

Zelladhäsion und -verhalten auf mikrostrukturierten Substraten mit variabler Fibronektin-Dichte

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Zhongxiang Jiang

aus Liaoning, China

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Co-Referent: Prof. Dr. Ulrich Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10. – 23.10.2009

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Institut für Zell- und Neurobiologie (Zoologie I) an der Universität Karlsruhe in der Zeit von Februar 2006 bis Mai 2009 durchgeführt.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Zhongxiang Jiang, 08. September 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Die extrazelluläre Matrix (ECM)	2
2.1.1 Erscheinungsform und Zusammensetzung der ECM	2
2.1.2 Das Fibronektin (FN).....	3
2.2 Die ECM-Rezeptoren der Integrin-Familie	5
2.2.1 Das Integrin-Heterodimer.....	5
2.2.2 Die Integrin-Aktivierung.....	6
2.2.3 Das „ <i>outside-in</i> “ Signalling	7
2.3 Zell-Matrix-Kontakte	8
2.3.1 Klassifizierung	9
2.3.2 Dynamik	10
2.4 Das Aktinzytoskelett.....	10
2.4.1 Aufbau und Organisationsformen	11
2.4.2 Regulation	13
2.5 Zellverhalten und Ligandendichte	15
2.5.1 Die initiale Zelladhäsion	15
2.5.2 Zellspreading	18
2.5.3 Zellmigration	19
2.5.4 Langzeitwirkung von Zell-Matrix-Interaktionen.....	20
2.5.5 Relevanter Ligandenabstand für Zellreaktionen	20
2.6 Der Einsatz strukturierter Substrate	21
2.7 Zielsetzung.....	23
3 Material und Methoden.....	26
3.1 Angewandte Chemikalien und Lösungsmittel	26

3.2	Herstellung mikrostrukturierter Substrate	28
3.2.1	Stempelmuster.....	28
3.2.2	Reinigung der Master und Herstellung der Stempel.....	28
3.2.3	Goldbedampfung der Deckgläser	30
3.2.4	Stempelvorgang und ECM-Beschichtung.....	31
3.2.5	Herstellung von Substraten mit definiert verminderter Fibronectin-Aktivität	32
3.3	Charakterisierung der mikrostrukturierten Substrate	33
3.3.1	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	33
3.3.2	Kritische-Punkt-Trocknung (KPT).....	34
3.3.3	Raster Elektronen Mikroskopie (REM)	35
3.3.4	Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS).....	35
3.3.5	Berechnung der effektiven Fibronectinbedeckung der Substrate.....	36
3.4	Zellkultur	37
3.4.1	Routine-Zellkultivierung	37
3.4.2	Auszählen der Zellen	37
3.4.3	Zell-Aussaat für Experimente	38
3.4.4	Transiente Transfektion der Zellen	38
3.4.5	Zeitrafferuntersuchungen zur Dynamik der Zellkontaktproteine	39
3.5	Immunohistochemie	39
3.5.1	Ablauf	39
3.5.2	Verwendete Antikörper und Färbesubstanzen	40
3.6	Quantifizierung	41
3.6.1	Verwendete Optiken zur Analyse der Präparate	41
3.6.2	Zellflächen und Kontaktmessung.....	41
3.6.3	Überbrückung antiadhäsiver Distanzen.....	43
3.6.4	Software zur Auswertung, Darstellung und statistischen Analyse.....	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Charakterisierung der μ CP-Substrate	44
4.1.1	Erfolgreicher Protein-Übertrag durch μ CP.....	45
4.1.2	ECM-Beschichtung bildet einen homogenen Monolayer.....	46

4.1.3	Kalkulation einer FN-Monolayer-Bedeckung von ca. 1000 FN-Moleküle/ μm^2	49
4.2	Zellspreading auf strukturierten Substraten	49
4.2.1	Anzahl adhärierter Zellen nimmt mit zunehmender FN-Bedeckung zu und mit FN-Verdünnung ab	50
4.2.2	Die Fähigkeit zur Distanzüberbrückung nimmt mit der FN-Verdünnung ab	51
4.2.3	Zellgröße nimmt mit der FN-Bedeckung zu und mit der FN-Verdünnung ab	54
4.2.4	Zellen benötigen für Spreadingprozess mehr Fibronectin als für Adhäsion	56
4.3	Qualitative Analysen der Zell-Matrix-Kontaktausbildung	58
4.3.1	Paxillinakkumulation im Zell-Matrix-Kontakt korreliert positiv mit FN-Ligandendichte	58
4.3.2	$\beta 1$ -Integrin-Verteilung ist von anderen Kontaktproteinen abweichend	59
4.3.3	Ligandenverdünnung ohne Einfluss auf die Verteilung der Integrinrezeptoren	62
4.4	Quantitative Analysen	64
4.4.1	$\beta 1$ -Integrin-Fläche korreliert mit effektiver Fibronectinbedeckung	64
4.4.2	Zellfläche korreliert linear mit der $\beta 1$ -Integrin-Fläche	66
4.4.3	Korrelation auf strukturierten aber nicht immer auf homogenen Substraten	66
4.5	Zeitraffer-Analysen	72
4.5.1	Dynamische Verteilung signalverarbeitender Kontaktproteine	72
4.5.2	B16-Zellen sind viel beweglicher als A549-Zellen und die Mobilität ist von der Fibronectinbedeckung abhängig	73
4.6	Zellspreading auf dem quadratischen Muster wird nur durch die FN-Verdünnung, jedoch nicht durch die Geometrie beeinflusst	75
4.6.1	Zellfläche auf quadratischem Muster ändert sich nur mit der FN-Verdünnung	75
4.6.2	Zellfläche auf dem quadratischen Muster wird allein durch FN-Verdünnung beeinflusst	77
5	Diskussion	79
5.1	Anzahl zur Verfügung stehender Liganden wird unabhängig von der Geometrie quantitativ wahrgenommen	79
5.1.1	Ligandenanzahl wird unabhängig von Zelltyp und Gewebeansprung quantifiziert	80
5.1.2	Zelltypspezifische Reaktionen bezüglich der Ligandendichte	82

5.1.3	Zellflächenänderung auf Quadratmuster nur nach Fibronektinverdünnung	84
5.2	Liganden auf strukturierten und homogenen Substraten werden unterschiedlich verrechnet.....	85
5.2.1	Unterschiedliche Verteilungsmuster der Zell-Matrix-Kontaktproteine	85
5.2.2	Integrinabhängige Ligandenverrechnung auf strukturierten, aber nicht auf homogenen Substraten.....	89
5.3	Berechnungsmodell.....	95
5.4	Ausblick	100
6	Literaturverzeichnis	102
7	Anhang.....	115
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	115
7.2	Danksagung	117
7.3	Publikationen	118
7.4	Lebenslauf	119

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Strukturmodell des Fibronektins	4
Abb. 2.2 Die Integrin-Familie	5
Abb. 2.3 Integrin-Aktivierung	7
Abb. 2.4 Unterschiedliche Organisationsformen des Aktin-Zytoskeletts	12
Abb. 2.5 Komponente der integrinvermittelten Signalverarbeitung	25
Abb. 3.1 Quadrat-Flächen-Stempelmuster	29
Abb. 3.2 <i>Dot</i> -Stempelmuster	30
Abb. 3.3 Schematische Darstellung der Stempel- und Substratherstellung	32
Abb. 3.4 Schwellenwertabhängige Quantifizierung der Zell- und Kontaktfläche	42
Abb. 4.1 Erfolgreiche geometrische Proteinanordnung	46
Abb. 4.2 AFM-Analyse demonstriert konstante Schichthöhe trotz unterschiedlichem Anteil von aktivem Fibronektin	47
Abb. 4.3 XPS-Analyse demonstriert Fibronektin-Schichtdicke von ca. 3 nm	48
Abb. 4.4 Anzahl adhärierter Zellen nimmt mit der FN-Bedeckung zu und mit der Verdünnung ab	50
Abb. 4.5 Zellen überbrücken nach FN-Verdünnung geringere antiadhäsive Distanzen (1)	52
Abb. 4.6 Zellen überbrücken nach FN-Verdünnung geringere antiadhäsive Distanzen (2)	53
Abb. 4.7 Zellfläche nimmt sowohl mit der effektiven als auch mit der geometrischen FN-Bedeckung zu	55
Abb. 4.8 Für Zellspreading wird höhere Fibronektindichte als für Adhäsion benötigt.....	57
Abb. 4.9 Paxillin-Kontaktausbildung ist von Fibronektin-Ligandendichte abhängig.....	59
Abb. 4.10 β 1-Integrin-Lokalisation ist von Adapter- und Signallingproteinen abweichend	61
Abb. 4.11 Unveränderte Integrinverteilung auf Substraten mit 100% und 50% aktivem Fibronektin	63
Abb. 4.12 Zellfläche und β 1-Integrin-Fläche korreliert mit effektiver FN-Bedeckung	65
Abb. 4.13 Zellfläche korreliert linear mit der β 1-Integrin-Fläche.....	66
Abb. 4.14 Lineare Korrelation zwischen Zellfläche und benutztem Fibronektin sowie β 1-Integrin, aber nicht zwischen Integrin und benutztem Fibronektin.....	67

Abb. 4.15 Generelle Korrelation auf strukturierten Substraten.....	69
Abb. 4.16 Zeitrafferaufnahme zeigt an Signalverarbeitung beteiligte Zellkontaktproteine	73
Abb. 4.17 Migrationsrate ist abhängig vom Zelltyp und von der Substratbedeckung	74
Abb. 4.18 Zellspreading auf quadratischen Mustern mit verschiedenen FN-Verdünnungen	76
Abb. 4.19 A549-Zellfläche ist auf Quadrat-Muster von FN-Verdünnung abhängig	78
Abb. 5.1 Arbeitshypothese für die Kontrolle der Zellfläche durch die Ligandendichte	90
Abb. 5.2 Modifiziertes Rezeptorsättigungsmodell	98

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Zellverhalten aufgrund unterschiedlicher ECM-Ligandendichte	16
Tab. 3.1: Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel	26
Tab. 3.2 Fibronectin-Verdünnungsschema.....	33
Tab. 3.3: Verwendete Primärantikörper	40
Tab. 3.4: Verwendete Sekundärantikörper	40
Tab. 3.5: Verwendete weitere Färbesubstanzen	41
Tab. 4.1 Determinationskoeffizienten untersuchter Parameter in Abhängigkeit vom Substrattyp und der aktiven Fibronectin-Konzentration	70
Tab. 4.2 Generelle Korrelation auf strukturierten, jedoch nicht auf homogenen Substraten.	71
Tab. 5.1 Ligandenabstand bei unterschiedlichen Fibronectinverdünnungen	87

1 Zusammenfassung

Die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix (ECM) ist nicht nur Grundlage physiologischer Vorgänge, die der Entwicklung und Erhaltung vielzelliger Organismen dienen, sondern spielt auch bei pathologischen Prozessen wie der Metastasierung eine bedeutende Rolle. Neben der biochemischen Zusammensetzung der ECM wird das Zellverhalten auch durch die Menge und die räumliche Verteilung der Liganden entscheidend beeinflusst. Um die Bedeutung der Ligandenmenge sowie der geometrischen Ligandenverteilung auf das Zellverhalten systematisch zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit strukturierte Substrate mittels *Microcontact Printing* (μ CP) hergestellt. Durch eine Kombination mit definierten Verdünnungen des zum Beschichten benutzten Fibronektins (FN) kann das Ligandenangebot präzise kontrolliert werden. Hierbei wird die gleiche effektive Fibronektinbedeckung (FN-Moleküle/ μm^2) entweder durch geometrische Strukturierung, durch homogene Fibronektinverdünnung, oder durch Kombination beider Methoden erzielt. Der Vergleich des Zellverhaltens auf diesen Substraten ermöglicht zum ersten Mal zwischen der Wirkung von Ligandenmenge und Substratgeometrie exakt zu differenzieren.

Untersuchungen bei drei Zelllinien unterschiedlichen Gewebeursprungs zeigen, dass sowohl epitheliale A549-Zellen, parenchymale BRL-Zellen als auch fibroblastenähnliche B16-Zellen bevorzugt auf Substraten mit hoher effektiver Fibronektinbedeckung adhären und gleichzeitig eine gesteigerte Fähigkeit zur Überbrückung antiadhäsiver Distanzen erhalten. Die Zellfläche korreliert unabhängig von der Geometrie allein mit der effektiven Fibronektinbedeckung. Diese Zellreaktionen basieren auf einer verstärkten integrinvermittelten Signaltransduktion in der Zelle, die durch eine zunehmende Rekrutierung der Signalproteine Paxillin und pFAK in die Zell-Matrix-Kontakte charakterisiert ist. Unabhängig von der Ligandenpräsentation korreliert sowohl auf den strukturierten als auch auf den homogenen Substraten die Menge an β 1-Integrin, Paxillin und pFAK linear mit der Zellfläche. Der Integrinrezeptor und die Kontaktproteine stehen jedoch nur auf den strukturierten, nicht auf den homogenen Substraten, in einem linearen Zusammenhang mit der Ligandendichte. Die der intrazellulären Signalverarbeitung zugrunde liegenden Mechanismen unterscheiden sich daher möglicherweise auf strukturierten und auf homogenen Substraten.

In der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal gezeigt, dass Zellen unabhängig von dem Gewebeursprung und der Substratgeometrie die absolute Menge der zur Verfügung stehenden ECM-Liganden berechnen können. Mit Hilfe dieser Resultate wird ein Rezeptorsättigungsmodell zum Erklären des von der Ligandendichte abhängigen Zellverhaltens entwickelt.

2 Einleitung

Zelladhäsion spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Gestaltbildung vielzelliger Organismen. Dabei vermittelt die Zelladhäsion nicht nur den mechanischen Zusammenhalt der Zellen untereinander, sondern beinhaltet auch die Wechselwirkung zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (ECM). Diese Interaktionen bestimmen die Architektur von Geweben und Organen und sind auch an pathologischen Prozessen wie der Wundheilung und der Tumormetastasierung beteiligt. Die Signale aus der ECM werden vordergründig über die membrangebundenen Rezeptoren der Integrin-Familie aufgenommen und durch die Aktivierung von Signalübertragungswegen ins Innere der Zellen weitergeleitet, wodurch das Zellverhalten wie Zellwachstum, Zellteilung und Genexpression gesteuert wird. Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von Zell-Interaktionen mit der ECM.

Alle Zellen des menschlichen Gewebes sind abgesehen von Blutzellen in einer adhäsionsvermittelnden ECM verankert. Für diese adhärent wachsenden Zellen garantiert die erfolgreiche Ausbildung von Zell-ECM-Adhäsionen die Aufrechterhaltung überlebenswichtiger Zellfunktionen. Erfolgt keine Interaktion mit der ECM, wird in diesen Zellen der Apoptoseprozess eingeleitet und die Zellen sterben ab. Diese spezielle Form der Apoptose wird als Anoikis bezeichnet (Frisch und Ruoslahti 1997; Grossmann 2002; Valentijn *et al.* 2004). In den folgenden Kapiteln werden die an der Zell-ECM-Adhäsion beteiligten Komponenten und ihre Funktionen ausführlich vorgestellt.

2.1 Die extrazelluläre Matrix (ECM)

Unter der ECM versteht man ein flexibles, dreidimensionales, aus adhäsiven Proteinen und Signalmolekülen bestehendes Netzwerk, das in Geweben den Raum zwischen den Zellen ausfüllt. Dabei stellt die ECM für die Zellen eine strukturgebende und physikalische Umgebung dar, die grundlegende zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Wachstum und Migration ermöglicht. Neben der Stützfunktion vermittelt die ECM die intrazelluläre Weiterleitung mechanischer oder chemischer Signale und steuert somit aktiv das Zellverhalten.

2.1.1 Erscheinungsform und Zusammensetzung der ECM

Ein besonders hoher Anteil an ECM ist im Bindegewebe enthalten. Hier trägt die Matrix zum Schutz der Zellen bei, gewährleistet die Zelladhäsion und den Zellzusammenhalt und stabilisiert die relative Position der Zellen. Die ECM kommt im Organismus abhängig von den verschiedenen funktionellen Erfordernissen in sehr unterschiedlichen Formen vor. In die Matrix kann sich beispielsweise Kalk einlagern und somit stabile Strukturen mit hoher

Festigkeit wie Knochen bilden. Die Hornhaut der Augen besteht aus einer durchsichtigen ECM, während sich Sehnen, in denen die Matrix eine seilartige Struktur annimmt, durch hohe Zugfestigkeit auszeichnen. Eine besondere Form der ECM stellt die Basallamina dar. Diese liegt an der Grenzfläche zwischen Epithel- und Bindegewebe und bildet ein engmaschiges, quasi zweidimensionales Netz mit einer Dicke von unter 100 nm. Die Basallamina fördert neben der direkten Zell-Zell-Adhäsion den Zusammenhalt der Epithelzellen.

Die ECM stellt jedoch im Gewebe kein statisches, unveränderliches Gerüst dar. In sich entwickelnden Organismen wird die ECM ununterbrochen modifiziert, abgebaut und neu synthetisiert. Auch bei erwachsenen Organismen werden, unter anderem während der Wundheilung, Bestandteile der Matrix ständig abgebaut und erneut gebildet. Pathologische Änderungen in der Anordnung der ECM können zu Krebserkrankungen und Entwicklungsschäden führen.

Die ECM besteht aus einer Vielzahl von Proteinen und Polysacchariden, die ein komplexes dreidimensionales Netzwerk bilden. Die Bestandteile der ECM werden von Zellen, die in der ECM eingebettet sind, sezerniert und bestehen im Wesentlichen aus drei Komponenten: den hoch viskosen Proteoglykanen, den unlöslichen Kollagenfasern und den löslichen Multiadhäsionsmolekülen, die für die Zelladhäsion eine sehr wichtige Rolle spielen. Multiadhäsionsmatrixproteine sind lange flexible Moleküle, die Bindungsdomänen für verschiedene Kollagentypen, andere Matrixproteine, Polysaccharide, Zelloberflächenproteine und Signalmoleküle, wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Hormone, enthalten. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die Adhäsion der Zellen an die ECM zu vermitteln.

2.1.2 Das Fibronektin (FN)

Ein wichtiger Vertreter der Multiadhäsionsmatrixproteine ist das Fibronektin (FN). Fibronektin ist ein ca. 440 kDa großes Glycoprotein, das in zwei Erscheinungsformen vorkommt. Im Blut und anderen Körperflüssigkeiten findet man es in gelöster Form und in der ECM in Form unlöslicher Fibrillen. Gelöstes Fibronektin kann auch ins Gewebe diffundieren und somit in die ECM eingebaut werden (Moretti *et al.* 2007). Fibronektin spielt eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion, Migration, Wachstum und Differenzierung der Zellen (Pankov und Yamada 2002). Seine Hauptaufgabe besteht in der Vermittlung der Zellanheftung an extrazelluläre Kollagenfasern. Dadurch können die Zellgestalt sowie die Anordnung des Zytoskeletts beeinflusst werden.

Mindestens 20 verschiedene Fibronektinketten sind mittlerweile bekannt, die von einem einzigen Fibronektin-Gen kodiert sind. Das Fibronektin-Molekül ist ein Dimer aus zwei

ähnlichen Polypeptiden, die an ihren C-Termini über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Abb. 2.1). Jede Kette besteht aus 29 - 31 Struktur-Domänen, die durch kurze Spacer-Sequenzen voneinander getrennt und in drei Gruppen eingeteilt sind (Leiss *et al.* 2008). Das Fibronectin-Dimer ist ca. 130 nm lang und 2 - 3 nm dick (Engel *et al.* 1981). Als minimale Erkennungssequenz für den Haupt-Fibronectinrezeptor (Integrin $\alpha_5\beta_1$, Kap. 2.2) dient die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD-Sequenz) in der zehnten Fibronectindomäne vom Typ III (FN III₁₀) (Pytela *et al.* 1985). Die Bindung zwischen Fibronectin und seinem Rezeptor wird durch die synergistisch wirkende Sequenz PHSRN in der benachbarten Domäne FN III₉ verstärkt (Aota *et al.* 1994; Nagai *et al.* 1991, Ochsenhirt *et al.* 2006). Sie sorgt für eine optimale Adhäsion des Hauptrezeptors an das Fibronectin. Fibronectin besitzt neben den Bindungsstellen für den Membran-Rezeptor weitere Bindungsstellen für andere Proteine, wie zum Beispiel Kollagen, Heparin, Fibrin usw. Diese Bindungsstellen ermöglichen die Lokalisierung und Verankerung der Fibronectin-Moleküle in der ECM. Durch aktive Ausbildung zellulärer Kräfte werden diese mechanischen Informationen mittels Zell-ECM-Adhäsion in die Zelle weitergeleitet.

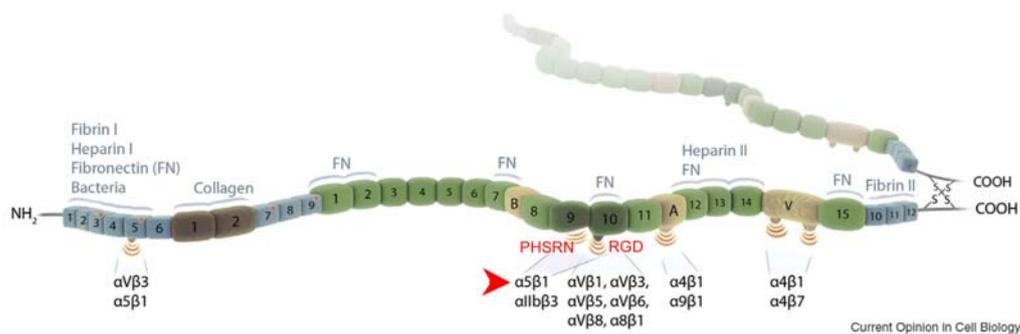


Abb. 2.1 Strukturmodell des Fibronectins

Modell eines Fibronectin-Dimers. Die beiden Fibronectinketten sind an dem Carboxyterminal über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (rechts). Jede Kette besteht aus aneinander gereihten Fibronectindomänen. Die drei Typen von Fibronectindomänen sind farblich unterschieden: FN I (blau), FN II (braun) und FN III (grün). Die Domänen A, B und V (ockerfarben) sind Extradomänen aus alternativen Splicingprozessen. Potenzielle Interaktionsbereiche mit anderen Proteinen sind angegeben (blaue Schrift). Für die Zelladhäsion wichtig sind vor allem die beiden synergistisch wirkenden Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Bindestellen in FN III₉₊₁₀ (roter Pfeil). Abbildung aus Leiss *et al.* 2008.

Ein weiteres Mitglied der Multiadhäsionsmatrixproteine ist Vitronectin (VN). Vitronectin ermöglicht die Zelladhäsion ebenfalls über die RGD-Signalsequenz und beeinflusst in ganz ähnlicher Weise wie Fibronectin das Zellverhalten. Der am besten untersuchte Rezeptor für Vitronectin ist das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin (Felding-Habermann und Cheresch 1993; Kim *et al.* 1994).

2.2 Die ECM-Rezeptoren der Integrin-Familie

Zell-ECM-Adhäsionen stellen mechanische Verbindungen zwischen den Zellen und der ECM dar, durch die die Informationsweiterleitung aus der Umgebung in die Zelle vermittelt wird. An der Ausbildung dieser Kontaktstellen sind diverse membranständige Rezeptoren beteiligt, unter denen die Rezeptorfamilie der Integrine die Hauptrezeptoren darstellen.

2.2.1 Das Integrin-Heterodimer

Integrine sind transmembranale Heterodimere mit jeweils einer α - und β -Untereinheit, die nicht kovalent miteinander verbunden sind (Hynes 2002). Sie durchspannen die Zellmembran und verbinden der ECM mit dem Zytoskelett. Somit können Informationen aus der Umgebung weitergeleitet und das Zellverhalten gesteuert werden. Bisher wurden 18 verschiedene α -Untereinheiten sowie 8 unterschiedliche β -Untereinheiten entdeckt, die sich zu 24 bekannten Kombinationen zusammenlagern können (Abb. 2.1). Diese Kombinationen weisen eine spezifische aber auch redundante Liganden-Bindung auf. Beispielsweise erkennt das Integrin- $\alpha_v\beta_3$ neben dem Hauptliganden Vitronektin ebenfalls Fibronektin, jedoch mit geringer Affinität. Des Weiteren kann ein Ligand häufig auch von mehreren Integrin-Heterodimeren erkannt werden. Das Fibronektin wird beispielsweise außer von seinem Hauptrezeptor Integrin- $\alpha_5\beta_1$ auch noch von $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ -Integrin erkannt (Hynes 1992; Plow *et al.* 2000; Wehrle-Haller und Imhof 2003).

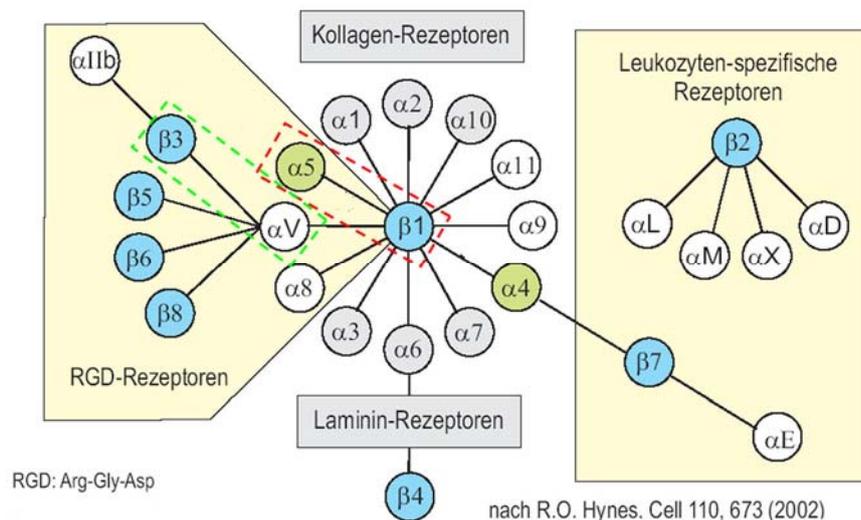


Abb. 2.2 Die Integrin-Familie

Integrine sind membrandurchspannende heterodimere Proteine aus jeweils einer α - und β -Untereinheit. Bisher sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten mit insgesamt 24 heterodimerischen Kombinationen bekannt. Diese Rezeptoren können nach ihrer Ligandenspezifität in vier Gruppen eingeteilt werden: RGD-Rezeptoren, Kollagen-Rezeptoren, Laminin-Rezeptoren und die Leukozyten-spezifischen Rezeptoren, die Zell-Zell-Interaktionen vermitteln (Hynes 2002). Die Hauptrezeptoren für Fibronektin und Vitronektin sind durch ein rotes bzw. grünes Rechteck hervorgehoben.

Jede α/β -Integrin-Kombination weist eine Ligandenbindungsspezifität auf. Die Integrine können je nach Ligandenbindung in vier Klassen eingeteilt werden: (1) RGD-Rezeptoren, die an die ECM-Komponenten mit dem RGD-Motiv (Fibronektin, Vitronektin; Kap. 2.1) binden; (2) Laminin-Rezeptoren; (3) Kollagen-Rezeptoren und (4) Integrine, die die Zell-Zell-Adhäsion vermitteln (Hynes 1992; Wiesner *et al.* 2005). Die wichtigsten Integrine für die Zell-Matrix-Interaktion sind die beiden RGD-Rezeptoren Integrin- $\alpha_5\beta_1$ und $-\alpha_v\beta_3$, die jeweils die ECM-Proteine Fibronektin und Vitronektin erkennen.

2.2.2 Die Integrin-Aktivierung

Die Liganden-Bindungsstelle der Integrine befindet sich zwischen den extrazellulären Domänen der beiden Rezeptor-Untereinheiten, die gleichzeitig zur Spezifität und Affinität des Rezeptors beitragen. Des Weiteren benötigen Integrine noch divalente Kationen für die Ligandenbindung. Integrine kommen in zwei Konformationszuständen vor. Man unterscheidet zwischen einer „*low-affinity*“ Konformation, in der die extrazellulären Domänen beider Untereinheiten gebeugt sind (Abb. 2.3 A), und einer „*high-affinity*“ Konformation, in der die beiden Domänen gestreckt sind (Abb. 2.3 B) (Xiong *et al.* 2001; Xiong *et al.* 2002). In der „*high-affinity*“ Konformation erhält der Ligand Zugang zur Bindungsstelle und in der „*low-affinity*“ Konformation wird die Bindung des Liganden blockiert. Die intrazellulären Domänen beider Integrin-Untereinheiten sind kurz und liegen im inaktiven, „*low-affinity*“ Zustand dicht aneinander (Abb. 2.3 C). Nach der Aktivierung werden die beiden Untereinheiten räumlich getrennt (Abb. 2.3 B). Das Umschalten der Integrine zwischen den beiden Konformationszuständen wird intrazellulär gesteuert. Dieses Steuerungsmodell ist unter dem Begriff des „*inside-out-signallings*“ bekannt (Hynes 2002; Ginsberg *et al.* 2005).

Bisher war lediglich Talin als einziger Aktivator der Integrine bekannt (Zhang *et al.* 2008). Das PIP_2 -System vermittelt dabei mittels Phosphorylierung die Aufhebung der Autoinhibition von Talin, die durch Interaktion der Kopfdomäne mit der Schwanzdomäne erzielt wird (Abb. 2.3 D). Die somit frei werdende F3-Subdomäne kann dann an die β -Untereinheit des Integrinrezeptors binden. Ma *et al.* zeigten 2006, dass für eine vollständige Konformationsänderung der Integrine in einen „*high-affinity*“-Zustand zusätzlich die Kindline erforderlich sind (Ma *et al.* 2006; Moser *et al.* 2008). Sowohl Talin (Critchley 2009) als auch Kindlin besitzen eine FERM-Domäne (Band 4.1, Ezrin, Radixin und Moesin) (Larjava *et al.* 2008), die wiederum aus drei Subdomänen F1, F2 und F3 besteht (Abb. 2.3 D und E). Für die Bindung an den intrazellulären Teil der β -Untereinheit ist allein die F3-Subdomäne verantwortlich (Moser *et al.* 2009). Beide Moleküle wirken synergistisch und müssen gleichzeitig vorliegen, um eine erfolgreiche Aktivierung der

Integrine zu gewährleisten. Der genaue Interaktionsmechanismus beider Integrin-Aktivatoren ist allerdings noch weitgehend unklar.

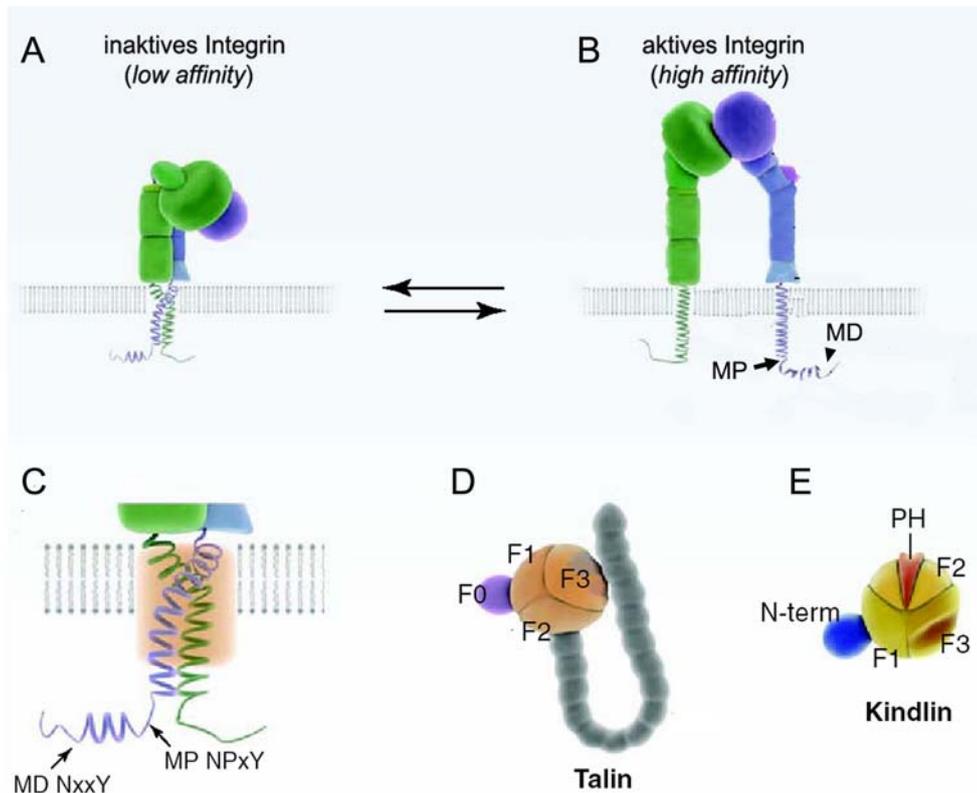


Abb. 2.3 Integrin-Aktivierung

(A) Im inaktiven Konformationszustand (*low affinity*) sind die extrazellulären Domänen des Integrin-Heterodimers zusammengefaltet bzw. abgeknickt. Die transmembranalen und intrazellulären Domänen liegen dicht nebeneinander. (B) Nach der Aktivierung (*high affinity*) strecken sich die extrazellulären Domänen und die transmembranalen und intrazellulären Domänen trennen sich räumlich. (C) Die zytosomatischen Integrindomänen weisen Bindestellen für Talin „MP“ (*Membrane Proximal Motif*) und für Kindlin „MD“ (*Membrane Distal Motif*) auf. (D) Schematische Darstellung von Talin und (E) Kindlin. Beide Proteine besitzen eine FERM-Domäne, die aus F1, F2 und F3 Subdomänen bestehen. Die F3-Subdomänen vermitteln die Bindung an die Schwanzdomänen des Integrinrezeptors. Abbildung von Moser *et al.* 2009.

2.2.3 Das „*outside-in*“ Signalling

Die Integrin-Rezeptoren stellen die Schaltstelle zwischen der ECM und dem Zytoskelett der Zelle dar. Durch sie können die Zellen ihre Umgebung wahrnehmen und entsprechend darauf reagieren (sog. „*outside-in-signalling*“). Da die intrazellulären Domänen der Integrine keine katalytische Aktivität aufweisen, wird die Informationsweiterleitung über eine Reihe von Adapter- und Enzymproteinen, den sogenannten Kontaktproteinen, gewährleistet. Integrine sind prinzipiell frei in der Zellmembran

beweglich (Duband *et al.* 1988; Schmidt *et al.* 1993). Nach dem Kontakt mit den ECM-Liganden ordnen sich die Rezeptoren zu sogenannten Clustern an. Dabei werden sie im Zellinneren über Kontaktproteine wie z.B. Talin, Kindlin, Vinculin und Paxillin usw. miteinander verlinkt und an das Aktinzytoskelett gekoppelt (Miyamoto *et al.* 1995). Somit wird eine Verbindung zwischen der ECM und dem intrazellulären Zytoskelett durch die Integrinrezeptoren realisiert. Unter den Komponenten des zellulären Zytoskeletts spielt das Aktinfilamentsystem die wichtigste Rolle in der integrinvermittelten Signalweiterleitung (Disanza *et al.* 2005), da es unter dem Einfluss der eingehenden Signale die morphologischen und mechanischen Eigenschaften der Zellen bestimmt (Kap. 2.4). Der um die Integrine entstehende Proteinkomplex bildet eine spezialisierte Struktur, den sogenannten Zell-Matrix-Kontakt. Diese Zell-Matrix-Kontakte und das Aktinzytoskelett werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

Neben der strukturellen und funktionellen Regulation des Aktinzytoskeletts werden durch Integrine jedoch auch andere Signalling-Wege gesteuert, die langfristig das Zellverhalten durch Wachstum oder Differenzierung kontrollieren (Geiger *et al.* 2009). Diese integrinvermittelte Signaltransduktion verläuft über Signalwege, die auch bei der Bindung löslicher Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren aktiviert werden (Lee und Juliano 2004; Yamada und Even-Ram 2002). Aktivierte Integrine können z.B. die Signalwege einiger Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK), PDGF (*platelet-derived growth factor*) oder epidermaler Wachstumsfaktoren (EGF) transaktivieren (Legate *et al.* 2009). Über nachgeschaltete mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPKinasen) kann nachfolgend durch Regulation der Genexpression das Zellwachstum gesteuert werden.

2.3 Zell-Matrix-Kontakte

Nach der Aktivierung der Integrin-Rezeptoren und der sich anschließenden Clusterbildung wird eine Reihe von Proteinen in den entstehenden Zell-Matrix-Kontakt rekrutiert. Mehr als 160 dieser Proteine sind bereits bekannt (Geiger *et al.* 2009). Darunter befinden sich neben Strukturproteinen auch GTPasen und andere Enzyme wie z.B. Kinasen, Phosphatasen, Proteasen oder Lipasen (Geiger *et al.* 2001; Wehrle-Haller und Imhof 2002; Zaidel-Bar *et al.* 2007; Zamir und Geiger 2001). Die koordinierte Funktion dieser Proteine gewährleistet die erfolgreiche Signaltransduktion. So wird beispielsweise nach Ligandenbindung an den aktivierten Integrin-Rezeptor die *focal adhesion kinase* (FAK) durch Autophosphorylierung aktiviert. Diese Phosphorylierungsstelle stellt eine neue Bindungsstelle für zellkontaktspezifische Proteine dar, die eine SH2-Domäne enthalten und nachfolgend neue komplexe Phosphorylierungskaskaden auslösen können (Parsons 2003; Pawson *et al.* 1993).

2.3.1 Klassifizierung

Der Begriff des „Zell-Matrix-Kontaktes“ ist eine übergeordnete Bezeichnung für alle Verbindungen zwischen der Zelle und der ECM. Diese Verbindungen unterscheiden sich hinsichtlich ihres Entstehungsortes, der Morphologie, der molekularen Zusammensetzung und ihrer Funktion. Bei Fibroblasten werden Fokalkomplexe, Fokalkontakte und fibrilläre Adhäsion unterschieden. Fokalkomplexe sind Strukturen, die, unter dem Einfluss der monomeren GTPase Rac, vor allem in den Lamellipodien gebildet werden. Sie sind klein, punktförmig und kurzlebig (Nobes und Hall 1995; Ridley *et al.* 2003; Zaidel-Bar *et al.* 2004). Fokalkomplexe bleiben auch in migrierenden Zellen relativ zum Substrat stationär. Unter dem Einfluss von RhoA oder bei Anwendung einer externen mechanischen Kraft, reifen die Fokalkomplexe zu Fokalkontakten (Clark *et al.* 1998; Riveline *et al.* 2001; Rottner *et al.* 1999).

„Klassische“ Fokalkontakte sind oft ovale Strukturen in der Zellperipherie des sich nachziehenden Zellkörpers. Sie sind deutlich größer als Fokalkomplexe (ZAMIR *ET AL.* 1999). Im Gegensatz zu den stationären Fokalkomplexen sind Fokalkontakte in der Zelle gleitend (Ballestrem *et al.* 2001; Smilenov *et al.* 1999). Exakte quantitative Unterschiede an der molekularen Zusammensetzung von Fokalkomplexen und Fokalkontakten sind bisher noch unbekannt, jedoch enthalten Fokalkontakte vor allem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, Vinculin und Paxillin und sind hoch tyrosinphosphoryliert (Zaidel-Bar *et al.* 2003). Im Gegensatz zu Fokalkomplexen enthalten sie Zyxin (Zaidel-Bar *et al.* 2004) und Tensin (Cukierman *et al.* 2002). Fokalkomplexe üben wahrscheinlich während der Zellmigration eine stärkere Kraft auf das Substrat aus als Fokalkontakte (Beningo *et al.* 2001; Beningo und Wang 2002; Juliano 2002), und dienen als Anker für Filopodien und Lamellipodien bei der Membranvorstülpung (Humphries *et al.* 2004).

Anders als Fokalkomplexe und Fokalkontakte kommen die fibrillären Kontakte eher im Zellzentrum vor und werden über $\alpha_5\beta_1$ -Integrin vermittelt. Die in Fokalkontakten typischerweise vorkommenden Proteine wie Paxillin, Vinculin, Phosphotyrosin, FAK und FAK-pY³⁹⁷ fehlen (Cukierman *et al.* 2002). Das namensgebende Merkmal der fibrillären Kontakte ist das Auftreten entlang von Fibronectinfibrillen (Olski *et al.* 2001; Zamir *et al.* 1999). Die Ausbildung der fibrillären Kontakte spielt eine wichtige Rolle in der Fibronectin-Sekretion und ECM-Fibrillogenese (Katz *et al.* 2000; Zaidel-Bar *et al.* 2004).

Zimmerman *et al.* 2004 beschrieben zudem noch eine neue, punktförmige Adhäsionsstruktur. Diese sogenannte Adhäsionsdots sind kleine, podosomenähnliche Strukturen mit einem Durchmesser von ca. 1 μm . Sie bilden einen Aktin-Kern und enthalten Integrin, Vinculin, Paxillin und Phosphotyrosin. Diese Zell-Matrix-Kontakte sind sehr kurzlebig und treten nur innerhalb den ersten Minuten während des Zellsreadings auf.

2.3.2 Dynamik

Die Zell-Matrix-Kontakte dienen der Verankerung der Zellen an die ECM und ermöglichen somit Zellspreeding und -Migration. Um ihre Funktionen zu erfüllen, unterliegen sie einem ständigen Auf- und Abbau. Diese dynamischen Umstrukturierungsprozesse sind eng mit der Organisation des Aktinzytoskeletts und den Eigenschaften der ECM verknüpft. Die Integrine sind zu Beginn der Adhäsion diffus auf der Oberfläche der Zellmembran verteilt. Nach ihrer Aktivierung und der Ligandenbindung erfolgt die Signalweiterleitung über die Rho-GTPasen und deren nachgeschaltete Effektorproteine, die die Aktin-Myosin-Interaktion verstärken. Die somit entstandenen intrazellulären Kräfte führen zur Entstehung von strukturell verstärkten Aktinfilamentbündeln und zur Clusterbildung der Integrine (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge 1996; Watanabe *et al.* 1997b; Watanabe *et al.* 1997a). Die geclusterten Integrine verstärken die ins Zellinnere weitergeleiteten Signale, wodurch noch mehr Rho-GTPasen aktiviert werden. Dieses positive „*Feed-back*“ vermittelt durch die intrazelluläre Aktomyosin-Kontraktilität die Transformation von Fokalkomplexen zu Fokalkontakten. Auch die Entstehung und Aufrechterhaltung von Fokalkomplexen ist von der Entwicklung intrazellulärer Kräfte abhängig. Werden Zellen mit Inhibitoren der Myosin-Kontraktilität behandelt, führt das zum Abbau von Fokalkomplexen (Small *et al.* 1999). Die Tatsache, dass die Kontaktreifung auch durch äußere Kraffteinwirkung induziert werden kann (Choquet *et al.* 1997; Riveline *et al.* 2001; Wang *et al.* 1993), zeigt, dass Zellen mechanosensitiv sind. Sie testen die physikalischen Bedingungen ihrer Umwelt und reagieren mit angepasster Modulation der Zell-Matrix-Kontakte oder der migratorischen Aktivität (Dobereiner *et al.* 2004; Geiger *et al.* 2009; Nicolas *et al.* 2004).

2.4 Das Aktinzytoskelett

Die morphologischen und mechanischen Eigenschaften der Zellen wie beispielsweise die äußere Zellform oder die innere physikalische Stabilität basieren auf der Organisation des Zytoskeletts. Das Zytoskelett der Zelle wird gemeinsam aus den drei Filamentsystemen der Mikrotubuli, der Intermediärfilamente und der Aktinfilamente ausgebildet. Während Mikrotubuli die Position membranumschlossener Organellen bestimmen und vor allem dem intrazellulären Transport dienen, bieten Intermediärfilamente mechanische Festigkeit und Widerstand gegen Scherkräfte. Die Aktinfilamente legen die Form der Zelloberfläche fest und sind für die Zellmigration erforderlich (Small *et al.* 1999). Alle drei Zytoskelett-komponenten sind vorübergehend oder kontinuierlich an der Organisation der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte beteiligt. Der wichtigste Effektor der integrinvermittelten Signalweiterleitung ist dabei das Aktinzytoskelett (Disanza *et al.* 2005), das strukturell dynamisch auf die Signale aus der extrazellulären Umgebung reagiert.

2.4.1 Aufbau und Organisationsformen

Das Aktinzytoskelett ist in Bündeln und Netzwerken aus einzelnen Aktin-Filamenten (F-Aktin) angeordnet, die wiederum aus globulären Aktin-Monomeren (G-Aktin) zusammengelagert sind. Aktin ist das häufigste Protein in einer eukaryotischen Zelle. Das globuläre Monomer besteht aus ca. 375 Aminosäuren und besitzt eine strukturelle Polarität. Die Aktinfilamente weisen einen Durchmesser von ca. 7 nm auf und stellen daher die dünnsten Filamente des Zytoskeletts dar. Das helixförmige Filament weist eine strukturelle und funktionelle Polarität auf. Die Polarität ist Folge des gleich gerichteten Einbaus der Aktin-Monomere bei der Polymerisation. Dabei erhält das Filament ein Plus-Ende und ein Minus-Ende (Pollard und Borisy 2003). Aktinfilamente sind dynamische Strukturen, die einem permanenten Auf- und Abbau unterliegen. An beiden Enden des Filaments kann (De-)Polymerisation stattfinden, die am Plus-Ende jedoch schneller als am Minus-Ende läuft. Die unterschiedlichen Kinetiken beruhen auf unterschiedlichen Kritischen Konzentrationen (C_c) an Aktin-Monomer für die beiden Filament-Enden. Die Kritische Konzentration ist die Konzentration, bei der G-Aktin-Monomere mit Aktinfilamenten im Gleichgewicht vorliegen, das heißt, der Anbau und der Abbau der Aktinmonomere verläuft mit gleicher Geschwindigkeit. Somit ist das Nettowachstum am Ende des Filaments bei dieser Konzentration gleich Null. Weil der C_c -Wert für das Plus-Ende kleiner als für das Minus-Ende ist, läuft prinzipiell die Polymerisation am Plus-Ende schneller. Liegt die Aktin-Konzentration zwischen den beiden C_c -Werten von Plus- und Minus-Ende, befindet sich das System im Fließgleichgewicht. Das Filament wird am Plus-Ende verlängert und am Minus-Ende abgebaut und die Länge der Filamente bleibt unverändert. Das Aktinzytoskelett unterliegt aufgrund dieser (De-)Polymerisationsvorgänge einem permanenten Umbau und ist hoch dynamisch. Durch die gesteuerte Dynamik des Aktinzytoskeletts werden die flexible Gestalt der Zellen und die Anpassung an eine sich ändernde Umgebung gewährleistet.

Einzelne Aktinfilamente können sich zu unterschiedlichen übergeordneten Strukturen organisieren. Bündel und Netzwerke sind die häufigsten Aktinfilamentstrukturen in einer Zelle. Der strukturelle Unterschied zwischen Bündeln und Netzwerken beruht auf der jeweiligen Anordnung der Aktinfilamente. Die Aktinfilamente sind im Bündel parallel und im Netzwerk überkreuzend angeordnet. Das Netzwerk liegt in einer Zelle in zwei Varianten vor. Direkt unter der Zellmembran bilden die Filamente eine dünne, quasi zweidimensionale Schicht, den Kortex. Im Zellinneren bauen sie ein dreidimensionales Gerüst auf und verleihen dem Zytoplasma eine gelartige Konsistenz. In kultivierten Zellen präsentieren sich diese Organisationsformen als Lamellipodien, Filopodien und Stressfasern (Abb. 2.4) (Faix *et al.* 2009; Small *et al.* 1999). Beispiel für netzartig organisierte Aktinstrukturen sind die Lamellipodien. Sie werden vorzugsweise am

Vorderende einer migrierenden Zelle ausgebildet. Lamellipodien stellen flache Membranausstülpungen mit fein verzweigten Aktinfilamenten hoher Dichte dar (Lai *et al.* 2008). In den Lamellipodien sind die Aktinfilamente einheitlich mit ihrem schnell polymerisierenden Plus-Ende in Richtung der Zellperipherie ausgerichtet. Durch die Verlängerung der Aktinfilamente wird die Plasmamembran nach außen geschoben und ermöglicht den Zellen somit, sich auszubreiten und zu wandern. Das Aktinnetzwerk der Lamellipodien wandert jedoch gleichzeitig aufgrund von Aktin-Myosin-Interaktionen zentripetal entgegengesetzt zur Bewegungsrichtung (Lin *et al.* 1997). Diese Bewegung wird als retrograder Fluss (engl. *retrograd flow*) bezeichnet.

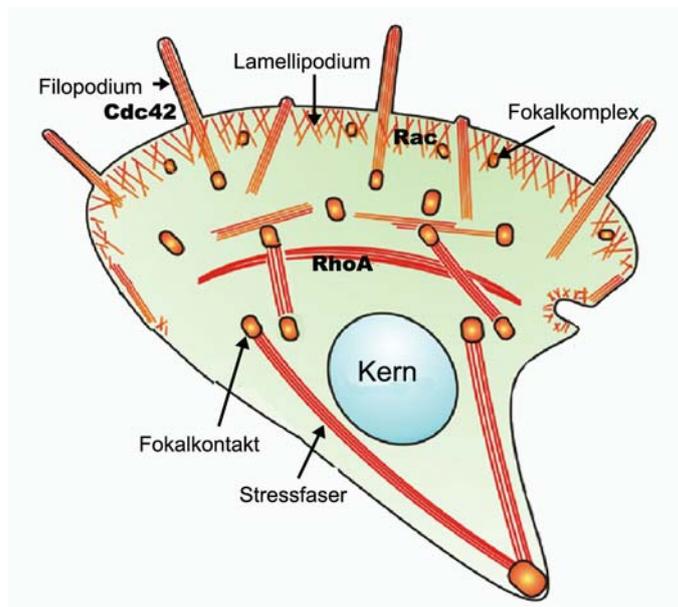


Abb. 2.4 Unterschiedliche Organisationsformen des Aktin-Zytoskeletts

Eine wandernde Zelle ist funktionell polarisiert und breitet sich mit Hilfe ihrer protrusiven, unipolaren Strukturen aus. Die engmaschig quervernetzten Aktinfilamente des Lamellipodiums drücken die Zellmembran in Bewegungsrichtung der Zelle nach vorn. Unter dem Einfluss der Rho-GTPase Cdc42 herausragende Aktinbündel des Leitsaums (engl. *leading edge*) werden als Filopodien bezeichnet. Die GTPase Rac induziert dagegen die Ausbildung kleiner Aktinfilamente und Fokalkomplexe, die den Ausgangspunkt für Rho-induzierte bipolare Aktinstressfasern bilden. Die beteiligten Rho-GTPasen sind an den Wirkungsstellen dargestellt. Modifiziert nach Faix *et al.* 2009.

Filopodien und Stressfasern bestehen aus bündelförmig angeordneten Aktinfilamenten. Die Filamente sind hier dicht aneinander gepackt und liegen parallel zueinander. Die Filopodien finden ihren Ursprung in der Regel in den Lamellipodien (Faix *et al.* 2009; Mellor 2009) und stülpen sich, umschlossen von der Zellmembran, aus dem Zellkörper heraus. Ventrale Stressfasern (Small *et al.* 1998) spannen sich dagegen an der Zellbasis zwischen zwei Zell-Matrix-Kontakten auf. Aufgrund der Initiation der Aktinpolymerisation können Lamellipodien als „Filamentfabriken“ angesehen werden (Small *et al.* 2002;

Wennerberg und Der 2004). Funktionell dienen die Filopodien der Wahrnehmung der Zellumgebung (Mattila und Lappalainen 2008). Die Tatsache, dass auch in den Filopodien Integrine die Interaktion der Zelle und der ECM vermitteln (Galbraith *et al.* 2007; Partridge und Marcantonio 2006), belegt die Bedeutung der Filopodien für das Zellspreeding und die Migration. Die Aktinfilamente sind in den Filopodien ebenso wie in den Lamellipodien mit dem Plus-Ende in Richtung der Zellperipherie orientiert. Diese Organisationsform der Aktinfilamente wird daher als unipolar bezeichnet. Die Ausbildung dieser polaren Strukturen ist unabhängig von der Verankerung der Zelle an das Substrat. Die Entstehung von Stressfasern ist hingegen auf solche Verankerungen angewiesen (Hotulainen und Lappalainen 2006) und die Aktinfilamente sind hier bipolar angeordnet. In diesen Strukturen findet man neben den entgegengesetzt orientierten Aktinfilamenten auch Myosin II, eine Klasse der Myosin-Motorprotein-Familie. Myosine können durch ATP-Hydrolyse Konformationsänderungen vollziehen und in Verbindung mit Aktin daher intrazelluläre Kraft entwickeln. Dies verleiht den Zellen die Fähigkeit zu kontrahieren. Die Entwicklung von intrazellulären Zugkräften ist für adhären wachsende Zellen essentiell. Sie trägt wesentlich zur Organisation von Zell-Matrix-Kontakten bei und ermöglicht den Zellen die Migration.

2.4.2 Regulation

Die Funktionalität des Aktinzytoskeletts hat für die Zelle eine fundamentale Bedeutung und wird hochkomplex reguliert. Sowohl die Polymerisation der Filamente als auch die Organisation zu übergeordneten Strukturen wird von einer Vielzahl von Proteinen gesteuert. Bis heute wurden über 100 dieser sog. aktinbindenden Proteine (ABPs) entdeckt, die gezielt durch Zell-Matrix-Interaktionen reguliert werden (Cameron *et al.* 2000; dos Remedios *et al.* 2003). Diese regulierenden Proteine kontrollieren neben der Aktin-Polymerisation und -Depolymerisation auch deren Nukleation, wie beispielsweise der Arp2/3-Komplex und die Formine. Die Polymerisation der Aktinfilamente wird durch die Bindung von Profilin und β -Thymosin an Aktin-Monomere beeinflusst. Während Aktin-Depolymerisationsfaktoren (ADF/Cofilin) den Filamentabbau fördern, verhindern die sogenannten *Capping*-Proteine wie beispielsweise Gelsolin durch Bindung an das Plus-Filamentende die Depolymerisation (Vicente-Manzanares *et al.* 2005; Dianza *et al.* 2005). Die ABPs, die übergeordnete Strukturen der Aktin-Filamente organisieren, werden in aktinbündelnde Proteine (engl. *bundler*) und quervernetzende Proteine (engl. *crosslinker*) unterteilt. Beispiele aktinbündelnder Proteine sind Fimbrin und α -Actinin. Filamin hat zwei eng nebeneinander liegende Aktin-Bindungsdomänen und realisiert somit die Bildung von dicht gepackten Aktinbündeln, die u.a. in Mikrovilli vorkommen. Jede Untereinheit von α -Actinin, einem antiparallelen Dimer-Protein, hat dagegen eine

einzigste Aktin-Bindungs-domäne. Diese Bindungsdomänen sind im funktionellen Dimer durch eine helikale Region getrennt. Dadurch entsteht ein lockeres Aktin-Bündel wie in den Filopodien und Stressfasern. Die Aktin-Bindungsdomänen in den quervernetzenden Proteinen wie Filamin sind prinzipiell durch flexible lange Spacersequenzen getrennt, die eine quervernetzende Organisation der Filamente vermitteln (Winder und Ayscough 2005).

Die ABPs stehen ihrerseits unter der Kontrolle spezifischer *Upstream*-Effektoren (Winder und Ayscough 2005), die durch unterschiedliche extrazelluläre Stimuli induziert werden. In diesen Signaltransduktionswegen spielt die Familie der kleinen Rho-GTPasen eine Schlüsselrolle (Dianza *et al.* 2005). Rho-GTPasen sind Mitglieder der Ras-Superfamilie und werden in sechs Unterfamilien eingeteilt (Wennerberg *et al.* 2005; Wennerberg und Der 2004). Die GTPasen wechseln zwischen einem aktiven GTP-gebundenen Zustand und einem inaktiven GDP-gebundenen Zustand. Somit kontrollieren diese Proteine als molekularer Schalter die Organisation des Zytoskeletts und der damit verbundenen zellulären Prozesse (Hall 1998; Etienne-Manneville und Hall 2002). Der Wechsel zwischen dem aktiven und dem inaktiven Zustand der Rho-GTPasen wird durch sog. GEFs (engl. *guanine nucleotide exchange factors*) und GAPs (engl. *GTPase-activating proteins*) reguliert. GEFs aktivieren die Rho-Proteine dadurch, dass sie den Austausch von gebundenem GDP durch GTP bewirken (Mcgurk *et al.* 1999; Schmidt und Hall 2002). Nach der Bindung von GTP wird die Bindungsaktivität zu den Zielproteinen, beispielsweise den Proteinkinasen, erhöht (Ridley *et al.* 2003). Die Inaktivierung der Rho-GTPasen erfolgt über GAPs, die die intrinsische GTPase-Aktivität der Proteine stimulieren (Gamblin und Smerdon 1998). Das GTP wird durch die GTPase-Aktivität hydrolysiert und das Protein geht in den inaktiven Zustand über. Bei Rho-GTPasen findet man eine dritte Klasse von regulatorischen Proteinen, die GDIs (engl. *guanine nucleotide dissociation inhibitors*). Die GDIs inhibieren sowohl den Nukleotidaustausch als auch die Assoziation der GTPasen an die Zytoplasmamembran, wo sie biologisch aktiv sind (DerMardirossian und Bokoch 2005; Dovas und Couchman 2005; Olofsson 1999). Dadurch wird die Regeneration der GTPase blockiert und die Weiterleitung der Information gestört.

Unter den kleinen Rho-GTPasen sind RhoA, Rac1 und Cdc42 die am besten untersuchten Mitglieder. Eine ihrer charakteristischen Funktionen liegt in der Regulation des Aktinzytoskeletts, wodurch sie die Zellmorphologie, -adhäsion und -migration maßgeblich beeinflussen (Hall 1998; Heasman und Ridley 2008; Schmitz *et al.* 2000). Die Aktivität dieser kleinen GTPasen unterliegt einer noch nicht ganz klar aufgeklärten räumlichen und zeitlichen Kontrolle (Bishop und Hall 2000; Etienne-Manneville und Hall 2002; Machacek *et al.* 2009). Die Aktivierung von Rac1 fördert die Aktinpolymerisation an der Zellfront (Abb. 2.4), was zur Bildung von blattartigen Lamellipodien führt. Cdc42 löst

nach der Aktivierung die Polymerisation von Aktin und die Bündelung der Filamente aus, wodurch Filopodien entstehen. Außerdem spielt Cdc42 auch bei der Polarisierung von Zellen eine Rolle (Wu *et al.* 2007), indem es im Komplex mit verschiedenen Kinasen die Positionierung des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) reguliert (Burrige und Wennerberg 2004; Schwartz 2004). Die Aktivierung von RhoA begünstigt sowohl die Bündelung von Aktin-Myosin II-Filamenten zu Stressfasern, die die Retraktion im hinteren Teil der Zelle während der Migration ermöglichen (Small *et al.* 1999; Van Aelst und D'Souza-Schorey 1997; Wennerberg und Der 2004), als auch die Zusammenlagerung von Integrinen und zugehörigen Hilfsproteinen zu Fokalkontakten.

2.5 Zellverhalten und Ligandendichte

Bei der Untersuchung des Einflusses der ECM auf das Zellverhalten spielen sowohl biophysikalische Faktoren, wie die Substratfestigkeit, als auch chemische Faktoren, wie die molekulare Zusammensetzung der ECM und die Ligandendichte der ECM-Moleküle auf dem Substrat eine Rolle. Da die *in vivo* Interaktion der Zellen mit der ECM hauptsächlich durch die Integrinrezeptoren vermittelt wird (Kap. 2.2), werden auf artifiziellen Zellkultursubstraten deren natürlichen Liganden wie Kollagen, Vitronektin, Fibronektin oder Derivate wie RGD-Peptide aufgebracht. Gegen den Integrin-Rezeptor gerichtete Antikörper können ebenso als aktivierende Integrin-Liganden dienen (Duband *et al.* 1991). Alle diese Moleküle werden in diesem Kapitel als ECM-Liganden bezeichnet. Der Einfluss der Ligandendichte auf zelluläre Verhaltensweisen wird in Tab. 2.1 zusammengefasst und in den nachfolgenden Kapiteln ausführlich diskutiert.

2.5.1 Die initiale Zelladhäsion

Das Haften einer Zelle auf dem ECM-Substrat stellt den ersten Schritt der Zell-ECM-Interaktion dar. Der Einfluss der ECM-Ligandendichte auf diesen Prozess wurde in der Vergangenheit im Bezug zur Anzahl adhärierter Zellen und deren ausgeübten Adhäsionskräfte untersucht. Mehrere Studien haben gezeigt, dass zwischen der Anzahl adhäsierter Zellen und der Ligandendichte eine positive Korrelation besteht. Mit der Zunahme der Ligandendichte binden mehr Zellen an das Substrat. Dieser Zusammenhang wurde für Fibronektin (Koo *et al.* 2002; Reyes *et al.* 2008), RGD-Peptide (Houseman und Mrksich 2001; Willcox *et al.* 2005) oder auch Kollagen (Belisario *et al.* 2005; Reyes *et al.* 2008) bei unterschiedlichen Ligandendichten gezeigt. Während Willcox *et al.* mit einer Ligandendichte von 0 - 800 RGD/ μm^2 arbeiteten, untersuchten Houseman und Mrksich diesen Effekt bei höheren Ligandendichten von 4×10^3 - 10^4 RGD/ μm^2 .

Tab. 2.1 Zellverhalten aufgrund unterschiedlicher ECM-Ligandendichte

Die Ergebnisse von Untersuchungen auf harten Zellkultursubstraten sind schwarz, auf flexiblen Substraten dagegen blau dargestellt. Wenn nicht anders angegeben, beträgt die Einheit der Ligandendichte Anzahl der Moleküle/ μm^2 . Abkürzungen: M: Migration. S: Spreading. A; Adhäsion. PD: Petrischale. FN: Fibronekin. GL: Glas. PAA: Polyacrylamid. PDMS: Polydimethylsiloxan. KG: Kollagen. LN: Laminin. RGD: Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Tripeptid. VN: Vitronektin. FA: Fokaladhäsion. k.Ä: keine Änderung. Die Pfeile $\uparrow\downarrow$ stellen eine biphasische Zellantwort dar und entsprechend \uparrow eine monophasisch zunehmende Reaktion. Die Abnahme der Zellantwort ist rot markiert.

Liganden-Typ	Dichte	Zelltyp	Zellverhalten				Referenz
			M	S	A	Sonstige	
anti- β 1 auf PD	1-100 $\mu\text{g/ml}$	Neuralleistenzellen aus Wachtelembryo	$\uparrow\downarrow$				Duband <i>et al.</i> 1991
FN auf GL	3.3-13.2 $\mu\text{g/ml}$	MEF (engl. <i>Mouse embryonal fibroblasts</i>)		\uparrow		Verkürzte lag-Phase beim Spreading	Dubin-Thaler <i>et al.</i> 2004
	0.1-3 $\mu\text{g/ml}$	NR6 Fibroblasten	$\uparrow\downarrow$	\uparrow	Stärke \uparrow	Biphasische Membran-Protrusion; EGF-abhängig	Maheshwari <i>et al.</i> 1999
	0-1400	MDA-MB-231 (engl. <i>human breast tumor cells</i>)	$\uparrow\downarrow$				Silvestre <i>et al.</i> 2009
FN auf PD	0-100 $\mu\text{g/ml}$	Primäre MEF	$\uparrow\downarrow$	\uparrow			Millon-Fremillon <i>et al.</i> 2008
	320-2600	HSMC (humane glatte Muskelzellen)	$\uparrow\downarrow$		Stärke \uparrow	Wirkt stärker als Kollagen	DiMilla <i>et al.</i> 1993
	1-100 $\mu\text{g/ml}$	Neuralleistenzellen aus Wachtelembryo	\uparrow				Duband <i>et al.</i> 1991
	0-100 $\mu\text{g/ml}$	Eosinophile Leukozyten	\downarrow	\downarrow			Holub <i>et al.</i> 2003
	235-17354	Kapillarendothelzellen				Erhöhte Proliferation und DNA-Synthese	Ingber 1990
	66-2112	HT1080 (humane Fibroblasten)			Anzahl \uparrow	Erhöhte Proliferation; Synergistische Wirkung mit Kollagen	Reyes <i>et al.</i> 2008
	0.1-250 ng/cm^2	Humane Endothelzellen				Erhöhte Überlebensrate; Schutz vor Apoptose	Re <i>et al.</i> 1994
	1-1000 ng/cm^2	Hepatozyten aus der Ratte				Erhöhte DNA-Synthese und Proliferation; Reduzierte Albumin-Sekretion	Mooney <i>et al.</i> 1992
FN auf PAA	2×10^3 - 10^4	Hepatozyten aus der Ratte		\uparrow		Reduzierte Albumin-Sekretion und -Genexpression	Semler <i>et al.</i> 2005
FN auf PDMS	10-1900	3T3		$\uparrow\downarrow$	Stärke \uparrow		Rajagopalan <i>et al.</i> 2004
	0-100 $\mu\text{g/ml}$	CHO (engl. <i>chinese hamster ovary</i>)	\downarrow	\uparrow			Rhoads und Guan 2007
KG auf GL	0.5×10^6	Glatte Muskelzellen		$\uparrow\downarrow$			Engler <i>et al.</i> 2004

Liganden-Typ	Dichte	Zelltyp	Zellverhalten				Referenz
			M	S	A	Sonstige	
KG auf PD	24-2784	HT1080 (Humane Fibroblasten)			Anzahl ↑	Erhöhte Proliferation; Synergistische Wirkung mit Fibronectin	Reyes <i>et al.</i> 2008
	0-100 µg/ml	Primäre MEF	↑↓	↑	Anzahl ↑;	Kollagen I	Millon-Fremillon <i>et al.</i> 2008
	1-10 µg/ml	QEC (Wachtel Chondrozyten)			Anzahl ↑	Kollagen II	Belisario <i>et al.</i> 2005
	300-40000	HSMC (humane glatte Muskelzellen)	↑↓		Stärke ↑	Kollagen IV	DiMilla <i>et al.</i> 1993
KG auf PAA	0-5x10 ⁶	Glatte Muskelzellen		↑↓		Kollagen I	Engler <i>et al.</i> 2004
	4-750	3T3		↑↓	Stärke ↑↓	Kollagen I	Gaudet <i>et al.</i> 2003
LN auf PD	1-1000 ng/cm ²	Hepatozyten aus der Ratte				Erhöhte DNA-Synthese und Proliferation; Reduzierte Albumin-Sekretion	Mooney <i>et al.</i> 1992
	1-1000 ng/cm ²	Hepatozyten aus der Ratte		↑			Mooney <i>et al.</i> 1995
RGD auf GL	200-1800	3T3		↑		FA-Bildung ab 420 RGD/µm ²	Arnold <i>et al.</i> 2004
	4-45 x 10 ³	3T3		↑	Anzahl ↑		Houseman und Mrksich 2001
	0-3,8 x 10 ⁵	HUVEC	k.Ä.	↑	Anzahl ↑		Liu und Tirrell 2008
	900-2 x 10 ⁵	NR6 Fibroblasten	↑		Stärke ↑		Maheshwari <i>et al.</i> 2000
	6x 10 ⁻³ -10 ³	HFF (engl. <i>human foreskin fibroblast</i>)		↑↓		Spreading ab 5 RGD/µm ² ; FA-Bildung ab 60 RGD/µm ²	Massia und Hubbell 1991
RGD auf Agargel	0-400 µM	BMSC (engl. <i>bone marrow stromal cell</i>)	↑	↑		Reduzierte chondrogene Induktion	Connelly <i>et al.</i> 2008
RGD auf Polymer	260-5270	NR6 Fibroblasten			Stärke ↑		Koo <i>et al.</i> 2002
RGD auf PAA	50-1500	3T3		↑↓	Stärke ↑		Rajagopalan <i>et al.</i> 2004
	0-900	BAEC (engl. <i>Bovine aortic endothelial cells</i>)		↑	Anzahl ↑	Spreading ab 200 RGD/µm ²	Willcox <i>et al.</i> 2005
	2,5-15 x 10 ⁴	NR6 Fibroblasten		↑	Anzahl ↑	FA-Bildung ab 83 000 RGD/µm ²	Berg <i>et al.</i> 2004
	150-1500	BAEC		↑	Frühere, vermehrte FA	Erhöhte Spreadingrate;	Reinhart-King <i>et al.</i> 2005
VN auf PD	0,1-250 ng/cm ²	Humane Endothelzellen				Erhöhte Überlebensrate; Schutz vor Apoptose	Re <i>et al.</i> 1994

Nach dem ersten Kontakt zwischen den Zellen und dem unterliegenden Substrat verstärken die Zellen durch zunehmende Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten ihre Substrathaftung. Der Einfluss der Ligandendichte auf die Adhäsionskraft wurde mit Zentrifugationsexperimenten untersucht und dabei eine verstärkte Haftungskraft bei erhöhter Ligandenbedeckung beobachtet (Liu und Tirrell 2008; Maheshwari *et al.* 2000). Die untersuchten Ligandendichten weichen in der Literatur jedoch voneinander ab. Während dieser Effekt von Maheshwari *et al.* 2000 bei einer hohen Substratbedeckung von 10^3 RGD/ μm^2 bis 10^5 RGD/ μm^2 beschrieben wurde, beobachteten Koo *et al.* 2002 diesen Zusammenhang bei deutlich niedrigeren Ligandendichten von 260 RGD/ μm^2 bis 5270 RGD/ μm^2 . Diese Korrelation der maximalen Adhäsionskraft mit der Fibronektin-Dichte wurde auch durch weitere Techniken wie dem hydrodynamischen Adhäsionsstärke-Assay gezeigt (Gallant *et al.* 2005).

Auch die Ausbildung der Zell-Matrix-Kontakte (Kap. 2.3) ist von der Ligandendichte abhängig. Massia und Hubbell 1991 zeigten, dass für die Fokalkontakt-Bildung eine Ligandendichte von mindestens 60 RGD/ μm^2 benötigt wird. Arnold *et al.* 2004 wiesen dagegen eine Mindestmenge von ca. 400 RGD/ μm^2 nach, um die Fokalkontakt-Bildung zu induzieren. Die benötigte Anzahl adhäsionsvermittelnder Liganden steigt bei Experimenten mit weichen Substraten noch erheblich an (Hersel *et al.* 2003). Beispielsweise beobachteten Berg *et al.* 2004 auf flexiblen Substraten aus Polyacrylamidgel die Fokalkontakt-Ausbildung erst ab einer Moleküldichte von 83 000 RGD/ μm^2 . Die kinetische Untersuchung der Korrelation zwischen Ligandendichte und Fokalkontakt-Ausbildung zeigte, dass auf Substraten mit höherer Ligandenzahl nicht nur eine größere Anzahl, sondern auch zeitlich früher Zell-Matrix-Kontakte ausgebildet werden (Reinhart-King *et al.* 2005).

2.5.2 Zellspreading

Nach der Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten tasten die Zellen ihre Umgebung ab und breiten sich aus (Dobereiner *et al.* 2005). Dieser Prozess setzt eine ausreichende Ligandendichte voraus und wird als Spreading bezeichnet. Das Spreading wird durch Membranausstülpungen in der Zellperipherie ermöglicht. Diese Ausstülpungen sind eine Folge der Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts, die durch die Kontaktdynamik reguliert wird. Es ist zwar allgemein anerkannt, dass das Zellspreading eng mit der Ligandendichte des Substrats korreliert, die experimentellen Beobachtungen sind jedoch kontrovers. So wurde einerseits eine einfache positive Korrelation von Zellfläche und Ligandendichte beschrieben (Mooney *et al.* 1995; Rhoads und Guan 2007), und andererseits eine biphasische Zunahme der Zellfläche beobachtet (Engler *et al.* 2004; Gaudet *et al.* 2003; Massia und Hubbell 1991; Rajagopalan *et al.* 2004). Beim biphasischen Spreadingverlauf

vergrößert sich die Zellfläche mit der Ligandendichte zunächst und nimmt nach Erreichen eines Maximums trotz ansteigender Ligandenzahl wieder ab. Auf Substraten mit Fibronectin oder RGD-Peptiden wird die maximale Zellfläche bei einer Ligandenbedeckung von ca. 200 - 600 Liganden/ μm^2 erreicht (Massia und Hubbell 1991; Rajagopalan *et al.* 2004). Dubin-Thaler *et al.* 2004 beobachteten eine zeitliche Verzögerung zwischen der initialen Adhäsion und Beginn des Spreadings. Diese als lag-Phase bezeichnete Zeitspanne wird durch höhere Ligandendichte verkürzt. Der Anteil ausgebreiteter Zellen ist im Vergleich zur Gesamtzahl adhärirter Zellen (Spreadingrate) jedoch von der Ligandendichte unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu zeigten Reinhart-King *et al.* 2005 und Millon-Fremillon *et al.* 2008 eine Zunahme der Spreadingrate mit steigender Ligandendichte. Grundsätzlich unterscheidet man isotropisches und anisotropisches Zellspreading (Dubin-Thaler *et al.* 2004). Bei isotropischem Spreading wird die runde Morphologie einer Zelle beibehalten. Bei anisotropischem Spreading weisen die Zellen dagegen sehr viele Fortsätze auf. Auf Substraten mit hoher Ligandendichte zeigen die Zellen eher ein isotropisches und bei niedriger Ligandendichte ein anisotropisches Spreading (Reinhart-King *et al.* 2005).

2.5.3 Zellmigration

Die Zellmigration ist ein elementarer Prozess adhärent wachsender Zellen. Nach der Polarisierung der Zelle aufgrund von Signalen der Umgebung werden in der Zellfront spezifische Strukturen wie Filopodien und Lamellipodien gebildet. Hat die Zelle unter den Lamellipodien neue Kontakte gebildet und verstärkt, wird die Substratverankerung im Zellhinterende aufgelöst. Durch Zellkontraktion wird der hintere Teil des Zellkörpers nachgezogen und die Zelle bewegt sich nach vorn.

Auch die Zellmigration zeigt eine Abhängigkeit von der Ligandendichte des Substrats, wie Duband *et al.* 1991 am Beispiel der Neuralleistenzellen zeigten. Während auf Fibronectin-Substraten die von den Neuralleistenzellen zurückgelegte Strecke innerhalb eines definierten Zeitraums stetig mit der Ligandendichte steigt, ist die Migration auf Substraten mit aktivierenden anti-Integrin-Antikörpern dagegen biphasisch: Hier nimmt die zurückgelegte Strecke im niedrigen Ligandendichtebereich (0,1 - 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zu und nimmt im höheren Bereich (>1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wieder ab. Das Migrationsverhalten nicht adhärent wachsender Zellen korreliert dagegen negativ mit der Ligandendichte. Holub *et al.* 2003 zeigten, dass die chemotaktische Migration eosinophiler Leukozyten auf Kultur-Platten mit der Erhöhung der Fibronectin-Dichte abnimmt. Die Migrationsgeschwindigkeit von Fibroblasten auf Fibronectin-Substraten mit verschiedenen Fibronectin-Dichten verläuft meist biphasisch (Maheshwari *et al.* 1999; Maheshwari *et al.* 2000; Millon-Fremillon *et al.* 2008; Rajagopalan *et al.* 2004; Silvestre *et al.* 2009). Werden die Zellen jedoch auf

Substraten mit RGD-Liganden zunehmender Dichte kultiviert, zeigen sie eine stetige Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit mit monophasischen Verlauf (Maheshwari *et al.* 2000; Rajagopalan *et al.* 2004).

2.5.4 Langzeitwirkung von Zell-Matrix-Interaktionen

Zelladhäsion, -spreading und -migration sind relativ kurzzeitige Zellreaktionen, die sich innerhalb von Minuten oder Stunden nach dem ersten Kontakt zwischen der Zelle und der ECM ereignen. Zell-Matrix-Interaktionen lösen jedoch auch bedeutende Langzeitreaktionen wie z.B. Differenzierung und Proliferation aus. Ingber beobachtete 1990, dass Zellen auf Substraten mit höherer Fibronectin-Dichte eine höhere Sensitivität gegenüber proliferativen Faktoren aufweisen und dadurch eine gesteigerte Proliferationsrate und DNA-Synthese zeigen (Ingber 1990). Weiterhin werden Gene wie z.B. Histone, die für die DNA-Replikation unabdingbar sind, verstärkt exprimiert (Mooney *et al.* 1992). Adhärenz wachsende Zellen sterben ab, wenn sie keinen Kontakt mit der ECM aufbauen können. Dieser Prozess der Apoptose wird ebenfalls von der Ligandendichte kontrolliert. Eine höhere ECM-Ligandendichte kann daher die Zellen vor Apoptose schützen (Re *et al.* 1994). Die Ligandendichte hat auch einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Zelldifferenzierung. Ausdifferenzierte Hepatozyten sekretieren beispielsweise das leberspezifische Protein Albumin. Neben der Abnahme der Albumin-Sekretion auf den Substraten mit höherer Fibronectin-Dichte (Semler *et al.* 2005; Mooney *et al.* 1992) verringert sich auch die Expression des Albumingens bei Hepatozyten (Mooney *et al.* 1992).

2.5.5 Relevanter Ligandenabstand für Zellreaktionen

Das Clustern der Integrine ist Voraussetzung für die Ausbildung der Zell-ECM-Kontakte und aller nachfolgenden Zellreaktionen wie Spreading und Migration (Harburger und Calderwood 2009; Pozzi und Zent 2003). Um clustern zu können, müssen sich aktivierte Integrin-Moleküle in ausreichender räumlicher Nähe befinden. Dabei ist der exakte maximale Abstand zwischen den einzelnen Liganden, der noch das Integrinclustern vermittelt, von großem Interesse. Mit einfachen Verdünnungsexperimenten errechneten Massia und Hubbell 1991, dass für ein optimales Zellspreading der RGD-Ligandenabstand maximal 440 nm betragen darf. Eine erfolgreiche Ausbildung der Fokaladhäsion und Streßfasern vermittelt ein Abstand von lediglich 140 nm. Unter Verwendung der Methode der *Block-Copolymer*-Nanolithographie gelang es Spatz *et al.*, den Abstand der einzelnen immobilisierten Liganden im Nanometerbereich exakt zu kontrollieren. Somit wurde gezeigt, dass die Ausbildung stabiler Zell-ECM-Kontakte (Cavalcanti-Adam *et al.* 2007), die Adhäsionsstärke (Selhuber-Unkel *et al.* 2008) und das Zellspreading (Arnold *et*

al. 2004) vom Ligandenabstand abhängig sind. Ab einem Ligandenabstand von über 73 nm können Zellen keine Fokalkontakte und Stressfasern mehr ausbilden und auch das Anheften und Spreaden sind limitiert. Sind die Liganden mit einem durchschnittlichen Abstand von 73 nm dagegen unordentlich bzw. zufällig verteilt, sind die Signale für das Cluster der Integrine und die Fokalkontakt-Ausbildung ausreichend (Huang *et al.* 2009). Die lokale, nicht jedoch die globale Ligandendichte ist somit entscheidend für das Zellverhalten.

2.6 Der Einsatz strukturierter Substrate

Zell-ECM-Interaktionen spielen sowohl für einzelne, adhären wachsende Zellen als auch für vielzellige Organismen eine entscheidende Rolle. Zur Untersuchung dieser Zell-Matrix-Interaktionen werden Modellsysteme eingesetzt, durch die die hoch komplexe ECM durch zweidimensionale (2D) Zellkultursubstrate ersetzt wird. Dabei werden ECM-Moleküle oder deren funktionelle Homologe auf eine Trägeroberfläche wie z.B. Kulturplastik (Belisario *et al.* 2005; Ingber 1990), Glas (Massia und Hubbell 1991; Dubin-Thaler *et al.* 2004) oder Polyacrylamid-Gele (Berg *et al.* 2004; Willcox *et al.* 2005) aufgebracht und anschließend die Zellen kultiviert. Diese Substrate sind meist homogen mit ECM-Molekülen beschichtet und entsprechen somit nur begrenzt der geometrischen *in vivo* Umgebung der Zelle. Dennoch lieferten sie wichtige Erkenntnisse über zelluläre Verhaltensweisen. Dreidimensionale (3D)-Matrix-Substrate kommen den *in vivo* Bedingungen zwar am nächsten, jedoch ist eine exakte Analyse des Einflusses der ECM auf das Zellverhalten wegen der oft undefinierten Matrix-Geometrie nicht möglich (Cukierman *et al.* 2001; Friedl und Brocker 2000; Roskelley und Bissell 1995). Eine gute Alternative bieten mittels Direktem Laserschreiben (DLS) hergestellte dreidimensionale Substrate mit definierter Geometrie (Klein *et al.* 2009, *Advanced Materials*, akzeptiert). Nachteil dieser Methode sind der hohe Kosten- und Zeitaufwand in der Herstellung sowie die lediglich homogene Beschichtung der 3D-Gerüste. Daher findet bis heute das *microcontact printing* (μ CP) (Jackman *et al.* 1995; Kumar und Whitesides 1993) eine breite Anwendung. Vorteil dieser Technik ist die einfache und kostengünstige Herstellung mikrostrukturierter 2D-Substrate mit kontrollierbarer Geometrie im Nanometer- und Mikrometerbereich.

Beim μ CP wird mit Hilfe eines 3D-strukturierten Stempels ein geometrisches Muster auf eine Substratoberfläche aufgebracht. Dabei entstehen mit Proteinen der extrazellulären Matrix beschichtete adhäsive Bereiche, die durch zellabweisende antiadhäsive Bereiche getrennt sind. Auf diesen Substraten haften und spreaden die Zellen nur auf den adhäsiven Bereichen (Lopez *et al.* 1993; Singhvi *et al.* 1994). Die definierte Substratgeometrie ermöglicht eine gezielte Kontrolle über die Größe und Form der Zellen und reguliert somit wichtige Zellverhaltensweisen (Liu und Chen, 2007). Mittels

mikrostrukturierter Substrate wurde z.B. gezeigt, dass die Zellgeometrie die polarisierte Orientierung der mitotischen Spindel definiert (Thery *et al.* 2005; Thery *et al.* 2007). Je nach Substratgeometrie bilden die Zellen Ecken und scharfe Kanten (Brock *et al.* 2003; Thery *et al.* 2007) oder Kreisformen aus (Chen *et al.* 1997). Anhand der vom Substrat vorgegebenen Zellform lässt sich lokal die Ausbildung von Lamellipodien (Jiang *et al.* 2005; Parker *et al.* 2002) und Zellkontakten (Chen *et al.* 2003) vorhersagen.

Das Zellverhalten auf strukturierten Substraten unterliegt definierten geometrischen Grenzen. Lehnert *et al.* 2004 zeigten, dass fibroblastenähnliche Zellen antiadhäsive Distanzen von maximal 25 μm überbrücken können. Ein 0.1 μm^2 großer ECM-*Dot* reicht aus, um die intrazelluläre Signaltransduktion zu induzieren, unterstützt jedoch ab einem *Dot*-Abstand von $>4 \mu\text{m}$ das Zellspreading nicht mehr. Zwischen dem Zellspreading und der geometrischen Proteinbedeckung der Substrate besteht eine direkte Korrelation, die unabhängig von der Substratgeometrie ist (Lehnert *et al.* 2004). Ein positiver Zusammenhang besteht ebenfalls zwischen der geometrischen Proteinbedeckung der Substrate und der Anzahl adhärierter Zellen. Chen *et al.* 1997 kultivierten Epithelzellen auf Substraten, die trotz unterschiedlicher Inselgrößen und -abstände immer die gleiche Gesamtproteinbedeckung aufwiesen. Dabei zeigte sich im Gegensatz zu den Experimenten vom Lehnert *et al.* eine Zellflächenzunahme auf Substraten mit kleineren Inseln und gleichzeitig kleiner werdenden Abständen. Die Spreadingfläche nahm allein aufgrund der Änderung der Geometrie um ein Zehnfaches zu, ohne dass sich die Gesamtproteinbedeckung signifikant änderte.

Neben des Einflusses der Zellmorphologie auf die Spreadingfläche wurden mittels mikrostrukturierter Substrate auch andere zelluläre Verhaltensweisen wie beispielsweise die Adhäsionsstärke, die Zellpolarisierung und die Differenzierung untersucht. So wiesen Gallant *et al.* 2002 nach, dass die Adhäsionsstärke von der Größe einer adhäsiven Struktur abhängt. Auf homogenen Substraten zeigen Zellen die stärkste Adhäsion. Auf kleineren Strukturen nimmt die Adhäsionsstärke dagegen ab. Jiang *et al.* 2005 untersuchten die Zellmigration mit „abschaltbaren“ tropfenförmigen Substratgeometrien. Aufgrund der Polarisierung der Mikrotubuli gab die resultierende asymmetrische Form der adhärten Zellen nach elektrochemischer Auflösung der Substratstrukturierung die Migrationsrichtung der Zellen vor.

Singhvi *et al.* 1994 beobachteten bei Hepatozyten eine Reduzierung der DNA-Synthese und eine Zunahme der Apoptose auf strukturierten Substraten, die die Zellgröße begrenzten. Eine erhöhte Albuminsekretion weist auf eine verstärkte Zelldifferenzierung bei Adhäsion auf kleineren Inseln hin. Auf größeren Inseln dagegen wird das Wachstumsprogramm eingeschaltet und gleichzeitig die Differenzierung vermindert. Diese

Abhängigkeit der Zelldifferenzierung von der Begrenzung der Zellfläche zeigte sich auch bei der Kultivierung humaner mesenchymaler Stammzellen. Bei kleiner Spreadingfläche differenzieren sie zu Adipozyten, bei großer Spreadingfläche zu Osteoblasten (McBeath *et al.*, 2004). Chen *et al.* 1998 beobachteten ebenfalls, dass die Apoptose-Rate bei Kultivierung von Epithelzellen auf größeren adhäsiven Strukturen sinkt und gleichzeitig die DNA-Synthese zunimmt. Dike *et al.* 1999 zeigten mittels Endothelzellen ähnliche Effekte. Auf dünnen adhäsiven Streifen (10 µm breit) differenzieren die Zellen und bilden röhrenförmige Strukturen. Nach Kultivierung auf breiten Streifen schalten sie das Differenzierungsprogramm ab und proliferieren. Ein anderes Beispiel für die geometrisch induzierte Morphogenese ist die Ausbildung von Myofibrillen bei Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Form des adhäsiven Substrates (Geisse *et al.*, 2009; Parker *et al.*, 2008).

2.7 Zielsetzung

Auf homogenen Substraten ist die eindeutige Abhängigkeit des Zellverhaltens von der Ligandendichte allgemein anerkannt (Kap. 2.5). Auf strukturierten, *in vivo* ähnlicheren Substraten wurde das geometrisch kontrollierte Zellverhalten zwar intensiv untersucht, die Mechanismen zur Ausbildung der Zellfläche werden jedoch bis heute kontrovers diskutiert. Einerseits zeigten Lehnert *et al.* 2004 einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der geometrischen Proteinbedeckung der Substrate und der Anzahl adhärierter Zellen sowie der Zellfläche. Diese Korrelation von Zellfläche und Proteinbedeckung unabhängig von der Substratgeometrie steht jedoch im Widerspruch zu Experimenten von Chen *et al.* 2003, die eine Kontrolle der Zellfläche durch die geometrische Ligandenverteilung, nicht jedoch durch die absolute Ligandenmenge beschrieben. Die genauen Mechanismen, wie Zellen das Ligandenangebot ihrer Umgebung wahrnehmen und durch welche nach-geschalteten Signalwege sie diese Informationen verarbeiten, sind daher noch unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob Zellen die zur Verfügung stehenden ECM-Liganden quantitativ wahrnehmen können und in wieweit diese Fähigkeit von der Substratgeometrie oder vom Zelltyp abhängig ist. Des Weiteren sollten durch die quantitative Analyse einer Vielzahl intrazellulärer Zell-Matrix-Kontaktproteine, die an der Signalweiterleitung und -verarbeitung beteiligt sind, Einblicke in die zugrunde liegenden zellulären Berechnungsmechanismen gewonnen werden.

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sollten geometrische mikrostrukturierte Zellkultursubstrate eingesetzt werden, die mit definiert verdünnten ECM-Proteinen beschichtet werden. Bisher wurde die Variabilität in der Substratbedeckung entweder durch die homogene Beschichtung mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen

(Verdünnungsexperiment; Kap. 2.5) oder durch den Einsatz mikrostrukturierter Substrate mit variablen *Dot*-Mustern (Kap. 2.6) erzielt. In dieser Arbeit sollten beide Verfahren kombiniert eingesetzt werden. Somit kann durch den Einsatz einer großen Mustervielfalt in Kombination mit der Bindung definierter Anteile aktiver ECM-Moleküle an die Substratoberfläche eine enorme Variation der Ligandenanzahl und -verteilung auf der Substratoberfläche erzielt werden. Dies ermöglicht eine optimierte präzise Kontrolle der ECM-Ligandenpräsentation. So kann erstmalig systematisch der Einfluss der Ligandenanzahl und der Substratgeometrie auf das Zellverhalten bei gleicher effektiver Proteinbedeckung, jedoch unterschiedlicher geometrischer Ligandenverteilung, verglichen und analysiert werden.

Die Wahrnehmung der Zellumgebung wird hauptsächlich über die Integrin-Rezeptoren vermittelt, die durch die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten die Verbindung zwischen der ECM und dem Aktinzytoskelett realisieren (Abb. 2.5) Die daraus resultierende strukturelle und funktionelle Reorganisation des Aktinzytoskeletts führt dann zu Änderungen des Zellverhaltens. Um zu untersuchen, ob und wie die Integrin-Rezeptoren an der Quantifizierung der ECM-Liganden beteiligt sind, sollten ausgewählte Komponenten der intrazellulären integrinvermittelten Signalweiterleitung quantifiziert und die Dynamik der immunohistochemisch ausgewerteten Zell-Matrix-Proteine anschließend durch Lebendzellmikroskopie analysiert werden. Die phosphorylierte bzw. aktive Form des Adapterproteins Paxillin und die der signalweiterleitenden *focal adhesion kinase* (FAK) sollten mittels quantitativer Bildanalyse im Verhältnis zur bestimmten Ligandenanzahl und ausgebildeter Integrinfläche erfasst werden, das Verhältnisse zwischen den Parametern analysiert und ein Modell für die quantitative Wahrnehmung entwickelt werden.

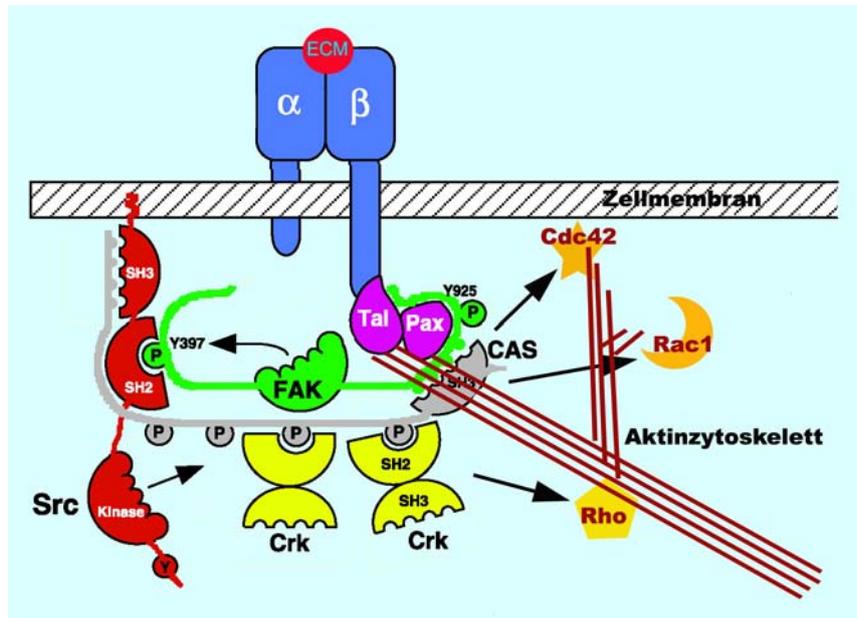


Abb. 2.5 Komponente der integrinvermittelten Signalverarbeitung

Schematische, stark vereinfachte Darstellung der intrazellulären Adapter- und Effektorproteine, die an der Weiterleitung der integrinvermittelten Informationsverarbeitung beteiligt sind. Die Signale aus der ECM werden durch Zell-Matrix-Kontaktproteine wie Talin, Paxillin und FAK u.a. verarbeitet und zu Regulatoren der Rho-GTPasen weitergeleitet. Die somit gesteuerten Rho-GTPasen Rho, Rac1 und Cdc42 kontrollieren ihrerseits die strukturelle Organisation des Aktinzytoskeletts, wodurch das Zellverhalten bestimmt wird. Modifiziert nach Giancotti und Ruoslahti 1999.

3 Material und Methoden

3.1 Angewandte Chemikalien und Lösungsmittel

Tab. 3.1: Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Name/Abkürzung	Herkunft	Anwendung
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe	Kritische-Punkt-Trocknung
Agarose	PeqLab (Erlangen)	Agarose Gelelektrophorese, <i>E. coli</i> Ausstrich
<i>Alexa protein labeling kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe	FN-Inaktivierung
Ammoniak/NH ₃ (33%)	Carl Roth	Reinigung
Bovine Growth Serum/BGS	Hyclone, Logan/UT, USA	10% in Medium; Zellkultur
Bovine Serum Albumin/BSA	Sigma-Aldrich (München)	1% in PBS; IHC
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (high glucose)/DMEM</i>	Invitrogen	Kultivierung von B16- und BRL-Zellen
<i>EndoFree Plasmid MaxiPrep Kit</i>	Qiagen (Hilden)	Plasmidpräparation
Ethanol/EtOH; >99.8% p.a	Carl Roth	Reinigung, Lösungsmittel
Ethylenglycol-3-O-Mercaptan/EG3OMe	Dr. Egg, Universität Heidelberg	1.5 mM in EtOH; Passivierung bei μ CP
<i>F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification/F-12K</i>	Invitrogen	(+) L-Glutamin; A549-Zellkultur
Fibronektin/FN	Sigma-Aldrich	Verdünnung in PBS; Substratbeschichtung
Geneticin/G-418 Sulfate	Invitrogen	1 mg/ml in DMEM; Zellkultur
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich	2% in PBS; Fixierung
Hefeextrakt	Fluka	5 g/l; LB-Medium
Heptan	Carl Roth	Lösungsmittel
Isopropanol/2-Propanol	Carl Roth	Reinigung
Kalziumchlorid/CaCl ₂	Carl Roth	Schutz vor Luftfeuchtigkeit
Kanamycine	Carl Roth	0,5% in LB-Medium; Selektion
Kohlendioxid/CO ₂	Linde Gas, München	Zellkultur
Lipofectamine	Invitrogen	Transiente Transfektion

Name/Abkürzung	Herkunft	Anwendung
Mowiol	Hoechst, Frankfurt/Main	20%; Einbettmedium
Natriumdodecylsulfat/SDS	Carl Roth	Reinigung
Natriumchlorid/NaCl	Carl Roth	5 g/l; LB-Medium
n-Propylgallat/NPG	Sigma-Aldrich	1 Spatelspitze auf 10 ml Mowiol; Anti-Fading
Octadecylmercaptan/ODM	Sigma-Aldrich	1.5 mM in Ethanol; μ CP
Octadecyltrichlorsilan/OTS	Sigma-Aldrich	1 mM in Heptan; Masterbehandlung
Paraformaldehyd/PFA	Sigma-Aldrich	2% oder 4% in PBS; Fixierung
PBS	Biochrom, Berlin	1x, (-)Ca ²⁺ , (-)Mg ²⁺ ; Waschpuffer
PBS	Invitrogen	1x; (-)CaCl ₂ , (-)MgCl ₂ ; Zellkultur
pEGFP-Integrin- α 5	Addgene (Cambridge, MA, USA)	Transiente Transfektion
pEGFP-Paxillin	Addgene	Transiente Transfektion
Salzsäure/HCl	Carl Roth	Reinigung
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth	>95%; Reinigung
Stickstoff/N ₂	Linde	Reinheit 5.0; Trockenblasen
Sylgard 184/Silicon	Dow Corning Wiesbaden	Stempelherstellung
Tetrabutylammoniumfluorid/ TBAF	Sigma-Aldrich	Reinigung
TritonX100	Carl Roth	0.1% in PBS; Permeabilisierung
Trypanblau	Carl Roth	1:2; Färbung, Zellzählung
Trypsin/EDTA	Invitrogen	1:5, 1:10 in HBSS (-)Ca ²⁺ , (-)Mg ²⁺ ; Zellablösung
Trypton	Carl Roth	10 g/l; LB-Medium
Vitronectin/VN	Sigma-Aldrich	5 μ g/ml in PBS; Substratbeschichtung
Wasserstoffperoxid/H ₂ O ₂	Carl Roth	Reinigung

3.2 Herstellung mikrostrukturierter Substrate

Mikrostrukturierte Substrate werden durch *Microcontact-Printing* (μ CP) (Kumar und Whitesides 1993) hergestellt und anschließend mit Proteinen der ECM beschichtet. Diese Methode beruht auf der Wechselwirkung von Alkanthiolen mit Gold und der daraus resultierenden Ausbildung von „*self-assembled monolayers*“ (SAMs) (Mrksich 1998). Etabliert wurde diese Stempeltechnik in unserer Arbeitsgruppe (Lehnert *et al.* 2004).

3.2.1 Stempelmuster

Bei der Methode des *Microcontact-Printings* werden geometrische Strukturen mit Hilfe eines Stempels erzeugt. Der Stempel besteht aus hervorstehenden Silikonstrukturen definierter Muster (Abb. 3.1, Abb. 3.2), die beim Stempelvorgang in Kontakt mit einem goldbedampften Deckglas treten und somit die Muster auf die Goldoberfläche übertragen. Zu den hervorstehenden Strukturen gehören neben den Musterstrukturen auch Stege zwischen den Mustern und, je nach Stempel, meist breitere Außenstege, die im fertigen Substrat großflächige homogen beschichtete Substratbereiche darstellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Stempelmuster angewandt: das Quadrat-Flächen-Muster (Abb. 3.1) und das *Dot*-Muster (Abb. 3.2). Ein komplettes Stempelmuster besteht bei dem Quadrat-Flächen-Muster aus 2 x 5 (Abb. 3.1 D) bzw. bei dem *Dot*-Muster aus 2 x 8 (Abb. 3.2 C) rechteckigen Musterbahnen, von denen jede Bahn ein anderes Muster aufweist.

3.2.2 Reinigung der Master und Herstellung der Stempel

Silikonstempel werden aus negativen Abgussformen, den sog. Mastern, abgegossen. Ein solcher Master besteht aus reinem metallischem Silizium, in das mittels Elektronenstrahl-lithographie die beschriebenen Muster (Abb. 3.1, Abb. 3.2) als inverse topographische Struktur eingätzt werden. Die Herstellung der Master wurde von Dr. Christian David am Paul-Scherrer-Institut in Villigen, Schweiz, durchgeführt. Die Tiefe der eingätzten Struktur lag bei 650-700 nm.

Um Silizium-Master von organischem Material zu reinigen, wurden sie in Piranha-Lösung, bestehend aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , >30%) und Schwefelsäure (H_2SO_4 , >95%) in einem Volumenverhältnis von 1:1, für 15 min auf einer Heizplatte bis zur Blasenbildung auf ca. 80 °C erwärmt. Nach einer gründlichen Spülung mit Aqua bidest (ddH_2O) wurden die Master mit Stickstoff (N_2 , Reinheit 5.0, Linde) trocken geblasen und bei Bedarf in einem zweiten Waschschrift erneut gereinigt. Bei stärkerer Verschmutzung wurden die Master in Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF, 75%, Aldrich) über Nacht gereinigt. Nach abschließender Spülung wurden die Master mit Stickstoff trocken geblasen.

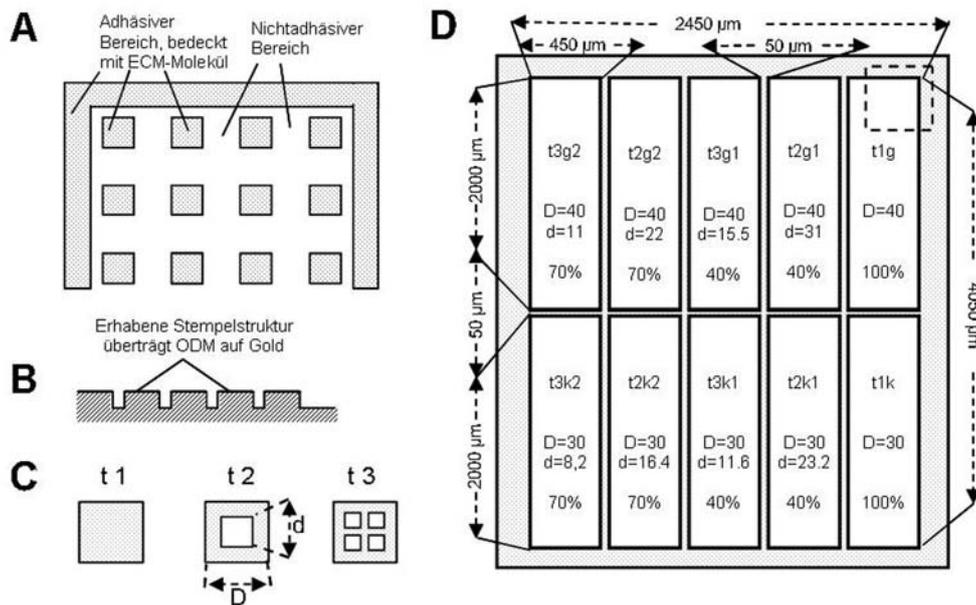


Abb. 3.1 Quadrat-Flächen-Stempelmuster

(A) Prinzipieller Aufbau einer Bahn: Punktierte Flächen stellen im später fertigen Substrat fibronectinbeschichtete, adhäsive Bereiche dar, die durch nichtadhäsive Bereiche getrennt werden. (B) Stempelstruktur im Querschnitt: erhabene Bereiche übertragen ODM auf das goldbeschichtete Deckglas, an das sich später das Fibronectin anlagert. (C) Schematische Darstellung der drei Quadrattypen. Antiadhäsive Aussparungen innerhalb der Quadrate erzielen unterschiedliche geometrische Fibronectinbedeckungen (Prozentuell angegeben in (D)). (D) Überblick über alle Stempelbahnen. In der Beschriftungen für die Bahnen steht „g“ für große Quadrate mit $D = 40 \mu\text{m}$ und „k“ für kleine Quadrate mit $D = 30 \mu\text{m}$. Modifiziert nach Lehnert *et al.* 2004.

Um die Silikonabgüsse später gut ablösen zu können, wurden die Master im Anschluss an die Reinigung mit Octadecyltrichlorsilan (OTS, Aldrich) silanisiert. Dabei wurde der Master für ca. 10 min in einer 1 mM OTS-Lösung in Heptan unter Stickstoffatmosphäre inkubiert, da OTS eine wasserempfindliche Substanz ist, die unter Einwirkung von Luftfeuchtigkeit zur Polymerisierung neigt. Sofort nach der Entnahme wurde der Master mit Stickstoff trocken geblasen. Ziel der Silanisierung ist die Ausbildung einer hydrophoben Oberfläche auf dem Master, wodurch die Abgüsse leichter abgelöst werden können. Perlte ein Tropfen Aqua bidest auf der Masteroberfläche mit großem Kontaktwinkel ab, war die Silanisierung erfolgreich.

Einen schematischen Überblick über die Stempelherstellung zeigt Abb. 3.3. Dabei wurden ca. 50 μl durchgemischtes, flüssiges, luftblasenfreies Silikon (Sylgard 184, Dow Corning) über die Struktur des Masters gegeben. Ein mit Isopropanol (2-Propanol) gereinigter, ca. 1 cm breiter Glasstreifen wurde ohne Einschlüsse von Luftblasen auf den Silikontropfen gelegt. Für eine bessere Haftung des Silikons auf dem Glasstreifen kann die

Glasoberfläche mit 6% Salzsäure (HCl, 37%, Roth) in ddH₂O für 4 - 6 h bei 90 °C aktiviert werden. Der Glasstreifen wurde mit Messingklötzchen beschwert und gegen Verrutschen seitlich gesichert. Die Polymerisation des Silikons erfolgte mindestens 6 h bei 60 °C im Ofen. Beim Abtrennen des Glasstreifens vom Master blieb das auspolymerisierte Silikon an der Glasunterseite haften. Nach dem Aufkleben eines Griffs ist der Stempel einsatzbereit.

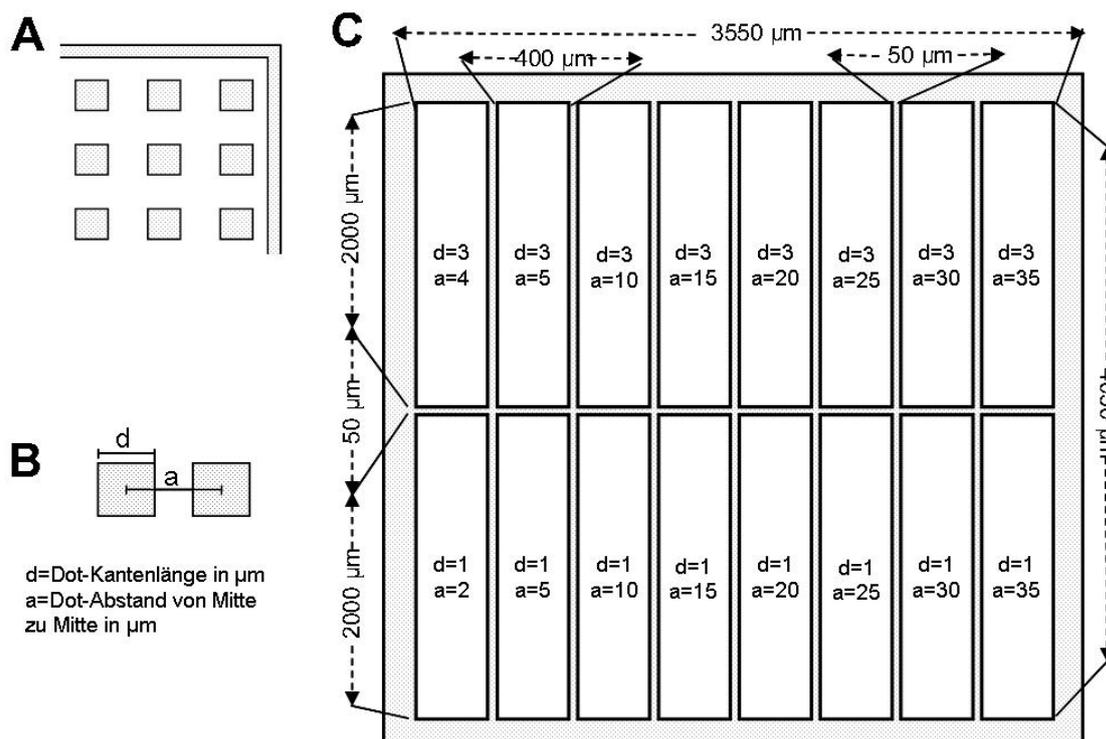


Abb. 3.2 Dot-Stempelmuster

(A) Das Bauprinzip des *Dot*-Stempelmusters ähnelt dem des Quadrat-Flächen-Musters. (B) Die kleinen Quadrate (hier *Dots* genannt) sind jedoch mit einer Außenkantenlänge „ d “ von 1 - 3 μm wesentlich kleiner als die bei dem Quadrat-Flächen-Muster. Der Abstand zwischen den benachbarten *Dots* „ a “ variiert von 5 bis 35 μm . (C) Übersicht des kompletten Musters, bestehend aus 2 x 8 rechteckigen Bahnen mit unterschiedlichen *Dot*-Größe und -Abständen. Modifiziert nach Lehnert *et al.* 2004.

3.2.3 Goldbedampfung der Deckgläser

Die zur Herstellung der mikrostrukturierten Substrate verwendeten Deckgläser (Roth, # 1, 22 x 22 mm) wurden vor der Goldbedampfung gereinigt. Dabei wurden sie einzeln in speziell angefertigte Halterungen aus Teflon gestellt. Die beladenen Deckglashalter wurden unter dem Abzug in einer Lösung aus Ammoniak (NH₃, 33%), H₂O₂ und ddH₂O (1:1:5 in Volumen) für 10 min auf ca. 80 °C erwärmt. Anschließend wurden die Deckgläser gründlich mit reichlich ddH₂O gespült und mit Stickstoff trocken geblasen. Eine spezielle

Halterungsvorrichtung wurde mit gereinigten Deckgläsern beladen und in eine Aufdampfanlage eingebaut. Zunächst wurde als Haftvermittler eine 3 - 5 nm dicke Titanschicht aufgedampft. Direkt im Anschluss erfolgte das Aufdampfen einer 15 - 20 nm Goldschicht. Fertig aufgedampfte Golddeckgläser wurden zum Schutz vor Verunreinigung in Glaspetrischalen gelagert und innerhalb einer Woche verbraucht.

3.2.4 Stempelvorgang und ECM-Beschichtung

Der Stempel wurde vor dem Gebrauch mehrmals mit klarem Tesafilm® abgezogen, um grobe Schmutz- und Staubpartikel zu entfernen. Dieses Vorgehen wurde vor und nach jeder Stempelreihe wiederholt. Zur Beseitigung eventuell zurückgebliebener Tesafilmreste wurde der Stempel gründlich mit reinem Ethanol (>99,8%) abgespült und im Anschluss mit Stickstoff trocken geblasen. Dieser Vorgang wurde während des Stempelns wiederholt, falls sich der Stempel aufgrund auskristallisierter Thiolrückstände nicht mehr richtig ansaugte. Bei starker Verschmutzung wurde der Stempel für 10 min im Ultraschallbad unter Ethanol oder 1%igem SDS in ddH₂O behandelt.

Nach der Reinigung wurde der Stempel für 30 sec mit 1.5 mM Octadecylmercaptan (ODM; Aldrich; gelöst im Ethanol), einem hydrophoben Alkanthiol, inkubiert und danach mit Stickstoff trocken geblasen. Durch vorsichtiges Aufdrücken des Stempels auf ein goldbedampftes Deckglas wurde an den vorstehenden Stempelstrukturen ODM auf das Gold übertragen. Im Idealfall saugte sich der Stempel von selbst an. Falls nicht, wurde leichter Druck mit einer spitzen Pinzette auf die Deckglasrückseite ausgeübt. Bei einem erfolgreichen Stempelvorgang zeigten sich Newtonsche Farbringe auf der Deckglasrückseite. Der Stempel sollte möglichst zügig vom Gold-Deckglas getrennt werden, sobald sich der Stempel komplett ansaugt. Ein zu langer Kontakt führt aufgrund des hohen Diffusionsvermögens von ODM zu einem erhöhten Substrathintergrund. Anschließend erfolgte das Abspülen des ungebundenen Thiols vom Deckglas mit reinem Ethanol und Trockenblasen mit Stickstoff. Nicht bestempelte Bereiche wurden durch 1.5 mM Ethylenglycol-3-O-Mercaptan (EG3O-Me, gelöst im Ethanol), einem hydrophilen Thiol, blockiert. Die Deckgläser wurden dabei vollständig mit EG3O-Me bedeckt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Spülung der Deckgläser mit reinem Ethanol wurde die strukturierte Oberfläche mit 150 µl sterilem Fibronectin (FN, 10 µg/ml, Sigma) oder Vitronectin (VN, 5 µg/ml, Sigma) für 1 h bei 4 °C beschichtet. Das Protein lagert sich dabei selektiv an das strukturiert aufgebrachte, hydrophobe Thiol ODM an. Nach einem Waschschrift mit PBS konnten die nun ECM-beschichteten Golddeckgläser für ein Experiment eingesetzt werden (Mrksich und Whitesides 1996).

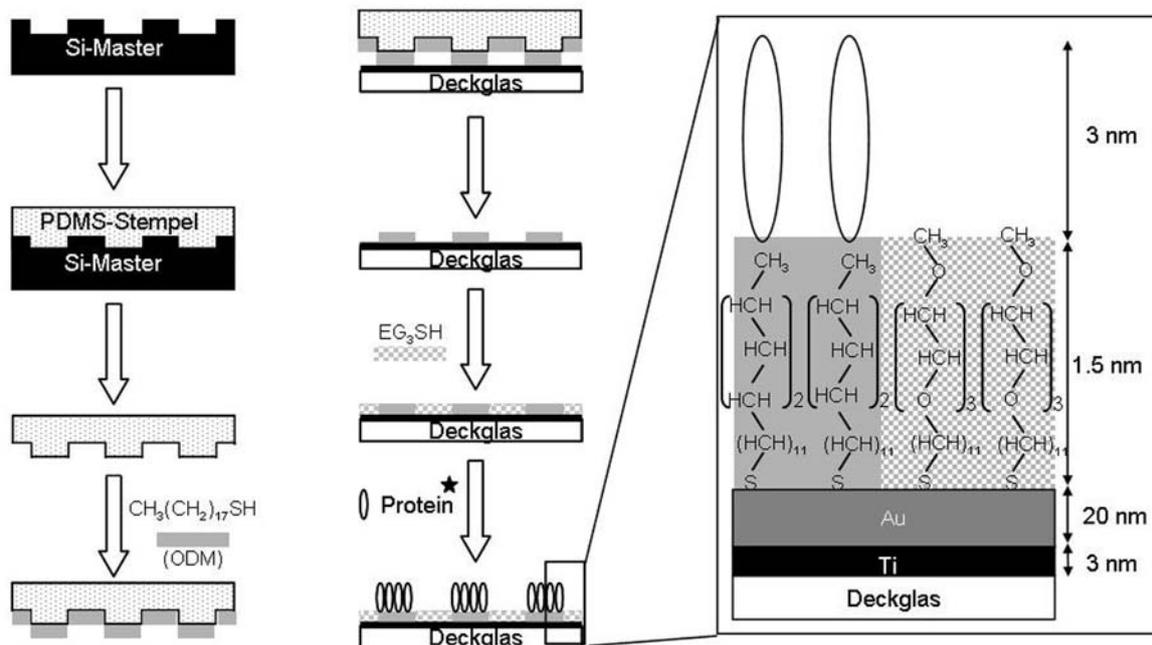


Abb. 3.3 Schematische Darstellung der Stempel- und Substratherstellung

Als Vorlage für den Silikonstempel dient ein Silizium-Master, in den mittels Elektronenstrahl-lithographie die gewünschten Strukturen eingätzt wurden. Die Auspolymerisierung des Silikons auf dem Master liefert einen Stempel komplementär zu der in den Master eingätzten Struktur. Vorsichtiges Aufdrücken des Stempels auf ein goldbedampftes Deckglas überträgt an den erhabenen Stempelstrukturen ODM auf das Gold in den Bereichen, in denen sich nach einem weiteren Schritt die ECM-Proteine anlagern. Die nicht-adhäsiven Bereiche werden mit EG₃O-Me blockiert. Die schematischen Schichtdicken im Substratquerschnitt sind nicht maßstabsgetreu wiedergegeben. Die resultierenden Schichthöhen sind daher im rechten Bildausschnitt angegeben. Modifiziert nach Mrksich und Whitesides 1996.

★ Hier wird die Proteinkonzentration modifiziert (Kapitel 3.2.5).

3.2.5 Herstellung von Substraten mit definiert verminderter Fibronektin-Aktivität

Ziel der kontrollierten Abnahme des Anteils vom biologisch aktiven Fibronektin auf strukturierten Substraten war die definierte Abnahme der Fibronektin-Aktivität bei konstant bleibender Substratgeometrie. Die Abnahme der Fibronektin-Aktivität wurde dabei durch Proteinverdünnung erzielt. Um auch nach der Proteinverdünnung ein konstantes Bindungsverhältnis zwischen Fibronektin und dem hydrophoben ODM zu garantieren, wurde die Gesamtproteinkonzentration von 10 µg/ml bei der Verdünnung beibehalten. Dazu wurde das aktive Fibronektin anteilig durch inaktives Fibronektin ersetzt.

Die Inaktivierung des Fibronektins wurde durch zwei unterschiedliche Methoden erzielt. Die eine Möglichkeit ist die Fluoreszenzmarkierung (Lehnert *et al.* 2004) mittels eines

kommerziell erhältlichen *Alexa633 protein labeling Kits* (Molecular Probes). Die andere Möglichkeit ist eine thermische Behandlung der Proteinlösung bei 95 °C für 30 min. In beiden Fällen verlor das Fibronectin seine biologische Aktivität und somit die Fähigkeit, Zelladhäsion zu induzieren.

Die Verdünnung wurde durch Mischen von aktiven und inaktiven Fibronectinlösungen erzielt (Tab. 3.2), wobei beide Proteinlösungen eine Gesamtproteinmenge von 10 µg/ml enthielten. Die Fibronectinlösung mit einer aktiven Konzentration von 10 µg/ml wurde als 100% aktiv definiert und die Fibronectinlösung, alleinig bestehend aus inaktivem Fibronectin, entsprechend als „0% aktiv“ bezeichnet. Die fertig gestempelten Substrate wurden anschließend mit den unterschiedlich verdünnten Fibronectinlösungen inkubiert (Kap. 3.2.4). (Der Schritt wurde in Abb. 3.3 mit einem Stern gekennzeichnet.)

Tab. 3.2 Fibronectin-Verdünnungsschema

FN-Aktivität (%)	Aktives FN (10 µg/ml)	Inaktiviertes FN (10 µg/ml)
100%	150 µl	0 µl
50%	75 µl	75 µl
25%	37,5 µl	112,5 µl
20%	30 µl	120 µl
10%	15 µl	135 µl
0%	0 µl	150 µl

3.3 Charakterisierung der mikrostrukturierten Substrate

Um die erfolgreiche Übertragung der Thiole und Proteine nachzuweisen und um die Oberflächeneigenschaften des übertragenen Fibronectins zu charakterisieren, wurden die Proben mittels verschiedener Methoden wie Rasterkraft Mikroskopie (AFM, engl. *Atomic Force Microscopy*), Immunohistochemie (IHC), Raster Elektronen Mikroskopie (REM) und Röntgen Photoelektronen Spektroskopie (XPS, engl. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) untersucht.

3.3.1 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Methode der Rasterkraftmikroskopie (AFM) bietet die Möglichkeit, die Oberflächen-Topographie einer zu untersuchenden Struktur im Nanometer-Bereich durch mechanische Abtastung zu analysieren. Dabei wurde eine feine Spitze an einen *Cantilever* angebracht

und Zeile für Zeile über die zu messende Oberfläche geführt. Die Deformation des *Cantilevers* bei Unebenheiten bzw. topographischen Änderungen wurde durch die Ablenkung eines Laserstrahles detektiert.

Die AFM-Messung wurde in Kooperation mit Dr. C. Franz mit einem inversen Axiovert 200 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) durchgeführt, auf das ein NanoWizard AFM System (JPK Instruments, Berlin) angebracht wurde. Die mit unterschiedlichen Fibronektin-Konzentrationen beschichteten mikrostrukturierten Substrate wurden zur Oberflächenanalyse auf einen Objektträger geklebt. Um die Strukturen vor Austrocknung zu schützen, wurde ein Silikonring um die Probe angebracht und dieser mit Puffer gefüllt. Anschließend wurde eine Fläche von 20 x 20 μm^2 durch die Spitze des AFMs im Kontaktmodus abgetastet und analysiert.

3.3.2 Kritische-Punkt-Trocknung (KPT)

Die Oberflächenanalysen der Raster Elektronen Mikroskopie (REM) und Röntgen Photoelektronen Spektroskopie (XPS) erfolgten unter Hochvakuumbedingungen. Um die Entstehung von Wasserdampf in den Geräten zu minimieren, wurden die Proben vor der Analyse gründlich getrocknet. Das Trocknen der Präparate durch Wasserverdunstung führt jedoch zu starken Strukturzerstörungen aufgrund der Einwirkung von Oberflächenspannungen. Um das Auftreten von Oberflächenspannung strikt zu vermeiden, wurde die Methode der Kritischen-Punkt-Trocknung (KPT) (Horridge und Tamm 1969) angewendet. Dabei wurde das Wasser der Proben durch Aceton substituiert. Anschließend wurden die Proben in eine Druckkammer überführt, in der das Aceton schrittweise durch CO_2 , das bei Zimmertemperatur bereits unter einem Druck von ca. 55 bar flüssig ist, verdrängt wurde. Nach der vollständigen Umgebung der Probe mit reinem CO_2 wurde die Temperatur und somit der Druck in der Druckkammer erhöht. Lagen Druck und Temperatur über den kritischen Werten, wurde der Druck durch Entlassen des CO_2 -Gases gesenkt, wobei die Temperatur weiterhin über der kritischen Temperatur verblieb. Nach Erreichen des Normaldrucks wurde die Probe getrocknet entnommen.

Vor KPT wurden die Proben mit 2% Paraformaldehyd (PFA) und 2% Glutaraldehyd in PBS bei Raumtemperatur über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Proben in einer Aceton-Konzentrationsreihe mit 10, 30, 50, 70, 90 und 100% Aceton für jeweils 10 min entwässert, wobei die Entwässerung mit 100% Aceton dreimal wiederholt wurde. Danach erfolgte die KPT in einem Leica EM CPD030 Kritischen-Punkt-Trockner mit Aceton als Substitutionsmedium. Die Proben wurden 6 - 8-fach mit flüssigem CO_2 durchgespült und nachfolgend bei 40 °C und 75 bar getrocknet. Die getrockneten Proben wurden einzeln, in

verschlossenen Behältern und in Anwesenheit von CaCl_2 im Exikator bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

3.3.3 Raster Elektronen Mikroskopie (REM)

Vor der REM wurden die durch KPT getrockneten Proben auf einen Probenhalter mit Leitsilber geklebt und mit einer dünnen 3 - 5 nm Schicht von leitfähigem Metall wie Silber oder Platin beschichtet. Die REM-Aufnahme erfolgte im Laboratorium für Elektronenmikroskopie der Universität Karlsruhe mit einem *Leo 1530* Feld Emission Raster Elektronen Mikroskop.

3.3.4 Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS)

Bei der Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS, engl. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) erfolgt die Anregung einer Probenoberfläche mit einer charakteristischen Röntgenstrahlung. Üblicherweise wird $\text{MgK}\alpha$ -Strahlung mit $h\nu = 1253.6$ eV oder $\text{AlK}\alpha$ -Strahlung mit $h\nu = 1486.6$ eV verwendet. Durch den 1887 von Hertz beschriebenen Photoeffekt werden Elektronen aus den inneren oder äußeren Atomshalen des oberflächennahen Probenmaterials herausgeschlagen und verlassen die Probe mit der kinetischen Energie E_{kin} :

$$E_{\text{kin}} = h\nu - E_{\text{B}} - e\phi$$

E_{B} ist die Bindungsenergie des betreffenden Photoelektrons und wird als charakteristische Größe zum Element- und Verbindungsnachweis benutzt, $h\nu$ ist die Energie der anregenden Röntgenstrahlung und $e\phi$ die Elektronenaustrittsarbeit, die aufgebracht werden muss, um ein Elektron aus einem Festkörper ins Vakuum zu transferieren.

Die Informationstiefe beträgt materialabhängig etwa 6 - 10 nm. Mit winkelabhängigen Messungen lässt sich über Intensitätsabschwächung des Photoelektronensignals in dünnen Schichten mittels modifizierter Lambert-Beer-Gleichung bei Kenntnis der mittleren freien Weglänge des Photoelektrons auf die Dicke der analysierten Schicht schließen.

$$I(d) = I_0 * e^{-\frac{d}{\lambda(E) \cos\beta}}$$

$I(d)$ Intensität in Abhängigkeit vom Entstehungsort

I_0 Intensität ohne Abschwächung

d Tiefe / Entfernung vom Entstehungsort

β Emissionswinkel

Die XPS-Analysen wurden mit einem K-Alpha Spektrometer (ThermoFisher Scientific, East Grinstead, UK) im Forschungszentrum Karlsruhe, IMF III, Gruppe Dr. M. Bruns, durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit monochromatisierter $AlK\alpha$ -Strahlung und die Anregungsfläche war eine Ellipse mit Hauptachsenlänge von 200 μm . Für minimale Strahlenbelastung bei gutem Signal/Rauschverhältnis wurden jeweils 35 Punkte gemessen und die Daten zu einem Spektrum zusammengefasst. Winkelabhängige Messungen wurden für 7 Winkel zwischen 0° und 60° Photoelektron-Emissionswinkel durchgeführt. Als Substrate wurden $10 \times 10 \text{ mm}^2$ große Si-Wafer, beschichtet mit 100 nm Gold eingesetzt (Haftvermittler 30 nm Chrom). Diese wurden entweder nur mit ODM oder mit ODM und anschließend mit Fibronectin beschichtet. Allein mit ODM beschichtete Proben wurden direkt charakterisiert und die mit Fibronectin beschichteten Proben wurden erst über KPT (siehe Kap. 3.3.2) getrocknet.

3.3.5 Berechnung der effektiven Fibronectinbedeckung der Substrate

Die Vielfalt in der Fibronectinbedeckung der Substrate wurde zum einen durch die Geometrie der *Dot*-Muster und zum anderen durch die Fibronectinverdünnungen erzielt (Kap. 3.2.5). Unter effektiver Fibronectinbedeckung versteht man die den Zellen tatsächlich präsentierte Anzahl von aktiven Fibronectin-Molekülen auf einer bestimmten Substratfläche. Die effektive Fibronectinbedeckung wird in Anzahl Fibronectin-Moleküle/ μm^2 angegeben. Um die effektiven Fibronectinbedeckungen der Substrate zu berechnen, wurde als erstes die geometrische Fibronectinbedeckung einer Bahn in Prozent ermittelt. Diese Bedeckung entsteht allein durch die Strukturgeometrie und ist eine prozentuale Angabe bezogen auf die entsprechende Bahn. Die geometrische Fibronectinbedeckung wurde anhand der immunohistologischen Fibronectin-Färbung (Kap. 3.5) bestimmt. Um die fluoreszent markierten Fibronectin-*Dots* klar vom Hintergrund abzutrennen und somit deren Fläche zu bestimmen, wurde mit Hilfe der Metamorph-Software ein Schwellenwert festgelegt. Anschließend wurde eine rechteckige Region festgelegt, die in beiden Richtungen (horizontal und vertikal) die Fläche von einer Kante des ersten *Dots* bis zu der gleichen Kante eines der nächsten *Dots* erfasste. Das Programm errechnete dann automatisch die prozentuale geometrische Fibronectinbedeckung der Region, deren Bedeckung repräsentativ für die gesamte Bahn ist. Als 100% bedeckt galten die homogen beschichteten Bereiche und als 0% die unbedeckten Bereiche. Die effektive Fibronectinbedeckung (Anzahl FN-Moleküle/ μm^2) ergab sich durch Multiplizieren der geometrischen Bedeckung (Prozent der Substratoberfläche) mit den jeweiligen Verdünnungsfaktoren (prozentuale aktive Fibronectin-Konzentration) und der geschätzten Moleküldichte auf dem hydrophoben Thiol bei 100% aktivem Fibronectin (ca. 1000 FN-Moleküle/ μm^2 , Lehnert *et al.* 2004, Kap. 4.1.3).

3.4 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden die adhärenenten Zelllinien A549-Humane-Lungen-Epithelzellen (A549; ATCC, Rockville/MD, USA, CCL-185), Buffalo-Rat-Liver-Zellen (BRL; ATCC) und B16-Maus-Melanoma-Zellen (B16; Nicholson, Houston, TX, USA) untersucht, die unterschiedlichem Gewebe entstammen und somit verschiedene Zelltypen repräsentieren. Des Weiteren wurde die stabil transfizierte B16- β 3-Integrin-EGFP Linie eingesetzt. Für Zeitrafferaufnahmen wurden die A549-Zellen transient mit EGFP-gekoppelten Proteinen transfiziert (Kap. 3.4.4).

3.4.1 Routine-Zellkultivierung

Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen im Brutschrank bei 37 °C, 5% Kohlendioxid (CO₂, Linde) und 98% Luftfeuchtigkeit. Dreimal wöchentlich wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen passagiert. Als Medium diente *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Invitrogen) für BRL- und B16-Zellen und F12-K (Invitrogen) für A549-Zellen. Die Medien wurden mit 10% (v/v) Bovine Growth Serum (BGS, Hyclone) angereichert. Nach dreimaligem Waschen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, ohne Mg²⁺ und Ca²⁺, Invitrogen) erfolgte die Zellablösung durch Zugabe von 150 μ l Trypsin/EDTA (0.1% Trypsin/0.04% EDTA, in *Hanks balanced salt solution* (HBSS), beide von Invitrogen) und einer ca. 3 min dauernden Inkubation im Brutschrank. Zum Auswaschen der Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen in 5 ml serumhaltigem Medium aufgenommen, 5 min bei 1000 U/min (Multifuge 1 S-R, Heraeus) zentrifugiert und das erhaltene Pellet erneut in serumhaltigem Medium (10% BGS) resuspendiert. Danach konnten die Zellen auf neue, bereits mit Medium gefüllte Kulturflaschen verdünnt werden.

3.4.2 Auszählen der Zellen

Um die Zelldichte in den Experimenten zu standardisieren, wurden die Zellen vor der Aussaat mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ausgezählt. Dabei wurden 150 μ l der Zellsuspension mit 150 μ l Trypanblaulösung versetzt und ca. 10 μ l der Mischung in die Zählkammer eingefüllt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Zytoplasma und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen so unter dem Mikroskop leuchtend hell. Trypanblau ist aufgrund der Bindung an die Zellproteine zytotoxisch. Daher muss die Auswertung unmittelbar nach der Zugabe des Farbstoffes zügig erfolgen. Es wurde die Zahl lebender Zellen aus vier Großquadraten der Neubauerzählkammer (entspricht 4 mm²) bestimmt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension ergab sich dann aus folgender Formel:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{gezählte Zellen aus vier Großquadraten} \times 10^3}{\text{Kammertiefe (0.1 mm)} \times \text{Verdünnung (1/2)} \times \text{Fläche (4 mm}^2\text{)}}$$

(Vereinfacht kann man aber auch die aus vier Großquadraten gemittelte Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor „2“ und 10^4 multiplizieren.)

3.4.3 Zell-Aussaat für Experimente

Für Experimente wurden Zellen aus Kulturflaschen verwendet, die zu 60 - 80% konfluent bewachsen waren. Die mit Trypsin/EDTA abgelösten Zellen wurden in serumhaltigem DMEM-Medium aufgenommen, 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und das erhaltene Pellet in serumfreiem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden ausgezählt und die Zellkonzentration errechnet. Die mit Fibronektin beschichteten Deckgläser wurden im 6-well-Platte mit serumfreiem Medium überschichtet und im Brutschrank akklimatisiert. Anschließend wurden Zellen zugegeben, so dass jedes „well“ von $1,5 \times 10^4$ Zellen/cm² überschichtet war. Das entsprach $1,5 \times 10^5$ Zellen/well.

Für Experimente wurde lediglich serumfreies Medium eingesetzt, da Serum ein undefinierter Mediumzusatz ist, dessen genaue quantitative und qualitative Zusammensetzung der Inhaltsstoffe nicht bekannt ist. Um diffuse Wechselwirkungen der Zellen mit den enthaltenen Inhaltsstoffen (Hormone, Wachstumsfaktoren, Komponenten der extrazellulären Matrix usw.) zu vermeiden und um die Substratmodifikation durch zelluläre Proteinsekretion zu reduzieren, wurde für Experimente daher generell nur definiertes, serumfreies Medium eingesetzt.

Die Zellen wurden 80 min im Brutschrank inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen bei 5% CO₂, 98% Luftfeuchtigkeit und 37 °C. In diesem Zeitraum konnten die Zellen adhärieren und *spreaden*. Anschließend wurden die Zellen fixiert und immunohistochemisch gefärbt.

3.4.4 Transiente Transfektion der Zellen

Um die Dynamik der Kontaktproteine zu beobachten, wurden für Zeitrafferaufnahmen EGFP-tranfizierte Zellen eingesetzt. Dazu wurden A549-Zellen transient mit Plasmiden, die EGFP-gekoppelte Zielproteine kodieren, tranfiziert. In dieser Arbeit wurden pEGFP-Integrin- α 5 (Plasmid 15238) als auch pEGFP-Paxillin (Plasmid 15233) (beide von Addgene) Plasmide eingesetzt. Die Transfektion erfolgt mittels Lipofektion (Lipofectamine, Invitrogen).

Die Plasmide wurden in Form von *E. coli* DH5a Bakterienkulturen geliefert und kodierten eine Kanamycin (Kan)-Resistenzsequenz. Um größere Mengen eines Plasmides aus transformierten Bakterien für den experimentellen Einsatz zu erhalten (ca. 500 μ g), wurde

ein fraktionierter Ausstrich auf einer LB/Kan-Agarplatte angefertigt. Die aus einer einzelnen Kolonie stammende 2 ml Übernachtskultur wurde in 100 ml LB/Kan-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler weiterkultiviert. Die anschließende Extraktion und Aufreinigung der Plasmid-DNA dieser Großkultur erfolgte mit dem „*QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi*“-Kit der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend des Herstellerprotokolls. Die Konzentration der Plasmide wurde mit dem NanoDrop (Thermo Scientific) bestimmt und auf 1 mg/ml eingestellt und die Plasmide anschließend bei -20 °C gelagert.

Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine (Invitrogen) und die Konzentrationen der Plasmide und der Lipofektamine wurden den Herstellerangaben entnommen.

3.4.5 Zeitrafferuntersuchungen zur Dynamik der Zellkontaktproteine

Die Substrate für die Zeitrafferuntersuchungen wurden mittels μ CP (Kap. 3.2) hergestellt und entweder mit Vitronectin (zur Untersuchung der B16-Integrin β 3-EGFP-Zelllinie) oder mit Fibronectin (zur Untersuchung der transient transfizierten A549-Zelllinie) beschichtet. Um die Fluoreszenzaufnahmen am inversen Axiovert 200M-Mikroskop (Carl Zeiss) zu ermöglichen, wurden die Gold-Thiol-strukturierten Substrate umgedreht, so dass die proteinbeschichteten Deckglasseite nach unten in Richtung der Glasbodenpetrischale zeigte.

Die stabil oder transient transfizierten Zellen wurden aus der Zellkulturfläche abgelöst (Kap. 3.4.1) und auf den mikrostrukturierten Substraten für 30 min in Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit adhärten die Zellen an das strukturierte Substrat. Nachfolgend wurde das Substrat mit den adhärten Zellen vorsichtig in eine mit phenolrotfreiem Medium gefüllte Glasbodenpetrischale (MatLab) überführt und zügig mikroskopiert. Während der Zeitrafferaufnahmen kultivierten die Zellen in einer Inkubationskammer bei konstant 37°C, 5% CO₂ sowie 98% Luftfeuchtigkeit. Die Mikroskopsteuerung erfolgte mittels MetaMorph Software und die Intervalle der Aufnahme betragen 1 min.

3.5 Immunohistochemie

3.5.1 Ablauf

Nach der Zellkultivierung auf strukturierten Substraten bzw. nach Abschluss der Zeitrafferaufnahmen wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 4% PFA in PBS (Biochrom) fixiert und anschließend 3 x 5 min mit 0,1% Triton-X100 in PBS (PBST) gewaschen und dabei permeabilisiert. Anschließend wurden die Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschriff mit PBST erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern ebenfalls für

1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Dabei handelte es sich um fluoreszenzmarkierte F(ab)₂-Fragmente. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden in 1% Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich) in PBS verdünnt. Für die Färbung des Aktinzytoskeletts wurde dem Sekundärantikörper-Mix fluoreszenzmarkiertes Phalloidin zugegeben. Abschließend wurden die Substrate nochmals 3 x 5 min mit PBST gewaschen und die Präparate in mit n-Propylgallat komplementiertem Mowiol eingebettet. Nach dem Aushärten konnten die Präparate mikroskopisch untersucht werden.

3.5.2 Verwendete Antikörper und Färbesubstanzen

Tab. 3.3: Verwendete Primärantikörper

Antigen	Antikörper-Typ	Herkunft	Verdünnung
FAK	mkl IgG	BD Biosciences, Heidelberg	1:100
Fibronektin	mkl IgG	BD Biosciences	1:500
Fibronektin	pkl IgG	Sigma-Aldrich	1:400
Fibronektin	mkl IgM	Santa Cruz	1:400
Paxillin	mkl IgG	BD Biosciences	1:500
p-FAK (Tyr397)	pkl IgG	Biosource, Solingen	1:300
p-Paxillin (Tyr118)	pkl IgG	Cell Signaling, Danvers/ USA	1:400
Talin	mkl IgG	Biotrend	1:100
Vinculin	mkl IgG	Sigma-Aldrich	1:50
Vitronektin	mcl IgM	Sigma-Aldrich	1:1000
β1-Integrin	IgG (Ratte)	BD Biosciences	1:50

Tab. 3.4: Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Farbstoff	Herkunft	Verdünnung
Maus IgG	Alexa488	Invitrogen	1:200
Maus IgG	AMCA	Dianova, Hamburg	1:200
Maus IgG	Cy3	Dianova	1:400
Maus IgG	Cy5	Dianova	1:200
Maus IgG (Fcγ spezifisch)	Cy3	Dianova	1:400
Maus IgM, μ-Kette	Cy3	Dianova	1:400
Maus IgM, μ-Kette	AMCA	Dianova	1:200
Kaninchen IgG	Alexa488	Molecular Probes	1:200
Kaninchen IgG	AMCA	Dianova	1:200

Antigen	Farbstoff	Herkunft	Verdünnung
Kaninchen IgG	Cy3	Dianova	1:400
Kaninchen IgG	Cy5	Dianova	1:200
Ratte IgG	Alexa488	Invitrogen	1:200
Ratte IgG	Alexa568	Invitrogen	1:200

Tab. 3.5: Verwendete weitere Färbesubstanzen

Farbstoff	Herkunft	Verdünnung
Phalloidin Alexa546	Invitrogen	1:200
Phalloidin Alexa488	Invitrogen	1:200
DAPI	Sigma-Aldrich	1:1000

3.6 Quantifizierung

3.6.1 Verwendete Optiken zur Analyse der Präparate

Apotom Imager Z1, Carl Zeiss	aufrechtes Mikroskop mit Durchlicht, Fluoreszenzlicht
Axiovert 200M, Carl Zeiss	konventionelles inverses Mikroskop mit Durchlicht, Fluoreszenzlicht, CO ₂ -, Temperatur-Kontrolleinheit
LSM 510 Meta, Carl Zeiss	inverses konfokales Laser Scanning Mikroskop

3.6.2 Zellflächen und Kontaktmessung

Zur Messung der Zellfläche als Parameter für das Zellspreading und der Kontaktgröße als Parameter für das Signalling wurden die Fluoreszenzbilder abhängig von den verwendeten Mikroskopen mit MetaMorph (Axiovert 200M, LSM 510 Meta) oder mit AxioVision (Apotom Imager Z1) ausgewertet. Zur Quantifizierung der Konfokalbilder mit MetaMorph wurden die Maximalprojektionen der aufgenommenen Bildstapel im tif-Format exportiert. Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgte durch die Festlegung eines Schwellenwertes, so dass das zu messende Signal für die Zellflächenbestimmung bzw. Kontaktflächenmessung klar vom Hintergrund getrennt werden konnte (Abb. 3.4). Anhand des Schwellenwertes wurde dann die Kontur der zu quantifizierenden Region und somit deren Fläche automatisch erfasst (Abb. 3.4 B, C).

Auf jeder Musterbahn wurden pro Experiment fünf bis 20 Zellen vermessen. Die Zellflächen auf den jeweiligen Bahnen wurden gemittelt (aus drei parallelen Experimenten) und mit dem Standardfehler gegen die geometrische Fibronectinbedeckung in Prozent aufgetragen.

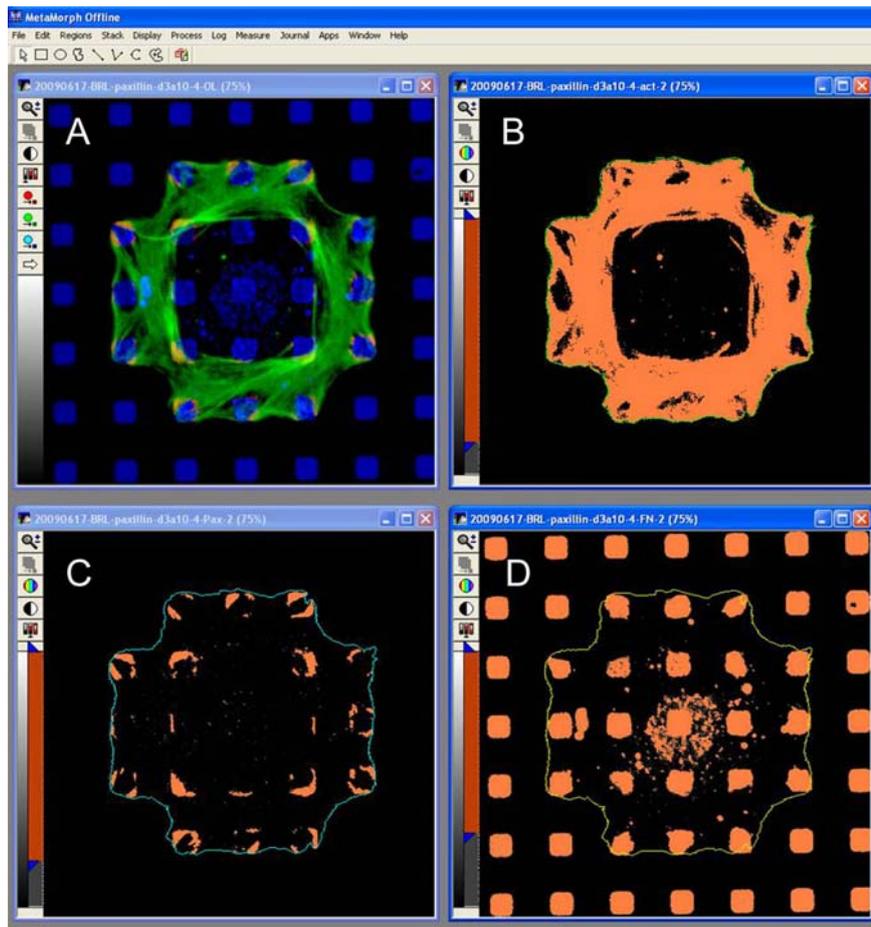


Abb. 3.4 Schwellenwertabhängige Quantifizierung der Zell- und Kontaktfläche

Unter Standardbedingungen kultivierte Zellen wurden fluoreszent markiert und mittels Mikroskop aufgenommen. (A) Ein Beispiel eines LSM-Scans wird ins Metamorph exportiert. (B) Zur Messung der Zellfläche anhand der Aktinfärbung wurde ein Schwellenwert der Pixelintensität so festgelegt, dass der zu messende Bereich (orange markiert in B, C und D) klar vom Hintergrund abgetrennt wurde. Die Konturen wurden nachfolgend automatisiert angelegt. Für die Zellflächenmessung wurden schwarze Bereiche in der Region, in denen die Pixelintensität kleiner als der Schwellenwert ist, durch die Funktion „Löcherfüllung“ mit einberechnet. (C, D) Die erhaltene Kontur wurde nachfolgend in die Bilder der Kontakt- bzw. Fibronectin-Färbung kopiert und dadurch die schwellenwertmarkierte Fläche des (C) Kontaktmarkers bzw. (D) die geometrische Fibronectinbedeckung unter der Zelle bestimmt.

Um den Einfluss der effektiven Fibronectinbedeckung auf das Zellverhalten zu untersuchen, wurde die effektive Fibronectinbedeckung einzelner Bahnen für jede Verdünnung ausgerechnet (Kapitel 3.3.5). Die Zellflächen wurden dann mit dem Standardfehler gegen die effektive Fibronectinbedeckung (FN-Moleküle/ μm^2) aufgetragen.

3.6.3 Überbrückung antiadhäsiver Distanzen

Einzelnen auf den strukturierten Substraten mit *Dot*-Muster ausgebreitete Zellen wurden ausgezählt und hinsichtlich ihrer Fähigkeit, antiadhäsive Distanzen zu überbrücken, in drei verschiedene Gruppen eingeteilt: (1) Zellen, die sich über 5 oder mehr *Dots* ausbreiteten, (2) Zellen, die 2 bis 4 *Dots* überbrücken konnten und (3) Zellen, die nur auf einem *Dot* adhärten. Zellen auf jeder Musterbahn wurden komplett ausgezählt und für jede Fibronectinverdünnung wurden drei Experimente ($n = 3$) durchgeführt. Alle Zellen der gleichen Bahnen in einem Experiment entsprachen einer relativen Zellzahl von 100%. Aus den ermittelten absoluten Zellzahlen der drei Gruppen wurde dann die relative Zellzahl errechnet, gegen den *Dot*-Abstand aufgetragen und der ermittelte Standardfehler angezeigt.

3.6.4 Software zur Auswertung, Darstellung und statistischen Analyse

- MetaMorph[®] Version 6.2r6, Visitron (Puchheim)
- LSM Release Version 4.2 SP1, Carl Zeiss
- AxioVision Version 4.7, Carl Zeiss
- Photoshop[®] CS2, Version 9.0.2, Adobe, München
- Office Excel 2003 SP3, Microsoft, Redmont/WA, USA
- Origin 8.0, Microcal, Bucks, UK

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Zelladhäsionsverhaltens auf geometrischen mikrostrukturierten Substraten mit variabler Ligandendichte. Dabei sollte die Frage beantwortet werden, ob adhärent wachsende Zellen in der Lage sind, die Anzahl der präsentierten ECM-Moleküle pro Fläche quantitativ wahrzunehmen. Des Weiteren sollten die zugrunde liegenden intrazellulären Mechanismen analysiert werden. Lehnert *et al.* haben bereits gezeigt, dass das Zellspreading positiv mit der geometrischen ECM-Bedeckung korreliert. Dabei wurde die Variation in der geometrischen ECM-Bedeckung durch den Einsatz verschiedener Substratgeometrien erzielt. Zudem ist bekannt, dass auch die Änderung der Ligandendichte durch die Verdünnung der ECM-Moleküle auf homogenen Substraten eine entscheidende Wirkung auf das Zellverhalten ausübt (Kap. 2.5).

Um die Änderungen der Substratbedeckung, die in dieser Arbeit sowohl musterabhängig durch die geometrische Strukturierung als auch verdünnungsabhängig durch den Einsatz definierter Liganden-Konzentrationen erzielt wurden, zu berücksichtigen, wird der Begriff der „effektiven ECM-Bedeckung“ eingeführt. Die effektive Bedeckung gibt an, wie viele effektive (aktive) Fibronectin-Moleküle sich auf einer Flächeneinheit des Substrats befinden. Die Kombination aus Substratgeometrien und Fibronectinverdünnungen ermöglichte es, definierte effektive Fibronectinbedeckungen über beide Wege zu erzielen. Damit konnte überprüft werden, ob die ECM-Molekülanzahl unabhängig von der Substrat-Geometrie durch die Zellen wahrgenommen wird. Die Quantifizierung einer Vielzahl unterschiedlicher intrazellulärer Markerproteine, die eine bedeutende Rolle in der Kontaktausbildung und Signalweiterleitung spielen, ermöglicht die Analyse der Mechanismen, die der quantitativen Wahrnehmung der zellulären Umgebung zu Grunde liegen.

4.1 Charakterisierung der μ CP-Substrate

Die geometrischen mikrostrukturierten Substrate wurden durch *Microcontact-Printing* (μ CP) hergestellt (Kap. 2.2.3). Das Fibronectin bindet durch hydrophobe Wechselwirkung an das gestempelte hydrophobe Thiol. Da das Bindungsverhalten von Fibronectin an Thiol schwer kontrollierbar ist, wurde die gesamte Proteinkonzentration während der Verdünnung des aktiven Fibronectins konstant gehalten. Zur Ergänzung der verringerten Menge an aktivem Protein wurde inaktives Fibronectin als Ersatz-Protein eingesetzt, das keine Zelladhäsion vermittelt. Das inaktive Fibronectin sollte im Vergleich zu anderen Proteinen immer noch die größte strukturelle Ähnlichkeit mit dem natürlichen Fibronectin besitzen. Daher sind ähnliche Bindungseigenschaften vergleichbar zu aktivem Fibronectin

an das hydrophobe Thiol zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Inaktivierung des Fibronektins eingesetzt. Zum Einen wurde das Fibronektin mit einem NHS-aktivierten, fluoreszierenden Farbstoff markiert (Lehnert *et al.* 2004). Zum anderen wurde das Fibronektin durch Erhitzung bzw. Denaturierung inaktiviert. Die erfolgreiche Inaktivierung des Fibronektins wurde durch ein deutlich vermindertes Zellspreading nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Um die Substrateigenschaften der strukturierten fibronektinbeschichteten Oberfläche zu definieren, wurden die Methoden der immunohistochemischen Färbung (IHC), der Rasterelektronenmikroskopie (REM), der Rasterkraftmikroskopie (AFM) und der Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) (Kap. 3.3) eingesetzt und die Strukturierung und Fibronektinbeschichtung charakterisiert.

4.1.1 Erfolgreicher Protein-Übertrag durch μ CP

Um die übertragenen Proteine bei der Herstellung der strukturierten Substrate nachzuweisen, wurden die Substrate direkt nach der Herstellung immunohistochemisch angefärbt und mikroskopisch untersucht. Abb. 4.1 A zeigt ein *Dot*-Muster mit einer Kantenlänge von 3 μ m und einem Abstand von 10 μ m. Die *Dots* sind ohne Abweichungen identisch abgebildet und gleichmäßig angefärbt, was auf eine homogene Fibronektinbeschichtung deutet. Nicht bestempelte Bereiche sind schwarz ohne Fluoreszenzsignal und demonstrieren die erfolgreiche Passivierung der Oberfläche.

Um die Zellreaktion auf die Geometrie zu beobachten, wurden A549- und BRL-Zellen für 80 min auf strukturierten Substraten kultiviert und anschließend fixiert. Die fixierten Präparate wurden durch Kritische-Punkt-Trocknung (KPT) getrocknet und rasterelektronenmikroskopisch gescannt. Die geometrisch angeordneten Fibronektin-*Dots* heben sich vom passivierten Hintergrund ab (Abb. 4.1 B, B', C und C'). Die erwartete Schichthöhe von ca. 3 nm scheint nicht ausreichend für ein starkes Signal zu sein. Der Nachweis der Proteinschichthöhe bedarf somit noch weiteren Analysemethoden wie AFM und XPS (Kap 4.1.2).

Beide Zelltypen (Abb. 4.1 B, B', C und C') bilden eine geometrische Morphologie aus, deren Kontaktstellen durch die proteinbeschichteten *Dots* vorgegeben sind. Die Zellkonturen sind dabei kreisbogenförmig mit abstandsabhängigen Radien ausgebildet (Bischofs *et al.* 2008). Die REM-Bilder verdeutlichen zudem, dass die beiden Zelltypen unterschiedliche Oberflächenmorphologien aufweisen. Die A549-Zellen sind aus einem humanen Lungenkarzinomgewebe kultivierte Alveolarepithelzellen (Giard *et al.* 1973). Daher haben sie auf der Oberfläche zahlreiche Mikrovilli sowie kleine kugelförmige Strukturen. Diese Strukturen sind ursprünglich wahrscheinlich für die Sekretion komplexer Oberflächenmaterialien, die die innere Wand der Alveolen verkleiden, verantwortlich. Die

BRL-Zellen sind parenchymale Zellen aus dem Ratten-Lebergewebe. Diese Zellen zeigen im Vergleich zu den A549-Zellen eine komplett glatte Oberfläche mit sehr vereinzelt Mikrovilli. Die unterschiedlichen Ergebnisse von Chen und Lehnert resultieren sehr wahrscheinlich aus der Untersuchung unterschiedlicher Zelltypen (Kap. 2.6). Um einen allgemeingültigen Mechanismen für die Ligandenerkennung zu finden, wurden hier die epithelialen A549-Zellen, die parenchymalen BRL-Zellen und die fibroblastenähnlichen B16-Zellen eingesetzt.

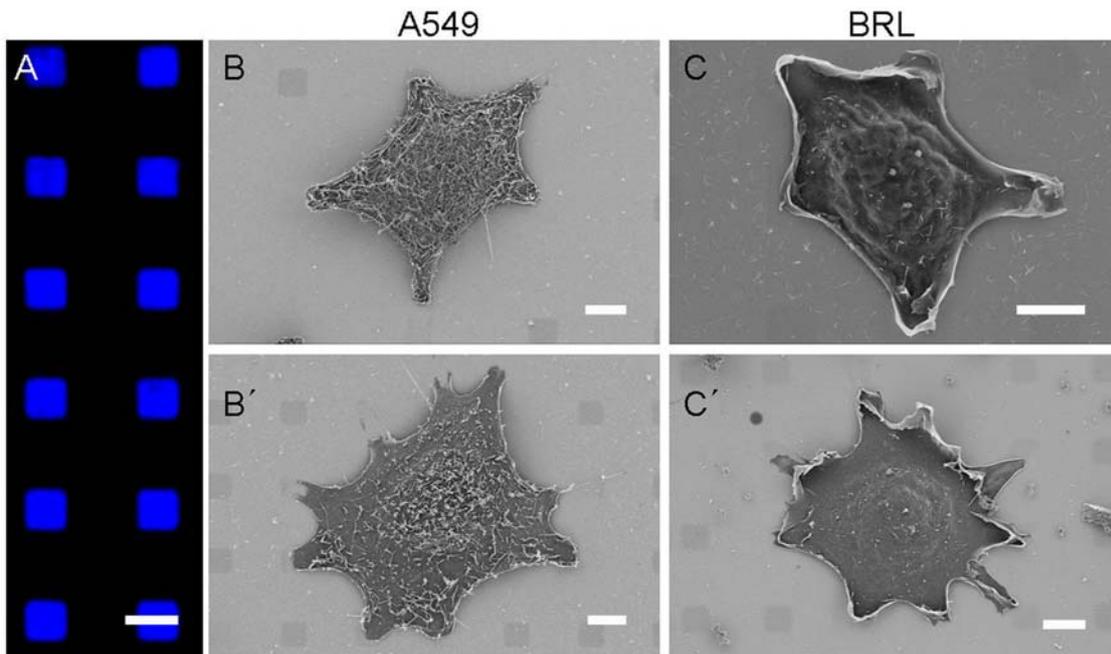


Abb. 4.1 Erfolgreiche geometrische Proteinanordnung

(A) Fibronectinbeschichtete strukturierte Substrate wurden immunohistochemisch gefärbt und zeigen den strikten Übertrag des Proteins. (B, B') A549- und (C, C') BRL-Zellen wurden auf mikrostrukturierten Substraten kultiviert und nach der Fixierung rasterelektronenmikroskopisch gescannt. Die geometrischen Protein-Dots heben sich vom passivierten Hintergrund ab. Die Zellen bilden eine geometrische Morphologie aus, die durch die Substratgeometrie vorgegeben ist. Beide Zelltypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zelloberflächenstruktur. Die A549-Zellen bilden zahlreiche Mikrovilli auf ihrer Oberfläche aus, die BRL-Zellen hingegen zeigen eine glatte Oberfläche. Maßstabsbalken: 5 μm .

4.1.2 ECM-Beschichtung bildet einen homogenen Monolayer

Die in Kap. 4.1.1 gezeigten immunohistochemischen und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen demonstrieren lediglich den erfolgreichen Protein-Übertrag durch μCP . Aussagen über die absolute Fibronectin-Molekülanzahl pro Flächeneinheit lassen sich mit diesen Methoden jedoch nicht treffen. Eine Möglichkeit des quantitativen Nachweises bzw. der direkten Bestimmung der Ligandendichte ist die Radioisotopen-

Analyse (Asthagiri *et al.* 1999; Hughes *et al.* 1979; Kowalczyńska *et al.* 2005; Rajagopalan *et al.* 2004), für deren Durchführung unsere Laborstandards jedoch nicht ausreichend sind. Andere Methoden wie die Immunohistochemie und der Elisa (engl. *Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay*) liefern nur indirekt eine relative Angabe über die Ligandendichte (Kowalczyńska *et al.* 2005; Semler *et al.* 2005). Da die Molekülgröße von Fibronectin bekannt ist (Engel *et al.* 1981), kann die Fibronectinanzahl pro Flächeneinheit bei bekannter Fibronectin-Schichtdickenhöhe errechnet werden. Mittels AFM-Messung zeigten Lehnert *et al.* 2004, dass die Fibronectin-Schicht ca. 3 nm hoch ist und kalkulierten basierend auf dieser Kenntnis für eine homogene Fibronectinbeschichtung eine Ligandendichte von ca. 1000 FN-Moleküle/ μm^2 . In dieser Arbeit wurde anhand der gleichen Methode überprüft, ob die Verminderung des Anteils an aktivem Fibronectin die Beschichtung beeinflusst. Ergänzend wurde die Oberfläche durch die Methode des XPS charakterisiert.

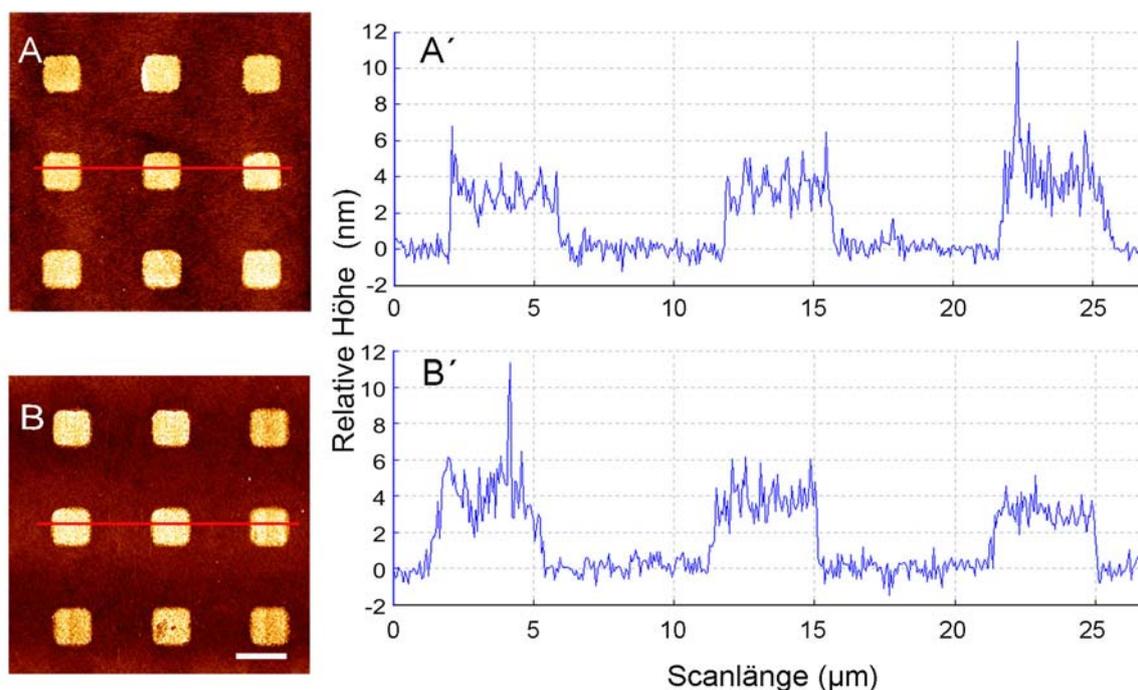


Abb. 4.2 AFM-Analyse demonstriert konstante Schichthöhe trotz unterschiedlichem Anteil von aktivem Fibronectin

Mittels μCP hergestellte, mit 100% aktivem (A) oder 50% (B) aktivem Fibronectin beschichtete Substrate wurden über Nacht in 2% Paraformaldehyd und 2% Glutaraldehyd in PBS fixiert und 3x je 10 min mit PBS gespült. Die fixierten Substrate wurden mittels AFM im Kontaktmodus gescannt. A und B zeigen erfolgreich übertragene *Dot*-Muster auf den Substraten. Aufgrund der Fibronectinbeschichtung heben sich die *Dots* in ihrer Höhe vom passivierten Hintergrund ab. (A') und (B') Die Höhenprofile von Querschnitten (gekennzeichnet durch roten Linien in A und B) fibronectinbeschichteter Bereiche demonstrieren eine Erhöhung von ca. 3 nm im Vergleich zum passivierten Hintergrund. Auch bei Zugabe von 50% inaktivem Fibronectin zeigen sich konstante Höhenprofile der *Dots*. Maßstabsbalken: 5 μm .

Sowohl mit 100% als auch mit 50% aktivem Fibronectin beschichtete Substrate zeigen ein gleichmäßiges Höhenprofil der *Dots* (Abb. 4.2). Der Höhenunterschied zwischen dem fibronectinbeschichteten Bereich und dem passivierten Hintergrund beträgt einheitlich ca. 3 nm. Da der Durchmesser eines Fibronectin-Moleküls ca. 3 nm beträgt, kann man bei beiden Proteinkonzentrationen auf die Ausbildung eines Monolayers aus Fibronectin-Molekülen rückschließen. Der Monolayer ist sporadisch von ca. 6 nm hohen Peaks unterbrochen (Abb. 4.2 A' und B'), die sehr wahrscheinlich Überlagerungen von Fibronectin-Molekülen entsprechen.

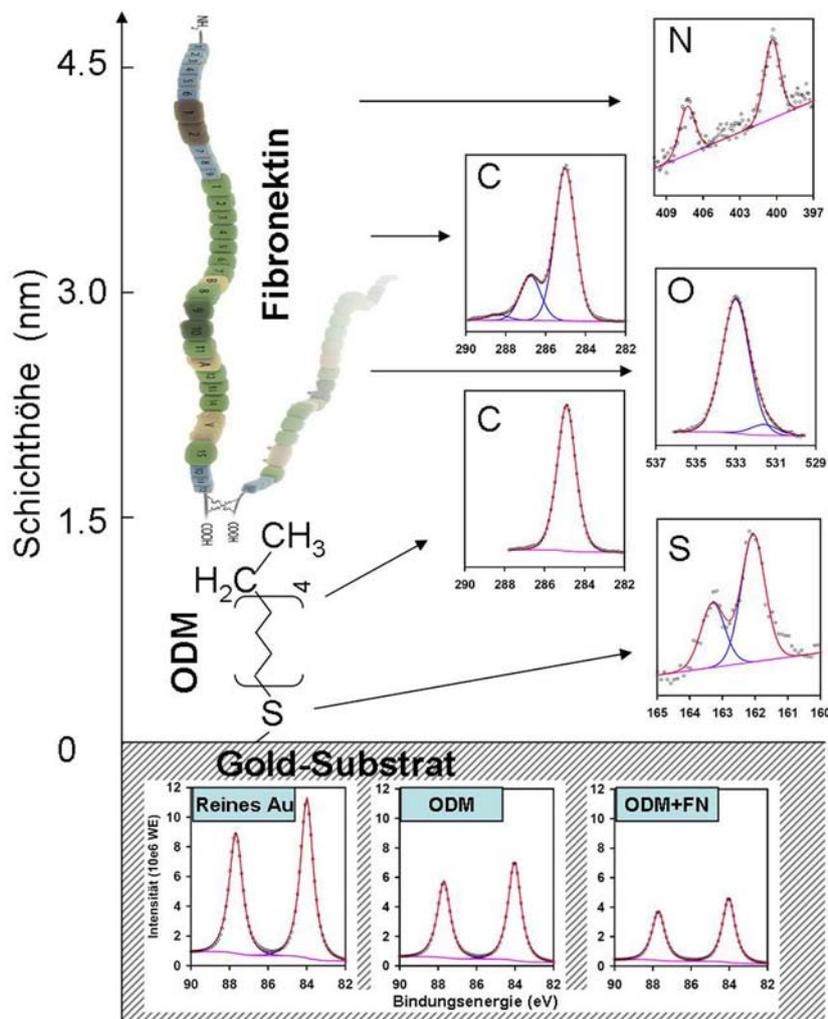


Abb. 4.3 XPS-Analyse demonstriert Fibronectin-Schichtdicke von ca. 3 nm

Das auf der Goldoberfläche gebundene ODM und darauf absorbiertes Fibronectin wird schematisch dargestellt. Die y-Achse gibt die Höhe im Vergleich zur Goldoberfläche an. Die rechte Bildreihe zeigt einzelne Spektren typischer Zählungen bestimmter Atome in den funktionellen Verbindungen vom ODM und Fibronectin. Die Spektren unten sind für das Gold bei unterschiedlichen Oberflächenbehandlungen (in hellblauen Kästen gekennzeichnet). Die detektierte Intensität nimmt mit der Zunahme der Schichtdicke ab. Die ODM-Schicht hat eine Dicke von ca. 1.5 nm und Fibronectin ca. 3 nm. Die Intensitätsachse bei N, C, O und S ist nicht normalisiert und daher nicht miteinander zu vergleichen.

Auch bei Zugabe von 50% inaktiviertem Fibronectin bleibt das Höhenprofil von durchschnittlich 3 nm Schichthöhe vergleichbar zur Oberfläche mit 100% aktivem Fibronectin erhalten. Die Inaktivierung von Fibronectin zur Beimischung bzw. Verdünnung von aktivem Fibronectin ist somit zur Untersuchung des Zellverhaltens auf Strukturen mit definierter Ligandendichte geeignet.

Mittels winkelabhängiger XPS-Messungen lässt sich die Dicke der analysierten Schicht über Intensitätsabschwächung des Photoelektronensignals bestimmen. Allein mit ODM beschichtete und mit ODM und Fibronectin nacheinander beschichtete Proben wurden mittels XPS analysiert. Das auf dem Gold gebundene ODM bildet eine Schicht von ca. 1.5 nm (Abb. 4.3). Die darauf gebundene Fibronectin-Schicht ist ca. 3 nm dick. Diese gemessene Dicke entspricht dem bekannten Durchmesser eines Fibronectin-Moleküls.

4.1.3 Kalkulation einer FN-Monolayer-Bedeckung von ca. 1000 FN-Moleküle/ μm^2

Sowohl die AFM als auch die XPS-Analyse liefern eindeutige Hinweise auf die Ausbildung eines Fibronectin-Monolayers. Da die Fibronectin-Moleküle sehr wahrscheinlich nicht parallel nebeneinander angeordnet, sondern vermutlich zufällig auf der Oberfläche verteilt sind, ist davon auszugehen, dass die Oberfläche nicht komplett von den Fibronectin-Molekülen bedeckt ist. Unter der Annahme einer 50%igen Molekül-Bedeckung errechneten Lehnert *et al.* 2004 die Bindung von ca. 1000 FN-Molekülen auf einer Fläche von 1 μm^2 . Da ein Fibronectin-Molekül aus zwei Monomeren besteht und auf jedem Monomer eine Bindungsstelle für den Hauptrezeptor lokalisiert ist, sind durch μCP ca. 2000 Bindungsstellen für das Integrin- $\alpha_5\beta_1$ auf einer Fläche von 1 μm^2 angebracht.

4.2 Zellspreading auf strukturierten Substraten

Die Wechselwirkungen zwischen den Zellen und ihrer ECM-Umgebung beginnen mit dem ersten Kontakt zwischen den Reaktionspartnern. Auf einem homogen beschichteten Substrat tasten die Zellen die Umgebung ab. Bei günstigen Bedingungen bilden sie Zell-ECM-Kontakte und breiten sich flächig auf dem Substrat aus. Auf den strukturierten Substraten haben die Zellen jedoch nur die Möglichkeit, über den mit Fibronectin beschichteten *Dots* zu haften und Kontakte auszubilden. Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, wie die Zellen auf unterschiedlich präsentierte ECM-Moleküldichten reagieren. Der Dichtenunterschied des präsentierten ECM-Proteins wird dabei durch eine strukturierte Geometrie, eine definierte Fibronectinverdünnung oder aus deren Kombination hergestellt. Um sich auszubreiten, versuchen die Zellen beispielsweise mit Hilfe eines Lamellipodiums antiadhäsive Distanzen zu überbrücken. Diesem Zellverhalten sind geometrische Grenzen gesetzt (Lehnert *et al.* 2004). Ist die Distanz für die Zellen nicht mehr überbrückbar, adhären sie kugelförmig auf nur einem *Dot*. In den folgenden

Kapiteln wird der Einfluss der Strukturgeometrie, der Fibronektinverdünnung bzw. der effektiven Fibronektinbedeckung auf das Zellverhalten im Bezug auf die Anzahl adhärierter Zellen, die Überbrückung antiadhäsiver Distanzen sowie die Spreadingfläche untersucht.

4.2.1 Anzahl adhärierter Zellen nimmt mit zunehmender FN-Bedeckung zu und mit FN-Verdünnung ab

Um den Einfluss der Fibronektinverdünnung auf die Anzahl adhärierter Zellen zu untersuchen, wurden A549- und BRL-Zellen auf strukturierten *Dot*-Substraten mit unterschiedlichen Fibronektinverdünnungen für 80 min in serumfreiem Medium kultiviert. Nach der Kultivierung wurden das Aktinzytoskelett der Zellen sowie das Substratprotein

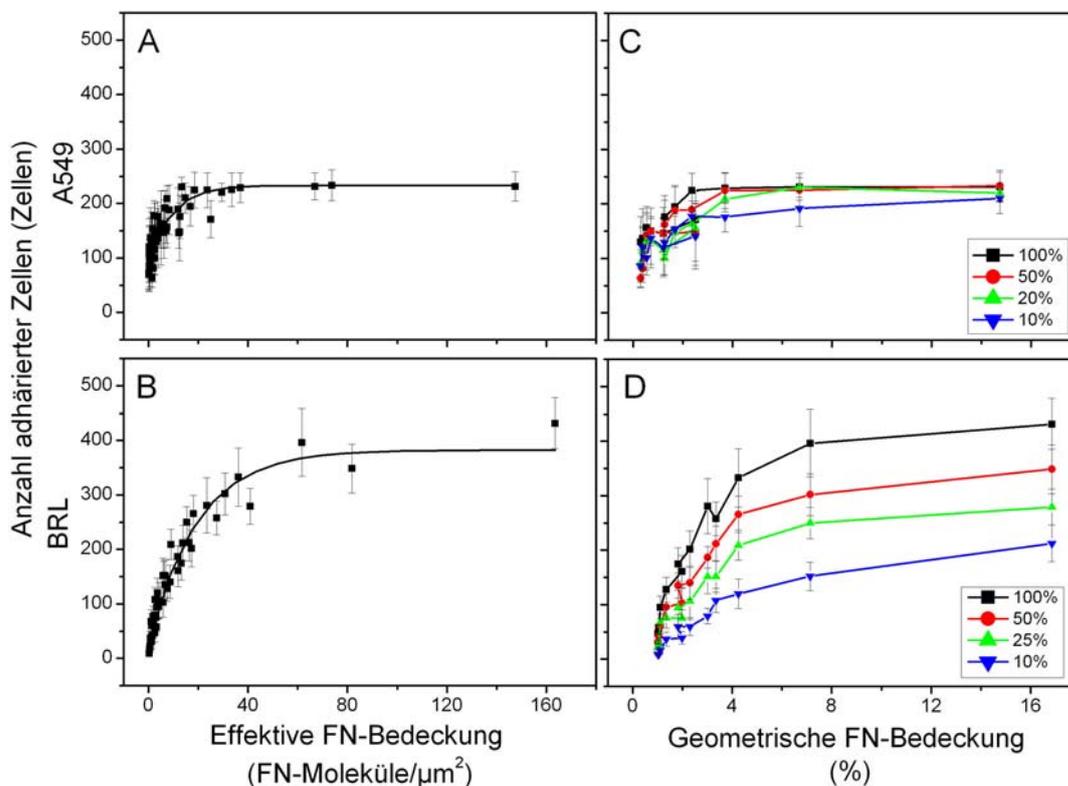


Abb. 4.4 Anzahl adhärierter Zellen nimmt mit der FN-Bedeckung zu und mit der Verdünnung ab

A549- und BRL-Zellen wurden auf strukturierten Substraten mit unterschiedlichen Konzentrationen von aktivem Fibronektin für 80 min kultiviert. Anhand der immunohistochemischen Färbung wurde auf jeder Bahn die Anzahl adhärierter Zellen ausgezählt und gegen die Fibronektinbedeckung aufgetragen. (A) A549- und (B) BRL-Zellen zeigen eine Zunahme der Zellzahl bei ansteigender effektiver Fibronektinbedeckung. Die maximal adhärterte Zellzahl ist bei BRL-Zellen im Vergleich zu A549-Zellen ungefähr verdoppelt. (C) und (D) Die Zellzahl wurde zusätzlich durch die Fibronektinverdünnung verringert, was besonders eindeutig bei BRL-Zellen zu sehen ist.

fluoreszent markiert. Einzeln ausgebreitete Zellen auf Bahnen mit einer theoretischen *Dot*-Größe von $1 \mu\text{m}^2$ und $9 \mu\text{m}^2$ und antiadhäsiven Distanzen zwischen $10 \mu\text{m}$ und $35 \mu\text{m}$ wurden anhand der Aktinfärbung ausgezählt. Von jedem Substrat wurden drei gestempelte Strukturen ausgezählt und die Zellzahl identischer Muster zusammengeführt. Der Mittelwert dreier Experimente wurde mit dem Standardfehler gegen die effektive bzw. geometrische Fibronectinbedeckung aufgetragen.

Beide Zelltypen zeigen eine Zunahme der Zellzahl mit der effektiven Fibronectinbedeckung (Abb. 4.4 A und B), die nach einer Anlaufphase in die Sättigung übergeht. Die Anlaufphase ist bei A549- etwas kürzer als bei BRL-Zellen. Die A549-Zellen brauchen daher weniger Fibronectin-Moleküle für eine maximale Zelladhäsion. Im Vergleich zu den BRL-Zellen ist die maximale Anzahl von A549-Zellen im Sättigungsbereich jedoch halbiert. In Abb. 4.4 C und D ist die adhärenzte Zellzahl abhängig von der Fibronectinkonzentration gegen die geometrische Fibronectinbedeckung aufgetragen. Beide Zelltypen zeigen im Adhäsionsverhalten eine Abhängigkeit von der Konzentration des aktiven Fibronectins, die bei BRL-Zellen besonders klar ausgeprägt ist.

4.2.2 Die Fähigkeit zur Distanzüberbrückung nimmt mit der FN-Verdünnung ab

Um die Fähigkeit zur Überbrückung antiadhäsiver Abstände zu untersuchen, wurden die für die Adhäsionsstatistik ausgezählten Zellen (Kap. 4.2.1) in drei Gruppen eingeteilt: (1) Zellen, die 5 oder mehr *Dots* bedecken; (2) Zellen, die auf 2 - 4 *Dots spreaden* und (3) Zellen, die auf nur einem *Dot* haften. Die prozentuale relative Zellzahl jeder Gruppe wurde errechnet und die gemittelte relative Zellzahl mit dem Standardfehler gegen den *Dot*-Abstand aufgetragen. Für jede Verdünnung wurden drei Experimente ($n = 3$) ausgewertet. Generell vermindert sich die relative Zellzahl der gut ausgebreiteten Zellen (Zellgruppe 1) mit der Zunahme des *Dot*-Abstands. Im Vergleich zu BRL-Zellen sind die A549-Zellen wesentlich besser in der Lage, antiadhäsive Distanzen zu überbrücken. Betrachtet man nur Zellen auf 100% aktivem Fibronectin, so *spreaden* ca. 80% der A549- und 60% der BRL-Zellen über fünf bzw. mehr als fünf $9 \mu\text{m}^2$ *Dots* bei einem *Dot*-Abstand von $10 \mu\text{m}$ (Abb. 4.5 D, J). Die restlichen Zellen überbrücken überwiegend 2 - 4 *Dots* (Abb. 4.5 E, K). A549-Zellen adhären kaum auf nur einem *Dot* (Abb. 4.5 F). Der Anteil dieser Gruppe beträgt bei BRL ebenfalls weniger als 20%. Vergrößert sich der *Dot*-Abstand auf $15 \mu\text{m}$, sinkt der Anteil der gut ausgebreiteten Zellen (Gruppe 1) bis auf ca. 50% bei A549- und bei BRL-Zellen dramatisch auf 5%. Der Anteil nicht ausgebreiteter Zellen (Gruppe 3) steigt dagegen auf ca. 10% bei A549 und 50% bei BRL. Die relative Zellzahl mittelgroßer Zellen (Gruppe 2) steigt bei beiden Zelltypen leicht an. Ab einem *Dot*-Abstand von $20 \mu\text{m}$ ist der Anteil der A549-Zellen an der Gruppe 1 immer noch ca. 20%, dagegen schaffen es

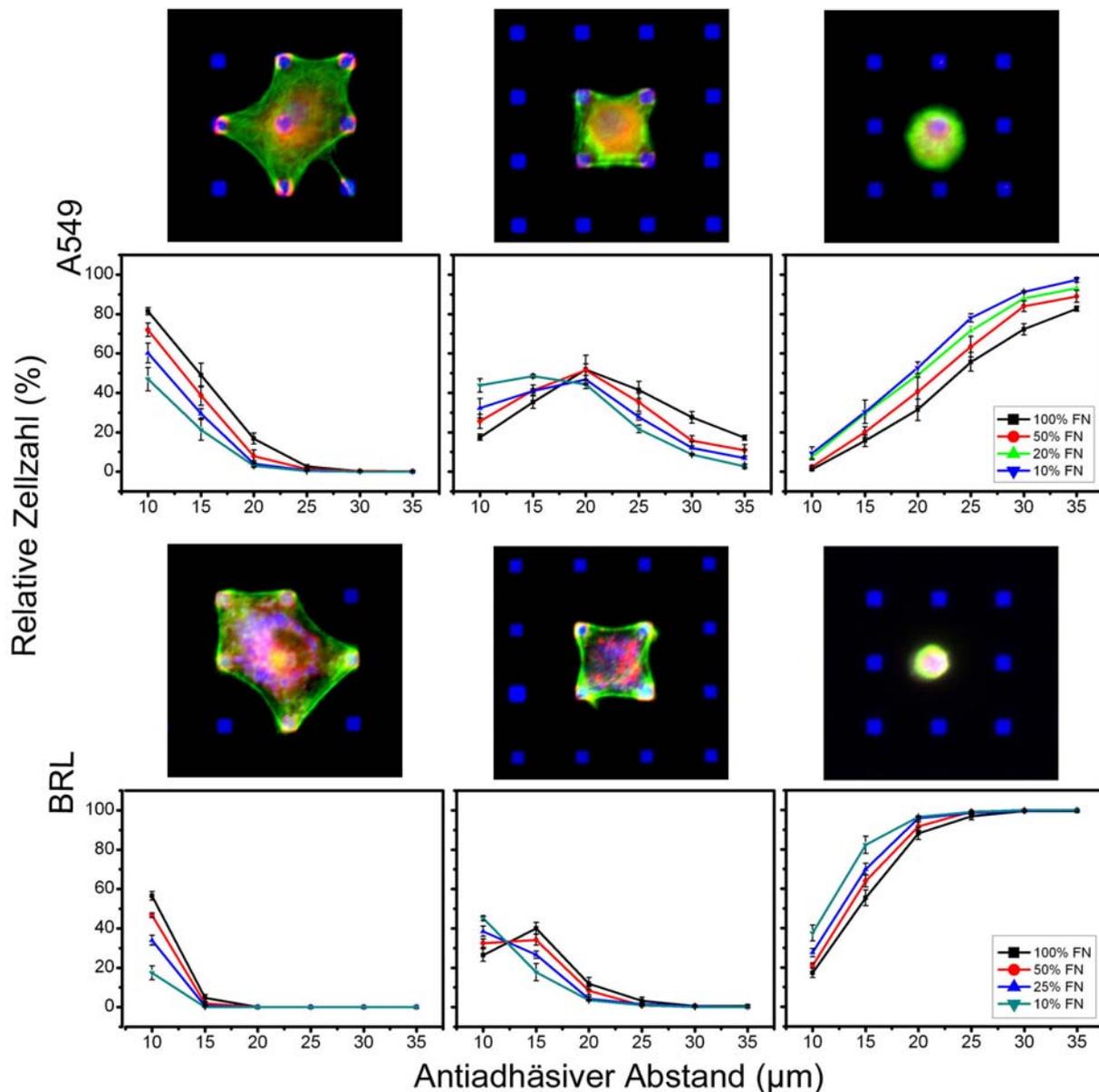


Abb. 4.5 Zellen überbrücken nach FN-Verdünnung geringere antiadhäsive Distanzen (1)

(A-F) A549- und (G-L) BRL-Zellen wurden auf strukturierten Substraten mit unterschiedlich aktiven Fibronektin-Konzentrationen (10-100%) für 80 min in serumfreiem Medium kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen fixiert und Aktin (grün), Fibronektin (blau) und Paxillin (rot) immunohistochemisch gefärbt. Einzelne ausgebreitete Zellen wurden ausgezählt und in drei Gruppen eingeteilt: (1) Zellen, die 5 oder mehr *Dots* überbrücken können; (2) Zellen, die auf 2 - 4 *Dots* spreaden und (3) Zellen, die auf nur einem *Dot* adhären. Immunofluoreszenzbilder repräsentativer Zellen einer jeden Gruppe sind gezeigt (A, B und C für A549; G, H und I für BRL). Die relative Zellzahl der einzelnen Gruppen auf $9 \mu\text{m}^2$ *Dots* wurde berechnet und mit dem Standardfehler gegen den *Dot*-Abstand aufgetragen. Bei beiden Zelltypen nimmt die Fähigkeit zur Überbrückung antiadhäsiver Distanzen mit stärkerer Fibronektinverdünnung ab. A549-Zellen überbrücken größere Distanzen als BRL-Zellen.

keine BRL-Zellen in diese Gruppe. Steigt die antiadhäsive Distanz auf maximale 35 μm , überbrücken nur noch ca. 20% der A549-Zellen 2 - 4 *Dots*. Die BRL-Zellen adhären dagegen bei einer Distanz ab 25 μm fast nur noch auf einem *Dot* (Zellgruppe 3).

Bei einer Verdünnung der aktiven Fibronektin-Konzentration zwischen 10 - 50% nehmen die relativen Zellzahlen auf gleichem *Dot*-Muster verdünnungsabhängig bei der Gruppe 1 ab und bei Gruppe 3 zu. Je größer die Fibronektinverdünnung ist, desto kleiner ist der Anteil an ausgebreiteten Zellen und desto größer ist der Anteil an Zellen auf einem *Dot*. Alle drei Zellgruppen zeigen klar eine Linksverschiebung der Kurven, die strikt mit der Verdünnungsstärke zunimmt. Das heißt, je stärker das Fibronektin verdünnt wird, desto weiter links liegt die entsprechende Kurve, da die Zellen geringere antiadhäsive Distanzen überbrücken.

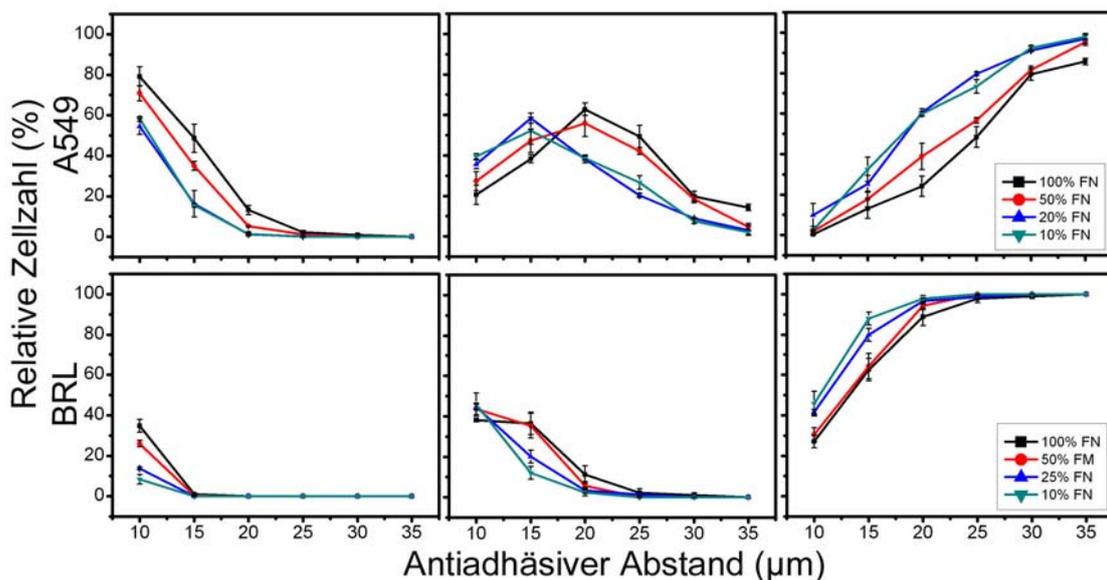


Abb. 4.6 Zellen überbrücken nach FN-Verdünnung geringere antiadhäsive Distanzen (2)

A549 und BRL-Zellen wurden auf geometrischen Substraten mit 1 μm^2 *Dots* kultiviert und hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Distanzüberbrückung ausgewertet. Beide Zelltypen zeigen eine von der Fibronektinverdünnung abhängige Überbrückungsfähigkeit. A549-Zellen können größere Distanzen als BRL-Zellen überbrücken.

Die gleiche Tendenz zeigen auch Zellen, die auf Musterbahnen mit 1 μm^2 großen *Dots* kultiviert wurden (Abb. 4.6). Prinzipiell verlaufen alle Kurven ähnlich denen auf dem 9 μm^2 *Dot*-Muster. Mit der Verdünnung des Fibronektins werden auch diese Kurven nach links verschoben. Diese Linksverschiebung nimmt ebenfalls mit der Fibronektinverdünnung zu. Die Verringerung der Fibronektinbedeckung durch die kleine *Dot*-Größe zeigt keinen Einfluss auf das Überbrückungsverhalten der A549-Zellen (Vergleich Abb. 4.5 D, E, F mit Abb. 4.6 A, A', A''). Jedoch beeinträchtigt diese Verringerung signifikant die Distanzüber-

brückung der BRL-Zellen (Vergleich Abb. 4.5 J, K, L mit Abb. 4.6 B, B', B''). Die relative Zellzahl der Gruppe 1 verringert sich von ca. 60% auf den 9 μm^2 *Dots* auf ca. 35% auf den 1 μm^2 *Dots* bei 100% aktivem Fibronectin. Es gibt keine BRL-Zellen, die bei Distanzen von 15 μm mehr als 5 *Dots* überbrücken können. Auf dem 9 μm^2 *Dots* liegt dieser Anteil bei ca. 5%.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass beide Zelltypen unabhängig von der *Dot*-Größe bei einer Abnahme der Fibronectin-Ligandendichte zunehmend die Fähigkeit zur Distanzüberbrückung verlieren. Die A549-Zellen überbrücken im Vergleich zu BRL-Zellen größere Distanzen unabhängig von der *Dot*-Größe sowohl auf den großen 9 μm^2 *Dots*, als auch auf den kleinen 1 μm^2 *Dots*. Bei den BRL-Zellen zeigt sich dagegen eine positive Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Distanzüberbrückung und der *Dot*-Größe.

4.2.3 Zellgröße nimmt mit der FN-Bedeckung zu und mit der FN-Verdünnung ab

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Anzahl adhärierter Zellen und die Distanzüberbrückung von der Fibronectinbedeckung des Substrates abhängig sind und auch durch die Fibronectinverdünnung bzw. Ligandendichte beeinflusst werden. Um den Einfluss der präsentierten Fibronectin-Menge auf das Zellspreading zu untersuchen, wurden drei verschiedene Zelltypen auf identischen geometrischen Substraten mit unterschiedlichen Fibronectinverdünnungen kultiviert und fluoreszent markiert. Die Zellfläche wurde anhand der aktinegefärbten Zellen mit der Metamorph-Software ermittelt, und mit angezeigten Standardfehlern gegen die effektive oder geometrische Fibronectinbedeckung aufgetragen.

Unabhängig davon, wie die effektive Fibronectinbedeckung erzielt wurde (durch geometrische Strukturierung, durch Fibronectinverdünnung, oder durch eine Kombination beider Methoden) zeigen alle Spreadingkurven unabhängig vom Zelltyp einen ähnlichen Verlauf. Die Zellfläche nimmt im Bereich geringerer Ligandendichten mit der effektiven Fibronectinbedeckung stark zu und erreicht bei einer zelltypspezifischen Fibronectinbedeckung ein Spreading-Maximum (Abb. 4.7 A, B, C). Wurden die Spreadingkurven entsprechend der aktiven Fibronectin-Konzentration aufgetrennt und gegen die geometrische Fibronectinbedeckung aufgetragen, bleibt der sigmoidale Kurvenverlauf erhalten (Abb. 4.7 A', B', C'). Die Zellgröße verringert sich jedoch mit der Stärke der Verdünnung bei gleicher geometrischer Bedeckung, so dass auch die maximale Zellgröße positiv mit der Fibronectin-Konzentration korreliert. Die Kreise mit durchgezogener Linie in Abb. 4.7 A' und B' zeigen Zellflächen auf homogen beschichteten Substraten mit 50% aktivem Fibronectin. Die punktierten Kreise markieren ähnlich hohe Bedeckungen, die jedoch durch Strukturierung erzielt werden. Der t-Test zwischen Zellen auf diesen beiden

Substrattypen zeigt, dass die Zellflächen sich nicht signifikant unterscheiden. Dies ist ein weiterer Beleg, dass nicht die geometrische Verteilung, sondern die Menge der Fibronektin-Liganden für das Zellspreading entscheidend ist.

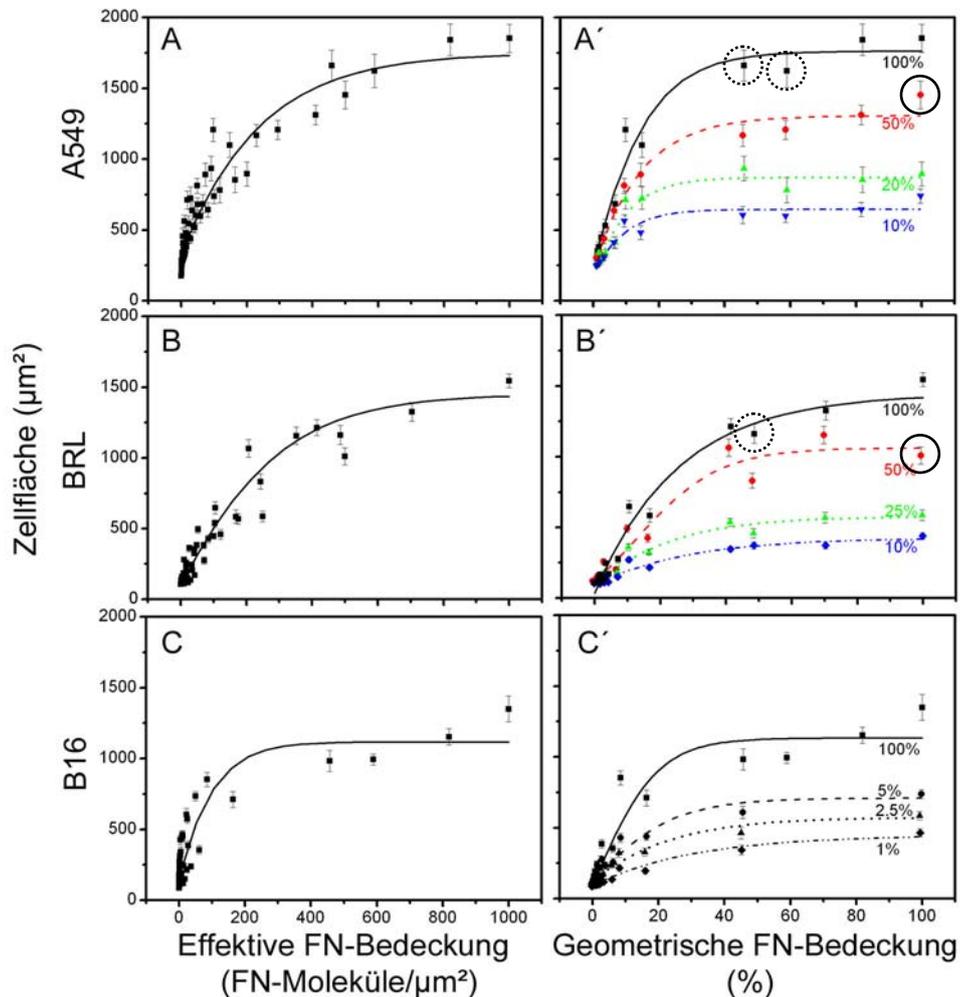


Abb. 4.7 Zellfläche nimmt sowohl mit der effektiven als auch mit der geometrischen FN-Bedeckung zu

A549-, BRL- und B16-Zellen wurden für 80 min auf strukturierten Substraten mit unterschiedlichen Fibronektinverdünnungen kultiviert. Die Zellen wurden fixiert und das Aktinzytoskelett und Fibronektin immunohistochemisch angefärbt. Die geometrische bzw. effektive Fibronektinbedeckung der Substrate sowie die Zellflächen wurden ermittelt und mit dem Standardfehler gegen die effektive oder geometrische Bedeckung aufgetragen. Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Zellgröße und der effektiven (A, B, C) sowie der geometrischen (A', B', C') Fibronektinbedeckung. Bei gleicher geometrischer Bedeckung nimmt die Zellgröße mit höherer Fibronektinverdünnung (Angabe in %) ab. Kein signifikanter Flächenunterschied wurde bei Zellen auf einer effektiven Bedeckung von 50% (homogen durch Verdünnung, durchgezogene Kreise in A' und B') und ca. 50% (Geometrie, punktierte Kreise) festgestellt (Unabhängiger t-Test bei einer Signifikanzebene von $p < 0,05$). Die A549- und BRL-Zellen reagieren sensibler auf die Fibronektinverdünnung als die B16-Zellen. Daten zu B16-Zellen entstammen der Diplomarbeit (Jiang, 2006).

Bei genauer Betrachtung werden jedoch einige Unterschiede zwischen den Zelltypen deutlich. Zum Ersten unterscheiden sich die Zellen hinsichtlich ihrer maximalen Größe. A549-Zellen haben mit $1852.22 \pm 98.86 \mu\text{m}^2$ die größte Fläche. Mit $1350.13 \pm 90.03 \mu\text{m}^2$ sind B16-Zellen die kleinsten und BRL-Zellen liegen mit $1544 \pm 49.01 \mu\text{m}^2$ dazwischen. Zum Zweiten gibt es für ein optimales Spreading abhängig vom Zelltyp dramatische Unterschiede hinsichtlich des Ligandenbedarfs. Das optimale Zellspreading wurde als ein Parameter für die quantitative Bewertung des Zellsreadings von Lehnert *et al.* 2004 eingeführt und als 80% der maximalen Zellgröße definiert. Um optimal zu spreaden, benötigen A549-Zellen ähnlich wie die BRL-Zellen ca. 400 FN-Moleküle/ μm^2 , während bei B16-Zellen nur ca. 200 FN-Moleküle/ μm^2 erforderlich sind. Der verminderte Bedarf der B16-Zellen ist allerdings nicht auf ihre geringere Zellfläche zurückzuführen. Vergleicht man die erforderliche Fibronectinbedeckung zur Ausbildung einer konstanten Zellfläche von $1000 \mu\text{m}^2$ benötigen die A549-Zellen ca. 160 FN-Moleküle/ μm^2 , die B16-Zellen ca. 210 FN-Moleküle/ μm^2 und die BRL-Zellen ca. 300 FN-Moleküle/ μm^2 .

Diese zelltypabhängige Sensitivität hinsichtlich der Änderung der Fibronectinbedeckung belegt den dritten Unterschied zwischen den Zelltypen, der in Abb. 4.7 A', B' und C' veranschaulicht ist. Hier wurde die resultierende Zellfläche nach entsprechender Fibronectinverdünnung gegen die geometrische Fibronectinbedeckung aufgetragen. Die Flächenänderung bzw. Halbierung der Maximalfläche, die die A549-Zellen schon bei einem Ligandenangebot von 20% und BRL-Zellen bei 25% aktivem Fibronectin zeigen, bildet sich bei B16-Zellen erst bei einer aktiven Fibronectin-Konzentration von 5% aus. Die A549- und BRL-Zellen sind daher viel sensitiver im Bezug auf die Fibronectinverdünnung als die B16-Zellen.

4.2.4 Zellen benötigen für Spreadingprozess mehr Fibronectin als für Adhäsion

In den Kapiteln 4.2.1 und 4.2.3 wurde gezeigt, dass die Anzahl adhärierter Zellen sowie die Zellfläche positiv mit der effektiven Fibronectinbedeckung korrelieren (Abb. 4.4 und Abb. 4.7). Der typische Kurvenverlauf gliedert sich dabei in zwei Phasen: nach dem Anstieg bei zunehmender Fibronectinbedeckung folgt die stationäre Phase. Vergleicht man die erforderlichen Fibronectinbedeckungen beim Übergang in die stationäre Phase, zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Ligandenbedarf zwischen der Zelladhäsion und dem Spreadingprozess.

Die Änderung der Zellfläche bzw. die Änderung der Anzahl adhärierter Zellen wurde in Bezug auf die effektive Fibronectinbedeckung untersucht (Abb. 4.8). Abb. 4.8 A und C zeigen dabei jeweils Bereiche der Spreadingkurven (Abb. 4.7 A und B) bei geringer Fibronectinbedeckung bis $170 \text{ FN-Liganden}/\mu\text{m}^2$. Die rot eingezeichneten Linien geben

die Fibronektinbedeckungen an, bei denen die Anzahl adhärrierter Zellen auch bei zunehmender Fibronektinbedeckung konstant bleibt. Diese stationäre Phase erreichen A549-Zellen ab einer Konzentration von ca. 20 FN-Moleküle/ μm^2 (Abb. 4.8 C) und die BRL-Zellen ab ca. 40 FN-Moleküle/ μm^2 (Abb. 4.8 D).

In Kap. 4.2.1 wurde bereits gezeigt, dass ein optimales Spreading der A549- und BRL-Zellen eine vergleichbare effektive Fibronektinbedeckung von ca. 400 FN-Moleküle/ μm^2 voraussetzt. Der Bedarf an Fibronektin-Liganden für das Zellspreading ist somit bei A549-zwanzigfach und bei BRL-Zellen zehnfach höher als für eine optimale Adhäsion. In Bedeckungsbereichen, die eine optimale Adhäsion begünstigen, erreichen die A549-Zellen lediglich eine Fläche von ca. 400 μm^2 und BRL-Zellen von ca. 200 μm^2 (Abb. 4.8 A und B). Unabhängig vom Zelltyp benötigen die Zellen daher für den Spreadingprozess eine weitaus größere Ligandendichte als für die Adhäsion.

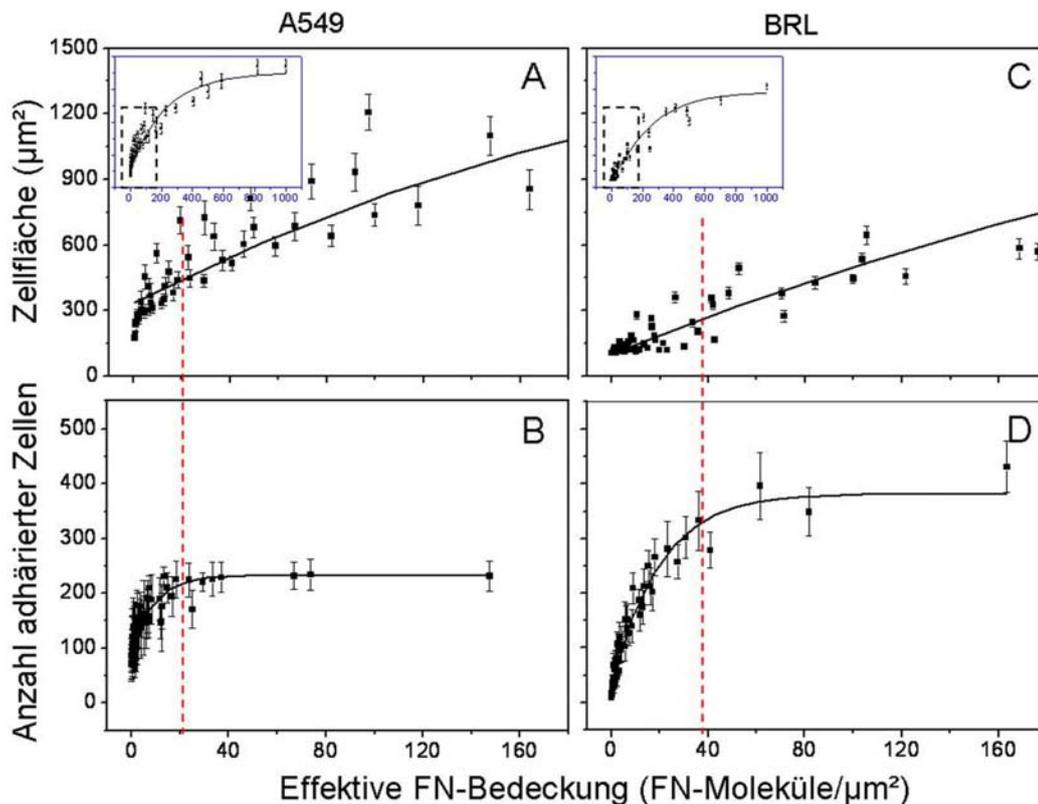


Abb. 4.8 Für Zellspreading wird höhere Fibronektindichte als für Adhäsion benötigt

Um den Ligandenbedarf bei der Adhäsion und beim Zellspreading miteinander zu vergleichen, wurden die Kurven aus Abb. 4.4 und Abb. 4.7 modifiziert. (A) und (C) zeigen Ausschnitte aus den Spreadingkurven im Bereich des Anstiegs bis zu einer effektiven Fibronektinbedeckung von 170 FN-Moleküle/ μm^2 . Die Originalkurven beider Zelltypen sind jeweils links oben eingefügt. Die roten Linien, die die Diagramme A und B bzw. C und D verbinden, zeigen die effektive Fibronektinbedeckung, bei der die Anzahl adhärrierter Zellen in ein Maximum übergeht. Bei dieser Fibronektinbedeckung sind die Zellflächen jedoch noch weit von der maximalen Größe entfernt. Unabhängig vom Zelltyp benötigen die Zellen für den Spreadingprozess eine weitaus größere Ligandendichte als für die Adhäsion.

4.3 Qualitative Analysen der Zell-Matrix-Kontaktausbildung

In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass sowohl die Anzahl adhärierter Zellen, die Fähigkeit zur Überbrückung antiadhäsiver Distanzen als auch das Zellspreading mit steigender Fibronectin-Ligandenanzahl zunehmen. Da die Zelladhäsion und -ausbreitung die Fähigkeit der Zellen zur Substratinteraktion und Kontaktausbildung voraussetzt, sind bei Substraten mit geringer Ligandendichte reduzierte Signale zu erwarten. Um das zu prüfen, wurden typische Zell-Matrix-Kontakte, bestehend aus extrazellulären Liganden, transmembranalen Rezeptoren und einer Vielzahl von intrazellulären signalgebenden Molekülen und Zytoskelett-Elementen (Kap 2.3) qualitativ und quantitativ beurteilt. In diesem Kapitel wird anhand immunohistochemisch gefärbter Präparate analysiert, wie sich diese zellkontaktassoziierten Proteine auf geometrischen Substraten mit definierten Fibronectin-Ligandendichten verhalten.

4.3.1 Paxillinakkumulation im Zell-Matrix-Kontakt korreliert positiv mit FN-Ligandendichte

Um zu untersuchen, ob eine Korrelation zwischen der präsentierten Fibronectin-Ligandenanzahl und der intrazellulären Signaltransduktion besteht, wurden A549- und BRL-Zellen auf *Dot*-Substraten mit unterschiedlichen Fibronectinverdünnungen unter Standardbedingungen kultiviert, fixiert und immunohistochemisch gefärbt. Auf Substraten mit 100% aktivem Fibronectin zeigen beide Zelltypen eine klar definierte und vom *Dot*-Muster abhängige Kontakt- und Aktinfaserausbildung (Abb. 4.9). Die Paxillin-Kontakte lokalisieren lediglich auf den fibronectinbedeckten *Dots* und zeigen einen deutlichen Kanteneffekt, d.h., die Kontaktausbildung wird besonders an den Außenkanten der *Dots* verstärkt. Intrazellulär wird, abgesehen von den durch die Substratgeometrie vorgegebenen Kontakten, kaum Paxillin akkumuliert. Die Aktinfasern sind zu starken Filamentbündeln, den sogenannten Stressfasern, organisiert und erstrecken sich ausschließlich zwischen den Zellkontakten bzw. adhäsiven *Dots*. Die Stressfasern sind bei BRL-Zellen besonders stark ausgeprägt und definieren die kreisbogenförmig nach innen gerichtete Zellkontur.

Zellen, die auf Substraten mit 50% aktivem Fibronectin kultiviert wurden, zeigen im Vergleich zu Kontrollzellen auf unverdünnten Substraten keine Änderung in der Kontaktausbildung und der Organisation des Aktinzytoskeletts. Bei stärkeren Fibronectinverdünnungen ab 25% werden jedoch sowohl Zell-Matrix-Kontakte als auch die Aktinfasern weniger definiert ausgebildet. Auch die Zellfläche verkleinert sich (Kap. 4.2.3). Auf Substraten mit 20% bzw. 25% aktivem Fibronectin werden zwar noch vereinzelt Kontakte über den Fibronectin-*Dots* ausgebildet. Mehrheitlich ist jedoch ein Anstieg des intrazellulären Hintergrundes zu beobachten, der durch ein gleichmäßig hohes

Fluoreszenzsignal in der gesamten Zelle gekennzeichnet ist. Die Aktinfasern erscheinen desorganisiert bzw. fehlen bei BRL-Zellen fast vollständig. Bei der hier untersuchten Verdünnung mit dem geringsten Anteil an aktivem Fibronectin von 10% sind weder Kontakte noch Stressfasern ausgebildet.

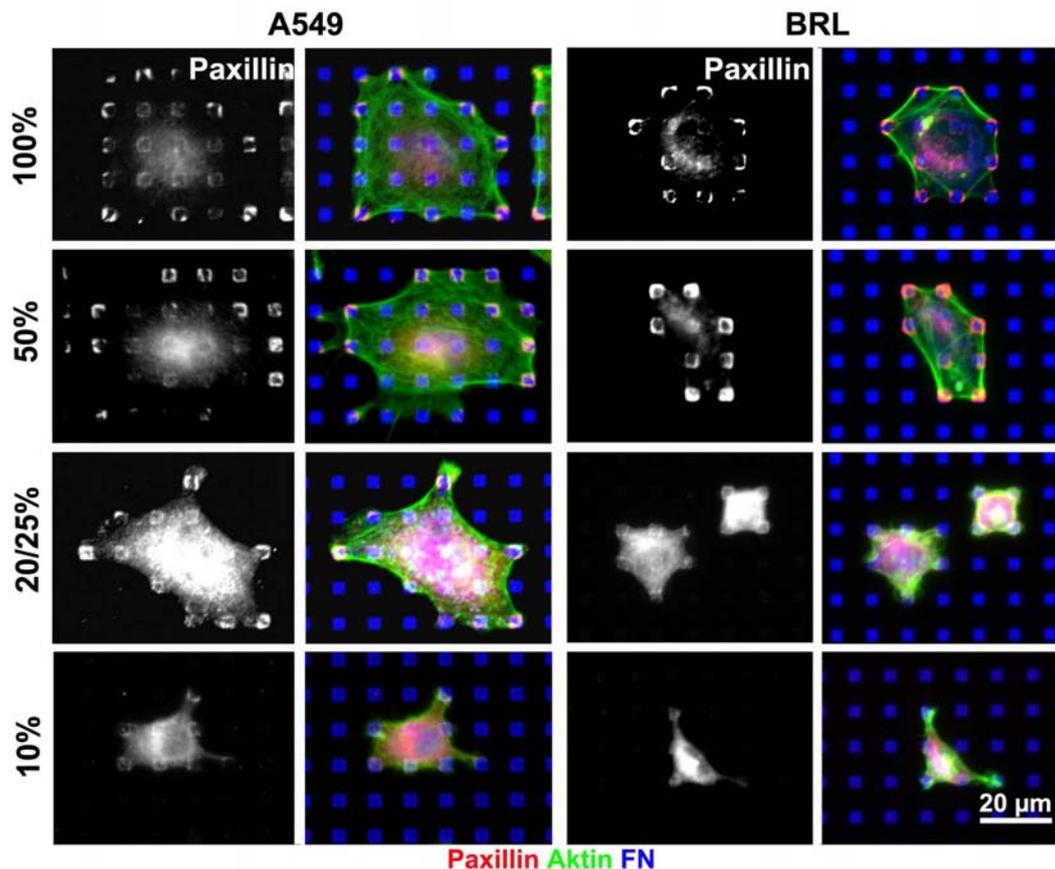


Abb. 4.9 Paxillin-Kontaktausbildung ist von Fibronectin-Ligandendichte abhängig

A549- und BRL-Zellen wurden für 80 min auf strukturierten Substraten mit unterschiedlichen Fibronectinverdünnungen in serumfreiem Medium kultiviert. Die Zellen und das Substrat wurden immunohistochemisch markiert (blau: Fibronectin; grün: Aktin; rot: Paxillin). Beide Zelltypen zeigen klar sowohl bei 100% als auch bei 50% aktivem Fibronectin eine durch die Substratgeometrie vorgegebene Kontakt- und Aktinfaserausbildung. Die Aktinfasern erstrecken sich zwischen den Zellkontakten, die über den fibronectinbedeckten *Dots* lokalisiert sind und zeigen einen deutlichen Kanteneffekt auf. Bei stärkeren Fibronectinverdünnungen ab 25% aktivem Fibronectin sind sowohl die Zellkontakte als auch die Aktinfasern weniger definiert ausgebildet oder fehlen vollständig.

4.3.2 β 1-Integrin-Verteilung ist von anderen Kontaktproteinen abweichend

Bei der Interaktion von Zellen mit der umgebenden ECM vermitteln hauptsächlich die transmembranalen Rezeptoren der Integrin-Familie den Kontakt mit den ECM-Liganden. Anschließend werden räumlich, zeitlich und kraftabhängig intrazelluläre Adapter- und signalvermittelnde Proteine nachgeschaltet und rekrutiert. Im Gegensatz zur Dynamik der Adapter- und Signallingproteine wird von den Integrin-Rezeptoren eine Garantie der

beständigen Bindung zu dem Substrat erwartet, damit sich die Zellen nicht wegen fehlender Anhaftung vom Substrat ablösen. Auch in diesen Kontakten werden die Integrin-Moleküle ständig ausgetauscht (Ballestrem *et al.* 2001). Eine Ausnahme stellt die vollständige Auflösung der Zell-Matrix-Kontakte bei der Migration dar. Um die räumliche Integrin-Verteilung im Vergleich zu anderen Kontaktmarkern zu untersuchen, wurden Zellen auf mikrostrukturierten Substraten kultiviert. Da nur einer unter einer Reihe von getesteten Integrin-Antikörpern und nur bei A549-Zellen funktioniert, wurden A549-Zellen auf Substraten mit 100% aktivem Fibronectin für 80 min unter Standardbedingungen kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die Zellen gegen Aktin, Fibronectin, β 1-Integrin und jeweils ein weiteres Zellkontaktprotein wie FAK, pFAK (Tyr³⁹⁷), Paxillin, pPaxillin (Tyr¹¹⁸), Talin oder Vinculin angefärbt.

In Abb. 4.10 ist die typische Verteilung von Adapter- und Signallingproteinen im Vergleich zur β 1-Integrin-Lokalisation und Zellmorphologie repräsentativer A549-Zellen gezeigt. Die Aktin- und Fibronectin-Färbung zeigt deutlich, dass die Zellform strikt durch die Substratgeometrie kontrolliert ist (Abb. 4.10 A2 – G2). Alle Adapter- und Signallingproteine (B0 – G0) werden vorwiegend über den peripheren Fibronectin-*Dots* angereichert. β 1-Integrin (A1 – G1) akkumuliert dagegen über allen von Zellen besetzten Fibronectin-*Dots*, auch im Zellzentrum. Reife Zell-Matrix-Kontakte entstehen daher vermutlich eher in der Zellperipherie. Im Zellzentrum dagegen erscheinen kaum reife Kontakte, in denen die Adapterproteine Vinculin und Paxillin exprimiert bzw. rekrutiert werden. Die integrin-vermittelte Verbindung mit der ECM scheint jedoch räumlich unabhängig erhalten zu bleiben, sehr wahrscheinlich um die Zellanhaftung an das darunterliegende Substrat zu gewährleisten. Die phosphorylierte Form von FAK und Paxillin wird häufiger in peripheren Zellkontakten angehäuft, wohingegen der unphosphorylierte Zustand vermehrt im Zellzentrum detektiert wird. Da die Phosphorylierung in diesem Fall eine Folge der Aktivierung des entsprechenden Proteins ist, scheinen FAK und Paxillin daher hauptsächlich in der Zellperipherie aktiv zu sein. Werden die neugebildeten Kontakte aufgrund der Zellausbreitung in der Mitte der Zelle lokalisiert, sind diese Proteine zwar möglicherweise nicht mehr aktiv, könnten jedoch weiterhin strukturelle Funktionen erfüllen.

In Kap. 4.2.3 wurde klar gezeigt, dass die Zellfläche positiv mit der FN-Ligandenanzahl korreliert und unabhängig von der Geometrie bzw. vom Substrattyp (homogen oder strukturiert) ist. Auf homogenen Substraten haben die Zellen die Möglichkeit, sich beliebig auf der gesamten zur Verfügung stehenden fibronectinbeschichteten Substratoberfläche auszubreiten. Auf strukturierten Substraten hingegen sind die möglichen Adhäsionspunkte durch die Geometrie der fibronectinbeschichteten *Dots* vorgegeben. Die antiadhäsiven Distanzen zwischen den Fibronectin-*Dots* müssen von den Zellen mit Hilfe von Filopodien

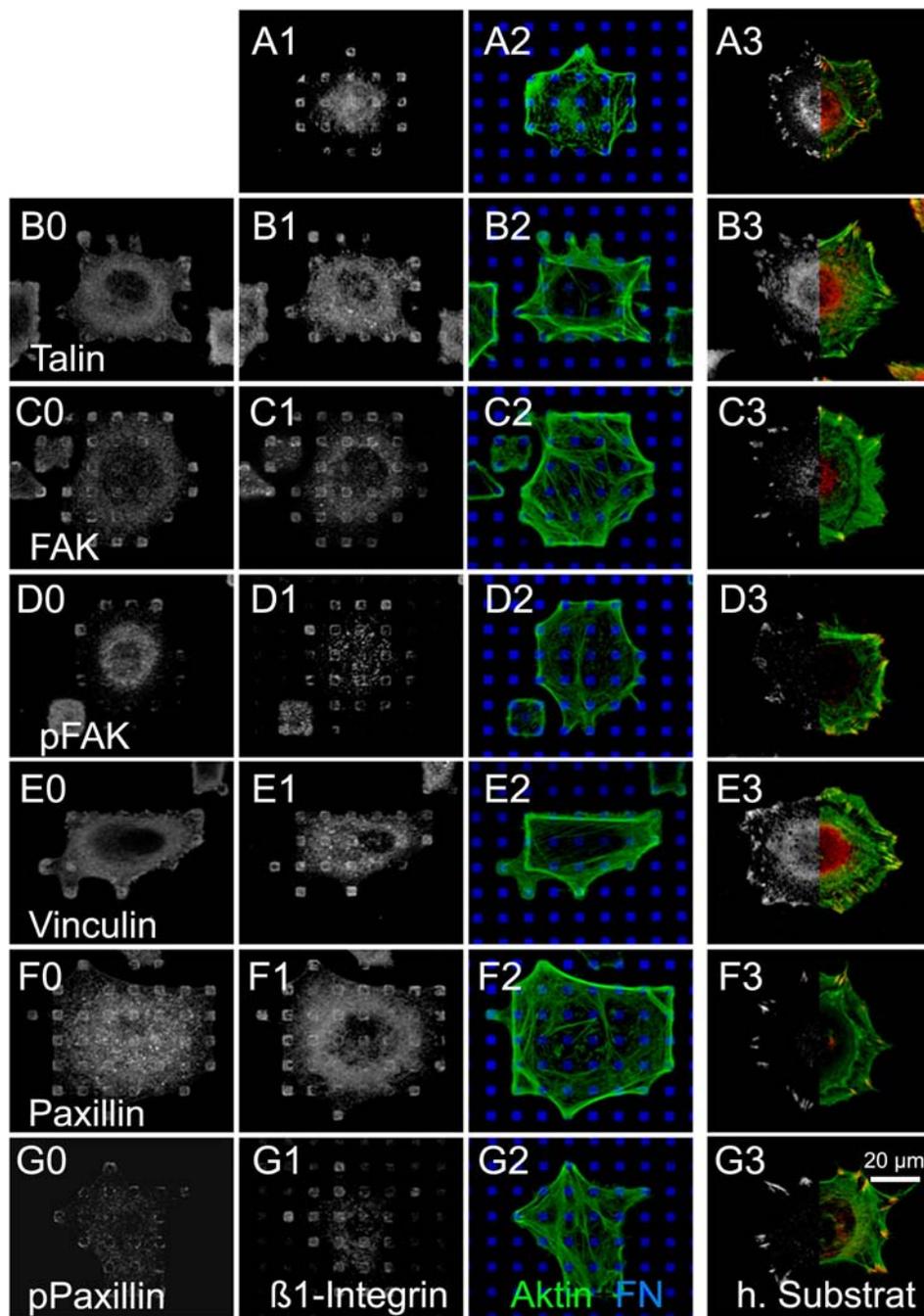


Abb. 4.10 β 1-Integrin-Lokalisation ist von Adapter- und Signallingproteinen abweichend

A549-Zellen wurden für 80 min auf mikrostrukturierten Substraten unter Standardbedingungen kultiviert, dann fixiert und immunohistochemisch gefärbt (Aktin/grün, Fibronectin/blau, β 1-Integrin und Talin, FAK, pFAK, Vinculin, Paxillin und pPaxillin weiß dargestellt). Auf strukturierten Substraten (B0 – G2) ist die Zellform strikt durch die Substratgeometrie vorgegeben. Alle Adapter- und signalvermittelnden Proteine sind vorwiegend über den Fibronectin-Dots angereichert und besonders häufig in peripheren Zellkontakten lokalisiert (B0 – G0). β 1-Integrin ist dagegen räumlich unabhängig über allen zellbesetzten Fibronectin-Dots akkumuliert (A1 – G1). Auf homogenen (h.) Substraten (A3 – G3) kommen die Zell-Matrix-Kontakte unregelmäßig in der Zellperipherie vor. Sie erscheinen spindelförmig mit der Längsachse in Richtung des Zellzentrums.

und Lamellipodien überbrückt werden. Auf homogenen Substraten spielt die Distanzüberbrückung dagegen keine Rolle. In diesem Fall ist der Abstand zwischen den Fibronectin-Liganden für ein Zellspreading völlig ausreichend (Arnold *et al.* 2004). Die ausgebildeten Zell-Matrix-Kontakte sind willkürlich in der Peripherie lokalisiert und vermitteln die Substrathaftung und Zellausbreitung.

Die Morphologie und räumliche Verteilung der Zell-Matrix-Kontakte zeigen Unterschiede auf homogenen im Vergleich zu strukturierten Substraten. Wie bereits gezeigt sind auf den strukturierten Substraten alle untersuchten Zellkontaktproteine in der Zellperipherie angereichert (Abb. 4.10 B0 - G0). Eine Ausnahme stellt der β 1-Integrin-Rezeptor dar (Abb. 4.10 A1 - G1'), der überall auf den Fibronectin-*Dots* unter der Zelle substratgebunden vorkommt. Auf homogenen Substraten sind dagegen alle Zellkontaktproteine ebenso wie der β 1-Integrin-Rezeptor in der Zellperipherie lokalisiert. Im Zellinnen ist das Fluoreszenz-signal der integringefärbten Zell-Matrix-Kontakte schwach ausgeprägt (Abb. 4.10 A3), im Gegensatz zu den anderen Kontaktproteinen wie FAK, pFAK, Paxillin und pPaxillin (Abb. 4.10 B3 - G3), die gar kein Signal im Zellinnen zeigen. Des Weiteren zeigt sich ein signifikanter Unterschied im räumlichen Vorkommen. Während die Zell-Matrix-Kontakte auf strukturierten Substraten nur über den Fibronectin-*Dots* ausgebildet werden, kommen sie hingegen auf homogenen Substraten unregelmäßig in der Zellperipherie vor. Auf den strukturierten Substraten erscheinen die Zell-Matrix-Kontakte meist eckig über dem distalen *Dot*-Ende. Dieses Phänomen wird als „Kanteneffekt“ bezeichnet (Lehnert *et al.* 2004). Auf den homogenen Substraten sind die Zell-Matrix-Kontakte dagegen oft spindelförmig und die Längsachse zeigt in Richtung des Zellzentrums.

4.3.3 Ligandenverdünnung ohne Einfluss auf die Verteilung der Integrinrezeptoren

Es wird allgemein angenommen, dass die Integrine als Hauptrezeptoren der ECM die Berechnung der umgebenden Ligandendichte vermitteln (Gaudet *et al.* 2003; Jiang 2006). Jeder Rezeptor kann nur einen Liganden in einem Verhältnis von 1:1 binden. Daher ist zu erwarten, dass sich die Anzahl der substratgebundenen Integrin-Rezeptoren auf Substraten mit weniger Liganden aufgrund der Proteinverdünnung entsprechend proportional verringert. Um das zu überprüfen, wurden A549-Zellen auf Substraten mit 100% und 50% aktivem Fibronectin kultiviert, die β 1-Integrin-Rezeptoren immunohistochemisch angefärbt und die Fluoreszenzbilder anschließend quantitativ ausgewertet. In peripheren Zell-Matrix-Kontakten wurde nach Anlegen eines Schwellenwerts die Integrin-Fläche über einzelnen *Dots* ermittelt sowie die durchschnittliche Pixel-Intensität erfasst. In Abb. 4.11 ist gezeigt, dass sich die über drei *Dots* ermittelte Fläche des Integrins auf Substraten mit 100% und 50% aktivem Fibronectin nicht unterscheidet. Die Zellen nutzen

unabhängig von der Substratbedeckung überwiegend die gesamten *Dots* zur Kontaktausbildung. Dennoch sind in der Mitte der *Dots* auch Bereiche ohne Integrin-Signale zu sehen.

Bei der hier verwendeten Scaneinstellung beträgt die Pixelgröße 160 nm. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Integrin-Moleküle geclustert mit einem Abstand von ca. 60 nm voneinander getrennt vorliegen (Arnold *et al.* 2004). Somit könnten in einem Pixel bis zu sieben Integrin-Moleküle erfasst werden. Daher ist es nicht möglich, allein von der ermittelten Integrin-Fläche auf die Integrin-Molekülanzahl rückzuschließen. Auch der Fluoreszenzintensitätsvergleich zeigt zwischen Zell-Matrix-Kontakten auf beiden Substraten mit unterschiedlicher Anzahl aktiver Proteine keinen signifikanten Unterschied. Da jedoch die Scaneinstellung (Detektorempfindlichkeit, Offset) beider Bildaufnahmen voneinander abweichen, ist der Intensitätsvergleich kritisch zu beachten. Dennoch ist in Abb. 4.11 klar demonstriert, dass sich die Morphologie der Zell-Matrix-Kontakte trotz Proteinverdünnung nicht unterscheidet.

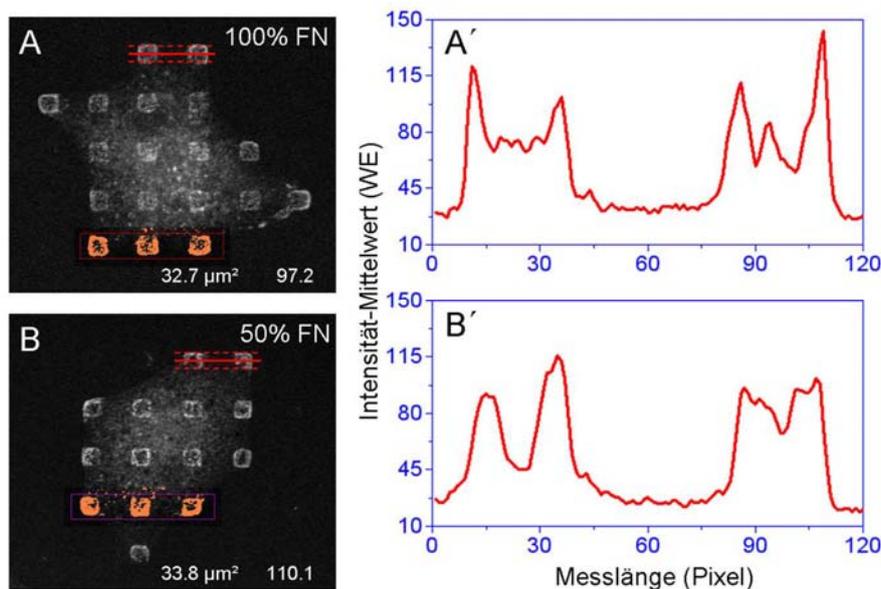


Abb. 4.11 Unveränderte Integrinverteilung auf Substraten mit 100% und 50% aktivem Fibronektin

A549-Zellen wurden auf strukturierten Substraten mit (A) 100% oder (B) 50% aktivem Fibronektin unter Standardbedingungen kultiviert und die β 1-Integrin-Rezeptoren angefärbt. (A', B') Das Intensitätsprofil von peripheren Zell-Matrix-Kontakten wurde entlang der rot eingezeichneten Linien ermittelt. Die Intensität des Integrin-Rezeptors unterscheidet sich zwischen Zellkontakten auf beiden Fibronektin-Konzentrationen nicht signifikant. Der in (A) und (B) zu sehene Kanteneffekt ist bei den Kurven klar dargestellt. Die gemessenen Flächen des substratgebundenen β 1-Integrins sind orange dargestellt und die ermittelten Werte entsprechend im Bild angegeben. Des Weiteren ist die durchschnittliche Pixel-Intensität oberhalb des festgelegten Schwellenwerts für den vermessenen Bereich (Rechteck) angezeigt. Sowohl die Fläche als auch die Intensität des Integrin-Rezeptors sind unabhängig von der aktiven Fibronektin-Konzentration.

4.4 Quantitative Analysen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Zellen unabhängig von der Substratgeometrie spreaden. Das Spreadingverhalten ist allein durch die zur Verfügung stehende Ligandenmenge beeinflusst. Folglich scheinen die Zellen in der Lage zu sein, die Liganden in ihrer Umgebung quantitativ wahrzunehmen. Zell-Matrix-Kontakte stellen die Kommunikationsstellen zwischen den Zellen und ihrer Umgebung dar. Daher ist es anzunehmen, dass die Zellen über diese Adhäsionsstellen die Zahl der Liganden vermessen. Die dem zugrunde liegenden Mechanismen sollten in dieser Arbeit durch quantitative Analysen untersucht und aufgeklärt werden. Dazu wurden die verwendeten ECM-Liganden und die entsprechenden Rezeptoren, sowie typische Zell-Matrix-Proteine quantifiziert und mit der resultierenden Zellfläche korreliert. Als Parameter für den Korrelationsgrad diente der Determinationskoeffizient einer linearen Regression.

Der Determinationskoeffizient (R^2) gibt an, inwieweit der Streuungsanteil einer Variablen durch die Regressionsgerade "bestimmt" wird. Der Koeffizient variiert zwischen 0 und 1. $R^2 = 0$ bedeutet, daß die unabhängigen Variablen keine Vorhersage der Zielvariablen erlauben. Je größer der Wert ist, desto stärker gibt die Regressionsgerade die Korrelation zwischen den untersuchten Variablen wider. $R^2 = 1$ weist auf eine optimale Modellanpassung hin.

4.4.1 $\beta 1$ -Integrin-Fläche korreliert mit effektiver Fibronektinbedeckung

In Kap. 4.2.3 wurde klar gezeigt, dass die Zellfläche von der präsentierten Ligandenmenge abhängig ist. Um zu untersuchen, ob dieser Zusammenhang durch den Integrin-Rezeptor vermittelt wird, wurde die Korrelation zwischen Zellfläche, $\beta 1$ -Integrin-Fläche und effektiver Fibronektinbedeckung untersucht. Dafür wurden A549-Zellen auf mikrostrukturierten Substraten mit 100% aktivem Fibronektin für 80 min unter Standardbedingungen kultiviert. Im Anschluss an die immunohistochemische Färbung wurden die Zellfläche (anhand der Aktinfärbung), die $\beta 1$ -Integrin-Fläche und die effektive Fibronektinbedeckung bestimmt. Die Zellfläche und die $\beta 1$ -Integrin-Fläche wurden mit dem Standardfehler gegen die effektive Fibronektinbedeckung aufgetragen.

In Abb. 4.12 A ist die Spreadingkurve der A549-Zellen gezeigt, deren Zellfläche mit der effektiven Fibronektinbedeckung korreliert (entspricht Abb. 4.7, jedoch anderer Datensatz). Der sigmoidale Kurvenverlauf zeigt sich auch beim Auftragen der $\beta 1$ -Integrin-Fläche pro Zelle gegen die effektive Fibronektinbedeckung (Abb. 4.12 B) trotz der verstärkt gestreuten Datenpunkten. Beide gefitteten Kurven haben eine ähnliche Steigungsstrecke bis ca. 450 FN-Moleküle/ μm^2 . In dieser Phase des Anstiegs weichen die Datenpunkte bei beiden Kurven kaum von der gefitteten Kurve ab. In der Sättigungsphase

dagegen zeigt die Spreadingkurve immer noch eine gute Übereinstimmung, mindestens zwei der fünf Datenpunkte der $\beta 1$ -Integrin-Kurve weichen jedoch stark vom sigmoidalen Kurvenverlauf ab. Dennoch bleibt die Sättigungstendenz erhalten. Bei ähnlichem Kurvenverlauf unterscheiden sich die absoluten Werte, so ist die Zellfläche stets um den Faktor drei im Vergleich zur entsprechenden Integrin-Fläche vergrößert. Auch bei homogener Fibronectinbeschichtung bilden die Zellen nur mit einem Drittel ihrer Fläche Zell-Matrix-Kontakte aus.

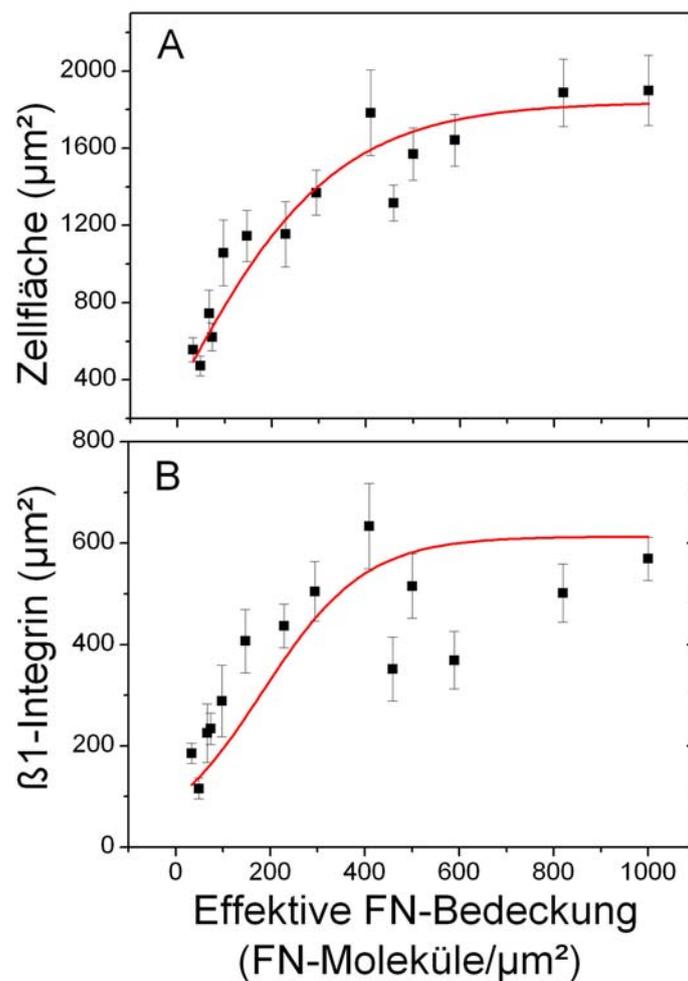


Abb. 4.12 Zellfläche und $\beta 1$ -Integrin-Fläche korreliert mit effektiver FN-Bedeckung

A549-Zellen wurden auf strukturierten Substraten unter Standardbedingungen kultiviert. Nach der Fixierung wurden die Präparate immunohistochemisch gefärbt. Anhand der Färbung wurden die (A) Zellfläche und die (B) $\beta 1$ -Integrin-Fläche unter der Zelle gemessen und mit dem Standardfehler gegen die ermittelte effektive Fibronectinbedeckung aufgetragen. Sowohl die Zellfläche als auch die Integrinmenge steigen mit der effektiven Fibronectinbedeckung sigmoidal an und gehen bei gleicher Fibronectinbedeckung in die Sättigung über. A549-Zellen bilden nur mit ca. einem Drittel ihrer Zellfläche Integrin-Kontakte aus.

4.4.2 Zellfläche korreliert linear mit der $\beta 1$ -Integrin-Fläche

In Kap. 4.4.1 wurde gezeigt, dass sowohl die Zellfläche als auch die Integrin-Fläche positiv mit der effektiven Fibronectinbedeckung korrelieren. Unter der Annahme, dass die Ligandenanzahl quantitativ durch die Besetzung der Integrin-Rezeptoren wahrgenommen und damit einhergehend die Zellfläche festgelegt wird, sollte die Zellfläche ebenfalls eine quantitative Abhängigkeit zur Integrin-Fläche aufweisen. Die Abb. 4.13 verdeutlicht die lineare Korrelation von Zellfläche und $\beta 1$ -Integrin-Fläche pro Zelle. Die Datenpunkte zeigen mit einem Determinationskoeffizienten von 0.8718 eine sehr gute Übereinstimmung bzw. signifikante Korrelation mit der linearen Funktion.

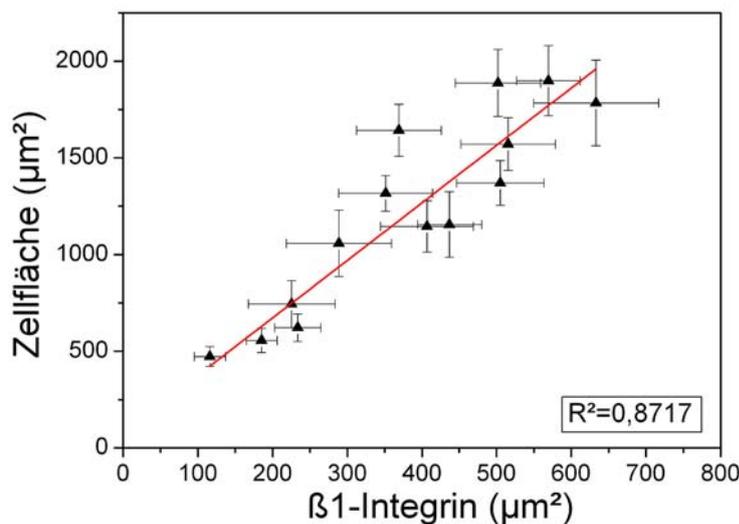


Abb. 4.13 Zellfläche korreliert linear mit der $\beta 1$ -Integrin-Fläche

Die Zellfläche (Daten aus der Abb. 4.12 A) korreliert signifikant linear mit der $\beta 1$ -Integrin-Fläche (Daten aus Abb. 4.12 B). Der Determinationskoeffizient beträgt 0.8718.

4.4.3 Korrelation auf strukturierten aber nicht immer auf homogenen Substraten

In Kap. 4.4.1 wurde klar gezeigt, dass sowohl die Zellfläche als auch die $\beta 1$ -Integrin-Fläche mit der effektiven Fibronectinbedeckung korrelieren. Die effektive Fibronectinbedeckung gibt dabei nur die Ligandendichte des geometrischen Musters wieder, jedoch nicht die absolute, von der Zelle benutzte Fibronectin-Molekülzahl. Um das quantitative Verhältnis zwischen signalauslösendem Ligand und resultierender Flächeneinheit näher zu untersuchen, wurde die von einer jeden Zelle benutzte Fibronectin-Ligandenanzahl durch Multiplikation der Zellfläche mit der effektiven Fibronectinbedeckung des darunter liegenden Substrats errechnet. Die resultierenden Werte individueller Zellen wurden gegeneinander aufgetragen, eine Regressionsgerade angelegt und der Determinationskoeffizient bestimmt.

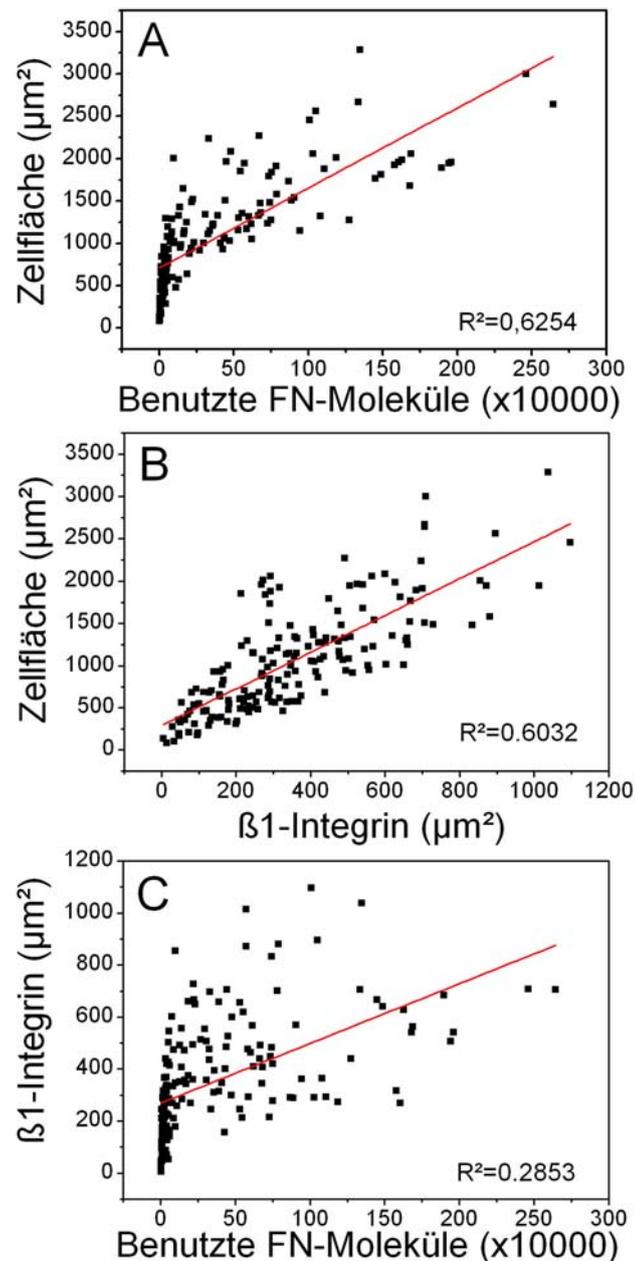


Abb. 4.14 Lineare Korrelation zwischen Zellfläche und benutztem Fibronectin sowie β1-Integrin, aber nicht zwischen Integrin und benutztem Fibronectin

A549-Zellen wurden auf strukturierten Substraten unter Standardbedingungen kultiviert. Nach der Fixierung wurden die Präparate immunohistochemisch angefärbt. Anhand der Färbung wurden die Zellfläche und die β1-Integrin-Fläche unter der Zelle gemessen. Die benutzte Fibronectin-Molekülanzahl unter einer Zelle wurde anhand der Zellfläche und der effektiven Fibronectinbedeckung ausgerechnet. Die Auftragung der (A) Zellfläche gegen die benutzte Fibronectin-Molekülanzahl bzw. gegen die (B) β1-Integrin-Fläche zeigt eine lineare Korrelation. (C) die β1-Integrin-Fläche ändert sich nicht linear mit der benutzten Fibronectin-Molekülanzahl.

Die Zellfläche zeigt eine lineare Korrelation mit der benutzten Fibronectin-Molekülanzahl (Abb. 4.14 A). Diese Korrelation wird mit einem Determinationskoeffizienten von 0.6254

als signifikant eingestuft. Auffällig ist, dass in dem Bereich mit geringer benutzter Fibronectin-Molekülzahl mehr Datenpunkte zu finden sind. Dies ist auf das Strukturdesign zurückzuführen, da die ausgewerteten Muster in den Bereichen mittlerer und höherer Fibronectinbedeckung weniger Strukturvariationen anbieten. Die Zellfläche korreliert ebenfalls linear mit der β 1-Integrin-Fläche (Abb. 4.14 B; Zellen einzeln als Datenpunkt aufgetragen). Der Determinationskoeffizient ($R^2 = 0.6032$) ist hier geringfügig kleiner im Vergleich zur Korrelation mit der benutzten Fibronectin-Molekülzahl (Abb. 4.13 A, $R^2 = 0.6264$), was aber die Tendenz nicht ändert. Trägt man jedoch die Integrin-Fläche gegen die benutzte Fibronectin-Molekülzahl auf, zeigt sich eine stark gestreute Verteilung der Datenpunkte (Abb. 4.14 C). Aufgrund des sehr kleinen Determinationskoeffizienten von $R^2 = 0.2853$ ist die angenommene lineare Korrelation nicht signifikant. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zellfläche sowohl direkt von der Fibronectin-Molekülzahl als auch von der β 1-Integrin-Fläche abhängt, jedoch keine klare Korrelation zwischen der β 1-Integrin-Fläche und der benutzten Fibronectin-Molekülzahl nachgewiesen werden kann.

In Abb. 4.14 A und C ist anhand der Datenverteilung zu erkennen, dass sich die Datenpunkte abhängig von der Anzahl benutzter Fibronectin-Moleküle in zwei Gruppen einteilen lassen. Zellen der ersten Gruppe nutzen bis ca. 400 000 Fibronectin-Moleküle und spreaden meist auf strukturierten Substraten mit geringerer effektiver Fibronectinbedeckung. Zellen der zweiten Gruppe nutzen dagegen mehr als 400 000 Fibronectin-Moleküle und spreaden vorwiegend auf homogenen oder homogenähnlichen Substraten mit höheren effektiven Fibronectinbedeckungen. Beispiele solcher Muster mit hohen Fibronectinbedeckungen enthalten große Fibronectin-*Dots* mit einer Kantenlänge von 3 μ m und einem Abstand von 4 - 5 μ m, oder kleinere Fibronectin-*Dots* mit einer Kantenlänge von 1 μ m und einem Abstand von 2 μ m. Der tatsächliche antiadhäsive *Dot*-Abstand ist in Wirklichkeit jedoch noch geringer, da beim Stempelvorgang oft Deformationen auftreten, durch die die *Dot*-Fläche vergrößert wird. Der antiadhäsive Abstand ist für die Zellen dann möglicherweise so gering, dass diese Substrate als homogen beschichtete Flächen wahrgenommen werden.

Die Daten wurden daher je nach Fibronectinbedeckung bzw. Anzahl benutzter Fibronectin-Moleküle analysiert. Zur besseren Anschaulichkeit wurden die Daten beider Gruppen aus Abb. 4.14 in Abb. 4.15 farbig getrennt dargestellt. In rot sind die Daten von Zellen auf echt strukturierten Substraten gezeigt, in schwarz dagegen die von Zellen auf homogenen bzw. homogenähnlichen Substraten. Die Zellgröße zeigt sowohl auf den homogenen (Abb. 4.15 A', $R^2 = 0.5088$) als auch auf den strukturierten Substraten (Abb. 4.15 A'', $R^2 = 0.666$) eine lineare Korrelation mit der Anzahl benutzter Fibronectin-

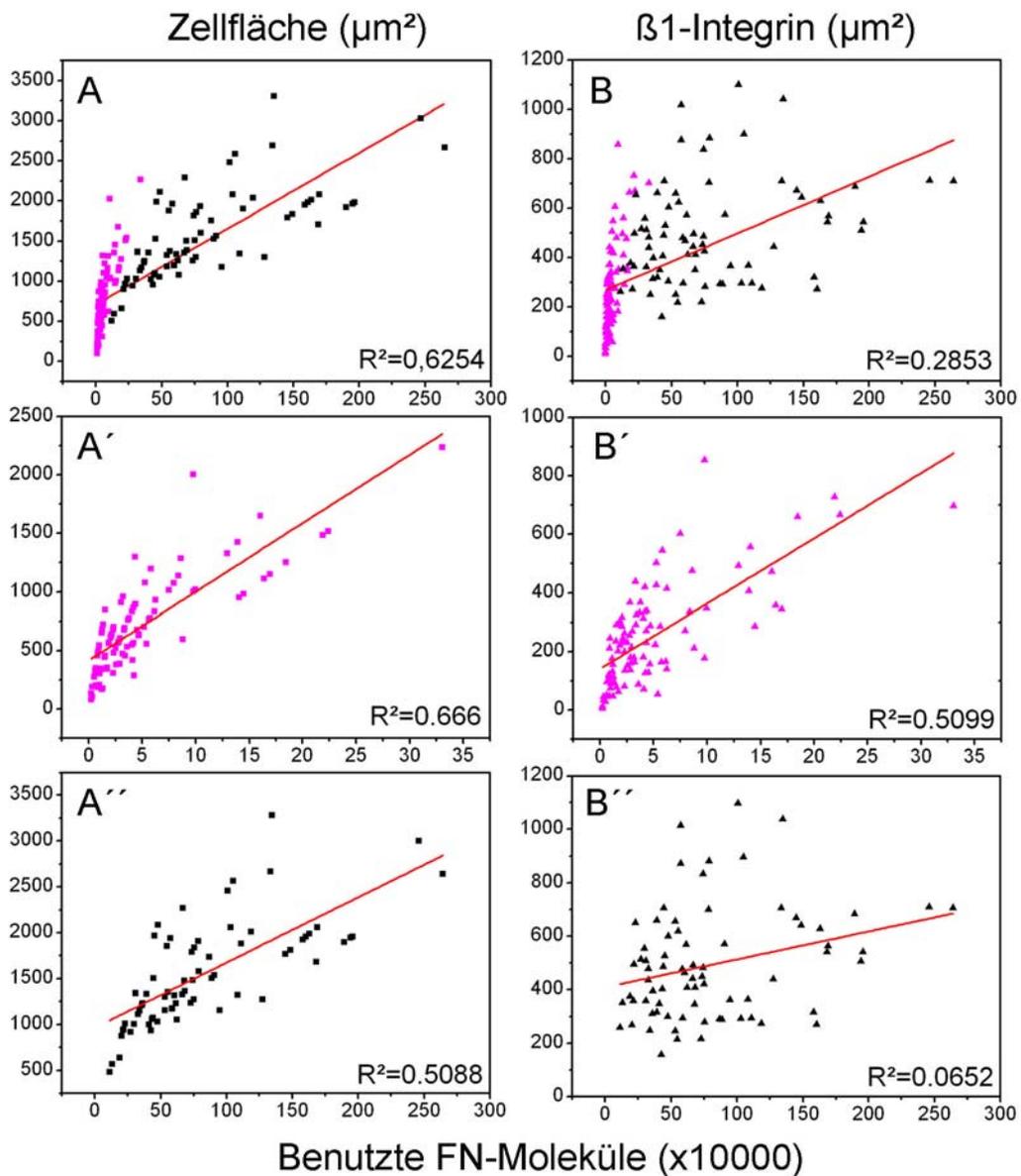


Abb. 4.15 Generelle Korrelation auf strukturierten Substraten

Die Daten aus Abb. 4.14 A und C wurden hier je nach Substrattyp getrennt aufgetragen. Die roten Datenpunkte in A und B stammen von Zellen auf strukturierten Substraten (siehe auch A' und B'). Die schwarzen Punkte (siehe auch A'' und B'') entsprechen dagegen Zellen auf homogenen oder homogenähnlichen Substraten. (A', A'') Die Zellfläche korreliert auf strukturierten und homogenen Substraten gut mit der Anzahl benutzter Fibronectin-Liganden. (B', B'') Die β1-Integrin-Fläche korreliert dagegen nur differenziert mit der benutzten Fibronectin-Molekülzahl. Auf strukturierten Substraten zeigt sich eine gute lineare Korrelation ($R^2 = 0.5099$), jedoch nicht auf homogen beschichteten Substraten ($R^2 = 0.0652$).

Moleküle. Bei der β1-Integrin-Fläche zeigt sich diese Korrelation erst nach der Datenauftrennung und zwar nur auf Substraten in Bereichen mit geringer Fibronectinbedeckung (Abb. 4.14 C entspricht Abb. 4.15 B). Auf strukturierten Substraten korreliert die β1-

Integrin-Fläche linear mit den benutzten Fibronectin-Molekülen ($R^2 = 0.5099$). Auf den homogenen Substraten dagegen ist die Korrelation nicht signifikant (Abb. 4.15 B', $R^2 = 0.0652$).

In den vorangegangenen Kapiteln wurde gezeigt, dass die Zellfläche unabhängig vom Substrattyp durch die benutzte Fibronectin-Molekülanzahl bestimmt wird. Diese Abhängigkeit scheint nur auf strukturierten Substraten durch Integrin vermittelt zu werden, nicht jedoch auf homogenen Substraten. Um zu untersuchen, wie im Anschluss an die Integrin-Aktivierung bzw. -Besetzung die zelluläre Signalverarbeitung weiter vermittelt wird und wie sich die Fibronectinverdünnung darauf auswirkt, wurden die entsprechenden Determinationskoeffizienten in Tabelle 4.1 zusammen gestellt.

Tab. 4.1 Determinationskoeffizienten untersuchter Parameter in Abhängigkeit vom Substrattyp und der aktiven Fibronectin-Konzentration

A549-Zellen wurden auf strukturierten Substraten mit 100% und 50% aktivem Fibronectin (aFN) kultiviert. Nach der Färbung wurde die Fläche des Integrin-Rezeptors, des Adaptermoleküls Paxillin und des Signallingsmarkers pFAK bestimmt und im Bezug auf die Zellfläche bzw. auf die von der Zelle benutzte Fibronectin-Ligandenanzahl analysiert. Die Determinationskoeffizienten der Wertepaare wurden nach Signifikanzgrad in drei Kategorien unterteilt, die verschieden farbig markiert sind: $R^2 > 0.5$ (rot) demonstriert eine signifikante Korrelation; $0.1 < R^2 < 0.5$ (schwarz) beschreibt eine Korrelation, die jedoch für ein determinierendes Verhältnis nicht ausreichend ist; $R^2 < 0.1$ (grau) ist nicht signifikant.

aFN (%)	Determinationskoeffizient (R^2)	Geometrische Substrate			Homogene Substrate		
		$\beta 1$ -Integrin	pFAK	Paxillin	$\beta 1$ -Integrin	pFAK	Paxillin
100	Zellfläche	0.7072	0.6446	0.2852	0.3911	0.2626	0.3973
	Benutztes FN/Zelle	0.7176	0.6118	0.9096	0.5179	0.1906	0.0615
50	Zellfläche	0.6256	0.6380	0.6043	0.3364	0.4114	0.0114
	Benutztes FN/Zelle	0.5462	0.3794	0.5031	0.0063	0.3489	0.0526
		Benutztes FN pro Zelle			Benutztes FN pro Zelle		
100	Zellfläche	0.8041	0.7340	0.3379	0.8136	0.6255	0.6905
50	Zellfläche	0.6780	0.5360	0.6410	0.7492	0.6385	0.6937

Um den möglichen Einfluss des Substratypen zu untersuchen wurden die Daten nach der Form der Ligandenpräsentation in strukturierte und homogene Substrate und entsprechend der untersuchten Fibronectinverdünnung in Substrate mit 100% und 50% aktivem Fibronectin eingeteilt und analysiert. Ein Determinationskoeffizient ab einem Wert > 0.5 wurde als signifikanter Wert zur Definition eines linearen Zusammenhanges beider

Parameter angesehen (Tab. 4.1, rot). Werte zwischen 0.1 und 0.5 wurden als Korrelation definiert, die jedoch nicht für ein determinierendes Verhältnis beider Variablen ausreichend ist (Tab. 4.1, schwarz). Ein Determinationskoeffizient <0.1 wurde als nicht ausreichend für eine Signifikanzaussage eingestuft (Tab. 4.1, grau).

Auf strukturierten Substraten sowohl mit 100% als auch mit 50% aktivem Fibronektin zeigen A549-Zellen eine gute Korrelation zwischen den untersuchten Parametern. Lediglich 1/6 der R^2 -Werte ist kleiner als 0.5. Diese Tatsache belegt, dass hier die Zellfläche sehr wahrscheinlich durch die Fibronektin-Ligandenmenge bestimmt wird. Die Signalweiterleitung bzw. -verarbeitung erfolgt in einem linearen Verhältnis über die Fibronektin-Liganden zum Integrin-Rezeptor, und führt downstream über das Adaptermolekül Paxillin und das Signalprotein pFAK zur quantitativen Regulation der Zellfläche. Auf homogenen Substraten ist die Korrelation weniger eindeutig und scheint eher auf nicht-lineare Weise kontrolliert zu werden. Bei über 60% der analysierten Paare (11 von 18) sind die R^2 -Werte kleiner als 0.5. Da die überwiegende Mehrheit der Wertepaare mit starker linearer Korrelation (6 von 7) die Beziehung zwischen der Zellfläche und der Anzahl der benutzten Fibronektin-Moleküle beschreibt, wird die Zellfläche auf jeden Fall durch die Ligandenmenge bestimmt. Die signalweiterleitenden Proteine Paxillin und pFAK spielen hierbei jedoch keine oder nur eine untergeordnete Rolle. Zwischen den beiden untersuchten Fibronektin-Konzentrationen konnte hinsichtlich der Signalverarbeitung kein Unterschied festgestellt werden. Fasst man die Daten beider Fibronektin-Konzentrationen zusammen (Tab. 4.2), so zeigt sich tendenziell eine gute Korrelation auf strukturierten Substraten im Gegensatz zu einem nicht-linearen Zusammenhang auf homogen beschichteten Substraten. Grundsätzlich bleibt jedoch die Korrelation zwischen der Zellfläche und der benutzten Fibronektin-Ligandenmenge stets erhalten.

Tab. 4.2 Generelle Korrelation auf strukturierten, jedoch nicht auf homogenen Substraten.

Tabellenüberschrift wie für Tab. 4.1.

Determinations- koeffizient (R^2)	Geometrische Substrate			Homogene Substrate		
	β 1-Integrin	pFAK	Paxillin	β 1-Integrin	pFAK	Paxillin
Zellfläche	0.6855	0.6332	0.5558	0.2909	0.4311	0.3855
Benutztes FN/Zelle	0.5099	0.5555	0.7466	0.0652	0.4606	0.2223
	Benutztes FN/Zelle			Benutztes FN/Zelle		
Zellfläche	0.6660	0.6791	0.5312	0.5088	0.6135	0.6777

4.5 Zeitraffer-Analysen

Die bisherigen quantifizierten Daten wurden aus fixierten und immungefärbten Zellkulturpräparaten gewonnen, die eine Momentaufnahme des Zellverhaltens unmittelbar vor der Fixierung darstellen. Die Zell-ECM-Wechselwirkungen sind jedoch hochdynamische Prozesse. Um die Dynamik der Integrin-Rezeptoren und des intrazellulären Signallings auf den strukturierten Substraten zu untersuchen, wurden das Zellspreading von B16- und A549-Zellen mittels Zeitrafferaufnahmen analysiert. Dazu wurde eine stabile B16- β 3-Integrin-EGFP-Linie eingesetzt und auf strukturierten vitronektinbeschichteten Substraten kultiviert. Da keine stabil transfizierte A549-Linie vorhanden ist, wurde bei diesen Zellen eine transiente Transfektion mit α 5-Integrin-EGFP oder Paxillin-EGFP durchgeführt. Die A549-Zellen wurden im Anschluss auf fibronectinbeschichteten Substraten kultiviert und analysiert. Die Sequenzen der Video-Zeitrafferaufnahme sind in Abb. 4.16 gezeigt. Die Aufnahme startete ca. 30 min nach der Aussaat der Zellen und endete 30 min später. Die Bildaufnahme erfolgte im Minutentakt. Gezeigt sind Einzelbilder verschiedener Zeitpunkte (0, 10, 20 und 30 min).

4.5.1 Dynamische Verteilung signalverarbeitender Kontaktproteine

In Kapitel 4.3 wurden anhand immunohistochemischer Färbung gezeigt, dass sich die Verteilung des Integrin-Rezeptors von der Verteilung der Adapter- und Signallingproteine in den Zell-Matrix-Kontakten unterscheidet. Die Analyse der Zeitrafferaufnahmen bietet nun die Möglichkeit, den dynamischen Verlauf signalverarbeitender Proteine während des Spreadings und der Migration in lebenden Zellen mit einzubeziehen. Abb. 4.16 A zeigt vier Zeitpunkte während der 30minütigen Kultivierung einer B16- β 3-Integrin-Zelle auf einem vitronektinbeschichteten *Dot*-Muster mit $1 \mu\text{m}^2$ *Dots*. Es ist klar erkennbar, dass der β 3-Integrin-Rezeptor über allen vitronektinbeschichteten *Dots* unter der Zelle akkumuliert. Die Kontaktausbildung erfolgt dabei hochdynamisch mit der Bildung neuer Kontakte sowie dem Abbau bereits bestehender Zell-Matrix-Kontakte. Die β 3-Integrin-Verteilung über allen zellbesetzten *Dots* ist auch auf dem $9 \mu\text{m}^2$ *Dot*-Muster (Abb. 4.16 B) deutlich gezeigt und ist identisch zur α 5-Integrin-Verteilung von A549-Zellen auf dem gleichen *Dot*-Muster (Abb. 4.16 C). Übereinstimmend mit der immunohistochemischen Färbung aus Kap. 4.3.2 ist das Adapterprotein Paxillin (Abb. 4.16 D und E, A549-Zellen gezeigt) dagegen nur in peripheren Zell-Matrix-Kontakten angehäuft. Abb. 4.16 D zeigt die Entstehung eines Zell-Matrix-Kontaktes. Dieser ist zu Beginn des Spreading eher in Richtung des Zellzentrums lokalisiert (Pfeil) und reift erst, nachdem sich ein in der Zellperipherie befindender Kontakt auflöst (Sternchen). Die hier gezeigte globale Verteilung des Integrin-Rezeptors und die auf die Peripherie begrenzte Verteilung von Paxillin stimmen in lebenden B16 und A549-Zellen mit den immunohistochemischen Ergebnissen fixierter Zellen (Kap. 4.3) überein.

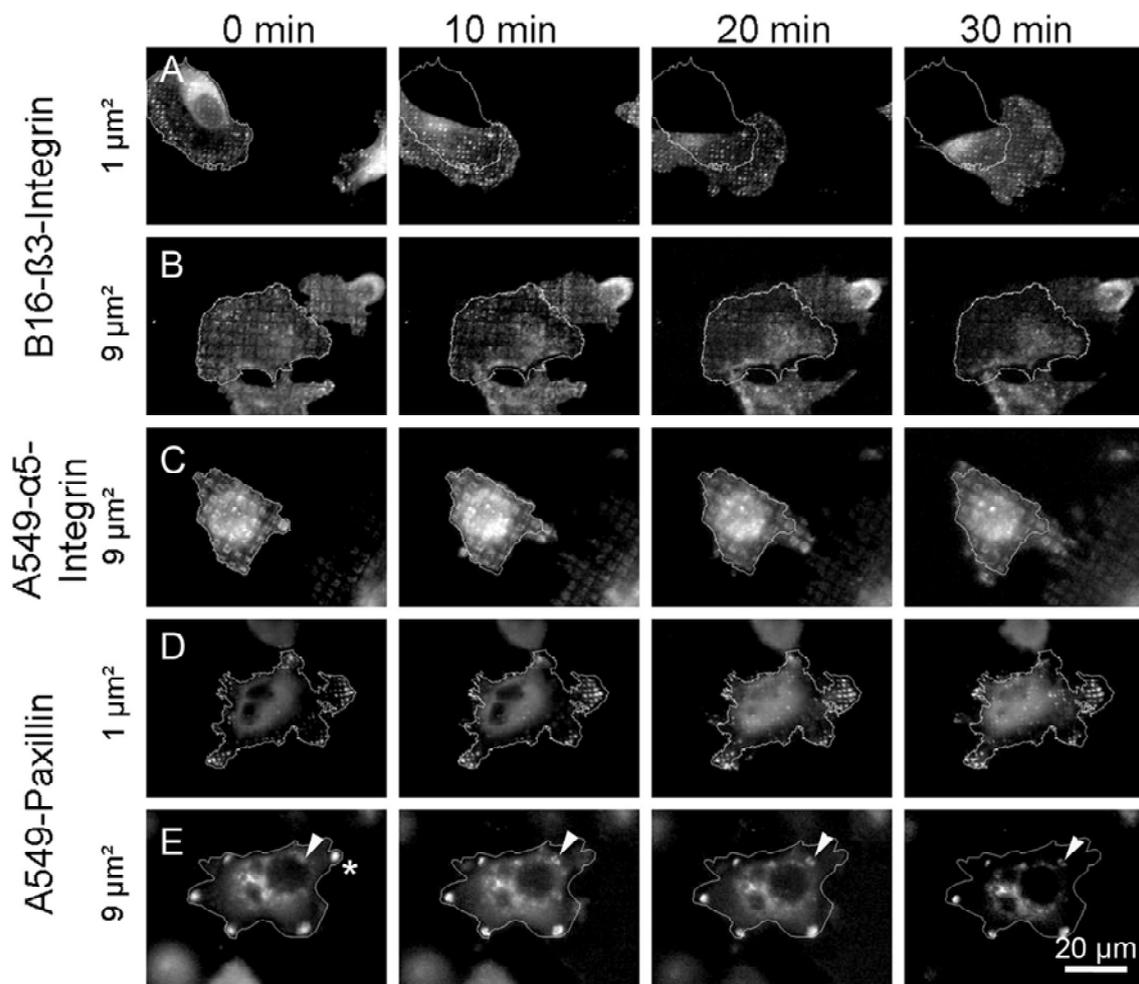


Abb. 4.16 Zeitrafferaufnahme zeigt an Signalverarbeitung beteiligte Zellkontaktproteine

Einzelbilder zeigen lebende (A, B) B16-Zellen und (C, D, E) A549-Zellen, die GFP-gekoppelte Integrin-Rezeptoren oder das Adapterprotein Paxillin exprimieren. Die Aufnahme startete ca. 30 min nach der Aussaat der Zellen auf Substraten mit *Dot*-Muster und endete 30 min später. Die Einzelbildaufnahme erfolgte im Minutentakt. Gezeigt sind Einzelbilder verschiedener Zeitpunkte (0, 10, 20 und 30 min). Die weiße durchgezogene Linie definiert die Zellkontur zum Zeitpunkt $t = 0$ min. Die B16- β 3-Integrin-Zelle auf dem 1 μm^2 *Dot*-Muster (A) zeigt im Vergleich zur B16-Zelle auf dem 9 μm^2 *Dot*-Muster (B) sowie zu den A549-Zellen auf beiden *Dot*-Mustern die höchste Migrationsrate. Sowohl β 3- (A, B) als auch α 5-Integrine (C) clustern auf allen von Zellen besetzten *Dots*. Paxillin (D, E) akkumuliert dagegen nur in der Zellperipherie. Der Pfeil in D zeigt auf einen entstehenden Kontakt und das Sternchen kennzeichnet einen sich auflösenden Kontakt.

4.5.2 B16-Zellen sind viel beweglicher als A549-Zellen und die Mobilität ist von der Fibronektinbedeckung abhängig

Die Migration der Zellen ist ein dynamischer Prozess, wobei die Kontakte zwischen der Zelle und der ECM-Matrix am Zellvorderende einem Aufbau, am Hinterende einem ständigen Abbau unterliegen. Zellen verschiedenen Gewebersprungs weisen naturbedingt unterschiedliche Beweglichkeiten auf. Die Zeitrafferaufnahmen

verdeutlichen, dass die B16-Zellen gegenüber den A549-Zellen mobiler sind. In Abb. 4.16 ist die Zellkontur der Ausgangsposition zum Zeitpunkt $t = 0$ min eingezeichnet. Innerhalb einer 30minütigen Aufnahmezeit migrierte eine B16-Zelle auf einer geometrischer Struktur bestehend aus $1 \mu\text{m}^2$ *Dots* (Abb. 4.16 A) um ca. $30 \mu\text{m}$ (Zellmitte). Im selben Zeitraum und auf einem identischen Substrat hat eine A549-Zelle dagegen kaum Bewegung gezeigt (Abb. 4.16 E). Die quantitative Analyse belegt, dass B16-Zellen auf den $1 \mu\text{m}^2$ *Dots* eine Strecke von $29.82 \pm 2.29 \mu\text{m}$, auf den $9 \mu\text{m}^2$ *Dots* $14.43 \pm 2.56 \mu\text{m}$ und auf homogenen Substraten $15.39 \pm 3.37 \mu\text{m}$ zurücklegen. Alle diese Werte unterscheiden sich signifikant von denen der A549-Zellen (Abb. 4.17, Signifikanz mit einem Stern angezeigt).

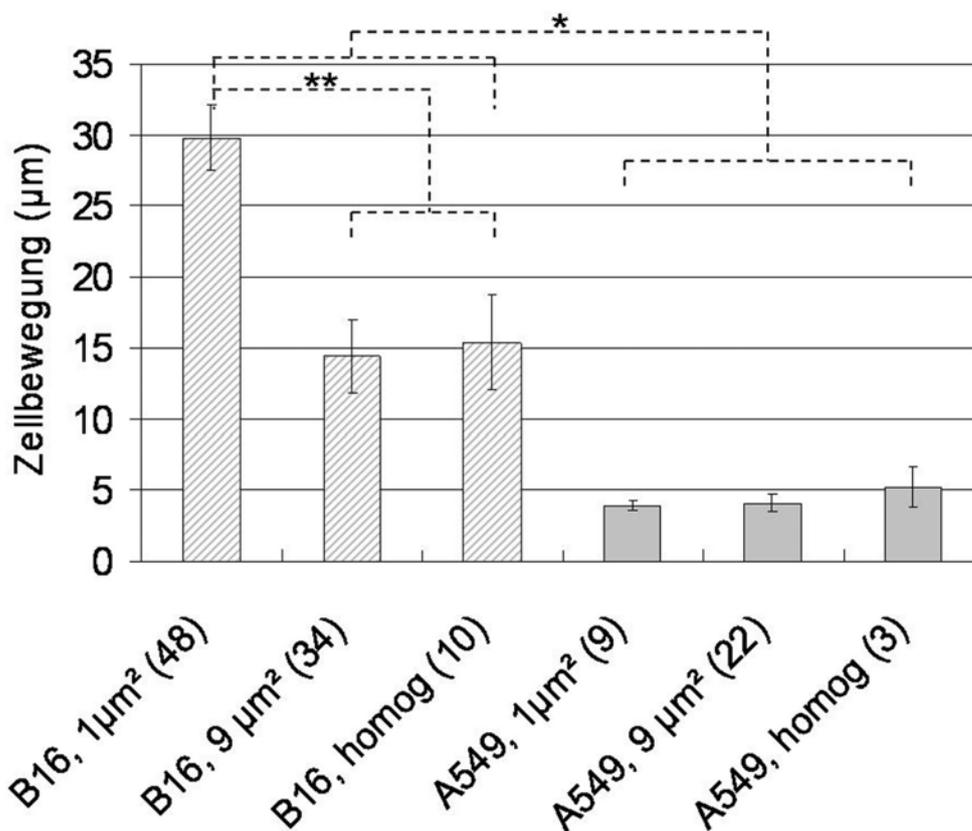


Abb. 4.17 Migrationsrate ist abhängig vom Zelltyp und von der Substratbedeckung

Einzelbilder von Zeitrafferaufnahmen der B16- $\beta 3$ -EGFP-Zellen und transient mit $\alpha 5$ -Integrin oder Paxillin transfizierter A549-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Zellbewegung bzw. der zurückgelegten Wegstrecke quantifiziert. Dazu wurde der lineare Abstand zwischen dem Zellzentrum zum Zeitpunkt $t = 0$ min und $t = 30$ min gemittelt und mit dem Standardfehler aufgetragen. Die untersuchte Zellzahl ist in Klammern angezeigt. Die B16-Zellen zeigen im Vergleich zu den A549-Zellen substratunabhängig signifikant höhere Migrationsraten (*). B16-Zellen migrieren differenziert in Abhängigkeit vom *Dot*-Muster auf $1 \mu\text{m}^2$ *Dots* signifikant schneller im Vergleich zu $9 \mu\text{m}^2$ *Dots* sowie den homogenen Substraten (**). Die A549-Zellen zeigen keinen Migrationsunterschied auf den verschiedenen Substraten. (Unabhängiger t-Test bei einer Signifikanzebene von $p < 0,05$).

Die Migrationsrate der B16-Zellen ist von der unterschiedlichen Substratbedeckung abhängig. So zeigen sich auf Strukturen mit $9 \mu\text{m}^2$ Dots (Abb. 4.16 B) und auf homogenen Substraten signifikant kleiner Migrationsraten als auf den $1 \mu\text{m}^2$ Dot-Struktur (Abb. 4.17, Signifikanz mit zwei Sternchen angezeigt). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die erhöhte Mobilität der B16-Zellen nicht nur auf die gesteigerte zelltypspezifische Migrationsgeschwindigkeit zurückzuführen ist, sondern auch vom Substrat abhängig ist.

4.6 Zellspreading auf dem quadratischen Muster wird nur durch die FN-Verdünnung, jedoch nicht durch die Geometrie beeinflusst

Die bisher gezeigten Ergebnisse demonstrieren eindeutig, dass die Zellfläche durch die Fibronectin-Ligandenmenge auf dem Substrat kontrolliert wird. Auf den strukturierten Substraten erfolgt die Signalverarbeitung in Form einer quantitativen Belegung bzw. Aktivierung der Integrin-Rezeptoren und deren nachfolgenden intrazellulären Signallingproteine. Der Mechanismus auf homogenen Substraten ist dagegen noch unklar. Der Einsatz von den quadratischen Mustern bietet zusätzlich die Möglichkeit, auf einer definierten Fläche die Fibronectin-Menge durch die geometrische Mustervielfalt und die Fibronectinverdünnung zu variieren. Der Vorteil dieser Muster besteht in der Untersuchung des Zellsreadings bei vordefinierter Begrenzung.

4.6.1 Zellfläche auf quadratischem Muster ändert sich nur mit der FN-Verdünnung

A549-Zellen wurden auf Substraten mit Quadrat-Mustern und unterschiedlichen Fibronectin-Konzentrationen für 80 min unter Standardbedingungen kultiviert. Anhand der immunohistochemischen Färbung wurde die Zellfläche mit der AxioVision-Software bestimmt. Dazu wurden die Zellen nach der relativen Größe im Verhältnis zu dem unter ihnen liegenden Quadrat in drei Kategorien eingeteilt: 1) Zellen, die auf $>70\%$ der Fibronectin-Quadratfläche spreaden, 2) Zellen, deren Fläche zwischen $30 - 70\%$ eines Quadrats entspricht und 3) Zellen, die auf $<30\%$ des Quadrats adhäreren. In Abb. 4.14 sind typische Zellen der drei Kategorien gezeigt, die auf unterschiedlichen Quadrat-Mustern spreaden. Der prozentuale Anteil der drei Spreading-Kategorien wurde in Bezug auf die Fibronectinverdünnung gegen die untersuchten quadratischen Muster (Abb. 3.1) aufgetragen.

Bei einer Beschichtung mit 100% aktivem Fibronectin ist auf den Quadraten mit einer Kantenlänge von $30 \mu\text{m}$ der Anteil großer Zellen (Kategorie 1) im Vergleich zu den Quadraten mit $40 \mu\text{m}$ Kantenlänge mehr als verdoppelt (Abb. 4.14). Dementsprechend verringert sich die Anzahl kleiner Zellen in Kategorie 3 signifikant. Die Anzahl mittelgroßer Zellen bleibt fast unverändert. Innerhalb der großen Quadrate (erste 5 Balken in den Verdünnungen) oder innerhalb der kleinen Quadrate (letzte 5 Balken) ist kein signifikanter

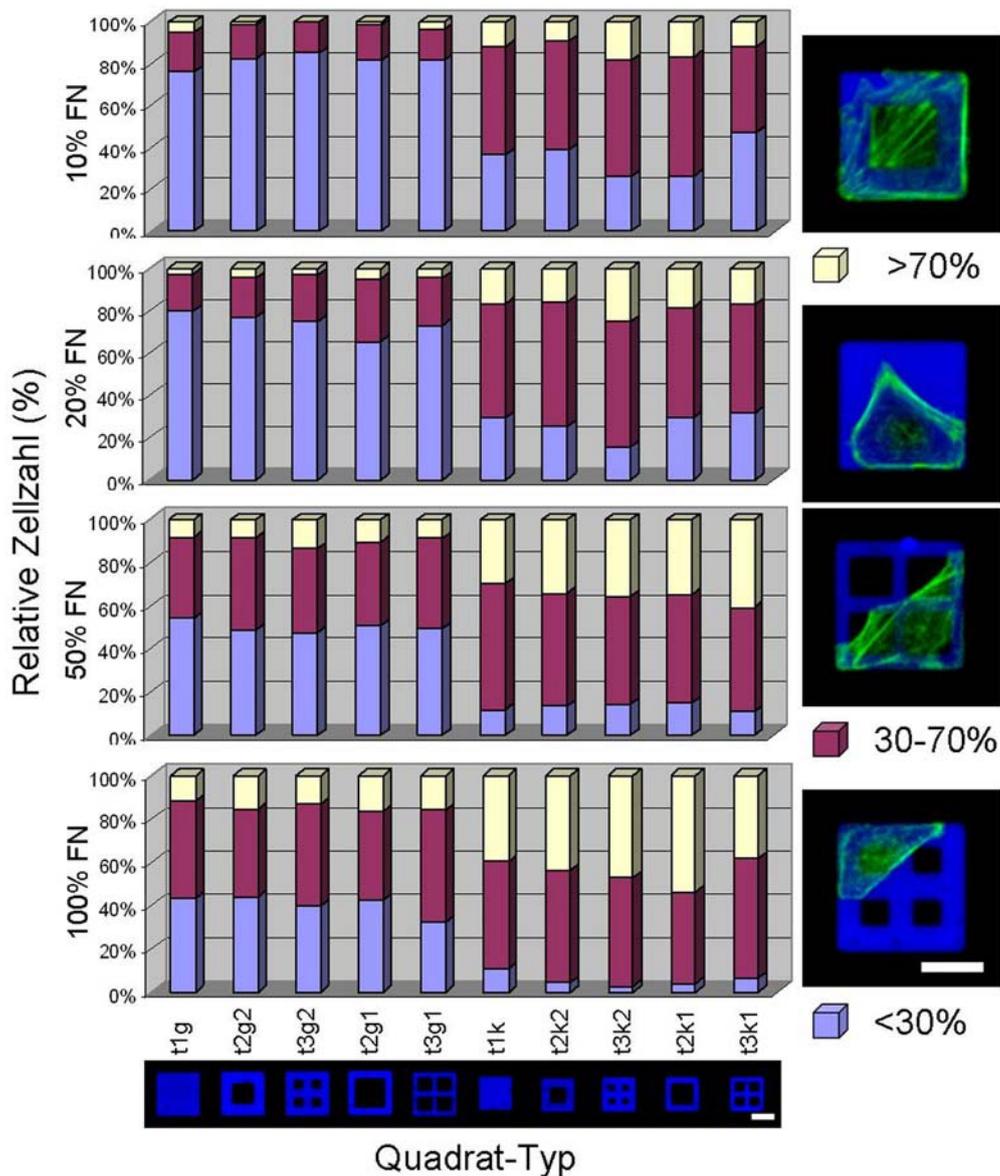


Abb. 4.18 Zellspreading auf quadratischen Mustern mit verschiedenen FN-Verdünnungen

A549-Zellen wurden auf Quadrat-Flächen-Muster mit 100%, 50%, 20% oder 10% aktivem Fibronectin für 80 min unter Standardbedingungen kultiviert. Nach der Fixierung wurden die Präparate immunhistochemisch angefärbt. Die Fläche einzeln gespreadeter Zellen wurde bestimmt und nach der relativen Größe zu dem darunter liegenden Quadrat in drei Kategorien eingeteilt: 1) Zellen, die auf >70% der Fibronectin-Quadratfläche spreaden, 2) Zellen, deren Fläche zwischen 30 - 70% eines Quadrats entspricht und 3) Zellen, die auf <30% eines Quadrats adhären. Die drei Zellkategorien sind rechts mit repräsentativen Zellen auf unterschiedlichen Quadrattypen dargestellt (blau: FN; grün: Aktin). Der prozentuale Anteil der drei Kategorien wurde nach der Fibronectinverdünnung gegen die Quadrattypen aufgetragen. In der x-Achse sind die entsprechenden fibronectingefärbten Quadrate gezeigt. Der Anteil gut ausgebreiteter Zellen (Kategorie 1) nimmt mit höherer aktiver Fibronectin-Konzentration zu. Die Änderung der Fibronectinbedeckung durch die Geometrie zeigt keinen signifikanten Einfluss auf das Zellspreading. Maßstabsbalken: 20 µm.

Unterschied festzustellen, obwohl sich die absolute Fibronectin-Ligandenzahl aufgrund der Aussparungen (Abb. 3.1) unterscheidet. Diese Tendenz gilt für alle vier untersuchten Fibronectin-Konzentrationen. Vergleicht man jeweils einen Quadrattyp bei unterschiedlichen Fibronectin-Konzentrationen, wird ein Anstieg des Anteils gut gespreadeter Zellen (Kategorie 3) mit zunehmender Fibronectin-Konzentration unabhängig von der Quadrat-Grundfläche deutlich. Auch die Anzahl der Zellen mittlerer Größe nimmt auf den großen Quadraten abhängig von der Fibronectinverdünnung zu, bleibt auf den kleinen Quadraten jedoch fast unverändert. Insgesamt wird die Zellgröße nur durch die Fibronectin-Konzentration bzw. Ligandendichte, jedoch nicht durch die geometrische Aussparung bzw. geometrische Fibronectinbedeckung bestimmt.

4.6.2 Zellfläche auf dem quadratischen Muster wird allein durch FN-Verdünnung beeinflusst

Die Größenverteilung der A549-Zellen auf den Quadraten wird nur durch die Fibronectinverdünnung beeinflusst, jedoch nicht durch die Änderung der geometrischen Bedeckung aufgrund von Aussparungen in den Quadraten. Des Weiteren spielt die Quadrat-Grundfläche eine Rolle bei der Einteilung der Zellen, da auf den kleinen Quadraten der Anteil großer Zellen stets größer ist als auf den großen Quadraten. Die mögliche Ursache liegt darin, dass die Zellen auf kleinen Quadraten mit entsprechend kleiner absoluter Grundfläche eine bestimmte relative Zellfläche einfacher ausbilden können.

In Abb. 4.19 sind Daten von 8419 vermessenen Zellen gezeigt, die auf zehn verschiedenen Quadrattypen adhären, die mit jeweils vier unterschiedlichen Fibronectin-Konzentrationen beschichtet wurden. Auf dem Quadrat-Muster beträgt die maximale Zellfläche der A549-Zelllinie lediglich ca. $850 \mu\text{m}^2$. Auf dem in Kap. 4.2.3 untersuchten *Dot*-Muster ist die Fläche mit ca. $1850 \mu\text{m}^2$ dagegen wesentlich größer. Die resultierenden Zellflächen nach der Fibronectinverdünnung stimmen musterunabhängig überein. Bei einer Beschichtung mit 10% aktivem Fibronectin auf dem Quadratmuster halbiert sich die Zellfläche auf ca. $400 \mu\text{m}^2$; auf den *Dot*-Mustern mit identischer Fibronectin-Konzentration beträgt die Fläche vergleichbar ca. $550 \mu\text{m}^2$.

Die verschiedenen Quadrattypen zeigen kaum einen Einfluss auf die Zellfläche. Diese bleibt zwar nicht vollständig konstant, zeigt jedoch auch keine klare Tendenz zur Zellflächenvergrößerung bei zunehmender Fibronectinbedeckung. Auf unterschiedlichen Quadrat-Mustern gespreadete Zellen zeigen lediglich eine direkte Korrelation zwischen der Zellfläche und der Fibronectinverdünnung.

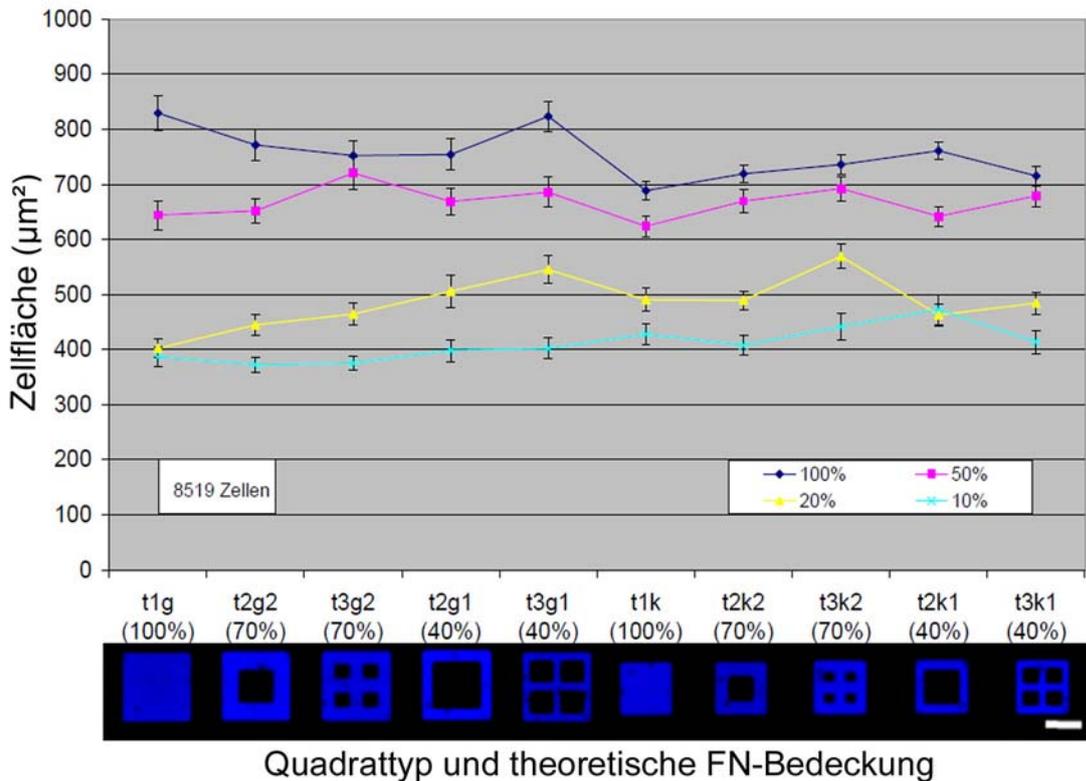


Abb. 4.19 A549-Zellfläche ist auf Quadrat-Muster von FN-Verdünnung abhängig

Die für die Abb. 4.18 bestimmten Zellflächen wurden nach der Fibronectinverdünnung für jeden Quadrattyp gemittelt. Die Mittelwerte wurden mit dem Standardfehler gegen den jeweils analysierten Quadrattyp aufgetragen. Die Zellfläche verkleinert sich in Abhängigkeit von der Fibronectinverdünnung. Es ist keine klare Tendenz erkennbar, dass hier die Zellfläche durch die geometrische Bedeckung (in Prozent unter x-Achse angegeben) aufgrund der Aussparung in den Quadraten beeinflusst wird. Maßstabsbalken: 20 µm.

5 Diskussion

Lebende Zellen stehen in ständiger Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix (ECM) und verarbeiten dabei sowohl physikalische als auch chemische Informationen in ihrer Umgebung. Auf diese externen Signale reagieren sie durch Anpassung ihres Verhaltens beispielsweise mittels Umorganisation der Zytoskelettkomponenten. Des Weiteren können sie ihre Umgebung auch aktiv durch den Umbau der extrazellulären Matrix modifizieren. Um auf die externen Signale adäquat zu reagieren, müssen die Zellen zunächst feststellen, welche Art von Signal eingegangen ist. Die physikalischen Eigenschaften der ECM werden beispielsweise durch aktive Kontraktion bzw. Ausbildung intrazellulärer Zugkräfte erfasst (Geiger *et al.* 2009). Um biochemische Signale in der Umgebung wahrzunehmen, muss die Zelle erstens die Art des Signals feststellen, und zweitens dessen Stärke messen. Während die chemische Spezifität der Liganden durch spezifische Rezeptoren detektiert wird, ist die Wahrnehmung der Ligandenmenge noch unklar. *In vitro* Experimente zeigen, dass die Ligandendichte eine entscheidende Rolle bei vielen zellulären Vorgängen, sowohl kurzzeitigen Prozessen wie Adhäsion, Spreading und Migration, als auch langzeitige Vorgänge wie Wachstum und Differenzierung (Kap. 2.5), spielt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, anhand mikrostrukturierter geometrischer Substrate und unter Verwendung von Zellen unterschiedlichen Gewebeursprungs zu untersuchen, ob die Substratgeometrie einen Einfluss auf das Zellverhalten hat und ob die untersuchten ECM-Liganden zelltypunabhängig quantifiziert werden können. Des Weiteren sollten mittels quantitativer Bildanalyse immunohistochemischer Zellkulturpräparate die Komponenten der ECM-induzierten Signalverarbeitung quantifiziert und ein allgemein gültiger Mechanismus erarbeitet werden, wie die Zellen die zur Verfügung stehenden Liganden auslesen und benutzen.

5.1 Anzahl zur Verfügung stehender Liganden wird unabhängig von der Geometrie quantitativ wahrgenommen

Zahlreiche Studien belegen, dass die Zellen in der Lage sind, die zur Verfügung stehende Ligandenanzahl zu erkennen. Die Literaturdaten liefern jedoch widersprüchliche Angaben über die Art der Zellreaktion. Während in einigen Experimenten auf homogen beschichteten Substraten eine biphasische Änderung der Zellfläche in Verhältnis zur Ligandendichte gezeigt wurde (Engler *et al.* 2004; Gaudet *et al.* 2003; Massia und Hubbell 1991), demonstrierten andere Experimente dagegen einen monophasischen Verlauf mit stetig steigender Zellfläche, die in einem abschließenden Flächenmaximum resultiert (Mooney *et al.* 1995; Rhoads und Guan 2007). Es ist allgemein anerkannt, dass die Substrat-

geometrie die Zellform bedingt und somit die Zellfunktion beeinflusst wird (Kap. 2.6). Während Chen *et al.* 1998 zu dem Ergebnis kamen, dass lediglich die Substratgeometrie, jedoch nicht die absolute Ligandenmenge, die Zellfläche bestimmt, zeigten dagegen Lehnert *et al.* 2004, dass die Zellfläche allein durch die zur Verfügung stehende Menge der Liganden, jedoch nicht durch die Geometrie der Substrate kontrolliert wird. Die Ursache für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten an grundsätzlichen Unterschieden im experimentellen Ansatz liegen: Einerseits könnten die von Chen *et al.* untersuchten Epithelzellen über andere Regulationsmechanismen verfügen als die fibroblastenähnlichen Zellen, die von Lehnert *et al.* eingesetzt wurden, da sich der Gewebersprung und somit die *in vivo* Zusammensetzung und Organisation der ECM deutlich unterscheiden. Des Weiteren untersuchten Chen und Mitarbeiter Langzeiteffekte bis zu 24 Stunden, die auch einen Einfluss auf die Zellreaktion haben könnten. Im Vergleich dazu untersuchten Lehnert *et al.* Kurzzeiteffekte bis zu 1 h. Unterschiede zeigen sich ebenso in der experimentellen Substratvielfalt und damit einhergehend in der statistischen Aussagekraft. Während Chen und Mitarbeiter lediglich drei Substratgeometrien untersuchten, analysierten Lehnert *et al.* mehr als zehn verschiedene Substratgeometrien.

Um neue Einblicke in die mechanistische Verarbeitung extrazellulärer Signale zu gewinnen, wird in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu der geometrischen Mustervielfalt die Menge an aktiven Liganden durch definierte Proteinverdünnung kontrolliert. Die Kombination beider Methoden liefert somit eine weit höhere Variabilität und Substratvielfalt. Um eine allgemein gültige Aussage treffen zu können, wurden drei verschiedene adhärente Zelllinien unterschiedlicher Herkunft untersucht: die humane epitheliale A549-Zelllinie aus der Lunge, die parenchymale BRL-Zelllinie (Buffalo-Rat-Liver) aus der Leber der Ratte und die fibroblastenähnliche B16- Melanoma-Zelllinie aus der Maus.

5.1.1 Ligandenanzahl wird unabhängig von Zelltyp und Gewebersprung quantifiziert

Durch Kombination der Methode des *Microcontactprintings* (μ CP) mit definierter Fibronectinverdünnung konnte in dieser Arbeit eine enorme Variabilität der Substratbedeckung erzielt werden. Diese ermöglichte die Realisierung unterschiedlicher Proteinbedeckungen bei konstanter Geometrie um zu untersuchen, ob entweder die Substratgeometrie oder die Ligandendichte für das Zellspreading entscheidend ist. Nach Kultivierung von drei Zelltypen unterschiedlichen Gewebersprungs auf diesen Substraten zeigt sich eine verdünnungsunabhängige Zunahme der Anzahl adhärerter Zellen (Abb. 4.4 C und D) sowie der Zellfläche (Abb. 4.7 A' - C') bei steigender geometrischer Fibronectinbedeckung (in Prozent). Gleichzeitig nehmen die Anzahl adhärerter Zellen und

deren Zellfläche mit der Konzentration des aktiven Fibronektins zu. Bei ansteigender effektiver Fibronektinbedeckung (FN-Moleküle/ μm^2), die sich aus der Kombination von vielfältigen Geometrien und Fibronektinverdünnungen ergibt, zeigen alle untersuchten Zellen eine Zunahme der Zellfläche im Bereich mit niedriger Proteinbedeckung, die bei höheren Bedeckung in die Sättigung übergeht (Abb. 4.4 A und B, Abb. 4.7 A - C). Somit scheinen alle drei untersuchten Zelltypen unbeeinflusst durch die Substratgeometrie in der Lage zu sein, die zur Verfügung stehenden ECM-Moleküle quantitativ zu errechnen und mit entsprechender Flächenvergrößerung darauf zu reagieren. Die Reproduzierbarkeit und Allgemeingültigkeit dieses Ergebnisses zeigt sich sowohl bei der Quantifizierung des Integrin-Rezeptors von A549-Zellen (Abb. 4.12), als auch im Zellverhalten zweier weiterer Zelllinien. So sind ähnliche Tendenzen in der Zunahme der Zellfläche in Abhängigkeit von der effektiven Fibronektinbedeckung auch bei NRK- (*normal rat kidney*) und MEF-Zellen (*mouse embryonal fibroblasts*) beobachtet worden (Daten nicht gezeigt).

Mit Beginn des ersten Kontakts zwischen den Zellen und der ECM beginnt der Spreading-Vorgang. Dabei tasten die Zellen mit Hilfe ihrer Filopodien und Lamellipodien die Umgebung ab. Bei günstigen Bedingungen bilden sie Zell-Matrix-Kontakte und breiten sich flächig aus (Kap. 2.3). Auf homogenen Substraten können Zellen in beliebigen Richtungen uneingeschränkt spreaden und sind nach ihrer Ausbreitung meist auf dem Substrat abgeflacht. Dabei zeigte sich bei Verringerung der Ligandendichte durch Verdünnung eine positive Korrelation der Zellfläche mit der Konzentration der extrazellulären Matrixproteine (Kap. 2.5.2). Auf strukturierten Substraten wird das Zellspreading dagegen durch die Substratgeometrie begrenzt. Um spreaden zu können, müssen die Zellen antiadhäsive Bereiche überbrücken. Die gespreadeten Zellen passen dabei ihre Form der Geometrie der Substrate an (Chen et al., 1997; Singhvi et al., 1994), wobei das Zellverhalten bestimmten geometrischen Grenzen unterliegt (Lehnert et al., 2004). Während Substrate, deren adhäsive Bereiche Abstände von $\leq 2 \mu\text{m}$ aufweisen, keinen offensichtlichen Einfluss auf die Zellmorphologie ausüben, entstehen auf Substratgeometrien mit Abständen $\geq 4 \mu\text{m}$ geometrische Zellformen. Dieser Effekt verdeutlicht sich mit zunehmendem antiadhäsivem Abstand.

Auf dem hier untersuchten *Dot*-Muster befinden sich sechzehn Bahnen, die zwei verschiedene *Dot*-Größen und acht unterschiedliche *Dot*-Abstände aufweisen. In Kombination mit vier Fibronektin-Konzentrationen ergeben sich somit 64 verschiedene Bedeckungsmöglichkeiten, die sich durch definierte effektive Fibronektinbedeckungen auszeichnen. Trotz der enormen Vielfalt in Geometrie und Bedeckung wird die Zellfläche von fünf unterschiedlichen Zelltypen einheitlich sigmoidal über die effektive Fibronektinbedeckung integriert. Die Geometrie spielt dabei keine Rolle. Beispielsweise gibt es

keinen signifikanten Unterschied in der Zellfläche auf Substraten mit einer einheitlichen effektiven Bedeckung von ca. 500 FN-Moleküle/ μm^2 , die entweder durch homogene Beschichtung mit 50% aktivem Fibronectin oder durch Bindung von 100% aktivem Fibronectin auf eine ca. 50% geometrisch bedeckte Oberfläche erzielt wurde (Abb. 4.7, unabhängiger t-Test bei $p < 0.05$). Diese Ergebnisse belegen, dass die Zellfläche allein durch die Ligandendichte unabhängig von der Geometrie reguliert ist. Entscheidend ist dabei nur, wie groß der proteinbedeckte Anteil der Oberfläche bei der Strukturierung ist und wieviel Fibronectinmoleküle davon aktiv sind.

5.1.2 Zelltypspezifische Reaktionen bezüglich der Ligandendichte

Die hier untersuchten Zellen kommen *in vivo* in sehr unterschiedlichen Geweben vor und üben entsprechend vielfältige Funktionen aus. Trotz der Diversität ihrer Herkunft zeigen alle drei untersuchten Zelltypen abhängig von der Ligandendichte identische Änderungsprofile in der Anzahl adhärierter Zellen und der Zellfläche. Dennoch werden auf den untersuchten Substraten zelltypspezifische Verhaltensweisen deutlich. Erste morphologische Unterschiede zwischen A549- und BRL-Zellen zeigen rasterelektronische Aufnahmen. Im Gegensatz zur homogen glatten Oberfläche der BRL-Zellen weisen die A549-Zellen zahlreiche Mikrovilli und unterschiedlich große kugelförmige Strukturen auf der Zelloberfläche auf, die wahrscheinlich auf die ursprüngliche Funktion der Zellen zurückzuführen sind. Alveolare Epithelzellen wie A549-Zellen sekretieren *in vivo* komplexe Lipoproteine, die die oberflächenaktiven Eigenschaften der inneren Lungenoberfläche bestimmen (Lieber *et al.* 1976).

Erste quantitative Unterschiede sind durch die Anzahl der adhärierter Zellen auf den Substraten belegt. Während bei gleicher Dichte in der Zellaussaat auf einer Musterbahn ca. 230 A549-Zellen adhären, haften fast doppelt so viele BRL-Zellen (Abb. 4.4). Beide Zelltypen benötigen ungefähr die gleiche Anzahl an Fibronectinmolekülen für eine vergleichbare Anzahl adhärierter Zellen. Für eine maximale Adhäsionsanzahl brauchen BRL-Zellen jedoch fast doppelt so viel Fibronectinliganden wie die A549 Zellen. Die Fähigkeit der A549-Zellen, antiadhäsive Distanzen zu überbrücken, ist im Vergleich zu BRL-Zellen stärker ausgeprägt. Sowohl auf den großen $9 \mu\text{m}^2$ *Dot*-Mustern als auch auf den kleinen $1 \mu\text{m}^2$ *Dot*-Mustern überbrücken sie im Vergleich zu den BRL-Zellen signifikant größere *Dot*-Abstände. Dieser Effekt wird bei allen untersuchten Fibronectin-Konzentrationen beobachtet. Nicht nur die Distanzüberbrückung, auch die Ausbildung der Zellfläche ist zelltypabhängig. Die epithelialen A549-Zellen sind mit einer Fläche von $1852.22 \pm 98.86 \mu\text{m}^2$ ca. $300 \mu\text{m}^2$ größer als die parenchymalen BRL-Zellen, die eine Fläche von $1544 \pm 49.01 \mu\text{m}^2$ aufweisen (Abb. 4.7). Die fibroblastenähnlichen B16-Zellen stellen mit einer Größe von lediglich $1350.13 \pm 90.03 \mu\text{m}^2$ die kleinste der drei Zelllinien

dar. Die Grundfläche der untersuchten Musterbahn ist jedoch nicht der limitierende Faktor. Da jede Musterbahn eine Fläche von $2000 \times 400 \mu\text{m}^2$ aufweist (Abb. 3.2), können sich so theoretisch mindestens 430 A549-Zellen oder 520 BRL-Zellen, auch bei Erreichen ihrer maximalen Fläche, ausbreiten. Diese Zahl wird bei keinem der beiden Zelltypen erreicht, auch wenn unter experimentellen Bedingungen eine Vielzahl der Zellen unter dem Flächenmaximum spreadet.

Des Weiteren zeigen die untersuchten Zellen gewebespezifisch eine unterschiedliche Toleranz in Bezug auf die Fibronektinverdünnung. Bei epithelialen A549- und parenchymalen BRL-Zellen vermindert sich deren Zellfläche um ca. $500 \mu\text{m}^2$ bei einer Fibronektinverdünnung von 50%. Eine vergleichbare Verminderung der Zellfläche wird bei den fibroblastenähnlichen B16-Zellen bei einem Proteinanteil von nur noch 5% aktivem Fibronektin erzielt. Das heißt, dass die epithelialen A549- und die parenchymalen BRL-Zellen viel empfindlicher auf die Fibronektinverdünnung reagieren als die fibroblastenähnlichen B16-Zellen. Die Fibroblasten sind *in vivo* in einem lockeren dreidimensionalen ECM-Netzwerk eingebettet und aufgespannt, das weit verteilte, einzelne Liganden auf vielfältigen Filamenten bietet. Die Epithelzellen dagegen sitzen auf einer engmaschigen Basallamina, die den Zellen annähernd eine homogene Kontaktfläche anbietet. Daher könnten die epithelialen A549-Zellen auf eine hohe Ligandendichte angewiesen sein, so dass kleine Änderung in der Ligandendichte starke Effekte auslösen könnte. Im Gegensatz dazu spreaden die fibroblastenähnlichen B16-Zellen *in vivo* bei niedriger Ligandendichte und zeigen erst bei stark verringertem Ligandenangebot Zellreaktionen.

In Hinblick auf das Migrationsverhalten unterscheiden sich auch die A549-Zellen von den B16-Zellen. Während B16-Zellen mit einer hohen Geschwindigkeit von ca. $60 \mu\text{m}/\text{h}$ migrieren, ändern die A549-Zellen auf dem selben $1 \mu\text{m}^2$ *Dot*-Muster ihre Position um weniger als $5 \mu\text{m}$ im Untersuchungszeitraum von 30 min. Die Migrationsrate der B16-Zellen ist ebenfalls von dem unterliegenden Substrattyp abhängig. So ist die Positionsänderung dieser Zellen auf den großen $9 \mu\text{m}^2$ *Dot*-Mustern sowie auf homogenen Substraten halbiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz aller zelltypspezifischen Unterschiede bezüglich der Anzahl adhärierter Zellen, der maximalen Zellfläche sowie der Migrationsrate generell die Zellfläche durch die Ligandendichte bestimmt wird. Alle Zellen sind unabhängig vom Gewebsursprung in der Lage, die Anzahl der ECM-Liganden in ihrer Umgebung zu quantifizieren.

5.1.3 Zellflächenänderung auf Quadratmuster nur nach Fibronektinverdünnung

Der Vorteil des quadratischen Musters gegenüber dem *Dot*-Muster besteht darin, dass das Zellspeading bei definierter geometrischer Bedeckung untersucht und somit zusätzlich die zelluläre Adhäsionsfläche begrenzt werden kann. Die Kombination mit der Fibronektinverdünnung erweitert auch hier die Vielfalt in der Herstellung effektiver Substratbedeckungen. Epitheliale A549-Zellen zeigen eine verdünnungsabhängige Abnahme der Zellfläche (Abb. 4.19) von ca. $800 \mu\text{m}^2$ bei 100% aktivem Fibronektin bis ca. $400 \mu\text{m}^2$ bei einer Fibronektinaktivität von 10% auf allen Quadratformen. Die quadratischen Muster bestehen aus zehn unterschiedlichen Quadrattypen, die theoretisch drei verschiedene geometrische Bedeckungen von 40, 70 und 100% aufweisen (Abb. 3.1). Die tatsächliche Bedeckung ist aufgrund des Stempelvorgangs jedoch wesentlich höher. Für die Quadrate, die durch Einsparungen theoretische Bedeckungen von 40% und 70% aufweisen, sind tatsächliche Bedeckungen von $68.64 \pm 2.37\%$ bzw. $84.49 \pm 1.47\%$ gemessen worden. Bei einer Beschichtung mit 100% aktivem Fibronektin sollten alle Zelllinien auf allen untersuchten Quadrattypen ihre maximale Fläche erreichen können. Allerdings ist die durchschnittliche Zellfläche viel kleiner als das auf homogenen Substraten ermittelte Zellflächen-Maximum. Die Ursache für das vermehrte Auftreten kleiner Zellen (Abb. 4.18) könnte an der Begrenzung der Zellausbreitung durch das adhäsive Quadrat liegen. Die Quadrate haben entweder eine Fläche von ca. $1850 \mu\text{m}^2$ oder ca. $1100 \mu\text{m}^2$, die durch einen antiadhäsiven Abstand von $40 \mu\text{m}$ voneinander getrennt sind. Dieser Abstand zwischen den adhäsiven Bereichen ist von den Zellen nicht überbrückbar (Abb. 4.5). Adhärert eine Zelle zufällig in der Peripherie des Quadrats und nicht in dessen Mitte, kann sie sich nur in eine Richtung ausbreiten. Das stellt gegenüber großflächigen Substraten, auf denen sich die Zellen uneingeschränkt im Rahmen ihrer geometrischen Limitierung ausbreiten können, einen großen Nachteil dar. Zusätzlich bilden die Zellen im Falle der Adhäsion in der Quadratperipherie sogleich an der Kante des adhäsiven Bereiches Zell-Matrix-Kontakte aus, die während des Spreadings verstärkt werden und die Ausbreitung in Richtung der gegenüberliegenden Seite erschweren könnten. Daher haften vermutlich viele Zellen nur am Rand eines Quadrates und können sich nicht richtig ausbreiten. Auf Substraten mit großen Quadraten, die mit 100% aktivem Fibronektin beschichtet sind, beträgt dieser Anteil an Zellen ca. 40%. Mit zunehmender Fibronektinverdünnung kann der Anteil solcher kleiner Zellen bis zu 80% betragen (Abb. 4.18). Auf den kleinen Quadraten ist der Anteil solcher Zellen zwar kleiner, aber die Grundfläche der Quadrate ist auch kleiner als bei den großen Quadraten. Daher haben die relativ vergrößerten Zellen nicht unbedingt eine größere Fläche. Alle diese Faktoren zusammen führen sehr wahrscheinlich dazu, dass die Zellfläche auf dem quadratischen Mustern im Vergleich zum *Dot*-Muster kleiner ist. Trotz der Begrenzung durch die

adhäsiven Bereiche und infolgedessen kleinerer Spreadingflächen nimmt allgemein die Zellfläche eindeutig mit der Fibronektinverdünnung ab. Somit konnten auf weiteren Substratgeometrien gezeigt werden, dass die Zellfläche allein durch die Ligandendichte bestimmt ist.

5.2 Liganden auf strukturierten und homogenen Substraten werden unterschiedlich verrechnet

In der Vergangenheit wurde bereits sowohl bei den Verdünnungsexperimenten als auch auf strukturierten Substraten neben der Änderung der Zellfläche auch stets eine veränderte Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten beschrieben (Arnold *et al.* 2004; Belisario *et al.* 2005; Massia und Hubbell 1991). Da Zell-Matrix-Kontakte die Informationsaustauschstellen zwischen den Zellen und ihrer Umgebung darstellen, ist anzunehmen, dass über diese Kontakte die Ligandenanzahl verrechnet wird. Um zu untersuchen, welche zellulären Mechanismen zur Vermessung der Ligandenanzahl Anwendung finden, wurden repräsentative, an der Interaktion zwischen der Zelle und der ECM beteiligte Proteine, sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert.

5.2.1 Unterschiedliche Verteilungsmuster der Zell-Matrix-Kontaktproteine

Werden epitheliale A549-Zellen als auch parenchymale BRL-Zellen auf gleichen *Dot-*Mustern kultiviert, zeigt das Adapterprotein Paxillin eine von der Fibronektinverdünnung abhängige Verminderung in der Anzahl und Qualität der Kontakte (Abb. 4.9). Der selbe Effekt wurde auch bei fibroblastenähnlichen B16-Zellen beschrieben (Jiang 2006). Beim Zellspreading flachen die Zellen ab und breiten sich auf dem Substrat aus. Dieser Prozess wird durch das Clustern der Integrine induziert und löst eine intrazelluläre Signaltransduktion aus. Eine erste Zell-ECM-Adhäsion kann aber auch ohne Wechselwirkung der Integrine mit ihren Liganden erfolgen (Zhang *et al.* 2008). Zum Beispiel adhären die Zellen auch auf mit Poly-Lysin beschichteten Substraten (Lehnert *et al.* 2004). Solche Zell-Matrix-Kontakte können durch Zelloberflächenmoleküle wie Hyaluronan vermittelt werden (Zimerman *et al.* 2004). Für weitere nachfolgende aktive Spreadingprozesse ist jedoch die integrinvermittelte Signaltransduktion erforderlich. Nach Aktivierung durch ihre Liganden bilden die in der Zellmembran frei beweglichen Integrine (Duband *et al.* 1988) Cluster. Auf der intrazellulären Seite dieser Integrin-Cluster wird eine Reihe unterschiedlicher Proteine rekrutiert, die verschiedene Funktionen bei der Signalweiterleitung ausüben (Kap. 2.2.3). In Folge dessen werden Fokalkomplexe ausgebildet, die über ihren intrazellulären Signalweg die Aktivität der Rho-GTPasen und somit die Ausbildung von Filopodien und Lamellipodien kontrollieren (Faix *et al.* 2009). Die Aktivität der kleinen GTPase RhoA wird zu diesem Zeitpunkt möglicherweise durch

die *focal adhesion kinase* (FAK) unterdrückt (Ren *et al.* 2000). Der Spreading-Prozess setzt sich mit der Entwicklung von Rac1-abhängigen Lamellipodien sowie Cdc42-abhängigen Filopodien fort, die die Ausbreitung der Zellen ermöglichen (Ladwein und Rottner 2008; Lauffenburger und Horwitz 1996). Die Effektoren der Integrin-Signaltransduktion können auch über andere Membranrezeptoren, wie z.B. Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren, kontrolliert werden (Kap. 1.3.1), die dann ebenfalls regulierend in das Zellspreading eingreifen. In dieser Arbeit wurde bei der Durchführung der Experimente ausschließlich Medium ohne Serumzusatz verwendet, um substratunabhängiges Spreading, das beispielsweise durch lösliche Wachstumsfaktoren im Serum hervorgerufen wird, zu vermeiden. Somit sind die substratgebundenen Integrin-Liganden alleinige Auslöser der Integrin-Signaltransduktion.

Es liegen unterschiedliche Angaben über die minimale Dichte, bei der die Fokalkontakte noch ausgebildet werden können, vor. Massia und Hubbell 1991 zeigten mit einfachen Verdünnungsexperimenten, dass eine RGD-Dichte von $60 \text{ RGD}/\mu\text{m}^2$ für die Ausbildung der Fokalkontakte ausreichend ist. Anhand besser kontrollierbarer Gold-Nanodot-Substrate mit RGD-Beschichtung fanden dagegen Arnold *et al.* 2004, dass für den selben Effekt mindestens $420 \text{ RGD}/\mu\text{m}^2$ benötigt werden. Der effektive Abstand zwischen zwei benachbarten RGD-Molekülen ist somit in einem Bereich zwischen 58 nm (Arnold *et al.* 2004) und 140 nm (Massia und Hubbell 1991) zu erwarten. Die am Clustern der Integrine beteiligten Moleküle Talin und α -Actinin weisen beide eine Länge von ca. 60 nm auf. Arnold *et al.* begründen basierend auf dieser Proteinelänge ihre Beobachtung, dass Zellen bei Ligandenabständen von 58 nm noch Zell-Matrix-Kontakte ausbilden können, jedoch bei größerem Abstand ab 73 nm die Kontaktausbildung verhindert ist. Da dieser Ligandenabstand von 73 nm die Proteinelänge von Talin und α -Actinin übersteigt, kann möglicherweise das Clustern der Integrinmoleküle nicht mehr erfolgen. In der hier vorgestellten Arbeit wird für die untersuchten Substrate eine Fibronectin-Ligandendichte von $1000 \text{ Moleküle}/\mu\text{m}^2$ bei einer homogenen Beschichtung kalkuliert (Kap. 4.1.3). Bei der Beschichtung mit 100% aktivem Fibronectin beträgt somit der effektive Abstand zwischen den einzelnen aktiven Fibronectin-Molekülen 33 nm und zwischen den RGD-Motiven, die für die Rezeptorbindung hauptverantwortlich sind, 22 nm (Tab. 5.1). Bei der Verdünnung des Fibronectins nimmt der Abstand zwischen den substratgebundenen RGD-Motiven entsprechend zu. So beträgt er bei 50% aktivem Fibronectin 32 nm, bei 25% 42 nm, bei 20% 50 nm und bei 10% aktivem Fibronectin bereits 70 nm (Tab. 5.1). Der kalkulierte Abstand der RGD-Motive ist mit der immunohistochemisch untersuchten Paxillinverteilung übereinstimmend. So ist in Abb. 4.9 gezeigt, dass sich das in Zell-Matrix-Kontakten enthaltene Paxillin aufgrund der Fibronectinverdünnung stufenweise verringert. Doch erst bei der Beschichtung mit 10% aktivem Fibronectin fehlt das Adapterprotein Paxillin klar in

den Zell-Matrix-Kontakten über den adhäsiven *Dots*. Der effektive RGD-Motiv-Abstand beträgt hier 70 nm und verhindert nach Arnold *et al.* das Clustern der Integrine.

Tab. 5.1 Ligandenabstand bei unterschiedlichen Fibronektinverdünnungen

Konzentration aktives Fibronektins	Ligandendichte (FN-Moleküle/ μm^2)	Mittlerer Abstand der Fibronektinmoleküle	Mittlerer Abstand der RGD-Motive
100%	1000	33 nm	22 nm
50%	500	45 nm	32 nm
25%	250	65 nm	42 nm
20%	200	70 nm	50 nm
10%	100	100 nm	70 nm

Durch den Einsatz von dominant negativen Rac1- und Cdc42-Mutanten zeigten Guillou *et al.* 2008, dass auf strukturierten Substraten die Ausbildung von Filopodien die Voraussetzung für das Zellspreading ist. Über das Verhältnis zwischen der Kontaktstärke und der Länge der Filopodien liegen zwar keine quantitativen Untersuchungen vor. Dennoch ist denkbar, dass stärkere Zellkontakte die Aktivität der Rho-GTPasen erhöhen und dadurch die vermehrte Ausbildung längerer Filopodien vermitteln. Die somit bei zunehmender Verringerung des Anteils an aktivem Fibronektin erwartete Zellflächenverkleinerung konnte experimentell gezeigt werden (Kap. 4.2.3). Möglicherweise ist an der Zellmembran die Anzahl geclusterter Integrin-Moleküle aufgrund mangelnder Ligandendichte zu gering. Infolgedessen werden nicht genügend Signale in die Zelle weitergeleitet und spreadingvermittelnde Signalkaskaden bleiben aus. Sowohl die Anzahl als auch die Länge der Filopodien sind somit von der verminderten Signalweiterleitung betroffen und die Zellen überbrücken geringere antiadhäsive Abstände. Demzufolge wird die Zellfläche kleiner.

Der Integrin-Rezeptor wird allgemein als Hauptvermittler der Zell-ECM-Wechselwirkung angenommen und scheint daher für die Verrechnung der Ligandendichte verantwortlich zu sein (Gaudet *et al.* 2003). Um direkt die Verteilung der Integrin-Rezeptoren mit dem Vorkommen anderer typischer Zell-ECM-Kontaktproteine zu vergleichen, wurden epitheliale A549-Zellen auf mikrostrukturierten Substraten kultiviert und quantitative Bidanalysen durchgeführt. Da die hier untersuchten kommerziell erhältlichen Antikörper vorwiegend gegen humane Integrin-Rezeptoren gerichtet sind, blieb die immunohistochemische Untersuchung der Rezeptorverteilung auf die humane epitheliale A549-Zelllinie beschränkt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Integrin-Rezeptoren auf den

strukturierten Substraten im Vergleich zu anderen Zellkontaktproteinen wie Talin, FAK, Vinculin und Paxillin unterschiedlich verteilt sind. Während die Adapter- und signalvermittelnde Proteine vorwiegend in der Zellperipherie vorkommen, binden Integrin-Rezeptoren dagegen an alle *Dots* unterhalb der Zellen (Abb. 4.10). Zell-Matrix-Kontakte sind dynamische Strukturen, die besonders bei migrierenden Zellen einem ständigen Umbau unterliegen. Ihre Ausbildung ist auch Voraussetzung für die gerichtete Zellmigration und -ausbreitung, indem sie Zellausstülpungen wie Filopodien und Lamellipodien induzieren. Da die Zell-Matrix-Kontaktproteine überwiegend in der Zellperipherie vorkommen, scheinen reife Kontakte nur in diesen Bereichen für den Spreadingprozess benötigt zu werden. Die Kontaktreifung ist Folge der interaktiven Wechselwirkung zwischen Integrin-Clustern und Aktinstressfasern (Watanabe *et al.* 1997a). Reife Zell-Matrix-Kontakte sind stets mit Stressfasern assoziiert. Bildet eine Zelle keine Kontakte mit dem unterliegenden Substrat aus, nimmt sie eine energetisch günstige Kugelform an. Bei einer abgeflachten Zelle ist die Kraft, die der Oberflächenspannung entgegen wirkt, am Rand einer Zelle am größten (Balaban *et al.* 2001; Tan *et al.* 2003). Daher sind die Zell-Matrix-Kontakte in der Zellperipherie verstärkt, wobei in der Zellmitte kaum Kontakte vorkommen. Dennoch bleibt der Integrin-Rezeptor auf jedem *Dot* unterhalb der Zelle mit den substratgebundenen Liganden verankert. Diese Verbindung der Zelle mit dem Substrat kann beispielsweise verhindern, dass sich die Zelle sogleich vom Substrat ablöst und stirbt, falls die peripheren Kontakte abgerissen oder aufgelöst werden. Da im Zellzentrum kaum Kräfte durch das Aktinzytoskelett ausgeübt werden, erfolgt hier auch keine Kontaktreifung und Rekrutierung anderer Kontaktproteine. Daher handelt es sich wahrscheinlich nur um schwache Bindungen zwischen den Liganden und den Rezeptoren. Da die Bindung der Integrin-Rezeptoren an die Fibronectin-Liganden erst nach ihrer Aktivierung möglich ist (Kap. 2.2.2), stellen diese schwachen Bindungen vermutlich Überreste von bereits aufgelösten reifen Kontakten dar. Diese Kontakte waren zu Beginn des Spreadings in der Zellperipherie lokalisiert und wurden durch Zellausbreitung in der Zellmitte angeordnet. Aufgrund fehlender Kraft dissoziierten die Kontaktproteine, so dass nur die bestehenden Verbindungen zwischen den Integrin-Rezeptoren und ihren Fibronectin-Liganden behalten wurden. Die Integrin-Rezeptoren unterliegen in den Zell-Matrix-Kontakten einem ständigen Turnover (Ballestrem *et al.* 2001), dessen Geschwindigkeit sich je nach der Eigenschaft der Kontakte unterscheidet. Die RhoA-induzierten Zell-Matrix-Kontakte mit hoher Integrin-Dichte weisen im Vergleich zu den Rac1- und Cdc42-induzierten stationären Kontakten mit niedriger Integrin-Dichte einen hochdynamischen Turnover auf. Die in dieser Arbeit gezeigten, über allen Fibronectin-*Dots* ausgebildeten Integrin-Kontakte sind wahrscheinlich RhoA-unabhängig, da sie nicht mit Stressfasern korreliert sind.

5.2.2 Integrinabhängige Ligandenverrechnung auf strukturierten, aber nicht auf homogenen Substraten

Quantitative Spreadinganalysen von Zelllinien unterschiedlichen Gewebeursprungs in Korrelation mit der Ligandendichte weisen daraufhin, dass die Zellen in der Lage sind, die zur Verfügung stehende Ligandendichte wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Um die zugrunde liegenden Mechanismen der zellulären Verrechnung der Ligandendichte zu analysieren, wurden die an der integrinvermittelten Signalweiterleitung beteiligten Komponenten wie die phosphorylierte *Fokal Adhäsion Kinase* (pFAK) und Paxillin quantitativ untersucht. Das Verhältnis dieser Zell-Matrix-Kontaktproteine zur Ligandendichte und den substratgebundenen Integrin-Rezeptoren sollte Aufschluss über die zelluläre Signalverarbeitung geben. Dazu wurden Zellen auf mikrostrukturierten Substraten definierter Proteinbedeckung kultiviert, immunohistochemisch angefärbt und die Zellfläche sowie die Komponente der Zell-Matrix-Kontakte quantifiziert. Es konnten lediglich humane A549-Zellen untersucht werden, da der einzige funktionierende Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrin ausschließlich gegen humane Integrine gerichtet ist.

An der Interaktion zwischen Zellen und der umgebenden ECM sind zahlreiche membranständige Proteine und Polysaccharide beteiligt. Darunter spielt beispielsweise das Hyaluronan aus der zellumgebenden, bis zu 5 μm dicken Glycocalyx (Zaidel-Bar *et al.* 2004), eine wichtige Rolle für die Initiation des ersten Zell-Matrix-Kontakts. Für eine stabile Verbindung zwischen Zellen und der ECM sorgen jedoch hauptsächlich die Integrin-Rezeptoren (Kap. 2.2). Daher wird angenommen, dass sich der Integrin-Rezeptor an der Verrechnung der Ligandenanzahl beteiligt ist. Das $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Heterodimer, der Hauptrezeptor des Fibronektins, besitzt nur eine einzige Liganden-Bindestelle. Nach der Bindung des Liganden leitet das Integrin die Information aus der ECM in die Zelle weiter. Dabei werden zahlreiche intrazelluläre Adapter- und Signallingproteine rekrutiert bzw. aktiviert. Dieser Prozess der Signalweitergabe könnte in einem bestimmten Verhältnis erfolgen, wodurch die Zellen über ihre Integrin-Rezeptoren und nachgeschalteten Effektorproteine die Ligandendichte in der Umgebung wahrnehmen. Die aufgestellte Arbeitshypothese beinhaltet die Informationsweitergabe bzw. Aktivierung eines Integrin-Rezeptors durch einen Fibronektin-Liganden (Abb. 5.1). Das aktivierte Integrin löst intrazellulär eine sogenannte Signaleinheit aus, an der beispielweise FAK und Paxillin beteiligt sind. Dieses Signal wird proportional weitergeleitet und reguliert über die Rho-GTPasen die Aktivität des Aktinzytoskeletts. Durch die so kontrollierte Dynamik des Aktinzytoskeletts wird die Zellfläche, der hier untersuchte Parameter für das Zellspreading, bestimmt.

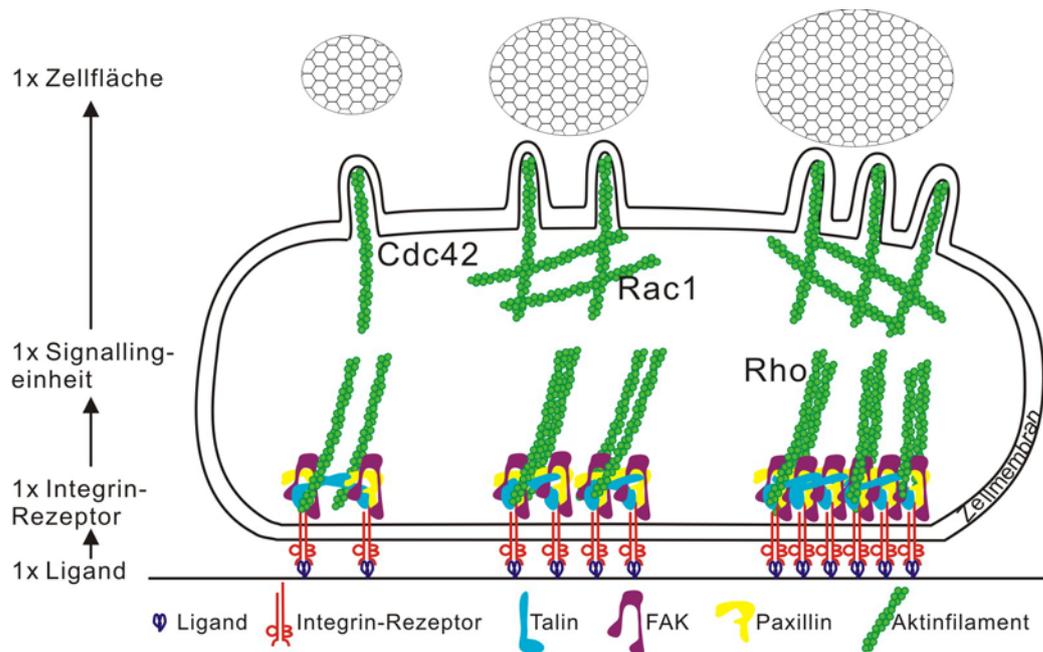


Abb. 5.1 Arbeitshypothese für die Kontrolle der Zellfläche durch die Ligandendichte

Das schematische Modell basiert auf der experimentellen Beobachtung, dass die Zellfläche von der Ligandendichte kontrolliert wird. Dabei wird angenommen, dass die Vermessung der Ligandenanzahl über die Integrin-Rezeptoren vermittelt wird. Dabei aktiviert ein Ligand einen Rezeptor, der das Signal proportional an nachgeschalteten Effektoren weitergibt. Die Anzahl der Liganden kontrolliert so unter Beibehaltung des Verhältnisses die Aktivität der Rho-GTPasen, die die Dynamik des Aktinzytoskeletts regulieren und dadurch die Zellfläche bestimmen.

Basierend auf diesem Arbeitsmodell (Abb. 5.1) wurden die Fläche des substratgebundenen $\beta 1$ -Integrin-Rezeptors, des Paxillins und des pFAKs auf allen Zell-Matrix-Kontakten individueller Zellen sowie deren Zellfläche quantifiziert und in Korrelation zur Ligandendichte analysiert. Der Korrelationsgrad wird durch den Determinationskoeffizienten (R^2) ausgedrückt. Dieser Determinationskoeffizient gibt an, inwieweit der Streuungsanteil einer Variablen durch die Regressionsgerade "bestimmt" wird. Der Koeffizient variiert zwischen 0 und 1. $R^2 = 0$ bedeutet, dass die unabhängigen Variablen keine Vorhersage der Zielvariablen erlauben. Je größer der Wert ist, desto stärker gibt die Regressionsgerade die Korrelation zwischen den untersuchten Variablen wider. $R^2 = 1$ weist auf eine optimale Modellanpassung hin.

Die gemittelte Integrin-Fläche zeigt auf den untersuchten Mustern eine ähnliche Abhängigkeit von der effektiven Fibronectinbedeckung wie die Zellfläche. Auch die Integrin-Fläche steigt mit der zunehmenden Fibronectindichte an und geht ab einer Bedeckung von ca. 400 Fibronectinmoleküle/ μm^2 in die Sättigung über (Abb. 4.12). Die gemittelte Zellfläche zeigt dagegen eine lineare Abhängigkeit von der gemittelten Integrin-

Fläche (Abb. 4.13). Der Determinationskoeffizient für die lineare Regression belegt mit einem Wert von 0.8718 die sehr gute Korrelation beider Parameter. Dieser nimmt ab ($R^2 = 0.6032$, Abb. 4.14), wenn statt der Mittelwerte einzelne Datenpunkte analysiert werden, die eine höhere Streuung aufweisen. Dennoch demonstriert dieser verringerte Determinationskoeffizient im Rahmen der biologischen Variabilität die lineare Korrelation von Zellfläche und Integrin-Fläche.

Die effektive Fibronektinbedeckung gibt die Anzahl der Fibronektin-Moleküle auf einer Flächeneinheit an. Sowohl die Zellfläche als auch die Integrin-Fläche ändern sich sigmoidal bei Zunahme der effektiven Fibronektinbedeckung. Um den Zusammenhang zwischen der Zellfläche und der Substratbedeckung genauer zu analysieren, wurde die Anzahl der von einer gespreadeten Zelle benutzten Fibronektin-Moleküle errechnet. Diese ergibt sich aus der Multiplikation der Zellfläche mit der effektiven Fibronektinbedeckung des Substrates unter der Zelle. Dabei zeigt sich eine gute lineare Korrelation der Zellfläche mit der Anzahl der benutzten Fibronektin-Moleküle ($R^2 = 0.6254$). Die $\beta 1$ -Integrin-Fläche korreliert jedoch nicht linear mit der von den Zellen benutzten Fibronektin-Molekülen ($R^2 = 0.2835$). Dies widerspricht der Annahme, dass die Zellen die Liganden in gleichem Verhältnis durch die Integrine quantitativ detektieren.

Bei der Analyse fällt jedoch auf, dass sich sowohl in Bezug auf die Zellfläche als auch in Bezug auf die Integrin-Fläche die Zellen in zwei Gruppen einteilen lassen. In der ersten Gruppe sind Zellen, die relativ wenige Fibronektin-Moleküle bis ca. 200 000 pro Zelle benutzen. Sowohl die Zellfläche als auch die Integrin-Fläche korrelieren hier linear mit der Anzahl benutzter Fibronektin-Liganden. Zu der zweiten Gruppe gehören Zellen, die relativ viele Liganden ab 200 000 bis 3 000 000 Fibronektin-Moleküle/Zelle nutzen. Hier zeigt sich aufgrund der starken Streuung keine lineare Abhängigkeit der Zellfläche und der Integrin-Fläche von der Ligandennutzung. Die Gruppeneinteilung der Zellen stimmt mit der eingesetzten Substratstrukturierung überein. Während die von der ersten Gruppe benutzten Substrate mit einer Ligandennutzung bis 200 000 echte Substratgeometrien aufweisen, sind die Substrate der zweiten Gruppe mit hoher Ligandennutzung homogen bzw. nahezu homogen beschichtet. Hier bestehen die Substratstrukturen entweder aus $9 \mu\text{m}^2$ *Dots* mit 4 oder 5 μm theoretischen *Dot*-Abständen oder $1 \mu\text{m}^2$ *Dots* mit 2 μm *Dot*-Abstand. So beträgt der theoretische antiadhäsive Abstand von *Dot*-Kante zu *Dot*-Kante, den die Zellen beim Spreaden überbrücken müssen, nur 1 oder 2 μm bei den Mustern mit $9 \mu\text{m}^2$ *Dots*, bzw. 1 μm bei dem Muster mit $1 \mu\text{m}^2$ *Dots*. Im Experiment sind die Abstände aufgrund der Deformation des Stempels bei Substratherstellung noch kleiner. Die Zellen spreaden auf Mustern mit kleinen antiadhäsiven Abständen von 2 μm in Bezug auf die Morphologie, die Zellfläche sowie die Zell-Matrix-Kontaktausbildung vergleichbar zu

Zellen auf homogenen Substraten (Lehnert *et al.* 2004). Diese drei Muster mit geringer antiadhäsiver Distanz werden daher hier als homogen betrachtet.

Entsprechend dieser Gruppeneinteilung zeigt sowohl die Zellfläche als auch die β 1-Integrin-Fläche eine akzeptable lineare Korrelation zur Anzahl der benutzten Fibronektin-Moleküle, jedoch nur auf den strukturierten Substraten (Abb. 4.15). Auf den homogenen Substraten korreliert lediglich die Zellfläche mit der benutzten Fibronektinanzahl, während die β 1-Integrin-Fläche mit der Fibronektin-Nutzung sehr wahrscheinlich nicht korreliert ($R^2 = 0.0652$). Somit scheint die Verrechnung der Ligandenanzahl nur auf den strukturierten Substraten, jedoch nicht auf den homogenen Substraten, über die Integrin-Rezeptoren vermittelt zu werden.

Die quantitativen Untersuchungen basieren auf Bildanalysen immunfluoreszenter Färbungen. Dabei wurden von Zellen, die auf unterschiedlichen Substraten kultivierten, verschiedene Zielproteine angefärbt und fluoreszente Bilder aufgenommen. Anschließend wurde ein Schwellenwert definiert, der angibt, ab welcher Graustufe die Bildinformation positiv ist. Diese Pixelanzahl wurde addiert und in einer Flächenangabe umgewandelt. Da die Präparate unterschiedlich angefärbt sind, ist eine Standardisierung des Schwellenwertes nicht möglich. Daher wurde der Schwellenwert bei allen Messungen manuell so definiert, dass die Zielstruktur ohne Informationsverlust klar vom Hintergrund getrennt werden konnte. Mögliche Messfehler könnten bei Präparaten homogener Substrate stärker ausgeprägt sein als bei Zellen auf strukturierten Substraten. Da auf den strukturierten Substraten die Zell-Matrix-Kontakte nur auf den proteinbeschichteten Bereichen ausgebildet werden, ist der Kontrast zum Hintergrund stärker im Vergleich zu Zellen, die auf homogenen Substraten spreaden. Zellen auf homogenen Substraten bilden zwar in der Peripherie willkürlich prominente, längliche Kontakte aus, die sich gut vom Hintergrund abheben und das Festlegen eines Schwellenwertes leicht ermöglichen. Doch könnten auf diese Weise schwach ausgeprägte Zell-Matrix-Kontakte nicht mit erfasst werden. Weitere Fehler könnten schon bei der Bildaufnahme auftreten. Um eine Überbelichtung zu vermeiden, wurde die Belichtungszeit auf die prominenten Zell-Matrix-Kontakte eingestellt. Signale von schwächer ausgeprägten Zellkontakten könnten aufgrund geringer Fluoreszenzintensität ebenso nicht mit erfasst werden. Diese aufgezeigten Fehlerquellen könnten mit der schwachen Korrelation der β 1-Integrin-Fläche mit der Fibronektin-Nutzung auf homogenen Substraten in Zusammenhang stehen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Zellfläche allein durch die zur Verfügung stehende Ligandendichte kontrolliert wird. Der Mechanismus zur Bestimmung der Ligandendichte unterscheidet sich jedoch auf strukturierten und homogenen Substraten. Auf strukturierten Substraten wird die Ligandenanzahl durch die Integrinrezeptoren

erkannt. Eine proportionale Signalverarbeitung leitet die ECM-Information in die Zelle und vermittelt die Signalumwandlung in eine entsprechende Zellfläche. Auf homogenen Substraten zeigt die β 1-Integrin-Fläche eine gute Korrelation zu der Zellfläche, jedoch nicht zu der Ligandendichte. Die Zellfläche wird durch die Anzahl aktivierter Integrin-Rezeptoren kontrolliert, die aber ihrerseits nicht mit der Anzahl der Fibronektin-Liganden übereinstimmt. Wahrscheinlich sind an dem Quantifizierungsprozess der Liganden noch weitere Reaktionspartner beteiligt, die hier nicht betrachtet werden.

Da die Zellen scheinbar unterschiedliche Mechanismen für die Erkennung der Ligandenanzahl auf homogenen und strukturierten Substraten benutzen, wurde die Analyse weiterer Zell-Matrix-Kontaktproteine auf Substraten mit verdünntem Fibronektin nach dem Substrattyp getrennt durchgeführt. Auf strukturierten Substraten zeigen alle untersuchten Parameter (Integrin-Rezeptor, Adapterprotein Paxillin, Signallingprotein pFAK und Zellfläche) eine gute Korrelation zu der von den Zellen benutzten Ligandenanzahl (Tab. 4.1). Auch die Zellfläche steht in einem direkten Zusammenhang zu den untersuchten Zellkontaktproteinen. Lediglich 1/6 der insgesamt 18 untersuchten Kombinationen weist einen R^2 -Wert kleiner als 0.5 auf und verdeutlicht so die gute Korrelation zwischen den verglichenen Variablen. Auf homogenen Substraten zeigt sich keine eindeutige Korrelation, da über 60% der analysierten Paare (11 von 18) R^2 -Werte aufzeigen, die kleiner als 0.5 sind. Die Korrelation scheint eher auf nicht-lineare Weise zu existieren. Von den sieben akzeptablen Korrelationen beschreiben sechs den Zusammenhang zwischen der Zellfläche und den von Zellen benutzten Fibronektin-Molekülen. Daher wird die Zellfläche sehr wahrscheinlich durch die Ligandenanzahl bestimmt. Die fehlende Korrelation zwischen der Zellfläche und den Zell-Kontaktproteinen zeigt die untergeordnete Rolle des Integrins auf den homogenen Substraten bei der Quantifizierung der Ligandenanzahl.

Fasst man die Daten beider Fibronektin-Konzentrationen zusammen, zeigen alle verglichenen signalverarbeitenden Parameter eine gute Korrelation auf strukturierten Substraten auf. Auch auf den homogenen Substraten wird die Zellfläche von der Ligandendichte bestimmt. Doch spielen der untersuchte β 1-Integrin-Rezeptor, das Paxillin und das pFAK wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle in der Wahrnehmung der Ligandendichte. Der in dieser Arbeit untersuchte ECM-Ligand Fibronektin bietet weit mehr Bindungsstellen als das RGD-Motiv für den $\alpha_5\beta_1$ -Integrin-Hauptrezeptor. Fibronektin wird aufgrund anderer Bindungsstellen beispielsweise noch von $\alpha_v\beta_3$ - und $\alpha_4\beta_1$ -Integrin-Rezeptoren erkannt. Auch das RGD-Motiv allein kann von mindestens 8 verschiedenen Integrin-Heterodimeren erkannt werden (Kap. 2.1.2). Daher ist es leicht vorstellbar, dass noch andere Membranrezeptoren an der Verrechnung der Ligandendichte beteiligt sind.

Da das RGD-Motiv auch von zahlreichen anderen Rezeptoren erkannt wird, bietet die Untersuchung des RGD-Peptids gegenüber dem Fibronectin kaum Vorteile. Dennoch ist aufgrund der kleinen Molekülgröße das RGD-Tripeptid besser zur Kontrolle der Ligandenverteilung geeignet. Das Fibronectin-Molekül ist 130 nm lang und ca. 2 - 3 nm dick (Engel *et al.* 1981) und präsentiert ungefähr in der Mitte jeder Kette ein RGD-Motiv. Da die Lage der Fibronectin-Moleküle bei der Beschichtung unkontrollierbar ist, könnte der tatsächliche Abstand zwischen den Liganden sehr stark voneinander abweichen. Liegen im Idealfall beispielsweise alle Fibronectinketten direkt nebeneinander, beträgt der mittlere Abstand zwischen den RGD-Motiven 14 nm. In lateraler Richtung sind die RGD-Motive aufgrund der Moleküldicke lediglich 3 nm entfernt, in longitudinaler Richtung dagegen abhängig von der Kettenlänge 65 nm. Die Variabilität in der Ausrichtung der Fibronectinmoleküle ist weder bei der Substratherstellung kontrollierbar noch mit immunohistochemischen Methoden nachweisbar. Eine elegantere Methode ist die *Block-Copolymer*-Nanolithographie, durch die der Abstand der RGD-Peptide nanometergenau kontrolliert werden kann (Arnold *et al.* 2004; Arnold *et al.* 2008; Huang *et al.* 2009). Somit konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Zelladhäsion und das Spreading ab einem durchschnittlichen Ligandenabstand von 73 nm limitiert ist (Huang *et al.* 2009). Bei einer unordentlichen bzw. zufälligen Verteilung der Liganden sind die Signale für das Clustern der Integrine und die Fokalkontakt-Ausbildung jedoch ausreichend. Bei den hier untersuchten A549- und BRL-Zellen fehlt das Adapterprotein Paxillin klar in den Zell-Matrix-Kontakten über den adhäsiven *Dots* auf Substraten mit 10% aktivem Fibronectin. Diese Substrate sollten einen mittleren Abstand der RGD-Motive von 70 nm anbieten (Kap. 5.2.1), der nach Huang *et al.* 2009 das Integrin-Clustern noch ermöglicht. Die Ursache für das Fehlen von Paxillin auf Substraten mit 10% aktivem Fibronectin könnte zum Einen in der unregelmäßigen Anordnung der Fibronectin-Moleküle liegen. So wäre eine zu hohe Kalkulation der Ligandendicke denkbar, falls weniger Fibronectin-Moleküle gebunden sind. Zum Anderen könnte die Bindungsaffinität des inaktivierten Fibronectins an die Substratoberfläche im Vergleich zum aktiven Fibronectin höher sein. Somit wäre der tatsächlich substratgebundene Anteil des aktiven Fibronectins geringer als angenommen und der effektive Abstand zwischen RGD-Motive daher größer als 70 nm.

5.3 Berechnungsmodell

Die hier gezeigten Experimente liefern einen Einblick in die Mechanismen, wie Zellen die zur Verfügung stehende Ligandenanzahl erkennen und intrazellulär verrechnen. Es wurde klar gezeigt, dass beim Spreading alle untersuchten Zelllinien die Ligandenanzahl quantitativ unabhängig von der Geometrie wahrnehmen können. Auf den strukturierten Substraten verläuft die Verrechnung sehr wahrscheinlich über die Integrin-Rezeptoren und die darauf folgende proportionale intrazelluläre Weiterleitung der Signale. Auf den homogenen Substraten ist die Funktion des Integrins in Bezug auf die Ligandenquantifizierung unklar. Guillou *et al.* 2008 zeigten, dass sich Zellen auf diskontinuierlichen, strukturierten Substraten anisotropisch ausbreiten. Dabei erreichen die Zellen mit Hilfe ihrer Filopodien nächstgelegene adhäsive Bereiche. Das Fehlen der funktional aktiven Rho-GTPase Rac1 inhibiert das Zellspreading auf strukturierten Substraten, jedoch nicht auf den homogenen Substraten. Auf den homogenen Substraten breiten sich die Zellen daher möglicherweise mittels eines lamellipodienunabhängigen Mechanismus aus.

Eine mögliche Hypothese zur Verrechnung der Ligandendichte ist das Rezeptorsättigungsmodell mit biphasischer Zellflächenzunahme bei erhöhter Ligandendichte (Gaudet *et al.* 2003). Das Modell basiert auf der Annahme, dass die Zelle eine bestimmte Anzahl von Integrin-Rezeptoren zur Verfügung hat. Da sich die Zellfläche mit einem biphasischen Verlauf bei Zunahme der Ligandendichte ändert, werden drei verschiedene Ligandendichten definiert: Bei geringer Ligandendichte wird nur ein Teil der Rezeptoren durch die Liganden belegt, so dass die Zellen kaum spreaden oder lediglich adhärieren. Eine optimale Ligandendichte liegt vor, wenn alle Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Liganden besetzt sind und die Zellen ihre maximale Fläche erreichen. Nimmt die Ligandendichte jedoch weiter zu, wird die Rezeptorsättigung bei einem niedrigeren Spreading-Niveau erreicht. Aufgrund der sehr hohen Ligandendichte sind laut diesem Modell auch die belegten Integrin-Rezeptoren dicht angeordnet. Da die Anzahl an Rezeptoren begrenzt ist, werden die Zellen wieder kleiner, obwohl mehr Liganden zur Verfügung stehen. Das Modell ist jedoch nur bei biphasischer Zunahme der Zellfläche (Engler *et al.* 2004; Massia und Hubbell 1991; Rajagopalan *et al.* 2004) anwendbar (Tab. 2.1). Die häufiger beschriebene, einfache positive Korrelation zwischen Zellfläche und Ligandendichte (Lehnert *et al.* 2004; Mooney *et al.* 1995; Rhoads und Guan 2007) kann so nicht erklärt werden. Das Rezeptorsättigungsmodell nimmt an, dass Rezeptor und Ligand in einem 1:1 Verhältnis binden. Das geclusterte Integrin kommt jedoch häufig ausschließlich in Form von Zell-Matrix-Kontakten in der Zellperipherie vor (Ballestrem *et al.* 2001; Cavalcanti-Adam *et al.* 2007). Für eine Erklärung der monophasischen Zunahme der Zellfläche wurde das Modell angepasst (Jiang 2006). Basierend auf dem modifizierten

Modell nimmt die Zellfläche mit steigender Ligandendichte zu und erreicht ein Maximum bei der optimalen Bedeckung, identisch mit dem Modell von Gaudet. Steigt die Ligandendichte noch weiter an, wird die Fläche nicht mehr durch die Ligandenanzahl, sondern durch das Zellvolumen, die Oberflächenspannung und die intrazelluläre Kontraktilität (Klein 2005) beschränkt. Bei solch hoher Ligandendichte oberhalb des Optimums werden unter den Lamellipodien neue Kontakte aufgebaut und alte Kontakte im Zellzentrum aufgelöst. Somit werden die für den Aufbau neuer Kontakte benötigten Rezeptoren freigesetzt. Da Zell-Matrix-Kontakte hoch dynamische Strukturen sind und sich ständig im Auf- und Abbau befinden (Kap. 2.3.2), ist diese postulierte Umpositionierung der Rezeptoren daher vorstellbar. Bei einer gespreadeten Zelle werden die Zell-Matrix-Kontakte dann überwiegend in der Peripherie stabilisiert.

In der vorliegenden Arbeit ist gezeigt, dass das β 1-Integrin auf strukturierten Substraten auf allen von Zellen benutzten *Dots* vorkommt (Abb. 4.10, Abb. 4.16) und sich auf homogenen Substraten überwiegend auf die Zellperipherie beschränkt. Die Integrin-Fläche beträgt daher immer ca. 1/3 der Zellfläche (Abb. 4.12). Bei der immunohistochemischen Färbung zeigt sich ein verstärkter Hintergrund im Kernbereich, der bei der Quantifizierung der Integrin-Fläche mit einbezogen wird. Die Zellen können maximal bis zu 2 500 000 Fibronektin-Moleküle erkennen bzw. unter sich bedecken (Abb. 4.14), die ca. 5 Millionen Bindestellen für die Integrin-Rezeptoren anbieten. Der Anteil solcher Zellen mit dieser Ligandennutzung ist jedoch klein. Die meisten Zellen spreaden auf weniger als 1 500 000 Fibronektin-Molekülen. Anhand der Spreadingkurven (Abb. 4.7 A, Abb. 4.12 A) wird deutlich, dass die A549-Zellen ca. 600 000 Fibronektin-Moleküle für ein optimales Spreading brauchen. Beim maximalen Spreading können durchaus bis zu 1 800 000 Fibronektin-Moleküle benutzt werden. Für ein optimales Spreading der BRL-Zellen werden ca. 500 000 und für das maximale Spreading bis zu 1 500 000 Fibronektin-Moleküle gebraucht (Abb. 4.7 B). Die B16-Zellen brauchen im Vergleich dazu lediglich 250 000 Moleküle für ein optimales und 1 300 000 Moleküle für ein maximales Spreading (Abb. 4.7 C). Der unterschiedliche Ligandenverbrauch deutet darauf hin, dass Zellen auch bei einer niedrigen Substratbedeckung maximal spreaden können. Akiyama und Yamada 1985 wiesen mit Hilfe eines radioaktiven Bindungsassays nach, dass die fibroblastenähnlichen BHK-Zellen ca. 5×10^5 Fibronektin-Rezeptoren besitzen. Diese Rezeptorzahl wurde jedoch bei abgekugelten Zellen in Suspension ermittelt. In diesem Zustand ist die Oberfläche der Zelle viel kleiner als bei einer gespreadeten Zelle. Unter hypotonischen Bedingungen kann die Zelloberfläche mehr als verdreifacht werden (Groulx *et al.* 2006). Daher ist nicht auszuschließen, dass die ermittelte Anzahl an Integrin-Rezeptoren im gespreadeten Zustand größer ist, wenn alle Membranreserven freigesetzt sind. Außerdem ist unklar, ob alle tierischen Zellen die gleiche Anzahl an Integrin-Molekülen exprimieren.

Angenommen alle Zellen besäßen die gleiche Integrinanzahl wie die BHK-Zellen ohne intrazelluläre Reserven, würden die A549- und BRL-Zellen das optimale Spreading bei der Belegung aller Rezeptoren durch die Liganden erreichen. Die B16-Zellen bräuchten jedoch nur die Hälfte der Liganden. Auf einem homogen beschichteten Substrat mit voller Fibronectin-Aktivität würde auf jeden Fall ein Ligandenüberschuß bestehen. Die Rezeptoren reichen dann nicht aus, um an jeden Liganden zu binden. Daher müssten die Zellen einen Mechanismus anwenden, um die Rezeptoren wieder zu mobilisieren und erneut einsetzen zu können.

Die Zellausbreitung ist ein Prozess, bei dem vor allem am Rand der Zelle Kräfte wirken, die ständig ausbalanciert werden. Diese Kräfte bestehen (1) aus einer intrazellulären, nach innen gerichteten Kraft, die dem Zellspreading entgegen wirkt (F_{SI}), (2) einer antreibende Protrusionskraft (F_P), die die Zellausbreitung fördert und (3) der Adhäsionskraft (F_A) zwischen der Zelle und dem unterliegenden Substrat (Abb. 5.2). Eine adhären wachsende Zelle hat stets die Tendenz sich auszubreiten. Dieser Neigung wirken die nach innen gerichtete intrazelluläre Kontraktilität und die Oberflächenspannung entgegen und verhindern somit ein Abflachen der Zelle. Außerdem wirken zelltypspezifisch das Volumen und die Membranreserven als limitierende Faktoren bei der Zellflächenvergrößerung. Diese Faktoren würden zusammen mit der Oberflächenspannung die Ablösung der Zelle bewirken. Je flacher die Zelle wird, desto größer wird die dem Spreading entgegenwirkende Kraft (F_{SI}) in der Zellperipherie (Liu *et al.* 2008; Tan *et al.* 2003). Um dennoch haften bzw. sich ausbreiten zu können, bilden die Zellen Kontakte mit dem unterliegenden Substrat aus. Mit Hilfe der spreadingvermittelnden Protrusionskraft erreicht die Zelle bzw. deren Zellmembran den nächsten Liganden. Gegen Ende des Spreadingprozesses herrscht ein Gleichgewicht zwischen der spreadingverhindernden bzw. ablösenden Kraft und der Adhäsionskraft aufgrund der Zell-Matrix-Kontakte. Unter diesen Annahmen stimmt das Rezeptorsättigungsmodell auch mit der experimentell gezeigten, sigmoidalen Beziehung zwischen Zellfläche und Ligandendichte überein. Das Modell sagt voraus, dass jede Zelle eine maximale Fläche erreichen kann. Diese ist zelltypspezifisch durch das Volumen, die Membranreserven und die Oberflächenspannung der Zelle bestimmt. Mindestvoraussetzung für das Erreichen der maximalen Zellfläche ist eine optimale Ligandendichte. Sie garantiert, dass alle Rezeptoren durch Liganden beladen und die Kräfte im Gleichgewicht sind. Ist die Anzahl der präsentierten Liganden unter dem Optimum, kann die Zelle zwar adhären und eingeschränkt spreaden. Die Adhäsionskraft kompensiert die spreadingverhindernde bzw. ablösende Kraft und vermittelt so die Anheftung der Zelle. Dennoch ist die antreibende Protrusionskraft aufgrund der geringeren Ligandenbedeckung nicht ausreichend, die Membran bzw. die Rezeptoren zum nächstgelegenen Liganden vorzuschieben. Somit erreicht die Zelle nur

eine kleine Fläche trotz freier Rezeptoren in der Membran. Wird das Ligandendichte-Optimum auf den Substraten überschritten, sind die Rezeptoren bereits besetzt, bevor die maximale Zellfläche erreicht wird. Gleichzeitig ist die Protrusionskraft für die Zelle ausreichend, um den nächsten Liganden zu erreichen. Daher werden die besetzten Rezeptoren aus der Zellmitte freigesetzt und in Richtung der Zellperipherie transportiert, damit die Zellen weiter spreaden können. Der Vorgang der Zellausbreitung wird beendet, wenn die Zellen ihre maximale Fläche erreicht haben.

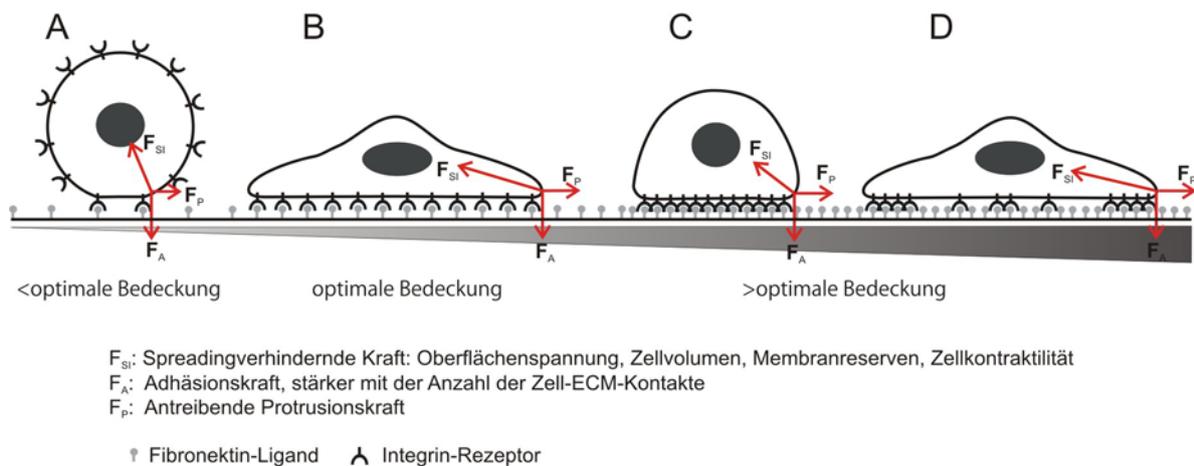


Abb. 5.2 Modifiziertes Rezeptorsättigungsmodell

Der Prozess des Zellsreadings ist von der Ligandendichte abhängig. In dem hier gezeigten Modell erfolgt die Kontrolle der Zellfläche durch das Zusammenspiel einer begrenzten Anzahl an Rezeptoren sowie an der Zellperipherie wirkender Kräfte. (A) Bei einer niedrigen Ligandendichte wird nur ein Teil der Integrin-Rezeptoren belegt. Da aufgrund der verringerten Signaltransduktion und somit kleinerer spreadingfördernder Protrusionskraft (F_P) nächstgelegene Liganden nicht erreicht werden, ist die Zellfläche relativ gering. (B) Bei einer optimalen Ligandendichte werden alle Integrin-Rezeptoren auf der Zelloberfläche belegt und die Zelle erreicht die maximale Fläche. Die Signale sind ausreichend, um die Zellmembran zu nahgelegenen Liganden zu bringen. Die weitere Ausbreitung ist jedoch durch das begrenzte Zellvolumen und Membranangebot beschränkt. (C) Spreadet eine Zelle auf Substraten mit einem Ligandenüberangebot, kann sie sich nur begrenzt ausbreiten, wenn alle Rezeptoren besetzt sind. Dennoch erhält die Zelle genügend Signale und wird noch nicht durch Volumen und Membranen eingeschränkt. Somit spreadet sie weiter und (D) der Transport der Rezeptoren von der Zellmitte in die Peripherie garantiert die Ausdehnung.

Graustufenskala zeigt die Zunahme der effektiven FN-Bedeckung.

Anhand des vorgestellten Modells lässt sich der hier experimentell gezeigte monophasische Spreadingprozess vorhersagen. Doch warum brauchen die B16-Zellen im Vergleich zu den anderen beiden Zelltypen für ein optimales Spreading wesentlich weniger Fibronectinliganden? Die Ursachen könnten in den mechanischen Eigenschaften der Zellen begründet sein. Möglicherweise ist die Steifigkeit der B16-Zellen geringer als

bei den anderen beiden Zelltypen. Somit ist die Kompressionskraft aufgrund beispielsweise dünnerer Aktinstressfasern kleiner und eine geringere Ligandenzahl reicht bereits aus, um eine relativ starke Protrusionskraft zu induzieren. Noch bevor die Rezeptoren komplett besetzt sind, wird das Zellspreading aufgrund limitierter Membranvorräte und der Volumenbeschränkung beendet. Allerdings ist bekannt, dass die Lungenfibroblasten aufgrund prominenter Stressfasern eine steifere Oberfläche als die Epithelzellen aufweisen (Azeloglu *et al.* 2008). Hier konnte jedoch anhand der Aktinfärbung gezeigt werden, dass die fibroblastenähnlichen B16-Zellen weniger strukturell verstärkte Stressfasern im Vergleich zu den parenchymalen BRL- und epithelialen A549-Zellen ausbilden. Da die Steifigkeit von der Organization des Aktinzytoskelettes abhängt, könnten die B16-Zellen mechanisch weniger steif sein und ein geringeres Ligandenangebot für ein optimales Spreading ausreichen.

Trotz allem kann das hier vorgestellte modifizierte Rezeptorsättigungsmodell zwar das monophasische, nicht jedoch das biphasische Spreading erklären. Berücksichtigt man jedoch die in der Literatur beschriebene Häufigkeit beider Zellreaktionen, kommt das biphasische Spreading deutlich seltener vor (Tab. 2.1). Von 21 gezeigten Untersuchungen über das Zellspreading weisen nur 6 Experimente auf ein biphasisches Verhalten hin und der Großteil deutet klar auf das Vorkommen monophasischer Verhaltensweisen. Bezieht man die Art der untersuchten Substrate, die das biphasische Verhalten induzieren, mit ein, wurde der Großteil (4 von 6) der Experimente auf flexiblen Substraten durchgeführt. Auf diesen weichen Substraten könnten sehr wahrscheinlich andere zelluläre Regulationsmechanismen als auf harten Substraten angewendet werden. Von den zwei beschriebenen Untersuchungen auf harten Substraten wurde eine mit glatten Muskelzellen durchgeführt (Engler *et al.* 2004), zu denen wenige Daten über das Spreadingverhalten vorliegen. Die zweite Publikation zum biphasischen Spreading auf harten Substraten beschreibt als Einzige das Verhalten von lediglich einer Fibroblastenlinie (*human foreskin fibroblast*) (Massia und Hubbell 1991). In dieser Arbeit wurden jedoch insgesamt fünf verschiedene Zelllinien unterschiedlichen Gewebeerstoffs untersucht, die, wie die überwiegende Mehrheit publizierter Daten, auf ein einheitliches monophasisches Spreading hinweisen. Das hier vorgestellte modifizierte Rezeptorsättigungsmodell spiegelt daher das überwiegend vorkommende Spreadingverhalten einer Vielzahl an Zellen wider.

5.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert neue Einblicke in das Verständnis der Zellinteraktion mit der umgebenden extrazellulären Matrix. Durch die hier erzielte enorme Substratvielfalt, die durch die Kombination der geometrischen Substratstrukturierung mit der Proteinverdünnung realisiert ist, konnte gezeigt werden, dass die Zellfläche einzig von der effektiven Anzahl, jedoch nicht von der strukturierten Verteilung der Fibronectinliganden abhängig ist. Diese Fähigkeit ist eine allgemeine Eigenschaft aller untersuchten adhären wachsenden Zellen unterschiedlichen Gewebeansprungs. Die zukünftige Untersuchung weiterer Moleküle der ECM, wie beispielsweise Vitronectin oder Laminin, kann Aufschluss darüber geben, ob die Fähigkeit zur Quantifizierung der Liganden auf das ubiquitär vorkommende Fibronectin beschränkt oder für alle Liganden allgemeingültig zutreffend ist.

Ebenfalls sollte die besondere Rolle der GTPasen basierend auf dem hier vorgestellten modifizierten Rezeptorsättigungsmodell untersucht werden. Bei der Kultivierung konstitutiv aktiver Rac1-Mutanten ist zu erwarten, dass die Zellen auch bei niedriger effektiver FN-Bedeckung optimal spreaden und dadurch eine vergrößerte Zellfläche ausbilden. Umgekehrt sollte bei dominant negativen Rac1-Mutanten die Fläche auch bei 100%iger Fibronectinaktivität abnehmen. Des Weiteren können in Zukunft beispielsweise durch den Einsatz von Stimulatoren wie EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor) oder Lysophosphatidsäure (LPA) die Signaltransduktionswege moduliert und gezielt untersucht werden. Mit Hilfe ihrer Rezeptoren können diese Stimulatoren die Integrin-Effektoren transaktivieren und dadurch möglicherweise die beobachtete Abnahme der Zellfläche bei niedriger Ligandendichte aufheben. Darüber hinaus kann der Einsatz der *Laser-Tweezer*-Technik die gezielte Präsentation zusätzlicher Signale auf der Oberseite der spreadenden Zelle ermöglichen. So könnten mit Liganden funktionalisierte Polystyrol-*beads* ein zusätzliches *outside-in* Signal vermitteln um zu prüfen, ob die Zellen somit auch auf Substraten mit niedriger Bedeckung gut spreaden.

Eine weitere Möglichkeit zur gezielten Untersuchung der im Modell beschriebenen intrazellulären Kräfte ist der Einsatz pharmakologischer Inhibitoren. Da die Zellfläche zum Teil durch die intrazelluläre Zugkraft limitiert ist, sollten die Zellen auch bei niedriger Ligandenbedeckung noch optimal spreaden können, wenn die Zugkraft in der Zelle durch die Inhibitoren verringert ist. Erste Hinweise lieferte bereits die Vergrößerung der Zellfläche auf Substraten mit 100% aktivem Fibronectin nach Inhibition der Rho-Kinase (Klein 2005). Die bei einer Erhöhung der Zugkraft durch den Einsatz von Calyculin erwartete Verkleinerung der Zellfläche bei optimaler Bedeckung konnte auch gezeigt werden (Kurth 2005). Für zukünftige Untersuchungen sollte daher analysiert werden, wie

sich die Zellen auf Substraten mit verringerter Fibronectinligandendichte bei gleichzeitiger Modulation der intrazellulären Kraftentstehung verhalten.

Der im Modell vorgestellte Spreadingvorgang bei Ligandenüberschuss basiert auf der Annahme, dass die Integrin-Rezeptoren aus abgebauten Zell-Matrix-Kontakten von der Zellmitte zur Ausbildung neuer Kontakte in die Zellperipherie transportiert und wiederverwendet werden. Ein postuliertes Model ist das Integrin-*Recycling* über die Endozytose (Pellinen und Ivaska 2006). Die gezielte Inhibition der Endozytose könnte daher den Integrinnachschub entkoppeln und lässt eine Abnahme des Zellsreadings auf Substraten höher Fibronectindichte erwarten. Moderne mikroskopische Methode wie TIRF (*total internal reflection fluorescence*) können zusätzlich eine exakte Analyse der Integrin-Dynamik im Grenzbereich zwischen der Zellmembran und dem Substrat ermöglichen und somit die Untersuchung der angenommenen Integrinrezeptor-Tanslokation verwirklichen.

6 Literaturverzeichnis

- Akiyama, S. K. und Yamada, K. M.** (1985) The interaction of plasma fibronectin with fibroblastic cells in suspension. *J.Biol.Chem.* 260: (7) 4492-4500.
- Aota, S., Nomizu, M., und Yamada, K. M.** (1994) The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J.Biol.Chem.* 269: (40) 24756-24761.
- Arnold, M., Cavalcanti-Adam, E. A., Glass, R., Blummel, J., Eck, W., Kantlehner, M., Kessler, H., und Spatz, J. P.** (2004) Activation of integrin function by nanopatterned adhesive interfaces. *Chemphyschem* 5: (3) 383-388.
- Arnold, M., Hirschfeld-Warneken, V. C., Lohmuller, T., Heil, P., Blummel, J., Cavalcanti-Adam, E. A., Lopez-Garcia, M., Walther, P., Kessler, H., Geiger, B., und Spatz, J. P.** (2008) Induction of cell polarization and migration by a gradient of nanoscale variations in adhesive ligand spacing. *Nano.Lett.* 8: (7) 2063-2069.
- Asthaigiri, A. R., Nelson, C. M., Horwitz, A. F., und Lauffenburger, D. A.** (1999) Quantitative relationship among integrin-ligand binding, adhesion, and signaling via focal adhesion kinase and extracellular signal-regulated kinase 2. *J.Biol.Chem.* 274: (38) 27119-27127.
- Azeloglu, E. U., Bhattacharya, J., und Costa, K. D.** (2008) Atomic force microscope elastography reveals phenotypic differences in alveolar cell stiffness. *Journal of Applied Physiology* 105: (2) 652-661.
- Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., und Geiger, B.** (2001) Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature Cell Biology* 3: (5) 466-472.
- Ballestrem, C., Hinz, B., Imhof, B. A., und Wehrle-Haller, B.** (2001) Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J.Cell Biol.* 155: (7) 1319-1332.
- Belisario, M. A., Tafuri, S., Pontarelli, G., Staiano, N., und Gionti, E.** (2005) Modulation of chondrocyte adhesion to collagen by echistatin. *Eur.J.Cell Biol.* 84: (10) 833-842.
- Beningo, K. A., Dembo, M., Kaverina, I., Small, J. V., und Wang, Y. L.** (2001) Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J.Cell Biol.* 153: (4) 881-888.
- Beningo, K. A. und Wang, Y. L.** (2002) Flexible substrata for the detection of cellular traction forces. *Trends Cell Biol.* 12: (2) 79-84.
- Berg, M. C., Yang, S. Y., Hammond, P. T., und Rubner, M. F.** (2004) Controlling mammalian cell interactions on patterned polyelectrolyte multilayer surfaces. *Langmuir* 20: (4) 1362-1368.

- Bischofs, I. B., Klein, F., Lehnert, D., Bastmeyer, M., und Schwarz, U. S.** (2008) Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape. *Biophys.J.* 95: (7) 3488-3496.
- Bishop, A. L. und Hall, A.** (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J.* 348 Pt 2: 241-255.
- Brock, A., Chang, E., Ho, C. C., LeDuc, P., Jiang, X., Whitesides, G. M., und Ingber, D. E.** (2003) Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir* 19: (5) 1611-1617.
- Burridge, K. und Wennerberg, K.** (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* 116: (2) 167-179.
- Cameron, L. A., Giardini, P. A., Soo, F. S., und Theriot, J. A.** (2000) Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 1: (2) 110-119.
- Cavalcanti-Adam, E. A., Volberg, T., Micoulet, A., Kessler, H., Geiger, B., und Spatz, J. P.** (2007) Cell spreading and focal adhesion dynamics are regulated by spacing of integrin ligands. *Biophys.J.* 92: (8) 2964-2974.
- Chen, C. S., Alonso, J. L., Ostuni, E., Whitesides, G. M., und Ingber, D. E.** (2003) Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 307: (2) 355-361.
- Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., und Ingber, D. E.** (1997) Geometric control of cell life and death. *Science* 276: (5317) 1425-1428.
- Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., und Ingber, D. E.** (1998) Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol.Prog.* 14: (3) 356-363.
- Choquet, D., Felsenfeld, D. P., und Sheetz, M. P.** (1997) Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell* 88: (1) 39-48.
- Chrzanowska-Wodnicka, M. und Burridge, K.** (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J.Cell Biol.* 133: (6) 1403-1415.
- Clark, E. A., King, W. G., Brugge, J. S., Symons, M., und Hynes, R. O.** (1998) Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J.Cell Biol.* 142: (2) 573-586.
- Connelly, J. T., Garcia, A. J., und Levenston, M. E.** (2008) Interactions between integrin ligand density and cytoskeletal integrity regulate BMSC chondrogenesis. *J.Cell Physiol* 217: (1) 145-154.
- Critchley, D. R.** (2009) Biochemical and structural properties of the integrin-associated cytoskeletal protein talin. *Annu.Rev.Biophys.* 38: 235-254.
- Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., und Yamada, K. M.** (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 294: (5547) 1708-1712.
- Cukierman, E., Pankov, R., und Yamada, K. M.** (2002) Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current Opinion in Cell Biology* 14: (5) 633-639.

- DerMardirossian, C. und Bokoch, G. M.** (2005) GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol.* 15: (7) 356-363.
- Dike, L. E., Chen, C. S., Mrksich, M., Tien, J., Whitesides, G. M., und Ingber, D. E.** (1999) Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 35: (8) 441-448.
- DiMilla, P. A., Stone, J. A., Quinn, J. A., Albelda, S. M., und Lauffenburger, D. A.** (1993) Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J.Cell Biol.* 122: (3) 729-737.
- Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K., und Scita, G.** (2005) Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol.Life Sci.* 62: (9) 955-970.
- Dobereiner, H. G., Dubin-Thaler, B., Giannone, G., Xenias, H. S., und Sheetz, M. P.** (2004) Dynamic phase transitions in cell spreading. *Phys.Rev.Lett.* 93: (10) 108105.
- Dobereiner, H. G., Dubin-Thaler, B. J., Giannone, G., und Sheetz, M. P.** (2005) Force sensing and generation in cell phases: analyses of complex functions. *J.Appl.Physiol* 98: (4) 1542-1546.
- dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., und Nosworthy, N. J.** (2003) Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83: (2) 433-473.
- Dovas, A. und Couchman, J. R.** (2005) RhoGDI: multiple functions in the regulation of Rho family GTPase activities. *Biochem.J.* 390: (Pt 1) 1-9.
- Duband, J. L., Dufour, S., Yamada, S. S., Yamada, K. M., und Thiery, J. P.** (1991) Neural crest cell locomotion induced by antibodies to beta 1 integrins. A tool for studying the roles of substratum molecular avidity and density in migration. *J.Cell Sci.* 98 (Pt 4): 517-532.
- Duband, J. L., Nuckolls, G. H., Ishihara, A., Hasegawa, T., Yamada, K. M., Thiery, J. P., und Jacobson, K.** (1988) Fibronectin receptor exhibits high lateral mobility in embryonic locomoting cells but is immobile in focal contacts and fibrillar streaks in stationary cells. *J.Cell Biol.* 107: (4) 1385-1396.
- Dubin-Thaler, B. J., Giannone, G., Dobereiner, H. G., und Sheetz, M. P.** (2004) Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophys.J.* 86: (3) 1794-1806.
- Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J. A., Furthmayr, H., Rohde, H., und Timpl, R.** (1981) Shapes, Domain Organizations and Flexibility of Laminin and Fibronectin, 2 Multifunctional Proteins of the Extracellular-Matrix. *Journal of Molecular Biology* 150: (1) 97-120.
- Engler, A., Bacakova, L., Newman, C., Hategan, A., Griffin, M., und Discher, D.** (2004) Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys.J.* 86: (1 Pt 1) 617-628.

- Etienne-Manneville, S. und Hall, A.** (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420: (6916) 629-635.
- Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T. E., und Rottner, K.** (2009) Filopodia: Complex models for simple rods. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 41: (8-9) 1656-1664.
- Felding-Habermann, B. und Cheresch, D. A.** (1993) Vitronectin and its receptors. *Curr.Opin.Cell Biol.* 5: (5) 864-868.
- Friedl, P. und Brocker, E. B.** (2000) The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol.Life Sci.* 57: (1) 41-64.
- Frisch, S. M. und Ruoslahti, E.** (1997) Integrins and anoikis. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: (5) 701-706.
- Galbraith, C. G., Yamada, K. M., und Galbraith, J. A.** (2007) Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science* 315: (5814) 992-995.
- Gallant, N. D., Capadona, J. R., Frazier, A. B., Collard, D. M., und Garcia, A. J.** (2002) Micropatterned surfaces to engineer focal adhesions for analysis of cell adhesion strengthening. *Langmuir* 18: (14) 5579-5584.
- Gallant, N. D., Michael, K. E., und Garcia, A. J.** (2005) Cell adhesion strengthening: contributions of adhesive area, integrin binding, and focal adhesion assembly. *Mol.Biol.Cell* 16: (9) 4329-4340.
- Gamblin, S. J. und Smerdon, S. J.** (1998) GTPase-activating proteins and their complexes. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 8: (2) 195-201.
- Gaudet, C., Marganski, W. A., Kim, S., Brown, C. T., Gunderia, V., Dembo, M., und Wong, J. Y.** (2003) Influence of type I collagen surface density on fibroblast spreading, motility, and contractility. *Biophys.J.* 85: (5) 3329-3335.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., und Yamada, K. M.** (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2: (11) 793-805.
- Geiger, B., Spatz, J. P., und Bershadsky, A. D.** (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 10: (1) 21-33.
- Giancotti, F. G. und Ruoslahti, E.** (1999) Integrin signaling. *Science* 285: (5430) 1028-1032.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., und Parks, W. P.** (1973) In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J.Natl.Cancer Inst.* 51: (5) 1417-1423.
- Ginsberg, M. H., Partridge, A., und Shattil, S. J.** (2005) Integrin regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 17: (5) 509-516.
- Grossmann, J.** (2002) Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis.* 7: (3) 247-260.
- Groulx, N., Boudreault, F., Orlov, S. N., und Grygorczyk, R.** (2006) Membrane reserves and hypotonic cell swelling. *J.Membr.Biol.* 214: (1) 43-56.

- Guillou, H., Depraz-Depland, A., Planus, E., Vianay, B., Chaussy, J., Grichine, A., Albiges-Rizo, C., und Block, M. R.** (2008) Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling. *Exp.Cell Res.* 314: (3) 478-488.
- Hall, A.** (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279: (5350) 509-514.
- Harburger, D. S. und Calderwood, D. A.** (2009) Integrin signalling at a glance. *J.Cell Sci.* 122: (Pt 2) 159-163.
- Heasman, S. J. und Ridley, A. J.** (2008) Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 9: (9) 690-701.
- Hersel, U., Dahmen, C., und Kessler, H.** (2003) RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials* 24: (24) 4385-4415.
- Holub, A., Byrnes, J., Anderson, S., Dzaidzio, L., Hogg, N., und Huttenlocher, A.** (2003) Ligand density modulates eosinophil signaling and migration. *J.Leukoc.Biol.* 73: (5) 657-664.
- Horridge, G. A. und Tamm, S. L.** (1969) Critical Point Drying for Scanning Electron Microscopic Sthdy of Ciliary Motion. *Science* 163: (3869) 817-818.
- Hotulainen, P. und Lappalainen, P.** (2006) Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J.Cell Biol.* 173: (3) 383-394.
- Houseman, B. T. und Mrksich, M.** (2001) The microenvironment of immobilized Arg-Gly-Asp peptides is an important determinant of cell adhesion. *Biomaterials* 22: (9) 943-955.
- Huang, J., Grater, S. V., Corbellini, F., Rinck, S., Bock, E., Kemkemer, R., Kessler, H., Ding, J., und Spatz, J. P.** (2009) Impact of order and disorder in RGD nanopatterns on cell adhesion. *Nano.Lett.* 9: (3) 1111-1116.
- Hughes, R. C., Pena, S. D., Clark, J., und Dourmashkin, R. R.** (1979) Molecular requirements for adhesion and spreading of hamster fibroblasts. *Exp.Cell Res.* 121: (2) 307-314.
- Humphries, M. J., Travis, M. A., Clark, K., und Mould, A. P.** (2004) Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. *Biochem.Soc.Trans.* 32: (Pt 5) 822-825.
- Hynes, R. O.** (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69: (1) 11-25.
- Hynes, R. O.** (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110: (6) 673-687.
- Ingber, D. E.** (1990) Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87: (9) 3579-3583.
- Jackman, R. J., Wilbur, J. L., und Whitesides, G. M.** (1995) Fabrication of submicrometer features on curved substrates by microcontact printing. *Science* 269: (5224) 664-666.

- Jiang, X., Bruzewicz, D. A., Wong, A. P., Piel, M., und Whitesides, G. M.** (2005) Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102: (4) 975-978.
- Jiang, Z.** (2006) Zelladhäsion auf Fibronectin-Substraten mit variabler Geometrie und Dichte. *Diplomarbeit*.
- Juliano, R. L.** (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 42: 283-323.
- Katz, B. Z., Zamir, E., Bershadsky, A., Kam, Z., Yamada, K. M., und Geiger, B.** (2000) Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol.Biol.Cell* 11: (3) 1047-1060.
- Kim, J. P., Zhang, K., Chen, J. D., Kramer, R. H., und Woodley, D. T.** (1994) Vitronectin-driven human keratinocyte locomotion is mediated by the alpha v beta 5 integrin receptor. *J.Biol.Chem.* 269: (43) 26926-26932.
- Klein, F.** (2005) Zelladhäsion auf mikrostrukturierten Substraten nach Inhibition der intrazellulären Kraftentwicklung und Aktin-Dynamik. *Diplomarbeit*.
- Klein, F., Striebel, T., Fischer, J., Jiang, Z., Franz, C. M., von Freymann, G., Wegener, M., und Bastmeyer, M.** (2009) Elastic fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements. *Manuskript in Bearbeitung*.
- Koo, L. Y., Irvine, D. J., Mayes, A. M., Lauffenburger, D. A., und Griffith, L. G.** (2002) Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus. *J.Cell Sci.* 115: (Pt 7) 1423-1433.
- Kowalczyńska, H. M., Nowak-Wyrzykowska, M., Kolos, R., Dobkowski, J., und Kaminski, J.** (2005) Fibronectin adsorption and arrangement on copolymer surfaces and their significance in cell adhesion. *J.Biomed.Mater.Res.A* 72: (2) 228-236.
- Kumar, A. und Whitesides, G. M.** (1993) Features of Gold Having Micrometer to Centimeter Dimensions Can be Formed Through A Combination of Stamping with An Elastomeric Stamp and An Alkanethiol Ink Followed by Chemical Etching. *Applied Physics Letters* 63: (14) 2002-2004.
- Kurth, I.** (2005) Zelladhäsion auf mikrostrukturierten Substraten nach Stimulation der Aktin-Dynamik und der intrazellulären Kraftentwicklung. *Diplomarbeit*.
- Ladwein, M. und Rottner, K.** (2008) On the Rho'd: The regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases. *Febs Letters* 582: (14) 2066-2074.
- Lai, F. P., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H. G., Stradal, T. E., Dunn, G. A., Small, J. V., und Rottner, K.** (2008) Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* 27: (7) 982-992.
- Larjava, H., Plow, E. F., und Wu, C.** (2008) Kindlins: essential regulators of integrin signalling and cell-matrix adhesion. *EMBO Rep.* 9: (12) 1203-1208.
- Lauffenburger, D. A. und Horwitz, A. F.** (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: (3) 359-369.

- Lee, J. W. und Juliano, R.** (2004) Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol. Cells* 17: (2) 188-202.
- Legate, K. R., Wickstrom, S. A., und Fassler, R.** (2009) Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes & Development* 23: (4) 397-418.
- Lehnert, D., Wehrle-Haller, B., David, C., Weiland, U., Ballestrem, C., Imhof, B. A., und Bastmeyer, M.** (2004) Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *Journal of Cell Science* 117: (1) 41-52.
- Leiss, M., Beckmann, K., Giros, A., Costell, M., und Fassler, R.** (2008) The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20: (5) 502-507.
- Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., und Todaro, G.** (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* 17: (1) 62-70.
- Lin, C. H., Espreafico, E. M., Mooseker, M. S., und Forscher, P.** (1997) Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Biol. Bull.* 192: (1) 183-185.
- Liu, J. C. und Tirrell, D. A.** (2008) Cell response to RGD density in cross-linked artificial extracellular matrix protein films. *Biomacromolecules.* 9: (11) 2984-2988.
- Liu, P., Zhang, Y. W., Yu, H., Zhang, X., Cheng, Q. H., Lu, C., und Bonfield, W.** (2008) Spreading of an anchorage-dependent cell on a selectively ligand-coated substrate mediated by receptor-ligand binding. *J. Biomed. Mater. Res. A.*
- Lopez, G. P., Biebuyck, H. A., Harter, R., Kumar, A., und Whitesides, G. M.** (1993) Fabrication and Imaging of 2-Dimensional Patterns of Proteins Adsorbed on Self-Assembled Monolayers by Scanning Electron-Microscopy. *Journal of the American Chemical Society* 115: (23) 10774-10781.
- Ma, Y. Q., Yang, J., Pesho, M. M., Vinogradova, O., Qin, J., und Plow, E. F.** (2006) Regulation of integrin $\alpha 5 \beta 3$ activation by distinct regions of its cytoplasmic tails. *Biochemistry* 45: (21) 6656-6662.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G. L., Hahn, K. M., und Danuser, G.** (2009) Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature.*
- Maheshwari, G., Brown, G., Lauffenburger, D. A., Wells, A., und Griffith, L. G.** (2000) Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 10): 1677-1686.
- Maheshwari, G., Wells, A., Griffith, L. G., und Lauffenburger, D. A.** (1999) Biophysical integration of effects of epidermal growth factor and fibronectin on fibroblast migration. *Biophys. J.* 76: (5) 2814-2823.
- Massia, S. P. und Hubbell, J. A.** (1991) An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin $\alpha 5 \beta 3$ -mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J. Cell Biol.* 114: (5) 1089-1100.

- Mattila, P. K. und Lappalainen, P.** (2008) Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*
- Mcgurk, S. L., Green, R. J., Sanders, G. H. W., Davies, M. C., Roberts, C. J., Tendler, S. J. B., und Williams, P. M.** (1999) Molecular interactions of biomolecules with surface-engineered interfaces using atomic force microscopy and surface plasmon resonance. *Langmuir* 15: (15) 5136-5140.
- Mellor, H.** (2009) The role of formins in filopodia formation. *Biochim.Biophys.Acta.*
- Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Grichine, A., Manet-Dupe, S., Block, M. R., und Albiges-Rizo, C.** (2008) Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent beta1-integrin affinity. *J.Cell Biol.* 180: (2) 427-441.
- Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O. A., Gutkind, J. S., Burbelo, P. D., Akiyama, S. K., und Yamada, K. M.** (1995) Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J.Cell Biol.* 131: (3) 791-805.
- Mooney, D., Hansen, L., Vacanti, J., Langer, R., Farmer, S., und Ingber, D.** (1992) Switching from differentiation to growth in hepatocytes: control by extracellular matrix. *J.Cell Physiol* 151: (3) 497-505.
- Mooney, D. J., Langer, R., und Ingber, D. E.** (1995) Cytoskeletal filament assembly and the control of cell spreading and function by extracellular matrix. *J.Cell Sci.* 108 (Pt 6): 2311-2320.
- Moretti, F. A., Chauhan, A. K., Iaconig, A., Porro, F., Baralle, F. E., und Muro, A. F.** (2007) A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J.Biol.Chem.* 282: (38) 28057-28062.
- Moser, M., Legate, K. R., Zent, R., und Fassler, R.** (2009) The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324: (5929) 895-899.
- Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., und Fassler, R.** (2008) Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat.Med.* 14: (3) 325-330.
- Mrksich, M.** (1998) Tailored substrates for studies of attached cell culture. *Cell Mol.Life Sci.* 54: (7) 653-662.
- Mrksich, M. und Whitesides, G. M.** (1996) Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 25: 55-78.
- Nagai, T., Yamakawa, N., Aota, S., Yamada, S. S., Akiyama, S. K., Olden, K., und Yamada, K. M.** (1991) Monoclonal antibody characterization of two distant sites required for function of the central cell-binding domain of fibronectin in cell adhesion, cell migration, and matrix assembly. *J.Cell Biol.* 114: (6) 1295-1305.
- Nicolas, A., Geiger, B., und Safran, S. A.** (2004) Cell mechanosensitivity controls the anisotropy of focal adhesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: (34) 12520-12525.
- Nobes, C. D. und Hall, A.** (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81: (1) 53-62.

- Ochsenhirt, S. E., Kokkoli, E., McCarthy, J. B., und Tirrell, M.** (2006) Effect of RGD secondary structure and the synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement. *Biomaterials* 27: (20) 3863-3874.
- Olofsson, B.** (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal.* 11: (8) 545-554.
- Olski, T. M., Noegel, A. A., und Korenbaum, E.** (2001) Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily. *J.Cell Sci.* 114: (Pt 3) 525-538.
- Pankov, R. und Yamada, K. M.** (2002) Fibronectin at a glance. *J.Cell Sci.* 115: (Pt 20) 3861-3863.
- Parker, K. K., Brock, A. L., Brangwynne, C., Mannix, R. J., Wang, N., Ostuni, E., Geisse, N. A., Adams, J. C., Whitesides, G. M., und Ingber, D. E.** (2002) Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *Faseb Journal* 16: (10).
- Parsons, J. T.** (2003) Focal adhesion kinase: the first ten years. *J.Cell Sci.* 116: (Pt 8) 1409-1416.
- Partridge, M. A. und Marcantonio, E. E.** (2006) Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Mol.Biol.Cell* 17: (10) 4237-4248.
- Pawson, T., Olivier, P., Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., und Henkemeyer, M.** (1993) Proteins with SH2 and SH3 domains couple receptor tyrosine kinases to intracellular signalling pathways. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 340: (1293) 279-285.
- Pellinen, T. und Ivaska, J.** (2006) Integrin traffic. *Journal of Cell Science* 119: (18) 3723-3731.
- Plow, E. F., Haas, T. K., Zhang, L., Loftus, J., und Smith, J. W.** (2000) Ligand binding to integrins. *Journal of Biological Chemistry* 275: (29) 21785-21788.
- Pollard, T. D. und Borisy, G. G.** (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: (4) 453-465.
- Pozzi, A. und Zent, R.** (2003) Integrins: sensors of extracellular matrix and modulators of cell function. *Nephron Exp.Nephrol.* 94: (3) e77-e84.
- Pytela, R., Pierschbacher, M. D., und Ruoslahti, E.** (1985) Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 40: (1) 191-198.
- Rajagopalan, P., Marganski, W. A., Brown, X. Q., und Wong, J. Y.** (2004) Direct comparison of the spread area, contractility, and migration of balb/c 3T3 fibroblasts adhered to fibronectin- and RGD-modified substrata. *Biophysical Journal* 87: (4) 2818-2827.
- Re, F., Zanetti, A., Sironi, M., Polentarutti, N., Lanfrancone, L., Dejana, E., und Colotta, F.** (1994) Inhibition of Anchorage-Dependent Cell Spreading Triggers Apoptosis in Cultured Human Endothelial-Cells. *Journal of Cell Biology* 127: (2) 537-546.

- Reinhart-King, C. A., Dembo, M., und Hammer, D. A.** (2005) The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophysical Journal* 89: (1) 676-689.
- Ren, X. D., Kiosses, W. B., Sieg, D. J., Otey, C. A., Schlaepfer, D. D., und Schwartz, M. A.** (2000) Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *Journal of Cell Science* 113: (20) 3673-3678.
- Reyes, C. D., Petrie, T. A., und Garcia, A. J.** (2008) Mixed extracellular matrix ligands synergistically modulate integrin adhesion and signaling. *J. Cell Physiol* 217: (2) 450-458.
- Rhoads, D. S. und Guan, J. L.** (2007) Analysis of directional cell migration on defined FN gradients: role of intracellular signaling molecules. *Exp. Cell Res.* 313: (18) 3859-3867.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., und Horwitz, A. R.** (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: (5651) 1704-1709.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., und Bershadsky, A. D.** (2001) 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) 1175-1185.
- Roskelley, C. D. und Bissell, M. J.** (1995) Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem. Cell Biol.* 73: (7-8) 391-397.
- Rottner, K., Hall, A., und Small, J. V.** (1999) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* 9: (12) 640-648.
- Schmidt, A. und Hall, A.** (2002) The Rho exchange factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *Journal of Biological Chemistry* 277: (17) 14581-14588.
- Schmidt, C. E., Horwitz, A. F., Lauffenburger, D. A., und Sheetz, M. P.** (1993) Integrin-cytoskeletal interactions in migrating fibroblasts are dynamic, asymmetric, and regulated. *J. Cell Biol.* 123: (4) 977-991.
- Schmitz, A. A., Govek, E. E., Bottner, B., und Van Aelst, L.** (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp. Cell Res.* 261: (1) 1-12.
- Schwartz, M.** (2004) Rho signalling at a glance. *J. Cell Sci.* 117: (Pt 23) 5457-5458.
- Selhuber-Unkel, C., Lopez-Garcia, M., Kessler, H., und Spatz, J. P.** (2008) Cooperativity in adhesion cluster formation during initial cell adhesion. *Biophys. J.* 95: (11) 5424-5431.
- Semler, E. J., Lancin, P. A., Dasgupta, A., und Moghe, P. V.** (2005) Engineering hepatocellular morphogenesis and function via ligand-presenting hydrogels with graded mechanical compliance. *Biotechnol. Bioeng.* 89: (3) 296-307.
- Silvestre, J., Kenis, P. J., und Leckband, D. E.** (2009) Cadherin and Integrin Regulation of Epithelial Cell Migration. *Langmuir*.

- Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G. P., Stephanopoulos, G. N., Wang, D. I. C., Whitesides, G. M., und Ingber, D. E.** (1994) Engineering Cell-Shape and Function. *Science* 264: (5159) 696-698.
- Small, J. V., Rottner, K., und Kaverina, I.** (1999) Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr.Opin.Cell Biol.* 11: (1) 54-60.
- Small, J. V., Rottner, K., Kaverina, I., und Anderson, K. I.** (1998) Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1404: (3) 271-281.
- Small, J. V., Stradal, T., Vignal, E., und Rottner, K.** (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12: (3) 112-120.
- Smilenov, L. B., Mikhailov, A., Pelham, R. J., Marcantonio, E. E., und Gundersen, G. G.** (1999) Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science* 286: (5442) 1172-1174.
- Tan, J. L., Tien, J., Pirone, D. M., Gray, D. S., Bhadriraju, K., und Chen, C. S.** (2003) Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* 100: (4) 1484-1489.
- Thery, M., Jimenez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M., und Julicher, F.** (2007) Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* 447: (7143) 493-496.
- Thery, M., Racine, V., Pepin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J. B., und Bornens, M.** (2005) The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat.Cell Biol.* 7: (10) 947-953.
- Valentijn, A. J., Zouq, N., und Gilmore, A. P.** (2004) Anoikis. *Biochem.Soc.Trans.* 32: (Pt3) 421-425.
- Van Aelst, L. und D'Souza-Schorey, C.** (1997) Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11: (18) 2295-2322.
- Vicente-Manzanares, M., Webb, D. J., und Horwitz, A. R.** (2005) Cell migration at a glance. *J.Cell Sci.* 118: (Pt 21) 4917-4919.
- Wang, N., Butler, J. P., und Ingber, D. E.** (1993) Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260: (5111) 1124-1127.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. M., und Narumiya, S.** (1997b) p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 16: (11) 3044-3056.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. M., und Narumiya, S.** (1997a) p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 16: (11) 3044-3056.
- Wehrle-Haller, B. und Imhof, B.** (2002) The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol.* 12: (8) 382-389.

- Wehrle-Haller, B. und Imhof, B. A.** (2003) Integrin-dependent pathologies. *J.Pathol.* 200: (4) 481-487.
- Wennerberg, K. und Der, C. J.** (2004) Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J.Cell Sci.* 117: (Pt 8) 1301-1312.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L., und Der, C. J.** (2005) The Ras superfamily at a glance. *J.Cell Sci.* 118: (Pt 5) 843-846.
- Wiesner, S., Legate, K. R., und Fassler, R.** (2005) Integrin-actin interactions. *Cell Mol.Life Sci.* 62: (10) 1081-1099.
- Willcox, P. J., Reinhart-King, C. A., Lahr, S. J., DeGrado, W. F., und Hammer, D. A.** (2005) Dynamic heterodimer-functionalized surfaces for endothelial cell adhesion. *Biomaterials* 26: (23) 4757-4766.
- Winder, S. J. und Ayscough, K. R.** (2005) Actin-binding proteins. *J.Cell Sci.* 118: (Pt 4) 651-654.
- Wu, X., Li, S., Chrostek-Grashoff, A., Czuchra, A., Meyer, H., Yurchenco, P. D., und Brakebusch, C.** (2007) Cdc42 is crucial for the establishment of epithelial polarity during early mammalian development. *Dev.Dyn.* 236: (10) 2767-2778.
- Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L., und Arnaout, M. A.** (2001) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294: (5541) 339-345.
- Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L., und Arnaout, M. A.** (2002) Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296: (5565) 151-155.
- Yamada, K. M. und Even-Ram, S.** (2002) Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat.Cell Biol.* 4: (4) E75-E76.
- Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., und Geiger, B.** (2003) Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J.Cell Sci.* 116: (Pt 22) 4605-4613.
- Zaidel-Bar, R., Cohen, M., Addadi, L., und Geiger, B.** (2004) Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem.Soc.Trans.* 32: (Pt3) 416-420.
- Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., und Geiger, B.** (2007) Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat.Cell Biol.* 9: (8) 858-867.
- Zamir, E. und Geiger, B.** (2001) Components of cell-matrix adhesions. *J.Cell Sci.* 114: (Pt 20) 3577-3579.
- Zamir, E., Katz, B. Z., Aota, S., Yamada, K. M., Geiger, B., und Kam, Z.** (1999) Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J.Cell Sci.* 112 (Pt 11): 1655-1669.
- Zhang, X., Jiang, G., Cai, Y., Monkley, S. J., Critchley, D. R., und Sheetz, M. P.** (2008) Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat.Cell Biol.*

Zimmerman, B., Volberg, T., und Geiger, B. (2004) Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell Motil. Cytoskeleton* 58: (3) 143-159.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius	GEF	engl. <i>guanine nucleotide exchange factors</i>
µCP	Microcontact Printing	GTP	Guanosin-triphosphat
µg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)	h	Stunden
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
µm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)	H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
2D	zweidimensional	HBSS	engl. <i>Hanks balanced salt solution</i>
3D	dreidimensional	HCl	Salzsäure
Abb.	Abbildung	IgM/G	Immunglobulin G/M
ABP	Aktin-bindenden Proteine	IHC	Immunohistochemie
ADF	Aktin-Depolymerisationsfaktoren	Kan	Kanamycin
AFM	Rasterkraftmikroskop (engl. <i>atomic force microscope</i>)	Kap.	Kapitel
ATCC	American Type Culture Collection	kDa	Kilodalton
BGS	Bovine Growth Serum	KPT	Kritische-Punkt-Trocknung
Bidest/ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser, aqua bidestillata	l	Liter
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)	LN	Laminin
bzw.	beziehungsweise	LSM	Laser Scanning Mikroskop
ca.	circa	MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinasen
CaCl ₂	Kalziumchlorid	mg	Milligramm
Cc	Kritischkonzentration	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
cm	Zentimeter (10 ⁻² m)	min	Minuten
CO ₂	Kohlendioxid	mkl	monoklonaler Antikörper (meist aus Maus)
DLS	Direktes Laserschreiben	ml	Milliliter (10 ⁻⁶ l)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Growth Medium	mM	Millimolar (10 ⁻³ M)
DNA	Desoxyribonucleinsäure	mm	Millimeter (10 ⁻³ m)
ECM	Extrazelluläre Matrix	MTOC	Mikrotubuli-organisierenden Zentrum
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	N ₂	Stickstoff
EG30-Me	Ethylenglycol-3-O-Mercaptan	NH ₃	Ammoniak
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
EGFP	enhanced (verstärkt) grün fluoreszierendes Protein	ODM	Octadecylmercaptan
Elisa	engl. <i>Enzym-Linked ImmunoSorbent Assay</i>	OTS	Octadecyltrichlorsilan
engl.	englisch	PAA	Polyacrylsäure
EtOH	Ethanol	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, engl. <i>Phosphat bufferd salin</i>
FAK	engl. <i>Focal Adhesion Kinase</i>	PDGF	engl. <i>platelet-derived growth factor</i>
FN	Fibronektin	PDMS	Polydimethyl-Siloxan
g	Gramm	PFA	Paraformaldehyd
GAP	engl. <i>GTPase-activating proteins</i>	pFAK	Phosphoryliertes FAK
GDI	engl. <i>guanine nucleotide dissociation inhibitors</i>	pkI	polyclonaler Antikörper
GDP	Guanosin-diphosphat	pY	Phosphoryliertes Tyrosin
		R ²	Determinationskoeffizient
		REM	Raster Elektronen Mikroskopie
		RGD	Argini-Glycin-Asparaginsäure-Tripeptid

RTK	Rezeptortyrosinkinase	U/min	Umdrehungen pro Minute
SAM	engl. <i>self-assembled monolayers</i>	usw.	und so weiter
SDS	Natriumdodecylsulfat	v	Volumen
sog.	sogenannt	VN	Vitronektin
β	beta	XPS	Röntgen Photoelektronen Spektroskopie
Tab.	Tabelle	z.B.	zum Beispiel
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid	α	alpha-
u.a.	unter anderem		

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Bastmeyer bedanken, nicht nur für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen, sondern auch für sein stetes Interesse am Fortschritt der Arbeit sowie sein großes Engagement in der Schaffung exzellenter Arbeitsbedingungen im Rahmen des CFN.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Ulrich Schwarz für die freundliche Übernahme des Co-Referats.

Großer Dank gebührt Lu Dao für die AFM-Analyse und Herr Dr. Michael Bruns für die XPS-Analyse.

Ein besonderer Dank gebührt an dieser Stelle Dr. Franziska Klein für die ermügende Unterstützung und anregenden Diskussionen während unserer gemeinsamen Laborarbeit und die intensive „Übersetzung“ dieser Arbeit auf richtiges Deutsch. Nicht zuletzt möchte ich bei Tanja Landmann – der besten TA, die man sich wünschen kann, für die Unterstützung im Labor bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht an die Codoktoranden Roberto Lattanzio, Micha Dietzsch und Melanie Langhauser für die entspannende Büroatmosphäre.

Mein spezieller Dank gilt meiner Familie, die mich in jeder Hinsicht unterstützt hat.

7.3 Publikationen

Veröffentlichungen:

von Philipsborn, A.C., Lang, S., Jiang, Z., Bonhoeffer, F. and Bastmeyer M. (2007). Substrate-bound Protein Gradients fabricated by Microfluidic Networks and Microcontact Printing. *Sci. STKE* (414), pl6.

Klein, F., Striebel, T., Fischer, J., Jiang, Z., Franz, C. M., von Freymann, G., Wegener, M., and Bastmeyer, M. (2009). Elastic fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements. *Advanced Materials*, accepted.

Abstracts:

Jiang, Z., Klein, F., Bastmeyer, M. and Lehnert, D. Cell size on micropatterned substrates is controlled by intracellular tension and ECM-induced signaling but not by ECM-geometry. 29. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ). Braunschweig, April 2006.

Jiang, Z., Klein, F. and Bastmeyer, M. Cell size on micropatterned substrates is controlled by intracellular tension and ECM-induced signaling but not by ECM-geometry. Gordon Research Conference: Fibronectin, Integrins & Related Molecules. Lucca (Barga), April 2007.

Autenrieth, T., Jiang, Z., Klein, F. and Bastmeyer, M. Controlling cell behaviour with mikro- and nanostructured substrates: from 2D to 3D. 5th International Summer School of the DFG-Center for Functional Nanostructures. Bad Herrenalb, August 2007.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Zhongxiang Jiang

geboren am 30. Oktoberr 1976 in Liaoning, China

Verheiratet seit Dezember 2004

Akademische Ausbildung

- | | |
|-------------------|--|
| 10/1995 – 07/2000 | Medizinstudium an der Suzhou Universität
Abschluss: Bachelor der Medizin |
| 10/2002 – 01/2006 | Biologiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Zellbiologie, Biochemie
Diplomarbeitsthema: „Zelladhäsion auf Fibronektin-Substraten mit variabler Geometrie und Dichte“
(Gesamtnote 1.1) |
| 05/2006 – 10/2009 | Promotion am Institut für Zell- und Neurobiologie,
Universität Karlsruhe |

Karlsruhe, den 10. August 2009