

Experimentelle Untersuchung molekularer Signalkaskaden in der zellulären Mechanosensorik

Dissertation

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

vorgelegt von

Verena Niediek
aus Marburg

Bonn, September 2012

Anfertigung 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: 23.1.2013

Erscheinungsjahr: 2013

Zusammenfassung

Physikalische Signale stellen für Zellen wichtige Informationen dar, die über eine Reihe von Signalkaskaden auf verschiedenste Zellfunktionen wie Zellzyklus, Differenzierung oder Migrationsverhalten wirken. Die von Zellen wahrgenommenen mechanischen Signale können dabei u.a. Topographie, Elastizität oder Dehnung des Substrates umfassen. Zur Erkennung solcher Signale sind Strukturen notwendig, die solche äußeren Signale ins Zellinnere übertragen. Insbesondere die Fokaladhäsionen, die die Verbindung zwischen der Extrazellulären Matrix und dem Zytoskelett der Zelle aufbauen, scheinen eine wichtige Rolle zu übernehmen.

Der Aufbau von Fokaladhäsionen ist hoch komplex. Mehr als 150 bisher bekannte Proteine sind zumindest peripher daran beteiligt. Diese setzen sich in erster Linie aus Struktur-, Adapter- und Signalproteinen zusammen. Ein Großteil der an der Fokaladhäsion beteiligten Proteine wird in Bezug auf Struktur und Funktion reguliert, wobei die Regulation dabei weitgehend über Phosphorylierung erfolgt. Tyrosinkinasen wie FAK und die Tyrosinkinasen der Src-Familie nehmen in den Fokaladhäsionen eine zentrale Rolle ein.

Setzt man Zellen dem physikalischen Signal der uniaxialen, zyklischen Dehnung aus, reagieren diese, indem sie ihre Orientierung ändern. Dabei richten Zellen als erstes ihr Zytoskeletts und nachfolgend ihre ganze Zellform senkrecht zur Zugrichtung aus. Die an diesem Prozess beteiligten Signalwege sind noch immer zu großen Teilen unverstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Kinasen der Src-Familie auf die Reorientierung bei uniaxialer, zyklischer Dehnung untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Zellen, denen alle drei ubiquitär exprimierten Kinasen der Src-Familie (Src, Yes und Fyn) fehlen, eine im Vergleich zum Wildtypen deutlich verminderte Reorientierung senkrecht zur Zugrichtung aufwiesen. Daraus folgt, dass die Zellantwort auf zyklische Dehnung zumindest teilweise auf der Funktion der Kinasen beruht. Zellen, denen Yes und Fyn fehlen, während Src unverändert exprimiert wird, zeigten einen intermediären Effekt. Das deutet darauf hin, dass die Kinasen einander in diesem Signalweg nur teilweise komplementieren können.

Ein Fokaladhäsionsprotein mit möglicher mechanosensitiver Funktion stellt p130Cas dar. Für dieses Protein konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es bei mechanischer Dehnung wie eine Feder auseinander gezogen und nachfolgend von den Kinasen der Src-Familie

phosphoryliert wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle dieses Proteins *in vivo* bei zyklischer Dehnung untersucht. Die Versuche zeigten, dass Zellen, die nicht mehr über p130Cas verfügen, sich nur unvollständig reorientieren können. In Versuchen mit einer p130Cas Mutante, in der die Tyrosine der streckbaren Substratdomäne durch Punktmutationen konstitutiv inaktiviert wurden, zeigte sich die gleiche verminderte Fähigkeit zur Reorientierung wie bei p130Cas-Knockout-Mutanten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Dehnung von p130Cas sowie die nachfolgende Phosphorylierung einen wichtigen Einfluss auf die Reorientierung von Zellen als Reaktion auf zyklische Dehnung haben.

Auf dieser Basis wurden weitere Versuche mit Crk, einem Adapterprotein von p130Cas, sowie einer Reihe weiterer Signalproteine wie C3G oder Dock1 durchgeführt. Knockdown- oder Knockout-Experimente mit diesen Proteinen stellen eine gute Grundlage für die Untersuchung des weiteren Signalweges dar.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung | I |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Mechanosensorik und mögliche Signalwege | 1 |
| 1.2 Fokaladhäsionen als Verbindung zwischen Zytoskelett und der Extrazellulären Matrix | 4 |
| 1.2.1 Die Extrazelluläre Matrix | 4 |
| 1.2.2 Integrine | 4 |
| 1.2.3 Fokaladhäsionen | 4 |
| 1.2.4 Stressfasern | 6 |
| 1.3 Regulierung und Signalwege der Fokaladhäsion | 6 |
| 1.3.1 Bildung und Reifung | 6 |
| 1.3.2 Die Rolle der Phosphorylierung | 7 |
| 1.3.3 Regulation der Phosphorylierung durch Kinasen | 8 |
| 1.3.4 Vinculin in der Fokaladhäsion | 10 |
| 1.3.5 p130Cas als möglicher Mechanosensor | 11 |
| 1.3.6 Das Adapterprotein Crk | 14 |
| 1.3.7 Bindungspartner von Crk | 15 |
| 1.3.8 Der ERK1/2 Signalweg | 16 |
| 1.4 Eigene Vorversuche zu MEF-WT, -SYF und -Src++ | 17 |
| 1.5 Ziele der Arbeit | 17 |
| 2 Material und Methoden | 21 |
| 2.1 Zellkultur | 21 |
| 2.1.1 Zelllinien | 21 |
| 2.1.2 Kulturbedingungen | 22 |
| 2.1.3 Transfektion | 22 |
| 2.1.4 Inhibitor-Experimente | 23 |
| 2.2 Immunocytochemie | 23 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.3 | Proteinanalyse | 24 |
| 2.3.1 | Proteinisolation | 24 |
| 2.3.2 | SDS-Gelelektrophorese | 25 |
| 2.3.3 | Western Transfer und Antikörperfärbung | 25 |
| 2.3.4 | Quantifizierung von Western Blots | 25 |
| 2.4 | RNA-Analyse | 26 |
| 2.4.1 | RNA Isolation und Reverse Transkriptase PCR | 26 |
| 2.4.2 | qRT-PCR | 27 |
| 2.4.3 | Auswertung | 28 |
| 2.5 | Zugexperimente | 28 |
| 2.5.1 | Herstellung der Zugkammern | 28 |
| 2.5.2 | Aufbau der Zugapparatur und Durchführung der Experimente | 29 |
| 2.5.3 | Digitale Bildverarbeitung und Auswertung | 31 |
| 2.6 | Mikroskopie | 35 |
| 2.7 | Statistische Datenverarbeitung | 36 |
| 3 | Ergebnisse | 37 |
| 3.1 | Validierung der Methoden zur Bestimmung der Zellorientierung | 38 |
| 3.2 | Die Rolle der Kinasen der Src-Familie bei zyklischer Dehnung | 44 |
| 3.2.1 | Dehnungsexperimente an MEF-WT, -SYF und -Src++ | 44 |
| 3.2.2 | Kontrolle der Versuche durch SFK-Inhibitoren | 49 |
| 3.3 | Die Rolle von p130Cas bei zyklischer Dehnung | 52 |
| 3.3.1 | Knockdown von p130Cas mittels siRNA | 52 |
| 3.3.2 | Charakterisierung der MEF-Cas $-/-$, -Cas-15F- und -Cas-WT-Zelllinien | 57 |
| 3.3.3 | Dehnungsexperimente mit MEF-Cas-WT, -Cas-15F und -Cas $-/-$ | 59 |
| 3.4 | Untersuchung der Rolle direkter und indirekter Bindungspartner von p130Cas in der Reorientierung | 62 |
| 3.4.1 | Crk | 62 |
| 3.4.2 | Dock1 | 64 |
| 3.4.3 | C3G | 66 |
| 3.4.4 | Abl1 | 67 |
| 3.5 | Die Rolle von Vinculin bei zyklischer Dehnung | 68 |
| 3.6 | Phosphorylierungsmuster einzelner Proteine bei zyklischer Dehnung | 70 |
| 3.6.1 | Phosphorylierung von Erk1/2 in Podozyten nach zyklischer Dehnung | 70 |
| 3.6.2 | Phosphorylierung von Crk und p130Cas in MEF-WT nach zyklischer Dehnung | 73 |

| | |
|--|------------|
| 4 Diskussion | 77 |
| 4.1 Orientierungsbestimmung von MEF-Zellen | 77 |
| 4.1.1 Orientierung der Zellform | 77 |
| 4.1.2 Das Aktinzytoskelett | 78 |
| 4.1.3 Auswertung der Aktinorientierung | 79 |
| 4.1.4 Ordnungsparameter | 80 |
| 4.2 Einfluss der SFK auf die Reorientierung | 80 |
| 4.3 p130Cas bei zyklischer Dehnung | 82 |
| 4.4 Das Adapterprotein Crk | 84 |
| 4.5 Bindungspartner von Crk | 86 |
| 4.6 Alternative Signalwege zu p130Cas | 87 |
| 4.7 Die Signalkaskade bei zyklischer Dehnung | 89 |
| 5 Anhang | 91 |
| 5.1 Abkürzungsverzeichnis | 91 |
| 5.2 Materialien | 94 |
| 5.2.1 Chemikalien | 94 |
| 5.2.2 Verwendete Antikörper | 96 |
| 5.2.3 siRNAs und TaqMan Sonden | 97 |
| 5.2.4 Puffer, Medien und Lösungen | 98 |
| 5.2.5 Verbrauchsmaterial | 100 |
| 5.2.6 Geräte | 101 |
| Literaturverzeichnis | VII |

1 Einleitung

Zellen stehen mit ihrer Umwelt in stetigem Kontakt. Neben zahlreichen chemischen Boten- und Signalstoffen werden auch mechanische Signale von der Zelle wahrgenommen. Steifigkeit, Deformation oder Topografie stellen Signale dar, die die Zellen in Differenzierung, Wachstum und Motilität beeinflussen können. Die Mechanosensoren, über die die Zellen mechanische Eigenschaften wahrnehmen können, sind dabei noch nicht vollständig verstanden. Die Ergebnisse aktueller Forschungsarbeiten zur zellulären Mechanosensorik werden im Folgenden vorgestellt und erläutert.

1.1 Mechanosensorik und mögliche Signalwege

Die Mechanosensorik ist in erster Linie in der Sinnesphysiologie bekannt: Im Innenohr werden durch mechanische Wellenbewegungen der Basilarmembran Haarzellen ausgelenkt. Dadurch werden mechanosensitive Ionenkanäle geöffnet, wodurch der Einstrom von Ionen ein Aktionspotential auslöst. Damit wird ein mechanisches Signal in ein neuronales umgewandelt [3]. Doch auch auf zellulärer Ebene spielt die Mechanosensorik eine Rolle in verschiedenen Prozessen. Die mechanischen Reize können dabei Härte, Topographie oder Bewegung eines Substrates umfassen, welche z.B. Differenzierung oder Motilität von Zellen beeinflussen können [26, 31]. In Abb. 1.1 sind Stammzellen auf Substraten unterschiedlicher Steifigkeit kultiviert. Die Steifigkeiten wurden dabei so eingestellt, dass sie verschiedenen Gewebetypen wie Gehirn, Muskel oder Knochen gleichen. Nachdem die Zellen für 96 h auf diesen Substraten kultiviert wurden, zeigten sie eine Morphologie, die den jeweiligen Gewebetypen entspricht. Zellen zeigten auf sehr weichem Substrat viele dünne Ausläufer, was für Neuronen typisch ist, während Zellen auf besonders harten Substraten die Morphologie von Knochenzellen aufweisen [34].

Nicht nur Differenzierung, auch Ausrichtung oder Orientierung von Zellen kann durch mechanische Signale beeinflusst werden. In Abb. 1.2 sind die Endothelzellen einer Arterienwand abgebildet. Alle Zellen liegen mit einer Ausrichtung parallel zum Blutfluss bzw. senkrecht zum Pulsdruck. In vitro lässt sich die Ausrichtung senkrecht zur Zugrichtung reproduzieren, indem Zellen auf einem elastischen Substrat kultiviert und für eine bestimmte Zeit zyklisch gezogen werden [17].

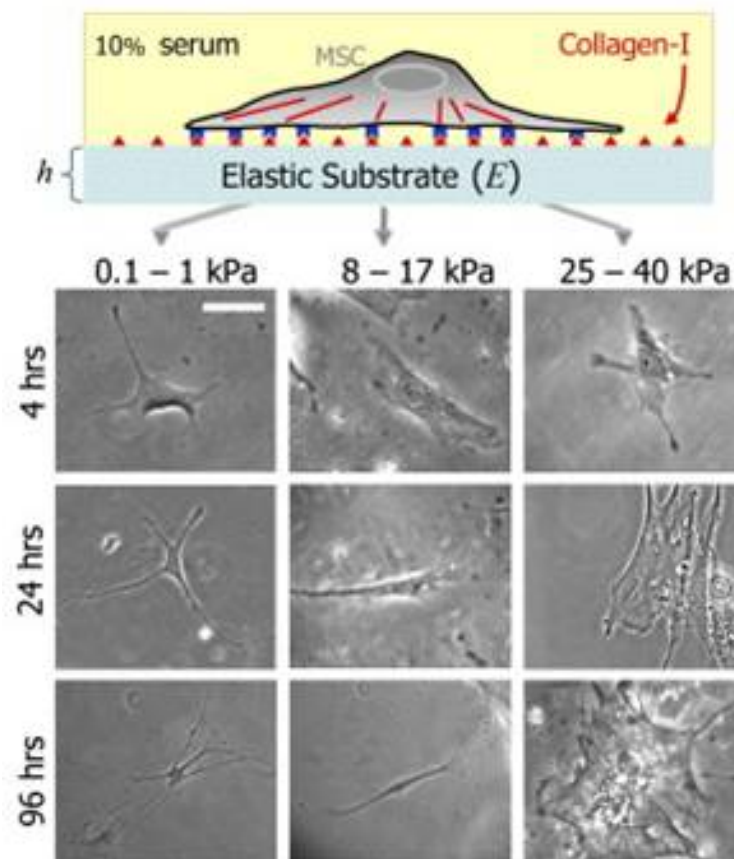


Abbildung 1.1: Mesenchymale Stammzellen wurden auf Substraten unterschiedlicher Steifigkeiten kultiviert. Die Steifigkeiten entsprechen verschiedenen Gewebetypen (0,1 - 1 kPa entspricht der Hirnsubstanz, 8 - 17 kPa den Muskeln und 25 - 40 kPa dem Knochengewebe). Die Zellen zeigen nach 96 h eine Morphologie, die den Zelltypen der jeweiligen Gewebetypen entspricht. Verändert nach [34].

Die Wahrnehmung und Verarbeitung mechanischer Reize ist für Zellen essentiell. Über welchen Mechanismus sie in der Lage sind, Dehnung oder Bewegung im Substrat zu erfassen ist noch nicht geklärt. Es existieren einige Hypothesen, welche im Folgenden vorgestellt werden.

Ein Mechanismus der Wahrnehmung von Substratdehnung funktioniert über Ionenkanäle, ähnlich zur Mechanosensorik des Innenohres. Die Kanäle sind in der Plasmamembran lokalisiert und werden über die Dehnung der Membran geöffnet, so dass Ionen einströmen. Naruse et al. konnten 1997 zeigen, dass die intrazelluläre Calcium (Ca^{2+}) Konzentration bei zyklischer Dehnung ansteigt [83]. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass sich uniaxial zyklisch gedehnte Zellen in Ca^{2+} -freiem Medium nicht senkrecht zur Zugrichtung ausrichten. Ein Inhibitor gegen Ca^{2+} -Ionenkanäle verhindert ebenfalls eine zelluläre Reorientierung [81].

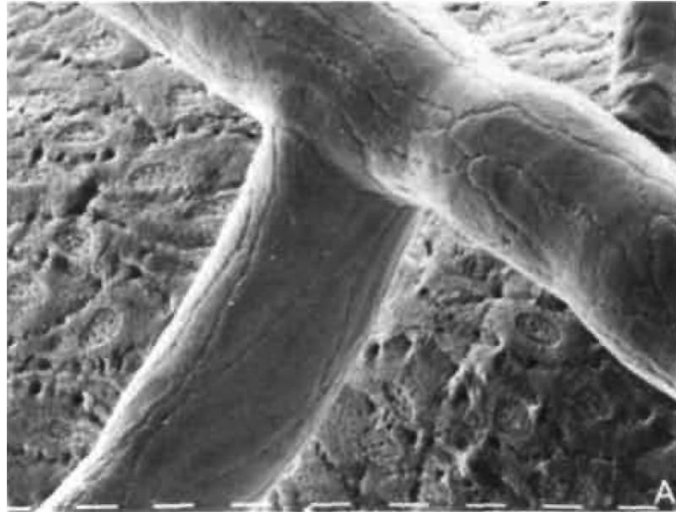


Abbildung 1.2: Ausrichtung von arteriellen Endothelzellen. Die inneren Zellen der Arterienwand liegen alle parallel zur Richtung des Blutflusses. Aus Langille & Adamson, 1981 [71].

Allerdings konnte von Hayakawa et al. 2001 gezeigt werden, dass die Umorientierung der Stressfasern im Gegensatz zur Zellform nicht Ca^{2+} abhängig ist. Hierfür wurden Zellen in einem Medium, das mit einem Ca^{2+} -Chelat versetzt war, zyklisch gezogen. Sie passten ihre Zellform der Dehnung nicht an während die Stressfasern weiterhin ausgerichtet wurden [49].

Das Aktinzytoskelett ist ebenfalls an der Mechanosensorik beteiligt. Zum einen wird durch das Aktin-Myosin-System die Kraft der Zelle generiert und eine charakteristische Zellspannung aufgebaut, die ein Equilibrium zur Spannung der EZM darstellt [58, 113]. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass bei Dehnung im Zytoskelett Risse entstehen, in die verstärkt Zyxin zusammen mit α -Actinin und VASP eingelagert wird [120]. Ein weiterer vorgeschlagener Weg der Mechanosensorik läuft über Filamin A, einem Protein welches mit dem Aktinzytoskelett als Kreuzvernetzer interagiert [33].

Im Bereich der Extrazellulären Matrix (EZM) findet eine Mechanosensorik durch die Entfaltung von Fibronectin oder anderen EZM Proteinen statt [35].

Die Mehrzahl an Untersuchungen deutet jedoch darauf hin, dass die zelluläre Mechanosensorik über integrinvermittelte Adhäsionen, den Fokaladhäsionen (FA) läuft, die die EZM mit dem Zytoskelett verbinden [11, 43, 115]. An Nadelverzugsexperimenten konnte gezeigt werden, dass bei Substratdehnung das Zytoskelett stabil bleibt, während in der Fokaladhäsion eine Dehnung erfolgt [63]. Zudem werden FA von der Zelle verstärkt, wenn Dehnungskraft auf sie wirkt [94]. In den letzten Jahren sind viele Experimente zu mechanosensorischen Mechanismen unter Beteiligung der FA vorgestellt worden. Aufbau, Reifung und wichtige beteiligte Proteine sind schematisch in Abb. 1.3 abgebildet und werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

1.2 Fokaladhäsionen als Verbindung zwischen Zytoskelett und der Extrazellulären Matrix

1.2.1 Die Extrazelluläre Matrix

Die Extrazelluläre Matrix (EZM) befindet sich im Extrazellularraum zwischen tierischen Zellen. Dort übt sie unterschiedliche Funktionen aus, beispielsweise als Bindegewebe, Basalmembran oder auch Knorpelgewebe. Die EZM besteht aus Faserproteinen wie Kollagen oder Fibronectin, die der EZM ihre Stabilität verleihen sowie aus Glycosaminoglykanen und Proteoglykanen. Diese bilden eine wasserhaltige, gelartige Substanz. Die genaue Zusammensetzung und die sich daraus ergebenden Eigenschaften der EZM variieren mit den ausgeführten Aufgaben. Der Einfluss von EZM und Zellen ist wechselseitig. Die Zelle sekretiert die Bestandteile der EZM und verändert diese konstant während die EZM ihrerseits die Zelle in Adhäsion, Migration und Proliferation beeinflusst [3].

1.2.2 Integrine

Integrine vermitteln die Bindung von Zellen an die EZM. Sie stellen eine homologe Familie von Transmembranproteinen dar, die sich in zwei Klassen (α und β) unterteilen lassen. Jeweils ein α - und ein β -Integrin bilden einen Heterodimer, wobei bisher 18 α - und 8 β -Integrine in 24 bisher möglichen Kombinationen bekannt sind wodurch die Spezifität der Integrine erhöht ist. Fibronectin wird beispielsweise von $\alpha_5\beta_1$ an einer speziellen Arg-Gly-Asp (RGD) Sequenz gebunden, während $\alpha_v\beta_3$ an die gleiche Sequenz in Vitronectin bindet [53]. Integrine bestehen aus einer langen N-terminalen extrazellulären Domäne, einer helikalen Transmembrandomäne und einer kurzen intrazellulären Domäne am C-Terminus. In der inaktiven Form sind die extrazellulären Domänen angewinkelt und die Bindestellen zu EZM Proteinen verdeckt. Die intrazellulären Domänen sind dann in engem Kontakt zueinander und ebenfalls nicht für Bindungspartner zugänglich [9]. Die Aktivierung von Integrinen kann bidirektional erfolgen. Zum einen kann durch die Bindung von Integrinen an EZM Proteine die intrazelluläre Domäne Bindestellen für Talin und Vinculin freigeben. Zum anderen können intrazelluläre Bindungen von Adapterproteinen wie Talin Integrine aktivieren [20].

1.2.3 Fokaladhäsionen

Fokaladhäsionen sind Proteinkomplexe, die die EZM über Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden. Diese Strukturen sind seit 1971 bekannt und immer noch Teil der aktuellen Forschung [1, 43]. Sie haben vielfache und wichtige Funktionen in Adhäsion

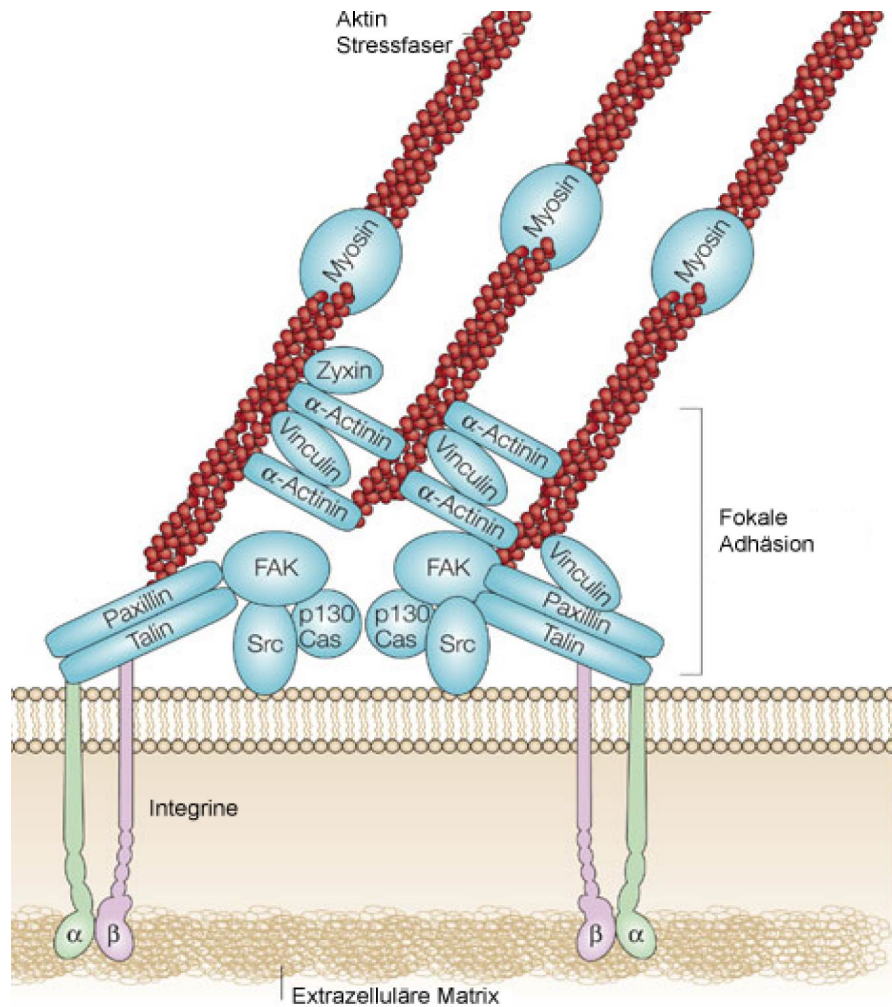


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung einer FA. Die Integrine stellen den transmembranen Bestandteil an den Adhäsionsproteine wie Talin oder Vinculin binden und die Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellen. Verändert nach [78].

und Migration. Des weiteren sind sie an der beidseitigen Signal- und Kraftübertragung zwischen extra- und intrazellulären Strukturen beteiligt [125]. An der FA sind 91 bisher bekannte Proteine beteiligt und wenigstens 65 interagieren mit diesem Proteinkomplex, wobei sich die Zusammensetzung der FA im Zuge der Entstehung, Reifung bis zum Abbau verändert [123]. Einen wichtigen Anteil der Proteine der FA machen Adapter- und Strukturproteine aus, die zwei andere Proteine zur Interaktion zusammenbringen [43]. Zu diesen Gruppen gehören beispielsweise Vinculin und Crk. FA sind stark reguliert, wobei die wichtigste Regulation über Phosphorylierungen vermittelt sind. Die wichtigsten Kinasen sind hier FAK (Fokale Adhäsions Kinase) und Src. Bildung und Reifung von FA sind in Abschnitt 1.3.1 ausführlich beschrieben.

1.2.4 Stressfasern

Stressfasern sind Bündel aus 10 bis 15 Aktinfilamenten, die die ganze Zelle durchspannen. Die Filamente werden über Kreuzvernetzer wie α -Actinin und Filamin gebündelt wobei in den Zwischenräumen Myosin Motorproteine eingelagert werden [89]. Über die Myosine wird eine ins Zellinnere gerichtete Spannung erzeugt, die von den Stressfasern auf die FA und darüber auf die EZM übertragen wird [8]. FA sind von einem sehr frühen Zeitpunkt ihrer Bildung mit dem Aktin Zytoskelett assoziiert und viele FA-Proteine haben Aktin-Bindestellen. Des Weiteren spielt die Zellkraft eine wichtige Rolle für die Regulation von FA. Wird eine größere Kraft auf FA ausgeübt werden diese verstärkt, bei fehlendem Zug abgebaut [94].

1.3 Regulierung und Signalwege der Fokaladhäsion

1.3.1 Bildung und Reifung

Die Bildung von integrinvermittelten Adhäsionen ist ein Prozess, der trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig verstanden ist. Die erste Zelladhäsion wird vermutlich durch Hyaluronsäure, einem Bestandteil der EZM vermittelt [24], die auch später noch zur Stabilisierung von FA notwendig ist [112]. Dieser schwachen Adhäsion folgt die Aktivierung der Integrinrezeptoren durch Liganden der EZM oder intrazelluläre Proteine wie Talin. So konnten schwache, integrinabhängige "slip-bonds", nachgewiesen werden, die durch Kraftereinwirkung von 2 pN gebrochen werden können und für deren Funktion Talin nötig ist [61]. Fokalkomplexe (FX) sind die ersten Adhäsionen, die mit 100 nm Durchmesser im Mikroskop sichtbar sind. In migrierenden Zellen entstehen sie am vorderen Rand von Lamellipodien und enthalten neben Integrin bereits Talin und Paxillin. Im Zuge der Reifung werden später auch Vinculin und α -Actinin sowie FAK und VASP in den FX nachweisbar [121]. Die Reifung von FX zu FA findet an der Grenze vom Lamellipodium zur Lamelle statt und ist durch ein Wachstum und eine damit einhergehende Stabilisierung der FA gekennzeichnet. Neben dem Einbau charakteristischer FA Proteine wie Zyxin und Tensin ist ein weiteres Merkmal von FA die stabile Verankerung von Stressfasern [122]. Über die Stressfasern wird ein Zug auf die FA ausgeübt, der für deren Bildung notwendig ist. Fehlt das Motorprotein Myosin IIA werden die FX wieder aufgelöst statt zu FA zu reifen [22]. Reguliert wird die Reifung der FA über Phosphorylierung. Insbesondere die Tyrosinphosphorylierung scheint einen Einfluss auf die Regulation von Adhäsionen zu haben. Junge FA zeigen einen hohen phospho-Tyrosin (pY) Gehalt und damit einhergehend eine hohe Dynamik. Reife und stabile FA sind wenig phosphoryliert während FA, die im Abbau begriffen sind, erneut eine starke Phosphorylierung zeigen [79].

Eine in der FA häufig auftretende Signalübertragung durch Proteininteraktion wird über strukturell konservierte Src-Homology-Domänen (SH Domänen) vermittelt. SH3 Domänen können an bestimmte prolinreiche Regionen binden. SH2 Domänen interagieren dagegen mit Sequenzen, die ein phosphoryliertes Tyrosin enthalten. Diese Domänen finden sich in vielen Proteinen und sind oft mit der Regulation des Zytoskeletts assoziiert [3]. Ein weiteres wiederkehrendes Motiv in der Regulation von FA ist die Interaktion zweier Proteine, die über ein Adapterprotein vermittelt wird [43].

1.3.2 Die Rolle der Phosphorylierung

Phosphorylierungen sind Bestandteile von vielen zellulären Signalwegen. Bei dieser posttranslationalen Modifikation werden Phosphatgruppen an die Seitenketten von Serin (Ser, S), Threonin (Thr, T) oder Tyrosin (Tyr, Y) angefügt. Die Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf die Seitenketten der Aminosäuren wird über Proteinkinasen vermittelt und durch Phosphatasen wieder entfernt. Serin/Threonin-Kinasen wirken auf die beiden Aminosäuren, Tyrosinkinase meist ausschließlich auf Tyrosine. Die Bindung der Phosphatgruppe kann eine intramolekulare Konformationsänderung bewirken, die zumeist durch die negative Ladung der Phosphatgruppe Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül erzeugt oder verlagert. Der gleiche Mechanismus kann auch Interaktionen mit einem anderen Molekül ermöglichen. Die Phosphatgruppe kann die Bindestellen oder direkt das aktive Zentrum durch sterische Hinderung blockieren. [90]

In FA reguliert die Phosphorylierung die Reifung der Strukturen. In migrierenden Zellen ist die Lebensdauer von FA besonders kurz. An der Zellfront werden FA aufgebaut und verbleiben dann ortsstabil relativ zum Substrat und werden wieder abgebaut, wenn die Zelle darüber hinweggewandert ist [79]. In Abb. 1.4 ist die Phosphorylierung in migrierenden Keratinozyten dargestellt. Zu sehen ist, dass in jungen FA ebenso wie in FA, die im Abbau begriffen sind, der Grad der Phosphorylierung erhöht ist. Im Gegensatz dazu sind stabile FA unter dem Zellkörper weniger phosphoryliert. Bei nicht motilen Zellen ist die Phosphorylierung ähnlich verteilt: Die FA an der Zellperipherie sind stärker phosphoryliert als die unter dem Zellkörper (siehe Abb. 1.5).

Des Weiteren spielt Phosphorylierung in der zellulären Mechanosensorik, insbesondere bei der Wahrnehmung von zyklischer Dehnung eine Rolle. Sie steigt wenige Minuten nach Beginn der Dehnung sehr deutlich an [36, 44]. Zellen ohne FAK oder der Src Kinase zeigen eine verminderte Fähigkeit zyklischer Dehnung auszuweichen [96, 82] und eine erhöhte Aktivität der FAK bei zyklischer Dehnung [116]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Rolle der Kinasen und damit einhergehend der Phosphorylierung in der Wahrnehmung mechanischer Signale.

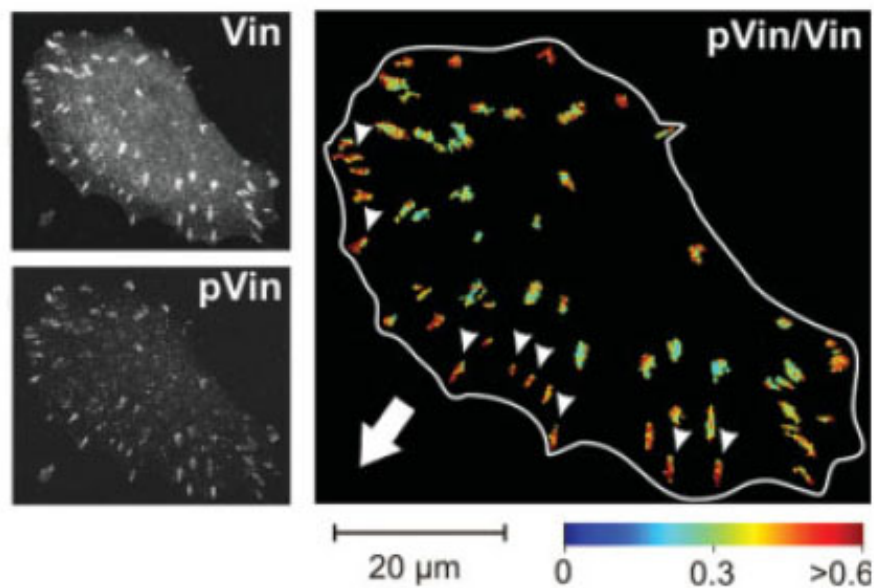


Abbildung 1.4: Phosphorylierung von Vinculin in FA migrierender Keratinozyten. Links sind Immunfärbungen gegen Vinculin (Vin) und phosphoryliertem Vinculin (pVin) dargestellt. Rechts ist das Verhältnis phosphorylierten und unphosphorylierten Vinculins in Falschfarben dargestellt, wobei wärmere Farben eine stärkere Phosphorylierung darstellen. Verändert nach [79].

1.3.3 Regulation der Phosphorylierung durch Kinasen

In den FA sind eine Reihe von Kinasen vertreten. Die wichtigsten sind dabei die FAK und die Kinasen der Src-Familie (Src-family kinases, SFK).

FAK

FAK (Fokale Adhäsions Kinase, auch PTK2 genannt) ist eine ubiquitär exprimierte Tyrosin-Kinase und die erste Kinase die in entstehenden FA eingebaut wird, wo sie auch ihre wichtigsten Funktionen ausübt [103]. FAK $-/-$ Zellen zeigen deutliche Defekte in Adhäsion und Migration [57]. Die FAK lokalisiert über eine C-terminale FAT (Focal Adhesion Targeting) Domäne in der FA und vermittelt die Interaktion mit Paxillin [2, 52]. N-terminal liegt eine FERM-Domäne, die im inaktiven Zustand der FAK mit der zentralen Kinasedomäne interagiert. Durch eine Bindung mit einem Liganden (z.B. β -Integrin) wird die Autophosphorylierungsstelle Y397 frei und auch schnell phosphoryliert, wodurch die Kinase aktiv wird und Proteine mit einer SH2-Domäne binden können. Src verfügt über eine solche Domäne und wird durch FAK an Y527 phosphoryliert. Im Gegenzug phosphoryliert Src die FAK an Y576 und Y577, wodurch die Kinaseaktivität verstärkt wird [19, 127]. Zusätzlich wird FAK an Y861 phosphoryliert, was die Bindung an p130Cas erhöht [2, 73]. Eine weitere Phosphorylierung an Y925 ermöglicht eine Aktivierung von

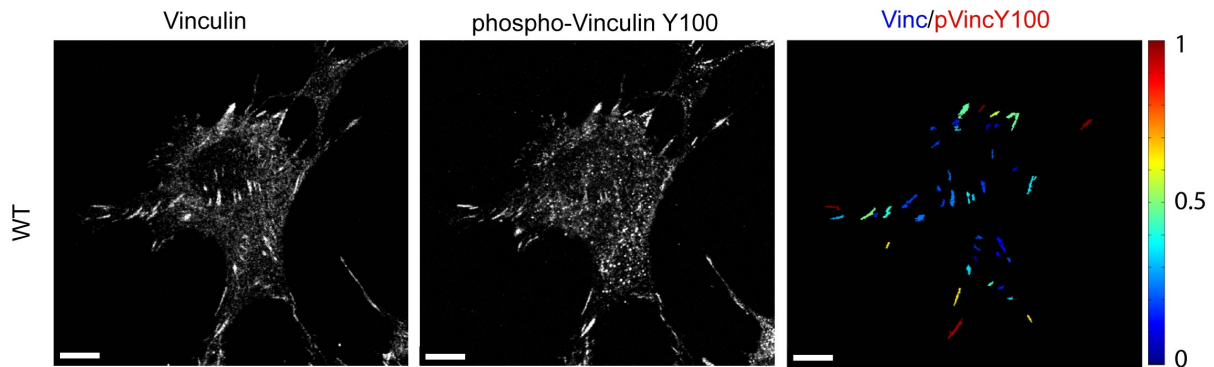


Abbildung 1.5: Phosphorylierung von Vinculin in MEF-WT-Zellen. Links ist eine Immunfärbung gegen Vinculin, in der Mitte gegen phosphoryliertes Vinculin (Y100) dargestellt. Rechts ist das Verhältnis von phosphoryliertem zu unphosphoryliertem Vinculin in Falschfarben zu sehen, wobei warme Farben eine stärkere Phosphorylierung zeigen. Maßstab = 10 μm . Verändert nach [84].

MLCK und damit eine indirekte Regulation der FA-Dynamik [78]. Die vielseitige und zentrale Position von FAK unterstreicht die Wichtigkeit der Phosphorylierung als Signalmechanismus der FA.

Die Kinasen der Src-Familie

Von der Familie der Src Kinasen sind insgesamt 9 Vertreter (Lyn, Fyn, Lck, Hck, Fgr, Blk, Yrk, Yes, Src) bekannt, von denen jedoch nur Src, Yes und Fyn ubiquitär exprimiert werden, während alle anderen auf hämatopoietische Zellen, Neuronen oder Lymphozyten beschränkt sind [4, 66].

Der Prototyp der Src-Familie wurde 1977 als v-Src, dem transformierenden Onkogen des Rous-Sarkoma Retrovirus, entdeckt. Das zelluläre Analog ist Src (c-Src oder pp60Src), eine mehrfach regulierte Tyrosin Kinase die an Zelldifferenzierung, Proliferation und Migration beteiligt ist [4].

Src (60 kDa) besteht aus einer C-terminalen Kinasedomäne, einer N-terminalen SH3 Domäne, die an prolinreichen Sequenzen bindet und einer SH2 Bindedomäne, die tyrosinphosphorylierte Proteine erkennt [3]. N-terminal findet sich zusätzlich ein Myristidyl-Anker, der die Kinase in der Plasmamembran verankert (siehe auch Abb. 1.6). Am C-Terminus befindet sich nahe der Kinasedomäne ein Tyrosin (Y530), welches phosphoryliert (vermittelt durch C-terminal Src Kinase, CSK) eine intramolekulare Bindung zur N-terminalen SH2 Domäne eingeht. Zur Aktivierung von Src muss dieses Tyrosin dephosphoryliert werden, was u.a. von der Rezeptor-Tyrosin Phosphatase α und den Phosphatasen Shp-1 und Shp-2 vermittelt wird [4]. Ein weiteres Tyrosin an Y416 befindet sich in der sogenannten Aktivierungsschleife und muss für eine vollständige Aktivität der Kinasedomäne von FAK phosphoryliert werden. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von Src liegt in der

Bindung von p130Cas [98].

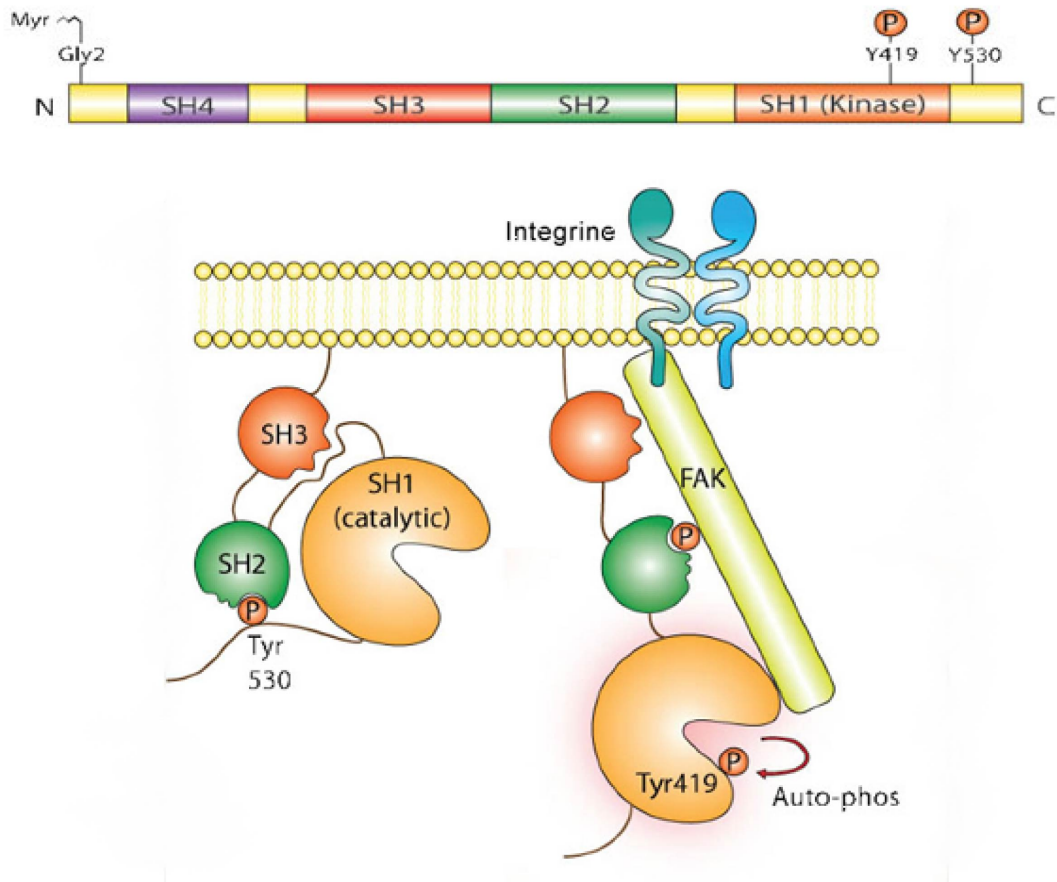


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Aktivierung von Src. Im oberen Teil ist die Domänenstruktur dargestellt. Unten ist Src in inaktiver Form sowie aktiviert durch die Bindung von FAK an Integrine zu sehen. Verändert nach [4].

Alle weiteren SFK sind im Aufbau analog zu Src, welche die am meisten untersuchte Kinase ist [4]. Über die weiteren Kinasen ist außerhalb der Rolle in der Tumorgenese wenig bekannt. Yes (62 kDa) und Fyn (59 kDa) sind wie Src in verschiedenen Tumorarten hochreguliert [87, 97, 99]. Fyn hat verschiedene Aufgaben in Zellzyklus-Eintritt, Wachstum und Proliferation. Zusätzlich wurden immunologische und neuronale Funktionen untersucht [97]. Yes hat Funktionen im Zellzyklus und bei der Zytokinese [62]. Alle drei fungieren jedoch in der FA als Signalüberträger [87].

1.3.4 Vinculin in der Fokaladhäsion

Vinculin ist ein Protein, welches sich als Hauptstrukturprotein in FA und den verwandten Zell-Zell-Kontakten Adherens Junctions gezeigt hat. Vinculin gliedert sich in eine globuläre Kopf- und eine globuläre Schwanzdomäne, die über eine prolinreiche Halsregion verbunden sind [7]. An der Schwanzdomäne befinden sich Bindestellen für Aktin und

Paxillin, in der Kopfdomäne für α -Actinin und Talin [126]. Die Halsregion verfügt über Bindestellen für VASP, Vinexin, Ponsin, PIP₂ und Arp2/3 [124]. Die zentrale Funktion in der FA zeigt sich u.a. dadurch, dass Vinculin-Knockout-Zellen kleinere Adhäsionen haben, weniger stark adhäreren und schneller migrieren [119].

Vinculin kann in einer geöffneten und einer geschlossenen Konformation vorliegen. Durch die Bindung der Kopf- an die Schwanzdomäne werden sämtliche Bindungsstellen für andere Proteine unzugänglich und das Protein ist inaktiv [7]. Der Mechanismus, durch den Vinculin aktiviert werden kann, ist noch nicht sicher geklärt, aber es wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen. Zum einen kann die Bindung von sauren Phospholipiden an die Schwanzregion von Vinculin die intramolekulare Bindung lösen. Dies wird auch durch die Bindung von mehr als zwei anderen Interaktionspartnern Vinculins bewirkt [7], wobei die hochaffine Bindung von Talin oder α -Actinin alleine bereits ausreichen können [15]. Ein anderer Mechanismus beinhaltet die Phosphorylierung von Vinculin an den Tyrosinen Y100 und Y1065, die über die Src Kinase vermittelt wird [126]. Simulationen konnten zeigen, dass eine solche Aktivierung notwendig ist, um eine stabile Bindung von Talin zu ermöglichen [45]. Zusätzlich werden die Austauschdynamiken von Vinculin direkt über die Phosphorylierung reguliert: stabile, reife Fokaladhäsionen zeigen wenig Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu sind FA während des Auf- oder Abbaus hoch phosphoryliert. Zellen mit mutiertem, nicht phosphorylierbarem Vinculin (Y1065F) zeigen ebenfalls eine verringerte Austauschdynamik [79].

1.3.5 p130Cas als möglicher Mechanosensor

Bei p130Cas (Crk Associated Substrate, Cas, Breast Cancer Anti-estrogen Resistance oder BCAR1) handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Strukturprotein von etwa 130 kDa, das Zellmotilität sowie Proliferation reguliert [28]. Mäuse, die p130Cas nicht exprimieren sterben pränatal. p130Cas Knockout Zellen zeigen verkürzte und diffusere Aktinfilamente sowie weniger und schwächer ausgebildete FA [54].

In Abb. 1.7 sind die Domänenstrukturen von p130Cas dargestellt. Das Protein besteht aus einer aminoterminalen SH3 Domäne, einer zentralen Substratbindedomäne und carboxyterminal einer SFK-Bindedomäne. Die SH3 Domäne kann mit einer Reihe von Proteinen interagieren, darunter die Kinasen FAK und Pyk2 und die Phosphatase PTP-PEST. In der C-terminalen Domäne befindet sich eine Bindestelle für Kinasen der Src-Familie und eine Bindestelle für Proteine der Nsp Familie (Nsp1, And-34 und Chat). Die C-terminale SFK-Bindedomäne lokalisiert zusammen mit der N-terminalen SH3 Domäne das Protein in der FA, während die Substratdomäne daran nicht beteiligt ist [80]. Diese hat 15 Wiederholungen von einer YxxP Sequenz aus Tyrosin und Prolin, die phosphoryliert eine Bindedomäne für das Adapterprotein Crk darstellt [77].

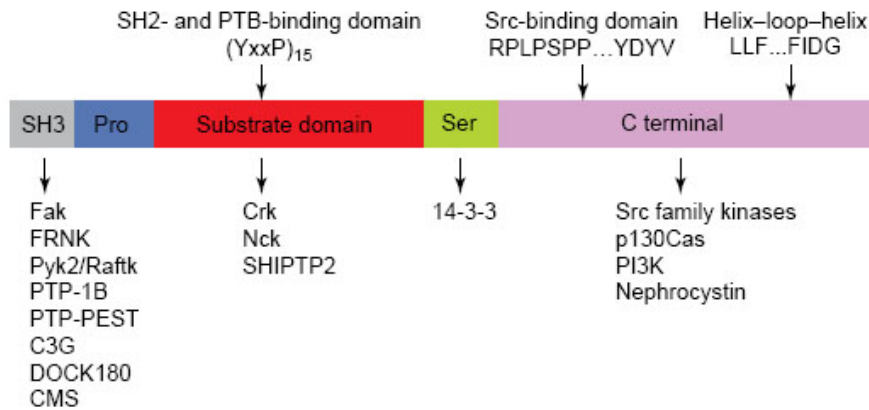


Abbildung 1.7: Domänenstruktur von p130Cas. Die SH3 Domäne befindet sich N-terminal und interagiert mit FAK, während die C-terminale Domäne mit Kinasen der Src-Familie interagiert. Die Substratdomäne enthält 15 Wiederholungen einer YxxP Sequenz, die phosphoryliert Binde-domänen für Crk darstellen. Entnommen aus Defilippi et al. 2006 [28]

Die SH3 Domäne ist für die Lokalisation von p130Cas in die FA notwendig. Zusätzlich ist Cas durch eine weitere Phosphorylierungsstelle (Y12) in der SH3 Domäne reguliert [60]. Ist Y12 phosphoryliert ist die Lokalisation in der FA sowie die Interaktion mit FAK und PTP-PEST verringert. Und obwohl p130Cas von FAK nicht phosphoryliert wird [105, 111]. wirkt FAK als Adapterprotein und rekrutiert Src, was eine verstärkte Phosphorylierung von Cas bewirkt [38]. Eine mutierte Form des Tyrosins (Y12F), das eine nicht phosphorylierbare Form darstellt, zeigt eine deutliche Verstärkung der Phosphorylierung von p130Cas [60].

p130Cas wurde als eines der Proteine isoliert, die bei einer Transformation mit v-Src hochgradig phosphoryliert werden [98]. Die Phosphorylierung von p130Cas erfolgt von Src entweder direkt über die Bindung an die SFK-Bindedomäne oder indirekt über die Bindung von Src an die Autophosphorylierungsstelle Y397 von FAK [95]. Die Tyrosine 6 bis 15 der Substratdomäne sind die Hauptstellen, die von Src phosphoryliert werden [106].

Reguliert wird die Phosphorylierung auch von einer sehr großen Anzahl an Wachstumsfaktoren, Hormonen oder EZM-Proteinen aber auch durch mechanische Dehnung, Scherfluß oder osmotischen Stress [13]. Sawada et al. konnten 2006 zeigen, dass p130Cas stark phosphoryliert wird, wenn es auf einer elastischen Membran immobilisiert ist und diese gedehnt wird [101]. Die Phosphorylierung erfolgt durch Src, wobei keine Erhöhung in der Aktivität der Kinase zu beobachten war. Die Substratdomäne von p130Cas besteht aus einer Reihe von Wiederholungen einer bestimmten Sequenz. Solche Wiederholungen sind typische Merkmale für Proteine, die in ihrer Länge variabel sind, wie beispielsweise Titin. Die 15 Wiederholungen in Cas könnten eine gleiche Funktion haben. Sawada et al.

konnten zeigen, dass die Substratdomäne wie eine Feder funktioniert und die Phosphorylierungsstellen für Src zugänglich werden, wenn das Protein entfaltet oder aufgezogen wird (siehe Abb. 1.8). Zusätzlich detektiert ein Antikörper, der gegen die entfaltete Form von p130Cas gerichtet ist, das Protein verstärkt in FA an der Zellperipherie, wo besonders starke Zellkräfte wirken. An phosphoryliertes p130Cas bindet das Adapterprotein Crk, welches mit verschiedenen weiteren Proteinen interagiert und weitere Signalkaskaden aktiviert [13].

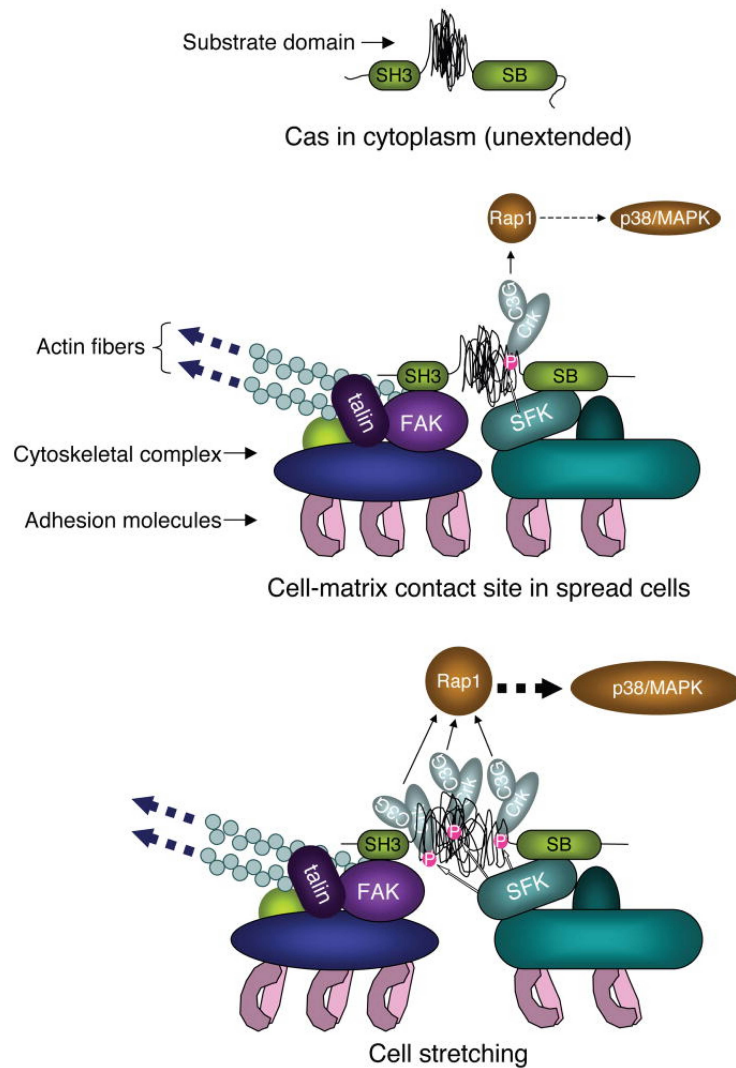


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung von p130Cas in entspannter und aufgezogener Form. Wird das Protein auseinander gezogen werden kryptische Phosphorylierungsstellen frei, an die das Adapterprotein Crk bindet und große Anzahl verschiedener Proteine rekrutiert, die auf Proliferation, Motilität und das Aktinzytoskelett wirken. Aus [101].

Zur Cas-Familie gehören noch zwei weitere Proteine, HEF1 und Efs/Sin. HEF1 (Human Enhancer of Filamentation) reguliert Mitose und Neuritenwachstum, Efs/Sin (Embryonal

fyn substrate/Src interacting) ist in T-Lymphozyten aktiv [28]. Vieles deutet darauf hin, dass diese Proteine keine überlappenden Funktionen ausüben [13], so dass sie für die vorliegende Arbeit vernachlässigt wurden.

1.3.6 Das Adapterprotein Crk

Crk (CT10 Regulator of a Tyrosine Kinase) wurde 1990 als Protein beschrieben, das in der Lage ist den Phosphorylierungsgehalt deutlich zu erhöhen ohne eine eigene Kinasedomäne zu haben. Dabei war das am stärksten phosphorylierte Protein p130Cas [75]. Crk-Proteine gehören zur Gruppe der Adapterproteine und sind in der Lage andere Proteine in räumliche Nähe zu bringen und so die Signalübertragung zu vermitteln. In Abb. 1.9 sind die verschiedenen Isoformen der Crk Proteine dargestellt. CrkI bis III sind dabei Spleißvarianten des gleichen Gens, während CrkL (Crk Like) von einem anderen Gen transkribiert wird und mit CrkII zu 60% homolog ist [100]. Allen Isoformen ist eine N-terminale SH2- und SH3-Domäne (SH3^N) gemein. v-Crk, welches von Sarkoma Retroviren exprimiert wird, verfügt zusätzlich noch über eine GAG-Sequenz, die virale Funktionen enthält. CrkII und CrkL haben eine weitere, C-terminale SH3 Domäne (SH3^C), die über eine 50 Aminosäure lange, prolinreiche Sequenz mit der SH3^N verbunden ist [76, 13]. Über die dritte Spleißvariante CrkIII ist nur bekannt, dass sie eine verkürzte SH3^C Domäne hat [91].

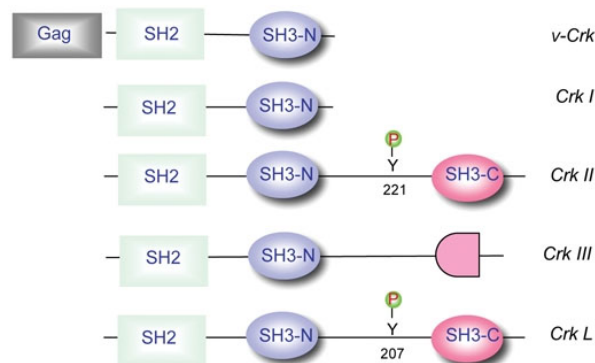


Abbildung 1.9: Die Isoformen von Crk. CrkI ist der viralen Form ähnlich und konstitutiv aktiv. CrkII und CrkL sind über die Phosphorylierungsstelle reguliert. Verändert nach [108]

Während CrkI konstitutiv aktiv ist, sind CrkII und CrkL über eine intramolekulare Bindung regulierbar, durch die alle 3 Domänen für Bindungspartner unzugänglich werden. Dabei bindet die SH2 Domäne an ein Phosphotyrosin, in CrkII an Position 221, in Crk L an Position 207. Die Phosphorylierung wird durch die Abl Kinasen übertragen [37].

Ob CrkI+II und CrkL unterschiedliche Funktionen haben, wird in der aktuellen Forschung diskutiert. Im Reelin-Signalweg spielen sie überlappende Rollen [86] während

Knockout Mäuse unterschiedliche, aber auch übereinstimmende Defekte zeigen [85, 47]. Auch zeigen Experimente, dass CrkI und CrkII unterschiedliche Funktionen haben können, obwohl sie mit Ausnahme einer weiteren Bindedomäne bei Crk II identisch sind. Antoku et al. haben 2009 gezeigt, dass nach Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF durch CrkI die kleine GTPase Rap1 aktiviert wird, während CrkII und CrkL Rac1 aktivieren [5]. Eine Deletionsmutante von CrkII, der die SH3 Domäne fehlt, zeigte ebenfalls eine verstärkte Aktivierung von Rap1. Wie es sein kann, dass die beiden Isoformen trotz ihres ähnlichen Aufbaus unterschiedliche GTPasen aktivieren, ist noch unklar. Möglicherweise wird dies über sterische Hinderung durch die SH3^C Domäne vermittelt [5, 67]. Diese Domäne könnte generell die Affinität von CrkII zu Bindungspartnern durch sterische Hinderung beeinflussen und dadurch bestimmte Bindungspartner bevorteilen.

Crk bindet an phosphoryliertes p130Cas und rekrutiert dann eine Reihe weiterer Signalproteine. Dazu gehören u.a. C3G, Dock1 und SOS1, die verschiedene Rollen in der Regulation von Proliferation, Zytoskelett und Motilität spielen.

1.3.7 Bindungspartner von Crk

Crk interagiert mit einer Reihe von Proteinen [13]. Als Adapterprotein agiert es als Vermittler, indem Crk mit der SH2 Domäne an ein pY enthaltendes Protein bindet und ein weiteres Protein rekrutiert wird. So kann Crk die Interaktion von p130Cas mit Dock1, C3G, Abl, JNK, SOS und PI3K vermitteln. JNK und SOS sind in Zusammenhang mit p130Cas in der Kontrolle des Zellzyklusses involviert und damit für mechanosensorische Signalwege von untergeordneter Rolle. Abl ist dagegen eine Kinase, die Crk deaktivieren kann, bei C3G und Dock1 handelt es sich um GEFs die auf kleine GTPasen wirken, die im Zusammenhang mit Adhäsion und Migration stehen.

Abl

Abl1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1, c-Abl) und Abl2 (auch Arg, Abelson related gene) sind Tyrosinkinase, die zueinander zu 70% homolog sind [13]. Die Kinasen liegen sowohl zytoplasmatisch als auch im Nucleus vor. Sie sind zunächst inaktiv und werden durch Autophosphorylierung und Phosphorylierung durch SFK aktiviert [110]. Abl wirkt auf Zellmigration, Zelladhäsion, Zelldifferenzierung sowie Apoptose. Durch Phosphorylierung von CrkII und CrkL an Y221 bzw. Y207 regulieren sie die Aktivität dieser Adapterproteine, wobei Crk selbst in der Lage ist Abl zu aktivieren [107]. Des Weiteren fördert Zelladhäsion die Aktivierung von Abl und bewirkt eine Translokation des Proteins vom Nucleus zum Zytoplasma [72].

C3G

C3G (Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide releasing factor, Rapgef1) ist ein Guanin Austauschfaktor für die kleinen GTPasen Rap1, Rap2 und R-Ras. Es entfernt das GDP von der inaktiven Kinase, ermöglicht damit eine erneute Bindung von GTP und bewirkt damit eine Aktivierung der GTPase [46]. Rap1 reguliert das Zytoskelett, Zellproliferation, Zell-Zell Verbindungen sowie die Zelladhäsion. Bei letzterem verstärkt aktiviertes Rap1 die Affinität von Integrinen zu EZM-Liganden [16]. Weitere Signalwege, die aktiviert werden können, laufen über JNK1 und MAPK.

Dock1

Bei Dock1 (Dedicator of cytokinesis, Dock180) handelt es sich ebenfalls um einen Guanin Austauschfaktor, der jedoch Rac1 aktiviert indem das Protein im nucleotidfreien Zustand stabilisiert wird [25]. Für die Aktivierung von Rac1 ist jedoch noch die Aktivierung eines weiteren Proteinkomplexes (ELMO) durch die SFK notwendig [74]. Die Rho-Familie der kleinen GTPasen, zu denen Rac1, Rho und Cdc42 gehören, regulieren Zellwachstum, zytoskeletale Organisation sowie die Organisation von FA [10, 92].

1.3.8 Der ERK1/2 Signalweg

ERK1 (Extracellular signal-regulated kinase, MAPK3) und ERK2 (Extracellular signal-regulated kinase, MAPK1) gehören zu den MAP Kinasen (Mitogen activated protein kinase). Sie wirken auf eine Reihe zellulärer Funktionen wie Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose oder Motilität und Adhäsion [68, 88]. Der Signalweg, der zur Aktivierung von ERK1/2 führt verläuft in vielen Einzelschritten. Im ersten Schritt werden Zelloberflächenrezeptoren stimuliert, die die kleine GTPase Ras aktivieren. Diese bindet und aktiviert Raf, welche wiederum durch Phosphorylierung die MEK1 und 2 (MAPK and ERK kinase) aktiviert. MEK1/2 sind selbst Kinasen und aktivieren schließlich ERK1/2 wiederum durch Phosphorylierung [68]. Aktiviertes ERK1/2 phosphoryliert und aktiviert ihrerseits verschiedene Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren [23].

Eine Rolle in der zyklischen Dehnung konnte an Fibroblasten festgestellt werden. Die Phosphorylierung von ERK1/2 steigt bei zyklischer Dehnung nach 10 min stark an. In FAK Knockout Zellen ist dieser Anstieg reduziert [116]. Dieser Signalweg scheint ebenso in der Erkennung zyklischer Dehnung beteiligt zu sein.

1.4 Eigene Vorversuche zu MEF-WT, -SYF und -Src++

Für die Versuche der zellulären Reorientierung wurden Fibroblastenzelllinien aus der Maus, MEF-WT, -SYF und -Src++ verwendet. MEF-SYF fehlen die drei ubiquitär exprimierten SFK (Src, Yes und Fyn) während MEF-Src++ nur Yes und Fyn fehlen. Die Charakterisierung der Zelllinien wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit durchgeführt. Die Ergebnisse daraus bildeten eine Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche und werden hier noch einmal zusammengefasst¹. Abb. 1.10 zeigt Immunfärbungen der verwendeten Zelllinien. MEF-WT und -SYF wurden zusammen gegen Vinculin (links, grün) und Phosphotyrosin (mitte, rot) gefärbt und mit gleichen Einstellungen aufgenommen. MEF-WT zeigt eine starke Phosphotyrosin-Färbung in den FA, während MEF-SYF zwar FA normal ausbildet, die Phosphotyrosin-Färbung jedoch bis auf eine schwache Restfärbung nicht zu erkennen ist. MEF-Src++ wurde zu einem späteren Zeitpunkt aufgenommen und statt Vinculin ist das Aktinzytoskelett gefärbt. Die Phosphotyrosin-Färbung in den FA ist auch hier gut zu erkennen.

Verschiedene Versuchsreihen an MEF-WT und -SYF-Zellen konnten zeigen, dass die FA in allen drei Zelllinien normal gebildet werden. Sie zeigen eine vergleichbare Größe mit dem Unterschied, dass MEF-SYF im Mittel doppelt so viele FA wie MEF-WT oder -Src++ aufweist. Die über Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) gemessenen Austauschraten von GFP-Vinculin zeigten keinen Unterschied. Die Kraft, die von Zellen auf ihr Substrat übertragen, wurde über Traction Force Microscopy gemessen und zeigte keinen eindeutigen Unterschied zwischen den Zelllinien [84].

1.5 Ziele der Arbeit

Mechanische Reize wirken nicht nur auf ganze Organismen sondern sind auch auf zellulärer Ebene von entscheidender Bedeutung. Sie regulieren Proliferation, Migration und beeinflussen die Zelle in Morphologie oder Ausrichtung. Die an der Erkennung von externen mechanischen Reizen beteiligten Signalwege sind stark vernetzt und es ist durchaus möglich, dass verschiedene Signalwege zur gleichen Reaktion führen bzw. ein einzelner Reiz verschiedene Reaktionen auslöst. Der bisherige Ansatz zur Entschlüsselung der Signalwege war es, in vitro über die Interaktionen von Proteinen auf deren Funktion zu schließen, oder aber Proteine bzw. das Zytoskelett zu isolieren und die Reaktion getrennt zu beobachten. In dieser Arbeit sollte die Reaktion von ganzen Zellsystemen statt isolierter Bestandteile

¹Auswirkung der Phosphorylierung auf die Eigenschaften und Mechanosensorik von Fokaladhäsionen, Bonn 2009, Institut für Bio- und Nanosysteme, IBN 4, Forschungszentrum Jülich GmbH

auf zyklischer Dehnung als mechanischen Reiz untersucht werden. Als Zellsystem sollten MEF-Zellen verwendet werden, über die auf dem Gebiet der Mechanosensorik bereits viel

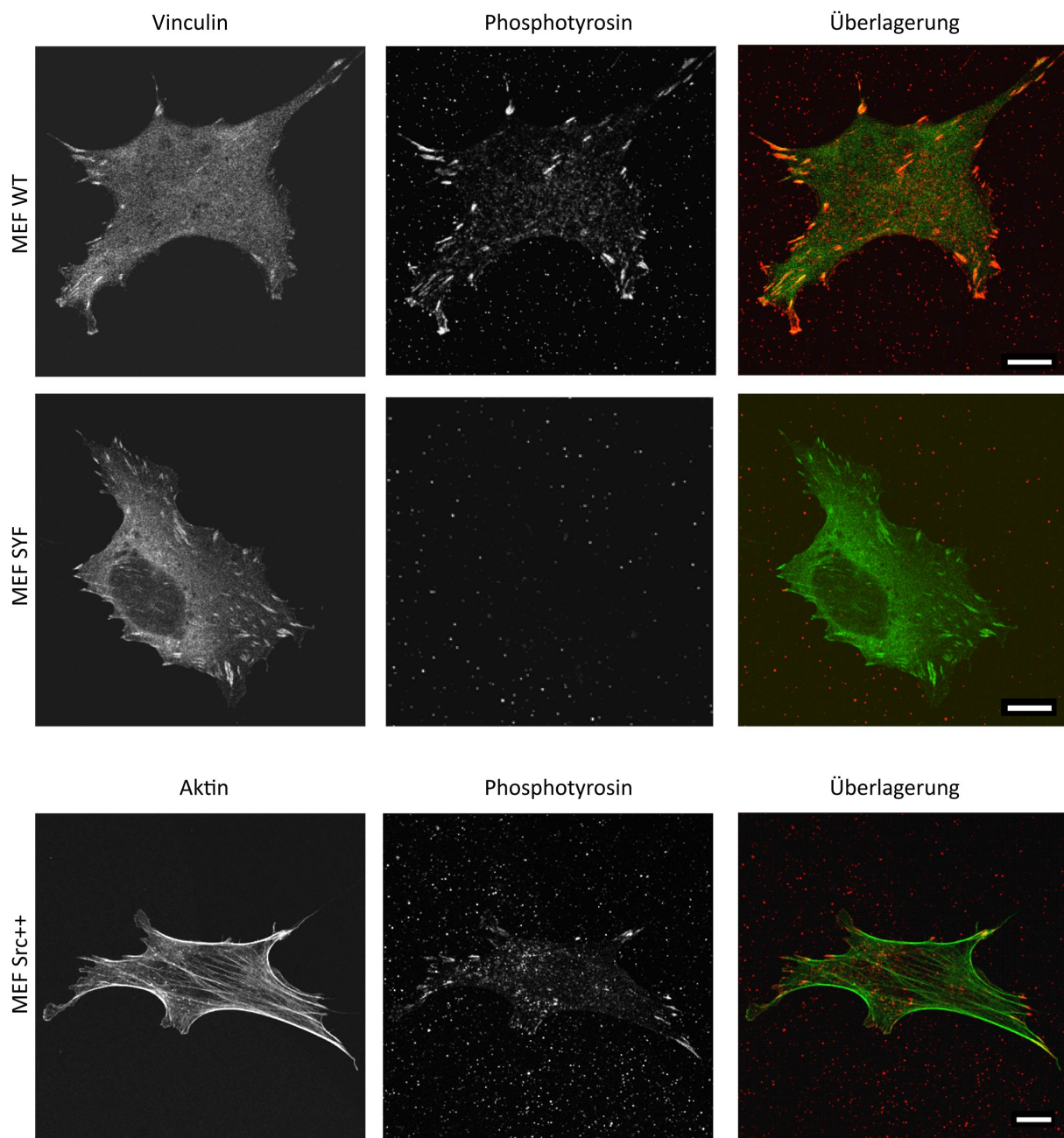


Abbildung 1.10: Tyrosin-Phosphorylierung von MEF-SYF, -Src++ und -WT. Die Abbildung aus der Diplomarbeit zeigt eine Färbung gegen Phosphotyrosin und Vinculin bzw. Aktin. MEF-WT und -SYF wurden zusammen gefärbt und mit gleichen Einstellungen aufgenommen, während -Src++ nachträglich hinzugenommen wurde. Bei MEF-WT und -Src++ ist die Phosphorylierung der FA zu sehen, während MEF-SYF nur eine sehr schwache Restfärbung zeigt. Die FA sind bei MEF-SYF trotz fehlender Phosphorylierung normal ausgebildet. Maßstab = 10 μm .

untersucht wurde und von denen eine Reihe Mutationen zur Verfügung stehen und die sich zudem gut transfizieren lassen, was die Verwendung von siRNA ermöglicht. Durch Quantifizierung der Zellantwort auf einen mechanischen Reiz, in diesem Fall die Umorientierung der Zelle bei zyklischer Dehnung in eine Richtung, die für die Zelle minimalen Stress bedeutet, sind die Wirkungen einzelner Proteine auf Funktionen in der ganzen Zelle sichtbar.

Die wichtigsten Ankerpunkte der Zelle sind die FA, deren Rolle in der Mechanosensorik vielfach untersucht wurde. Bekannt ist, dass die Phosphorylierung von Kinasen bei zyklischer Dehnung kurzzeitig stark ansteigt [36]. Die für die Regulierung der FA wichtigsten Kinasen sind die FAK und Src. Von beiden ist bekannt, dass sie die Reorientierung von Zellen bei zyklischer Dehnung beeinflussen [82, 96]. Die Rolle der anderen Kinasen der SFK sowie über Proteine des weiteren Signalweges ist noch nicht untersucht. Insbesondere p130Cas stellt einen interessanten Ansatz in der Mechanosensorik dar, da von diesem Protein gezeigt wurde, dass es wie eine Feder bei mechanischer Dehnung aufgezo-gen wird wodurch kryptische Phosphorylierungsstellen frei werden, die dann weitere Signalproteine aktivieren können [101].

Im Rahmen dieser Dissertation sollten mittels der genauen Bestimmung der Reorientierung von Zellen aufgrund zyklischer Dehnung die Funktionen von Bestandteilen der Signalkaskaden in der Wahrnehmung und Verarbeitung mechanischer Reize untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden verschiedene MEF (mouse embryonic fibroblast) Zelllinien verwendet.

Die MEF-Wildtyp (MEF-WT) Zelllinie wurde uns von B. de Strooper (Neuronal Cell Biology Laboratory, Katholieke Universiteit Leuven and Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Belgien) überlassen [51]. MEF-SYF (Src, Yes und Fyn) ist eine dreifach-knockout Mutante, der die drei ubiquitär exprimierten Kinasen der Src-Familie fehlen. MEF-Src⁺⁺ fehlen ausschließlich Yes und Fyn, während Src weiterhin normal exprimiert wird [66]. Bei diesen beiden Zelllinien kann man mit Ausnahme der fehlenden Kinasen von einem vergleichbaren genetischen Hintergrund ausgehen, da die Isolation zeitgleich aus Tieren des gleichen Wurfs erfolgte. Beide Zelllinien wurden über ATCC erworben (ATCC CRL-2459 und CRL-2497).

Die MEF-Cas-Zelllinien basieren auf Cas-Knockout-Zellen, die 1998 unter der Leitung von H. Hirai (Third Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Japan) isoliert wurden [55]. Sie wurden von P. M. Fonseca (Prof. S. K. Hanks, Department of Cell and Developmental Biology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN, USA) mit Plasmiden stabil transfiziert und uns zur Verfügung gestellt [38]. MEF-Cas^{-/-} trägt einen leeren Vektor, MEF-Cas-WT exprimiert unverändertes p130Cas und MEF-Cas-15F exprimiert eine mutierte Form von p130Cas, in der alle 15 Tyrosine der Substratdomäne durch Phenylalanin ersetzt wurden. Dadurch stellt MEF-Cas-15F eine stille und nicht phosphorylierbare Form des Proteins dar. Alle drei Zelllinien exprimieren zur Kontrolle der Transfektion GFP, das jedoch nicht an die Proteine gebunden ist.

Die MEF-Crk-Knockout-Zelllinien wurden uns von T. Curran (The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA) zugeschickt. MEF-Crk^{-/-}CrkL^{+/+} (im Folgenden Crk^{-/-}) fehlt Crk I und Crk II während CrkL normal exprimiert wird, bei MEF-Crk^{+/+}CrkL^{-/-} (im Folgenden CrkL^{-/-}) fehlt CrkL während beide Isoformen von Crk exprimiert werden. MEF-Crk^{+/+}CrkL^{+/+} (im Folgenden Crk-WT) ist eine unveränderte WT Zelllinie, die als Kontrolle für die beiden Knockout Zelllinien fungiert [86].

Die Vinculin Knockout Zelllinie (MEF-Vinc -/-) wurde uns zusammen mit einer MEF-WT Zelllinie (im Folgenden zur Unterscheidung MEF-WT-V genannt) von W. H. Goldmann (Friedrich Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt [69].

Für einzelne Versuche wurden auch HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells), humane Nabelschnurfibroblasten sowie Podozyten verwendet. Diese Experimente wurden von T. Feichtmeier im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt¹. Die HUVECs wurden von Lonza (Bestellnummer C2519A) erworben, die Nabelschnurfibroblasten wurden uns von T. Noll (Universität Bielefeld) zur Verfügung gestellt. Die differenzierten Podozyten aus der Maus wurden ebenfalls von W. H. Goldmann (Friedrich Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt. Die Podozyten wurden wie beschrieben kultiviert [32].

2.1.2 Kulturbedingungen

Die MEF-Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ in gesättigter feuchter Luft gehalten.

Als Kulturmedium diente Dulbecco's Modified Eagles Medium, dem zur Kultur 10 % fötales Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin zugegeben wurde (DMEM++). Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage bei 80-100 % Konfluenz passagiert. Hierfür wurden alle benötigten Lösungen auf 37°C vorgewärmt und eine mit Medium befüllte Kulturflasche bereit gestellt. Zur Passage wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer geeigneten Menge (1 ml pro T25-Flasche) einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert. Nach vollständigem Ablösen der Zellen wurde die Reaktion mit der gleichen Menge Medium abgestoppt. Die Zellen wurden bei 200 g für 2 min abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, verworfen und die Zellen in DMEM++ resuspendiert. Die HUVECs wurden in EGM-2 und die Nabelschnurfibroblasten in ECGM kultiviert.

2.1.3 Transfektion

Für die Transfektion mit Plasmiden wurden die Zellen am Vortag in gewünschter Zellzahl ausgesäht. Die Transfektion erfolgte über Lipofectamin 2000. Pro Transfektion wurden zwei Ansätze vorbereitet: im ersten Ansatz wurde Medium (DMEM --, d.h. DMEM ohne weitere Zusätze) mit dem Transfektionsreagenz vermischt, im zweiten Ansatz mit Plasmid-DNA. Für eine 6-Loch-Platte wurden pro Ansatz je 250 µl Medium und 5 µl Lipofectamin 2000 bzw. 2 µg DNA verwendet, für eine 12-Loch-Platte je 100 µl Medium und 2 µl Lipofectamin 2000 bzw. 0,8 µg DNA. Die Ansätze wurden für 5 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert, anschließend Ansatz 1 zu Ansatz 2 pipettiert und weitere

¹Tim Feichtmeier, Etablierung von Phosphorylierungsanalysen an Adhäsionsproteinen tierischer Zellen unter zyklischer Dehnung, Bonn 2010

20 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Gesamtansatz auf die Zellen pipettiert, bei denen in der Zwischenzeit das Kulturmedium mit DMEM - - ersetzt wurde. Nach vier bis sechs Stunden wurde das Medium durch DMEM++ ersetzt.

Für die Transfektion mit siRNA wurde Metafectene verwendet. Für die Transfektion von 40.000 Zellen wurden 120 µl des SI-Puffers in eine Vertiefung einer 12-Loch-Platte pipettiert, 8 µl des Transfektionsmediums und 120 pmol der gewünschten siRNA zugegeben, einmal gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen passagiert, auf 40.000 Zellen/ml verdünnt und nach Ablauf der Inkubationszeit auf den Transfektionsansatz gegeben. Um die Transfektionseffizienz zu erhöhen wurde die Transfektion nach zwei Tagen wiederholt. Einen Tag nach der zweiten Transfektion wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

2.1.4 Inhibitor-Experimente

Für Experimente unter Einfluss eines Kinaseinhibitors wurde 8 h vor Beginn der Experimente das Medium mit den jeweiligen Inhibitoren bzw. Kontrollsubstanzen in den Konzentrationen 1, 10, 50 oder 100 µM versetzt und auf die Zellen gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen bereits adhäriert waren. Das Medium wurde alle 8 bis 16 h ausgetauscht wobei jeweils frisch Inhibitor zugegeben wurde.

2.2 Immunocytochemie

Für sekundäre Immunfärbungen wurden Deckgläser mit 15 mm Durchmesser abgeflammt², mit Fibronectin (FN) 2,5 µg/cm² beschichtet, die Zellen mit einer Dichte von 15-17.000 Zellen/cm² ausgesät und für einen Tag kultiviert.

Für die Färbung wurden alle Lösungen in CB-Puffer (Zusammensetzung siehe Anhang) angesetzt und vorbereitet. Mit Ausnahme der Fixierung wurden alle Schritte bei RT durchgeführt. Die Zellen wurden für die Färbung zunächst mit auf 37°C vorgewärmtem CB-Puffer gewaschen und mit ebenfalls vorgewärmtem PFA (3,7%) für 30 min bei 37°C fixiert. Die PFA-Lösung wurde anschließend abpipettiert und zur Absättigung des verbliebenen PFAs mit 30 mM Glycin für 10 min gewaschen. Die Deckgläser wurden in eine feuchte Kammer³ gelegt. Die Zellmembran wurde mit 100 µl 0,2%iger Triton-X100 Lösung perforiert und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 100 µl 10%igem Ziegen Serum (ZS) für 1 h inkubiert. Der erste Antikörper wurde für 1 h in einer

²Hierfür werden die Deckgläser in Ethanol abs. getränkt und an eine offene Flamme gehalten bis das Ethanol verbrannt ist.

³Lichtundurchlässige, verschließbare Kammer, deren Boden mit in Wasser getränkten Tüchern ausgelegt wird, während die Deckgläser erhöht auf Stegen liegen. Proben können darin für mehrere Stunden inkubiert werden ohne dabei auszutrocknen.

Konzentration von 1:100 in 20 μl 10 %igem ZS inkubiert. Anschließend wurde dreimal für 5 min mit 100 μl 10 %igem ZS gewaschen und mit 25 μl der Zweitantikörperlösung (1:200 in 10 %igem ZS) erneut für 1 h inkubiert. Zur Markierung des Zytoskeletts wurde 0,01 % fluoreszenzgekoppeltes Phalloidin (Fluoreszenzsonde: Alexa Fluor 488, 546 oder 633), gelöst in Methanol, zur Zweitantikörperlösung gegeben. Abschließend wurde erneut zweimal für 5 min mit CB-Puffer und einmal mit destilliertem Wasser inkubiert, um kristallbildende Salze zu entfernen. Die Deckgläser wurden mit 20 μl GelMount mit 0,1 % DABCO auf einen Objektträger aufgeklebt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht und aufgenommen.

2.3 Proteinanalyse

Zur Mengenanalyse von Proteinen werden diese zunächst aufgereinigt und über eine Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine über einen Western Transfer auf eine Membran gebunden, wo sie immunochemisch detektiert werden können. Dafür bindet an das Protein ein primärer Antikörper der von einem weiteren, enzymgekoppelten Antikörper detektiert wird. Das Enzym am Zweitantikörper löst eine Farbreaktion aus und macht damit das Proteins auf der Membran sichtbar. Für diese Arbeit wurden die Membranen eingescannt und die Bandenintensität quantifiziert.

2.3.1 Proteinisolation

Für die Proteinanalyse werden die Zellen in Kulturschalen oder Kammern (siehe Abschnitt 2.5.2) kultiviert und vor der Lyse mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Um einen Abbau der Proteine zu verhindern wurden alle Arbeiten zügig auf Eis durchgeführt und dem Lysepuffer 1 % Protease- sowie 1 % Phosphatase-Inhibitor zugegeben. Die Zellen wurden für 30 min mit dem Lysepuffer inkubiert, wobei die Menge des zugegebenen Lysepuffers je nach Zellmenge und Kulturschalengröße variierte: für eine Schale mit 3 cm Durchmesser wurden 250 μl eingesetzt, in Kammern 100 μl . Nach 30 min Lyse wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Bei Isolationen aus Kammern wurden die Zellen zuerst abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und dann für 30 min inkubiert. Abschließend wurden die Zelltrümmer für 15 min bei 16.000 g bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch bei 280 nm (ND-1000, NanoDrop Products, Wilmington, USA) grob abgeschätzt. Hierfür wurde die Option A280 bei 1 Abs = 1mg/ml verwendet. In Fällen, in denen keine Proteinkonzentration bestimmt werden konnte, wurde das Lysat unverdünnt eingesetzt. Das Lysat wurde bis zur Verwendung bei

-20°C gelagert oder direkt mit Loading Dye aufgekocht und in der SDS-Gelelektrophorese eingesetzt bzw. bei 4°C gelagert.

2.3.2 SDS-Gelelektrophorese

Die Proteine des Zelllysats wurden mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Es wurde ein Zwei-Phasen-Gelsystem verwendet [70]. Die Gele wurden in einer Dicke von 1,5 mm selbst hergestellt. Die Trenngele wurden in verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen (8, 10, 12 oder 15 %, siehe Anhang) verwendet, wobei das Sammelgel bei allen identisch war.

Das Protein (maximal 10 µg) wurde auf 16-32 µl mit H₂O verdünnt und im Volumenverhältnis 1:4 mit 5x LoadingDye für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Gelelektrophorese wurde für ca. 2 h bei 100 V durchgeführt (Electrophoresis System, Bio-Rad, München).

2.3.3 Western Transfer und Antikörperfärbung

Für den Transfer der Proteine vom Gel auf eine Membran wurden die Nylon-Membranen (Amersham, Buckinghamshire, UK) zunächst nach Herstellerangaben für 10 s in Methanol aktiviert und für 10 min in H₂O sowie für 10 min in Western-Transfer-Puffer gespült. Währenddessen wurden die Gele für 20 min in Western-Transfer-Puffer gespült. Für die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran wurde beides zwischen Filterpapiere gelegt wobei die Transfervorrichtung unter Transfer-Puffer zusammengesetzt wurde, um Lufteinschlüsse zu vermeiden. Der Transfer wurde über Nacht (ü.N.) bei 4°C in einer Nass-Transfer-Vorrichtung (Tank Transfer System, Bio-Rad, München) durchgeführt. Am nächsten Morgen wurde die Vorrichtung auseinander gebaut und die Membranen sofort in Absättigungslösung (10 ml TBST mit 3% BSA) gegeben. Darin wurden sie für 4 h bei RT inkubiert um freie Bindestellen zu besetzen. Der erste Antikörper wurde in einer Verdünnung 1:1000 in 10 ml 1%igem BSA in TBST für 1 bis 2 h bei RT inkubiert, der zweite Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000. Zwischen den beiden Antikörper-Inkubationsschritten wurde dreimal für 5 min mit 1% BSA in TBST gewaschen, nach Inkubation des zweiten Antikörpers zwei mal mit TBST. Die Detektion der Antikörper erfolgte über eine Farbreaktion der an den Zweitantikörper gebundenen Alkalischen Phosphatase mit BCIP/NBT als Substrat.

2.3.4 Quantifizierung von Western Blots

Die Membranen wurde für 24 h getrocknet und anschließend eingescannt (Flachbettscanner, Canon FB630U). Über die Funktion GelAnalyzer von ImageJ (Version 1.44p, Wayne Rasband, NIH, USA) wurden die Banden mit einem weiten Rechteck umrandet und die

Intensität gewertet, indem die Fläche des Maximums bestimmt wurde. Die relative normierte Intensität I_{norm} wurde wie folgt berechnet:

$$I_{norm} = \frac{A_{Probe}}{A_{Referenz}} \cdot \frac{B_{Referenz}}{B_{Probe}} \quad (2.1)$$

wobei A die oben beschriebene Intensität des zu untersuchenden Proteins (z.B. Phospho-Protein) und B das Gesamtprotein bzw. Tubulin darstellt. Der Index Referenz stellt die Probe dar, auf die normiert werden soll. Das war entweder der Ausgangszeitpunkt oder die Transfektion mit einer Negativkontrolle. Der Index Probe bezeichnet die zu vergleichende Probe, also spätere Zeitpunkte oder nach funktionalen Transfektionen. Dadurch ergibt I_{norm} die n-fache Menge der Probe zum Referenzwert, welcher auf 1 normiert ist.

2.4 RNA-Analyse

Zusätzlich zur Western-Transfer Analyse wurde auch die quantitative RealTime Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) zur Bestimmung des Knockdowns von Proteinen durch siRNA eingesetzt. Bei der qRT-PCR wird die gesamte RNA von Zellen zunächst isoliert und über eine Reverse Transkriptase PCR in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA wird dann in einer qRT-PCR vervielfacht und quantifiziert. Durch das Verhältnis der RNA Menge der zu untersuchenden Proteine zu einem Haushaltsgen, das unabhängig von Zelltyp, -stadium oder äußeren Einflüssen exprimiert wird, lassen sich Proben untereinander vergleichen.

2.4.1 RNA Isolation und Reverse Transkriptase PCR

Die Isolation erfolgte über das RNeasy RNA-Aufreinigungs Kit von Qiagen. Dafür wurde dem Lysepuffer des Kits 10 μ l β -Mercaptoethanol pro ml zugesetzt und auf die Zellen gegeben, die zuvor mit 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen wurden. Das Lysat wurde sofort mit einem Zellschaber gesammelt und in QiaShredder (Qiagen) gegeben und für 2 min bei 16.000 g zentrifugiert. Dadurch wurde die Zellsuspension von Zelltrümmern und Membranresten abgetrennt. Aus dem Lysat konnte nach Herstellerangaben die RNA isoliert werden. Über das Quantitect RT-PCR Kit (Qiagen) wurde die RNA in cDNA umgeschrieben. Die verschiedenen Proben wurden auf die gleiche Konzentration (maximal 83 ng/ μ l) verdünnt. Jeweils 12 μ l RNA wurden in ein 0,2 μ l Reaktionsgefäß überführt und mit RNase-freiem H₂O verdünnt. Die Proben wurden zunächst mit dem genomic DNA Wipeout Buffer des Kits für 2 min bei 42°C erhitzt und anschließend sofort auf Eis überführt. Dann wurden 4 μ l Puffer, 1 μ l Reverse Transkriptase und 1 μ l Primer-Mix aus

einer vorbereiteten Mischung hinzugegeben, die PCR für 15 min bei 42°C durchgeführt und die Enzyme anschließend für 2 min bei 95°C deaktiviert. Die erhaltenen cDNA-Proben wurden für weitere Verwendung in der quantitativen RealTime PCR (qRT-PCR) auf 10 ng/ μ l verdünnt.

2.4.2 qRT-PCR

qRT-PCRs basieren auf dem Prinzip von üblichen PCRs, in denen durch Polymerasen und einer Mischung aus Primern und Oligonucleotiden viele Kopien von DNA hergestellt werden können. Der Unterschied der qRT-PCR liegt darin, dass während den Polymerisationsschritten eine Fluoreszenzemission gemessen wird, deren Intensität von der Anzahl der hergestellten Kopien abhängt [50]. An unserem Institut wurde ein StepOne qRT-PCR Gerät von Applied Biosystems und TaqMan-Sonden (siehe Anhang) verwendet. Diese bestehen aus spezifisch gegen das Zielgen gerichteten Oligonucleotiden, die an einem Ende mit einem Reporter-Fluorophor und am anderen Ende mit einem Fluoreszenz-Löscher (Quencher) gekoppelt sind. Ist die Sonde intakt, befinden sich Reporter und Löscher in unmittelbarer Nähe, so dass bei Anregung des Reporters eine strahlungsfreie Energie-Übertragung auf den Löscher stattfindet, wo sie in Wärme umgewandelt wird. Das bedeutet, dass bei intakten Sonden nach Anregung keine Fluoreszenz gemessen werden kann. Bindet die Sonde mit dem DNA-Strang wird sie durch die Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase während der Synthese des Gegenstranges abgebaut. Dadurch werden Reporter und Löscher voneinander getrennt und die emittierte Fluoreszenz des Reporters messbar. Die Fluoreszenz steigt mit der Anzahl der Kopien eines Stranges an. Zu Beginn ist der Anstieg sehr langsam, da sich nur wenige Kopien finden. Dann erfolgt eine Phase exponentiellen Anstiegs der Intensität der wieder langsamer wird, wenn sich TaqMan-Sonden und Nucleotide verbrauchen. Am Anfang des exponentiellen Bereichs des Fluoreszenzanstieges wird ein Intensitätsschwellenwert festgelegt und für jede Probe der C_T -Wert (Cycle Threshold) bestimmt, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über den Schwellenwert angestiegen ist. Dieser C_T -Wert wird für die Berechnung der enthaltenen mRNA Mengen verwendet.

Zur Durchführung einer qRT-PCR wurden je eine Mischung (Mastermix) für die cDNA des zu untersuchenden Gens sowie für ein Referenzgen vorbereitet, von dem eine konstante Expression bekannt ist. Die Mischung setzt sich für jede Probe aus 10 μ l TaqMan Pre-Amp Mastermix, 6 μ l H₂O und 1 μ l der entsprechenden TaqMan Sonde zusammen. 17 μ l der Mischung wurden in eine Vertiefung einer 48-Loch Probenplatte pipettiert und 3 μ l cDNA hinzugegeben. Jede cDNA Probe wurde doppelt angesetzt. Eine Negativkontrolle, bestehend aus der vorbereiteten Mischung ohne Zusatz von RNA, wurde jedes mal mit gemessen. Die Platte wurde mit einer Klebefolie verschlossen und die PCR durch-

geführt. Dafür wurden die Proben zunächst für 2 min auf 50°C und dann für 10 min bei 95°C aufgeheizt und 40 Zyklen der PCR durchgeführt. Ein Zyklus besteht dabei aus einer Denaturierungsphase von 15 s bei 95°C und einer Anlagerungs (Annealing)- und Elongationsphase von 1 min bei 60°C, wobei parallel die Fluoreszenzintensität gemessen wird. Bei einer starken Abweichung der Doppelbestimmung oder einem Signal in der Negativkontrolle wurde die PCR wiederholt.

2.4.3 Auswertung

Für die Auswertung der qRT-PCR wurde die $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode verwendet, bei der die Verhältnisse zweier Proben als n-fache Menge errechnet wird [104]. Für die Berechnung werden die C_T -Werte (der Zyklus an dem die Fluoreszenz in einer Probe erstmalig einen Schwellenwert überschreitet) der Doppelbestimmungen gemittelt. Der ΔC_T Wert einer cDNA-Probe wurde über

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ Referenzgen}} \quad (2.2)$$

ermittelt. Das Referenzgen ist dabei ein Haushaltsgen, das unverändert exprimiert wird. Für die vorliegende Arbeit wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Der $\Delta\Delta C_T$ Werte wird errechnet, indem die ΔC_T Werte der Kontrolleprobe (entspricht der untransfizierten Probe bzw. dem Ausgangszustand) von den ΔC_T Werten der behandelten oder transfizierte Proben abgezogen werden.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ Probe}} - \Delta C_{T \text{ Kontrolle}} \quad (2.3)$$

Das Verhältnis der Proben zur Kontrollprobe erhält man als n-fache Menge durch die Berechnung von $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

2.5 Zugexperimente

In diesem Versuch wurden die Zellen in elastischen Zugkammern ausgesät und uniaxial zyklisch gedehnt. Anschließend wurden sie entweder fixiert, das Aktinzytoskelett gefärbt und daran die Orientierungswinkel bestimmt oder die Proteine wie in 2.3.1 beschrieben isoliert. Kammern sowie Zugapparatur sind in [36] ausführlich beschrieben.

2.5.1 Herstellung der Zugkammern

Als Elastomer zur Kammerherstellung wurde kreuzvernetzbares Zweikomponenten-System auf Basis von Polydimethylsiloxan (PDMS) verwendet. Die Grundsubstanz verfügt

über freie Vinylgruppen, die beim Erhitzen mit Hilfe eines Katalysators über einen Quervernetzer (Methylhydrosiloxan-Dimethylsiloxan Copolymer) zu einem elastischen Polymernetzwerk verknüpft werden. Es wurde ein kommerziell erhältliches Zweikomponenten-System verwendet (Sylgard 184, Dow Corning, Wiesbaden), das Mischungsverhältnis von Kreuzvernetzer zu Grundsubstanz betrug 1:40 im Gewichtsverhältnis. Die beiden Substanzen wurden abgewogen, sorgfältig gemischt und anschließend für wenige Minuten in einem Ölpumpen-Vakuum entgast. Das Gemisch wurde in Gussformen aus PVC gegossen (Abb. 2.1 A) in deren Erhöhung eine Silizium-Siliziumdioxid (Si-SiO₂) Plättchen eingesetzt ist. In diese sind zwei gekreuzte Linien eingearbeitet, die exakt parallel zur Seitenwand der Gußform verlaufen. Diese Linien sind in der ausgehärteten Kammer im Boden eingepreßt und erlauben in der späteren mikroskopischen Analyse eine Bestimmung der Zugrichtung. Die Formen sind so gearbeitet, dass die Kammern eine Innengröße von 2 x 2 cm mit einem 5 mm starken Rand haben. Der Boden hat eine Stärke von ca. 400 µm. An den Ecken sind Montagelöcher integriert, über die die Kammern in die Zugapparatur eingebaut werden. Die Kammerränder sind zu diesem Zweck dort verstärkt (siehe Abb. 2.1). Die Aushärtung der Kammern erfolgte ü.N. bei 60°C. Das Elastomer hatte anschließend ein Elastizitätsmodul von 50 kPa (siehe auch [36]). Die Steifigkeit wurde für jede neue Verpackungseinheit überprüft⁴ um Schwankungen auszuschließen.

2.5.2 Aufbau der Zugapparatur und Durchführung der Experimente

Die Kammern wurden in Halterungen eingespannt (siehe Abb. 2.1) und um 1,5 mm vorgestreckt, um ein Durchhängen des Kammerbodens zu verhindern. Der Kammerboden wurde für 60 min mit FN 2,5 µg/cm² in PBS bei RT beschichtet, um eine Zelladhäsion zu ermöglichen. In die Kammern wurden mind. 6 h vor Beginn der Dehnungsexperimente $16 \cdot 10^3$ bzw. $17 \cdot 10^3$ Zellen ausgesät. Die Zellen wurden in maximal 500 µl Medium kultiviert, um den Kammerboden nicht zu stark zu belasten. Um die Kulturbedingungen von 37°C und 5% CO₂ aufrecht zu erhalten wurden die Zugexperimente im Inkubator durchgeführt. Um eine Verdunstung des Kulturmediums und damit osmotischen Stress für die Zellen zu vermeiden wurde die

Kammer mit einem ausgedehnten und weichen Stück "Parafilm" abgedeckt.

Für die Dehnungsexperimente wurden zwei unterschiedliche Zugapparate verwendet, in denen unterschiedliche Parameter eingestellt werden konnten.

Für eine Dehnung um 14% wurde in beiden Apparaten von 1,5 mm um 3 mm auf 4,5 mm gezogen. Die Frequenz der Dehnung war abhängig von der Geschwindigkeit mit

⁴Die Bestimmung der Elastizitäten ist in [36] näher beschrieben und wurde an unserem Institut von N. Hampe durchgeführt.

der gezogen wurde. Für eine zyklische Dehnung von 24 mHz bei 14 % Amplitude stand ein Zugapparat zur Verfügung, in dem fünf Kammern gleichzeitig gezogen werden konnten.

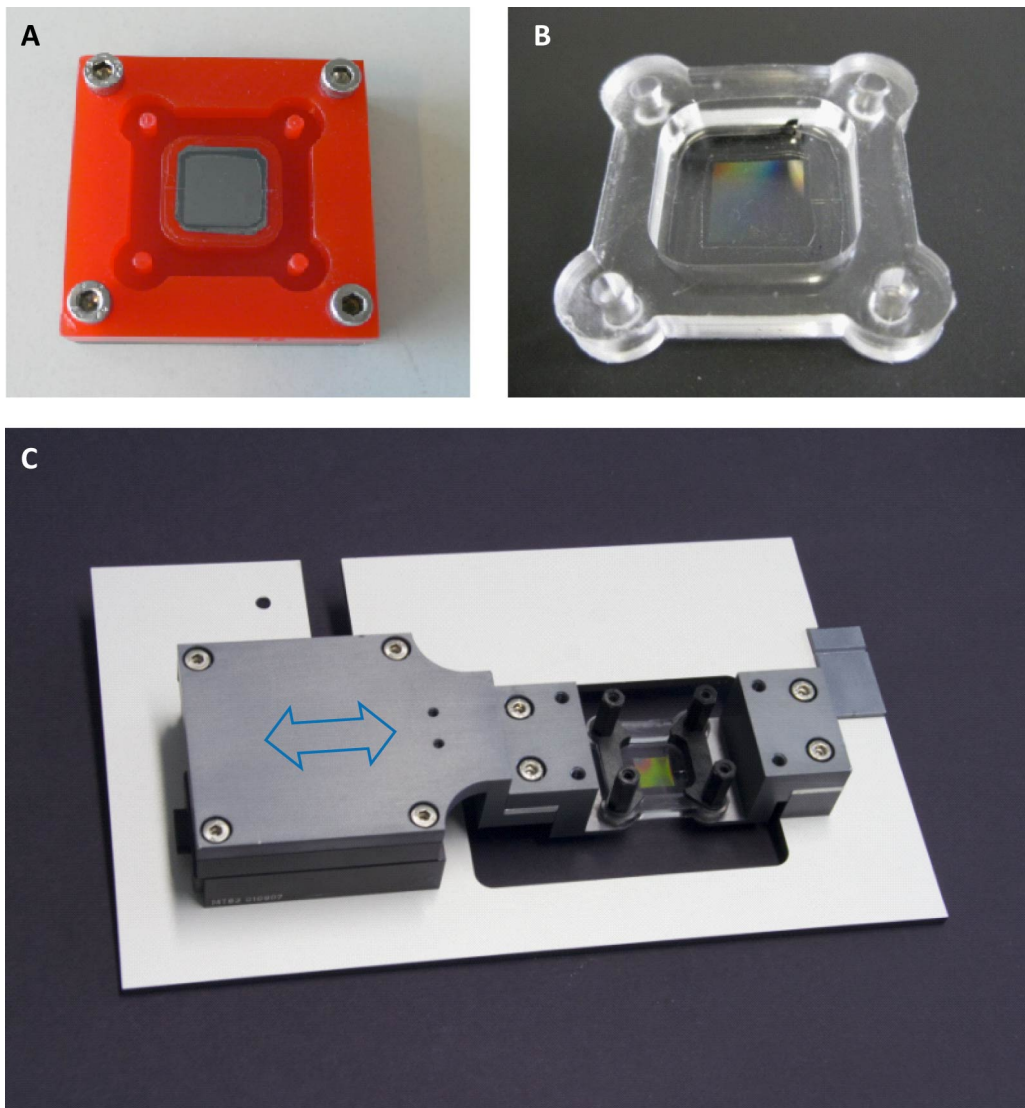


Abbildung 2.1: Beispiel einer Kammer und einer Zugapparatur. In A ist eine Gussform dargestellt, in die das noch flüssige Silikonkautschuk gegossen wird. B zeigt eine fertige Kammer. Hier ist noch ein mikrostrukturiertes Boden zu sehen. Die Mikrostruktur wurde in meinen Experimenten durch eine einfache Linie ersetzt. In C ist eine Zugapparatur dargestellt, wie sie für Experimente bei schnelleren Frequenzen verwendet wurde. Der Pfeil zeigt die Richtung des Zuges an. Danke an W. Rubner für die Abbildungen.

Dieser hatte eine festgelegte Geschwindigkeit von 10 mm/min bei einer Pausenzeit von 3 Sekunden in der Anfangs- und Endposition.

Für höhere Frequenzen wurde ein anderes Modell der Zugapparatur verwendet, das in Abb. 2.1 C dargestellt ist. In diesem konnte die Dehnungsgeschwindigkeit, Verfahrweg und

Pausenzeit frei eingestellt werden. Hier standen drei identische Geräte zur Verfügung, die jedoch getrennt betrieben wurden.

| Dehnung [%] | Frequenz [mHz] | Geschwindigkeit [mm/min] | Pausenzeit [s] |
|-------------|----------------|--------------------------|----------------|
| 14 | 24 | 10 | 3 |
| 14 | 100 | 0,8 | 1,25 |
| 14 | 130 | 1,04 | 1 |

Tabelle 2.1: Verwendete Parameter für die zyklische Dehnung.

Die Zellen wurden nach Beenden der Dehnungsexperimente sofort, wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, fixiert. Unter den Kammerboden wurde ein Objektträger geklebt, der am Silikonkautschuk haftet. Die Zellen wurden in der Kammer mit fluoreszent markiertem Phalloidin gefärbt und abschließend Deckgläser aufgeklebt. Nach Aushärten wurde um die Deckgläser herum geschnitten und die Kammerreste entfernt. Die Zellen wurden dann, wie in Abschnitt 2.6 beschrieben, aufgenommen.

2.5.3 Digitale Bildverarbeitung und Auswertung

Die Auswertung der Bildreihen erfolgte in einer von Dr. N. Kirchgeßner⁵ geschriebenen und von Dr. R. Springer sowie G. Dreissen weiterentwickelten Programmreihe⁶. Über den Algorithmus wurde zunächst das Zytoskelett ermittelt. Von jedem Pixel des Zytoskeletts wurde die Orientierung bestimmt. Darüber wurde dann die Hauptorientierung der Zelle errechnet. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden detailliert beschrieben.

Im ersten Schritt wurden die Originalbilder auf die erste Stufe einer Gaußpyramide reduziert, d.h. das Bild wurde unter Verwendung einer 5x5 Binomialmaske geglättet und dabei in jeder Dimension auf die Hälfte reduziert [18]. Dann wurde dieses Bild mit einer 7x7 Binomialmaske geglättet und von der 1. Gaußebene abgezogen (Hochpassfilter). Um den Hintergrund zu reduzieren, wurde das Ergebnis erneut mit einer 7x7 Binomialmaske geglättet. Alle Regionen oberhalb einer Grauwertschwelle wurden dem Zytoskelett zugeordnet. In Abb. 2.2 A ist eine Beispielaufnahme dargestellt und in B das ermittelte Zytoskelett. Als Schwelle wurde die Summe des mittleren Grauwertes eines Bildes und dessen halber Standardabweichung gesetzt. Darüber hinaus wurden ausschließlich Areale mit einer Größe oberhalb von 128 μm^2 (5000 Pixeln) verwendet. Um überstrahlte Bereiche herauszufiltern, wurde zusätzlich definiert, dass nur Regionen mit einer lokalen Varianz > 0 berücksichtigt werden. Alle verbliebenen Regionen wurden dem Zytoskelett

⁵Aktuelle Adresse: Institute of Agricultural Sciences, ETH Zürich, Schweiz

⁶Die Programme wurden an unserem Institut geschrieben und sind dort als “structens_4cell8-weighted_pyramidchoice” und “cellori_manualmark3” in Verwendung

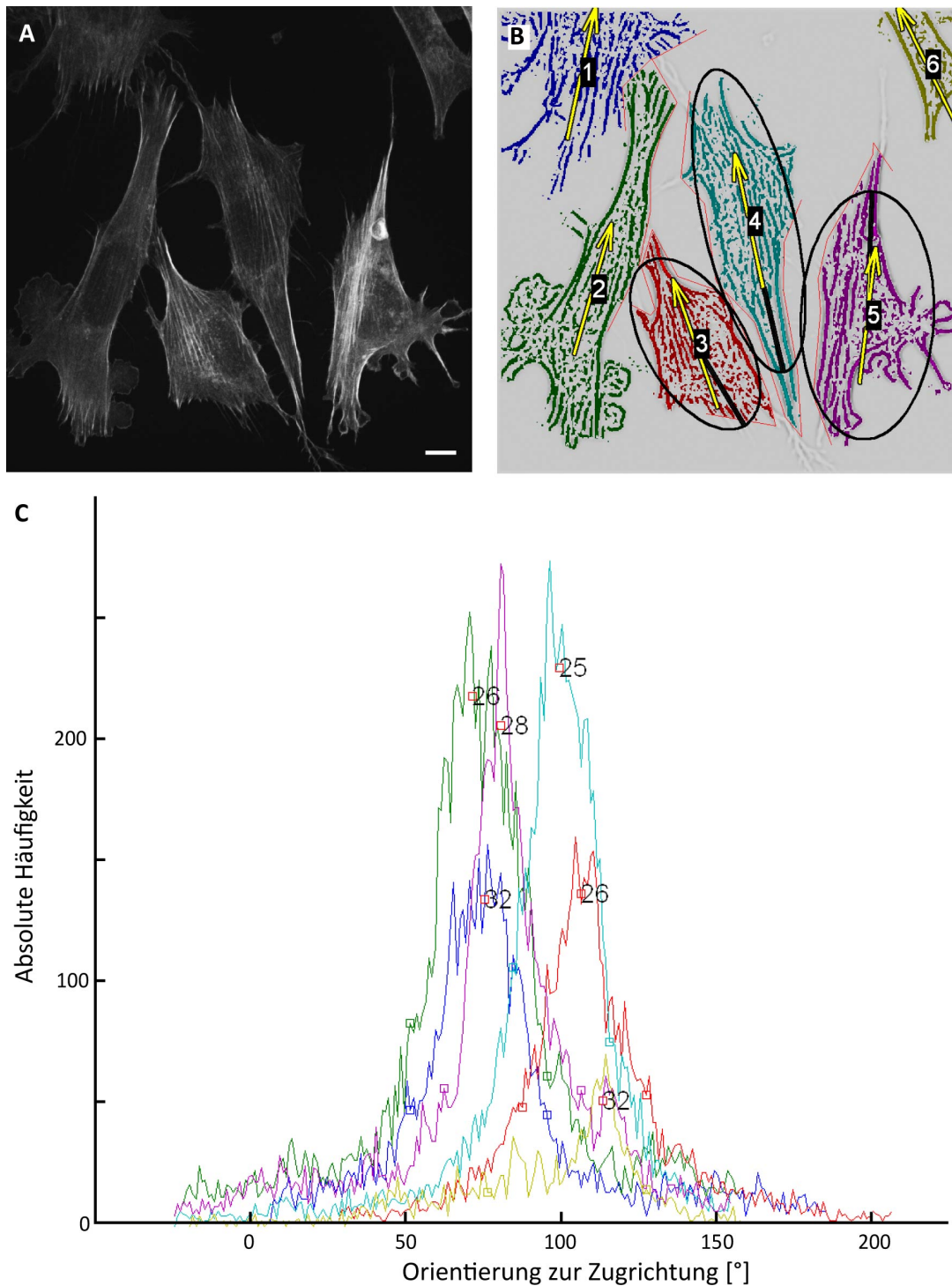


Abbildung 2.2: Bestimmung der Orientierung von Zellen anhand des Zytoskeletts. In A ist das Aktinzytoskelett von MEF-WT-Zellen zu sehen, die für 30 h bei 24 mHz gezogen wurden. B zeigt die Bereiche, die vom Algorithmus erkannt werden, wobei jede Zelle in verschiedenen Farben dargestellt ist. Die gelben Pfeile zeigen die Hauptaktinorientierungen, die für die Zellen im Beispiel bestimmt wurden. An den Zellen 3, 4 und 5 ist zusätzlich die Ellipsenorientierung dargestellt, die Hauptachse ist durch einen schwarzen Strich dargestellt. In C ist das Histogramm der für jede Zelle bestimmten Winkel dargestellt. Die Farben entsprechen dabei den Zellen in B. Die Zahl zeigt hier an der ermittelten Maximalposition die Standardabweichung. Maßstab in A = 10 μm .

zugeordnet. Über einen lokalen 2D Struktur-Tensor-Ansatz [12] wurden die lokalen Orientierungen für jeden Pixel bestimmt. Dieser Tensor ist definiert als

$$S_L = \begin{pmatrix} g_x g_x & g_x g_y \\ g_x g_y & g_y g_y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{12} & S_{22} \end{pmatrix} \quad (2.4)$$

wobei g_x und g_y die x- und y-Komponente des Grauwert-Gradienten darstellen. Der Grauwert-Gradient wird mittels des optimierten Sobel-Operators bestimmt [102]. Der Winkel φ zwischen dem Grauwert-Gradienten und der x-Achse ist gegeben durch

$$\tan(2\varphi) = \frac{2S_{12}}{S_{22} - S_{11}} \quad (2.5)$$

Um nur Regionen in der Auswertung zu verwenden, die ein klar orientiertes Zytoskelett aufweisen, wurde der Orientierungsvektor (der Einheitsvektor, der in die gleiche Richtung zeigt wie der Grauwertgradient) mit einem 7x7 Binomialkern gemittelt. Regionen, in denen der so gemittelte Orientierungsvektor einen Betrag größer 0,5 aufweist, wurden als gerichtet angesehen [59] und in der weiteren Analyse berücksichtigt.

Über den zweiten Teil der Programmreihe wurden benachbarte Zellen manuell getrennt, da diese nicht vom Programm als einzelne Zellen im Verbund erkannt werden können. Zudem wurden konfluent bewachsene Bereiche (siehe Abb. 2.3 A) aus der Auswertung entfernt da über Zell-Zell Kontakte die Orientierung beeinflusst werden kann [30]. Es wurden nur Zellen in die Auswertung mit aufgenommen, die einzeln lagen oder nur leichten Kontakt mit anderen Zellen hatten.

Des weiteren zeigen MEF-Zellen fadenartige Ausläufer, die teilweise lange Strecken überspannen und zumeist eine Verbindung mit anderen Zellen herstellen (siehe Abb. 2.3 B). Diese haben einen starken Kontrast zum Hintergrund und werden vom Algorithmus erkannt. Da sie auf lange Strecke eine bestimmte Orientierung ergeben, können sie die Auswertung beeinflussen. Solche Zellausläufer sowie Zellreste wurden entfernt, da diese nicht in die Auswertung einfließen sollen. Zusätzlich wurden auch einzelne Zellen, die nur zu einem geringen Teil im Bild waren, manuell gelöscht. Dies verhindert zum einen, dass Zellen doppelt in die Auswertung einfließen können. Zum anderen können kleine Zellabschnitte eine andere Haupttaktinausrichtung zeigen als die Zelle insgesamt.

Die einzelnen bestimmten lokalen Orientierungswinkel des Zytoskeletts einer Zelle wurden in einem Histogramm zusammengefasst (siehe Abb. 2.2 C), wobei die Werte zwischen 0 und 180° liegen konnten. Anschließend wurde das Maximum des Histogramms bestimmt. In den Fällen, in denen das Maximum zu nah am Rand des Winkelbereichs lag, wurde das Histogramm an seinem Minimum geteilt und auf der anderen Seite wieder zusammengesetzt. Das Histogramm wurde dann mit einem 59x1 Binomialkern geglättet.

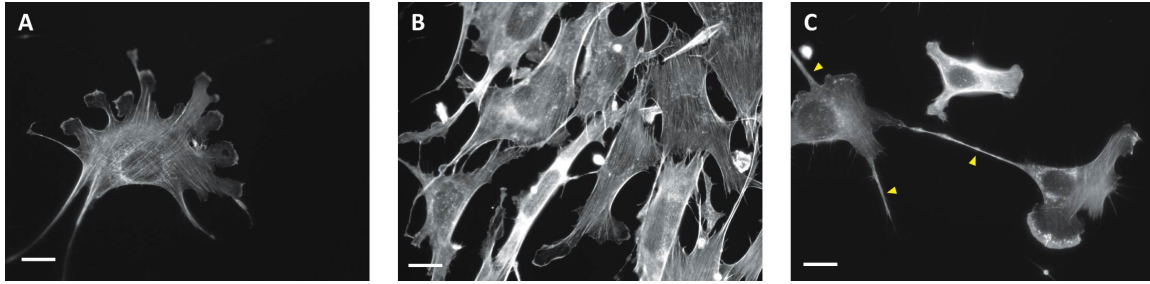


Abbildung 2.3: Beispielzellen für konfluentes Wachstum sowie Zellausläufer. In A ist ein Beispiel für Zelle dargestellt, deren Zytoskelett optimal ermittelt werden konnte. B zeigt konfluent gewachsene Zellen, die eine starke parallele Orientierung zeigen. In C sind mit gelben Pfeilen Zellausläufer markiert. Die rechte Zelle stellt darüber eine Verbindung zur Zelle links im Bild her. Sowohl die konfluent gewachsenen Zellen, als auch Zellausläufer wurden für die automatisierte Auswertung manuell entfernt. Maßstab = 10 μm .

Der maximale Wert des geglätteten Histogramms wurde detektiert. An diesen sowie an den nächsten Wert zu beiden Seiten des Maximums wurde eine Parabel angefitet. Der Scheitelpunkt dieser Parabel wurde als Hauptaktinorientierung der Zelle für die weiteren Auswertungen verwendet.

Eine alternative Bestimmung der Aktinorientierung beinhaltet die Lösung des Eigenwertproblems. Hierfür werden die bestimmten Winkel aus dem globalen Strukturtensor in einem weiteren Tensor aufsummiert.

$$S_G = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \begin{pmatrix} \sin^2(\varphi_i) & \sin(\varphi_i) \cos(\varphi_i) \\ \sin(\varphi_i) \cos(\varphi_i) & \cos^2(\varphi_i) \end{pmatrix} \quad (2.6)$$

Die Diagonalisierung dieser Matrix und die Bestimmung des Eigenvektors mit dem größten Eigenwert ergibt eine Hauptorientierungsachse. Diese kann ebenfalls zur Bestimmung der Hauptorientierung einer Zelle herangezogen werden. Der Vergleich zwischen der Bestimmung über diese Hauptachse und über das Maximum der Winkelverteilung ist in Abschnitt 3.1 dargestellt.

Der größte Eigenwert selbst ergibt den Ordnungsparameter und kann zwischen 0,5 und 1 liegen, wobei 0,5 eine isotrope Verteilung über alle Winkel und 1 eine maximale Ausrichtung beschreibt.

Zur Bestimmung der Ellipsenorientierung wurde der Schwerpunkt des oben ermittelten Zytoskeletts berechnet. Die Ellipse mit dem gleichen normalisierten zweiten Moment wie das Zytoskelett wurde berechnet. Die Richtung der Hauptachse der errechneten Ellipse wurde als Zell- oder Ellipsenorientierung verwendet. Das Aspektverhältnis der Zellen ergibt sich aus dem Verhältnis der Haupt- zur kleineren Nebenachse. Mit Ausnahme von Abb. 3.9 sind jedoch stets die Aktinorientierungen für die Orientierungsanalysen verwen-

det worden.

In Kapitel 3 sind die Ergebnisse der Dehnungsexperimente dargestellt. Von den Verteilungen sind stets die Gesamtverteilungen als kumulierte Häufigkeiten in 1° Intervallen dargestellt. Daneben ist zumeist das Histogramm der relativen Häufigkeiten der Einzelergebnisse in 10° Intervallen dargestellt. Wurden mehr als zwei Einzelergebnisse durchgeführt wurden diese gemittelt und die Standardabweichung in den Histogrammen mit angegeben. Bei nur zwei durchgeführten Einzelergebnissen wurden die relativen Häufigkeiten nicht gemittelt, sondern beide Einzelergebnisse dargestellt.

2.6 Mikroskopie

Die Immunfluoreszenzexperimente (siehe Abschnitt 2.2) wurden an einem konfokalen Mikroskop (LSM 510, Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Als Objektiv diente ein 63x Plan Achromat NA 1,4 DIC Öl Objektiv (Carl Zeiss, Jena) und als Software AIM (Version 4.2.0.121, Carl Zeiss, Jena). Als Anregungslaser wurden ein Argon-Ionen-Laser (488 nm) sowie zwei He-Ne-Laser (543 nm bzw. 633 nm) verwendet. Die unterschiedlichen Fluorophore wurden nacheinander und über verschiedene Filtersätze aufgenommen. Bei Doppelfärbungen mit Alexa Fluor (AF) 488 und 546 wurde ein Hauptfarbteiler (HFT) 488/543 und bei Dreifachfärbungen mit zusätzlich AF 633 ein HFT 488/543/633/UV verwendet. AF 488 wurde über einen Bandpassfilter (BP) 505-530, AF 546 entweder über einen BP 560-615 oder einen Langpassfilter (LP) 560 und AF 633 über einen LP 650 detektiert.

Die Aufnahmen der Orientierungsanalysen (siehe Abschnitt 2.5.2) wurden an einem inversen Epifluoreszenz-Mikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Als Objektiv wurde ein 40x Plan Neofluar NA 1,3 DIC Öl verwendet. Die Fluorophore (AF 488 und 546) wurden mit einer Quecksilberdampfampe über entsprechende Filter angeregt und die Fluoreszenz über geeignete Filter ([Hier Filter einfügen], Carl Zeiss, Jena) aufgenommen. Zur Aufnahme diente eine ORCA ER CCD Kamera (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan). Als Software wurde Open Box (Version 1.77, Informationssysteme Schilling, München) verwendet.

Einzelne Aufnahmen wurden an einem automatisierten Mikroskop (Axio Observer Z.1, Carl Zeiss, Jena) durchgeführt. Anregung und Filtersätzen entsprechen den vorher beschriebenen. Als Objektiv diente ein 40x Plan Neofluar NA 1,3 Ph3 Öl (Carl Zeiss, Jena), für die Aufnahme der Bilder eine CCD Kamera (AxioCam MRM, Carl Zeiss, Jena). Als Programm für die Aufnahme diente Axiovision (Version 4.8, Carl Zeiss, Jena). Die Bildreihen wurden automatisiert über das Modul MosaiX aufgenommen. In x- und in y-Richtung wurden je drei aneinander grenzende, parallele Bildreihen aufgenommen. Die Einzelbilder

hatten zueinander je 2 % Überlapp und wurden über das MosaiX Modul der Axiovision Software aneinander gesetzt.

2.7 Statistische Datenverarbeitung

Zum Vergleich der Verteilungen von Zellorientierungen wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test (KS-Test) angewendet [93]. Dieser betrachtet die Übereinstimmung zweier Wahrscheinlichkeitsverteilungen. Er kann sowohl für den Vergleich von zwei Stichproben als auch für den Vergleich einer Stichprobe mit einer angenommenen Wahrscheinlichkeitsverteilung (z.B. Normalverteilung) verwendet werden. Im Folgenden wird der Zweistichproben Test für den Vergleich zweier Verteilungen beschrieben. F_1 und F_2 sind dabei die unterliegenden Wahrscheinlichkeitsfunktionen.

Die Nullhypothese ist

$$H_0 : F_1(x) = F_2(x) \quad (2.7)$$

und die Alternativhypothese ist mit

$$H_1 : F_1(x) \neq F_2(x) \quad (2.8)$$

definiert. Für den KS-Test wird die Teststatistik der empirischen Verteilungsfunktionen \hat{F}_1 und \hat{F}_2 über

$$D = \sup_x | \hat{F}_1(x) - \hat{F}_2(x) | \quad (2.9)$$

berechnet, wobei sup das Supremum bezeichnet und die größte Abweichung der Verteilungen darstellt. Die Nullhypothese wird abgelehnt, wenn

$$\sqrt{\frac{nm}{n+m}} D > K_\alpha \quad (2.10)$$

K_α bezeichnet dabei die kritische Schwelle und n und m die Stichprobengröße. Bei Stichproben von $n, m > 20$ wird K_α approximiert verwendet (siehe Tabelle 2.2). In den Versuchen wurde sofern nicht anders angegeben ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$ verwendet. [93]

| | | | | | | |
|---------------------|------|------|------|------|------|-------|
| Signifikanzniveau p | 0,20 | 0,15 | 0,10 | 0,05 | 0,01 | 0,001 |
| K_α | 1,07 | 1,14 | 1,22 | 1,36 | 1,63 | 1,95 |

Tabelle 2.2: K_α der verschiedenen Signifikanzniveaus. Entnommen aus [93].

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Signalkaskaden untersucht, die an der zellulären Mechanosensorik als Reaktion auf zyklische Dehnung beteiligt sind. Integrinvermittelte Adhäsionen, insbesondere FA als Verbindung des Aktinzytoskeletts mit der EZM, stellen eine oft diskutierte Lokalisation für die mechanosensorischen Proteine dar [43]. Die Kinasen der Src-Familie mit Src (pp60Src) als wichtigstem Vertreter, sind für einen Großteil der Phosphorylierung der FA maßgeblich [14]. Frühere Versuche konnten außerdem zeigen, dass die Reaktion von Zellen auf mechanische Reize durch ein Fehlen von Src vermindert werden kann [96]. Ein solcher mechanischer Reiz stellt zyklische Dehnung dar; dabei werden Zellen auf elastischen Substraten kultiviert und dieses gedehnt. Zellen nehmen diesen Reiz wahr und versuchen ihm zu entgehen, indem sie sich senkrecht zur Zugrichtung ausrichten [17, 27, 49]. In Abb. 3.1 sind MEF-WT-Zellen dargestellt, die als Kontrolle nicht gedehnt wurden (A) oder die für 30 h zyklischer Dehnung von 14 % bei 23 mHz (B) ausgesetzt, anschließend fixiert sowie gegen Aktin gefärbt wurden. Die Orientierung des Aktinzytoskeletts wurde bestimmt und für jede Zelle der Winkel der Hauptaktinorientierung bestimmt (siehe Abschnitt 2.2). Über die Verteilung der Winkel ließen sich anschließend Zellpopulationen vergleichen.

Dass Src an dieser Mechanosensorik beteiligt ist zeigt sich dadurch, dass sich Src-Knockdown-Zellen in Dehnungsexperimenten nicht mehr ausrichten [96]. Während meiner Diplomarbeit (10/2008 - 10/2009) wurden Versuche durchgeführt, die diese Ergebnisse bestätigten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht nur Src, sondern auch die anderen ubiquitär exprimierten Kinasen der Src-Familie Yes und Fyn an der zellulären Reorientierung beteiligt sind. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde zunächst die Methode der Auswertung validiert und die in der Diplomarbeit erhobenen Daten neu ausgewertet. Zusätzlich wurde die Beteiligung der SFK mittels eines Inhibitors weiter untersucht und die Methode auf weitere, in der FA lokalisierte Signalproteine angewendet. Insbesondere wurde die Beteiligung von p130Cas untersucht. Dabei handelt es sich um ein Protein in der FA, von dem beschrieben wurde, dass es bei Dehnung gestreckt und nachfolgend von den SFK phosphoryliert wird. Ebenso wurden das an p130Cas bindende Adapterprotein Crk sowie einzelne weitere Bindungspartner auf ihre Rolle bei zellulärer Reorientierung bei zyklischer Dehnung untersucht und die Ergebnisse im Folgenden vorgestellt.

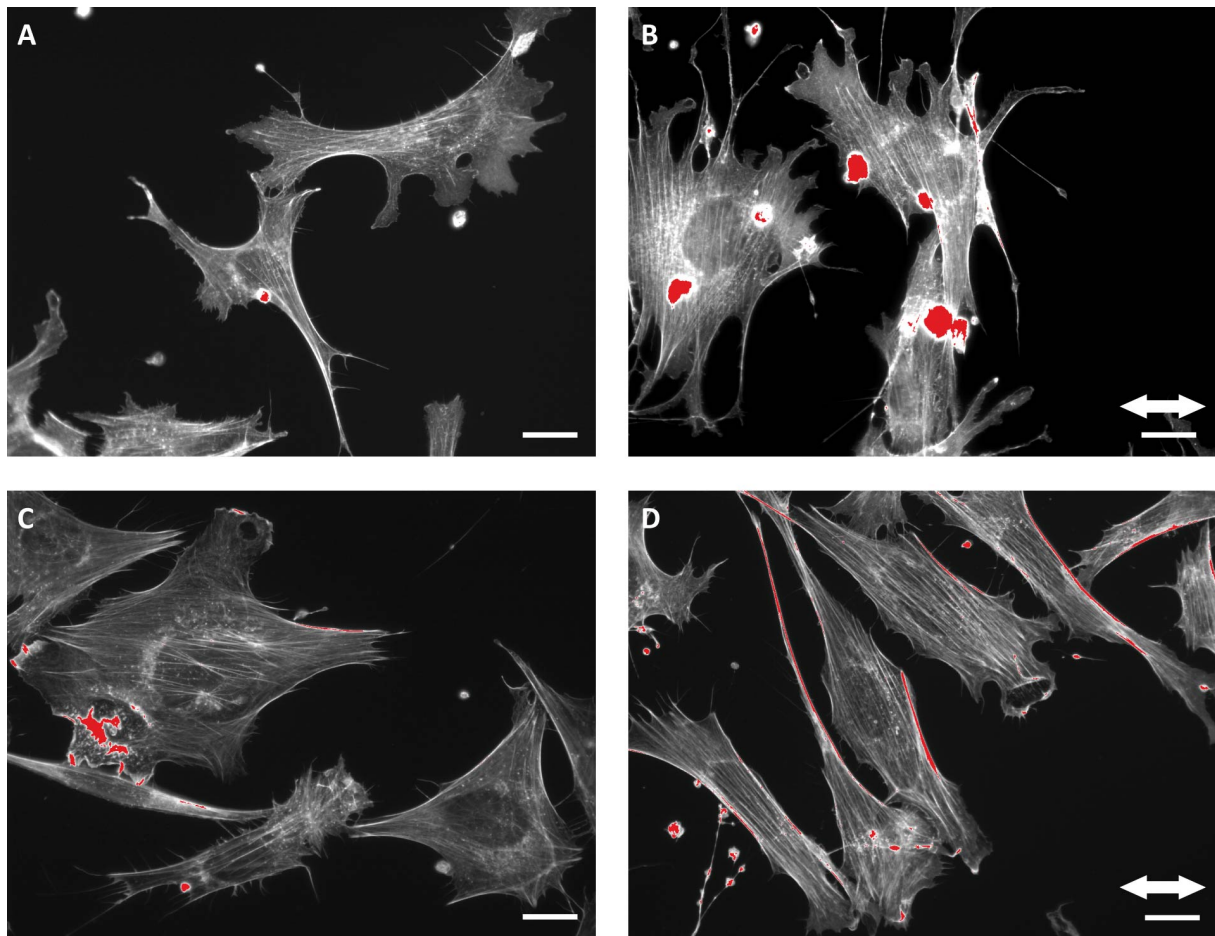


Abbildung 3.1: MEF-WT und -SYF-Zellen vor und nach zyklischer Dehnung. A zeigt ungedehnte MEF-WT Kontrollzellen und B Zellen, die für 30 h bei 14 % und 24 mHz zyklisch gezogen wurden. C zeigt nicht gezogene und D MEF-SYF-Zellen, die mit den gleichen Parametern wie B gezogenen wurden. Die Pfeile zeigen die Zugrichtung. Maßstab = 10 μm

3.1 Validierung der Methoden zur Bestimmung der Zellorientierung

Die für die Diplomarbeit verwendete Auswertung wurde für die Versuche in dieser Arbeit optimiert. Zum einen wurde eine weitere Methode zur Orientierungsbestimmung implementiert und zum anderen wurde ein Ordnungsparameter eingeführt, der Rückschlüsse auf den Grad der Ordnung des Zytoskeletts einer Zelle zulässt.

Die Orientierung einer Zelle kann über mehrere Methoden bestimmt werden. Eine weit verbreitete basiert auf der Zellform [81]. Dies kann zum einen durch die Lage einer Achse durch die zwei am weitesten voneinander entfernten Punkte des Zellrandes [48] oder durch das Berechnen einer Ellipse um die Zelle erfolgen [36].

Für diese Arbeit wurde die Orientierung der Zelle anhand der Ausrichtung des Ak-

tinzytoskeletts bestimmt. Hierfür wurden zwei verschiedene Möglichkeiten miteinander verglichen, die in Abschnitt 2.5.3 ausführlich beschrieben sind. Beiden liegen die lokalen Orientierungen des über den Algorithmus ermittelten Zytoskeletts zugrunde. In der ersten Methode wird für jede Zelle das Maximum der Verteilung der lokalen Orientierungen bestimmt. Diese wird im Folgenden Maximalorientierung genannt. In der zweiten Methode wird die globale Vorzugsorientierung über die Gl. 2.6 bestimmt. Der Eigenvektor mit dem größten Eigenwert zeigt die Richtung dieser Vorzugsorientierung und wird im Folgenden Hauptachsenorientierung genannt.

In Abb. 3.2 ist der Vergleich der beiden Methoden an der Winkelverteilung von MEF-WT dargestellt. Der Vergleich zeigte, dass sich die Ergebnisse der beiden Bestimmungen nicht wesentlich unterscheiden (KS-Test). Auch in den Orientierungsverteilungen der Zellen in Abb. 3.4 ließ sich kein eindeutiger Unterschied zwischen den Methoden zur Bestimmung der Zellorientierung ablesen. Aus diesem Aspekt heraus war keine der beiden Auswertungen vorzuziehen. Da in der Vergangenheit das Maximum der Winkelverteilung als Hauptorientierung verwendet worden war, ist zur besseren Vergleichbarkeit in der vorliegenden Arbeit diese Methode beibehalten worden. Alle in dieser Arbeit als Hauptaktinorientierungen bezeichneten Orientierungen beziehen sich auf die Maximalorientierung. Für zukünftige Arbeiten lässt sich jedoch vorschlagen, die Bestimmung anhand des Eigenvektors zu verwenden, da dieser eindeutiger zu berechnen ist (siehe 2.5.3).

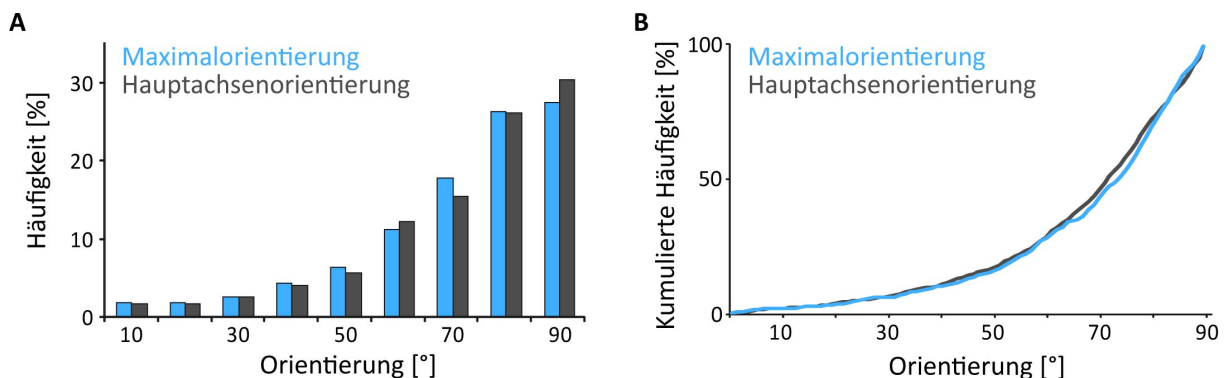


Abbildung 3.2: Vergleich der Auswertung nach Maximalposition und Hauptachsenorientierung. Die Orientierungen von MEF-WT ($n = 949$ Zellen aus 6 Einzelexperimenten) nach 30 h zyklischer Dehnung bei 24 mHz und 14% wurden mit den verschiedenen Methoden bestimmt und die Gesamtverteilungen als relative Häufigkeit (A) sowie als kumulierte Häufigkeit (B) dargestellt.

Aus der durch die Lösung des Eigenwertproblems erhaltenen Eigenwerte wird ein Maß für den Grad der Ausrichtung des Zytoskeletts einer Zelle berechnet, das als Ordnungsparameter bezeichnet wird (siehe Gl. 2.6). Eine isotrope Verteilung der Zytoskelettorientierungen ergibt einen Ordnungsparameter von 0,5 während eine vollständige Orientierung in eine Richtung einen Ordnungsparameter von 1 ergibt. Beispiele für Zellen mit unter-

schiedlichen Ordnungsparametern sind in Abb. 3.3 dargestellt. Die Zelle 1 in A zeigte einen Ordnungsparameter, der mit 0,72 im Bereich des Durchschnitts (siehe auch Abb. 3.5) angesiedelt war, während die zweite Zelle in der Abbildung einen sehr niedrigen Ordnungsparameter von 0,59 zeigte. In den Verteilungen der Aktinorientierungen spiegelt sich dies wider. Während bei der ersten Zelle eine Hauptorientierung zu erkennen war, war in der Verteilung der zweiten Zelle kaum ein eindeutiges Maximum ablesbar. Die Zelle in C zeigt eine eindeutige Vorzugsorientierung und wies einen Ordnungsparameter von 0,83 auf.

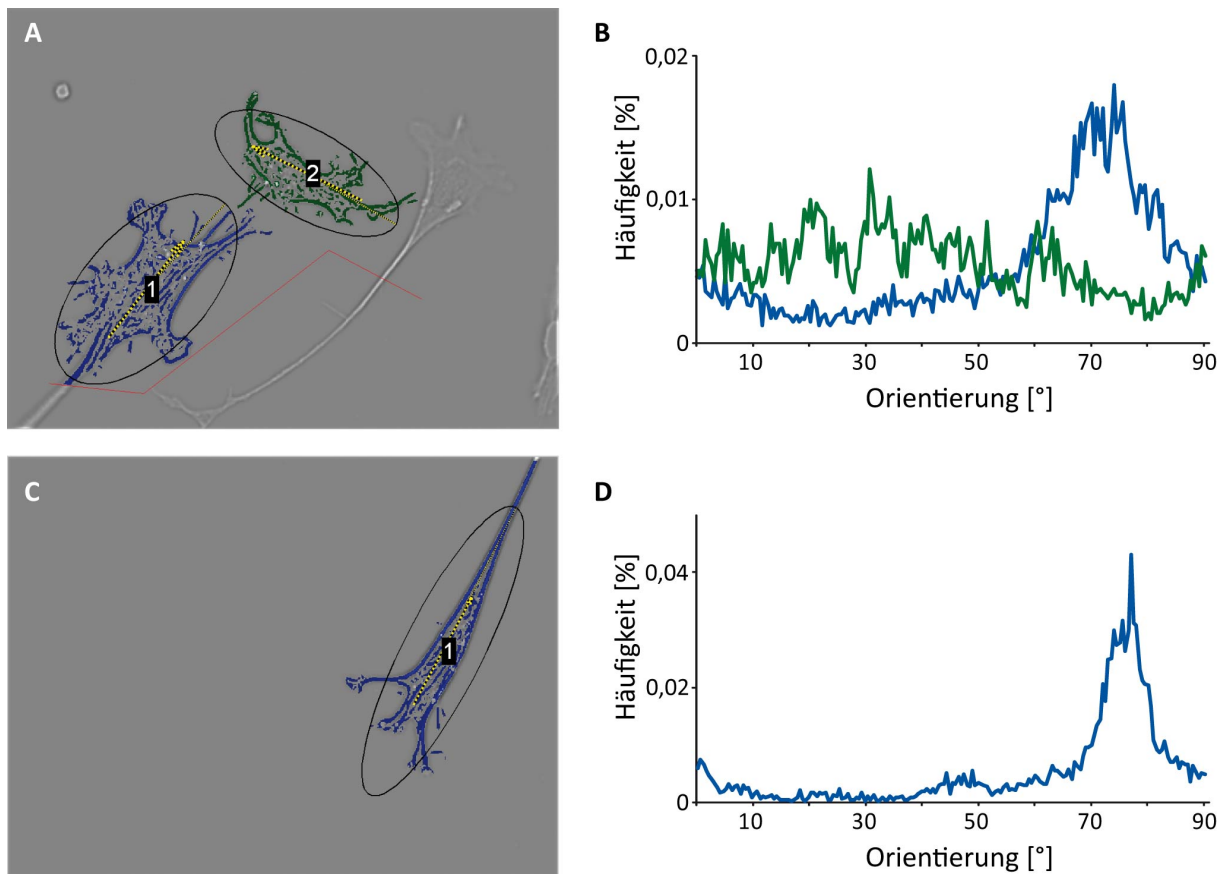


Abbildung 3.3: Beispiele der Winkelverteilungen von Zellen mit unterschiedlichen Ordnungsparametern. Die MEF-WT Zellen wurden für 30 h bei 24 mHz und 14 % zyklisch gezogen. In A und C ist das über den Algorithmus ermittelte Zytoskelett für die Zellen dargestellt. In B und D ist die Verteilung der relativen Häufigkeit der gemessenen Winkel des Aktinzytoskeletts dargestellt. Die Zelle 1 in A (blau) wies einen Ordnungsparameter von 0,72, die Zelle 2 (grün) von 0,59 auf. Die Zelle in B stellte mit einem Ordnungsparameter von 0,83 ein Beispiel für eine stark ausgerichtete Zelle dar.

Bei Zellen, die einer zyklischen Dehnung ausgesetzt sind, konnte beobachtet werden, dass sich diese zu Winkeln senkrecht zur Zugrichtung hin ausrichteten. In Abb. 3.4 A und B ist zusätzlich zu sehen, dass Zellen mit verschiedenen Ordnungsparametern einen

unterschiedlichen Grad in der Reorientierung zeigen. Je höher der Ordnungsparameter, umso stärker verschob sich die Verteilung der Hauptorientierungen zu höheren Winkeln (bestimmt sowohl über die Maximalorientierung als auch über die Hauptachsenorientierung). Eine Ausnahme stellte dabei der Ordnungsparameterbereich von 0,9 und 1,0 dar. Zu beachten ist jedoch, dass nur wenige Zellen einen solche, sehr hohe Orientierung aufwiesen ($n = 12$ aus insgesamt 949 gedehnten Zellen). Zudem beschreibt eine solch starke Ausrichtung meist eine “nadelförmige” Zellmorphologie, die untypisch und abnorm ist. Zellen, die keine Orientierung (Ordnungsparameter 0,5 bis 0,6) aufweisen kommen sowohl in den Kontrollzellen als auch in Zellen vor, die zyklischer Dehnung ausgesetzt waren. Bei nicht gezogenen Kontrollen sind jedoch nur 2,2 % mehr Zellen mit diesem Ordnungsparameter vorhanden als bei gedehnten Zellen (n -Zahlen siehe Abb. 3.4). Dies zeigt, dass auch nicht gezogene MEF-Zellen in sich eine Ausrichtung aufweisen. In der Gesamtverteilung der Zellen zeigt sich jedoch keine Vorzugsrichtung sondern die Zellen sind gleichmäßig über alle Winkel verteilt.

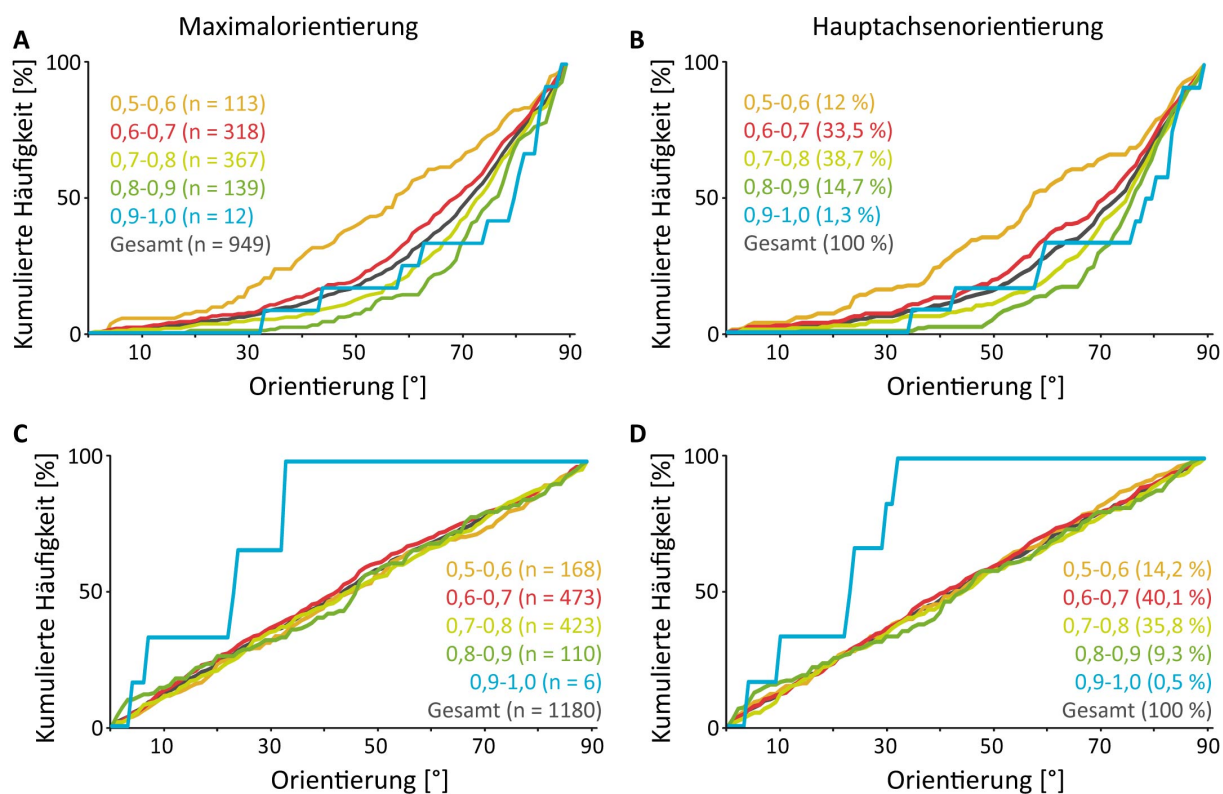


Abbildung 3.4: Orientierung von Zellen bei unterschiedlichen Ordnungsparametern. Die Verteilungen von MEF-WT (siehe Abb. 3.7) wurden mittels des jeweils bestimmten Ordnungsparameters getrennt aufgetragen. A und B zeigen Zellen die für 30 h bei 24 mHz zyklisch gedehnt wurden. In C und D sind nicht gedehnte Kontrollzellen dargestellt. In A und C ist die Bestimmung der Hauptorientierung über die maximalen Orientierung (Maximalorientierung) und in B und D die Hauptorientierung anhand der Hauptachse zu sehen.

In Abb. 3.5 sind die mittleren Ordnungsparameter von MEF-WT, -Src++ und -SYF vor und nach zyklischer Dehnung dargestellt. Bei MEF-SYF handelt es sich um Fibroblasten, denen alle drei ubiquitär exprimierten Kinasen der Src-Familie (Src, Yes und Fyn) fehlen. MEF-Src++ fehlt nur Yes und Fyn, während Src regulär exprimiert wird. Die genauen Versuchsbeschreibungen sowie die Orientierungsanalysen der Zellen sind in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Die Aufnahmen wurden alle am gleichen Mikroskop mit dem gleichen Objektiv aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität sowie die entsprechenden Kameraeinstellungen wurden jedoch angepasst. Es wurde darauf geachtet die Zellen möglichst hell aufzunehmen ohne dabei eine Überzubelichtung zu generieren. Die Ordnungsparameter variieren dabei leicht von Zellen ohne Dehnung zu Zellen mit Dehnung. MEF-WT wies in der ungedehnten Kontrolle einen mittleren Ordnungsparameter von 0,69 ($\sigma = 0,08$; $n = 1180$ Zellen) und gezogen von 0,71 ($\sigma = 0,09$; $n = 949$) auf. MEF-SYF hat in der Kontrolle einen Ordnungsparameter von 0,78 ($\sigma = 0,11$, $n = 820$) und gezogen von 0,76 ($\sigma = 0,09$; $n = 1729$). MEF-Src++ zeigte in der Kontrolle einen Ordnungsparameter von 0,73 ($\sigma = 0,09$; $n = 575$) und gezogen von 0,71 ($\sigma = 0,09$; $n = 943$). Die Verteilungen sind nach dem KS-Test ($p = 0,05$) alle zueinander signifikant verschieden. Eine deutliche Veränderung oder eine gleiche Tendenz der Veränderung zwischen Kontrollzellen und Zellen, die zyklischer Dehnung ausgesetzt waren, ließ sich jedoch nicht erkennen.

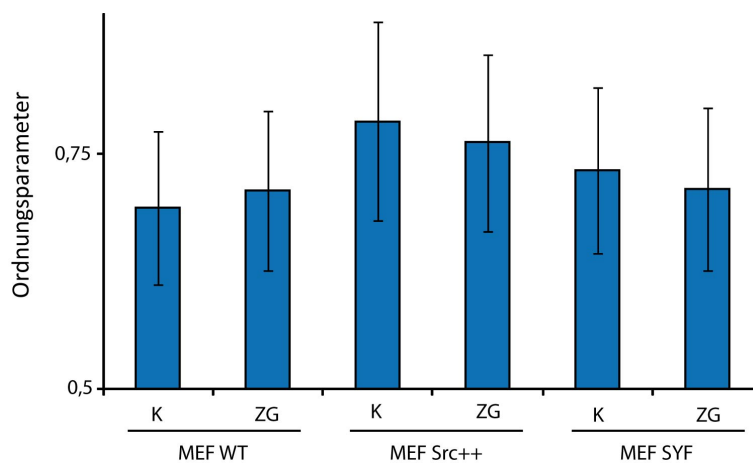


Abbildung 3.5: Mittlere Ordnungsparameter in Abhängigkeit von zyklischer Dehnung. Die Ordnungsparameter von MEF-WT, MEF-Src++ und MEF-SYF-Zellen (siehe Abschnitt 3.2) nach zyklischer Dehnung sowie die der Kontrollzellen wurden gemittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Der Ordnungsparameter war zwar möglicherweise durch zyklische Dehnung, jedoch nicht durch das Fehlen von p130Cas beeinflusst. MEF-Cas-WT zeigt einen mittleren Ordnungsparameter von 0,78 ($\sigma = 0,09$; $n = 627$), MEF-Cas-15F von 0,78 ($\sigma = 0,09$; $n = 788$) und MEF-Cas -/- von 0,79 ($\sigma = 0,09$; $n = 736$). MEF-WT-Zellen, die mit einer Negativkontroll-siRNA transfiziert worden waren, zeigten einen zum untransfizierten

MEF-WT vergleichbaren mittleren Ordnungsparameter von 0,70 ($\sigma = 0,08$; $n = 721$). Mit einer siRNA gegen p130Cas transfiziert ergab sich ein Ordnungsparameter von 0,70 ($\sigma = 0,08$; $n = 620$). Auch hier zeigte sich der stärkere Unterschied zwischen den verwendeten Zelllinien und nicht zwischen Zellen transfizierten und untransfizierten Zellen bzw. Zellen mit den verschiedenen stabilen Transfektionen.

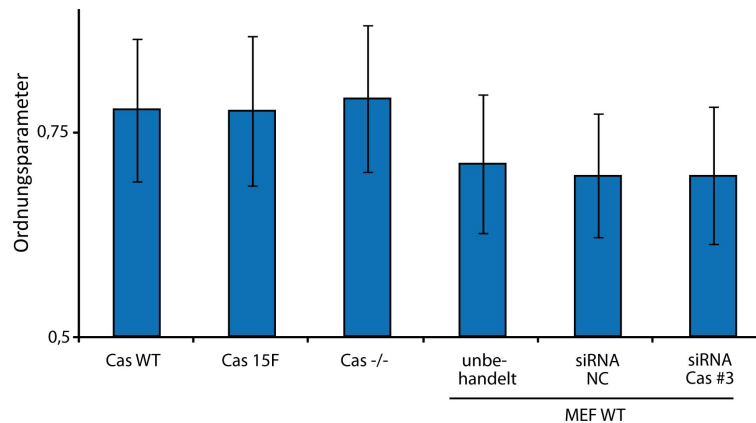


Abbildung 3.6: Ordnungsparameter der Cas Zelllinien sowie von MEF-WT Zelllinien nach Transfektion mit einer siRNA gegen p130Cas oder einer Negativkontrolle. Die Zellen wurden alle für 30 h bei 24 mHz zyklisch gezogen. Eine genauere Beschreibung findet sich in Abschnitt 3.3. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Zellen mit einem niedrigen Ordnungsparameter zeigen keine eindeutige Orientierung zu einer Richtung. In der Auswertung wurde dennoch eine Hauptorientierung für solche Zellen bestimmt. Die Verteilung dieser Orientierungen ging in der Tendenz in Richtung einer zufälligen, über alle Winkel gestreuten (siehe Abb. 3.4, gelbe Linie) Verteilung. Um nur Zellen in die Auswertung aufzunehmen, die eine tatsächliche Ausrichtung zeigten, könnte ein Schwellenwert des Ordnungsparameters bestimmt werden. Dieser lässt sich jedoch schwer festlegen, da die Übergänge zum einen fließend sind und der Ordnungsparameter zum anderen zelltypabhängig war (siehe Abb. 3.5). Daher wurden, obwohl eine Orientierungsbestimmung an Zellen mit sehr niedrigem Ordnungsparameter die Gesamtorientierung einer Messung in Richtung einer zufälligeren Verteilung beeinflusst, weiterhin alle aufgenommenen Zellen betrachtet.

3.2 Die Rolle der Kinasen der Src-Familie bei zyklischer Dehnung

Fokaladhäsionen stellen die Verbindung zwischen dem Zellinneren und der EZM dar. An diesen Multiproteinkomplexen ist eine große Zahl von Proteinen beteiligt. Eine Vielzahl dieser Proteine ist über Phosphorylierung reguliert und insbesondere Tyrosinphosphorylierungen werden als einen zentralen Mechanismus in der Mechanosensorik vermutet [124]. Die Tyrosin-Phosphorylierung von Proteinen der FA wird hauptsächlich durch die Kinasen der Src-Familie (Src Family Kinases, SFK) reguliert. Von dieser Familie werden 3 Kinasen ubiquitär in allen Zelltypen exprimiert: Src, Yes und Fyn. Zur Untersuchung der Mechanosensorik in Abhängigkeit der Kinasen der Src-Familie wurden Dehnungsexperimente mit MEF-WT, -SYF und -Src++ sowie mit MEF-WT unter Einfluss eines SFK-Inhibitors durchgeführt.

3.2.1 Dehnungsexperimente an MEF-WT, -SYF und -Src++

Zur Untersuchung, ob die Phosphorylierung für die Wahrnehmung zyklischer Dehnung des Substrates notwendig ist, wurden Dehnungsexperimente mit MEF-WT, -SYF und -Src++ durchgeführt. Die Zellen wurden wie in 2.5.2 beschrieben in Kammern ausgesät und für 30 Stunden bei einer Frequenz von 24 mHz und einer effektiven Amplitude von 14 % gezogen. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit fluoreszent markiertem Phalloidin gefärbt und am Mikroskop aufgenommen. Für jede Zelle wurde die Hauptaktinorientierung bestimmt und die Häufigkeiten aller Orientierungen in einer Kammer betrachtet.

Abbildung 3.7 A zeigt die Orientierungen von MEF-WT-Zellen; in blau sind die Orientierungen von Zellen, die zyklisch gezogen wurden dargestellt. In grau die Kontrollzellen, die gleich kultiviert wurden ohne dabei Dehnung ausgesetzt gewesen zu sein. Während die Orientierung der Kontrollzellen eine gleichmäßige Verteilung über alle Winkel zeigte, wiesen die Zellen im Dehnungsexperiment eine deutlich stärkere Reorientierung in Richtung senkrecht zur Zugrichtung auf. Im Mittel lag der Median der Verteilung der Kontrolle bei 44° ($\sigma = 3^\circ$, $n = 1180$ Zellen aus 4 Experimenten) während die gezogenen Zellen einen Median von 71° ($\sigma = 4^\circ$, $n = 949$ Zellen aus 6 Experimenten) aufwiesen. Die Verteilungen von MEF-SYF sind in Abb. 3.7 B (grün) dargestellt. Der Median der Hauptaktinorientierung nach zyklischer Dehnung lag bei 57° ($\sigma = 2^\circ$, $n = 1729$ Zellen aus 6 Experimenten), der Median nicht gezogener Kontrollzellen bei 43° ($\sigma = 3^\circ$, $n = 820$ Zellen aus 2 Experimenten). Damit zeigten MEF-SYF-Zellen eine deutlich geringere Verschiebung zu höheren Winkeln als MEF-WT. In C ist das Ergebnis von MEF-Src++

¹Die Standardabweichung bezieht sich auf die Abweichungen der Mediane der Einzelexperimente

dargestellt, die mit einem Median von 64° ($\sigma = 3^\circ$, $n = 943$ Zellen aus 3 Experimenten) einen intermediären Effekt zu MEF-WT und -SYF zeigten. Die Kontrollzellen zeigten hier einen Median von 40° ($\sigma = 1^\circ$, $n = 575$ Zellen aus 3 Experimenten). In D sind alle drei Zelllinien vergleichend als kumulative Häufigkeitsverteilung in 1° Schritten dargestellt. Der Unterschied der drei Zelllinien wurde in dieser Darstellung deutlich. Die Orientierungsverteilungen aller drei Zelllinien unterschieden sich nach Dehnung signifikant (KS-Test, $p = 0,01$). Ebenso waren alle drei zu den jeweiligen Kontrollen verschieden, während zwischen den Kontrollen untereinander kein signifikanter Unterschied in der Verteilung festgestellt werden konnte.

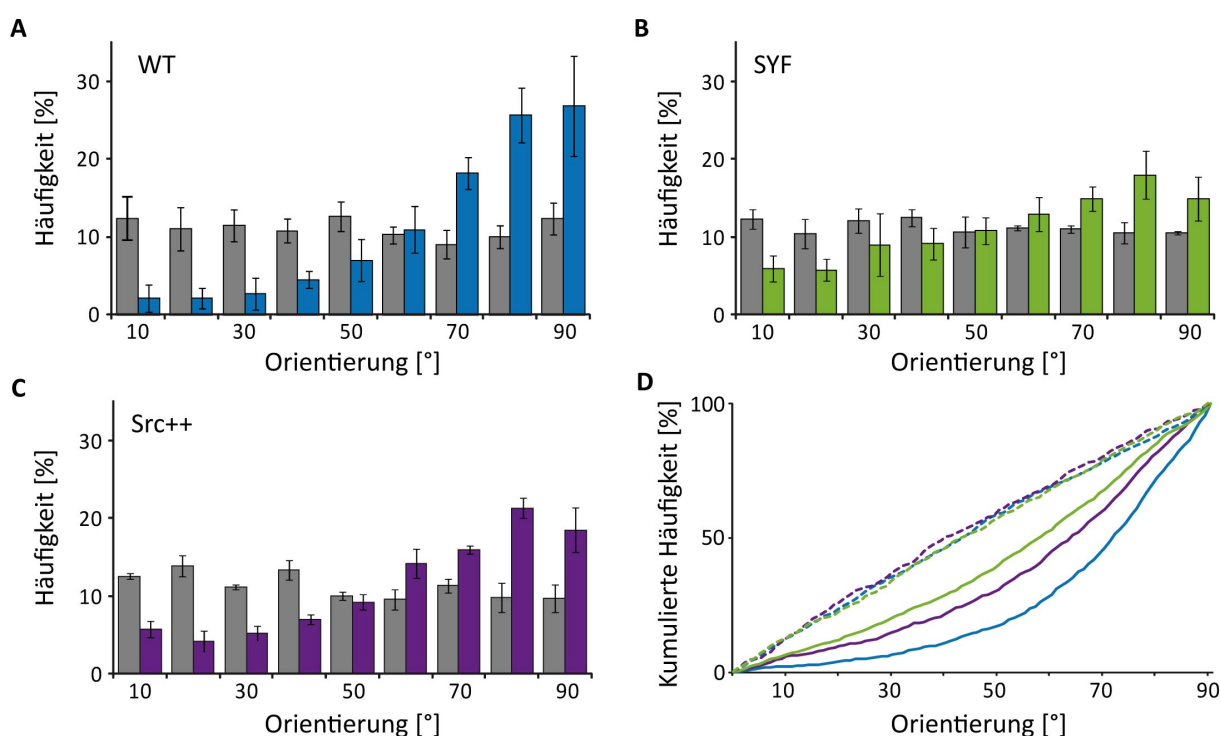


Abbildung 3.7: Zellorientierung von MEF-WT, -SYF und -Src++ nach zyklischer Dehnung. Die Rohdaten wurden während der Diplomarbeit erhoben und für die vorliegende Arbeit neu ausgewertet. A zeigt die Hauptaktinorientierungen von MEF-WT-Zellen (blau), B MEF-SYF (grün) und C MEF-Src++ (violett). In grau sind jeweils die Zellorientierung von nicht gezogenen Kontrollzellen dargestellt und in Farbe die Orientierungen von Zellen, die für 30 h bei 24 mHz zyklisch gezogen wurden. In D sind die Verteilungen als kumulierte Häufigkeiten zu sehen. Die Farben sind identisch zu A, B und C verwendet, wobei die Kontrollen jeweils als gepunktete Linie dargestellt sind.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Hauptorientierung am Zytoskelett bestimmt. MEF-Zellen haben oft Aktinorientierungen über alle Winkel, wobei eine Richtung dominiert und die Hauptausrichtung ergibt (siehe auch Abb. 3.3). Bei der Auswertung

anhand der Hauptaktinorientierung wurde nur die Hauptaktinorientierung berücksichtigt, während alle anderen Winkel vernachlässigt wurden sobald die Hauptausrichtung bestimmt worden war (siehe Abb. 2.2). Um sicher zu gehen, dass die zuvor gezeigten Differenzen in der Orientierung nicht artifiziell erzeugt werden, wurden zum Vergleich die Ausrichtungen aller gemessenen Aktinorientierungswinkel der Zellen verglichen. Hierfür wurden alle Winkel, die für die Zellen einer Fraktion in den verschiedenen Experimenten bestimmt wurden berücksichtigt. Zum besseren Vergleich und um nicht größere Zellen zu bevorzugen wurde die Fläche unter der Verteilung für jede Zelle auf 1 und die Zellen so normiert. In Abb. 3.8 sind die relativen Häufigkeiten der einzelnen Winkel als Gesamtverteilungen in 1° Intervallen (A) sowie über die Einzelexperimente gemittelt in 10° Intervallen² (B) dargestellt. Dadurch, dass in Zellen Winkelorientierungen in alle Richtungen vorkommen, fielen diese Verteilungen im Vergleich zur Verteilung der Hauptaktinorientierung flacher aus. Der Unterschied zwischen den Verteilungen von MEF-WT, -SYF und -Src++ blieb jedoch erhalten. MEF-WT zeigte einen deutlicheren Anstieg bei höheren Winkeln als MEF-SYF, während -Src++ weiterhin einen intermediären Effekt zeigte.

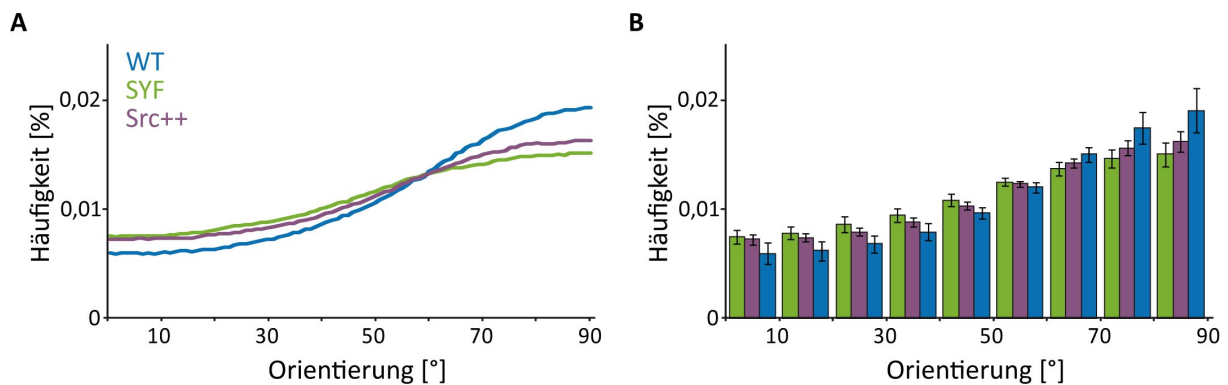


Abbildung 3.8: Häufigkeiten aller in der Auswertung bestimmter Winkel. In A ist die Gesamtverteilung von MEF-WT (blau, 5.246.552 Einzelorientierungen aus 6 unabhängigen Experimenten), MEF-SYF (grün, 11.489.497 Einzelorientierungen aus 6 Experimenten) und MEF-Src++ (violett, 5.559.342 Einzelorientierungen aus 4 Experimenten) dargestellt, in B die gemittelte Häufigkeit der Einzelexperimente sowie deren Standardabweichung.

Für eine Bestimmung der Orientierung über die Zellform wurden die Ellipsen der Zellen berechnet (siehe 2.5.2). Hierbei zeigte sich, dass MEF-WT nach 30 h zyklischer Dehnung von 24 mHz einen gemittelten Median von 61° ($n = 477$, Abb. 3.9) aufwies. Damit ist die Verteilung signifikant verschieden von Kontrollzellen, die einen Median von 39° ($n = 529$)

²Als Gesamtverteilung ist stets die Verteilung aller Zellen eines Genotyps bzw. einer Fraktion bezeichnet, während sich die gemittelte Häufigkeit auf die Einzelexperimente bezieht.

in einer etwa gleichmäßigen Verteilung über alle Winkel zeigten. Bei MEF-SYF war dagegen keine Abweichung von den Kontrollzellen zu erkennen, beide zeigten eine mediane Orientierung von 43° ($n = 461$ in der Kontrolle und 769 nach Dehnung). MEF-Src++ ließ gezogen mit einem Median von 47° ($n = 450$) im Vergleich zur Kontrolle von 40° ($n = 347$) eine Verschiebung zu höheren Winkeln erkennen, die signifikant verschieden war. Allerdings ist hier zu beachten, dass alle Kontrollen im Median deutlich unterhalb der zu erwartenden 45° lagen. Zudem fiel die Reorientierung der Zellform bei MEF-WT deutlich geringer aus als über die Bestimmung der Aktinorientierungen. Daher wurde in den folgenden Versuchen nur noch die Hauptaktinorientierung verwendet. In Abb. 3.9 B sind die Aspektverhältnisse der Ellipsen vor und nach zyklischer Dehnung dargestellt. Ein tendentieller Unterschied vor und nach zyklischer Dehnung ist nicht zu erkennen.

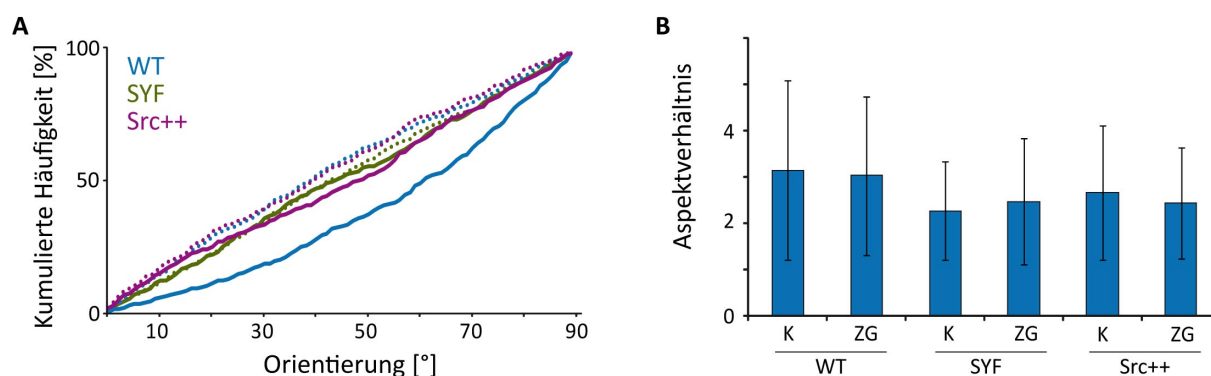


Abbildung 3.9: Gesamtzellorientierung der bestimmten Zellellipsen. A zeigt die Verteilungen der Orientierungen von MEF-WT, -SYF und -Src++ Zellen nach 30 h zyklischer Dehnung von 24 mHz und 14 %. Die jeweiligen nicht gedehnten Kontrollen sind als gepunktete Linie dargestellt. B zeigt die gemittelten Aspektverhältnisse der errechneten Ellipsen, K bezeichnet die Kontrollen und ZG die zyklisch gedehnten Zellen.

Zur Überprüfung der Streuung der Experimente wurden die Hauptaktinorientierungen der Einzelexperimente von MEF-WT in zwei Gruppen unterteilt. Die Experimente mit dem niedrigsten Median (WT min) wurden dabei zusammengefasst sowie die drei mit dem höchsten Median (WT max, siehe Abb. 3.10). Dabei zeigte der WT min einen Median von 69° und der WT max von 74° . Diese Differenz von 5° wurde nachfolgend als der Abschätzung des Fehlers durch die Streuung der Einzelexperimente angenommen, der maximal innerhalb einer Population bei zyklischer Dehnung von 24 mHz bei 30 h bestehen kann. Die Unterschiede im Median der Gesamtverteilung sind dabei zwischen MEF-WT, -SYF und -Src++ zueinander größer als die natürliche Variation innerhalb der MEF-WT Experimente.

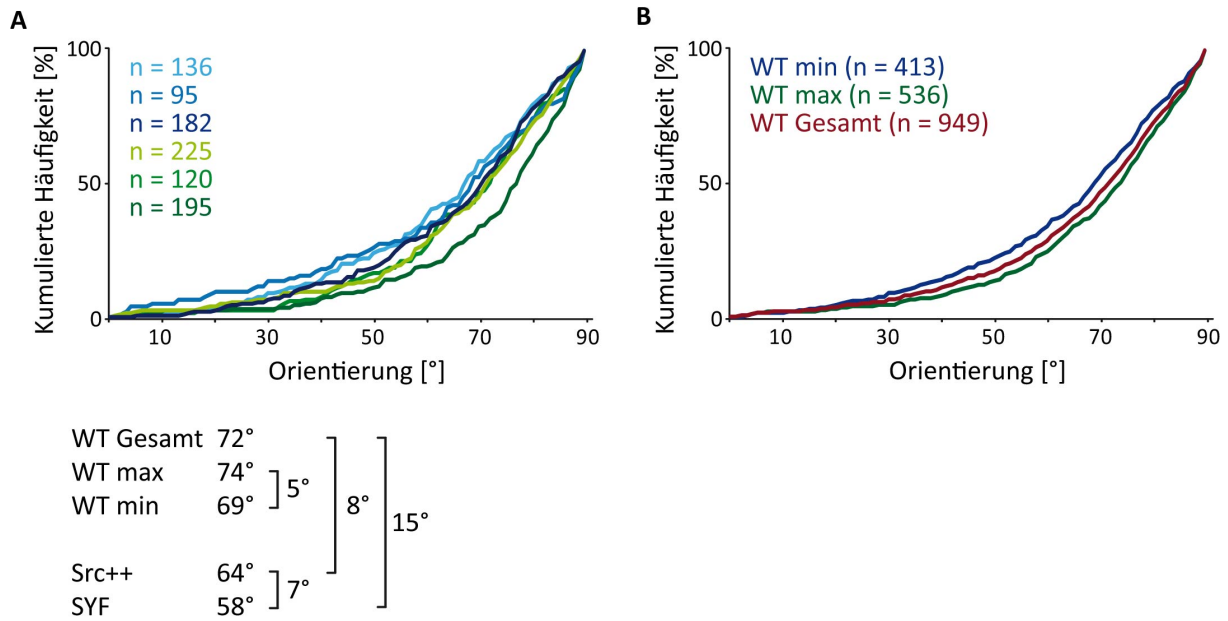


Abbildung 3.10: Kontrolle der Streuung der Experimente. A zeigt die Einzelergebnisse von MEF-WT. In B wurden die drei am schwächsten (WT min, blau) sowie die drei am stärksten reorientierten Verteilungen (WT max, grün) zusammengefasst und mit der Gesamtverteilung (WT Gesamt, rot) verglichen. Die Mediane der Verteilungen von MEF-WT min und max sowie die Gesamtverteilungen von MEF-WT ($n = 949$ Zellen aus 6 Experimenten), MEF-SYF ($n = 1729$ Zellen aus 6 Experimenten) und MEF-Src++ ($n = 943$ Zellen aus 3 Experimenten) sind darunter angegeben. Die Zahlen hinter den Klammern zeigen die Unterschiede.

Dehnungsexperimente mit höheren Frequenzen

Neben den Versuchen mit der relativ langsamen Frequenz von 24 mHz wurden auch Experimente mit höheren Frequenzen durchgeführt. Diese Experimente wurden etabliert um zum einen die Experimentdauer auf einen Tag zu reduzieren und zum anderen die Spannweite der Differenzen in der Reorientierung zu erhöhen. In Abb. 3.11 sind MEF-WT und MEF-SYF-Zellen dargestellt, die für unterschiedliche Zeiträume einer zyklischen Dehnung von 100 bzw. 130 mHz ausgesetzt waren. Dabei zeigte sich erneut, dass MEF-SYF kaum zu höheren Winkeln orientiert.

Die mediane Hauptaktinorientierung lag nach 2 h bei 57° ($n = 482$ Zellen), nach 4 h bei 53° ($n = 198$ Zellen) und nach 8 h bei 56° ($n = 292$ Zellen). Nach 16 h ließ sich mit einem Median von 63° bzw. 67° ($n = 308$ und 157 Zellen aus 2 Experimenten) eine leichte Erhöhung erkennen. Bei MEF-WT war dagegen mit einer medianen Hauptaktinorientierung von 72° nach bereits 1 h ($n = 422$ Zellen) eine deutlich stärkere Tendenz zu Winkeln senkrecht zur Zugrichtung zu erkennen. Nach 2 h war der Median um weitere 2° ($n = 252$ Zellen) höher, nach 4 h erneut bei 72° ($n = 243$ Zellen). Nach 8 h war die maximale Reorientierung zu erkennen, die sich in einem Median von 79° ($n = 268$ Zellen) zeigte. Nach

16 h war dieser mit 77° um 2° ($n = 377$ Zellen) niedriger, jedoch waren hier die Zellen in der Kammer bereits recht dicht gewachsen, was das Ergebnis beeinflussen haben könnte. Da sich keine eindeutige weitere Steigerung nach 8 h Dehnung erkennen ließ, wurde eine Reihe an nachfolgenden Experimenten bei 130 mHz für 8 h durchgeführt.

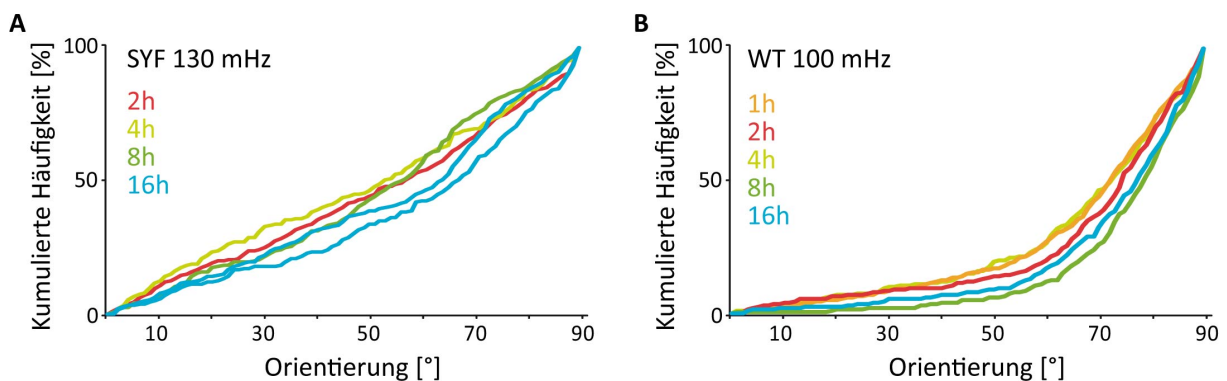


Abbildung 3.11: Hauptaktinorientierungen von MEF-WT und -SYF-Zellen bei 100 bzw. 130 mHz zyklischer Dehnung. Dargestellt sind die kumulierten Häufigkeiten von Einzelexperimenten. A zeigt MEF-SYF-Zellen bei einem zyklischer Dehnung von 130 mHz für eine Dauer von 2 h (rot), 4 h (hellgrün), 8 h (dunkelgrün) und 16 h (blau). In B sind MEF-WT-Zellen dargestellt, die bei 100 mHz für 1 h (orange), 2 h (rot), 4 h (hellgrün), 8 h (dunkelgrün) und 16 h (blau) gezogen wurden.

3.2.2 Kontrolle der Versuche durch SFK-Inhibitoren

Um zu untersuchen, ob die verminderte Umorientierung zu Winkeln senkrecht zur Zugrichtung auf die fehlenden Kinasen und nicht auf einen anderen Effekt zurückzuführen ist, wurden Kontrollexperimente mit Inhibitoren gegen die SFK durchgeführt. Hierfür standen zwei unterschiedliche Inhibitoren zur Verfügung: SU6656 sowie PP2. Als Kontrolle zu PP2 wurde zudem PP3 verwendet, das eine ähnliche Molekülstruktur jedoch ohne inhibierende Wirkung hat. Beide Inhibitoren wirken selektiv auf die SFK und sind damit in der Lage den MEF-SYF Phänotyp nachzuahmen [6].

Zur Überprüfung der inhibierenden Wirkung wurden MEF-WT-Zellen auf Glas kultiviert und dem Medium unterschiedliche Konzentrationen des Inhibitors zugegeben (siehe Abschnitt 2.1.4). Anschließend wurden die Zellen fixiert und gegen Phosphotyrosin (pY) gefärbt. In Abb. 3.12 sind MEF-WT-Zellen zu sehen, die mit 0, 10 und 100 μM PP2 behandelt wurden. Die Zellen sind dabei mit gleichen Einstellungen aufgenommen worden. Bei einer PP2 Konzentration von 10 μM (mittlere Zeile) war nur wenig Veränderung in der Phosphorylierung zu erkennen. Bei 100 μM dagegen zeigten die Zellen sowohl in phosphoryliertem Vinculin als auch in der Gesamtphosphorylierung ein schwächeres Signal.

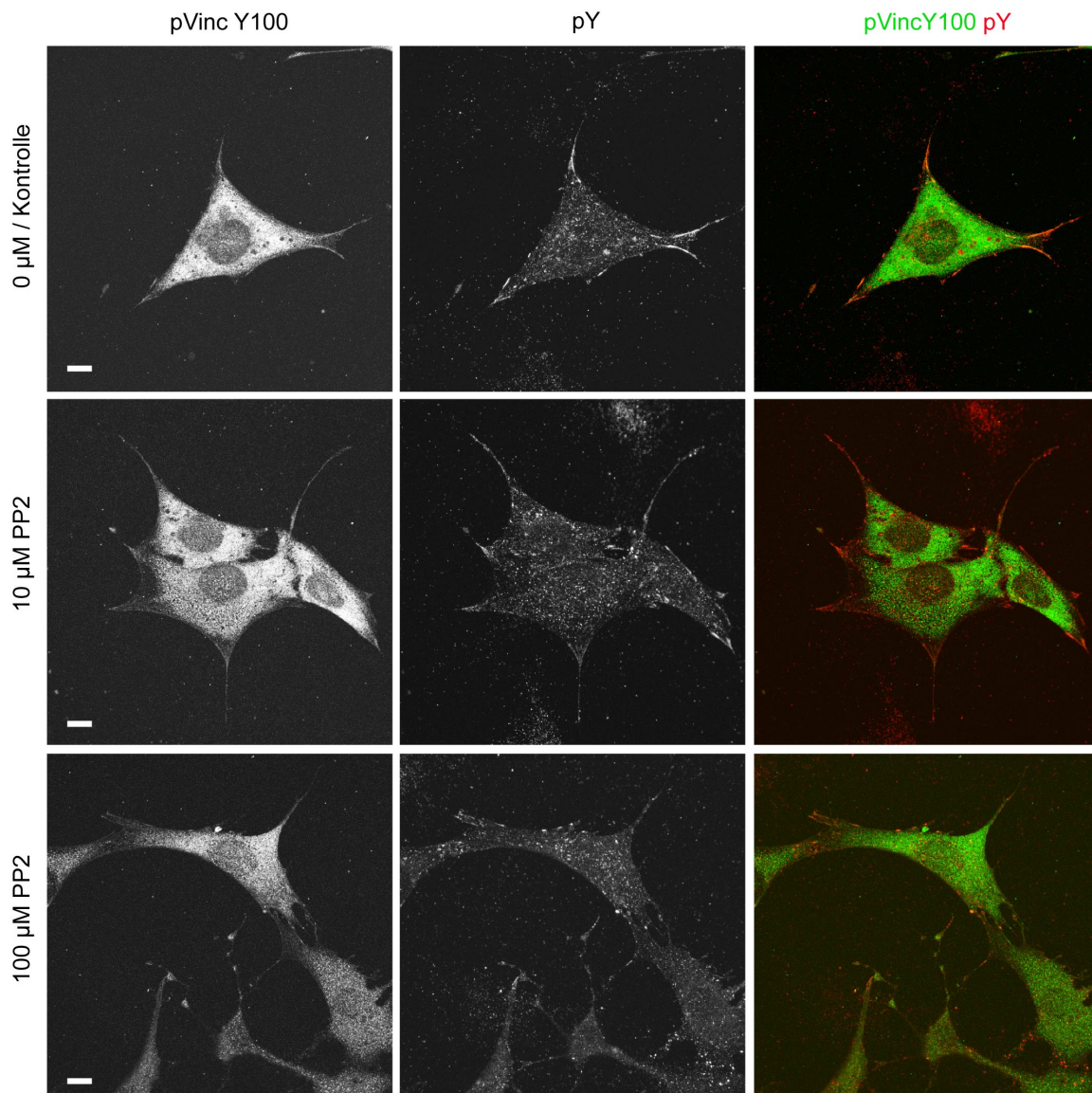


Abbildung 3.12: Auswirkungen verschiedener Konzentrationen von PP2 auf die Tyrosinphosphorylierung von MEF-WT-Zellen. MEF-WT-Zellen wurden auf Glas mit 0, 10 oder 100 μM PP2 versetztem DMEM - - kultiviert, fixiert und gleichzeitig gegen phosphoryliertes Vinculin (pVinc Y100, linke Spalte) und Phosphotyrosin (pY, mittlere Spalte) gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten für alle Zellen mit den gleichen Einstellungen. Maßstab = 10 μm .

Allerdings waren hier jeweils nur noch sehr wenige Zellen vital und adhärirt, was auf eine toxische Wirkung des Inhibitors bei höheren Konzentrationen hindeutet. Spätere Experimente mit 50 μM Inhibitor zeigten auf Glas ebenfalls eine stark reduzierte Anzahl an verbliebenen Zellen.

Parallel zu PP2 wurde auch SU6656 als Inhibitor getestet. Dieser war jedoch von einer leuchtend gelben Farbe, die im Mikroskop als grüne Eigenfluoreszenz die Aufnahmen zu sehr beeinflusste. Zusätzlich ließ sich durch die Färbung erkennen, dass der Inhibitor in

den Silikonkautschuk hinein diffundierte.

Die Wirkung von PP2 in einer Konzentration von 50 μM wurde unter Versuchsbedingungen erneut getestet. Dafür wurden Zellen in Elastomer-Kammern kultiviert, mit GFP-Vinculin transfiziert und das Medium für 30 h mit PP2 bzw. PP3 versetzt. Die auf Glas beobachtete Toxizität von PP2 bei 50 μM war in der Kammer nicht zu erkennen und diese Konzentration wurde für die Verzugsexperimente verwendet. Zur Kontrolle der Wirkung des Inhibitors wurden die FA anhand der Vinculin Färbung von Hand umrandet und über ImageJ die Intensität der Phosphotyrosin-Färbung bestimmt. Für PP2 konnte eine Reduktion der mittleren Intensität auf 72% bestimmt werden.

MEF-WT-Zellen wurden bei 24 mHz und 14% für 30 h gezogen und dem Medium 8 Stunden vor Zugbeginn sowie bei jedem Medienwechsel jeweils 50 μM PP2 bzw. PP3 zugegeben. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gefärbt und die Hauptorientierung bestimmt. In Abb. 3.13 sind die Hauptaktinorientierungen als relative (A) oder kumulierte Häufigkeit (B) zu sehen. PP2 (hellblau, $n = 105, 419$ und 436) zeigte dabei eine geringere Orientierung zu Winkeln senkrecht zur Zugrichtung als PP3 (dunkelblau; $n = 280$ und 298). Da mit PP3 nur zwei Experimente durchgeführt wurden, wurden diese nicht gemittelt sondern einzeln dargestellt. In B ist zusätzlich zum Vergleich noch MEF-WT (grau, siehe Abb. 3.7) mit dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass besonders in höheren Winkeln PP3 ebenfalls eine Abweichung zum unbehandelten MEF-WT zeigte. Die mediane Orientierung unter Einfluss von PP2 lag bei 65° ($\sigma = 3^\circ$) und unter Einfluss von PP3 bei 69° und 70° . Durch die Abweichung bei höheren Winkeln von PP3 zum MEF-WT zeigte der KS-Test nicht nur einen Unterschied in der Verteilung von PP2 zu PP3 sondern auch von PP3 zum MEF-WT.

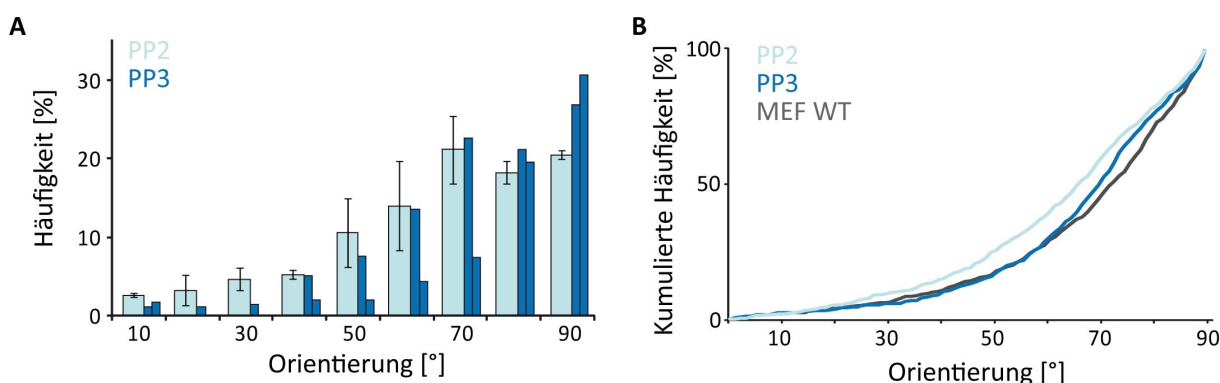


Abbildung 3.13: Orientierung von MEF-WT-Zellen unter Einfluss des Kinase-Inhibitors PP2 oder der Kontrollsubstanz PP3. In A sind die Häufigkeiten der Orientierung der gemittelten Experimente mit PP2 (hellblau) sowie die Einzelexperimente mit PP3 (dunkelblau) bei 30 h zyklischer Dehnung bei 24 mHz zu sehen. In B sind die kumulierten Häufigkeiten der Gesamtverteilungen sowie zusätzlich zum Vergleich noch die Verteilung von MEF-WT (grau, siehe Abb. 3.7) dargestellt.

3.3 Die Rolle von p130Cas bei zyklischer Dehnung

p130Cas ist ein in der FA verankertes Protein, das aufgrund seiner Eigenschaften als ein möglicher Mechanosensor für Dehnung diskutiert wird [101]. Im Folgenden wurde die Bedeutung von p130Cas, insbesondere von dessen Substratdomäne, für die Fähigkeit von Zellen, zyklischer Dehnung auszuweichen, untersucht. Hierzu wurden MEF-WT-Zellen mit siRNA gegen p130Cas transfiziert und zyklisch gezogen (siehe 2.5.2). Des Weiteren standen p130Cas-Knockout-Zelllinien zur Verfügung die mit drei verschiedenen Vektoren stabil transfiziert waren [38]: einem leeren Kontrollvektor, einer WT Variante von p130Cas sowie einem p130Cas-Konstrukt in dem alle 15 Tyrosine der Substratdomäne durch Phenylalanin ersetzt waren und die somit eine nicht-phosphorylierbare oder stille Form darstellte.

3.3.1 Knockdown von p130Cas mittels siRNA

Die Transfektion mit siRNA erfolgte über Metafectene (siehe Abschnitt 2.1.3) als Transfektionsreagenz. Zur Optimierung des Knockdowns wurden die Zellen zwei mal mit einem Abstand von 48 h transfiziert. Der Knockdown wurde sowohl auf Proteinebene über Western Blot (Abschnitt 2.3) als auch auf mRNA Ebene über quantitative RealTime PCR (qRT-PCR, Abschnitt 2.4) überprüft. In Abb. 3.14 ist die mittlere Proteinmenge dargestellt, wie sie 24 h nach der 2. Transfektion vorlag. Dabei konnte für p130Cas über siRNA Cas #1 eine mittlere verbliebene Proteinmenge von 38 % ($\sigma = 25\%$) und über siRNA Cas #3 von 26 % ($\sigma = 11\%$) im Vergleich zum Proteingehalt von Proben, die mit einer Negativkontroll-siRNA transfiziert wurden, ermittelt werden.

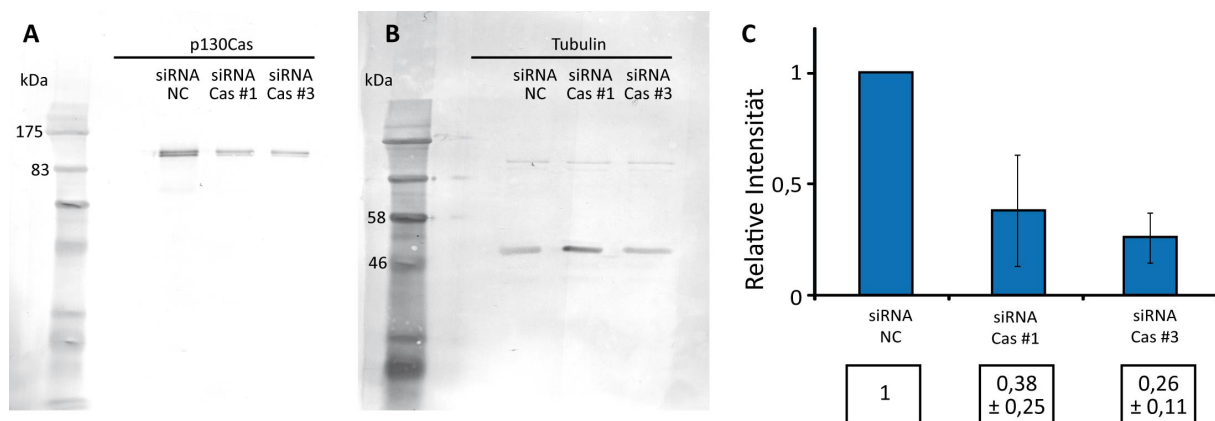


Abbildung 3.14: Relative Proteinmengen nach Transfektion mit siRNA gegen p130Cas. A zeigt einen Western Blot gegen p130Cas und B gegen Tubulin. C zeigt die relativen Intensitäten von p130Cas im Vergleich zur Intensität von Tubulin ($n = 3$), normiert auf die Negativkontrolle (siRNA NC). Die Isolationen fanden 24 h nach der 2. Transfektion statt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Danke an S. Born für die Western Blots.

In Abb. 3.15 ist die Proteinmenge nach Transfektion mit siRNA gegen p130Cas (siRNA Cas #3) im zeitlichen Verlauf dargestellt. Die Proteine wurden dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert und sofort in Loading Dye aufgekocht (siehe 2.3.1). Der Western Blot wurde gemeinsam für alle Proben durchgeführt. Die Negativkontrolle sowie der untransfizierte WT wurden zeitgleich mit dem 0 h Wert isoliert welcher dem Zeitpunkt zu Dehnungsbeginn, also 40 h nach der 2. Transfektion entspricht. Für den Wert "8 h" wurden die Zellen zusätzlich 8 h zyklischer Dehnung von 130 mHz ausgesetzt, dieser Zeitpunkt liegt 48 h nach der 2. Transfektion. Dabei war in der Proteinmenge noch kein Wiederanstieg zu sehen, zu beiden Zeitpunkten wurde eine Proteinmenge von 29 % im Vergleich zur Negativkontrolle (siRNA NC) bestimmt. Die Proteinmenge stieg zum Ende der Versuche, d.h. 70 h nach der 2. Transfektion bzw. nach 30 h zyklischer Dehnung von 24 mHz bei 14 % jedoch wieder an.

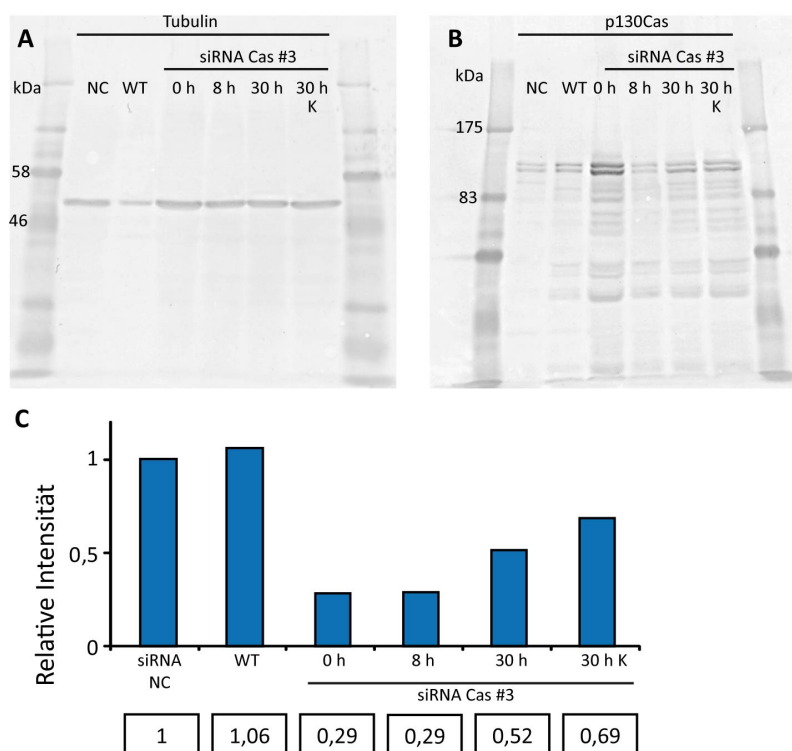


Abbildung 3.15: Proteinmenge von p130Cas zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Zellen wurden 24 h nach der 2. Transfektion in Elastomer-Kammern ausgesät und für 16 h kultiviert. siRNA NC, WT und 0 h wurden zeitgleich nach diesen 16 h isoliert. Die Werte bei 8 h und 30 h beziehen sich auf Proben, die zusätzlich noch für 8 bzw. 30 h zyklischer Dehnung ausgesetzt und anschließend isoliert worden waren. 30 h K wurde nicht gezogen sondern parallel im Inkubator gehalten und parallel mit 30 h isoliert. Alle Proben wurden direkt nach der Isolation in Loading Dye aufgekocht und der Western Blot zusammen durchgeführt. In A ist der Western Blot gegen Tubulin dargestellt und in B gegen p130Cas. C zeigt die relativen Intensitäten von p130Cas relativ zur Tubulin-Intensität. Normiert wurde auf die Negativkontrolle.

Zur Kontrolle der Effizienz der siRNA wurden zusätzlich quantitative RealTime-PCR Experimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde, nach Aussaat der gewünschten Zellzahlen in Elastomer-Kammern, die verbliebenen Zellen lysiert, die RNA isoliert und eine qRT-PCR durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4). Die verbliebene Menge von p130Cas mRNA lag im Mittel bei 23 % ($\sigma = 7\%$, $n = 3$, siRNA Cas #1).

Die Zellen in Kammern wurden wie vorher beschrieben für 30 h bei 14 % und 24 mHz gezogen und nachfolgend ausgewertet. In Abb. 3.16 sind die Häufigkeiten der Orientierungen von MEF-WT-Zellen zu sehen, die entweder mit siRNA gegen p130Cas oder mit einer Negativkontrolle transfiziert wurden. Letztere zeigten eine Orientierung zu höheren Winkeln, welche mit untransfizierten MEF-WT-Zellen vergleichbar war. Dagegen waren Zellen, die mit siRNA gegen p130Cas (siRNA Cas #1) transfiziert wurden, weniger reorientiert. Dies zeigte sich auch im Median, der für die durchgeführten Einzelerperimente mit 64° und 67° ($n = 465$ und 155 Zellen) geringer war als der von Zellen mit Kontroll-siRNA mit 71° und 72° ($n = 148$ und 156 Zellen). Die Gesamtverteilung der mit siRNA gegen p130Cas transfizierten Probe war signifikant verschieden zu den mit einer Negativkontrolle transfizierten.

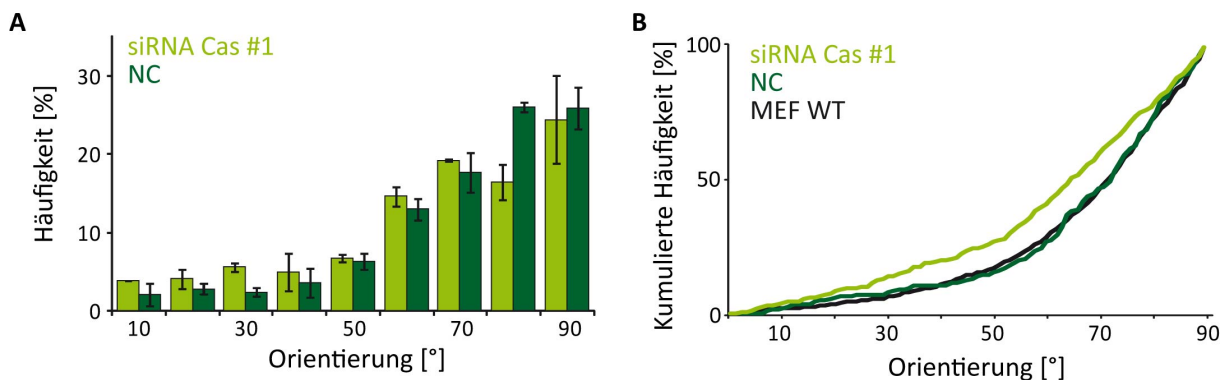


Abbildung 3.16: Orientierung von Zellen mit vermindertem p130Cas Gehalt. A zeigt die Hauptaktinorientierungen in 10° Intervallen von Zellen mit siRNA gegen p130Cas (hellgrün) und einer Negativkontroll-siRNA (dunkelgrün). B zeigt die kumulierten Häufigkeiten der Gesamtverteilung. Zum besseren Vergleich wurde auch MEF-WT (siehe Abb. 3.7) dargestellt.

Zur Kontrolle wurden aus den Daten die Verteilungen aller gemessener Aktinorientierungen bestimmt. Diese Verteilungen waren erneut breiter gestreut als die Auswertungen auf Basis einer Hauptorientierung. Abb. 3.17 zeigt, dass Zellen, die mit einer siRNA gegen p130Cas transfiziert wurden, eine flachere Verteilung bzw. weniger Orientierungen in Winkelbereichen senkrecht zur Zugrichtung aufwiesen als bei einer Transfektion mit einer Negativkontroll-siRNA.

Bei Zellen die mit 130 mHz für 8 h gezogen wurden zeigte sich ein geringfügig anderes Bild. In Abb. 3.18 sind die Häufigkeiten der Aktinorientierung von untransfizierten Zellen

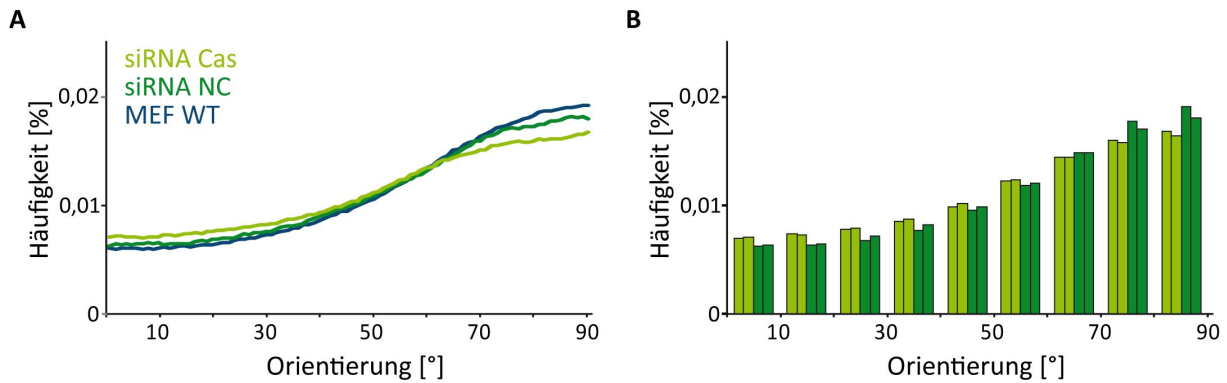


Abbildung 3.17: Auswertung der Orientierung aller gemessenen lokalen Aktinorientierungswinkel. In A sind die Gesamtverteilungen nach Transfektion gegen p130Cas (siRNA Cas #1, hellgrün, 2.549.789 Einzelwinkel, 2 unabhängige Experimente) bzw. einer Negativkontroll-siRNA (NC, dunkelgrün, 1.839.826 Einzelwinkel, 2 unabhängige Experimente) dargestellt. Zum Vergleich ist die Verteilung von MEF-WT mit angegeben (siehe Abb. 3.8). B zeigt die Häufigkeiten der Einzelexperimente .

sowie von Zellen, die mit siRNA gegen p130Cas (Cas #3) bzw. einer Negativkontrolle transfiziert wurden, dargestellt. Die verbleibende Menge an p130Cas RNA wurde in einer qRT-PCR bestimmt und lag in allen 4 Experimenten unter 22% im Vergleich zur Negativkontrolle. Die mediane Zellorientierung lag bei p130Cas Knockdown Zellen im Mittel bei 77° ($\sigma = 3^\circ$, $n = 437$ Zellen aus 4 Experimenten). Bei Transfektion mit einer Negativkontrolle lag der Median im Mittel bei 76° ($\sigma = 5^\circ$, $n = 412$ Zellen aus 5 Experimenten), wobei von den durchgeführten Experimenten 2 durch eine starke Abweichung auffielen; deren Median lag bei 68° ($n = 54$ Zellen) bzw. 82° ($n = 152$ Zellen). Untransfizierte MEF-WT-Zellen zeigten im Median eine Hauptaktinorientierung von 77° und 84° ($n = 116$ und 73 Zellen) und ebenfalls eine starke Varianz zwischen den Experimenten. Die Gesamtverteilungen zeigten keinen Unterschied zwischen Zellen nach Transfektion mit siRNA oder einer Negativkontrolle. MEF-WT wich davon leicht ab, ein signifikanter Unterschied der Verteilungen konnte jedoch nicht bestimmt werden (KS-Test). In 3.18 E sind in 10°-Intervallen die Histogramme der gemittelten Häufigkeiten sowie deren Standardabweichung dargestellt. Auch hier ließ sich keine Tendenz zu verringerter Reorientierung erkennen. Zu bemerken ist, dass die Experimente im Vergleich zu anderen Versuchen bei diesen Frequenzen stärker streuten (vergl. Abb. 3.7).

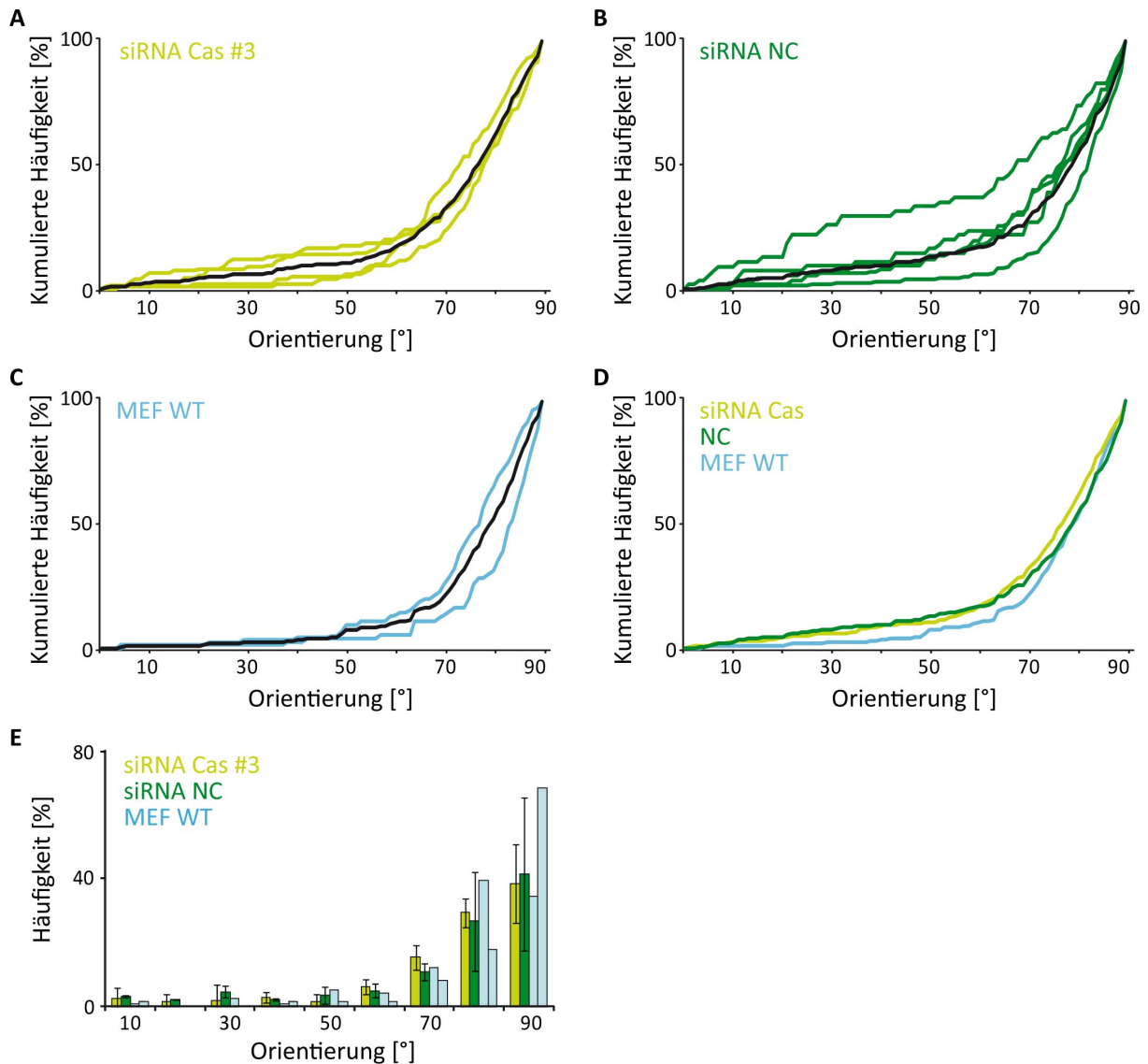


Abbildung 3.18: Zellorientierung bei 130 mHz von MEF-WT bei siRNA Transfektion gegen p130Cas. In A, B und C sind die kumulierten Häufigkeiten der Einzelexperimente (farbig) sowie die jeweilige Gesamtverteilung (schwarz) dargestellt. A zeigt die Verteilungen von Zellen, die mit siRNA gegen p130Cas (hellgrün, siRNA Cas #3) transfiziert wurden und B die Verteilungen nach Transfektion mit einer Negativkontroll-siRNA (dunkelgrün). C zeigt untransfizierte MEF-WT-Zellen (hellblau). In D sind die kumulierten Gesamtverteilungen der Messreihen im Vergleich dargestellt und in E die gemittelten Häufigkeiten sowie deren Standardabweichung in 10° Intervallen.

3.3.2 Charakterisierung der MEF-Cas $-/-$, -Cas-15F- und -Cas-WT-Zelllinien

Die MEF-Cas-Knockout-Zelllinie wurde aus Cas $-/-$ Mausembryonen in der Arbeitsgruppe H. Hirai (Faculty of Medicine, University of Tokyo, Japan) generiert unter der Leitung von S. K. Hanks (Vanderbilt University, Nashville, TN, USA) stabil mit Plasmiden transfiziert [55]. Dabei wurden drei Zelllinien erzeugt, die jeweils das gleiche Ausgangsplasmid mit unterschiedlichen p130Cas Varianten trugen. In MEF-Cas $-/-$ wurde außer GFP kein weiteres Protein exprimiert. In MEF-Cas-WT wurde zusätzlich zu GFP-p130Cas exprimiert und in MEF-Cas-15F eine mutierte Form von p130Cas, in der alle 15 Tyrosine der Substratdomäne durch Phenylalanin ersetzt sind [38].

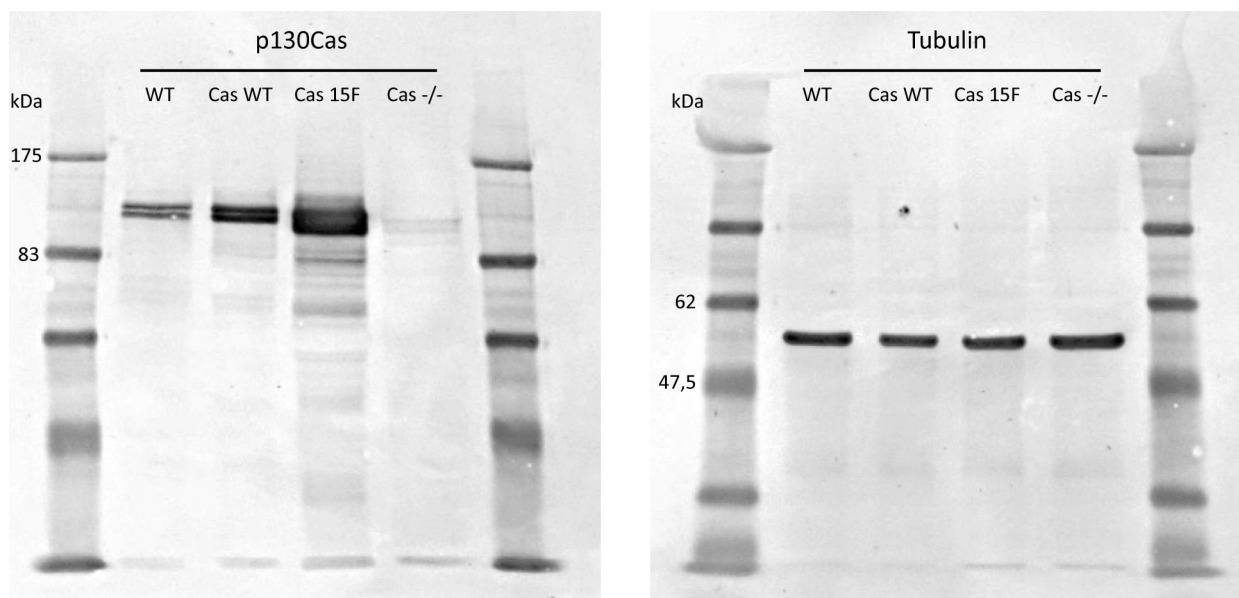


Abbildung 3.19: Western-Transfer Analyse der Cas Zelllinien. Links ist eine Färbung gegen p130Cas (125 kDa) dargestellt, rechts eine Färbung gegen Tubulin (55 kDa).

Zur Kontrolle, ob Zelllinien die Proteine korrekt exprimierten, wurden Western-Transfer-Analysen durchgeführt (Abb. 3.19). Dabei ist zu erkennen, dass in MEF-Cas-15F eine größere Menge p130Cas als in MEF-WT exprimiert wurde. In MEF-Cas-WT war die Expressionsmenge im Vergleich zu MEF-WT leicht erhöht. In MEF-Cas $-/-$ war eine leichte Restfärbung zu erkennen. Diese könnte auf eine Kreuzkontamination mit einer anderen Zelllinie oder aber eine Kreuzreaktion des Antikörpers mit anderen Isoformen von p130Cas hindeuten. Für letzteres spricht, dass sich die zu sehende Bande leicht unterhalb von p130Cas befand und sie im Laufe der Experimente nicht stärker wurde (Daten nicht gezeigt).

Alle drei Zelllinien exprimieren GFP, das jedoch nicht an die zu untersuchenden Proteine gekoppelt ist, zur Kontrolle der Transfektion. In Abb. 3.20 ist zu sehen, dass sich die GFP

Intensität stark zwischen einzelnen Zellen unterschied. Eine generell erhöhte Expression bei einer der Zelllinien war jedoch nicht auszumachen. In der gleichen Abbildung sind die FA anhand einer Vinculin-Färbung zu erkennen. Sie zeigten eine typische, längliche Morphologie und waren am Zellrand, insbesondere in den Ecken lokalisiert. Auch das Aktinzytoskelett zeigte bei keiner der drei Zelllinien eine auffällige Abweichung vom MEF-WT. Insgesamt waren die Zelllinien also für die Dehnungsexperimente gut geeignet.

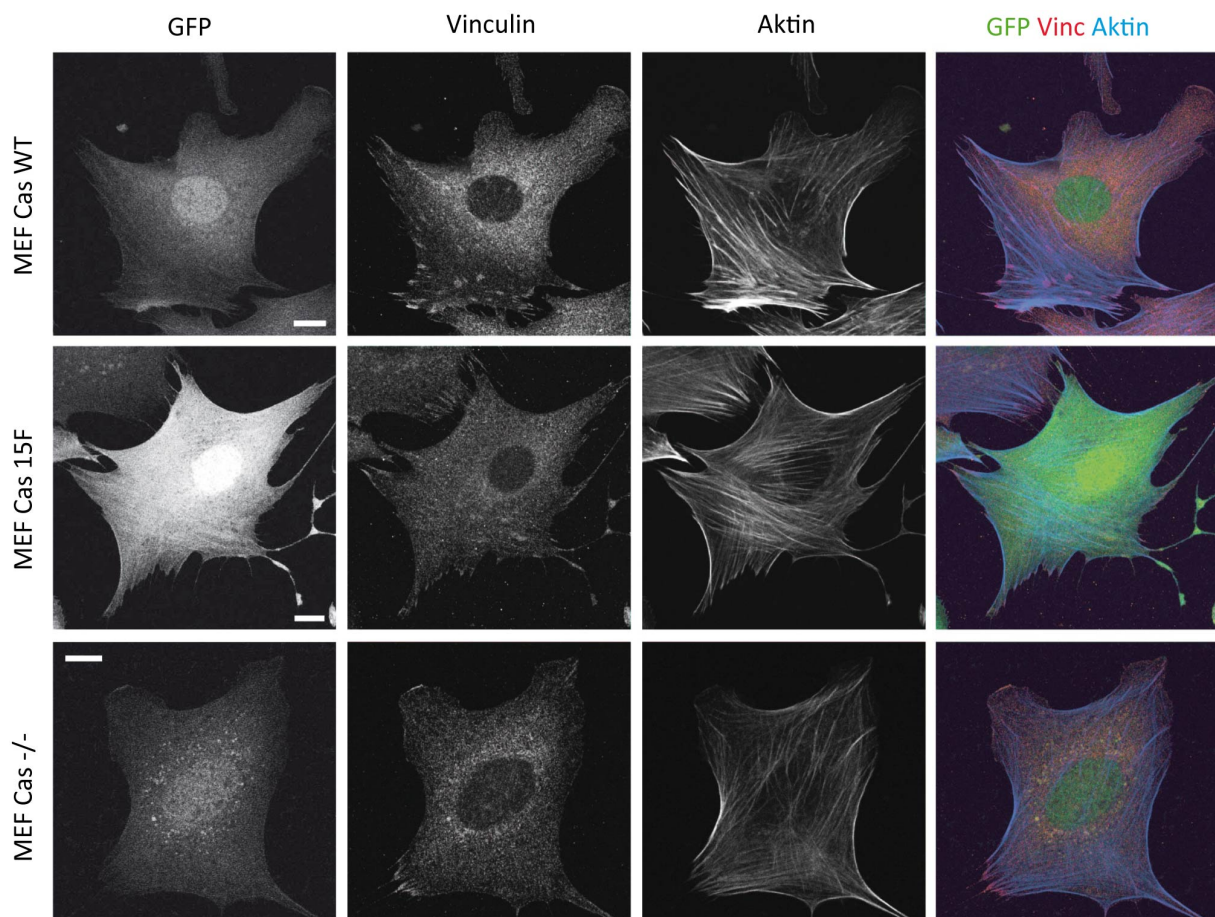


Abbildung 3.20: Immunfärbung von MEF-Cas-WT, Cas-15F und Cas -/- Zellen. Die Zellen wurden für die Färbung auf Glas kultiviert. Alle drei Zelllinien exprimierten ungekoppeltes GFP zur Kontrolle der stabilen Transfektion. Die Zellen wurden fixiert und anschließend gegen Vinculin (zweite Spalte) und Aktin (dritte Spalte) gefärbt. Rechts ist die Überlagerung der drei Färbungen dargestellt. Maßstab = 10 μ m.

3.3.3 Dehnungsexperimente mit MEF-Cas-WT, -Cas-15F und -Cas -/-

Die für diese Versuche verwendeten Zelllinien (MEF-Cas -/-, gelb, -Cas-15F, rot und -Cas-WT, grau) wurden wie MEF-WT kultiviert. Die Zellen wurden für 30 h bei 24 mHz und 14 % gezogen, anschließend fixiert, gefärbt und die Hauptaktinorientierungen ausgewertet (Abb. 3.21).

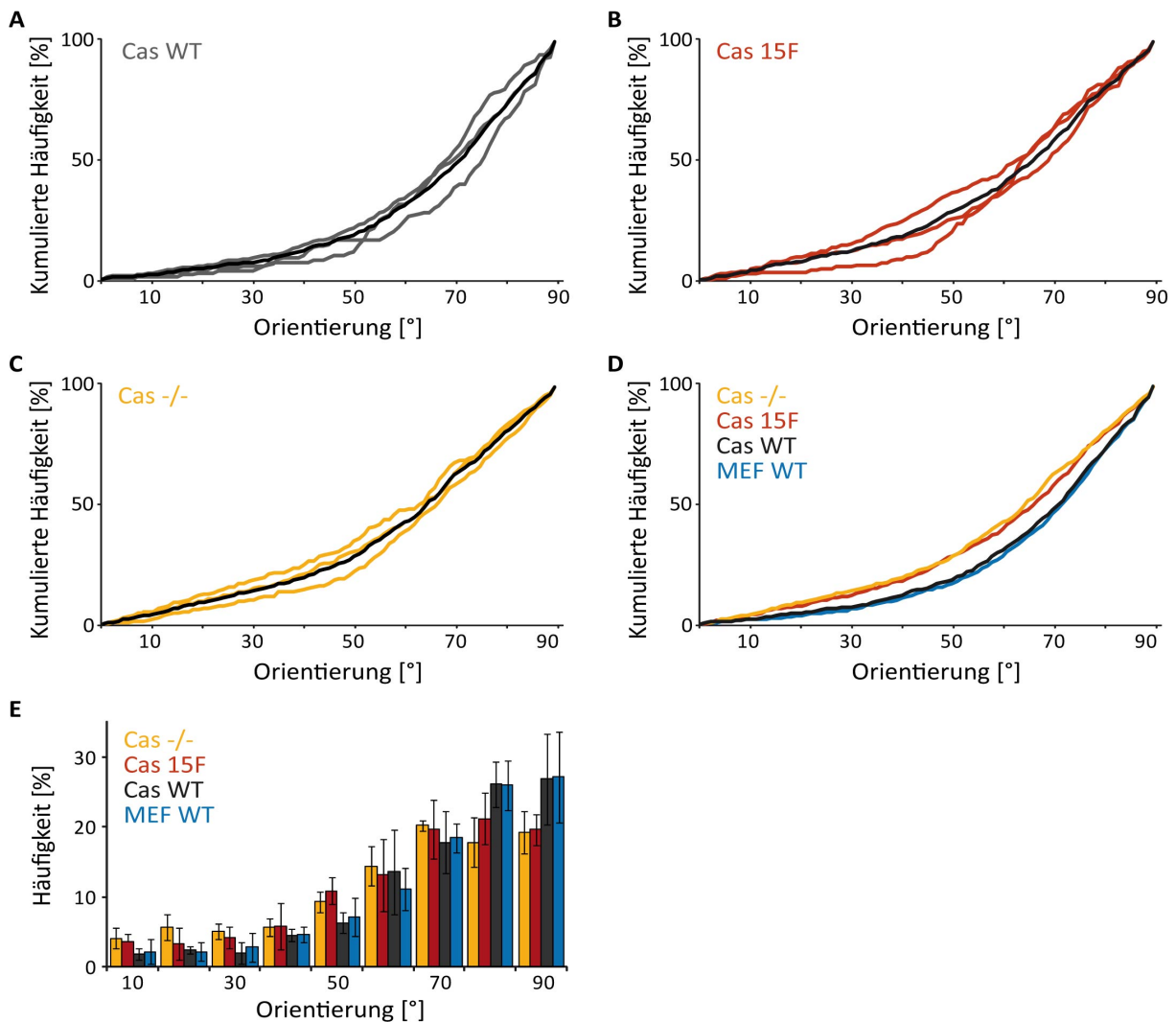


Abbildung 3.21: Vergleich der Orientierung von Zellen in Abhängigkeit von p130Cas. MEF-p130Cas-Knockout-Zellen die entweder einen leeren Kontrollvektor (Cas -/-, orange), eine WT-Variante von p130Cas (Cas-WT, grau) oder eine nicht phosphorylierbare Form von p130Cas (Cas-15F, rot) exprimierten wurden bei 24 mHz und 14 % für 30 h zyklisch gezogen. In A, B und C sind die kumulierten Häufigkeiten der Hauptaktinorientierungen der Einzelexperimente dargestellt wobei in schwarz jeweils die entsprechende Gesamtverteilung eingezeichnet ist. In D sind die Gesamtverteilungen vergleichend zusammen mit MEF-WT (siehe Abb. 3.7) dargestellt. In E sind in 10° Intervallen die gemittelten Häufigkeiten und deren Standardabweichung dargestellt.

In den kumulierten Häufigkeiten der Gesamtverteilung (Abb. 3.21 D) zeigte sich, dass MEF-Cas $-/-$ Zellen aber auch MEF-Cas-15F seltener als MEF-Cas-WT in Winkeln senkrecht zur Zugrichtung orientiert sind. Der gemittelte Median der Hauptaktinorientierung lag für beide Zelllinien bei 65° ($\sigma = 3^\circ$, $n = 736$ Zellen für MEF-Cas $-/-$ und $n = 742$ Zellen für MEF-Cas-15F aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten). MEF-Cas-WT dagegen war stärker zu Winkeln senkrecht zur Zugrichtung orientiert und zeigte einen entsprechend höheren gemittelten Median von 71° ($\sigma = 4^\circ$, $n = 627$ Zellen aus 3 Experimenten). Dieser lag somit gleich zu MEF-WT (siehe 3.2.1). MEF-Cas $-/-$ und $-$ Cas-15F unterschieden sich vom MEF-Cas-WT signifikant (KS-Test, $p = 0,05$), während zwischen ihnen kein signifikanter Unterschied festzustellen war.

Die Gesamtverteilungen sowie die gemittelten Einzelexperimente der Auswertung aller gemessenen Winkel sind in Abb. 3.22 dargestellt. Cas $-/-$ und Cas-15F zeigten beide eine im Vergleich zu Cas-WT verminderte Häufigkeit von Winkeln in Richtung senkrecht zur Zugrichtung.

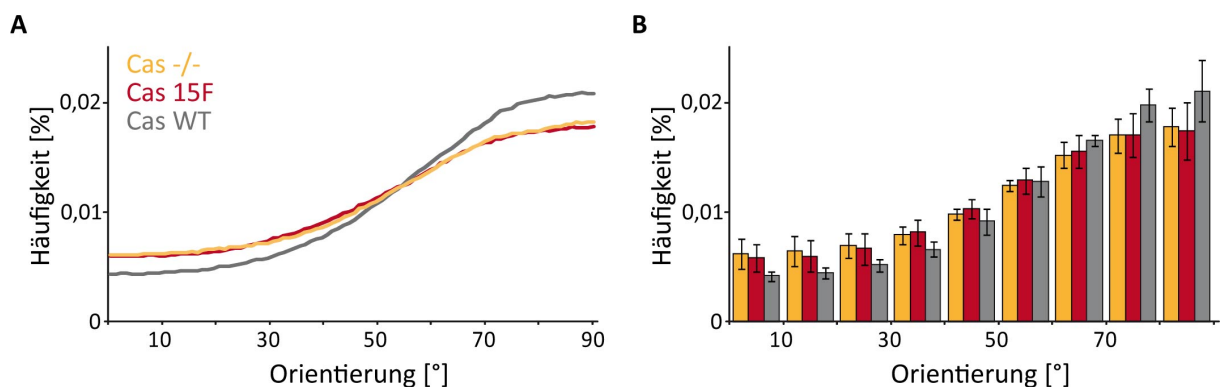


Abbildung 3.22: Auswertung aller gemessenen lokalen Aktinorientierungen von Cas $-/-$, Cas 15F und Cas WT. In A sind die Gesamtverteilungen aller gemessenen Winkel der angegebenen Zelllinien dargestellt. In gelb ist MEF-Cas $-/-$ (5.332.102 Einzelorientierungen aus 3 Experimenten), in rot MEF-Cas 15F (6.354.907 Einzelorientierungen aus 3 Experimenten) und in grau MEF-Cas WT (5.303.137 Einzelorientierungen aus 3 Experimenten) gezeigt. In B sind die gemittelten Häufigkeiten und deren Standardabweichungen dargestellt.

Zur Untersuchung des Einflusses der Frequenz auf die Reorientierung bei zyklischer Dehnung wurden MEF-Cas $-/-$ und $-$ Cas-WT für 8 h bei 130 mHz für 14 % gezogen. In Abb. 3.23 A sind die kumulierten Häufigkeiten von Einzelexperimenten dargestellt, die an zwei verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Der Median der Orientierung lag für MEF-Cas $-/-$ im ersten Experiment bei 51° ($n = 123$ Zellen) und 62° ($n = 146$ Zellen) und für Cas-WT bei 71° ($n = 145$ Zellen). Im zweiten Experiment zeigte MEF-Cas $-/-$ einen Median von 61° ($n = 104$ Zellen) und 69° ($n = 90$ Zellen) und MEF-Cas-WT von 78° ($n = 109$ Zellen). In beiden Versuchen zeigte MEF-Cas $-/-$ eine geringere Verteilung

zu höheren Winkeln als MEF-Cas-WT. Die Ergebnissen schwankten untereinander jedoch stark. In der Gesamtverteilung hat MEF-Cas -/- eine mediane Orientierung von 61° und Cas-WT von 75° . Für beide Versuchstage unterschieden sich die Verteilungen von MEF-Cas -/- im KS-Test signifikant von der Negativkontrolle, während zueinander kein Unterschied festzustellen war.

Insgesamt zeigte sich ein Einfluss von p130Cas auf die zelluläre Reorientierung, der in 4.3 ausführlich diskutiert wird. Um den weiteren Signalweg von p130Cas zu untersuchen, wurden Experimente mit dem Adapterprotein von p130Cas, Crk durchgeführt.

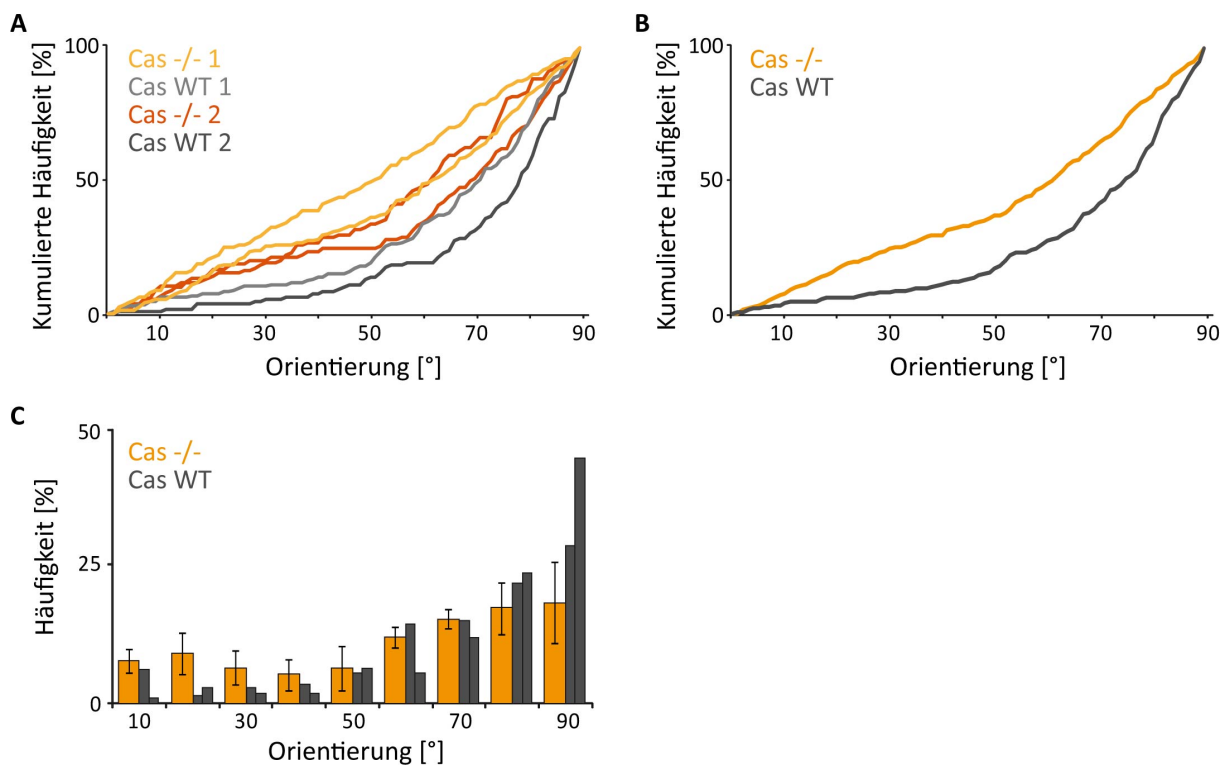


Abbildung 3.23: Hauptaktinorientierungen von MEF-Cas -/- und MEF-Cas-WT nach 8 h zyklischer Dehnung von 130 mHz und 14 %. MEF-Cas -/- ist jeweils in orange dargestellt, MEF-Cas-WT in grau. In A sind Experimente dargestellt, die an zwei unterschiedlichen Tagen aber mit gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt wurden. In B sind die Gesamtverteilungen von Cas -/- (orange, $n = 463$ Zellen aus 4 Experimenten) und MEF-Cas-WT (grau, $n = 254$ Zellen aus 2 Experimenten) als kumulierte Häufigkeit in 1° Schritten dargestellt. In C sind die Einzelexperimente von MEF-Cas WT und die gemittelten Einzelexperimente und deren Standardabweichung von MEF-Cas -/- als Histogramm in 10° Intervallen zu sehen.

3.4 Untersuchung der Rolle direkter und indirekter Bindungspartner von p130Cas in der Reorientierung

3.4.1 Crk

Crk ist ein direkter Bindungspartner von p130Cas, das in zwei Spleißvarianten (CrkI und CrkII) exprimiert wird. Ein zu 70 % homologes Protein (CrkL) wird von einem anderen Genlokus exprimiert [13]. Crk fungiert als Adapterprotein für eine Reihe weiterer Proteine, die in verschiedene Signalwege führen (siehe auch Abb. 4.1). Die Rolle von Crk und insbesondere die Unterschiede der zwei bekannten Isoformen sollten im Folgenden untersucht werden.

In der Arbeitsgruppe von T. Curran (The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, USA) wurden Crk und CrkL Knockout Mäuse hergestellt und drei MEF Zelllinien generiert [86]. Die MEF-Crk $-/-$ Zelllinie exprimiert zwar das Homolog CrkL, aber keine der beiden Isoformen CrkI und CrkII. MEF-CrkL $-/-$ dagegen exprimiert beide Crk Isoformen, jedoch nicht CrkL. Neben den Knockout Zelllinien wurde von T. Curran eine MEF-Crk-WT Zelllinie generiert, die alle drei Proteine unverändert exprimiert. Mit MEF-Crk-WT stand hier eine direkte Vergleichszelllinie zu MEF-Crk $-/-$ zur Verfügung, welche daher dem MEF-WT vorgezogen wurde. Alle drei Zelllinien wurden mir von T. Curran zur Verfügung gestellt. Zur Unterscheidung der Zelllinien wurden Western-Transfer-Analysen durchgeführt (Abb. 3.24).

Bei der Färbung gegen Crk waren beide Isoformen gut zu erkennen, CrkI als Einzelbande und CrkII als Doppelbande auf den zu erwartenden Höhen bei MEF-WT, -Crk-WT und -CrkL. MEF-Crk $-/-$ zeigte hier keine Bande. Die Färbung gegen CrkL zeigte bei MEF-WT, -Crk WT und -Crk $-/-$ eine deutliche Bande die bei MEF-CrkL $-/-$ fehlte. Diese Zelllinie wurde für die Versuche jedoch nicht verwendet und ist hier nur zur Vollständigkeit dargestellt.

Zur Untersuchung, ob Crk einen Einfluss auf die Reorientierung hat, wurden verschiedene Zugexperimente mit MEF-Crk $-/-$ und -Crk-WT durchgeführt. Die Zellen wurden sowohl mit einer Frequenz von 130 mHz für 8 h als auch bei einer Frequenz von 24 mHz für 30 h gezogen. In Abb. 3.25 sind die Ergebnisse der Einzelexperimente zu sehen. MEF-Crk-WT zeigte bei 24 mHz eine fast uniforme Verteilung über alle Winkel. Der Median lag mit 48° im Bereich von nicht ausgerichteten Zellen. Bei 130 mHz war eine leichte Verschiebung zu höheren Winkeln zu erkennen, die sich in einem etwas erhöhten Median von 58° ($\sigma = 1^\circ$, $n = 3$) zeigte. Da MEF-Crk-WT keine deutliche Orientierung zeigte war diese Zelllinie nicht als Kontrolle geeignet. Zudem zeigte MEF-Crk $-/-$ ein inkonsistentes

3.4 Untersuchung der Rolle direkter und indirekter Bindungspartner von p130Cas in der Reorientierung 63

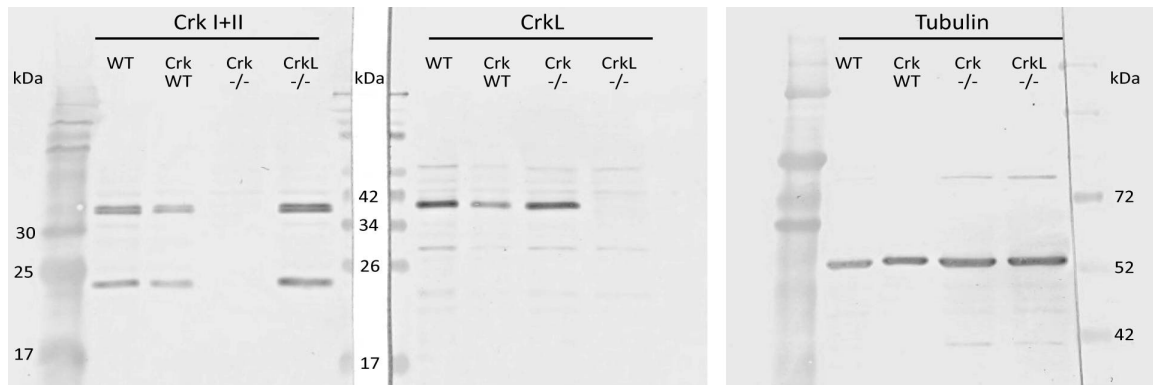


Abbildung 3.24: Western-Transfer Analyse der drei Crk Zelllinien. Es waren jeweils MEF-WT, -Crk WT, -Crk -/- und CrkL -/- aufgetragen. Der Blot auf der linken Seite wurde mit einem Antikörper inkubiert, der sowohl CrkI (28 kDa) als auch CrkII (40-42 kDa) detektiert. Der mittlere wurde mit einem Antikörper spezifisch gegen CrkL (39 kDa) und der rechte mit einem Antikörper gegen Tubulin (55 kDa) gefärbt. Es wurden zwei verschiedene Protein-Marker verwendet, wobei der linke Marker in der Färbung gegen Tubulin verwaschen und nicht mehr zuzuordnen war.

Bild. In den ersten durchgeführten Experimenten zeigte sich bei 24 mHz eine Verschiebung zu Winkeln senkrecht zur Zugrichtung. Zwei zeitgleich durchgeführte Experimente bei 130 mHz zeigten eine noch deutlichere Verschiebung zu höheren Winkeln. In späteren Versuchen ließ sich dieses Ergebnis jedoch nicht mehr reproduzieren, da die Zellen wie MEF-Crk-WT nur wenig Reorientierung zeigten. Über den Einfluss von Crk auf die Reorientierung war nach diesen Experimenten keine Aussage machbar.

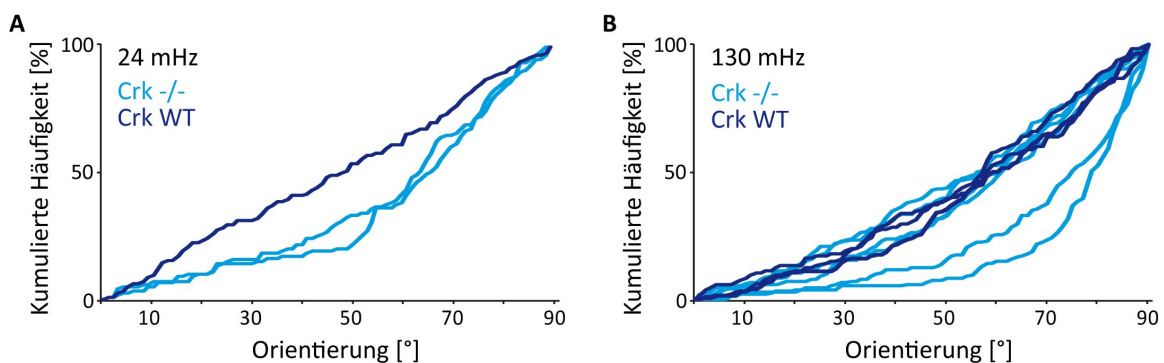


Abbildung 3.25: Orientierung von MEF-Crk -/- und MEF-Crk-WT-Zellen bei zyklischer Dehnung. Dargestellt sind die kumulierten Häufigkeiten der Einzelerperimente, MEF-Crk -/- in türkis und -Crk-WT in dunkelblau. Aufgrund der starken Abweichungen innerhalb der Zelllinien wurden die Verteilungen nicht gemittelt. In A sind die Orientierungen von Zellen dargestellt, die mit 24 mHz für 30 h gezogen wurden. MEF-Crk-WT enthält dabei 123 Zellen, MEF-Crk -/- 98 bzw. 119 Zellen. B zeigt die Orientierungen von Zellen, die mit 130 mHz für 8 h gezogen wurden. MEF-Crk-WT umfasst dabei jeweils 104 bis 173 Zellen in 3 Einzelerperimenten, MEF-Crk -/- 132 bis 221 Zellen in 6 Einzelversuchen.

3.4.2 Dock1

Dock1 (Dock180) ist ein Signalprotein, welches über Crk an p130Cas bindet [65]. Aktiviertes Dock1 ist in der Lage das Zytoskelett zu regulieren [13] und ist damit möglicherweise in der Signalweiterleitung der Erkennung von zyklischer Dehnung involviert. Um den Einfluss von Dock1 auf die Reorientierung von Zellen bei zyklischer Dehnung zu untersuchen, wurden MEF-WT-Zellen mit einer siRNA gegen Dock1 transfiziert. Die Transfektion wurde über qRT-PCR überprüft und es konnte eine Verminderung der Dock1 RNA Menge auf 16 - 26 % im Vergleich zur Transfektion mit Negativkontroll-siRNA erzielt werden. Bei den Dehnungsexperimenten war auffällig, dass nur wenige Experimente mit einer Transfektion gegen Dock1 auswertbar waren. Bei insgesamt 10 durchgeführten Experimenten waren nur 4 auswertbar, da sich die Zellen in den anderen 6 Experimenten abgelöst hatten ohne dass dafür ein experimenteller Grund gefunden werden konnte.

In Abb. 3.26 sind die Hauptaktinorientierungen aus den Dehnungsexperimenten bei 24 und 130 mHz dargestellt. Bei 24 mHz wurden zwei Experimente mit je einer Transfektion gegen Dock1 (Dock1 #1) sowie einer Negativkontrolle parallel durchgeführt. Der erste Versuch zeigte für Zellen, die mit siRNA gegen Dock1 transfiziert worden waren, eine mediane Ausrichtung von 70° ($n = 332$ Zellen) und für die Negativkontrolle von 66° ($n = 243$). Beim zweiten Versuch lag der Median nach Transfektion mit siRNA gegen Dock1 bei 72° ($n = 161$) und bei der Negativkontrolle bei 68° ($n = 177$). Alle Ergebnisse lagen im Bereich der zum Vergleich dargestellten bisherigen Versuche mit einer Negativkontroll-siRNA (3.26, B), die einen mittleren Median von 72° aufwies.

Bei 130 mHz zeigten die Zellen, die mit siRNA gegen Dock1 transfiziert wurden, eine deutlich stärkere Orientierung zu Winkeln senkrecht zur Zugrichtung als die parallel durchgeführte Negativkontrolle. Im Vergleich zu Kontrollen aus anderen Experimenten zeigte eine Transfektion mit siRNA gegen Dock1 jedoch keinen Unterschied. Dies spiegelte sich auch in den Medianen wieder, der für beide mit Dock1 #1 transfizierten Experimente bei 78° ($n = 357$ und 232 Zellen) lag. Für die parallel gezogene Negativkontrolle zeigte sich ein Median, der mit 71° ($n = 230$ Zellen) unter den bisherigen Negativkontrollen (79° , siehe Abb. 3.7) lag.

3.4 Untersuchung der Rolle direkter und indirekter Bindungspartner von p130Cas in der Reorientierung 65

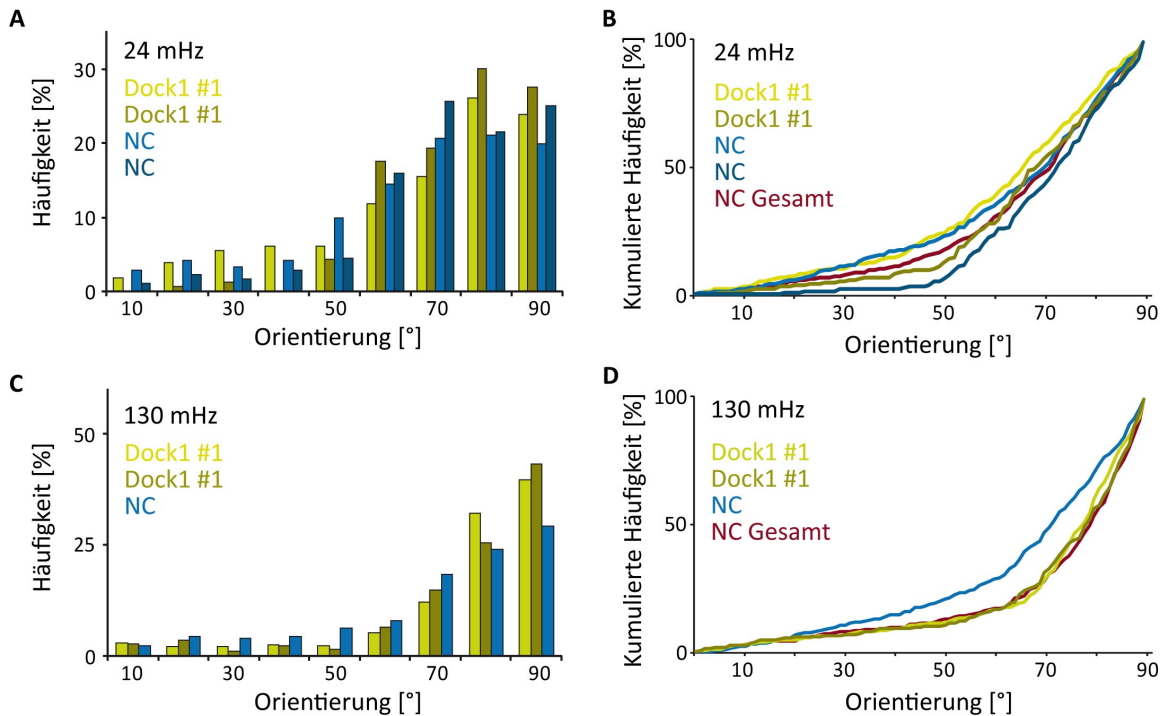


Abbildung 3.26: Zellorientierungen von MEF-WT-Zellen mit siRNA Transfektion gegen Dock1 nach zyklischer Dehnung. In A sind die Häufigkeiten nach 30 h bei 24 mHz zyklischer Dehnung dargestellt. Die Zellen wurden entweder mit siRNA gegen Dock1 (Dock1 #1, grün) oder der Negativkontroll-siRNA (NC, blau) transfiziert. Die Experimente bei 24 mHz teilen sich in zwei Versuchstage, wobei jeweils eine Transfektion mit siRNA gegen Dock1 parallel mit einer Negativkontrolle durchgeführt (jeweils farblich abgesetzt) wurde. Die Gesamtverteilung von bisherigen Negativkontrollen ist zum besseren Verständnis mit dargestellt (rot, NC Gesamt, siehe Abb. 3.16). C zeigt die Häufigkeiten der Zellorientierung nach Transfektion gegen Dock1 (grün) oder der Negativkontrolle (blau) bei einer höheren Frequenz (130 mHz, 8 h). In D ist zusätzlich die Verteilung von bisherigen Negativkontrolllexperimenten (NC Gesamt, siehe Abb. 3.18) dargestellt.

3.4.3 C3G

C3G ist ein Signalprotein, von dem beschrieben wurde, dass es an p130Cas binden kann [64]. Es ist, wie Dock1, ein GEF Protein welches jedoch die Aktivierung von Rap1 vermittelt. Zur Untersuchung, ob die zelluläre Reorientierung, ausgelöst durch das mechanische Signal der zyklischen Dehnung, über C3G vermittelt wird, wurden MEF-WT-Zellen mit siRNA gegen C3G transfiziert. Der Transfektionserfolg wurde über eine qRT-PCR bestimmt. Die RNA von C3G konnte über die siRNA C3G #5 auf 8 bis 24 % gesenkt werden, über C3G #6 auf 10 bis 34 %.

In Abb. 3.27 sind die Hauptaktinorientierungen von MEF-WT-Zellen, die mit siRNA gegen C3G transfiziert wurden dargestellt. Die Zellen wurden mit einer Amplitude von 14 % entweder bei 24 mHz für 30 h oder bei 130 mHz für 8 h gezogen. Alle in den Versuchen zu C3G bei 24 mHz ausgewerteten Kontrollen, die mit einer Negativkontroll-siRNA transfiziert worden waren, zeigten eine im Vergleich zu den bisher beschriebenen Kontrollen verminderte Reorientierung. Dies war jedoch in allen Fällen auf einen Ausfall des Dehnungsapparates und damit einer verkürzten Dehnungszeit zurück zu führen. Da aber die Versuche mit funktionaler und Negativkontroll-siRNA gleichzeitig im gleichen Gerät durchgeführt wurden galt diese verkürzte Dehnungszeit für alle Fraktionen und die Zellorientierungen waren untereinander vergleichbar. Beim Vergleich zeigte sich jedoch kein eindeutiger Unterschied in der Reorientierung zwischen den mit siRNA gegen C3G oder einer Negativkontrolle transfizierten Zellen. Nach Transfektion mit siRNA C3G #5 lag die gemittelte mediane Zellorientierung bei 63° ($\sigma = 2^\circ$, $n = 547$ Zellen aus 6 Einzelexperimenten), nach Transfektion mit C3G #6 bei 68° ($\sigma = 2^\circ$, $n = 501$ Zellen aus 4 Experimenten) und nach Transfektion mit einer Negativkontrolle bei 65° ($\sigma = 1^\circ$, $n = 381$ Zellen aus 3 Experimenten).

Bei Versuchen mit 130 mHz zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier wurden jeweils nur 2 Experimente pro siRNA durchgeführt. Dabei zeigte die Negativkontrolle eine sehr starke Schwankung (siehe Abb. 3.27 C). Die Mediane der Zellorientierungen lagen hier für C3G #5 bei beiden Experimenten bei 77° ($n = 159$ bzw. 369 Zellen), für C3G #6 bei 75° und 76° ($n = 257$ bzw. 202 Zellen) und für die Negativkontrolle bei 71° und 81° ($n = 248$ bzw. 239 Zellen). Eine eindeutig veränderte Verteilung der Ausrichtungen ließ sich somit nicht beobachten.

3.4 Untersuchung der Rolle direkter und indirekter Bindungspartner von p130Cas in der Reorientierung 67

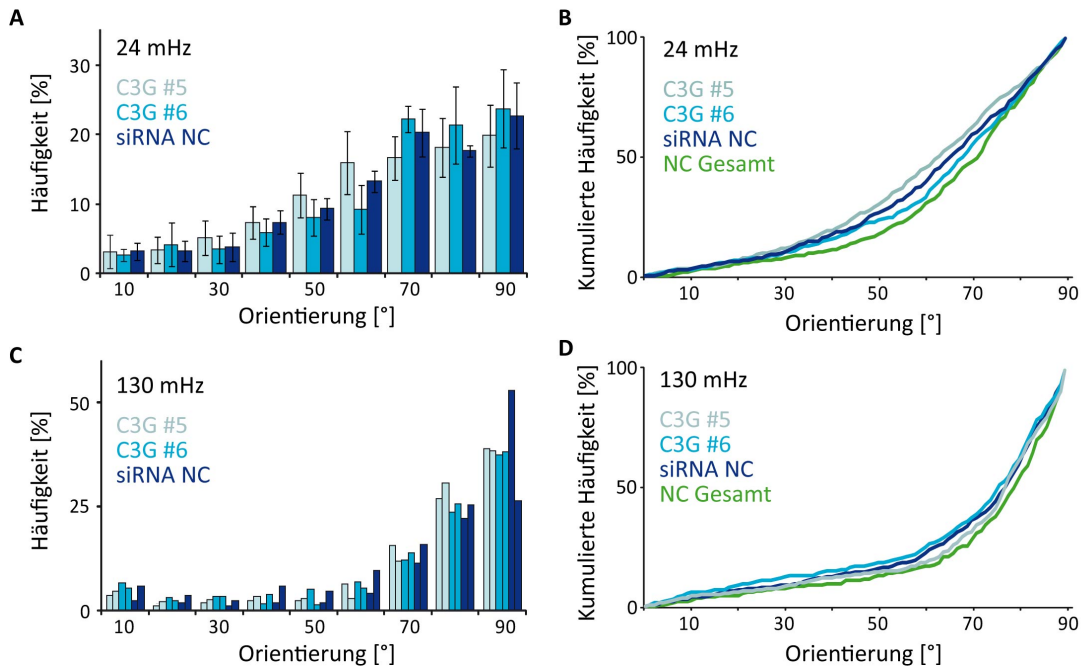


Abbildung 3.27: Hauptaktinorientierung von MEF-WT-Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen C3G. A zeigt die gemittelten Häufigkeiten sowie die Standardabweichung von Einzelexperimenten mit MEF-Zellen nach 30 h zyklischer Dehnung mit 24 mHz, B die kumulierten Häufigkeiten der Gesamtverteilungen. Die verwendeten siRNAs sind C3G #5 (hellblau) und C3G #6 (blau) und die Negativkontrolle (dunkelblau). In grün ist die Negativkontrolle aus Abb. 3.16 mit dargestellt. In C sind die Histogramme der Einzelexperimente von Zellen, die mit 130 mHz für 8 h gezogen wurden, dargestellt; je zweimal C3G #5 in hellblau, C3G #6 in blau und die Negativkontrolle in dunkelblau. In D sind die kumulierten Häufigkeiten der Gesamtverteilungen dargestellt. In grün ist die Negativkontrolle anderer Experimente (siehe Abb. 3.18) dargestellt.

3.4.4 Abl1

Im folgenden Experiment sollte der Einfluss einer erhöhten Menge aktivierten Crks auf die Orientierung untersucht werden. Hierfür wurde die Abl1 Kinase, die Crk phosphoryliert und damit für die Signalwirkung inaktiviert, über siRNA herunterreguliert. Eine Verminderung von Abl1 sollte in einer verminderten Phosphorylierung von CrkII und damit in einer stärkeren Aktivierung und Bindung an p130Cas resultieren.

MEF-WT-Zellen wurden mit zwei verschiedenen siRNAs (Abl1 #1 und #2) sowie einer Negativkontroll-siRNA transfiziert und die Reduktion der Abl1-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich, dass nur die siRNA Abl1 #2 eine relative Reduktion der Abl1 RNA-Menge um 80 % im Vergleich zur Negativkontrolle bewirkt hat, Abl1 #1 zeigte mit 87 % verbleibender RNA-Menge nahezu keine Funktionalität. Des wegen wurden die damit durchgeführten Experimente verworfen.

In Abb. 3.28 sind die Hauptaktinorientierungen dargestellt. Eine Abweichung im Grad

der Orientierung war nicht zu erkennen, was sich auch in den Medianen der Zellorientierung widerspiegelte. Die Mediane der Einzelexperimente von Abl1 #2 lagen bei 68° bzw. 71° ($n = 259$ und 172). Die zeitgleich getestete Negativkontrolle siRNA zeigte Mediane von 69° bzw. 70° ($n = 211$ und 213). Für MEF-WT wurde eine mediane Orientierung von 71° ($\sigma = 4^\circ$) gefunden. Der KS-Test zeigte keinen Unterschied zwischen den Verteilungen.

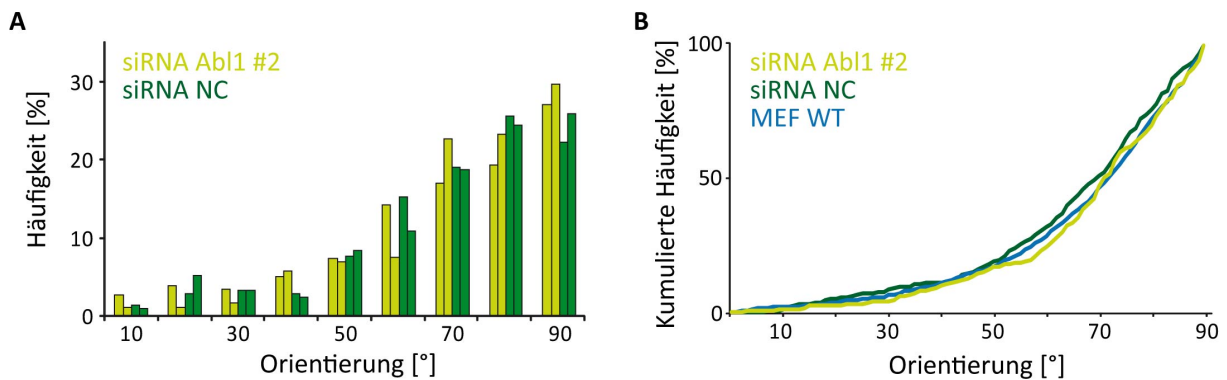


Abbildung 3.28: Zellorientierung nach Transfektion mit siRNA gegen Abl1 bei 30 h zyklischer Dehnung bei 24 mHz. In A sind die Häufigkeiten der Zellorientierungen von Zellen dargestellt, die mit Abl1 #2 (hellgrün) oder der Negativkontrolle (dunkelgrün) transfiziert worden waren. In B sind die kumulierten Häufigkeiten der Gesamtverteilungen dargestellt. Zum besseren Vergleich wurden MEF-WT-Zellen (blau, siehe Abb. 3.7) mit dargestellt.

3.5 Die Rolle von Vinculin bei zyklischer Dehnung

Vinculin ist ein zentrales Strukturprotein der FA, das durch Phosphorylierung oder Bindung von Liganden aktiviert wird [126]. Zur Untersuchung, ob Vinculin an der Reorientierung von Zellen bei zyklischer Dehnung beteiligt ist, wurde eine Vinculin Knockout Zelllinie (MEF-Vinc $-/-$) verwendet. Die Zelllinie wurde zusammen mit einer MEF-WT Zelllinie (MEF-WT-V) durch die W. Goldmann (Universität Erlangen-Nürnberg) zur Verfügung gestellt. Die MEF-WT-V zeigte allerdings bereits in den Kulturschalen eine ungewöhnliche Morphologie, die eine Vergleichbarkeit mit dem bisher verwendeten WT in Frage stellte. Dehnungsexperimente an dieser Zelllinie waren nicht auswertbar (siehe Abb. 3.29). Die Zellen saßen vereinzelt und wiesen eine auffällige Morphologie auf. MEF-Vinc $-/-$ Zellen zeigten typische FA, waren in der Lage zu adhären und zeigten eine MEF-typische Morphologie.

Die Zellen wurden mit 24 mHz bei 14 % für 30 h gezogen und ausgewertet (siehe Abb. 3.30). Die Zellen zeigen dabei eine flache Verteilung und nur wenig Verschiebung zu höheren Winkeln. Der Median lag für die beiden Einzelexperimente bei 54° bzw. 58° ($n = 144$

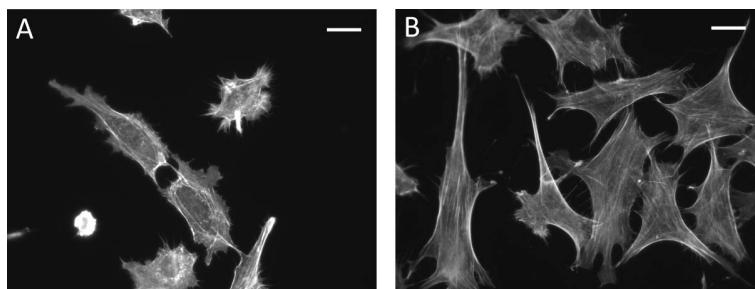


Abbildung 3.29: Beispielaufnahmen von MEF-WT-V und -Vinc -/- nach zyklischer Dehnung. In A ist die Morphologie von MEF-WT-V zu sehen. Die Zellen sind kleiner und runder als Vinc -/- in B. Diese zeigten eine mit MEF-WT (siehe Abb. 3.1) vergleichbarere Morphologie. Maßstab = 10 µm.

und. 130 Zellen) und damit deutlich unterhalb aller anderen getesteten Zelllinien. Die Experimente stellen einen interessanten Ansatz dar, jedoch müssen für eine Aussage über die Beteiligung von Vinculin an der Reorientierung weiterführende Experimente durchgeführt werden.

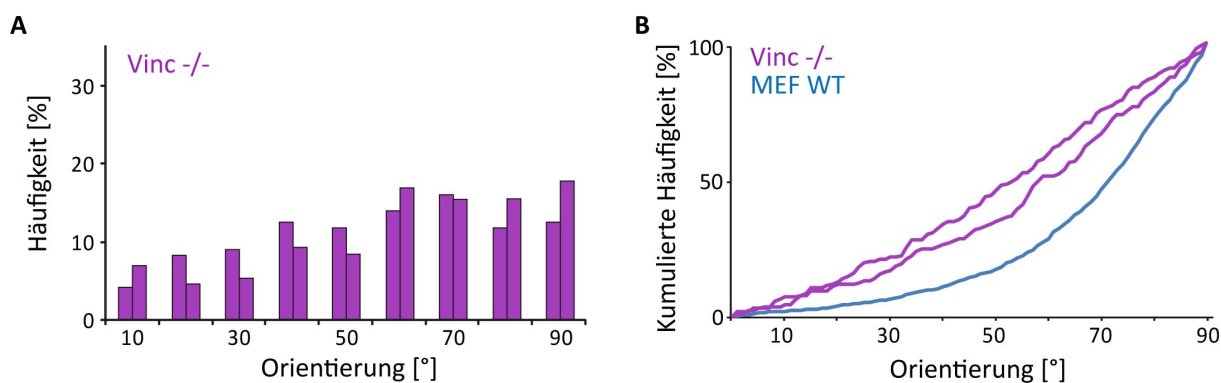


Abbildung 3.30: Orientierung von Vinculin Knockout Zellen nach zyklischer Dehnung. MEF-Vinc -/- Zellen wurden für 30 h bei 24 mHz gezogen und die Hauptaktinorientierungen bestimmt. In A sind die relativen und in B die kumulierten Häufigkeiten dargestellt. Zum Vergleich wurde MEF-WT (blau, siehe Abb. 3.7) mit dargestellt.

3.6 Phosphorylierungsmuster einzelner Proteine bei zyklischer Dehnung

Die Analyse der Phosphorylierungsmuster ist eine andere Möglichkeit zur Untersuchung der bei einem mechanischen Reiz wie zyklischer Dehnung aktivierten Signalwege. Viele Proteine wie z.B. p130Cas oder Paxillin befinden sich regulär in einem inaktiven Zustand und werden erst bei Bedarf durch Phosphorylierung aktiviert. Die Menge eines phosphorylierten Proteins im Verhältnis zur Menge des nicht-phosphorylierten Proteins kann damit auf die Aktivierung eines Signalweges hinweisen.

Um zu überprüfen, ob sich eine Erhöhung der Phosphorylierung von Proteinen im p130Cas Signalweg zeigen lässt, wurden eine Reihe von Western-Transfer-Analysen durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür in Kammern (100.000 Zellen/Kammer) kultiviert und wie in 2.5.2 beschrieben gedehnt. Nach der Dehnung wurden die Proteine in Anwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren zügig lysiert und nach Auftrennung und Färbung quantifiziert (siehe 2.3)

Die Etablierung und Optimierung der Versuche und die Analyse der Phosphorylierungsstärke bestimmter Proteine in Podozyten, humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) bzw. humanen Nabelschnurfibroblasten wurden von Tim Feichtmeier im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit³ durchgeführt und das erstellte Protokoll von mir auf die MEF-Zellen übertragen.

3.6.1 Phosphorylierung von Erk1/2 in Podozyten nach zyklischer Dehnung

Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen wurden Vorexperimente an Podozyten durchgeführt, von denen bekannt war, dass ein Anstieg der Phosphorylierung der Erk1/2 Proteine als Reaktion auf zyklische Dehnung beobachtet werden kann [32]. Die Versuchsbedingungen an unserem Institut wurden so weit wie möglich den beschriebenen angepasst. Die Zellen wurden daher zwischen 0 und 20 min bei 0,2 Hz und 24,9% gezogen. Zusätzlich wurden die Zellen 3 h vor den Versuchen in serumfreiem Medium gehalten. In Abb. 3.31 sind die Western Analysen⁴ dieser Experimente zu sehen. Gefärbt wurde mit einem Antikörper gegen Erk1/2 (A) und einem Antikörper, der speziell die phosphorylierte Form (pErk1/2 T202/Y204, B) erkennt. Die Intensitäten der Banden wurden quantifiziert und sind in C dargestellt. In diesem Versuch ist bereits nach 2 min ein Anstieg der Phosphorylierung zu erkennen die bei 5 min ihr Maximum erreicht und bei 20 min wieder

³Tim Feichtmeier, Etablierung von Phosphorylierungsanalysen an Adhäsionsproteinen tierischer Zellen unter zyklischer Dehnung, Bonn 2010

⁴Die Western Blots sind der Bachelorarbeit von Tim Feichtmeier entnommen.

absinkt.

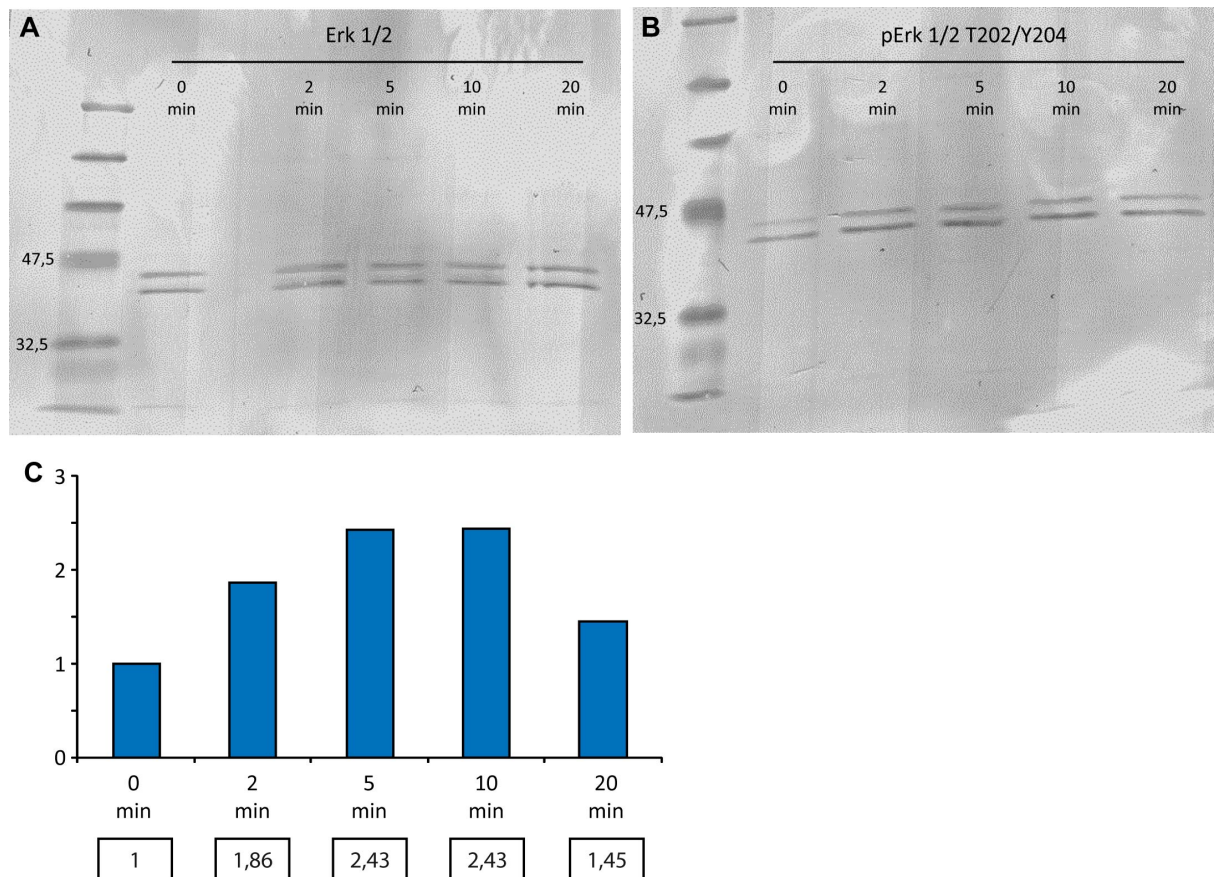


Abbildung 3.31: Western-Transfer Analyse der Phosphorylierung von Erk1/2 bei zyklischer Dehnung. Die verwendeten Podozyten wurden zwischen 0 und 20 min gezogen. A zeigt eine Färbung gegen Erk1/2 (44 und 42 kDa), B eine gleichzeitige Färbung gegen phosphoryliertes Erk1/2. In C ist die Quantifizierung von pErk1/2 im Verhältnis zu Gesamt-Erk1/2 relativ zur ungezogenen Kontrolle dargestellt. Unter den Balken sind die relativen Werte angegeben.

Im Rahmen der Bachelorarbeit wurden die Versuche zu Erk1/2 auch an HUVEC und Nabelschnurfibroblasten durchgeführt. Die Zellen wurden ebenfalls für 3 h in serumfreiem Medium kultiviert. In Abb. 3.32⁵ sind Western-Transfer-Analysen der Zellen bei 0, 5, 10 und 20 min zyklischer Dehnung von 0,2 Hz und 24,9% dargestellt. In C und D sind die Quantifizierungen der Phosphorylierung relativ zur Tubulin-Menge dargestellt. Bei HUVECs war ein starker Anstieg zu erkennen. Nach 5 min war bereits die 6fache Menge Erk1/2 phosphoryliert, nach 20 min die 20fache Menge. Bei Nabelschnurfibroblasten stieg die Menge an phosphoryliertem Erk1/2 nach 5 min ebenfalls auf die etwa 6fache Menge an, sank danach jedoch wieder ab. Zu beachten ist, dass diese Versuche nur einmal durchgeführt wurden.

⁵Die Western Blots sind der Bachelorarbeit von Tim Feichtmeier entnommen.

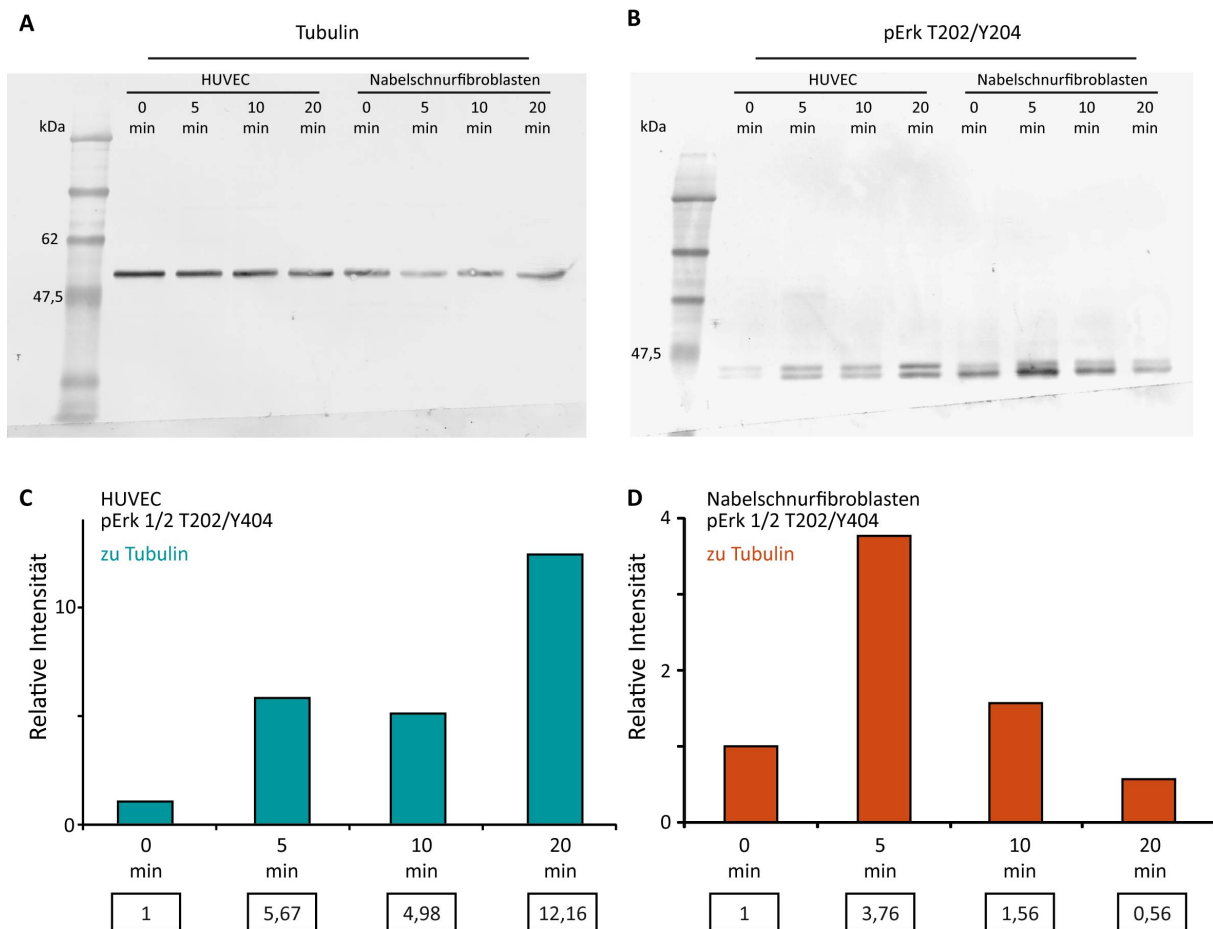


Abbildung 3.32: Western-Transfer-Analysen von HUVEC und Nabelschnurfibroblasten. Die Zellen wurden jeweils für 0, 5, 10 oder 20 min zyklisch mit 0,2 Hz und 24,9% gezogen. In A ist eine Färbung gegen Tubulin (55 kDa) und in B gegen phosphoryliertes Erk 1/2 (T202/Y204, 42 und 44 kDa) dargestellt. In C und D sind die relativen Mengen von phosphoryliertem Erk 1/2 relativ zu Tubulin dargestellt.

Parallel zu den Untersuchungen mit Erk 1/2 wurden an den Nabelschnurfibroblasten Untersuchungen zur Phosphorylierung von p130Cas durchgeführt. In Abb. 3.33⁶ sind die Western-Transfer-Analysen dargestellt. Die Färbung gegen phosphoryliertes p130Cas war dabei teilweise sehr schwach. Die Intensitäten des phosphorylierten p130Cas wurden relativ zu Tubulin (siehe Abb. 3.32) oder zum gesamten p130Cas berechnet. Die Ergebnisse der Quantifizierung waren dabei nicht schlüssig und wichen teilweise stark voneinander ab. Ein eindeutiger Anstieg oder Abfall der Phosphorylierung konnte daher nicht bestimmt werden.

⁶Die Western Blots sind der Bachelorarbeit von Tim Feichtmeier entnommen.

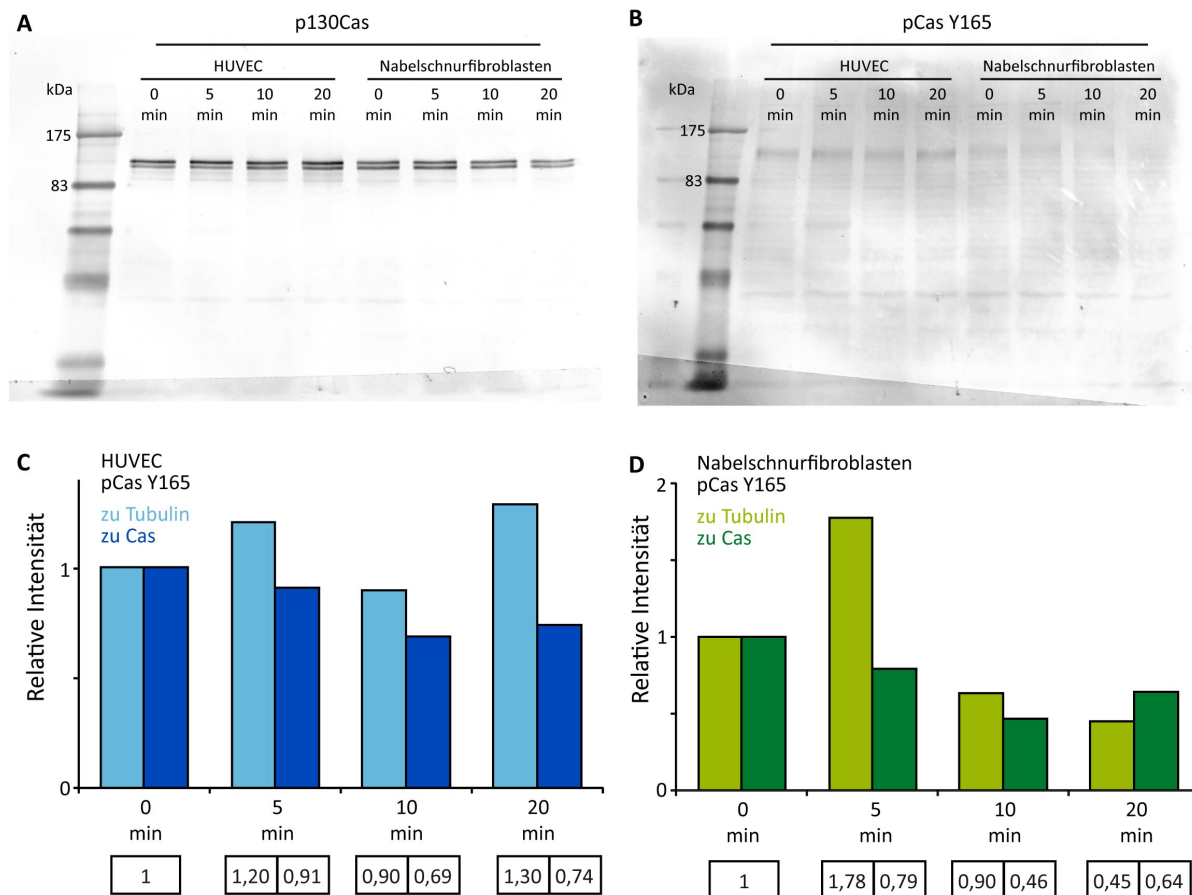


Abbildung 3.33: Western-Transfer-Analysen von HUVEC und Nabelschnurfibroblasten. Es wurde das gleiche Proteinlysate eingesetzt wie in Abb. 3.32. In A ist eine Färbung gegen p130Cas (130 kDa) und in B gegen phosphoryliertes p130Cas (Y165) dargestellt. In C und D sind die relativen Mengen von phosphoryliertem p130Cas relativ zum Gesamt-p130Cas sowie zu Tubulin (siehe Abb. 3.32) dargestellt.

3.6.2 Phosphorylierung von Crk und p130Cas in MEF-WT nach zyklischer Dehnung

Die von Tim Feichtmeier etablierte Methode wurde von mir für die Untersuchung von MEF-Zellen angepasst. Hierfür wurden in der Kammer weniger Zellen (50.000) ausgesät und die Dehnungsbedingungen den Orientierungsexperimenten angepasst (24 mHz bei 14%). Auf eine Kultivierung in serumfreiem Medium wurde verzichtet. Die Dauer der Dehnung wurde für die Experimente auf 5 und 10 min reduziert. In Abb. 3.34 sind Western-Transfer-Analysen von MEF-Zellen dargestellt. Die Versuche wurden unter gleichen Bedingungen mehrfach wiederholt. In C und D sind die relativen Mengen phosphorylierter Proteine zum Gesamtprotein dargestellt. Für p130Cas ließ sich nach 10 min ein leichter Anstieg um 34% in der Phosphorylierung im Vergleich zum Ausgangswert zeigen, wobei die Standardabweichung der insgesamt 5 durchgeführten Experimente 24%

betrug. Für Crk II war ein Absinken der Phosphorylierung nach 5 min um 20 % und nach 10 min auf 76 % zu sehen.

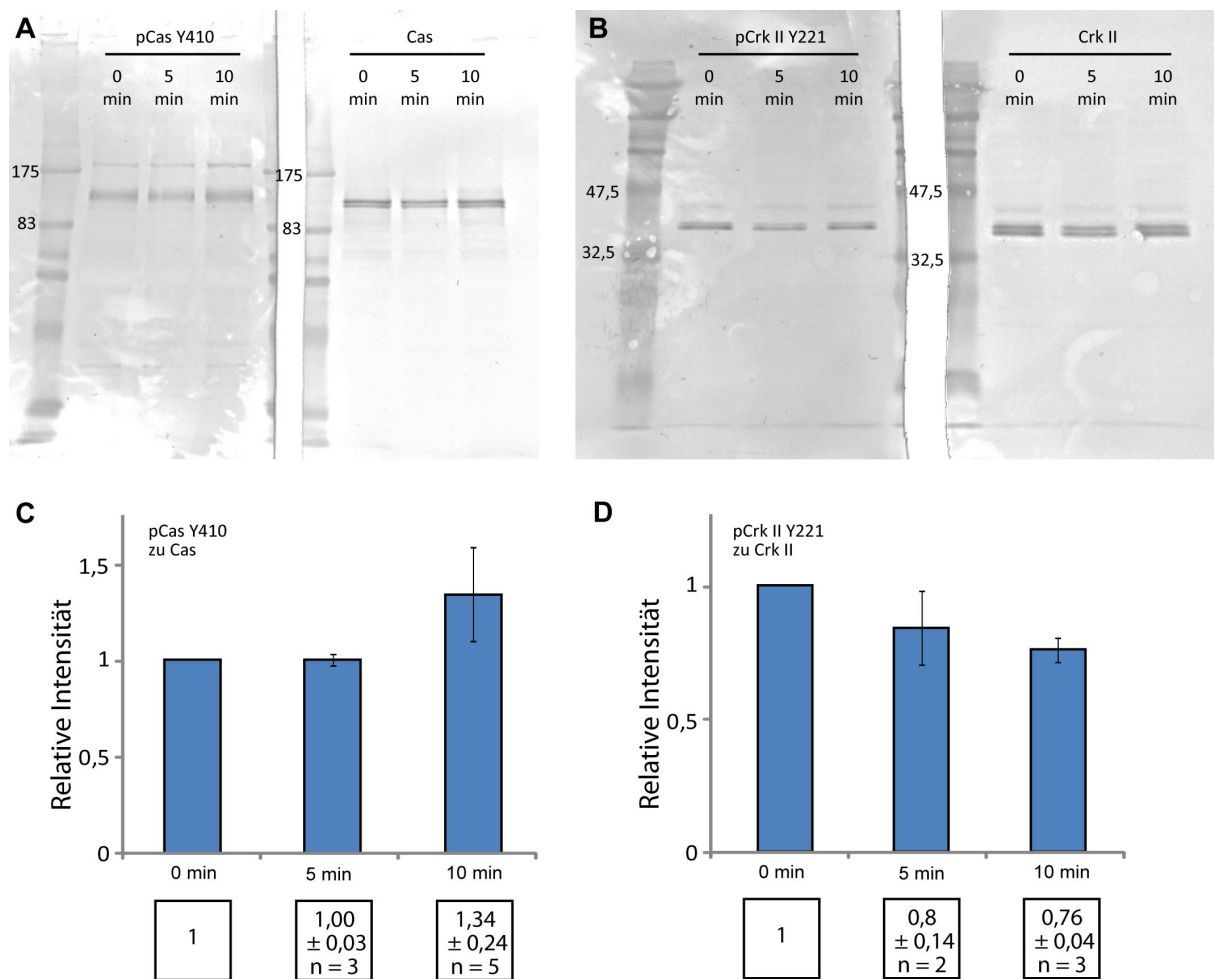


Abbildung 3.34: Western-Transfer Analyse von MEF-WT-Zellen nach 0, 5 und 10 min zyklischer Dehnung. In A und B sind Beispiele der Western Analysen dargestellt. A zeigt Färbungen gegen p130Cas (Cas) und phosphoryliertes Cas (pCas Y410). In B sind die Lysate aus der gleichen Isolation gegen Crk II und phosphoryliertes Crk II (pCrk II Y221) gefärbt. C und D zeigen jeweils die Proteinmengen von phosphoryliertem Protein im Verhältnis zur Gesamtmenge des Proteins.

Die Experimente mit Färbung gegen Crk wurden auch bei höheren Frequenzen (130 mHz) durchgeführt. Diese waren jedoch in keinem Fall eindeutig quantifizierbar, da sie einen starken Hintergrund zeigten oder die eingesetzte Proteinmenge zu gering war. In diesen Experimenten ließ sich jedoch auch visuell keine Tendenz zur verminderten Phosphorylierung erkennen.

Über die Phosphorylierungsanalysen nach zyklischer Dehnung lässt sich zusammenfassend sagen, dass diese Experimente eine große Varianz aufweisen und eine Aussage daher nur bedingt machbar ist. Dennoch stellen die mehrfach durchgeführten Experimente der

Phosphorylierung von p130Cas einen weiteren Hinweis auf die Aktivierung dieses Proteins bei zyklischem Verzug. Dies ist konsistent mit der verringerten Reorientierung von Zellen, denen dieses Protein fehlt. Auch eine Beteiligung von CrkII an der Reorientierung kann durch die verstärkte Aktivierung des Proteins angenommen werden.

Die Zusammenhänge der gesamten Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt detailliert betrachtet und diskutiert.

4 Diskussion

Viele Zellen im Körper, wie z.B. Zellen in Arterien oder der Lunge, sind zyklischer Dehnung als Folge des Herzschlages oder der Atmung ausgesetzt. Die Reaktion auf einen solchen Reiz führt bei einer Vielzahl von Zelltypen zur Reorientierung oder Umverlagerung der Zelle, hin zu Winkeln senkrecht zur Zugrichtung. Trotz zahlreicher Untersuchungen ist wenig über die Signalwege bekannt, die bei der Erkennung des Reizes der zyklischen Dehnung beteiligt sind. Bisherige Untersuchungen des Signalweges beruhen auf *in vitro* Systemen, wobei einzelne Bestandteile isoliert und in zellfreien Systemen die Aktivitäten und Interaktionen von Proteinen untersucht wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Signalweg in Zellen, *in vivo* untersucht. Statt Proteine zu isolieren wurden einzelne Proteine oder Proteinklassen ausgeschaltet oder herunterreguliert. Über die Quantifizierung der Orientierung von Zellen konnte nachfolgend der Einfluß der einzelnen Proteine gemessen und verglichen werden. Diese Untersuchung stellt damit den nächsten Schritt im Verständnis der beteiligten Signalwege dar.

Die hierfür verwendeten MEF-Zellen haben den entscheidenden Vorteil, dass viele Deletionsmutanten zur Verfügung stehen. Für die Auswertung ihres Aktinzytoskeletts bei zyklischer Dehnung müssen jedoch zunächst die Eigenschaften des Zytoskeletts kritisch betrachtet werden. Der Algorithmus der Auswertung sowie der vorgestellte Ordnungsparemeter werden ebenfalls im folgenden Abschnitt besprochen. Danach werden die durchgeführten Experimente einzeln betrachtet und in den Zusammenhang des aktuellen Forschungsstandes eingeordnet.

4.1 Orientierungsbestimmung von MEF-Zellen

4.1.1 Orientierung der Zellform

Die Orientierung von Zellen kann über das Zytoskelett oder über die Form bzw. Lage der Zellen bestimmt werden. Zur Untersuchung, ob die Zellform eine geeignete Methode darstellt, wurden die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Dehnungsexperimente neben ihrer Hauptaktinorientierung auch über ihre Zellform ausgewertet. Für die Bestimmung anhand der Zellform wurde für jede Zelle eine Ellipse berechnet (siehe Abschnitt 2.5.2).

Die Längsachse der Ellipse gab die Orientierung der Zelle an. In Abb. 3.9 sind die Ellipsen der Experimente von MEF-WT, -SYF und -Src++ bei 24 mHz für 30 h sowie die zugehörigen Kontrollen dargestellt. Dabei war zu sehen, dass die Orientierung von MEF-WT zu höheren Winkeln tendiert. Eine solche Reorientierung war bei MEF-SYF sowie den Kontrollen nicht zu sehen. MEF-Src++ zeigte ebenso wie in der Auswertung über die Hauptaktinorientierung einen intermediären Effekt, im Vergleich zur Kontrolle lag der Median höher und die Verteilungen waren signifikant verschieden. Im Vergleich zur Hauptaktinorientierung (siehe 3.7) war die Reorientierung von MEF-WT jedoch auffällig geringer.

MEF-Zellen wiesen typischerweise eine dreieckige oder sternförmige Morphologie auf (siehe Abb. 3.1), was die Berechnung einer Ellipse beeinflusste. Zum anderen wurde gezeigt, dass die Orientierung der Zellform dem des Aktinzytoskeletts zeitlich nachfolgt [36], so dass bei der Bestimmung der Ellipsen eine unvollständige Orientierung zu sehen gewesen sein könnte. Allerdings war die Versuchsdauer mit 30 h bereits recht lang und könnte zur Überprüfung auch nicht verlängert werden, da MEF-Zellen sich sehr schnell reproduzieren, konfluent wachsen und eine Auswertung damit nicht mehr vergleichbar wäre. Desweiteren würde die Zellform auch bei längeren Experimenten weiterhin die Berechnung der Ellipse beeinflussen.

Auffällig ist auch, dass alle Mediane der Kontrollexperimente unterhalb der zu erwartenden 45° lagen und die Zellen eine Tendenz zu niedrigeren Winkeln aufwiesen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass nur für Zellen eine Ellipse berechnet wurden, die keinen Kontakt zum Rand der Aufnahme aufwiesen. Da alle Bilder bei Aufnahme die Form eines Rechteckes mit der Zugorientierung parallel zur Längsseite hatten, wurden durch die Auswahl der Zellen innerhalb des Bildes möglicherweise Zellen in Längsrichtung bevorzugt.

Die MEF typische Zellform sowie die Art der Aufnahme beeinflussten die Auswertung der Zellform daher zu stark, so dass insgesamt die Auswertung anhand der Aktinorientierung bevorzugt wurde.

4.1.2 Das Aktinzytoskelett

MEF-Zellen zeigen ein diffuseres Zytoskelett als die für Orientierungsanalysen oft verwendeten Endothelzellen [36]. Das bedeutet, dass auch bei sehr stark ausgerichteten Zellen ein Teil der Stressfasern in beliebige Richtungen zeigte (Abb. 3.1). Dennoch war die Ausrichtung des Zytoskeletts analysierbar. Im Vergleich zur Zellform (Abb. 3.9) zeigte sich sogar eine deutlichere Orientierung. Zudem wiesen auch nicht gezogene Kontrollzellen meist eine Richtung in ihrem Zytoskelett auf, was sich auch im vergleichbaren Ordnungsparameter zwischen zyklisch gedehnten Zellen und Kontrollzellen widerspiegelt. Die Richtung, in die die Kontrollzellen zeigten, war dabei jedoch nicht gerichtet und in der Gesamt-

verteilung der Experimente über alle Winkel verteilt (siehe Abb. 3.7). Die Ausrichtung in den einzelnen Zellen wurde vermutlich durch die Zellform hervorgerufen, die meistens langgestreckt war. Zudem durchspannte das Aktinnetzwerk die Zelle längs, wobei die Stressfasern weitestgehend parallel geordnet waren. Am Zellrand waren die Stressfasern besonders gebündelt und hatten, wenn das Aktinzytoskelett sonst sehr schwach oder diffus ausgeprägt war, einen starken Einfluss auf die Orientierungsbestimmung.

Als abschließende Kontrolle wurden die Dehnungsexperimente verglichen, indem statt einer Hauptorientierung pro Zelle alle gemessenen Winkel des Aktinzytoskeletts ausgewertet wurden (siehe Abb. 3.8; 3.17 und 3.22). Dabei zeigte sich in allen Fällen eine Tendenz, die mit der Hauptaktinorientierung vergleichbar war. Damit konnte bestätigt werden, dass die Verwendung des Maximums der Winkelhäufigkeit nicht die gemessenen Orientierungen verändert und für die Versuche verwendet werden konnte.

4.1.3 Auswertung der Aktinorientierung

Für die Auswertung der Aktinorientierung wurden aus jeder Dehnungskammer zwei Bildreihen, eine in x- und eine in y-Richtung aufgenommen und die Zellorientierung anhand des Zytoskeletts nachfolgend computergestützt ausgewertet. Der Algorithmus ermöglicht die Bestimmung der Zellorientierung großer Zellzahlen weitestgehend ohne Beeinflussung durch den Anwender. MEF-Zellen haben jedoch die Tendenz, Verbindungen zur Nachbarzelle herzustellen und sich zudem zu schnell zu teilen. Daher mussten mehr Zellen manuell gelöscht werden, als ursprünglich vorgesehen. Die Kriterien für solche manuellen Änderungen wurden für alle Zelllinien gleich behalten und in allen Fällen gut begründet. Um auszuschließen, dass durch die manuelle Nachbearbeitung das Ergebnis verändert wurde, wurden in einem Experiment Aufnahme und Auswertung im Blindversuch durchgeführt und die Ausrichtungen den Zelllinien erst hinterher zugeordnet. Dabei zeigte sich kein Unterschied zu den normal durchgeführten Auswertungen. Außerdem wurden die Datenbeschriftungen der Mikroskopaufnahmen im normalen Ablauf so gewählt, dass während der Auswertung Zelltyp und Dehnungsparameter nicht zu lesen waren.

Die Experimente innerhalb eines Genotypes zeigten ebenfalls Variationen. Zur Überprüfung, ob diese Streuung die Ergebnisse beeinflussen könnte, wurden die MEF-WT Experimente in zwei Gruppen geteilt. Jeweils die mit dem höchsten Median und die mit dem niedrigsten Median wurden zusammen ausgewertet. Die Unterschiede der beiden Gruppen sind in Abb. 3.10 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass die Differenzen zwischen den Gesamtverteilungen von MEF-WT, -SYF und -Src++ in jedem Fall größer waren als die Streuung innerhalb von MEF-WT.

4.1.4 Ordnungsparameter

Der für die Versuche verwendete Ordnungsparameter erlaubt einen Rückschluss auf die Qualität der Orientierung. Je stärker Zellen eine Orientierung in eine Richtung aufweisen, umso größer ist der Ordnungsparameter. Von einem Schwellenwert zur Auswahl der Zellen wurde abgesehen, da der mittlere Ordnungsparameter zwischen den Zelllinien schwankte und dadurch keine gemeinsame klare Grenze für die Zelllinien gesetzt werden konnte (siehe Abb. 3.4 und 3.5). Zudem hatten Zellen mit einem sehr starken Ordnungsparameter meist keine MEF typische Morphologie, sondern waren nadelförmig langgezogen ohne erkennbares Zytoskelett.

Die Verteilungen der Ordnungsparameter von MEF-WT, -SYF und -Src++ unterschieden sich gezogen signifikant von den nicht gezogenen (Abb. 3.7). Eine klare Tendenzen konnte jedoch nicht aufgezeigt werden. Bei MEF-WT stieg er bei Dehnung an, während er bei -SYF und -Src++ sank. Ob dieses Verhalten spezifisch war oder auf anderen Gründen beruhte, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden, da hierfür weitere Experimente notwendig gewesen wären.

Von humanen Nabelschnurfibroblasten und Endothelzellen ist bekannt, dass das Zytoskelett bei zyklischer Dehnung verstärkt wird [36, 117]. Eine solche Beobachtung könnte bei MEF-Zellen darüber hinaus die Auswertung beeinflussen, indem das stärkere Zytoskelett ein stärkeres Signal vermittelt. Beim Vergleich der Ordnungsparameter zeigte sich jedoch, dass MEF-SYF einen höheren Ordnungsparameter aufwies als der MEF-WT. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die bei MEF-SYF verminderte Fähigkeit zur Reorientierung durch ein verringertes Signal des Aktinzytoskeletts hervorgerufen wurde. Von Cas-Knockout-Zellen wurde beschrieben, dass sie über kürzere und ungeordnetere Stressfasern verfügen [55] und dadurch ebenfalls die Messung der Orientierung beeinflussen könnten. Diese Möglichkeit kann hier jedoch ausgeschlossen werden, da der Ordnungsparameter für MEF-Cas -/- höher ausfiel als für -Cas-WT (siehe Abb. 3.6).

4.2 Einfluss der SFK auf die Reorientierung

Die Kinasen der Src-Familie spielen eine wichtige Rolle in der integrinvermittelten Signalübertragung [66]. Sie regulieren dabei Zellmigration, integrinvermittelte Adhäsion und die Ausbreitung der Zelle [21].

Eine weiteres Wirkungsgebiet der SFK zeigt sich bei MEF-SYF. Bei diesen Zellen ist der Abbau der FA sowie die Migrationsrate deutlich vermindert [118] und beides könnte die Auswertung der Zellorientierung beeinflussen. Zur Untersuchung, ob die FA-Dynamik durch die fehlenden Kinasen beeinflusst ist, habe ich im Rahmen der vorhergehenden Diplomarbeit FRAP-Analysen an Vinculin durchgeführt. Dabei wurde die Austausch-

dynamik von GFP-Vinculin an FA der Zellperipherie untersucht. Auf Basis bestehender Literatur [79] wurde die Austauschrate aufgrund der stärkeren Phosphorylierung der peripheren FA im MEF-WT am stärksten vermutet. Ein Unterschied konnte jedoch zumindest für Vinculin nicht bestätigt werden [84]. Des Weiteren ist die Migrationsrate bei MEF-SYF im Vergleich zum MEF-WT als verringert beschrieben, wodurch es zu einer Verzögerung in der Reorientierung kommen könnte [118]. Die Dauer der zyklischen Dehnung ist jedoch mit 30 h sehr lange und die verringerte Migrationsgeschwindigkeit sollte hier keinen Einfluss haben.

Über die Wirkung der SFK bei der zellulären Reorientierung durch zyklische Dehnung war bisher nur bekannt, dass durch Reduktion von Src und FAK diese Reorientierung vermindert ist [82, 96]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen den Einfluss von Src und zeigen zudem, dass auch Yes und Fyn beteiligt sind. MEF-SYF-Zellen, denen die drei ubiquitär exprimierten Kinasen fehlen, hatten eine deutlich verminderte Fähigkeit, die zyklische Dehnung zu erkennen und darauf zu reagieren (siehe Abschnitt 3.2). Insbesondere in Winkeln zur Zugrichtung ($0^\circ - 30^\circ$), also in Bereichen, in denen die Dehnung besonders stark ist, fanden sich bei -SYF mehr als dreimal so viele Zellen wie bei MEF-WT.

Auch bei höheren Frequenzen zeigte sich der Unterschied zwischen MEF-WT und -SYF (Abb. 3.11). Hier wurden die Zellen bei 130 mHz (SYF) oder 100 mHz (WT) zyklisch gezogen. MEF-WT reorientierte bereits nach einer Stunde sehr stark, während -SYF auch nach 16 Stunden nur eine geringe Tendenz zu höheren Winkeln erkennen ließ.

Der Einsatz von SFK Inhibitoren unterstützt das Ergebnis weiter. Unter Einfluss von PP2 orientierten MEF-Zellen weniger als unter PP3 oder unbehandelt (siehe Abb. 3.13). Hier ist jedoch anzumerken, dass auch PP3 als nicht inhibierende Kontrollsubstanz insbesondere in höheren Winkeln einen Einfluss auf die zelluläre Reorientierung ausübte. Dies zeigte sich in einem signifikanten Unterschied zwischen den mit PP3 behandelten und unbehandelten MEF-WT-Zellen. Die durch PP3 verringerte Reorientierung war hierbei möglicherweise ein Resultat der erhöhten Menge DMSO als Lösungsmittel der Inhibitoren.

Bei der Verwendung von SU6656 als weiteren SFK-Inhibitor wurde deutlich, dass dieser stark in den Silikonkautschuk hinein diffundierte und damit im Medium den Zellen nicht mehr zur Verfügung stand. Es besteht die Möglichkeit, dass PP2, das ebenso wie das Substrat einen hydrophoben Charakter aufweist, ebenfalls in den Silikonkautschuk eindiffundierte. Um dem zu entgehen wurde das Medium in den Kammern mehrfach gewechselt und stets Inhibitor zugegeben. Dennoch konnte auf Basis nachträglich durchgeführter Immunocytochemischer Experimente nur eine geringe Verminderung der SFK-abhängigen Phosphorylierungen gemessen werden.

Zur Untersuchung des Einflusses von Src im Vergleich zu Yes und Fyn wurde die Reori-

entierung einer weiteren Zelllinie betrachte. MEF-Src⁺⁺, der Yes und Fyn fehlt während Src normal exprimiert wird, zeigte eine intermediäre Orientierung zu höheren Winkeln im Vergleich zu MEF-WT und -SYF (siehe Abb. 3.7). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Src zwar unmittelbar an der Erkennung von zyklischer Dehnung beteiligt ist, jedoch auch die beiden anderen Kinasen eine Rolle spielen. Das zeigt, dass die SFK hier trotz ihrer Ähnlichkeit nicht in der Lage sind, einander vollständig zu komplementieren.

4.3 p130Cas bei zyklischer Dehnung

Von p130Cas wurde beschrieben, dass es bei mechanischer Dehnung in Abhängigkeit von Src an mehreren Positionen phosphoryliert wird. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass das Protein in der Länge variabel ist. Beides zusammen spricht dafür, dass p130Cas bei mechanischem Zug Phosphorylierungsstellen frei gibt, die sonst in der Substratdomäne verborgen sind (siehe Abb. 4.1). Diese können dann von Src phosphoryliert werden [101]. In der Zelle könnte dieser Mechanismus zur Wahrnehmung einer auf die FA wirkenden Kraft dienen und p130Cas damit die Funktion eines zellulären Mechanosensors übernehmen [41]. Die hier vorgestellten Versuche zeigen, dass p130Cas tatsächlich an der zellulären Wahrnehmung von zyklischer Dehnung beteiligt sein muss. Dies wurde hier sowohl auf Proteinebene als auch auf Ebene der Fähigkeit zur Reorientierung von Zellen nachgewiesen.

Bei zyklischer Dehnung von 24 mHz war nach 10 min ein Anstieg um 34% der Phosphorylierung des Tyrosins an Position 410 innerhalb der Substratdomäne von p130Cas im Vergleich zu 0 und 5 min zu sehen (Abb. 3.34). Allerdings wiesen die Quantifizierungen der Western Blots eine starke Streuung auf. Dies könnte zum einen durch eine schwache Antikörperfärbung gegen phosphoryliertes p130Cas bedingt sein. Zum anderen konnte aus Zugkammern meist nur gering konzentriertes Zelllysate isoliert werden, was die Intensität der Banden im Vergleich zum Hintergrund nochmals verringerte. In Abb. 3.33 sind Quantifizierungen von HUVEC und Nabelschnurfibroblasten dargestellt. Die Experimente zeigen die Quantifizierungen von p130Cas (Y165) im Vergleich zu Tubulin bzw. zu p130Cas selbst. Die dabei errechneten Werte schwanken erheblich, je nachdem welches Protein als Referenz gewählt wurde. Für Y165 des p130Cas lässt sich aus diesen Experimenten kein Anstieg der Phosphorylierung erkennen.

Zur Untersuchung der Rolle von p130Cas in der Reorientierung bei zyklischer Dehnung wurden MEF-Zellen verwendet, in denen p130Cas fehlt oder über siRNA herunterreguliert war. Mit dem auf die MEF-Zellen abgestimmten Transfektionsprotokoll war eine für p130Cas sowohl auf Protein- als auch auf RNA Ebene deutliche Reduktion zu erzielen (siehe Abschnitt 3.3.1). Die Reduktion blieb auf Proteinebene bis zum Ende der

Dehnungsexperimente erhalten. Nach 8 h zyklischer Dehnung (ca. 58 h nach der 2. Transfektion) lag die Reduktion noch auf dem gleichen Niveau wie 24 h nach Transfektion. Nach 30 h Dehnung, also etwa 70 h nach der 2. Transfektion (siehe 2.1.3) konnte jedoch eine Erholung auf 50 - 70 % beobachtet werden (Abb. 3.14). Ein Einfluss der Erholung des Proteingehaltes auf die gemessene Reorientierung kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, wobei dieser erst spät im Versuchsablauf erfolgte.

Bei zyklischer Dehnung von 24 mHz für 30 h zeigten Zellen, die mit siRNA gegen p130Cas (siRNA Cas #3) transfiziert wurden, eine verminderte Orientierung zu höheren Winkeln im Vergleich zu untransfizierten MEF-WT-Zellen oder solchen, die mit einer Negativkontroll-siRNA (siRNA NC) transfiziert wurden (Abb. 3.16). Gerade im Winkelbereich zur Zugrichtung verblieben bei verminderter p130Cas Expression mehr Zellen als bei MEF-WT oder der Negativkontrolle. Der Unterschied in der Reorientierung zeigte sich auch deutlich in der verminderten medianen Orientierung.

Cas-Knockout-Zellen (MEF-Cas -/-), die mit gleichen Parametern gezogen wurden, zeigten das gleiche Ergebnis. Im Vergleich zu Zellen, die p130Cas reexprimieren (MEF-Cas-WT), sind die Zellen weniger in der Lage der zyklischen Dehnung auszuweichen (Abb. 3.21). Der Median ist bei MEF-Cas -/- Zellen im Vergleich zum -Cas-WT um die gleiche Spanne verringert wie bei den Knockdown-Experimenten.

Dehnungsexperimente bei 130 mHz für 8 h von MEF-Cas -/- und -Cas-WT-Zellen sind in Abb. 3.23 dargestellt. Dabei ist zu sehen, dass sich MEF-Cas -/- Zellen insgesamt deutlich weniger ausrichteten als Cas-WT. Jedoch ist die Streuung der Einzelexperimente sehr groß. Auch bei den in Abb. 3.18 dargestellten Dehnungsexperimenten von MEF-WT untransfiziert sowie nach Transfektion mit siRNA gegen p130Cas (Cas #1) oder einer Negativkontrolle zeigt sich eine hohe Streuung der Einzelexperimente. Speziell bei der Negativkontrolle zeigen zwei der fünf dargestellten Versuche eine deutliche Abweichung von der Gesamtverteilung. Auch wenn hier eine geringe n-Zahl mit berücksichtigt werden muss deuten die Daten darauf hin, dass die Zellen bei höheren Frequenzen variabler reagieren. Zusätzlich zu der breiten Streuung zeigt die siRNA gegen p130Cas keine Änderung in der Reorientierung. Das Ergebnis, dass Zellen bei 24 mHz bei expressionsreduziertem p130Cas weniger reorientieren, konnte bei höheren Frequenzen daher nicht reproduziert werden. Der Grund hierfür könnte sein, dass bei höheren Frequenzen eine geringere Menge an p130Cas bereits ausreicht, um die Signalwirkung zu aktivieren. Dass bei höheren Frequenzen ein anderer Signalweg aktiviert wird, der nicht über p130Cas läuft, erscheint unwahrscheinlich, da MEF-Cas -/- Zellen auch hier weniger reorientieren als -Cas-WT.

Um die Funktionsweise von p130Cas in den Dehnungsexperimente weiter einzugrenzen wurde zusätzlich eine Zelllinie untersucht, die eine mutierte Form von p130Cas exprimiert, in der alle 15 Tyrosine der Substratdomäne durch Phenylalanin (15F) ersetzt wurden [38].

Damit ist p130Cas vorhanden und kann auch über die SFK- und FAK-Bindedomänen in die FA inkorporiert werden. Bei zyklischer Dehnung zeigte sich aber eine zu MEF-Cas^{-/-} Zellen sehr ähnlich verminderte Reorientierung. Das bedeutet, dass für die Wahrnehmung der zyklischen Dehnung die Phosphorylierung der Substratdomäne von p130Cas von Bedeutung ist. Vereinfacht spricht diese Versuchsreihe dafür, dass durch die Dehnung p130Cas innerhalb der FA auseinander gezogen wird. Dabei werden Phosphorylierungsstellen der Substratdomäne freigelegt und phosphoryliert. An phosphoryliertes p130Cas können dann weitere Signalproteine binden, von denen das wichtigste das Adapterprotein Crk darstellt (siehe Abb. 4.1).

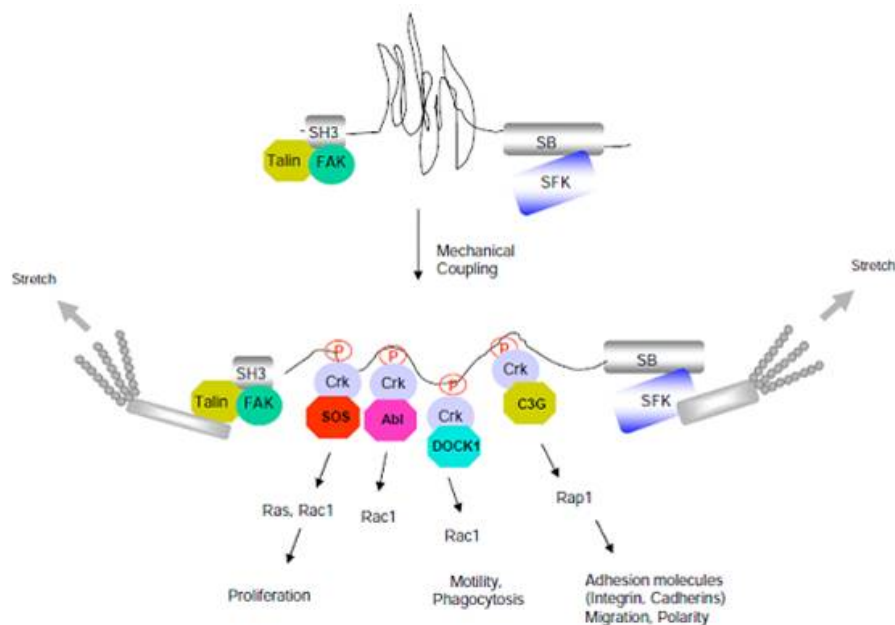


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung von p130Cas in entspannter und aufgezogener Form. Wird das Protein auseinander gezogen werden kryptische Phosphorylierungsstellen frei, an die das Adapterprotein Crk bindet und eine große Anzahl verschiedener Proteine rekrutieren kann, die auf Proliferation, Motilität und das Aktinzytoskelett wirken. Aus [13].

4.4 Das Adapterprotein Crk

Crk bildet zelluläre Signalkomplexe, indem es zwei weitere Proteine in räumliche Nähe zueinander bringt und darüber die Interaktion vermittelt. Von Crk sind zwei Isoformen (CrkI und II) sowie ein homologes Protein (CrkL) bekannt [13]. CrkI und CrkII unterscheiden sich darin, dass CrkII eine weitere SH3 Domäne aufweist, und über Phosphorylierung reguliert wird. Crk ist ein direkter Bindungspartner von p130Cas und in der Lage, eine Reihe weiterer Signalproteine zu rekrutieren. Die wichtigsten sind in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.

Die Experimente zur Phosphorylierung von Crk zeigten, dass CrkII wenige Minuten nach Beginn der Dehnung weniger phosphoryliert und damit aktiviert vorliegt (siehe Abb. 3.34). Dies spricht dafür, dass mindestens CrkII ein Bestandteil des Signalweges ist. Die Western Blot Experimente zeigten jedoch nur eine geringe Abnahme in der Phosphorylierung von 24 % bei drei durchgeführten Versuchen. Die Auswertungen von Western Blots können starke Schwankungen aufweisen (siehe Abb. 3.33) und die Versuche müssen mehrfach durchgeführt werden, um ein gesichertes Ergebnis zu bringen. Dennoch sind die Ergebnisse der Phosphorylierung von CrkII ein gutes Indiz für eine Beteiligung des Proteins an diesem Signalweg.

Die in den Dehnungsexperimenten eingesetzten MEF-Crk-WT-Zellen zeigten bei 24 mHz keine und bei 130 mHz nur eine sehr leichte Reaktion auf zyklische Dehnung (Abb. 3.25). Damit unterschieden sich MEF-Crk-WT-Zellen von allen bisher getesteten MEF-WT Zelllinien. Es kann vermutet werden, dass die Zellen über einen Defekt verfügen, der über die hier durchgeführten Experimente jedoch nicht näher bestimmt werden konnte. Eine Kreuzkontamination mit MEF-Crk -/- konnte über Western-Transfer-Analysen ausgeschlossen werden. Des weiteren zeigten die Crk-Knockout-Zellen im ersten durchgeführten Experiment eine sehr starke Orientierung, während sie in allen späteren Experimenten nicht mehr reagierten. Die Gründe hierfür können nicht mehr nachvollzogen werden. Der einzige Hinweis ist, dass zwischen den Experimente neue Zellen aufgetaut worden waren, da die Zellen im ersten Experiment eine für MEF-Zellen ungewöhnliche Morphologie und übermäßig parallel angeordnete Stressfasern aufwiesen. Möglicherweise lag hier eine Kreuzkontamination mit einem anderen Zelltyp vor. Über die Beteiligung von Crk bei zyklischer Dehnung kann nach diesen Experimenten, speziell aufgrund der Tatsache, dass bereits der Crk-WT unter Zug keine Reorientierung aufwies, keine Aussage gemacht werden.

Eine alternative Untersuchung der Wirkung von Crk auf die Reorientierung bei zyklischer Dehnung wäre die Reduktion der Crk Menge über siRNA. Hierfür wurden mehrere siRNAs getestet. Dabei zeigte sich, dass viele siRNAs gegen Crk wirkungslos waren und nur eine in der Lage war, die Crk RNA-Menge auf maximal 42 % zu reduzieren. Zyklische Dehnungsexperimente mit einer funktionalen siRNA sind daher bislang nicht erfolgreich durchgeführt worden. Des weiteren wäre wünschenswert, dass eine Doppeltransfektion mit siRNA gegen Crk und gegen CrkL etabliert wird, um auszuschließen, dass die Proteine einander komplementieren.

In diesem Zusammenhang wären auch Reexpressionsexperimente mit Plasmiden, die GFP-CrkI oder -CrkII tragen, von Interesse. Sollte sich dann für den einen oder anderen Fall eine Reorientierung zeigen, könnte zum einen die Rolle von Crk insgesamt bestätigt werden und zum anderen sogar möglicherweise die verschiedenen Aufgaben der beiden

Isoformen bestimmt werden. Antoku et al. konnten 2009 zeigen, dass CrkII und CrkL die kleine GTPase Rac1 aktivieren, während CrkI die kleine GTPase Rap1 aktiviert [5]. Bei der Dehnung des isolierten Zytoskeletts wird eben diese GTPase Rap1 aktiviert [109]. Sollten sich die unterschiedlichen Wirkungen der Crk Isoformen bestätigen, würde das bedeuten, dass bei zyklischer Dehnung CrkI verstärkt an phosphoryliertes p130Cas bindet. Dem widerspricht jedoch, dass CrkII in Phosphorylierungsanalysen bei zyklischer Dehnung weniger phosphoryliert und damit in aktivierter Form vorlag.

4.5 Bindungspartner von Crk

Das Adapterprotein Crk interagiert mit einer großen Zahl von Signalproteinen, von denen Dock1, C3G und Abl1 in Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

C3G

C3G stellt ein GEF (Guanosin Exchange Factor) dar und unterstützt den Austausch von Guanosin an kleinen GTPasen. C3G aktiviert die kleine GTPase Rap1, deren Aktivität bei zyklischer Dehnung ansteigt [109]. Damit ist C3G der wahrscheinlichste Bindungspartner von Crk bei zyklischer Dehnung. Zur Untersuchung wurden Dehnungsexperimente mit siRNAs gegen das Protein durchgeführt (Abb. 3.27), die jedoch keinen eindeutigen Unterschied zur Negativkontrolle aufzeigen konnten. Bei den Versuchen mit 130 mHz besteht die Möglichkeit, dass die unveränderte Reorientierung auf dem gleichen Effekt basiert wie in den Experimenten mit siRNA gegen p130Cas (Vergl. 4.3). Allerdings war mit siRNA gegen C3G auch bei 24 mHz kein Unterschied in Bezug auf das Reorientierungsverhalten zur Negativkontrolle zu sehen. Diese Experimente könnten darauf hindeuten, dass C3G selbst mit der verbliebenen Proteinkonzentrationen von 24 % die volle Funktionsfähigkeit aufrecht erhalten kann. Alternativ kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, dass C3G nicht im Signalweg involviert ist. Oder aber weitere, parallele Signalwege spielen eine komplementierende Rolle. Zur Klärung dieser Möglichkeiten müssen in einem ersten Schritt die Experimente zur Reorientierung von C3G wiederholt werden.

Dock1

Bei Dock1 handelt es sich um ein GEF für Rac1, welches für die Funktion noch mit ELMO interagieren muss, um aktiviert zu werden. Der genaue Mechanismus und die Funktion sind dabei noch nicht verstanden [13].

Die Dehnungsexperimente mit Dock1 wurden durchgeführt, indem das Protein in MEF-WT-Zellen über siRNA herunterreguliert wurde. Die Zellen wurden nachfolgend bei

24 mHz und 130 mHz zusammen mit einer Negativkontrolle zyklisch gezogen (Abb. 3.26). In den Experimenten bei 130 mHz zeigte die Negativkontrolle eine Reorientierung, die im Vergleich zu bisherigen Versuchen mit Negativkontrollen verringert war, während Dock1 zu dieser keinen Unterschied zeigte. Bei 24 mHz waren zwei Versuchsreihen durchgeführt worden, die in beiden Fällen im Bereich von Negativkontrollen aus anderen Experimenten lag. In jedem Experiment war es jedoch so, dass die mit siRNA gegen Dock1 transfizierten Zellen eine leicht stärkere Reorientierung gegenüber der parallel getesteten Negativkontrolle zeigten. Da Dock1 mit C3G um die Bindung an Crk konkurriert, könnte dieses Ergebnis auf eine indirekte Verstärkung von C3G hindeuten. Dadurch, dass weniger Bindungen mit C3G von Dock1 besetzt werden, könnte C3G stärker an Crk binden und anschließend verstärkt Rap1 aktivieren, was eine erhöhte Reorientierung zur Folge haben könnte. Allerdings ist die verstärkte Orientierung im Bereich der üblichen Streuung der Experimente und müssten für eine Aussage über die Zusammenhänge zunächst mehrfach wiederholt werden.

Abl1

Abl1 ist eine Tyrosinkinase, die von den SFK aktiviert wird und CrkII und CrkL phosphoryliert und inaktiviert [37]. Eine verringerte Menge dieser Kinase müsste eine stärkere Aktivierung von CrkII und damit möglicherweise über die erhöhte Aktivität einen Einfluss auf das Reorientierungsverhalten von Zellen zur Folge haben.

Es wurden Dehnungsexperimente von MEF-WT-Zellen, die mit einer siRNA gegen Abl1 (Abb. 3.28) transfiziert worden waren, bei 24 mHz für 30 h durchgeführt. Ein Unterschied im Orientierungsverhalten zwischen mit siRNA gegen Abl1 oder einer Negativkontrolle transfizierten Zellen war nicht zu sehen. Beide Experimente lagen auch im Bereich des untransfizierten MEF-WT. Ein solches negatives Ergebnis könnte damit zusammenhängen, dass Abl1 hoch homolog zu Abl2 ist und sich die Kinasen gegenseitig komplementieren könnten [13, 114]. Eine andere, spekulative Möglichkeit besteht darin, dass die Reorientierung bei zyklischer Dehnung eher durch CrkI als durch CrkII vermittelt wird [5]. Da CrkI nicht von der Abl1 Kinase reguliert wird, wäre keine Änderung im Grad der Ausrichtung zu sehen. Zur genaueren Untersuchung der Rolle der Kinase auf zelluläre Reorientierung sollten jedoch zunächst Doppeltransfektionen mit siRNA gegen Abl1 und 2 angestrebt werden, um eine funktionale Komplementierung auszuschließen.

4.6 Alternative Signalwege zu p130Cas

Die Große Zahl an Literatur sowie die vielen unterschiedlichen Ansätze deuten an, dass bereits allein für die Erkennung zyklischer Dehnung eine Reihe unabhängiger, mechano-

sensitiver Mechanismen existieren. Untersuchungen im Zusammenhang mit Ca^{2+} konnten beispielsweise zeigen, dass die Umorientierung von Zellen bei zyklischer Dehnung nur die der Zellform von Ca^{2+} abhängt, während das Aktinzytoskelett über einen anderen Signalweg reguliert wird [49]. Innerhalb des Aktinzytoskeletts ist eine Mechanosensorik über das typischerweise in der FA lokalisierte Protein Zyxin zu sehen. Bei Dehnung oder Scherfluss wird dieses, zusammen mit α -Actinin und VASP an die Stressfasern rekrutiert [120]. Jedoch bleiben die Stressfasern bei Dehnung des Substrates stabil, während die FA selbst gestreckt werden [63] und vieles spricht dafür, dass die an der Reorientierung bei zyklischer Dehnung beteiligten Signalwege von in der FA lokalisierten Proteinen ausgehen [43].

p130Cas ist ein Teil dieses Signalweges, wie die Versuche aus dieser Arbeit verdeutlichen. Allerdings zeigen -SYF-Zellen eine stärkere Reorientierung als Cas Knockout oder Knockdown Zellen. Dieser Unterschied bedeutet, dass die Signalwirkung durch das Fehlen der SFK stärker unterbrochen ist als durch das Fehlen von p130Cas. Daraus lässt sich ableiten, dass p130Cas nicht das einzige Substrat der SFK in der Reorientierung von zyklischem Verzug sein kann, sondern weitere Proteine phosphoryliert werden, die ebenfalls an der Reorientierung beteiligt sind.

Neben p130Cas werden verschiedene andere FA-lokalisierte Proteine vorgeschlagen, die meist über ähnliche Mechanismen aktiviert werden können, wobei Talin, Vinculin und Paxillin zu den interessantesten gehören.

Paxillin ist ein Struktur- und Signalprotein in der FA, das mit Vinculin, FAK und β -Integrinen interagiert. Paxillin wird durch FAK phosphoryliert und bildet dadurch Bindungsstellen für Crk. Untersuchungen von Huang et al. konnten zeigen, dass dieses Protein für die zelluläre Reorientierung in den ersten Minuten von zyklischer Dehnung notwendig war, während zu späteren Zeitpunkten kein Unterschied in der Reorientierung zu erkennen war [56].

Ein weiteres mögliches Protein, von dem ebenfalls beschrieben wurde, dass es bei Dehnung entfaltet werden kann wodurch potentielle kryptische Bindungsstellen frei werden, ist Talin [29]. Dieses Protein ist eines der ersten Proteine, die in der FA integriert werden und interagiert u.a. mit Vinculin, Aktin und Integrinen [121]. Vinculin bindet bei der Aktivierung von Talin an eine solche kryptische Bindungsstelle, was eine Verstärkung der gesamten Struktur zur Folge hat. Eine solche Verstärkung kann zum Beispiel dann beobachtet werden, wenn Kraft, extern durch Dehnung oder intern über das Aktinzytoskelett, auf die Adhäsion ausgeübt wird [40].

Vinculin spielt eine zentrale Rolle in der FA. Von diesem Protein sind mehrere Mechanismen der Aktivierung untersucht worden. Der genaue Mechanismus ist dabei noch unbekannt. Zur Untersuchung, ob Vinculin an der Reorientierung von Zellen aufgrund zy-

klischer Dehnung beteiligt ist, wurde eine Experimentreihe mit Vinculin Knockout Zellen durchgeführt (siehe 3.30). Parallel stand ein WT (MEF-WT-V) zur Verfügung, der jedoch eine ungewöhnliche Morphologie aufwies und die Experimente daher nicht verwertbar sind (siehe Abb. 3.29) MEF-Vinc^{-/-} Zellen zeigten im Vergleich zum bisher verwendeten MEF-WT eine verminderte Reorientierung. Diese beiden Zelllinien sind jedoch aufgrund unterschiedlicher Herstellungsgrundlagen der Zelllinien nur bedingt vergleichbar. Um auf eine Beteiligung von Vinculin an der Mechanosensorik zu schließen müssen daher noch weitere Experimente durchgeführt werden. Zum einen sollten Reexpressionsexperimente mit Vinculin in MEF-Vinc^{-/-} Zellen durchgeführt werden. Sollte sich dabei eine Beteiligung von Vinculin an der zellulären Mechanosensorik bestätigen, würden Vinculin-Varianten mit Mutationen in den Phosphorylierungsstellen Y100 und Y1065 Aufschluß über die Aktivierung von Vinculin geben. Wird Vinculin in erster Linie über die Phosphorylierung aktiviert müsste sich bei zyklischer Dehnung von nicht phosphorylierbarem Vinculin eine ähnliche Verschiebung zu höheren Winkeln zeigen wie bei MEF-Vinc^{-/-}. Bei einer Aktivierung durch die Bindungspartner müsste dagegen eine Orientierungsverteilung ähnlich zu MEF-WT zu sehen sein.

4.7 Die Signalkaskade bei zyklischer Dehnung

Die an der Reorientierung durch zyklische Dehnung beteiligten Signalkaskaden sind trotz intensiver Forschung noch nicht sicher geklärt. Die Mechanosensorik findet dabei vermutlich in erster Linie in den FA [39, 42] unter Beteiligung von FAK und Src statt [82, 96]. Die vorliegende Arbeit zeigt jedoch, dass neben diesen Kinasen auch die weiteren ubiquitär exprimierten SFK, Yes und Fyn, an diesem Signalweg beteiligt sind. Des Weiteren kann auf Basis der hier durchgeführten Arbeiten sowie unter Bezugnahme bereits veröffentlichter Daten anderer Arbeitsgruppen [101] angenommen werden, dass p130Cas eines der zentralen mechanosensorischen Proteine darstellt, dass bei Dehnung durch Src phosphoryliert wird. Die nächsten Signalproteine, die in der zellulären Reorientierung beteiligt sind, sind bisher jedoch nur indirekt nachweisbar. An phosphoryliertes p130Cas bindet das Adapterprotein Crk welches eine Reihe weiterer Signalproteine rekrutiert. Beispiele hierfür sind C3G und Dock1. Diese GEF Proteine können verschiedene GTPasen aktivieren, die eine Vielzahl weiterer Signalwege oder Kinasen aktivieren können [13].

Die Abl-Kinase stellt ein Beispiel für einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar: Durch die Aktivierung von Src wird die Kinase aktiviert welche CrkII phosphoryliert und dadurch inaktiviert. Dies kann jedoch auch dazu führen, dass die Signalwirkung verstärkt über CrkI läuft, welches statt Rac1 die kleine GTPase Rap1 aktiviert [5]. Tamada et al. konnten an isoliertem Zytoskelett zeigen, dass wenn dieses gedehnt wird, die GTPase Rap1

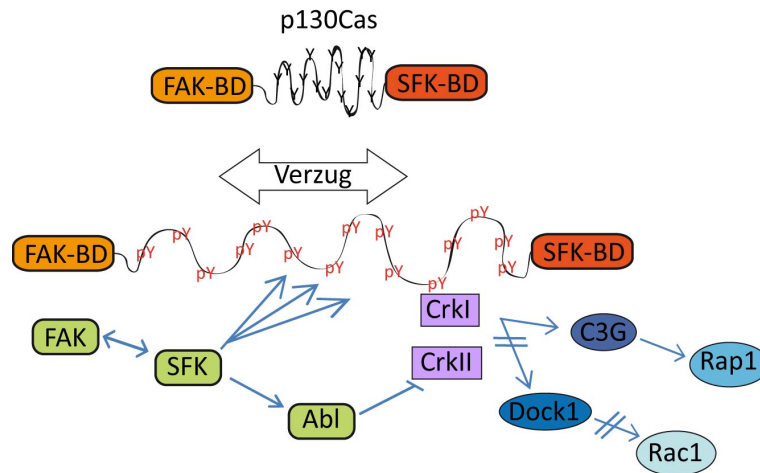


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der möglichen Zusammenhänge der in dieser Arbeit untersuchten Proteine. p130Cas ist dabei der zentrale Ausgangspunkt, über den die Signalkaskade induziert wird.

aktiviert wird. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass für diese Aktivierung C3G notwendig ist [109].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beteiligten Proteine auf ihre Rolle in der Reorientierung bei zyklischer Dehnung hin untersucht. Die Beteiligung der SFK konnte durch eine verminderte Orientierung bestätigt werden. Zusätzlich zeigt die unvollständige Reorientierung von MEF-*Src*⁺⁺, dass neben *Src* auch *Yes* und *Fyn* an dieser Reorientierung beteiligt sind. Desweiteren muss, damit die Zelle der Dehnung ausweichen kann, p130Cas vorhanden sein und phosphoryliert werden können. Jedoch zeigte sich auch hier, dass MEF-SYF-Zellen deutlich weniger in der Lage waren den Reorientierungsprozess zu durchlaufen als Cas Knockout Zellen. Dies könnte auf die verschiedenen genetischen Hintergründe zurück zu führen sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass neben p130Cas auch weitere Signalwege durch zyklische Dehnung aktiviert werden können. Paxillin oder Talin/Vinculin sind hierfür diskutierte Optionen.

5 Anhang

5.1 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------|--|
| Abb. | Abbildung |
| Abl1 | Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1 |
| Abl2 | Abelson-related gene |
| AF | Alexa Fluor |
| AG | Arbeitsgruppe |
| Arp2/3 | Actin-Related Proteins2 und 3 |
| BP | Bandpassfilter |
| bzw. | beziehungsweise |
| C3G | Crk SH3-domain-binding guanine-nucleotide releasing factor, Rapgef1 |
| ca. | circa |
| Cas | Crk associated Substrate, p130Cas, BCAR1, Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 |
| cDNA | complementary (komplementäre) DNA |
| CRK | CT10 Regulator of a Tyrosine Kinase |
| CSK | C-src tyrosine kinase |
| d. h. | das heisst |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagles Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleic acid Desoxyribonucleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| Dock1 | Dock180, Deducator of cytokinesis |
| E | Glutaminsäure, Glu |
| E(C)GM | Endothelial (Cell) Growth Medium |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetic acid |
| EGTA | Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid |
| ERK1 | Extracelullar signal-Regulated Kinase, MAPK3 |
| ERK2 | Extracelullar signal-Regulated Kinase, MAPK1 |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |

| | |
|---------|---|
| F | Phenylalanin; Phe |
| FA | Fokale Adhäsion(en) |
| FAK | Fokale Adhäsions Kinase |
| FAT | Fokal Adhesion Targeting, FA Zielsequenz |
| FERM | 4.1 protein, Ezrin, Radixin unnd Moesin |
| FKS | Fötale Kälberserum |
| FN | Fibronektin |
| FRAP | Fluorescence Recovery After Photobleaching |
| FRET | Förster Resonance Energy Transfer, Förster Resonanzenergietransfer |
| FX | Fokalkomplex(e) |
| g | Erdanziehungskraft |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GEF | Guanin Nucleotide Exchange Factor, Guanin Austausch Faktor |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GFP | Grün Fluoreszierendes Protein |
| Gl. | Gleichung |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunden |
| HFT | Hauptfarbteiler |
| HUVEC | Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Humane Nabelschnurendothelzellen |
| kDa | Kilo Dalton |
| KS Test | Kolmogorov-Smirnov Test |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinasen |
| LP | Langpassfilter |
| MAPK | Mitogen-activated Protein Kinasen |
| MEF | Mouse Embryonic Fibroblast, Fibroblast aus embryonaler Maus |
| MEK | MAPK and ERK kinase |
| min | Minuten |
| NC | Negativ Control, Negativkontrolle |
| p.a. | pro analysi |
| PBS | Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase Chain Reaction, Polymerase Ketten Reaktion |
| PDGF(R) | Platelet Derived Growth Factor (Receptor) |
| PDMS | Polydimethylsiloxan |
| PFA | Para-Formaldehyd |
| PI3K | Phosphatidylinositol 3-kinases |

| | |
|------------------|--|
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate |
| ppb | Parts per billion, Teile pro Milliarde |
| pY | Phospho-Tyrosin |
| qRT | quantitative RealTime |
| RNA | Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfat |
| SFK | Src-Familie der Kinasen |
| SH | Src Homology |
| Src | c-Src, pp60Src, Rous Sarcoma Virus |
| SOS | Son Of Sevenless |
| SYF | Src, Yes und Fyn |
| TBS(T) | Tris Buffered Saline (Tween-20) |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| u.a. | unter anderem |
| ü.N. | über Nacht |
| VASP | Vasodilator Stimulated Protein |
| WT | Wildtyp |
| Y | Tyrosin, Tyr |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZS | Ziegenserum |

5.2 Materialien

5.2.1 Chemikalien

Das verwendete Wasser wurde mit einer Wasseraufbereitungsanlage (Milli-Q, Typ „Gradient A10“, Millipore, Billerica, MA, USA) aufbereitet (18,2 MΩ, max. 3 ppb TOC-Gehalt). Zur Aufreinigung oder Verdünnung von RNA bzw. siRNA wurde RNase-freies Wasser verwendet, das im RNeasy Kit oder bei siRNA im Lieferumfang enthalten war.

| | |
|---|---------------------------|
| (3-Aminopropyl)triethoxysilane | Sigma, Taufkirchen |
| 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) | Sigma, Taufkirchen |
| 5-Brom-4-Chlor-3-indoxylphosphat (BCIP/NBT) | Sigma, Taufkirchen |
| Acrylamid | Sigma, Taufkirchen |
| Ammoniumperoxidsulfat (APS) | Sigma, Taufkirchen |
| Ampicillin | Sigma, Taufkirchen |
| Bis-Acrylamid | Sigma, Taufkirchen |
| Bromphenolblau | Sigma, Taufkirchen |
| Dulbecco's Modified Eagles Medium, High-Glucose (DMEM) | Sigma, Taufkirchen |
| Dithiotreitol (DTT) | Applichem, Darmstadt |
| Endothelial basal medium 2 (EBM-2) | Lonza, Köln |
| Endothelial Cell Growth Medium (ECGM) | Promocell, Heidelberg |
| Ethanol, p.a. | Merck, Darmstadt |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) | Sigma, Taufkirchen |
| Ethylenglykol-bis(aminoethyl-ether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) | Sigma, Taufkirchen |
| Fetal Bovine Serum, Fötales Kälberserum (FKS) | Sigma, Taufkirchen |
| Fibronectin aus humaner Plazenta | BD Bioscience, Heidelberg |
| FluoMount | Sigma, Taufkirchen |
| Glukose | Sigma, Taufkirchen |
| Glycerin | Sigma, Taufkirchen |
| Glyzin | Sigma, Taufkirchen |
| Isopropanol (2-propanol) | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid (KCl) | Sigma, Taufkirchen |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Sigma, Taufkirchen |
| LB (Lysogeny Broth)-Pulver | Sigma, Taufkirchen |

| | |
|---|-----------------------------------|
| Lipofectamine 2000 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Magermilch-Pulver | Sigma, Taufkirchen |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂) | Sigma, Taufkirchen |
| Marker P2208S | New England Biolabs, Frankfurt |
| Marker 310007 | GeneOn, Ludwigshafen |
| MES 2(N-Morpholino)-ethansulfonsäure | Sigma, Taufkirchen |
| Methanol | KMF, Lohmar |
| Midi-Prep Kit | Qiagen, Hilden |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumdeoxycholat | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Sigma, Taufkirchen |
| Para-Formaldehyd-Lösung 37 % (PFA) | Merck, Darmstadt |
| Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) | Sigma, Taufkirchen |
| Phalloidin Alexa 488 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Phalloidin Alexa 546 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Phalloidin Alexa 633 | Invitrogen, Karlsruhe |
| Phosphatase-Inhibitor Cocktail (P5726) | Sigma, Taufkirchen |
| Protease-Inhibitor Cocktail (P8340) | Sigma, Taufkirchen |
| QuantiTect Rev. Transcription Kit | Qiagen, Hilden |
| Reduziertes Triton X-100 | Qiagen, Hilden |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| Salzsäure, rauchend 37 % (HCl) | Merck; Darmstadt |
| Sylgard 184 Silicone Elastomere Kit | Dow Corning, Wiesbaden |
| TaqMan PreAmp Master Mix | Applied Biosystems |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Sigma, Taufkirchen |
| Tris | Sigma, Taufkirchen |
| Tris-HCl | Sigma, Taufkirchen |
| Triton X-100 | Sigma, Taufkirchen |
| Trypsin/EDTA (0,5 % / 0,2 %) | Sigma, Taufkirchen |
| Tween 20 | Sigma, Taufkirchen |

5.2.2 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper

| Bezeichnung | Wirt | Bestell- nummer | Hersteller |
|--|-----------|--------------------|--|
| α -Tubulin, monoklonaler Antikörper mAB (YL 1/2) | Ratte | MAB1864 | Sigma, Taufkirchen |
| C3G | Maus | sc-17840 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| Crk I+II | Maus | 610035 | BD Bioscience, Heidelberg |
| Crk II | Kaninchen | sc-289 | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| p130Cas | Maus | 610271 | Chemicon, Hofheim |
| Phospho-CrkII (Y221) | Kaninchen | 3491 | Cell Signaling, Heidelberg |
| Phospho-Tyrosin mAB (PY20) | Maus | 610000 | BD Bioscience, Heidelberg |
| Phospho-Vinculin (pY100) polyclonal | Kaninchen | Ab1959 | Chemicon, Hofheim |
| Phospho-p130Cas (Y165) | Kaninchen | 4015 | Cell Signaling, Heidelberg |
| Phospho-p130Cas (Y410) | Kaninchen | 4011 | Cell Signaling, Heidelberg |
| Vinculin mAB | Maus | V9131 | Sigma, Taufkirchen |

Sekundäre Antikörper

| Bezeichnung | Wirt | Nummer | Hersteller und Bestellnummer |
|--|-------|--------|---------------------------------|
| Alkaline Phosphatase anti Kaninchen | Ziege | A3812 | Sigma, Taufkirchen |
| Alkaline Phosphatase anti Maus | Ziege | A3562 | Sigma, Taufkirchen |
| Alkaline Phosphatase anti Ratte | Ziege | A8438 | Sigma, Taufkirchen |

| | | | |
|--------------------------------|-------|-------------|---|
| Cy3 anti Maus | Ziege | 115-166-062 | Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA |
| Alexa Fluor 488 anti Kaninchen | Ziege | | Invitrogen, Karlsruhe |
| Cy2 anti Maus | Ziege | | Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA |

5.2.3 siRNAs und TaqMan Sonden

TaqManSonden

| Bezeichnung | Genbezeichnung | Bestellnummer |
|-------------|----------------|---------------|
| p130Cas | BCAR1 | Mm00487210_m1 |
| GAPDH | GAPDH | Mm99999915_g1 |
| Abl1 | Abl1 | Mm00802029_m1 |
| C3G | Rapgef1 | Mm00475208_m1 |
| Dock1 | Dock180 | Mm01269874_m1 |

siRNAs

Alle siRNAs wurden von Qiagen bezogen und die Sequenzen können unter der Bestellnummer nachgeschlagen werden.

| Bezeichnung | | Name | Bestellnummer |
|-------------|----|--------------|---------------|
| Abl1 | #1 | Mm_Abl1_1 | SI00887131 |
| Abl1 | #2 | Mm_Abl1_2 | SI00887138 |
| p130Cas | #1 | Mm_Bcar1_1 | SI00188951 |
| p130Cas | #3 | Mm_Bcar1_3 | SI00188965 |
| Dock1 | #1 | Mm_Dock1_1 | SI00982527 |
| C3G | #5 | Mm_Rapgef1_5 | SI02676205 |
| C3G | #6 | Mm_Rapgef1_6 | SI02696904 |

5.2.4 Puffer, Medien und Lösungen

Die Puffer wurden mit HCl und NaOH auf einen pH eingestellt, sofern angegeben.

| | |
|-------------------------------------|---|
| 5-fach SDS-Ladepuffer | 250 mM Tris-HCl 500 mM DTT 10 % SDS 1 % Bromphenolblau 50 % Glycerin |
| Acrylamid-Lösung (30%) | 30 g Acrylamid 0,8 g Bis-Acrylamid |
| CB (Zytoskelett-Puffer) | 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 5 mM Glukose 5 mM EGTA 10 mM MES pH 6,1 |
| DMEM + + | DMEM (Sigma) 10 % FKS 1 % Penicillin/Streptomycin |
| Lämmli-Puffer | 25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 0,1 % SDS |
| PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) | 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,47 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4 |
| Protein Transfer-Puffer | 25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 20 % Methanol |

| | |
|----------------------------|---|
| Trenngel 8% | 4,6 ml H ₂ O 2,7 ml 30 % Acrylamid-Lösung 2,5 ml Trenngel-Puffer 100 µl 10 % SDS-Lösung 100 µl 10 % APS 6 µl TEMED |
| Trenngel 10% | 4 ml H ₂ O 3,3 ml 30 % Acrylamid-Lösung 2,5 ml Trenngel-Puffer 100 µl 10 % SDS-Lösung 100 µl 10 % APS 4 µl TEMED |
| Trenngel 12 % | 3,3 ml H ₂ O 4 ml 30 % Acrylamid-Lösung 2,5 ml Trenngel-Puffer 100 µl 10 % SDS-Lösung 100 µl 10 % APS 4 µl TEMED |
| Trenngel Puffer | 1,5 ml Tris 0,4 % SDS pH 8,8 |
| Sammelgel | 4,6 ml H ₂ O 2,7 ml 30 % Acrylamid-Lösung 2,5 ml Trenngel-Puffer 0,1 ml 10 % SDS-Lösung 0,1 ml 10 % APS 0,04 ml TEMED |
| Sammelgelpuffer | 1 M Tris 0,4 % SDS |
| TBS (Tris Buffered Saline) | 100 mM Tris 300 mM NaCl |

| | |
|--------------------|---|
| TBST (TBS Tween20) | 100 mM Tris 300 mM NaCl 0,1 % Tween20 |
| Zellysepuffer | 10 mM Tris 158 mM NaCl 1 mM EDTA 0,1 % SDS 1 % Natriumdeoxycholat 1 % reduziertes Triton X-100 pH 7,2 |

5.2.5 Verbrauchsmaterial

| | |
|---|--------------------------------|
| Deckgläser Ø 15 mm #0 | Menzel, Braunschweig |
| Filterpapiere | VWR, Darmstadt |
| Homogenisatorsäulen (QiaShredder) | Qiagen, Hilden |
| Nylonmembranen (Hybond ECL-Membran) | Amersham, Buckinghamshire, UK |
| Objektträger | VWR, Darmstadt |
| Parafilm | VWR, Darmstadt |
| PCR Abdeckfolien | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Pipettenspitzen (div. Größen) | Eppendorf, Wesseling/Bedzdorf |
| Pipettenspitzen mit Filter (div. Größen) | Eppendorf, Wesseling/Bedzdorf |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml | Eppendorf, Wesseling/Berzdorf |
| Reaktionsgefäße 2 ml | Eppendorf, Wesseling/Berzdorf |
| Reaktionsgefäße 15 ml | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße 50 ml | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| RNeasy RNA Isolations Kit | Qiagen, Hilden |
| Schalen, 6 und 12-Loch (Well) (Cellstar) | Greiner Bio-one, Frickenhausen |
| Schalen, 48-Loch (Well) | Applied Biosystems, Darmstadt |
| Zellkulturflaschen 25 cm ² | BD Bioscience, Heidelberg |
| Zellkulturflaschen 75 cm ² | BD Bioscience, Heidelberg |

Zellschaber

BD Bioscience, Heidelberg

5.2.6 Geräte

Die Zugapparaturen sind für das Institut hergestellt worden. Eine genauere Beschreibung findet sich in Faust et al. 2011 und in Abschnitt 2.5.2.

| Gerät | Bezeichnung | Hersteller |
|-------------------------------|--------------------------------------|--|
| Begasungs- brutschrank | Typ B12 | Heraeus, Osterode |
| Inverses Mikroskop | Axio Observer Z.1 (Cell Observer) | Carl Zeiss, Jena |
| Inverses Mikroskop | Axiovert 200 | Carl Zeiss, Jena |
| Inverses Mikroskop | Axiovert 40 CFL | Carl Zeiss, Jena |
| Konfokales Mikroskop (LSM) | 510 Meta | Carl Zeiss, Jena |
| Mikroskopkamera | Axiocam MRM | Carl Zeiss, Jena |
| Mikroskopkamera | Orca ER CCD | Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan |
| Objektiv | PlanApochromat 63x NA 1,4 Öl DIC | Carl Zeiss, Jena |
| Objektiv | PlanNeofluar 40x NA 1,3 Öl DIC | Carl Zeiss, Jena |
| Photometer | ND-1000 | Nano Drop Products, Wilmington, USA |
| Real-Time PCR Gerät | StepOne RealTime PCR | Applied Biosystems |
| Sterilbank | HeraSafe | Heraeus, Osterode |
| Vakuum-Pumpe | RC6 | Vucuumbrand, Wertheim |
| Wärmeschrank | E400 | Memmert, Schwabach |
| Wasserbad | WNB-22 | Memmert, Schwabach |
| Zentrifuge | 3-16K | Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode |
| Zentrifuge | 5415-R | Eppendorf, Wesseling/Berzdorf |
| Zentrifuge | 5415-D | Eppendorf, Wesseling/Berzdorf |

Literaturverzeichnis

- [1] M. Abercrombie, J. E. Heaysman, and S. M. Pegrum. The locomotion of fibroblasts in culture. IV. Electron microscopy of the leading lamella. *Experimental Cell Research*, 67(2):359–67, August 1971.
- [2] R. Abu-Ghazaleh, J. Kabir, H. Jia, M. Lobo, and I. Zachary. Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. *The Biochemical Journal*, 360(Pt 1):255–64, November 2001.
- [3] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular Biology of the Cell, 4th Edition*. Garland Science, 2008.
- [4] A. Aleshin and R. S. Finn. SRC: a century of science brought to the clinic. *Neoplasia*, 12(8):599–607, August 2010.
- [5] S. Antoku and B. J. Mayer. Distinct roles for Crk adaptor isoforms in actin reorganization induced by extracellular signals. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 22):4228–38, November 2009.
- [6] J. Bain, H. McLauchlan, M. Elliott, and P. Cohen. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *The Biochemical Journal*, 371(Pt 1):199–204, April 2003.
- [7] C. Bakolitsa, D. M. Cohen, L. A. Bankston, A. A. Bobkov, G. W. Cadwell, L. Jennings, D. R. Critchley, S. W. Craig, and R. C. Liddington. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature*, 430(6999):583–6, July 2004.
- [8] N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biology*, 3(5):466–72, May 2001.
- [9] A. Banno and M. H. Ginsberg. Integrin activation. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 2):229–34, April 2008.

- [10] R. Begum, M. S. A. Nur-E-Kamal, and M. A. Zaman. The role of Rho GTPases in the regulation of the rearrangement of actin cytoskeleton and cell movement. *Experimental & Molecular Medicine*, 36(4):358–66, August 2004.
- [11] A. Bershadsky, M. Kozlov, and B. Geiger. Adhesion-mediated mechanosensitivity: a time to experiment, and a time to theorize. *Current Opinion in Cell Biology*, 18(5):472–81, October 2006.
- [12] J Bigün and GH Granlund. Optimal Orientation Detection of Linear Symmetry. *Proceedings of the IEEE First International Conference on Computer Vision: London, Great Britain*, pages 434–438, 1987.
- [13] R. B. Birge, C. Kalodimos, F. Inagaki, and S. Tanaka. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. *Cell Communication and Signaling*, 7:13, January 2009.
- [14] S. M. Bockholt and K. Burridge. An examination of focal adhesion formation and tyrosine phosphorylation in fibroblasts isolated from src-, fyn-, and yes- mice. *Cell Adhesion and Communication*, 3(2):91–100, May 1995.
- [15] P. R. J. Bois, B. P. O’Hara, D. Nietlispach, J. Kirkpatrick, and T. Izard. The vinculin binding sites of talin and alpha-actinin are sufficient to activate vinculin. *Journal of Biological Chemistry*, 281(11):7228–36, March 2006.
- [16] J. L. Bos. Linking Rap to cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(2):123–8, April 2005.
- [17] R. C. Buck. Reorientation response of cells to repeated stretch and recoil of the substratum. *Experimental Cell Research*, 127(2):470–4, June 1980.
- [18] P. Burt and E. Adelson. The Laplacian Pyramid as a Compact Image Code. *IEEE Transactions on Communications*, 31(4):532–540, April 1983.
- [19] M. B. Calalb, T. R. Polte, and S. K. Hanks. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Molecular and Cellular Biology*, 15(2):954–63, February 1995.
- [20] D. A. Calderwood, R. Zent, R. Grant, and D. J. G. Rees. The talin head domain binds to integrin β subunit cytoplasmic tails and regulates integrin *Journal of Biological Chemistry*, 274(49):28071–28074, 1999.
- [21] L. A. Cary, R. A. Klinghoffer, C. Sachsenmaier, and J. A. Cooper. SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation,

- cell migration, and cell spreading. *Molecular and Cellular Biology*, 22(8):2427–40, April 2002.
- [22] C. K. Choi, M. Vicente-Manzanares, J. Zareno, L. A. Whitmore, A. Mogilner, and A. R. Horwitz. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nature Cell Biology*, 10(9):1039–50, September 2008.
- [23] D. Chuderland and R. Seger. Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Molecular Biotechnology*, 29(1):57–74, January 2005.
- [24] M. Cohen, E. Klein, B. Geiger, and L. Addadi. Organization and adhesive properties of the hyaluronan pericellular coat of chondrocytes and epithelial cells. *Biophysical Journal*, 85(3):1996–2005, September 2003.
- [25] J.-F. Côté and K. Vuori. GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends in Cell Biology*, 17(8):383–93, August 2007.
- [26] A. Curtis and C. Wilkinson. Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18(24):1573–83, December 1997.
- [27] P. C. Dartsch and E. Betz. Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation. *Basic Research in Cardiology*, 84(3):268–81, 1989.
- [28] P. Defilippi, P. Di Stefano, and S. Cabodi. p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends in Cell Biology*, 16(5):257–63, May 2006.
- [29] A. del Rio, R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J. M. Fernandez, and M. P. Sheetz. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*, 323(5914):638–41, January 2009.
- [30] R. A. Desai, L. Gao, S. Raghavan, W. F. Liu, and C. S. Chen. Cell polarity triggered by cell-cell adhesion via E-cadherin. *Journal of Cell Science*, 122(Pt 7):905–11, April 2009.
- [31] D. E. Discher, P. Janmey, and Y.-L. Wang. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science*, 310(5751):1139–43, November 2005.
- [32] A. Eekhoff, N. Bonakdar, J. L. Alonso, B. Hoffmann, and W. H. Goldmann. Glomerular podocytes: a study of mechanical properties and mechano-chemical signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 406(2):229–33, March 2011.

- [33] A. J. Ehrlicher, F. Nakamura, J. H. Hartwig, D. A. Weitz, and T. P. Stossel. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature*, 478(7368):260–3, October 2011.
- [34] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677–689, 2006.
- [35] H. P. Erickson. Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(21):10114–8, October 1994.
- [36] U. Faust, N. Hampe, W. Rubner, N. Kirchgeßner, S. Safran, B. Hoffmann, and R. Merkel. Cyclic Stress at mHz Frequencies Aligns Fibroblasts in Direction of Zero Strain. *PLoS one*, 6(12):e28963, January 2011.
- [37] S. M. Feller, B. Knudsen, and H. Hanafusa. c-Abl kinase regulates the protein binding activity of c-Crk. *The EMBO Journal*, 13(10):2341–51, May 1994.
- [38] P. M. Fonseca, N. Y. Shin, J. Brábek, L. Ryzhova, J. Wu, and S. K. Hanks. Regulation and localization of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation. *Cellular Signalling*, 16(5):621–629, 2004.
- [39] C. G. Galbraith and M. P. Sheetz. Forces on adhesive contacts affect cell function. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(5):566–71, October 1998.
- [40] C. G. Galbraith, K. M. Yamada, and M. P. Sheetz. The relationship between force and focal complex development. *Journal of Cell Biology*, 159(4):695–705, November 2002.
- [41] B. Geiger. A role for p130Cas in mechanotransduction. *Cell*, 127(5):879–81, 2006.
- [42] B. Geiger and A. Bershadsky. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(5):584–592, October 2001.
- [43] B. Geiger, J. P. Spatz, and A. D. Bershadsky. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(1):21–33, January 2009.
- [44] G. Giannone and M. P. Sheetz. Substrate rigidity and force define form through tyrosine phosphatase and kinase pathways. *Trends in Cell Biology*, 16(4):213–23, April 2006.

- [45] J. Golji, T. Wendorff, and M. R. K. Mofrad. Phosphorylation Primes Vinculin for Activation. *Biophysical Journal*, 102(9):2022–2030, May 2012.
- [46] T. Gotoh, S. Hattori, S. Nakamura, H. Kitayama, M. Noda, Y. Takai, K. Kaibuchi, H. Matsui, O. Hatase, and H. Takahashi. Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. *Molecular and Cellular Biology*, 15(12):6746–53, December 1995.
- [47] D. L. Guris, J. Fantes, D. Tara, B. J. Druker, and A. Imamoto. Mice lacking the homologue of the human 22q11.2 gene CRKL phenocopy neurocristopathies of DiGeorge syndrome. *Nature Genetics*, 27(3):293–8, March 2001.
- [48] K. Hayakawa, A. Hosokawa, K. Yabusaki, and T. Obinata. Orientation of smooth muscle-derived a10 cells in culture by cyclic stretching: relationship between stress fiber rearrangement and cell reorientation. *Zoological Science*, 17(5):617–624, 2000.
- [49] K. Hayakawa, N. Sato, and T. Obinata. Dynamic reorientation of cultured cells and stress fibers under mechanical stress from periodic stretching. *Experimental Cell Research*, 268(1):104–14, August 2001.
- [50] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams. Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10):986–94, October 1996.
- [51] A. Herreman, L. Serneels, W. Annaert, D. Collen, L. Schoonjans, and B. De Strooper. Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, 2(7):461–2, July 2000.
- [52] J. D. Hildebrand, M. D. Schaller, and J. T. Parsons. Identification of sequences required for the efficient localization of the focal adhesion kinase, pp125FAK, to cellular focal adhesions. *Journal of Cell Biology*, 123(4):993–1005, November 1993.
- [53] K. M. Hodivala-Dilke, A. R. Reynolds, and L. E. Reynolds. Integrins in angiogenesis: multitasking molecules in a balancing act. *Cell and Tissue Research*, 314(1):131–44, October 2003.
- [54] H. Honda, T. Nakamoto, R. Sakai, and H. Hirai. p130Cas, an assembling molecule of actin filaments, promotes cell movement, cell migration, and cell spreading in fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262(1):25–30, 1999.
- [55] H. Honda, H. Oda, T. Nakamoto, Z. Honda, R. Sakai, T. Suzuki, T. Saito, K. Nakamura, K. Nakao, T. Ishikawa, M. Katsuki, Y. Yazaki, and H. Hirai. Cardiovascular

- anomaly, impaired actin bundling and resistance to Src-induced transformation in mice lacking p130Cas. *Nature Genetics*, 19(4):361–5, August 1998.
- [56] W. Huang, N. Sakamoto, R. Miyazawa, and M. Sato. Role of paxillin in the early phase of orientation of the vascular endothelial cells exposed to cyclic stretching. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 418(4):708–13, February 2012.
- [57] D. Ilić, Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada, and T. Yamamoto. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature*, 377(6549):539–44, 1995.
- [58] D. E. Ingber. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annual Review of Physiology*, 59:575–99, January 1997.
- [59] B. Jähne. *Digitale Bildverarbeitung, 6. Auflage*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005.
- [60] R. Janostiak, O. Tolde, Z. Bruhová, M. Novotny, S. K. Hanks, D. Rösel, and J. Brábek. Tyrosine Phosphorylation within the SH3 domain Regulates CAS Subcellular Localization, Cell Migration, and Invasiveness. *Molecular Biology of the Cell*, 22(22):4256–4267, September 2011.
- [61] G. Jiang, G. Giannone, D. R. Critchley, E. Fukumoto, and M. P. Sheetz. Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature*, 424(6946):334–7, 2003.
- [62] J. Jung, M.-K. Lee, Y. Jin, S.-B. Fu, J. L. Rosales, and K.-Y. Lee. Clues for c-Yes involvement in the cell cycle and cytokinesis. *Cell Cycle*, 10(9):1502–3, May 2011.
- [63] D. Kirchenbüchler, S. Born, N. Kirchgessner, S. Houben, B. Hoffmann, and R. Merkel. Substrate, focal adhesions, and actin filaments: a mechanical unit with a weak spot for mechanosensitive proteins. *Journal of Physics. Condensed Matter*, 22(19):194109, May 2010.
- [64] K. H. Kirsch, M. M. Georgescu, and H. Hanafusa. Direct binding of p130(Cas) to the guanine nucleotide exchange factor C3G. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(40):25673–9, October 1998.
- [65] E. Kiyokawa, Y. Hashimoto, S. Kobayashi, H. Sugimura, T. Kurata, and M. Matsuda. Activation of Rac1 by a Crk SH3-binding protein, DOCK180. *Genes & Development*, 12(21):3331–6, November 1998.

- [66] R. A. Klinghoffer, C. Sachsenmaier, J. A. Cooper, and P. Soriano. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *The EMBO Journal*, 18(9):2459–2471, 1999.
- [67] Y. Kobashigawa, M. Sakai, M. Naito, M. Yokochi, H. Kumeta, Y. Makino, K. Ogura, S. Tanaka, and F. Inagaki. Structural basis for the transforming activity of human cancer-related signaling adaptor protein CRK. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(6):503–10, June 2007.
- [68] W. Kolch. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(11):827–37, November 2005.
- [69] K. Küpper, N. Lang, C. Möhl, N. Kirchgeßner, S. Born, W. H. Goldmann, B. Hoffmann, and R. Merkel. Tyrosine phosphorylation of vinculin at position 1065 modifies focal adhesion dynamics and cell tractions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399(4):560–4, August 2010.
- [70] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–5, August 1970.
- [71] B. L. Langille and S. L. Adamson. Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice. *Circulation Research*, 48(4):481–8, April 1981.
- [72] J. M. Lewis, R. Baskaran, S. Taagepera, M. A. Schwartz, and J. Y. Wang. Integrin regulation of c-Abl tyrosine kinase activity and cytoplasmic-nuclear transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26):15174–9, December 1996.
- [73] Y. Lim, I. Han, J. Jeon, H. Park, Y.-Y. Bahk, and E.-S. Oh. Phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861 is crucial for Ras transformation of fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 279(28):29060–5, July 2004.
- [74] M. Lu and K. S. Ravichandran. Dock180-ELMO cooperation in Rac activation. *Methods in Enzymology*, 406:388–402, January 2006.
- [75] M. Matsuda, B. J. Mayer, Y. Fukui, and H. Hanafusa. Binding of transforming protein, P47gag-crk, to a broad range of phosphotyrosine-containing proteins. *Science*, 248(4962):1537–9, June 1990.
- [76] M. Matsuda, S. Tanaka, S. Nagata, A. Kojima, T. Kurata, and M. Shibuya. Two species of human CRK cDNA encode proteins with distinct biological activities. *Molecular and Cellular Biology*, 12(8):3482–9, August 1992.

- [77] B. J. Mayer, H. Hirai, and R. Sakai. Evidence that SH2 domains promote processive phosphorylation by protein-tyrosine kinases. *Current Biology*, 5(3):296–305, March 1995.
- [78] S. K. Mitra, D. A. Hanson, and D. D. Schlaepfer. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(1):56–68, 2005.
- [79] C. Möhl, N. Kirchgessner, C. Schäfer, K. Küpper, S. Born, G. Diez, W. H. Goldmann, R. Merkel, and B. Hoffmann. Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 66(6):350–64, July 2009.
- [80] T. Nakamoto, R. Sakai, H. Honda, S. Ogawa, H. Ueno, T. Suzuki, S. Aizawa, Y. Yazaki, and H. Hirai. Requirements for localization of p130cas to focal adhesions. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7):3884–97, July 1997.
- [81] K. Naruse, X. Sai, N. Yokoyama, and M. Sokabe. Uni-axial cyclic stretch induces c-src activation and translocation in human endothelial cells via SA channel activation. *FEBS Letters*, 441(1):111–5, December 1998.
- [82] K. Naruse, T. Yamada, X. R. Sai, M. Hamaguchi, and M. Sokabe. Pp125FAK is required for stretch dependent morphological response of endothelial cells. *Oncogene*, 17(4):455–63, July 1998.
- [83] K. Naruse, T. Yamada, and M. Sokabe. Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch. *The American Journal of Physiology*, 274(5 Pt 2):H1532–8, May 1998.
- [84] V. Niediek, S. Born, N. Hampe, N. Kirchgeßner, R. Merkel, and B. Hoffmann. Cyclic stretch induces reorientation of cells in a Src family kinase- and p130Cas-dependent manner. *European Journal of Cell Biology*, 91(2):118–128, December 2011.
- [85] T.-J. Park, K. Boyd, and T. Curran. Cardiovascular and craniofacial defects in Crk-null mice. *Molecular and Cellular Biology*, 26(16):6272–82, August 2006.
- [86] T.-J. Park and T. Curran. Crk and Crk-like play essential overlapping roles downstream of disabled-1 in the Reelin pathway. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(50):13551–62, December 2008.
- [87] S. J. Parsons and J. T. Parsons. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, 23(48):7906–9, October 2004.

- [88] M. J. Paszek, 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, and V. M. Weaver. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3):241–54, September 2005.
- [89] S. Pellegrin and H. Mellor. Actin stress fibres. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 20):3491–9, October 2007.
- [90] T. D. Pollard, W. C. Earnshaw, and J. Lippincott-Schwartz. *Cell Biology, 2nd Edition*. Saunders Elsevier, Philadelphia, PA, 2nd edition, 2008.
- [91] S. Prosser, E. Sorokina, P. Pratt, and A. Sorokin. CrkIII: a novel and biologically distinct member of the Crk family of adaptor proteins. *Oncogene*, 22(31):4799–806, July 2003.
- [92] A. J. Ridley. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends in Cell Biology*, 16(10):522–9, October 2006.
- [93] H. Rinne. *Taschenbuch der Statistik, 4. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage*. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt, 2003.
- [94] D. Riveline, E. Zamir, N. Q. Balaban, U. S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and 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. *Journal of Cell Biology*, 153(6):1175–86, June 2001.
- [95] P. J. Ruest, N. Y. Shin, T. R. Polte, X. Zhang, and S. K. Hanks. Mechanisms of CAS substrate domain tyrosine phosphorylation by FAK and Src. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22):7641–52, November 2001.
- [96] X. Sai, K. Naruse, and M. Sokabe. Activation of pp60(src) is critical for stretch-induced orienting response in fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 9:1365–73, May 1999.
- [97] Y. D. Saito, A. R. Jensen, R. Salgia, and E. M. Posadas. Fyn: a novel molecular target in cancer. *Cancer*, 116(7):1629–37, April 2010.
- [98] R. Sakai, A. Iwamatsu, N. Hirano, S. Ogawa, T. Tanaka, H. Mano, Y. Yazaki, and H. Hirai. A novel signaling molecule, p130, forms stable complexes in vivo with v-Crk and v-Src in a tyrosine phosphorylation-dependent manner. *The EMBO Journal*, 13(16):3748–56, August 1994.

- [99] A. Sato, M. Sekine, N. Virgona, M. Ota, and T. Yano. Yes is a central mediator of cell growth in malignant mesothelioma cells. *Oncology Reports*, September 2012.
- [100] M. Sattler and R. Salgia. Role of the adapter protein CRKL in signal transduction of normal hematopoietic and BCR/ABL-transformed cells. *Leukemia*, 12(5):637–44, May 1998.
- [101] Y. Sawada, M. Tamada, B. J. Dubin-Thaler, O. Cherniavskaya, R. Sakai, S. Tanaka, and M. P. Sheetz. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, 127(5):1015–26, 2006.
- [102] H. Scharr. *Optimale Operatoren in der digitalen Bildverarbeitung*. Dissertation, Universität Heidelberg, 2000.
- [103] D. D. Schlaepfer, S. K. Mitra, and D. Ilic. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1692(2-3):77–102, 2004.
- [104] T. D. Schmittgen and K. J. Livak. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6):1101–1108, June 2008.
- [105] A. Sharma and B. J. Mayer. Phosphorylation of p130Cas initiates Rac activation and membrane ruffling. *BMC Cell Biology*, 9:50, January 2008.
- [106] N.-Y. Shin, R. S. Dize, J. Schneider-Mergener, M. D. Ritchie, D. M. Kilkenny, and S. K. Hanks. Subsets of the major tyrosine phosphorylation sites in Crk-associated substrate (CAS) are sufficient to promote cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37):38331–7, September 2004.
- [107] T. Shishido, T. Akagi, A. Chalmers, M. Maeda, T. Terada, M. M. Georgescu, and H. Hanafusa. Crk family adaptor proteins trans-activate c-Abl kinase. *Genes to Cells*, 6(5):431–40, May 2001.
- [108] G. Sriram and R. B. Birge. Emerging roles for crk in human cancer. *Genes & Cancer*, 1(11):1132–9, November 2010.
- [109] M. Tamada, M. P. Sheetz, and Y. Sawada. Activation of a signaling cascade by cytoskeleton stretch. *Developmental Cell*, 7(5):709–18, November 2004.
- [110] K. Q. Tanis, D. Veach, H. S. Duewel, W. G. Bornmann, and A. J. Koleske. Two distinct phosphorylation pathways have additive effects on Abl family kinase activation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11):3884–96, June 2003.

- [111] T. Tazaki, K. Miyazaki, E. Hiyama, T. Nakamoto, R. Sakai, N. Yamasaki, Z.-I. Honda, M. Noda, N. Miyasaka, T. Sueda, and H. Honda. Functional analysis of Src homology 3-encoding exon (exon 2) of p130Cas in primary fibroblasts derived from exon 2-specific knockout mice. *Genes to Cells*, 13(2):145–57, February 2008.
- [112] S. Twarock, M. I. Tammi, R. C. Savani, and J. W. Fischer. Hyaluronan stabilizes focal adhesions, filopodia, and the proliferative phenotype in esophageal squamous carcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(30):23276–84, July 2010.
- [113] K. Y. Volokh. On tensegrity in cell mechanics. *Molecular & Cellular Biomechanics*, 8(3):195–214, September 2011.
- [114] B. Wang, T. Mysliwiec, S. M. Feller, B. Knudsen, H. Hanafusa, and G. D. Kruh. Proline-rich sequences mediate the interaction of the Arg protein tyrosine kinase with Crk. *Oncogene*, 13(7):1379–85, October 1996.
- [115] H. B. Wang, M. Dembo, S. K. Hanks, and Y. Wang. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20):11295–300, September 2001.
- [116] J. G. Wang, M. Miyazu, E. Matsushita, M. Sokabe, and K. Naruse. Uniaxial cyclic stretch induces focal adhesion kinase (FAK) tyrosine phosphorylation followed by mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288(2):356–61, October 2001.
- [117] J. H. Wang, P. Goldschmidt-Clermont, and F. C. Yin. Contractility affects stress fiber remodeling and reorientation of endothelial cells subjected to cyclic mechanical stretching. *Annals of Biomedical Engineering*, 28(10):1165–71, January 2000.
- [118] D. J. Webb, J. T. Parsons, and A. F. Horwitz. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again. *Nature Cell Biology*, 4(4):E97–100, 2002.
- [119] W. Xu, J.-L. Coll, and E. D. Adamson. Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null F9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin. *Journal of Cell Science*, 1544:1535–1544, 1998.
- [120] M. Yoshigi, L. M. Hoffman, C. C. Jensen, H. J. Yost, and M. C. Beckerle. Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *Journal of Cell Biology*, 171(2):209–15, October 2005.

- [121] R. Zaidel-Bar, C. Ballestrem, Z. Kam, and B. Geiger. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 22):4605–13, 2003.
- [122] R. Zaidel-Bar, M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society Transactions*, 32(3):416–420, June 2004.
- [123] R. Zaidel-Bar and B. Geiger. The switchable integrin adhesome. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 9):1385–8, May 2010.
- [124] E. Zamir and B. Geiger. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 20):3583–90, October 2001.
- [125] E. Zamir, B. Z. Katz, S. Aota, K. M. Yamada, B. Geiger, and Z. Kam. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *Journal of Cell Science*, 112 (Pt 1:1655–69, June 1999.
- [126] Z. Zhang, G. Izaguirre, S.-Y. Lin, H. Y. Lee, E. Schaefer, and B. Haimovich. The phosphorylation of vinculin on tyrosine residues 100 and 1065, mediated by SRC kinases, affects cell spreading. *Molecular Biology of the Cell*, 15(9):4234–47, September 2004.
- [127] J. Zhao and J.-L. Guan. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 28(1-2):35–49, June 2009.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Rudolf Merkel für die Möglichkeit, meine Arbeit an seinem Institut anzufertigen und für die stete Unterstützung.

Prof. Dr. Ulrich Kubitscheck danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Bernd Hoffmann danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, für die vielen Tips, Ideen und die stets positive Sichtweise auf Dinge.

Der iTea, Dr. Ronald Springer und Georg Dreissen, danke ich für die Hilfe mit den Programmen und der Statistik.

Simone Born danke ich für die viele Hilfe im Labor, der Etablierung der siRNA und für das gelegentlich Hinterherräumen.

Ich danke allen Kolleginnen und Kollegen am ICS 7 für die vielen Dinge im Labor- und Büroalltag und für die unterhaltsame Zeit. Ich danke der Mittagsfraktion für die spannenden und aufschlußreichen Diskussionen. Und meinem Bürokollegen Alexander Zielinski gilt mein besonderer Dank für eine wirklich sehr unterhaltsame Zeit.

Ich danke den fleissigen Korrekturlesern Kevin Küpper, Evelin Jaschinski, Christian Kleusch und Inka Lauter dafür, dass sie sich freiwillig durch meinen Satzbaudschungel gekämpft haben.

Der größte Dank gilt jedoch meiner Familie; meinen Eltern für die ständige Unterstützung und Motivation und meinem Bruder dafür, dass er mir doch immer ein Vorbild ist.

<http://www.youtube.com/watch?v=oHg5SJYRHA0>