

Zellpolarisierung und Haptotaxis auf mikrostrukturierten Fibronektin- Dotgradienten

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Tatjana Autenrieth

aus Bretten

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2012

Quidquid agis prudenter agas et respice finem!

Äsops Fabel 45

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), in der Zeit von Mai 2008 bis Juni 2012 durchgeführt.

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hinweise benutzt, sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der gültigen Fassung beachtet habe.

Bretten, den 26.05.2012

Tatjana Autenrieth

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	2
1.1 Extrazelluläre Matrix	3
1.2 Fibronektin als Komponente der extrazellulären Matrix	3
1.3 Zell-Matrix-Kontakte (Integrine und ihre Adaptoren)	4
1.3.1 Zytoskelett	5
1.3.1.1 Aktin-Zytoskelett	5
1.3.1.2 Mikrotubuli-Netzwerk.....	9
1.4 Zellmigration	12
1.5 Zellpolarisierung als Grundlage der Zellmigration	14
1.6 Rho GTPasen	17
1.7 Haptotaxis	22
1.8 Einsatz mikrostrukturierter Substrate	25
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit	30
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Chemikalien und Lösungsmittel	32
2.2 Herstellung mikrostrukturierter Gradienten mittels Gold-Thiol-Chemie	34
2.2.1 Stempelmuster	34
2.2.2 Herstellung der Master.....	37
2.2.3 Reinigung und Silanisierung der Siliziummaster	37
2.2.4 Herstellung der Stempel	38
2.2.5 Reinigung und Goldbedampfung der Deckgläser	38
2.2.6 Substratherstellung (Gold-Thiol-Chemie)	38
2.3 Zellkultur	40
2.3.1 Zelltypen	40
2.3.2 Präparation primärer Hühnerfibroblasten	41
2.3.3 Routine Zellkultur	42
2.3.4 Auszählen der Zelldichte	42
2.3.5 Transiente Transfektion der Zellen.....	43
2.3.5.1 Plasmide.....	43
2.3.5.2 Plasmidvermehrung und -isolation	44
2.3.5.3 Elektroporation von primären Hühnerfibroblasten	44
2.3.5.4 Lipofektion von humanen Fibroblasten	44
2.3.6 Inhibitionsexperimente	45
2.3.6.1 Störung der intrazellulären Kontraktilität	45
2.3.6.2 Störung der Mikrotubulidynamik.....	45

2.3.6.3	Inhibition der Proteinkinase C zeta (α PKC ζ).....	46
2.4	Immunhistochemie	47
2.5	Quantifizierung	49
2.5.1	Verwendete Optiken zur Analyse der Präparate	49
2.5.1.1	Mikroskope und Objektive	49
2.5.2	Verwendete Software zur Bildbearbeitung und Auswertung	49
2.5.3	Haptotaxis Assay	50
2.5.3.1	Bestimmung der Migrationsrichtung.....	50
2.5.3.2	Bestimmung der Zellpolarisierung	51
2.5.3.3	Zeitrafferuntersuchungen zur Visualisierung der Haptotaxis.....	52
2.5.3.4	Messung der prozentualen Fibronektin-Bedeckung	53
2.5.4	Wundheilungsassay	54
2.5.4.1	Quantifizierung der Zeitrafferaufnahmen	54
2.5.5	Statistische Tests	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Migrationsverhalten auf mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten ...	57
3.1.1	Primäre Hühnerfibroblasten zeigen Haptotaxis.....	59
3.1.2	Substratparameter für eine optimale Haptotaxis	61
3.1.3	Humane Fibroblasten zeigen ebenfalls Haptotaxis	64
3.1.4	Primäre Hühnerfibroblasten lesen Gradienten kontinuierlich aus.....	65
3.2	Zellpolarisierung auf mikrostrukturierten Fibronektin- Dotgradienten	66
3.2.1	Zellelongation entlang der Fibronektin-Gradientenachse	67
3.2.2	Lokalisation des Golgi-Apparates zwischen Nukleus und Zellhinterende bei der Haptotaxis	67
3.2.3	Anterograde Bewegung des Nukleus bei stationärem Verbleiben des Golgi-Apparates während der Haptotaxis	70
3.3	Bedeutung des Zytoskeletts für die Haptotaxis und die Zellpolarisierung ...	72
3.3.1	Zell-Matrix-Kontakte akkumulieren über den Fibronektin-Dots	72
3.3.2	Ausrichtung des Aktin-Zytoskeletts entlang der Gradientenachse	75
3.3.3	Intrazelluläre Zugkräfte sind notwendig für die Haptotaxis und die Zellpolarisierung	76
3.3.4	Veränderte Mikrotubuli-Organisation auf mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten	78
3.3.5	Ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk ist wichtig für die Erkennung des Gradienten und die Zellpolarisierung	80
3.4	Bedeutung der Rho GTPase Cdc42 und ihres downstream Effektors αPKCζ für die Haptotaxis	82
3.4.1	Cdc42 ist erforderlich für die Haptotaxis	83
3.4.2	Die Proteinkinase α PKC ζ ist notwendig für die Haptotaxis.....	85

4 Diskussion	92
5 Ausblick	114
6 Appendix	118
Literaturverzeichnis	124
Abbildungsverzeichnis	144
Tabellenverzeichnis	145
Abkürzungsverzeichnis.....	146
Lebenslauf	148
Publikationen	149
Danksagung	150

Zusammenfassung

Die haptotaktische Migration spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Organismen, bei der Regeneration insbesondere der Wundheilung und in pathologischen Prozessen wie z.B. der Metastasierung. Haptotaxis ist die gezielte Zellmigration entlang eines adhäsiven Proteingradienten in Richtung der höheren Proteinbedeckung. Ziel dieser Arbeit war es, den wenig bekannten Mechanismus der Haptotaxis näher zu untersuchen. Da Zellen *in vivo* von einer extrazellulären Matrix (ECM) umgeben sind, deren Bestandteile wie z.B. Fibronectin (FN) in der ECM verteilt vorliegen, wurden mikrostrukturierte Substrate, bestehend aus FN-Dotgradienten (Dot = Punkt), verwendet. Es wurden Faktoren untersucht, die die Haptotaxis sowohl extra- als auch intrazellulär beeinflussen können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Fibroblasten einen diskontinuierlichen, mikrostrukturierten FN-Dotgradienten auslesen und uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung wandern. Die Haptotaxis wird weder durch eine Änderung der angebotenen FN-Menge, noch durch eine Variation der Gradientensteigung beeinflusst. Durch Modifikation der FN-Dotgröße und der FN-Dotform innerhalb der FN-Gradienten konnte gezeigt werden, dass sowohl die geometrisch bedingte Gesamtmenge des FN, als auch die geometrische Form, in der das FN den Zellen angeboten wird, einen entscheidenden Einfluss auf die Rate und die Direktionalität der Migration haben. Bei einer Verdreifachung der Dotfläche migrieren die Zellen nicht mehr haptotaktisch sondern verbleiben stationär. Eine Änderung der Dotform von quadratisch zu rechteckig (breite Seite senkrecht zum Gradienten) führt zu einer Zellmigration senkrecht zur Gradientenachse und verhindert die Haptotaxis.

Grundvoraussetzung für die haptotaktische Migration ist die initiale Zellpolarisierung. Die Zellen elongieren entlang der Gradientenachse und lokalisieren ihren Golgi-Apparat zwischen Nukleus und Zellvorderende in Richtung der höheren FN-Bedeckung. Mit Beginn der haptotaktischen Migration liegt der Golgi-Apparat downhill zwischen Nukleus und Zellhinterende. Zeitrafferuntersuchungen zeigten, dass der Golgi-Apparat tatsächlich stationär in der Zelle verbleibt, während der Nukleus anterograd an das Zellvorderende in Richtung der höheren FN-Bedeckung gezogen wird. Dies steht im Gegensatz zu dem Verhalten von Zellen, die gerichtet in eine Wunde einwandern und dabei ihren Golgi-Apparat uphill in Richtung der Migrationsfront (Wunde) lokalisieren.

Die Zellpolarisierung bei der Haptotaxis benötigt ein koordiniertes Zusammenspiel des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts. Mit Hilfe pharmakologischer Inhibition ist es erstmals gelungen, die Gradientenerkennung in zwei Teilprozesse aufzutrennen. Nach Reduktion der intrazellulären Aktin-/Myosin Kontraktilität (Y-27632, Blebbistatin) können Zellen die Gradientenachse nicht mehr erkennen und wandern ungerichtet. Zellen, deren Mikrotubulidynamik reduziert wurde (Nocodazol, Taxol), erkennen zwar noch die Achse des Gradienten, sind aber nicht mehr in der Lage zwischen höherer und niedrigerer FN-Bedeckung zu unterscheiden. Somit legt die Aktin-/ Myosin Kontraktilität die Migration entlang der Gradientenachse fest, während die Mikrotubulidynamik über das Vorzeichen der Migration (uphill, downhill) entscheidet. Eine transiente Überexpression von dominant negativen Proteinen (Cdc42-DN, α PKC ζ -DN) ergab zudem, dass die kleine Rho GTPase Cdc42 und ihr downstream Effektor, die Proteinkinase α PKC ζ , für die Haptotaxis und auch für die gerichtete Zellmigration in eine Wunde erforderlich sind. Damit konnte gezeigt werden, dass eine intakte Aktin- und Mikrotubulidynamik, sowie eine funktionale Cdc42- und α PKC ζ -Aktivität notwendig sind, damit Zellen haptotaktisch gerichtet migrieren können, allerdings sind sie nicht essentiell für eine ungerichtete Migration. Insgesamt trägt diese Arbeit dazu bei, sowohl die extra- als auch die intrazellulären Einflüsse auf die Haptotaxis besser zu verstehen.

1 Einleitung

Die Zellmigration ist ein grundlegender physiologischer Prozess, der sowohl bei der Entwicklung und Regeneration als auch bei der Aufrechterhaltung multizellulärer Organismen eine zentrale Schlüsselrolle einnimmt. Neben der ungerichteten, spontanen Bewegung (*random migration*) kann die Zellmigration durch eine Reihe von externen Signalen spezifisch und gerichtet induziert werden. Diese Signale stammen aus der extrazellulären Matrix (ECM) oder dem Medium, das die Zellen umgibt, und können physikalischer oder chemischer Natur sein. Physikalische Einflüsse umfassen z.B. die mechanischen Eigenschaften der Zellumgebung wie etwa die Steifigkeit. Bei den Signalen chemischer Natur spielen Stoffe wie z.B. Wachstumsfaktoren und strukturbildende Proteine wie Fibronectin eine wichtige Rolle. Diese liegen oft in einer gradierten Verteilung vor und übermitteln dadurch wichtige positionelle und direktionale Informationen für die Zellen. Neben chemotrophen, löslichen Konzentrationsgradienten, deren gezielte Erkennung und Reaktion durch Zellen und Organismen als Chemotaxis bezeichnet wird, existieren *in vivo* zudem strukturgebundene (adhäsive) Proteingradienten. Die gezielte Orientierung und Migration entlang eines Konzentrationsgefälles an adhäsiven Proteinen wird dabei als Haptotaxis bezeichnet. Haptotaxis spielt vor allem in Entwicklungsverläufen wie beispielsweise der Angiogenese oder in pathologischen Prozessen wie der Metastasierung eine wichtige Rolle. Viele Positions- und Richtungsinformationen für Zellen beruhen auf einer Kombination von beiden Prozessen, der Chemo- und Haptotaxis. Dabei werden die Signale aus der ECM von den Zellen über membrangebundene Rezeptoren aufgenommen und durch die Aktivierung diverser Signaltransduktionswege ins Innere der Zelle weitergeleitet. Dies führt letztlich zu einer biologischen Antwort wie z.B. der Änderung der Migrationsrichtung. Änderungen in der Zellmigration und Polarisierung benötigen die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts und des Mikrotubuli-Netzwerks. Diese beiden Zytoskelettfilamente sind essentiell für die gerichtete Zellmigration, aber auch an anderen intrazellulären Prozessen wie z.B. dem Vesikeltransport beteiligt.

Das zentrale Thema dieser Arbeit ist die Untersuchung des bisher wenig bekannten Mechanismus der Haptotaxis. Da Zellen *in vivo* ihre aus ECM-Proteinen bestehende Umgebung verteilt vorfinden, werden zur Untersuchung mikrostrukturierte Fibronectin-Gradienten verwendet, um die physiologische Situation besser zu imitieren. In den folgenden Kapiteln soll ein Einblick in die Interaktionen von Zellen mit ihrer Umgebung (ECM) gegeben und dabei die hochkomplexen Vorgänge bei der Induktion einer gerichteten Zellmigration und -polarisierung näher erläutert werden. Der Fokus wird hierbei zunächst auf die ECM, die Zell-Matrix-Kontakte und die Zytoskelettfilamente gelegt. Anschließend erfolgt ein Überblick über den bisherigen Kenntnisstand bezüglich der Zellmigration, der Zellpolarisierung und insbesondere über den Mechanismus der Haptotaxis.

1.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (*extracellular matrix* = ECM) bildet ein hochkomplexes, dreidimensionales Netzwerk aus und liefert neben ihrer Stabilisierungs- und Schutzfunktion vor allem wichtige positionelle und direktionale Informationen für grundlegende Prozesse wie die Zelladhäsion und -migration (Frantz *et al.*, 2011; Gumbiner, 1996). Die Bestandteile der ECM umfassen im wesentlichen Proteoglykane (z.B. Heparansulfat), Kollagenfasern, Multiadhäsionsmatrixproteine (z.B. Fibronectin), sowie Hormone und Wachstumsfaktoren. Die Multiadhäsionsmatrixproteine der ECM (Fibronectin, Laminin, Vitronectin) können mit einer Vielzahl anderer Moleküle interagieren (z.B. Kollagen und Wachstumsfaktoren) und werden von Zellen über spezifische, transmembrane Oberflächenrezeptoren erkannt. In diesem Zusammenhang vermitteln sie die Zelladhäsion und wirken somit direkt auf die Signaltransduktionskaskade in den Zellen ein. Da bei der Haptotaxis das Multiadhäsionsmatrixprotein Fibronectin eine besondere Bedeutung hat, wird im Folgenden nur das Fibronectin beschrieben.

1.2 Fibronectin als Komponente der extrazellulären Matrix

Als dimeres Glykoprotein findet man Fibronectin (FN) neben seiner gelösten Form in Körperflüssigkeiten (Blut) vor allem in Form ungelöster Fibrillen in Bindegewebe und auf Zelloberflächen. Gelöstes FN kann dabei auch ins Gewebe diffundieren und nachträglich in die ECM eingebaut werden (Moretti *et al.*, 2007). Dort besteht seine Hauptaufgabe darin, die Zelladhäsion zu vermitteln, und beeinflusst damit auch die Zellform und Organisation des Zytoskeletts adhärenter Zellen. Durch seine gradierte Verteilung während der Embryogenese ist es zudem an der gerichteten Zellmigration sowie der zellulären Differenzierung beteiligt. So findet man z.B. einen FN-Gradienten entlang des Weges, auf dem zukünftige Mesodermzellen während der Gastrulation in Amphibien wandern. Mit einer Länge von 130 nm und einer Breite von 2-3 nm (Engel *et al.*, 1981) stellt das FN ein großes, glykosyliertes Protein dar. Es ist als Dimer aus zwei ähnlichen Polypeptidketten aufgebaut, die an ihrem C-Terminus über zwei Disulfidbrücken verbunden sind. Jede Kette besteht wiederum aus etwa 29 - 31 Bindungsdomänen, die durch kurze Spacer-Sequenzen voneinander getrennt sind und die Interaktion mit einer Vielzahl anderer Moleküle wie Kollagen, Heparin oder Fibrin vermitteln (Leiss *et al.*, 2008). Um Signale aus der ECM an die Zelle weiterleiten zu können, müssen FN-Moleküle mit zellulären Oberflächenrezeptoren interagieren. Als minimale Erkennungssequenz für den wichtigsten, Zelladhäsion-vermittelnden FN-Rezeptor (Integrin $\alpha_5\beta_1$) dient hierbei die Aminosäuresequenz RGD in der zehnten FN-Domäne vom Typ III (FN III₁₀) (Pytela *et al.*, 1985). Durch eine weitere Sequenz (PHSRN) in der benachbarten Domäne FN III₉ wird diese Interaktion noch weiter verstärkt (Aota *et al.*, 1994; Nagai *et al.*, 1991; Ochsenhirt *et al.*, 2006). Damit wird eine optimale Verankerung der Zellen in der ECM gefördert. Die Kontaktstelle zwischen einem Multiadhäsionsmatrixprotein wie FN und z.B. transmembranen Integrin-Rezeptoren wird allgemein als Zell-Matrix-Kontakt bezeichnet.

1.3 Zell-Matrix-Kontakte (Integrine und ihre Adaptoren)

Zell-Matrix-Kontakte bilden die Schnittstelle zwischen den Proteinen der ECM und dem intrazellulären Zytoskelett der Zelle. Durch diese Schlüsselfunktion kommt ihnen bei der Zelladhäsion und -migration eine besondere Bedeutung zu. Zell-Matrix-Kontakte entstehen, wenn Oberflächenrezeptoren (Integrine) an ECM-Proteine binden. Integrine sind transmembrane Heterodimere und bilden, gebunden an ECM-Proteine, in der Zellmembran einen Glycoproteinkomplex aus, der Wechselwirkungen zwischen der ECM und dem Zytoskelett der Zelle vermittelt. Integrine bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Bisher kennt man 18 verschiedene α - sowie 8 unterschiedliche β -Untereinheiten, die sich zu 24 bis dato entdeckten Dimeren zusammenlagern können (Hynes, 2002). Jedes dieser Dimere zeigt dabei seine eigene Affinität für einen bestimmten Liganden. So sind für die spezifische Bindung des ECM-Moleküls FN vor allem das $\alpha_5\beta_1$ - und das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin von Bedeutung. Die Bindung von Integrinen an ECM-Proteine führt zu deren Aktivierung, anschließender Clusterbildung der Integrine und Rekrutierung einer Reihe von Proteinen, die für die Entstehung vollfunktionsfähiger Zell-Matrix-Kontakte wichtig sind. Die rekrutierten Proteine bilden zusammen mit der intrazellulären Domäne von Integrin einen Komplex aus bisher über 160 bekannten Proteinen (Geiger *et al.*, 2009). Unter diesen befinden sich neben Strukturproteinen und GTPasen vor allem Enzyme wie beispielsweise Kinasen, Lipasen, Proteasen und Phosphatasen (Geiger *et al.*, 2001; Wehrle-Haller und Imhof, 2002; Zaidel-Bar *et al.*, 2007; Zamir und Geiger, 2001). Zell-Matrix-Kontakte lassen sich in Zellen hinsichtlich ihrer Lokalisation, Morphologie, molekularen Zusammensetzung und Funktion in drei Klassen untergliedern: (1) Den Fokalkomplexen, (2) Fokalkontakten und (3) fibrillären Adhäsionen. Fokalkomplexe werden unter der Kontrolle der Rho GTPase Rac vorwiegend im Lamellipodium gebildet und weisen meist eine punktartige Morphologie auf. Sie bilden die kleinste Einheit von Zell-Matrix-Kontakten und sind in der Regel nur kurzlebig (Nobes und Hall, 1995; Ridley *et al.*, 2003; Zaidel-Bar *et al.*, 2004). Unter Einwirkung einer mechanischen Kraft von außen bzw. durch die Rho GTPase RhoA können Fokalkomplexe stabilisiert werden und zu Fokalkontakten reifen (Clark *et al.*, 1998; Rivelino *et al.*, 2001). Diese befinden sich in der Regel in der Peripherie der Zelle und sind in ihrer oft ovalen Struktur meist deutlich größer als Fokalkomplexe (Zamir *et al.*, 1999). Neben ihrer Form unterscheiden sich Fokalkomplexe und Fokalkontakte aber auch in ihrer Dynamik und Zusammensetzung. Während Fokalkomplexe in migrierenden Zellen relativ zum Substrat stationär verbleiben und somit als Ankerpunkte für migrierende Zellen dienen (Humphries *et al.*, 2004), können Fokalkontakte in migrierenden Zellen gleiten (Ballestrem *et al.*, 2001; Smilenov *et al.*, 1999). Dabei üben Fokalkontakte stärkere Kräfte auf das Substrat aus als Fokalkomplexe (Beningo *et al.*, 2001; Beningo und Wang, 2002; Juliano 2002). Obwohl noch keine exakten, quantitativen Unterschiede in der molekularen Organisation von Zell-Matrix-Kontakten vorliegt, enthalten Fokalkontakte vor allem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, zytoskelettassoziierte Proteine wie Paxillin und Vinculin und auch Signaltransduktionsmarker wie beispielsweise Phosphotyrosin (Zaidel *et al.*, 2003). Desweiteren beinhalten sie im Gegensatz zu den Fokalkomplexen noch Zyxin (Zaidel *et al.*, 2004) und Tensin (Cukierman *et al.*, 2002).

Anders als Fokalkomplexe und Fokalkontakte sind fibrilläre Adhäsionen vorwiegend im Zellzentrum zu finden. Ihren Namen verdanken sie dabei ihrem Auftreten entlang von FN-Fibrillen (Olski *et al.*, 2001; Zamir *et al.*, 1999). Sie sind in erster Linie an der FN-Sezernierung und der ECM-Fibrillogenese beteiligt (Katz *et al.*, 2000; Zaidel-bar *et al.*, 2004) und weisen die sonst für Fokalkontakte typischen Proteine wie Paxillin und Vinculin bzw. Signaltransduktionsmarker wie pFAK (*focal adhesion kinase*) nicht auf (Cukierman *et al.*, 2002).

Es bedarf einer strengen Regulation dieser Zell-Matrix-Kontakte, damit ein Signal aus der Umgebung gezielt in ein intrazelluläres Signal umgewandelt werden kann, auf welches die Zelle dann unter anderem mit der Reorganisation des Zytoskeletts reagiert.

1.3.1 Zytoskelett

Um ihre vielfältigen Aufgaben erfüllen zu können, müssen Zellen genau definierte Eigenschaften besitzen. Zu diesen gehören unter anderem die Ausbildung einer definierten Zellmorphologie, deren Stabilität, sowie intrazelluläre Transportvorgänge und die Zellmotilität. Gewährleistet werden diese Eigenschaften durch das Zytoskelett der Zelle, das aus Aktin-, Mikrotubuli- und Intermediärfilamenten aufgebaut ist (Lauffenburger und Horwitz, 1996). Diese bilden das Gerüst der Zelle und ermöglichen durch ihren dynamischen Auf- und Abbau eine schnelle und flexible Reaktion (bzw. Adaptation) auf eine sich ändernde Umgebung. Vor allem bei der Zellmigration spielt diese Dynamik eine große Rolle, da hier Aktin- wie auch Mikrotubulifilamente einer ständigen Reorganisation unterliegen (Watanabe *et al.*, 2005; Small *et al.*, 1999).

1.3.1.1 Aktin-Zytoskelett

Struktur und Dynamik

Aktinfilamente (F-Aktin) bestehen aus globulärem Aktinmonomer (G-Aktin) und repräsentieren mit einem Durchmesser von ca. 7 nm die dünnsten, filamentären Strukturen des Zytoskeletts. Sie unterliegen einem ständigen Auf- und Abbau und zeichnen sich dabei durch eine differente Polymerisierungs- und Depolymerisierungsgeschwindigkeit aus. Das so genannte „stumpfe“ Ende (barbed/Plus) verfügt hierbei über eine höhere Umbaurate als das so genannte „spitze“ Ende (pointed/Minus) (Pollard und Borisy, 2003). Um einen koordinierten, dynamischen Auf- und Abbau der Filamente zu gewährleisten wird zudem eine Fülle an Hilfsproteinen benötigt, welche die Filamente untereinander oder mit anderen Zellbestandteilen verknüpfen. Die Aktindynamik gewährleistet eine flexible Zellmorphologie und somit eine schnelle Adaptation an eine sich ändernde Umgebung. Durch einen zudem klar definierten Aufbau des Aktin-Zytoskeletts lassen sich komplexe Vorgänge wie beispielsweise die Zellmigration regulieren. Sie beruht auf strukturellen Unterschieden in der filamentösen Anordnung des Aktins, die im nachfolgenden Abschnitt genauer erläutert werden.

Organisationsformen des Aktin-Zytoskeletts

Aktinfilamente bilden unterschiedliche, übergeordnete Organisationsformen aus, die sich in uni- und bipolare Strukturen unterteilen lassen. Ein Überblick über diese Anordnung ist in **Abbildung 1.1** am Beispiel einer migrierenden Zelle gezeigt. Unipolare Strukturen enthalten dabei nur Filamente mit gleich orientierter Polarität und einem zur Zellperipherie (distal) gerichteten, schnell polymerisierenden Plusende. Zu solchen Strukturen zählen die Lamellipodien, Filopodien und die Mikrospikes (Small *et al.*, 1998) (**Abb. 1.1, blau**). Das Lamellipodium bildet als flach und breit angelegter Zellfortsatz das Vorderende einer polarisierten und migrierenden Zelle. Mit einer Höhe von 0,1 μm bis 0,2 μm und einer hohen Dichte fein verzweigter Aktinfilamente ermöglicht dieses kompakte Aktin-Netzwerk das nach vorne Schieben der Membran, was einzelnen Aktinfilamenten aufgrund ihrer Flexibilität nicht gelingen würde (Mogilner und Oster, 2003). Eine besonders bemerkenswerte Eigenschaft von Lamellipodien ist der retrograde Aktinfluss, der durch eine kontinuierliche, myosinabhängige Wanderung des Aktin-Netzwerks proximal zur Zellmitte hin definiert ist (Lin *et al.*, 1997) und die Vorwärtsbewegung der Zelle gewährleistet. Neben einer quervernetzten Anordnung können Aktinfilamente im Lamellipodium aber auch in parallelen Bündeln (0,15 μm) vorliegen. Ragen diese Aktinbündel aus dem Lamellipodium heraus, bezeichnet man sie als Filopodien. Sind sie jedoch in das Lamellipodium eingebettet, handelt es sich um so genannte Mikrospikes. Filopodien sind als fadenförmige Zellausstülpungen maßgeblich an der Erkundung der extrazellulären Umgebung beteiligt und obliegen dabei einem ständigen Auf- und Abbau.

Ein besonderes Kennzeichen unipolarer Aktinstrukturen besteht darin, dass sie sich ohne Verankerung am Substrat entwickeln und ausbilden können. Dies erklärt auch ihren äußerst dynamischen Charakter. Bipolare Aktinstrukturen hingegen benötigen die Verankerung im Substrat (Small *et al.*, 1999). Sie sind aus entgegengesetzt orientierten Aktinfilamenten aufgebaut und umfassen zusätzlich das Motorprotein Myosin II. Dies verleiht ihnen die Fähigkeit zur Kontraktion, wodurch Zugkräfte auf die Umgebung ausgeübt werden können. Zu den bipolaren Aktinstrukturen zählen die lamellaren Aktinbögen, die Aktinstressfasern und peripheren Aktinbündel (Small und Resch, 2005) (**Abb. 1.1, magenta**). Lamellare Aktinbögen verlaufen parallel zum Zellvorderende und sind je nach Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt (Heath *et al.*, 1993). Ihren Ursprung haben sie in der Basis des Lamellipodiums, von wo aus sie sich retrograd über die gesamte Zelle aufspannen und dabei entlang der Fließrichtung Filamentbündel mit entgegengesetzter Polarität ausbilden (Small *et al.*, 1996; Small *et al.*, 1998). In der Lamelle, die zwischen dem Lamellipodium und dem eigentlichen Zellkörper liegt (Ballestrem *et al.*, 1998), entsteht eine zweite Form bipolarer Strukturen, die so genannten Aktinstressfasern. Diese weisen eine stark reduzierte Polymerisierungsrate ihrer Aktinmonomere auf, die lediglich 10 % der Rate im Lamellipodium entspricht (Ponti *et al.*, 2004; Vallotton *et al.*, 2004). Nach heutiger Definition werden diese „kontraktilen Fasern“ als Bündel von 10-30 Aktinfilamenten mit alternierender Polarität verstanden (Cramer *et al.*, 1997). Sie entstehen durch Assemblierung kurzer Aktinbündel und bilden längere und kontraktile Strukturen (Hotulainen und Lappalainen, 2006). Aktinstressfasern können starke Zugkräfte entwickeln, mit deren Hilfe unter anderem die mechanische Stabilisierung stationärer Zellen, oder die Translokation des Zellkörpers während

der Zellmigration gewährleistet wird (Ballestrem *et al.*, 2000). In Fibroblasten gebildete Aktinstressfasern lassen sich je nach subzellulärer Lokalisation in drei Klassen unterteilen: (1) Ventrale und (2) dorsale Aktinstressfasern, sowie (3) transverse Aktinbögen (Small *et al.*, 1998). Am häufigsten sind dabei ventrale Aktinstressfasern vertreten, die an der Zellbasis zwischen zwei Zell-Matrix-Kontakten aufgespannt sind. Dort vermitteln sie unter anderem das Zurückziehen des Zellhinterendes (Chen *et al.*, 1981) während der Migration und wirken in der Peripherie zugleich der Membranspannung entgegen (Thery *et al.*, 2006). Dorsale Aktinstressfasern sind an einem Ende in Zellkontakten verankert, während das andere, ungebundene Ende im dorsalen Bereich der Zelle liegt. Im Gegensatz zu ventralen Aktinstressfasern und transversen Aktinbögen sind hier die α -Aktinin-Myosin-Moleküle nicht periodisch verteilt, sondern zeigen eine uniforme Polarität. Somit sind sie streng genommen nicht wirklich bipolar (Naumanen *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu den ventralen und dorsalen Aktinstressfasern sind transverse Aktinbögen in der Regel nicht in Zell-Matrix-Kontakten verankert (Hotulainen und Lappalainen, 2006), werden allerdings über dorsale Aktinstressfasern indirekt mit dem Substrat verbunden. Wie hier eine Kraftübertragung durch die Kontraktion erfolgt ist noch unklar. Unterstützung bei der Migration erhalten Aktinstressfasern von peripheren Aktinbündeln, die im hinteren Bereich der Zelle lokalisiert sind und senkrecht zur Bewegungsrichtung der Zelle verlaufen. Sie bewirken ebenfalls durch ihre Fähigkeit zur Kontraktion die Translokation des Zellkörpers (Anderson *et al.*, 1996; Svitkina *et al.*, 1997). Dazu bewirken sie das Lösen von Zell-Matrix-Kontakten am Zellhinterende, wodurch Dieses dem führenden Lamellipodium nachgezogen werden kann (Ridley *et al.*, 2003). Diese Prozesse zeigen, dass die Myosin II bedingte Kontraktilität des Zytoskeletts intrazelluläre Zugkräfte freisetzt, die für eine gerichtete Bewegung essentiell sind. Im folgenden Abschnitt wird daher näher auf die Funktionsweise von Myosin II und deren Assoziation mit dem Aktin-Zytoskelett eingegangen.

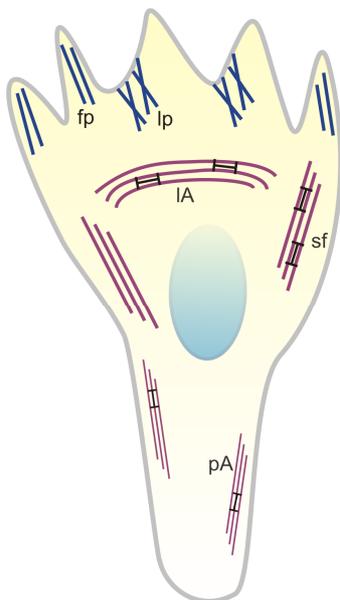


Abb. 1.1 Organisationsformen des Aktin-Zytoskeletts in migrierenden Zellen

Gezeigt sind die schematische Darstellung einer migrierenden Zelle und die verschiedenen Organisationsformen ihres Aktin-Zytoskeletts. Unipolare Strukturen (blau) enthalten dabei nur Aktinfilamente mit gleicher Polarität und einem zur Zellperipherie (distal) gerichteten, schnell polymerisierenden Plusende. Lamellipodien (lp), Filopodien (fp) und Mikrospikes werden durch unipolare Aktinstrukturen gebildet. Bipolare Strukturen (magenta) hingegen sind aus entgegengesetzt orientierten Aktinfilamenten aufgebaut und umfassen zusätzlich das Motorprotein Myosin II, das ihnen die Fähigkeit zur Kontraktion verleiht. Bipolare Aktinstrukturen sind die lamellaren Aktinbögen (IA), die Aktinstressfasern (sf) und die peripheren Aktinbündel (pA). Durch die Kombination von uni- und bipolaren Strukturen wird eine gerichtete Migration gewährleistet.

Intrazelluläre Kontraktilität

Myosine bilden eine Familie von mechanochemisch aktiven Motorproteinen, die sich entlang von Aktinfilamenten bewegen und dabei viele zelluläre Mechanismen wie beispielsweise den Proteintransport, die Exocytose, die Mitose und Zytokinese wie auch die Kontraktilität und die Migration von Zellen steuern (Bond *et al.*, 2011; Matsumura *et al.*, 2011; Krendel und Mooseker, 2005). Von den bisher insgesamt 24 bekannten Myosin Klassen (Foth *et al.*, 2006) stellt Myosin II das am häufigsten vorkommende Motorprotein dar und reguliert die Aktin-/Myosin Kontraktilität von Zellen. Diese Kontraktilität wird durch die bipolare Aneinanderlagerung von Myosin II Proteinen ermöglicht. Dabei dimerisieren zwei Myosin II Proteine [anhand der elektrostatischen Wechselwirkung ihrer C-terminalen coiled coil-Strukturen] (Hostetter *et al.*, 2004) und binden mit ihren N-terminalen Motordomänen jeweils an entgegengesetzt orientierte Aktinfilamente. Diese Bindung ist an einen Zyklus gekoppelt, bei dem die aus ATP-Bindung und Hydrolyse gewonnene Energie genutzt wird, um eine gerichtete Bewegung entlang der Aktinfilamente auszulösen (Querbrückenzyklus). Die Bewegung der beiden Myosine erfolgt dabei jeweils vom Minus- zum Plusende der Aktinfilamente, wodurch sie die beteiligten Aktinfilamente jeweils in die andere Richtung gegeneinander verschieben. Bei diesem Prozess entstehen hohe intrazelluläre Zugkräfte, die für eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie beispielsweise für die Zellmigration und Mechanotransduktion essentiell sind (Orr *et al.*, 2006). Für den Start einer gerichteten Bewegung muss die Zelle zuerst polarisieren. Dabei ermöglicht der Myosin II abhängige Aktinfluss die Ausrichtung des Zellkerns, in dem dieser wie auf Schienen an das Hinterende der Zelle gezogen wird (Gomes *et al.*, 2005). Gleichzeitig verhindert die Aktin-/ Myosin Kontraktilität die Ausbildung lateraler Membranausstülpungen (Van Haastert und Devreotes, 2004). Dies führt dazu, dass die Zelle auch morphologisch polarisiert wird. Um zusätzlich das Vorwärtstommen der Zelle zu gewährleisten, bewirken intrazelluläre Zugkräfte die Translokation des Zellkörpers bei gleichzeitigem Ablösen der Zell-Matrix-Kontakte am Hinterende der Zelle (Ridley *et al.*, 2003). Neueren Studien zufolge spielen kontraktionsabhängige Kräfte auch eine maßgebende Rolle bei der Ausbildung der Zellfront in migrierenden Zellen (Gupton und Waterman- Storer, 2006; Ponti *et al.*, 2004). Alles in allem stellen die durch das Aktin-/Myosin Zytoskelett erzeugten, intrazellulären Zugkräfte einen wesentlichen Bestandteil der Zellmigration dar und übernehmen wichtige richtungsweisende Funktionen. Aus diesem Grund müssen intrazelluläre Zugkräfte streng reguliert werden. Dabei spielt das Mikrotubuli-Netzwerk eine entscheidende Rolle (Danowski, 1989) und steht in direktem Antagonismus zur Aktin-/Myosin Kontraktilität, da eine Reduktion der Mikrotubulifilamente zu einer erhöhten Zugkraftentwicklung führt (Rape *et al.*, 2012).

1.3.1.2 Mikrotubuli-Netzwerk

Neben den Aktinfilamenten bilden die Mikrotubulifilamente einen weiteren Hauptbestandteil des Zytoskeletts. Mikrotubulifilamente übernehmen dabei wichtige Funktionen bei der Positionierung von Zellorganellen, dem intrazellulären Vesikeltransport sowie bei der Zellpolarisierung und Zellmigration (Forges *et al.*, 2011; Kaverina und Straube 2011). Mit ihrer hohlen, röhrenförmigen Struktur und einem Durchmesser von nahezu 25 nm sind sie die stärksten Gerüstelemente des Zell-Zytoskeletts. Dabei setzt sich ein Mikrotubulus aus 13 Protofilamenten zusammen, die jeweils aus alternierend aneinandergelagerten α - und β -Tubulinmonomeren (= α/β Heterodimer) aufgebaut sind. Durch ihren parallelen Verlauf entlang der Längsachse der Zelle und der immer wiederkehrenden, gleichen α/β -Ausrichtung erhält jedes Mikrotubulifilament eine strukturelle Polarität. Diese zeichnet sich durch ein zur Zellmembran hin gerichtetes, schnell polymerisierendes, dynamisches Plusende und ein im Zentrosom - nahe dem Zellkern - verankertes, nur langsam wachsendes Minusende aus (Mandelkow und Mandelkow, 1995; Alberts *et al.*, 2008) (**Abb. 1.2**). Das Zentrosom (*microtubule-organizing center* = MTOC) bildet hierbei mit seinen γ -Tubulin Ringkomplexen (γ TuRC) den Nukleationspunkt auswachsender Mikrotubulifilamente (Oakley und Oakley, 1989; Oakley und Akkari, 1999) und sorgt durch das so genannte Capping der Minusenden zusätzlich für eine Stabilisierung der Mikrotubulifilamente (Wiese und Zheng, 2000). An diesem Nukleationspunkt findet keine Polymerisierung der Mikrotubulifilamente statt (Dammermann *et al.*, 2003). Entgegen der gängigen Ansicht, dass alle Mikrotubulifilamente dem Zentrosom entspringen, zeigten Efimov *et al.* 2007 erstmals, dass knapp 50 % ihren Ursprung im Golgi-Apparat der Zelle haben. Der Golgi-Apparat einer Zelle besteht aus Stapeln von Zisternen und zahlreichen Vesikeln, die einen gerichteten An- und Abtransport verschiedener Moleküle ermöglichen. Hierbei werden Sekretprodukte aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) aufgenommen und anschließend weiterverarbeitet. Funktionell liegt der Golgi-Apparat somit am Endpunkt der Protein- und Lipidproduktion, wobei seine Hauptaufgaben aus deren Glycosilierung, dem vesikulären Abtransport für die Exocytose (Sekretion) sowie dem lysosomalen Abbau bestehen. Neben den γ -Tubulinen spielen bei der Golgi-vermittelten Mikrotubulientstehung auch CLASP Proteine eine wichtige Rolle, die als Mikrotubuli-bindende Proteine das Gerüst für die Mikrotubulinukleation bilden. Mikrotubuli, die dem Golgi-Apparat entspringen, weisen in über 90 % aller Fälle in Richtung der Zellfront und sorgen somit für eine schnelle und gerichtete Versorgung der Migrationsfront mit neuen Membranbausteinen. Darüber hinaus sind sie auch an der Organisation und Stabilisierung des Golgi-Apparates beteiligt (Miller *et al.*, 2009).

Wie erwähnt befindet sich der Golgi-Apparat in unmittelbarer Nähe zum Nukleus und steht in engem Kontakt mit dem Zentrosom (Kupfer *et al.*, 1982; Sütterlin und Colanzi, 2010). Der Golgi-Apparat liegt wie das Zentrosom in migrierenden Zellen in der Regel zwischen Nukleus und Zellvorderende. Vom Zentrosom und Golgi-Apparat aus ziehen die Mikrotubulifilamente radiärsymmetrisch bis zur Zellmembran und legen dabei grob die Zellform fest. Hierbei münden mehr Mikrotubulifilamente am Zellvorder- als am Zellhinterende, wodurch eine schnelle Versorgung der dynamischen Migrationsfront mit neuen Membranbausteinen gewährleistet wird (Bergmann *et al.*, 1983; Prigozinha und Waterman-Storer, 2004; Schmoranzler *et al.*, 2003). Die Zellform obliegt während zahlreichen, biologischen Prozessen

wie beispielsweise der Zellpolarisierung und -migration ständigen Veränderungen, und ist daher auf einen raschen Auf- und Abbau der Mikrotubuli Plusenden an der Zellmembran angewiesen. Dieser schnelle Wechsel zwischen Wachstums- und Schrumpfphase von Mikrotubulifilamenten wird auch als dynamische Instabilität bezeichnet (Kirschner und Mitchison, 1986; Howard *et al.*, 2009). Die dynamische Instabilität beruht auf den strukturellen Unterschieden der beiden α - und β - Tubulinuntereinheiten, sowie der Assoziation und Regulierung durch zahlreiche MAPs (*microtubule-associated proteins*) und +TIPs (*plus-end tracking proteins*). MAPs wie beispielsweise CLASP sorgen hierbei für eine stringente Kontrolle der Dynamik und der Nukleation von Mikrotubulifilamenten, während TIPs wie z.B. EB3 deren Stabilisierung in der Zellperipherie ermöglichen. Neben einer Regulation durch mikrotubuliassoziierende Proteine können Mikrotubulifilamente auch noch posttranslational modifiziert werden. Die bekanntesten Modifikationen sind die Acetylierung und Detyrosinierung der α - beziehungsweise die Polyglutamylierung und Polyglycosylierung der α - und β -Mikrotubulinuntereinheiten. Die Acetylierung und Detyrosinierung treten vorzugsweise an stabilen, langlebigen Mikrotubulifilamenten auf und können in ihrer Funktionalität untereinander gleichgesetzt werden (Hammond, 2010; Palazzo, 2003; Webster *et al.*, 1987). So schützen sie die Mikrotubulifilamente vor Depolymerisierung und ermöglichen dadurch deren Stabilität (Matov *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2007). Darüberhinaus scheinen sie einen für Motorproteine lesbaren „barcode“ zu besitzen und spielen damit für die Koordination des Vesikeltransports in der Zelle eine große Rolle (Cai *et al.*, 2009; Reed *et al.*, 2006; Verhey und Hammond, 2009). So konnte z.B. für Kinesin-1 eine erhöhte Präferenz für acetylierte Mikrotubulifilamente gezeigt werden (Hammond *et al.*, 2010; Reed, 2006). Kinesine gehören zusammen mit den Dyneinen zur Familie der Motorproteine und bewegen sich entlang von Mikrotubulifilamenten. Beide gewährleisten den aktiven Vesikeltransport, indem Kinesine vom Innern der Zelle in die Peripherie (anterograd) und Dyneine von der Peripherie ins Zellinnere

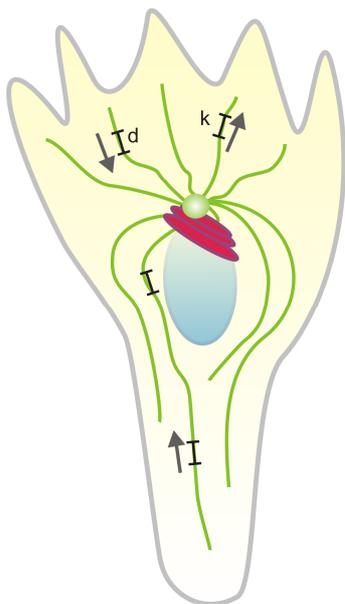


Abb. 1.2 Mikrotubuli-Organisation in migrierenden Zellen

Gezeigt sind die schematische Darstellung einer migrierenden Zelle und die Organisation ihres Mikrotubuli-Netzwerks. Mikrotubulifilamente (grün) haben ihren Nukleationspunkt im Zentrosom (grüner Punkt). In migrierenden Zellen liegen das Zentrosom und der Golgi-Apparat (rot) in der Regel zwischen Nukleus (blau) und Zellvorderende. Von hier ziehen die Mikrotubulifilamente radiärsymmetrisch bis zur Zellmembran, wobei mehr Mikrotubulifilamente vorne als hinten münden. Durch diese Organisation wird eine schnelle und gezielte Versorgung der dynamischen Migrationsfront mit neuen Membranbausteinen und anderen niedermolekularen Substanzen ermöglicht. Diese Versorgung erfolgt in erster Linie durch den gerichteten Vesikeltransport, der von den beiden Motorproteinen Kinesin (k) und Dynein (d) geregelt wird. Diese Motorproteine bewegen sich entlang von Mikrotubulifilamenten, wobei Kinesine den aktiven Transport vom Innern der Zelle in die Peripherie (anterograd) und Dyneine von der Peripherie ins Zellinnere (retrograd) vermitteln.

(retrograd) wandern. Dieser gerichtete Transport ist vor allem während der Zellmigration von großer Bedeutung, da das Lamellipodium für seine Vorwärtsbewegung ständig neue Membrankomponenten benötigt, während Membranbausteine am Hinterende der Zelle entfernt werden müssen. Darüberhinaus werden eine Reihe von Signalstoffen in die Peripherie versendet, die dort die Aktivität anderer Zielmoleküle, wie die der kleinen Rho GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 regulieren.

Neben einer direkten Wirkung auf die kleinen Rho GTPasen vermitteln Mikrotubulifilamente auch den Umsatz von Fokaladhäsionen. Hierfür werden sie vermutlich mit Hilfe von bestimmten Linkerproteinen, wie beispielsweise dem Spektraplaklin ACF7, an Aktinfilamente gekoppelt und finden somit den Weg zu den Fokalkontakten, deren Abbau sie gezielt einleiten (Wu *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011). Dies geschieht einerseits durch Dynamin- oder Clathrin-abhängige Endocytose, andererseits durch die Aktivierung von GTP-aktivierenden Proteinen (*guanine nucleotide exchange factors* = GEFs) wie z.B. TIAM2 (Rooney *et al.*, 2010).

Die Mikrotubulifilamente regulieren Mechanismen in der Zelle, die für eine koordinierte Migration notwendig sind und stellen damit essentielle Strukturen dar.

1.4 Zellmigration

Die Zellmigration ist ein elementarer Prozess adhärent wachsender Zellen und spielt unter anderem eine wichtige Rolle während der Morphogenese und der Regeneration. Generell kann sie in eine ungerichtete, spontane (*random migration*) oder eine gerichtete Bewegung unterteilt werden. Viele verschiedene Vorgänge in multizellulären Organismen beruhen auf einer gerichteten Migration. Dazu gehört unter anderem die Wanderung von Neuronen während der Embryogenese, die Bewegung von Fibroblasten während der Wundheilung oder von Immunzellen während der Immunantwort. Die gerichtete Migration kann durch eine Vielzahl extrazellulärer Signale aus der ECM und dem umgebenden Medium spezifisch und gezielt ausgelöst werden. Diese Signale liegen meist in einer gradierten Verteilung vor und übermitteln dadurch den Zellen wichtige positionelle und direktionale Informationen. Die bekanntesten Mechanismen, die durch externe Signale gesteuert werden und somit die Fortbewegungsrichtung beeinflussen können, sind die Durotaxis, die Chemotaxis und die Haptotaxis (Kim und Peyton, 2012) (**Abb. 1.3**). So zeigten Chun-Min Lo *et al.* im Jahre 2000, dass Fibroblasten einen Gradienten aus unterschiedlicher Steifigkeit erkennen und vorzugsweise in Richtung der steiferen Matrix wandern. Dieser Mechanismus wird als Durotaxis bezeichnet und verdeutlicht, dass nicht nur biochemische, sondern auch physikalische Eigenschaften der Umgebung eine direkte Wirkung auf die Zellmigration haben können. Zusätzlich kann die Steifigkeit des Substrates auch die Morphologie und Polarisierung von Zellen beeinflussen (Prager-Khoutorsky *et al.*, 2011).

Ein weiteres Beispiel der gerichteten Migration ist die Chemotaxis. Hierbei liegt ein löslicher Konzentrationsgradient eines Signalstoffes vor, der über spezifische Rezeptoren in der Membran detektiert und in ein intrazelluläres Signal übermittelt wird. Dieser hoch komplexe Mechanismus wurde bisher vor allem in zwei eukaryotischen Zellsystemen, dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* und den humanen Neutrophilen, eingehend untersucht und ist mittlerweile sehr gut verstanden. Die Membranrezeptoren (z.B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren), mit der die Zellen die löslichen Signalstoffe erkennen, sind uniform über die Zelle verteilt. Durch die räumlich und zeitlich regulierte Amplifikation von intrazellulären Signalmolekülen entsteht eine asymmetrische Verteilung zytoskelettaler Filamente, die in einer gerichteten Migration resultiert (Cai und Devreotes, 2011). Ein weiteres Beispiel für die Chemotaxis ist der Wundheilungsprozess. Hierbei werden an der Wundstelle eine Reihe von Signalstoffen, unter anderem der Wachstumsfaktor PDGF (*platelet-derived growth factor*) freigesetzt, die in das umliegende, gesunde Gewebe diffundieren und dort einen Konzentrationsgradienten ausbilden. Dieser wird von Fibroblasten und Makrophagen erkannt, die daraufhin in die Wunde einwandern, das verletzte Gewebe reparieren und somit die Wunde wieder schließen (Deuel und Kawahara, 1991). Neben einer richtungsweisenden Information durch chemische, lösliche Signalstoffe, können auch adhäsive Proteingradienten eine gerichtete Migration auslösen. Dieser Mechanismus wird als Haptotaxis bezeichnet und wurde erstmals in den sechziger Jahren beschrieben (Carter, 1965). Adhäsive Proteingradienten spielen eine wichtige Rolle in Entwicklungsprozessen wie beispielsweise der Angio- oder Axogenese. Daneben sind sie auch an zahlreichen, pathologischen Prozessen wie z.B. der Metastasierung beteiligt.

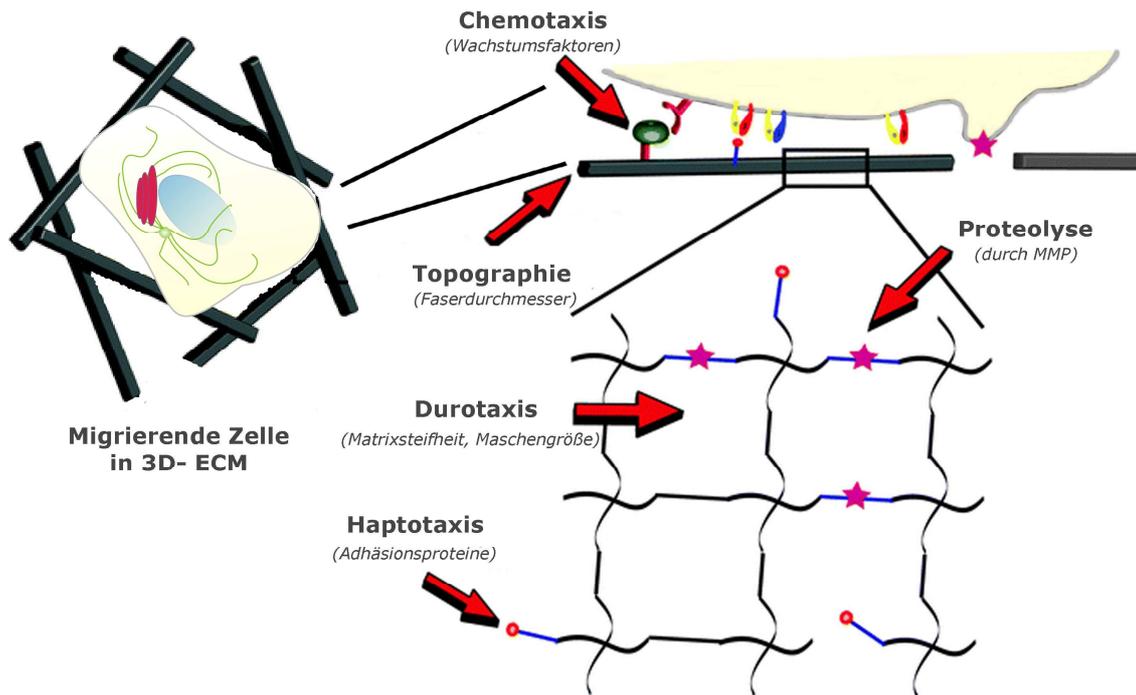


Abb. 1.3 Zellmigrationsprozesse in vivo

Die gerichtete Zellmigration wird *in vivo* durch eine Vielzahl an Signalen aus der extrazellulären Matrix (ECM) und dem umgebenden Medium spezifisch und gezielt ausgelöst. Meist liegen diese Signale in einer gradierten Verteilung vor und übermitteln hierdurch wichtige positionelle und directionale Informationen für die Zelle. Die bekanntesten Vertreter sind lösliche Wachstumsfaktoren (Chemotaxis), die Matrixsteifheit (Durotaxis) und substratgebundene Adhäsionsproteine (Haptotaxis). Daneben spielt auch die Topographie der ECM eine Rolle. Um sich gezielt innerhalb eines dreidimensionalen ECM-Maschennetzwerkes bewegen zu können, müssen Zellen darüber hinaus das Fasergeflecht mithilfe von Matrixmetalloproteinasen (MMP) degradieren können. Modifiziert nach Kim und Peyton, 2012

Aufgrund unzureichender *in vitro* Systeme sind sie allerdings im Gegensatz zur Chemotaxis noch weitestgehend unerforscht. [In **Kapitel 1.7** wird näher auf den Mechanismus der Haptotaxis eingegangen und die bislang vorliegenden Erkenntnisse aus der Literatur aufgeführt.]

Unabhängig von der Art des extrazellulären Signals durchlaufen Zellen während ihrer Migration mehrere Phasen, die sich grob in vier Stadien einteilen lassen. Zu Beginn ihrer Wanderung bildet die Zelle an ihrem Vorderende ein Lamellipodium aus. Um eine ausreichende Verankerung am Substrat zu gewähren, generiert sie dazu neue Zell-Matrix-Kontakte. Anschließend erfolgt die Translokation des Zellkörpers Richtung Leitsaum der Zelle. In der letzten Phase werden die Substratverankerungen am Zellhinterende abgelöst, wodurch der Zellkörper dem führenden Lamellipodium nachgeschoben werden kann. Die richtige Abfolge der Phasen und damit die Migration erfordern eine strenge Kontrolle. Grundvoraussetzung ist dabei eine Polarisierung der Zelle.

1.5 Zellpolarisierung als Grundlage der Zellmigration

Damit eine Zelle gerichtet wandern kann, bedarf es einer asymmetrischen Organisation intrazellulärer Komponenten. Diese Asymmetrie wird als Polarisation bezeichnet und umfasst zum einen intrazelluläre Signal- und Adhäsionsmoleküle und zum anderen das Zell-Zytoskelett mit seinen Aktin- und Mikrotubulifilamenten. Darüber hinaus ist die Relokalisierung des Zentrosoms, des Golgi-Apparates und des Nukleus eine weitere wichtige Voraussetzung für die Zellpolarisierung und somit für die gerichtete Zellmigration. Auch morphologisch lässt sich die Polarisation erkennen. So bilden migrierende Zellen ein definiertes Vorder- und Hinterende aus (**Abb. 1.4**) (Ridley *et al.*, 2003). In der Front migrierender Zellen entwickelt sich dabei eine protrusive Kraft, die durch das Ausstrecken eines (oder mehrerer) Lamellipodien und der damit verbundenen Ausbildung neuer Fokalkomplexe ausgelöst wird. Während der Großteil des Zytoplasmas im Zellkörper nach vorne fließt, bleibt die Zelle weiterhin über Fokalkontakte am Hinterende mit dem Substrat verankert. Hat die Zelle im Lamellipodium neue Fokalkomplexe ausgebildet und weiter verstärkt (Überführung in Fokalkontakte), werden durch Kontraktion des Aktin-/Myosin-Zytoskeletts die Verankerungen am Hinterende aufgelöst und somit das Nachschieben des Zellkörpers hinter dem führenden Lamellipodium ermöglicht (Ridley *et al.*, 2003). Die polarisierte Organisation des Aktin-Zytoskeletts stellt durch die Vermittlung sowohl von Protrusion („Vorschieben des Zellvorderendes“) als auch von Zellkontraktion die treibende Kraft während der Zellmigration dar.

Wie bereits zu Beginn des Kapitels erwähnt, spielt während der Zellpolarisierung auch die Relokalisierung des Zentrosoms und des Golgi-Apparates eine entscheidende Rolle. Hierbei werden die beiden Kompartimente in der Regel zwischen Nukleus und Vorderende der Zelle positioniert (**Abb. 1.4 B**). Zusammen mit einer selektiven Stabilisierung von Mikrotubulifilamenten am Zellvorderende ermöglicht diese Golgi- und Zentrosomen-Lokalisation eine schnelle und gezielte Versorgung der dynamischen Zellmigrationsfront mit neuen Membranbausteinen, transmembranen Proteinen und anderen wichtigen niedermolekularen Substanzen (Bergmann *et al.*, 1983; Prigozinja und Waterman-Storer, 2004; Schmoranzler *et al.*, 2003). Bereits im Jahre 1885 postulierte Van Beneden, dass die Polaritätsachse einer Zelle mithilfe einer Geraden durch den Mittelpunkt des Nukleus und des Zentrosoms definiert werden kann (*Nuclear centrosomal axis* = NC-Achse) (Van Beneden 1883; Wilson 1900). Diese NC-Achse steht im Einklang mit der morphologischen Polarisation vieler Zelltypen und ist somit für deren Entwicklung und Aufrechterhaltung von großer Bedeutung (Li und Gundersen, 2008). Entgegen der gängigen Lehrbuchmeinung, dass sich das Zentrosom und der Golgi-Apparat vorzugsweise zwischen Nukleus und Zellvorderende (*uphill*) befinden, existieren einige zelltypspezifische Beispiele, die eine Lokalisation zwischen Nukleus und Zellhinterende (*downhill*) oder eine zufällige Organisation (*random*) belegen (**Tab. 1.1**, modifiziert nach Luxton und Gundersen, 2011). Die Gründe hierfür sind noch nicht genau erforscht und hängen nicht nur von der Verteilung und korrekten Zusammenführung der Golgi-Membranen ab (Hehnlly *et al.*, 2010). So zeigen z.B. stark motile Zellen wie T-Lymphozyten (Gudima *et al.*, 1988) oder humane Neutrophile im Gegensatz zu weniger motilen Zellen eine downhill Lokalisation ihres Zentrosoms und Golgi-Apparates

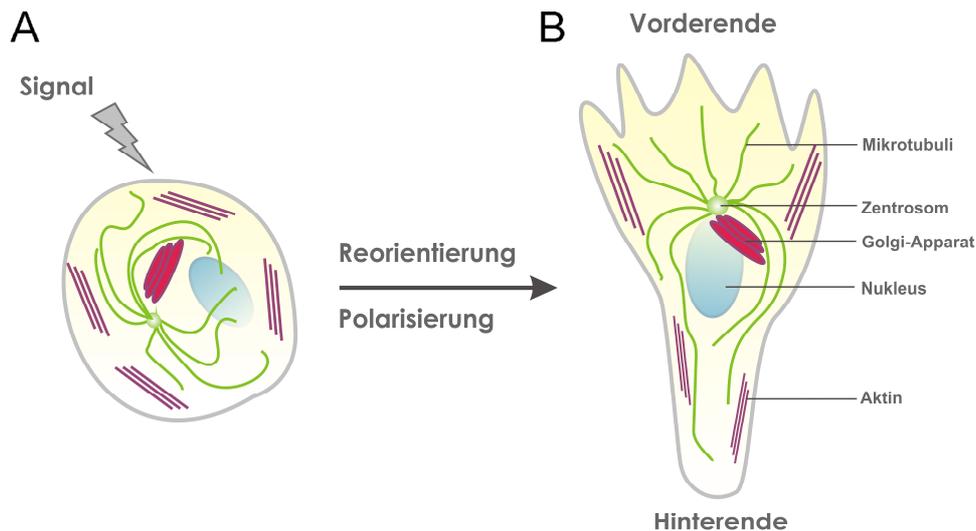
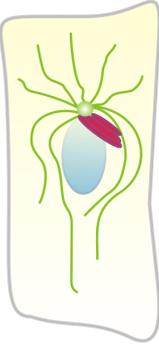
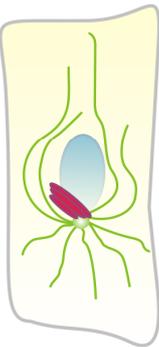


Abb. 1.4 Zellpolarisierung

Schematische Darstellung der Zellpolarisierung zu Beginn der Migration. **(A)** Bei einer statischen, unpolarierten Zelle sind die intrazellulären Komponenten wie der Nukleus (blau), das Zentrosom (grüner Punkt) sowie der Golgi-Apparat (rot) willkürlich verteilt. Auch morphologisch weist die Zelle keinerlei Vorzugsrichtung auf. Erhält die Zelle über ein externes Signal eine richtungsweisende Information, **(B)** bildet sie ein klar voneinander abgegrenztes Vorder- und Hinterende aus. Dabei lokalisiert sie für gewöhnlich das Zentrosom und den Golgi-Apparat zwischen Nukleus und Zellvorderende, während die Mikrotubulifilamente (grün) stabilisiert werden. Diese Organisation ermöglicht eine schnelle und gezielte Versorgung der dynamischen Migrationsfront mit neuen Membranbausteinen.

(Serrador *et al.*, 1999). Ein möglicher Grund hierfür könnte das fehlende Ausbilden eines flächigen Lamellipodiums sein, das beispielsweise bei Zellen auf zweidimensionalen Substraten zu beobachten ist. Neben der Zellmotilität spielt aber auch die Zellumgebung bei der Ausrichtung des Zentrosoms eine entscheidende Rolle. Während Zellen im Wundheilungsassay oder auf zweidimensionalen Substraten bevorzugt ihr Zentrosom zwischen Nukleus und Migrationsfront orientieren, weisen Zellen in dreidimensionalen ECM-Gelen eine downhill Lokalisation auf (Schütze *et al.*, 1991; Doyle *et al.*, 2009). Studien auf mikrostrukturierten Substraten zeigen zudem eine starke geometrische Limitation der Zellpolarisierung (Hale *et al.*, 2012). Migrieren Zellen auf schmalen (6 μm) mit Fibronektin beschichteten Linien, reorientieren sie ihren Golgi-Apparat in 70 % aller Fälle zwischen Nukleus und Zellhinterende. Erst ab einer Breite von etwa 40 μm positionieren die meisten Zellen ihren Golgi-Apparat wieder vor den Nukleus in Migrationsrichtung (Pouthas *et al.*, 2008). Neben der Zellmotilität und der Zellumgebung spielt auch der Zelltyp an sich eine Rolle. So konnten Yvon *et al.* 2002 zeigen, dass bei der Wund-induzierten Migration verschiedene Zelltypen ihr Zentrosom unterschiedlich ausrichten. Einen Überblick aus der Literatur bezüglich der unterschiedlichen Orientierung der NC-Achsen in migrierenden Zellen liefert **Tabelle 1.1**. Für eine gerichtete Zellmigration und -polarisierung müssen somit viele Prozesse, insbesondere die Reorganisation des Zytoskeletts mit seinen Aktin- und Mikrotubulifilamenten (Goode *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2003), sowie die Reorientierung von Zentrosom und Golgi-Apparat in der Zelle streng koordiniert werden. An dieser Regulation ist in erster Linie die Familie der kleinen Rho GTPasen beteiligt.

Tab. 1.1 Unterschiedliche Orientierung der Nukleus-Zentrosomen Achse (NC-Achse) in migrierenden Zellen (modifiziert nach Luxton und Gundersen, 2011)

Orientierung	Zelltyp	Quelle	Substrat	Referenz
uphill 	Astrocyten	Ratte	2D Glas	Etienne-Manneville 2001
	Dictyostelium discoideum	cAMP	2D Agarplatten	Sameshima 1988
	Endothelzellen	Rinderherz	2D Glas	Gotlieb 1981, Coan 1993
	Eosinophile	Newt	2D Glas	Koonce 1984
	Epithelzellen	RPE1, BSC-1	2D Glas, 2D mikrostrukturiert	Yvon 2002, They 2006, Euteneuer 1992, Goncalves 2010, Wong 1988,
	Fibroblasten	NIH3T3, COS7, CHO, NRK, Maus-/Huhn embryonal, Mensch	2D Glas	Kupfer 1982, Gundersen 1988, Schutze 1991, Albrecht-Buehler 1979, Ang 2010, Singer 1986
	Makrophagen	Maus	2D Glas	Gudima 1988, Nemere 1985
downhill 	Dictyostelium discoideum	Chemotaxis	2D Agarplatten	Sameshima 1988
	Epithelzellen	Ptk, BSC-1	2D Glas, 1D Linien	Yvon 2002, Pouthas 2008, Danowski 2001
	Mesenchymal zellen	Seeigel	entwickelnder Embryo	Anstrom 1988
	Lymphozyten	Mensch	2D Glas, 3D Kollagengel /Matrigel	Nemere 1985, Ratner 1997, Verschueren 1991
	Nat. Killerzellen	Maus	2D Glas	Kupfer 1983
Sensorisches Primordium	Zebrafisch	entwickelnder Embryo	Pouthas 2008	
variierend 	Fibroblasten	Huhn embryonal	3D Kollagengel 2,5D	Schutze 1991
	Neurone	Zebrafisch	entwickelnder Embryo	Distel 2010
	Neutrophile	Mensch	2D Glas	Chiplonkar 1992

1.6 Rho GTPasen -

Schlüsselkomponenten der Zellpolarisierung und -migration

Wichtige molekulare Schalter in der Zelle sind die Rho GTPasen, die als Mitglieder der Ras-Superfamilie in sechs Unterfamilien unterteilt werden können (Wennerberg und Der, 2004). Rho GTPasen dienen als Regulatoren des Aktin- bzw. Mikrotubuli-Zytoskeletts und beeinflussen somit direkt die Zellmorphologie und Zelladhäsion, die Endo- und Exozytose sowie die Zellmigration (Harris und Tepass, 2010; Etienne-Manneville und Hall, 2002; Sit und Manser, 2011). Darüber hinaus sind sie auch an der Transkription, dem Zellzyklus und der Zelldifferenzierung beteiligt (Van Aelst und D`Souza-Schorey, 1997).

Um komplexe, zelluläre Vorgänge koordiniert steuern zu können, unterliegen Rho GTPasen selbst einer strengen Regulation (Guilluy *et al.*, 2011). Diese Regulation erfolgt über die Bindung von Nukleotiden (GTP/GDP) durch die Rho GTPasen. Hierbei wechseln die Rho GTPasen zwischen einer GTP-gebundenen, aktiven und einer GDP-beladenen, inaktiven Form. In ihrem aktiven Zustand sind die Rho GTPasen über GPI-Anker in der Membran gekoppelt, während sie in ihrer inaktiven Form im Zytoplasma lokalisiert sind (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Van Aelst und D`Souza-Schorey, 1997). Dieser Wechsel zwischen Aktiv und Inaktiv ermöglicht eine räumlich wie auch zeitlich getrennte Aktivierung von Rho GTPasen. Allerdings sind dafür interagierende Proteine nötig, die die Rho GTPasen Aktivierung modulieren. Die bekanntesten Modulatoren sind hierbei die GEFs (*guanine nucleotide exchange factors*), GAPs (*GTPase-activating proteins*), GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) und GDFs (*GDI displacement factors*) (Guilluy *et al.*, 2011). GEFs aktivieren Rho GTPasen, indem sie deren Regulationsaustausch von GDP zu gebundenem GTP stimulieren (Sander *et al.*, 1999). In dieser GTP-gebundenen Form ist die Bindungsaffinität von Rho GTPasen zu ihren Effektoren, wie beispielsweise Proteinkinasen, erhöht und ermöglicht somit eine gezielte Signalweiterleitung (Ridley *et al.*, 2003; Zhao und Manser, 2005). Durch GAPs lässt sich dieser Prozess rückgängig machen, indem durch Stimulation der intrinsischen GTP-Hydrolyse wieder GDP entsteht und die Rho GTPasen somit inaktiviert werden (Sander *et al.*, 1999). Eine andere Art der Modulation stellen GDIs dar (Mata *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu GEFs und GAPs, denen nur eine Funktion bei der Regulation von Rho GTPasen (GTP- vs. GDP-Austausch) zugesprochen werden kann, besitzen GDIs mindestens drei weitere Möglichkeiten zur Inhibition von Rho GTPasen. So binden und komplexieren sie sowohl die inaktiven, GDP-gebundenen als auch die aktiven, GTP-gebundenen Rho GTPasen und verhindern somit im ersten Falle eine Dissoziation des GDPs, während sie im zweiten Falle durch Maskierung von Bindungsstellen eine Interaktion mit den Effektoren der Rho GTPasen blockieren. Die dritte Variante der Inhibition besteht in einer gezielten Freisetzung der Rho GTPasen aus der Membran und somit in einer Akkumulation inaktiver Rho GTPasen im Zytoplasma (Dransart *et al.*, 2005). Damit diese nun wieder aktiviert werden können, müssen sie an die Zellmembran transportiert werden, wo eine Dissoziation des GDI-GTPase-Komplexes stattfindet. Dieser regulatorische Schritt der Dissoziation kann durch GDFs vermittelt werden, zu denen unter anderem auch Integrine und Tyrosinkinasen wie beispielsweise Etk gehören (del Pozo *et al.*, 2002). Nach ihrer Aktivierung sind die Rho GTPasen in der Lage spezifisch mit ihren Effektoren zu interagieren und können komplexe Signalkaskaden regulieren (Ridley, 2001; Wennerberg und Der, 2004). Bei den Effektoren handelt es sich in erster Linie um

Enzyme wie beispielsweise Proteinkinasen, Lipidkinasen oder Phospholipasen. Innerhalb der Familie der kleinen Rho GTPasen stellen RhoA, Rac1 und Cdc42 die wichtigsten Vertreter dar. Eine ihrer charakteristischen Eigenschaften ist hierbei die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, wodurch sie maßgeblich die Zellmorphologie, Zellpolarisierung und Zellmigration beeinflussen (Hall 1998; Heasman und Ridley 2008; Schmitz *et al.* 2000). Um eine gerichtete Bewegung ausüben zu können, müssen Zellen polarisieren (Kap. 1.5). Diese Polarisation wird durch unterschiedliche, molekulare Prozesse am Vorder- und Hinterende der Zelle ermöglicht und umfasst einerseits die Bildung einer aktinreichen Zellfront, andererseits die Reorganisation des Mikrotubuli-Netzwerks und die Relokalisierung des Zentrosoms und des Golgi-Apparats. Dabei reguliert die Rho GTPase Rac1 die Aktinpolymerisierung an der Zellfront und induziert dadurch die Ausbildung von Lamellipodien. Sie wird unter anderem von den beiden GEFs TIAM1 und TIAM2 aktiviert, die mit Hilfe des Motorproteins Kinesin entlang der Mikrotubulifilamente an das Zellvorderende transportiert werden (Montenegro-Venegas *et al.*, 2010; Rooney *et al.*, 2010). RhoA hingegen vermittelt durch Stimulation der Aktin-/Myosin Kontraktilität und einer daraus resultierenden Aktinstressfaserbildung die Retraktion des Zellhinterendes (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Small *et al.*, 1999; Van Aelst und D`Souza-Schorey, 1997; Wennerberg und Der, 2004). Dadurch kann das Zellhinterende der Zellfront nachgezogen werden und erlaubt somit eine gerichtete Migration. Neben seinen regulatorischen Funktionen am Zellhinterende bewirkt RhoA auch die gezielte Aktinpolymerisierung am Frontsaum, wodurch die Membranstülpung der Zelle gewährleistet wird (Machacek *et al.*, 2009). Die Aktivierung der Rho GTPase RhoA kann ebenfalls wie bei Rac1 durch Mikrotubulifilamente erfolgen. So binden Mikrotubulifilamente den GEF-H1, der nach der Mikrotubuli-Depolymerisierung freigesetzt wird und dadurch RhoA aktivieren kann (Nalbant *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2008; Krendel *et al.*, 2002). Die Rho GTPase Cdc 42 ist am Vorderende der Zelle maßgeblich an der Ausbildung von Filopodien und früher Zell-Matrix-Kontakte (Fokalkomplexe) beteiligt. Zusammen mit Rac1 ermöglicht sie durch die Regulation von Zelladhäsionen das Vorwärtsgleiten der Zelle (Machacek *et al.*, 2009). Darüber hinaus spielt Cdc42 auch für die Zellpolarisierung eine wichtige Rolle (Wu *et al.* 2007). Hierbei reguliert sie im Komplex mit verschiedenen Kinasen die intrazelluläre Lokalisation des Zentrosoms (Burrige und Wennerberg 2004; Schwartz 2004). Durch die Entwicklung fluoreszierender Biosensoren konnten in den letzten Jahren tiefere Einblicke in die subzelluläre Lokalisation der kleinen Rho GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 ermöglicht werden. Entgegen der verbreiteten Meinung, dass diese räumlich stark voneinander getrennt vorliegen, zeigen neue Analysen eine eher dynamische Verteilung. Hierbei ist eine erhöhte Konzentration aller drei Rho GTPasen am Zellvorderende auszumachen (Kraynov *et al.*, 2000; Nalbant *et al.*, 2004; Pertz *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2010).

Cdc42, Rac 1 und ihre Effektoren

Der kleinen Rho GTPase Cdc42 kommt eine Schlüsselrolle bei der Polarisierung vieler Zellen, wie beispielsweise den Astrozyten, primären Fibroblasten, NIH3T3 Zellen, Epithel- und Endothelzellen, zu (Nobes und Hall, 1999; Etienne- Manneville und Hall, 2001; Etienne- Manneville und Hall, 2003; Palazzo *et al.*, 2001; Tzima *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2004; Cau und Hall, 2005; Gomes *et al.*, 2005). Die meisten gewonnenen Erkenntnisse über ihren Wirkmechanismus stammen aus Wundheilungsassays mit Fibroblasten und Astrozyten. Hierbei wird durch eine manuelle Läsion eines Zellmonolayers eine „Wunde“ zugefügt, in welche die Zellen gezielt einwandern (Liang *et al.*, 2007). Ein Teil der Studien wurde auch an chemotaktisch wandernden Zellen durchgeführt. Hierbei wird ebenfalls eine gerichtete Migration induziert, allerdings durch Zugabe eines chemoattraktiven Signalstoffes (z.B. eines Wachstumsfaktors). Zusammen mit Rac1 wird Cdc42 am Vorderende migrierender Zellen aktiviert (Itoh *et al.*, 2002), wobei ihre Rekrutierung und Integrin-vermittelte Aktivierung unter anderem durch den aktiven Membrantransport am Vorderende der Zelle ermöglicht wird (Osmani *et al.*, 2011). Dort induziert Cdc42 durch Bindung an WASP- Proteine (*Wiskott- Aldrich syndrome protein*) die Aktivierung des Arp 2/3 Komplexes, der als Nukleationskeim für die Aktinpolymerisierung dient und somit die Ausbildung von Filopodien unterstützt (Welch und Mullins, 2002). Parallel dazu bindet Rac1 an so genannte WAVE-Proteine (*WASP-family verprolin-homologous protein*), die ebenfalls eine Aktivierung des Arp 2/3 Komplexes zur Folge haben und dadurch die Ausbildung eines flächigen Lamellipodiums erlauben (Cory und Ridley, 2002). Um eine koordinierte Aktinpolymerisierung am Vorderende der Zelle zu ermöglichen, regulieren WASP- und WAVE-Proteine ihrerseits wieder die Aktivität von Cdc42 und Rac1, indem sie durch Bindung an entsprechende GEFs oder GAPs eine positive bzw. negative Rückkopplungsschleife nutzen (Soderling *et al.*, 2002; Cory *et al.*, 2002; Hussain *et al.*, 2001). Diese Kontrolle ist für eine koordinierte Ausbildung von Filo- und Lamellipodien essentiell, die wiederum eine gerichtete Vorwärtsbewegung der Zelle gewährleisten.

Neben der Filopodienbildung ist Cdc42 auch an der Ausrichtung des Zentrosoms zwischen Nukleus und Zellvorderende beteiligt. Diese Lokalisation des Zentrosoms erleichtert das Wachstum der Mikrotubulifilamente in das Lamellipodium, wo sie z.B. durch Acetylierung stabilisiert werden und eine schnelle und gezielte Versorgung der dynamischen Migrationsfront mit neuen Membranbausteinen ermöglichen (Bergmann *et al.*, 1983; Prigozinja und Waterman-Storer, 2004; Schmoranzler *et al.*, 2003).

Die Positionierung des Zentrosoms zwischen Nukleus und Zellvorderende wird in erster Linie durch zwei Cdc42-vermittelte Signalwege reguliert (**Abb. 1.5**). Hierbei wird zum einen die gezielte, retrograde Bewegung des Nukleus an das Hinterende der Zelle induziert, während zum anderen die Lokalisation des Zentrosoms im Zellzentrum stabilisiert wird (Gomes *et al.*, 2005). Für Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass Cdc42 und ihr Effektor MRCK (*myotonic dystrophy kinase-related Cdc42 binding kinase*) das Motorprotein Myosin II aktivieren (Gomes *et al.*, 2005). Dadurch wird ein retrograder Aktinfluss an das Hinterende der Zelle erzeugt, mit dessen Hilfe der Nukleus wie auf Schienen mitgezogen wird (Gomes *et al.*, 2005). Belegt wird diese retrograde, aktinabhängige Nukleusbewegung dadurch, dass die Geschwindigkeit, mit der sich der Nukleus nach hinten bewegt, der des retrograden Aktinflusses entspricht (Mikhailov und Gundersen, 1995; Waterman- Storer und Salmon, 1997; Salmon *et al.*, 2002).

Studien, bei denen der retrograde Aktinfluss durch pharmakologische Inhibition von Myosin II (mit Blebbistatin) zum Erliegen kommt, belegen ebenfalls eine retrograde, aktinabhängige Nucleusbewegung. Der Stopp des retrograden Aktinflusses führt zu einem Arrest der Nucleusbewegung, wodurch eine Ausrichtung des Zentrosoms zwischen Nucleus und Zellvorderende verhindert wird (Gomes *et al.*, 2005). Bei der retrograden Bewegung des Nucleus spielen unter anderem die Kernmembranproteine SUN2 und Nesprin2 eine wichtige Rolle, da sie den Nucleus mit den dorsalen, retrograd fließenden Aktinfilamenten verlinken und somit dessen Reorientierung zum Zellhinterende ermöglichen (Luxton *et al.*, 2010; Starr, 2010). Darüber hinaus sind SUN2 und Nesprin, die auch als LINC Komplex (*Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*) bezeichnet werden, bei der Mechanotransduktion zwischen Zytoskelett und Nucleus beteiligt (Lombardi *et al.*, 2011). In Astrozyten konnte bei der Reorientierung des Nucleus an das Zellhinterende neben Aktinfilamenten zusätzlich eine Beteiligung der Intermediärfilamente gezeigt werden. Hierbei werden durch den retrograden Aktinfluss Kräfte auf Intermediärfilamente übertragen, die um den Nucleus angehäuft sind und diesen an das Zellhinterende schieben (Dupin *et al.*, 2011).

Für eine erfolgreiche Zellpolarisierung bedarf es allerdings nicht nur eines funktionierenden retrograden Aktinflusses, sondern auch eines funktionalen Mikrotubuli-Zytoskeletts. Durch pharmakologische Inhibitionsexperimente mit Nocodazol konnte gezeigt werden, dass auch die Depolymerisierung der Mikrotubulifilamente zu einer reduzierten Zellpolarisierung führt (Gomes *et al.*, 2005). Fasst man diese Erkenntnisse zusammen, wird ersichtlich, dass die Polarisierung einer Zelle von der Asymmetrie des retrograden Aktinflusses abhängt. Diese Asymmetrie wird durch die Aktin-/Myosin II abhängige Kontraktilität induziert und gleichzeitig durch Mikrotubuli stabilisiert.

Die Stabilisierung des Zentrosoms im Zellzentrum erfolgt durch die Cdc42-vermittelte Aktivierung des Par Komplexes (*partitioning-defective protein*) im leading edge der Zelle. Dieser hochkonservierte Komplex besteht aus Par Proteinen, deren bekanntesten Vertreter Par3 und Par6 sind. Eine weitere Schlüsselkomponente dieses Komplexes ist die Isoform Proteinkinase α PKC ζ . Durch die Bindung von Cdc42 an Par6 wird α PKC ζ aktiviert und phosphoryliert als Proteinkinase eine Reihe von Zielproteinen, unter anderem auch Par3. Der Par6/Par3/ α PKC ζ Komplex aktiviert über einen noch nicht vollends aufgeklärten Signalweg eine Vielzahl an TIPs, die die Mikrotubulifilamente am Zellkortex verankern und damit einen gerichteten und schnellen Vesikeltransport an das Vorderende der Zelle ermöglichen. Ein Mechanismus der hierbei in Fibroblasten eine Rolle spielt, ist die Stabilisierung der Mikrotubulifilamente über Dynein und Par3 an Zell-Zell-Kontakten (Schmoranzner *et al.*, 2009). Auch bei Astrozyten vermittelt das Motorprotein Dynein die Verankerung der Mikrotubulifilamente. Hier sind allerdings noch andere Adaptoren wie Dlg (*Discs large*) und GKAP von Bedeutung (Manneville *et al.*, 2010). Frühere Studien zeigen auch eine Beteiligung des TIP Proteins APC (*adenomateous polyposis coli*). Diese Komponente ist Teil des Wnt-Signalweges und wird nach der Inaktivierung von GSK3 β (Glykogen Synthase 3 β) durch α PKC ζ freigesetzt. APC bildet zusammen mit GSK3 β und Axin eine Untereinheit im Degradationskomplex des Wnt-Signalwegs, wodurch der Abbau von β -Catenin induziert wird. Durch diesen Abbau werden anschließend spezifische Zielgene nicht mehr aktiviert.

(*T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*), der wiederum Rac aktiviert und somit eine Rolle bei der Aktinpolymerisierung und Stabilisierung der Mikrotubulifilamente spielt (Pegtel *et al.*, 2007).

Cdc42, MRCK und der Par6/Par3/αPKCζ Komplex sind damit – zusammen mit anderen Faktoren - wichtige Komponenten für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarisierung und beeinflussen viele downstream liegende essentielle Signalkaskaden, die eine gerichtete Zellmigration ermöglichen.

1.7 Haptotaxis

Bereits 1965 beschrieb Carter den Mechanismus der Haptotaxis in seinem Artikel über die Gesetzmäßigkeiten der gerichteten Zellwanderung. Dabei definierte er die Haptotaxis als eine direktionale Zellmigration auf adhäsiven Proteingradienten in Richtung höherer Proteinkonzentration (Carter, 1965). Diese adhäsiven Proteingradienten werden in erster Linie durch ECM-Proteine, wie beispielsweise Fibronectin (FN), Laminin oder Kollagen, gebildet. Die Haptotaxis spielt bei vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Eine besondere Funktion hat sie dabei während der Wundheilung. Hier wird die Zellmigration neben chemischen, löslichen Stoffen auch durch das Adhäsionsprotein FN vermittelt. In Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass FN sehr früh im Granulationsgewebe nachweisbar ist und anschließend eine Fibroblasteninvasion mit beginnender Kollagensynthese erfolgt (Kurkinen *et al.*, 1980). *In vivo* Experimente an Meerschweinchen und weitere Studien verifizieren das frühe Auftreten von FN im Wundgebiet (Grinnell *et al.*, 1981; Mosesson und Umfleet, 1970; Mosher und Vaheri, 1978; Tsukamoto *et al.*, 1981; Mensing *et al.*, 1985). Ein FN-Konzentrationsgefälle gegenüber der Umgebung führt zu der Invasion von Fibroblasten, aber auch zu der Immigration von Monozyten oder T-Zellen und anderen Komponenten der Immunabwehr in die Wunde (Postlethwaite *et al.*, 1979; Senior *et al.*, 1982; Hauzenberger *et al.*, 1995). Mit der Wundheilung eng verbunden ist die Angiogenese. Auch hier spielt die Haptotaxis neben der Chemo- und Mechanotaxis eine entscheidende Rolle (Eming und Hubbell, 2011; Lamalice *et al.*, 2007; Davis *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2007; Herbst *et al.*, 1988). Desweiteren ist die Haptotaxis bei der Entwicklung und Differenzierung einzelner Gewebestrukturen und Organe involviert. Herzvorläuferzellen aus Hühnerembryonen wandern haptotaktisch entlang eines anterior/posterior verlaufenden FN-Gradienten zwischen Ekto- und Entoderm zur Embryomitte. Der Gradient wird dabei von der endodermalen Oberfläche vermittelt, auf der die Herzvorläuferzellen migrieren. Durch diese gerichtete, haptotaktische Bewegung gelangen die Zellen an ihren Zielort und differenzieren dort (Linask *et al.*, 1986). Die Haptotaxis ist zudem an der Wanderung von Neuralleistenzellen, der Bildung der Hühnerretina sowie an der Myogenese (Entwicklung von Muskelzellen) beteiligt (Vaz *et al.*, 2012; Moskal *et al.*, 1986; Gottlieb *et al.*, 1976; Erickson *et al.*, 1985; Collins und Lee, 1984). Die Ausstülpungen (Villi) des Darmepithels entstehen ebenfalls mithilfe von Proteingradienten (Laminin). Epithelvorläuferzellen orientieren sich hierbei entlang verschiedener Laminin-Gradienten und wandern so gezielt ein, um daraufhin die Villi des Darmepithels zu bilden (Gunawan *et al.*, 2006). Neben ihrer Funktion bei der Entwicklung und Regeneration von Organismen ist die Haptotaxis aber auch an

pathologischen Prozessen, wie z.B. der Metastasierung von Tumorzellen, beteiligt (Huang *et al.*, 2011; McCarthy *et al.*, 1983; McCarthy *et al.*, 1984; Nicolson *et al.*, 1985; Roos *et al.*, 1984; Varani *et al.*, 1985).

Die bisherigen Kenntnisse über den Mechanismus der Haptotaxis wurden fast ausschließlich in Studien gewonnen, die kontinuierliche ECM-Proteingradienten als System verwendeten. Dabei wurden bis dato vor allem Endothelzellen (Cai *et al.*, 2010; Lamalice *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; van Horssen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2005), Fibroblasten (Rhoads *et al.*, 2007; van Horssen *et al.*, 2006), Epithelzellen (Atkinson *et al.*, 2008; Gunawan *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2004), Neurone (Dertinger *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2005), Osteoblasten (Arnold *et al.*, 2008; Hirschfeld-Warneken *et al.*, 2008) und cancerogene Zellen (Klominek *et al.*, 1993, Brandley *et al.*, 1989; McCarthy *et al.*, 1984) als Zellsysteme verwendet und verschiedene ECM-Proteine (FN, Laminin, Kollagen, RGD = Sequenzmotiv von FN) für die Gradienten genutzt. Diese Arbeiten zeigen, dass die Anheftungsrate humaner Endothelzellen auf RGD-Gradienten mit zunehmender RGD-Konzentration ansteigt (Burdick *et al.*, 2004), Fibroblasten, Osteoblasten bzw. Epithelzellen sich morphologisch entlang der Gradientenachse ausrichten (Kang *et al.*, 2004; Arnold *et al.*, 2008; Hirschfeld-Warneken *et al.*, 2008) und Neurone ihre Axone in Richtung der höheren Laminin-Dichte orientieren (Dertinger *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2005). Die haptotaktische Migration wurde für Endothelzellen, Osteoblasten, Fibroblasten sowie Epithelzellen auf FN-Gradienten gezeigt (Smith *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2004; Arnold *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2007; Rhoads und Guan, 2007; van Horssen *et al.*, 2006). Auch auf Laminin- (Epithelzellen) und Kollagen-Gradienten (Endothelzellen, Epithelzellen) konnte eine gerichtete, haptotaktische Migration zur höheren Proteindichte beobachtet werden (Cai *et al.*, 2010; Atkinson *et al.*, 2008; Gunawan *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2005). Die Direktionalität, mit der die Zellen dabei wandern, hängt von der Gesamtmenge des dargebotenen Proteins ab. So zeigten Cai *et al.*, dass Endothelzellen lediglich bei niedriger und mittlerer FN-Dichte haptotaktisch migrieren, allerdings bei hoher FN-Bedeckung wieder in die entgegengesetzte Richtung wandern. Ähnliche Resultate erzielten auch Gunawan *et al.* in ihren Studien auf Laminin-Gradienten (Cai *et al.*, 2010; Gunawan *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen lassen somit auf einen Adaptationsmechanismus während der Haptotaxis schließen.

Eine Reihe an Studien untersuchte bereits den Einfluss der Gradientensteigung auf die Migrationsgeschwindigkeit und die Persistenz, mit der die Zellen zur höheren Proteindichte wandern. Aufgrund widersprüchlicher Aussagen ist es allerdings unklar, wie die Migrationsgeschwindigkeit dabei vom Gradientengefälle abhängt. Während in Studien von Smith *et al.* und Rhoads *et al.* bei zunehmender Steigung eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit beobachtet wurde (Smith *et al.*, 2009; Rhoads und Guan, 2007), zeigen andere Experimente keinen Einfluss der Gradientensteigung auf die Migrationsgeschwindigkeit (Liu *et al.*, 2007; Gunawan *et al.*, 2006). Da es bei beiden Studien grundsätzliche Unterschiede im experimentellen Ansatz gibt, könnte dies eine Erklärung für die verschiedenen Ergebnisse darstellen.

In den meisten physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Wundheilung spielen nicht nur adhäsive Proteingradienten eine wichtige Rolle, sondern meist erst die Kombination an löslichen Signalstoffen (Chemotaxis) und adhäsiven ECM-Proteinen (Haptotaxis). Es konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen nach Zugabe von VEGF (*vascular endothelial growth*

factor) schneller auf FN-Gradienten wandern, als Zellen, die nicht durch VEGF stimuliert werden. Dies kann dadurch erklärt werden, dass FN und VEGF an verschiedene Oberflächenrezeptoren binden und somit unterschiedliche Signaltransduktionswege in der Zelle anregen. So werden neben Integrinen auch VEGF-Rezeptoren aktiviert, was zu einem Verstärkungsmechanismus der intrazellulären Signalweiterleitung und infolgedessen zu einer erhöhten Migrationsrate führt (Liu *et al.*, 2007). Auch in Fibroblasten konnte nach Zugabe des löslichen Signalstoffes FGF (*fibroblast growth factor*) eine erhöhte Migrationsgeschwindigkeit auf FN-Gradienten beobachtet werden (Smith *et al.* 2009; van Horsen *et al.*, 2006). Das dabei die Chemotaxis und Haptotaxis einer unterschiedlichen, intrazellulären Regulation unterliegen, belegen neueste Studien von Wu *et al.* (Wu *et al.*, 2012).

Bis heute wurde eine Vielzahl an Signalmolekülen und Signaltransduktionswegen mit der Regulation der Zellmigration in Verbindung gebracht. Die intrazellulären Vorgänge, die einer haptotaktischen Migration zugrunde liegen, sind hingegen kaum bekannt. So zeigen lediglich Rhoads und Guan eine Beteiligung der kleinen Rho GTPase Cdc42, ihres downstream Effektors N-WASP, sowie ihres upstream Effektors FAK (*focal adhesion kinase*) an der Haptotaxis. Hierbei führt ein erhöhtes Expressionslevel von Cdc42 und N-WASP zu einer gerichteten Migration von Fibroblasten in Richtung der höheren FN-Dichte, während ein erhöhtes Expressionslevel von FAK die Migration stoppt (Rhoads und Guan, 2007). Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass verschiedene Signaltransduktionswege unterschiedliche Aspekte der haptotaktischen Zellmigration beeinflussen. Während die durch Cdc42 und N-WASP stimulierte Arp 2/3 Aktivierung und Aktinpolymerisierung im Lamellipodium den Zellen eine gerichtete Migration erlaubt (Wu *et al.*, 2012), ist der Mechanismus, über den FAK die Zellmigration auf Adhäsionsgradienten stoppt, noch unklar. Studien mit unterschiedlich steil verlaufenden Gradienten zeigen außerdem, dass der Einfluss von FAK auf steilen FN-Gradienten stärker ist als auf flachen. Dies führt zu der Annahme, dass verschiedene Signalwege downstream von FAK am Stopp der gerichteten, haptotaktischen und der ungerichteten Zellmigration beteiligt sind. Erhärtet wird diese Vermutung durch FAK Mutanten, bei denen die Interaktion von FAK mit PI3K aber nicht mit Src unterbrochen ist (Rhoads und Guan, 2007). Durch diese fehlende Interaktion wird die Fähigkeit von FAK, die Zellmigration in steil verlaufenden FN-Gradienten zu stoppen, verhindert. Somit scheint für die Regulation einer ungerichteten Migration in erster Linie der FAK/Src Signalweg eine Rolle zu spielen, während ein Stopp der gerichteten, haptotaktischen Zellmigration wohl über den FAK/PI3K Signalweg reguliert wird (Rhoads und Guan, 2007). Studien von Smith *et al.* zeigen hingegen genau das Gegenteil. So wandern Endothelzellen nach pharmakologischer Inhibition ihrer PI3K nicht mehr haptotaktisch in den Gradienten (Smith *et al.*, 2009). Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind daher notwendig, um die widersprüchlichen Informationen in der Literatur zu klären.

Abschließend sei zu betonen, dass unter physiologischen Bedingungen (*in vivo*) Zellen ihre aus ECM-Proteinen bestehende Umgebung nicht homogen, sondern strukturiert verteilt vorfinden. Somit sind kontinuierliche Gradienten, wie sie in fast allen bisherigen Studien verwendet wurden (Wu *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2009; Rhoads und Guan, 2007; Liu *et al.*, 2007; Gunawan *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2010; Lamalice *et al.*, 2007), nicht geeignet, um die tatsächlichen Bedingungen *in vivo* widerzuspiegeln. Aus diesem Grund werden in der

vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der haptotaktischen Migration (*in vitro*) diskontinuierliche, mikrostrukturierte ECM-Proteingradienten verwendet. (**Abb. 1.6**).

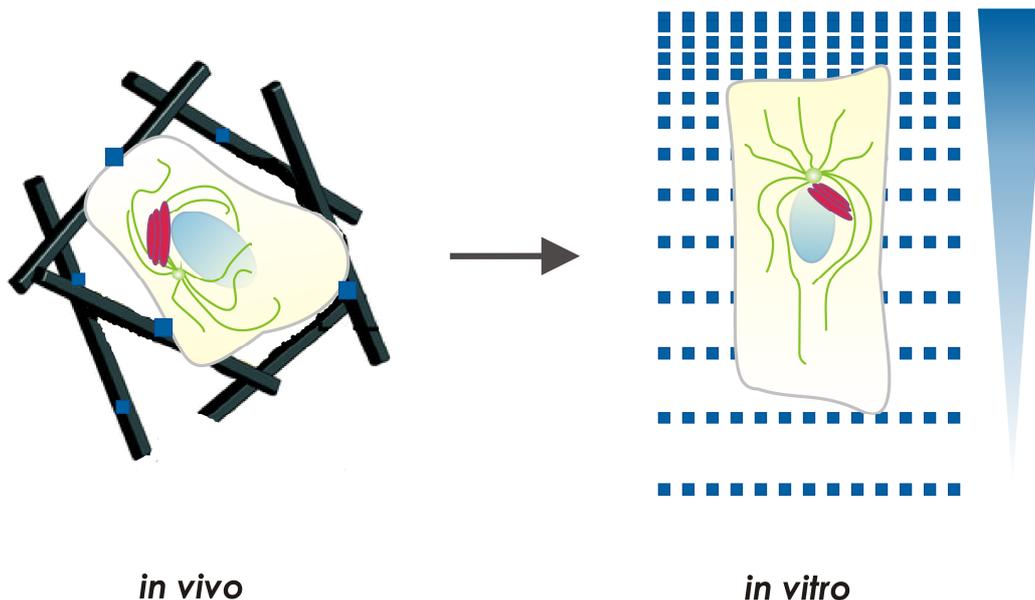


Abb. 1.6 Zelle *in vivo* und *in vitro* auf mikrostrukturierterm Fibronektin-Dotgradienten

Zellen finden *in vivo* ihre aus ECM-Proteinen bestehende Umgebung nicht homogen, sondern strukturiert verteilt vor. Um die tatsächlichen *in vivo* Bedingungen widerzuspiegeln, werden in der vorliegenden Arbeit für die *in vitro* Untersuchung der haptotaktischen Migration diskontinuierliche, mikrostrukturierte ECM-Proteingradienten verwendet.

1.8 Einsatz mikrostrukturierter Substrate

Adhärenz wachsende Zellen stehen in direktem Kontakt mit der sie umgebenden, dreidimensionalen extrazellulären Matrix (ECM). Die Untersuchung dieser hochkomplexen Interaktion steht bis heute im Fokus der Zellbiologie und hat zur Entwicklung zahlreicher Modellsysteme geführt. Diese lassen sich generell in `eindimensionale`, zweidimensionale und dreidimensionale Substrate unterscheiden. Bei `eindimensionalen` Modellsystemen werden ECM-Moleküle auf eine Trägeroberfläche wie beispielsweise Glas (Massia und Hubbell, 1991; Dubin-Thaler *et al.*, 2004), Plastik (Belisario *et al.*, 2005; Ingber 1990) oder Polyacrylamidgele (Berg *et al.*, 2004; Willcox *et al.*, 2005) aufgetragen und anschließend mit Zellen kultiviert. Der Begriff `Eindimensionalität` ist hierbei nicht streng geometrisch zu sehen, sondern vielmehr als eine Art Umschreibung der einheitlich und nicht geometrisch zweidimensional verteilten Trägerproteine zu verstehen. Genau in dieser Limitation liegt auch das Problem des Modellsystems. Eine homogen und dicht mit Protein beschichtete Oberfläche spiegelt nur bedingt die *in vivo* Situation einer dreidimensionalen ECM wider. Trotz einfacher Handhabung, guter Kontrollmöglichkeit und vieler wichtiger Erkenntnisse über zelluläres Verhalten, die auf diesem System basieren, darf die Bedeutung der Geometrie für physiologische Prozesse nicht außer Acht gelassen werden. So zeigte sich beispielsweise bei *in vitro* Studien in dreidimensionalen Gelen, dass Fibroblasten eine abweichende Morphologie

und ein verändertes Migrationsverhalten im Vergleich zu Zellen auf homogenen `eindimensionalen` Substraten aufweisen (Elsdale und Bard, 1972; Friedl und Brocker, 2000). Auch bei der Differenzierung von Epithelzellen bzw. der Struktur und Funktion von Zell-Matrix-Kontakten konnten je nach verwendetem Substrattyp Unterschiede beobachtet werden (Roskelley und Bissell, 1995; Cukierman *et al.*, 2001). Dreidimensionale Matrix-Substrate kommen zwar der *in vivo* Situation am nächsten, allerdings ist eine präzise Analyse von Zell-ECM-Interaktionen aufgrund der undefinierten Matrix-Geometrie nur bedingt möglich. Eine Alternative hierzu liefern die mittels direktem Laserschreiben (DLS) hergestellten, dreidimensionalen Substrate mit genau definierter Geometrie (Klein *et al.*, 2010; Fischer und Wegener, 2012).

In der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Migration auf adhäsiven Proteingradienten (Haptotaxis) wird die zweidimensionale Strukturierung von Substraten gewählt. Hierbei stehen eine Vielzahl an Methoden zur Verfügung, die eine Mikrostrukturierung von Zellkultursubstraten (Ito, 1999) und somit eine geometrische Verteilung von Proteinen erlauben (Blawas und Reichert, 1998). Neben der `konventionellen Litographie` und der Photochemie (MacAlear und Wehrung, 1978) kommt dabei vorwiegend die `weiche Litographie` zum Einsatz. Unter dem Begriff der `weichen Litographie` wird hierbei eine Gruppe an Methoden zusammengefasst, die Stempel (Microcontact Printing) oder Kanalsysteme aus elastischem Material verwenden, um damit eine definierte Verteilung von Proteinen auf Oberflächen zu übertragen. Neben einer kostengünstigen und einfachen Herstellung bei gleichzeitig hoher Reproduzierbarkeit ermöglicht die weiche Litographie eine Strukturierung planer Oberflächen mit kontrollierbarer Geometrie im Nano- und Mikrometerbereich.

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Herstellung mikrostrukturierter Substrate ist das so genannte Microcontact Printing (μ CP) (Kumar und Whitesides, 1993; Jackman *et al.*, 1995), das in unserer Arbeitsgruppe modifiziert und weiterentwickelt wurde (Lehnert *et al.*, 2004). Es existieren verschiedene Varianten des μ CP. Eine davon umfasst das direkte Stempeln von Proteinen. Obwohl dieses schon häufig in unterschiedlichen Zusammenhängen erfolgreich angewendet wurde (Patel *et al.*, 2000; Bernard *et al.*, 2000; Bernard *et al.*, 2001; Pouthas *et al.*, 2008; Doyle *et al.*, 2009), garantiert es aufgrund der mechanischen Belastung während des Stempelvorgangs nicht zwingend den Erhalt der Proteinfunktionalität (Dissertation, Dirk Lehnert; Bernard *et al.*, 1998). Die häufigste und proteinschonendste Variante stellt die Gold-Thiol-Chemie dar. Diese beruht auf der engen Wechselwirkung von Alkanthiolen mit Gold und einer daraus resultierenden Ausbildung von „self assembled monolayers“ (SAMs) (Ulman, 1996; Whitesides, 1995; Mrksich, 1998). Dazu wird ein dreidimensional strukturierter Stempel zunächst mit einem hydrophob terminierten Alkanthiol beschichtet. Durch den direkten Kontakt der vorstehenden Stempelstrukturen mit einem goldbedampften Substrat wird dieses anschließend (als geometrisches Muster) übertragen und stellt als hydrophobe SAMs in einem späteren Schritt die Adsorptionsfläche für die Proteine dar. Um zu gewährleisten, dass die Proteine nur an das geometrisch aufgetragene Muster binden, wird die verbliebene, SAM-freie Goldfläche mit einem Ethylenglykol terminierten (hydrophil) und proteinabweisenden Alkanthiol (Prime und Whitesides, 1991; Prime und Whitesides, 1993) abgesättigt. Dadurch entsteht eine hydrophob/hydrophil

strukturierte Oberfläche. Bei der anschließenden Proteinbeschichtung adsorbieren die Proteine selektiv an das hydrophob gestempelte Alkanthiol (Sigal *et al.*, 1998).

Mithilfe des μ CP lassen sich in der Zellbiologie viele Fragestellungen unter physiologischeren Bedingungen untersuchen (Thery 2010). Die definierte Substratgeometrie ermöglicht dabei eine gezielte Kontrolle über die Größe und Form von Zellen und reguliert somit grundlegendes zelluläres Verhalten (Liu und Chen, 2008). Neben der Zellmorphologie, der Adhäsionsstärke und der Zelldifferenzierung wurde der Einfluss kontrollierter Substratmuster auch auf die Zellpolarisierung und Migration untersucht.

Im Hinblick auf die Zellmorphologie konnte gezeigt werden, dass sich Zellen der vorgegebenen Substratgeometrie anpassen und dementsprechend Ecken, scharfe Kanten (Singhvi *et al.*, 1994; Brock *et al.*, 2003; Thery *et al.*, 2007) oder gar Kreisformen ausbilden (Chen *et al.*, 1997). Neben der Zellform lässt sich zudem die gezielte Ausbildung von Lamellipodien (Jiang *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2002) und Zellkontakten (Chen *et al.*, 2003) steuern. Dabei ist zu beachten, dass die Ausbreitung von Zellen (Spreading) klar definierten, geometrischen Grenzen unterliegt. Lehnert *et al.* 2004 zeigten, dass fibroblastenähnliche Zellen auf einem mikrostrukturierten FN-Dotmuster (Dot = Punkt) eine anti-adhäsive Distanz von maximal 25 μm überbrücken können. Durch die Variation der Dotgröße wurde zudem deutlich, dass ein 0,1 μm^2 flächiger FN-Dot ausreicht, um eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade in Gang zu setzen. Bei dieser Dotgröße darf allerdings eine anti-adhäsive Distanz von maximal 4 μm nicht überschritten werden, da ansonsten kein Spreading mehr gewährleistet ist. Erstaunlicherweise scheint eine direkte Korrelation zwischen dem Spreading und der Proteinbedeckung, allerdings nicht mit der Substratgeometrie zu bestehen. Unter Substratgeometrie versteht man hierbei die Einheit aus Dotgröße und Dotabstand (Lehnert *et al.*, 2004). In weiteren Studien auf mikrostrukturierten FN-Dotmustern konnte zudem gezeigt werden, dass Zellen - unabhängig von ihrem Gewebeursprung - die absolute Menge an den zur Verfügung stehenden FN-Liganden wahrnehmen können. Dies wurde mit Hilfe von geometrischer Strukturierung, Verdünnung des zum Beschichten benutzten FNs oder einer Kombination von Beidem gezeigt (Dissertation, Zhongziang Jiang, 2009). Im Gegensatz zu den Experimenten von Lehnert *et al.* und Z. Jiang postulierten Chen *et al.* 1997 sehr wohl eine Korrelation zwischen Spreading und definierter Substratgeometrie auf FN-Mustern. Bei dem Versuch Epithelzellen auf unterschiedlich großen FN-Inseln mit variierendem Abstand zu kultivieren, fanden sie heraus, dass bei gleichbleibender Gesamtproteinbedeckung die Zellfläche mit abnehmender Inselgröße und gleichzeitig kleiner werdendem Abstand zunimmt. Allein durch die Änderung der Geometrie nahm somit die Zellfläche um ein Vielfaches zu, ohne dass sich die Gesamtproteinbedeckung signifikant änderte.

Strukturierte Substratmuster beeinflussen auch in direktem Maße das Polarisierungs- und Migrationsverhalten von Zellen (Hale *et al.*, 2012). So zeigten Studien von Pitaval *et al.* 2010, dass Zellen, die auf einer geometrisch begrenzten FN-Fläche sitzen, ein weit verzweigtes Aktin-Netzwerk an der dorsalen Seite ausbilden und ihr Zentrosom oberhalb des Nukleus positionieren. Können sich Zellen allerdings geometrisch unbeschränkt ausbreiten, so assemblieren die Aktinfilamente auf der ventralen Seite zu Aktinstressfasern. In diesem Falle befindet sich auch das Zentrosom unterhalb des Nukleus in direkter Nähe zur Adhäsionsfläche. Demzufolge wird die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, das maßgeblich an der Ausbildung der Zellpolarisierung beteiligt ist, durch die Substratgeometrie beeinflusst. In

Abhängigkeit dieser Organisation orientieren sich auch die Mikrotubulifilamente. So wachsen sie in Zellen, die auf einem Substrat bestehend aus Dreiecksmustern adhären, entlang der Aktinstressfasern und stoppen, sobald sie das verzweigte Aktin-Netzwerk des Lamellipodiums erreichen. Gleichzeitig positionieren sie das Zentrosom im Zellzentrum und somit zwischen dem Nukleus und dem Lamellipodium (Thery *et al.*, 2006b). Diese Positionierung ist wie in Kapitel 1.5 bereits ausführlich erläutert ein Merkmal der gerichteten Migration.

Auch Studien von Pouthas *et al.* 2008 belegen, dass die Zellpolarisierung einer starken geometrischen Limitation unterliegt. Migrieren Zellen auf schmalen (6 µm) FN-beschichteten Linien, reorientieren sie zu 70 % ihren Golgi-Apparat zwischen Nukleus und Zellhinterende. Ist allerdings eine Mindestbreite von etwa 40 µm erreicht, positionieren die meisten Zellen ihren Golgi-Apparat wieder vor den Nukleus in Richtung der Migrationsfront (Pouthas *et al.*, 2008). Auch Doyle *et al.* 2009 zeigten, dass Zellen entlang schmaler FN-beschichteter Linien wandern und dabei ihr Zentrosom ähnlich wie in dreidimensionalen Matrixgelen zwischen Nukleus und Hinterende und somit entgegen der Lauffront positionieren. Neben der Zellpolarisierung beeinflusst die Substratgeometrie auch die Geschwindigkeit und Direktionalität migrierender Zellen. Zellen wandern weitaus schneller auf schmalen FN-beschichteten Linien als auf homogenen FN-Substraten, was somit einer Zellmigration in dreidimensionalen Kollagengelen nahekommt (Doyle *et al.*, 2009). Neben Linienstrukturen kann die Direktionalität der Zellmigration auch noch durch andere Geometriesubstrate beeinflusst werden. So bilden Zellen auf einem Substrat mit hintereinanderliegenden Dreiecksmustern an der apikalen Seite ein Lamellipodium aus, erfahren dadurch eine Polarisierung und beginnen von Dreieck zu Dreieck zu migrieren (Mahmud *et al.*, 2009). Diese Beispiele verdeutlichen, welche große Bedeutung die Geometrie der Zellumgebung (Substratgeometrie) für das Zellverhalten hat und wichtige Prozesse wie die Zelladhäsion, -polarisierung und -migration steuert.

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Haptotaxis ist als gerichtete Migration in adhäsiven ECM-Proteingradienten (ECM = *extracellular matrix*) definiert und wurde 1965 erstmals von Carter beschrieben (Carter, 1965). Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Regeneration multizellulärer Organismen (Hauzenberger *et al.*, 1995; Linask *et al.*, 1986; Vaz *et al.*, 2012; Gunawan *et al.*, 2006; Lamalice *et al.*, 2007), sowie bei pathologischen Prozessen wie beispielsweise der Metastasierung (Varani *et al.*, 1985; McCarthy *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 2011).

Die wenigen bisher bekannten Erkenntnisse über die Haptotaxis stammen aus *in vitro* Systemen, bei denen fast ausnahmslos kontinuierlich verlaufende Gradienten aus ECM-Proteinen verwendet wurden (Wu *et al.*, 2012; Gunawan *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2010; Lamalice *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009; Rhoads und Guan, 2007; Liu *et al.*, 2007). Diese ECM-Proteingradienten spiegeln allerdings nur bedingt die realen, physiologischen Bedingungen wieder, da Zellen *in vivo* ihre aus ECM-Protein bestehenden Adhäsionspunkte strukturiert im Raum verteilt vorfinden. Aus diesem Grund werden zur Untersuchung der Haptotaxis mit Hilfe von Microcontact Printing (Kumar und Whitesides, 1993) diskontinuierliche, mikrostrukturierte ECM-Proteingradienten hergestellt, die besser den tatsächlichen *in vivo* Bedingungen einer dreidimensionalen Matrix entsprechen.

Damit Zellen gerichtet migrieren können, bedarf es zunächst einer Zellpolarisierung. Eine polarisierte Zelle besitzt ein definiertes Vorder- und Hinterende. Der Prozess der Polarisierung beruht auf einer Reorganisation des intrazellulären Aktin und Mikrotubuli-Zytoskeletts (Goode *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2003), sowie einer Relokalisierung des Zentrosoms und des Golgi-Apparates. Reguliert wird die Zellpolarisierung in erster Linie durch die Familie der kleinen Rho GTPasen, wobei Cdc42 und ihre Effektoren eine Schlüsselrolle einnehmen (Etienne-Manneville *et al.*, 2003; Etienne-Manneville *et al.*, 2005; Solecki *et al.*, 2004; Pegtel *et al.*, 2007) (**Abb. 1.7**). Bisherige Erkenntnisse über den hochkomplexen Wirkmechanismus der Zellpolarisierung und der gerichteten Migration stammen meist aus Untersuchungen von chemotaktisch wandernden Zellen oder aus Wundheilungsassays. Über deren Regulation bei der Haptotaxis ist allerdings noch wenig bekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die haptotaktische Migration und die dafür notwendige Zellpolarisierung auf adhäsiven, mikrostrukturierten ECM-Proteingradienten zu untersuchen. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- (1) Wie migrieren und polarisieren Zellen auf einem diskontinuierlichen, mikrostrukturierten Fibronectin-Gradienten bzw. wie messen sie diesen aus? Welche Substratparameter sind wichtig für eine optimale Haptotaxis? (**Kap. 3.1 und 3.2**)
- (2) Welchen Einfluss hat die durch die Aktin-/Myosin Kontraktilität erzeugte, intrazelluläre Zugkraftentwicklung auf die Erkennung des Gradienten und die Haptotaxis? (**Kap. 3.3**)

- (3) Wie wirkt sich die Dynamik des Mikrotubuli-Systems auf die Zellpolarisierung und die Zellmigration aus? (**Kap. 3.3**)
- (4) Welche Bedeutung haben die kleine Rho GTPase Cdc42 und ihr Effektor α PKC ζ für die Zellpolarisierung und die Haptotaxis? (**Kap. 3.4**)

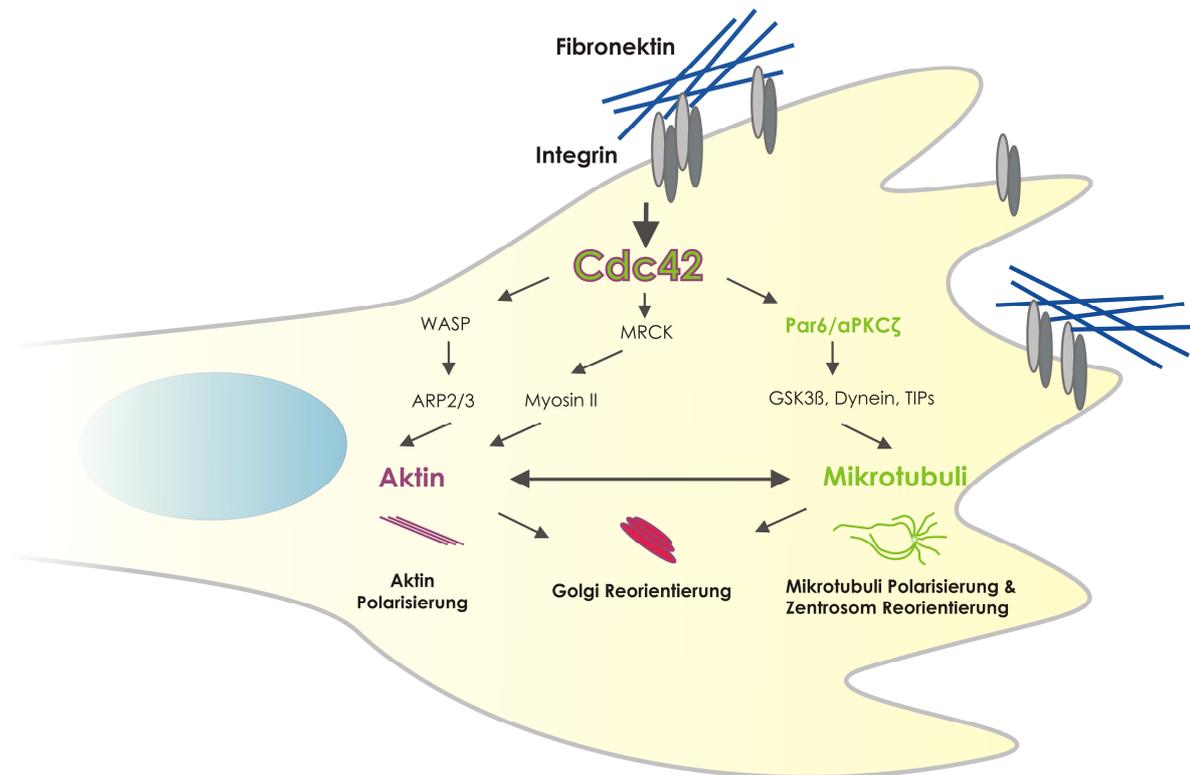


Abb. 1.7 Regulation der gerichteten Zellmigration und -polarisierung

Für eine gerichtete Zellmigration muss eine Zelle zunächst polarisieren. Hierbei bildet sie ein definiertes Vorder- und Hinterende aus und lokalisiert ihren Golgi-Apparat und ihr Zentrosom zwischen Nukleus und Zellvorderende. Diese Prozesse beruhen auf einer Reorganisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts und obliegen der Regulation durch die kleine Rho GTPase Cdc42 und ihrer downstream Effektoren, wie z.B. der Proteinkinase α PKC ζ . Alle bisherigen Erkenntnisse über diese Mechanismen stammen aus Wundheilungsassays oder wurden durch die Untersuchung von chemotaktisch wandernden Zellen gewonnen. Da allerdings über deren Regulation während der Haptotaxis noch wenig bekannt ist, werden in der vorliegenden Arbeit die Rolle des Aktin-/ Mikrotubuli-Zytoskeletts, der Golgi-Reorientierung, sowie die Bedeutung von Cdc42 und der Proteinkinase α PKC ζ untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Tab. 2.1 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Name/Abkürzung	Angaben	Hersteller
Aceton	> 99,8 %	Carl Roth
Agarose	5 %	PeqLab
Ammoniak/NH ₃	> 25 %	Carl Roth
Ampicillin		Carl Roth
<i>Bovine Growth Serum</i> /BGS	10 % in DMEM	HyClone
<i>Bovine Serum Albumine</i> /BSA	1 % in PBS	Sigma-Aldrich
<i>Chicken Serum</i> /CS	5 % in F12	Invitrogen
Dimethylsulphoxide/DMSO		Sigma-Aldrich
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (high glucose)</i> /DMEM	1x high glucose	Invitrogen
<i>EndoFree Plasmid MaxiPrep Kit</i>		Qiagen
Ethanol reinst./EtOH	> 99,8 % p.a.	Carl Roth
Ethylenglycol-3-O-Mercaptan/ EG-3-O-Me	1,5 mM in EtOH	Prochimia
<i>F-12K Nutrient Mixture Kaighn's Modification</i> /F-12K	(+) L-Glutamin	Invitrogen
<i>Foetal Bovine Serum "Gold"</i> /FBS	10 % in F12	PAA
<i>Foetal Calf Serum</i>	10 % in DMEM	HyClone
Fibronektin/FN	1 od.10 µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich
Gentamycin	0,02 mg/ml	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	2 % in PBS	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	5 g/l	Fluka
<i>Hanks balanced salt solution</i> /HBSS		Invitrogen
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure/HEPES	10 mM	Carl Roth
Heptan	> 99 %	Carl Roth
Isopropanol/2-Propanol	> 99,8%	Carl Roth
Kanamycin	0,5 %	Carl Roth
Lipofectamine		Invitrogen
Mowiol	20 %	Hoechst

Name/Abkürzung	Angaben	Hersteller
Natriumhydrogencarbonat/ NaHCO_3		Carl Roth
Natriumchlorid/ NaCl	5 g/l	Carl Roth
n-Propylgallat/NPG	1 Spatelspitze auf 10 ml Mowiol	Sigma-Aldrich
Octadecylmercaptan/ODM	1,5 mM in EtOH	Sigma-Aldrich
Octadecyltrichlorosilan/OTS	1 mM in Isopropanol	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd/PFA	2 od. 4 % in PBS	Sigma-Aldrich
Penicillin	10 U/ml	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline/PBS	1x, (-) Ca^{2+} , (-) Mg^{2+} (Waschpuffer)	Biochrom
Phosphate Buffered Saline/PBS	1x, (-) Ca^{2+} , (-) Mg^{2+} (Zellkultur)	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin/ Pen/Strep	10 U/ml	Invitrogen
Polydimethylsiloxan/Sylgard184/ PDMS	1 : 9	Dow Corning
Poly-L-Lysin/PLL	200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS	Sigma-Aldrich
Salpetersäure/ HNO_3	> 65 %	Carl Roth
Salzsäure/ HCl	> 25 %	Carl Roth
Schwefelsäure/ H_2SO_4	> 95 %	Carl Roth
Stickstoff/ N_2	Reinheit 5.0	Linde
Streptomycin	10 mg/ml	Sigma-Aldrich
TritonX100	0,1 % in PBS	Carl Roth
Trypanblau	1 : 2	Carl Roth
Trypsin/EDTA	1 : 5 ; 1 : 10 in HBSS (-) Ca^{2+} , (-) Mg^{2+}	Invitrogen
Wasserstoffperoxid/ H_2O_2	> 30 %	Carl Roth

2.2 Herstellung mikrostrukturierter Gradienten mittels Gold-Thiol-Chemie

Zur Herstellung mikrostrukturierter Gradienten wird das Verfahren des Microcontact Printings (μ CP) angewendet (Kumar und Whitesides, 1993). Diese Methode beruht auf der Wechselwirkung von Alkanthiolen mit Gold (Gold-Thiol-Chemie) und einer daraus resultierenden Ausbildung von „self assembled monolayers“ (SAMs) (Mirsich 1998). Etabliert wurde diese Stempeltechnik in unserer Arbeitsgruppe (Lehnert *et al.*, 2004).

2.2.1 Stempelmuster

Dotgradienten verschiedener Steigung (S und F)

Für die Untersuchung der Haptotaxis in adhäsiven, mikrostrukturierten Proteingradienten werden diskontinuierliche Gradientenstrukturen verwendet. Prinzipiell sind die Muster dabei aus quadratischen Strukturen („Dots“) aufgebaut (**Abb. 2.1 B**), die später im fertigen Zellkultursubstrat die Protein-beschichteten Bereiche bilden (**Abb. 2.1 A, blau**) und durch nicht Protein-beschichtete Bereiche voneinander getrennt sind (**Abb. 2.1 A, weiß**). **Abbildung 2.1 A** zeigt den vergrößerten Ausschnitt eines solchen Dotmusters, das im Folgenden als Gradientenbahn bezeichnet wird. Der Stempel ist topographisch aufgebaut und besteht sowohl aus vorstehenden Silikonstrukturen, die beim Stempelvorgang das geometrische Muster auf das Golddeckglas übertragen, als auch aus tiefer liegenden Bereichen (**Abb. 2.1 B`**). Die Stege zwischen den Bahnen bilden ebenfalls vorstehende Silikonstrukturen und stellen später die homogen mit Protein beschichteten Bereiche um die Bahnen dar.

Die Dots weisen stets eine Kantenlänge von 2 μ m auf (2 x 2 μ m). Während der horizontale Abstand der Dots in x-Richtung stets 5 μ m beträgt, verkürzt sich der Abstand von Dotmittelpunkt zu Dotmittelpunkt in y-Richtung kontinuierlich von anfangs 20 μ m auf letztlich 0 μ m. Dies führt zu einer Zunahme der Strukturdichte und somit unmittelbar auch zu einer Erhöhung der Proteinbedeckung.

Um den Einfluss der Steigung des Gradienten auf die Haptotaxis untersuchen zu können, werden zwei unterschiedlich steile Gradienten F und S (Gradient F = Flach mit 2 % Steigung und S = Steil mit 6 % Steigung) hergestellt. Die verschiedenen Steigungen werden dabei durch Variation der Abstandsänderungen zwischen den horizontalen Dotreihen erzeugt (**Abb. 2.1 C**). Der Gradient F, bei dem der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden, horizontalen Dotreihen in y-Richtung immer um 2 % kleiner als der vorangehende Abstand ist, ist somit flacher als der Gradient S, dessen Abstandsabnahme pro Dotreihe bei 6 % liegt. Demzufolge erstreckt sich der Gradient F über eine Distanz von 1 mm, während der Gradient S eine Länge von 0,3 mm aufweist. Neben Gradient F und S existieren auch noch die Gradienten FP und SP (Gradient FP = Flach mit 2 % Steigung und Plateau, Gradient SP = Steil mit 6 % Steigung und Plateau). Diese beiden Muster sind in der Mitte des Gradienten durch ein Plateau gekennzeichnet, in dem der Abstand von Dotmittelpunkt zu Dotmittelpunkt in y-

Richtung über eine Distanz von 250 μm konstant 15 μm beträgt. In diesem Bereich ändert sich die Struktur- bzw. Proteindichte nicht. **Abbildung 2.1 C** zeigt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit verwendeten Stempelstrukturen.

Dotgradient mit Plateau (SP1)

Der Dotgradient mit Plateau (SP1) weist die gleiche Steigung wie in **Abbildung 2.1 D** (6 %) auf und besteht aus Dotreihen, deren horizontale Abstandsänderung von 20 μm bis 5 μm kontinuierlich abnimmt, um dann in einem Plateau zu enden. Innerhalb des Plateaus beträgt der Abstand von Dotmittelpunkt zu Dotmittelpunkt sowohl in x- als auch in y-Richtung konstant 5 μm (**Abb. 2.1 E**). Die Struktur- und demzufolge auch die prozentuale Proteinbedeckung bleiben in beide Richtungen erhalten.

Geometriegradient (SR)

Ein Gradientenmuster mit Dotgrößen von 3 x 2 μm wurde benutzt (**Abb. 2.1 F**). Im Unterschied zu dem in **Abbildung 2.1 D** gezeigten Gradientenmuster mit quadratischen Dots (Gradient S; 2 x 2 μm), werden hierbei rechteckige Dots verwendet, wobei die längere Seite (3 μm) senkrecht zur y-Gradientenachse in x-Richtung zeigt. Um einen direkten Vergleich möglich zu machen, weisen beide Gradienten (S und SR) die gleiche Steigung (6 %) auf.

Bedeckungsgradient (SD)

Ein Muster wurde verwendet, dessen Dotgrößen 3,5 x 3,5 μm betragen (**Abb. 2.1 G**). Im Vergleich zu dem Gradientenmuster mit der Dotgröße 2 x 2 μm ist die prozentuale FN-Bedeckung um das Dreifache erhöht, während der graduelle Verlauf des Gradienten mit 6 % Steigung erhalten bleibt.

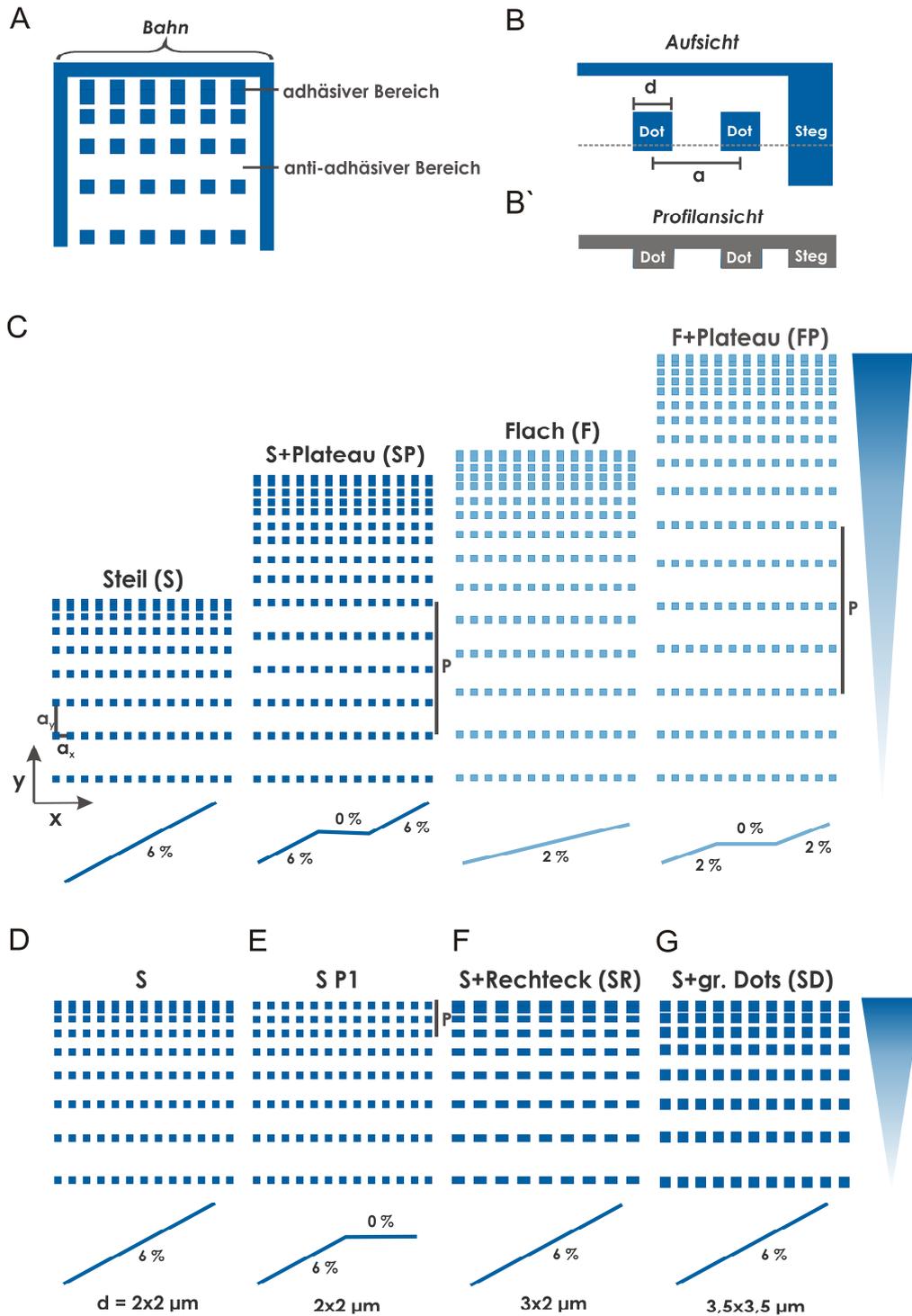


Abb. 2.1 Stempelmuster der verschiedenen Dotgradienten

(A) Prinzipieller Aufbau einer Gradientenbahn: Die blau hinterlegten quadratischen Strukturen („Dots“) stellen später im fertigen Substrat die adhäsiven, Fibronectin-beschichteten (FN) Bereiche dar. Dazwischen befinden sich in weiß die anti-adhäsiven Bereiche. (B) Vergrößerter Ausschnitt eines Musters, wobei d die Dotbreite und a der Abstand von Dotmittelpunkt zu Dotmittelpunkt in μm darstellt. (B') Profil der Topographie des Silikonstempels entlang der gestrichelten Linie in (B). (C) Schematische Übersicht der Stempelstrukturen mit den Gradienten Steil (S), Steil mit Plateau (SP), Flach (F) und Flach mit Plateau (FP). Die Gradienten besitzen alle eine Dotgröße von $2 \times 2 \mu\text{m}$ und unterscheiden sich lediglich in ihrer Steigung ($S = 6\%$, $F = 2\%$). (D) Standardgradient S (6% Steigung). (E) Dotgradient mit Plateau (6% Steigung bis Plateau). (F) Dotgradient bestehend aus rechteckigen Dots ($3 \times 2 \mu\text{m}$; 6% Steigung). Die längere Seite ($3 \mu\text{m}$) verläuft hierbei senkrecht zur y -Gradientenachse in x -Richtung. (G) Dotgradient mit einer Dotgröße von $3,5 \times 3,5 \mu\text{m}$ (6% Steigung). Hierbei ist die prozentuale FN-Bedeckung im Vergleich zu (D) um etwa das Dreifache erhöht. Die Gradienten (D) bis (G) weisen alle die gleiche Steigung auf. Das blaue Dreieck gibt den Gradientenverlauf an.

2.2.2 Herstellung der Master

Für die Herstellung von Silikonstempeln werden Abgussformen, so genannte Master, benötigt. Deren Fertigung basiert auf zwei unterschiedlichen Verfahren. Die Master für die Dotgradienten S, SP, F, FP (**Abb. 2.1 C**) bzw. für den Dotgradient SP1 (**Abb. 2.1 E**) bestehen aus reinem Silizium, in die mittels Elektronenstrahlolithographie die Muster als inverse topographische Struktur eingätzt werden (Dr. Mario Hauser, Institut für angewandte Physik, KIT). Die Master für den Geometrie- und Bedeckungsgradienten (**Abb. 2.1 F und G**) hingegen entstehen durch direktes Laserschreiben (DLS) (Benjamin Richter, Institut für angewandte Physik, KIT). Dabei wird ein Laserstrahl auf ein funktionalisiertes Deckglas mit einem negativen Fotolack (PETTA = Pentaerythritoltriacrylat; Sigma-Aldrich) gerichtet, der im Fokus eine 2-Photonenadsorption induziert. Dieser Prozess führt zu einer Polymerisierung des Negativlackes und somit auch hier zu einer inversen topographischen Strukturierung. Anschließend erfolgt eine Passivierung der Master mit PEG-CP (Polyethylenglycol-Cyclopentadienyl), um bei der nachfolgenden Stempelherstellung ein gutes Ablösen des auspolymerisierten Silikons zu gewährleisten.

2.2.3 Reinigung und Silanisierung der Siliziummaster

Zur Entfernung von organischem Material wird der Siliziummaster für 10 min in Piranha-Lösung ($\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2$; 1:1) auf einer Heizplatte auf ca. 80 °C bis zur Blasenbildung erhitzt. Anschließend erfolgt ein mehrfacher Waschschrift mit *Aqua bidest* (ddH₂O) bevor der Master mit Stickstoff (Reinheit 5.0) trocken geblasen wird. Bei starker Verschmutzung können diese Vorgänge auch mehrmals wiederholt werden. Als Abschlussreinigung dient eine Waschlösung aus NH_3 , H_2O_2 und *Aqua bidest* (1:1:5). In dieser wird der Master für 15 min bis zur Blasenbildung erhitzt und anschließend gründlich mit *Aqua bidest* gespült, bzw. mit Stickstoff trocken geblasen.

Um die Silikonabgüsse später gut ablösen zu können, wird der Master im Anschluss an die Reinigung mit Octadecyltrichlorosilan (OTS) beschichtet. Da OTS eine wasserempfindliche Substanz ist, die unter Einwirkung von Luftfeuchtigkeit zur Polymerisierung neigt, erfolgt dieser Schritt unter Stickstoffatmosphäre. Nach 10 min Inkubation in einer 1 mM OTS-Lösung (in n-Hexan) wird der Master entnommen und mit Stickstoff gründlich trocken geblasen. Bei erfolgreicher Silanisierung perlt ein auf den Master pipettierter Tropfen *Aqua bidest* mit großem Kontaktwinkel ab.

Die mittels DLS hergestellten PETTA Master bedürfen aufgrund ihrer Passivierung mit PEG-CP keiner weiteren Reinigung und können beliebig oft für die Stempelherstellung eingesetzt werden.

2.2.4 Herstellung der Stempel

Zur Herstellung der Stempel wird das kommerziell erhältliche Polydimethylsiloxan (PDMS) Sylgard 184 (Dow Corning) verwendet. Aufgrund seiner hohen Elastizität und Stabilität im auspolymerisierten Zustand (Polymer:Crosslinker; 10:1) eignet es sich gut für die Herstellung mikrostrukturierter Substrate. Es werden ca. 50 µl flüssiges Polymer mit Crosslinker auf die Struktur des Masters gegeben. Anschließend wird ein etwa 1 cm breiter und mit Isopropanol gereinigter Objektträgerglasstreifen unter Vermeidung von Luftblasenbildung auf das PDMS gelegt. Um ein Verrutschen durch das noch flüssige PDMS zu verhindern, werden Master und Glasstreifen mit Messingklötzchen beschwert und seitlich fixiert. Diese Vorgehensweise gewährleistet zudem auch die Entstehung einer planaren Oberfläche. Im Anschluss daran erfolgt die Polymerisierung des PDMS für 5 - 6 Stunden bei 60 °C im Ofen. Beim Abtrennen des Glasstreifens vom Master bleibt das auspolymerisierte PDMS an der Glasunterseite haften. Überschüssiges PDMS um die Stempelstruktur herum wird mittels einer Rasierklinge vom Objektträgerglas entfernt, so dass nur die Struktur sowie ein ca. 2 mm breiter Rand zurück bleiben. Zur besseren Handhabung des Stempels wird auf der Glasoberseite ein Haltegriff angebracht. In **Abbildung 2.2** ist der Ablauf der Stempelherstellung schematisch dargestellt.

2.2.5 Reinigung und Goldbedampfung der Deckgläser

Die Deckgläser (Carl Roth, 22 x 22 mm) für die Herstellung mikrostrukturierter Substrate werden vor der Goldbedampfung in einer Lösung aus NH_3 , H_2O_2 und ddH_2O (1:1:5) gereinigt. Diese intensive Reinigung erfolgt in einer speziell angefertigten Halterung aus Teflon, in die die Deckgläser gestellt und für 15 min auf 80 °C erhitzt werden. Nach gründlichem Spülen in ddH_2O und Trocken blasen mit Stickstoff können sie anschließend für die Goldbedampfung eingesetzt werden.

Dazu werden sie in eine speziell angefertigte Halterungsvorrichtung gelegt und in eine Aufdampfanlage eingebaut. Bei einem Druck von $< 1 \times 10^{-6}$ mbar wird zunächst eine 3 - 5 nm dicke Titanschicht aufgedampft. Diese Schicht dient als Haftvermittler für die direkt im Anschluss aufgedampfte 15 - 20 nm dicke Goldschicht. Nach vorsichtiger Entnahme aus der Aufdampfanlage werden die Golddeckgläser zum Schutz vor Verunreinigung in eine Glaspetrischale überführt. Ab diesem Zeitpunkt sind sie bis zu 2 Wochen für die Substratherstellung einsetzbar.

2.2.6 Substratherstellung (Gold-Thiol-Chemie)

Zur Entfernung von Staubpartikeln und auskristallisierten Thiolen wird vor und nach jedem Gebrauch der Stempel mehrmals mit klarem Tesafilm abgezogen. Anschließend erfolgt eine gründliche Reinigung mit Ethanol (> 99,8 %), um zurückgebliebene Tesafilmreste zu entfernen. Bei Bedarf kann dieser Vorgang auch während des Stempelns wiederholt werden, falls sich der Stempel nicht mehr gut an die Stempelfläche ansaugt. Dies kann unter Umständen dann nötig sein, wenn Gold am Stempel haften geblieben ist oder Thiol-

Rückstände auskristallisieren. Bei starker Verschmutzung der Stempel erfolgt eine 10 - 15 minütige Behandlung im Ultraschallbad, wobei der Stempel in Ethanol oder alternativ in 1 % SDS in ddH₂O getaucht wird. Nach der Reinigung wird der Stempel gründlich mit Stickstoff trocken geblasen und für 20 sec mit 1,5 mM ODM beschichtet. ODM ist ein hydrophobes, methyl-terminiertes Alkanthiol, an das in einem späteren Schritt die FN-Moleküle binden. Vor dem Einsatz des Stempels wird dieser nochmals gründlich mit Stickstoff trocken geblasen und dann vorsichtig auf das goldbedampfte Deckglas aufgesetzt. Dieser Schritt muss aufgrund des hohen Diffusionsvermögens von ODM zeitnah erfolgen. Im Idealfall saugt sich der Stempel von selbst an. Falls nicht wird mittels einer Pinzette leichter Druck auf die Deckglasrückseite ausgeübt. Ein erfolgreiches Ansaugen des Stempels zeigt sich anhand von Newtonschen Farbringen an der Rückseite des Deckglases. Direkt im Anschluss wird das bestempelte Deckglas mit reinem Ethanol gespült und mit Stickstoff gründlich trocken geblasen. Zum Blockieren der nicht bestempelten Bereiche erfolgt eine 30 minütige Überschichtung mit 1,5 mM EG-30-Me. Dieses hydrophile Alkanthiol verhindert später die Proteinadsorption und Zelladhäsion in den nicht bestempelten Bereichen und gewährleistet die Mikrostrukturierung der Substrate. Abschließend wird das Deckglas mit Ethanol gereinigt, mit Stickstoff trocken geblasen und für 1 Stunde bei 4 °C mit 150 µl FN-Lösung (1 µg/ml) beschichtet. Das Protein bindet dabei selektiv an das strukturiert aufgebrachte, hydrophobe Thiol (ODM). Nach zwei Waschschrritten mit PBS können die nun FN-beschichteten Golddeckgläser für ein Zellkulturexperiment eingesetzt werden. Eine schematische Darstellung des geschilderten Ablaufs zeigt **Abbildung 2.2**.

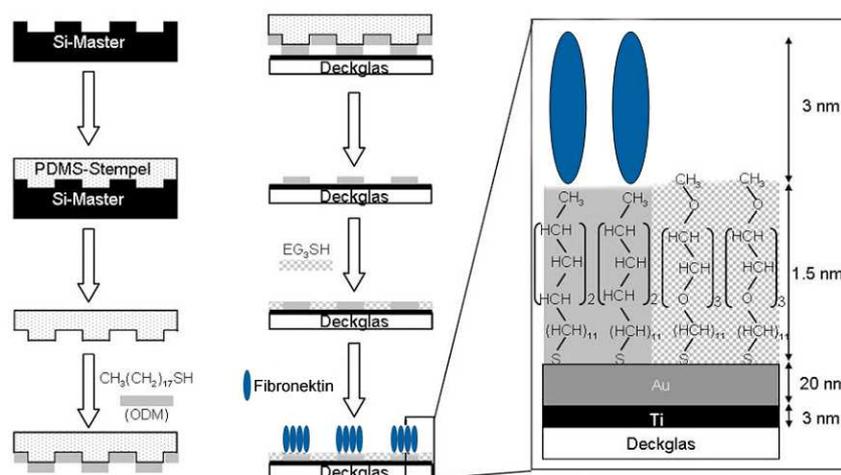


Abb. 2.2 Schematische Darstellung der Stempel- und Substratherstellung

Mit Hilfe eines dreidimensional strukturierten Silizium-Masters wird ein Silikonstempel (PDMS = Polydimethylsiloxan) hergestellt. Dieser wird mit dem hydrophob terminierten Alkanthiol ODM (Octadecylmercaptan) beschichtet und mit einem Golddeckglas in Kontakt gebracht, wodurch das Thiol übertragen wird. Um die nicht bestempelten Bereiche für die Proteinadsorption und Zelladhäsion zu blockieren, wird das Deckglas mit dem hydrophil terminierten EG-30-Me (Ethylenglycol-30-Mercaptan) beschichtet. Beim Eintauchen in eine Fibronectin-Lösung adsorbiert das Protein selektiv an die hydrophob terminierten Thiolstrukturen. Modifiziert nach Mrksich und Whitesides, 1997

2.3 Zellkultur

Im folgenden Kapitel werden die in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen vorgestellt. Neben adhärent wachsenden Zelllinien (BRL, A549, MEF, B16, HFF) wird dabei auch die Präparation und Kultivierung adhärenter, primärer Hühnerfibroblasten (PCF) erläutert. Alle verwendeten Zelltypen sind in **Tabelle 2.2** aufgelistet.

2.3.1 Zelltypen

In dieser Arbeit werden vier adhärenente Zelllinien unterschiedlicher Organismen- und Gewebeherkunft verwendet (**Tab. 2.2**).

Bei der A549-Tumorzell-Linie (ATCC, Rockville/MD, USA, CCL-185) handelt es sich um humane Alveolarepithelzellen, die 1972 aus dem Lungenkarzinomgewebe eines 58-jährigen männlichen Patienten entnommen wurden (Giard *et al.*, 1973).

BRLs sind eine parenchymale Zelllinie (Coon und Weiss, 1969), die 1968 aus dem Lebergewebe einer 5 Wochen alten, weiblichen Büffelratte (*Rattus norvegicus*) kultiviert wurden (Coon, 1968) und als Subklon BRL-2A (CRL-1442) bei ATCC bezogen werden können. MEFs (ATCC) stammen aus Mausembryonen im Stadium E14.

Bei HFFs (PromoCell) handelt es sich um humane Vorhautzellen, die 2003 aus zwei neugeborenen Säuglingen kultiviert und anschließend vereinigt wurden. Das Wachstum von HFFs wird als fibroblastenartig beschrieben.

Tab. 2.2 Verwendete Zelltypen, eingesetztes Medium und Ablösung vom Zellkultursubstrat

Die angegebenen Zelllinien wurden ursprünglich von ATCC bzw. PromoCell bezogen. Die PCFs werden aus der Rückenhaut von embryonalen Hühnerfibroblasten präpariert (Kap.2.3.2) und anschließend in Kultur genommen. Die Angaben 1:5 und 1:10 Trypsin entsprechen 0,1 % Trypsin und 1,1 mM EDTA bzw. 0,05 % Trypsin und 0,53 mM EDTA. Die Passage erfolgt dreimal wöchentlich.

Linie	Zelltyp	Eigenschaften	Medium	Trypsin	Herkunft
A549	Humane Lungenkarzinomzellen	epithelial	F12K +10 % FCS	1:5	ATCC
BRL	Büffelrattenleberzellen	parenchymal	DMEM +10 % FCS	1:5	ATCC
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i>	fibroblastenartig	DMEM +10 % FCS	1:10	PromoCell
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>	fibroblastenartig	DMEM +10 % FCS	1:5	ATCC
PCF	<i>primary chicken fibroblasts</i>	fibroblastenartig	F12+10 % FCS + 2 % CS	1:5	primär

2.3.2 Präparation primärer Hühnerfibroblasten

Für die Präparation primärer Hühnerfibroblasten (PCF = *primary chicken fibroblasts*) werden pathogenfreie Hühnereier der Rasse „White Leghorn“ von der *Hockenberger Geflügelzuchterei in Eppingen-Elsenz* verwendet. Ihre Bebrütung erfolgt in einem Brutschrank mit geregelter Ventilationssystem und automatischer Wendevorrichtung, die die Eier alle 2 Stunden um 180° dreht. Die Temperatur wird konstant auf 37 °C gehalten, während die Luftfeuchtigkeit stets 60 % beträgt. Der Einlegetag, d.h. der erste Tag der Bebrütung wird als „Tag 0“ definiert.

Primäre Hühnerfibroblasten werden acht Tage alten Hühnerembryonen (**Abb. 2.3 A**) unter sterilen Bedingungen entnommen. Dazu wird die Eierschale mit 70 % Ethanol gesäubert und dann an einer Kante vorsichtig aufgebrochen. Anschließend kann der Embryo aus dem Ei entnommen, von seinem Chorion befreit, und in eine mit kaltem Hanksmedium vorbereitete Petrischale überführt werden. In dieser wird der Embryo mit einer Pinzette am Untergrund der Petrischale manuell fixiert, während mit einer zweiten Pinzette die Rückenhaut entlang der Wirbelsäule vorsichtig abgezogen wird (**Abb. 2.3 B**). Nach Überführung in eine neue Schale mit Hanksmedium wird die Haut nochmals mit Hanksmedium gespült und in eine mit F12-Medium (+10 % FCS und 2 % CS) vorbereitete Petrischale pipettiert. Anschließend werden die Hautstücke mit Hilfe eines Skalpell in kleine Stücke geschnitten und mit einer Pinzette am Boden der Petrischale angedrückt (**Abb. 2.3 C**).

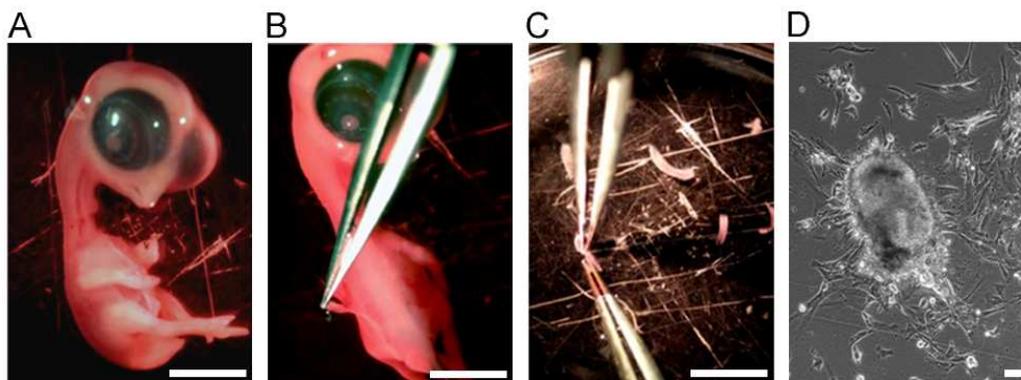


Abb. 2.3 Präparation primärer Hühnerfibroblasten

(A) Seitenansicht eines acht Tage alten Hühnerembryos. (B) Mithilfe einer sterilen Pinzette wird die Rückenhaut entfernt und (C) in eine neue Petrischale mit F12-Medium überführt. Dort werden die Hautstücke mechanisch zerkleinert und durch Andrücken am Schalenboden fixiert, um ein verbessertes Auswachsen der primären Hühnerfibroblasten zu ermöglichen. (D) Während einer nun folgenden, einwöchigen Inkubationsphase wandern die sich teilenden Zellen aus den Hautstücken aus und können anschließend in die Routinezellkultur übernommen werden. (A-C) Binokular 5x, Maßstab 0,5 cm; (D) Axiovert 200M 40x. Maßstabsbalken: 100 µm

Während einer einwöchigen Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 98 % gesättigte Luftfeuchtigkeit) wachsen die Zellen aus den Gewebestücken aus (**Abb. 2.3 D**) und können in eine Zellkulturflasche überführt werden. Unter Standardbedingungen werden die Zellen anschließend bis zur Passage 12 kultiviert.

2.3.3 Routine Zellkultur

Die Zelllinien A549, BRL, MEF und HFF (Kap. 2.3.1) sowie die primären Hühnerfibroblasten (PCFs) werden unter Standardbedingungen im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dreimal wöchentlich erfolgt unter sterilen Bedingungen die Passage der Zellen. Die Handhabung der verschiedenen Zelltypen unterscheidet sich dabei lediglich in der Zusammensetzung der Medien. Während BRL, MEF und HFF Zellen ein aus 10 % FCS angereichertes DMEM Medium erhalten, wird für A549 Zellen ein mit 10 % FCS angereichertes F12-K Medium verwendet. PCFs werden in F12 Medium mit 10 % FCS und 2 % CS kultiviert.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen unter Zugabe von 150 µl Trypsin/EDTA (**Tab. 2.2**) und einer 3-5 minütigen Inkubation im Brutschrank abgelöst. Zum Auswaschen der Trypsin/EDTA- Lösung werden die Zellen in 5 ml FCS-haltigem Medium aufgenommen und für 5 min (1000 U/min, RT) abzentrifugiert. Das dadurch erhaltene Pellet wird in 5 ml serumhaltigem Medium resuspendiert, und die Zellen in den jeweiligen Verdünnungen (1:5, 1:10, 1:15) auf die bereits mit dem Medium befüllten Kulturflaschen verteilt. Bei den PCFs wird jedes Umsetzen als Passage definiert, wobei für Experimente lediglich Zellen aus Charge 5 – 15 eingesetzt werden.

2.3.4 Auszählen der Zelldichte

Um eine standardisierte Zelldichte in den Experimenten zu gewährleisten, werden die Zellen vor der Aussaat mittels der Neubauerzählkammer ausgezählt. Dazu werden 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung versetzt und ein Tropfen in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine binden kann. Durch defekte Zellmembranen gelangt er in das Zytoplasma toter Zellen und färbt diese tiefblau. Lebende Zellen hingegen erscheinen unter dem Mikroskop hell. Die Zellzahl lebender Zellen wird aus vier Großquadraten der Neubauer-Zählkammer (entspricht 4 mm²) bestimmt.

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

Alternativ und schneller kann man die Zelldichte auch bestimmen, indem man die gemittelte Zellzahl mit dem Verdünnungsfaktor „2“ und 10⁴ multipliziert.

2.3.5 Transiente Transfektion der Zellen

2.3.5.1 Plasmide

Bei der „transienten Transfektion“ handelt es sich im Gegensatz zur „stabilen Transfektion“ um ein nur zeitweiliges Einbringen eines Plasmids in eine Wirtszelle.

Um dynamische Prozesse während der Haptotaxis genauer untersuchen zu können, werden Zeitrafferaufnahmen mit transient transfizierten PCFs und HFFs durchgeführt. Dazu werden die Zellen mit Plasmiden, die für Fluoreszenz-gekoppelte Zielproteine kodieren, transfiziert.

Zur Visualisierung der Organisation und Dynamik von Fokaladhäsionen werden $\alpha 5$ -Integrin-eGFP als auch Vinculin-eGFP Plasmide in PCFs eingesetzt. Für die Untersuchung der Mikrotubulidynamik und deren assoziierten Proteine (+TIPs) werden PCFs und HFFs mit unterschiedlichen Tubulin und EB-Protein kodierenden Plasmiden transfiziert (EB1-eGFP, EB3-eGFP, EB3-eGFP, EB3-RFP, CLIP170-eGFP, β -Tubulin-eGFP, Tubulin-RFP). Um den Einfluss der Rho GTPase Cdc42 und ihres downstream Effektors, der Proteinkinase α PKC ζ auf die Haptotaxis zu untersuchen, werden PCFs mit Wildtyp (wt) und dominant negativen (DN) Konstrukten dieser beiden Proteine transfiziert.

Bei PCFs erfolgt die Transfektion mittels Elektroporation (Kap.2.3.5.3), während bei HFFs aufgrund verbesserter Transfektions- und Überlebensraten die Lipofektion (Kap.2.3.5.4) eingesetzt wird. Alle verwendeten Plasmide sind in **Tab. 2.3** aufgelistet.

Tab. 2.3 Verwendete Plasmide

Plasmid	Fluorophor	Transfizierter Zelltyp	Herkunft
CLIP170	GFP	PCF, HFF	Niels Galjart, Amsterdam
EB1	GFP	PCF	Christoph Ballestrem, Manchester
EB3	GFP	PCF, HFF	Anna Akhmanova, Amsterdam
EB3	RFP	PCF	Christoph Ballestrem, Manchester
Cdc42-wt	dTom	PCF	Joel Levine, New York
Cdc42-DN	dTom	PCF	Joel Levine, New York
GM-130	eGFP	PCF	Emmanuel Reynaud, Heidelberg
Integrin-$\alpha 5$	eGFP	PCF	Addgene
αPKCζ-wt	eGFP	PCF	Joel Levine, New York
αPKCζ-DN	eGFP	PCF	Joel Levine, New York
Tubulin (β-)	GFP	PCF, HFF	Evrogen
Tubulin	RFP	PCF, HFF	Evrogen
Vinculin	eGFP	PCF	Clemens Franz, Karlsruhe

2.3.5.2 Plasmidvermehrung und -isolation

Zur Vermehrung der Plasmide werden die kompetenten Bakterien *E.coli* TOP10 verwendet. Diese werden mit den Plasmiden auf Eis vermischt und für 30 sec einem Hitzeschock (42 °C) ausgesetzt, um eine Aufnahme der Plasmide in die Bakterien zu gewährleisten. Anschließend wird ein fraktionierter Ausstrich auf LB/Amp- bzw. LB/Kan-Agarplatten angefertigt. Die transformierten Bakterien wachsen auf diesen Selektionsplatten über Nacht bei 37 °C und können am folgenden Tag gepickt werden. Die aus einer einzelnen Kolonie stammende 2 ml Übernachtskultur wird in 100 ml LB/Amp- bzw. LB/Kan-Flüssigmedium über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler weiterkultiviert. Die anschließende Extraktion und Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt mit dem „QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi“-Kit der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend des Herstellerprotokolls. Mit Hilfe eines NanoDrop (Thermo Scientific) wird am Ende die Konzentration der Plasmide bestimmt und auf 1 mg/ml eingestellt. Anschließend werden die Plasmide bis zu deren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.3.5.3 Elektroporation von primären Hühnerfibroblasten

Für die transiente Transfektion von PCFs wird das Verfahren der Elektroporation angewendet. Dabei wird durch das Anlegen eines elektrischen Feldes die Zellmembran permeabilisiert und somit die Aufnahme von Plasmiden ermöglicht.

Die zu 90 % konfluent gewachsenen Zellen werden zunächst unter Standardbedingungen aus einer 75 cm² Zellkulturflasche gelöst und abzentrifugiert (600 U/min, 5 min). Anschließend wird das Zellpellet in kaltem E-Puffer gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet kann nun erneut in kaltem E-Puffer aufgenommen und mit der entsprechenden Plasmid-DNA vermengt werden. In einer Küvette folgt die Elektroporation nach dem *exponential protocol* (250 V, 900 µF). Nach einer kurzen Ruhephase auf Eis werden die Zellen schließlich in das Kulturmedium aufgenommen und in einer 6 well Platte ausgesät. Je nach Art des verwendeten Plasmides erfolgt nun eine Inkubationsphase von 12 - 24 Stunden, bevor die transfizierten Zellen für Experimente eingesetzt werden.

2.3.5.4 Lipofektion von humanen Fibroblasten

Bei der transienten Transfektion von HFFs wird die Lipofektion mithilfe des Lipofectamine^R 2000 eingesetzt. Dieses Verfahren wird der Elektroporation bei den HFFs vorgezogen, da es weitaus schonender ist und eine bessere Transfektionsrate liefert. Bei der Lipofektion bindet die positiv geladene Kopfgruppe des polykationischen Lipid-Präparates an die negativ geladenen DNA-Moleküle (Plasmide). Dadurch erfolgt die Bildung von polykationischen Komplexen, die wiederum unspezifisch an die negativ geladene Oberfläche von Zellen binden und somit von diesen aufgenommen werden.

24 Stunden vor der Transfektion werden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/6 well in DMEM + 10 % FCS ausgesät. Unmittelbar vor der Transfektion wird das Medium abgesaugt

und durch Medium ohne FCS (Opti-MEM, Gibco) ersetzt. Für die Transfektion werden zunächst jeweils 10 % der eingesetzten Menge an Opti-MEM I Medium (250 µl) in zwei Eppendorfgefäßen vorgelegt. In einem Gefäß erfolgt die Zugabe des Plasmids, in dem Anderen die der Lipofektionslösung. Nach jeweils 10 min Inkubation werden beide Lösungen gemischt und nach weiteren 20 min zu den bereits mit Medium vorgelegten Zellen gegeben. Die Inkubation beträgt nun 3 - 5 Stunden, wobei die Bildung von pDNA- Agglomeraten als Zeichen einer erfolgreichen Lipofektion dient. Nachdem die Zellen abgelöst und in neue 6 well Platten überführt wurden, findet nun die Expression des Proteins statt. Die genaue Expressionszeit hängt dabei von der Art des verwendeten Plasmids ab und schwankt zwischen 12 und 24 Stunden. Danach können die Zellen für Experimente eingesetzt werden.

2.3.6 Inhibitionsexperimente

2.3.6.1 Störung der intrazellulären Kontraktilität

Die intrazelluläre Kontraktilität der Zellen wird mit Hilfe der beiden pharmakologischen Inhibitoren Y-27632 und Blebbistatin reduziert. Hierzu werden PCFs unter Standardbedingungen vom Routine-Substrat abgelöst und nach der Zentrifugation in Medium mit einer Inhibitorkonzentration von 100 - 1000 nM des Rho-Kinase-Inhibitors Y-27632 (Ishizaki *et al.*, 2000; Uehata *et al.*, 1997) aufgenommen (**Tab. 2.4**). Anschließend erfolgt zur Untersuchung der Polarisierung eine 30 minütige bzw. für den Haptotaxis-Assay eine 120 minütige Inkubation im Brutschrank, bevor die Zellen fixiert und das Aktin-Zytoskelett (grün), der Golgi-Apparat (rot), der Nukleus (blau) und der FN-Gradient (blau) immunhistochemisch angefärbt werden. Zur Inhibition der Myosin II ATPase wird Blebbistatin (Limouze *et al.*, 2004) mit einer Konzentration von 100 - 3000 nM (**Tab. 2.4**) eingesetzt. Die Inkubationszeiten und immunhistochemischen Färbungen für den Haptotaxis Assay entsprechen dabei denen bei der Y-27632 Behandlung.

Tab. 2.4 Verwendete Inhibitoren der intrazellulären Kontraktilität

Inhibitor	Funktion	Konzentrationen (nM)	Inkubationszeit (min)	Herkunft
Blebbistatin (Blebb)	hemmt Myosin II ATPase	100, 300, 500, 1000, 3000	120	Sigma-Aldrich
Y-27632	inhibiert Effektoren von Rho	100, 300, 500, 1000	30, 120	Sigma-Aldrich

2.3.6.2 Störung der Mikrotubulidynamik

Der Auf- und Abbau von Mikrotubulifilamenten wird durch den Einsatz der beiden pharmakologischen Inhibitoren Nocodazol und Taxol gestört. Dazu werden PCFs unter Standardbedingungen vom Substrat abgelöst und nach der Zentrifugation in Medium mit Nocodazol aufgenommen. Dies stört die Polymerisierung und somit den Aufbau von Mikrotubulifilamenten. Die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen reichen dabei von 25 bis

1000 nM (**Tab. 2.5**). Anschließend erfolgt wie in Kapitel 2.3.6.1 zur Untersuchung der Polarisierung eine 30 minütige bzw. für den Haptotaxis-Assay eine 120 minütige Inkubation im Brutschrank, bevor die Zellen fixiert und das Aktin-Zytoskelett (grün), der Golgi-Apparat (rot), der Nukleus (blau) und der FN-Gradient (blau) immunhistochemisch angefärbt werden. Neben der Inhibition mit Beginn der Kultivierung findet auch eine Inhibition nach Präinkubation der Zellen auf den Gradienten statt. Dabei lässt man die Zellen zuerst 30 min auf den Substraten adhären, bevor die entsprechende Menge an Nocodazol hinzugegeben wird.

Um die Depolymerisierung der Mikrotubuli, und somit deren Abbau, zu stören, wird Taxol mit einer Konzentration von 30-1000 nM (**Tab. 2.5**) eingesetzt. Die Inkubationszeiten und immunhistochemischen Färbungen für den Haptotaxis-Assay entsprechen dabei denen bei der Nocodazol Behandlung.

Tab. 2.5 Verwendete Inhibitoren der Mikrotubulidynamik

Inhibitor	Funktion	Konzentrationen (nM)	Inkubationszeit (min)	Herkunft
Nocodazol (Noc)	depolymerisiert MTs	25, 50, 100, 200, 300, 500, 1000	30, 120, nach 30 min Vorinkubation	Sigma-Aldrich
Taxol (Tax)	stabilisiert MTs	30, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000	120	Sigma-Aldrich

2.3.6.3 Inhibition der Proteinkinase C zeta (α PKC ζ)

Die Proteinkinase C zeta (α PKC ζ) wird mit Hilfe pharmakologischer Inhibition (*protein kinase C ζ pseudosubstrate*) gehemmt (**Tab. 2.6**). Hierzu werden PCFs unter Standardbedingungen vom Substrat abgelöst, nach der Zentrifugation in Medium mit α PKC ζ Inhibitor (iPKC ζ) aufgenommen und auf den entsprechenden Substraten kultiviert. Anschließend erfolgt die immunhistochemische Färbung, bei der das Aktin-Zytoskelett (grün), der Golgi-Apparat (rot), der Nukleus (blau) und das Substratmuster (blau) fluoreszent markiert werden. Für den Haptotaxis-Assay werden PCFs mit 10 bzw. 20 μ M iPKC ζ behandelt und für 120 min auf den Substraten inkubiert. Die gleichen Konzentrationen werden auch für den Wundheilungsassay (Kap. 2.5.4) eingesetzt, wobei hier die Kultivierungszeit der Zellen für die immunhistochemische Analyse bei 180 min, für die Zeitrafferuntersuchung (Kap. 2.5.3.3) bei 20 Stunden liegt. Die Morphologiestudien auf homogen FN-beschichteten Substraten erfolgen bei Konzentrationen von 5, 10 und 15 μ M iPKC ζ und einer Kultivierungszeit von 120 min.

Tab. 2.6 Verwendeter Inhibitor der Proteinkinase C zeta (α PKC ζ)

Inhibitor	Funktion	Konzentrationen (μ M)	Inkubationszeit (min)	Herkunft
iPKCζ	hemmt α PKC ζ	5, 10, 15, 20	180 (Haptotaxis) 1200 (Wundheilung)	Sigma-Aldrich

2.4 Immunhistochemie

Die Zellen werden bei Raumtemperatur für 10 min mit 4 % PFA in PBS fixiert und anschließend dreimal für jeweils 5 min mit 0,1 % Triton-X100 in PBS gewaschen und permeabilisiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern (**Tab. 2.7**) erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Dabei werden die Primärantikörper in 1 % BSA in PBS verdünnt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 0,1 % Triton-X100 in PBS erfolgt die Inkubation mit Sekundärantikörpern (**Tab. 2.8**) für ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Bei den Sekundärantikörpern handelt es sich um fluoreszenzmarkierte F(ab)₂-Fragmente, die wie die Primärantikörper in 1 % BSA in PBS verdünnt werden. Für die Färbung des Aktin-Zytoskeletts und des Nukleus wird dem Sekundärantikörper-Mix fluoreszenzmarkiertes Phalloidin oder DAPI zugegeben (**Tab. 2.9**). Abschließend erfolgt nochmals ein 3 x 5 minütiger Waschschrift mit 0,1 % Triton-X100 in PBS, bevor die Präparate in Mowiol eingebettet werden.

Um die Präparate vor Austrocknung und Konzentrationsschwankungen zu schützen, wird die Färbung auf einer hydrophob beschichteten Platte (z.B. Parafilm über Glas) in einer feuchten Färbekammer durchgeführt.

Tab. 2.7 Verwendete Primärantikörper (mkl = monoklonal, pkl = polyklonal) und ihre Verdünnungen in 1 % BSA in PBS

Antigen	Antikörper-Typ	Herkunft	Verdünnung
FAK	mkl IgG	BD Biosciences	1:100
Fibronektin	pkl IgG	Sigma-Aldrich	1:400
Fibronektin	mkl IgG	BD Transduction Labs	1:500
GM-130	mkl IgG	BD Transduction Labs	1 :400
Integrin (β1)	mkl IgG	DSHB	1:300
Paxillin	mkl IgG	BD Transduction Labs	1:500
p-FAK (Tyr397)	pkl IgG	Invitrogen	1:300
p-Paxillin (Tyr118)	pkl IgG	Cell Signaling	1 :400
p-Tyrosin (Tyr99)	mkl IgG	Santa Cruz Biotech	1:100
Talin	mkl IgG	Sigma-Aldrich	1:100
Tensin	mkl IgG	BD Transduction Labs	1:50
Tensin	mkl IgG	BD Transduction Labs	1:50
Tubulin (acetyl-)	mkl IgG	Sigma-Aldrich	1:400
Tubulin (detyr-)	pkl IgG	Millipore	1:200
Tubulin (tyr-) aus der Ratte	mkl IgG	abcam	1:200
Tubulin (α-)	mkl IgG	Serotec	1:200

Antigen	Antikörper-Typ	Herkunft	Verdünnung
Tubulin (β-)	pkl IgG	Sigma-Aldrich	1:200
Tubulin (γ-)	pkl IgG	Sigma-Aldrich	1:800
Vinculin	mkl IgG	Sigma-Aldrich	1:100

Tab. 2.8 Verwendete Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen in 1 % BSA in PBS

Antigen	Farbstoff	Herkunft	Verdünnung
Maus IgG	AMCA	Dianova	1:200
Maus IgG	Alexa488	Molecular Probes	1:200
Maus IgG	Cy3	Dianova	1 :500
Maus IgG	Cy5	Dianova	1:200
Kaninchen IgG	AMCA	Dianova	1:200
Kaninchen IgG	Alexa488	Molecular Probes	1:200
Kaninchen IgG	Cy3	Dianova	1 :500
Kaninchen IgG	Cy5	Dianova	1:200
Ratte IgG	Alexa488	Invitrogen	1:200

Tab. 2.9 Verwendete Färbesubstanzen und ihre Verdünnungen in 1 % BSA in PBS

„Antigen“	Farbstoff	Herkunft	Verdünnung
Aktin	Alexa488	Molecular Probes	1:200
Aktin	Alexa594	Molecular Probes	1:200
DANN	DAPI	Sigma-Aldrich	1:1000

2.5 Quantifizierung

2.5.1 Verwendete Optiken zur Analyse der Präparate

2.5.1.1 Mikroskope und Objektive

Apotom Imager Z1, Carl Zeiss:	Aufrechtes Mikroskop; Streifenprojektion mittels optischem Gitter <ul style="list-style-type: none"> • EC Plan NEOFLUAR 20x/0.50 • EC Plan NEOFLUAR 40x/0.75 • Plan APOCHROMATE 63x/1.4 Oil
Axioplan, Carl Zeiss:	Aufrechtes Mikroskop mit Durchlicht und Fluoreszenzlicht <ul style="list-style-type: none"> • Ph1 Plan NEOFLUAR 10x/0.30 • Ph2 Plan NEOFLUAR 20x/0.50
Axiovert 200M, Carl Zeiss:	Inverses Mikroskop mit Durchlicht, Fluoreszenzlicht, CO ₂ -, Temperatur- und Kontrolleinheit <ul style="list-style-type: none"> • EC Plan NEOFLUAR 20x/0.50 • EC Plan NEOFLUAR 40x/0.75
LSM 510 Meta, Carl Zeiss:	Inverses, konfokales Laser Scanning Mikroskop <ul style="list-style-type: none"> • LCI Plan NEOFLUAR 63x/1.3 DIC ImKorr
Elyra PS.1, Carl Zeiss:	Inverses, hochauflösendes Mikroskop mit strukturierter Beleuchtung, HR-SIM(<i>structured illumination microscopy</i>) <ul style="list-style-type: none"> • Plan APOCHROMATE 63x/1.4 Oil
SteReo Discovery.V12, Carl Zeiss:	Binokular

Filtersätze: GFP (38 HE, Zeiss), AlexaFluor 647 (50, Zeiss), DsRed (43, HE, Zeiss), DAPI (49, HE, Zeiss)

2.5.2 Verwendete Software zur Bildbearbeitung und Auswertung

AxioVision Rel.4.7 (Carl Zeiss), Corel DRAW X3 (Corel), ImageJ (Wayne Rasband)
MetaMorph 3.0 (Visitron), Microsoft Office 2007 (Microsoft), Photoshop CS2 (Adobe)

2.5.3 Haptotaxis Assay

Zur Untersuchung der Migration auf adhäsiven, mikrostrukturierten FN-Dotgradienten werden Zellen aus Kulturflaschen verwendet, die zu 60 - 80 % konfluent bewachsen sind. Die mit Trypsin/EDTA abgelösten Zellen werden in serumhaltigem F12 Medium aufgenommen, 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und das erhaltene Pellet in Medium resuspendiert. Die mit der Gradientenstruktur (Abb. 2.1) bestempelten und mit FN-beschichteten Deckgläser werden in 6 well Platten mit Medium überschichtet und im Inkubator akklimatisiert. Anschließend erfolgt die Zellkultivierung auf den Substraten. Für die Untersuchung der Migration werden PCFs und HFFs zwei Stunden unter Standardbedingungen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 98 % gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert, während die Zeitspanne bei A549, BRLs und MEFs neben zwei auch sechs Stunden beträgt. Für die Analyse der intrazellulären Polarisierung während des Spreadings und der Migration auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten werden die Versuche 30 min, 45 min, 60 min und 120 min nach der Aussaat von PCFs abgestoppt. Anschließend erfolgt die Fixierung und die immunhistochemische Färbung, bei der die zytoskelettalen Filamente (Aktin, Mikrotubuli, posttranslationale Modifikationen), Fokalkontakte, Polarisierungsmarker (Golgi-Apparat, Zentrosom), der Nukleus und der FN-Gradient angefärbt werden.

2.5.3.1 Bestimmung der Migrationsrichtung

Die Migrationsrichtung von Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten wird bestimmt. Da die Zellen während der Migration die FN-Dots am Hinterende ablösen, lässt sich die Migrationsrichtung anhand immunhistochemischer Färbung des FN-Substrates und der fehlenden Dots leicht nachvollziehen (**Abb. 2.4, blauer Pfeil**). Für die Statistik werden dabei nur Einzelzellen gewertet, die mindestens 2 FN-Dotdistanzen in y-Richtung (also entlang der Gradientenachse) bedecken und somit die Möglichkeit haben, den Gradienten aufgrund einer Zunahme der Proteindichte wahrzunehmen. Desweiteren müssen diese Zellen vollständig im Gradientenfeld lokalisiert sein und dürfen keinen Kontakt zu dem umgebenden, homogen FN-beschichteten Bereich ausbilden, da dies den Effekt des Proteingradienten zunichte machen würde.

Für die Analyse der Migration auf adhäsiven, mikrostrukturierten FN-Dotgradienten sind vier unterschiedliche Verhaltensmuster zu beobachten.

- (1) Zellmigration entlang der y-Gradientenachse nach oben (**uphill**) in Richtung der zunehmenden Proteindichte (= Haptotaxis)
- (2) Zellmigration entlang der y-Gradientenachse nach unten (**downhill**) in Richtung der abnehmenden Proteindichte
- (3) Zellmigration seitlich (**lateral**) zur y-Gradientenachse entlang der x-Achse
- (4) Zellen, die keine Migration zeigen und stationär verbleiben

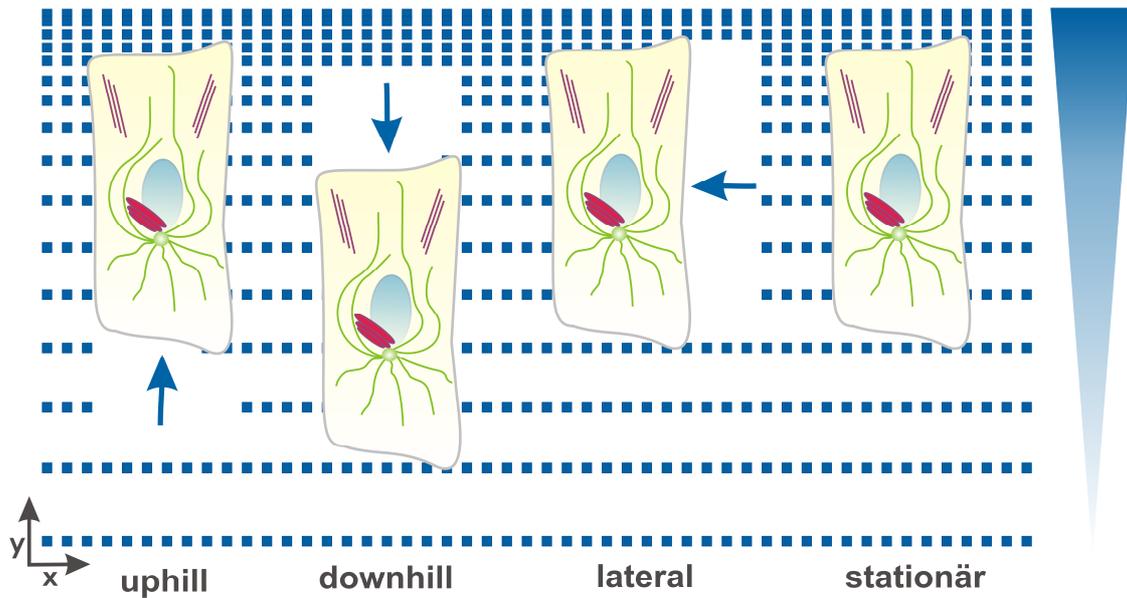


Abb. 2.4 Bestimmung der Migrationsrichtung auf mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten

Gezeigt ist eine schematische Darstellung der verschiedenen Migrationsrichtungen (blauer Pfeil) auf mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten (FN). Durch die Abnahme der FN-Dotabstände von anfangs 20 μm auf 0 μm in y-Richtung entsteht ein Gradient. Dieser verläuft hier und in allen nachfolgenden Abbildungen immer von unten nach oben (blaues Dreieck). Die prozentuale FN-Bedeckung nimmt somit von unten nach oben entlang der y-Achse zu. Da die Zellen während der Migration die FN-Dots am Hinterende ablösen, lässt sich die Migrationsrichtung anhand immunhistochemischer Färbungen des FN-Substrates und der fehlenden Dots leicht nachvollziehen. Wandert eine Zelle entlang der y-Gradientenachse in Richtung der höheren FN-Dichte, wird sie als uphill migrierend definiert (= Haptotaxis). Bei einer Migration in die entgegengesetzte Richtung, also zur niedrigeren Proteinbedeckung FN, wird die Zelle als downhill migrierend gewertet. Lateral wandern diejenigen Zellen, die sich senkrecht zur y-Gradientenachse entlang der x-Achse bewegen. Zellen, die keine Dots entfernen, zeigen kein Migrationsverhalten im Gradienten und sind deshalb stationär.

2.5.3.2 Bestimmung der Zellpolarisierung

Um die Polarisierung von haptotaktisch wandernden Zellen auf FN-Gradienten zu untersuchen, wird die intrazelluläre Position des Golgi-Apparates und des Zentrosoms als Indikator der Polarisierung verwendet. Dabei wird die Lokalisation in Relation zum Nukleus und der Migrationsrichtung ausgewertet (**Abb. 2.5**). Folgende Definition bezüglich einer uphill wandernden Zelle wird festgelegt: Als das Vorderende einer Zelle wird derjenige Teil bezeichnet, der in Richtung der höheren Strukturichte ausgerichtet ist. Demzufolge zeigt das Hinterende der Zelle zur niedrigeren FN-Bedeckung. Anhand dieser Definition kann die Polarisierung in drei Kategorien erfolgen:

- (1) Lokalisation des Golgi-Apparates bzw. des Zentrosoms zwischen dem Nukleus und dem Zellvorderende (**uphill**)
- (2) Lokalisation des Golgi-Apparates bzw. des Zentrosoms zwischen dem Nukleus und dem Zellhinterende (**downhill**)
- (3) Seitliche Lokalisation des Golgi-Apparates bzw. des Zentrosoms (**lateral**)

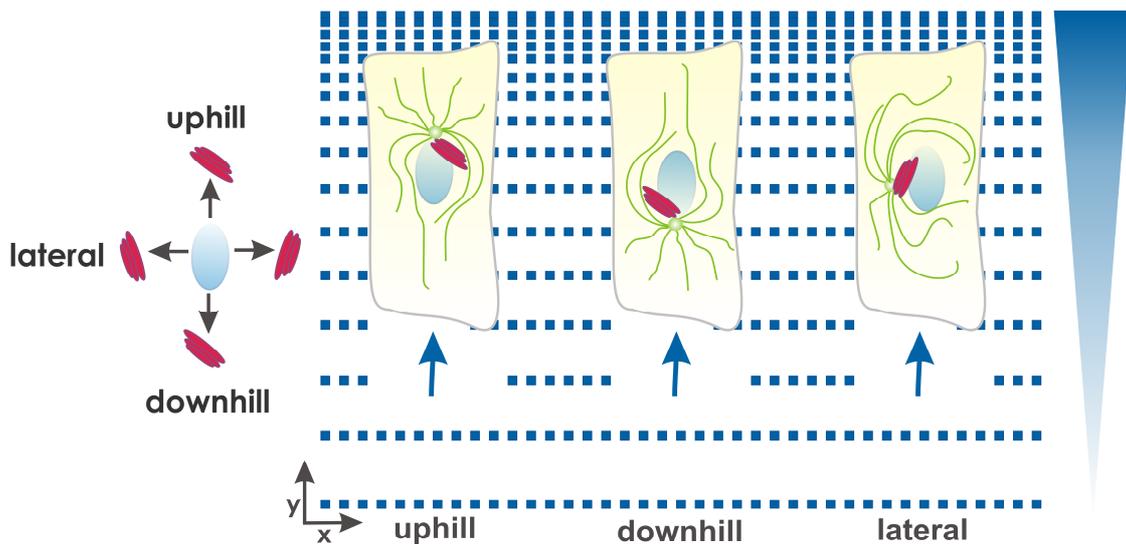


Abb. 2.5 Bestimmung der Polarisation auf mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten

Gezeigt ist eine schematische Darstellung haptotaktisch wandernder Zellen auf mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten (FN). Der Gradient verläuft von unten nach oben, und die prozentuale FN-Bedeckung nimmt entlang der y-Achse von unten nach oben hin zu (blaues Dreieck). Die Polarisation wird anhand der intrazellulären Lokalisation des Golgi-Apparates bzw. des Zentrosoms bestimmt. Dabei wird die Position in Relation zum Nucleus und der Migrationsrichtung ausgewertet. Das Vorderende einer Zelle ist in Richtung der höheren Proteinbedeckung ausgerichtet, während das Hinterende zur niedrigeren Strukturichte zeigt. Die Polarisation kann in drei Kategorien erfolgen: (1) Befindet sich der Golgi-Apparat/das Zentrosom zwischen dem Nucleus und dem Vorderende, wird die Zelle als uphill polarisiert bezeichnet. (2) Bei einer Lokalisation zwischen dem Nucleus und dem Hinterende hingegen als downhill polarisiert. (3) Zellen, bei denen der Golgi-Apparat/das Zentrosom seitlich und somit weder zum Vorder- noch Hinterende positioniert ist, sind lateral polarisiert.

2.5.3.3 Zeitrafferuntersuchungen zur Visualisierung der Haptotaxis

Für die Untersuchung der Migration von PCFs auf FN-Dotgradienten werden Zeitrafferaufnahmen durchgeführt. Um eine visuelle Darstellung der FN-Strukturen während der Aufnahme zu gewährleisten, wird der FN-Lösung während der Substratbeschichtung 10 % Alexa546- fluoreszenzmarkiertes BSA beigemischt. Da die Zeitrafferuntersuchungen an einem inversen Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss) erfolgen, müssen spezielle Glasboden-Petrischalen (MatTek Corporation) verwendet werden.

Primäre Hühnerfibroblasten werden wie beschrieben (Kap. 2.3.3) vom Routine-Substrat abgelöst und auf den mikrostrukturierten Substraten in 6 well Platten ausgesät. Direkt im Anschluss erfolgt eine ca. 30 - 45 minütige Inkubation im Brutschrank. Diese Zeitspanne reicht aus, damit die Zellen an das Substrat anheften. Nach erfolgreicher Adhäsion werden die Substrate vorsichtig entnommen, umgedreht und in mit serumhaltigem F12-Medium befüllte Glasboden-Petrischalen gelegt. Während der Zeitrafferaufnahmen werden die Zellen in einer Inkubationskammer auf dem Mikroskop bei Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, 98 % gesättigte Luftfeuchtigkeit) gehalten. DIC-Bilder werden mit einem Standardfilterset (Omega) und einer CCD-Kamera gemacht. Die Zellen werden maximal fünf Stunden lang aufgenommen, wobei das Zeitintervall für die Bildaufnahme je nach Experiment divergiert (10, 15 min).

2.5.3.4 Messung der prozentualen Fibronektin-Bedeckung

Um die Migrationsrate in Relation zur dargebotenen FN-Menge zu untersuchen, wird jeweils die prozentuale FN-Bedeckung der FN-Dotgradienten mit kleinen Dots (Gradient S; $2 \times 2 \mu\text{m}$), großen Dots (Gradient SD; $3,5 \times 3,5 \mu\text{m}$) und rechteckigen Dots (Gradient SR; $3 \times 2 \mu\text{m}$) (**Abb. 2.6**) bestimmt. Hierzu verwendet man eine 20-fach vergrößerte Fluoreszenzaufnahme des jeweils auszuwertenden FN-Dotgradienten und ermittelt die prozentuale FN-Verteilung in dem Teilbereich des Gradienten, in dem theoretisch Haptotaxis stattfinden kann. Dieser Auswertungsbereich (**Abb. 2.6, grüner Balken**) umfasst entlang der y-Gradientenachse eine Länge von insgesamt $123 \mu\text{m}$. Das Zellen nur in diesem Bereich haptotaktisch migrieren, liegt daran, dass sie bei einer geringeren Strukturdicke (etwa ab einem Dotabstand von mehr als $15 \mu\text{m}$) häufig nur noch eine FN-Dotdistanz entlang der y-Gradientenachse überbrücken können und somit nicht mehr in der Lage sind, die Änderung der Proteindichte wahrzunehmen. Der Auswertungsbereich entspricht in etwa 3 Zelllängen und wird nochmals in 3 Segmente unterteilt. Segment 1 weist dabei die höchste FN-Dichte auf, während in Segment 3 die geringste FN-Bedeckung zu verzeichnen ist.

Die Auswertung der Fluoreszenzbilder erfolgt mit Hilfe der MetaMorph Software und eines Schwellenwertes, der die Pixelintensität so festlegt, dass sich das zu messende Signal, also in diesem Fall die FN-Dots, klar vom Hintergrund abhebt. Anhand dieses Schwellenwertes wird dann die Korrektur der zu quantifizierenden Region und somit deren Fläche automatisch erfasst.

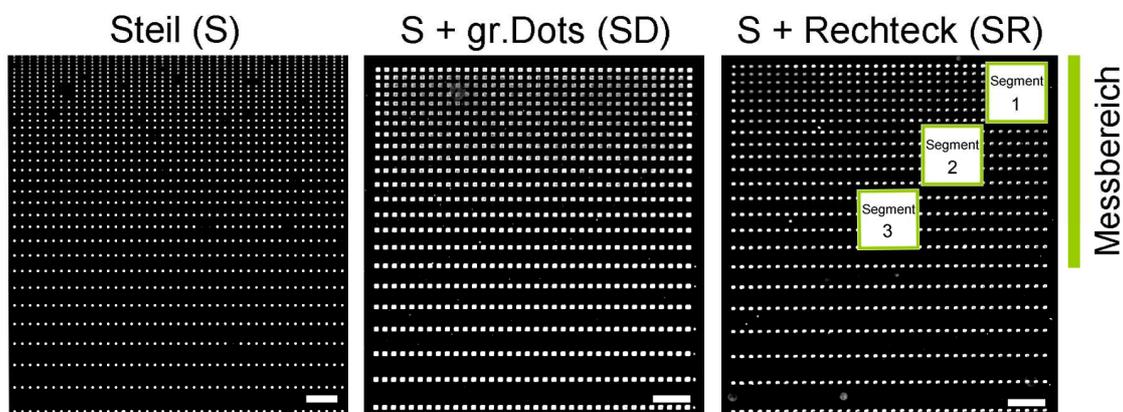


Abb.2.6 Messung der prozentualen Fibronektin-Bedeckung

Die Fibronektin-Dotgradienten (FN) mit kleinen Dots (Gradient S; $2 \times 2 \mu\text{m}$), großen Dots (Gradient SD; $3,5 \times 3,5 \mu\text{m}$) und rechteckigen Dots (Gradient SR; $3 \times 2 \mu\text{m}$) werden fluoreszent markiert und mikroskopiert. Die Messung der prozentualen FN-Bedeckung des Gradienten erfolgt in einem definierten Auswertungsbereich (grüner Balken), in dem theoretisch Haptotaxis stattfinden kann und der entlang der y-Gradientenachse eine Länge von insgesamt $123 \mu\text{m}$ umfasst. Der Auswertungsbereich entspricht in etwa 3 Zelllängen und wird nochmals in 3 Segmente unterteilt. Segment 1 weist dabei die höchste FN-Dichte auf, während in Segment 3 die geringste FN-Bedeckung zu verzeichnen ist. Die Messung der prozentualen FN-Bedeckung erfolgt mit Hilfe der MetaMorph Software. Hierbei wird ein Schwellenwert angelegt, der die Pixelintensität so festlegt, dass sich das zu messende Signal, also in diesem Fall die FN-Dots, klar vom Hintergrund abhebt. Maßstabsbalken: $20 \mu\text{m}$

2.5.4 Wundheilungsassay

Zur Untersuchung der Wund-induzierten Migration werden die Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten ausgesät und dem Zellmonolayer nach Erreichen einer konfluenten Zelldichte (12 Stunden) eine scharfe Wunde zugefügt. Durch diese manuelle Läsion eines Zellmonolayers wird eine „Wunde“ simuliert, in welche die Zellen gezielt einwandern. Es folgen immunhistochemische Färbungen und Zeitrafferuntersuchungen. Für die immunhistochemische Analyse werden die Zellen (unbehandelt oder mit iPKC ζ behandelt, Kap. 2.3.6.3) drei Stunden nach dem Verwunden des Monolayers fixiert und das Aktin-/bzw. das Mikrotubuli-Zytoskelett (grün), der Golgi-Apparat (rot) und der Nukleus (blau) angefärbt. Es folgen Aufnahmen mit herkömmlicher Epifluoreszenz, dem Apotom-Modus oder mittels hoch auflösender SIM-Mikroskopie. Für die Zeitrafferuntersuchungen gelten dieselben Rahmenbedingungen wie unter Kapitel 2.5.3.3 bereits erläutert, wobei hier die Glasboden-Petrischalen mit FN beschichtet und anschließend mit Zellen kultiviert werden. Nach der manuell induzierten Wunde wird die Glasboden-Petrischale in die Inkubationsvorrichtung des Mikroskops gestellt und das Schließen der Wunde für etwa 20 Stunden in Intervallen von 15 min detektiert.

2.5.4.1 Quantifizierung der Zeitrafferaufnahmen

Um die Migrationsgeschwindigkeit und Migrationsrichtung der Zellen im Wundheilungsassay zu ermitteln, wird das *Manual Tracking Tool* von ImageJ eingesetzt. Diese Software ermöglicht das Erfassen einzelner Zellen und gibt daher Aufschluss über die Migrationsgeschwindigkeit, die zurückgelegte Wegstrecke und die Persistenz. Unter Persistenz versteht man hierbei die Abweichung von der Strecke zwischen Anfangs- und Endpunkt der Zellmigration. Der direkte Weg, vergleichbar mit der Luftlinie, erhält den Wert 1. Je ungerichteter die Zelle in die Wunde einwandert, desto mehr weicht der Persistenzwert in Richtung 0 ab. Um die Länge a_L der Strecke zwischen Anfangs- und Endpunkt zu berechnen, wird folgende Formel angewendet:

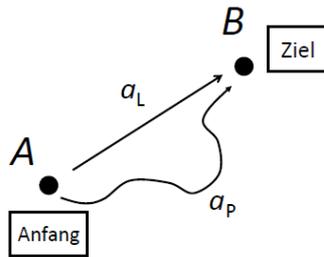
$$a_L = \sqrt{(x_A - x_E)^2 + (y_A - y_E)^2}$$

Dabei besitzt der Anfangspunkt die Koordinaten $(x_A|y_A)$ und der Endpunkt $(x_E|y_E)$. Diese Werte werden von der Software ImageJ direkt im Anschluss an das Erfassen der Zelle ermittelt. Während sich die Zelle innerhalb des detektierten Zeitraumes von 20 Stunden vom Anfangs- bis zum Endpunkt bewegt, wird sie n -mal aufgenommen. Bei einem Zeitintervall von 15 min wird der Gesamtweg der Zelle somit in 80 Teilstrecken mit jeweils Anfangs- und Endpunkt zerlegt. Mithilfe der folgenden Formel können alle Teilstrecken berechnet und zur insgesamt zurückgelegten Strecke a_p aufsummiert werden.

$$a_p = \sum_{i=1}^n \sqrt{(x_i - x_{i+1})^2 + (y_i - y_{i+1})^2}$$

Zur Berechnung der Persistenz wird der Quotient aus direkter Entfernung a_L (Luftlinie) und der tatsächlich zurückgelegten Wegstrecke a_p gebildet:

$$P = \frac{a_L}{a_p}$$



2.5.5 Statistische Tests

Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgt in Excel mit dem zweiseitigen Zwei-Stichproben-t-Test oder alternativ mit dem χ^2 -Test. Dabei werden Werte von $p < 0,05$ mit *, $p < 0,01$ mit ** und $p < 0,001$ mit *** gekennzeichnet und als signifikant eingestuft.

3 Ergebnisse

Bisherige Erkenntnisse über die Haptotaxis stammen aus *in vitro* Systemen, bei denen ausnahmslos kontinuierlich verlaufende Gradienten aus ECM-Proteinen verwendet wurden (Wu *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2009; Rhoads und Guan, 2007). Diese ECM-Proteingradienten spiegeln nur bedingt die realen, physiologischen Bedingungen wider, da Zellen *in vivo* ihre aus ECM-Proteinen bestehenden Adhäsionspunkte (wie z.B. Fibronectin) strukturiert verteilt vorfinden. Aus diesem Grund werden in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung der Haptotaxis diskontinuierliche, mikrostrukturierte ECM-Proteingradienten verwendet.

Damit Zellen gerichtet in einem ECM-Proteingradienten migrieren können, bedarf es zunächst einer Zellpolarisierung. Studien an chemotaktisch wandernden Zellen und in Wundheilungsassays haben gezeigt, dass die Zellpolarisierung durch die Ausbildung eines definierten Zellvorder- und Hinterendes gekennzeichnet ist und vor allem auf einer Reorganisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts (Goode *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2003), sowie einer Relokalisierung des Zentrosoms und des Golgi-Apparates beruht. Reguliert wird die Zellpolarisierung in erster Linie durch die Familie der kleinen Rho GTPasen, wobei Cdc42 und ihre Effektoren eine Schlüsselrolle einnehmen (Bergmann *et al.*, 1983; Manneville *et al.*, 2010). Da über die Regulationsmechanismen während der Haptotaxis noch wenig bekannt ist (Kap.1.7), werden diese in der folgenden Arbeit näher untersucht. Dabei erfolgt folgende Untergliederung:

In **Kapitel 3.1** wird mit Hilfe von Zeitrafferaufnahmen und immunhistochemischen Färbungen die Haptotaxis auf diskontinuierlichen, mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten (FN) untersucht. Hierbei wird auch der Einfluss der FN-Konzentration, der Gradientensteigung sowie unterschiedlicher Dotgeometrien auf die Direktionalität und Geschwindigkeit der Zellmigration geprüft.

Anschließend erfolgt in **Kapitel 3.2** eine Analyse der Zellpolarisierung auf den FN-Gradienten. Neben der morphologischen Polarisierung steht hier vor allem die intrazelluläre Polarisierung mit der Lokalisation des Golgi-Apparates und des Zentrosoms im Vordergrund.

Nach der Untersuchung der Zellpolarisierung befasst sich **Kapitel 3.3** mit der Bedeutung des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts für die Haptotaxis und die Zellpolarisierung. Hierzu werden unterschiedliche pharmakologische Inhibitoren der intrazellulären Aktin-/Myosin Kontraktilität (Y-27632, Blebbistatin) sowie der Mikrotubulidynamik (Taxol, Nocodazol) eingesetzt.

In **Kapitel 3.4** wird die Wirkung der kleinen Rho GTPase Cdc42 und ihres Effektors, der Proteinkinase α PKC ζ auf die Haptotaxis und die Zellpolarisierung geprüft. Neben einer pharmakologischen Inhibition (Pseudosubstrate α PKC ζ) kommen hierbei auch dominant negativ agierende Proteine zum Einsatz (Cdc42-DN, α PKC ζ -DN).

3.1 Migrationsverhalten auf mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten

Zur Untersuchung der haptotaktischen Migration werden diskontinuierliche, mikrostrukturierte ECM-Proteingradienten verwendet. Die gradierte Protein-Verteilung wird hierbei mit Hilfe eines Dotmusters (Dot = Punkt) erzeugt, bei dem die Abstände zwischen benachbarten Dots in einer Reihe (x-Richtung) unverändert bleiben, während in der dazu senkrechten Richtung (y) die Abstände zwischen den Dotreihen kontinuierlich abnehmen. In y-Richtung liegen die Dots also immer dichter beieinander, wodurch der Proteinanteil pro Substratfläche steigt (**Abb. 3.1 A**). Das Protein, mit dem der Gradient erzeugt wird, ist FN. Als Multiadhäsionsmatrixprotein und Hauptbestandteil der ECM trägt es maßgeblich zur Zellmigration bei, indem es die Zelladhäsion vermittelt und somit die Zellform und die Organisation des Zytoskeletts reguliert. In **Abbildung 3.1 B** ist der Ausschnitt eines FN-Gradienten gezeigt, auf dem Zellen für zwei Stunden kultiviert und anschließend immunhistochemisch angefärbt wurden.

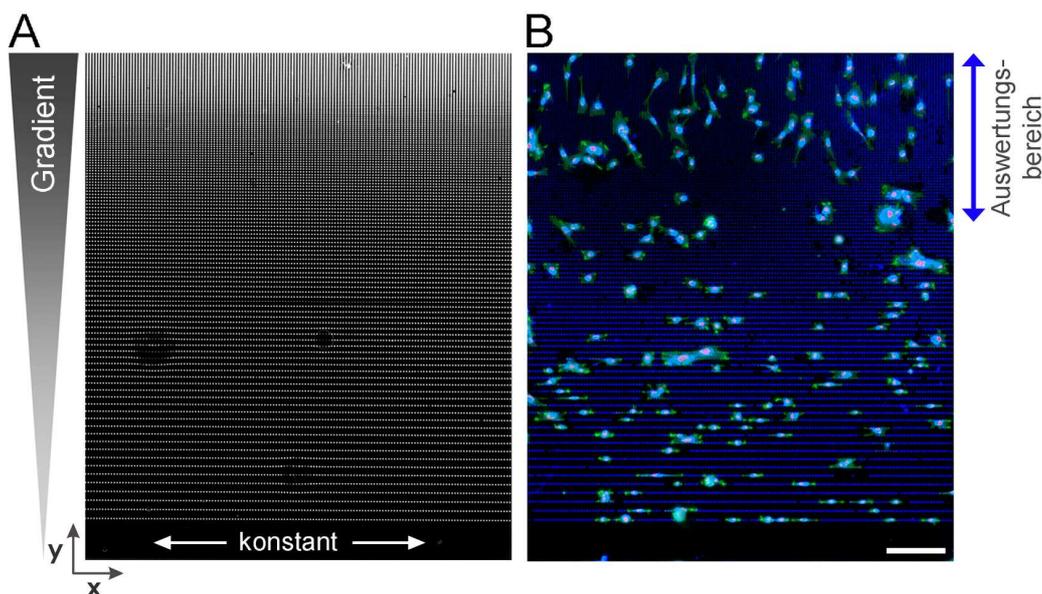


Abb. 3.1 Übersichtsaufnahme des mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten

In **(A)** ist eine Übersichtsaufnahme des mikrostrukturierten Fibronektin-Gradienten (FN) gezeigt, mit dem in dieser Arbeit die grundlegenden Mechanismen der Haptotaxis untersucht wurden. Die gradierte FN-Verteilung wird mit Hilfe eines Dotmusters (Dot = Punkt) erzeugt, bei dem die Abstände zwischen benachbarten Dots in einer Reihe (x-Richtung) unverändert bleiben, während in der dazu senkrechten Richtung (y) die Abstände zwischen den Dotreihen kontinuierlich abnehmen. Somit liegen in y-Richtung die Dots immer dichter beieinander, wodurch der Proteinanteil pro Substratfläche steigt und der Proteingradient von unten nach oben verläuft. Demnach befindet sich die höchste Proteinbedeckung an der Oberseite des Bildes. **(B)** zeigt einen Ausschnitt eines FN-Dotgradienten, auf dem Zellen für zwei Stunden kultiviert und anschließend das Aktin-Zytoskelett (grün), der Golgi-Apparat (rot), der Nukleus (blau) und das Substrat (blau) immunhistochemisch angefärbt wurden. Für die Auswertung werden lediglich die Zellen im oberen Drittel des Gradienten berücksichtigt (blauer Pfeil). Maßstabsbalken: 100 μm

Zur Untersuchung der Zellmigration auf adhäsiven, mikrostrukturierten FN-Dotgradienten werden folgende Definitionen festgelegt (Abb. 2.4, Seite 51):

- (1) Die Migration entlang der y -Gradientenachse in Richtung der höheren Proteindichte wird als **uphill** bezeichnet (= Haptotaxis)
- (2) Die Migration entlang der y -Gradientenachse in Richtung der niedrigeren Proteindichte wird als **downhill** definiert
- (3) Die Migration senkrecht zur y -Gradientenachse, entlang der x -Achse, wird **lateral** genannt
- (4) Zellen, die keine Migration zeigen, werden als **stationär** bezeichnet

Für die Experimente werden primäre Hühnerfibroblasten (*primary chicken fibroblasts* = PCF) verwendet. Primärzellen sind im Gegensatz zu herkömmlichen Zelllinien nicht immortalisiert und damit quasi `unsterblich`, sondern werden direkt aus dem lebenden Organismus extrahiert. Sie haben somit den entscheidenden Vorteil, dass sie mehr dem natürlichen System entsprechen und keine Veränderungen ihres Metabolismus durch eine Immortalisierung erfahren.

3.1.1 Primäre Hühnerfibroblasten zeigen Haptotaxis

Um die Dynamik einer Migration zu erfassen, werden zunächst Zeitrafferuntersuchungen durchgeführt. Einige Zeitpunkte einer solchen DIC-Video-Zeitrafferuntersuchung von insgesamt drei Stunden sind in **Abbildung 3.2 B** gezeigt. Der Gradient wurde nachträglich hinterlegt (weiße Dots). Innerhalb der ersten 100 min der Aufnahme spannt sich die Zelle über dem Substratmuster auf. Hierbei nimmt sie eine stark asymmetrische Morphologie an und elongiert entlang der Gradientenachse, wobei sie hier mehrere Dottreihen überspannt. Im weiteren Verlauf stabilisiert sie ihr Vorderende, während das Hinterende immer schmaler wird und sich letztendlich ablöst. Die Zelle wandert somit uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung und zeigt demzufolge Haptotaxis (**Abb. 3.2 A, B**). Weitere Zeitrafferuntersuchungen ergaben, dass nahezu 80 % der Zellen haptotaktisch wandern (n = 24) (**Abb. 3.2 C**).

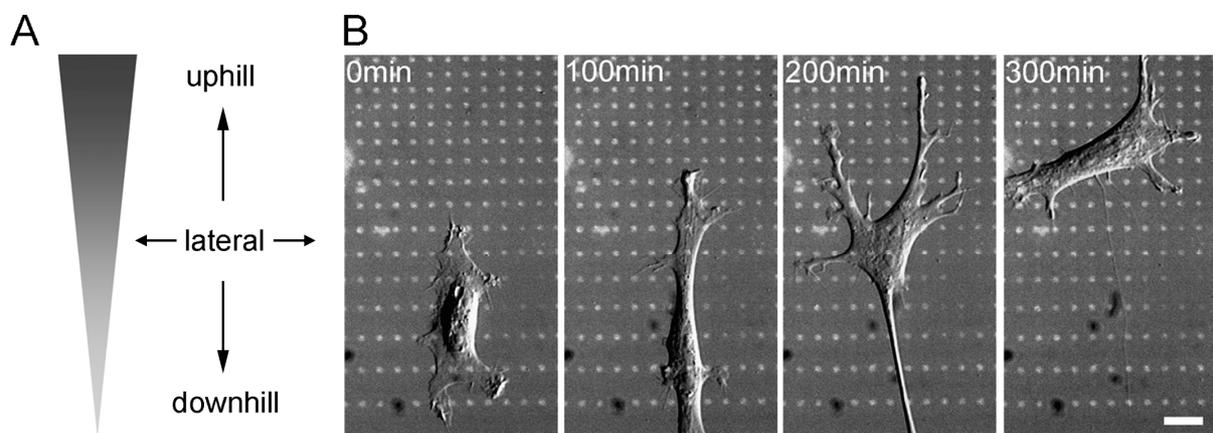


Abb. 3.2 Haptotaxis von primären Hühnerfibroblasten (PCF)

In **(A)** sind mit Hilfe eines Dreiecks der Gradientenverlauf und die Definition der Migrationsrichtung angezeigt. Wandert eine Zelle entlang der y-Gradientenachse nach oben zur höheren FN-Bedeckung, wird sie als uphill migrierend gewertet. Bei einer Migration entlang der y-Gradientenachse in Richtung der niedrigeren FN-Dichte hingegen als downhill migrierend. Wandert die Zelle seitlich zur y-Gradientenachse, entlang der x-Achse, wird sie als lateral migrierend betrachtet. In **(B)** ist die DIC-Video-Zeitrafferaufnahme einer haptotaktisch migrierenden, PCF-Zelle gezeigt. Der Gradient verläuft von unten nach oben zur höheren FN-Bedeckung hin und wurde nachträglich hinterlegt (weiße Dots). Beim Aufspannen innerhalb der ersten 100 min über dem Substrat nimmt die Zelle eine stark asymmetrische Form an. Dabei elongiert sie entlang der y-Gradientenachse, wobei sie mehrere Dottdistanzen in vertikaler Richtung überbrückt. Im weiteren Verlauf stabilisiert sie ihr Vorderende (200 min), das zur höheren Proteindichte zeigt. Währenddessen wird das Hinterende schmaler und löst sich letztendlich ab (300 min). Die Zelle wandert uphill in Richtung der höheren Proteindichte und zeigt demzufolge Haptotaxis. In **(C)** ist der Migrationsweg einzelner, haptotaktisch wandernder Zellen (n = 10) mit Hilfe der Software ImageJ dargestellt. Diese Grafik verdeutlicht, dass die Zellen sehr direktional uphill wandern. Maßstabsbalken: 10 μm

Die Zeitrafferaufnahmen wurden durch Auswertung von immunhistochemischen Färbungen bestätigt. Hierzu wurden PCFs auf den mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert (120 min) und anschließend das Aktin-Zytoskelett und das FN-Muster fluoreszent markiert (**Abb. 3.3 A**). Betrachtet man eine wandernde Zelle auf dem Gradientenmuster, so zeigt sich, dass diese die FN-Dots vom Untergrund ablöst (Lehnert *et al.*, 2004). Dadurch hinterlässt sie bei ihrer Migration eine FN freie Spur auf dem Substrat (**Abb. 3.3 A, Pfeil**). Anhand dieser Spur kann man präzise die Migrationsrichtung erkennen und quantifizieren, mit welchem Prozentsatz die Zellen uphill, downhill oder lateral wandern. Auch hier zeigen über 80 % aller Zellen Haptotaxis, während die restlichen 20 % downhill in Richtung der niedrigeren Proteinbedeckung migrieren (**Abb. 3.3 B**) (N = 6; n = 165). Da lateral wandernde und stationäre Zellen einen Prozentsatz von < 10 % ausmachen, werden sie nicht in die Auswertung miteinbezogen.

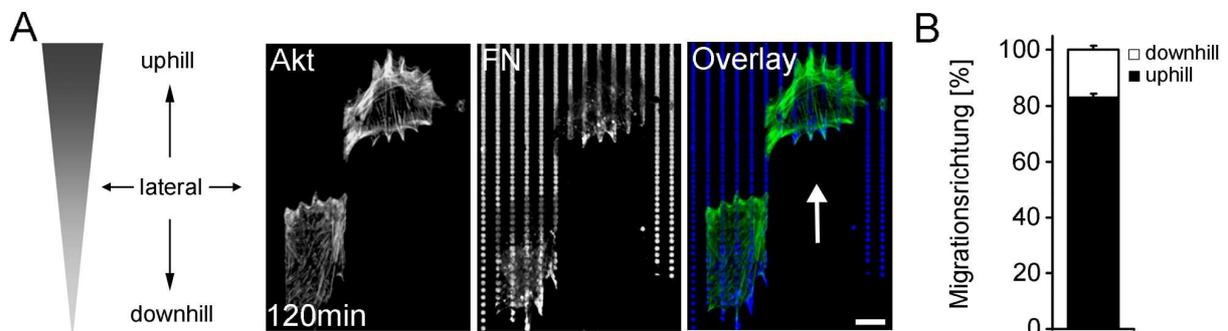


Abb. 3.3 Quantitative Analyse der Haptotaxis von PCF

Für die Untersuchung des Migrationsverhaltens von PCF auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten werden die Zellen 120 min auf den Substraten kultiviert und anschließend **(A)** das Aktin-Zytoskelett (grün) und das Gradientenmuster (blau) fluoreszent visualisiert. **(B)** Gezeigt ist die prozentuale Verteilung der Migrationsrichtungen von PCFs in den Gradienten. Die Migrationsrichtung lässt sich anhand der immunhistochemischen Färbung des Substratmusters durch die ausgerissenen FN-Dots (weißer Pfeil) bestimmen. Die PCFs wandern zu 83 % uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung und zeigen Haptotaxis. Da lateral wandernde und stationäre Zellen einen Prozentsatz von < 10 % ausmachen, werden sie nicht in die Auswertung miteinbezogen. N = 6; n = 165. Maßstabsbalken: 10 μ m

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass Zellen auf einem mikrostrukturierten FN-Dotgradienten Unterschiede in der ECM-Dichte erkennen können und vorzugsweise uphill in Richtung der höheren Proteinbedeckung wandern (Haptotaxis). Die Regulation der Haptotaxis durch externe wie auch interne Faktoren soll nun in den nächsten Kapiteln näher analysiert werden.

3.1.2 Substratparameter für eine optimale Haptotaxis

Um den Einfluss der Substrateigenschaften auf die Haptotaxis zu untersuchen, werden folgende Parameter genauer betrachtet:

- (i) Verdünnung des FN-Anteils
- (ii) Änderung der Gradientensteigung
- (iii) Variation der FN-Dotgröße
- (iv) Variation der FN-Dotform

(i) Für die Analyse der Zellmigration in Abhängigkeit von der FN-Ligandenmenge werden mikrostrukturierte FN-Dotgradienten mit 10 µg/ml (unverdünnt) und 1 µg/ml FN (verdünnt) verwendet. Hierbei zeigt sich eine Änderung der Migrationsgeschwindigkeit, allerdings keine Änderung der Persistenz der Zellmigration. PCFs wandern auf Substraten mit verdünntem, 1 µg/ml FN zweimal schneller als auf Substraten mit unverdünntem, 10 µg/ml FN und legen in der gleichen Zeit eine größere Distanz in den Gradienten zurück.

(ii) Um den Einfluss der Gradientensteigung auf die Haptotaxis zu untersuchen, werden zwei unterschiedlich steile FN-Dotgradienten verwendet (Gradient F = Flach, 2 % Steigung; Gradient S = Steil, 6 % Steigung). Die verschiedenen Steigungen lassen sich durch Variation der Abstandsänderungen zwischen den vertikalen Dotreihen (y-Richtung) erzielen. Eine schematische Übersichtsaufnahme der beiden unterschiedlich steilen Gradienten zeigt Abbildung 2.1 C (Seite 36). PCFs migrieren mit einem Anteil von > 80 % sowohl auf dem FN-Dotgradient F als auch auf dem FN-Dotgradient S uphill und zeigen damit Haptotaxis. Mit einer mittleren Geschwindigkeit von 29 µm/h auf dem flachen FN-Dotgradienten F (n = 15) sind die Zellen nicht signifikant schneller als auf dem steilen FN-Dotgradienten S, auf dem die Zellen mit 25 µm/h wandern (n = 9 Zellen).

(iii) Wie unter (i) bereits gezeigt, erhöht eine Verdünnung des FN-Anteils die Migrationsgeschwindigkeit auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten. Auf dieser Beobachtung aufbauend soll nun eine musterabhängige Änderung der FN-Bedeckung erfolgen. Diese wird durch die gezielte Variation der geometrischen Dotstrukturierung erreicht. Dadurch kann der Einfluss der prozentualen FN-Bedeckung, welche abhängig ist von Abstand und Größe der Dots, auf die gerichtete Zellmigration in mikrostrukturierten FN-Dotgradienten untersucht werden. Das bisher verwendete Muster der Gradienten F und S weist quadratische Dots mit einer Seitenlänge von 2 x 2 µm auf. Das nun eingesetzte Gradientenmuster (Gradient SD, 6 % Steigung) besteht aus Dots mit einer Kantenlänge von 3,5 x 3,5 µm (**Abb. 3.4 B**) (vgl. Abb. 2.1 G, Seite 36), die mit einer Fläche von 12,25 µm² etwa dreimal so groß sind wie die quadratischen Dots des Gradienten S (4 µm²) (**Abb. 3.4 A**). Die Analyse der Migration auf dem Gradienten SD mit den größeren FN-Dots ergibt, dass etwa 80 % der PCFs stationär sind (**Abb. 3.4 B und D**) (N = 7; n = 393). Für nähere Details zur Zellmorphologie und -polarisierung siehe Appendix (Seite 122).

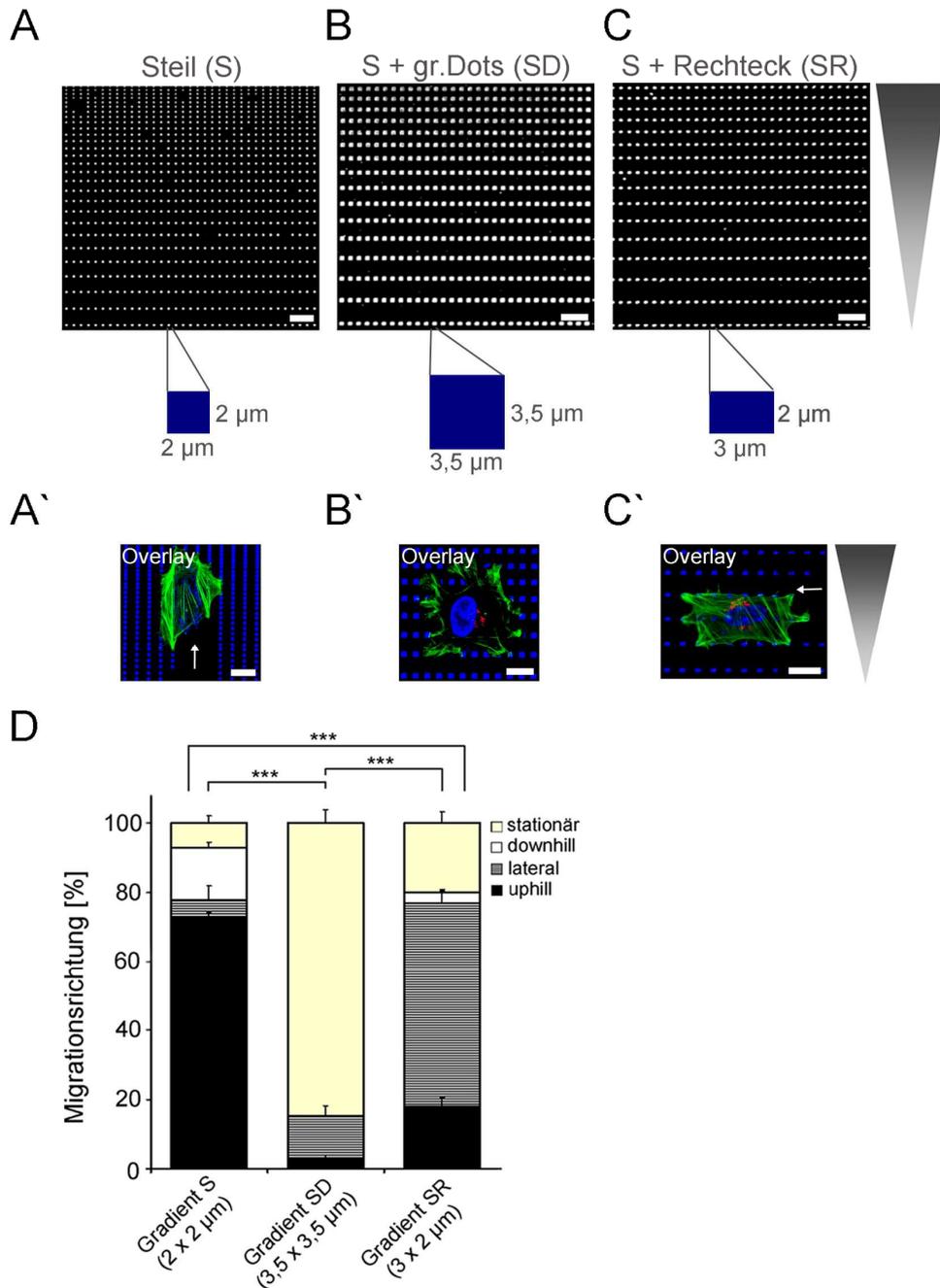


Abb. 3.4 Einfluss der Fibronektin-Dotgröße und -Dotform auf die Haptotaxis

Um den Einfluss der FN-Dotgröße und der FN-Dotform auf das Migrationsverhalten von PCFs zu untersuchen, werden die Zellen auf mikrostrukturierten FN-Gradienten mit **(A)** kleinen, quadratischen Dots (Gradient S; 2 x 2 μm), **(B)** großen, quadratischen Dots (Gradient SD; 3,5 x 3,5 μm) und **(C)** rechteckigen Dots (Gradient SR; 3 x 2 μm) kultiviert. Die Steigung beträgt bei allen Gradienten 6 %. Maßstabsbalken: 15 μm. **(A'-C')** Die PCFs werden 120 min nach der Aussaat fixiert und immunhistochemisch angefärbt (Aktin-Zytoskelett = grün; Golgi-Apparat = rot; Nukleus = blau; Substratmuster = blau). Vergleicht man die Morphologie der Zellen auf den unterschiedlich strukturierten Gradienten, so sind die PCFs auf dem Gradient S (mit kleinen Dots) elongiert und entlang der y-Gradientenachse ausgerichtet, während PCFs auf dem Gradient SD (mit großen Dots) keine Vorzugsrichtung aufweisen. Zellen auf dem Gradient SR (mit rechteckigen Dots) sind senkrecht zur y-Gradientenachse entlang der breiten Seite der Dots (3 μm) ausgerichtet. Maßstabsbalken: 10 μm. **(D)** Die Analyse der Migrationsrichtung ergibt, dass Zellen auf dem Gradient S mit kleinen, quadratischen Dots zu knapp 80 % haptotaktisch (uphill) in Richtung der höheren FN-Bedeckung wandern, während Zellen auf dem Gradient SD mit großen, quadratischen Dots zu 80 % stationär verbleiben. Auf dem Gradient SR mit rechteckigen Dots migrieren die meisten Zellen (ca. 60 %) senkrecht zur y-Gradientenachse entlang der breiten Seite der Dots (3 μm). Der Prozentsatz an lateral wandernden und stationären Zellen auf Gradient S beträgt < 10 %, wird hier aber zum besseren Vergleich mit SD und SR miteinbezogen. N = 6-9; n = 1007. Chi²-Test: P < 0,001 (***).

(iv) Im Zuge meiner Diplomarbeit wurde bereits das Polarisierungs- und Migrationsverhalten von PCFs auf einem mit FN-beschichteten Liniengradienten untersucht (Diplomarbeit, Tatjana Autenrieth, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen in Bereichen niedriger FN-Bedeckung entsprechend der Substratgeometrie entlang der Linien elongieren und migrieren. In Bereichen hoher FN-Bedeckung verbleiben die Zellen stationär und polarisieren uphill (Golgi-Lokalisation in Richtung der höheren FN-Dichte). Im Rahmen dieser Dissertation wird nun der Einfluss der Geometrie der Dots auf die Erkennung des FN-Gradienten und auf das Migrationsverhalten von PCFs untersucht. Für diese Untersuchungen werden Gradientenmuster mit einer rechteckigen Dotgröße von $3 \times 2 \mu\text{m}$ (Fäche $6 \mu\text{m}^2$) verwendet (Gradient SR) (**Abb. 3.4 C**). Im Unterschied zu dem bisher genutzten Standard FN-Gradienten S mit quadratischen, kleinen Dots von $2 \times 2 \mu\text{m}$, sind die Dots des Gradienten SR rechteckig und die breite Seite ($3 \mu\text{m}$) verläuft senkrecht zur y-Gradientenachse. Durch die Variation der Dotform von quadratisch (Gradient S) zu rechteckig (Gradient SR) kann eine Veränderung der Migrationsrichtung der Zellen beobachtet werden (**Abb. 3.4 C und D**) ($N = 9$; $n = 449$). Während 80 % der Zellen auf quadratischen FN-Dotgradienten ($2 \times 2 \mu\text{m}$) haptotaktisch migrieren, weisen Zellen auf den rechteckigen FN-Dotgradienten mit etwa 60 % eine vorzugsweise laterale Migration auf und wandern entlang der x-Achse. Zellen auf diesen rechteckigen FN-Dotgradienten elongieren in Migrationsrichtung und nicht in Richtung höherer FN-Bedeckung. Die Aktinfilamente in diesen Zellen sind interessanterweise entlang der y-Gradientenachse (Richtung höherer FN-Bedeckung), also im 90° Winkel zur Migrationsrichtung ausgebildet. Nähere Details zur Zellpolarisierung siehe Appendix (Seite 122).

Unter (iii) konnte gezeigt werden, dass 80 % der Zellen auf dem FN-Gradienten mit großen Dots (Gradient SD) stationär sind (vgl. Abb. 3.4 D). Im Gegensatz hierzu sind auf dem FN-Gradienten mit kleinen, quadratischen (Gradient S) bzw. rechteckigen (Gradient SR) FN-Dots die wenigsten Zellen stationär, sondern weisen eine Migrationsrate von über 80 % auf (vgl. Abb. 3.4 D). Die drei Gradienten (S, SR und SD) unterscheiden sich nicht nur in ihrer Dotform, sondern auch in ihrer absoluten FN-Bedeckung. Die Ergebnisse der prozentualen FN-Messungen sind in **Appendix 6** dargestellt und zeigen eine direkte Korrelation zwischen der prozentualen FN-Bedeckung eines Gradienten und der Zellmigration. Während bei einer FN-Bedeckung bis 15 % die Zellen sowohl haptotaktisch (Gradient S) als auch gerichtet (Gradient SR) migrieren können, sind Zellen ab einer FN-Dichte von mehr als 18 % (Gradient SD) nicht mehr zu einer haptotaktischen Migration fähig. Für nähere Details siehe Appendix (Seite 122).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Haptotaxis weder durch eine verdünnungsabhängige Änderung der FN-Menge noch durch eine Variation der Gradientensteigung beeinflusst wird. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl die geometrisch bedingte Gesamtmenge des FN, als auch die geometrische Form, in der das FN den Zellen angeboten wird, einen entscheidenden Einfluss auf die Rate und die Direktionalität der Migration nehmen. Bei einer Verdreifachung der Dotfläche migrieren die Zellen nicht mehr haptotaktisch sondern verbleiben stationär. Eine Änderung der Dotform von quadratisch zu rechteckig (breite Seite senkrecht zum Gradienten) führt zu einer Zellmigration senkrecht zur y-Gradientenachse und verhindert die Haptotaxis.

3.1.3 Humane Fibroblasten zeigen ebenfalls Haptotaxis

Nachdem gezeigt werden konnte, dass primäre Hühnerfibroblasten (PCFs) einen diskontinuierlichen, mikrostrukturierten FN-Dotgradienten erkennen und uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung wandern, werden nun weitere Zelltypen bezüglich ihrer Fähigkeit zur Haptotaxis untersucht. Hierzu werden Zelllinien mit unterschiedlichem Gewebsursprung ausgewählt, wie z.B. epitheliale (A549) und parenchymale (BRLs), aber auch fibroblastenartige Zellen (MEF, NIH3T3, HFF). Für die Analyse des Migrationsverhaltens werden die Zellen nach 120 min auf den Gradientenstrukturen fixiert und anschließend das Mikrotubuli-Zytoskelett, der Nukleus und das Substratmuster fluoreszent markiert (**Appendix 1**). Alle Zelltypen sind entlang der γ -Gradientenachse elongiert. Trotz dieser Ausrichtung, findet nur bei den humanen Fibroblasten (*human foreskin fibroblasts* = HFF) eine gerichtete Migration statt (**Abb. 3.5 A**). Die epithelialen A549, die parenchymalen BRL sowie die fibroblastenartigen MEF und NIH3T3 Zellen elongieren zwar, sind aber ansonsten stationär, da keine ausgerissenen FN-Dots auf eine Migration hindeuten (**Appendix 1 A-C**). Auch eine längere Kultivierungszeit von sechs Stunden und zusätzlich durchgeführte Zeitrafferuntersuchungen mit A549, BRL und NIH3T3 Zellen belegen lediglich eine Elongation entlang der Gradientenachse, allerdings keine Migration. Wertet man das Migrationsverhalten von HFFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten aus, so wandern 83 % aller Zellen uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung und zeigen somit wie die PCFs ebenfalls Haptotaxis (**Abb. 3.5 B**) (N = 5; n = 511). Lediglich 4 % der HFFs wandern downhill in Richtung der niedrigeren Proteinbedeckung, 2 % senkrecht zur γ -Gradientenachse und 11 % verbleiben stationär und zeigen keine Migration.

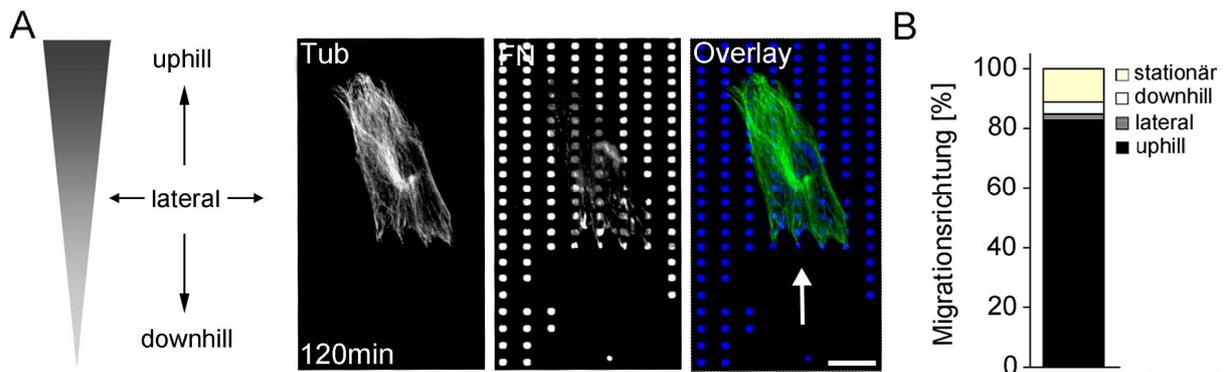


Abb. 3.5 Quantitative Analyse der Haptotaxis von humanen Fibroblasten (HFF)

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von HFFs werden die Zellen für 120 min auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert und anschließend (**A**) das Mikrotubuli-Zytoskelett (grün) und das Substratmuster (blau) immunhistochemisch angefärbt. Anhand der ausgerissenen FN-Dots (weißer Pfeil) lässt sich die Wanderungsrichtung bestimmen. In (**B**) ist die prozentuale Verteilung der unterschiedlichen Migrationsrichtungen gezeigt. Mit 83 % wandern HFFs vorzugsweise uphill zur höheren Proteinbedeckung und zeigen somit Haptotaxis. N = 5; n = 511. Maßstabsbalken: 10 μ m

3.1.4 Primäre Hühnerfibroblasten lesen Gradienten kontinuierlich aus

Die bisherigen Daten haben gezeigt, dass PCFs auf einem mikrostrukturierten FN-Dotgradienten Unterschiede in der Proteindichte wahrnehmen können und haptotaktisch Richtung höherer FN-Bedeckung wandern. Die Migration hängt hierbei von der Konzentration des eingesetzten FNs, von der FN-Dotgröße und der FN-Dotform, allerdings nicht von der Steigung des Gradienten (Kap. 3.1.2) ab. Aufgrund dieser Erkenntnisse stellt sich nun die Frage, ob die Gradientenerkennung nur ein initialer Schritt zu Beginn der Migration ist, oder ob Zellen den FN-Gradienten auch während der Migration kontinuierlich auslesen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wird ein Dotgradient mit Plateau (SP1) verwendet (vgl. Abb. 2.1 E, Seite 36), dessen Steigung 6 % ($S = \text{Steil}$) entspricht. Das Plateau (P) ist dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand von Dotmitte zu Dotmitte sowohl in horizontaler (x) als auch in vertikaler (y) Richtung konstant 5 μm beträgt und demzufolge auch die prozentuale FN-Bedeckung in beide Richtungen unverändert bleibt. Damit liegt für die Zellen im Plateau keine richtungsweisende Information mehr vor. Um die Dynamik der Migration im Dotgradient mit Plateau (SP1) erfassen zu können, erfolgen Zeitrafferuntersuchungen. Als Kontrolle dienen Zellen, die bereits zu Beginn der Aufnahme auf dem Plateau adhären und Zellen, die auf dem FN-Dotgradienten migrieren. **Abbildung 3.6 A** zeigt eine Zelle auf einem Substrat mit Gradient und Plateau (SP1). Das FN-Dotgradientenmuster wurde nachträglich in hellgrau hinterlegt. Zu Beginn der Zeitrafferaufnahme (**Abb. 3.6 A, rot**) befindet sich die Zelle noch im Bereich des FN-Gradienten, elongiert entlang der y-Gradientenachse und migriert uphill in Richtung der höheren Proteinbedeckung. Erreicht sie das Plateau (**Abb. 3.6 A, grün**), auf dem sie keine richtungsweisende Information mehr erhält, stoppt sie und bewegt sich lediglich noch in laterale Richtung (**Abb. 3.6 A, blau**) ($n = 8$). Dies ist mit einer morphologischen Veränderung verbunden, wobei sich die Zelle im Gegensatz zu vorher nun horizontal entlang der x-Achse ausrichtet. Betrachtet man eine Zelle, die bereits zu Beginn der Aufnahme im Plateau saß (**Abb. 3.6 B, rot**), so zeigt diese keine gerichtete, sondern eine zufällige Migration und ändert spontan ihre Wanderungsrichtung (**Abb. 3.6 B, grün nach blau**) ($n = 11$). Eine Zelle, die sich ausschließlich auf dem mikrostrukturierten FN-Dotgradienten (S) befindet, migriert uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung und zeigt somit Haptotaxis (**Abb. 3.6 C**). Dabei elongiert sie entlang der Gradientenachse (**Abb. 3.6 C, rot**), bildet ein flächiges Lamellipodium in Migrationsrichtung aus (**Abb. 3.6 C, grün**) und zieht ihr Hinterende letztlich dem führenden Lamellipodium nach (**Abb. 3.6 C, blau**) ($n = 19$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass PCFs mikrostrukturierte FN-Dotgradienten kontinuierlich auslesen. Sie wandern gezielt uphill in Richtung der höheren Proteindichte und stoppen ab, sobald der Gradient durch ein Plateau abgelöst wird und die Zellen keine richtungsweisende Information mehr erhalten.

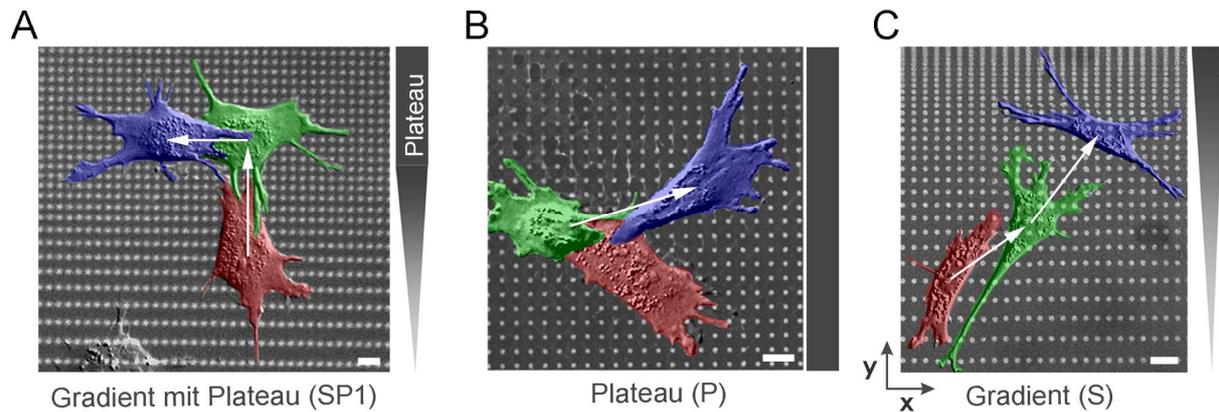


Abb. 3.6 Vergleich der Zellmigration auf Gradient mit Plateau (SP1), Plateau (P) und Gradient (S)

Um herauszufinden, ob PCFs den Gradienten während der Haptotaxis kontinuierlich ausmessen, werden Zeitrasteruntersuchungen durchgeführt. Hierbei wird ein Dotgradient verwendet, der in einem Plateau endet (SP1). In diesem Plateau nimmt der Abstand von Dotmitte zu Dotmitte in y-Richtung nicht weiter ab, sondern verbleibt konstant und entspricht dem Abstand in x-Richtung ($5\ \mu\text{m}$). Die rote Markierung zeigt die Zelle zum Zeitpunkt 1 nach 30 min, während in grün die Zelle nach 60 min und in blau nach 90 min dargestellt ist. Das FN-Dotgradientenmuster wurde nachträglich in hellgrau hinterlegt. **(A)** zeigt eine Zelle auf dem Gradient mit Plateau (SP1). Zu Beginn der Aufnahme befindet sie sich noch im Bereich des Gradienten, elongiert entlang der Gradientenachse und migriert uphill zur höheren Proteinbedeckung (rot). Erreicht die Zelle das Plateau (grün), auf dem sie keine richtungsweisende Information mehr erhält, stoppt sie ab und bewegt sich lediglich noch in lateraler Richtung (blau). Gleichzeitig ändert sie ihre Morphologie und richtet sich neu aus ($n = 8$). **(B)** Eine Zelle, die sich von Beginn an im Plateau befindet, migriert ungezielt und ändert ihre Migrationsrichtung willkürlich ($n = 11$). In **(C)** ist eine Zelle auf dem Gradient S gezeigt, die entlang der Gradientenachse elongiert (rot), ein flächiges Lamellipodium ausbildet (grün) und letztlich ihr Hinterende dem führenden Lamellipodium nachschiebt (blau). Sie migriert uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung und zeigt damit Haptotaxis ($n = 19$). Maßstabsbalken: $10\ \mu\text{m}$

3.2 Zellpolarisierung auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten

Für eine gerichtete Migration auf ECM-Proteingradienten bedarf es zunächst einer Zellpolarisierung. Die Polarisation zeichnet sich durch die Ausbildung eines definierten Vorder- und Hinterendes der Zelle aus (Small *et al.*, 2002). Neben dieser morphologischen Zellpolarisierung findet auch eine intrazelluläre Polarisation der Zelle statt. Als Indikator für eine intrazelluläre Polarisation gilt unter anderem die Lokalisation des Golgi-Apparates und des Zentrosoms zwischen Nukleus und Zellvorderende (Gomes *et al.*, 2005; Etienne-Manneville *et al.*, 2001; Etienne-Manneville *et al.*, 2003). In den folgenden Kapiteln soll die morphologische wie auch die intrazelluläre Polarisation anhand der gerichteten, haptotaktischen Migration auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten näher untersucht werden.

3.2.1 Zellelongation entlang der Fibronektin-Gradientenachse

Nach dem primären Kontakt mit dem Substrat beginnen Zellen sich innerhalb weniger Minuten auszubreiten. Hierbei ergeben sich zwischen Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten und Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten klare Unterschiede in ihrer Morphologie. Für die Analyse werden PCFs auf homogenen wie auch auf mikrostrukturierten Substraten ausgesät, fixiert und gefärbt. Die Untersuchung des Spreadingverhaltens erfolgt über einen Zeitraum von zwei Stunden in 15 min Intervallen.

Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten adhäreren innerhalb der ersten 15 min, weisen allerdings zu diesem Zeitpunkt noch eine kugelförmige Morphologie, ähnlich wie in Suspension, auf (**Appendix 2**). Im weiteren Verlauf flachen sie dann zusehends ab, wobei sie nach etwa 60 min ihre maximale Zellausdehnung erreichen. Ab diesem Zeitpunkt verändern die Zellen ausschließlich ihre Form. Hierbei generieren sie vom Zellkörper ausgehende, flächige Ausläufer, so genannte Lamellipodien, elongieren und bilden somit ein klar definiertes Vorder- und Hinterende aus.

Breiten sich Zellen auf strukturierten Gradientenmustern aus, können sie nur über proteinbeschichteten Stellen (den FN-Dots) Kontakte zum Substrat ausbilden und adhäreren. Dadurch werden sie in eine geometrische Form gezwungen, die von der Substratstruktur vorgegeben wird. Bereits nach 15 min bilden sich dabei rechtwinklige Zellecken, gerade Zellkanten und sich zwischen den Dots aufspannende Bögen aus (**Appendix 3**). Ihre maximale Ausdehnung erreichen die Zellen, ähnlich wie auf homogenem Substrat, nach etwa 60 min. Zellen auf FN-Dots weisen aufgrund ihrer starken Anpassung an das geometrische Substratmuster kein klar definiertes Vorder- und Hinterende auf, wie es bei Zellen auf homogenen FN-Substraten vorzufinden ist. Dennoch sind die Zellen auf dem Gradienten morphologisch polarisiert, indem sie eine elongierte Zellform annehmen, die entlang der y -Gradientenachse ausgerichtet ist. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten eine zweimal kleinere Zellfläche ($\sim 600 \mu\text{m}^2$) aufweisen, als Zellen, die auf homogenen Substraten ($\sim 1150 \mu\text{m}^2$) adhäreren ($N = 3$; $n = 264$).

3.2.2 Lokalisation des Golgi-Apparates zwischen Nukleus und Zellhinterende bei der Haptotaxis

Zellen polarisieren morphologisch auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten, indem sie elongieren und sich entlang der y -Gradientenachse ausrichten. Dabei bilden sie jedoch kein definiertes Vorder- und Hinterende aus, wie es bei Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten der Fall ist. In einem nächsten Schritt soll nun die intrazelluläre Polarisierung auf FN-Gradienten untersucht werden. Hierbei wird die Position des Golgi-Apparates und des Zentrosoms als ein Indikator für die intrazelluläre Polarisierung genutzt und in Relation zum Nukleus und der Gradientenachse analysiert. Zur Bestimmung der intrazellulären Polarisierung gelten folgende Definitionen: Aufgrund der beobachteten, 100 %igen Kolo-kalisation des Zentrosoms mit dem Golgi-Apparat fließt nur die Auswertung der Golgi-Position in die Statistik dieser Arbeit mit ein. Hierbei ist das Zellvorderende als das Ende

definiert, welches in Richtung der höheren Proteinbedeckung zeigt, während das Zellhinterende zur niedrigeren Strukturichte ausgerichtet ist. Befindet sich der Golgi-Apparat zwischen dem Nukleus und dem Zellvorderende wird die Zelle als uphill polarisiert bezeichnet; Bei einer Lokalisation zwischen dem Nukleus und dem Zellhinterende hingegen als downhill polarisiert; Zellen, deren Golgi-Apparat seitlich und demnach weder zum Zellvorder- noch zum Zellhinterende zeigt, sind lateral polarisiert (Abb. 2.5, Seite 52).

Betrachtet man die Zellpolarisierung nach immunhistochemischen Färbungen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten über einen Zeitraum von 120 min, so zeigen 30 min nach der Aussaat etwa zwei Drittel aller Zellen eine uphill Polarisierung (**Abb. 3.7 A, Abb. 3.7 B**). Im weiteren Zeitverlauf nimmt der Anteil an uphill polarisierten Zellen stetig ab, bis er nach 120 min nur noch 25 % beträgt. Im Vergleich hierzu nimmt der Anteil der downhill polarisierten Zellen kontinuierlich zu (von 16 % nach 30 min auf 65 % nach 120 min). Hierbei ist zu beachten, dass in die Quantifizierung (**Abb. 3.7 B**) alle Zellen unabhängig von ihrem Migrationsverhalten einfließen.

Als Ergebnis kann somit festgestellt werden, dass die meisten PCFs zu Beginn des Spreadings auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ihren Golgi-Apparat uphill zwischen Nukleus und Zellvorderende ausrichten. Nach 120 min, wenn die Mehrzahl der Zellen gewandert ist, ist hingegen eine signifikant stärkere downhill Polarisierung des Golgi-Apparates zwischen Nukleus und Zellhinterende zu beobachten (**Abb. 3.7 B**) (N = 3-6; n = 533; unabhängiger Chi²-Test; Signifikanzniveau: **, P < 0,01; ***, P < 0,001).

Um zu überprüfen, ob die Lokalisation des Golgi-Apparates während der Haptotaxis ein zelltypspezifisches Merkmal von migrierenden PCFs darstellt, wird als Referenzversuch ein Wundheilungsassay auf homogen beschichteten FN-Substraten hinzugezogen. Hierbei wird durch eine manuelle Läsion (= Scratches) eines Zellmonolayers eine Wunde verursacht, in welche die PCFs gezielt einwandern (**Abb. 3.7 C**). Vergleicht man die intrazelluläre Polarisierung zwischen Zellen, die gerichtet in eine künstliche Wunde einwandern, und Zellen, die haptotaktisch auf einem FN-Dotgradienten migrieren (**Abb. 3.7 D**), so ist ein klarer Unterschied zu erkennen. Wie bereits in **Abbildung 3.7 B** ersichtlich, richten nach 120 min die meisten Zellen (65 %) auf strukturierten Gradienten ihren Golgi-Apparat bevorzugt downhill zwischen Nukleus und Zellhinterende aus. In diese Statistik fließen alle Zellen unabhängig von ihrem Migrationsverhalten ein. Betrachtet man nur die haptotaktisch wandernden PCFs, so weisen diese in über 80 % der Fälle eine downhill Polarisierung und somit eine Ausrichtung des Golgi-Apparates entgegen der Migrationsfront auf (**Abb. 3.7 D**) (N = 6; n = 165). Auch bei haptotaktisch migrierenden HFFs zeigt sich bevorzugt eine Lokalisation des Golgi-Apparates entgegen der Migrationsfront (**Appendix 4**) (N = 3; n = 339). Im Gegensatz zur Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten polarisieren PCFs, die gerichtet in eine Wunde einwandern, mit einem Anteil von etwa 60 % uphill. Ihr Golgi-Apparat weist demnach zur Migrationsfront und somit in Richtung der Wunde (**Abb. 3.7 D**) (N = 3-6; n = 1319; unabhängiger Chi²-Test; Signifikanzniveau: ***, P < 0,001).

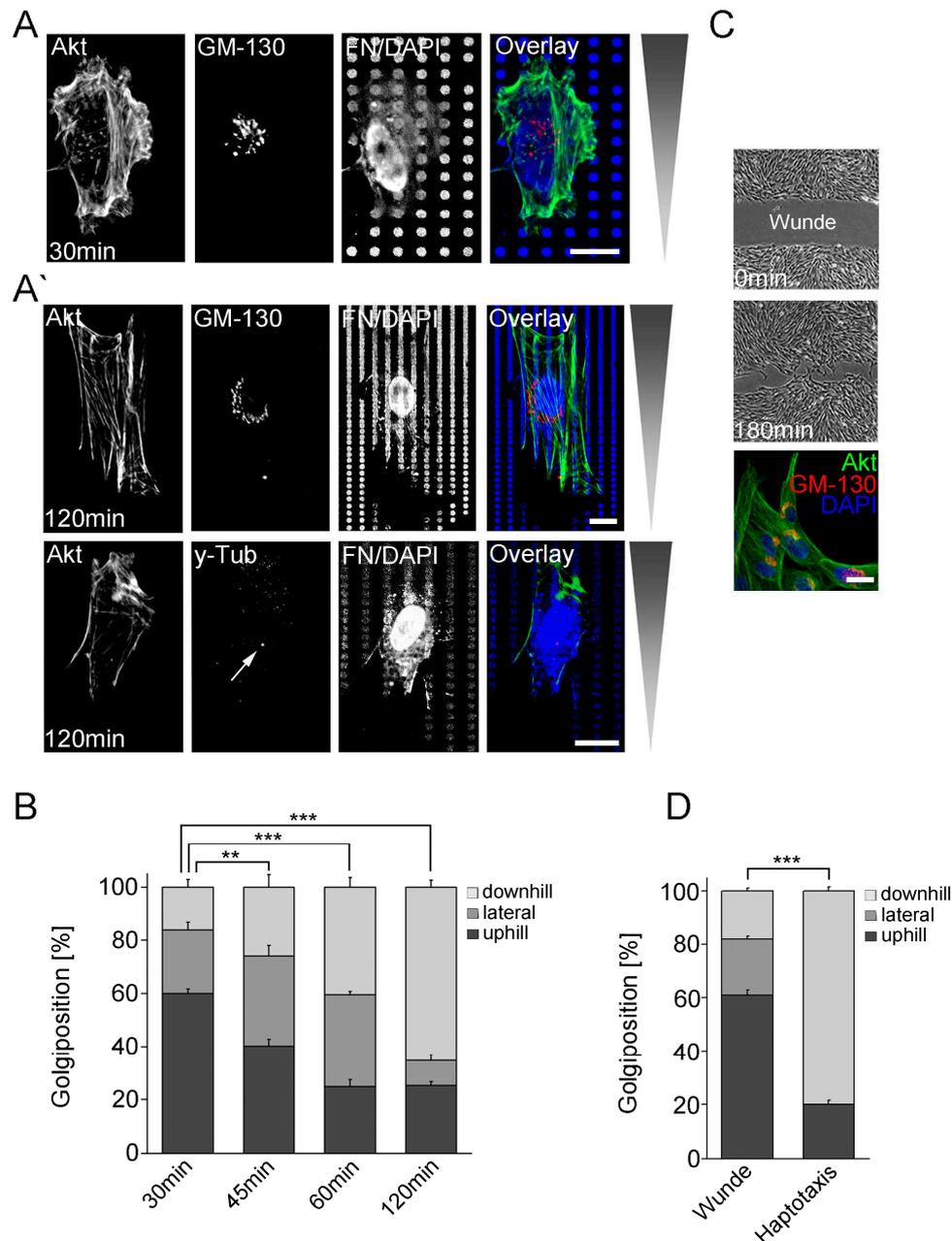


Abb. 3.7 Intrazelluläre Polarisierung von PCFs auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten

(A) zeigt die intrazelluläre Polarisierung während des Spreadings nach 30 min, (A') während der Haptotaxis nach 120 min (Aktin-Zytoskelett = grün; Golgi-Apparat/Zentrosom = rot; Nukleus = blau; Substratmuster = blau; das graue Dreieck zeigt den Gradientenverlauf an). In (B) ist die intrazelluläre Polarisierung (= Golgi-Position) in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit (30, 45, 60, 120 min) aufgetragen. Nach 30 min lokalisieren die meisten Zellen (60 %) ihren Golgi-Apparat vor dem Nukleus in Richtung der höheren Proteindichte und sind somit uphill polarisiert. Im weiteren Zeitverlauf nimmt der Anteil an uphill polarisierten Zellen stetig ab, bis er nach 120 min nur noch 25 % beträgt. Gleichzeitig nimmt der Anteil der downhill polarisierten Zellen kontinuierlich zu (von 16 % nach 30 min auf 65 % nach 120 min). In die Statistik fließen alle Zellen unabhängig von ihrem Migrationsverhalten ein. $N = 3-6$; $n = 533$. Unabhängiger χ^2 -Test bei einem Signifikanzniveau von $P < 0,01$ (**) bzw. $P < 0,001$ (***). (C) Es wird ein Wundheilungsassay auf homogenen FN-beschichtetem Substrat durchgeführt, und die intrazelluläre Polarisierung nach 180 min gerichteter Migration in eine manuell zugefügte Wunde analysiert. (D) Vergleicht man die intrazelluläre Polarisierung von Zellen, die gerichtet in eine Wunde migrieren (180 min) mit haptotaktisch wandernden Zellen (120 min), so zeigt sich ein klarer Unterschied. Während mit einem Anteil von etwa 60 % die meisten Zellen in Wundheilungsassays uphill polarisieren und demnach ihren Golgi-Apparat zur Migrationsfront in Wundrichtung lokalisieren, polarisieren haptotaktisch wandernde Zellen in über 80 % der Fälle downhill. Hier ist der Golgi-Apparat somit entgegen der höheren Proteinbedeckung und der Migrationsfront positioniert. $N = 3-6$; $n = 1319$. Unabhängiger χ^2 -Test bei einem Signifikanzniveau von $P < 0,001$ (***). Maßstabsbalken: 10 μm

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Zellen zu Beginn des Spreadings auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten polarisieren, indem sie ihren Golgi-Apparat zwischen Nukleus und Zellvorderende (uphill in Richtung der höheren Proteinbedeckung) positionieren. Beginnen die Zellen haptotaktisch zu migrieren, verändert der Golgi-Apparat seine Position und ist nun zwischen Nukleus und Zellhinterende lokalisiert. Dies steht im Gegensatz zur Lage des Golgi-Apparates während der gerichteten Migration in Wundheilungsassays, bei der der Golgi-Apparat vorzugsweise in Richtung der Migrationsfront ausgerichtet ist und keine Positionsveränderung stattfindet.

3.2.3 Anterograde Bewegung des Nukleus bei stationärem Verbleiben des Golgi-Apparates während der Haptotaxis

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass PCFs während der initialen Adhäsion auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ihren Golgi-Apparat uphill zwischen Nukleus und Zellvorderende positionieren. Während der Haptotaxis wird der Golgi-Apparat allerdings downhill zwischen Nukleus und Zellhinterende lokalisiert. Offen blieb bisher die Frage, wie diese Golgi-Reorientierung mechanistisch abläuft. Hierzu sind 3 Modelle denkbar:

- (1) Der Golgi-Apparat wird bei der haptotaktischen Migration retrograd an das Zellhinterende geschoben (aktiv), während der Nukleus stationär verbleibt (passiv)
- (2) Der Nukleus wird über das Aktin-Zytoskelett anterograd an das Zellvorderende gezogen (aktiv), während der Golgi-Apparat stationär verbleibt (passiv)
- (3) Der Golgi-Apparat wie auch der Nukleus werden jeweils aktiv in die entgegengesetzte Richtung transportiert

Um herauszufinden, welches dieser drei Modelle bei der Relokalisierung des Golgi-Apparates in haptotaktisch migrierenden Zellen zutrifft, werden Zeitrafferuntersuchungen mit GM-130-eGFP transient transfizierten Zellen (GM = Golgimarker) durchgeführt. Die Sequenz der DIC-Video-Zeitrafferaufnahme einer GM-130-eGFP exprimierenden und haptotaktisch wandernden Zelle ist in **Abbildung 3.8 A** gezeigt. Zur besseren Visualisierung des Nukleus wurde dieser nachträglich blau markiert. Betrachtet man die Position des Golgi-Apparates und des Nukleus in einer haptotaktisch wandernden Zelle über einen Zeitraum von 120 min, so ist der Golgi-Apparat während des Spreadings und der Zellelongation (entlang der Gradientenachse) (0 – 60 min) uphill zwischen Nukleus und Zellvorderende gelegen und somit in Richtung der höheren FN-Bedeckung und der späteren Migrationsfront lokalisiert (**Abb. 3.8 A**). Mit Beginn der Migration nach etwa 90 min verbleibt der Golgi-Apparat (grün) in Relation zur Bewegungsrichtung stationär. Der Nukleus (blau) wird anterograd an das Zellvorderende bewegt. Dies führt zu einer Relokalisierung des Golgi-Apparats zwischen Nukleus und Zellhinterende. Bei der ungerichteten Zellmigration zeigt sich auf homogenem FN-Substrat ein gegensätzliches Verhalten (**Abb. 3.8 B**). Der Golgi-Apparat weist bei bereits adhärennten Zellen in Richtung der Migrationsfront, die durch das klar ausgebildete Lamellipodium gut zu erkennen ist (0 min). Ändert sich der Migrationsverlauf der Zelle (60 min), so reorientiert der

Golgi-Apparat zuerst vor den Nukleus in die neu eingeschlagene Richtung, bevor die Zelle ihre Migration fortsetzt (90 – 120 min) (**Abb. 3.8 B**). Der Golgi-Apparat ist in Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten somit immer uphill zwischen dem Nukleus und dem Zellvorderende lokalisiert.

Diese Untersuchungen favorisieren für die intrazelluläre Polarisierung während der Haptotaxis damit das Model (2). Der Golgi-Apparat befindet sich zu Beginn der Migration uphill zwischen Nukleus und Zellvorderende und verbleibt stationär in dieser Position, während der Nukleus im Verlauf der haptotaktischen Migration nach vorne gezogen wird. Dadurch gelangt der Golgi-Apparat automatisch zwischen Nukleus und Zellhinterende und liegt damit downhill.

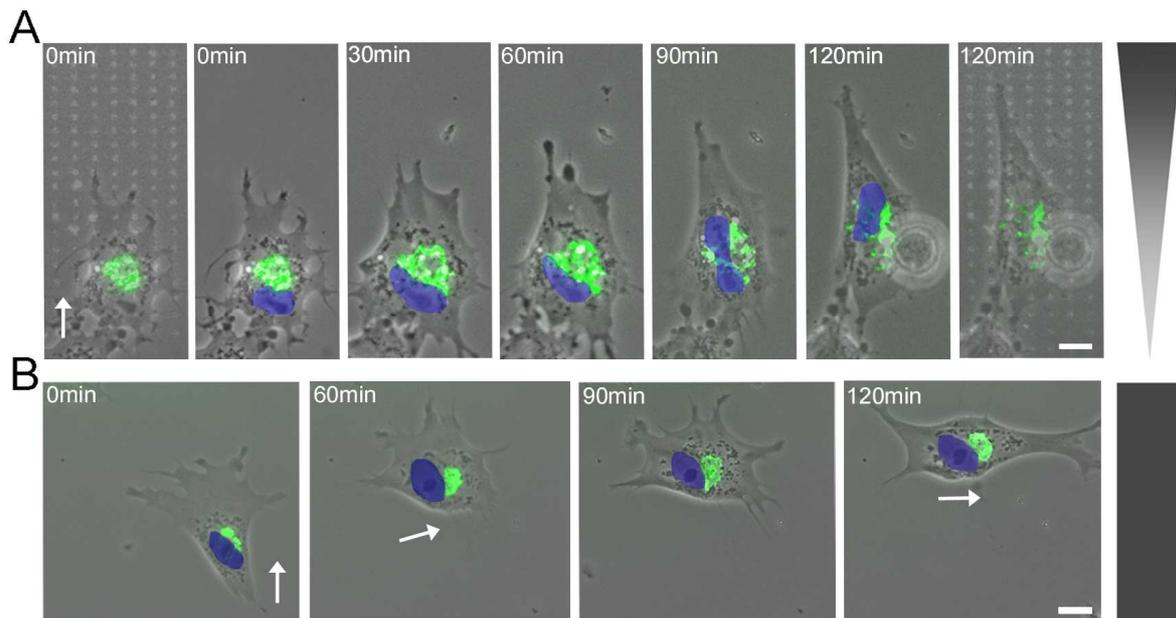


Abb. 3.8 Golgi-Reorientierung während der Haptotaxis und der ungerichteten Migration

In **(A)** ist eine transient GM-130-eGFP (Golgi-Marker) transfizierte Zelle gezeigt, die haptotaktisch migriert (weißer Pfeil). Der Zeitpunkt 1 (0 min) und Zeitpunkt 5 (120 min) sind mit dem dazugehörigen FN-Gradientenmuster unterlegt. Während des Spreadings und der Elongation entlang der Gradientenachse (0 – 60 min), lokalisiert die Zelle ihren Golgi-Apparat (grün) uphill zwischen Nukleus (blau) und Zellvorderende. Beginnt die Zelle haptotaktisch zu migrieren (90 - 120 min), verbleibt der Golgi-Apparat stationär, während der Nukleus anterograd an das Vorderende gezogen wird. Dadurch kommt der Golgi-Apparat in eine downhill Position. **(B)** zeigt die Golgi-Relokalisierung bei einer ungerichteten Zellmigration auf homogen FN-beschichtetem Substrat. Hier weist der Golgi-Apparat in Richtung der Lauffront und befindet sich vor dem Nukleus (0 min, weißer Pfeil). Ändert die Zelle ihren Migrationsverlauf, so reorientiert der Golgi-Apparat zunächst in die neue Richtung (60 min), bevor die Zelle weiterwandert. Der Golgi-Apparat liegt somit immer in Migrationsrichtung. Maßstabsbalken: 10 μ m

3.3 Bedeutung des Zytoskeletts für die Haptotaxis und die Zellpolarisierung

Bisher wurde gezeigt, dass PCFs und HFFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten uphill in Richtung der höheren Proteinbedeckung wandern. Dabei elongieren sie entlang der Gradientenachse und relokalisieren ihren Golgi-Apparat zwischen Nukleus und Zellhinterende. Damit Zellen morphologisch wie auch intrazellulär polarisieren und somit gerichtet migrieren können, bedarf es einer koordinierten Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten und einer Reorganisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts (Small *et al.*, 2002). Deren Rolle bei der Haptotaxis, der Gradientenerkennung und der Zellpolarisierung auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten soll in den folgenden Kapiteln näher untersucht werden.

3.3.1 Zell-Matrix-Kontakte akkumulieren über den Fibronectin-Dots

Zellen adhären innerhalb weniger Minuten auf homogen beschichteten FN-Substraten und mikrostrukturierten FN-Gradienten (Appendix 2 und 3). Bei der Adhäsion bilden die transmembranen Rezeptoren der Integrinfamilie die Schnittstelle zwischen dem Zytoskelett der Zelle und der umgebenden ECM und sind Bestandteil von Zell-Matrix-Kontakten. Typische Zell-Matrix-Kontakte enthalten zytosolisch eine Reihe von zytoskelettalen Elementen und signalgebenden Molekülen, die räumlich und zeitlich den Integrinen nachgeschaltet sind. Beispiele für zytoskelettassoziierte Proteine (Adapterproteine) sind Paxillin, Vinculin, Talin und Tensin. Marker für die Signaltransduktion (Signalproteine) sind unter anderem Phosphotyrosin und FAK (*focal adhesion kinase*).

Um herauszufinden, ob bei der Haptotaxis die Zell-Matrix-Kontakte asymmetrisch über die Zelle verteilt sind, werden die Morphologie und räumliche Verteilung der Zell-Matrix-Kontakte in Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten untersucht, und mit denen von Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten verglichen. Dabei können deutliche Unterschiede festgestellt werden. Zellen, die auf homogen FN-beschichteten Substraten kultiviert wurden, zeigen ein typisches Verteilungsmuster von Zell-Matrix-Kontakten: Sie bilden ausgehend von der Zellmitte kleine, punktförmige Ansammlungen aus, die in der Zellperipherie durch größere, längliche Strukturen abgelöst werden. Dies gilt für alle untersuchten Adapterproteine (Paxillin, Vinculin, Talin, Tensin) und Signalproteine (Phosphotyrosin und FAK). Stellvertretend für alle Zell-Matrix-Kontakt Marker ist die Verteilung von Vinculin in **Abbildung 3.9 A** dargestellt. Im Gegensatz zu einer homogen FN-beschichteten Unterlage sind Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten gezwungen, ihre Kontakte entsprechend dem unterliegenden FN-Substratmuster zu organisieren. Die Adapterproteine Vinculin (**Abb. 3.9 A`**), Paxillin, Talin und Tensin, sowie die Signalproteine Phosphotyrosin und FAK akkumulieren ausschließlich über den FN-Dots. Hierbei fällt auf, dass die Adapterproteine und Signalproteine vornehmlich in der Zellperipherie über den FN-Dots lokalisiert sind, allerdings nicht in der Zellmitte. Betrachtet man die Verteilung der β 1-Integrin-Rezeptoren, welche die Schlüssel-moleküle für die Akkumulation der Zell-Matrix-Kontakt Marker darstellen, auf mikrostrukturierten FN-Gradienten, so ist ebenfalls ein starkes Signal über den FN-Dots zu verzeichnen.

Diese $\beta 1$ -Integrin Akkumulation ist allerdings im Gegensatz zu der Verteilung der Adapter- und Signalproteine nicht nur in der Zellperipherie, sondern auch in der Zellmitte zu beobachten (**Abb. 3.9 A` , B`**) und vergleichbar zur $\beta 1$ -Integrin Anordnung in Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten (**Abb. 3.9 B**) (Dissertation, Zhongziang Jiang, 2009).

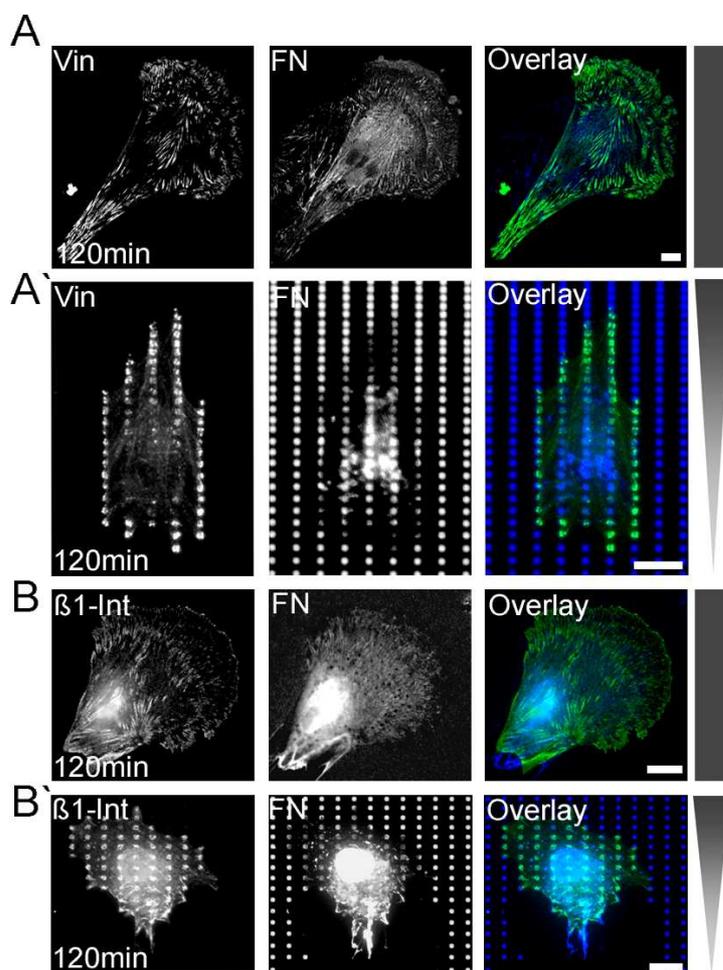


Abb. 3.9 Zell-Matrix-Kontakte auf mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten und homogen beschichteten Substraten

Für die Untersuchung der Zell-Matrix-Kontakte werden PCFs für 120 min auf den Substraten kultiviert, fixiert und anschließend immunhistochemisch markiert. **(A)** Während Vinculin in Zellen auf homogen FN-beschichtetem Substrat vor allem in der Zellperipherie punkt- und ellipsenförmig verteilt vorliegt, organisieren sich die Kontakte in **(A`)** Zellen auf mikrostrukturiertem FN-Dotgradienten entsprechend dem unterliegenden FN-Substratmuster und akkumulieren ausschließlich über den FN-Dots. Dabei ist eine Anhäufung von Vinculin nur in der Zellperipherie und nicht in der Zellmitte zu erkennen. Betrachtet man die Verteilung der $\beta 1$ -Integrin-Rezeptoren in **(B)** Zellen auf homogen FN-beschichtetem und **(B`)** FN-mikrostrukturiertem Substrat, so ist nicht nur in der Zellperipherie, sondern auch in der Zellmitte eine erhöhte Anhäufung von $\beta 1$ -Integrin über den FN-Dots zu beobachten. Zwischen Vorder- und Hinterende haptotaktisch migrierender Zellen ist keine Asymmetrie von Vinculin und $\beta 1$ -Integrin zu erkennen. Maßstabsbalken: 10 μm

Die bisherigen Daten wurden aus immungefärbten Zellpräparaten gewonnen, die nur eine Momentaufnahme des Zellverhaltens liefern und nicht den dynamischen Prozess, dem eine Zell-ECM-Wechselwirkung unterliegt, widerspiegeln. Um das dynamische Verhalten der Zell-Matrix-Kontakte während der Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu untersuchen, werden deshalb Zeitrafferaufnahmen mit transient transfizierten PCFs ($\alpha 5$ -Integrin-eGFP, Vinculin-eGFP) durchgeführt. Betrachtet man eine haptotaktisch wandernde $\alpha 5$ -Integrin-transfizierte Zelle, so zeigt sich eine starke Akkumulation des $\alpha 5$ -Integrin-Rezeptors über allen FN-Dots. Die Ausbildung der Zell-Matrix-Kontakte erfolgt dabei hochdynamisch mit der fortwährenden Bildung neuer Kontakte an der Migrationsfront sowie deren stetigem Abbau am Zellhinterende (**Abb. 3.10 A**). Im Gegensatz zur $\alpha 5$ -Integrin-Verteilung zeigt Vinculin in haptotaktisch migrierenden Zellen nur in der Zellperipherie eine Akkumulation über den FN-Dots, allerdings nicht in der Zellmitte (**Abb. 3.10 B**).

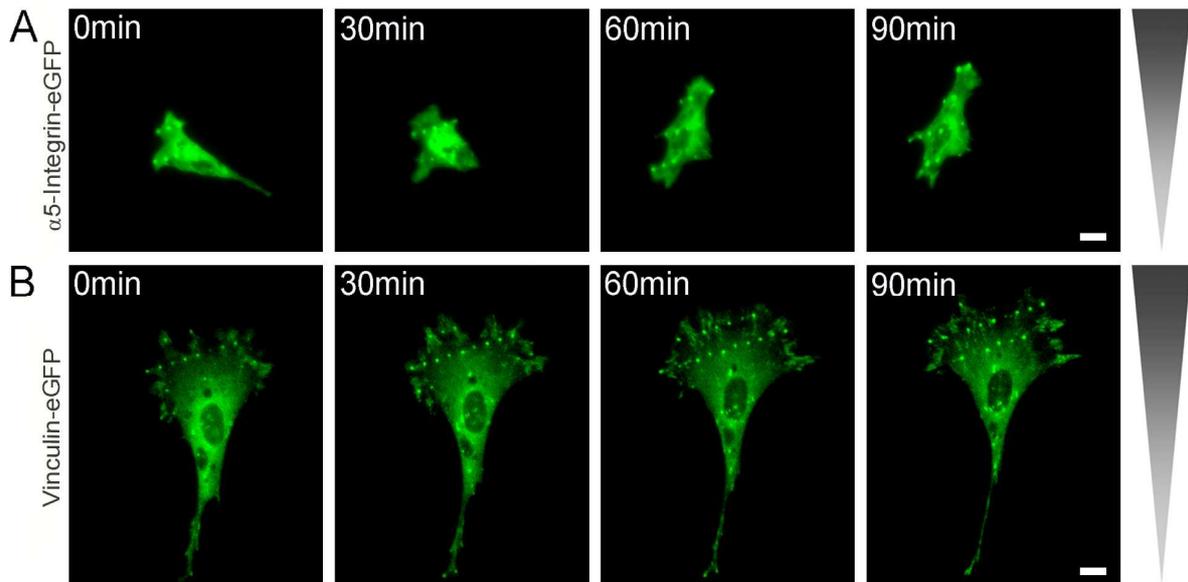


Abb. 3.10 Dynamische Integrin und Vinculin-Verteilung während der Haptotaxis

Um die Dynamik von Zell-Matrix-Kontakten während der Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu untersuchen, werden Zeitrafferuntersuchungen durchgeführt. **(A)** Betrachtet man eine haptotaktisch wandernde $\alpha 5$ -Integrin-eGFP transfizierte Zelle, so zeigt sich eine starke Akkumulation des $\alpha 5$ -Integrin-Rezeptors über allen FN-Dots, an denen die Zelle adhärert. Die Ausbildung der Zell-Matrix-Kontakte erfolgt dabei hochdynamisch mit der Bildung neuer Kontakte an der Migrationsfront sowie deren Abbau am Zellhinterende. In **(B)** ist eine haptotaktisch migrierende, Vinculin-eGFP exprimierende Zelle gezeigt. Im Gegensatz zur $\alpha 5$ -Integrin-Verteilung in haptotaktisch migrierenden Zellen zeigt Vinculin nur in der Zellperipherie eine Akkumulation über den FN-Dots, nicht aber in der Zellmitte. Der Gradientenverlauf wird durch das graue Dreieck angezeigt. Maßstabsbalken: 10 μm

Die Zeitrafferuntersuchungen bestätigen die aus den immunhistochemischen Färbungen gewonnenen Erkenntnisse und geben zudem Aufschluß über die Dynamik von Zell-Matrix-Kontakten. Sowohl die immunhistochemischen Daten, als auch die Untersuchung an lebenden Zellen belegen, dass sich die Verteilung der $\alpha 5/\beta 1$ -Integrin Rezeptoren von der ihrer nachgeschalteten Adapterproteine wie Vinculin oder Paxillin unterscheidet. $\alpha 5/\beta 1$ -Integrin-Rezeptoren akkumulieren über allen FN-Dots, an denen die Zelle adhärert. Adapterproteine und Signalproteine hingegen sind vermehrt in den dynamischeren Regionen der Zellperipherie angehäuft. Zwischen Vorder- und Hinterende haptotaktisch migrierender Zellen ist keine Asymmetrie von Vinculin und $\alpha 5/\beta 1$ -Integrin zu erkennen.

3.3.2 Ausrichtung des Aktin-Zytoskeletts entlang der Gradientenachse

Zell-Matrix-Kontakte bilden die Schnittstelle zwischen der umgebenden ECM und dem Zytoskelett im Innern der Zelle. Dabei dienen sie als Ankerpunkte für Aktinfilamente und sorgen für deren Stabilisierung. Nachdem die substratabhängige Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten gezeigt werden konnte, soll nun die Organisation des Aktin-Zytoskeletts untersucht werden. Hierzu werden PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten mit PCFs auf homogen beschichteten FN-Substraten bezüglich ihres Aktin-Zytoskeletts verglichen (**Abb. 3.11**). Zellen bilden während der Migration auf homogen FN-beschichteten Substraten vom Zellkörper ausgehende, flächige Ausläufer, so genannte Lamellipodien, aus (**Appendix 2**). Dabei elongieren sie entlang der Migrationsrichtung und entwickeln ein klar definiertes Zellvorder- und Hinterende. Betrachtet man die Organisation des Aktin-Zytoskeletts, so sind die filamentären Strukturen entlang der Längsachse der Zellen ausgerichtet und weisen eine starke Bündelung (Aktinstressfasern) auf.

Adhären die Zellen auf strukturierten FN-Gradientenmustern, so wird ihre Morphologie durch das geometrische Substratmuster dominiert (**Appendix 3**). Dabei bilden sie kein klar definiertes Vorder- und Hinterende aus, sind aber dennoch morphologisch entlang der Gradientenachse elongiert (**Appendix 3**). Betrachtet man die Organisation des Aktin-Zytoskeletts in diesen Zellen, so sind die Aktinfilamente parallel zur Längsachse der Zelle orientiert und in den Zell-Matrix-Kontakten verankert (**Abb. 3.11 A`**). Hierbei weisen die Aktinfilamente eine ausgeprägtere Bündelung als in Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Ausrichtung der Aktinbündel von der Geometrie des verwendeten mikrostrukturierten FN-Gradienten beeinflusst wird. Die Aktinfilamente sind entlang der Gradienten- und Migrationsachse ausgerichtet und formen stark gebündelte Aktinstressfasern.

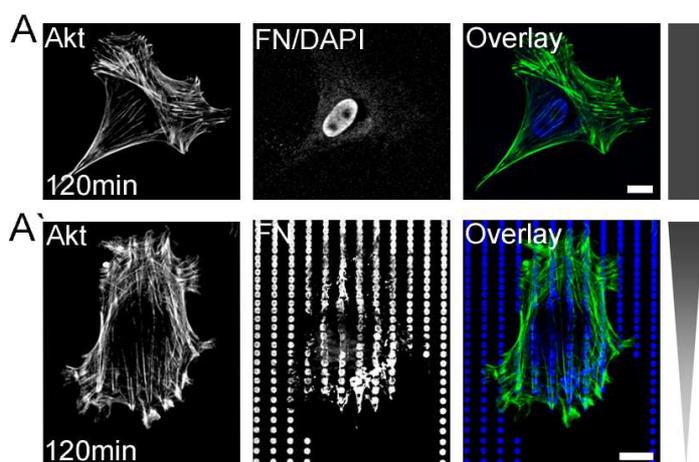


Abb. 3.11 Organisation des Aktin-Zytoskeletts bei der ungerichteten Migration und Haptotaxis

Zur Untersuchung des Aktin-Zytoskeletts werden PCFs für 120 min auf homogen mit FN beschichteten Substraten bzw. auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert und anschließend das Aktin-Zytoskelett (grün), der Nukleus (blau) und das Substratmuster (blau) immunhistochemisch angefärbt. (**A**) Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten zeigen eine klar definierte Organisation des Aktin-Zytoskeletts. So sind die filamentären Strukturen entlang der Längsachse der Zelle ausgerichtet und bilden am Vorderende ein dichtes

Maschennetzwerk. In (**A`**) ist eine Zelle auf mikrostrukturiertem FN-Dotgradient gezeigt. Der Gradient verläuft von unten nach oben zur höheren Proteinbedeckung (graues Dreieck). Die Zellmorphologie wird stark von der Substratgeometrie bestimmt und weist eine Elongation entlang der Gradientenachse auf. Dementsprechend orientieren sich auch die Aktinbündel vorzugsweise parallel zur Längsachse der Zelle. Maßstabsbalken: 10 μm

3.3.3 Intrazelluläre Zugkräfte sind notwendig für die Haptotaxis und die Zellpolarisierung

Da die intrazelluläre Zugkraft (= Kontraktilität) für die Zellpolarisierung und Migration in Wundheilungsassays von großer Bedeutung ist (Gomes *et al.*, 2005), stellt sich nun die Frage, welche Rolle sie bei der Zellpolarisierung und der Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten spielt. Die intrazelluläre Zugkraft entsteht durch das Zusammenwirken von Myosin II und Aktinfilamenten und wird über die Zell-Matrix-Kontaktstellen der Zelle auf die sie umgebende ECM übertragen. Die intrazelluläre Zugkraft wird dabei maßgeblich von Mitgliedern der kleinen Rho GTPasen wie z.B. RhoA reguliert (Etienne-Manneville und Hall, 2002; Small *et al.*, 1999; Van Aelst und D`Souza-Schorey, 1997; Wennerberg und Der, 2004).

Um die Bedeutung der intrazellulären Kontraktilität für die Haptotaxis und die Zellpolarisierung auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu untersuchen, werden PCFs mit pharmakologischen Inhibitoren behandelt. Dabei kommen sowohl das zellpermeable Pyridinderivat Y-27632 als auch Blebbistatin zum Einsatz. Y-27632 hemmt konzentrationsabhängig u.a. die Rho-Effektoren ROCK und MLCK und verhindert dadurch die Ausbildung von Aktinstressfasern und folglich die intrazelluläre Kontraktilität der Zelle (Ishizaki *et al.*, 2000; Uehata *et al.*, 1997). Blebbistatin hingegen inhibiert mit hoher Affinität die Myosin II ATPase Funktion, wodurch die intrazelluläre Kontraktilität zum Erliegen kommt (Kovacs *et al.*, 2004; Allingham *et al.*, 2005).

Für die Analyse des Migrationsverhaltens und der Zellpolarisierung nach pharmakologischer Reduktion der intrazellulären Kontraktilität werden PCFs bereits zu Beginn der Aussaat auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten mit Y-27632 oder Blebbistatin behandelt. Für die quantitativen Analysen werden Zelltyp-optimierte, niederkonzentrierte Mengen (Y-27632: 300 nM, Blebbistatin: 500 nM) eingesetzt, da lediglich eine Störung der filamentären Aktin-/Myosin Strukturen erzielt werden soll. Die Auswirkung von Y-27632 und Blebbistatin auf die Zellmorphologie und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts zeigt **Abb. 3.12 A**. Die Zellen weisen morphologisch eingebuchtete Zellränder und deutlich verkleinerte und weniger stark gebündelte Aktinfilamente auf. Ihre Fähigkeit die anti-adhäsiven Bereiche zwischen den FN-beschichteten Dots zu überbrücken ist ebenfalls reduziert. Dementsprechend besitzen sie eine kleinere Zellfläche als unbehandelte Zellen (**Abb. 3.12 A**), sind aber dennoch entlang der y -Gradientenachse elongiert.

Quantifiziert man mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen die Migrationsrichtung in den FN-Gradienten, so zeigt sich, dass PCFs sowohl nach der Inhibition mit Y-27632 als auch nach der Hemmung mit Blebbistatin nicht mehr vorzugsweise uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung wandern, wie es für 80 % der unbehandelten Zellen der Fall ist (**Abb. 3.12 B**). Lediglich etwa ein Drittel der Zellen migriert haptotaktisch, während die restlichen Zellen nahezu gleich verteilt downhill (ca. 25 %) in Richtung der niedrigeren FN-Dichte oder lateral (ca. 35 %) und damit senkrecht zur y -Gradientenachse wandern. Der Unterschied zwischen den unbehandelten Kontrollzellen und den mit Y-27632 und Blebbistatin inhibierten Zellen ist dabei statistisch signifikant. Da stationäre Zellen einen Prozentsatz von < 10 % ausmachen, werden sie nicht in die Auswertung miteinbezogen (**Abb. 3.12 B**) ($N = 3-6$; $n = 646$; unabhängiger χ^2 -Test; Signifikanzniveau: ***, $P < 0,001$).

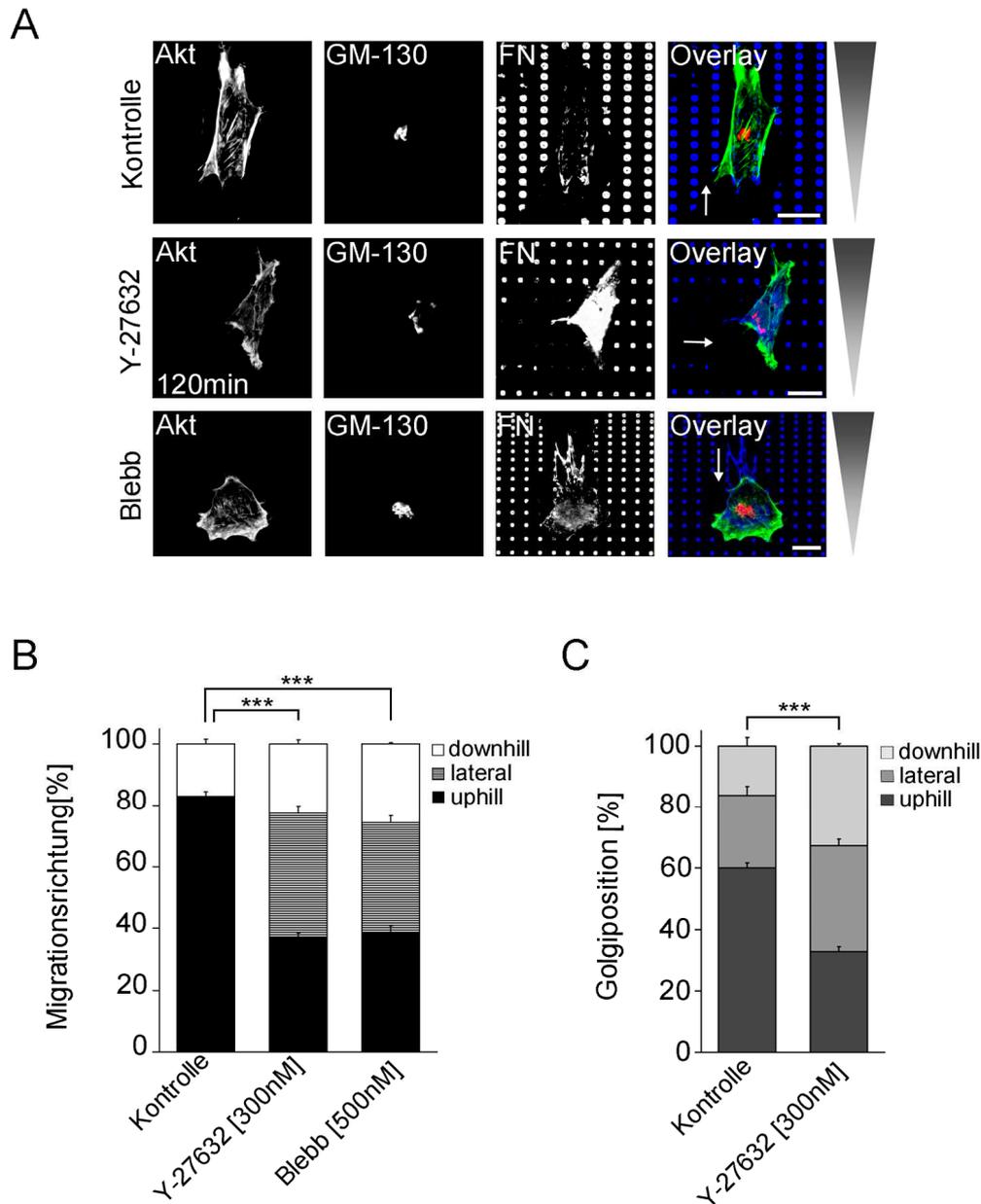


Abb. 3.12 Einfluss der intrazellulären Zugkräfte auf die Haptotaxis und die Zellpolarisierung

Um den Einfluss der Aktin-/Myosin Kontraktilität auf die Haptotaxis und die Zellpolarisierung zu untersuchen, werden PCFs für 120 min/30 min (mit 300 nM Y-27632 bzw. 500 nM Blebbistatin (Blebb)) auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert, fixiert und anschließend immunhistochemisch markiert (Aktin-Zytoskelett = grün; Golgi-Apparat = rot; Nukleus = blau; Substratmuster = blau). **(A)** Zellen, deren intrazellulären Zugkräfte gestört sind, weisen im Gegensatz zu unbehandelten Zellen deutlich verkleinerte und weniger stark gebündelte Aktinfilamente auf. Ihre Fähigkeit zur Distanzüberbrückung ist reduziert, wodurch sie sich weniger stark auf dem Substrat ausbreiten. Dennoch elongieren die Zellen entlang der Gradientenachse. **(B)** Die quantitative Analyse der Migrationsrichtung ergibt, dass Kontrollzellen nach 120 min zu 80 % uphill in Richtung der höheren Proteinbedeckung wandern und somit Haptotaxis zeigen. Inhibiert man die Aktin-/Myosin Kontraktilität mittels Y-27632 bzw. Blebbistatin, so migrieren nur noch etwa ein Drittel der Zellen haptotaktisch, während der Rest nahezu gleichverteilt downhill oder lateral wandert. Da stationäre Zellen einen Prozentsatz von < 10 % ausmachen, werden sie nicht in die Auswertung miteinbezogen. N = 3-6; n = 646; Chi²-Test: P < 0,001 (***). **(C)** Während unter Kontrollbedingungen die meisten Zellen (> 60 %) zu Beginn des Spreadings auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten (nach 30 min) ihren Golgi-Apparat uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung ausrichten, zeigen Zellen mit eingeschränkter intrazellulärer Kontraktilität eine gleichmäßige Verteilung ihrer Golgi-Position in alle Richtungen (uphill, downhill, lateral). N = 3-6; n = 611; Chi²-Test: P < 0,001 (***). Maßstabsbalken: 10 µm

Da Zellen nach Störung ihrer intrazellulären Kontraktilität keine gerichtete Migration mehr in den Gradienten aufweisen, stellt sich die Frage, welchen Einfluss die Zugkraftentwicklung auf die Zellpolarisierung ausübt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Zellen nach einer 30 minütigen Kultivierung auf den Gradienten ihren Golgi-Apparat vorzugsweise uphill zur höheren FN-Bedeckung hin positionieren (Abb. 3.7 B, Kapitel 3.2.2). Vergleicht man nun die Ausrichtung des Golgi-Apparats von diesen unbehandelten mit den Zugkraft-reduzierten Zellen, so ist ein deutlicher Unterschied in der Golgi-Lokalisation auf mikrostrukturierten FN-Substraten zu erkennen (**Abb. 3.12 C**). Während die Mehrzahl der Zellen unter Standardbedingungen (60 %) uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung polarisiert ist, zeigen Zellen mit eingeschränkter intrazellulärer Kontraktilität eine gleichmäßige Verteilung ihrer Golgi-Position. So ist der Golgi-Apparat dieser Zellen in alle Richtungen (uphill = 32 %, downhill = 33 %, lateral = 35 %) gleichermaßen lokalisiert (**Abb. 3.12 C**) (N = 3-6; n = 611; unabhängiger Chi²-Test; Signifikanzniveau: ***, P < 0,001).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Reduktion der intrazellulären Kontraktilität neben der Zellmorphologie auch die Polarisierung der Zellen und deren Fähigkeit zur gerichteten Migration auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten beeinflusst. Die durch Aktin und Myosin II vermittelte Zugkraftentwicklung ist dabei notwendig, damit Zellen ihren Golgi-Apparat uphill in Richtung der höheren Proteindichte positionieren und anschließend haptotaktisch migrieren können.

3.3.4 Veränderte Mikrotubuli-Organisation auf mikrostrukturierten Fibronektin-Dotgradienten

Die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts sind stark von der Substratgeometrie abhängig (vgl. Abb. 3.9 und 3.11, Kap. 3.3.1 und 3.3.2). Es stellt sich nun die Frage, ob die Organisation der Mikrotubulifilamente und ihrer Modifikationen ebenfalls einer substratabhängigen Geometrie unterliegt und in haptotaktisch migrierenden Zellen asymmetrisch verteilt ist.

Das Mikrotubuli-Netzwerk durchzieht die ganze Zelle, entspringt am Zentrosom und Golgi-Apparat und unterliegt ähnlich wie die Aktinfilamente einem ständigen Auf- und Abbau. Durch diese Dynamik können die Mikrotubulifilamente schnell umorganisiert werden und sich einer konstant ändernden Umgebung gezielt anpassen. Neben solchen, sehr dynamischen Mikrotubulifilamenten existieren auch stabile Mikrotubulifilamente, die sich durch eine geringe Polymerisierungs – bzw. Depolymerisierungsrate auszeichnen. Beide Mikrotubulifilament-Typen (dynamisch und stabil) spielen eine große Rolle bei der Zellmigration und Polarisierung. Für eine erfolgreiche Migration ist dabei eine selektive Stabilisierung von Mikrotubulifilamenten am Zellvorderende erforderlich (Cook *et al.*, 1998; Bulinski und Gundersen, 1991; Palazzo *et al.*, 2001). Stabilisierte Mikrotubulifilamente sind durch eine Reihe posttranslationaler Modifikationen, wie z.B. der Lysin-40 Acetylierung des α -Tubulin, gekennzeichnet (Webster *et al.*, 1987). Zur Untersuchung der Organisation dynamischer wie auch stabiler Mikrotubulifilamente, werden PCFs auf homogen FN-beschichteten Substraten bzw. auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert und anschließend tyrosiniertes α -Tubulin (dynamische MTs) und acetyliertes α -Tubulin (stabile MTs) immunhistochemisch

visualisiert. Vergleicht man die Orientierung von tyrosinierten (dynamischen) mit acetylierten (stabilen) Mikrotubulifilamenten, so zeigt sich, dass tyrosinierte Mikrotubuli in Zellen auf homogenen FN-beschichteten Substraten einen stark filamentösen Aufbau und eine radiärsymmetrische Verteilung haben. Sie weisen eine deutliche Kolo­kalisierung mit acetylierten α -Tubulinen auf, wobei die acetylierten α -Tubuline jedoch weniger stark in der Zellperipherie anzutreffen sind (**Abb. 3.13 A**). Im Gegensatz zur Mikrotubuli-Organisation von Zellen auf homogenen FN-Substraten sind tyrosinierte (dynamische) und acetylierte (stabile) Mikrotubulifilamente in Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten in ihrer Organisation weitaus weniger gebündelt (**Abb. 3.13 A'**). Sie erstrecken sich vom Zellzentrum in die Peripherie und sind dabei schwer voneinander zu differenzieren. Auch hier findet eine Kolo­kalisierung von tyrosinierten und acetylierten α -Tubulinen statt, wobei hier die acetylierten α -Tubuline ebenfalls weniger weit in die Zellperipherie reichen als tyrosinierte α -Tubuline. Neben kolo­kalisier­ten, acetylierten existieren zudem einige rein acetylierte α -Tubuline. Diese bilden häufig kurvige Strukturen, so genannte Loops, aus.

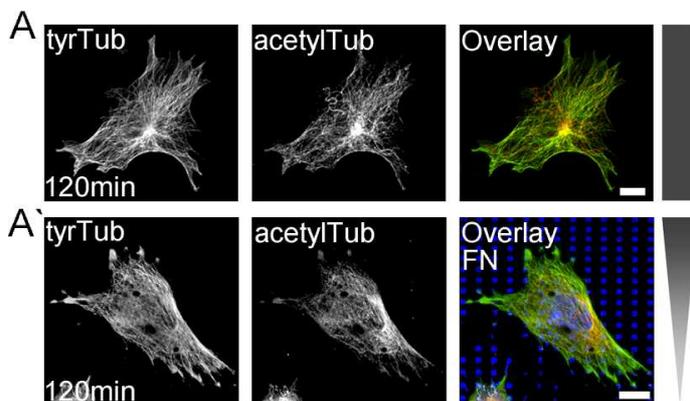


Abb. 3.13 Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts bei der ungerichteten Migration und Haptotaxis

Zur Untersuchung der Mikrotubuli-Organisation werden PCFs für 120 min auf homogen mit FN beschichteten Substraten sowie auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert und anschließend ihr tyrosiniertes α -Tubulin (grün), acetyliertes α -Tubulin (rot) und das Substratmuster (blau) immunhistochemisch angefärbt. (**A**) Zellen auf homogenen Substraten weisen einen filamentösen Aufbau ihrer tyrosinierten

Mikrotubulifilamente auf. Ausgehend vom Zellzentrum strahlen sie radiärsymmetrisch in die Zellperipherie. Dabei kolo­kalisieren sie mit acetyliertem α -Tubulin. In (**A'**) ist die Mikrotubuli-Organisation einer Zelle auf mikrostrukturiertem FN-Dotgradienten gezeigt. Die tyrosinierten Mikrotubulifilamente sind weniger stark gebündelt als auf homogenem Substrat und weisen einen unstrukturierten Charakter auf. Auch hier findet eine Kolo­kalisierung mit acetyliertem α -Tubulin statt. Der Gradient verläuft von unten nach oben zur höheren Proteinbedeckung hin (graues Dreieck). Maßstabsbalken: 10 μ m

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Organisation der Mikrotubulifilamente sehr stark durch die unterliegende Substratgeometrie bestimmt wird. Während die dynamischen Mikrotubulifilamente in Zellen auf homogenen FN-beschichteten Substraten in klaren, filamentären Strukturen vom Zellzentrum in die Peripherie radiärsymmetrisch verlaufen, weisen sie auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten eine weniger stark gebündelte Organisation und einen unstrukturierten Charakter auf. Die stabileren Mikrotubulifilamente sind vorwiegend in der Zellmitte zu finden und nicht in den dynamischen Regionen der Zellperipherie. Weder bei den dynamischen, noch bei den posttranslational modifizierten, stabilen Mikrotubulifilamenten konnte eine Asymmetrie zwischen Vorder- und Hinterende haptotaktisch migrierender Zellen beobachtet werden.

3.3.5 Ein intaktes Mikrotubuli-Netzwerk ist wichtig für die Erkennung des Gradienten und die Zellpolarisierung

Das Mikrotubuli-Zytoskelett trägt maßgeblich zur Zellpolarisierung und der gerichteten Migration bei, was bisher sowohl an chemotaktisch wandernden Zellen als auch in Wundheilungsassays gezeigt werden konnte (Manneville *et al.*, 2010; Etienne-Manneville *et al.*, 2003; Etienne-Manneville *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005). In dieser Arbeit soll nun die Bedeutung des Mikrotubuli-Systems für die Haptotaxis und die Zellpolarisierung von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten untersucht werden. Hierzu erfolgt eine pharmakologische Reduktion der Mikrotubulidynamik durch Nocodazol bzw. Taxol, wobei Nocodazol die Depolymerisierung der Mikrotubulifilamente, Taxol durch Integration in β -Tubuline deren Stabilisierung verursacht. Für die quantitativen Analysen werden Zelltyp-optimierte, niederkonzentrierte Mengen eingesetzt (Taxol: 400 nM, Nocodazol: 500 nM), da ab einer Konzentration von 1000 nM Nocodazol bzw. 500 nM Taxol die Zellen nicht mehr zu einer Migration auf den strukturierten Dotgradienten fähig sind. Außerdem sollte lediglich eine Störung der Mikrotubulidynamik, allerdings kein vollständiger Abbau der Filamente erfolgen. Zellen, die mit Taxol bzw. Nocodazol behandelt wurden, weisen eine deutlich kleinere Zellfläche auf, wodurch ihre Fähigkeit, die anti-adhäsiven Bereiche zwischen den FN-Dots zu überbrücken, reduziert ist (**Abb. 3.14 A**). Mit einer Zellfläche von etwa 300 μm^2 sind Zellen, die mit 400 nM Taxol inhibiert wurden, nur etwa halb so groß wie unbehandelte Zellen ($N = 4$, $n = 244$). Dennoch sind sie in der Lage entlang der y -Gradientenachse zu elongieren, wobei die Elongation bei den mit Taxol behandelten Zellen etwas schwächer ausgeprägt ist, als bei den mit Nocodazol Inhibierten (**Abb. 3.14 A**). Betrachtet man die Mikrotubulifilamente in Taxol bzw. Nocodazol behandelten Zellen, so weisen diese, ähnlich wie die Kontrollzellen, eine unstrukturierte Anordnung auf, strahlen allerdings weniger stark in die Zellperipherie und sind verstärkt in der Zellmitte zu finden (**Abb. 3.14 A**).

Die quantitative Analyse der Migrationsrichtung nach Störung des Mikrotubuli-Netzwerks durch Nocodazol bzw. Taxol ergibt interessanterweise, dass die Hälfte aller behandelten Zellen haptotaktisch (also uphill) migrieren, während die andere Hälfte downhill zur niedrigeren FN-Dichte wandert (**Abb. 3.14 B**). Keine der Zellen migrieren lateral zum Gradientenverlauf. Demnach orientieren sich die Zellen nach wie vor entlang der y -Gradientenachse, können allerdings nicht mehr erkennen, in welche Richtung die Proteinkonzentration zu- bzw. abnimmt. Dies steht im Gegensatz zu unbehandelten Zellen, die vorzugsweise uphill migrieren. Da stationäre Zellen einen Prozentsatz von $< 10\%$ ausmachen, werden sie nicht in die Auswertung miteinbezogen (**Abb. 3.14 B**) ($N = 3-6$; $n = 382$; unabhängiger Chi^2 -Test; Signifikanzniveau: ***, $P < 0,001$).

Da die intrazelluläre Polarisierung die Grundlage einer gerichteten Migration darstellt, werden die Zellen in einem weiteren Experiment zuerst für 30 min unbehandelt auf den Gradienten vorkultiviert, bevor sie mit Nocodazol behandelt werden. Dies gewährleistet eine uphill Polarisierung des Golgi-Apparates in Richtung der höheren FN-Dichte, bevor die Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts chemisch gestört wird. Zellen, deren Mikrotubuli-System erst nach diesen 30 min reduziert wird, zeigen, ebenso wie unbehandelte Kontrollzellen, in über 80 % der Fälle eine uphill Migration in Richtung der höheren FN-Bedeckung und damit Haptotaxis (**Abb. 3.14 B**) ($N = 3$; $n = 136$; unabhängiger Chi^2 -Test; nicht signifikant = n.s., $P > 0,05$).

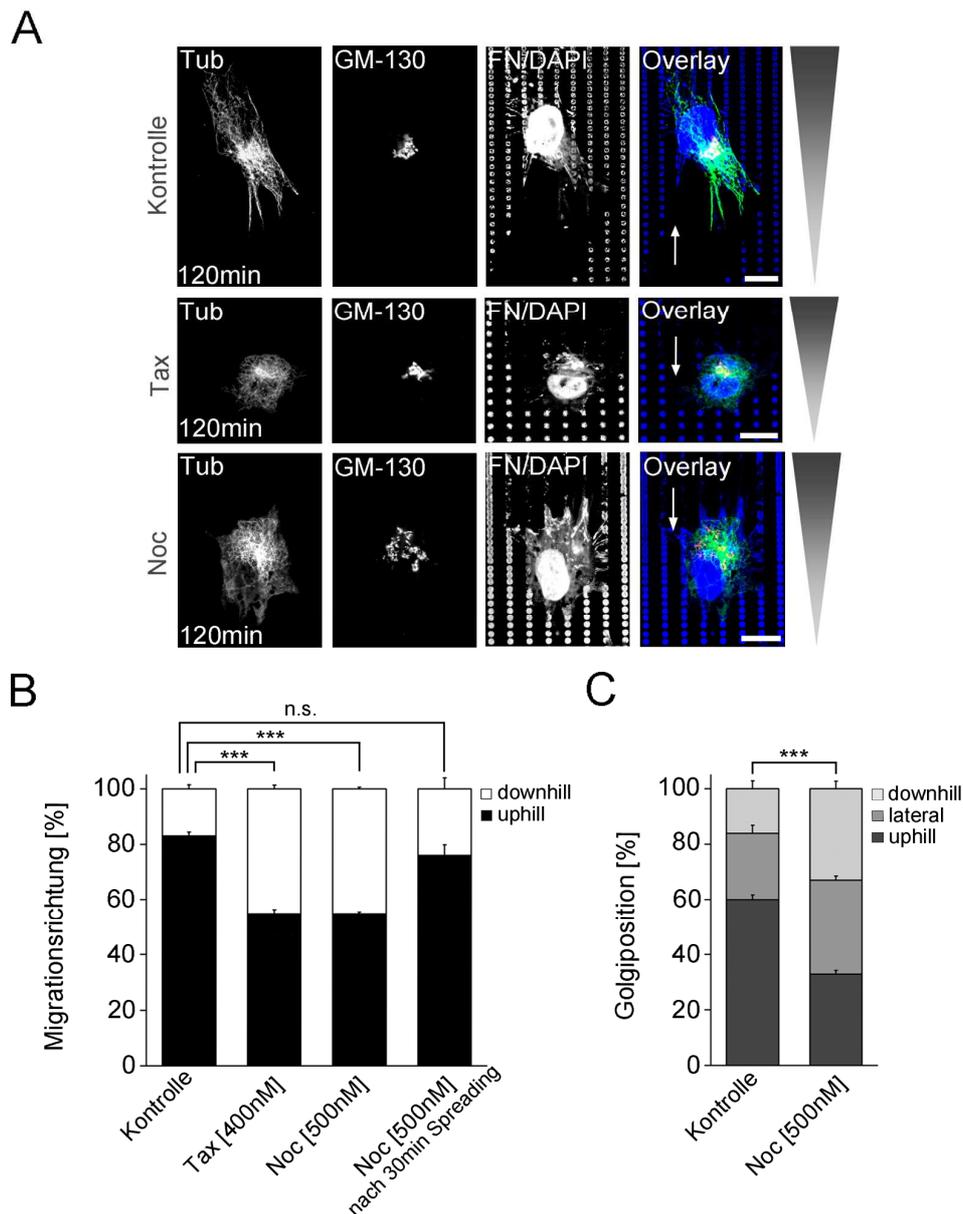


Abb. 3.14 Einfluss der Mikrotubulidynamik auf die Haptotaxis und die Zellpolarisierung

Welche Rolle die Mikrotubulidynamik bei der Haptotaxis und der Zellpolarisierung spielt, wird mittels pharmakologischer Inhibition ermittelt. Hierzu werden PCFs für 120 min/30 min (mit 400 nM Taxol (Tax) bzw. 500 nM Nocodazol (Noc)) auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert, fixiert und anschließend immunhistochemisch angefärbt (Mikrotubuli-Zytoskelett = grün, Golgi-Apparat = rot, Nukleus = blau, Gradientenmuster = blau). **(A)** Zellen, deren Mikrotubulidynamik gestört ist, weisen im Gegensatz zu unbehandelten Zellen eine deutlich verringerte Zellfläche auf. Dennoch elongieren sie entlang der y-Gradientenachse, wobei dieser Effekt bei den mit Taxol behandelten Zellen etwas schwächer ausgeprägt ist. Betrachtet man die Organisation der Mikrotubulifilamente, so weisen diese einen unstrukturierten Charakter ähnlich wie in unbehandelten Zellen auf. In **(B)** ist die prozentuale Verteilung der Migrationsrichtungen in Abhängigkeit der unterschiedlichen Behandlungen graphisch dargestellt. Während die Kontrollzellen vorwiegend uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung wandern und somit Haptotaxis zeigen (> 80 %), migrieren nach der Inhibition mit Taxol bzw. Nocodazol nur noch die Hälfte aller Zellen haptotaktisch. Die andere Hälfte migriert downhill zur niedrigeren FN-Dichte. Demzufolge orientieren sich die Zellen nach wie vor entlang der Gradientenachse, können allerdings nicht mehr erkennen, in welcher Richtung die FN-Konzentration zu- bzw. abnimmt. N = 3-6; n = 382; Chi²-Test: P < 0,001 (***). Inhibiert man die Zellen erst nach einer 30 minütigen Vorkultivierung auf den Gradienten, so migrieren die meisten Zellen (> 80 %) wieder uphill in Richtung der höheren Proteinbedeckung. Da stationäre Zellen einen Prozentsatz von < 10 % ausmachen, werden sie nicht in die Auswertung miteinbezogen. N = 3; n = 136; Chi²-Test: P > 0,05; n.s. = nicht signifikant. **(C)** Während unter Kontrollbedingungen die meisten Zellen (60 %) zu Beginn des Spreadings auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten (nach 30 min) ihren Golgi-Apparat uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung ausrichten, zeigen Nocodazol behandelte Zellen eine gleichmäßige Verteilung ihrer Golgi-Position in alle Richtungen (uphill, downhill, lateral). N = 3-6; n = 367; Chi²-Test: P < 0,001 (***).

Demzufolge ist die Zellpolarisierung mit einer intakten Mikrotubulidynamik zu Beginn des Spreadings auf den FN-Gradienten zwingend erforderlich, damit die Zellen anschließend haptotaktisch wandern können.

Da die Störung des Mikrotubuli-Systems während die Zellen auf dem FN-Gradienten adhären, einen Einfluss auf die Golgi-Orientierung zu haben scheint, wird die Lokalisation des Golgi-Apparates nach Nocodazolbehandlung analysiert (**Abb. 3.14 C**). Hierzu werden PCFs zu Beginn der Aussaat mit dem Inhibitor behandelt und für 30 min auf den mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert. Vergleicht man die Position des Golgi-Apparats von Nocodazol inhibierten mit unbehandelten Zellen, so ist zu erkennen, dass die meisten Zellen mit gestörtem Mikrotubuli-Netzwerk eine ungerichtete Verteilung ihrer Golgi-Lokalisation aufweisen. Der Golgi-Apparat ist gleichermaßen uphill, downhill und lateral orientiert und hat somit keine Vorzugsausrichtung. Dies steht im Gegensatz zu unbehandelten Zellen, bei denen der Golgi-Apparat zu 60 % uphill lokalisiert ist (**Abb. 3.14 C**) (N = 3-6; n = 367; unabhängiger Chi²-Test; Signifikanzniveau: ***, P < 0,001).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Mikrotubuli-Netzwerk erforderlich ist, damit Zellen während des Spreadings auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ihren Golgi-Apparat uphill polarisieren können. Eine Reduktion der Mikrotubulidynamik führt dazu, dass Zellen die Achse des FN-Gradienten zwar noch erkennen, aber nicht mehr zwischen höherer und niedrigerer FN-Dichte unterscheiden können. Diese mikrotubuliabhängige uphill Polarisierung in Richtung der höheren FN-Bedeckung stellt somit die Grundlage für die gerichtete, haptotaktische Migration dar.

3.4 Bedeutung der Rho GTPase Cdc42 und ihres downstream Effektors α PKC ζ für die Haptotaxis

Bisher konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Aktin/Myosin Kontraktilität sowie das Mikrotubuli-Netzwerk eine entscheidende Rolle bei der Zellpolarisierung und der Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten spielen. Die Steuerung der Aktinpolymerisierung und die Stabilisierung bzw. Destabilisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts unterliegt in Zellen unter anderem der Kontrolle der kleinen Rho GTPase Cdc42. Diese nimmt zusammen mit der Proteinkinase C (α PKC ζ), einer Isoform der atypischen Proteinkinase C, eine wichtige Stellung bei der Zellpolarisierung und der gerichteten Migration ein (Etienne-Manneville *et al.*, 2003; Etienne-Manneville *et al.*, 2005; Solecki *et al.*, 2004; Pegtel *et al.*, 2007). Bisherige Erkenntnisse hierzu basieren meist auf Studien an Zellen in Wundheilungsassays (Etienne-Manneville *et al.*, 2003; Etienne-Manneville *et al.*, 2005) oder an chemotaktisch wandernden Zellen (Pegtel *et al.*, 2007). Die Bedeutung von Cdc42 und α PKC ζ für die Zellpolarisierung und die Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ist allerdings noch unbekannt. Sie stand mit im Fokus dieser Arbeit und wird in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

3.4.1 Cdc42 ist erforderlich für die Haptotaxis

Um den Einfluss der kleinen Rho GTPase Cdc42 auf die Haptotaxis von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu untersuchen, wird das dominant negative Protein Cdc42-DN-dTom transient transfiziert. Dieses ähnelt in seiner Struktur der des endogen produzierten Cdc42, ist allerdings nicht funktionsfähig. Durch eine Überexpression an dominant negativem Cdc42 wird somit statistisch ein Großteil der Effekte des endogenen Cdc42 in der Zelle kompensiert. Zusätzlich werden zur Kontrolle PCFs mit dem Wildtyp Protein Cdc42-wt-dTom transient transfiziert. Als Referenz zu den Cdc42-wt-dTom und Cdc42-DN-dTom exprimierenden Zellen werden nicht-transfizierte Kontrollzellen für die Experimente verwendet. Diese haben ebenfalls das Transfektionsprotokoll durchlaufen, um einen möglichen Einfluss der Transfektion an sich auf das Zellverhalten ausschließen zu können. Vergleicht man die Morphologie der unterschiedlich behandelten Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten, so zeigt sich kein Unterschied zwischen Cdc42-wt-dTom, Cdc42-DN-dTom exprimierenden Zellen und nicht-transfizierten Kontrollzellen. Die Zellen sind unabhängig von der Behandlung elongiert und entlang der γ -Gradientenachse ausgerichtet (**Abb. 3.15 A**).

Vergleicht man die prozentuale Verteilung der Migrationsrichtungen in den verschiedenen Zellen, so zeigt sich, dass 58 % der Kontrollzellen wie auch 59 % der Cdc42-wt-dTom exprimierenden Zellen uphill in Richtung der höheren FN-Dichte wandern (Haptotaxis) (**Abb. 3.15 B**). Etwa 25 % migrieren downhill zur niedrigeren FN-Bedeckung, während ca. 15 % lateral und damit senkrecht zur γ -Gradientenachse in x-Richtung wandern. Zellen, die das dominant negative Cdc42 Protein exprimieren, migrieren hingegen nur zu 25 % haptotaktisch (**Abb. 3.15 B**). Hier nimmt im Vergleich zu den Kontroll- und Cdc42 Wildtyp exprimierenden PCFs zusätzlich der Anteil an downhill und lateral wandernden Zellen zu (N = 3-4; n = 908).

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, wird deutlich, dass die kleine Rho GTPase Cdc42 eine zentrale Schlüsselrolle bei der Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten einnimmt. Liegt Cdc42 nicht funktional in den Zellen vor, so sind diese nicht mehr in der Lage adäquat auf den Gradienten zu reagieren und uphill (haptotaktisch) in Richtung der höheren Proteinbedeckung zu wandern.

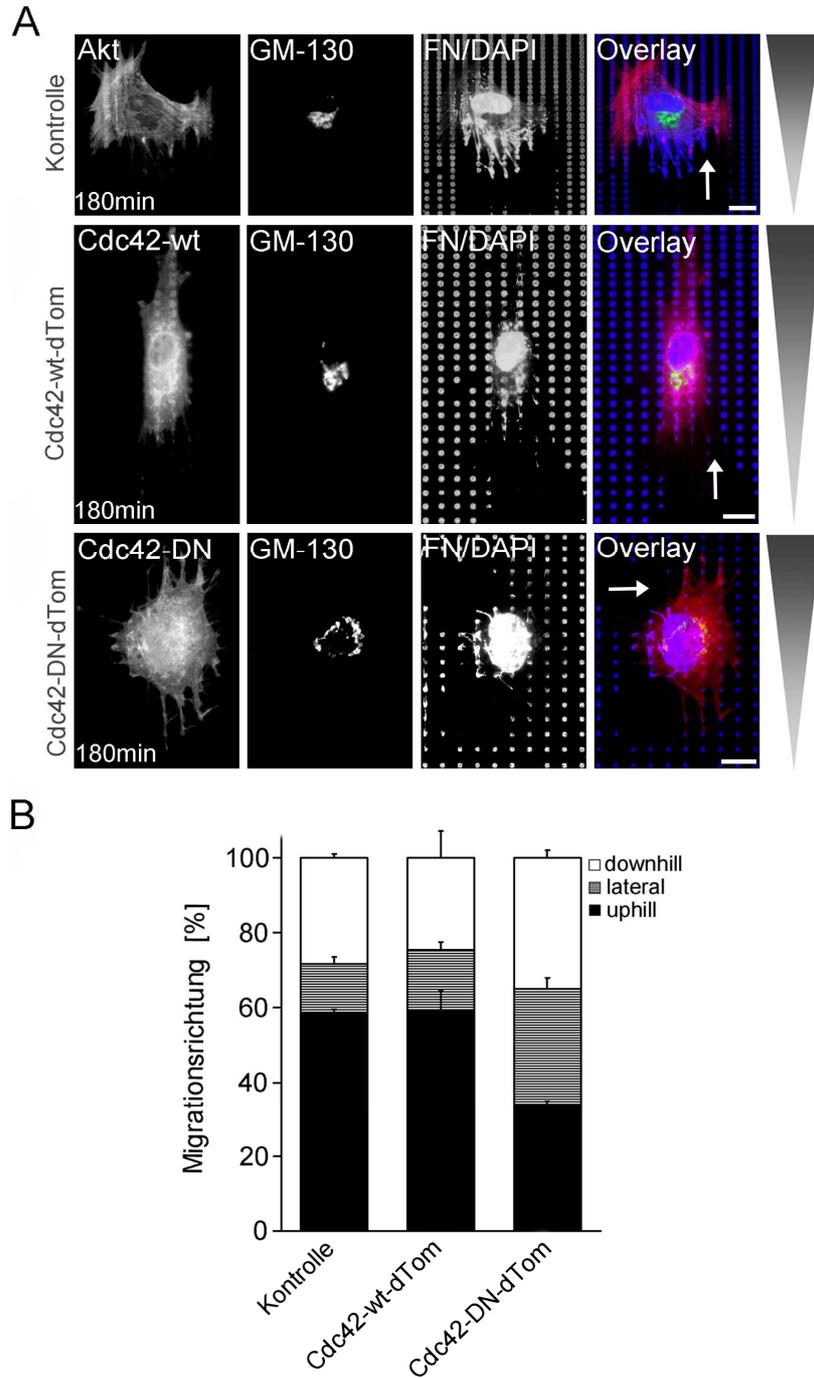


Abb. 3.15 Einfluss von Cdc42 auf die Haptotaxis

Um den Einfluss der kleinen Rho GTPase Cdc42 auf die Haptotaxis zu untersuchen, wird das Migrationsverhalten von PCFs unter **(A)** Kontrollbedingungen, nach Transfektion von Cdc42-wt-dTom sowie in Cdc42-DN-dTom exprimierenden Zellen analysiert. PCFs werden 180 min auf den Gradientenmustern kultiviert, fixiert und anschließend immunhistochemisch angefärbt (Aktin-Zytoskelett = rot; Golgi-Apparat = grün; Nucleus = blau; Substratmuster = blau). **(B)** Die quantitative Analyse der Migrationsrichtung ergibt, dass Kontroll- und Cdc42-wt-dTom exprimierende Zellen vorwiegend uphill in Richtung der höheren Proteinbedeckung wandern und somit Haptotaxis zeigen. Zellen, die eine Überexpression an dominant negativem Cdc42 (Cdc42-DN-dTom) aufweisen, migrieren hingegen nur zu 25 % haptotaktisch. Gleichzeitig nimmt hier der Anteil an downhill und lateral wandernden Zellen zu. Da stationäre Zellen einen Prozentsatz von < 10 % ausmachen, werden sie nicht in die Auswertung miteinbezogen. N = 3-4; n = 908. Maßstabsbalken: 10 μ m

3.4.2 Die Proteinkinase α PKC ζ ist notwendig für die Haptotaxis

Die Proteinkinase α PKC ζ spielt eine wichtige Rolle bei der Zellpolarisierung sowie bei der gerichteten Zellmigration (Etienne-Manneville und Hall, 2001; Etienne-Manneville, 2005). Dabei unterliegt sie einer strengen Kontrolle durch die kleine Rho GTPase Cdc42. Um den Einfluss der Proteinkinase α PKC ζ auf die Haptotaxis von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu untersuchen, wird neben einer pharmakologischen Inhibition (iPKC ζ) auch das dominant negative Protein α PKC ζ -DN-eGFP eingesetzt. Dieses weist eine ähnliche Struktur wie das endogen produzierte α PKC ζ auf, ist aber im Gegensatz zu diesem nicht funktionsfähig. Aufgrund einer transienten Überexpression an dominant negativem α PKC ζ in der Zelle wird somit ein Großteil der Effekte des endogenen α PKC ζ blockiert.

Um einen ersten Eindruck über den Wirkmechanismus des pharmakologischen Inhibitors iPKC ζ zu erhalten, wird dessen konzentrationsabhängiger Einfluss auf die Morphologie von PCFs auf homogen FN-beschichteten Substraten untersucht. Vergleicht man die Morphologie der Zellen bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (5, 10, 15 μ M), so lässt sich kein offensichtlicher Unterschied feststellen (**Appendix 5 A**). Die Zellen bilden unabhängig von der Inhibitorkonzentration ein definiertes Vorder- und Hinterende aus und generieren Lamellipodien an der Zellfront. Die Betrachtung der Mikrotubulifilamente zeigt, dass diese bei allen Behandlungen von der Zellmitte radiärsymmetrisch ausgerichtet sind. Bei genauerer Untersuchung lässt sich allerdings eine leichte Veränderung in der Mikrotubuli-Organisation feststellen. Mit zunehmender Inhibitorkonzentration strahlen die Mikrotubulifilamente zwar noch von der Zellmitte in die Zellperipherie aus, wirken aber im Gegensatz zu Mikrotubulifilamenten in Kontrollzellen weniger strukturiert und sind in der Zellperipherie stärker gebündelt (**Appendix 5 B**). Die Analyse der Aktinfilamente zeigt keine Beeinflussung durch den α PKC ζ Inhibitor. Die Aktinfilamente weisen eine typische Organisation auf, wobei die Aktinstressfasern entlang der Längsachse der Zelle verlaufen (**Appendix 5 C**). Die Inhibition der Proteinkinase α PKC ζ zeigt somit keinen Einfluss auf die Morphologie von PCFs auf homogen FN-beschichteten Substraten.

In einem nächsten Schritt soll nun die Wirkung des α PKC ζ Inhibitors auf die gerichtete Zellmigration in Wundheilungsassays untersucht werden. Wundheilungsassays stellen eine sehr effektive Methode dar, um grundlegende Mechanismen der gerichteten Zellmigration und der daran beteiligten Signalmoleküle zu untersuchen. Unbehandelte Zellen wandern effektiv und dicht in die Wunde ein und schließen diese nach 20 Stunden vollständig, während die inhibierten Zellen in der gleichen Zeit langsamer einwandern und am Ende die Wunde nicht dicht verschließen (**Abb. 3.16 A**). Der Migrationsweg von PCFs wurde nachverfolgt und die Migrationsgeschwindigkeit berechnet. Für die nicht-inhibierten Kontrollzellen ergibt sich eine mittlere Geschwindigkeit von 28 μ m/h (N = 2; n = 17), während die mit 10 μ M iPKC ζ behandelten PCFs 22 μ m/h (N = 3; n = 21) und die mit 20 μ M iPKC ζ behandelten Zellen 21 μ m/h (N = 3; n = 28) erreichen. Somit wandern unbehandelte Zellen etwas schneller in die Wunde ein als Zellen, deren Proteinkinase α PKC ζ inhibiert ist. Dieser Unterschied ist allerdings statistisch nicht signifikant. Neben der Migrationsgeschwindigkeit wird auch die Direktionalität der einwandernden Zellen analysiert und die Persistenz bestimmt (**Abb. 3.16 A'**) (N = 2-3; n = 42). Mit einer Persistenz von 0,91 weisen unbehandelte Zellen eine Migration mit der höchsten Direktionalität in die Wunde auf (**Abb. 3.16 A''**).

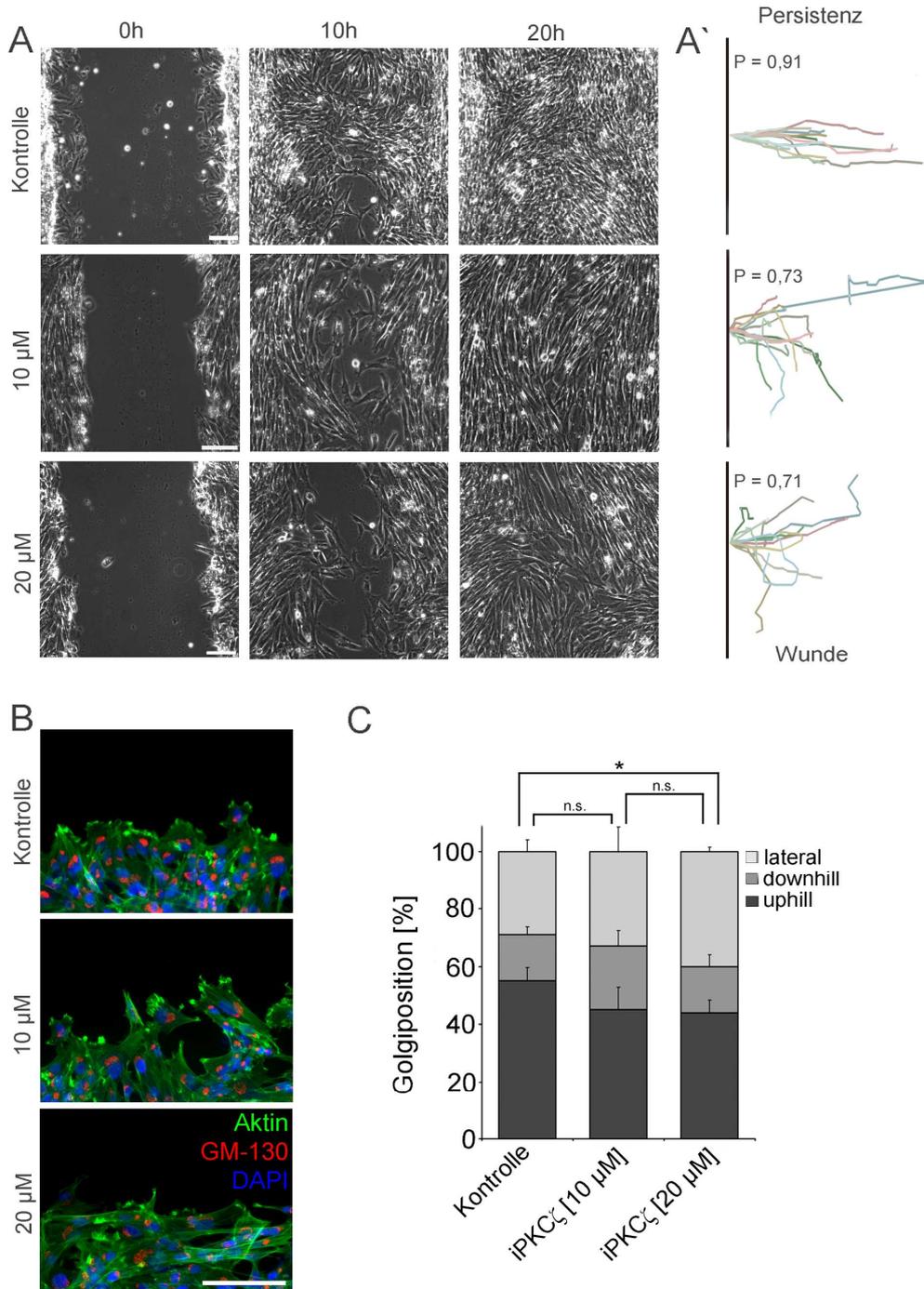


Abb. 3.16 Einfluss der pharmakologischen aPKCζ-Inhibition auf die Zellmigration und -polarisierung in Wundheilungsassays

(A) Unbehandelte Zellen zeigen im Vergleich zu den mit 10 μM und 20 μM iPKCζ behandelten Zellen den schnellsten Wundverschluss (20 h). Maßstabsbalken: 100 μm. **(A')** Die Persistenz, mit der die Zellen in die Wunde einwandern zeigt für Kontrollzellen mit einem P-Wert von 0,91 die Migration mit der höchsten Direktionalität. Zellen, deren Proteinkinase aPKCζ inhibiert wurde, weisen ein deutlich desorientiertes Einwanderungsverhalten mit vielen Richtungswechseln auf. Der P-Wert liegt für 10 μM iPKCζ bei 0,73 und für 20 μM iPKCζ bei 0,71. N = 2-3; n = 42. **(B)** Zellen in Wundheilungsassays werden nach 180 min fixiert und immunhistochemisch angefärbt (Aktin-Zytoskelett = grün, Golgi-Apparat = rot, Nukleus = blau). **(C)** Für die intrazelluläre Polarisation ergibt sich, dass Kontrollzellen (nach 180 min) zu etwa 60 % ihren Golgi-Apparat zwischen Nukleus und Zellvorderende in Migrations- und Wundrichtung positionieren. Dieser Anteil sinkt auf etwa 50 % (10 μM iPKCζ) und 40 % (20 μM iPKCζ) bei aPKCζ inhibierten Zellen. Gleichzeitig steigt die Anzahl der Zellen, deren Golgi-Apparat lateral zur Migrationsrichtung positioniert ist, während der Anteil downhill polarisierter Zellen konstant bei etwa 20 % liegt. N = 3-6; n = 635. Chi²-Test: P > 0,05 n.s. = nicht signifikant; P < 0,05 (*). Maßstabsbalken: 100 μm

Für 10 μM iPKC ζ wird ein Persistenzwert von 0,73 und für 20 μM iPKC ζ ein Wert von 0,71 ermittelt. Zellen, deren Proteinkinase $\alpha\text{PKC}\zeta$ inhibiert wurde, zeigen somit ein deutlich desorientiertes Einwanderungsverhalten mit vielen Richtungswechseln.

Nachdem das Migrationsverhalten analysiert wurde, wird der Einfluss der $\alpha\text{PKC}\zeta$ Inhibition auf die intrazelluläre Polarisierung in Wundheilungsassays untersucht (**Abb. 3.16 B**). Die Bestimmung der Lokalisation des Golgi-Apparates ergibt, dass Kontrollzellen zu etwa 60 % ihren Golgi-Apparat zwischen Nukleus und Zellvorderende und somit in Migrationsrichtung zur Wunde hin positionieren (**Abb. 3.16 C**) (vgl. Abb. 3.7 C, Kap. 3.2.2). Diese Golgi-Positionierung nimmt nach dem Einsatz von 10 μM iPKC ζ auf etwa 50 % ab und nach 20 μM iPKC ζ auf 40% (**Abb. 3.16 B und C**). Die Anzahl der Zellen, deren Golgi-Apparat lateral zur Migrationsrichtung positioniert ist, nimmt bei den $\alpha\text{PKC}\zeta$ inhibierten Zellen zu, während der Anteil an Zellen, deren Golgi-Apparat entgegen der Migrationsfront lokalisiert ist, konstant bei etwa 20 % bleibt (**Abb. 3.16 C**) (N = 3-6; n = 635; unabhängiger Chi²-Test; Signifikanzniveau: nicht signifikant = n.s., P > 0,05; *, P < 0,05).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Zellen eines Monolayers, bei denen die Proteinkinase $\alpha\text{PKC}\zeta$ inhibiert ist, langsamer und desorientierter in eine manuell zugefügte Wunde einwandern. Auch der Anteil der Zellen, die ihren Golgi-Apparat vor den Nukleus in Richtung der Migration zur Wunde hin ausrichten, ist reduziert (gestörte intrazelluläre Polarisierung).

Es stellt sich nun die Frage, ob Zellen nach (i) Inhibition der Proteinkinase $\alpha\text{PKC}\zeta$ (iPKC ζ) bzw. nach (ii) Expression des dominant negativen Proteins $\alpha\text{PKC}\zeta$ -DN-eGFP noch Haptotaxis zeigen. Für (ii) werden die Zellen mit dem dominant negativen Protein $\alpha\text{PKC}\zeta$ -DN-eGFP transient transfiziert. Zusätzlich erfolgt als Kontrolle eine transiente Transfektion mit dem Wildtyp Protein $\alpha\text{PKC}\zeta$ -wt-eGFP. Als Referenz zu den $\alpha\text{PKC}\zeta$ -wt-eGFP und $\alpha\text{PKC}\zeta$ -DN-eGFP exprimierenden Zellen werden noch nicht-transfizierte Kontrollzellen für die Experimente eingesetzt. Vergleicht man die Morphologie der unterschiedlich behandelten Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten, so zeigt sich kein Unterschied. Die Zellen sind unabhängig von der Behandlung elongiert und entlang der γ -Gradientenachse ausgerichtet (**Abb. 3.17 A**).

Vergleicht man das Migrationsverhalten von unbehandelten Kontrollzellen mit den $\alpha\text{PKC}\zeta$ -wt-eGFP exprimierenden PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten, so zeigt sich, dass diese zu 80 % haptotaktisch und damit uphill in Richtung der höheren FN-Dichte migrieren (**Abb. 3.17 B**). Nach pharmakologischer Inhibition der $\alpha\text{PKC}\zeta$ nimmt der Anteil uphill migrierender Zellen signifikant ab und erreicht einen Wert von 30 % (10 μM iPKC ζ) bzw. 40 % (20 μM iPKC ζ , Daten nicht gezeigt), während die Anzahl der Zellen, die lateral wandern oder stationär verbleiben, zunimmt (**Abb. 3.17 B**) (für 20 μM iPKC ζ : N = 2; n = 130). Diese Ergebnisse der pharmakologischen Inhibition werden durch die Untersuchung mit dem dominant negativen $\alpha\text{PKC}\zeta$ Protein bestätigt. Zellen, die $\alpha\text{PKC}\zeta$ -DN-eGFP exprimieren, zeigen ebenfalls eine Abnahme in ihrer haptotaktischen Migration auf 42 %. Gleichzeitig nimmt hier die Zahl der lateral und downhill wandernden Zellen zu (**Abb. 3.17 B**) (N = 3-6; n = 845, unabhängiger Chi²-Test: Signifikanzniveau: nicht signifikant = n.s., P > 0,05; ***, P < 0,001).

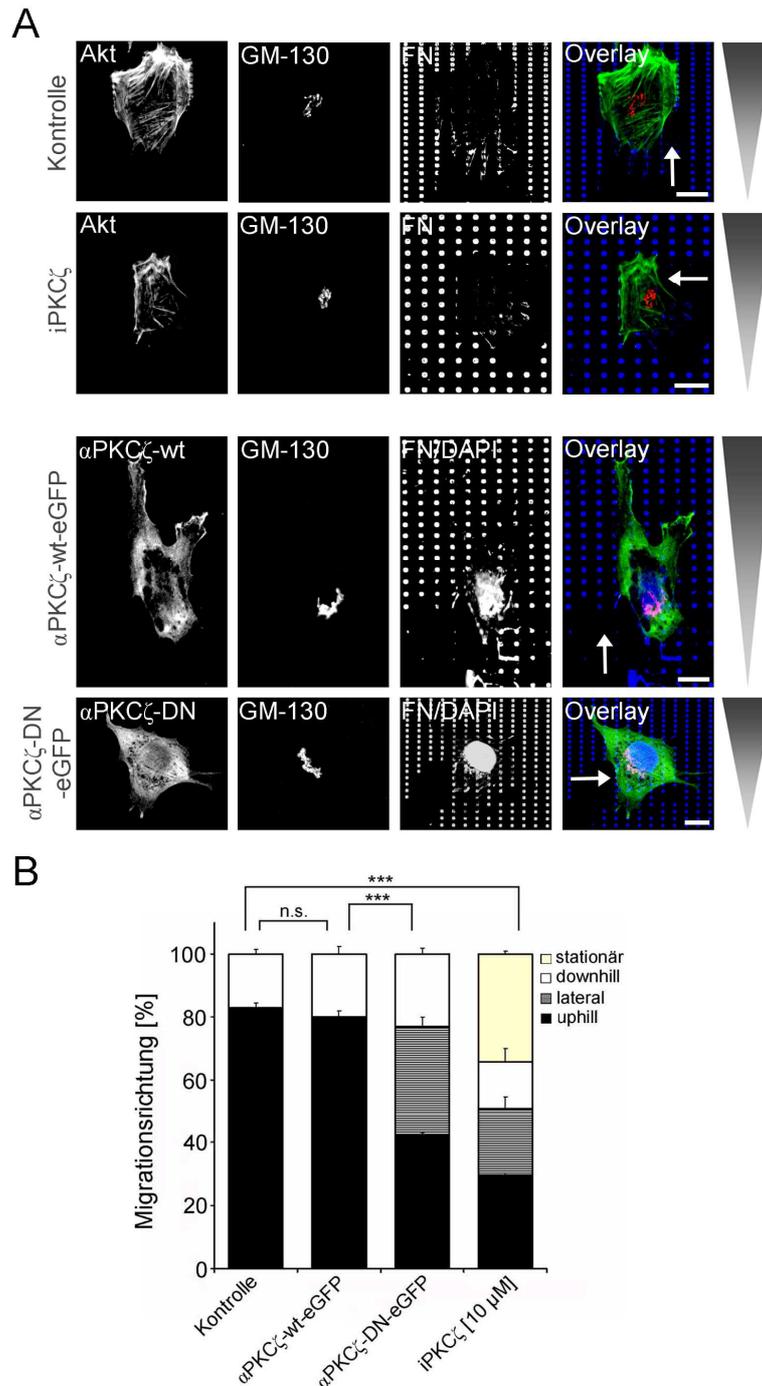


Abb. 3.17 Bedeutung von α PKC ζ für die Haptotaxis

(A) Um den Einfluss der Proteinkinase α PKC ζ auf die Haptotaxis zu untersuchen, wird das Migrationsverhalten von unbehandelten Kontrollzellen, α PKC ζ inhibierten (iPKC ζ) Zellen und Zellen, die das Wildtyp Protein von α PKC (α PKC ζ -wt-eGFP) bzw. das dominant negative Protein von α PKC (α PKC ζ -DN-eGFP) exprimieren, analysiert. Hierzu werden PCFs für 180 min auf den mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert und anschließend immunhistochemisch angefärbt (Aktin-Zytoskelett = grün; Golgi-Apparat = rot, Nukleus = blau; Gradienten-muster = blau). **(B)** Die quantitative Analyse der Migrationsrichtung ergibt, dass Kontroll- und α PKC ζ -wt-eGFP exprimierende Zellen vorwiegend haptotaktisch (uphill) in Richtung der höheren Proteinbedeckung wandern (je 80 %). Nach pharmakologischer Inhibition der α PKC ζ nimmt der Anteil uphill migrierender Zellen signifikant ab und erreicht einen Wert von 30 %, während die Anzahl der Zellen, die lateral wandern oder stationär verbleiben, zunimmt. Diese Ergebnisse der pharmakologischen Inhibition werden durch die Untersuchung mit dem dominant negativen α PKC ζ Protein bestätigt. Zellen, die α PKC ζ -DN-eGFP exprimieren, zeigen ebenfalls eine Abnahme in ihrer haptotaktischen Migration (42 %). Gleichzeitig nimmt hier die Zahl der lateral und downhill wandernden Zellen zu. Da stationäre Zellen bei der Kontrolle und der wt-Expression einen Prozentsatz von < 10 % ausmachen, werden sie nicht in die Auswertung miteinbezogen. N = 3-6, n = 845. Chi²-Test: P > 0,05 n.s. = nicht signifikant; P < 0,001 (***). Maßstabsbalken: 10 μ m

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach Inhibition der α PKC ζ die Zellen nicht mehr vorzugsweise haptotaktisch migrieren, wird nun der Einfluss der α PKC ζ auf die laterale, gerichtete Migration in FN-Gradienten mit rechteckigen Dots (**Abb. 3.18 B**) ($3 \times 2 \mu\text{m}$; Gradient SR) untersucht (siehe hierzu Kapitel 3.1.2; Abb. 3.4; Seite 62). Quantifiziert man mit Hilfe von immunhistochemischen Analysen die Migrationsrichtung, so zeigt sich, dass PCFs nach der Inhibition der Proteinkinase α PKC ζ (10 und 20 μM iPKC ζ) mit über 50 % immer noch vorzugsweise entlang der x-Achse wandern (**Abb. 3.18 A und B**) ($N = 3-9$; $n = 837$; Chi²-Test: nicht signifikant = n.s., $P > 0,05$; ***, $P < 0,001$). Vergleicht man α PKC ζ inhibierte Zellen mit unbehandelten Zellen, so zeigen die Aktinfilamente nach der Inhibition der α PKC ζ eine deutlich stärkere Bündelung, sind aber wie in den unbehandelten Zellen entlang der FN-Dichte und damit entlang der y-Gradientenachse ausgerichtet.

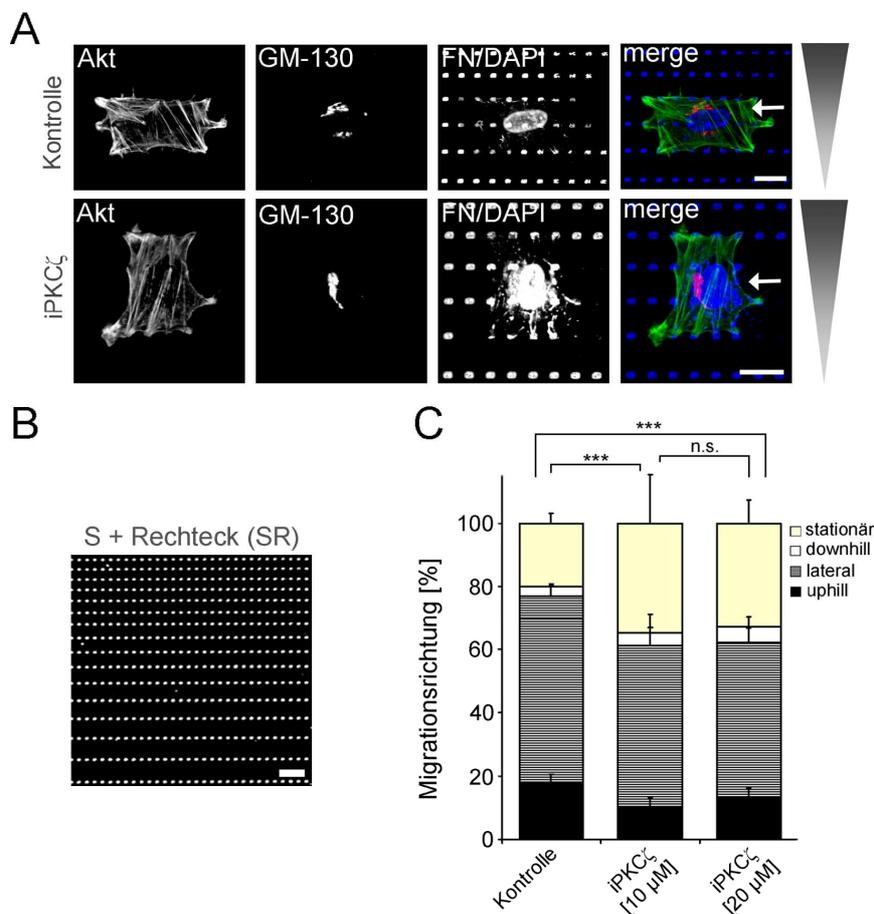


Abb. 3.18 Bedeutung von α PKC ζ für die laterale Zellmigration auf Fibronectin-Gradienten mit rechteckigen Dots

(A) Um den Einfluss der Proteinkinase α PKC ζ auf die laterale Migration von PCFs in FN-Dotgradienten mit rechteckigen FN-Dots (Gradient SR; $3 \times 2 \mu\text{m}$) zu untersuchen, werden PCFs für 120 min mit 10 und 20 μM iPKC ζ behandelt, fixiert und anschließend immunhistochemisch markiert (Aktin-Zytoskelett = grün; Golgi-Apparat = rot; Nukleus = blau; Substratmuster = blau). Vergleicht man die Organisation des Aktin-Zytoskeletts von unbehandelten mit iPKC ζ behandelten Zellen, so weisen die Aktinfilamente nach Inhibition der α PKC ζ eine deutlich stärkere Bündelung auf, sind aber wie in den unbehandelten Zellen entlang der FN-Dichte und damit entlang der y-Gradientenachse ausgerichtet. **(B)** zeigt eine Übersicht über den Gradienten SR mit rechteckigen Dots ($3 \times 2 \mu\text{m}$). **(C)** Die Analyse der Migrationsrichtung ergibt, dass PCFs nach der Inhibition der Proteinkinase α PKC ζ mit über 50 % immer noch vorzugsweise entlang der breiten Seite der FN-Dots ($3 \mu\text{m}$) und damit senkrecht zur y-Gradientenachse wandern. ($N = 3-9$; $n = 837$; Chi²-Test: $P > 0,05$ n.s. = nicht signifikant; $P < 0,001$ (***)). Maßstabsbalken: 10 μm

Fasst man die Erkenntnisse über die Funktionsanalyse der Proteinkinase α PKC ζ zusammen, so zeigt sich, dass Zellen nach Inhibition der α PKC ζ immer noch migrieren können, allerdings eine Änderung in ihrer Direktionalität aufweisen. Zellen in einem Wundheilungsassay wandern langsamer und desorientierter in eine manuell zugefügte Wunde ein. Dabei ist der Anteil der Zellen, die ihren Golgi-Apparat vor den Nukleus in Richtung der Migration (zur Wunde hin) ausrichten, reduziert. Auch bei der Haptotaxis spielt die α PKC ζ eine entscheidende Rolle. Wird deren Aktivität reduziert, migrieren die Zellen nicht mehr vorzugsweise haptotaktisch, uphill zur höheren FN-Bedeckung, sondern unabhängig vom Gradientenverlauf in alle Richtungen. Im Gegensatz zur haptotaktischen Migration hat die α PKC ζ keinen Einfluss auf die gerichtete, laterale Migration von Zellen in mikrostrukturierten FN-Gradienten mit rechteckigen Dots. Hier wandern die Zellen nach wie vor entlang der breiteren Seite der Dots und damit senkrecht zur y-Gradientenachse.

4 Diskussion

Als Haptotaxis wird die Reaktion von Zellen auf die graduelle Bedeckung des Untergrundes mit adhäsiven Proteinen bezeichnet, die in einer gerichteten Zellmigration zur höheren Proteindichte hin resultiert (Carter, 1965). Vermittelt werden diese Proteingradienten in erster Linie durch ECM-Proteine, wie beispielsweise Fibronectin (FN), Laminin oder Kollagen. Die Haptotaxis ist wichtig für die Entwicklung und Regeneration multizellulärer Organismen, sowie für die Immunabwehr (Vaz *et al.*, 2012; Gunawan *et al.*, 2006; Lamalice *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist sie auch an pathologischen Prozessen wie z.B. der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt (McCarthy *et al.*, 1983; Huang *et al.*, 2011). Damit Zellen gerichtet migrieren können, bedarf es eines koordinierten Zusammenspiels zwischen der Zellpolarisierung, den Zytoskelettstrukturen, der Aktivierung von Integrinen und ihrer nachgeschalteten, intrazellulären Signalwege. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Parameter und damit den grundlegenden Mechanismus der Haptotaxis besser zu verstehen.

Haptotaxis

Das heutige, grundlegende Wissen um die biochemischen, intrazellulären Vorgänge bei der Zellmigration basiert vorwiegend auf Experimenten mit flachen, homogen ECM-beschichteten Substraten (Zamir und Geiger, 2001; Geiger und Bershadsky, 2002; Wehrle-Haller und Imhof, 2002). Diese sind zwar chemisch gut definiert, entsprechen jedoch kaum der dreidimensionalen, natürlichen Zellumgebung, da die ECM *in vivo* ein dichtes Maschennetzwerk mit Dimensionen von feinsten Nanostrukturen bis hin zu Faserdistanzen von mehreren μm ausbildet. Migrationsanalysen in dreidimensionalen Strukturen zeigen im Vergleich zu Experimenten auf flachen, homogen ECM-beschichteten Substraten deutliche Unterschiede (Cukierman *et al.*, 2001; Doyle *et al.*, 2009; Thery *et al.*, 2010). Dies verdeutlicht, dass die Dimensionalität der Zellumgebung eine entscheidende Rolle für das grundlegende Zellverhalten spielt und es deshalb wichtig ist, Versuche unter physiologischeren Bedingungen durchzuführen. Da dreidimensionale Strukturen schwer kontrollierbar sind (Cukierman *et al.*, 2001), bzw. einen hohen Kosten- und Zeitaufwand erfordern (Klein *et al.*, 2010), bilden zweidimensionale, mikrostrukturierte ECM-Substrate hierzu einen interessanten Kompromiss. Sie übertreffen einerseits die Komplexität flacher, homogen ECM-beschichteter Substrate und lassen sich dennoch geometrisch gut kontrollieren. Untersuchungen an mikrostrukturierten Proteingradienten, die die natürliche, dreidimensionale ECM-Umgebung imitieren, sind bisher nicht durchgeführt worden. Aus diesem Grund erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Untersuchung der Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten. Es konnte nachgewiesen werden, dass primäre Hühnerfibroblasten (PCFs) Haptotaxis zeigen, da sie vorzugsweise uphill zur höheren FN-Bedeckung wandern. Aus Arbeiten mit kontinuierlich verlaufenden FN-Gradienten ist bekannt, dass Fibroblasten, Endothel- sowie Epithelzellen haptotaktisch migrieren (Smith *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007; Rhoads und Guan, 2007; van Horssen *et al.*, 2006). Ferner zeigen auch Epithel- und Endothelzellen auf kontinuierlich verlaufenden Laminin- und

Kollagen-Gradienten eine zur höheren Proteindichte gerichtete Migration (Cai *et al.*, 2010; Atkinson *et al.*, 2008; Gunawan *et al.*, 2006; Hsu *et al.*, 2005). Die haptotaktische Migration von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten konnte durch Zeitrafferuntersuchungen und immunhistochemische Analysen quantitativ bestätigt werden. Während der Zellwanderung auf mikrostrukturierten FN-Gradienten lösen PCFs das FN vom Untergrund ab und hinterlassen eine Spur ohne Protein auf dem Substrat. Eine derartige Substratveränderung zeigte bereits Dirk Lehnert im Rahmen seiner Doktorarbeit (Dissertation, Dirk Lehnert, 2003). Hierbei kultivierte er Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotsubstraten, wobei zur Visualisierung des Substrates dem FN rot fluoreszierendes BSA beigemischt wurde. Mit zunehmender Inkubationszeit konnte ein Anstieg der Rotfluoreszenz in den Zellen beobachtet werden, was nur mit einer Proteininternalisierung durch die Zellen erklärbar ist. Diese Beobachtungen stehen auch im Einklang mit Studien, die auf homogen ECM-beschichteten Substraten erfolgten. Seit den frühen 80er Jahren ist bereits bekannt, dass das FN unter den Zell-Matrix-Kontakten reduziert vorliegt (Chen und Singer, 1980; Avnur und Geiger, 1981). Die in den Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation verwendeten PCFs sind in der Lage 2 μm^2 große Dots zu lösen und anschließend zu internalisieren. Daher ist anzunehmen, dass die Zugkräfte, die von der Zelle auf die FN-Dots ausgeübt werden, stärker sind, als die Adsorptionskräfte der FN-Moleküle an das Substrat. Die FN-Moleküle sind über Thiole an das Substrat gebunden, wobei die Thiole wiederum an das aufgedampfte Gold koppeln. Die Gold-Schwefel-Bindung zwischen dem gestempelten Thiol und der Substratoberfläche ist die stärkste Verbindung im System und beträgt 1,4 nN (Fenter *et al.*, 1994). Da diese Bindung semi-kovalent ist, können Zellen vermutlich nicht die Kräfte aufbringen, die zur Lösung dieser Bindung nötig wären. Die Kraft, mit der einzelne FN-Moleküle an das Thiol adsorbieren liegt hingegen bei etwa 10 – 100 pN (Dissertation, Dirk Lehnert, 2003). Messungen mithilfe eines Rasterkraftmikroskops ergaben, dass bei Blutzellen die Wechselwirkungen zwischen der Integrin bindenden FN-Domäne FN III₇₋₁₀ und einzelner Integrin $\alpha 5\beta 1$ -Rezeptoren mehr als 90 pN beträgt (Li *et al.*, 2003). Dies liegt somit im Bereich der hydrophoben Wechselwirkung zwischen FN und dem Thiol und bestätigt die Hypothese, dass Zellen bei der Migration das FN vom Untergrund ablösen können.

Um den Einfluss der FN-Ligandenmenge auf die Haptotaxis von PCFs zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit mikrostrukturierte FN-Dotgradienten mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FN (unverdünnt) und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (verdünnt) FN eingesetzt. Hierbei zeigte sich eine Änderung der Migrationsgeschwindigkeit, allerdings keine Änderung der Persistenz der Zellmigration. PCFs wanderten auf Substraten mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FN schneller als auf Substraten mit 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FN und legten in der gleichen Zeit eine etwa doppelt so große Distanz in den Gradienten zurück. Diese Beobachtung deckt sich mit einer Reihe an Migrationsstudien, die auf homogen FN-beschichteten Substraten durchgeführt wurden. Maheshwari *et al.* konnten zeigen, dass bei einer FN-Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eine maximale Migrationsgeschwindigkeit ungerichtet wandernder Fibroblasten erreicht wird. Höhere und niedrigere FN-Konzentrationen hingegen reduzieren die Motilität von Zellen (Maheshwari *et al.*, 1999). Dieser von der FN-Konzentration abhängige, biphasische Verlauf der Migrationsgeschwindigkeit auf homogen FN-beschichteten Substraten konnte auch in einigen anderen Studien beobachtet werden (Maheshwari *et al.*, 2000; Millon-Fremillon *et al.*, 2008; Gupton and Waterman-Storer, 2006; DiMilla *et al.*, 1993; Rajagopalan *et al.*, 2004; Silvestre *et al.*, 2009). Gupton und Waterman-

Storer postulierten, dass vor allem die von der FN-Konzentration abhängige Aktindynamik im Lamellipodium für die Änderung der Migrationsgeschwindigkeit verantwortlich ist. Während die Aktin-Polymerisierungsrate bei mittlerer FN-Konzentration (in diesem Falle 10 µg/ml) ein Optimum erreicht, sinkt die Rate, ebenso wie die Migrationsgeschwindigkeit mit abnehmender wie auch mit zunehmender Proteindichte (Gupton and Waterman-Storer, 2006). Neben der veränderten Aktin-Polymerisierungsrate ist die variable Zell-Substrat-Adhäsionsstärke, bedingt durch die unterschiedlichen Proteinbedeckungen, eine weitere Ursache für das biphasische Migrationsverhalten von Fibroblasten. Einerseits sind die Zell-Substrat-Adhäsionen bei niedrigen FN-Konzentrationen am Zellvorderende nicht stark genug, um das Lamellipodium zu stabilisieren, andererseits bei hohen FN-Konzentrationen am Hinterende zu stark, um dort ein Ablösen der Zelle vom Untergrund zu ermöglichen. In diesem Fall kann das Hinterende dem führenden Lamellipodium nicht mehr nachgezogen werden, wodurch eine Zellmigration verhindert bzw. reduziert wird. Dieser Einfluss der Zell-Substrat-Adhäsion könnte auch die reduzierte Migrationsgeschwindigkeit von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Gradienten mit unverdünntem FN (10 µg/ml) erklären. Analysen zur Messung der Kontaktstärke zwischen PCFs und homogen FN-beschichtetem Substrat mit 10 µg/ml FN (unverdünnt) bzw. mit 1 µg/ml FN (verdünnt) belegen, dass PCFs dreimal so stark an unverdünntes wie an verdünntes FN binden. Somit scheint die verstärkte Zell-Substrat-Adhäsion beim Einsatz von unverdünntem FN (10 µg/ml) Ursache für die reduzierte Migrationsgeschwindigkeit von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu sein. Neben Studien, die den Einfluss der FN-Konzentration auf die ungerichtete Migration von Zellen in homogen FN-beschichteten Substraten untersuchten, existieren auch Studien, die die Bedeutung der FN-Konzentration für die Haptotaxis von Zellen auf kontinuierlich verlaufenden Proteingradienten analysierten. Rhoads und Guan zeigten, dass sich Zellen im Bereich des Gradienten mit höherer FN-Bedeckung stärker ausbreiten und infolgedessen weniger schnell migrieren (Rhoads und Guan, 2007). Studien von van Horssen *et al.* beobachteten zudem eine zelltypspezifische Abhängigkeit der Migrationsgeschwindigkeit von der dargebotenen Proteinmenge. So zeigen Endothelzellen auf kontinuierlich verlaufenden FN-Gradienten bei hoher Substratbedeckung die stärkste Motilität, während Fibroblasten bei niedriger und hoher Proteindichte am schnellsten migrieren (van Horssen *et al.*, 2006). Neben der Migrationsgeschwindigkeit konnte in Haptotaxis-Studien auf kontinuierlich verlaufenden FN- und Laminin-Gradienten auch ein Zusammenhang zwischen der dargebotenen Proteinmenge und der Direktionalität der Migration beobachtet werden. Cai *et al.* zeigten, dass Endothelzellen lediglich bei niedriger und mittlerer FN-Dichte haptotaktisch migrieren, allerdings nicht bei hoher Proteinbedeckung. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Studien von Gunawan *et al.* auf Laminin-Gradienten (Cai *et al.*, 2010; Gunawan *et al.*, 2006). Vergleicht man diese Arbeiten mit den im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnissen, so zeigten PCFs keine Änderung in der Persistenz ihrer haptotaktischen Migration. Die FN-Konzentration scheint somit keinen Effekt auf die Direktionalität der Migration von Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu haben.

Um den Einfluss der Gradientensteigung auf die Haptotaxis zu untersuchen, wurden zwei unterschiedlich steile Dotgradienten (2 und 6 % Steigung) verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen unabhängig von der Steigung haptotaktisch migrieren und keinen Unterschied in ihrer Migrationsgeschwindigkeit aufweisen. Diese Ergebnisse werden durch

Arbeiten von Liu *et al.* und Gunawan *et al.* bestätigt, die ebenfalls keinen Einfluss der Gradientensteigung auf die Migrationsgeschwindigkeit feststellen konnten (Liu *et al.*, 2007; Gunawan *et al.*, 2006). Im Gegensatz hierzu stehen Studien von Smith *et al.* und Rhoads *et al.*, die bei zunehmender Gradientensteigung eine schnellere Migrationsgeschwindigkeit nachweisen konnten (Smith *et al.*, 2009; Rhoads *et al.*, 2007). Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte im experimentellen Ansatz liegen, da neben verschiedenen Zelltypen auch unterschiedliche Proteine und Steigungen verwendet wurden.

Die im Rahmen dieser Arbeit bisher gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Haptotaxis zeigen, dass Zellen die Gesamtmenge an dargebotenem FN integrieren können und es ihnen demnach möglich sein sollte Unterschiede in der FN-Dichte zu erkennen. Um herauszufinden, ob Zellen den Gradienten während der gerichteten Migration stetig ausmessen, wurden Untersuchungen mit Dotgradienten, die in einem Plateau münden, durchgeführt. In diesem Plateau sind die Strukturdichte und demzufolge auch die prozentuale FN-Bedeckung in alle Richtungen gleich, wodurch die Zellen keine richtungsweisende Information mehr erhalten. Die Analyse des Migrationsverhaltens ergab, dass sich Zellen im Bereich des Gradienten kontinuierlich uphill zur höheren Proteindichte bewegen. Erreichen sie das Plateau, stoppt die Migration. Zum ersten Mal konnte somit gezeigt werden, dass Zellen nicht nur zu Beginn des Spreadings einen adhäsiven Proteingradienten auslesen, sondern ihn auch während der Migration immer wieder kontinuierlich wahrnehmen und die ihnen dabei zur Verfügung stehende Ligandenmenge erfassen.

Für die Untersuchung der Haptotaxis im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden primäre Hühnerfibroblasten (PCF) verwendet. Der Grund für die Wahl von Primärzellen besteht darin, dass sie direkt aus dem lebenden Organismus stammen und dadurch mehr dem natürlichen System entsprechen, als die in den bisherigen Studien zur Haptotaxis vorwiegend verwendeten Endothel-, Epithel- sowie Fibroblastenzelllinien (Cai *et al.*, 2010; Lamalice *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; van Horssen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2005; Rhoads *et al.*, 2007; van Horssen *et al.*, 2006; Atkinson *et al.*, 2008; Gunawan *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu Primärzellen erfahren Zelllinien durch die Immortalisierung Veränderungen in ihrer Wachstumsrate wie auch in ihrer Fähigkeit zur Zelladhäsion, was zu einer Modifikation ihres gesamten Metabolismus führt. Daher ist es denkbar, dass Mechanismen in Gang gesetzt oder aber auch ausgeschaltet werden, die für eine intakte Zellpolarisierung und -migration erforderlich sind. Die Verwendung von Fibroblasten als Zellsystem liegt nahe, da Fibroblasten *in vivo* eine dynamischere Polarisierung und ein stärker ausgeprägtes Migrationsverhalten aufweisen als epitheliale Zellen. PCFs zeigten auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten Haptotaxis. In einem nächsten Schritt wurden weitere Zelltypen (epitheliale A549, parenchymale BRL, fibroblastenartige MEF, NIH3T3 und HFF) bezüglich ihrer Fähigkeit zur Haptotaxis untersucht. Die quantitative Analyse der Migration ergab, dass HFFs analog zu den PCFs Haptotaxis zeigen, während die anderen Zelltypen stationär in den Gradienten verbleiben. Der Grund für dieses stationäre Verhalten könnte in der Diversität ihrer Herkunft liegen. Die untersuchten, stationären Zelltypen stammen aus unterschiedlichsten Geweben und weisen entsprechend vielfältige Funktionen und zelltypspezifische Verhaltensweisen auf. Die Tatsache, dass z.B. A549 Zellen auf den mikrostrukturierten FN-Gradienten keine Migration zeigten, könnte unter anderem daran liegen, dass sie als Epithelzellen unter physiologischen Bedingungen nicht

dreidimensional in der ECM aufgespannt sind, sondern zweidimensional verteilt der Basallamina aufsitzen. In der Basallamina stellen nicht das FN, sondern andere ECM-Komponenten wie Laminin oder Kollagen den Hauptinteraktionspartner für Zellen dar. Vorstellbar wäre auch, dass die Größe der Zellfläche für das Auslesen des Gradienten eine Rolle spielt. Da allerdings sowohl die haptotaktisch migrierenden PCFs und HFFs, als auch die stationär in den Gradienten verbleibenden A549, BRL und MEFs keinen Unterschied in ihrer Zellfläche aufweisen, kann diese Hypothese verworfen werden. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben einer Migration könnte sein, dass die Kräfte, die von den Zellen auf das Substrat ausgeübt werden, geringer sind, als die Bindungskräfte zwischen dem Protein und dem Thiol. Infolgedessen können die Zellen die FN-Dots nicht mehr vom Untergrund ablösen. Unterstützt wird diese Annahme durch Studien von Dirk Lehnert, der zeigte, dass die Mausmelanomzelllinie B16 erst bei einer Dotgröße $< 0,25 \mu\text{m}^2$ in der Lage sind, das FN vom Substrat zu entfernen. Die FN-Dots, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind mit einer Größe von $2 \mu\text{m}^2$ allerdings achtmal so groß. Demzufolge müssen Zellen eine relativ große Kraft auf das Substrat ausüben, um die FN-Dots entfernen zu können. Es liegt nahe, dass PCFs und HFFs, die beide Haptotaxis auf den Gradienten zeigten, diese Kräfte aufbringen können, die anderen verwendeten, stationär verbleibenden Zelllinien vermutlich aber nicht. Experimente mit kovalent gebundenem FN, das stärker an das Substrat haftet, als das durch die Gold-Thiol-Chemie hydrophob gebundene FN, bestätigen, dass Kräfte eine wichtige Rolle bei der Migration spielen. Es zeigte sich, dass es den PCFs kaum möglich war, sich vom Untergrund zu lösen und haptotaktisch zu migrieren (eigene Daten im Rahmen dieser Dissertation nicht gezeigt).

Zellpolarisierung

Die Zellpolarisierung stellt die Grundlage für eine gerichtete Zellmigration dar und ist vor allem für die Ausbildung eines definierten Vorder- und Hinterendes der Zelle verantwortlich (Ridley *et al.*, 2003; Small 2002). Neben dieser morphologischen Zellpolarisierung findet auch eine intrazelluläre Polarisierung der Zelle statt. Als Indikator für eine intrazelluläre Polarisierung gilt unter anderem die Reorientierung des Golgi-Apparats und des Zentrosoms zwischen Nukleus und Zellvorderende (Bergmann *et al.*, 1983; Prigozinja und Waterman-Storer, 2004; Schmoranzler *et al.*, 2003; Sütterlin und Colanzi, 2010). Diese Ausrichtung der Kompartimente ermöglicht eine schnelle und gezielte Versorgung der dynamischen Migrationsfront mit Membranbausteinen und schafft damit die Voraussetzung für eine gerichtete Zellmigration. Das meiste Wissen über die Mechanismen der Zellpolarisierung stammt aus Wundheilungsassays, in denen ein Zellverband gerichtet in eine manuell zugefügte Wunde wandert (Gomes *et al.*, 2005; Etienne-Manneville *et al.*, 2003; Etienne-Manneville *et al.*, 2005; Manneville *et al.*, 2010). Diese Studien sind zwar nützlich, um eine große Anzahl an Zellen zu untersuchen, verzerren allerdings das Bild einer gerichteten Einzelzellmigration, da sie nicht ausschließlich auf Zell-ECM-Wechselwirkungen, sondern auch auf der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten basieren. Migrationsprozesse *in vivo*, sei es bei der Embryogenese, der Immunabwehr oder der Metastasierung, beruhen vorwiegend auf Einzelzellbasis und sind nicht auf Zell-Zell-Kontakte angewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit

wurde sowohl die morphologische als auch die intrazelluläre Polarisierung von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PCFs eine an die Substratgeometrie angepasste Morphologie aufweisen und entlang der Gradientenachse elongieren. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der geometrischen Limitation, die von einer Mikrostrukturierung der Substrate ausgeht. So können PCFs lediglich über den FN-Dots Zell-Matrix-Kontakte aufbauen. Bereits 2004 zeigten Lehnert *et al.*, dass Zellen während des Spreadings auf homogen FN-beschichteten Substraten ihre Fokalkontakte und Aktinstressfasern und damit ihre Zellmorphologie in einem scheinbar zufälligen Muster ausbilden (Lehnert *et al.*, 2004). Adhärenz Zellen allerdings auf mikrostrukturierten FN-Substraten, werden ihnen lokal Adhäsionsstellen für Zell-Matrix-Kontakte vorgegeben, wodurch sie in eine geometrische Form gezwungen werden. Während Zellen auf Substraten, deren FN-Dots eine Distanz von $< 2 \mu\text{m}$ aufweisen, rein morphologisch betrachtet kaum von Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten zu unterscheiden sind, wirkt sich die Substratgeometrie bei Dotabständen von $> 4 \mu\text{m}$ klar auf die Zellform aus. Je größer die Entfernung zwischen den Dots wird, desto deutlicher ist dieser Effekt zu beobachten (Lehnert *et al.*, 2004). Bestätigt wird diese geometrische Anpassung durch Experimente mit PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten. Hier betrug die Dotdistanz entlang der y -Gradientenachse sowie in dazu senkrechter Richtung (x -Richtung) in der Regel auch mehr als $4 \mu\text{m}$. Obwohl die Zellen entlang der y -Gradientenachse elongierten, generierten sie dabei kein definiertes Vorder- und Hinterende, wie es bei Zellen auf homogen FN-beschichteten Substraten der Fall war. Diese Beobachtung könnte durch die Gradientengeometrie erklärt werden. Während PCFs auf homogen FN-beschichteten Substraten überall Kontakte ausbilden können, ist auf mikrostrukturierten Substraten eine Zelladhäsion nur auf den mit FN beschichteten Dots möglich. Da die Zellen über den anti-adhäsiven Bereichen keine Kontakte ausbilden können, ist es ihnen bei dem hier verwendeten Dotmuster vermutlich nicht möglich ein flächiges Lamellipodium und demzufolge ein definiertes Vorderende zu generieren.

Zusätzlich zur morphologischen wurde in dieser Doktorarbeit auch die intrazelluläre Polarisierung von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten untersucht. Als Indikator für die Zellpolarisierung wurde dabei die Lokalisation des Golgi-Apparates verwendet. Die Analyse ergab, dass die meisten Zellen (60 %) zu Beginn des Spreadings (30 min) ihren Golgi-Apparat vor den Nukleus in Richtung der höheren FN-Dichte (uphill) positionieren. Dies entspricht der gängigen Lehrbuchmeinung, wonach Zellen ihren Golgi-Apparat vorzugsweise zwischen Nukleus und Zellvorderende ausrichten, um anschließend eine gerichtete Migration zu starten (Bergmann *et al.*, 1983; Prigozhina und Waterman-Storer, 2004; Schmoranzler *et al.*, 2003, Alberts *et al.*, 2008). Analysiert man allerdings die Golgi-Position von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten über einen längeren Zeitraum hinweg, so nahm der Anteil an uphill polarisierten Zellen mit fortschreitender Zeit stetig ab. Nach zwei Stunden, wenn die meisten PCFs (83 %) bereits haptotaktisch migrierten, war der Golgi-Apparat vorzugsweise zwischen Nukleus und Zellhinterende und somit in Richtung der niedrigeren FN-Dichte lokalisiert. Diese downhill Polarisierung wirkt zunächst befremdlich, da es fraglich scheint, den Golgi-Apparat entgegen der dynamischen Migrationsfront zu positionieren. Allerdings existieren auch in der Literatur einige Beispiele, in denen eine Lokalisation des Golgi-Apparates zwischen Nukleus und Hinterende der Zelle sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet wurde (Tab. 1.1). Unter anderem konnte in stark motilen Zellen wie T-

Lymphozyten und humanen Neutrophilen eine Polarisierung entgegen der Migrationsrichtung festgestellt werden (Gudima *et al.*, 1988; Serrador *et al.*, 1999). Dabei wird diskutiert, ob das Fehlen eines flächigen Lamellipodiums eine mögliche Ursache sein könnte, wodurch es morphologisch betrachtet kein definiertes Zellvorder- und Hinterende bei der Zellmigration gibt. Wenn das Lamellipodium fehlt, ist kein verstärkter Vesikeltransport an die Zellfront erforderlich, und der Golgi-Apparat muss nicht notwendigerweise im vorderen Bereich der Zelle positioniert sein. Vergleicht man diese Literaturdaten mit den in dieser Dissertation gewonnenen Daten, so fällt auf, dass PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ebenfalls kein flächiges Lamellipodium bilden. Dies liegt allerdings weniger an ihrer Motilität als vielmehr an der Substratgeometrie und der damit verbundenen Limitation ihrer Zell-Matrix-Kontakte. Somit könnte auch bei PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten das Fehlen eines flächigen Lamellipodiums ein Grund für die downhill Polarisierung sein. Allerdings zeigen auch andere Studien, dass die Substratgeometrie bzw. die Topologie der Zellumgebung ebenfalls einen Einfluss auf die Reorientierung des Golgi-Apparates haben. Zellen weisen in 3D Matrigelen morphologisch betrachtet eine starke Elongation auf und richten dabei ihren Golgi-Apparat entgegen der Migrationsrichtung aus (Doyle *et al.*, 2009). Auch bei der Entwicklung des Seitenliniennervs im Zebrafischembryo konnte eine derartige Golgi-Lokalisation beobachtet werden (Doyle *et al.*, 2009; Pouthas *et al.*, 2008). Studien auf mikrostrukturierten FN-Liniensubstraten zeigen zudem eine starke geometrische Limitation der Zellpolarisierung. So reorientieren Zellen, die auf schmalen (6 μm) FN-beschichteten Linien migrieren, ihren Golgi-Apparat vorzugsweise zwischen Nukleus und Zellhinterende. Ab einer Linienbreite von 40 μm positionieren die meisten Zellen ihren Golgi-Apparat jedoch vor den Nukleus in Migrationsrichtung (Pouthas *et al.*, 2008). Diese geometrische Limitation scheint aber weniger der Grund für die downhill Polarisierung haptotaktisch migrierender PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu sein. Aufgrund der FN-Dotdistanzen von knapp 5 μm senkrecht zur Gradientenachse (x-Achse) können die Zellen mehrere FN-Dotabstände gleichzeitig überbrücken und sind somit in ihrer Breite weniger begrenzt, als Zellen auf Liniensubstraten. Eine einfache Erklärung, im Vergleich zu Zellform/Motilität und Zellumgebung, könnte eine zelltypspezifische Positionierung des Golgi-Apparates sein. Yvon *et al.* konnten zeigen, dass bei der Migration in Wundheilungsassays verschiedene Zelltypen ihr Zentrosom unterschiedlich ausrichten (Yvon *et al.*, 2002). Um zu überprüfen, ob eine zelltypspezifische Lokalisation des Golgi-Apparates auch ein Grund für die downhill Polarisierung von haptotaktisch migrierenden PCFs sein könnte, wurden in dieser Arbeit Wundheilungsassays als Referenz durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass die meisten Zellen (65 %), die gerichtet in eine Wunde einwandern, ihren Golgi-Apparat zwischen Nukleus und Migrationsfront und somit in Wundrichtung orientieren. Daraus folgt, dass die downhill Polarisierung von haptotaktisch migrierenden PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten nicht auf den verwendeten Zelltyp (= PCF) zurückzuführen ist, zumal auch die haptotaktisch migrierenden HFFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten vorzugsweise downhill polarisierten.

Fasst man die Daten zusammen, so polarisierten die Zellen zu Beginn des Spreadings auf den Gradienten uphill, indem sie ihren Golgi-Apparat vor den Nukleus zur höheren FN-Bedeckung hin positionierten. Anschließend begannen die Zellen in diese Richtung haptotaktisch zu migrieren und der Golgi-Apparat orientierte sich downhill zwischen Nukleus und

Zellhinterende. Es stellte sich nun die Frage, wie diese Positionsänderung des Golgi-Apparates während der Haptotaxis zustandekommt, da zu Beginn des Spreading (bis 30 min) der Golgi-Apparat uphill, dann aber bei der Migration im Gradienten downhill lokalisiert ist. Die bisherigen Analysen erfolgten anhand immunhistochemischer Färbungen. Da diese nur Momentaufnahmen der Zelle darstellen und nicht den dynamischen Prozess einer Golgi-Reorientierung adäquat widerspiegeln, wurden Zeitrafferuntersuchungen mit GM-130-eGFP (ein Golgi-Marker) transfizierten Zellen durchgeführt. Diese zeigten, dass der Golgi-Apparat zu Beginn der haptotaktischen Migration noch uphill zwischen Nukleus und Zellvorderende lokalisiert ist. Im weiteren Zeitverlauf wird der Nukleus in Migrationsrichtung nach vorne gebracht, während der Golgi-Apparat stationär verbleibt. Durch diese aktive Positionsänderung des Nukleus gelangt der Golgi-Apparat zwischen Nukleus und Zellhinterende und ist nun entgegen der Migrationsrichtung ausgerichtet. Diese Beobachtungen entsprechen zum Teil der Literatur zu Wundheilungsassays, in denen festgestellt wurde, dass die Lokalisation des Zentrosoms und des Golgi-Apparates im Zellzentrum beibehalten und stabilisiert wird, während der Nukleus eine aktive Bewegung erfährt (Gomes *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den haptotaktisch migrierenden PCFs wird bei den von Gomes *et al.* verwendeten NIH3T3 Fibroblasten der Nukleus allerdings nicht an das Vorder-, sondern retrograd an das Hinterende der Zelle gebracht. Dabei konnten Gomes *et al.* zeigen, dass diese gerichtete Bewegung über die kleine Rho GTPase Cdc42 und ihres Effektors MRCK vermittelt wird. Cdc42 und MRCK sorgen für eine Aktivierung des Motorproteins Myosin II, wodurch ein retrograder Aktinfluss an das Hinterende der Zelle stattfindet und der Nukleus wie auf Schienen nachgezogen wird (Gomes *et al.*, 2005). Die Aktinabhängigkeit der Nukleusbewegung wird zum einen dadurch belegt, dass die Geschwindigkeit, mit der sich der Nukleus nach hinten bewegt, der des retrograden Aktinflusses entspricht (Mikhailov und Gundersen, 1995; Waterman-Storer und Salmon, 1997; Salmon *et al.*, 2002). Desweiteren wurde gezeigt, dass eine pharmakologische Inhibition der Myosin II ATPase (= verhindert Aktinbündelung) durch Blebbistatin zu einem Stopp der Nukleusbewegung führt und infolgedessen eine Ausrichtung des Zentrosoms zwischen Nukleus und Zellvorderende verhindert wird (Gomes *et al.*, 2005). An der Verankerung des Nukleus mit den dorsalen, retrograd fließenden Aktinfilamenten sind in erster Linie die beiden Kernmembranproteine SUN2 und Nesprin2 beteiligt, die die Nukleus-Reorientierung zum Zellhinterende ermöglichen (Luxton *et al.*, 2010; Starr, 2010). Berücksichtigt man diese Erkenntnisse, stellt sich nun die Frage, warum der Golgi-Apparat im Falle haptotaktisch migrierender PCFs (und HFFs) an das Vorder- statt an das Hinterende der Zelle transportiert wird. Dazu sei zu berücksichtigen, dass in Wundheilungsassays und in Chemotaxisassays Zellen ein flächiges Lamellipodium und demzufolge eine sehr dynamische Lauffront ausbilden. Aufgrund dieser Dynamik sind die Zell-Matrix-Kontakte am Zellvorderende im Gegensatz zu PCFs und HFFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten weniger stabil und können leichter abgebaut werden. PCFs bilden auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kein flächiges, dynamisches Lamellipodium aus und sind am Vorderende sehr stark mit dem strukturierten FN-Substratmuster verankert. Vergleicht man Vorder- und Hinterende, so bilden die Zellen aufgrund des Gradientenverlaufs am Vorderende prozentual mehr Zell-Matrix-Kontakte aus, da sie dort auch mehr FN-Adhäsionspunkte vorfinden. Migriert nun die Zelle, so löst sich aufgrund der starken Verankerung des Zellvorderendes zuerst das schwächer gebundene Hinterende mit seinen

Aktinfilamenten, während das Vorderende mit den Aktinfilamenten noch mit dem Substrat verbunden ist. Da der Nukleus physikalisch über den SUN2/Nesprin2 Komplex an die Aktinfilamente gekoppelt ist (Luxton *et al.*, 2010; Starr, 2010), könnte vermutet werden, dass er automatisch an das Vorderende transportiert wird, da die Aktinfilamente des Zellhinterendes sich bei der Migration lösen. Die vorliegende Arbeit unterstützt diese Hypothese durch Zeitrafferuntersuchungen an ungerichtet migrierenden PCFs auf homogenem FN-Substrat. Es konnte gezeigt werden, dass PCFs ein flächiges Lamellipodium ausbilden und ihren Golgi-Apparat immer in Migrationsrichtung (uphill) orientieren.

Zell-Matrix-Kontakte und Zytoskelett der Zelle

Zell-Matrix-Kontakte sind hochdynamische Strukturen und unterliegen insbesondere in migrierenden Zellen einem ständigen Auf- und Abbau (Wehrle-Haller und Imhof, 2002; Huttenlocher und Horwitz, 2011; Gardel *et al.*, 2010; Goetz, 2009). Sie stellen die Voraussetzung für eine gerichtete Zellmigration dar, indem sie die Ausbildung und Stabilisierung von Lamellipodien sowie Filopodien bewirken. Da Zell-Matrix-Kontakte die Schnittstelle zwischen der Zelle und ihrer Umgebung bilden und somit für den gegenseitigen Informationsaustausch verantwortlich sind, ist anzunehmen, dass sie die zur Verfügung stehende Ligandenanzahl wahrnehmen können. Hierbei sind insbesondere die Integrin-Rezeptoren als Hauptvermittler der Zell-ECM-Wechselwirkung von entscheidender Bedeutung (Huttenlocher und Horwitz, 2011; Mostafavi-Pour *et al.*, 2003; Gaudet *et al.*, 2003). Betrachtet man die räumliche Verteilung der Zell-Matrix-Kontakte in PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten, so zeigte sich eine Akkumulation über den FN-Dots. Während die signalgebenden Adapterproteine wie beispielsweise Vinculin fast ausschließlich in der Zellperipherie vorkamen, häuften sich die Integrin-Rezeptoren über allen FN-Dots an, die von den Zellen bedeckt wurden. Das überwiegend periphere Vorkommen von Zell-Matrix-Kontakten lässt darauf schließen, dass reife Kontakte nur in diesen Bereichen für die Adhäsion benötigt werden. Da im Zellzentrum kaum Kräfte durch das Aktin-Zytoskelett ausgeübt werden (Goldmann, 2012), erfolgt hier auch selten Kontaktreifung. Dennoch bleibt der Integrin-Rezeptor auf jedem FN-Dot, an dem die Zelle adhärert, verankert. Dies könnte z.B. verhindern, dass sich die Zelle vom Substrat ablöst und stirbt, falls die peripheren Kontakte bei der Migration aufgelöst oder abgerissen werden. Aufgrund der Kontaktverteilung und -anzahl lässt sich nicht erkennen, wie PCFs einen mikrostrukturierten FN-Dotgradienten auslesen. Es ist zwar bekannt, dass Zellen Unterschiede in ihrer ECM-Ligandenanzahl erkennen und verrechnen können (Dissertation, Zhongxiang Jiang, 2009), allerdings ist dieser Mechanismus bisher nicht verstanden. Nachdem das Integrin an FN gebunden hat, wird die Information aus der ECM in die Zelle weitergeleitet. Dabei werden eine Reihe von intrazellulären Adapter- und Signalproteinen rekrutiert und aktiviert (Geiger *et al.*, 2001; Wehrle-Haller und Imhof, 2002; Zaidel-Bar *et al.*, 2007; Zamir und Geiger, 2001). Es ist vorstellbar, dass diese Signalweiterleitung in einem bestimmten Verhältnis erfolgt (Integrinmolekül : Adaptermolekül; 1 : 1), wodurch die Zellen die FN-Dichte in der Umgebung wahrnehmen können. Da PCFs auf einem mikrostrukturierten FN-Dotgradienten an ihrem Vorderende an mehr Liganden binden als an ihrem Hinterende, sind der Input und damit auch

die intrazellulär weitergeleiteten Signale entsprechend verschieden. Dies könnte zu einem Verstärkungsmechanismus der intrazellulären Signaltransduktionswege führen. Bereits bei der Chemotaxis konnte ein derartiger Verstärkungsmechanismus gezeigt werden. Höher entwickelte Zellen wie z.B. *Dictyostelium discoideum* oder humane Neutrophile besitzen die Fähigkeit, Gradienten aus löslichen, chemischen Signalstoffen zu erkennen und spezifisch zu reagieren (Cai und Devreotes, 2011). Ihre Oberflächenrezeptoren, mit denen diese Stoffe erkannt werden, sind dabei gleichmäßig über die Zelle verteilt. Da allerdings an dem der Quelle des chemischen Stoffes zugewandten Ende der Zelle mehr Rezeptoren durch attraktive, chemische Signalstoffe abgesättigt werden, findet hier eine stärkere Aktivierung von Signalproteinen statt, als am entgegengesetzten Ende. Durch eine Reihe von nachgeschalteten, komplexen Vorgängen, wie Antagonismen und Rückkopplungsschleifen, entsteht eine Asymmetrie intrazellulärer Signale. Diese wirken unter anderem auf das Zytoskelett der Zelle ein und induzieren eine gerichtete Migration zur chemischen Quelle (Chemotaxis) hin (Korodha *et al.*, 2002; Cai und Devreotes 2011). Es ist denkbar, dass bei der Haptotaxis von PCFs ähnliche Mechanismen das Erkennen und Verrechnen von mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ermöglichen. Die Aktinfilamente sind mit den Zell-Matrix-Kontakten verankert, orientieren sich entlang der Gradientenachse und zeigen damit eine Asymmetrie, die möglicherweise auch zu asymmetrischen, intrazellulären Signalen führt. Die Verankerung an Zell-Matrix-Kontakte erfolgt dabei in erster Linie über Adapterproteine, während die Bündelung von Aktinfilamenten vor allem der Interaktion mit dem Motorprotein Myosin II unterliegt. Diese Interaktion (von Aktinfilamenten mit Myosin II) erzeugt eine intrazelluläre Zugkraft, welche für die Regulation vieler zellulärer Mechanismen wie der Zelladhäsion, der Zellpolarisierung und der Zellmigration wichtig ist (Orr *et al.*, 2006; Svitkina *et al.*, 1997). Die Bedeutung der intrazellulären Zugkraft für die Haptotaxis und die Zellpolarisierung auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ist nicht bekannt. Ihr Einfluss ist aber sehr wahrscheinlich und wurde deshalb im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht. Die gezielte Manipulation der intrazellulären Aktin-/Myosin Kontraktilität und gelang durch den Einsatz diverser, pharmakologischer Inhibitoren. Hierbei wurde erstens Y-27632 verwendet, welches unter anderem Effektoren der kleinen Rho GTPase Rho, wie z.B. die ROCK-Kinase (ROCK) inhibiert. Zwei wichtige ROCK-Substrate sind die regulatorische MLC (*myosin light chain*) des Motorproteins Myosin II und die MBS (*myosin binding subunit*) der MLC-Phosphatase (Bishop und Hall, 2000). Behandelt man Zellen mit Y-27632 nimmt aufgrund einer reduzierten ROCK-Aktivierung die Phosphorylierung der MLC des Motorproteins Myosin II ab. Hierdurch können weniger Aktinfilamente gebündelt und gegeneinander verschoben werden (Riento und Ridley, 2003). Dies führt zu einer reduzierten Ausbildung von Aktinstressfasern und inhibiert infolgedessen die intrazelluläre Kontraktilität (Ishizaki *et al.*, 2000; Uehata *et al.*, 1997). Als zweiter, pharmakologischer Inhibitor wurde Blebbistatin verwendet, welches die Myosin II ATPase Aktivität blockiert (Kovacs *et al.*, 2004; Limouze *et al.*, 2004). Hierbei bindet Blebbistatin an das Myosin II ATPase Intermediat (ADP und Phosphat), verhindert dessen Phosphatgabe und damit auch die krafterzeugende Konformationsänderung des Myosinköpfchens. Folglich können Aktinfilamente nicht mehr gegeneinander verschoben werden, und der intrazelluläre Zug kommt - ähnlich wie bei Verwendung des ROCK-Inhibitors Y-27632 - zum Erliegen (Kovacs *et al.*, 2004; Allingham *et al.*, 2005).

Für die Experimente dieser Arbeit wurden niederkonzentrierte Mengen an Y-27632 und Blebbistatin eingesetzt, da lediglich eine Störung und kein vollständiger Verlust der intrazellulären Kontraktilität erzielt werden sollte. Es zeigte sich, dass PCFs, die mit Y-27632 und Blebbistatin behandelt wurden, auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten nicht mehr haptotaktisch wandern, sondern - unabhängig vom Gradientenverlauf - gleichermaßen in alle Richtungen migrieren. Dies verdeutlicht, dass die intrazelluläre Zugkraft wichtig für die Haptotaxis von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ist. Den Verlust der gerichteten Migration nach Reduktion der intrazellulären Zugkraft wird auch durch Studien von Wang *et al.* in Chemotaxisassays bestätigt. Muskelzellen migrieren nach Behandlung mit Blebbistatin innerhalb eines PDGF (*platelet-derived growth factor*) Gradienten nicht mehr chemotaktisch zur höheren Konzentration, sondern - unabhängig von der chemischen Quelle - in alle Richtungen (Wang *et al.*, 2008). Für Krebszellen konnte ebenfalls ein Einfluss der reduzierten Zellkontraktilität auf das Migrationsverhalten beobachtet werden (Chang *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012). Doyle *et al.* zeigten in Zellmigrationanalysen auf FN-Linien, dass Zell-FN-Adhäsionen nach Reduktion der intrazellulären Kontraktilität weniger stabil sind und dadurch die Effizienz der Migration reduziert ist (Doyle *et al.*, 2012). Die verringerte Stabilität der Zell-FN-Adhäsionen nach Inhibition der intrazellulären Zugkräfte könnte auch erklären, warum PCFs keine haptotaktische Migration mehr auf den mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ausführen. Es könnte aber auch sein, dass dieses Verhalten auf eine mangelnde intrazelluläre Polarisierung zu Beginn des Spreadings zurückzuführen ist. Analysiert man die Golgi-Position von PCFs, die mit Y-27632 behandelt wurden, so zeigte sich im Gegensatz zu unbehandelten Zellen eine ungerichtete, in allen Richtungen gleichermaßen verteilte Lokalisation des Golgi-Apparates. Erklären lässt sich die willkürliche Position des Golgi-Apparates (nach Reduktion der intrazellulären Kontraktilität) unter anderem durch eine fehlende Ausrichtung des Nukleus. Aus der Literatur ist bekannt, dass für die Zellpolarisierung während der Migration (bei der der Golgi-Apparat und das Zentrosom vor dem Nukleus in Richtung des Lamellipodiums positioniert sind) der Nukleus retrograd an das Zellhinterende gelangen muss (Gomes *et al.*, 2005). Studien belegen, dass diese Bewegung durch den Myosin II abhängigen Aktinfluss reguliert wird. Die Geschwindigkeit, mit der sich der Nukleus an das Zellhinterende bewegt, entspricht der des retrograden Aktinflusses (Mikhailov und Gundersen, 1995; Waterman-Storer und Salmon, 1997; Salmon *et al.*, 2002). Inhibitionsexperimente von Myosin II in Wundheilungsassays zeigen zwar keinen Einfluss auf den retrograden Aktinfluss im Lamellipodium, führen aber zu einem Stopp des Aktinflusses in der nachgeschalteten Lamelle. Dies hat zur Folge, dass der Nukleus nicht mehr an das Zellhinterende transportiert werden kann und die Zellen nicht mehr polarisieren bzw. gerichtet in die Wunde einwandern (Henson *et al.*, 1999; Vallotton *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Vergleicht man diese Literaturdaten mit den im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnissen, so könnte auch bei den PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten durch die Inhibition von ROCK (Y-27632) der retrograde Aktinfluss zum Erliegen kommen. Dies hätte ebenfalls zur Folge, dass der Nukleus nicht mehr an das Hinterende gezogen wird und die Zellen nicht mehr polarisieren. Weitere Indizien für diese Hypothese liefern Einzelzellstudien aus der Literatur. Diese Studien, die auf unterschiedlich mikrostrukturierten Proteinsubstraten durchgeführt wurden, belegen auch eine Beteiligung intrazellulärer Zugkräfte an der Ausrichtung des Nukleus. Wurden die Einzelzellen mit niederkonzentrierten Mengen an

Blebbistatin oder Y-27632 behandelt, so verblieb der Nukleus im Zellzentrum und somit in unmittelbarer Nähe zum Zentrosom (Hale *et al.*, 2012; Khatau *et al.*, 2009; Khatau *et al.*, 2010). Es ist allerdings zu beachten, dass die Reduktion der intrazellulären Kontraktilität nicht nur zu einer Störung der Nukleusausrichtung führt, sondern, aufgrund der Kopplung von Nukleus und Zentrosom, auch Einfluss auf die Position des Zentrosoms nimmt. Eine mangelhafte Ausrichtung des Nukleus hat somit zusätzlich eine fehlerhafte Lokalisation des Zentrosoms zur Folge (Crisp *et al.*, 2006; Hale *et al.*, 2008; Salpingidou *et al.*, 2007).

Neben den Aktinfilamenten spielen auch die Mikrotubulifilamente eine wichtige Rolle bei der Zellpolarisierung und der Zellmigration. Betrachtet man ihre Organisation in haptotaktisch migrierenden PCFs, so zeigte sich allerdings im Gegensatz zu den Aktinfilamenten eine weniger starke Orientierung an der Substratgeometrie. Während Aktinfilamente entlang der γ -Gradientenachse elongierten und dabei stark gebündelte Aktinstressfasern ausbildeten, wiesen die Mikrotubulifilamente einen nicht offensichtlich organisierten Charakter auf. Diese Mikrotubuli-Organisation wurde außer bei den PCFs auch bei den haptotaktisch wandernden HFFs beobachtet. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die Mikrotubulifilamente in migrierenden Zellen weitaus dynamischer sind, als in stationären Zellen, und somit einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen (de Forges *et al.*, 2012). Bekräftigt wird diese Vermutung durch die Mikrotubuli-Organisation von stationär auf den FN-Gradienten verbleibenden A549, BRL und MEF Zellen in dieser Arbeit. Bei diesen stationären Zellen zeigte sich eine deutliche Anordnung von Mikrotubulibündeln, die im Zellzentrum starteten und sich von dort in die Zellperipherie ausbreiteten. Da die Mikrotubulifilamente auch in PCFs und HFFs auf homogenen, FN-beschichteten Substraten in klaren, filamentären Strukturen vom Zellzentrum radiärsymmetrisch in die Peripherie verliefen, lässt sich ein Zusammenhang zwischen der Mikrotubuli-Organisation, dem Gradientenmuster und der Migration herstellen. Denkbar ist es, dass der unorganisierte Charakter der Mikrotubulifilamente von haptotaktisch migrierenden Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten durch die vorgegebene Lokalisation der Zell-Matrix-Kontakte und durch den hohen Mikrotubuliumsatz während der Haptotaxis verursacht wird.

Um die Bedeutung der Mikrotubulidynamik für die Haptotaxis und die Polarisierung von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt die beiden pharmakologischen Inhibitoren Taxol und Nocodazol eingesetzt. Während Taxol zu einer Stabilisierung der Mikrotubulifilamente führt, bewirkt Nocodazol deren Depolymerisierung. Trotz ihrem unterschiedlichen Wirkmechanismus haben beide Chemikalien eine Reduktion der Wachstums- und Abbaurate von Mikrotubulifilamenten in Zellen zur Folge. Da lediglich eine Störung der Mikrotubulidynamik und kein vollständiger Abbau der Mikrotubulifilamente erfolgen sollten, wurden niederkonzentrierte Mengen eingesetzt. Nach Reduktion der Mikrotubulidynamik migrierten die PCFs nicht mehr vorzugsweise uphill zur höheren FN-Dichte. Es wanderte nur noch die Hälfte der PCFs haptotaktisch, während die andere Hälfte in die entgegengesetzte Richtung zur niedrigeren Proteindichte migrierte. Demnach orientierten sich die PCFs nach wie vor entlang der γ -Gradientenachse, konnten allerdings den Gradientenverlauf nicht mehr erkennen. Sie waren nicht in der Lage wahrzunehmen, in welche Richtung die FN-Konzentration zu- bzw. abnahm und migrierten zufällig je zur Hälfte uphill und downhill. Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob Taxol oder Nocodazol verwendet wurde. In der Literatur konnte bei Versuchen mit chemotaktisch

wandernden Neutrophilen, Makrophagen und Endothelzellen bereits eine starke Abnahme der gerichteten Migration nach Depolymerisierung der Mikrotubulifilamente durch Nocodazol beobachtet werden (Niggli *et al.*, 2003; Redd *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005; Hotchkiss *et al.*, 2002). Andere Studien belegen sogar einen kompletten Stopp der Migration oder zumindest eine verringerte Migrationsrate (Vasiliev *et al.*, 1970; Liao *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1983). Grund hierfür könnte unter anderem die in Folge einer gestörten Mikrotubulidynamik reduzierte Ausbildung von Filo- und Lamellipodien sein (Krendel *et al.*, 2002; Mikhailov *et al.*, 1998). Diese Strukturen sind für eine koordinierte Vorwärtsbewegung der Zelle essentiell, wodurch sich deren Verlust negativ auf die Migrationsfähigkeit auswirkt. Da die PCFs in den Arbeiten zu dieser Dissertation nach Reduktion ihrer Mikrotubulidynamik noch entlang der y -Gradientenachse, allerdings nicht in dazu senkrechter Richtung (lateral) wanderten, stellte sich die Frage, wie und warum die PCFs die y -Achse des Gradienten noch erkennen, aber offensichtlich nicht die Proteinmenge auslesen konnten. Hierüber lassen sich einige Vermutungen anstellen. Es könnte sein, dass für das Auslesen des FN-Gradienten weniger die Mikrotubulifilamente als vielmehr die durch das Aktin-Zytoskelett vermittelten, intrazellulären Zugkräfte verantwortlich sind. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, dass die PCFs – wie bereits oben erwähnt – nach Reduktion ihrer intrazellulären Kontraktilität keine Haptotaxis mehr zeigten und in alle Richtungen wanderten. Desweiteren lässt sich vermuten, dass den Mikrotubulifilamenten eher eine Rolle bei der Zellpolarisierung zukommt, als bei der haptotaktischen Migration. Gestützt wird diese These durch Studien aus der Literatur, die in Wundheilungs- und Chemotaxisassays eine Beteiligung der Mikrotubulifilamente an der Zellpolarisierung nachweisen konnten (Gomes *et al.*, 2005).

Aufgrund der Tatsache, dass die Zellpolarisierung die Grundlage einer gerichteten Migration darstellt (Biname *et al.*, 2010), wurde in einem nächsten Schritt untersucht, inwiefern die Störung der Mikrotubulidynamik auch Einfluss auf die Polarisierung von PCFs zu Beginn des Spreadings auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten nimmt. Die Golgi-Position von PCFs wurde ermittelt, nachdem die Zellen mit Nocodazol behandelt wurden. Ähnlich wie bei der Reduktion der intrazellulären Kontraktilität durch Y-27632 zeigte sich auch hier im Gegensatz zu unbehandelten PCFs eine gleichmäßige Verteilung der Golgi-Lokalisation unabhängig vom FN-Gradientenverlauf. Der Golgi-Apparat war in nahezu alle Richtungen gleichermaßen positioniert. Einen Verlust der Zellpolarisierung nach Reduktion der Mikrotubulifilamente belegen auch Studien an chemotaktisch wandernden T-Zellen und Neutrophilen, sowie an Fibroblasten in Wundheilungsassays (Gomes *et al.*, 2005; Takesono *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2005). Hierbei spielt vor allem die fehlerhafte Ausrichtung des Zentrosoms und des Golgi-Apparates eine Rolle (Hale *et al.*, 2012). Es ist bekannt, dass Mikrotubulifilamente ihren Nukleationspunkt im Zentrosom, aber auch im Golgi-Apparat haben (Oakley und Oakley, 1989; Oakley und Akkari, 1999; Efimov *et al.*, 2007). Von dort strahlen sie vorwiegend in Richtung Zellvorderende aus und sorgen für eine schnelle und gerichtete Versorgung der Migrationsfront mit neuen Membranbausteinen (Bergmann *et al.*, 1983; Prigozina und Waterman-Storer, 2004; Schmoranzler *et al.*, 2003). Wie bereits erwähnt, wird die Ausrichtung des Zentrosoms und des Golgi-Apparates zwischen Nukleus und Zellvorderende einerseits durch die retrograde Bewegung des Nukleus, andererseits durch die Stabilisierung des Zentrosoms und des Golgi-Apparates gewährleistet (Gomes *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2009). Während für die retrograde Bewegung des Nukleus in erster Linie die Aktinfilamente

verantwortlich sind (Gomes *et al.*, 2005), spielen die Mikrotubulifilamente vor allem bei der Stabilisierung des Zentrosoms und des Golgi-Apparates eine Rolle (Miller *et al.*, 2009). Sie werden unter anderem über eine Reihe von TIPs wie beispielsweise APC (*adenomateous polyposis coli*) am Zellkortex verankert. Darüber hinaus sind daran je nach Zelltyp auch das Motorprotein Dynein, Par3, Dlg (*Discs large*) oder GKAP (*Guanylate Kinase-Associated Protein*) beteiligt (Schmoranzner *et al.*, 2009; Manneville *et al.*, 2010; Etienne-Manneville *et al.*, 2003a; Etienne-Manneville *et al.*, 2005; Schlessinger *et al.*, 2007; Barth *et al.*, 2008). Werden die Mikrotubulifilamente nun durch pharmakologische Inhibition reduziert, kann die Stabilisierung des Zentrosoms und des Golgi-Apparats, und somit deren Ausrichtung zwischen Nukleus und Zellvorderende nicht mehr gewährleistet werden (Gomes *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass PCFs auf den mikrostrukturierten FN-Dotgradienten nicht mehr vorzugsweise in Richtung der höheren FN-Bedeckung polarisierten, könnte auch der Grund dafür sein, warum die Zellen nicht mehr haptotaktisch migrierten. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden die Zellen in einem weiteren Experiment zuerst für 30 min auf den Gradienten vorkultiviert und anschließend mit Nocodazol behandelt. Dadurch sollte eine uphill Polarisierung in Richtung der höheren Proteindichte gewährleistet werden, bevor anschließend die Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts gestört wurde. Die Analyse ergab, dass die meisten Zellen wieder haptotaktisch wanderten. Das Migrationsverhalten entsprach somit dem von unbehandelten Zellen. Daraus lässt sich schließen, dass die Grundlage für eine haptotaktische Migration die Zellpolarisierung zu Beginn des Zellsreadings auf den FN-Gradienten ist.

Cdc42 und ihr downstream Effektor α PKC ζ

Die Regulation der Aktin- und Mikrotubuliorganisation während der Zellpolarisierung und -migration unterliegt einer strengen Kontrolle durch die kleinen Rho GTPasen. Hierbei spielen Cdc42 und ihre Effektormoleküle wie beispielsweise die Proteinkinase α PKC ζ eine besondere Rolle (Etienne-Manneville *et al.*, 2003; Etienne-Manneville *et al.*, 2005; Solecki *et al.*, 2004; Pegtel *et al.*, 2007). Cdc42 koordiniert unter anderem die Ausbildung von Filopodien, was zusammen mit der Rac1 induzierten Lamellipodienentwicklung eine gerichtete Vorwärtsbewegung der Zelle ermöglicht (Welch und Mullins, 2002). Daneben spielt Cdc42 auch bei der Ausrichtung des Zentrosoms zwischen Nukleus und Vorderende der Zelle eine entscheidende Rolle (Hehnlly *et al.*, 2010). Diese Ausrichtung wird in erster Linie durch zwei Cdc42 vermittelte Signalwege gesteuert. Hierbei wird einerseits durch die Aktivierung der MRCK und des Motorproteins Myosin II ein retrograder Aktinfluss an das Hinterende der Zelle induziert, und der daran gekoppelte Nukleus nachgezogen (Gomes *et al.* 2005; Luxton *et al.* 2010; Starr *et al.*, 2010). Gleichzeitig wird durch die Aktivierung des Par6/Par3/ α PKC ζ Komplexes die Lokalisation des Zentrosoms im Zellzentrum beibehalten. Dies geschieht durch die Stabilisierung der Mikrotubulifilamente, deren Ursprung im Zentrosom liegt, und die über eine Reihe an TIPs, Adapter- sowie Motorproteinen in der Zellperipherie verankert werden (Schmoranzner *et al.*, 2003; Schmoranzner *et al.*, 2009; Manneville *et al.*, 2010). Der bisherige Kenntnisstand über den Wirkmechanismus von Cdc42 und ihrem Effektor α PKC ζ basiert hauptsächlich auf Studien, in denen Wundheilungs- oder Chemotaxisassays verwendet

wurden (Etienne-Manneville und Hall, 2001; Etienne-Manneville, 2005; Gomes *et al.*, 2005). Der Einfluss von Cdc42 und α PKC ζ auf die Haptotaxis von PCFs ist allerdings noch weitestgehend unbekannt und wurde in den Experimenten zu der vorliegenden Arbeit analysiert. Für die Untersuchung von Cdc42 wurden die Zellen mit verschiedenen Cdc42-pDNA Konstrukten transient transfiziert. Neben dem Cdc42-wt-dTom (wt = wildtyp) wurde auch das dominant negative Protein Cdc42-DN-dTom verwendet. Cdc42-wt-dTom diente hierbei als Kontrolle, um den Einfluss des zusätzlich zum endogen vorhandenen Cdc42 zu bestimmen. Das dominant negative Cdc42-DNA-Konstrukt kodiert für ein Protein, welches dem endogenen Cdc42 strukturell recht ähnlich ist. Hierbei ist lediglich eine Aminosäure, in diesem Fall Threonin, an Position 17 durch Asparagin ersetzt, wodurch die Affinität von Cdc42 für GTP aufgehoben und die für GDP reduziert ist (Heasman und Ridley, 2008). Dies führt dazu, dass sich Cdc42 entweder in einem nukleotid-freien (inaktiv) oder aber in einem GDP-gebundenen (auch inaktiv) Zustand befindet. Hierdurch fängt es die GEFs ab, was die Aktivierung des endogenen Cdc42 und somit die Signalweiterleitung verhindert (Wong *et al.*, 2006). Die Analyse der Migration von transient transfizierten PCFs (Cdc42-DN) auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ergab, dass Cdc42 eine zentrale Schlüsselrolle bei der Haptotaxis einnimmt. Liegt Cdc42 nicht funktional vor, so sind PCFs nicht mehr in der Lage auf den mikrostrukturierten FN-Dotgradienten adäquat zu reagieren und zeigen eine ungerichtete Migration in alle Richtungen (keine Haptotaxis). Diese ungerichtete Migration, ausgelöst durch die Expression eines dominant negativen Cdc42 Proteins konnte bereits bei der Chemotaxis nachgewiesen werden. Makrophagen bilden zwar noch ein definiertes Vorder- und Hinterende aus, sind aber nicht mehr in der Lage auf einen chemischen, löslichen Gradienten zu reagieren (Allen *et al.*, 1998). Ähnliche Resultate wurden auch in embryonalen Mausfibroblasten beobachtet (Yang *et al.*, 2006). Im Gegensatz zu den Studien von Allen und Yang schließen Monypenny *et al.* eine Beeinflussung der Migrationsrichtung durch Cdc42 bei der Chemotaxis aus. Sie postulieren lediglich eine Reduktion der Motilität in den löslichen Gradienten. Ein Grund für dieses abweichende Ergebnis könnte im experimentellen Ansatz begründet sein. So wurde die Analyse nicht mit dominant negativen Konstrukten, sondern mit einem Cdc42 knock-down in embryonalen Mausfibroblasten durchgeführt (Monypenny *et al.*, 2009). Wie aus der Literatur zu entnehmen ist, hat eine reduzierte Cdc42 Funktionalität tiefgreifende Auswirkungen auf das Polarisierungs- und Migrationsverhalten von Zellen. Da Cdc42 am Zellvorderende eine Reihe von Signaltransduktionswegen reguliert, die für eine erfolgreiche Zellpolarisierung und -migration notwendig sind (Wu *et al.*, 2007; Hehnlly *et al.*, 2010; Etienne-Manneville, 2003; Etienne-Manneville, 2005; Etienne-Manneville und Hall, 2001; Etienne-Manneville und Hall, 2003; Schlessinger, 2007; Cau *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2005), erklärt dies auch, warum PCFs auf adhäsiven, mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ihre Direktionalität verlieren, sobald Cdc42 nicht mehr funktional vorliegt.

Der downstream Effektor von Cdc42, die Proteinkinase α PKC ζ , spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Zellpolarisierung und der gerichteten Zellmigration. Um den Einfluss von α PKC ζ auf die Haptotaxis von PCFs zu untersuchen, wurden neben einer pharmakologischen Inhibition (iPKC ζ) auch α PKC ζ -pDNA Konstrukte verwendet. Sowohl α PKC ζ -wt-eGFP als auch das dominant negative Protein α PKC ζ -DN-eGFP wurden eingesetzt. Die Migrationsanalyse ergab, dass PCFs, deren α PKC ζ inhibiert wurde, nicht mehr vorzugsweise uphill zur höheren Proteindichte wanderten und Haptotaxis zeigten, sondern gleichermaßen in alle Richtungen

migrierten. Dasselbe galt für PCFs, die das dominant negative Protein der Proteinkinase α PKC ζ exprimierten. Eine Inhibition von α PKC ζ bewirkt damit das gleiche ungerichtete Migrationsverhalten von PCFs, wie nach Reduktion der Cdc42 Aktivität. Erklären lässt sich dieses Ergebnis damit, dass die Proteinkinase α PKC ζ downstream von Cdc42 eine Reihe von Signalmolekülen reguliert, die für die Zellpolarisierung und somit auch für die gerichtete Migration essentiell sind. α PKC ζ liegt in einem hochkonservierten Komplex mit Par6 und Par3 (Par Komplex) vor, der vor allem für drei Signalwege von Bedeutung ist.

In dem ersten Signalweg kontrolliert der Par6/Par3/ α PKC ζ Komplex eine Vielzahl an Proteinen wie z.B. die Mikrotubuli Plusenden assoziierten TIPs EB3 bzw. APC oder das Motorprotein Dynein, welche die Mikrotubulifilamente am Zellkortex verankern und somit das Zentrosom in der Zellmitte stabilisieren. Dies gewährleistet einen gezielten und schnellen Vesikeltransport an das Vorderende der Zelle und ermöglicht dadurch eine gerichtete Zellmigration. (Schmoranzner *et al.* 2009, Manneville *et al.*, 2010; Etienne-Manneville *et al.*, 2003a; Etienne-Manneville *et al.*, 2005; Schlessinger *et al.*, 2007; Barth *et al.* 2008). Wird nun die Aktivität der Proteinkinase α PKC ζ in PCFs vermindert, könnte die daraus resultierende, ungerichtete Migration auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten damit begründet werden, dass die PCFs aufgrund einer reduzierten Mikrotubulistabilisierung kein definiertes Vorderende mehr ausbilden können.

In einem zweiten Signalweg reguliert der Par6/Par3/ α PKC ζ Komplex die Aktivität der kleinen Rho GTPase Rac1. Hierbei rekrutiert Par3 am Zellvorderende den GEF TIAM1 (*T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*), der wiederum Rac1 aktiviert und somit eine Rolle bei der Aktinpolymerisierung und der daraus resultierenden Ausbildung des Lamellipodiums spielt. Rac1 koordiniert ebenfalls wie TIPs, APC und Dynein die Stabilisierung von Mikrotubulifilamenten am Zellvorderende (Pegtel *et al.*, 2007). Legt man diese Literaturdaten den in dieser Dissertation durchgeführten Experimenten zugrunde, lässt sich vermuten, dass es in den PCFs durch die Inhibition von α PKC ζ oder Expression des α PKC ζ -DN ebenfalls zu einer verminderten Aktivierung von TIAM1 und Rac1 kommt (Pankov *et al.*, 2005; Pegtel *et al.*, 2007). Eine Folge davon könnte sein, dass die PCFs kein definiertes Vorderende mehr ausbilden und somit keine Haptotaxis mehr ausführen können.

In einem dritten Signalweg wirkt der Par6/Par3/ α PKC ζ Komplex auf die kleine Rho GTPase RhoA, die ein Antagonist zu Rac1 darstellt. Bei diesem Signalweg wird über die Aktivierung der E3 Ubiquitin Ligase Smurf1 (*Smad ubiquitination regulatory factor-1*) die Degradation von RhoA stimuliert und somit durch Reduktion der Aktinstressfaserbildung die Zellkontraktilität am Zellvorderende vermindert (Wang *et al.*, 2003). Dies ist wichtig, damit die Zelle dynamisch auf Reize reagieren kann. Außerdem wird zusätzlich die inhibitorische Wirkung von RhoA auf Rac1 reduziert. Liegt nun die Proteinkinase α PKC ζ nicht mehr funktional in den PCFs vor, könnte es zu einem Anstieg von RhoA im Zellvorderende kommen, was einerseits durch verstärkte Zugkraftentwicklung der Dynamik des Zellvorderendes entgegenwirken würde und zum anderen ein Herunterregulieren von Rac1 zur Folge hätte. Diese beiden Faktoren könnten einen negativen Effekt auf die gerichtete Migration von PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten haben.

Mit weiteren Experimenten soll zukünftig untersucht werden, welcher der hier vorgestellten Signalwege des Par6/Par3/ α PKC ζ Komplexes für die Haptotaxis von Bedeutung ist.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Einflusses der Proteinkinase α PKC ζ auf die Haptotaxis wurden durch Experimente in Wundheilungsassays untermauert. Nach Inhibition von α PKC ζ wiesen die PCFs eine Reduktion ihrer Migrationsgeschwindigkeit und -direktionalität auf. Die PCFs waren ebenfalls weniger stark polarisiert, was durch eine reduzierte Ausrichtung des Golgi-Apparates zwischen Nukleus und Zellvorderende zum Ausdruck kam.

Geometrische Limitation

In dieser Arbeit wurden verschiedene, intrazelluläre Mechanismen beschrieben, welche für die Haptotaxis eine wichtige Rolle spielen. Dabei wurde deutlich, dass die Organisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts wesentlich durch die Substratgeometrie bestimmt wird, und damit Einfluss auf die haptotaktische Migration nimmt. Daher wurde untersucht, wie sich unterschiedliche FN-Dotgrößen bzw. Veränderungen in der FN-Dotform auf die Haptotaxis auswirken. PCFs migrierten haptotaktisch, wenn die FN-Dots auf den Gradienten eine Seitenlänge von 2 μm aufweisen. Verwendete man statt dieser Strukturen nun Gradienten, deren FN-Dots eine etwa dreimal so große Fläche (3,5 x 3,5 μm) besitzen, so wanderten die meisten PCFs nicht mehr, sondern verblieben stationär. Mögliche Ursachen für eine reduzierte Migration bei erhöhter prozentualer FN-Bedeckung könnten die verstärkte Zell-Substrat-Adhäsion über Zell-Matrix-Kontakte und die verminderte Aktinpolymerisierung im Lamellipodium sein (DiMilla *et al.*, 1993; Gupton und Waterman-Storer, 2006). Die Wirkung von unterschiedlichen FN-Konzentrationen auf die haptotaktische Migration von PCFs wurde bereits diskutiert. Obwohl bei diesen Experimenten die FN-Dotgrößen konstant blieben, können dennoch Parallelen zu den hier vorliegenden Versuchen mit veränderter Dotgröße gezogen werden, da in beiden Fällen die Menge an FN, welche den Zellen angeboten wurde, variabel ist. Um den Einfluss der Substratgeometrie auf die Haptotaxis zu untersuchen, wurden in einem nächsten Schritt Gradientenmuster mit rechteckigen FN-Dots (3 x 2 μm) verwendet. Ihre längere Seite (3 μm) verlief dabei senkrecht zur y -Gradientenachse in x -Richtung. Durch die Variation der Dotform von quadratisch zu rechteckig ergab sich eine drastische Veränderung des Migrationsverhaltens. Während die meisten PCFs auf Gradienten, bestehend aus quadratischen Dots (2 x 2 μm), haptotaktisch migrierten, wiesen PCFs auf Gradienten, bestehend aus rechteckigen Dots (3 x 2 μm), eine vorwiegend laterale, senkrecht zur y -Gradientenachse orientierte Migration auf. Desweiteren zeigten sie auch Veränderungen in ihrer Zellmorphologie und Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Während - wie zu erwarten war - PCFs entsprechend der Migrationsrichtung senkrecht zur y -Gradientenachse (x -Achse) elongierten, überraschte die Ausrichtung ihres Aktin-Zytoskeletts. So waren die Filamente vorzugsweise entlang der y -Gradientenachse und somit um 90° zur Migrationsrichtung versetzt. Dies ist absolut ungewöhnlich für die Zellmigration, da hier die Aktinfilamente normalerweise immer parallel zur Wanderungsrichtung ausgebildet werden (Small *et al.*, 1998; Small *et al.*, 1999). Spekulieren liese sich, ob die Ausrichtung der Aktinfilamente senkrecht zur Wanderungsrichtung durch die Organisation der Zell-Matrix-Kontakte entlang der Gradientenachse bedingt sein könnte.

Zellen können geometrische Formen erkennen. Dies wurde bereits an einer Reihe von Studien gezeigt. Brock *et al.* und They *et al.* untersuchten den Einfluss geometrischer, Protein-beschichteter Substratmuster, bestehend aus Dreiecken, Quadraten und Trapezen auf das zelluläre Verhalten. Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, dass Zellen verschieden große Winkel erkennen und unterscheiden können (Brock *et al.*, 2003; They *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass Zellen geometrische Protein-Muster wahrnehmen können, bietet auch eine mögliche Erklärung dafür, warum sich PCFs auf dem FN-Gradientenmuster mit rechteckigen FN-Dots morphologisch in laterale Richtung ausrichteten und anschließend migrierten. Dieses Verhalten ähnelt demjenigen von Zellen auf FN-Linien. Hier migrieren Zellen bevorzugt entlang der Protein-Linien, anstatt diese zu verlassen (Doyle *et al.*, 2009). FN-Gradienten, bestehend aus Linienmustern, zeigen ebenfalls, dass Liniengradienten sehr stark die Morphologie von PCFs beeinflussen und diese in ihrem Migrationsweg senkrecht zum Gradienten ablenken (Diplomarbeit, Tatjana Autenrieth, 2008). Gerade in den Bereichen des Gradienten, in denen der anti-adhäsive Abstand in y-Richtung groß ist, führen die FN-Linien zu einer seitlichen Zellausrichtung bzw. -migration und verhindern, dass die Zellen die y-Gradientenachse erkennen können. Da die FN-Dots in den Versuchen zu dieser Dissertation eine rechteckige Form aufwiesen, war der Unterschied zu FN-Linien nicht sehr groß, wodurch die Zellen morphologisch in x-Richtung gedrängt wurden und dementsprechend in diese Richtung migrierten.

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass PCFs nach Inhibition ihrer Proteinkinase α PKC ζ nicht mehr haptotaktisch migrierten. Darauf aufbauend wurde in einem nächsten Schritt die Bedeutung der α PKC ζ für die laterale Zellmigration auf Gradienten mit rechteckigen FN-Dots untersucht. Die Analyse ergab, dass PCFs nach Inhibition ihrer α PKC ζ immer noch vorzugsweise lateral migrierten. Somit scheint α PKC ζ keine Rolle bei der gerichteten Migration an sich zu spielen. Besonders auffällig war zudem die Morphologie des Aktin-Zytoskeletts. Im Vergleich zu unbehandelten PCFs gab es mehr und stärker gebündelte Aktinfilamente. Ursache hierfür könnte der Wirkmechanismus des Par6/Par3/ α PKC ζ Komplexes sein. Der Par6/ α PKC ζ Komplex rekrutiert am Zellvorderende unter anderem Smurf1 (*Smad ubiquitination regulatory factor-1*). Diese E3 Ubiquitin Ligase bindet RhoA und bewirkt deren Degradation. RhoA wiederum induziert die Ausbildung von Aktinstressfasern, die durch den Abbau von RhoA durch Smurf1 am Zellvorderende in ihrer Anzahl abnehmen (Wang *et al.*, 2003). Wird nun die Proteinkinase PKC ζ in PCFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten inhibiert, könnte es durch die ausbleibende Degradation von RhoA zu einer vermehrten Ausbildung von Aktinstressfasern kommen.

Betrachtet man die Migrationsrate - unabhängig von der Direktionalität - auf den diversen, mikrostrukturierten FN-Gradienten unterschiedlicher Dotmorphologie (2 x 2 μ m; 3 x 2 μ m; 3,5 x 3,5 μ m), so zeigte sich, dass bei den Gradienten mit kleinen, quadratischen bzw. rechteckigen Dots fast alle PCFs migrierten, während Zellen auf Gradienten mit großen, quadratischen Dots kaum wanderten. Dies führt zu der Vermutung, dass eine Korrelation zwischen der geometrieabhängigen, prozentualen FN-Dichte und der Fähigkeit zur Migration besteht. Messungen der FN-Bedeckung ergaben, dass ab einer Proteinbedeckung von etwa 18 % die Migrationsrate deutlich abnimmt. Dieser Wert deckt sich in etwa mit dem des optimalen Spreadings von fibroblastenartigen Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dots substraten

(keine Gradienten) (Lehnert *et al.*, 2004). Damit konnte eine direkte Korrelation zwischen der FN-Bedeckung, der Zellfläche und der Migrationsrate nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl die geometrische Form, in der das FN den Zellen auf mikrostrukturierten Gradienten angeboten wird, als auch die geometrisch bedingte Gesamtmenge an FN einen entscheidenden Einfluss auf die Migrationsrate und die Direktionalität der Migration hat. Die in den Versuchen verwendeten, rechteckigen FN-Dots lenken die Migration senkrecht zur Gradientenachse ab, während große, quadratische FN-Dots die Migration blockieren.

Modell zur Haptotaxis

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass Zellen einen diskontinuierlichen, mikrostrukturierten FN-Dotgradienten erkennen und haptotaktisch migrieren. Die Direktionalität der Migration wird dabei weder durch eine Reduktion des FN-Anteils noch durch eine Änderung der FN-Gradientensteigung beeinflusst. Lediglich die Geschwindigkeit, mit der die Zellen haptotaktisch wandern, korreliert mit der FN-Dichte und steigt mit abnehmender FN-Bedeckung an. Die Migration wird inhibiert, wenn die FN-Dichte einen Grenzwert überschreitet. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen während ihrer Wanderung die FN-Menge innerhalb der Gradienten kontinuierlich messen und verrechnen. Dabei ist die initiale Zellpolarisierung Grundvoraussetzung für die haptotaktische Migration auf den FN-Gradienten. Die Zellen elongieren entlang der y -Gradientenachse und positionieren ihren Golgi-Apparat sowie ihr Zentrosom zu Beginn der Adhäsion vor dem Nukleus in Richtung der höheren FN-Dichte. Mit Beginn der haptotaktischen Migration relokalisiert der Golgi-Apparat und liegt nun zwischen Nukleus und Zellhinterende. Dies wird durch eine aktive, anterograde Bewegung des Nukleus an das Zellvorderende gewährleistet, während der Golgi-Apparat stationär verbleibt (Abb. 4.1).

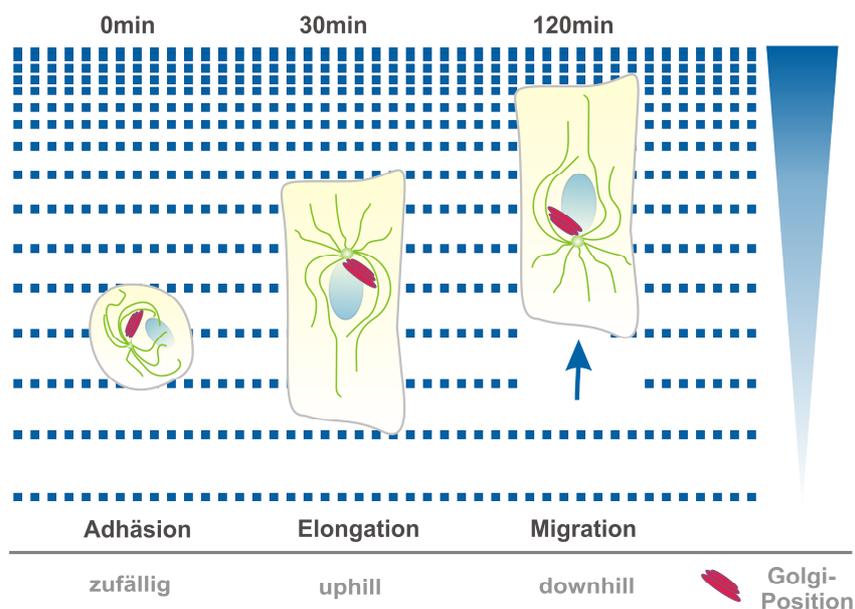


Abb. 4.1 Zeitlicher Verlauf der Zellpolarisierung und Haptotaxis

Zu Beginn der Aussaat adhären die Zellen auf dem mikrostrukturierten FN-Dotgradient (0 min). Hierbei sind sie weder morphologisch noch intrazellulär polarisiert. Im weiteren Zeitverlauf elongieren die Zellen entlang der Gradientenachse, wobei sie ihren Golgi-Apparat uphill vor dem Nukleus in Richtung der höheren FN-Bedeckung lokalisieren (30 min). Beginnen die Zellen haptotaktisch zu migrieren, wird der Nukleus anterograd an das Zellvorderende gezogen, während der Golgi-Apparat stationär verbleibt und damit downhill zwischen Nukleus und Zellhinterende liegt (120 min).

Aus den im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Erkenntnissen lässt sich folgendes Modell zur Haptotaxis erstellen:

Damit Zellen polarisieren und haptotaktisch (unidirektional) in Richtung der höheren FN-Bedeckung (uphill/+) migrieren können, bedarf es eines koordinierten Zusammenspiels der Aktin-/Myosin Kontraktilität und der Mikrotubulidynamik. Reguliert werden die Aktin-/Myosin Kontraktilität und die Mikrotubulidynamik unter anderem von der Rho GTPase Cdc42 und ihres downstream Effektors, der Proteinkinase α PKC ζ (**Abb. 4.2 A**).

Reduziert man die Mikrotubulidynamik direkt, so erkennen die Zellen zwar immer noch die Gradientenachse, wandern allerdings bidirektional entweder in Richtung der höheren (uphill/+) oder der niedrigeren FN-Bedeckung (downhill/-). Zusammen mit den Inhibitionsexperimenten der Aktin-/Myosin Kontraktilität lässt dies darauf schließen, dass die intrazelluläre Zugkraftentwicklung in erster Linie für die Erkennung der Gradientenachse notwendig ist und damit die Winkelentscheidung bei der Migration übernimmt.

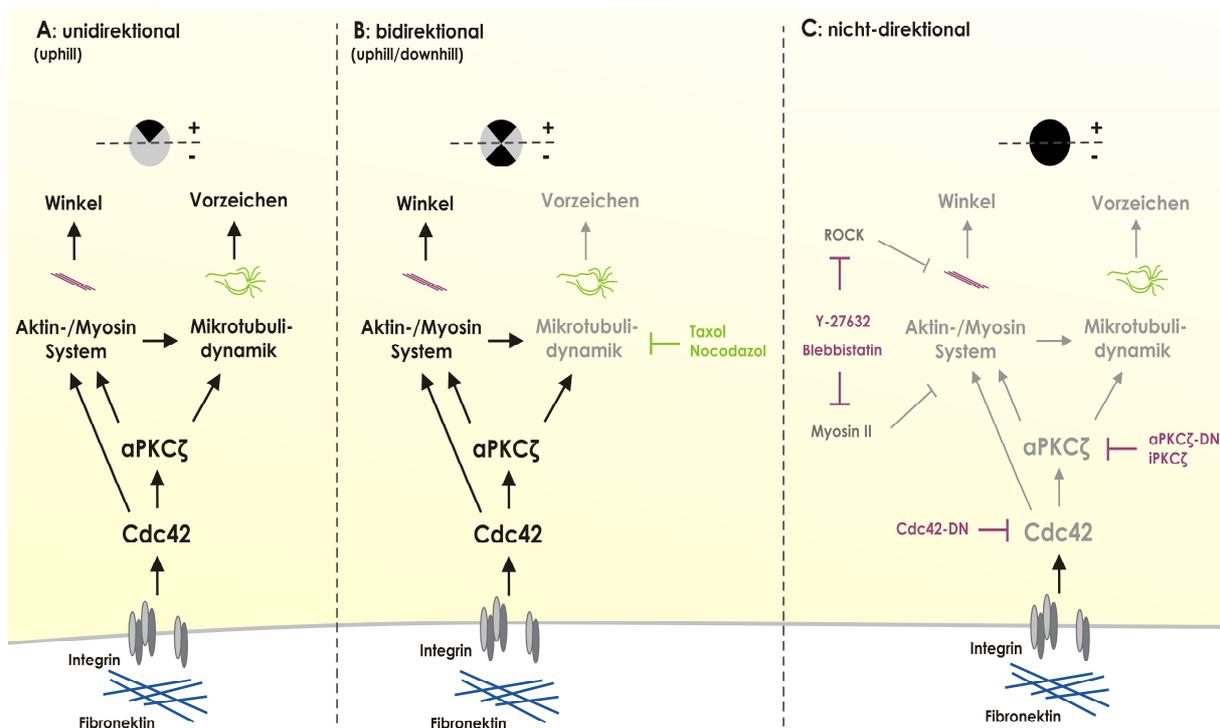


Abb. 4.2 Modell zur Haptotaxis

(A) Für eine haptotaktische, unidirektionale Zellmigration in Richtung der höheren FN-Bedeckung (uphill/+), bedarf es einer funktionellen Aktin-/Myosin Kontraktilität und Mikrotubulidynamik. Reguliert werden die Aktin-/Myosin Kontraktilität und die Mikrotubulidynamik dabei von der Rho GTPase Cdc42 und ihres downstream Effektors, der Proteinkinase α PKC ζ . **(B)** Wird die Mikrotubulidynamik reduziert, erkennen die Zellen zwar immer noch die Gradientenachse, wandern allerdings entweder in Richtung der höheren (uphill/+) oder der niedrigeren FN-Bedeckung (downhill/-) und damit bidirektional. Diese bidirektionale Migration nach Reduktion der Mikrotubulidynamik lässt darauf schließen, dass die Aktin-/Myosin Kontraktilität für die Erkennung der Gradientenachse notwendig ist und damit den Winkel bei der Migration festlegt. Die Mikrotubulidynamik hingegen entscheidet über das Vorzeichen der Migration. **(C)** Wird die Aktin-/Myosin Kontraktilität über ROCK oder Myosin II reduziert, zeigen die Zellen keine direktionale Wanderung mehr. Dieses ungerichtete Migrationsverhalten führt zu der Annahme, dass das Aktin-/Myosin System die Mikrotubulidynamik beeinflusst, da ansonsten eine Vorzeichenentscheidung zu erwarten wäre. Inhibiert man die funktionelle Aktivität der kleinen Rho GTPase Cdc42 oder ihres downstream Effektors α PKC ζ , zeigen die Zellen ebenfalls keine direktionale Migration. Dies kann damit begründet werden, dass Cdc42 und α PKC ζ sowohl auf die Aktin-/Myosin Kontraktilität als auch auf die Mikrotubulidynamik wirken.

Die Mikrotubulidynamik hingegen entscheidet über das Vorzeichen der Migration, was dadurch belegt wird, dass die Zellen nach Reduktion ihrer Mikrotubulidynamik sowohl uphill (+) als auch downhill (-) migrieren (**Abb. 4.2 B**).

Reduziert man die Aktin-/Myosin Kontraktilität über ROCK oder Myosin II, so wandern die Zellen in alle Richtungen und demzufolge nicht mehr direktional. Dieses Wanderungsverhalten lässt vermuten, dass das gestörte Aktin-/Myosin System einen direkten Einfluss auf die Mikrotubulidynamik nimmt. Wäre die Mikrotubulidynamik nach Reduktion der Aktin-/Myosin Kontraktilität noch in vollem Umfang aktiv, so würden die Zellen nur in γ -Richtung wandern und damit das Vorzeichen der Migration bestimmen. Wird die funktionelle Aktivität der kleinen Rho GTPase Cdc42 oder ihres downstream Effektors α PKC ζ inhibiert, zeigen die Zellen ebenfalls eine nicht-direktionale Migration. Dies liegt daran, dass Cdc42 und α PKC ζ sowohl auf die Aktin-/Myosin Kontraktilität als auch auf die Mikrotubulidynamik wirken (**Abb. 4.2 C**).

Aus der momentanen Datenlage lässt sich schließen, dass Zellen bei der Haptotaxis den Gradienten initial durch die Integrin-vermittelte Aktin-/Myosin Kontraktilität auslesen. Dieser mechanische Prozess wurde bisher weder für die Haptotaxis noch für die Chemotaxis gezeigt. Im Gegensatz zur Haptotaxis dominiert bei der Chemotaxis die Mikrotubulidynamik und die damit verbundene intrazelluläre Signaltransduktion über die mechanische Aktin-/Myosin Kontraktilität (Irima *et al.*, 2009; Bouzigues *et al.*, 2007; Lowery und Van Vactor *et al.*, 2009).

5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert erstmalig Einblicke in den Mechanismus der Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten. Durch diese interessanten Ergebnisse ergeben sich Anknüpfungspunkte für weitere Untersuchungen. Im Folgenden soll ein Überblick über Projekte gegeben werden, die in Zukunft das Verständnis über die Haptotaxis weiter vertiefen sollen:

Projekt 1: Mikrotubulidynamik während der Haptotaxis

Im Rahmen dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass PCFs und HFFs auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu 80 % haptotaktisch uphill in Richtung der höheren FN-Bedeckung wandern. Wurde allerdings die Dynamik des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch die Zugabe einer subletalen Dosis von Nocodazol und Taxol gestört, konnten die Zellen zwar noch die Achse des Gradienten erkennen, waren allerdings nicht mehr in der Lage zwischen höherer und niedrigerer FN-Dichte zu unterscheiden. Dieser Zusammenhang legt eine wichtige Rolle des Mikrotubuli-Zytoskeletts bei der Haptotaxis nahe. Anknüpfend an diese Ergebnisse ist eine Untersuchung der Mikrotubulidynamik mittels Zeitrafferaufnahmen von haptotaktisch migrierenden PCFs oder HFFs sinnvoll und interessant.

Hierfür erfolgten bereits Vorexperimente. PCFs und HFFs wurden mit verschiedenen Tubulin-pDNA Konstrukten (β -Tubulin-GFP, Tubulin-RFP) transient transfiziert, dies führte bisher allerdings zu keiner erfolgreichen Mikrotubuli-Expression. Desweiteren wurden die Zellen mit verschiedenen TIP-pDNA Konstrukten (TIP = Mikrotubuli Plusenden bindende Proteine) transfiziert, da sich die Mikrotubulidynamik - als Prozess des ständigen Auf- und Abbaus - hauptsächlich an den dynamischen Plusenden (TIPs) der Mikrotubulifilamente abspielt. Für EB3-eGFP wie auch CLIP170-eGFP konnte eine erfolgreiche Expression in HFFs und PCFs gezeigt und auf homogenem FN-beschichtetem Substrat (**Abb. 5.1 A**) bzw. mikrostrukturierten FN-Dotgradienten visualisiert werden (**Abb. 5.1 B**).

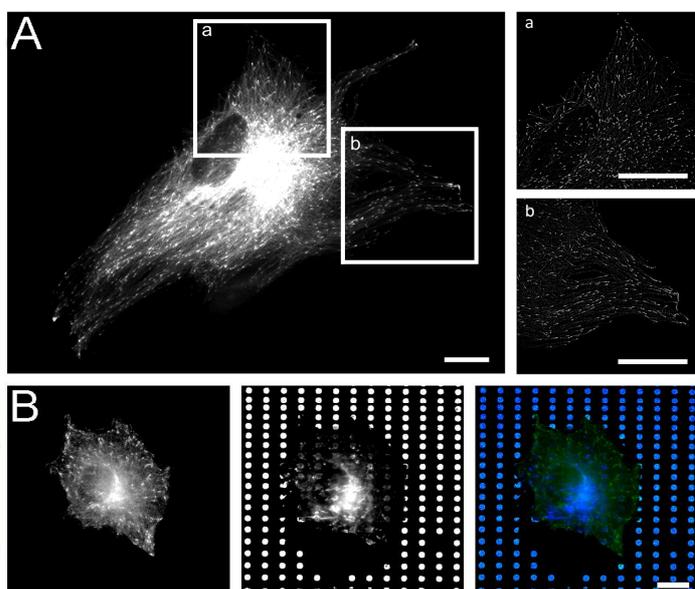


Abb. 5.1 EB3-Dynamik in humanen Fibroblasten auf homogenem Substrat und mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten

Zur Visualisierung der EB3-Dynamik wurden HFFs transient mit EB3-eGFP transfiziert und auf **(A)** homogenem Substrat und **(B)** mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert. (A) zeigt eine Zelle aufgenommen mit hochauflösender Mikroskopie (*structured illumination microscopy* = SIM), (B) mit herkömmlicher Epifluoreszenz.

Maßstabsbalken: 20 μ m

Projekt 2: Rolle von Rho GTPasen und ihren Effektoren bei der Haptotaxis

Die kleine Rho GTPase Cdc42 und ihr downstream Effektor, die Proteinkinase α PKC ζ , sind für die haptotaktische Migration notwendig. Darauf aufbauend kann in Zukunft der Einfluss weiterer downstream Effektoren von Cdc42, wie beispielsweise Par3 und Par6, auf die Haptotaxis untersucht werden. Neben diesen downstream Effektoren von Cdc42 wäre auch die Bedeutung der kleinen Rho GTPase Rac1 von Interesse. Als Interaktionspartner von Cdc42 ist Rac1 ebenfalls für eine koordinierte Aktinpolymerisierung am Zellvorderende und damit für eine gerichtete Vorwärtsbewegung der Zelle notwendig. Die Funktionsanalyse von Rac1, Par3 und Par6 während der Haptotaxis könnte durch pharmakologische Inhibition oder den Einsatz von siRNA und dominant negativen Proteinen erfolgen. Parallel zu dieser Funktionsanalyse wäre auch eine Aufklärung der subzellulären Lokalisation der aktiven, kleinen Rho GTPasen Cdc42 und Rac1, sowie deren downstream Effektoren während der Haptotaxis von großem Interesse. Diese wurde bereits für ungerichtet und chemotaktisch wandernde Zellen (Pertz *et al.*, 2006) gezeigt, und könnte für haptotaktisch migrierende Zellen mit Hilfe von FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) ermittelt werden. Neben FRET-Aufnahmen, die an lebenden Zellen erfolgen, ist zudem der Einsatz hochauflösender Mikroskopie (*structured illumination microscopy* = SIM) für die Aufklärung subzellulärer Proteinverteilungen an fixierten Zellen möglich.

Hierzu wurden bereits einige Vorexperimente durchgeführt, wobei PCFs mit Par6-wt-dTom und α PKC ζ -wt-eGFP kotransfiziert wurden. Anschließend erfolgte die Visualisierung ihrer Lokalisation während der Migration in Wundheilungsassays, der ungerichteten Migration auf homogen FN-beschichteten Substraten und während der Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten (**Abb. 5.2**). Es zeigte sich, dass Par6 und α PKC ζ bei der Wund-induzierten Migration am Zellvorderende kolokalisieren, während sie bei der ungerichteten Migration und bei der Haptotaxis keine Kolokalisation aufweisen. Dies verdeutlicht, dass die ungerichtete und gerichtete Migration unterschiedlich reguliert werden.

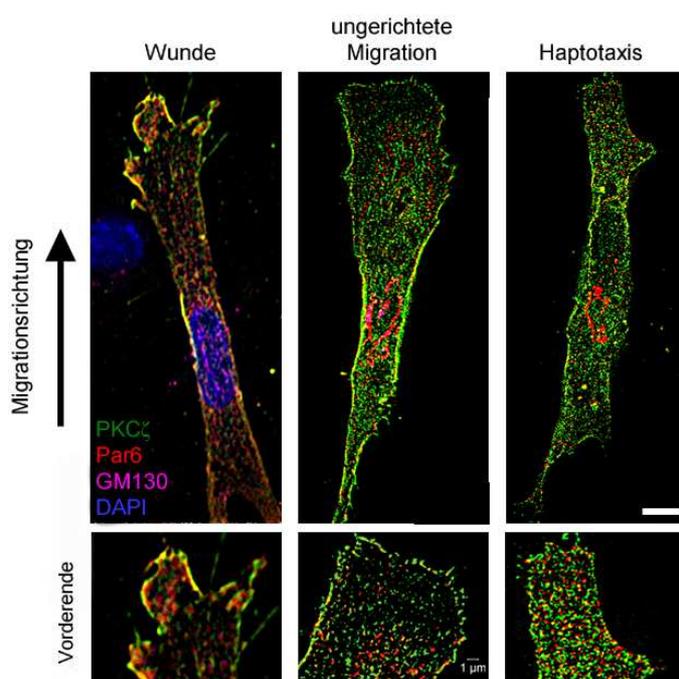


Abb. 5.2 Verteilung von Par6 und α PKC ζ während der Wund-induzierten Migration, der ungerichteten Migration und der Haptotaxis

PCFs wurden mit Par6-wt-dTom und α PKC ζ -wt-eGFP kotransfiziert und mit hochauflösender Mikroskopie (*structured illumination microscopy* = SIM), während der Migration in Wundheilungsassays, der ungerichteten Migration auf homogen FN-beschichteten Substraten und während der Haptotaxis auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten visualisiert. Bei der Wund-induzierten Migration zeigen PCFs eine Kolokalisation von Par6 und α PKC ζ (gelb) am Zellvorderende, während bei der ungerichteten Migration und der Haptotaxis keine Kolokalisation stattfindet. Maßstabsbalken: 10 μ m

Projekt 3: Geometriegradienten

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die geometrische Form, in der das FN den Zellen auf mikrostrukturierten Gradienten angeboten wird, als auch die geometrisch bedingte Gesamtmenge an FN einen großen Einfluss auf die Rate und die Direktionalität der Migration haben. Zellen auf FN-Gradienten bestehend aus rechteckigen Dots ($3 \times 2 \mu\text{m}$) zeigten keine Haptotaxis mehr, sondern migrierten lateral entlang der breiteren Seite der FN-Dots ($3 \mu\text{m}$) und damit senkrecht zur y -Gradientenachse. Ausgehend von diesem Ergebnis wären zukünftig weitere Variationen der Dotform sinnvoll, um die Kenntnisse über die externe Regulation der Haptotaxis zu erweitern. Hierbei könnte z.B. der Abstand der rechteckigen FN-Dots in x -Richtung vergrößert werden. Damit liese sich untersuchen, ob die Zellen weiterhin lateral entlang der x -Achse migrieren oder ob die y -Gradientenachse mit zunehmendem Dotabstand in x -Richtung attraktiver wird.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte zudem gezeigt werden, dass Zellen ihre Aktinstressfasern bei der gerichteten, lateralen Migration auf FN-Gradienten bestehend aus rechteckigen Dots ($3 \times 2 \mu\text{m}$) um 90° versetzt entlang der y -Gradientenachse und nicht - wie üblich - parallel zur Migrationsrichtung ausrichten. Mit Hilfe LifeAct exprimierender Zellen soll dieser Mechanismus zukünftig näher untersucht werden. Durch pharmakologische Inhibition der intrazellulären Aktin-/Myosin Kontraktilität (Y-27632, Blebbistatin) und der Mikrotubulidynamik (Nocodazol, Taxol) könnte zusätzlich der Einfluss des Zytoskeletts auf die gerichtete, laterale Migration bestimmt werden.

Projekt 4: Alternative Herstellung mikrostrukturierter FN-Dotgradienten

Die in dieser Arbeit verwendeten, mikrostrukturierten FN-Dotgradienten wurden mit Hilfe der Gold-Thiol-Chemie hergestellt (Microcontact Printing). Bei diesem etablierten und gut reproduzierbaren Verfahren können große Stückzahlen produziert und unter Verwendung herkömmlicher Epifluoreszenz qualitativ gute Bilder erzeugt werden. Um zukünftig verstärkt die Verteilung subzellulärer Proteine während der Haptotaxis untersuchen zu können, müssen gut auflösende Mikroskopietechniken (SIM, TIRF, FRET) verwendet werden. Diese Techniken werden jedoch durch den Einsatz von Gold-Deckgläsern erschwert. Der reflektierende Charakter des Goldes (Quenching) verschlechtert deutlich die Aufnahmequalität oder verhindert eine Darstellung völlig. Aus diesem Grund wurden bereits Methoden zur Herstellung von adhäsiven, mikrostrukturierten FN-Dotgradienten angewendet und weiterentwickelt, die nicht mehr auf Gold als Trägermaterial angewiesen sind. Hierbei wurde unter anderem FN über einen Crosslinker (BS^3) auf silanisiertes Glas gestempelt (Pouthas *et al.*, 2008). Der Nachteil dieser Methode war, dass das FN kovalent an die Substratoberfläche bindet und von den Zellen nicht abgelöst werden kann. Infolgedessen waren die Zellen nicht mehr in der Lage auf den mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu migrieren. Eine alternative Methode zur Gradientenherstellung basierte auf dem direkten Stempeln des FN auf Glas. Hierdurch konnte eine kovalente Bindung des FN umgangen werden. Allerdings zeigten auch hier die Zellen keine Migration mehr auf den strukturierten Gradienten. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass das FN aufgrund der

mechanischen Beanspruchung während des Stempelvorgangs nicht zwingend seine Proteinfunktionalität behält (Bernard *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurde nach einer Methode gesucht, bei der das Protein schonend aus Lösung auf eine Oberfläche adsorbiert. Es ist bekannt, dass Methacrylat und Thiol – ähnlich wie Gold und Thiol – eine sehr starke Bindung eingehen (Li *et al.*, 2010; Khire *et al.*, 2007). Davon ausgehend wurde eine Methode entwickelt, die sich diese starke Bindung zunutze macht und als Acrylat-Thiol-Chemie (ATC) bezeichnet wird. Diese Methode ähnelt vom Ablauf her der Gold-Thiol-Chemie, wobei hier das hydrophobe Thiol, an das später das FN bindet, unter Einwirkung des Katalysators EDA (Ethylendiamin) auf ein mit Methacrylat beschichtetes Deckglas gestempelt wird. Die Passivierung erfolgt mit PLL-PEG. Erste Versuche zeigten, dass sich mit ATC die Gradientenstrukturen übertragen lassen (**Abb. 5.3 A**). Zellen spreaden lediglich auf den FN-beschichteten Bereichen (rot) und adhären nicht an die mit PLL-PEG abgesättigten, anti-adhäsiven Stellen (**Abb 5.3 B und B`**). Auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zeigen die Zellen eine an die Substratgeometrie angepasste Morphologie und migrieren (**Abb 5.3 C**). Diese ersten Experimente sind vielversprechend und stellen einen guten Anknüpfungspunkt für weitere Optimierungen dar.

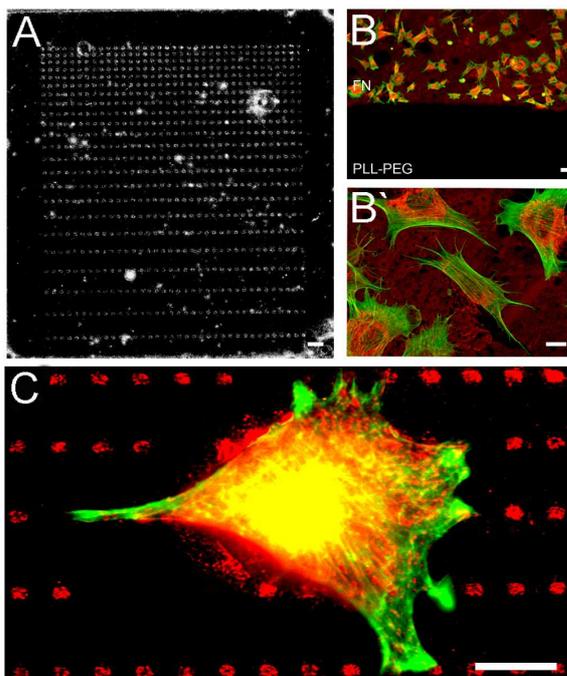
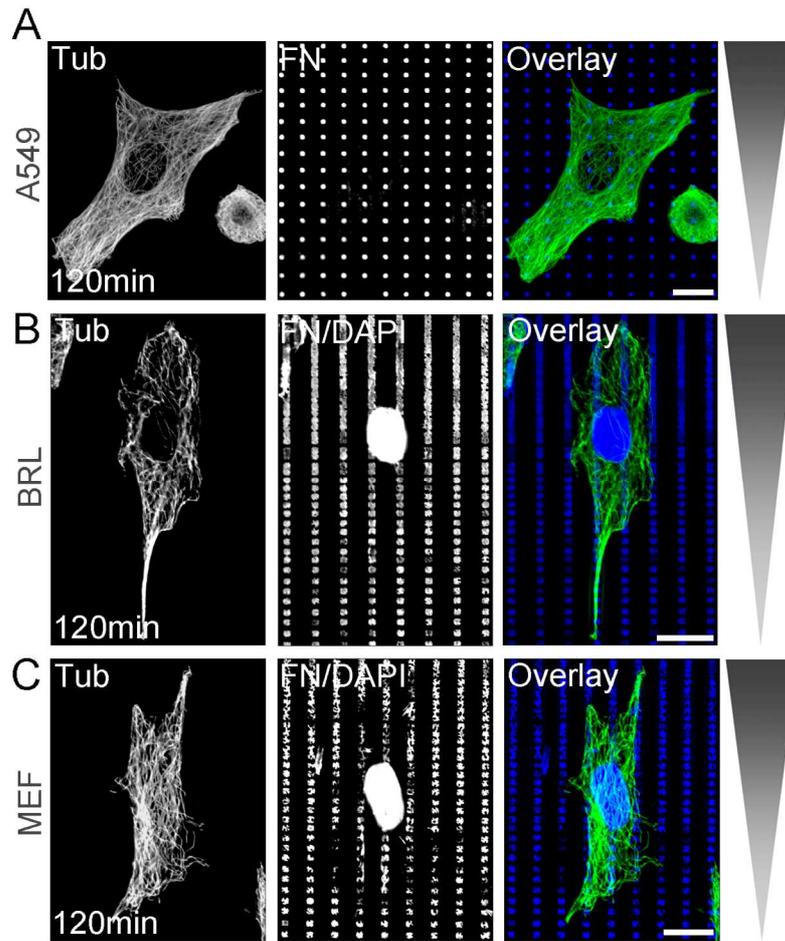


Abb. 5.3 Herstellung mikrostrukturierter Fibronectin-Dotgradienten mit Hilfe der Acrylat-Thiol-Chemie

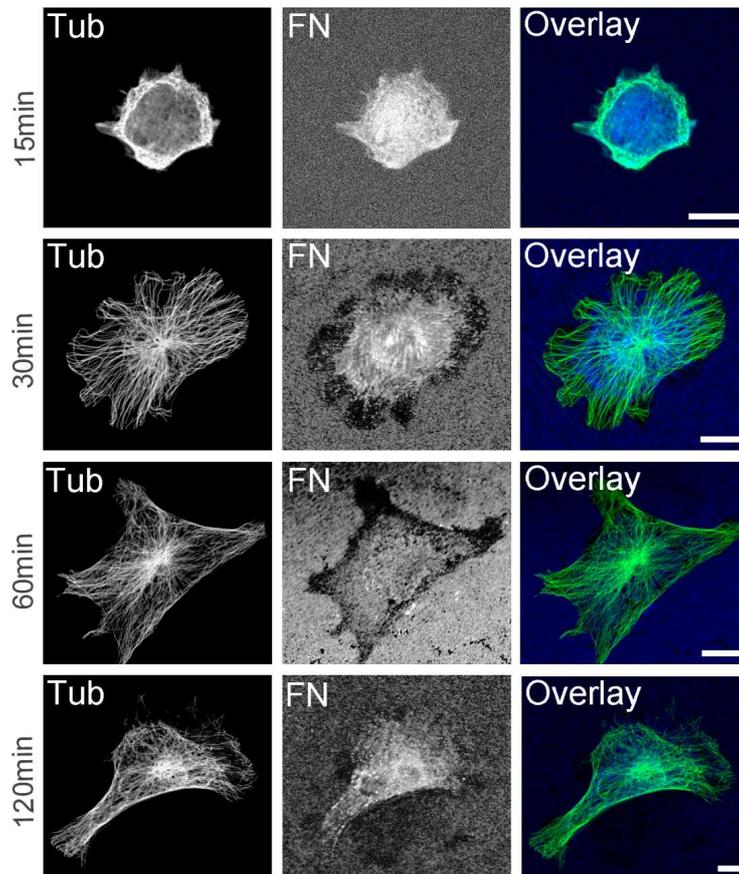
Bei der Acrylat-Thiol-Chemie (ATC) wird das hydrophobe Thiol, an das in einem späteren Schritt das FN bindet, auf ein mit Methacrylat beschichtetes Deckglas gestempelt. Die Passivierung erfolgt mit PLL-PEG. **(A)** Erste Versuche zeigen, dass sich mit ATC die Gradientenstrukturen übertragen lassen. **(B)** Zellen adhären lediglich auf den FN-beschichteten Bereichen und nicht an die mit PLL-PEG abgesättigten und anti-adhäsiven Stellen. **(B`)** Zellen spreaden erfolgreich und zeigen keine Auffälligkeiten in ihrer Morphologie. **(C)** Auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zeigen Zellen eine an die Substratgeometrie angepasste Morphologie und migrieren. Maßstabsbalken: 10 μm

6 Appendix



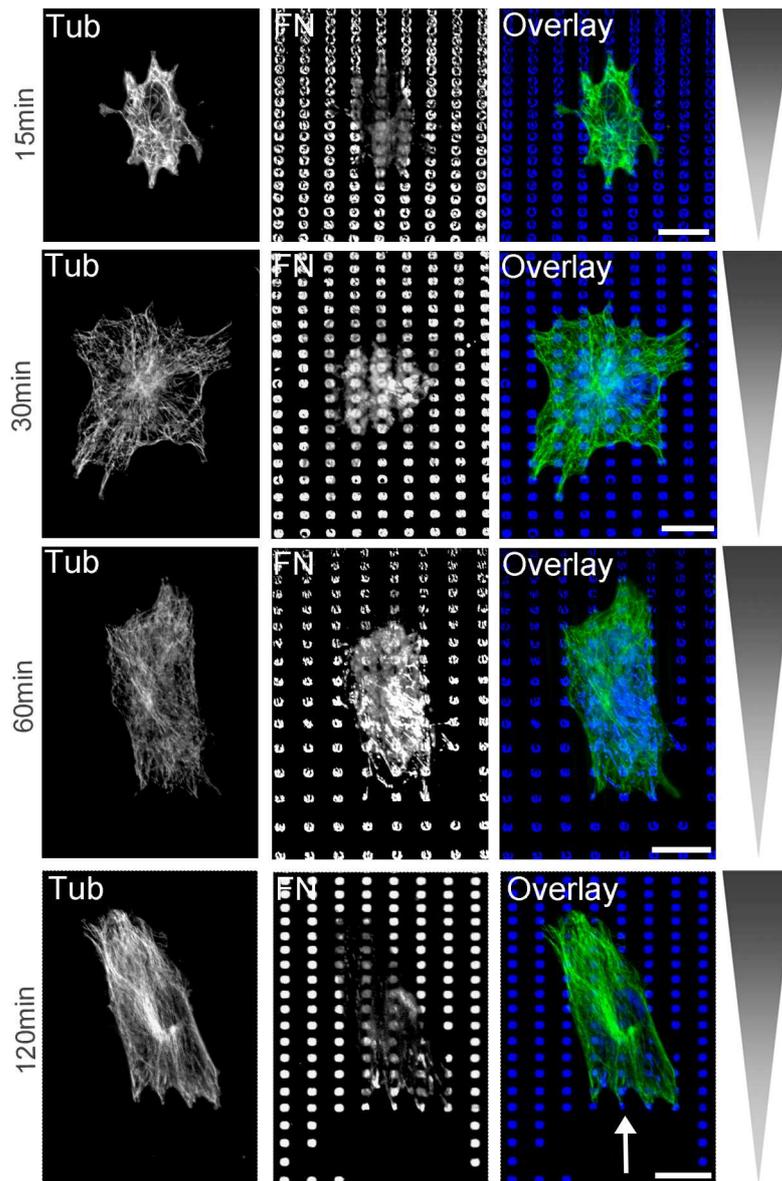
Appendix 1 Migrationsverhalten verschiedener Zelltypen auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten

Die Fähigkeit zur Haptotaxis verschiedener Zelltypen wird untersucht. Hierzu werden sowohl **(A)** epitheliale (A549) und **(B)** parenchymale (BRLs), als auch fibroblastenartige Zellen wie **(C)** MEFs für 120 min auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert und anschließend das Mikrotubuli-Zytoskelett (grün), der Nukleus (blau) und das Substrat (blau) immunhistochemisch angefärbt. Alle Zelltypen elongieren entlang der Gradientenachse. Betrachtet man das Dotmuster um die Zellen herum, so weist dieses keinerlei Beschädigungen auf. Die Zellen zeigen folglich kein dynamisches Verhalten und sind stationär, da ausgerissene FN-Dots als Indikator für eine Migration dienen. Maßstabsbalken: 10 μm



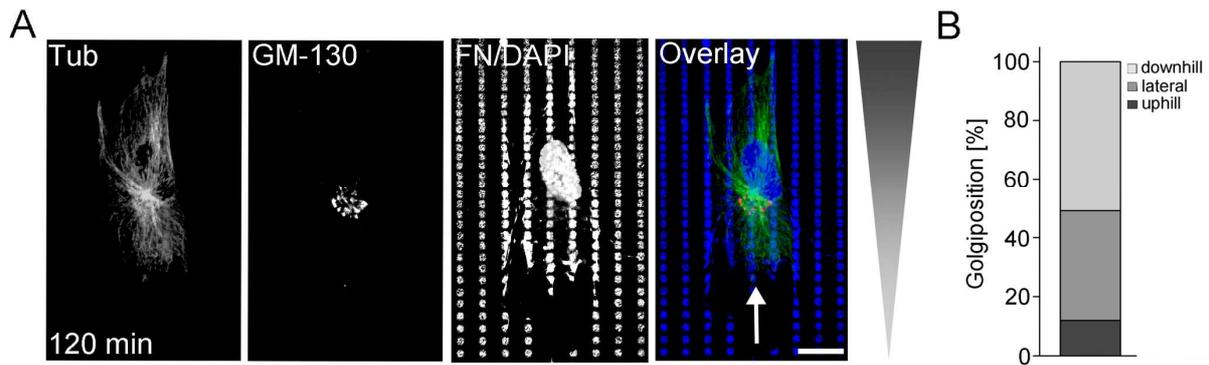
Appendix 2 Morphologische Polarisierung von primären Hühnerfibroblasten auf homogenen Fibronektin-Substraten

Für die Untersuchung der Zellmorphologie und des Spreadings werden PCFs auf homogenen FN-Substraten ausgesät und nach 15 min, 30 min, 60 min und 120 min fixiert und immunhistochemisch gefärbt (Mikrotubuli-Zytoskelett = grün; Substratmuster = blau). Nach 15 min sind die Zellen bereits an das Substrat adhärirt, weisen jedoch noch eine kugelförmige Morphologie auf. Im weiteren Verlauf flachen die Zellen zusehends ab, bis das Spreading nach etwa 60 min abgeschlossen ist. Ab diesem Zeitpunkt verändern die Zellen ausschließlich ihre Form. Sie bilden ein vom Zellkörper ausgehendes flächiges Lamellipodium aus, elongieren und entwickeln dadurch ein definiertes Vorder- und Hinterende. Maßstabsbalken: 10 μ m



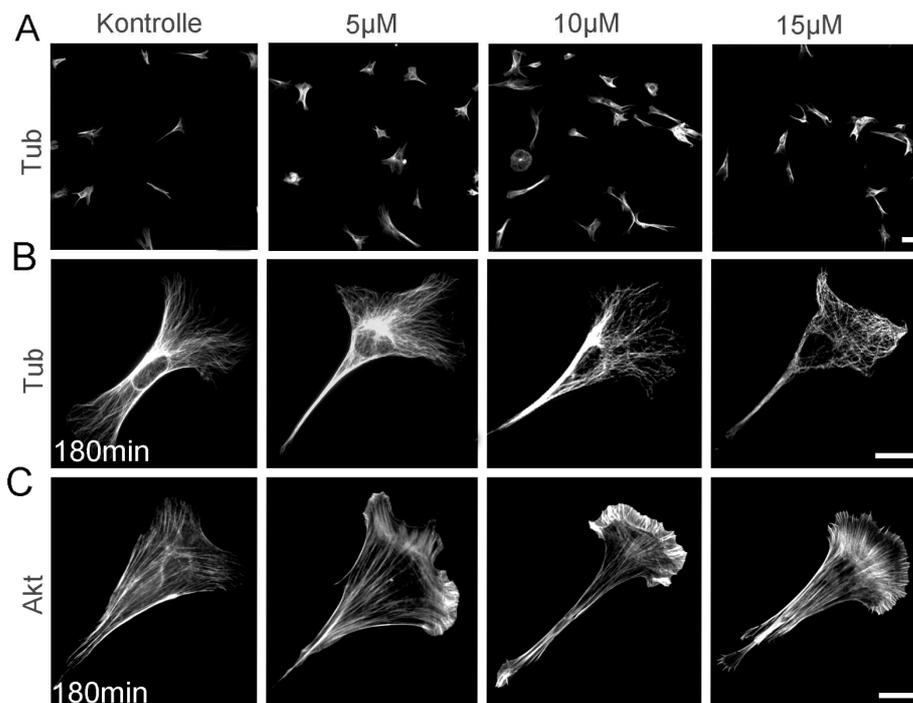
Appendix 3 Morphologische Polarisierung von primären Hühnerfibroblasten auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten

Um einen Eindruck über das Spreadingverhalten und die Zellmorphologie auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten zu erhalten, werden PCFs nach 15 min, 30 min, 60 min und 120 min Kultivierungszeit fixiert und immunhistochemisch angefärbt (Mikrotubuli-Zytoskelett = grün; Substratmuster = blau). Der Verlauf des Gradienten ist als graues Dreieck dargestellt. Bereits nach 15 min adhären die Zellen und nehmen eine geometrische Form an, die durch die Strukturierung des unterliegenden Substratmusters vorgegeben wird. Im weiteren Verlauf breiten sich die Zellen zunehmend aus, bis sie nach etwa 60 min ihre maximale Zellausdehnung erreicht haben. Hierbei bilden sie kein klar definiertes Vorder- und Hinterende aus. Dennoch sind sie morphologisch polarisiert und elongieren entlang der FN-Gradientenachse. Nach 120 min wandern die PCFs bereits haptotaktisch. Dies ist an den abgerissenen FN-Dots (weißer Pfeil) zu erkennen. Maßstabsbalken: 10 μm



Appendix 4 Intrazelluläre Polarisierung während der Haptotaxis von humanen Fibroblasten

Zur Untersuchung der Golgi-Lokalisation während der Haptotaxis werden HFFs für 120 min auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten ausgesät und anschließend **(A)** das Mikrotubuli-Zytoskelett (grün), der Golgi-Apparat (rot), der Nukleus (blau) und das Substratmuster (blau) immunhistochemisch angefärbt. Der Gradient verläuft von unten nach oben zur höheren Proteinbedeckung hin. Der weiße Pfeil zeigt das ausgerissene Substratmuster an. In **(B)** ist die prozentuale Verteilung der Golgi-Position aller haptotaktisch migrierenden HFFs gezeigt. Hierbei richten die meisten Zellen (51 %) ihren Golgi-Apparat downhill zwischen dem Nukleus und dem Zellhinterende aus und damit entgegen der Lauffront. Lediglich 12 % weisen eine uphill Polarisierung in Migrationsrichtung auf. N = 3; n = 339. Maßstabsbalken: 10 μ m



Appendix 5 Einfluss des Proteinkinase aPKC ζ -Inhibitors auf die Zellmorphologie und das Zytoskelett

Die Wirkung des pharmakologischen Inhibitors iPKC ζ auf die Zellmorphologie und die Organisation des Zytoskeletts wird untersucht. Hierzu werden PCFs für 120 min mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (5 μ M, 10 μ M, 15 μ M) auf homogen FN-beschichteten Substraten kultiviert, fixiert und anschließend immunhistochemisch markiert (Aktin-/Mikrotubuli-Zytoskelett). **(A)** Vergleicht man unbehandelte mit iPKC ζ behandelten Zellen, so ist kein Unterschied in ihrer Morphologie zu erkennen. Die Zellen elongieren und bilden ein definiertes Vorder- und Hinterende aus. Maßstabsbalken: 50 μ m. **(B)** Für die Mikrotubulifilamente lässt sich nach Inhibition der aPKC ζ eine leichte Veränderung in ihrer Organisation feststellen. Sie strahlen nach der Behandlung zwar noch von der Zellmitte in die Zellperipherie aus, wirken aber im Gegensatz zu den Mikrotubulifilamenten in Kontrollzellen weniger strukturiert und sind in der Zellperipherie stärker gebündelt. **(C)** Die Aktinfilamente zeigen keinen Unterschied zwischen Kontroll- und aPKC ζ inhibierten Zellen und verlaufen als Stressfasern entlang der Längsachse der Zellen. Maßstabsbalken: 10 μ m

Zu 3.1.2 Substratparameter für eine optimale Haptotaxis

(iii) Polarisierung von PCFs auf Gradient SD mit großen Dots (Seite 61)

Morphologisch weisen die Zellen auf dem Gradient SD (große FN-Dots) keine Vorzugsrichtung auf. Sie zeigen damit ein anderes Verhalten als haptotaktisch migrierende Zellen auf dem Gradient S (kleine Dots), die entlang der Gradientenachse elongieren (vgl. Abb. 3.4 B und Abb. 3.7 A`). Vergleicht man die Organisation des Aktin-Zytoskeletts zwischen PCFs auf dem Gradient SD (große Dots) und haptotaktisch migrierenden Zellen auf dem Standard FN-Dotgradient S (kleine Dots), so zeigen erstere weniger stark gebündelte Aktinfilamente und keine bevorzugte Aktinstressfaser-Ausrichtung entlang der γ -Gradientenachse (vgl. Abb. 3.4 B und Abb. 3.11 B). Die Untersuchungen der intrazellulären Polarisierung (Golgi-Position) ergeben, dass die stationären Zellen auf dem Gradient SD (große Dots) keine Vorzugsorientierung ihres Golgi-Apparates aufweisen. Dieser ist gleichmäßig uphill (zwischen Nukleus und höherer FN-Dichte), downhill (zwischen Nukleus und niedrigerer FN-Bedeckung) als auch lateral lokalisiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zellmigration und -polarisierung von der Menge an dargebotenem Protein abhängt.

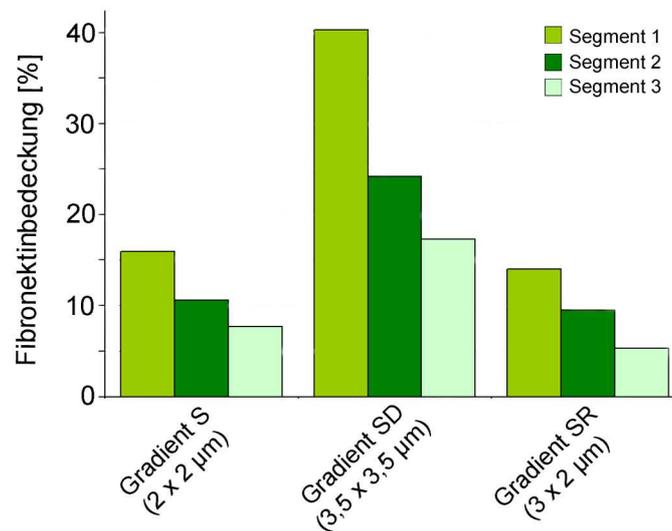
(iv) Polarisierung von PCFs auf Gradient SR mit rechteckigen Dots (Seite 63)

Eine Analyse der Golgi-Position in Zellen auf dem Gradient SR (rechteckige Dots) zeigt, dass etwa die Hälfte aller lateral migrierenden Zellen eine ebenfalls seitliche Lokalisation des Golgi-Apparates (im Verhältnis zu Nukleus und FN-Bedeckung) aufweisen. Es wird bei Zellen mit lateraler Golgi-Position unterschieden, ob sie ihren Golgi-Apparat vor dem Nukleus zur Migrationsfront, oder hinter dem Nukleus entgegen der Migrationsfront lokalisieren. Diese Auswertung ergibt eine gleichmäßige Aufteilung, bei der die eine Hälfte der Zellen den Golgi-Apparat in Migrationsrichtung, die andere Hälfte entgegen der Migrationsrichtung ausrichtet.

Messung der FN-Bedeckung auf Gradient S, SD und SR (Seite 63)

Um die maximale FN-Bedeckung zu bestimmen, die noch eine Zellmigration zulässt, wird die prozentuale FN-Verteilung in dem Teilbereich des Gradienten, in dem theoretisch Haptotaxis stattfinden kann (Abb. 2.6, Seite 53), ermittelt. Dieser Teilbereich entspricht in etwa 3 Zelllängen und wurde in 3 Segmente unterteilt. Segment 1 weist dabei die höchste FN-Dichte auf, während in Segment 3 die geringste FN-Bedeckung zu verzeichnen ist. Die Ergebnisse der prozentualen FN-Messungen sind in **Appendix 6** dargestellt. Die Daten zeigen eine direkte Korrelation zwischen der prozentualen FN-Bedeckung eines Gradienten und der Zellmigration. Während bei einer FN-Bedeckung bis 15 % die Zellen sowohl haptotaktisch (Gradient S) als auch gerichtet (Gradient SR) migrieren können, sind Zellen ab einer FN-Dichte von mehr als 20 % (Gradient SD) nicht mehr zu einer haptotaktischen Migration fähig. Vergleicht man jeweils die Resultate von Segment 1 der verschiedenen Gradienten (S, SR und SD) zeigt sich, dass bei dem FN-Gradient S mit kleinen FN-Dots ($2 \times 2 \mu\text{m}$) die FN-Bedeckung zwischen 8 und 17 % (Segment 1 – 3) beträgt und die Zellen vorwiegend haptotaktisch migrieren. Im Gegensatz dazu liegt bei dem FN-Gradient SD mit großen Dots ($3,5 \times 3,5 \mu\text{m}$) die FN-Bedeckung bei mit 18 % bis 40 % (Segment 1 – 3) damit deutlich höher und es zeigt

sich, dass die Zellen in allen Segmenten stationär sind. Für die Migration auf dem FN-Dotgradient SR mit rechteckigen Dots ($3 \times 2 \mu\text{m}$) zeigt sich folgendes Bild: Bei einer FN-Bedeckung von 5 bis 15 % migrieren die meisten Zellen entsprechend der breiten Dotseite gerichtet entlang der x-Achse.



Appendix 6 Messung der Proteinbedeckung von Fibronectin-Dotgradienten mit unterschiedlichen Dotgrößen und -formen

Die prozentuale FN-Verteilung innerhalb der jeweils verwendeten FN-Gradienten mit kleinen Dots (Gradient S; $2 \times 2 \mu\text{m}$), großen Dots (Gradient SD; $3,5 \times 3,5 \mu\text{m}$) und rechteckigen Dots (Gradient SR; $3 \times 2 \mu\text{m}$) wird ermittelt. Analysiert wird der Teilbereich des Gradienten, in dem Haptotaxis stattfindet. Dieser Teilbereich ($123 \mu\text{m}$) entspricht in etwa 3 Zelllängen und wird nochmals in 3 Segmente unterteilt. (vgl. hierzu Material und Methoden, Abb. 2.6, Seite 53). Segment 1 weist dabei die höchste FN-Dichte auf, während Segment 3 die geringste FN-Bedeckung innerhalb des gemessenen Teilbereiches hat. Vergleicht man jeweils die Resultate von Segment 1 der verschiedenen Gradienten (S, SR und SD) zeigt sich, dass bei dem FN-Gradient S mit kleinen FN-Dots ($2 \times 2 \mu\text{m}$) die FN-Bedeckung zwischen 8 und 17 % (Segment 1 – 3) beträgt und die Zellen vorwiegend haptotaktisch migrieren. Im Gegensatz dazu liegt bei dem FN-Gradient SD mit großen Dots ($3,5 \times 3,5 \mu\text{m}$) die FN-Bedeckung mit 18 bis 40 % (Segment 1 – 3) deutlich höher und die Zellen sind stationär. Der FN-Dotgradient SR mit rechteckigen Dots ($3 \times 2 \mu\text{m}$) weist eine FN-Bedeckung von 5 bis 15 % auf. Hier wandern die meisten Zellen gerichtet entsprechend der breiten Dotseite entlang der x-Achse.

Literaturverzeichnis

- Adams, D.N., E.Y. Kao, C.L. Hypolite, M.D. Distefano, W.S. Hu, and P.C. Letourneau. 2005. Growth cones turn and migrate up an immobilized gradient of the laminin IKVAV peptide. *J Neurobiol.* 62:134-147.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. 2008. *The Cytoskeleton. Molecular biology of the cell.* 5th Edition. New York. 965-1010.
- Albrecht-Buehler, G., and A. Bushnell. 1979. The orientation of centrioles in migrating 3T3 cells. *Exp Cell Res.* 120:111-118.
- Allen, W.E., D. Zicha, A.J. Ridley, and G.E. Jones. 1998. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol.* 141:1147-1157.
- Allingham, J.S., R. Smith, and I. Rayment. 2005. The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat Struct Mol Biol.* 12:378-379.
- Anderson, K.I., Y.L. Wang, and J.V. Small. 1996. Coordination of protrusion and translocation of the keratocyte involves rolling of the cell body. *J Cell Biol.* 134:1209-1218.
- Ang, S.F., Z.S. Zhao, L. Lim, and E. Manser. 2010. DAAM1 is a formin required for centrosome re-orientation during cell migration. *PLoS One.* 5.
- Anstrom, J.A., and R.A. Raff. 1988. Sea urchin primary mesenchyme cells: relation of cell polarity to the epithelial-mesenchymal transformation. *Dev Biol.* 130:57-66.
- Aota, S., M. Nomizu, and K.M. Yamada. 1994. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem.* 269:24756-24761.
- Arnold, M., V.C. Hirschfeld-Warneken, T. Lohmüller, P. Heil, J. Blümmel, E.A. Cavalcanti-Adam, M. López-García, P. Walther, H. Kessler, B. Geiger, and J.P. Spatz. 2008. Induction of cell polarization and migration by a gradient of nanoscale variations in adhesive ligand spacing. *Nano Lett.* 8:2063-2069.
- Atkinson, J.J., T.L. Adair-Kirk, D.G. Kelley, D. Demello, and R.M. Senior. 2008. Clara cell adhesion and migration to extracellular matrix. *Respir Res.* 9:1.
- Autenrieth, T. 2008. Zellpolarisierung im substratgebundenen Fibronectingradienten. Diplomarbeit, Universität Karlsruhe (TH).
- Avnur, Z., and B. Geiger. 1981. The removal of extracellular fibronectin from areas of cell-substrate contact. *Cell.* 25:121-132.
- Ballestrem, C., B. Wehrle-Haller, B. Hinz, and B.A. Imhof. 2000. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell.* 11:2999-3012.
- Ballestrem, C., B. Wehrle-Haller, and B.A. Imhof. 1998. Actin dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci.* 111 (Pt 12):1649-1658.
- Barth, A.I., H.Y. Caro-Gonzalez, and W.J. Nelson. 2008. Role of adenomatous polyposis coli (APC) and microtubules in directional cell migration and neuronal polarization. *Semin Cell Dev Biol.* 19:245-251.
- Belisario, M.A., S. Tafuri, G. Pontarelli, N. Staiano, and E. Gionti. 2005. Modulation of chondrocyte adhesion to collagen by echistatin. *Eur J Cell Biol.* 84:833-842.

- Beningo, K.A., M. Dembo, I. Kaverina, J.V. Small, and Y.L. Wang. 2001. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol.* 153:881-888.
- Beningo, K.A., and Y.L. Wang. 2002. Flexible substrata for the detection of cellular traction forces. *Trends Cell Biol.* 12:79-84.
- Berg, M.C., S.Y. Yang, P.T. Hammond, and M.F. Rubner. 2004. Controlling mammalian cell interactions on patterned polyelectrolyte multilayer surfaces. *Langmuir.* 20:1362-1368.
- Bergmann, J.E., A. Kupfer, and S.J. Singer. 1983. Membrane insertion at the leading edge of motile fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:1367-1371.
- Bernard, A., D. Fitzli, P. Sonderegger, E. Delamarche, B. Michel, H.R. Bosshard, and H. Biebuyck. 2001. Affinity capture of proteins from solution and their dissociation by contact printing. *Nat Biotechnol.* 19:866-869.
- Bernard, A., J.-P. Renault, B. Michel, H.R. Bosshard, und E. Delamarche. 2000. Microcontact Printing of Proteins. *Adv Mater.* 12:1067-1070.
- Binamé, F., G. Pawlak, P. Roux, and U. Hibner. 2010. What makes cells move: requirements and obstacles for spontaneous cell motility. *Mol Biosyst.* 6:648-661.
- Bishop, A.L., and A. Hall. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J.* 348 Pt 2:241-255.
- Blawas, A.S., and W.M. Reichert. 1998. Protein patterning. *Biomaterials.* 19:595-609.
- Bond, L.M., H. Brandstaetter, J.R. Sellers, J. Kendrick-Jones, and F. Buss. 2011. Myosin motor proteins are involved in the final stages of the secretory pathways. *Biochem Soc Trans.* 39:1115-1119.
- Bouzigues, C., M. Mathieu, A. Triller, and M. Dahan. 2007. Asymmetric redistribution of GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27:11251-11256.
- Brandley, B.K., and R.L. Schnaar. 1989. Tumor cell haptotaxis on covalently immobilized linear and exponential gradients of a cell adhesion peptide. *Dev Biol.* 135:74-86.
- Brock, A., E. Chang, C.C. Ho, P. LeDuc, X. Jiang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2003. Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir.* 19:1611-1617.
- Bulinski, J.C., and G.G. Gundersen. 1991. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *Bioessays.* 13:285-293.
- Burdick, J.A., A. Khademhosseini, and R. Langer. 2004. Fabrication of gradient hydrogels using a microfluidics/photopolymerization process. *Langmuir.* 20:5153-5156.
- Burrige, K., and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell.* 116:167-179.
- Cai, D., D.P. McEwen, J.R. Martens, E. Meyhofer, and K.J. Verhey. 2009. Single molecule imaging reveals differences in microtubule track selection between Kinesin motors. *PLoS Biol.* 7:e1000216.
- Cai, H., and P.N. Devreotes. 2011. Moving in the right direction: how eukaryotic cells migrate along chemical gradients. *Semin Cell Dev Biol.* 22:834-841.
- Cai, K., T. Kong, L. Wang, P. Liu, W. Yang, and C. Chen. 2010. Regulation of endothelial cells migration on poly(D, L-lactic acid) films immobilized with collagen gradients. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 79:291-297.

- Cameron, L.A., P.A. Giardini, F.S. Soo, and J.A. Theriot. 2000. Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:110-119.
- Carter, S.B. 1965. Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. *Nature.* 208:1183-1187.
- Carter, S.B. 1967. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature.* 213:256-260.
- Cau, J., and A. Hall. 2005. Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J Cell Sci.* 118:2579-2587.
- Chang, H.R., H.P. Huang, Y.L. Kao, S.L. Chen, S.W. Wu, T.W. Hung, J.D. Lian, and C.J. Wang. 2010. The suppressive effect of Rho kinase inhibitor, Y-27632, on oncogenic Ras/RhoA induced invasion/migration of human bladder cancer TSGH cells. *Chem Biol Interact.* 183:172-180.
- Chang, Y.C., P. Nalbant, J. Birkenfeld, Z.F. Chang, and G.M. Bokoch. 2008. GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol Biol Cell.* 19:2147-2153.
- Chen, C.S., J.L. Alonso, E. Ostuni, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2003. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun.* 307:355-361.
- Chen, C.S., M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science.* 276:1425-1428.
- Chen, W.T. 1981. Mechanism of retraction of the trailing edge during fibroblast movement. *J Cell Biol.* 90:187-200.
- Chen, W.T., and S.J. Singer. 1980. Fibronectin is not present in the focal adhesions formed between normal cultured fibroblasts and their substrata. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:7318-7322.
- Chiplonkar, J.M., D.D. Vandr e, and J.M. Robinson. 1992. Stimulus-dependent relocation of the microtubule organizing center in human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Sci.* 102 (Pt 4):723-728.
- Clark, E.A., W.G. King, J.S. Brugge, M. Symons, and R.O. Hynes. 1998. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol.* 142:573-586.
- Coan, D.E., A.R. Wechezak, R.F. Viggers, and L.R. Sauvage. 1993. Effect of shear stress upon localization of the Golgi apparatus and microtubule organizing center in isolated cultured endothelial cells. *J Cell Sci.* 104 (Pt 4):1145-1153.
- Collins, F., and M.R. Lee. 1984. The spatial control of ganglionic neurite growth by the substrate-associated material from conditioned medium: an experimental model of haptotaxis. *J Neurosci.* 4:2823-2829.
- Cook, T.A., T. Nagasaki, and G.G. Gundersen. 1998. Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol.* 141:175-185.
- Coon, H. G. 1968. Clonal culture of differentiated cells from mammals: rat liver cell culture. *Carnegie Inst. Washington Yearbook* 67: 419-421.
- Coon, H.G., and M.C. Weiss. 1969. A quantitative comparison of formation of spontaneous and virus-produced viable hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 62:852-859.

- Cory, G.O., R. Garg, R. Cramer, and A.J. Ridley. 2002. Phosphorylation of tyrosine 291 enhances the ability of WASp to stimulate actin polymerization and filopodium formation. Wiskott-Aldrich Syndrome protein. *J Biol Chem.* 277:45115-45121.
- Cory, G.O., and A.J. Ridley. 2002. Cell motility: braking WAVES. *Nature.* 418:732-733.
- Cramer, L.P., M. Siebert, and T.J. Mitchison. 1997. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J Cell Biol.* 136:1287-1305.
- Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J.B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P.D. Stahl, and D. Hodzic. 2006. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol.* 172:41-53.
- Cukierman, E., R. Pankov, D.R. Stevens, and K.M. Yamada. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 294:1708-1712.
- Cukierman, E., R. Pankov, and K.M. Yamada. 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr Opin Cell Biol.* 14:633-639.
- Dammermann, A., A. Desai, and K. Oegema. 2003. The minus end in sight. *Curr Biol.* 13:R614-624.
- Danowski, B.A. 1989. Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J Cell Sci.* 93 (Pt 2):255-266.
- Danowski, B.A., A. Khodjakov, and P. Wadsworth. 2001. Centrosome behavior in motile HGF-treated PtK2 cells expressing GFP-gamma tubulin. *Cell Motil Cytoskeleton.* 50:59-68.
- Davis, G.E., and D.R. Senger. 2005. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res.* 97:1093-1107.
- de Forges, H., A. Bouissou, and F. Perez. 2012. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol.* 44:266-274.
- Del Pozo, M.A., W.B. Kiosses, N.B. Alderson, N. Meller, K.M. Hahn, and M.A. Schwartz. 2002. Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol.* 4:232-239.
- Dertinger, S.K., X. Jiang, Z. Li, V.N. Murthy, and G.M. Whitesides. 2002. Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:12542-12547.
- Deuel, T.F., R.S. Kawahara, T.A. Mustoe, and A.F. Pierce. 1991. Growth factors and wound healing: platelet-derived growth factor as a model cytokine. *Annu Rev Med.* 42:567-584.
- DiMilla, P.A., J.A. Stone, J.A. Quinn, S.M. Albelda, and D.A. Lauffenburger. 1993. Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol.* 122:729-737.
- Distel, M., J.C. Hocking, K. Volkmann, and R.W. Köster. 2010. The centrosome neither persistently leads migration nor determines the site of axonogenesis in migrating neurons in vivo. *J Cell Biol.* 191:875-890.
- Doyle, A.D., M.L. Kutys, M.A. Conti, K. Matsumoto, R.S. Adelstein, and K.M. Yamada. 2012. Microenvironmental control of cell migration: Myosin IIA is required for efficient migration in fibrillar environments through control of cell adhesion dynamics. *J Cell Sci.*
- Doyle, A.D., F.W. Wang, K. Matsumoto, and K.M. Yamada. 2009. One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *J Cell Biol.* 184:481-490.

- Dransart, E., B. Olofsson, and J. Cherfils. 2005. RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic*. 6:957-966.
- Dubin-Thaler, B.J., G. Giannone, H.G. Döbereiner, and M.P. Sheetz. 2004. Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophys J*. 86:1794-1806.
- Dupin, I., Y. Sakamoto, and S. Etienne-Manneville. 2011. Cytoplasmic intermediate filaments mediate actin-driven positioning of the nucleus. *J Cell Sci*. 124:865-872.
- Efimov, A., A. Kharitonov, N. Efimova, J. Loncarek, P.M. Miller, N. Andreyeva, P. Gleeson, N. Galjart, A.R. Maia, I.X. McLeod, J.R. Yates, H. Maiato, A. Khodjakov, A. Akhmanova, and I. Kaverina. 2007. Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell*. 12:917-930.
- Elsdale, T., and J. Bard. 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol*. 54:626-637.
- Eming, S.A., and J.A. Hubbell. 2011. Extracellular matrix in angiogenesis: dynamic structures with translational potential. *Exp Dermatol*. 20:605-613.
- Engel, J., E. Odermatt, A. Engel, J.A. Madri, H. Furthmayr, H. Rohde, and R. Timpl. 1981. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Mol Biol*. 150:97-120.
- Erickson, C.A. 1985. Control of neural crest cell dispersion in the trunk of the avian embryo. *Dev Biol*. 111:138-157.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell*. 106:489-498.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629-635.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003. Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature*. 421:753-756.
- Etienne-Manneville, S., J.B. Manneville, S. Nicholls, M.A. Ferenczi, and A. Hall. 2005. Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol*. 170:895-901.
- Euteneuer, U., and M. Schliwa. 1992. Mechanism of centrosome positioning during the wound response in BSC-1 cells. *J Cell Biol*. 116:1157-1166.
- Fenter, P., A. Eberhardt, and P. Eisenberger. 1994. Self-Assembly of n-Alkyl Thiols as Disulfides on Au(111). *Science*. 266:1216-1218.
- Fidalgo, M., M. Fraile, A. Pires, T. Force, C. Pombo, and J. Zalvide. 2010. CCM3/PDCD10 stabilizes GCKIII proteins to promote Golgi assembly and cell orientation. *J Cell Sci*. 123:1274-1284.
- Fischer, J., and M. Wegener. 2012. Three-dimensional optical laser lithography beyond the diffraction limit. *Laser & Photonics Reviews*:n/a-n/a.
- Foth, B.J., M.C. Goedecke, and D. Soldati. 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:3681-3686.
- Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 123:4195-4200.
- Friedl, P., and E.B. Bröcker. 2000. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 57:41-64.

- Garcia-Mata, R., E. Boulter, and K. Burridge. 2011. The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:493-504.
- Gardel, M.L., I.C. Schneider, Y. Aratyn-Schaus, and C.M. Waterman. 2010. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 26:315-333.
- Gaudet, C., W.A. Marganski, S. Kim, C.T. Brown, V. Gunderia, M. Dembo, and J.Y. Wong. 2003. Influence of type I collagen surface density on fibroblast spreading, motility, and contractility. *Biophys J.* 85:3329-3335.
- Geiger, B., and A. Bershadsky. 2002. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell.* 110:139-142.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K.M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:793-805.
- Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky. 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:21-33.
- Giard, D.J., S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, and W.P. Parks. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 51:1417-1423.
- Goetz, J.G. 2009. Bidirectional control of the inner dynamics of focal adhesions promotes cell migration. *Cell Adh Migr.* 3:185-190.
- Goldmann, W.H. 2012. Mechanotransduction and Focal Adhesions. *Cell Biol Int.*
- Gomes, E.R., and G.G. Gundersen. 2006. Real-time centrosome reorientation during fibroblast migration. *Methods Enzymol.* 406:579-592.
- Gomes, E.R., S. Jani, and G.G. Gundersen. 2005. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell.* 121:451-463.
- Gonçalves, J., S. Nolasco, R. Nascimento, M. Lopez Fanarraga, J.C. Zabala, and H. Soares. 2010. TBCCD1, a new centrosomal protein, is required for centrosome and Golgi apparatus positioning. *EMBO Rep.* 11:194-200.
- Goode, B.L., D.G. Drubin, and G. Barnes. 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol.* 12:63-71.
- Gotlieb, A.I., L.M. May, L. Subrahmanyam, and V.I. Kalnins. 1981. Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *J Cell Biol.* 91:589-594.
- Gottlieb, D.I., K. Rock, and L. Glaser. 1976. A gradient of adhesive specificity in developing avian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:410-414.
- Green, K.J., and R.D. Goldman. 1983. The effects of taxol on cytoskeletal components in cultured fibroblasts and epithelial cells. *Cell Motil.* 3:283-305.
- Grinnell, F., R.E. Billingham, and L. Burgess. 1981. Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *J Invest Dermatol.* 76:181-189.
- Gu, J., M. Tamura, R. Pankov, E.H. Danen, T. Takino, K. Matsumoto, and K.M. Yamada. 1999. Shc and FAK differentially regulate cell motility and directionality modulated by PTEN. *J Cell Biol.* 146:389-403.
- Gudima, G.O., I.A. Vorobjev, and Chentsov YuS. 1988. Centriolar location during blood cell spreading and motion in vitro: an ultrastructural analysis. *J Cell Sci.* 89 (Pt 2):225-241.

- Guilluy, C., R. Garcia-Mata, and K. Burridge. 2011. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends Cell Biol.* 21:718-726.
- Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell.* 84:345-357.
- Gunawan, R.C., E.R. Choban, J.E. Conour, J. Silvestre, L.B. Schook, H.R. Gaskins, D.E. Leckband, and P.J. Kenis. 2005. Regiospecific control of protein expression in cells cultured on two-component counter gradients of extracellular matrix proteins. *Langmuir.* 21:3061-3068.
- Gunawan, R.C., J. Silvestre, H.R. Gaskins, P.J. Kenis, and D.E. Leckband. 2006. Cell migration and polarity on microfabricated gradients of extracellular matrix proteins. *Langmuir.* 22:4250-4258.
- Gundersen, G.G., and J.C. Bulinski. 1988. Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:5946-5950.
- Gupton, S.L., and C.M. Waterman-Storer. 2006. Spatiotemporal feedback between actomyosin and focal-adhesion systems optimizes rapid cell migration. *Cell.* 125:1361-1374.
- Hale, C.M., W.C. Chen, S.B. Khatau, B.R. Daniels, J.S. Lee, and D. Wirtz. 2011. SMRT analysis of MTOC and nuclear positioning reveals the role of EB1 and LIC1 in single-cell polarization. *J Cell Sci.* 124:4267-4285.
- Hale, C.M., A.L. Shrestha, S.B. Khatau, P.J. Stewart-Hutchinson, L. Hernandez, C.L. Stewart, D. Hodzic, and D. Wirtz. 2008. Dysfunctional connections between the nucleus and the actin and microtubule networks in laminopathic models. *Biophys J.* 95:5462-5475.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science.* 279:509-514.
- Hammond, J.W., C.F. Huang, S. Kaech, C. Jacobson, G. Banker, and K.J. Verhey. 2010. Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol Biol Cell.* 21:572-583.
- Harris, K.P., and U. Tepass. 2010. Cdc42 and vesicle trafficking in polarized cells. *Traffic.* 11:1272-1279.
- Hauzenberger, D., J. Klominek, S.E. Bergström, and K.G. Sundqvist. 1995. T lymphocyte migration: the influence of interactions via adhesion molecules, the T cell receptor, and cytokines. *Crit Rev Immunol.* 15:285-316.
- Heasman, S.J., and A.J. Ridley. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:690-701.
- Heath, J.P., and B.F. Holifield. 1993. On the mechanisms of cortical actin flow and its role in cytoskeletal organisation of fibroblasts. *Symp Soc Exp Biol.* 47:35-56.
- Hehnly, H., W. Xu, J.L. Chen, and M. Stamnes. 2010. Cdc42 regulates microtubule-dependent Golgi positioning. *Traffic.* 11:1067-1078.
- Henson, J.H., T.M. Svitkina, A.R. Burns, H.E. Hughes, K.J. MacPartland, R. Nazarian, and G.G. Borisy. 1999. Two components of actin-based retrograde flow in sea urchin coelomocytes. *Mol Biol Cell.* 10:4075-4090.
- Herbst, T.J., J.B. McCarthy, E.C. Tsilibary, and L.T. Furcht. 1988. Differential effects of laminin, intact type IV collagen, and specific domains of type IV collagen on endothelial cell adhesion and migration. *J Cell Biol.* 106:1365-1373.

- Higginbotham, H., T. Tanaka, B.C. Brinkman, and J.G. Gleeson. 2006. GSK3beta and PKCzeta function in centrosome localization and process stabilization during Slit-mediated neuronal repolarization. *Mol Cell Neurosci.* 32:118-132.
- Hirschfeld-Warneken, V.C., M. Arnold, A. Cavalcanti-Adam, M. López-García, H. Kessler, and J.P. Spatz. 2008. Cell adhesion and polarisation on molecularly defined spacing gradient surfaces of cyclic RGDfK peptide patches. *Eur J Cell Biol.* 87:743-750.
- Hostetter, D., S. Rice, S. Dean, D. Altman, P.M. McMahon, S. Sutton, A. Tripathy, and J.A. Spudich. 2004. Dictyostelium myosin bipolar thick filament formation: importance of charge and specific domains of the myosin rod. *PLoS Biol.* 2:e356.
- Hotchkiss, K.A., A.W. Ashton, R. Mahmood, R.G. Russell, J.A. Sparano, and E.L. Schwartz. 2002. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. *Mol Cancer Ther.* 1:1191-1200.
- Hotulainen, P., and P. Lappalainen. 2006. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol.* 173:383-394.
- Howard, J., and A.A. Hyman. 2009. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:569-574.
- Hsu, S., R. Thakar, and S. Li. 2007. Haptotaxis of endothelial cell migration under flow. *Methods Mol Med.* 139:237-250.
- Hsu, S., R. Thakar, D. Liepmann, and S. Li. 2005. Effects of shear stress on endothelial cell haptotaxis on micropatterned surfaces. *Biochem Biophys Res Commun.* 337:401-409.
- Huang, H.P., C.J. Wang, J.P. Tsai, S.W. Wu, T.W. Hung, J.D. Lian, and H.R. Chang. 2012. Y27632 attenuates the aristolochic acid-promoted invasion and migration of human urothelial cancer TSGH cells in vitro and inhibits the growth of xenografts in vivo. *Nephrol Dial Transplant.* 27:565-575.
- Huang, Y., B. Agrawal, D. Sun, J.S. Kuo, and J.C. Williams. 2011. Microfluidics-based devices: New tools for studying cancer and cancer stem cell migration. *Biomicrofluidics.* 5:13412.
- Humphries, M.J., M.A. Travis, K. Clark, and A.P. Mould. 2004. Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. *Biochem Soc Trans.* 32:822-825.
- Hussain, N.K., S. Jenna, M. Glogauer, C.C. Quinn, S. Wasiak, M. Guipponi, S.E. Antonarakis, B.K. Kay, T.P. Stossel, N. Lamarche-Vane, and P.S. McPherson. 2001. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol.* 3:927-932.
- Huttenlocher, A., and A.R. Horwitz. 2011. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3:a005074.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Iden, S., and J.G. Collard. 2008. Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:846-859.
- Ingber, D.E. 1990. Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:3579-3583.
- Irima, D., G. Balazsi, N. Agrawal, and M. Toner. 2009. Adaptive-control model for neutrophil orientation in the direction of chemical gradients. *Biophys. J.* 96: 3897-3916.
- Ishizaki, T., M. Uehata, I. Tamechika, J. Keel, K. Nonomura, M. Maekawa, and S. Narumiya. 2000. Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol.* 57:976-983.

- Ito, Y. 1999. Surface micropatterning to regulate cell functions. *Biomaterials*. 20:2333-2342.
- Itoh, R.E., K. Kurokawa, Y. Ohba, H. Yoshizaki, N. Mochizuki, and M. Matsuda. 2002. Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol*. 22:6582-6591.
- Jackman, R.J., J.L. Wilbur, and G.M. Whitesides. 1995. Fabrication of submicrometer features on curved substrates by microcontact printing. *Science*. 269:664-666.
- Jiang, Z. 2009. Zelladhäsion und -verhalten auf mikrostrukturierten Substraten mit variabler Fibronectin-Dichte. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH).
- Jiang, X., D.A. Bruzewicz, A.P. Wong, M. Piel, and G.M. Whitesides. 2005. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:975-978.
- 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.
- Kang, C.E., E.J. Gemeinhart, and R.A. Gemeinhart. 2004. Cellular alignment by grafted adhesion peptide surface density gradients. *J Biomed Mater Res A*. 71:403-411.
- Katz, B.Z., E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K.M. Yamada, and B. Geiger. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell*. 11:1047-1060.
- Kaverina, I., and A. Straube. 2011. Regulation of cell migration by dynamic microtubules. *Semin Cell Dev Biol*. 22:968-974.
- Khatau, S.B., C.M. Hale, P.J. Stewart-Hutchinson, M.S. Patel, C.L. Stewart, P.C. Searson, D. Hodzic, and D. Wirtz. 2009. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:19017-19022.
- Khatau, S.B., D.H. Kim, C.M. Hale, R.J. Bloom, and D. Wirtz. 2010. The perinuclear actin cap in health and disease. *Nucleus*. 1:337-342.
- Khire, V., T. Lee, and C. Bowman. 2007. Surface modification using thiol-acrylate conjugate addition reactions. *Macromolecules*. 40:5669-5677.
- Kim, H.D., and S.R. Peyton. 2012. Bio-inspired materials for parsing matrix physicochemical control of cell migration: a review. *Integr Biol (Camb)*. 4:37-52.
- Kirschner, M.W., and T. Mitchison. 1986. Microtubule dynamics. *Nature*. 324:621.
- Klein, F. 2009. Der Einfluss von 2D- und 3D-Substratgeometrien und Flexibilität auf Zellform und Zellverhalten. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH).
- Klein, F., T. Striebel, J. Fischer, Z. Jiang, C.M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, and M. Bastmeyer. 2010. Elastic fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements. *Adv Mater*. 22:868-871.
- Klominek, J., K.H. Robért, and K.G. Sundqvist. 1993. Chemotaxis and haptotaxis of human malignant mesothelioma cells: effects of fibronectin, laminin, type IV collagen, and an autocrine motility factor-like substance. *Cancer Res*. 53:4376-4382.
- Kodani, A., I. Kristensen, L. Huang, and C. Sütterlin. 2009. GM130-dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization. *Mol Biol Cell*. 20:1192-1200.
- Koonce, M.P., R.A. Cloney, and M.W. Berns. 1984. Laser irradiation of centrosomes in newt eosinophils: evidence of centriole role in motility. *J Cell Biol*. 98:1999-2010.

- Korohoda, W., Z. Madeja, and J. Sroka. 2002. Diverse chemotactic responses of *Dictyostelium discoideum* amoebae in the developing (temporal) and stationary (spatial) concentration gradients of folic acid, cAMP, Ca(2+) and Mg(2+). *Cell Motil Cytoskeleton*. 53:1-25.
- Kovács, M., J. Tóth, C. Hetényi, A. Málnási-Csizmadia, and J.R. Sellers. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *J Biol Chem*. 279:35557-35563.
- Kraynov, V.S., C. Chamberlain, G.M. Bokoch, M.A. Schwartz, S. Slabaugh, and K.M. Hahn. 2000. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*. 290:333-337.
- Krendel, M., and M.S. Mooseker. 2005. Myosins: tails (and heads) of functional diversity. *Physiology (Bethesda)*. 20:239-251.
- Krendel, M., F.T. Zenke, and G.M. Bokoch. 2002. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton. *Nat Cell Biol*. 4:294-301.
- Kumar, A., and G.M. Whitesides. 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*. 63:2002-2004.
- Kupfer, A., G. Dennert, and S.J. Singer. 1983. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center within cloned natural killer cells bound to their targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80:7224-7228.
- Kupfer, A., D. Louvard, and S.J. Singer. 1982. Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 79:2603-2607.
- Kurkinen, M., A. Vaheri, P.J. Roberts, and S. Stenman. 1980. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest*. 43:47-51.
- Lamallice, L., F. Le Boeuf, and J. Huot. 2007. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*. 100:782-794.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 84:359-369.
- Lehnert, D. 2003. Einfluss von Mikro- und Nanostrukturen auf Zellwachstum und -Migration. Dissertation, Universität Konstanz.
- Lehnert, D., B. Wehrle-Haller, C. David, U. Weiland, C. Ballestrem, B.A. Imhof, and M. Bastmeyer. 2004. Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci*. 117:41-52.
- Leiss, M., K. Beckmann, A. Girós, M. Costell, and R. Fässler. 2008. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol*. 20:502-507.
- Li, F., S.D. Redick, H.P. Erickson, and V.T. Moy. 2003. Force measurements of the alpha5beta1 integrin-fibronectin interaction. *Biophys J*. 84:1252-1262.
- Li, G., R. Randev, A. Soeriyadi, G. Rees, C. Boyer, Z. Tong, T. Davis, C. Becer, and D. Haddleton. 2010. Investigation into thiol-(meth)acrylate Michael addition reactions using amine and phosphine catalysts. *Polymer Chemistry*. 1:1196-1204.
- Li, R., and G.G. Gundersen. 2008. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:860-873.
- Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan. 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2:329-333.

- Liao, G., T. Nagasaki, and G.G. Gundersen. 1995. Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion. *J Cell Sci.* 108 (Pt 11):3473-3483.
- Limouze, J., A.F. Straight, T. Mitchison, and J.R. Sellers. 2004. Specificity of blebbistatin, an inhibitor of myosin II. *J Muscle Res Cell Motil.* 25:337-341.
- Lin, C.H., E.M. Espreafico, M.S. Mooseker, and P. Forscher. 1997. Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Biol Bull.* 192:183-185.
- Linask, K.K., and J.W. Lash. 1986. Precardiac cell migration: fibronectin localization at mesoderm-endoderm interface during directional movement. *Dev Biol.* 114:87-101.
- Liu, J.C., and D.A. Tirrell. 2008. Cell response to RGD density in cross-linked artificial extracellular matrix protein films. *Biomacromolecules.* 9:2984-2988.
- Liu, L., B.D. Ratner, E.H. Sage, and S. Jiang. 2007. Endothelial cell migration on surface-density gradients of fibronectin, VEGF, or both proteins. *Langmuir.* 23:11168-11173.
- Liu, P., Y.W. Zhang, H. Yu, X. Zhang, Q.H. Cheng, C. Lu, and W. Bonfield. 2009. Spreading of an anchorage-dependent cell on a selectively ligand-coated substrate mediated by receptor-ligand binding. *J Biomed Mater Res A.* 91:806-813.
- Lo, C.M., H.B. Wang, M. Dembo, and Y.L. Wang. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J.* 79:144-152.
- Lombardi, M.L., D.E. Jaalouk, C.M. Shanahan, B. Burke, K.J. Roux, and J. Lammerding. 2011. The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J Biol Chem.* 286:26743-26753.
- Lowery, L.A., and D. Van Vactor. 2009. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature rev.* 10: 332-343.
- Luxton, G.W., E.R. Gomes, E.S. Folker, E. Vintinner, and G.G. Gundersen. 2010. Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science.* 329:956-959.
- Luxton, G.W., and G.G. Gundersen. 2011. Orientation and function of the nuclear-centrosomal axis during cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* 23:579-588.
- MacAlear, J.M., und J. Wehrung. 1978. *Microsubstrates and method for making micropattern devices.*, USA.
- Machacek, M., L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G.L. Johnson, K.M. Hahn, and G. Danuser. 2009. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature.* 461:99-103.
- Maheshwari, G., G. Brown, D.A. Lauffenburger, A. Wells, and L.G. Griffith. 2000. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci.* 113 (Pt 10):1677-1686.
- Maheshwari, G., A. Wells, L.G. Griffith, and D.A. Lauffenburger. 1999. Biophysical integration of effects of epidermal growth factor and fibronectin on fibroblast migration. *Biophys J.* 76:2814-2823.
- Mahmud, G., C.J. Campbell, K.J.M. Bishop, Y.A. Komarova, O. Chaga, S. Soh, S. Huda, K. Kandere-Grzybowska, and B.A. Grzybowski. 2009. Directing cell motions on micropatterned ratchets. *Nat Phys.* 5:606-612.
- Mai, J., L. Fok, H. Gao, X. Zhang, and M.M. Poo. 2009. Axon initiation and growth cone turning on bound protein gradients. *J Neurosci.* 29:7450-7458.

- Mallet, D.G. 2004. Mathematical Modelling of the Role of Haptotaxis in Tumour Growth and Invasion. Dissertation, Queensland University
- Manneville, J.B., M. Jehanno, and S. Etienne-Manneville. 2010. Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. *J Cell Biol.* 191:585-598.
- Massia, S.P., and J.A. Hubbell. 1991. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J Cell Biol.* 114:1089-1100.
- Matov, A., K. Applegate, P. Kumar, C. Thoma, W. Krek, G. Danuser, and T. Wittmann. 2010. Analysis of microtubule dynamic instability using a plus-end growth marker. *Nat Methods.* 7:761-768.
- Matsumura, F., Y. Yamakita, and S. Yamashiro. 2011. Myosin light chain kinases and phosphatase in mitosis and cytokinesis. *Arch Biochem Biophys.* 510:76-82.
- McCarthy, J.B., and L.T. Furcht. 1984. Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro. *J Cell Biol.* 98:1474-1480.
- McCarthy, J.B., S.L. Palm, and L.T. Furcht. 1983. Migration by haptotaxis of a Schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. *J Cell Biol.* 97:772-777.
- Mensing, H. 1985. Bedeutung der Fibroblasten-Chemotaxis für Wundheilung und Tumorzellevasion. 145-151.
- Mikhailov, A., and G.G. Gundersen. 1998. Relationship between microtubule dynamics and lamellipodium formation revealed by direct imaging of microtubules in cells treated with nocodazole or taxol. *Cell Motil Cytoskeleton.* 41:325-340.
- Mikhailov, A.V., and G.G. Gundersen. 1995. Centripetal transport of microtubules in motile cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 32:173-186.
- Miller, P.M., A.W. Folkmann, A.R. Maia, N. Efimova, A. Efimov, and I. Kaverina. 2009. Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol.* 11:1069-1080.
- Millon-Frémillon, A., D. Bouvard, A. Grichine, S. Manet-Dupé, M.R. Block, and C. Albiges-Rizo. 2008. Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent beta1-integrin affinity. *J Cell Biol.* 180:427-441.
- Mogilner, A., and G. Oster. 2003. Polymer motors: pushing out the front and pulling up the back. *Curr Biol.* 13:R721-733.
- Montenegro-Venegas, C., E. Tortosa, S. Rosso, D. Peretti, F. Bollati, M. Bisbal, I. Jausoro, J. Avila, A. Cáceres, and C. Gonzalez-Billault. 2010. MAP1B regulates axonal development by modulating Rho-GTPase Rac1 activity. *Mol Biol Cell.* 21:3518-3528.
- Monypenny, J., D. Zicha, C. Higashida, F. Ocegüera-Yanez, S. Narumiya, and N. Watanabe. 2009. Cdc42 and Rac family GTPases regulate mode and speed but not direction of primary fibroblast migration during platelet-derived growth factor-dependent chemotaxis. *Mol Cell Biol.* 29:2730-2747.
- Moretti, F.A., A.K. Chauhan, A. Iaconcig, F. Porro, F.E. Baralle, and A.F. Muro. 2007. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J Biol Chem.* 282:28057-28062.
- Mosesson, M.W., and R.A. Umfleet. 1970. The cold-insoluble globulin of human plasma. I. Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components. *J Biol Chem.* 245:5728-5736.

- Mosher, D.F., and A. Vaheri. 1978. Thrombin stimulates the production and release of a major surface-associated glycoprotein (fibronectin) in cultures of human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 112:323-334.
- Moskal, J.R., D. Trisler, M.D. Schneider, and M. Nirenberg. 1986. Purification of a membrane protein distributed in a topographic gradient in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:4730-4733.
- Mostafavi-Pour, Z., J.A. Askari, S.J. Parkinson, P.J. Parker, T.T. Ng, and M.J. Humphries. 2003. Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol.* 161:155-167.
- Mrksich, M. 1998. Tailored substrates for studies of attached cell culture. *Cell Mol Life Sci.* 54:653-662.
- Mrksich, M., L.E. Dike, J. Tien, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. 1997. Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver. *Exp Cell Res.* 235:305-313.
- Nagai, T., N. Yamakawa, S. Aota, S.S. Yamada, S.K. Akiyama, K. Olden, and K.M. Yamada. 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.* 114:1295-1305.
- Nalbant, P., Y.C. Chang, J. Birkenfeld, Z.F. Chang, and G.M. Bokoch. 2009. Guanine nucleotide exchange factor-H1 regulates cell migration via localized activation of RhoA at the leading edge. *Mol Biol Cell.* 20:4070-4082.
- Nalbant, P., L. Hodgson, V. Kraynov, A. Toutchkine, and K.M. Hahn. 2004. Activation of endogenous Cdc42 visualized in living cells. *Science.* 305:1615-1619.
- Naumanen, P., P. Lappalainen, and P. Hotulainen. 2008. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J Microsc.* 231:446-454.
- Nemere, I., A. Kupfer, and S.J. Singer. 1985. Reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center inside macrophages subjected to a chemotactic gradient. *Cell Motil.* 5:17-29.
- Nicolson, G.L., K. Dulski, C. Basson, and D.R. Welch. 1985. Preferential organ attachment and invasion in vitro by B16 melanoma cells selected for differing metastatic colonization and invasive properties. *Invasion Metastasis.* 5:144-158.
- Niggli, V. 2003. Microtubule-disruption-induced and chemotactic-peptide-induced migration of human neutrophils: implications for differential sets of signalling pathways. *J Cell Sci.* 116:813-822.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 144:1235-1244.
- Oakley, B.R., and Y.N. Akkari. 1999. Gamma-tubulin at ten: progress and prospects. *Cell Struct Funct.* 24:365-372.
- Oakley, C.E., and B.R. Oakley. 1989. Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature.* 338:662-664.

- Ochsenhirt, S.E., E. Kokkoli, J.B. McCarthy, and M. Tirrell. 2006. Effect of RGD secondary structure and the synergy site PHSRN on cell adhesion, spreading and specific integrin engagement. *Biomaterials*. 27:3863-3874.
- Olski, T.M., A.A. Noegel, and E. Korenbaum. 2001. Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily. *J Cell Sci*. 114:525-538.
- Orr, A.W., B.P. Helmke, B.R. Blackman, and M.A. Schwartz. 2006. Mechanisms of mechanotransduction. *Dev Cell*. 10:11-20.
- Osmani, N., F. Peglion, P. Chavrier, and S. Etienne-Manneville. 2010. Cdc42 localization and cell polarity depend on membrane traffic. *J Cell Biol*. 191:1261-1269.
- Palazzo, A., B. Ackerman, and G.G. Gundersen. 2003. Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature*. 421:230.
- Palazzo, A.F., T.A. Cook, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2001a. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol*. 3:723-729.
- Palazzo, A.F., H.L. Joseph, Y.J. Chen, D.L. Dujardin, A.S. Alberts, K.K. Pfister, R.B. Vallee, and G.G. Gundersen. 2001b. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol*. 11:1536-1541.
- Pankov, R., and K.M. Yamada. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 115:3861-3863.
- Parker, K.K., A.L. Brock, C. Brangwynne, R.J. Mannix, N. Wang, E. Ostuni, N.A. Geisse, J.C. Adams, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2002. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J*. 16:1195-1204.
- Paskauskas, S., A. Parseliunas, V. Kerkadze, R. Nobiling, J. Schmidt, and E. Ryschich. 2011. Blockade of leukocyte haptokinesis and haptotaxis by ketoprofen, diclofenac and SC-560. *BMC Immunol*. 12:64.
- Patel, N., R. Bhandari, K.M. Shakesheff, S.M. Cannizzaro, M.C. Davies, R. Langer, C.J. Roberts, S.J. Tendler, and P.M. Williams. 2000. Printing patterns of biospecifically-adsorbed protein. *J Biomater Sci Polym Ed*. 11:319-331.
- Pegtel, D.M., S.I. Ellenbroek, A.E. Mertens, R.A. van der Kammen, J. de Rooij, and J.G. Collard. 2007. The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Curr Biol*. 17:1623-1634.
- Pertz, O., L. Hodgson, R.L. Klemke, and K.M. Hahn. 2006. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature*. 440:1069-1072.
- Petty, R.T., H.W. Li, J.H. Maduram, R. Ismagilov, and M. Mrksich. 2007. Attachment of cells to islands presenting gradients of adhesion ligands. *J Am Chem Soc*. 129:8966-8967.
- Pitaval, A., Q. Tseng, M. Bornens, and M. Théry. 2010. Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *J Cell Biol*. 191:303-312.
- Plummer, S.T., Q. Wang, P.W. Bohn, R. Stockton, and M.A. Schwartz. 2003. Electrochemically Derived Gradients of the Extracellular Matrix Protein Fibronectin on Gold. *Langmuir*. 19:7528-7536.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-465.
- Ponti, A., M. Machacek, S.L. Gupton, C.M. Waterman-Storer, and G. Danuser. 2004. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*. 305:1782-1786.

- Postlethwaite, A.E., R. Snyderman, and A.H. Kang. 1979. Generation of a fibroblast chemotactic factor in serum by activation of complement. *J Clin Invest.* 64:1379-1385.
- Pouthas, F., P. Girard, V. Lecaudey, T.B. Ly, D. Gilmour, C. Boulin, R. Pepperkok, and E.G. Reynaud. 2008. In migrating cells, the Golgi complex and the position of the centrosome depend on geometrical constraints of the substratum. *J Cell Sci.* 121:2406-2414.
- Prager-Khoutorsky, M., A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky. 2011. Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nat Cell Biol.* 13:1457-1465.
- Prigozhina, N.L., and C.M. Waterman-Storer. 2004. Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr Biol.* 14:88-98.
- Prime, K., and G. Whitesides. 1991. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science.* 252:1164-1167.
- Prime, K.L., and G.M. Whitesides. 1993. Adsorption of proteins onto surfaces containing end-attached oligo(ethylene oxide): a model system using self-assembled monolayers. *Journal of the American Chemical Society.* 115:10714-10721.
- Pytela, R., M.D. Pierschbacher, and E. Ruoslahti. 1985. Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell.* 40:191-198.
- Rajagopalan, P., W.A. Marganski, X.Q. Brown, and J.Y. Wong. 2004. Direct comparison of the spread area, contractility, and migration of balb/c 3T3 fibroblasts adhered to fibronectin- and RGD-modified substrata. *Biophys J.* 87:2818-2827.
- Rape, A., W.H. Guo, and Y.L. Wang. 2011. Microtubule depolymerization induces traction force increase through two distinct pathways. *J Cell Sci.* 124:4233-4240.
- Ratner, S., W.S. Sherrod, and D. Lichlyter. 1997. Microtubule retraction into the uropod and its role in T cell polarization and motility. *J Immunol.* 159:1063-1067.
- Redd, M.J., G. Kelly, G. Dunn, M. Way, and P. Martin. 2006. Imaging macrophage chemotaxis in vivo: studies of microtubule function in zebrafish wound inflammation. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63:415-422.
- Reed, N.A., D. Cai, T.L. Blasius, G.T. Jih, E. Meyhofer, J. Gaertig, and K.J. Verhey. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol.* 16:2166-2172.
- Renault, J.P., A. Bernard, D. Juncker, B. Michel, H.R. Bosshard, and E. Delamarche. 2002. Fabricating microarrays of functional proteins using affinity contact printing. *Angew Chem Int Ed Engl.* 41:2320-2323.
- Rhoads, D.S., and J.L. Guan. 2007. Analysis of directional cell migration on defined FN gradients: role of intracellular signaling molecules. *Exp Cell Res.* 313:3859-3867.
- Ridley, A.J. 2001. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 114:2713-2722.
- Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz. 2003. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 302:1704-1709.
- Riento, K., and A.J. Ridley. 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:446-456.

- Riveline, D., E. Zamir, N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol.* 153:1175-1186.
- Rodriguez, O.C., A.W. Schaefer, C.A. Mandato, P. Forscher, W.M. Bement, and C.M. Waterman-Storer. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol.* 5:599-609.
- Rooney, C., G. White, A. Nazgiewicz, S.A. Woodcock, K.I. Anderson, C. Ballestrem, and A. Malliri. 2010. The Rac activator STEF (Tiam2) regulates cell migration by microtubule-mediated focal adhesion disassembly. *EMBO Rep.* 11:292-298.
- Roos, E. 1984. Cellular adhesion, invasion and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 738:263-284.
- Roskelley, C.D., and M.J. Bissell. 1995. Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem Cell Biol.* 73:391-397.
- Salmon, W.C., M.C. Adams, and C.M. Waterman-Storer. 2002. Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J Cell Biol.* 158:31-37.
- Salpingidou, G., A. Smertenko, I. Hausmanowa-Petruciewicz, P.J. Hussey, and C.J. Hutchison. 2007. A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *J Cell Biol.* 178:897-904.
- Sameshima, M., Y. Imai, and Y. Hashimoto. 1988. The position of the microtubule-organizing center relative to the nucleus is independent of the direction of cell migration in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Motil Cytoskeleton.* 9:111-116.
- Sander, E.E., J.P. ten Klooster, S. van Delft, R.A. van der Kammen, and J.G. Collard. 1999. Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol.* 147:1009-1022.
- Sarvestani, A.S., and E. Jabbari. 2009. Analysis of cell locomotion on ligand gradient substrates. *Biotechnol Bioeng.* 103:424-429.
- Schaar, B.T., and S.K. McConnell. 2005. Cytoskeletal coordination during neuronal migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13652-13657.
- Schlessinger, K., E.J. McManus, and A. Hall. 2007. Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity. *J Cell Biol.* 178:355-361.
- Schmitz, A.A., E.E. Govek, B. Böttner, and L. Van Aelst. 2000. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res.* 261:1-12.
- Schmoranzer, J., J.P. Fawcett, M. Segura, S. Tan, R.B. Vallee, T. Pawson, and G.G. Gundersen. 2009. Par3 and dynein associate to regulate local microtubule dynamics and centrosome orientation during migration. *Curr Biol.* 19:1065-1074.
- Schmoranzer, J., G. Kreitzer, and S.M. Simon. 2003. Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. *J Cell Sci.* 116:4513-4519.
- Schwartz, M. 2004. Rho signalling at a glance. *J Cell Sci.* 117:5457-5458.
- Schütze, K., A. Maniotis, and M. Schliwa. 1991. The position of the microtubule-organizing center in directionally migrating fibroblasts depends on the nature of the substratum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:8367-8371.

- Senior, R.M., G.L. Griffin, and R.P. Mecham. 1982. Chemotactic responses of fibroblasts to tropoelastin and elastin-derived peptides. *J Clin Invest.* 70:614-618.
- Sigal, G.B., M. Mrksich, and G.M. Whitesides. 1998. Effect of Surface Wettability on the Adsorption of Proteins and Detergents. *Journal of the American Chemical Society.* 120:3464-3473.
- Silvestre, J., P.J. Kenis, and D.E. Leckband. 2009. Cadherin and integrin regulation of epithelial cell migration. *Langmuir.* 25:10092-10099.
- Singer, S.J., and A. Kupfer. 1986. The directed migration of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Biol.* 2:337-365.
- Singhvi, R., A. Kumar, G.P. Lopez, G.N. Stephanopoulos, D.I. Wang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1994. Engineering cell shape and function. *Science.* 264:696-698.
- Sit, S.T., and E. Manser. 2011. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 124:679-683.
- Small, J.V., K. Anderson, and K. Rottner. 1996. Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Biosci Rep.* 16:351-368.
- Small, J.V., and G.P. Resch. 2005. The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr Opin Cell Biol.* 17:517-523.
- Small, J.V., K. Rottner, and I. Kaverina. 1999. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 11:54-60.
- Small, J.V., K. Rottner, I. Kaverina, and K.I. Anderson. 1998. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta.* 1404:271-281.
- Smilenov, L.B., A. Mikhailov, R.J. Pelham, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 1999. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science.* 286:1172-1174.
- Smith, J.T., J.T. Elkin, and W.M. Reichert. 2006. Directed cell migration on fibronectin gradients: effect of gradient slope. *Exp Cell Res.* 312:2424-2432.
- Smith, J.T., D.H. Kim, and W.M. Reichert. 2009. Haptotactic gradients for directed cell migration: stimulation and inhibition using soluble factors. *Comb Chem High Throughput Screen.* 12:598-603.
- Smith, J.T., J.K. Tomfohr, M.C. Wells, T.P. Beebe, T.B. Kepler, and W.M. Reichert. 2004. Measurement of cell migration on surface-bound fibronectin gradients. *Langmuir.* 20:8279-8286.
- Soderling, S.H., K.L. Binns, G.A. Wayman, S.M. Davee, S.H. Ong, T. Pawson, and J.D. Scott. 2002. The WRP component of the WAVE-1 complex attenuates Rac-mediated signalling. *Nat Cell Biol.* 4:970-975.
- Solecki, D.J., L. Model, J. Gaetz, T.M. Kapoor, and M.E. Hatten. 2004. Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nat Neurosci.* 7:1195-1203.
- Starr, D.A., and H.N. Fridolfsson. 2010. Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 26:421-444.
- Svitkina, T.M., A.B. Verkhovskiy, K.M. McQuade, and G.G. Borisy. 1997. Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol.* 139:397-415.
- Sütterlin, C., and A. Colanzi. 2010. The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *J Cell Biol.* 188:621-628.

- Takesono, A., S.J. Heasman, B. Wojciak-Stothard, R. Garg, and A.J. Ridley. 2010. Microtubules regulate migratory polarity through Rho/ROCK signaling in T cells. *PLoS One*. 5:e8774.
- Théry, M. 2010. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci*. 123:4201-4213.
- Théry, M., A. Jiménez-Dalmaroni, V. Racine, M. Bornens, and F. Jülicher. 2007. Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature*. 447:493-496.
- Théry, M., A. Pépin, E. Dressaire, Y. Chen, and M. Bornens. 2006a. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton*. 63:341-355.
- Théry, M., V. Racine, M. Piel, A. Pépin, A. Dimitrov, Y. Chen, J.B. Sibarita, and M. Bornens. 2006b. Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:19771-19776.
- Tran, A.D., T.P. Marmo, A.A. Salam, S. Che, E. Finkelstein, R. Kabarriti, H.S. Xenias, R. Mazitschek, C. Hubbert, Y. Kawaguchi, M.P. Sheetz, T.P. Yao, and J.C. Bulinski. 2007. HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci*. 120:1469-1479.
- Tsai, L.H., and J.G. Gleeson. 2005. Nucleokinesis in neuronal migration. *Neuron*. 46:383-388.
- Tsukamoto, Y., W.E. Hessel, and S.M. Wahl. 1981. Macrophage production of fibronectin, a chemoattractant for fibroblasts. *J Immunol*. 127:673-678.
- Tzima, E., W.B. Kiosses, M.A. del Pozo, and M.A. Schwartz. 2003. Localized cdc42 activation, detected using a novel assay, mediates microtubule organizing center positioning in endothelial cells in response to fluid shear stress. *J Biol Chem*. 278:31020-31023.
- Uehata, M., T. Ishizaki, H. Satoh, T. Ono, T. Kawahara, T. Morishita, H. Tamakawa, K. Yamagami, J. Inui, M. Maekawa, and S. Narumiya. 1997. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 389:990-994.
- Ulman, A. 1996. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem Rev*. 96:1533-1554.
- Vallotton, P., S.L. Gupton, C.M. Waterman-Storer, and G. Danuser. 2004. Simultaneous mapping of filamentous actin flow and turnover in migrating cells by quantitative fluorescent speckle microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:9660-9665.
- Van Aelst, L., and C. D'Souza-Schorey. 1997. Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev*. 11:2295-2322.
- Van Beneden, E. 1883. Recherches sur la maturation de l'oeuf, la fécondation et la division cellulaire. *Arch Biol*. 4:265-638.
- Van Haastert, P.J., and P.N. Devreotes. 2004. Chemotaxis: signalling the way forward. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5:626-634.
- Van Horssen, R., N. Galjart, J.A. Rens, A.M. Eggermont, and T.L. ten Hagen. 2006. Differential effects of matrix and growth factors on endothelial and fibroblast motility: application of a modified cell migration assay. *J Cell Biochem*. 99:1536-1552.
- Varani, J., S.E. Fligiel, and P. Perone. 1985. Directional motility in strongly malignant murine tumor cells. *Int J Cancer*. 35:559-564.

- Vasiliev, J.M., I.M. Gelfand, L.V. Domnina, O.Y. Ivanova, S.G. Komm, and L.V. Olshevskaja. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J Embryol Exp Morphol.* 24:625-640.
- Vaz, R., G.G. Martins, S. Thorsteinsdóttir, and G. Rodrigues. 2012. Fibronectin promotes migration, alignment and fusion in an in vitro myoblast cell model. *Cell Tissue Res.*
- Verhey, K.J., and J.W. Hammond. 2009. Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:765-777.
- Verschueren, H., P. De Baetselier, and J. Bereiter-Hahn. 1991. Dynamic morphology of metastatic mouse T-lymphoma cells invading through monolayers of 10T1/2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 20:203-214.
- Wang, H.H., H. Tanaka, X. Qin, T. Zhao, L.H. Ye, T. Okagaki, T. Katayama, A. Nakamura, R. Ishikawa, S.E. Thatcher, G.L. Wright, and K. Kohama. 2008. Blebbistatin inhibits the chemotaxis of vascular smooth muscle cells by disrupting the myosin II-actin interaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294:H2060-2068.
- Wang, H.R., Y. Zhang, B. Ozdamar, A.A. Ogunjimi, E. Alexandrova, G.H. Thomsen, and J.L. Wrana. 2003. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science.* 302:1775-1779.
- Watanabe, T., J. Noritake, and K. Kaibuchi. 2005. Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol.* 15:76-83.
- Watanabe, T., S. Wang, J. Noritake, K. Sato, M. Fukata, M. Takefuji, M. Nakagawa, N. Izumi, T. Akiyama, and K. Kaibuchi. 2004. Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev Cell.* 7:871-883.
- Waterman-Storer, C.M., and E.D. Salmon. 1997. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J Cell Biol.* 139:417-434.
- Webster, D.R., G.G. Gundersen, J.C. Bulinski, and G.G. Borisy. 1987. Differential turnover of tyrosinated and detyrosinated microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:9040-9044.
- Wehrle-Haller, B., and B. Imhof. 2002. The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol.* 12:382-389.
- Welch, M.D., and R.D. Mullins. 2002. Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 18:247-288.
- Wennerberg, K., and C.J. Der. 2004. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci.* 117:1301-1312.
- Whitesides, G.M. 1995. Self-assembling Materials. *Scientific American* 273:146-149.
- Wiese, C., and Y. Zheng. 2000. A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat Cell Biol.* 2:358-364.
- Willcox, P.J., C.A. Reinhart-King, S.J. Lahr, W.F. DeGrado, and D.A. Hammer. 2005. Dynamic heterodimer-functionalized surfaces for endothelial cell adhesion. *Biomaterials.* 26:4757-4766.
- Wilson, E.B. 1900. *The Cell in Development and Inheritance.* 2.Auflage. Macmillan, New York
- Winder, S.J., and K.R. Ayscough. 2005. Actin-binding proteins. *J Cell Sci.* 118:651-654.
- Wong, K.W., S. Mohammadi, and R.R. Isberg. 2006. Disruption of RhoGDI and RhoA regulation by a Rac1 specificity switch mutant. *J Biol Chem.* 281:40379-40388.

- Wong, M.K., and A.I. Gotlieb. 1988. The reorganization of microfilaments, centrosomes, and microtubules during in vitro small wound reendothelialization. *J Cell Biol.* 107:1777-1783.
- Wu, C., S.B. Asokan, M.E. Berginski, E.M. Haynes, N.E. Sharpless, J.D. Griffith, S.M. Gomez, and J.E. Bear. 2012. Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell.* 148:973-987.
- Wu, X., A. Kodama, and E. Fuchs. 2008. ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity. *Cell.* 135:137-148.
- Wu, X., S. Li, A. Chrostek-Grashoff, A. Czuchra, H. Meyer, P.D. Yurchenco, and C. Brakebusch. 2007. Cdc42 is crucial for the establishment of epithelial polarity during early mammalian development. *Dev Dyn.* 236:2767-2778.
- Wu, X., Q.T. Shen, D.S. Oristian, C.P. Lu, Q. Zheng, H.W. Wang, and E. Fuchs. 2011. Skin stem cells orchestrate directional migration by regulating microtubule-ACF7 connections through GSK3 β . *Cell.* 144:341-352.
- Xu, J., F. Wang, A. Van Keymeulen, M. Rentel, and H.R. Bourne. 2005. Neutrophil microtubules suppress polarity and enhance directional migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:6884-6889.
- Yan, X., Y. Shen, and X. Zhu. 2010. Live show of Rho GTPases in cell migration. *J Mol Cell Biol.* 2:68-69.
- Yang, L., L. Wang, and Y. Zheng. 2006. Gene targeting of Cdc42 and Cdc42GAP affirms the critical involvement of Cdc42 in filopodia induction, directed migration, and proliferation in primary mouse embryonic fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 17:4675-4685.
- Yvon, A.M., J.W. Walker, B. Danowski, C. Fagerstrom, A. Khodjakov, and P. Wadsworth. 2002. Centrosome reorientation in wound-edge cells is cell type specific. *Mol Biol Cell.* 13:1871-1880.
- Zaidel-Bar, R., C. Ballestrem, Z. Kam, and B. Geiger. 2003. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J Cell Sci.* 116:4605-4613.
- Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi, and B. Geiger. 2004. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochem Soc Trans.* 32:416-420.
- Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, and B. Geiger. 2007. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol.* 9:858-867.
- Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114:3583-3590.
- Zamir, E., B.Z. Katz, S. Aota, K.M. Yamada, B. Geiger, and Z. Kam. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 112 (Pt 11):1655-1669.
- Zhang, X.F., A.W. Schaefer, D.T. Burnette, V.T. Schoonderwoert, and P. Forscher. 2003. Rho-dependent contractile responses in the neuronal growth cone are independent of classical peripheral retrograde actin flow. *Neuron.* 40:931-944.
- Zhao, Z.S., and E. Manser. 2005. PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J.* 386:201-214.

Abbildungsverzeichnis

Einleitung

Abb. 1.1	Organisationsformen des Aktin-Zytoskeletts in migrierenden Zellen	7
Abb. 1.2	Mikrotubuli-Organisation in migrierenden Zellen	10
Abb. 1.3	Zellmigrationsprozesse <i>in vivo</i>	13
Abb. 1.4	Zellpolarisierung	15
Abb. 1.5	Cdc42 und ihre Bedeutung bei der Zellpolarisierung	21
Abb. 1.6	Zelle <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> auf mikrostrukturiertem Fibronectin-Dotgradienten.....	25
Abb. 1.7	Regulation der gerichteten Zellmigration und -polarisierung	31

Material und Methoden

Abb. 2.1	Stempelmuster der verschiedenen Dotgradienten	36
Abb. 2.2	Schematische Darstellung der Stempel- und Substratherstellung	39
Abb. 2.3	Präparation primärer Hühnerfibroblasten	41
Abb. 2.4	Bestimmung der Migrationsrichtung auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten.....	51
Abb. 2.5	Bestimmung der Polarisierung auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten.....	52
Abb. 2.6	Messung der prozentualen Fibronectin-Bedeckung	53

Ergebnisse

Abb. 3.1	Übersichtsaufnahme des mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten.....	57
Abb. 3.2	Haptotaxis von primären Hühnerfibroblasten (PCF)	59
Abb. 3.3	Quantitative Analyse der Haptotaxis von PCF	60
Abb. 3.4	Einfluss der Fibronectin-Dotgröße und -Dotform auf die Haptotaxis.....	62
Abb. 3.5	Quantitative Analyse der Haptotaxis von humanen Fibroblasten (HFF).....	64
Abb. 3.6	Vergleich der Zellmigration auf Gradient mit Plateau (SP1), Plateau (P) und Gradient (S)	66
Abb. 3.7	Intrazelluläre Polarisierung von PCFs auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten	69
Abb. 3.8	Golgi-Reorientierung während der Haptotaxis und der ungerichteten Migration.....	71
Abb. 3.9	Zell-Matrix-Kontakte auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten und homogen beschichteten Substraten	73
Abb. 3.10	Dynamische Integrin und Vinculin-Verteilung während der Haptotaxis	74
Abb. 3.11	Organisation des Aktin-Zytoskeletts bei der ungerichteten Migration und Haptotaxis	75
Abb. 3.12	Einfluss der intrazellulären Zugkräfte auf die Haptotaxis und die Zellpolarisierung	77
Abb. 3.13	Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts bei der ungerichteten Migration und Haptotaxis.....	79
Abb. 3.14	Einfluss der Mikrotubulodynamik auf die Haptotaxis und die Zellpolarisierung.....	81
Abb. 3.15	Einfluss von Cdc42 auf die Haptotaxis	84
Abb. 3.16	Einfluss der pharmakologischen aPKC ζ -Inhibition auf die Zellmigration und -polarisierung in Wundheilungsassays.....	86
Abb. 3.17	Bedeutung von aPKC ζ für die Haptotaxis.....	88
Abb. 3.18	Bedeutung von aPKC ζ für die laterale Zellmigration auf Fibronectin-Gradienten mit rechteckigen Dots	89

Diskussion

Abb. 4.1	Zeitlicher Verlauf der Zellpolarisierung und Haptotaxis	111
Abb. 4.2	Modell zur Haptotaxis	112

Ausblick

Abb. 5.1	EB3-Dynamik in humanen Fibroblasten auf homogenem Substrat und mikrostrukturiertem Fibronectin-Dotgradienten	114
Abb. 5.2	Verteilung von Par6 und α PKC ζ während der Wund-induzierten Migration, der ungerichteten Migration und der Haptotaxis	115
Abb. 5.3	Herstellung mikrostrukturierter Fibronectin-Dotgradienten mit Hilfe der Acrylat-Thiol-Chemie ..	117

Appendix

Appendix 1	Migrationsverhalten verschiedener Zelltypen auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten	118
Appendix 2	Morphologische Polarisierung von primären Hühnerfibroblasten auf homogenen Fibronectin-Substraten	119
Appendix 3	Morphologische Polarisierung von primären Hühnerfibroblasten auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten	120
Appendix 4	Intrazelluläre Polarisierung während der Haptotaxis von humanen Fibroblasten	121
Appendix 5	Einfluss des Proteinkinase α PKC ζ -Inhibitors auf die Zellmorphologie und das Zytoskelett....	121
Appendix 6	Messung der Proteinbedeckung von Fibronectin-Dotgradienten mit unterschiedlichen Dotgrößen und -formen	123

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Unterschiedliche Orientierung der Nukleus-Zentrosomen Achse (NC-Achse) in migrierenden Zellen (modifiziert nach Luxton und Gundersen, 2011)	16
Tab. 2.1	Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel	32
Tab. 2.2	Verwendete Zelltypen, eingesetztes Medium und Ablösung vom Zellkultursubstrat	40
Tab. 2.3	Verwendete Plasmide	43
Tab. 2.4	Verwendete Inhibitoren der intrazellulären Kontraktilität	45
Tab. 2.5	Verwendete Inhibitoren der Mikrotubulidynamik.....	46
Tab. 2.6	Verwendeter Inhibitor der Proteinkinase C zeta (α PKC ζ).....	46
Tab. 2.7	Verwendete Primärantikörper (mkl = monoklonal, pkl = polyklonal) und ihre Verdünnungen in 1% BSA in PBS	47
Tab. 2.8	Verwendete Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen in 1 % BSA in PBS	48
Tab. 2.9	Verwendete Färbesubstanzen und ihre Verdünnungen in 1 % BSA in PBS	48

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	M	molar (mol/l)
μCP	Microcontact Printing	m	Meter
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)	mAb	monoklonaler Antikörper (meist aus der Maus)
μl	Mikroliter (10 ⁻⁶ l)	mg	Milligramm
μF	Mikrofarad	max	maximal
μm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)	mbar	Millibar (10 ⁻³ bar)
2D	zweidimensional	MHC	<i>myosin heavy chain</i>
3D	dreidimensional	mbar	Millibar (10 ⁻³ bar)
Abb.	Abbildung	min	Minuten
APC	adenomateous polyposis coli	ml	Milliliter (10 ⁻³ l)
ATC	Alkan-Thiol-Chemie	MLC	<i>myosin light chain</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	MLCK	<i>myosin light chain kinase</i>
ATP	Adenosintriphosphat	mM	Millimolar (10 ⁻³ M)
Au	Gold	mm	Millimeter (10 ⁻³ m)
bidest	zweifach destilliertes Wasser	MTOC	<i>microtubule-organizing center</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	N₂	Stickstoff
bzw.	beziehungsweise	NH₃	Ammoniak
ca.	circa	nM	Nanomolar (10 ⁻⁹ M)
cm	Zentimeter (10 ⁻² m)	nm	Nanometer (10 ⁻⁹ m)
CO₂	Kohlendioxid	ODM	Octadecylmercaptan
Cr	Chrom	OTS	Octadecyltrichlorosilan
DAPI	4'6'-Diamidiono-2-phenylimdol	PAK	<i>p21 activated kinase</i>
DIC	<i>differential interference contrast</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
DLS	Direktes Laserschreiben	PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle	PDMS	Polydimethyl-Siloxan
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PFA	Paraformaldehyd
ECM	Extrazelluläre Matrix	PKA	Proteinkinase A
EDA	Ethylendiamin	PKC	Proteinkinase C
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	pkl	polyklonaler Antikörper
EG-30-Me	Ethylenglykol-30-Mercaptan	RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure Tripeptid
EGFP	<i>enhanced grün fluoreszierendes Protein</i>	SAM	<i>self assembled monolayer</i>
evtl.	eventuell	s.o.	siehe oben
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>	s.u.	siehe unten
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>	sog.	sogenannte/-r/-s
FN	Fibronektin	Tab.	Tabelle
gr	Gramm	u.a.	unter anderem
GAP	<i>GTPase activating protein</i>	U/min	Umdrehungen pro Minute
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>	usw.	und so weiter
GDF	<i>GDI displacement factor</i>	v	Volumen
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
GDP	Guanosindiphosphat	wt	Wildtyp
GTP	Guanosintriphosphat	z.B.	zum Beispiel
h	Stunde	α	alpha
H₂O₂	Wasserstoffperoxid	β	beta
H₂SO₄	Schwefelsäure	γ	gamma
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	ζ	zeta
IgG	Immunglobulin G		
Kap.	Kapitel		
L	Liter		

Lebenslauf

Persönliche Daten

Tatjana Autenrieth

Geboren am 06.05.1983 in Bretten

Schulbildung

09/1997 – 06/2002	Edith-Stein-Gymnasium Bretten
09/1993 – 08/1997	Melanchthon-Gymnasium Bretten
06/2002	Allgemeine Hochschulreife (Gesamtnote: 2,1)

Akademische Ausbildung

10/2002 – 03/2008	Biologiestudium an der Technischen Hochschule Karlsruhe Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Biochemie, Zoologie Diplomarbeitsthema: „Zellpolarisierung im substratgebundenen Fibronektingradienten“ (Gesamtnote: 1,2)
05/2008 – 06/2012	Promotion am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) bei Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Publikationen

Veröffentlichungen und Manuskripte:

T. Autenrieth, A.M. Greiner, J. Levine, M. Bastmeyer. "Polarization and haptotaxis of primary fibroblasts depends on microtubule- and actin dynamics", 2012 (in preparation)

J. Soine, A. Besser, **T. Autenrieth**, M. Bastmeyer, U. Schwarz. "Cell shape dynamics on micropatterned substrates", 2012 (in preparation)

Konferenzverzeichnis mit Posterpräsentation:

T. Autenrieth, M. Bastmeyer. Micropatterned fibronectin-gradients induce polarization and haptotaxis in primary fibroblasts, *Eur. J. Cell Biol.* 89, 19 (2010)

T. Autenrieth, A.M. Greiner, M. Bastmeyer. Cell polarization and haptotaxis in micropatterned fibronectin-gradients. Oct 2011. The 26th European Cytoskeletal Forum (ECF) Meeting, *Actin-based Motility* (Stresa, Italy)

T. Autenrieth, M. Bastmeyer. Haptotaxis in micropatterned fibronectin-gradients. May 2010. *Cell Architects* Symposium (Heidelberg, Germany)

T. Autenrieth, M. Bastmeyer. Micropatterned fibronectin-gradients induce polarization and haptotaxis in primary fibroblasts. March 2010. 33rd Annual Meeting of the German Society for Cell Biology (Regensburg, Germany)

T. Autenrieth, M. Bastmeyer. Micropatterned fibronectin-gradients induce haptotaxis in primary fibroblasts. Oct 2009. 444. WE-Heraeus-Seminar *Cell Mechanics* (Bad Honnef, Germany)

Danksagung

An dieser Stelle danke ich all jenen, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Im Besonderen bedanke ich mich bei...

- ... Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer für die Möglichkeit, meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen. Ferner an seinem Vertrauen, das er über die ganzen Jahre in mich gesetzt hat, und das es mir ermöglichte selbstständig und mit großen Freiräumen zu forschen und mich dabei weiterzuentwickeln.
- ... Herrn Prof. Dr. Peter Nick für die freundliche Übernahme des Korreferats.
- ... Dr. Alexandra Greiner für die vielen anregenden Diskussionen und ihre unerschütterliche Hilfsbereitschaft, die mich wesentlich bei meiner Arbeit vorangebracht haben. Ein besonders großer Dank gebührt ihr für das gründliche Korrekturlesen meiner Dissertation und die vielen hilfreichen Anregungen.
- ... meinen ehemaligen Diplomanden/innen Christina Kath, Stefanie Frank und Dominik Klumpp für ihren Einsatz und eine tolle Atmosphäre in unserem kleinen Primärzellkulturlabor. Manchmal mussten wir uns zwar stapeln, das tat allerdings der guten Laune keinen Abbruch.
- ... meinen Kooperationspartnern. Hierbei seien insbesondere Dr. Mario Hauser, Thorsten Beck und Benjamin Richter erwähnt, die die Herstellung der Master übernahmen, Jerome Soine für das „Zellbogen“-Projekt und Michael Bachmann für die Erstellung von SIM-Bildern.
- ... den technischen Mitarbeitern Tanja Landmann, Kerstin Weber, Rainer Müller und Wolfgang Woditschka für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor.
- ... meinen ehemaligen Zellbio-Kollegen Dr. Franziska Klein und Dr. Zhongxiang Jiang für die Einweisung ins Labor und ihre Hilfestellungen zu Beginn meiner Wirkungszeit.
- ... den 3 M`s aus meinem Büro (Mica, Markus und Martin - ehemals auch Christoph und Raphael) für eine unvergesslich tolle und lustige Zeit, die vielen anregenden - wenn auch als nicht ganz so tiefgreifenden ;-)- Diskussionen und die gegenseitige moralische Unterstützung. Danke, dass ich mich bei euch so frei entfalten durfte, persönlich wie auch räumlich...

Ansonsten bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Bastmeyer für eine über Jahre andauernde tolle Arbeitsatmosphäre. Gerade in der Wissenschaft, in der man oft kleinere wie auch größere Niederlagen einstecken muss, ist es wichtig ein Umfeld zu haben, in dem man sich wohl fühlt, sich gegenseitig motiviert und ein Lacher manches wieder vergessen lässt. Das durfte ich in dieser Arbeitsgruppe erfahren!

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Hermann für ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre bedingungslose, moralische (wie auch finanzielle) Unterstützung, die ich bei Ihnen finden konnte. Sie boten mir immer einen Rückzugsort, an dem ich mich erholen konnte und bestärkten mich in meinen Entscheidungen. Danke für Alles!

Nicht zuletzt danke ich meinem Freund Harald, der für mich eine ganz besondere Stütze zum Ende dieser Arbeit war. Vielen Dank für das kritische Korrekturlesen, die vielen tollen Ratschläge, den mentalen Aufbau an den Wochenenden, dass du dich regelmäßig über die A8 zu mir quälst und einfach dafür, dass es dich gibt!

*Ein glücklicher Moment ist auch immer ein trauriger Moment.
Denn dann wird einem umso bewusster,
dass man diesen Moment mit bestimmten Menschen nicht mehr teilen kann*

Diese Arbeit ist meinem geliebten Papa gewidmet.
Ich weiß du wärst stolz auf mich!
