation von α -Actinin und Palladin mit filopodialen Aktinfilamenten, die bis in das Lamellipodium reichten (siehe Abb. 3.11 D und E, weiße Pfeile).

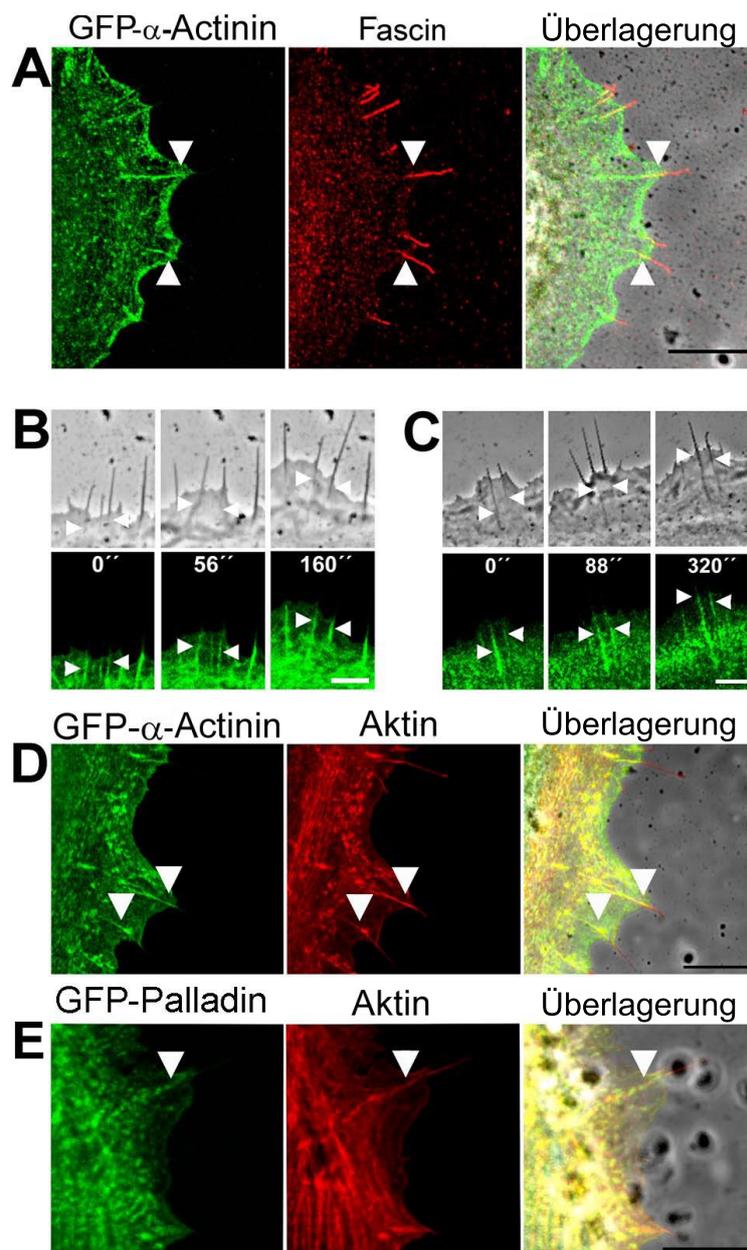


Abbildung 3.11: **Analyse des Aufbaus filopodialer Aktinbündel** - (A) GFP- α -Actinin transfizierte Keratinozyten wurden fixiert und gegen Fascin (rot) gefärbt. Die Überlagerung zeigt die Doppelfärbung zusätzlich mit dem Phasenkontrast-Bild. Fascin war ausschließlich in Filopodien zu finden, hingegen war α -Actinin direkt hinter filopodialen Fortsätzen im Lamellipodium lokalisiert. Die weißen Pfeile markieren einen Überlagerungsbereich der beiden Proteine am Schaft der Filopodien. Zeitserien von GFP- α -Actinin (B) und GFP-Palladin (C) transfizierten Zellen in Phasenkontrast und Fluoreszenz zeigten eine Lokalisation dieser beiden Proteine im Lamellipodium direkt hinter Filopodien. α -Actinin sowie Palladin wurden während des Filopodienwachstums immer wieder neu eingelagert (weiße Pfeile, siehe Film 7 und 8). Die Zeitschritte sind in Sekunden gegeben. Um eine Kolo-kalisation von diesen beiden Proteinen mit filopodiale-m Aktin zu zeigen, wurden GFP- α -Actinin (D) und GFP-Palladin (E) transfizierte Zellen fixiert und gegen Aktin (rot) gefärbt. α -Actinin sowie Palladin kolo-kalisiert mit filopodiale-m Aktinbündeln innerhalb des Lamellipodiums (weiße Pfeile). Maßstabsbalken in (A), (D) und (E) = 10 μ m, in (B) und (C) = 3 μ m.

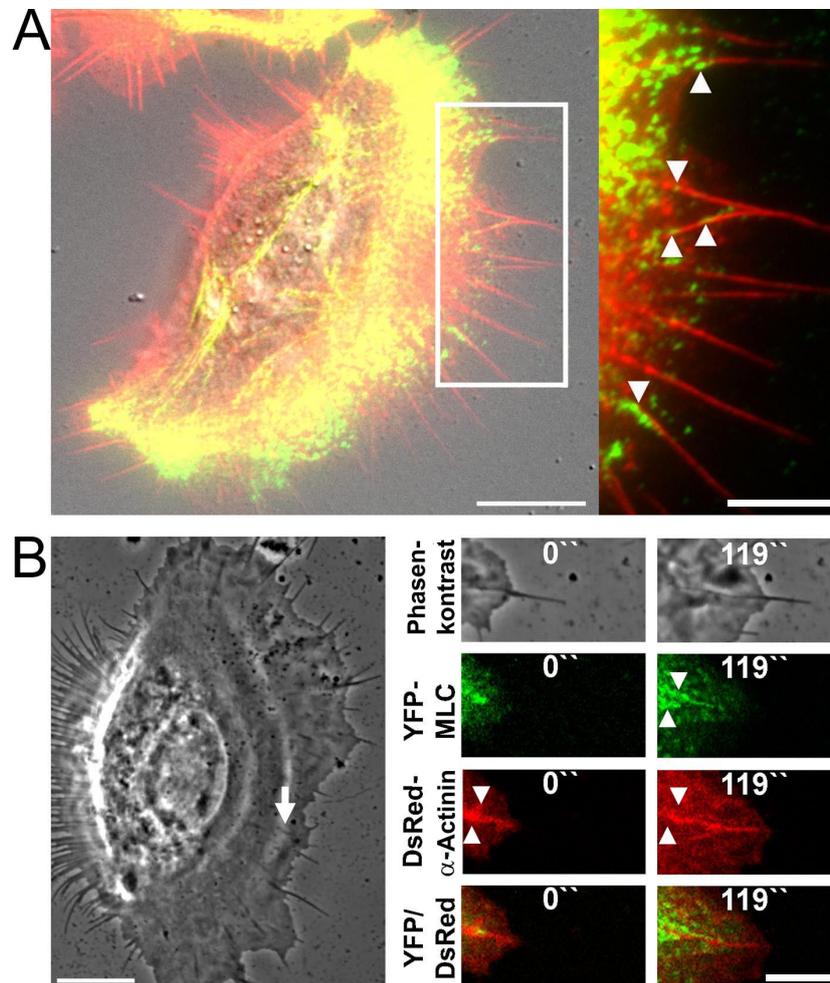


Abbildung 3.12: **Myosin II wird in filopodiale Aktinbündel eingebaut** - (A) Mobile Keratinozyten wurden fixiert und mittels Immunfluoreszenz gegen Aktin (rot) und Myosin II (grün) gefärbt. Die Aufnahme wurde am TIRF-Mikroskop angefertigt. Das Übersichtsbild wurde zusätzlich mit einem DIC-Bild überlagert. Der weiße Rahmen markiert den vergrößerten Bereich rechts im Bild. Myosin II zeigte im Bereich des Lamellipodiums ein deutliches Signal innerhalb sowie am Ende filopodiale Aktinfilamente (weiße Pfeilspitzen). (B) Bildserien von YFP-MLC (*Myosin light chain*) und DsRed- α -Actinin transfizierten Zellen wurden in Phasenkontrast gleichzeitig mit Fluoreszenz aufgenommen. Das Übersichtsbild zeigt die gesamte Zelle in Phasenkontrast kurz nach der Aufnahme der Zeitserie. Der weiße Pfeil markiert den Bereich der Zeitserie. Myosin II wurde während des Filopodienwachstums in α -Actinin markierte filopodiale Aktinbündel eingebaut. Die Pfeilspitzen kennzeichnen Bereiche, an denen α -Actinin teilweise durch Myosin II ersetzt wurde. Die Zeitschritte sind in Sekunden angegeben. Maßstabsbalken in den Übersichtsbildern = 10 μ m und in den Vergrößerungen = 5 μ m.

3.2.5 Filopodiale Aktinbündel bauen Myosin II ein

Lamellipodiale Aktinbündel, die mittels α -Actinin und Palladin vernetzt sind, werden oft auch als Stressfasern bezeichnet. α -Actinin vernetzt in Stressfasern nicht nur die einzelnen Filamente, sondern dient hier auch als definierter Abstandshalter zwischen den einzelnen Filamenten, sodass Myosin II eingelagert werden kann. Bei dieser Einlagerung wird α -Actinin teilweise durch Myosin ersetzt, sodass eine gestreifte Verteilung dieser zwei Proteine entlang der Stressfasern entsteht [38]. Wie im oberen Abschnitt (3.2.4) für filopodiale Aktinfasern gezeigt wurde, enthalten diese Palladin und α -Actinin innerhalb des Lamellipodiums. Fascin wurde hier bereits gegen α -Actinin ausgetauscht, welches Aktinfilamente sehr dicht vernetzt [52] und eine Einlagerung von Myosin II verhindern würde. Daher wurde vermutet, dass α -Actinin die filopodiale Aktinfilamente aufweitet und somit den Myosin-Einbau reguliert. Dies wurde als erstes anhand von Immunfluoreszenzfärbungen gegen Aktin (rot) und Myosin II (grün) überprüft (siehe Abb. 3.12 A). Diese Färbungen zeigten ein deutliches Signal von Myosin II innerhalb sowie am Ende filopodiale Aktinbündel im Lamellipodium (Abb. 3.12 A, rechts, Pfeilspitzen). Hingegen konnte kein Myosin II im Filopodium selber entdeckt werden. Dies konnte mit Lebendzelluntersuchungen bestätigt werden. Dazu wurden Doppeltransfektionen mit YFP-MLC (*Myosin light chain*) und DsRed- α -Actinin an mobilen Keratinozyten durchgeführt (Abb. 3.12 B). Auch hier konnte kein Myosin in filopodiale Fortsätze gefunden werden. Jedoch konnte die dynamische Myosin-Einlagerung in α -Actinin-haltige filopodiale Aktinfasern gezeigt werden. Dabei wurde Myosin entlang der Aktinbündel eingebaut und ersetzte hier teilweise α -Actinin (Abb. 3.12 B, rechts, Pfeilspitze), erkennbar durch eine Intensitätsreduktion von α -Actinin mit gleichzeitiger Intensitätszunahme des Myosin-Signals in den entsprechenden Bereichen.

3.2.6 Kopplung von Fokaladhäsionen an filopodiale Aktinbündel reduziert den retrograden Fluss

Der Einbau von Myosin II ließ darauf schließen, dass filopodiale Aktinfasern eine wesentliche Rolle während der Krafterzeugung spielen könnten. Dies wurde zuerst mittels Aktinflussmessungen getestet, da Myosin II den retrograden Aktinfluss innerhalb des Lamellipodiums sowie in Filopodien kontrolliert [69, 3, 17]. Außerdem ist bekannt, dass eine feste Anbindung von Aktin an FAs den Aktinfluss verringert [29, 39]. Diese Anbindung wäre jedoch eine wichtige Voraussetzung für eine effektive Kraftübertragung der filopodiale Aktinbündeln. Zu diesem Zweck wurden Keratinozyten mit GFP-Aktin transfiziert und EGF-stimuliert. Schmale Streifen wurden in die GFP-markierten filopodiale Aktinfasern gebleicht, um den retrograden Fluss sichtbar zu machen (siehe Abb. 3.13 A und B). Es wurden nur stabile Filopodien zur Messung verwendet, deren Aktinbündel weit in das Lamellipodium hineinreichten. Der Aktinfluss wurde von filopodiale Aktinfasern mit FA-Anbindung (Abb. 3.13 A) bestimmt und mit den Flussraten von Filopodien ohne stabile FAs (Abb. 3.13 B) verglichen. Stabile FAs wurden hier mittels Reflexionsmikroskopie bestimmt. Diese Experimente ergaben einen deut-

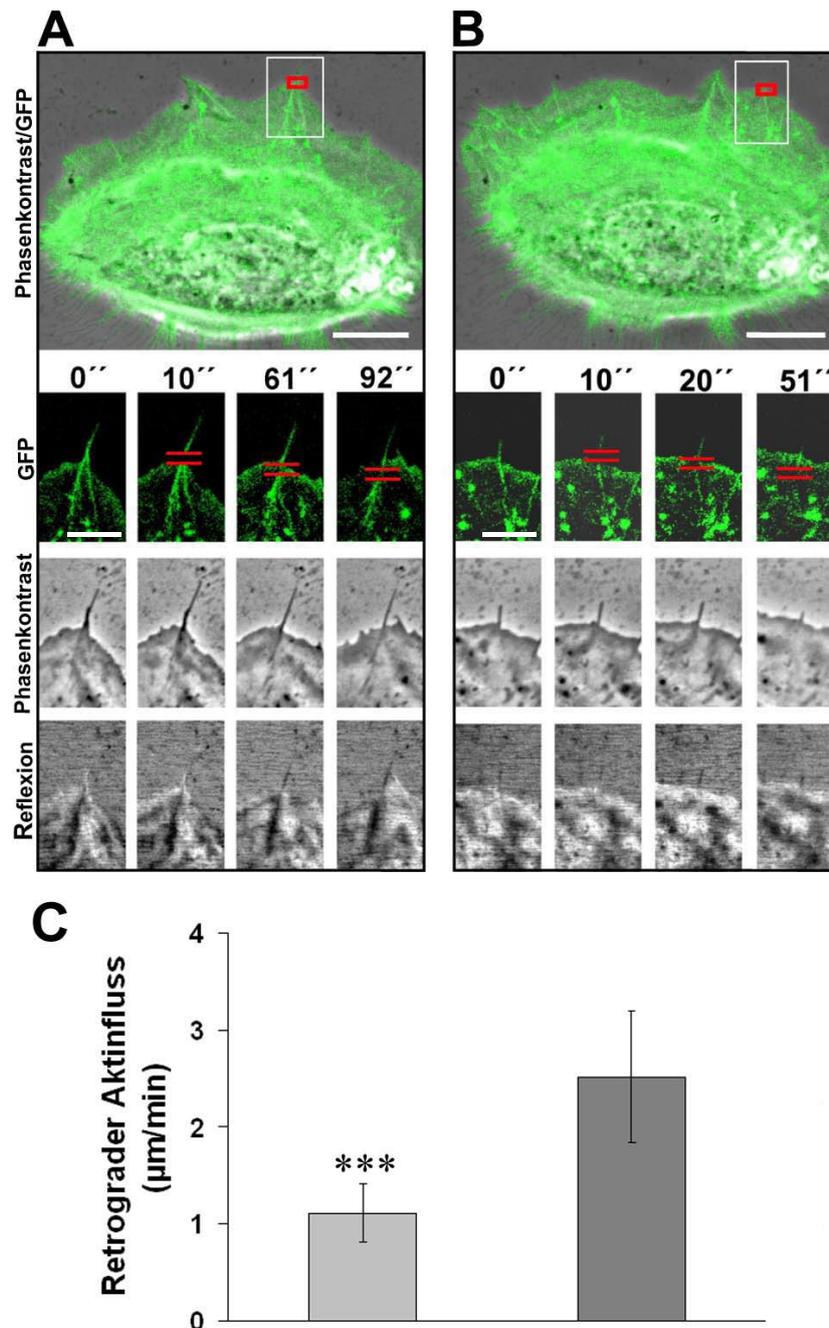


Abbildung 3.13: **Retrograde Aktinfluss-Messungen innerhalb filopodiale Aktinbündel** - Für die Messungen wurden Keratinozyten mit GFP-Aktin transfiziert und EGF-stimuliert. Schmale Streifen wurden in filopodiale Aktinfasern gebleicht, um den retrograden Aktinfluss innerhalb der Filopodien mit stabiler (A) und ohne stabiler FA (B) messen zu können. FAs wurden mittels Reflexion identifiziert. Die weißen Rahmen zeigen den vergrößerten Ausschnitt der Zeitserie und die roten Rahmen markieren die Bleich-Regionen. Die retrograde Bewegung der Bleichstreifen ist mit den roten Linien angedeutet. Die Zeitschritte sind in Sekunden angegeben. Gebleicht wurde zum Zeitpunkt 10 s. Zur besseren Darstellung wurde der Hintergrund des GFP-Signals vom Originalbild subtrahiert (siehe Abschnitt 2.5.4). Maßstabsbalken = 10 μm und in den Zeitserien = 5 μm . (C) zeigt die mittleren Aktinfluss-Geschwindigkeiten filopodiale Aktinbündel mit (hellgrau, n = 18, aus 9 Zellen) und ohne (dunkelgrau, n = 15, aus 6 Zellen) FA-Anbindung. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied (P -Wert < 0,001) an.

lich messbaren retrograden Fluss innerhalb der filopodialen Aktinbündel. Außerdem zeigte sich, dass der retrograde Aktinfluss in filopodialen Aktinfilamenten mit stabilen FAs im Vergleich zu Aktinbündeln ohne FA-Anbindung (Abb. 3.13 C) signifikant (P -Wert $< 0,001$) reduziert war. Der mittlere Aktinfluss von filopodialen Aktinfasern mit FAs betrug $1,11 \mu\text{m}/\text{min}$ ($\sigma = 0,29 \mu\text{m}/\text{min}$, $n = 18$, aus 9 Zellen), hingegen wiesen filopodiale Aktinbündel ohne stabile FAs eine mehr als doppelt so schnelle Flussrate von $2,52 \mu\text{m}/\text{min}$ ($\sigma = 0,68 \mu\text{m}/\text{min}$, $n = 15$, aus 6 Zellen) auf. Diese signifikante Verringerung der Flussrate durch die Lokalisation von FAs hinter Filopodien zeigte deutlich, dass stabile FAs effektiv mit filopodialen Aktinbündeln verbunden waren.

3.2.7 Hohe Krafttransmission korreliert mit Wachstum und Stabilität der Fokaladhäsionen

Die bisherigen Untersuchungen haben einen funktionalen Proteinaufbau der filopodialen Aktinbündel und eine effiziente Kopplung an filopodiale FAs gezeigt. Beides stellt eine essentielle Voraussetzung für eine effektive Krafterzeugung dar, welche einen kraftinduzierten Stabilisierungsprozess der filopodialen FXs zu FAs hervorrufen könnte. Diese Hypothese sollte im Folgenden mittels Zellkraft-Messungen an migrierenden Keratinozyten getestet werden. Dazu wurden Keratinozyten auf elastische Silikon-Substrate mit fluoreszenten Kugeln ausgesät und mit GFP-Vinculin transfiziert (siehe Abb. 3.14 A, Film 9). Die Substratdeformation durch die Zellkraft wurde mit Hilfe der eingebetteten, fluoreszenten Kugeln sichtbar gemacht. Die Kugeln lagen alle in der Oberschicht der Silikon-Substrate mit einer Schichtdicke von $\approx 0,5 \mu\text{m}$. Die Verschiebungsvektoren der Kugeln zeigten alle in Richtung Zellmittelpunkt, wobei die größten Verschiebungen seitlich im hinteren Teil der Zelle erzeugt wurden (Abb. 3.14 A, Film 9). Für die Berechnung der Kräfte pro FA wurden nur Zellen verwendet, die eine konstante Migrationsgeschwindigkeit aufwiesen. Zusätzlich wurden ausschließlich FAs in die Kraftauswertung einbezogen, die vorne am Leitsaum neu entstanden. Dies verhinderte eine Fehlinterpretation der Ergebnisse aufgrund einer generell höheren Krafttransmission seitlicher FAs sowie während einer Verlangsamung der Zellmigration. Außerdem konnte so die Einteilung neugebildeter FAs in stabil und instabil beibehalten werden. Auch hier wurde der Schwellenwert von 6 min verwendet. Dabei wurde aufgrund der bisherigen Ergebnisse angenommen, dass stabile FAs aus filopodialen FXs mit Anbindung an filopodiale Aktinbündel entstanden waren, da die Lokalisation von Filopodien auf Silikon-Substraten aufgrund der Mikrostruktur (siehe Abschnitt 2.3.3) mikroskopisch nicht möglich war. Analysen stabiler und instabiler FAs erbrachten das gleiche morphologische Verhalten auf elastischen Substraten (siehe Abb. 3.14 B und C) wie auf harten Glasoberflächen (siehe Abb. 3.9). Hierbei wurden stabile FAs vergrößert und entlang der filopodialen Ausrichtung verlängert (Abb. 3.14 B), wohingegen instabile FAs kein Wachstum aufwiesen (Abb. 3.14 C). Dies zeigte, dass beide Systeme ähnliche Ergebnisse erbrachten. Sie wurden somit als vergleichbar angenommen.

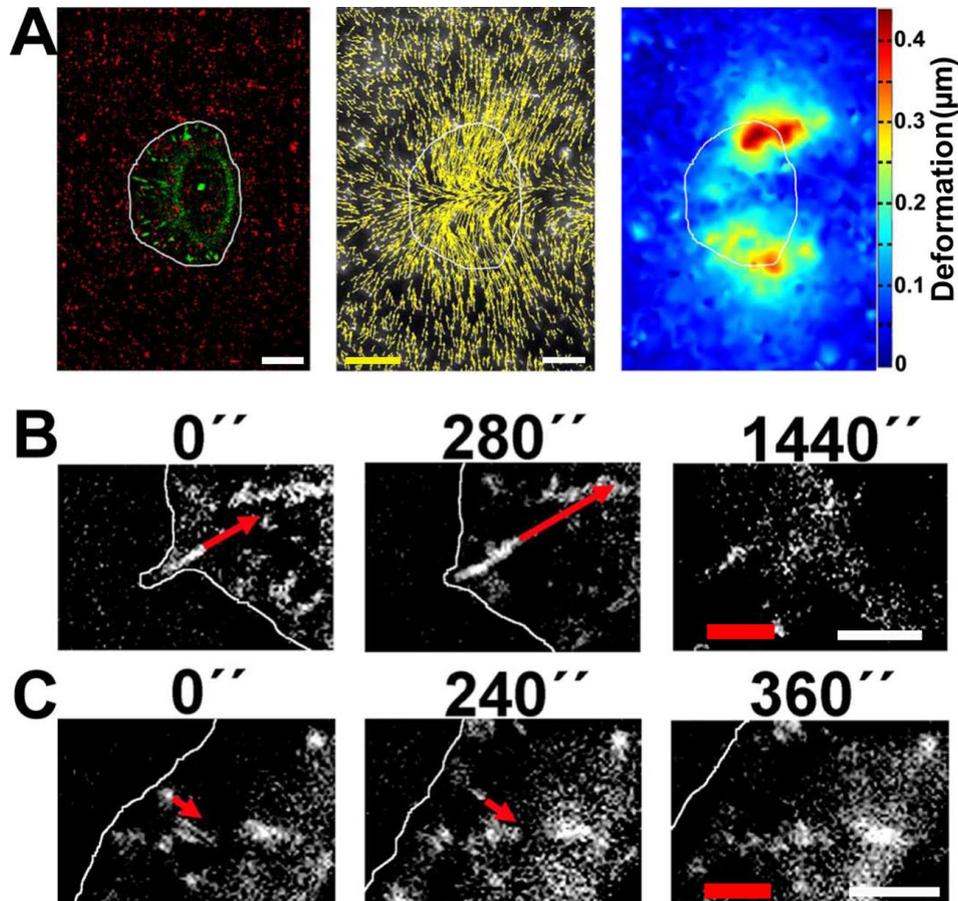


Abbildung 3.14: **FA-Stabilität und Wachstum hängen von der Krafttransmission ab** - GFP-Vinculin transfizierte Keratinozyten wurden auf elastische Silikon-Substrate mit fluoreszenten Kugeln ausgesät und EGF-stimuliert (A, links). Die Zellumrandung wurde mit der weißen Linie markiert. Die Verschiebungen der Kugeln durch die gleiche Zelle wurden mit gelben Vektorpfeilen (A, Mitte) sowie mittels Farbskala (A, rechts) dargestellt. Verschiebungsmaßbalken (gelb) = $0,5 \mu\text{m}$, Maßstabsbalken (weiß) = $10 \mu\text{m}$. Krafttransmission pro FA wurde für jede neugebildete FA berechnet (B und C). Der Schwellenwert von 6 min Lebensdauer wurde verwendet, um FAs als stabil (B, Lebensdauer über 6 min) und instabil (C, Lebensdauer unter 6 min) zu klassifizieren. Die roten Pfeile zeigen den Wert der Krafttransmission pro FA. Das letzte Bild der Zeitserie stellt den Zeitpunkt des FA-Abbaus dar und die weißen Linien markieren die Zellgrenzen. Stabile FAs zeigten ein deutliches Wachstum mit gleichzeitiger Erhöhung der Krafttransmission. Die Zeitschritte sind in Sekunden angegeben. Kraftmaßbalken (rot) = 3 nN . Maßstabsbalken = $5 \mu\text{m}$. Der Hintergrund des GFP-Signals wurde von den GFP-Aufnahmen zur besseren Visualisierung subtrahiert.

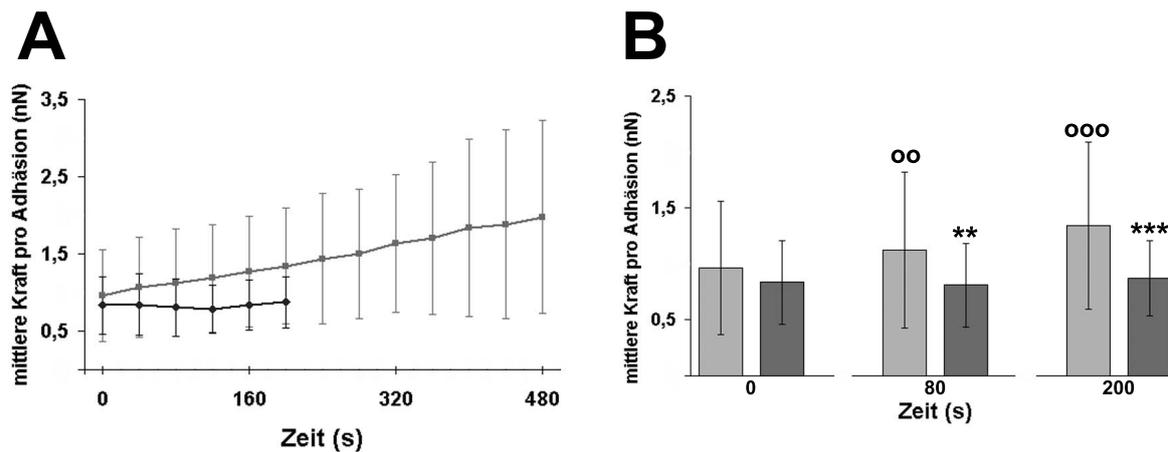


Abbildung 3.15: **Stabile Adhäsionen übertragen ansteigende und höhere Kräfte als Unstabile** - In (A) ist die Krafttransmission von stabilen (grau) und unstabilen (schwarz) FAs für die ersten 8 min dargestellt. (B) zeigt die mittleren Kräfte pro FA für stabile (hellgrau) und unstabile (dunkelgrau) FAs an verschiedenen Zeitpunkten. Die Sternchen zeigen einen signifikanten Unterschied zwischen stabilen und unstabilen FAs innerhalb eines Zeitpunkts. Der signifikante Anstieg der Krafttransmission von stabilen FAs wurde mit Kreisen dargestellt. Es wurden die Werte zu den Zeitpunkten 80 s und 200 s mit dem Wert des Zeitpunkts 0 s verglichen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. ** und oo: P -Wert $< 0,01$; * * *: P -Wert $< 0,002$, ooo: P -Wert $< 0,001$

Die Deformationsanalysen ergaben eine ansteigende Krafttransmission der stabilen FAs im Verlauf des Wachstums. Hingegen zeigten unstabile FAs eine gleichbleibende Kraft (Abb. 3.14 B und C, Abb. 3.15). In Abbildung 3.14 B und C ist der Kraftverlauf (rote Pfeile) am Beispiel einer stabilen (Abb. 3.14 B) sowie einer unstabilen (Abb. 3.14 C) FA über die gesamte Lebensdauer dargestellt. Es ist der Zeitpunkt des Aufbaus der FA an dem Leitsaum der Zelle sowie der Kraftverlauf und der Zeitpunkt des Auflösens gezeigt. Diese Analyse an einzelnen FAs verdeutlichte, dass die stabile FA im Gegensatz zu der unstabilen FA eine höhere und ansteigende Kraft aufwies. Statistische Analysen der mittleren Kraft von stabilen und unstabilen FAs erbrachten das gleiche Ergebnis (Abb. 3.15, Tabelle 5). Hierbei wurde ein signifikanter Unterschied (P -Wert $< 0,01$) der Krafttransmission zwischen stabilen und unstabilen FAs bereits 80 s nach der Entstehung festgestellt, der 200 s nach dem Aufbau der FAs noch deutlicher wurde (P -Wert $< 0,002$). Zusätzlich konnte ein konstanter, signifikanter Anstieg der Krafttransmission bei stabilen FAs beobachtet werden, wohingegen die Kraft der unstabilen FAs unverändert blieb (Abb. 3.15 B, Tabelle 5). Dieser Unterschied ist in Abbildung 3.15 A deutlicher gezeigt. Hier ist der Zeitverlauf der mittleren Krafttransmission von stabilen ($n_{t=0} = 124$) und unstabilen ($n_{t=0} = 38$) FAs für jeden Messpunkt innerhalb der ersten 8 min einer Messung dargestellt. Vergleichbare Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Messungen erzielt.

Zusammenfassend zeigte sich, dass stabile FAs höhere und ansteigende Kräfte im Vergleich zu unstabilen FAs übertragen.

	stabile FA (nN)	unstabile FA (nN)	P-Wert
t = 0 s	0,95 ($\sigma = 0,59$, n = 124)	0,84 ($\sigma = 0,37$, n = 38)	-
t = 80 s	1,13 ($\sigma = 0,69$, n = 124)	0,81 ($\sigma = 0,37$, n = 35)	< 0,01
t = 200 s	1,34 ($\sigma = 0,75$, n = 124)	0,87 ($\sigma = 0,33$, n = 19)	< 0,002

Tabelle 5: Mittlere Kraftübertragung von stabilen und unstabilen FAs - Kraftmessungen wurden an migrierenden Keratinozyten durchgeführt. Der Schwellenwert von 6 min wurde verwendet, um FAs in stabil und unstabil einzuteilen. Die mittleren Kräfte von stabilen und unstabilen FAs wurden für jeden Zeitschritt berechnet. t = 0 s beschreibt den Zeitpunkt des FA-Aufbaus. Alle Datensätze wurden auf Normalverteilung geprüft. Die Datensätzen der stabilen FAs (t = 80 und 200 s) waren nicht normal verteilt. Zur Bestimmung der signifikanten Unterschiede der Mittelwerte wurde daher der U-Test verwendet. Der Probenumfang der unstabile FAs reduzierte sich aufgrund des FA-Abbaus über die Zeit.

3.2.8 Zusammenfassung

Filopodien sind essentielle Strukturen, die den Aufbau von FAs während der Migration regulieren. Sie enthalten bereits kleine filopodiale FXs, die die Position sowie die Form der meisten Adhäsionsstrukturen des Lamellipodiums bestimmen, wie in Abschnitt 3.1 gezeigt wurde. In diesem Abschnitt konnte geklärt werden, welche Faktoren die Umwandlung von filopodialen FXs zu stabilen FAs des Lamellipodiums kontrollieren und welche mechanischen Reize dazu notwendig sind. Dabei spielen filopodiale Aktinbündel eine wesentliche Rolle, die grundlegende Prozesse wie die Adhäsionsreifung sowie die Krafterzeugung während der Migration regulieren. In einem koordinierten, sukzessiven Prozess werden die filopodialen FXs mit den filopodialen Aktinfasern verbunden. Diese Bündel ändern vom Filopodium aus bis in das Lamellipodium hinein ihre funktionale Proteinzusammensetzung. Innerhalb des Filopodiums werden die Filamente mittels Fascin dicht vernetzt, welches im Lamellipodium durch Palladin und α -Actinin ersetzt wird. Somit werden die Filamente aufgeweitet, damit Myosin II eingelagert werden kann. Aufgrund des Einbaus von Myosin II in filopodiale Aktinfasern sowie deren Verbindung mit stabilen FAs bilden diese Aktinbündel kontraktile Stressfasern, die für die Krafterzeugung und Transmission an der Zellfront verantwortlich sind. Dadurch werden diese FAs effektiv stabilisiert und entlang dieser Filamente vergrößert. FAs hingegen, die innerhalb des Lamellipodiums ohne Anbindung an solche Aktinfasern entstehen, erfahren keine kraftinduzierte Stabilisierung und werden alsbald ohne deutliches Wachstum aufgelöst. Die im Kapitel 3.2 dargelegten Ergebnisse wurden im Rahmen einer Publikation sowie eines Übersichtsartikels veröffentlicht [102, 37].

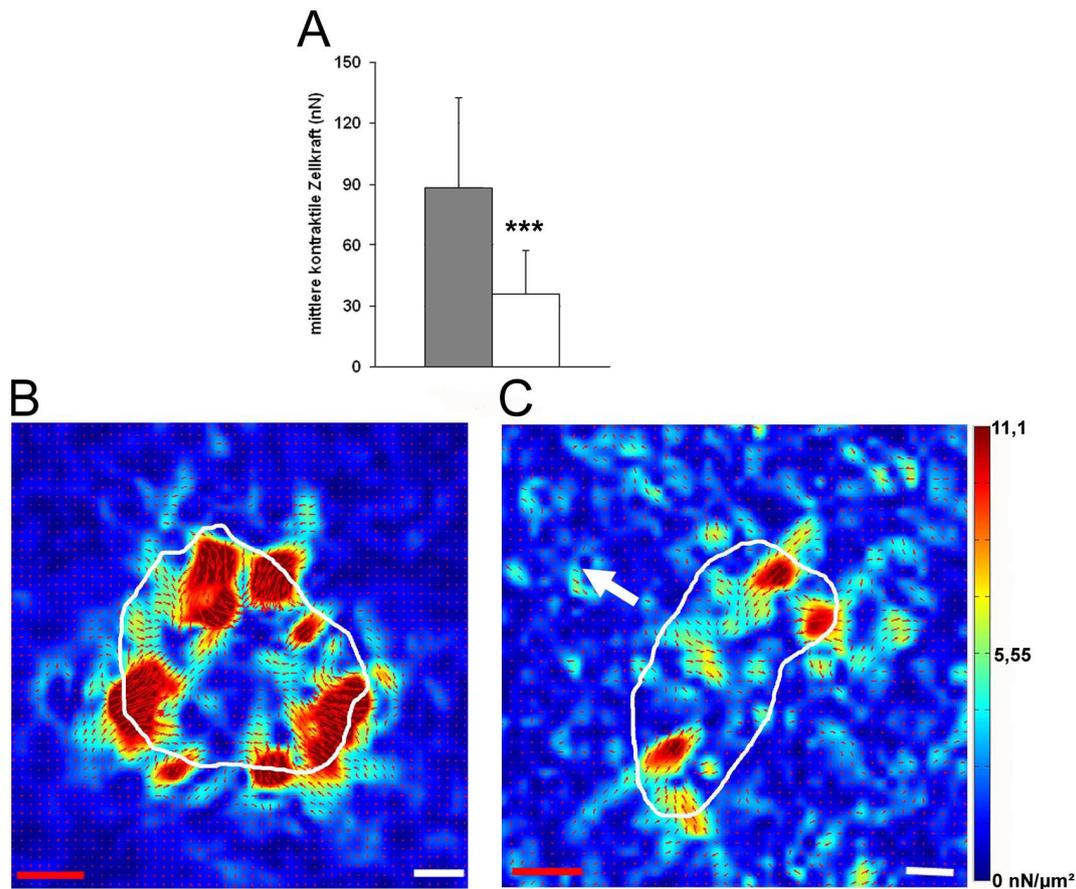


Abbildung 3.16: **Kontraktile Zellkraft sessiler und migrierender Keratinozyten** - (A) zeigt die Auswertung der mittleren kontraktile Zellkräfte sessiler (grau, $n = 20$) und migrierender (weiß, $n = 13$) Zellen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an. Die Signifikanz des Unterschieds (P -Wert $< 0,001$) der Mittelwerte ist mit Sternchen angedeutet. Die flächige Kraftschätzung ist beispielhaft für eine sessile (B) und eine migrierende (C) Keratinozyte gezeigt. Dazu wurden Keratinozyten auf elastische Silikon-Substrate mit fluoreszenten Kugeln ausgesät und EGF-stimuliert. Die Farbskala gibt die Kraft pro Fläche ($\text{nN}/\mu\text{m}^2$) wieder. Die roten Pfeile stellen die Kraftvektoren pro Gitterelement dar. Gitterelementgröße in (B) = $1,99 \times 1,99 \mu\text{m}$ und in (C) = $2,29 \times 2,29 \mu\text{m}$. Die weißen Linien markieren die Zellränder. In (C) ist die Migrationsrichtung der Zelle mit einem weißen Pfeil angezeigt. Es zeigte sich, dass sessile Zellen größere Kräfte aufwiesen als migrierende Zellen. Maßstabsbalken (weiß) = $10 \mu\text{m}$. Kraftmaßbalken (rot) = 2 nN .

3.3 Zusammenspiel von Zellkraft und Matrix-Sekretion

Das Wechselspiel zwischen Aufbau, Degeneration und Festigkeit der extrazellulären Matrix (ECM) reguliert viele, wichtige Prozesse wie die Differenzierung von Zellen, Wundheilung, Embryogenese und Inflammation. Fehlfunktionen der Regulationen dieser Prozesse können Krankheiten wie Krebs verursachen. Zum Beispiel wird die Festigkeit eines Gewebes dazu verwendet Tumore zu identifizieren.

Sämtliche in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Analyse zellulärer Kräfte beruhen

auf der Grundannahme, dass Substratdeformationen vollständig durch permanente Kontraktion der Zelle hervorgerufen werden. Allerdings verändern Zellen bei Adhäsion jedoch gleichzeitig aktiv ihr Substrat durch Sekretion selbst-gebildeter Matrix-Proteine. Dass diese Sekretion einen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Zellen hat, konnte in Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen bereits gezeigt werden. So wurde für hoch mobile Krebszelllinien gefunden, dass diese weniger ECM-Proteine sekretierten [84]. Hingegen verursachte eine Erhöhung der Fibronectin-Expression in Krebszellen eine reduzierte Motilität [2]. Da die in den ersten Abschnitten (3.1 und 3.2) dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse auch eine Abhängigkeit zwischen Migration, Adhäsion und Krafterzeugung aufgezeigt hatten, wurde in diesem Abschnitt das genaue Zusammenspiel von Zellkraft, Motilität und ECM-Sekretion in sessilen und migrierenden Keratinozyten näher untersucht.

3.3.1 Sessile Zellen erzeugen größere Kräfte als migrierende Zellen

Zunächst wurde die kontraktile Zellkraft sessiler und migrierender Zellen ermittelt. Dazu wurden Keratinozyten auf elastische Silikon-Substrate mit fluoreszenten Kugeln ausgesät. Wie im Abschnitt 3.2.7 beschrieben, lagen auch hier die fluoreszenten Kugeln innerhalb der obersten Schicht der Substrate. Zur Berechnung der kontraktilen Zellkraft wurde die flächige Kraftschätzung nach Sebastian Houben verwendet, da die Positionen der FAs bei dieser Analyse nicht bekannt waren (siehe Abschnitt 2.5.8). Unterschieden wurde dabei zwischen sessilen und migrierenden Keratinozyten. Als migrierend galten Keratinozyten, die deutlich polarisiert waren. Stichprobenartig wurde dies durch kurze Aufnahmen einer Zeitserie vor Experimentbeginn überprüft. Alle polarisierten Zellen zeigten die typische Kraftverteilung einer migrierenden Zelle mit den größten Kräften in den hinteren Seitenbereichen (siehe Abb. 3.16 C). Sessile Zellen zeigten keine Polarisierung und wiesen daher eine annähernd runde Form auf. Die Kraftmaxima waren hier typischerweise gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt (siehe Abb. 3.16 B). Dies bestätigte, dass die Einteilung nach der Morphologie der Zelle verlässlich war. Die Auswertung der kontraktilen Zellkraft ergab einen signifikanten (P -Wert $< 0,001$) Unterschied zwischen sessilen und migrierenden Zellen (siehe Abb. 3.16 A). Die mittlere kontraktile Zellkraft sessiler Keratinozyten betrug 89 nN ($n = 20$, $\sigma = 44$ nN) und war damit mehr als doppelt so hoch wie die migrierender Keratinozyten. Diese Zellen wiesen eine mittlere Zellkraft von 36 nN ($n = 13$, $\sigma = 21$ nN) auf. Somit wurde deutlich, dass Keratinozyten während der Migration geringere Kräfte auf das Substrat ausüben.

3.3.2 Sessile Zellen speichern mehr Kraft in ihrer Matrix als Migrierende

Da die erzeugten Substratdeformationen sessiler und migrierender Keratinozyten stark unterschiedlich waren, wurde im Folgenden der Einfluss der ECM auf die kontraktile Zellkraft genauer analysiert. Zu diesem Zweck wurde ein neuartiges Protokoll entwickelt. Dieses ermöglichte die Unterscheidung zwischen Zellkräften, die durch den kontraktilen Apparat der

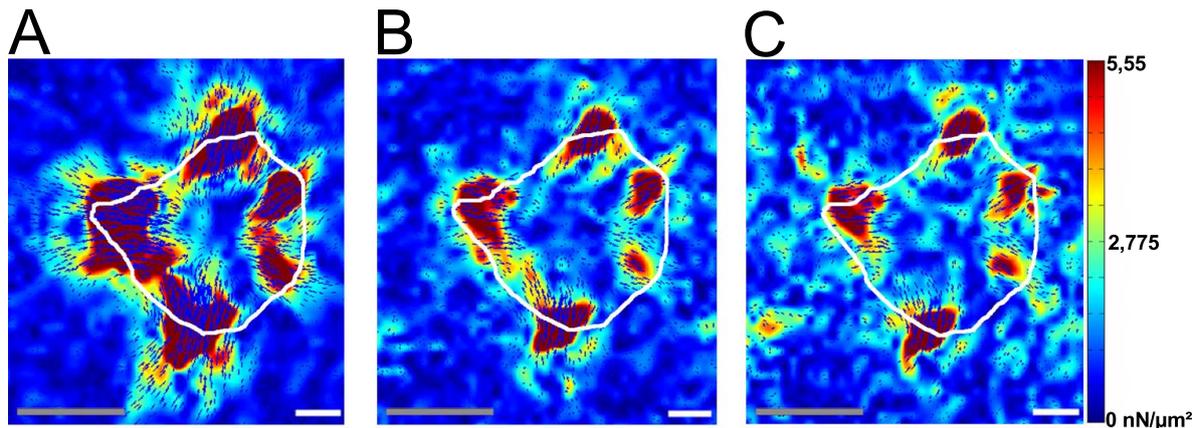


Abbildung 3.17: **Differenzierung zwischen Zellkräften und Kräften innerhalb der ECM** - (A) zeigt die flächige Kraftschätzung als Farbskala ($\text{nN}/\mu\text{m}^2$) überlagert mit der Original-Substratdeformation (blaue Pfeile) der Zelle vor CytoB-Behandlung. Zu diesem Zeitpunkt wies die Zelle eine kontraktile Zellkraft von 39 nN auf. (B) zeigt die gleiche Zelle nach CytoB-Behandlung. Die kontraktile Kraft verringerte sich auf 19 nN. Die restliche Deformation sowie die flächige Kraftschätzung nach dem Ablösen der Zelle mit Trypsin ist in (C) gezeigt. Die kontraktile Kraft betrug nach dem Entfernen der Zellreste noch 17 nN. Das Hintergrundrauschen dieser Messung betrug 0,7 nN. Es wurde deutlich, dass die CytoB-Behandlung alle Zellkräfte effektiv zerstörte. Die Zellposition zum Zeitpunkt vor CytoB ist weiß umrandet. Deformationsmaßbalken (grau) = $0,8 \mu\text{m}$. Maßstabsbalken (weiß) = $10 \mu\text{m}$.

Zelle erzeugt wurden, und Kräften, die in der ECM konserviert waren. Das Protokoll ist im Detail in Abschnitt 2.5.8 beschrieben. Zur Inaktivierung der kontraktile Zellkraft wurde das Aktinzytoskelett mittels Cytochalasin B zerstört. In Kontrollexperimenten konnte bestätigt werden, dass diese CytoB-Behandlung effektiv war (siehe Abschnitt 3.3.7, Abb. 3.27). Aufgrund dieser Kontrollen wurde angenommen, dass die Zelle nach der CytoB-Behandlung keine aktiven Kontraktionskräfte mehr auf das Substrat ausüben konnte, sodass alle restlichen Deformationen durch die sekretierte ECM der Zelle verursacht wurden. Um dies zu überprüfen, wurde nach jeder CytoB-Behandlung die Zelle zusätzlich mit Trypsin abgelöst. So konnte ausgeschlossen werden, dass die verbliebene Substratdeformation durch andere Zytoskelett-Bestandteile erzeugt wurde. Eine solche Untersuchung ist in Abbildung 3.17 beispielhaft an einer sessilen Zelle gezeigt. Die kontraktile Zellkraft der Zelle betrug vor CytoB-Behandlung 39 nN (Hintergrundrauschen der Messung: 0,7 nN, Abb. 3.17 A). Durch Depolymerisation des Aktinzytoskeletts verringerte sich die kontraktile Kraft auf 19 nN (Hintergrundrauschen der Messung: 0,7 nN, Abb. 3.17 B). Nach dem Entfernen aller verbliebener Zellreste konnte noch eine Kraft von 17 nN (Hintergrundrauschen der Messung: 0,7 nN) gemessen werden (Abb. 3.17 C). Dies zeigte, dass das Protokoll geeignet war, um Kräfte in der ECM nach Aktindepolymerisation zu messen. Die leichte Verringerung der Kräfte nach Trypsin-Behandlung ist durch den allmählichen Verdau der ECM-Proteine zu erklären. Da die Trypsin-Behandlung jedoch schwer zu kontrollieren war und daher zu einer erhöhten Schwankung der Kraftschätzungen führte, wurde das Ergebnis der Kraftschätzung nach der

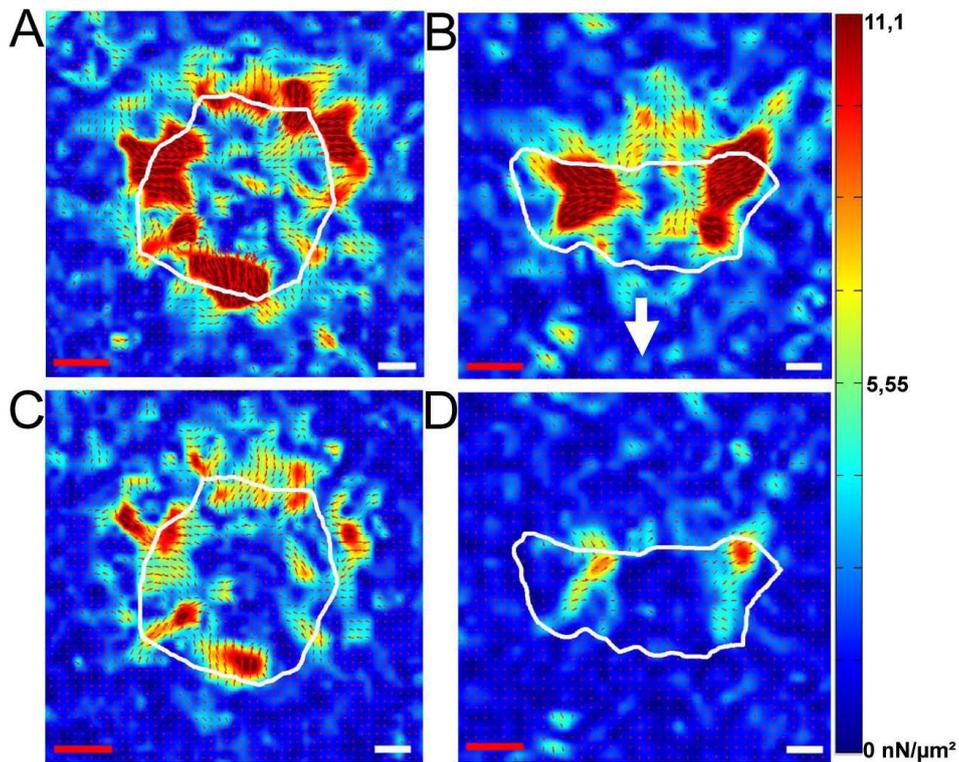


Abbildung 3.18: **ECM sessiler und migrierender Zellen konserviert Kräfte und deren Richtung** - Die flächigen Zellkräfte einer sessilen Zelle sind in (A) dargestellt. (C) zeigt die Auswertung der gleichen Zellen nach CytoB-Zugabe. In (B) sind die flächigen Zellkräfte einer migrierenden Zelle dargestellt und (D) zeigt die Kräfte in der ECM der gleichen Zelle aus (B). Es wurde jeweils die flächige Kraft als Farbskala ($\text{nN}/\mu\text{m}^2$) mit den Kraftvektoren (rote Pfeile) der Gitterelemente überlagert. Gitterelementgröße in (A und C) = $2,13 \times 2,13 \mu\text{m}$ und in (B und D) = $2,62 \times 2,62 \mu\text{m}$. Die Zellumrandungen sind weiß markiert. Der weiße Pfeil in (B) gibt die Migrationsrichtung an. Maßstabsbalken (weiß) = $10 \mu\text{m}$. Kraftmaßbalken (rot) = 2 nN .

CytoB-Behandlung als Wert der Kraft innerhalb der ECM für alle Experimente verwendet. Dies war vertretbar, da in drei unabhängigen Experimenten die gemessene Kraft nach CytoB-Behandlung und nach Trypsin im Rahmen der Messgenauigkeit unverändert blieb. Außerdem konnte durch Langzeit-Relaxationsmessungen an Silikon-Substraten ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Deformationen innerhalb der ECM durch einen viskoelastischen Effekt des Substrats hervorgerufen wurden (siehe Abschnitt 3.3.7, Abb. 3.28). Diese Kontrollen waren wichtig, da zwischen der Aufnahme der Bilder vor und nach CytoB-Behandlung nur 15 min und zwischen den Aufnahmen nach CytoB und nach Trypsin meist nicht mehr als 2 min lagen.

Für die Analyse der kontraktilen Kräfte innerhalb der ECM wurde zwischen sessilen und migrierenden Keratinozyten unterschieden. Die Auswertung der flächigen Kraftschätzung ist am Beispiel einer sessilen (siehe Abb. 3.18 A und C) und einer migrierenden (siehe Abb. 3.18 B und D) Zelle dargestellt. Abbildung 3.18 A und B zeigen jeweils die flächige Zellkraft vor der CytoB-Behandlung und in 3.18 C und D ist die Kraft innerhalb der ECM dargestellt. Es zeigte sich, dass sessile sowie migrierende Keratinozyten Kräfte in ihrer ECM konservierten. Dabei behielten die Kraftvektoren nach Depolymerisation des Aktinzytoskeletts (3.18 C und D) größtenteils ihre ursprüngliche Richtung (vgl. 3.18 A und B) bei und zeigten immer zum Zellinneren. Dies zeigte deutlich, dass die ECM nicht nur einen bestimmten Anteil der Beiträge, sondern auch die Ausrichtung der Zellkräfte konservierte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sessile Zellen im Vergleich zu migrierenden Zellen signifikant (P -Wert $< 0,001$) mehr Kräfte mit ihrer ECM erhielten (3.19 A und B). Für sessile Keratinozyten ergab die Kraftschätzung einen Mittelwert von 44 nN ($n = 20$, $\sigma = 28$ nN). Dies bedeutete, dass sessile Zellen 48% ($\sigma = 15\%$) ihrer gesamten kontraktilen Zellkraft mittels ihrer ECM aufrecht erhielten. Bei migrierenden Zellen betrug die mittlere Kraft in der ECM 11 nN ($n = 13$, $\sigma = 9$ nN). Diese entsprachen 27% ($\sigma = 14\%$) der kontraktilen Gesamtkraft.

Eine Übersicht aller Einzelwerte des prozentualen Anteils der ECM an der kontraktilen Zellkraft ist in Abbildung 3.20 gezeigt. In dieser wurde der prozentuale Kraftanteil der ECM zum einem gegen die kontraktile Zellkraft (Abb. 3.20 A) und zum anderen gegen die kontraktile Kraft in der ECM (Abb. 3.20 B) aufgetragen. Auch hier wurde der Unterschied zwischen sessilen und migrierenden Zellen deutlich. Außerdem ließ sich hier ein Zusammenhang zwischen der Höhe der kontraktilen Kraft in der ECM und deren prozentualen Anteil an der Gesamtkraft feststellen. Dabei zeigte sich, dass je mehr Kraft in der ECM gespeichert wurde, desto geringer fiel der Anteil der eigenen Zellkraft an der Gesamtkraft aus.

Zusammenfassend wurde deutlich, dass Keratinozyten während der Migration im Vergleich zu sessilen Zellen geringere Kräfte in der ECM speicherten. Diese Kräfte spiegelten jedoch immer die ursprüngliche Richtung der Zellkräfte wider.

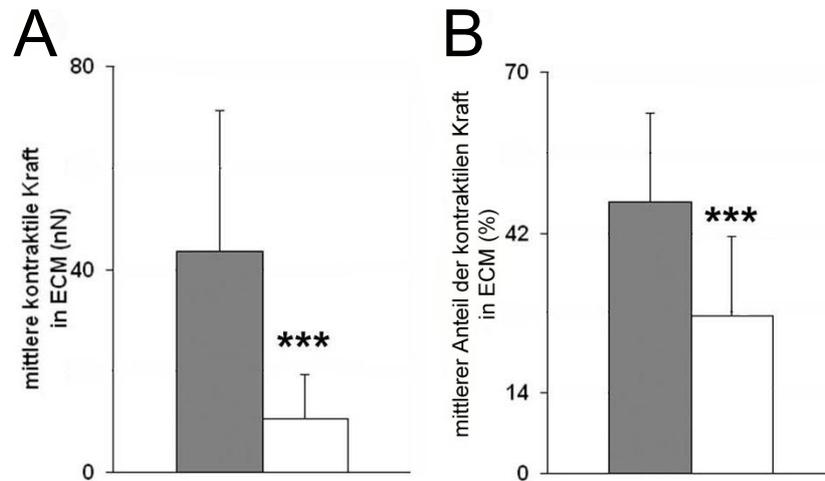


Abbildung 3.19: **Die statistische Auswertung der mittleren kontraktilen Kräfte in der ECM -** (A) Die mittleren kontraktilen Kräfte in nN von sessilen (grau, n = 20) Zellen sind im Vergleich zu migrierenden (weiß, n = 13) Zellen signifikant (P -Wert < 0,001) erhöht. (B) Das Gleiche zeigte sich auch für die Auswertung des mittleren prozentualen Anteils der ECM an der kontraktilen Zellkraft. Auch hier war die mittlere kontraktile Kraft in der ECM bei sessilen Zellen signifikant (P -Wert < 0,001) höher. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

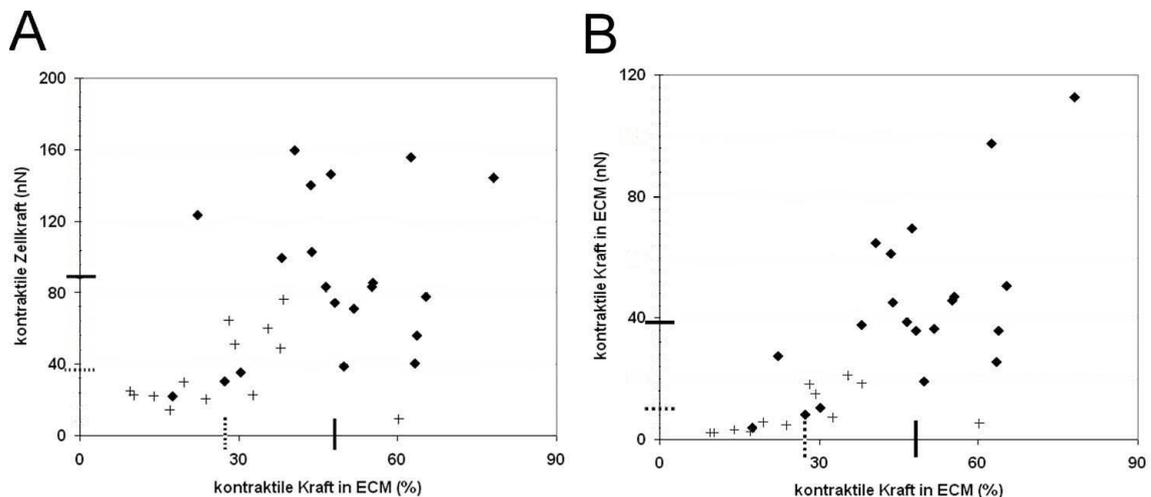


Abbildung 3.20: **Übersicht der Kraftmessungen an sessilen und migrierenden Keratinozyten -** (A) Die Einzelwerte der kontraktilen Zellkraft wurden gegen den Anteil der kontraktilen Kräfte der ECM in Prozent für sessile (Rauten) und migrierende (Kreuze) Zellen aufgetragen. (B) zeigt die Einzelwerte der kontraktilen Kraft in der ECM in Korrelation mit deren prozentualen Anteil an der Gesamtzellkraft. Die Mittelwerte wurden mit gestrichelten (migrierend) und schwarzen (sessil) Linien eingezeichnet.

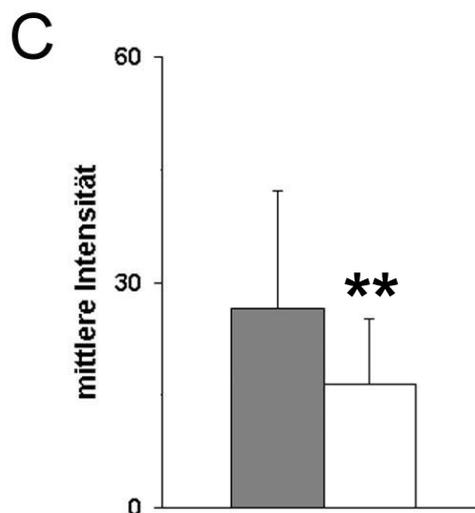
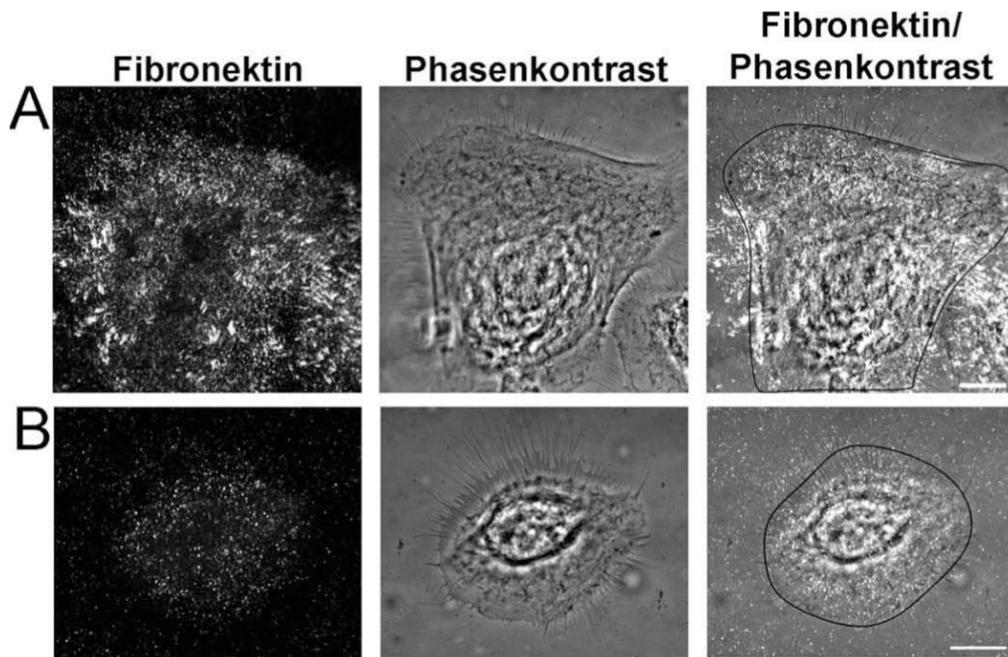


Abbildung 3.21: **Sessile Zellen sekretieren mehr Fibronektin** - Keratinozyten wurden mittels EGF stimuliert und danach fixiert. Anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen extrazelluläres Fibronektin angefertigt. Der Gehalt an sekretierter ECM wurde für sessile (A) und migrierende (B) Zellen anhand der Fluoreszenzintensitäten unterhalb der Zellen (schwarz umrandet) ermittelt. Sessile Zellen bildeten deutliche Fibronektin-Fibrillen. Maßstabsbalken = 10 μm . (C) Sessile Zellen (grau, $n = 35$) sekretierten im Vergleich zu migrierenden Zellen (weiß, $n = 28$) signifikant (P -Wert $< 0,01$) mehr Fibronektin. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

3.3.3 Migrierende Zellen sekretieren weniger Matrix als Sessile

In Abschnitt 3.3.2 wurde deutlich, dass Keratinozyten in ihrer ECM Kräfte speichern. Der direkte Vergleich sessiler und migrierender Zellen zeigte, dass sessile Zellen mehr kontraktile Kräfte mit ihrer ECM aufrecht erhielten. Im Folgenden wurde daher überprüft, ob dies durch eine erhöhte Fibronectin-Sekretion bedingt war. Dafür wurden Keratinozyten auf Glas-Substrate ausgesät. Die Vergleichbarkeit der Fibronectin-Sekretion auf Glas- und Silikon-Substraten wurde in Kontrollexperimenten bestätigt (siehe Abschnitt 3.3.7). Anschließend wurden die Zellen fixiert und mittels Immunfluoreszenz gegen extrazelluläres Fibronectin angefärbt. Auch hier wurde wieder zwischen sessilen und migrierenden Keratinozyten unterschieden. Als sessil galten Zellen, die keine Polarisierung oder deutliche Zell-Zell-Kontakte aufwiesen (siehe Abb. 3.21 A). Zellen, die polarisiert waren, wurden als migrierend eingeordnet (siehe Abb. 3.21 B). Der Gehalt an sekretierter ECM wurde anhand der Fluoreszenzintensitäten des Fibronectins unterhalb der Zelle quantifiziert. Daher wurden alle Einstellungen zur Bildaufnahme gleich gehalten. Um den Gehalt an sekretiertem Fibronectin unterhalb der Zelle zu bestimmen, wurde der Zellrand mit Hilfe der Phasenkontrast-Aufnahme markiert und die mittlere Intensität innerhalb des markierten Bereichs im Fluoreszenzkanal ermittelt. Die Auswertung ergab, dass sessile Keratinozyten im Vergleich zu migrierenden Zellen signifikant (P -Wert $< 0,01$) mehr Fibronectin sekretierten (Abb. 3.21 C). Dabei wiesen migrierende Zellen eine mittlere Intensität von 17 (Bereich von 0-255, $\sigma = 9$, $n = 28$) auf. Die mittlere Fluoreszenzintensität sessiler Zellen lag bei 27 (Bereich von 0-255, $\sigma = 16$, $n = 34$) und war damit im Vergleich zu migrierenden Keratinozyten fast doppelt so hoch. Außerdem konnte festgestellt werden, dass sessile Zellen deutliche Fibronectin-Fibrillen sekretiert hatten. Solche Fibrillen konnten nur selten direkt unterhalb migrierender Zellen entdeckt werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass der erhöhte Kraftanteil der ECM sessiler Zellen mit einer höheren Sekretion von ECM-Proteinen sowie mit der Bildung von Fibronectin-Fibrillen korrelierte.

Die gleiche Untersuchung wurde zusätzlich an einer Zelle durchgeführt, die aus dem sessilen Zustand in die Migration überging (siehe Abb. 3.22, Film 10). Dieses Experiment bestätigte an einer Zelle, dass diese im sessilen Zustand (Abb. 3.22, 1. Bild der Zeitserie) mehr Fibronectin und vor allem Fibronectin-Fibrillen sekretierte. Die Fibronectin-Fibrillen schienen besonders fest mit dem Substrat verbunden zu sein, da keine Bewegung der einzelnen Fibrillen während der Zellmigration festzustellen war (siehe Film 10). Die Fibrillen waren sehr ortstabil und behielten ihre Länge sowie ihre Ausrichtung bei, während die Zelle über sie hinweg wanderte. Während der Zellmigration konnte nur wenig sekretiertes Fibronectin hinter der Zelle lokalisiert werden (Abb. 3.22, 2. und 3. Bild der Zeitserie). Außerdem zeigte die Zelle während der Migration keine erkennbare Fibrillen-Bildung.

3.3.4 Migrierende Zellen hinterlassen eine Spur aus Matrix-Proteinen

Wie schon in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, hinterlassen migrierende Zelle eine Migrationsspur, die aus ECM-Proteinen, Integrinen und Zellmembran besteht [48, 78]. Es

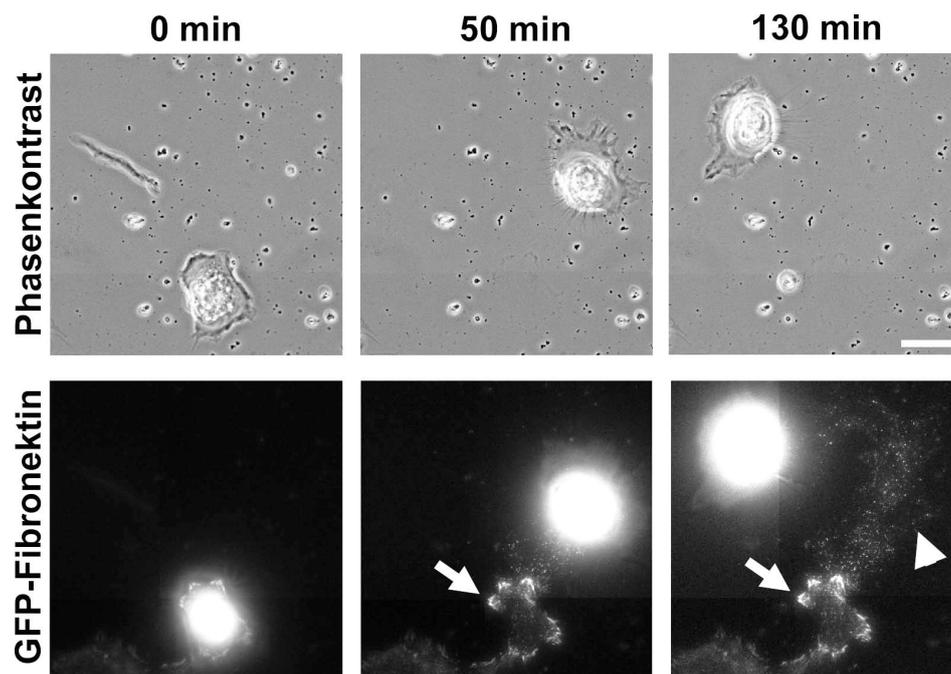


Abbildung 3.22: **Fibronektin-Sekretion während des Übergangs von sessil zu migrierend** - Keratinozyten wurden mit GFP-Fibronektin transfiziert und anschließend zur Migration stimuliert. Die Sekretion sowie die Fibrillen-Bildung wurden an einer Zelle untersucht, die aus dem sessilen Zustand in die Migration überging. Eine Bilderserie der Zelle ist in Phasenkontrast sowie in Fluoreszenz (GFP-Fibronektin) dargestellt. Es zeigte sich, dass die Zelle im sessilen Zustand (1. Bild der Zeitserie) mehr Fibronektin sekretierte und dabei Fibrillen bildete (weiße Pfeile). Während der Migration konnte keine Fibrillen-Bildung festgestellt werden (weiße Pfeilspitze). Die Aufnahmen wurden überbelichtet, um die Fluoreszenz des sekretierten Fibronektins hinter der Zelle sichtbar zu machen. Daher erschien die Fluoreszenz innerhalb der Zelle sehr hell. Maßstabsbalken = 10 μm . Siehe auch Film 10.

wird vermutet, dass die zurückgelassenen Proteine als Signal für nachfolgende Zellen fungieren und somit die Migrationsrichtung dieser Zellen beeinflussen können. Aus den vorherigen Abschnitten ging hervor, dass Zellen in ihrer ECM Kräfte in Betrag und Richtung speichern konnten. Ob solche mechanischen Signale der ECM auch innerhalb der Migrationsspur konserviert werden, sollte im Folgenden genauer untersucht werden.

In Lebendzelluntersuchungen an mit GFP-Fibronectin transfizierten Keratinozyten konnte nur selten während der Migration die Bildung von Fibronectin-Fibrillen beobachtet werden (siehe Abb. 3.22). Dies musste jedoch zunächst genauer untersucht werden, da Fibrillenbildung als Voraussetzung für die Speicherung messbarer, mechanischer Signale vermutet wurde. Zu diesem Zweck wurden Übersichtszeitserien migrierender Keratinozyten angefertigt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, sodass mittels Immunfluoreszenz die Migrationsspur angefärbt werden konnte. Diese Art der Untersuchung erlaubt die Analyse vieler Zellen während der Migration und nachfolgend der Bildung der Migrationsspuren der gleichen Zellen. Ein solches Experiment ist in Abbildung 3.23 gezeigt. Die ersten drei Bilder beschreiben den Migrationsweg der Zelle. Diese wanderte von oben nach unten im Bild und wieder zurück (siehe auch Film 11). Danach wurde die Probe fixiert und Aktin sowie extrazelluläres Fibronectin markiert. Man konnte deutlich eine Migrationsspur aus Fibronectin erkennen, die mit dem Migrationsweg der Zelle übereinstimmte. Innerhalb dieser Spur konnten vereinzelt kleine Fibronectin-Fibrillen identifiziert werden (Abb. 3.23, weiße Pfeile). Diese Fibrillen waren jeweils an den lateralen Seiten der Zelle lokalisiert und bildeten so zwei Streifen, die ein erhöhtes Fibronectin-Signal aufwiesen.

3.3.5 Die sekretierte Spur kann Kräfte ausüben

Im vorherigen Abschnitt (3.3.4) konnte gezeigt werden, dass migrierende Zellen eine Spur aus Fibronectin mit zum Teil eingelagerten, kleinen Fibronectin-Fibrillen sekretierten. Daher wurde analysiert, ob diese Migrationsspur ebenfalls Zellkräfte konservierte. Dazu wurden mobile Zellen auf elastischen Silikon-Substraten mit eingebetteten, fluoreszenten Kugeln ausgesät. Die Kraftanalyse der ECM wurde wie schon zuvor beschrieben (3.3.2) durchgeführt. Im Fokus der Untersuchung lag hier der Bereich direkt hinter migrierenden Zellen. So konnte sichergestellt werden, dass die entsprechende Migrationsspur auch zur untersuchten Zelle gehörte. Insgesamt wurden 13 migrierende Keratinozyten untersucht. Davon zeigten zwei deutliche Deformationen im Substrat direkt hinter den Zellen. Hinter den restlichen Keratinozyten konnten jedoch keine nachweisbaren Deformationen festgestellt werden (vgl. Abb. 3.16 C und Abb. 3.18 D, siehe Diskussion). Abbildung 3.24 zeigt exemplarisch eine migrierende Zelle, hinter welcher deutliche Deformationen erkennbar waren. Die stärksten Deformationen lagen direkt unterhalb der Zelle (weiß umrandet), jedoch erkannte man deutlich die Substratdeformation im Bereich direkt hinter der Zelle (Abb. 3.24 A). Diese Deformation wiesen auch hier wieder (vgl. Abschnitt 3.3.2) zum Zellinneren. Das Gleiche konnte auch für die flächige Kraftschätzung beobachtet werden (Abb. 3.24 B). Interessanterweise waren die Kräfte der ECM auf zwei lateralen Streifen konzentriert, sodass sich die größten

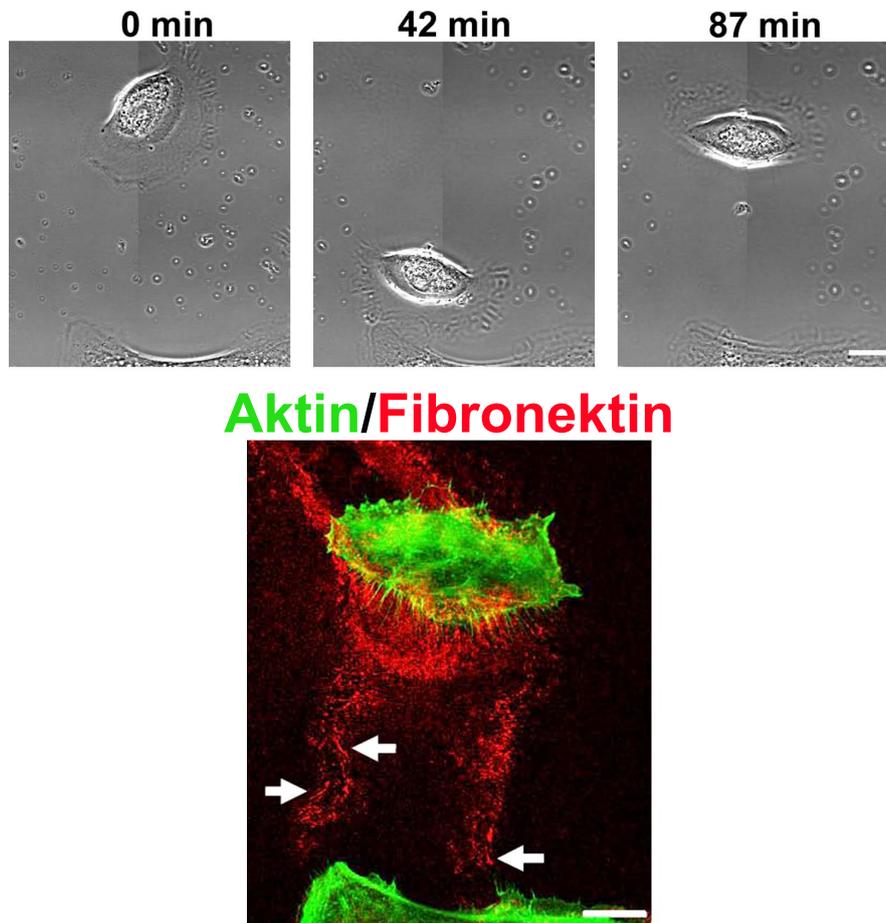


Abbildung 3.23: **Keratinozyten sekretieren eine Migrationsspur aus Fibronektin** - Keratinozyten wurden auf Glas-Substrate, die mit Gelatine beschichtet wurden, ausgesät. Danach wurden Übersichtszeitserien von mobilen Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend fixiert und Aktin sowie extrazelluläres Fibronektin wurden mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Die ersten drei Bilder zeigen die Zelle während der Migration. Die Zelle wanderte von oben nach unten im Bild und wieder zurück. Dargestellt ist ein Ausschnitt, der aus mehreren Einzelbildern zusammengesetzt wurde. Daher war die Zelle nicht ganz im Fokus und man erkennt die Kanten der Einzelbilder. Die anschließende Immunfluoreszenzaufnahme zeigt die Migrationsspur (rot, Fibronektin) sowie die entsprechende Zelle (grün, Aktin). Man erkannte kleine Fibronektin-Fibrillen in den Seitenbereichen der Spur (weiße Pfeile). Maßstabsbalken = 20 μm . Siehe auch Film 11.

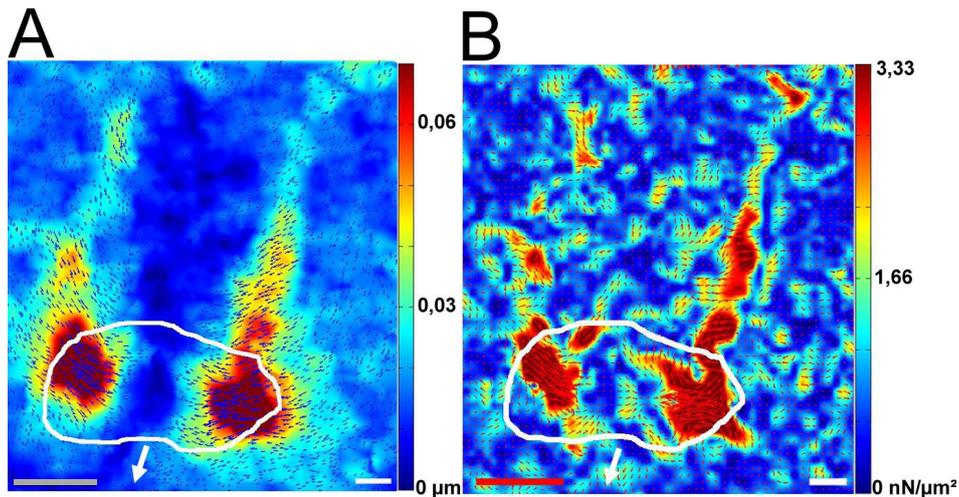


Abbildung 3.24: **Kontraktile Kräfte scheinen in der Migrationsspur gespeichert zu sein** - Keratinozyten wurden auf elastischen Silikon-Substraten mit fluoreszenten Kugeln ausgesät und zur Migration stimuliert. Die Substratdeformation (A) sowie die flächige Kraftschätzung (B) zeigten deutliche Kräfte innerhalb der Migrationsspur nach CytoB-Behandlung. (A) Die Verschiebungen der Kugeln wurden mit blauen Vektorpfeilen und mittels Farbskala verdeutlicht. In (B) ist die Auswertung der flächigen Kraft als Farbskala ($\text{nN}/\mu\text{m}^2$), überlagert mit den Kraftvektoren (rote Pfeile) eines jeden Gitterelements, dargestellt. Gitterelementgröße = $1,96 \times 1,96 \mu\text{m}$. Die ursprüngliche Zellposition ist weiß umrandet. Die weißen Pfeile geben die Migrationsrichtung an. Es wurde deutlich, dass die ursprüngliche Substratdeformation, erzeugt durch die Zelle, teilweise in der Migrationsspur konserviert wurde. Dabei behielten die Kraftvektoren sowie die Deformationsvektoren ihre Ausrichtung zum Zellinneren bei. (A) Deformationsmaßbalken (hellgrau) = $0,8 \mu\text{m}$. (B) Kraftmaßbalken (rot) = 1 nN . Maßstabsbalken (weiß) = $10 \mu\text{m}$.

Kräfte an den beiden, äußersten Seiten der Spur befanden. Dies stimmte mit der Anordnung der Fibronectin-Fibrillen in der Migrationsspur (siehe Abb. 3.23) überein. Diese Daten deuten darauf hin, dass auch während der Migration von Keratinozyten sekretiertes Fibronectin zu einem gewissen Anteil, das von der Zelle hervorgerufene Deformationsfeld, konservieren und dadurch Kräfte speichern kann.

3.3.6 Retraktionsfasern beeinflussen die Fibrillen-Bildung

Die Bildung von Fibronectin-Fibrillen scheint eine wesentliche Voraussetzung für die Speicherung von Zellkräften in der ECM zu sein. Doch wie genau diese Fibrillen in sessilen und migrierenden Zellen gebildet werden, ist unklar. Viele Untersuchungen zeigten, dass Fibronectin in globulärer Form von der Zelle sekretiert wurde und sich erst extrazellulär zu Fibrillen zusammen lagerte [67, 58]. In diesem Zusammenhang spielten das Aktinzytoskelett sowie die Kontraktilität der Zelle eine essentielle Rolle [60]. Im Folgenden wurde daher die Bildung der Fibronectin-Fibrillen während der Migration sowie deren besondere Anordnung an beiden Seiten der Migrationsspur näher untersucht.

In Immunfluoreszenzfärbungen gegen extrazelluläres Fibronectin fiel im Besonderen ei-

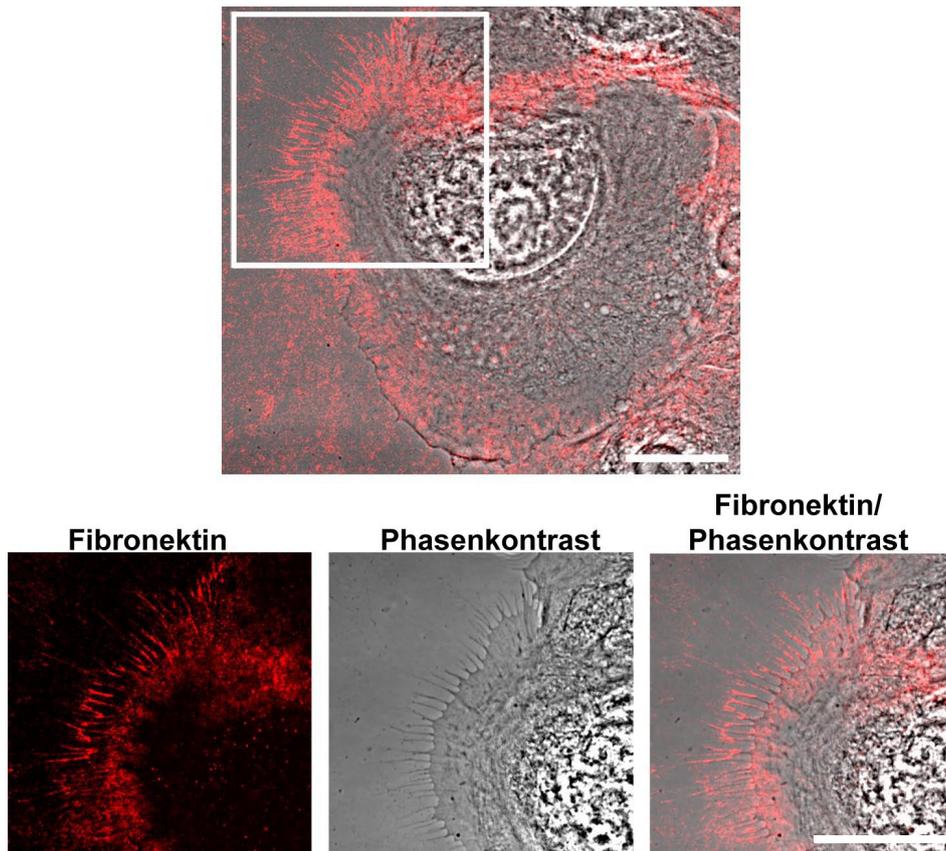


Abbildung 3.25: **Fibronectin-Fibrillen korrelieren mit der Lage der Retraktionsfasern** - Keratinozyten wurden auf Glas-Substrate, die mit Gelatine beschichtet wurden, ausgesät und mittels EGF zur Migration angeregt. Nachfolgend wurden die Zellen fixiert und extrazelluläres Fibronectin (rot) angefärbt. Das Übersichtsbild zeigt die gesamte Zelle in Phasenkontrast mit Fluoreszenz überlagert. Der weiße Rahmen markiert den Bereich, welcher vergrößert in den unteren Bildern dargestellt ist. Maßstabsbalken im Übersichtsbild und in der Vergrößerung = 10 μm . Man erkennt deutlich, dass Fibronectin-Fibrillen mit Retraktionsfasern kolokalisierten.

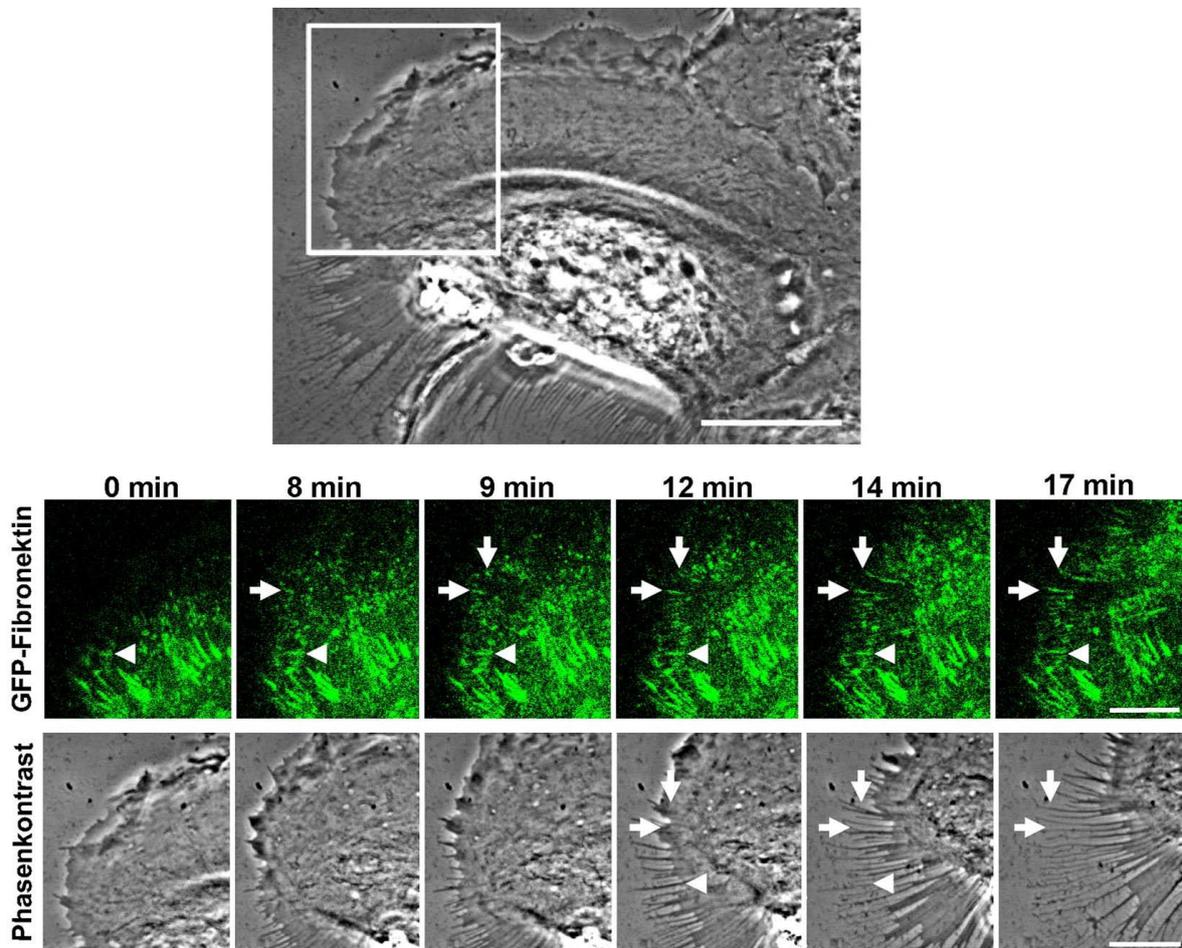


Abbildung 3.26: **Fibronectin-Fibrillen werden während der Migration innerhalb von Retraktionsfasern gebildet** - Mobile Keratinozyten wurden ausgesät und anschließend mit GFP-Fibronectin transfiziert. Die Zeitserien wurden in Phasekontrast und Fluoreszenz aufgenommen. Das Übersichtsbild zeigt die gesamte Zelle im Phasekontrast zum Zeitpunkt 0 min. Der vergrößerte Bereich, der nachfolgenden Zeitserie ist weiß umrandet. Maßstabsbalken = 20 μm . Die weißen Pfeile in den GFP-Aufnahmen markieren die Bildung von Fibrillen über die Zeit. Die Positionen der Pfeile wurden in den Phasekontrastaufnahmen gleich gehalten. Sie deuten die Kolokalisation von Fibrillen und Retraktionsfasern an. Maßstabsbalken = 10 μm . Siehe auch Film 12.

ne Kolokalisation von Fibronectin-Fibrillen mit Retraktionsfasern auf (siehe Abb. 3.25). Die Fibrillen befanden sich teilweise direkt im Bereich dieser Fasern, ragten aber manchmal auch über diese hinaus. Daher wurde der genaue, zeitliche Zusammenhang zwischen Fibronectin-Fibrillen und Retraktionsfasern mittels Lebendzelluntersuchungen näher analysiert. Dazu wurden Zellen mit GFP-Fibronectin transfiziert und anschließend EGF-stimuliert. Zeitserien von transfizierten Keratinozyten, die während der Migration Fibrillen sekretierten, wurden in Phasenkontrast und Fluoreszenz aufgenommen (Abb. 3.26). Es zeigte sich, dass die Fibrillen hinten, an beiden Seiten der Zelle gebildet wurden. In Abbildung 3.26 ist die Bildung von Fibrillen mit weißen Pfeilen innerhalb der GFP-Aufnahmen gekennzeichnet. Die Aufnahmen bestätigen die Kolokalisation von Retraktionsfasern und sekretiertem Fibronectin. Das sekretierte Fibronectin wurde anschließend in Fibrillen zusammen gelagert. Die Fibrillen erhielten jedoch erst ihre vollständige Länge und Form, nachdem sie innerhalb der Retraktionsfasern lang gezogen wurden (siehe Phasenkontrast, weiße Pfeile, Film 12).

Außerdem zeigen diese Aufnahmen, dass sekretierte Fibronectin-Fibrillen sehr stabil waren (vgl. Abschnitt 3.3.3). So konnten keine Veränderungen der Lage und Form bereits gebildeter Fibrillen, während die Zelle über diese migrierte, festgestellt werden (siehe auch Film 12).



Abbildung 3.27: **CytoB-Behandlung zerstörte effektiv das Aktinzytoskelett und Adhäsionsstellen** - Keratinozyten wurden 15 min mit 4 μM CytoB inkubiert und danach fixiert. Anschließend wurden die Zellen gegen Aktin und Vinculin angefärbt. Man erkannte, dass alle Strukturen zur Kraftübertragung zerstört waren. Maßstabsbalken = 10 μm .

3.3.7 Kontrollexperimente zur Matrix-Analyse

Die Aufnahme eines geeigneten Referenzbildes des entspannten Substrats ist die wichtigste Voraussetzung für eine exakte Kraftschätzung. Daher muss sichergestellt werden, dass vor der Aufnahme alle ECM-Proteine von dem Substrat gelöst werden und so keine Substratdeformationen mehr vorhanden sind. Zur Entfernung aller restlichen Proteine wurden die Proben mit 20 mM NH_4OH + 0,1 M NaCl inkubiert. Um nun zu überprüfen, ob diese Inkubation effektiv war, wurden die Proben nach der Behandlung fixiert und gegen zelluläres Fibronectin angefärbt. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem Cell Observer analysiert und es zeigte sich, dass die Behandlung der Substrate mit NH_4OH + 0,1 M NaCl das Fibronectin entfernte (Daten nicht gezeigt).

Zur Inaktivierung des kontraktilen Apparats der Zellen wurden diese mit $4 \mu\text{M}$ CytoB für 15 min inkubiert. Nach dieser Behandlung wurde angenommen, dass das Aktinzytoskelett depolymerisiert war und die Zelle keine kontraktilen Kräfte mehr auf das Substrat übertragen konnte. Dies wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen gegen Aktin und Vinculin überprüft. Dazu wurden Zellen auf Glas-Substrate ausgesät und EGF-stimuliert. Danach wurden sie 15 min mit $4 \mu\text{M}$ CytoB behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und Aktin sowie Vinculin angefärbt (siehe Abb. 3.27). Die Aufnahmen zeigten deutlich, dass die Dauer und die Konzentration der CytoB-Behandlung ausreichten, um das Aktinzytoskelett der Zelle vollständig zu depolymerisieren. Außerdem waren auch keine Adhäsionsstellen mehr erkennbar, sodass eine etwaige Übertragung restlicher Zellkräften vollständig blockiert wurde (vgl. Abb. 3.2 C und 3.13 A und B).

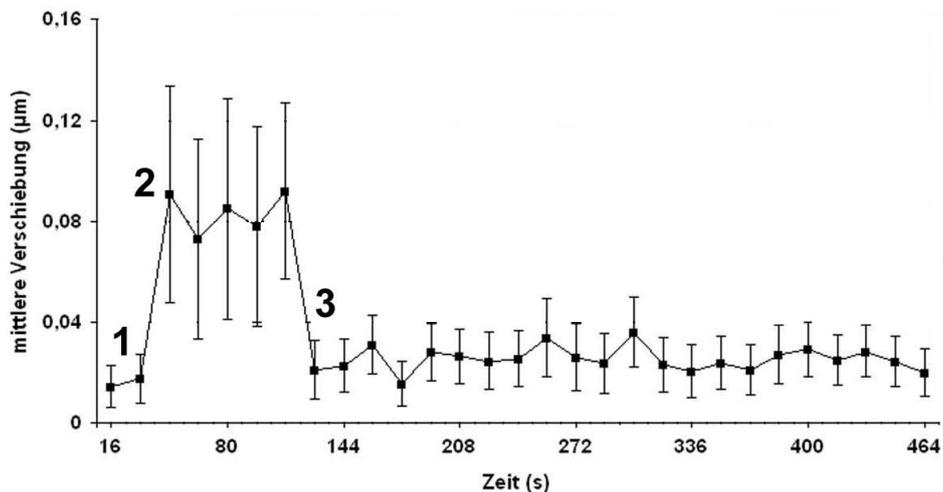


Abbildung 3.28: **Auswertung zur Relaxationsmessung des Silikon-Substrats** - Aufgetragen ist die mittlere Verschiebung der Kugeln ($n = 2542$) mit der jeweiligen Standardabweichung in jedem Bild über die Zeit. 1: Nach dem Aufsetzen der Nadel auf dem Substrat, 2: externe Deformation wurde induziert, 3: Nach dem Lösen der Deformation. Es zeigte sich, dass die Kugeln nach dem Lösen der externen Deformation wieder auf ihre Ausgangspositionen zurückkehrten (innerhalb der Schwankungsbreite).

In diesem Kapitel konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten kontraktile Kräfte in ihrer sekretierten ECM sowie teilweise innerhalb der Migrationsspur konservierten. Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse auf einen viskoelastischen Effekt des Substrats zurückzuführen waren, wurden Relaxationsmessungen des Substrats angefertigt. Hierzu wurde das Substrat mit einer Nadel deformiert und die Entspannung des Substrats nach Lösen der Deformation beobachtet. Die Positionen von fluoreszenten Kugeln innerhalb des Silikons wurden verfolgt und daraus die Verschiebungen bestimmt. Die Analyse der mittleren Verschiebungen ist in Abbildung 3.28 dargestellt. Es wurde deutlich, dass die Kugeln nach dem Lösen der externen Deformation nach wenigen Sekunden wieder auf ihre Ausgangsposition zurückgingen. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Deformationen nach 15

min CytoB-Behandlung durch einen viskoelastischen Effekt des Substrats bedingt waren. Dies sprach auch dafür, dass die Deformationen innerhalb der Migrationsspur effektiv aus der sekretierten ECM resultierten, da diese ca. 30 μm von der eigentlichen Zelle entfernt lagen. Keratinozyten migrieren im Mittel 1 $\mu\text{m}/\text{min}$. Daher relaxierte das Silikon innerhalb von ca. 30 min unterhalb des nachweisbaren Bereichs.

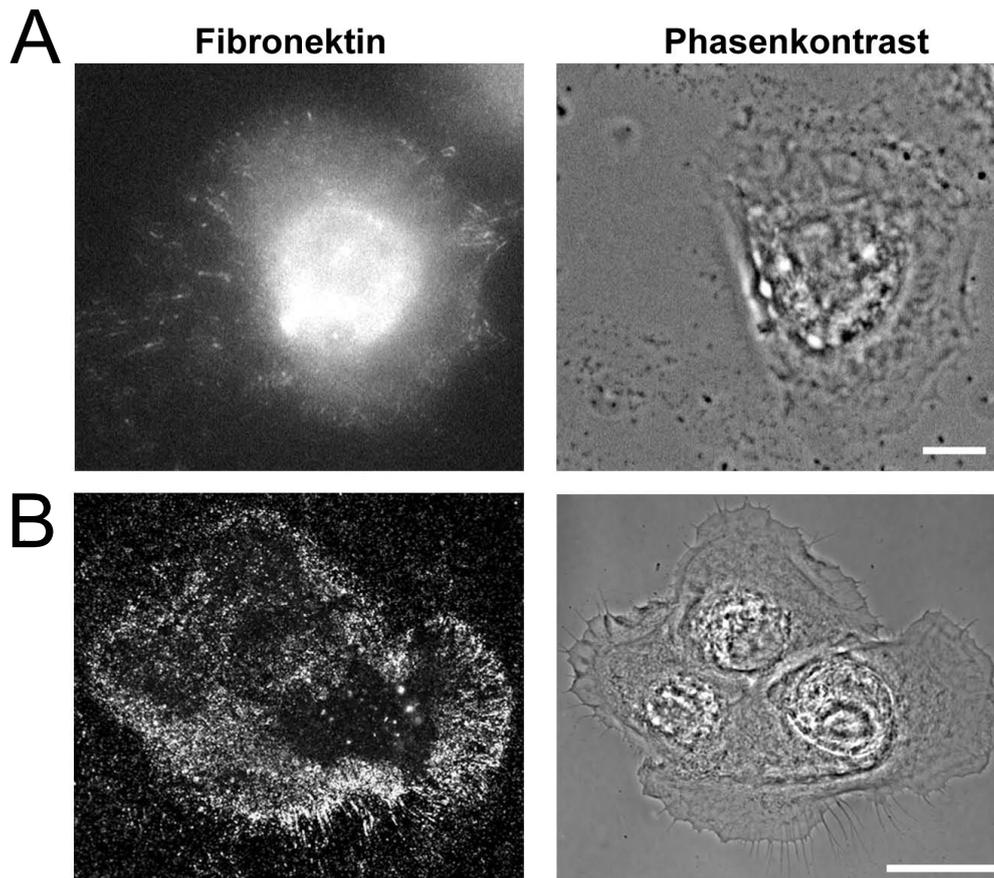


Abbildung 3.29: **Einfluss des Substrats auf die Bildung von Fibronektin-Fibrillen** - (A) Keratinozyten wurden auf elastische Silikon-Substrate (8-9 kPa) ausgesät und EGF-stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und extrazelluläres Fibronektin wurde angefärbt. Dieses Bild wurde am Cell Observer aufgenommen. Es wurde deutlich, dass Keratinozyten auf weichen Substraten Fibronektin-Fibrillen bildeten. Maßstabsbalken = 10 μm . (B) Glas-Substrate wurden mit Gelatine beschichtet. Anschließend wurden auf diese Keratinozyten ausgesät und fixiert. Mittels Immunfluoreszenz wurde extrazelluläres Fibronektin markiert und am LSM710 analysiert. Dies zeigte, dass die Fibrillogenese der Keratinozyten auch ohne exogenes Plasma-Fibronektin erfolgte. Maßstabsbalken = 20 μm .

Aktuelle Analysen haben gezeigt, dass die Substratsteifigkeit einen Einfluss auf die Sekretion von ECM-Proteinen haben kann [10]. Da die Experimente zur flächigen Kraftschätzung auf weichen Silikon-Substraten, hingegen die Quantifizierungen der sekretierten ECM auf harten Glas-Substraten durchgeführt wurden, wurde überprüft, ob die FN-Fibrillen-Bildung durch die Steifigkeit des Substrats beeinflusst wurde. Auf Glas-Substraten konnte die Bildung

von Fibronektin-Fibrillen bereits beobachtet werden (siehe Abb. 3.21). Zur Überprüfung der Fibrillen-Bildung auf weichen Substraten wurden Keratinozyten auf elastische Silikon-Substrate (8-9 kPa) ausgesät. Anschließend wurden die Proben fixiert und extrazelluläres Fibronektin wurde mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Diese Analyse ergab, dass Keratinozyten auch auf weichen Substraten Fibronektin-Fibrillen bildeten (Abb. 3.29 A). Jedoch waren diese auf Silikon-Substraten im Vergleich zu Glas-Substraten nicht so gut erkennbar (vgl. Abb. 3.29 B). Dies lag zu einem an der Mikroskopieart (Epi-Fluoreszenz, keine LSM-Aufnahme) und zum anderen weisen Immunfluoreszenzaufnahmen auf Silikon-Substraten immer ein schlechteres Signal zu Rausch-Verhältnis auf.

Frühere Untersuchungen ergaben, dass exogenes Plasma-Fibronektin die Bildung von zellulären Fibronektin-Fibrillen verstärken kann [108]. Da in nahezu allen Experimenten die Substrate mit Plasma-Fibronektin beschichtet wurden, musste getestet werden, ob dies die Fibrillogenese beeinflusste. Daher wurden Keratinozyten auf Gelatine-beschichteten Substraten ausgesät und anschließend wurden Immunfluoreszenzfärbungen gegen extrazelluläres Fibronektin durchgeführt. Es zeigte sich, dass Keratinozyten auf Gelatine-beschichteten Substraten ebenfalls Fibronektin-Fibrillen bildeten (Abb. 3.29 B, siehe auch Abb. 3.23 und 3.25). Somit konnte bestätigt werden, dass die Fibrillogenese nicht signifikant durch die Zugabe von exogenem Plasma-FN bedingt war. Außerdem zeigte sich, dass das Migrationsverhalten von Keratinozyten auf Gelatine-beschichteten Substraten unverändert war (siehe Film 11).

3.3.8 Zusammenfassung

Der funktionale Aufbau der ECM ist essentiell für die gewebespezifischen Zelleigenschaften. Veränderungen können zu abnormalem Zellverhalten führen und gefährliche Krankheiten auslösen. Daher ist es besonders wichtig die Regulationsmechanismen und deren Wechselwirkungen genau zu erforschen. In diesem Kapitel konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Zellkräfte innerhalb der ECM einer Zelle gespeichert werden. Dies zeigt, dass Zellkräfte nicht nur eine Rolle während des Aufbaus der ECM spielen, sondern auch einen Einfluss auf die mechanischen Eigenschaften der ECM haben. Des Weiteren konnte eine klare Korrelation zwischen Kontraktilität von Zellen und deren Migrationsverhalten sowie ECM-Sekretionsmuster aufgezeigt werden. So erzeugen sessile Keratinozyten stärkere kontraktile Zellkräfte als migrierende Zellen. Gleichzeitig werden erhöhte Mengen fibrillären Fibronektins von sessilen Zellen sekretiert, was vermutlich ursächlich für den ebenfalls erhöhten Kraftanteil in der ECM derselben Zelle ist. Interessanterweise speichert die ECM nicht nur einen bestimmten Anteil der Gesamtzellkraft, sondern konserviert auch die Ausrichtung der Zellkräfte zueinander. Die Analysen der Migrationsspur ergaben, dass auch in dieser kontraktile Kräfte gespeichert sein könnten, die auch die Anordnung der ursprünglichen Zellkräfte widerspiegeln. FN-Fibrillen wurden während der Migration seitlich am hinteren Ende der Zelle unter Beteiligung der Retraktionsfasern gebildet. Die Form und auch deren Länge korrelierte mit den Retraktionsfasern.

Kapitel 4

Diskussion und Ausblick

4.1 Filopodien bestimmen die Lokalisation der Fokaladhäsionen

Migrierende Zellen zeigen eine deutliche Polarisierung. Sie bilden ein weites Lamellipodium und viele Filopodien aus, die in Richtung der Migration weisen. Obwohl schon in früheren Untersuchungen Adhäsionsstrukturen für Filopodien beschrieben wurden [77, 20], nahm man trotzdem an, dass diese vornehmlich innerhalb des Lamellipodiums gebildet wurden [127]. Im ersten Abschnitt (3.1) dieser Arbeit konnte klar gezeigt werden, dass alle getesteten Adhäsionsproteine bereits in Filopodien enthalten sind. Im Einzelnen bedeutet dies, dass filopodiale Adhäsionen mindestens aus den Proteinen Vinculin, Talin, Tensin, Paxillin, VASP, β 1-Integrin (nicht gezeigt, siehe [101]) und sogar Zyxin aufgebaut sind (siehe Abb. 3.2). Diese Daten sprechen eindeutig dafür, dass noch weitere, nicht getestete Adhäsions- sowie Signalproteine zum FA-Aufbau funktional in Filopodien vorliegen. Obwohl filopodiale Adhäsionen das Protein Zyxin enthalten, welches in Fibroblasten ein Marker für gereifte FAs ist, weisen diese Strukturen eine große Ähnlichkeit mit lamellipodialen Fokalkomplexen (z.B. Größe und Form) auf. Deshalb wurden diese frühen, filopodialen Adhäsionen in dieser Arbeit als filopodiale Fokalkomplexe bezeichnet.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit werden die Erkenntnisse über die Funktion der Filopodien zur Substraterkundung für Keratinozyten erweitert. Es zeigte sich, dass Filopodien die exakte Position und die Form fast aller FAs innerhalb des Lamellipodiums bestimmen. Dabei bleiben die filopodialen FXs stabil an ihrem Entstehungsort lokalisiert, sodass diese nur mit dem ersten Kontakt zum nachfolgenden Lamellipodium vergrößert werden, um klassische FAs auszubilden (siehe Abschnitt 3.1.2). Unter normalen Umständen konnte in Keratinozyten nur selten die Bildung von FAs ohne den Einfluss von Filopodien beobachtet werden. Das Wachstum der filopodialen FXs nach lamellipodiale Kontakt erfolgt entlang der Achse der Filopodien, sodass diese die ursprüngliche Form der Filopodien widerspiegeln. Auf diese Weise determinieren die Filopodien nicht nur die Position, sondern auch die Form der FAs innerhalb der Lamelle. Überraschenderweise konnte keine Verän-

derung der FA-Zusammensetzung für alle getesteten FA-Proteinen festgestellt werden. Die Abhängigkeit der Adhäsionsbildung von Filopodien wurde zusätzlich mittels Experimenten bestätigt, bei denen die Bildung von Filopodien unterdrückt wurde. Nach Inhibierung der Filopodienbildung wurden keine neuen FAs aufgebaut. Außerdem führte dies zur fast vollständigen Reduktion der Zellmotilität (vgl. Abschnitt 3.1.4). Somit konnte bewiesen werden, dass Filopodien zur Adhäsionsbildung und zur effektiven Migration unbedingt notwendig sind. Zusätzlich wurde aufgrund der beobachteten reduzierten Migrationsgeschwindigkeit die Paxillin-Phosphorylierung innerhalb der FAs von Filopodien-gehemmten Keratinozyten analysiert und mit der normal migrierender Keratinozyten verglichen. Dabei konnte trotz reduzierter Motilität kein Unterschied festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.1.5). Dies könnte damit erklärt werden, dass die zugrunde liegenden Untersuchungen, die zum Vergleich der hier diskutierten Ergebnisse herangezogen wurden, an Krebszellen durchgeführt wurden [46, 87]. Solche Zellen weisen veränderte Zytoskelett- und FA-Strukturen auf, denen Regulationsmechanismen unterliegen, die gegebenenfalls nicht mit denen von Keratinozyten vergleichbar sind. Trotzdem konnte in früheren Analysen für FA-Proteine, z.B. Vinculin, eine Abhängigkeit des Phosphorylierungsgrads vom Alter der FAs in Keratinozyten und Fibroblasten festgestellt werden [73, 128]. Dies konnte in der hier diskutierten Untersuchung nicht beobachtet werden. Jedoch wurden hier nur FAs innerhalb des Lamellipodiums analysiert (siehe Abb. 3.6). Um eine Änderung der Paxillin-Phosphorylierung zu beobachten, müssten eventuell gereifte FAs im hinteren Teil der Zelle in die Analyse miteinbezogen werden.

Die genaue Analyse der Bildung filopodialer FX erbrachte eine Reihe interessanter Ergebnisse. Während des Wachstums bewegten sich Filopodien über das Substrat bis sie stoppten, um stabile Kontakte zum Substrat auszubilden. Das Protein VASP, welches Teil des Spitzen-Komplexes in Filopodien ist, war währenddessen immer in der Spitze der Filopodien lokalisiert (siehe Abb. 3.4 B, Film 2). Dieses VASP-Signal stoppte, nachdem das wachsende Filopodium stabil adhärierte. Interessanterweise wurde der Spitzen-Komplex nicht Teil des filopodialen FX, obwohl VASP die Verbindung von Aktinfilamenten mit FA-Proteinen vermittelt [35]. Stattdessen wurden filopodiale FXs immer direkt hinter dem VASP-Signal gebildet, während der Spitzen-Komplex selber unbeeinflusst blieb. Diese Ergebnisse sprechen daher für die bereits beschriebene VASP-Funktion als anti-*Capping* Protein, welches die Aktinpolymerisation im Spitzen-Komplex steuert [119, 100], während in filopodiale FXs neu eingebautes VASP als eine Art Vermittler zwischen Aktin und FA-Proteinen wie Vinculin und Zyxin fungieren kann [92]. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, in zukünftigen Analysen den Einfluss der Vinculin- und Zyxin-Bindungsdomäne des VASP-Proteins auf die Ausbildung von filopodialen FXs näher zu untersuchen. Der Ausschluss des Spitzen-Komplexes von filopodialen FXs scheint die Voraussetzung für das in dieser Arbeit beschriebene Wiederauswachsen der Filopodien zu sein (Abschnitt 3.1.3). Sobald die filopodialen FXs eine bestimmte Größe angenommen hatten oder mit dem Lamellipodium in Kontakt kamen, wird der VASP-markierte Spitzen-Komplex von dem filopodialen FX gelöst, um ein neues Filopodium auszubilden. Solange dieses stabil adhären kann, wird es immer wieder

4.1. FILOPODIEN BESTIMMEN DIE LOKALISATION DER FOKALADHÄSIONEN 101

verlängert, sodass eine Abfolge von hintereinander liegenden FAs im Lamellipodium entsteht.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Modell zur Adhäsionsbildung für Filopodien-bildende Zellen erstellt (siehe Abb. 4.1). Filopodien bewegen sich mit einem VASP-markierten Spitzen-Komplex über das Substrat, um geeignete Kontaktbereiche zu finden (Abb. 4.1 A). Nachdem das Filopodium stabil mit dem Substrat adhäriert, wird direkt hinter dem VASP-Signal ein filopodiale FX aufgebaut. Dieser filopodiale FX stellt eine kleine, aber vollständig ausgebildete Adhäsion dar, welche Proteine wie VASP, Tensin, Paxillin, Vinculin, Talin, Zyxin und β 1-Integrin (Daten nicht gezeigt, siehe [101]) enthalten (Abb. 4.1 B). Wenn dieser vom Lamellipodium eingeholt wird, wird der filopodiale FX vergrößert, um eine klassische lamellipodiale FA zu bilden (Abb. 4.1 C). Nach der Bildung des filopodiale FX wird das Filopodium erneut verlängert. Daher sind Filopodien unerlässlich für eine korrekte und gerichtete Zellmigration, da sie die Bildung und Lokalisation der FAs in Keratinozyten und wahrscheinlich in allen Filopodien-bildenden Zellen bestimmen.

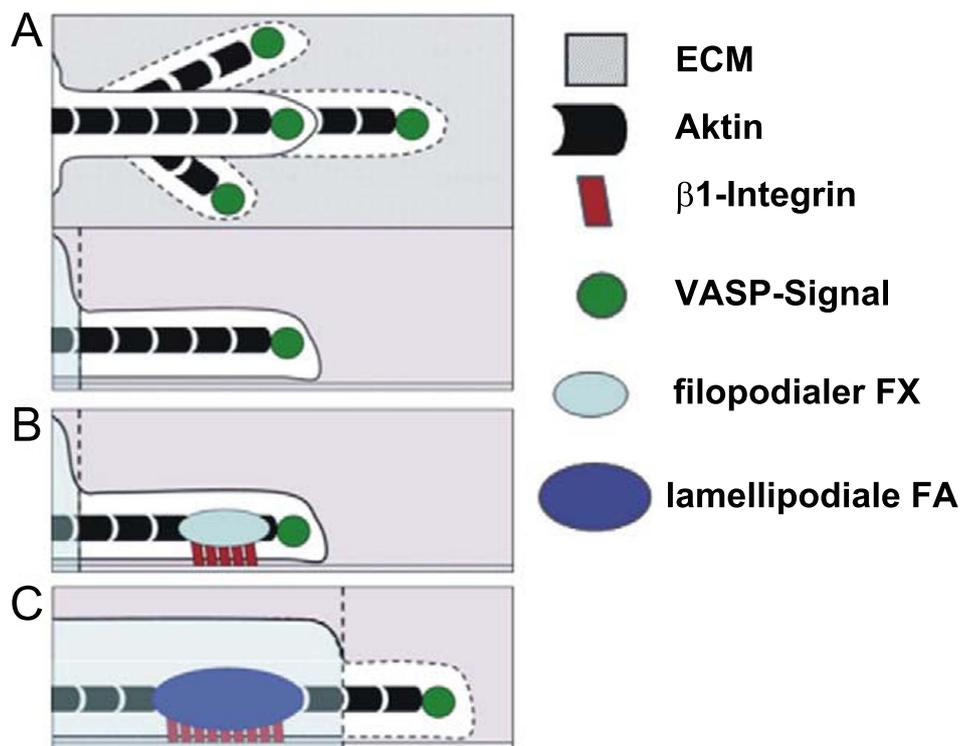


Abbildung 4.1: **Neues Modell zur Adhäsionsbildung in Keratinozyten** - Während des Wachstums der Filopodien bewegen sich diese über das Substrat. Dabei ist ein VASP-Signal (grüner Punkt) in der Spitze der Filopodien lokalisiert (A, Aufsicht und Seitenansicht). (B) Nach Adhäsion stoppt das VASP-Signal und vermittelt direkt dahinter die Bildung der filopodiale FXs (hellblaue Ellipse). Diese filopodiale FXs sind kleine, aber vollständig gereifte Adhäsionsstrukturen. (C) Nach Kontakt mit dem Leitsaum des Lamellipodiums (senkrechte, gestrichelte Linie), wächst das Filopodium wieder weiter aus (dargestellt mittels gestrichelter Linie). Innerhalb des Lamellipodiums werden die filopodiale FXs zu klassischen FAs vergrößert (dunkelblau).

4.2 Anbindung an kontraktile, filopodiale Strukturen bestimmt die Adhäsionsstabilität

Basierend auf den zuvor diskutierten Ergebnissen sollte weiterführend der genaue Mechanismus untersucht werden, der den Übergang von filopodialen FXs zu klassischen FAs innerhalb des Lamellipodiums reguliert. Diese Ergebnisse lieferten neue, interessante Aspekte, da für die Reifung lamellipodiale FXs ein klarer, abgestufter Prozess beschrieben ist [127, 128]. Proteine wie Zyxin und Tensin, die in lamellipodialen FXs nicht vorhanden sind, sind hingegen in filopodialen FXs enthalten (siehe Abb. 3.2). Beiden Typen der FXs gemeinsam ist jedoch, dass sie zu FAs reifen können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Übergang von filopodialen FXs zu FAs von der Anbindung an filopodiale Aktinfasern abhängt. Im Gegensatz zu lamellipodialen FXs weisen filopodiale FXs bereits direkt nach der Bildung eine deutliche Anbindung an Aktinfasern auf, welche auch während des nachfolgenden Wachstums innerhalb des Lamellipodiums aufrecht erhalten wird (Abschnitt 3.2.3). Adhäsionen, die innerhalb des Lamellipodiums aufgebaut wurden, konnten ebenfalls beobachtet werden. Jedoch lösten sich diese Adhäsionen, wie schon für andere Zelltypen gezeigt wurde, alsbald wieder auf, wenn keine Anbindung an Aktinbündel erfolgte [130]. Dieser Unterschied in der Aktin-Anbindung könnte somit auch der Grund dafür sein, dass filopodiale FXs bereits Zyxin und Tensin enthalten.

Des Weiteren konnten Veränderungen der Protein-Zusammensetzung der filopodialen Aktinfasern während der FX-Reifung beobachtet werden (Abb. 3.11). Solche Aktinbündel reichen typischerweise wenige μm in das Lamellipodium hinein. Direkt am Schaft der Filopodien wird Fascin, welches Aktinfasern in Filopodien eng miteinander verbindet, gegen α -Actinin ausgetauscht, welches nachfolgend teilweise gegen Myosin II ersetzt wird (siehe Abb. 4.2). Der Austausch von Fascin gegen α -Actinin ruft wahrscheinlich eine Aufweitung innerhalb der filopodialen Aktinfasern hervor, sodass Myosin II eingebaut werden kann. Ein solcher Mechanismus ist bereits für Aktinbündel innerhalb des Lamellipodiums beschrieben [38]. Außerdem wird der Einbau von α -Actinin in Aktinbündel als eine wesentliche Voraussetzung für die FA-Reifung diskutiert [16]. α -Actinin war in allen filopodialen Aktinfasern innerhalb des Lamellipodiums zu finden. Im Gegensatz dazu war Myosin II nur in einem gewissen Teil der filopodialen Aktinfasern lokalisiert (siehe Abb. 3.12), welches für weitere Regulationsmechanismen des Myosin-Einbaus spricht. Filopodiale Aktinbündel waren die Einzigen, die Myosin II enthielten und gleichzeitig in Migrationsrichtung ausgerichtet waren. Diese Beobachtungen stimmten mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen an Fibroblasten überein [3]. In diesem Zusammenhang wäre es besonders interessant in weiterführenden Untersuchungen zu analysieren, welche Signale zum Myosin-Einbau notwendig sind. Es ist z.B. vorstellbar, dass hierfür die Bildung von filopodialen FXs eine wesentliche Voraussetzung sein könnte, da nur mit solch einer Substrat-Verankerung eine effektive Kraftübertragung der filopodialen Aktinbündel stattfinden kann.

Der Zusammenhang zwischen Krafttransmission und Adhäsionsreifung wurde in vielen

Untersuchungen analysiert. Die FA-Reifung wurde sowohl durch die Aktivierung von Myosin als auch durch externe Zugkräfte beschrieben. Dadurch wurden die FAs vergrößert und konnten somit größere Kräfte übertragen [6, 120]. Außerdem scheinen Zugkräfte besonders für die Reifung junger FXs verantwortlich zu sein, da viele solcher Studien unter Serum-armen Zellkulturbedingungen durchgeführt wurden, die die FA-Dynamik erhöhten [28, 94]. In dieser Arbeit konnte eine deutliche Korrelation zwischen FA-Wachstum und erhöhter Krafttransmission der FAs unter unbeeinflussten, Serum-haltigen Bedingungen gezeigt werden (Abschnitt 3.2.7). Aus den hier beschriebenen Ergebnissen geht zwar nicht klar hervor, ob die erhöhte Krafttransmission zur Vergrößerung der FAs führte oder umgekehrt. Jedoch kann die Vergrößerung von FAs durch externe Zugkräfte nur durch die erste Möglichkeit erklärt werden, sodass diese auch für die Erklärung der hier beschriebenen Ergebnisse vermutet wird. Hier muss jedoch bedacht werden, dass FA-Wachstum und Kraftübertragung ein stark zusammenhängender Prozess ist, der vielen Rückkopplungsmechanismen unterliegt. Eine klare Ursache-Wirkungsverkettung ist hier deshalb nicht zu erwarten.

In Abschnitt 4.1 wurde bereits über das wiederholte Auswachsen von Filopodien diskutiert, welches schließlich zu einer aufeinanderfolgenden Anordnung filopodiale FAs entlang der Myosin-haltigen, filopodiale Aktinfasern führte. Die Anbindung der filopodiale FXs an filopodiale Aktinfasern erlaubt die kontinuierliche Krafterzeugung in Richtung der Migration, welche einen kraftinduzierten Stabilisierungsprozess der filopodiale FXs einleitet. Dies wird bestätigt durch den stark reduzierten retrograden Aktinfluss innerhalb filopodiale Aktinfasern, die mit deutlich erkennbaren FAs verbunden sind (Abschnitt 3.2.6). Hierbei erzeugt Myosin II eine Zugkraft auf das Substrat. Diese Kraft kann in filopodiale Aktinfasern ohne FA-Anbindung nicht effektiv auf das Substrat übertragen werden, sodass folglich der retrograde Aktinfluss ansteigt. Außerdem kann der reduzierte retrograde Aktinfluss die Grundlage für das wiederholte Auswachsen der Filopodien sein. Die Aktinpolymerisation in der Spitze des Filopodiums überlagert den Rückfluss und ist bei verlangsamtem Rückfluss schneller, sodass das Filopodium erneut verlängert werden kann.

Basierend auf den Analysen stabiler und unstabiler FAs wird das Modell aus Abschnitt 4.1 erweitert. Es beschreibt den Filopodien-abhängigen, kraftinduzierten FA-Reifungsprozess, der zur Stabilisierung der filopodiale FXs führt (siehe Abb. 4.2). Stabile FAs entstehen aus filopodiale FXs, die direkt nach ihrer Bildung eine Anbindung an parallele, filopodiale Aktinbündel aufweisen. Diese Fasern stellen die Voraussetzung für den kraftinduzierten Reifungsprozess der filopodiale FXs zu stabilen FAs dar. Filopodiale Aktinfasern sind mittels Fascin dicht gebündelt. Das gleiche Bündel verliert innerhalb des Lamellipodiums diese dichte Packung und Fascin wird gegen α -Actinin ersetzt. Nachfolgend werden zusätzlich Palladin und Myosin II eingebaut, wobei das α -Actinin-Signal wieder leicht reduziert wird. Basierend auf der effektiven Anbindung der filopodiale FXs an filopodiale Aktin wird durch Myosin-Kontraktion der kraftinduzierte Stabilisierungsprozess eingeleitet. Unstabile FAs werden innerhalb des dichten Aktinnetzwerks des Lamellipodiums gebildet. Diese unstabilen FAs weisen keine direkte Anbindung an den filopodiale, strukturellen Aufbau auf, sodass sie keine

kraftinduzierte Stabilisierung erfahren und schnell nach ihrer Entstehung wieder abgebaut werden.

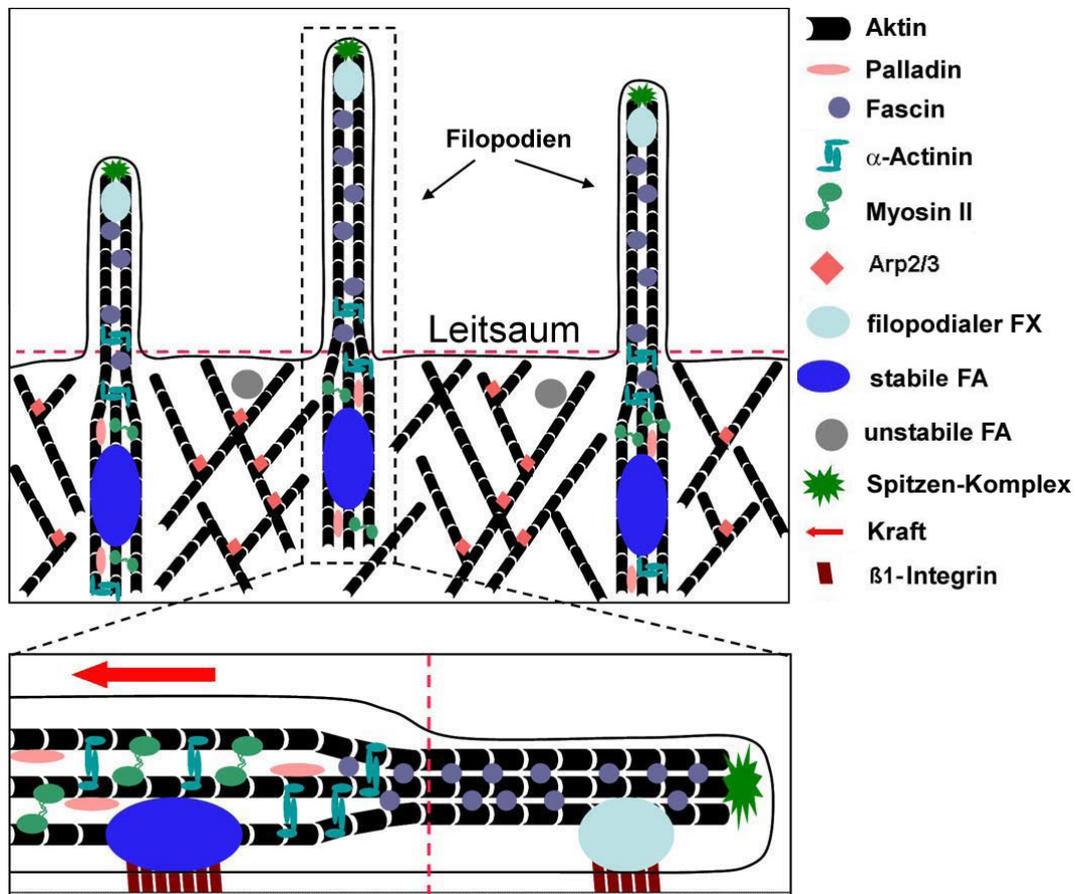


Abbildung 4.2: **Modell zur Filopodien-abhängigen, kraftinduzierten FA-Reifung** - Analysen von stabilen und unstabilen FAs zeigten strukturelle Unterschiede. Filopodiale FXs weisen eine stabile Anbindung an parallele, filopodiale Aktinfasern auf, währenddessen werden unstable FAs im dichten Aktinnetzwerk des Lamellipodiums gebildet. Nähere Erläuterungen im Text.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit deutlich, dass in Keratinozyten Filopodien nicht nur für Bildung und Reifung von FAs, sondern auch für die Erzeugung von kontraktile Aktinfasern innerhalb des Lamellipodiums verantwortlich sind. Der hier beschriebene Mechanismus basiert auf der Ausbildung von Filopodien. In Zellen, die keine Filopodien bilden, könnte dieser über kleine Filopodien-ähnliche Strukturen, sogenannte Mikrospikes, reguliert werden, sodass es sich eventuell um einen allgemeingültigen Prozess handeln könnte.

4.3 Zellkraft korreliert mit der Menge an sekretierter Matrix und Zellmotilität

Zur Analyse zellulärer Kräfte werden Zellen auf elastische Substrate ausgesät. Die Messung beruht auf der Bestimmung von Substratdeformationen, die durch die permanente Kontraktion der Zelle erzeugt werden. Der Einfluss der sekretierten Matrix auf die am Substrat anliegende Kraft wurde in diesem Zusammenhang bisher völlig vernachlässigt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die ECM sessiler sowie mobiler Keratinozyten Kräfte speichert (Abschnitt 3.3.2). Dabei war der mittlere Anteil der kontraktilen Kraft in der ECM an der Gesamtzellkraft überraschend hoch und lag in sessilen Zellen bei fast 50% und in migrierenden Zellen bei fast 30%. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Substratdeformationen nicht nur durch aktive Kontraktion des Aktin-Myosin-Apparats der Zelle, sondern auch durch Speicherung innerhalb der sekretierten Matrix hervorgerufen werden. Die Kräfte in der ECM wurden nach Depolymerisation des Aktinnetzwerks der Zellen gemessen. Dazu wurden die Zellen 15 min mit CytochalasinB inkubiert (Abb. 3.27). Hier ist zu beachten, dass die Matrix aktiv durch Zellkräfte und somit durch das Aktinzytoskelett aufgebaut und ständig umgestaltet wird. Daher ist es vorstellbar, dass durch die CytochalasinB-Behandlung die Matrix bereits vor der Messung verändert wurde. Dies würde jedoch bedeuten, dass der Effekt, der hier gemessen wurde, eigentlich noch deutlicher sein müsste, da eine Reduktion der Zellkontraktilität die Matrix-Sekretion und damit auch die gespeicherte Kraft verringert [67].

Wie oben schon beschrieben wurde, konservieren sessile Keratinozyten im Vergleich zu mobilen Zellen mehr Kräfte in ihrer ECM. Dies korreliert mit einer allgemein höheren Zellkraft in sessilen Zellen. Weiterführende Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit bestätigten, dass der Effekt, der erhöhten ECM-konservierten Kräfte, durch eine erhöhte Fibonektin-Sekretion sowie durch die Bildung von Fibronektin-Fibrillen der sessilen Keratinozyten bewirkt wurde (siehe Abschnitt 3.3.3). Aus diesen Versuchen geht jedoch nicht eindeutig hervor, ob die höhere Zellkontraktilität die gesteigerte Fibronektin-Sekretion bedingt oder umgekehrt. Basierend auf früheren Analysen, die zeigten, dass nach Inhibierung der Zellkontraktilität die Matrix-Sekretion verringert wurde [67], kann die höhere Zellkraft jedoch mindestens teilweise als Ursache für die gesteigerte Sekretion angesehen werden.

Eine wesentliche Voraussetzung zur Metastasierung von Tumorzellen ist der Abbau und die verringerte Sekretion von Matrix-Proteinen [84, 85]. Hingegen führt eine erhöhte Fibronektin-Sekretion zur Reduktion der Zellmotilität [2]. Hier zeigt sich ein klarer Zusammenhang zwischen Matrix-Sekretion und der Regulation der Zellmotilität. Dieser Zusammenhang konnte hier mit dem direkten Vergleich von sessilen mit mobilen Keratinozyten bestätigt werden (vgl. Abschnitt 3.3.3). Ob die Sekretion von Matrix-Komponenten nun ein wesentlicher Regulationsmechanismus der Zellmigration, z.B. über die Veränderung der Adhäsionsstärke, darstellt, muss allerdings noch genauer untersucht werden.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass migrierende Keratinozyten eine Spur aus Fi-

bronektin hinterlassen (siehe Abb. 3.23). Diese Spur besteht zum Teil aus Fibronektin-Fibrillen, die in Verbindung mit Retraktionsfasern gebildet werden (Abschnitt 3.3.6). Diese Beobachtung steht im engen Zusammenhang mit früheren Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die Bildung von Makroaggregaten aus β 1-Integrin innerhalb der Migrationsspur auch durch Retraktionsfasern bestimmt wird [49]. Diese Makroaggregate (siehe Abb. 1.7 B) werden durch Abreißen der einzelnen Membransegmente aufgrund der starken Verankerung der Integrine mit der ECM gebildet. Ob diese starke Verbindung einen Einfluss oder sogar eine wichtige Voraussetzung für die Bildung von Fibronektin-Fibrillen in migrierenden Zellen darstellt, bleibt noch zu klären.

Die Migrationsspur der Keratinozyten dient nachfolgenden Zellen als provisorische Matrix zur Adhäsion [49]. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Migrationsspur nicht nur biochemische Signalproteine, sondern auch mechanische Signale enthält, die die Migration nachfolgender Zellen beeinflussen können. Dazu wurde in dieser Arbeit die Substratdeformation direkt hinter mobilen Zellen analysiert (siehe Abschnitt 3.3.5). Dabei konnte nur bei 15% der Zellen eine Speicherung der ursprünglichen Zellkräfte in der Migrationsspur beobachtet werden. Die gemessenen Kräfte waren direkt hinter der Zelle am höchsten und nahmen mit zunehmendem Abstand zur Zelle stark ab. Dies zeigt, dass die Migrationsspur z.B. durch die Sekretion von MMPs verändert oder sogar aufgelöst wird. Es ist daher sehr schwierig solche Deformationen zu messen, zumal nicht alle mobilen Keratinozyten eine deutliche Matrix sowie Fibronektin-Fibrillen sekretieren. In diesem Zusammenhang ist jedoch zu beachten, dass die gemessenen Deformationen eventuell durch Retraktionsfasern erzeugt wurden. Diese können sehr lang werden und bis weit hinter die Zelle reichen. Jedoch wurden hier die Deformationen nach CytoB-Behandlung gemessen, sodass auch das Aktinzytoskelett innerhalb der Retraktionsfasern zerstört war. Um sicherzustellen, dass die Deformationen durch Fibronektin-Sekretion erzeugt werden, sollte diese Analyse in zukünftigen Experimenten an mit GFP-Fibronektin transfizierten Keratinozyten durchgeführt werden, sodass eine direkte Korrelation zwischen Kraft innerhalb der Migrationsspur und Fibronektin-Sekretion möglich ist.

Zusammenfassend stellte sich heraus, dass die hier etablierte Methode zur Messung von Kräften innerhalb der ECM geeignet ist. Mittels dieser Methode konnte gezeigt werden, dass sessile und mobile Keratinozyten Kräfte in der ECM speichern, welche mit der Gesamtkraft und der Menge an sekretierter Matrix korrelieren. Diese Fähigkeit der Kraftspeicherung stellt evolutionär eine hohe Energieersparnis für die Zellen dar, da die Gewebespannung sonst durch permanente, aktive Zellkontraktion aufgebaut werden müsste.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten viele neue Erkenntnisse über die Funktion von Filopodien gewonnen werden. Es wurde gezeigt, dass Filopodien in migrierenden Keratinozyten die Bildung, Form und Reifung fast aller Adhäsionsstrukturen bestimmen. Diese Prozesse wurden bis jetzt im Lamellipodium lokalisiert. Somit ist es besonders interessant in zukünftigen Untersuchungen das Aufgabenfeld von Filopodien für andere Zelltypen zu erweitern. Es ist nämlich vorstellbar, dass Filopodien die hier beschriebenen Prozesse auch z.B. in Fibroblasten regulieren.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass bereits gebildete Filopodien erneut auswachsen können. Ein solcher Mechanismus wurde unabhängig vom untersuchten Zelltyp bis jetzt für die Entstehung von Filopodien noch nie diskutiert. In diesem Zusammenhang wären weiterführende Experimente sehr aufschlussreich, die den genauen Prozess, der zur erneuten Aktivierung des Spitzen-Komplexes führt, sowie den strukturellen Aufbau aufklären, da es sich hierbei wahrscheinlich um einen generell gültigen Mechanismus zur Bildung von Filopodien handelt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zur Analyse der Zellkräfte und der Kräfte innerhalb der Matrix, zeigten dass Keratinozyten abhängig von ihrem migratorischen Zustand deutliche Kräfte in der sekretierten ECM speicherten. Diese Erkenntnisse sind wichtig für alle Messungen von zellulären Kräften, da bis heute angenommen wird, dass Substratdeformationen durch permanente Kontraktion der Zelle erzeugt werden. Keratinozyten sekretieren im Vergleich zu Fibroblasten relativ wenig Matrix. Somit ist es vorstellbar, dass der Einfluss der ECM auf die Gesamtzellkraft in Fibroblasten noch deutlich höher sein wird. Daher sollte zum weiteren Vergleich der Daten dieser Zelltyp in Zukunft im Fokus der Experimente liegen.

Außerdem zeigen die Daten, dass die Zellmigration durch mechanische Signale (d.h. ECM-Sekretion) reguliert werden kann. Diese Ergebnisse sind besonders interessant für weiterführende Experimente an metastasierenden Krebszellen. Hier sollte in Zukunft untersucht werden, ob in diesen Zellen ein solcher Regulationsmechanismus existiert und wie dieser genau gesteuert wird.

Kapitel 5

Anhang

5.1 Filmunterschriften

Film 1: **Filopodiale Fokalkomplexe verbinden Filopodien mit dem Substrat** - Gehört zu Abbildung 3.3. Keratinozyten wurden auf elastische Silikon-Substrate ausgesät und mittels EGF zur Migration angeregt. Zur Substratdeformation wurde eine Mikro-Nadel verwendet und vor einer einzeln migrierenden Zelle positioniert. Der vergrößerte Bereich links unten im Film wurde in der Übersichtsaufnahme schwarz gestrichelt umrandet. Während des Substratverzugs folgten stabil adhärierte Filopodien (weißer Stern) der Deformation. Hingegen blieben noch wachsende Filopodien (weißer Kreis) unbeeinflusst. Die Bildaufnahme erfolgte alle 2 s, Bildfrequenz: 12 Bilder/s. Maßstabsbalken = 10 μm .

Film 2: **Filopodiale Substraterkundung und Adhäsion** - Gehört zu Abbildungen 3.4 A-C. Keratinozyten wurden mit GFP-VASP transfiziert und anschließend EGF-stimuliert. Das VASP-Signal in der Spitze jedes Filopodiums ist deutlich erkennbar. Dieses blieb während des Wachstums in der Spitze lokalisiert. Nach stabiler Adhäsion des Filopodiums stoppte dieses und eine FA bildete sich direkt hinter diesem aus. Ein erneutes Auswachsen der Filopodien konnte beobachtet werden. Versuchsdurchführung zusammen mit Bodo Borm. Die Bildaufnahme erfolgte alle 5 s, Bildfrequenz: 15 Bilder/s. Maßstabsbalken = 10 μm .

Film 3: **Neue Filopodien entstehen durch Verlängerung bereits existierender Filopodien** - Gehört zu Abbildung 3.4 D. GFP-Fascin transfizierte Zellen wurden EGF-stimuliert und analysiert. Stabile Filopodien, die wiederholt neu auswachsen, sind mit weißen Pfeilen markiert. Die Bildaufnahme erfolgte alle 10 s, Bildfrequenz: 10 Bilder/s. Maßstabsbalken = 10 μm .

Film 4: **Schicksal von filopodialen Aktinbündeln** - Gehört zu Abbildung 3.4 E. Keratinozyten wurden mit GFP-Aktin transfiziert und zur Migration angeregt. Die weißen Pfeile zeigen beispielhaft sich repetitiv verlängernde Filopodien. Dieses erfolgte durch Verlängerung der filopodialen Aktinfilamente und nicht durch neue Aktin-Zusammenlagerung. Au-

Berdem konnte ein Abknicken der Filamente am Schaft von Filopodien (weiße Sterne) sowie ein Einbau der Aktinfilamente von nicht adhärerten Filopodien in das Aktinnetzwerk des Lamellipodiums (roter Pfeil) beobachtet werden. Die Bildaufnahme erfolgte alle 10 s, Bildfrequenz: 8 Bilder/s. Maßstabsbalken = 10 μm .

Film 5: Bildung von stabilen und instabilen Fokaladhäsionen - Gehört zu Abbildung 3.7. Mobile Keratinozyten wurden mit GFP-Vinculin transfiziert und mittels TIRF aufgenommen. FA-Stabilität wurde anhand von TIRF-Aufnahmen gleichzeitig mit DIC analysiert. Die weißen Pfeile markieren exemplarisch FAs, die aus filopodialen FXs entstammten. FAs, die im Lamellipodium entstanden, wurden mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Die Bildaufnahme erfolgte alle 20 s, Bildfrequenz: 6 Bilder/s. Maßstabsbalken = 10 μm .

Film 6: Bildung von stabilen FAs innerhalb filopodiale Aktinbündel - Gehört zu Abbildung 3.10. Keratinozyten wurden mit DsRed-Vinculin und GFP- α -Actinin transfiziert und EGF-stimuliert. Zeitserien wurden in Phasenkontrast und Fluoreszenz mit dem Avalanche-Photodioden-Systems des LSM710 aufgenommen. Stabil wachsende FAs wurden entlang filopodiale Aktinbündel gebildet (weiße Pfeilspitze). Unstabile FAs entstanden innerhalb des Lamellipodiums ohne erkennbare Aktinanbindung (rote Pfeilspitze). Außerdem wurden FAs umgehend aufgelöst, die innerhalb der Aktinbündel von Filopodien entstanden, die jedoch nicht stabil zum Substrat adhären konnten (weißer Pfeil). Die Bildaufnahme erfolgte alle 15 s, Bildfrequenz: 6 Bilder/s. Maßstabsbalken = 10 μm .

Film 7: Einbau von α -Actinin in filopodiale Aktinbündel - Gehört zu Abbildung 3.11 B. Mobile Keratinozyten wurden mit GFP- α -Actinin transfiziert und Zeitserien wurden in Phasenkontrast gleichzeitig mit Fluoreszenz aufgenommen. α -Actinin war deutlich in filopodiale Aktinbündeln innerhalb des Lamellipodiums erkennbar und wurde während des Wachstums eingebaut. Die Bildaufnahme erfolgte alle 8 s, Bildfrequenz: 12 Bilder/s. Maßstabsbalken = 5 μm .

Film 8: Einbau von Palladin in filopodiale Aktinbündel - Gehört zu Abbildung 3.11 C. Keratinozyten wurden mit GFP-Palladin transfiziert und zur Migration angeregt. Bildererien wurden in Fluoreszenz und Phasenkontrast aufgenommen. Palladin zeigte die gleiche Lokalisation wie α -Actinin. Die Bildaufnahme erfolgte alle 10 s, Bildfrequenz: 10 Bilder/s. Maßstabsbalken = 5 μm .

Film 9: Deformationsfeld einer migrierenden Keratinozyte - Gehört zu Abbildung 3.14 A. Keratinozyten wurden auf elastische Silikon-Substrate mit eingebetteten, fluoreszenten Kugeln ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit GFP-Vinculin transfiziert und mit EGF zur Migration angeregt. Die GFP-Vinculin-Aufnahmen während der Migration sind auf der linken Seite gezeigt. Die Deformation des Substrats durch die Zellkraft ist mit gelben Vektor-

pfeilen auf der rechten Seite dargestellt. Die Bildaufnahme erfolgte alle 40 s, Bildfrequenz: 20 Bilder/s. Deformationsmaßbalken (gelb) = $0,6 \mu\text{m}$, Maßstabsbalken (weiß) = $20 \mu\text{m}$.

Film 10: Fibronektin-Sekretion einer Zelle während des Übergangs von sessil in die Migration - Gehört zu Abbildung 3.22. Keratinozyten wurden mit GFP-Fibronektin transfiziert und zur Migration angeregt. Übersichtsaufnahmen wurden in Fluoreszenz gleichzeitig mit Phasenkontrast aufgenommen. Die Übersichtsaufnahmen wurden aus Einzelbildern zusammengesetzt. Daher erkennt man die Kanten der Einzelbilder im Film. Die Belichtungszeit wurde erhöht, damit die Fluoreszenz innerhalb der Migrationsspur sichtbar wurde. Im sessilen Zustand bildete die Zelle Fibronektin-Fibrillen. Die Fibronektin-Sekretion war während der Migration deutlich reduziert. Die Bildaufnahme erfolgte alle 5 min, Bildfrequenz: 7 Bilder/s. Maßstabsbalken (weiß) = $20 \mu\text{m}$.

Film 11: Keratinozyte während der Migration - Gehört zu Abbildung 3.23. Keratinozyten wurden auf Glas-Substrate, die mit Gelatine beschichtet wurden, ausgesät und zur Migration angeregt. Die Migration war auf Gelatine-beschichteten Substraten unverändert. Der Film zeigt einen Ausschnitt einer Übersichtsaufnahme, daher erkennt man die Kanten der Einzelbilder. Außerdem lag deshalb die Zelle nicht genau im Fokus. Die Bildaufnahme erfolgte alle 2 min, Bildfrequenz: 7 Bilder/s. Maßstabsbalken (weiß) = $20 \mu\text{m}$.

Film 12: Fibrillen-Bildung während der Migration von Keratinozyten - Gehört zu Abbildung 3.26. Keratinozyten wurden mit GFP-Fibronektin transfiziert und mittels EGF zur Migration angeregt. Zeitserien wurden in Phasenkontrast gleichzeitig mit Fluoreszenz aufgenommen. Fibronektin-Fibrillen wurden seitlich am hinteren Ende der migrierenden Zelle gebildet. Form und Länge wurden durch die Retraktionsfasern beeinflusst. Die Bildaufnahme erfolgte alle 30 s, Bildfrequenz: 12 Bilder/s. Maßstabsbalken (weiß) = $10 \mu\text{m}$.

5.2 Abkürzungen

Arp2/3: Aktin *related proteins 2/3*

CytoB: Cytochalasin B

Dia: *Diaphanous-related*

DIC: *Differential Interference Contrast*

E: Young-Modul

ECM: Extrazelluläre Matrix

EGF: *Epidermal Growth Factor*

Ena: *Enabled*

FA: Fokaladhäsion

FAs: Fokaladhäsionen

FN: Fibronectin

FRAP: *Fluorescence Recovery After Photobleaching*

FX: Fokalkomplex

FXs: Fokalkomplexe

GTP: Guanosintriphosphat

GDP: Guanosindiphosphat

h: Stunde

KBM: *Keratinocyte Basal Medium*

KGM: *Keratinocyte Growth Medium*

min: Minuten

MLC: *Myosin Light Chain*

MMP: Matrix-Metalloprotease

n: Probenumfang

n : Brechungsindex

NHEK: Normale Humane Epidermale Keratinozyten

PIP₂: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat

RT: Raumtemperatur

s: Sekunden

σ : Standardabweichung

t: Zeitpunkt

TIRF: *Total Internal Reflexion Fluorescence*

TNS: *Trypsin Neutralization Solution*

VASP: Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein

ν : Poissonzahl

vgl: vergleiche

WASP: Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein

z.B.: zum Beispiel

Literaturverzeichnis

- [1] ABERCROMBIE, M., J. E. HEAYSMAN und S. M. PEGRUM: *The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella.* Exp Cell Res, 67(2):359–367, Aug 1971.
- [2] AKAMATSU, H., K. ICHIHARA-TANAKA, K. OZONO, W. KAMIKE, H. MATSUDA und K. SEKIGUCHI: *Suppression of transformed phenotypes of human fibrosarcoma cells by overexpression of recombinant fibronectin.* Cancer Res, 56(19):4541–4546, Oct 1996.
- [3] ANDERSON, T. W., A. N. VAUGHAN und L. P. CRAMER: *Retrograde flow and myosin II activity within the leading cell edge deliver F-actin to the lamella to seed the formation of graded polarity actomyosin II filament bundles in migrating fibroblasts.* Mol Biol Cell, 19(11):5006–5018, Nov 2008.
- [4] APPLEWHITE, D. A., M. BARZIK, S.-I. KOJIMA, T. M. SVITKINA, F. B. GERTLER und G. G. BORISY: *Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation.* Mol Biol Cell, 18(7):2579–2591, Jul 2007.
- [5] ARBUZOVA, A., K. MARTUSHOVA, G. HANGYÁS-MIHÁLYNÉ, A. J. MORRIS, S. OZAKI, G. D. PRESTWICH und S. MCLAUGHLIN: *Fluorescently labeled neomycin as a probe of phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate in membranes.* Biochim Biophys Acta, 1464(1):35–48, Mar 2000.
- [6] BALABAN, N. Q., U. S. SCHWARZ, D. RIVELINE, P. GOICHBURG, G. TZUR, I. SABANAY, D. MAHALU, S. SAFRAN, A. BERSHADSKY, L. ADDADI und B. GEIGER: *Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micro-patterned substrates.* Nat Cell Biol, 3(5):466–472, May 2001.
- [7] BENINGO, K. A., M. DEMBO, I. KAVERINA, J. V. SMALL und Y. L. WANG: *Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts.* J Cell Biol, 153(4):881–888, May 2001.
- [8] BISCHOFF, F. und G. BRYSON: *Carcinogenesis through solid state surfaces.* Prog Exp Tumor Res, 5:85–133, 1964.

- [9] BROUSSARD, J. A., D. J. WEBB und I. KAVERINA: *Asymmetric focal adhesion disassembly in motile cells*. *Curr Opin Cell Biol*, 20(1):85–90, Feb 2008.
- [10] BUTCHER, D. T., T. ALLISTON und V. M. WEAVER: *A tense situation: forcing tumour progression*. *Nat Rev Cancer*, 9(2):108–122, Feb 2009.
- [11] BUTLER, J. P., I. M. TOLIC-NØRRELYKKE, B. FABRY und J. J. FREDBERG: *Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(3):C595–C605, Mar 2002.
- [12] CESA, C. M., N. KIRCHGESSNER, D. MAYER, U. S. SCHWARZ, B. HOFFMANN und R. MERKEL: *Micropatterned silicone elastomer substrates for high resolution analysis of cellular force patterns*. *Rev Sci Instrum*, 78(3):034301, Mar 2007.
- [13] CHELLAIAH, M. A.: *Regulation of actin ring formation by rho GTPases in osteoclasts*. *J Biol Chem*, 280(38):32930–32943, Sep 2005.
- [14] CHHABRA, E. S. und H. N. HIGGS: *The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures*. *Nat Cell Biol*, 9(10):1110–1121, Oct 2007.
- [15] CHIEN, C. B., D. E. ROSENTHAL, W. A. HARRIS und C. E. HOLT: *Navigational errors made by growth cones without filopodia in the embryonic *Xenopus* brain*. *Neuron*, 11(2):237–251, Aug 1993.
- [16] CHOI, C. K., M. VICENTE-MANZANARES, J. ZARENO, L. A. WHITMORE, A. MORGILNER und A. R. HORWITZ: *Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner*. *Nat Cell Biol*, 10(9):1039–1050, Sep 2008.
- [17] CLAINCHE, C. LE und M.-F. CARLIER: *Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration*. *Physiol Rev*, 88(2):489–513, Apr 2008.
- [18] CRITCHLEY, D. R. und A. R. GINGRAS: *Talin at a glance*. *J Cell Sci*, 121(Pt 9):1345–1347, May 2008.
- [19] DEGUCHI, S. und M. SATO: *Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells*. *Biorheology*, 46(2):93–105, 2009.
- [20] DEPASQUALE, J. A. und C. S. IZZARD: *Evidence for an actin-containing cytoplasmic precursor of the focal contact and the timing of incorporation of vinculin at the focal contact*. *J Cell Biol*, 105(6 Pt 1):2803–2809, Dec 1987.
- [21] DISCHER, D. E., P. JANMEY und Y.-L. WANG: *Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate*. *Science*, 310(5751):1139–1143, Nov 2005.

- [22] EDLUND, M., M. A. LOTANO und C. A. OTEY: *Dynamics of alpha-actinin in focal adhesions and stress fibers visualized with alpha-actinin-green fluorescent protein*. Cell Motil Cytoskeleton, 48(3):190–200, Mar 2001.
- [23] ENDLICH, N., C. A. OTEY, W. KRIZ und K. ENDLICH: *Movement of stress fibers away from focal adhesions identifies focal adhesions as sites of stress fiber assembly in stationary cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 64(12):966–976, Dec 2007.
- [24] FAROOQUI, R. und G. FENTEANY: *Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement*. J Cell Sci, 118(Pt 1):51–63, Jan 2005.
- [25] FRIEDL, P. und K. WOLF: *Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process*. Cancer Metastasis Rev, 28(1-2):129–135, Jun 2009.
- [26] FRIEDL, P. und K. WOLF: *Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model*. J Exp Med, 207(1):11–19, Jan 2010.
- [27] GALBRAITH, C. G., K. M. YAMADA und J. A. GALBRAITH: *Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites*. Science, 315(5814):992–995, Feb 2007.
- [28] GALBRAITH, C. G., K. M. YAMADA und M. P. SHEETZ: *The relationship between force and focal complex development*. J Cell Biol, 159(4):695–705, Nov 2002.
- [29] GARDEL, M. L., B. SABASS, L. JI, G. DANUSER, U. S. SCHWARZ und C. M. WATERMAN: *Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed*. J Cell Biol, 183(6):999–1005, Dec 2008.
- [30] GEIGER, B., A. BERSHADSKY, R. PANKOV und K. M. YAMADA: *Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2(11):793–805, Nov 2001.
- [31] GEIGER, B., J. P. SPATZ und A. D. BERSHADSKY: *Environmental sensing through focal adhesions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 10(1):21–33, Jan 2009.
- [32] GERHARDT, H., M. GOLDING, M. FRUTTIGER, C. RUHRBERG, A. LUNDKVIST, A. ABRAMSSON, M. JELTSCH, C. MITCHELL, K. ALITALO, D. SHIMA und C. BETSHOLTZ: *VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia*. J Cell Biol, 161(6):1163–1177, Jun 2003.
- [33] GIANNELLI, G., J. FALK-MARZILLIER, O. SCHIRALDI, W. G. STETLER-STEVENSON und V. QUARANTA: *Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5*. Science, 277(5323):225–228, Jul 1997.

- [34] GUPTON, S. L. und F. B. GERTLER: *Filopodia: the fingers that do the walking*. Sci STKE, 2007(400):re5, Sep 2007.
- [35] HARBECK, B., S. HÜTTELMAIER, K. SCHLUTER, B. M. JOCKUSCH und S. ILLENBERGER: *Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin*. J Biol Chem, 275(40):30817–30825, Oct 2000.
- [36] HARRIS, A. K., P. WILD und D. STOPAK: *Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion*. Science, 208(4440):177–179, Apr 1980.
- [37] HOFFMANN, B. und C. SCHÄFER: *Filopodial focal complexes direct adhesion and force generation towards filopodia outgrowth*. Cell Adh Migr, 4(2), Apr 2010.
- [38] HOTULAINEN, P. und P. LAPPALAINEN: *Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells*. J Cell Biol, 173(3):383–394, May 2006.
- [39] HU, K., L. JI, K. T. APPELEGATE, G. DANUSER und C. M. WATERMAN-STORER: *Differential transmission of actin motion within focal adhesions*. Science, 315(5808):111–115, Jan 2007.
- [40] HUANG, Y., I. A. QURESHI und H. CHEN: *Effects of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and neomycin on phospholipase D: kinetic studies*. Mol Cell Biochem, 197(1-2):195–201, Jul 1999.
- [41] HYNES, R. O.: *Fibronectins*. Springer-Verlag, New York, 1990.
- [42] HYNES, R. O.: *Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines*. Cell, 110(6):673–687, Sep 2002.
- [43] IDESES, Y., Y. BRILL-KARNIELY, L. HAVIV, A. BEN-SHAUL und A. BERNHEIM-GROSWASSER: *Arp2/3 branched actin network mediates filopodia-like bundles formation in vitro*. PLoS One, 3(9):e3297, 2008.
- [44] ILINA, O. und P. FRIEDL: *Mechanisms of collective cell migration at a glance*. J Cell Sci, 122(Pt 18):3203–3208, Sep 2009.
- [45] IMANAKA-YOSHIDA, K., M. ENOMOTO-IWAMOTO, T. YOSHIDA und T. SAKAKURA: *Vinculin, Talin, Integrin alpha6beta1 and laminin can serve as components of attachment complex mediating contraction force transmission from cardiomyocytes to extracellular matrix*. Cell Motil Cytoskeleton, 42(1):1–11, 1999.
- [46] IWASAKI, T., A. NAKATA, M. MUKAI, K. SHINKAI, H. YANO, H. SABE, E. SCHAEFER, M. TATSUTA, T. TSUJIMURA, N. TERADA, E. KAKISHITA und H. AKEDO: *Involvement of phosphorylation of Tyr-31 and Tyr-118 of paxillin in MM1 cancer cell migration*. Int J Cancer, 97(3):330–335, Jan 2002.

- [47] IZZARD, C. S. und L. R. LOCHNER: *Formation of cell-to-substrate contacts during fibroblast motility: an interference-reflexion study*. J Cell Sci, 42:81–116, Apr 1980.
- [48] KIRFEL, G. und V. HERZOG: *Migration of epidermal keratinocytes: mechanisms, regulation, and biological significance*. Protoplasma, 223(2-4):67–78, Jun 2004.
- [49] KIRFEL, G., A. RIGORT, B. BORM, C. SCHULTE und V. HERZOG: *Structural and compositional analysis of the keratinocyte migration track*. Cell Motil Cytoskeleton, 55(1):1–13, May 2003.
- [50] KOCGOZLU, L., P. LAVALLE, G. KOENIG, B. SENGER, Y. HAIKEL, P. SCHAAF, J.-C. VOEGEL, H. TENENBAUM und D. VAUTIER: *Selective and uncoupled role of substrate elasticity in the regulation of replication and transcription in epithelial cells*. J Cell Sci, 123(Pt 1):29–39, Jan 2010.
- [51] KOROBOVA, F. und T. SVITKINA: *Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuritogenesis in neuronal cells*. Mol Biol Cell, 19(4):1561–1574, Apr 2008.
- [52] KUREISHY, N., V. SAPOUNTZI, S. PRAG, N. ANILKUMAR und J. C. ADAMS: *Fascin, and their roles in cell structure and function*. Bioessays, 24(4):350–361, Apr 2002.
- [53] LADWEIN, M. und K. ROTTNER: *On the Rho'd: the regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases*. FEBS Lett, 582(14):2066–2074, Jun 2008.
- [54] LAI, F.P. L., M.SZCZODRAK, J. BLOCK, J. FAIX, D. BREITSPRECHER, H. G. MANNHERZ, T. E. B. STRADAL, G.A .DUNN, J. V. SMALL und K. ROTTNER: *Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia*. EMBO J, 27(7):982–992, Apr 2008.
- [55] LANSDOWN, A. B. G.: *Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin*. Wound Repair Regen, 10(5):271–285, 2002.
- [56] LAUFFENBURGER, D. A. und A. F. HORWITZ: *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 84(3):359–369, Feb 1996.
- [57] LEE, J., A. ISHIHARA und K. JACOBSON: *The fish epidermal keratocyte as a model system for the study of cell locomotion*. Symp Soc Exp Biol, 47:73–89, 1993.
- [58] LEISS, M., K. BECKMANN, A. GIRÓS, M. COSTELL und R. FÄSSLER: *The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo*. Curr Opin Cell Biol, 20(5):502–507, Oct 2008.

- [59] LELE, T. P., J. PENDSE, S. KUMAR, M. SALANGA, J. KARAVITIS und D. E. INGBER: *Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells*. J Cell Physiol, 207(1):187–194, Apr 2006.
- [60] LEMMON, C. A., C. S. CHEN und L. H. ROMER: *Cell traction forces direct fibronectin matrix assembly*. Biophys J, 96(2):729–738, Jan 2009.
- [61] LEVENTAL, K. R., H. YU, L. KASS, J. N. LAKINS, M. EGEBLAD, J. T. ERLER, S. F. T. FONG, K. CSISZAR, A. GIACCIA, W. WENINGER, M. YAMAUCHI, D. L. GASSER und V. M. WEAVER: *Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling*. Cell, 139(5):891–906, Nov 2009.
- [62] LIBOTTE, T., H. W. KAISER, W. ALT und T. BRETSCHEIDER: *Polarity, protrusion-retraction dynamics and their interplay during keratinocyte cell migration*. Exp Cell Res, 270(2):129–137, Nov 2001.
- [63] LODISH, H., D. BALTIMORE, A. BERK, S. L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA und J. DARNELL: *Molekulare Zellbiologie*. de Gruyter, Berlin, 1996.
- [64] MACHACEK, M., L. HODGSON, C. WELCH, H. ELLIOTT, O. PERTZ, P. NALBANT, A. ABELL, G. L. JOHNSON, K. M. HAHN und G. DANUSER: *Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion*. Nature, 461(7260):99–103, Sep 2009.
- [65] MACNEIL, S.: *Progress and opportunities for tissue-engineered skin*. Nature, 445(7130):874–880, Feb 2007.
- [66] MALLAVARAPU, A. und T. MITCHISON: *Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction*. J Cell Biol, 146(5):1097–1106, Sep 1999.
- [67] MAO, Y. und J. E. SCHWARZBAUER: *Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process*. Matrix Biol, 24(6):389–399, Sep 2005.
- [68] MARTÍN-BLANCO, E. und E. KNUST: *Epithelial morphogenesis: filopodia at work*. Curr Biol, 11(1):R28–R31, Jan 2001.
- [69] MEDEIROS, N. A., D. T. BURNETTE und P. FORSCHER: *Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones*. Nat Cell Biol, 8(3):215–226, Mar 2006.
- [70] MEJILLANO, M. R., S. KOJIMA, D. A. APPLEWHITE, F. B. GERTLER, T. M. SVITKINA und G. G. BORISY: *Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end*. Cell, 118(3):363–373, Aug 2004.
- [71] MERKEL, R., N. KIRCHGESSNER, C. M. CESA und B. HOFFMANN: *Cell force microscopy on elastic layers of finite thickness*. Biophys J, 93(9):3314–3323, Nov 2007.

- [72] MÖHL, C.: *Untersuchungen zur Adhäsionsdynamik migrierender Keratinozyten*. Doktorarbeit, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2009.
- [73] MÖHL, C., N. KIRCHGESSNER, C. SCHÄFER, K. KÜPPER, S. BORN, G. DIEZ, W. H. GOLDMANN, R. MERKEL und B. HOFFMANN: *Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(6):350–364, Jun 2009.
- [74] MILLARD, T. H. und P. MARTIN: *Dynamic analysis of filopodial interactions during the zippering phase of Drosophila dorsal closure*. *Development*, 135(4):621–626, Feb 2008.
- [75] MITRA, S. K., D. A. HANSON und D. D. SCHLAEPFER: *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(1):56–68, Jan 2005.
- [76] MURPHY, D.B.: *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*. John Wiley and Sons, New York, 2001.
- [77] NEMETHOVA, M., S. AUINGER und J. V. SMALL: *Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella*. *J Cell Biol*, 180(6):1233–1244, Mar 2008.
- [78] NGUYEN, B. P., M. C. RYAN, S. G. GIL und W. G. CARTER: *Deposition of laminin 5 in epidermal wounds regulates integrin signaling and adhesion*. *Curr Opin Cell Biol*, 12(5):554–562, Oct 2000.
- [79] NOBES, C. D. und A. HALL: *Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia*. *Cell*, 81(1):53–62, Apr 1995.
- [80] OLIVER, T., M. DEMBO und K. JACOBSON: *Separation of propulsive and adhesive traction stresses in locomoting keratocytes*. *J Cell Biol*, 145(3):589–604, May 1999.
- [81] PAGE-MCCAW, A., A. J. EWALD und Z. WERB: *Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3):221–233, Mar 2007.
- [82] PARAST, M. M. und C. A. OTEY: *Characterization of palladin, a novel protein localized to stress fibers and cell adhesions*. *J Cell Biol*, 150(3):643–656, Aug 2000.
- [83] PARDO, J. V., J. D. SILICIANO und S. W. CRAIG: *Vinculin is a component of an extensive network of myofibril-sarcolemma attachment regions in cardiac muscle fibers*. *J Cell Biol*, 97(4):1081–1088, Oct 1983.
- [84] PAREKH, A. und A. M. WEAVER: *Regulation of cancer invasiveness by the physical extracellular matrix environment*. *Cell Adh Migr*, 3(3):288–292, 2009.

- [85] PASZEK, M. J., N. ZAHIR, K. R. JOHNSON, J. N. LAKINS, G. I. ROZENBERG, A. GEFEN, C. A. REINHART-KING, S. S. MARGULIES, M. DEMBO, D. BOETTIGER, D. A. HAMMER und V. M. WEAVER: *Tensional homeostasis and the malignant phenotype*. *Cancer Cell*, 8(3):241–254, Sep 2005.
- [86] PERTZ, O., L. HODGSON, R. L. KLEMKE und K. M. HAHN: *Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells*. *Nature*, 440(7087):1069–1072, Apr 2006.
- [87] PETIT, V., B. BOYER, D. LENTZ, C. E. TURNER, J. P. THIERY und A. M. VALLÉS: *Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells*. *J Cell Biol*, 148(5):957–970, Mar 2000.
- [88] POLLARD, T. D.: *Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36:451–477, 2007.
- [89] POLLARD, T. D. und G. G. BORISY: *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. *Cell*, 112(4):453–465, Feb 2003.
- [90] PONTI, A., M. MACHACEK, S. L. GUPTON, C. M. WATERMAN-STORER und G. DANUSER: *Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells*. *Science*, 305(5691):1782–1786, Sep 2004.
- [91] RAFTOPOULOU, M. und A. HALL: *Cell migration: Rho GTPases lead the way*. *Dev Biol*, 265(1):23–32, Jan 2004.
- [92] REINHARD, M., T. JARCHAU und U. WALTER: *Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins*. *Trends Biochem Sci*, 26(4):243–249, Apr 2001.
- [93] RINNE, H.: *Taschenbuch der Statistik*. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, 2008.
- [94] RIVELINE, D., E. ZAMIR, N. Q. BALABAN, U. S. SCHWARZ, T. ISHIZAKI, S. NARUMIYA, Z. KAM, B. GEIGER und A. D. BERSHADSKY: *Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism*. *J Cell Biol*, 153(6):1175–1186, Jun 2001.
- [95] ROTTNER, K., A. HALL und J. V. SMALL: *Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics*. *Curr Biol*, 9(12):640–648, Jun 1999.
- [96] ROZARIO, T., B. DZAMBA, G. F. WEBER, L. A. DAVIDSON und D. W. DESIMONE: *The physical state of fibronectin matrix differentially regulates morphogenetic movements in vivo*. *Dev Biol*, 327(2):386–398, Mar 2009.

- [97] RØRTH, P.: *Collective guidance of collective cell migration.* Trends Cell Biol, 17(12):575–579, Dec 2007.
- [98] SABASS, B., M. L. GARDEL, C. M. WATERMAN und U. S. SCHWARZ: *High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances.* Biophys J, 94(1):207–220, Jan 2008.
- [99] SAFIEJKO-MROCZKA, B. und P. B. BELL: *Reorganization of the actin cytoskeleton in the protruding lamellae of human fibroblasts.* Cell Motil Cytoskeleton, 50(1):13–32, Sep 2001.
- [100] SAMARIN, S., S. ROMERO, C. KOCKS, D. DIDRY, D. PANTALONI und M.-F. CARLIER: *How VASP enhances actin-based motility.* J Cell Biol, 163(1):131–142, Oct 2003.
- [101] SCHÄFER, C., B. BORM, S. BORN, C. MÖHL, E.-M. EIBL und B. HOFFMANN: *One step ahead: role of filopodia in adhesion formation during cell migration of keratinocytes.* Exp Cell Res, 315(7):1212–1224, Apr 2009.
- [102] SCHÄFER, C., S. BORN, C. MÖHL, S. HOUBEN, N. KIRCHGESSNER, R. MERKEL und B. HOFFMANN: *The key feature for early migratory processes: Dependence of adhesion, actin bundles, force generation and transmission on filopodia.* Cell Adh Migr, 4(2), Apr 2010.
- [103] SCHÄFER, M. und S. WERNER: *Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited.* Nat Rev Mol Cell Biol, 9(8):628–638, Aug 2008.
- [104] SCHIRENBECK, A., R. ARASADA, T. BRETSCHEIDER, M. SCHLEICHER und J. FAIX: *Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia.* Biochem Soc Trans, 33(Pt 6):1256–1259, Dec 2005.
- [105] SCHIRENBECK, A., T. BRETSCHEIDER, R. ARASADA, M. SCHLEICHER und J. FAIX: *The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia.* Nat Cell Biol, 7(6):619–625, Jun 2005.
- [106] SCHMITZ, A. A., E. E. GOVEK, B. BÖTTNER und L. VAN AELST: *Rho GTPases: signaling, migration, and invasion.* Exp Cell Res, 261(1):1–12, Nov 2000.
- [107] SCHWARZ, U. S., N. Q. BALABAN, D. RIVELINE, A. BERSHADSKY, B. GEIGER und S. A. SAFRAN: *Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization.* Biophys J, 83(3):1380–1394, Sep 2002.
- [108] SECHLER, J. L. und J. E. SCHWARZBAUER: *Coordinated regulation of fibronectin fibril assembly and actin stress fiber formation.* Cell Adhes Commun, 4(6):413–424, Mar 1997.

- [109] SEDGEWICK, R.: *Algorithmen in C*. Addison-Wesley, New York, 1992.
- [110] SHAW, T. J. und P. MARTIN: *Wound repair at a glance*. J Cell Sci, 122(Pt 18):3209–3213, Sep 2009.
- [111] SHEETZ, M. P., D. P. FELSENFELD und C. G. GALBRAITH: *Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes*. Trends Cell Biol, 8(2):51–54, Feb 1998.
- [112] SIGAL, Y. J., O. A. QUINTERO, R. E. CHENEY und A. J. MORRIS: *Cdc42 and ARP2/3-independent regulation of filopodia by an integral membrane lipid-phosphatase-related protein*. J Cell Sci, 120(Pt 2):340–352, Jan 2007.
- [113] SMALL, J. V.: *Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks*. J Cell Biol, 91(3 Pt 1):695–705, Dec 1981.
- [114] SMALL, J. V., G. ISENBERG und J. E. CELIS: *Polarity of actin at the leading edge of cultured cells*. Nature, 272(5654):638–639, Apr 1978.
- [115] SMILENOV, L. B., A. MIKHAILOV, R. J. PELHAM, E. E. MARCANTONIO und G. G. GUNDERSEN: *Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts*. Science, 286(5442):1172–1174, Nov 1999.
- [116] STÖCKER, H.: *Taschenbuch der Physik*. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt am Main, 2000.
- [117] STEFFEN, A., J. FAIX, G. P. RESCH, J. LINKNER, J. WEHLAND, J. V. SMALL, K. ROTTNER und T. E. B. STRADAL: *Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes*. Mol Biol Cell, 17(6):2581–2591, Jun 2006.
- [118] STEKETEE, M. B. und K. W. TOSNEY: *Three functionally distinct adhesions in filopodia: shaft adhesions control lamellar extension*. J Neurosci, 22(18):8071–8083, Sep 2002.
- [119] SVITKINA, T. M., E. A. BULANOVA, O. Y. CHAGA, D. M. VIGNJEVIC, S. KOJIMA, J. M. VASILIEV und G. G. BORISY: *Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network*. J Cell Biol, 160(3):409–421, Feb 2003.
- [120] TAN, J. L., J. TIEN, D. M. PIRONE, D. S. GRAY, K. BHADRIRAJU und C. S. CHEN: *Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(4):1484–1489, Feb 2003.
- [121] VIGNJEVIC, D., S.-I. KOJIMA, Y. ARATYN, O. DANCIU, T. SVITKINA und G. G. BORISY: *Role of fascin in filopodial protrusion*. J Cell Biol, 174(6):863–875, Sep 2006.

- [122] WOLF, K. und P. FRIEDL: *Mapping proteolytic cancer cell-extracellular matrix interfaces*. Clin Exp Metastasis, 26(4):289–298, 2009.
- [123] WOOD, W. und P. MARTIN: *Structures in focus–filopodia*. Int J Biochem Cell Biol, 34(7):726–730, Jul 2002.
- [124] WROBEL, G., M. HÖLLER, S. INGEBRANDT, S. DIELUWEIT, F. SOMMERHAGE, H. P. BOCHEM und A. OFFENHÄUSSER: *Transmission electron microscopy study of the cell-sensor interface*. J R Soc Interface, 5(19):213–222, Feb 2008.
- [125] YAM, P. T., C. A. WILSON, L. JI, B. HEBERT, E. L. BARNHART, N. A. DYE, P. W. WISEMAN, G. DANUSER und J. A. THERIOT: *Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility*. J Cell Biol, 178(7):1207–1221, Sep 2007.
- [126] YANG, C., L. CZECH, S. GERBOTH, S. KOJIMA, G. SCITA und T. SVITKINA: *Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells*. PLoS Biol, 5(11):e317, Nov 2007.
- [127] ZAIDEL-BAR, R., C. BALLESTREM, Z. KAM und B. GEIGER: *Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells*. J Cell Sci, 116(Pt 22):4605–4613, Nov 2003.
- [128] ZAIDEL-BAR, R., M. COHEN, L. ADDADI und B. GEIGER: *Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes*. Biochem Soc Trans, 32(Pt3):416–420, Jun 2004.
- [129] ZAIDEL-BAR, R., S. ITZKOVITZ, A., R. IYENGAR und B. GEIGER: *Functional atlas of the integrin adhesome*. Nat Cell Biol, 9(8):858–867, Aug 2007.
- [130] ZAMIR, E. und B. GEIGER: *Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions*. J Cell Sci, 114(Pt 20):3583–3590, Oct 2001.