

**Analyse Integrin-vermittelter Zellkontakte  
auf differentiellen Fibronectin/Vitronectin-Substraten  
mit hochaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Erlangung des Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) – Universitätsbereich  
genehmigte

DISSERTATION

von

Michael Bachmann

aus

Zweibrücken

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: Prof. Dr. G. Ulrich Nienhaus

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Februar 2015



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung – Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0 Deutschland Lizenz (CC BY-SA 3.0 DE): <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>

## **Erklärung**

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2011 bis Dezember 2014 am Zoologischen Institut in der Abteilung für Zell- und Neurobiologie, des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt.

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet. Die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis habe ich in der gültigen Fassung beachtet. Die Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

**Michael Bachmann, Karlsruhe, den 06. 01. 2015**



# I Inhaltverzeichnis

I Inhaltverzeichnis.....	4
II Abkürzungsverzeichnis .....	6
III Abbildungen und Tabellen .....	8
IV Zusammenfassung.....	10
1 Einleitung.....	12
1.1 Extrazelluläre Matrix .....	12
1.2 Fibronektin und Vitronektin .....	13
1.3 Integrine .....	16
1.4 Zell-Matrix-Adhäsionen .....	19
1.5 Aktin .....	25
1.6 Einsatz mikrostrukturierter Substrate.....	26
1.7 Nanoskopie.....	28
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit .....	33
2 Material und Methoden .....	36
2.1 Chemikalien und Lösungsmittel .....	36
2.2 Herstellung mikrostrukturierter Substrate.....	37
2.3 Zellkultur.....	44
2.4 Transfektion von Zellen .....	46
2.5 Immunhistochemie und Zellexperimente .....	49
2.6 Mikroskopie und Auswertung .....	52
3 Ergebnisse.....	54
3.1 Hochaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie und strukturierte Substrate für die Zellbiologie.....	54
3.1.1 Vergleich von CLSM, SIM und dSTORM in biologischen Proben .....	54
3.1.2 Zeitrafferaufnahmen mit SIM.....	60
3.1.3 Kombination von Microcontact-Printing und inverser Mikroskopie.....	62
3.1.4 Zeitliche Auflösung für die Untersuchung von Aktin - und CMA - Dynamiken .....	66
3.2 Aktin – CMA – Interaktion bei der Kontaktentstehung.....	68
3.2.1 Bildung eines „Modell-CMAs“ durch strukturierte Substrate und SIM.....	68
3.2.2 CMAs auf strukturierten Substraten werden bevorzugt durch Filopodien vermittelt.....	70
3.3 Differenzielle Fibronektin/Vitronektin Substrate zur <i>in cellula</i> Separierung verschiedener Integrine .....	73
3.3.1 FN/VN Substrate zur <i>in cellula</i> Trennung von $\beta$ 1- und $\beta$ 3- Integrinen.....	76

3.3.2 Spreading inkompetente Integrine binden Talin und Vinculin, aber weder Paxillin noch FAK .....	81
3.3.3 Vergleich zu $\beta$ 1-Integrin-Spleißvarianten.....	86
3.3.4 Kindlinbindung an $\beta$ 3-Integrin beeinflusst Integrin-Aktivierung und -Signaling .....	88
3.3.5 Zeitrafferaufnahmen von $\beta$ 3-Integrin zeigen bevorzugte Kolo­kalisierung mit VN .....	91
4 Diskussion .....	96
4.1 Hochauflösungsmikroskopie für die Analyse von CMAs .....	96
4.2 Strukturierte Substrate für inverse Mikroskopie und Zeitrafferaufnahmen.....	99
4.2.1 Strukturierte Substrate auf unbehandeltem Glas für inverse Mikroskopie und Zeitrafferaufnahmen .....	99
4.2.2 Strukturierte Substrate auf dünnem Gold für inverse Mikroskopie und Zeitrafferaufnahmen .....	101
4.3 Wechselwirkung von Aktin und CMAs auf strukturierten Substraten .....	102
4.3.1 Lebendzellmikroskopie mit SIM und strukturierten Substraten .....	102
4.3.2 Geringe ECM Verfügbarkeit fördert filopodiale CMA-Entstehung.....	103
4.4 Integrinseparierung <i>in cellula</i> zur Untersuchung der CMA-Adapterrekrutierung.....	106
4.4.1 differenzielle FN/VN Substrate (dFVS) .....	107
4.4.2 Ein $\beta$ 3-Integrin-Y <sup>747</sup> -Talin-Komplex rekrutiert Paxillin und FAK, aber kein Vinculin.....	109
4.4.3 Adapterrekrutierung von $\beta$ 1A-Integrin und muskelspezifischem $\beta$ 1D-Integrin.....	111
4.4.4 Einfluss von Kindlin für Spreading und Adapterrekrutierung .....	111
4.4.5 $\beta$ 3-Integrin Dynamik auf FN/VN-Substraten .....	113
4.5 Model der CMA-Entstehung und der modulabhängigen Reifung.....	117
Literaturverzeichnis.....	122
Publikationen.....	136
Danksagung .....	138

## II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
cFN	zelluläres FN
CLSM	konfokales Laserscanningmikroskop
CMA	Zell-Matrix Adhäsion
dSTORM	<i>direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FA	<i>Focal Adhesion</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FERM	<i>(4.1 protein, ezrin, radixin, moesin)</i>
FN	Fibronektin
FP	fluoreszentes Protein
GA	Glutaraldehyd
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GEF	<i>Guanine Exchange Factor</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
Ig-CAM	<i>Immunoglobulin Cell Adhesion Molecule</i>
IgG	Immunglobulin G Antikörper
IgM	Immunglobulin M Antikörper
Kap.	Kapitel
ILK	<i>Integrin Linked Kinase</i>
IPP	ILK-PINCH-Parvin
LIM	<i>(Lin 11, Isl-1, Mec-3)</i>
mkl	monoklonal
NA	<i>Nascent Adhesion</i>
PALM	<i>Photoactivated Localization Microscopy</i>
PDMS	Polydimethyl-Siloxan
PFA	Paraformaldehyd

pFN	Plasma-Fibronektin
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PINCH	<i>Particularly Interesting New Cysteine-Histidine-rich protein</i>
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PIPKly	Phosphatidylinositol-Phosphatkinase Typ 1y
pkl	polyklonal
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RIAM	<i>Rap1-GTP-Interacting Adaptor Molecule</i>
SAM	<i>Self-Assembled Monolayer</i>
SIM	<i>Superresolution Structured Illumination Microscopy</i>
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
STORM	<i>Stochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
Tab.	Tabelle
TIRF	<i>Total Internal Reflection</i>
VASP	Vasodilator Stimuliertes Phosphoprotein
VH	<i>Vinculin Head</i>
Vin	Vinculin
VN	Vitronektin
VT	<i>Vinculin Tail</i>
α	alpha
β	beta
γ	gamma

# III Abbildungen und Tabellen

## Abbildungen

Abb. 1.1: schematischer Aufbau von Fibronectin (FN) und Vitronectin (VN).

Abb. 1.2: Integrine, Ligandenspezifität und Aktivierung.

Abb. 1.3: schematischer Aufbau wichtiger Zell-Matrix-Adhäsionsproteine.

Abb. 1.4: Schema verschiedener nanoskopischer Techniken.

Abb. 2.1: Verwendete Stempelmuster

Abb. 2.2: Schema der verschiedenen Strukturierungsmethoden

Abb. 3.1: Quantitativer Vergleich von CLSM, SIM und dSTORM anhand von Mikrotubuli-Halbwertsbreiten

Abb. 3.2: Qualitativer Vergleich von CLSM, SIM und dSTORM anhand von Cell-Matrix-Adhäsions (CMA) Bestandteilen

Abb. 3.3: Elektronenmikroskopische Fixierungsmethode ist notwendig zur Darstellung von Aktin mittels dSTORM

Abb. 3.4: Indirekte Immunmarkierung zeigt eine veränderte Lokalisation von Vinculin im Vergleich zu fluoreszenten Proteinen

Abb.3.5: SR-SIM ist geeignet für Zeitrafferaufnahmen von CMA-Entstehung und -Reifung

Abb. 3.6: *direct  $\mu$ Contact-Printing* ( $d\mu$ CP) ermöglicht Zeitrafferaufnahmen von Zellmigration

Abb. 3.7: Eine dünne Goldbeschichtung ermöglicht inverse Mikroskopie und ist kompatibel mit Gold-Thiol-Chemie für Microcontact Printing ( $\mu$ CP)

Abb. 3.8: Eine Bildrate von 1 pro min ist ausreichend zur Untersuchung der CMA Entstehung

Abb. 3.9: Strukturierte Substrate ermöglichen die Bildung von „Modell-CMAs“.

Abb. 3.10: Überbrückung passivierter Bereiche erfolgt bevorzugt durch filopodiale Aktinausläufer

Abb. 3.11: Aktivität und Signaling Talin-betreffender  $\beta$ 3-Integrinmutationen

Abb. 3.12: Aktivität und Signaling Kindlin-betreffender  $\beta$ 3-Integrinmutationen

Abb. 3.13: Differenzielle FN/VN Substrate zur *in cellula* Separierung von Integrinen

Abb. 3.14: Differenzielle FN/VN Substrate ermöglichen Spreading mittels endogenem  $\beta$ 1-Integrin

Abb. 3.15:  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA haben keinen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett

Abb. 3.16: Talin kolokalisiert mit  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA vergleichbar zu  $\beta$ 3-wt

Abb. 3.17: Spreading inkompetente  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA Mutationen kolokalisieren nicht mit Paxillin

Abb. 3.18: FAK kolokalisiert analog zu Paxillin nicht mit Spreading inkompetente  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA Mutationen

Abb. 3.19: Vinculin kolokalisiert mit Spreading inkompetente  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA Mutationen

Abb. 3.20:  $\beta$ 1D-Integrin kolokalisiert mit Vinculin, aber nicht mit Paxillin

Abb. 3.21: Die Rekrutierung von Paxillin wird durch die  $\beta$ 3-Integrin-Kindlin Interaktion beeinflusst

Abb. 3.22: Weder Kindlin-, noch Paxillin-defizitäre  $\beta$ 3-Integrin-Mutationen kolokalisieren mit ILK

Abb. 3.23:  $\beta$ 3-Integrin-vermittelte CMAs kolokalisieren unabhängig von Paxillin konstant mit Vitronektin (VN)

Abb. 3.24: Die Zellperipherie enthält transiente  $\beta$ 3-Cluster, die sich auf Vitronektin (VN) zu CMAs wandeln

Abb. 3.25: Neue  $\beta$ 3-wt-vermittelte CMAs entstehen auf Vitronektin (VN)

Abb. 4.1: Modell der CMA Entstehung und Reifung mittels spezialisierter Module für  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin

## **Tabellen**

Tab. 1.1: Publikationen über Unterschiede im Signaling von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin

Tab. 2.1 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Tab. 2.2 Verwendete Zell-Linien

Tab. 2.3 Verwendete Plasmide

Tab. 2.4 Verwendete primäre Antikörper

Tab. 2.5 Verwendete sekundäre Antikörper

Tab. 2.5 Verwendete Affinitätsmarkierungen

Tab. 3.1: Indirekte Immunmarkierung führt bei dSTORM zu mehr Hintergrund

Tab. 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Experimente auf FN/VN-Substraten

## IV Zusammenfassung

Zellen können mit anderen Zellen und mit ihrer Umgebung verbunden sein. Die wichtigste Klasse von Strukturen für die Verbindung zur extrazellulären Matrix (ECM) sind Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsionen (CMAs). Sie sind neben Zelladhäsion und -migration an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Diese Menge an Funktionen wird reflektiert durch mehr als 150 Proteine, die am Aufbau von CMAs beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war es, die Bildung und Reifung von CMAs näher zu untersuchen. Da Zellen *in vivo* von einer ECM umgeben sind, die in einer diskreten, strukturierten Form vorliegt, wurden mikrostrukturierte Substrate benutzt. Dies wurde kombiniert mit Zeitrafferaufnahmen mittels hochauflösten fluoreszenzmikroskopischen Methoden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Superresolution Methoden, Superresolution Structured Illumination Microscopy (SIM) und direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM), mit etablierter konfokaler Laserscanningmikroskopie (CLSM) verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass SIM und dSTORM beide für die Analyse von CMAs geeignet sind, dass aber dSTORM besondere Sorgfalt bei der Probenpräparation und der Datenanalyse erfordert. Im Weiteren wurde SIM erfolgreich als Methode für Zeitrafferaufnahmen etabliert.

Die Kombination von strukturierten Substraten und hochauflösten Zeitrafferaufnahmen erforderte die Modifizierung bisheriger Methoden. Es wurden zwei Methoden etabliert und charakterisiert, die beide geeignet sind, um CMA-Entstehung und -Reifung mit Hochauflösung zu untersuchen. Insbesondere wurde ein Substrat mit getrennten Fibronectin (FN) und Vitronectin (VN) Bereichen entwickelt. Diese haben sich als entscheidend für die Analysierung von Integrinen erwiesen: (i)  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin konnte von  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ -Integrin getrennt werden, da nur  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  an VN bindet; (ii)  $\beta\text{3}$ -Mutationen, die auf VN Spreading verhindern, konnten analysiert werden, da Zellen auf diesen Substraten mit endogenem  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ -Integrin auf FN spreaden; (iii) die subzelluläre Größe der FN-Bereiche verringert die Möglichkeit von Kompensationsmechanismen; (iv) die Wahlfreiheit zwischen FN und VN ermöglicht Abschätzungen über die Affinität von Integrinen. Mit diesen Substraten konnte gezeigt werden, dass Signaling-defizitäre Integrinmutationen die CMA-Proteine Paxillin und FAK nicht rekrutieren. Die Aktin-bindenden Proteine Talin und Vinculin dagegen werden rekrutiert. Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein Modell eines modularen CMA-Aufbaus vorgeschlagen, mit einem Paxillin-FAK-Signaling-Modul und einem Talin-Vinculin-Aktinvernetzungs-Modul. Es konnte gezeigt werden, dass solch ein modulares CMA-Konzept auch bei der Adhäsion von Muskelzellen mit einer Muskel-spezifischen Integrinvariante von Bedeutung ist. Im Weiteren konnte eine Abschätzung für die *in cellula* Affinität von  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin getroffen werden. SIM-Zeitrafferaufnahmen zeigten, dass neue  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -vermittelte CMAs bevorzugt auf VN entstehen. Erst maturierte CMAs können auf FN gleiten. Dieser Zustands-abhängige Wechsel von VN zu FN ist ein eindrucksvolles Beispiel für die zytoplasmatische Regulation von Integrinen. Die Ergebnisse dieser Arbeit und das Konzept des modularen CMA-Aufbaus werden zu einem besseren Verständnis von der Wechselwirkung von ECM, CMA-Proteinen und Integrinen beitragen.



# 1 Einleitung

Zellen benötigen die Fähigkeit sich stabil in ihrer Umgebung zu verankern oder sich zielgerichtet fortzubewegen. In beiden Fällen benötigen sie adhäsive Strukturen, die sie dauerhaft oder transient mit der Umgebung verbinden. Insbesondere Fortbewegung erfordert eine genaue Regulation der Zelladhäsion mit der Bildung neuer, und der Auflösung etablierter Strukturen im jeweils richtigen Moment. Gleichzeitig zeigte sich in den letzten Jahren, dass viele Zelladhäsionskontakte mechanosensitiv, also in der Lage sind, die mechanischen Eigenschaften ihrer Umgebung wahrzunehmen (Schwartz and DeSimone, 2008). Zelladhäsionskontakte können grob in Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsionen unterschieden werden. Während die Immunglobulin Familie von Zelladhäsionsmolekülen (Ig-CAM Familie) und die Familie der Cadherine von besonderer Bedeutung für die Zell-Zell-Interaktion sind, spielen Integrine eine wichtige Rolle für die Zell-Matrix-Adhäsion. All diese Familien sind in der Lage extrazelluläre Signale ins Zellinnere weiterzuleiten und zu modifizieren. Zusätzlich gibt es ausgeprägte gegenseitige Beeinflussung des Signalings der verschiedenen Adhäsionsproteine (Weber et al., 2011), aber auch mit Signalen von anderen Rezeptoren (Ivaska and Heino, 2011). Integrine weisen keine enzymatische Aktivität auf. Zur Weiterleitung von Signalen sind sie daher in besonderem Maße auf weitere Adaptoren angewiesen. Möglicherweise aus diesem Grund sind Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsionen (CMAs) sehr komplex aufgebaut mit etwa 150 verschiedenen assoziierten Proteinen (Schiller et al., 2013; Zaidel-Bar et al., 2007a). Gleichzeitig sind sie aber auch an einer Vielzahl von Prozessen und Signalkaskaden beteiligt. Neben Zelladhäsion und –migration, werden Differenzierung, Proliferation und Apoptose durch CMA-Signaling beeinflusst. Neue Methoden der hochauflösenden Fluoreszenzmikroskopie scheinen in besonderem Maße geeignet CMAs zu untersuchen, um Substrukturen und funktionelle Untereinheiten aufzudecken (Kanchanawong et al., 2010).

## 1.1 Extrazelluläre Matrix

Die ECM ist ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk, das sehr verschiedene Formen annehmen kann. Die wichtigsten ECM Proteine sind Kollagene, Proteoglykane wie Perlecan oder Syndecan, sowie Glykoproteine wie Fibrinogen, Fibronectin (FN), Laminin und Vitronectin (VN). Zusätzlich stellen auch Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure einen wichtigen Bestandteil der ECM dar. Diese Vielfalt von Makromolekülen mit jeweils eigenen mechanischen Eigenschaften ist beispielsweise die Grundlage für so unterschiedliche Gewebe wie Knochen, Knorpel und Sehnen, und hat eine große Bedeutung bei der Evolution der Vertebraten (Hynes, 2012). Zusätzlich können Wachstumsfaktoren und Hormone in die ECM eingelagert sein. Damit ist die ECM keine passive Verankerungsumgebung von Zellen, sondern beeinflusst sie in vielfacher Weise. Umgekehrt ist die ECM nicht statisch, sondern wird ständig durch Zellen umgeformt und in ihrer Zusammensetzung variiert (Geiger et al., 2001). Zur Wahrnehmung der verschiedenen ECM-Bestandteile dienen jeweils spezifische Rezeptoren. Die Interaktion von Integrinen mit den ECM-Liganden ist besonders komplex, da viele Integrine mehrere

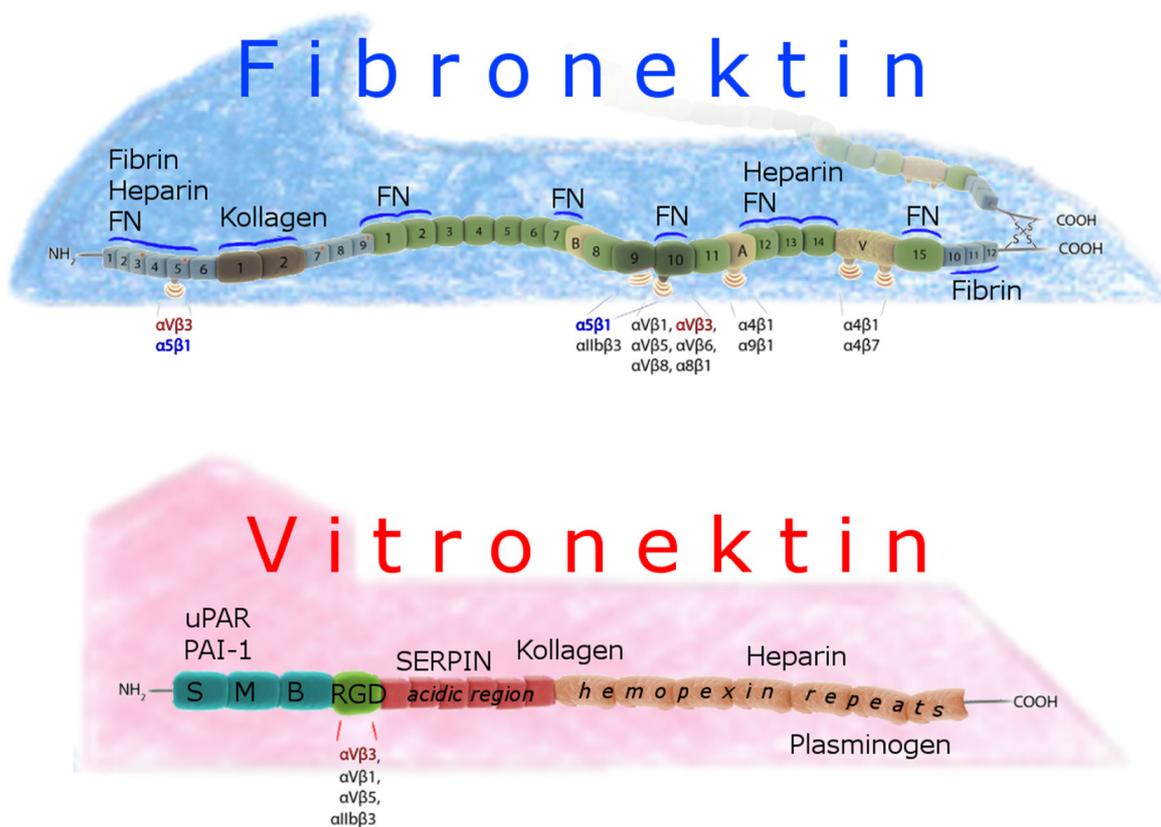
Liganden binden und viele Liganden von verschiedenen Integrinen gebunden werden können (Humphries et al., 2006; Hynes, 2002). Es ist eine anhaltende Frage inwiefern dies eine Redundanz darstellt oder verschiedene Ligand-Integrin-Kombinationen zu spezifischen Signalen führen. Ein Paar von Integrinen, für das diese Frage in besonderem Maß diskutiert wird ist  $\alpha V\beta 3$ -Integrin und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (Morgan et al., 2009). Beide binden an FN,  $\alpha V\beta 3$  bindet aber zusätzlich an VN. Diese Integrine, die Untersuchung ihrer spezifischen Aufgaben und ihre Interaktion mit FN, bzw. VN waren ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit (siehe Tab. 1.1).

## 1.2 Fibronektin und Vitronektin

Fibronektin (FN) ist ein Glykoprotein, das durch C-terminale Disulfidbindungen als Homodimer vorliegt und in dieser Form eine Masse von ca. 440 kDa aufweist (siehe Abb. 1.1). Es ist ubiquitär verbreitet und ist Bestandteile aller Gewebe in allen Entwicklungsstufen (Singh et al., 2010). FN Knockout-Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben embryonal an mesodermalen und vaskulären Defekten (Hynes, 1996). Einzelne FN-Fasern haben einen Durchmesser von etwa 3 nm, können aber quervernetzt wesentlich dicker werden (Engel et al., 1981). FN-Moleküle sind das Produkt eines einzelnen Gens, durch alternatives Spleißen gibt es jedoch 20 verschiedene humane FN-Isoformen. Durch den modularen Aufbau von FN entstehen verschiedene FN-Formen mit verschiedenen Eigenschaften. Jedes Monomer besteht aus einer Abfolge von sich wiederholenden Typ I, Typ II oder Typ III *FN-repeats* genannten Domänen (siehe Abb. 1.1). Diese weisen Bindungsstellen für verschiedene Integrine, aber auch für andere ECM-Bestandteile wie Heparin, Kollagene, oder Fibrin auf. Darüber hinaus hat FN viele Bindestellen für andere FN-Moleküle (Geiger et al., 2001).

Die verschiedenen FN-Isoformen können in zwei Gruppen unterteilt werden. Während lösliches Plasma-FN (pFN) von Hepatozyten in der Leber gebildet und ins Blut abgegeben wird, bilden Zellen in Geweben ein weniger lösliches Zell-FN (cFN) (Pankov and Yamada, 2002). cFN variiert durch alternatives Spleißing im Vergleich zu pFN wesentlich stärker in einer Zell- und Spezies-abhängigen Weise. Während pFN in einer Konzentration von etwa 300 - 500  $\mu\text{g/ml}$  im Blut zirkuliert, wird cFN in die ECM sekretiert und eingearbeitet, bis schließlich unlösliche FN Fibrillen entstehen; der Vorgang wird Fibrillogenese genannt. Der Prozess beinhaltet die mechanische Streckung von FN, was kryptische Bindungsstellen freilegt. Dies betrifft vor allem Bindungsstellen für andere FN-Moleküle, was die nachfolgende Bildung quervernetzter FN-Fibrillen ermöglicht (Vogel, 2006). Dies ist auch mit pFN möglich und wird beim Wundverschluss genutzt. Dabei wird es auch mit Fibrin quervernetzt und bildet eine provisorische ECM, um die Wunde zu verschließen und die nachfolgende Gewebsreparatur zu ermöglichen. Die hohe Konzentration von pFN an der Wundstelle führt zu einem Gradienten in Richtung der Wunde im Vergleich zum umliegenden Gewebe. Dies ermöglicht mittels Haptotaxis Zellen aus der Umgebung das Einwandern in die Wunde und schließlich die Vervollständigung des Wundverschlusses. Haptotaxis bezeichnet dabei die Migration entlang eines Gradienten eines gebundenen, adhesiven ECM-Proteins (Carter, 1965). Umgekehrt kann dieser Prozess aber auch eine pathologische Bedeutung haben. Undichte Blutgefäße in Tumoren führen zu

einem FN-Gradient vom Tumor zum Blutgefäß und ermöglichen Krebszellen durch haptotaktische Migration den Eintritt in das Blutsystem und damit die Migration in entfernte Körperregionen (Aznavorian et al., 1996; McDonald and Baluk, 2002). Das Zusammenspiel der FN-Rezeptoren und ihr Einfluss auf Zellmigration und Signalwege sind daher von großer Bedeutung.



**Abb. 1.1: schematischer Aufbau von Fibronektin (FN) und Vitronektin (VN).** Schematischer Aufbau von FN (obere Abbildung) und VN (untere Abbildung). Den jeweiligen Modellen ist in blau (FN), bzw. rot (VN) die Struktur hinterlegt, die diese Moleküle in weiteren Abbildungen dieser Arbeit haben. **Fibronektin:** Das Modell von FN ist der Arbeit von Leiss und Kollegen entnommen und modifiziert (Leiss et al., 2008). Im Vordergrund zu sehen ist ein Peptid des FN-Dimers. Die Peptide sind am C-Terminus mit Disulfidbrücken verknüpft. Das zweite Peptid ist schattiert im Hintergrund zu sehen. Die jeweiligen Domänen von FN sind in blaugrau (FN I), braun (FN II) oder grün (FN III) dargestellt. Blaue Klammern zeigen die Bindestelle der darüber angegebenen ECM-Moleküle an. Unter dem Modell sind die jeweiligen Integrine genannt, die FN an dieser Stelle binden. **Vitronektin:** Das Modell von VN ist der Arbeit von Preissner und Reuning entnommen und modifiziert (Preissner and Reuning, 2011). Die jeweiligen Domänen sind farbkodiert und im Modell beschriftet (SMB (blau), RGD (grün), acidic region (rot), hemopexin repeats (orange)). Unter dem Modell sind an der RGD-Domäne die möglichen Integrine genannt, die hier binden. Über dem Modell sind weitere Bindungspartner von VN genannt. Der Ort der Beschriftung gibt den Ort der Bindungsstelle an.

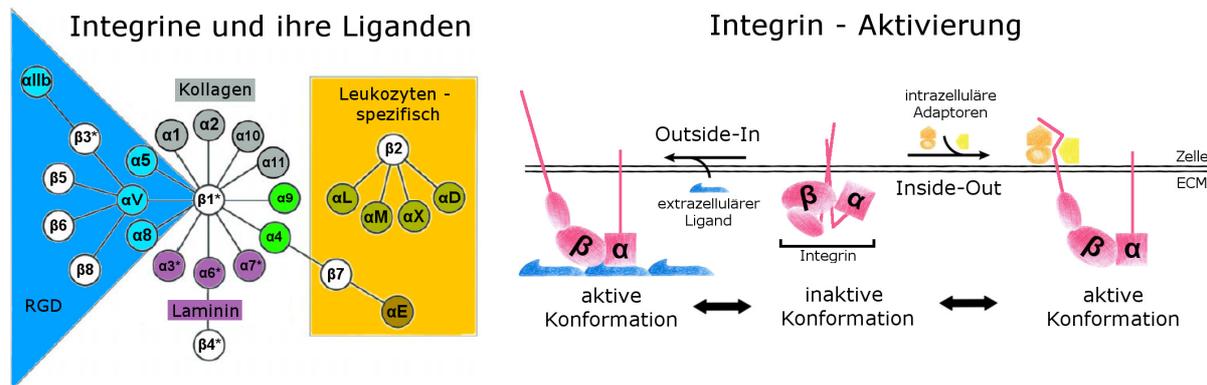
Vitronektin (VN) ist wie FN ein Glykoprotein der ECM (siehe Abb. 1.1). Es hat eine Masse von ca. 75 kDa und liegt im Blutplasma in einer ähnlichen Konzentration wie FN vor (200 – 400 µg/ml). Im Plasma liegt es als gefaltetes, inaktives Monomer vor (Schvartz et al., 1999). Hauptproduktionsort dieses Plasma-VNs sind, wie bei FN, Hepatozyten der Leber. Im Gegensatz zu FN ist die maßgebliche Rolle von VN aber nicht der strukturelle Aufbau oder die Integrität der ECM. Vielmehr ist VN durch seine Bindungspartner entscheidend als Koordinator an der ECM-Zell-Grenzfläche tätig. Es hat dabei Einfluss auf Blutstillung und –gerinnung, Fibrinolyse und das Komplementsystem der Immunabwehr. Daher wird es auch als „*matricellular*“ Protein eingeordnet (Leavesley et al., 2013). Die unterschiedlichen Funktionen von VN werden durch verschiedene Bindungspartner ermöglicht. N-terminal finden sich Bindungsstellen für Plasminogen-Aktivator Inhibitor (PAI), den Urokinase-Rezeptor (uPAR) und Integrine. In C-terminale Richtung folgen Bindungsstellen für Serpine, Kollagene, Heparin und Plasminogen (siehe Abb. 1.1). Die Interaktion mit Heparin unterstützt die Multimerisierung von VN, was wiederum das Clustering und das Signaling von uPAR und Integrinen fördert (Preissner and Reuning, 2011; Smith and Marshall, 2010). Im gesunden Zustand ist das meiste VN im Plasma zu finden. VN findet sich in geringerem Umfang jedoch auch in anderen Geweben. Da die kodierende mRNA im Vergleich in nicht-hepatozytischen Geweben aber kaum zu detektieren ist, scheint VN außerhalb der Leber und des Blutsystems vor allem durch Endozytose von Plasma-VN rekrutiert zu werden (Preissner and Reuning, 2011). VN Knockout-Mäuse weisen nur milde Schäden auf (Zheng et al., 1995), womit VN weniger bedeutsam als FN erscheint. Allerdings scheinen ECM-Proteine in den jeweiligen Knockout-Mäusen generell gut durch andere Protein ersetzbar zu sein (Hynes, 1996). VN-Knockout Mäuse haben jedoch Probleme bei der Wundheilung durch verringerte Thrombogenese und gesteigerte Fibrinolyse (Jang et al., 2000; Leavesley et al., 2013), was die oben genannten Aufgaben von VN unterstreicht. Eine weitere wichtige Bedeutung hat VN bei verschiedenen Krankheiten. Fehlregulationen können zu einem erhöhten Thromboserisiko beitragen, genauso wie zur Bildung arteriosklerotischer Plaques. Vor allem hat VN aber auch eine Rolle bei Angiogenese und Metastasierung von Tumoren. Zusammen mit den VN-bindenden Integrinen und uPAR ist es in vielen Tumoren hochreguliert. Dieser Komplex kann durch Fibrinolyse und seinen Einfluss auf Zelladhäsion und –migration eine entscheidende Rolle bei der Krebsmetastasierung spielen (Preissner and Reuning, 2011).

Sowohl FN, als auch VN gehören zur Klasse der RGD-ECM-Proteine. Diese werden so eingeteilt, da sie sich ein gemeinsames Erkennungsmotiv für Integrine teilen. Dieses besteht aus der Abfolge der drei Aminosäuren Arginin-Glycin-Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp im Dreibuchstabencode oder RGD im Einbuchstabencode) (Hynes, 2002). Weitere ECM Proteine dieser Klasse sind Thrombospondin, Osteopontin, von Willebrand Faktor (vWF), Fibrillin und Fibrinogen. Zur Klasse RGD-bindender Integrine gehören  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha V\beta 6$ ,  $\alpha V\beta 8$ ,  $\alpha 11\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$  und  $\alpha 8\beta 1$  (Humphries et al., 2006). Viele RGD-ECM-Proteine werden von mehreren Integrinen dieser Klasse gebunden und alle Integrine dieser Klasse binden an mehrere RGD-Proteine.

### 1.3 Integrine

Integrine sind transmembrane Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Aus 18  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten werden in Säugetieren 24 verschiedene Integrine gebildet (siehe Abb. 1.2). Beide Untereinheiten zusammen vermitteln die Ligandenspezifität des jeweiligen Integrins. In einer typischen Einteilung werden diese in Kollagen-, Laminin- und RGD-bindende (siehe Kap. 1.2) Integrine unterschieden. Darüber hinaus gibt es noch Leukozyten-spezifische Integrine, die neben ECM-Proteinen wie FN auch an Immunoglobulin-Zelladhäsionsmoleküle (Ig-CAMs) binden können (Hynes, 2002). Allerdings ist diese Einteilung nur eine grobe Orientierung. Tatsächlich kann beispielsweise ein Kollagenrezeptor wie  $\alpha 2 \beta 1$  auch an Laminin und Thrombospondin binden (Humphries et al., 2006). Diese Redundanz von mehreren Integrinen, die den gleichen Ligand binden können und von Integrinen, die mehrere Liganden binden können, macht das Studium Integrin-spezifischer Effekte schwierig. Nichtsdestotrotz haben Integrin-Knockout Mäuse spezifische Defekte (Hynes, 1996). Dies zeigt, dass es trotz aller Redundanz auch Integrin-spezifische Effekte gibt, die durch andere Ligand-Integrin-Kombinationen nicht kompensiert werden können.

Viele der Prozesse, an denen Integrine beteiligt sind, wie Migration oder Blutgerinnung erfordern eine genaue Kontrolle der Bindung zwischen Integrinen und dem Ligand. Wie sich gezeigt hat, liegen Integrine in verschiedenen Konformationen vor, die sich in der Affinität für den jeweiligen Ligand stark unterscheiden. Der Wechsel zwischen diesen Zuständen beinhaltet ausgedehnte allosterische Konformationsänderungen (Wehrle-Haller, 2012b). Dem klassischen Modell zufolge, kann dies durch intra- oder extrazelluläre Signale ausgelöst werden und wird entsprechend Inside-out-, bzw. Outside-in-Aktivierung genannt (siehe Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Integrine, Ligandenspezifität und Aktivierung.** Integrine und ihre Liganden (links) ist der Arbeit von Hynes entnommen und modifiziert (Hynes, 2002). Es zeigt die 24 Integrinkombinationen in Säugetieren. Evolutionäre Verwandtschaft ist durch Farbkodierung der  $\alpha$ -Untereinheiten gezeigt und gibt weitestgehend den bevorzugten Ligand des jeweiligen Integrins an. Viele Integrine haben eine begrenzte Expression (z.B.  $\beta 2$  und  $\beta 7$ : Leukozyten-spezifisch,  $\alpha 11b$ : Thrombozyten-spezifisch). Hochgestellte Sterne geben Untereinheiten an, deren zytoplasmatischer C-terminus durch alternatives Splicing variiert. **Integrin – Aktivierung** (rechts) zeigt das klassische Modell von Outside-In- und Inside-Out-Aktivierung (Shattil et al., 2010). In der Mitte ist ein schematisches, inaktives Integrin gezeigt (*bent conformation*). Durch extrazelluläre Liganden (Outside-In-Aktivierung, Pfeil nach links) kann das Integrin in die aktive, Liganden-gebundene Konformation übergehen (*extended, open conformation*). Eine andere Möglichkeit ist die Aktivierung durch intrazelluläre Adaptoren (Inside-Out-Aktivierung, Pfeil nach rechts). Deren Bindung führt ebenfalls zur aktiven Konformation, die im Folgenden zur Ligandenbindung führt.

Während bei letzterem die Bindung des Liganden zur Trennung der Transmembrandomänen der Integrin-Untereinheiten und damit auch der zytoplasmatischen C-termini führt, wird beim Inside-out-Signaling das Integrin durch einen Adaptor in eine Konformation gebracht, die eine höhere Affinität für den Liganden aufweist (Shattil et al., 2010). Im Weiteren führen aber beide Wege zum gleichen Ergebnis: einem Liganden-gebundenen Integrin, das durch gebundene zytoplasmatische Adapter in einem aktiven Zustand ist. Ein einzelnes, aktives Integrin ist aber nicht ausreichend, um eine Zell-Matrix-Adhäsion (CMA) zu etablieren. Dafür ist eine Agglomeration mehrerer aktiver Integrine, das sogenannte Integrin-Clustering, notwendig. Im Vergleich zur Affinitätsregulation, ist über Clustering aber weniger bekannt. Es zeigte sich ein wichtiger Einfluss der Membrenumgebung (Saltel et al., 2009) und der Glykokalyx (Paszek et al., 2009; Paszek et al., 2014). Experimente mit Antikörpern mit 10 Bindungsstellen für Integrine (dekavalenter IgM Antikörper) haben eine 60-fache Verstärkung der Integrinbindung im Vergleich zu einem Antikörper mit nur einer Bindungsstelle (monovalentes Fab Fragment des IgM Antikörpers) gezeigt (Abrams et al., 1994). Diese überproportionale Aktivierung zeigt, dass Integrin-Clustering mehr ist als eine lineare Vervielfachung des Signals durch Vervielfachung des Signalgebers. Welche Faktoren aber entscheiden, dass es zu Clustering kommt, wieso Clustering notwendig ist, um CMAs zu etablieren, und was einen solchen überproportionalen Anstieg des zellulären Signalings auslöst, ist bisher experimentell nicht ausreichend untersucht. Ein großes Problem ist dabei die schwierige methodische Zugänglichkeit dieser frühen Cluster, da mikroskopisch beispielsweise sehr hohe räumliche und zeitliche Auflösung notwendig sind, um sie zu untersuchen (Choi et al., 2008). In jedem Fall sind aber zytoplasmatische Adapter und ihre Interaktion miteinander und mit Integrinen entscheidend für die Wandlung einzelner Integrine zu Integrin-Clustern und anschließend zu reifen CMAs (Bachir et al., 2014; Choi et al., 2008; Saltel et al., 2009).

Die wichtigsten Integrine für die Adhäsion an FN sind  $\alpha\beta3$ -Integrin und  $\alpha5\beta1$ -Integrin. Der Effekt einer FN-Knockout-Maus kann nur durch eine Doppelknockout-Maus für  $\alpha5$ -Integrin und  $\alphaV$ -Integrin imitiert werden. Keine der jeweiligen Einzelknockouts kann die Effekte des FN-Knockouts imitieren und kein Knockout eines anderen FN-bindenden Integrins hat einen vergleichbaren Effekt (Yang et al., 1999). Ein weiterer wichtiger Ligand von  $\alpha\beta3$ -Integrin ist VN. Die VN-Knockout-Maus im Gegensatz zeigt aber milde Defekte und ist sowohl lebensfähig, als auch fertil (Zheng et al., 1995). Dies zeigt zum einen, dass  $\alpha5\beta1$ -Integrin nicht der alleinige FN-Rezeptor ist, und zum anderen, dass die Interaktion von  $\alphaV$ -Integrinen mit FN von wichtiger physiologischer Bedeutung ist. Die Frage, ob die Bindung dieser Rezeptoren an FN vollkommen redundant ist, oder im Gegensatz zu spezifischen Effekten führt, hat großes Interesse angeregt und zu zahlreichen Publikationen auf diesem Gebiet geführt. Tabelle 1.1 listet eine Auswahl von Publikationen auf. Der Fokus liegt dabei auf intrazellulären Effekten, die spezifisch durch eines der beiden Integrine verursacht werden und die in vergleichenden Untersuchungen der beiden Integrine entdeckt wurden. Wie sich zeigt, gibt es wichtige Unterschiede im Bezug auf Signaling durch die Tyrosinkinase c-Src und durch unterschiedliche Aktivierung von Rho-GTPasen (Huvneers and Danen, 2009; Morgan et al., 2009). Weitere wichtige Unterschiede betreffen die Struktur des Aktin-Zytoskeletts und die unterschiedliche Interaktion mit Adaptern (Legate and Fassler, 2009; Zaidel-Bar, 2013). Wie solche Unterschiede vermittelt werden, ist aber in vielen Fällen noch unklar.

**Tab. 1.1: Publikationen über Unterschiede im Signaling von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin.**

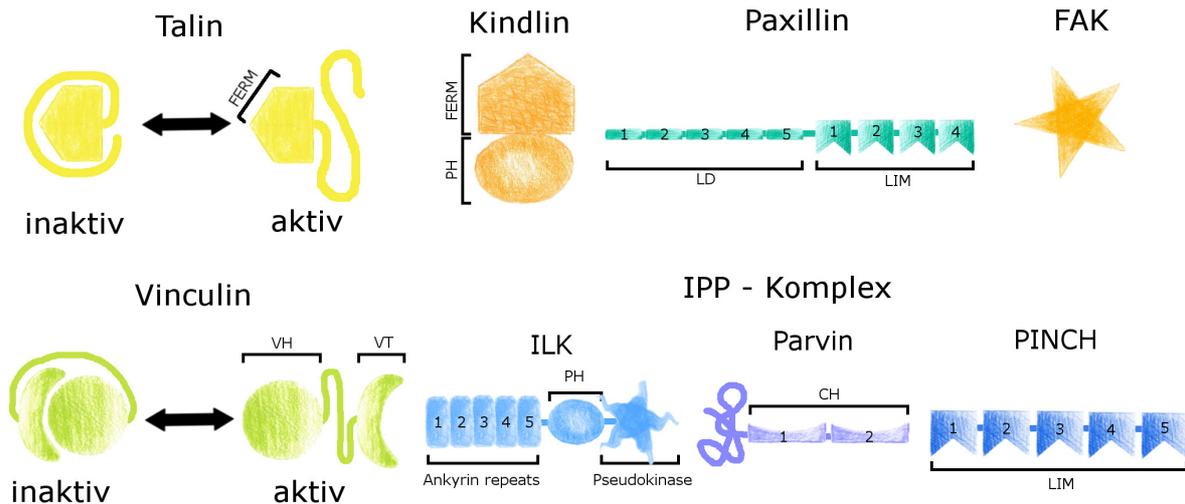
Publikation	Unterschied zwischen $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin und $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin
Blystone et al., 1995	$\alpha$ V $\beta$ 3 kann $\alpha$ 5 $\beta$ 1-vermittelte Phagozytose inhibieren
Chang et al., 1997	der cytoplasmatische Integrin-Inhibitor ICAP bindet nur an $\beta$ 1
Simon et al., 1997	$\alpha$ 5 $\beta$ 1 ist ausreichend für Adhäsion auf FN, $\alpha$ V $\beta$ 3 wird benötigt für gerichtete Migration
Blystone et al., 1999	$\alpha$ V $\beta$ 3 inhibiert <i>Calmodulin dependent Kinase II</i> (CamKII) und darüber $\alpha$ 5 $\beta$ 1 vermittelte Migration
Cukierman et al., 2001	CMAs in einer fibrillären 3D-Matrix enthalten kein $\beta$ 3-Integrin
Danen et al., 2002	$\alpha$ 5 $\beta$ 1 führt zu stärkerer RhoA Aktivität als $\alpha$ V $\beta$ 3; dafür entscheidend ist die extrazelluläre Domäne von $\beta$ 1
Arias-Salgado et al., 2003	Tyrosinkinase c-Src bindet bevorzugt an den C-terminus von $\beta$ 3 im Vergleich zu dem von $\beta$ 1
Beauvais et al., 2004	Syndecan 1 unterstützt die $\alpha$ V $\beta$ 3-Aktivierung, aber nicht die von $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin
Danen et al., 2005	$\alpha$ V $\beta$ 3 fördert persistente, $\alpha$ 5 $\beta$ 1 ungerichtete Migration; $\alpha$ 5 $\beta$ 1 inaktiviert Cofilin und verursacht mehr Aktin-Stressfasern
White et al., 2007	$\alpha$ V $\beta$ 3-Recycling führt über Rab4-Vesikel zu persistenter Migration und inhibiert gleichzeitig $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Recycling aus Rab11-Vesikeln
Bouaouina et al., 2008	$\beta$ 3 wird durch Talin <i>head</i> Domänen stärker aktiviert als $\beta$ 1 und benötigt weniger Domänen
Huveneers et al., 2008	$\alpha$ 5 $\beta$ 1 bindet im Gegensatz zu $\alpha$ V $\beta$ 3 lösliches FN und führt dadurch zu RhoA-vermittelter Kontraktilität
Kinsey et al., 2008	FN-Fibrillogenese und Fibrillin-Mikrofibrillen erfordern $\alpha$ 5 $\beta$ 1 und können nicht durch $\alpha$ V $\beta$ 3 kompensiert werden
Roca-Cusachs et al., 2009	$\alpha$ 5 $\beta$ 1 vermittelt stabile Adhäsionen, $\alpha$ V $\beta$ 3 ermöglicht durch schwächere Adhäsionen Mechanotransduktion
Rossier et al., 2012	$\beta$ 3 ist in CMAs im Vergleich zu $\beta$ 1 angereichert; $\beta$ 3 ist in CMAs stationärer
Roca-Cusachs et al., 2013	Talin und $\alpha$ -actinin konkurrieren um die Bindung an $\beta$ 3, aber kooperieren für $\beta$ 1
Schiller et al., 2013	$\beta$ 3 führt zu kraftsensitiveren CMAs und bildet dicke Aktinfasern, aber $\beta$ 1 vermittelt Kontraktilität

## 1.4 Zell-Matrix-Adhäsionen

Der Aufbau von CMAs ist sehr komplex. Über 150 verschiedene Proteine können am Aufbau beteiligt sein (Schiller et al., 2013) und miteinander 690 verschiedene Interaktionen eingehen (Zaidel-Bar et al., 2007a). Die Gesamtheit dieser Moleküle wird auch Adhäsom genannt. Die ungeheure Komplexität macht ein Verständnis von CMAs schwierig. Dass diese große Zahl an Proteinen und Wechselwirkungen nötig ist, kann wie oben beschrieben an der fehlenden enzymatischen Aktivität von Integrinen liegen. Dies macht für eine erfolgreiche Signaltransduktion eine Assoziation mit anderen Proteinen nötig. Die Komplexität reflektiert aber auch die Vielzahl an zellulären Prozessen, an denen Integrin-vermittelte CMAs beteiligt sind. Diese bringen viele transiente Interaktionen mit sich, und sind damit ebenfalls eine Erklärung für die Vielzahl an beteiligten Proteinen. Außerdem unterliegen CMAs einem Reifungsprozess, der ebenfalls eine Änderung der molekularen Zusammensetzung mit sich bringt (Gardel et al., 2010). Dabei werden vier Stadien unterschieden: *nascent adhesions* → *focal complexes* → *focal adhesions* → *fibrillar adhesions*. Allerdings unterliegen sämtliche Stadien auch einer hohen Turnoverrate, so dass beispielsweise viele *nascent adhesions* aufgelöst werden und nur wenige zu *focal complexes* maturieren.

Mittels iPALM, einer auch in axialer Richtung hochauflösenden PALM-Variante (siehe Kap. 1.7), haben Kanchanawong und Kollegen eine axiale Strukturierung oder Schichtung von CMAs gezeigt (Kanchanawong et al., 2010). Die einzelnen Schichten wurden durch die bevorzugte Lokalisierung wichtiger CMA-Proteine in distinkten Ebenen erstellt. Anhand bekannter Funktionen der entsprechenden Proteine wurden eine Integrin-Signaling-Schicht (Integrin, Talin, Paxillin, FAK), eine Krafttransduktionsschicht (Talin, Vinculin), und eine Aktinregulationsschicht (VASP, Zyxin,  $\alpha$ -actinin, Aktin) postuliert. Damit wurde erstmals direkt gezeigt, dass CMAs keine wahllose, chaotische Anordnung von Proteinen sind, sondern wohlgeordnete Strukturen. Es zeigte sich auch ansatzweise, dass nur ein geringer Umfang der biochemisch möglichen Interaktionen überhaupt umgesetzt wird. Da in dieser Studie aber nur die Lokalisation der Proteine und der jeweiligen Schicht untersucht wurde, ist noch nicht geklärt, welche funktionelle Bedeutung eine solche Schichtung hat. Auf alle Fälle ist diese Studie ein erster Schritt zu einem Verständnis von CMAs als Einheit wohlgeordneter Substrukturen.

In dieser Arbeit wurde die Rekrutierung einiger wichtiger Proteine für einen erfolgreichen Aufbau von CMAs näher untersucht. Diese sollen im Folgenden näher vorgestellt werden. Ihr jeweiliger schematischer Aufbau wird in Abbildung 1.3 gezeigt und in dieser Art im Rest dieser Arbeit genutzt.



**Abb. 1.3: schematischer Aufbau wichtiger Zell-Matrix-Adhäsionsproteine.** Gezeigt ist der jeweilige schematische Aufbau der in Kapitel 1.4 genauer vorgestellten Zell-Matrix-Adhäsionsproteine (CMA-Proteine). Wichtige Proteindomänen sind mit schwarzen Klammern an den jeweiligen Proteinen beschriftet. Gleiche Domänen in unterschiedlichen Proteinen werden in gleicher Form, aber unterschiedlicher Farbe dargestellt. Sich wiederholende Domänen sind durchnummeriert (N-terminal beginnend). Für eine genauere Übersicht über Domänen wird auf Übersichtsartikel (Schiller and Fässler, 2013), bzw. die im Text genannten Artikel verwiesen. **Talin** kommt in einer aktiven und inaktiven Konformation vor. In der aktiven Konformation wird die FERM Domäne im *Talin Head* Bereich durch den flexiblen, C-terminalen Schwanz freigegeben. **Kindlin** weist eine zu Talin ähnliche FERM-Domäne auf, in die aber zusätzlich eine PH-Domäne eingesetzt ist. **Paxillin** besteht N-terminal aus 5 LD-Domänen, mit zahlreichen Phosphorylierungsstellen und Bindungsstellen für andere Proteine (Vinculin: LD 2, FAK: LD 2 und 4). C-terminal folgen 4 LIM-Domänen, die für die CMA-Lokalisierung entscheidend sind. **FAK** besteht aus einer FERM-Domäne, einer Kinase und einer *Focal Adhesion Targeting* Domäne. FAK ist vereinfacht dargestellt. **Vinculin** kommt wie Talin in einer aktiven und inaktiven Form vor. In der aktiven Konformation bindet *Vinculin head* (VH) unter anderem an Talin und *Vinculin tail* (VT) unter anderem an Aktin. Der **IPP-Komplex** besteht aus den drei folgenden Proteinen. **ILK** besteht N-terminal aus fünf *Ankyrin Repeats*, einer PH-Domäne und einer Pseudokinase. Diese hat keine enzymatische Funktion mehr, sondern bindet **Parvin**. Parvin besteht aus einem N-terminalen flexiblen Linker und zwei CH-Domänen, die Interaktion mit Aktin vermitteln. **PINCH** besteht aus fünf LIM-Domänen und bindet an die Ankyrin Repeats von ILK.

## Talin

Talin ist ein großes zytoplasmatisches Protein mit einem Gewicht von 270 kDa. Der N-terminalen Kopfdomäne folgt C-terminal ein langer, flexibler Schwanz. Zytoplasmatisch liegt Talin in einer inhibierten Konformation vor, die bei Rekrutierung an die Zellmembran aufgehoben wird (Saltel et al., 2009). Die Kopfdomäne beinhaltet eine sogenannte FERM-Domäne, wie sie beispielsweise auch in Kindlin, FAK und Myosin-X vorkommt. Diese Domäne vermittelt insbesondere die Interaktion mit der Plasmamembran und mit dem zytoplasmatischen C-terminus von  $\beta$ -Integrinen (Calderwood et al., 2002; Frame et al., 2010). Im Fall von Talin ermöglicht die gleiche Domäne auch die Bindung an weitere Moleküle wie Layilin (Wegener et al., 2008) oder Phosphatidylinositol-Phosphatkinase Typ 1 $\gamma$  (PIP1 $\gamma$ ) (Barsukov et al., 2003), die an der Rekrutierung von Talin in die Zellperipherie und anschließend an dessen Aktivierung beteiligt sein können. Durch die Produktion des Talin-Bindungspartners Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) ist PIP1 $\gamma$  in besonderem Maß an der

Rekrutierung von Talin beteiligt (Schlaepfer and Mitra, 2004). Die folgende Bindung an das Membran-proximale und an das erste NPxY Motiv von  $\beta$ -Integrin führt zu dessen Aktivierung, indem Talin die Interaktion der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrin-Untereinheit unterbindet (Wehrle-Haller, 2012b). Der flexible Schwanz dagegen enthält Bindungsstellen für RIAM und Vinculin (Calderwood et al., 2013) und stellt die erste Verbindung von Integrinen zu Aktin her (Gingras et al., 2008). Wenn Talin unter mechanischer Spannung steht werden Vinculin-Bindungsstellen freigelegt (del Rio et al., 2009) und gleichzeitig die zuvor mögliche Bindung von RIAM unterbunden (Goult et al., 2013). Es wurde daher ein Modell aufgestellt, nach dem dieser Mechanismus einen molekularen Schalter der CMA-Maturierung darstellt (Lee et al., 2013).

### **Kindlin**

Kindlin wurde der Cousin von Talin genannt (Wehrle-Haller, 2012a). Beide beinhalten eine FERM-Domäne, in die bei Kindlin zusätzlich eine PH-Domäne eingearbeitet ist, die die Interaktion mit dem Membranlipid Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphate (PIP3) vermittelt (Liu et al., 2011). Der rostro-caudale Gradient von PIP3 in Zellen könnte dadurch eine Rolle spielen bei der Rekrutierung von Kindlin an die Zellfront (Wehrle-Haller, 2012a). Während Talin an das erste NPxY-Motiv der  $\beta$ -Integrin-Untereinheit bindet, interagiert Kindlin mit dem zweiten, distalen NxxY-Motiv (Wehrle-Haller, 2012a). Für das Integrin  $\alpha5\beta1$  wurde gezeigt, dass die Rekrutierung sequenziell erfolgt: Kindlin bindet vor Talin, obwohl beide gleichzeitig in *nascent adhesions* (NAs) vorliegen (Bachir et al., 2014). Kindlin wird dabei aber eher als Modulator der Integrin-Aktivierung durch Talin angesehen (Calderwood et al., 2013), da es im Gegensatz zu Talin nicht in der Lage ist, die inhibitorische Interaktion zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Integrin-Untereinheiten zu lösen (Bledzka et al., 2012). Zur Rolle als Modulator passend scheint Kindlin evolutionär nach Talin und Integrinen entstanden zu sein (Meller et al., 2014). In die gleiche Richtung geht eine Studie, die zeigte, dass Kindlin nicht die Affinität von Integrinen, aber ihr Clustering beeinflusst (Ye et al., 2013). Es ist jedoch unklar, wie dieses Ergebnis zur oben ausgeführten zeitlichen Rekrutierung von Kindlin vor Talin passt. In jedem Fall benötigen aber Integrine für eine vollständige Aktivierung sowohl die Anwesenheit von Talin, als auch von Kindlin (Moser et al., 2008; Pinon et al., 2014). Im Vergleich zu Talin ist aber über die genauen Mechanismen und Auswirkungen der Kindlin-Integrin-Interaktion, und auch der Talin-Kindlin-Interaktion, weniger bekannt. Es gibt derzeit Hinweise für differenzielle Effekte der drei Kindlin-Isoformen sowohl in Zell-, als auch in Integrin-abhängiger Weise, ohne dass die Grundlage für diese Effekte bisher verstanden ist (Ye et al., 2014).

### **Paxillin**

Paxillin ist eines der wichtigsten Gerüstproteine in CMAs mit einer Vielzahl von Interaktionspartnern. Paxillin weist viele Phosphorylierungsstellen auf, die sowohl bei der ECM-Adhäsion von Zellen, als auch im entwickelnden Embryo durch die Rekrutierung weiterer Adapterproteine von Bedeutung sind (Deakin and Turner, 2008). Einerseits ist Paxillin eines der ersten Proteine, die in CMAs rekrutiert

werden, andererseits sind CMAs in Paxillin reduzierten Zellen stabiler (Webb et al., 2004). Dies zeigt einen Einfluss von Paxillin, sowohl bei der CMA-Entstehung, als auch beim Abbau. Paxillin besteht C-terminal aus vier LIM-Domänen und ist damit ein Protein der LIM-Familie (Kadmas and Beckerle, 2004). Eine LIM-Domäne besteht aus einer Tandem-Zinkfinger-Struktur und vermittelt die Interaktion mit anderen Proteinen. Eine generelle Eigenschaft von LIM-Proteinen scheint die Möglichkeit zu sein, zwischen Zytoplasma und Nukleus zu wechseln. Im Zytoplasma sind LIM-Proteine häufig mit CMAs oder Aktin assoziiert (Kadmas and Beckerle, 2004). Insbesondere sind LIM-Domänen bei mehreren Proteinen, darunter auch Paxillin, dafür verantwortlich, dass diese an Aktinfasern unter Spannung binden (Smith et al., 2013). Darauf aufbauend wurde ein Modell vorgeschlagen, nach dem die Tandem-Zinkfinger-Struktur von LIM-Domänen als molekulares „Lineal“ periodische Oberflächenstrukturen erkennt (Schiller and Fässler, 2013). Für Paxillin ist gezeigt, dass die LIM-Domänen zwei und drei für die Lokalisierung in CMAs entscheidend sind (Brown et al., 1996). Bisher war das Paxillin-rekrutierende Protein in CMAs aber noch nicht bekannt (Deakin and Turner, 2008; Pinon et al., 2014; Wehrle-Haller and Bastmeyer, 2014). Abgesehen von der Bindung von Tubulin und der Tyrosin-Phosphatase PTP-PEST ist sonst wenig über die weitere Bedeutung der LIM-Domänen in Paxillin bekannt. Die Interaktion mit Mikrotubuli kann aber der Schlüssel für den Einfluss von Paxillin auf den Abbau von CMAs sein (Stehbens and Wittmann, 2012). N-terminal folgen den LIM-Domänen fünf Lysin- und Asparaginsäure-reiche LD Motive. Diese beinhalten zahlreiche Bindestellen für andere CMA-Proteine. Über die Rekrutierung von Rho-GTPasen inhibierenden und aktivierenden Proteine (GAPs, bzw. GEFs, siehe Kap. 1.5) sind die LD-Motive der Grund, dass Paxillin an vielen Signalkaskaden beteiligt ist. Die Regulation dieser Rekrutierung und des Signaling erfolgt durch die Phosphorylierung der entsprechenden Bindungsstellen. So kann an die phosphorylierten Tyrosine 31 und 118 jeweils ein DOCK-ELMO-CrkII-Komplex binden, der als GEF für die Rho-GTPase Rac1 wirkt. Genauso kann aber auch indirekt ein RhoA-GAP rekrutiert werden und diese Rho-GTPase inaktivieren (Deakin and Turner, 2008). An das phosphorylierte Serin 273 dagegen bindet ein PAK-PIX-GIT-Komplex, der als GEF für Cdc42 und Rac1 wirkt (Kutys and Yamada, 2014). Über diese Signalkaskaden ist Paxillin entscheidend an Spreading (ausbreiten und abflachen einer Zelle bei Kontakt mit einer adhäsiven Oberfläche) und Bildung von Lamellipodien beteiligt (Deakin and Turner, 2008; Sero et al., 2011).

## **FAK**

*Focal Adhesion Kinase* (FAK) ist als Tyrosinkinase an der Phosphorylierung von Paxillin und damit dem Paxillin-vermittelten Signaling direkt beteiligt (siehe oben, Paxillin). FAK besteht aus einer N-terminalen FERM-Domäne (siehe oben, Talin), gefolgt von der Kinase-Domäne und der C-terminalen *Focal Adhesion Targeting* (FAT) Domäne. Obwohl FAK eine funktionelle Kinase ist, kann sie ebenso als Gerüstprotein angesehen werden (Arold, 2011). Die Aktivierung von FAK erfolgt durch eine trans-Phosphorylierung in einem FAK-Homodimer am Tyrosin 397 (Y397). Damit die Bildung des Homodimers möglich ist, muss FAK lokal in ausreichend hoher Konzentration vorliegen. Dies ist durch die FERM-Domänen-vermittelte Rekrutierung an die Zellmembran möglich. Im nächsten Schritt wird die Tyrosinkinase Src an FAK rekrutiert, die für die meisten FAK-vermittelten Phosphorylierungen

verantwortlich ist. Unter anderem phosphoryliert Src auch FAK an zusätzlichen Tyrosinen und stabilisiert so die aktive Konformation (Arold, 2011). FAK wird früh in entstehende CMAs rekrutiert. Seine genaue Rolle dabei ist aber nicht restlos geklärt. Durch die Bindung der FAT-Domäne von FAK an die LD-Domänen von Paxillin könnte FAK durch Paxillin in CMAs rekrutiert werden (Mitra et al., 2005). Durch Phosphorylierung von Paxillin und dem daraus folgenden Einfluss auf Rho-GTPasen hätte FAK die Aufgabe bereits entstandene CMAs zu stabilisieren und ihre Reifung zu ermöglichen. Allerdings gibt es auch Berichte, dass FAK entscheidend für Talin Rekrutierung und Aktivierung ist und damit bereits Einfluss auf die Integrin-Aktivierung, und damit auf die ersten Schritte der CMA-Entstehung, ausübt. Dies kann indirekt durch die Aktivierung der PI3K geschehen (Ling et al., 2002), die durch PIP2 -Produktion wiederum zur Rekrutierung und Aktivierung von Talin beiträgt (siehe oben, Talin). Anderen Berichten zufolge rekrutiert FAK Talin durch direkte Bindung in entstehende CMAs (Lawson et al., 2012). Allerdings schließen sich beide Modelle, einerseits FAK als Rekrutierer von Talin und andererseits als Paxillin-Bindungspartner, nicht aus. FAK könnte nach der initialen Rekrutierung von Talin durch Bindung an Paxillin in CMAs stabilisiert werden und die Reifung von CMAs unterstützen.

FAK hat aber nicht nur in der Zelladhäsion Aufgaben, sondern hat auch Bindungspartner im Nukleus. Dort bindet es an den Tumorsuppressor p53, der als Transkriptionsfaktor Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose nimmt. FAK führt dabei zur Degradation von p53 und somit zur Zellproliferation (Sulzmaier et al., 2014). Diese Funktion von FAK ist unabhängig von der Phosphorylierung von FAK und unterstreicht damit die Rolle von FAK als Gerüstprotein, das durch (Auto-)Phosphorylierung zwischen verschiedenen Sets an Bindungspartnern und damit Funktionen wechseln kann.

## **Vinculin**

Vinculin ist ein klassischer Marker für CMAs. Im Vergleich zu den oben genannten Proteinen, die ebenfalls als Marker dienen, ist Vinculin jedoch einzigartig, da es auch als Marker für Zell-Zell-Adhäsionen dienen kann. In beiden Fällen scheint es der Wahrnehmung von Kräften und der folgenden Stabilisierung von Adhäsion zu dienen. Phosphorylierung entscheidet, ob Vinculin in Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Adhäsionen zu finden ist (Bays et al., 2014). Die überwiegende Zahl von Vinculin-Interaktionspartnern sind aber CMA-Proteine, darunter Talin,  $\alpha$ -actinin, VASP und Paxillin (Carisey and Ballestrem, 2011). Wie Talin kommt Vinculin in einer aktiven und einer inaktiven Konformation vor, deren Übergang durch die Auflösung der Autoinhibierung zwischen Kopf- und Schwanzdomäne (*Vinculin Head* (VH) und *Vinculin Tail* (VT)) gekennzeichnet ist. Bindungsstellen für andere Moleküle liegen in den beiden Domänen, aber auch im verbindenden Linker (Vincexin, Ponsin, Arp2/3). Die Aktivierung von Vinculin scheint, aufgrund der Stabilität der inhibierten Konformation, die Bindung mehrere Interaktionspartner zu benötigen (Ziegler et al., 2006). Dies würde die Aktivierung von Vinculin in CMAs wahrscheinlicher und im Zytoplasma unwahrscheinlicher machen. Tatsächlich liegt Vinculin in CMAs in der aktiven Konformation vor (Chen et al., 2005). In der aktiven Konformation bindet die Kopfdomäne VH an Talin, während die Schwanzdomäne VT an Aktin bindet. Damit bietet Vinculin eine zusätzliche CMA-Aktin-Verknüpfung neben Talin (Ziegler et al., 2006).

Diese Verbindung ist möglicherweise der entscheidende Grund, dass Vinculin im Vergleich zu anderen Proteinen sehr stabil in CMAs gebunden ist (Pasapera et al., 2010), und dass Vinculin CMAs stabilisiert (Humphries et al., 2007). Versuche mit intrazellulären Kraftsensoren zeigten, dass Aktomyosin-Kräfte über Vinculin übertragen werden (Grashoff et al., 2010). Umgekehrt wird Vinculin in der aktiven Konformation durch Aktomyosin-Kräfte (siehe Kap. 1.5) stabilisiert (Carisey et al., 2013). Damit ist Vinculin ein entscheidendes Protein für die Ausübung und Übertragung von Kräften zwischen ECM und der Zelle. Daher wird Vinculin als wichtiges Protein der Krafttransduktionsschicht in CMAs angesehen (Kanchanawong et al., 2010).

## ILK

*Integrin Linked Kinase* (ILK) bildet zusammen mit dem LIM-Protein PINCH (bestehend aus fünf LIM-Domänen) und Parvin (variabler N-Terminus, gefolgt von zwei *Calponin Homology* (CH) Domänen) den ILK-PINCH-Parvin-Komplex (IPP-Komplex). ILK selbst besteht aus *Ankyrin Repeat* Domänen, einer PH-Domäne und einer Pseudokinase (Wickström et al., 2010b). Der IPP-Komplex bildet sich bereits im Zytoplasma, noch bevor die Einzelkomponenten in CMAs rekrutiert werden (Zhang et al., 2002). Es scheint, dass nahezu alle Funktionen der IPP-Proteine nur möglich sind, wenn sie als Komplex vorliegen (Rooney and Streuli, 2011). Die Reduzierung des Proteinlevels von einem Protein des Komplexes hat die Reduzierung der anderen beiden Proteine zur Folge (Fukuda et al., 2003). Besondere Aufmerksamkeit erfährt vor allem ILK, da es eines der wenigen CMA-Proteine ist, die direkt an Integrine binden können, auch wenn die physiologische Bedeutung dieser Interaktion nicht geklärt ist (Hannigan et al., 1996); in *Drosophila melanogaster* ist neben Integrin auch Talin notwendig um ILK, beziehungsweise den IPP-Komplex zu rekrutieren (Zervas et al., 2011). In jedem Fall übt der IPP-Komplex einen großen Einfluss auf viele verschiedenen Signalkaskaden aus, insbesondere auf Proteinkinase B (Akt) und die Rho-GTPase Rac (Wehrle-Haller, 2012a). Darüber hinaus zeigen ILK Knockout-Zellen ein deutlich verändertes Aktin-Zytoskelett im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Aktin-Stressfasern sind weniger gebündelt und Zellen weniger polarisiert. Kryo-Elektronentomographie zeigt einen deutlich ungeordneteren Aufbau einzelner Aktinfasern in Abwesenheit von ILK (Elad et al., 2013). Der IPP-Komplex ist auch entscheidend an der Fibrillogenese, unter anderem durch Rekrutierung von Tensin, beteiligt (Stanchi et al., 2009). Zellen ohne ILK sind nicht in der Lage FN in Fibrillen umzubauen (Elad et al., 2013). Sowohl ILK, als auch Parvin haben Paxillin-Bindungsstellen und können damit auch über Paxillin Einfluss auf die Rho-GTPasen Rac und Cdc42 nehmen (Rooney and Streuli, 2011). Und schließlich interagiert ILK mit dem Mikrotubuli-Zytoskelett und beeinflusst darüber Caveolae (Einbuchtungen der Zellmembran) und deren Endozytose (Wickström et al., 2010a), genauso wie Zellpolarität und die Orientierung des Golgi-Netzwerkes (Akhtar and Streuli, 2013).

## 1.5 Aktin

Das Zytoskelett von Zellen hat drei Bestandteile: Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Alle drei sind aus Monomeren zusammengesetzt und weisen eine hohe Dynamik von Auf- und Abbau auf. Für Zellmigration und –adhäsion ist aber Aktin am wichtigsten. Wie oben bei Talin, Vinculin und ILK (bzw. Parvin) bereits angesprochen (Kap. 1.4), bilden wichtige CMA-Proteine eine direkte Verbindung zum Aktin-Zytoskelett. Darüber hinaus sind weitere Aktin bindende und regulierende Proteine wie Arp2/3, VASP, Zyxin oder Filamin wichtige Bestandteile von CMAs. Umgekehrt sind viele CMA-Proteine wie Talin und Vinculin mechanosensitiv und verändern ihre Konformation durch den Einfluss von Kräften, die durch Aktin und das Motorprotein Myosin (als Aktomyosin-Kräfte zusammengefasst) auf CMAs ausgeübt werden. Unter anderem aus diesem Grund ist ein CMA als gesamtes mechanosensitiv, so dass die CMA-Größe teilweise gut mit der auf das Substrat ausgeübten Kraft korreliert (Balaban et al., 2001; Oakes et al., 2014; Stricker et al., 2011). Insofern sind CMAs und das Aktin-Zytoskelett direkt miteinander verknüpft. Dies zeigt sich schon bei der Entstehung von CMAs. Neue CMAs entstehen typischerweise in der Peripherie von Zellen in neu gebildeten Ausläufern. Diese entstehen durch Aktin-Polymerisation und werden je nach Gestalt als Lamellipodium (flach und fächerförmig; verzweigtes Aktinnetzwerk; wenige  $\mu\text{m}$  aus der Zelle ragend) oder Filopodium (runde, lange „Finger“; parallele Aktinfasern; dünner als  $1 \mu\text{m}$ , aber mehrere  $\mu\text{m}$  lang) bezeichnet. In beiden Fällen gibt es einen retrograden Fluss von Aktin, der am Zell-proximalen Ende von Lamellipodien, beziehungsweise Filopodien stoppt (Blanchoin et al., 2014). Sowohl die jeweilige Aktin-Struktur, als auch die Dynamik des retrograden Flusses sind wichtige Faktoren für Bildung und Reifung von CMAs in Zellausläufern. Diese Wechselwirkung zeigt sich an mehreren Beispielen. Arp2/3 bildet Lamellipodien, kann aber auch Vinculin rekrutieren (DeMali et al., 2002). An Stellen von entstehenden CMAs wird der retrograde Aktinfluss beeinflusst (Shemesh et al., 2012). Die Geschwindigkeit des retrograden Aktinflusses korreliert direkt mit dem Wachstum von CMAs (Thievsen et al., 2013). Die Struktur quervernetzter Aktinfasern ist entscheidend zur Reifung von CMAs (Oakes et al., 2012; Stricker et al., 2013). Umgekehrt hat aber auch ein CMA einen deutlichen Einfluss auf das umliegende Aktin-Zytoskelett. Maturierte CMAs werden durch Aktin-Stressfasern verknüpft und unter Zugspannung stehende oder gerissene Aktin-Stressfasern rekrutieren die CMA-Proteine Paxillin und Zyxin (Colombelli et al., 2009; Smith et al., 2013), die auch an der folgenden Reparatur der Aktinfasern beteiligt sind (Smith et al., 2010). Einen weit darüber hinausgehenden Einfluss auf die Organisation des gesamten zellulären Aktin-Zytosketts haben CMAs aber durch die oben bereits angesprochene Beeinflussung des Rho-GTPasen Signalings. Rho-GTPasen sind molekulare Schalter von Signalkaskaden. Je nachdem, ob sie GTP oder GDP gebunden haben, sind sie aktiv, bzw. inaktiv. Der jeweilige Zustand wird zellulär genau kontrolliert durch GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) und GAPs (*GTPase activating proteins*). Hat eine Rho-GTPase ein GTP gebunden, ist es aktiv. Ein GAP sorgt durch Aktivierung der GTPasen-Funktion der Rho-GTPase für eine Umwandlung von GTP in GDP um damit für eine Inaktivierung der Rho-GTPase. Umgekehrt vermittelt ein GEF den Austausch von GDP zu GTP und aktiviert damit Rho-GTPasen. Am besten untersucht sind die Rho-GTPasen Cdc42 (Bildung von Filopodien; Polarisation; an der Zellfront lokalisiert), Rac (Bildung von Lamellipodien; Zellspreeding und -migration; an der Zellfront lokalisiert)

und Rho (Bildung von Stressfasern; Kontraktilität; am Zell-Ende lokalisiert). Die genannten Funktionen sind aber nur die charakteristischsten. Lokal und bei bestimmten zellulären Abläufen kann es zu deutlich abweichenden Funktionen und Lokalisationen der einzelnen Rho-GTPasen kommen (Pertz, 2010). Wie oben bereits beschrieben, rekrutieren CMA-Proteine verschiedene GEFs und GAPs und haben damit einen direkten Einfluss auf die Aktivität der verschiedenen Rho-GTPasen und damit auf das Aktin-Zytoskelett (Kap. 1.4). Diese Rekrutierung erfolgt vor allem durch Phosphorylierung der jeweiligen CMA-Proteine, womit sich eine zusätzliche Regulationsebene bietet. Beispielsweise führt die Phosphorylierung der Tyrosine 31 und 118 von Paxillin zu einer Rekrutierung eines Rac und Cdc42 GEFs oder eines Rho GAPs (Deakin and Turner, 2008). In der Summe wird also lokal die Rho-Aktivität zugunsten der Rac- und Cdc42-Aktivität gesenkt. Bemerkenswerterweise gibt es einen zellulären Gradienten der Paxillin-Y31/118-Phosphorylierung. Frühe CMAs in der Zellperipherie sind stark phosphoryliert, was bei zunehmender Reifung und vor allem bei zentralen fibrillären Adhäsionen stark abnimmt (Zaidel-Bar et al., 2007b). Somit unterstützt dieser Phosphorylierungsgradient die hohe Aktivität von Rac und Cdc42 in der Zellperipherie, während im Zellzentrum Rho überwiegt. Auf der Aktinebene wiederum sorgt dies für Filopodien und Lamellipodien in der Peripherie und kontraktile Aktinstressfasern im Zellzentrum.

Zusammengefasst interagiert von allen Zytoskelett-Elementen Aktin am stärksten mit CMAs. Einerseits kommen dabei der Struktur von Aktin und Aktomyosinkräften eine wichtige Bedeutung zu. Andererseits üben CMAs über die Rekrutierung von GEFs und GAPs, und damit durch Regulierung der Rho-GTPasen Aktivität, einen großen Einfluss auf Struktur und Aufbau des Aktin-Zytoskeletts aus. In den letzten Jahren wird deutlich, dass Mikrotubuli und vor allem Mikrotubuli-assoziierte Proteine einen gewissen Einfluss auf die Dynamik von CMAs nehmen (Stehbens and Wittmann, 2012) und umgekehrt CMAs eine rasche Depolymerisierung von Mikrotubuli auslösen können (Efimov et al., 2008). Über die Interaktionen von CMAs und Intermediärfilamenten ist weniger bekannt. Obwohl es zahlreiche Möglichkeiten der Interaktion gibt (das Intermediärfilament Synemin kann unter anderem an Vinculin,  $\alpha$ -actinin und Zyxin binden), ist über deren genauer Ablauf und die *in vivo* Bedeutung wenig bekannt (Leube et al., 2014).

## 1.6 Einsatz mikrostrukturierter Substrate

Mit ECM-Proteinen homogen beschichtete Deckgläser sind aufgrund ihrer Einfachheit nach wie vor der Standard für die Mehrzahl zellbiologischer Studien. Allerdings imitieren sie weder die diskrete Verteilung der ECM *in vivo*, noch erlauben sie viele Aussagen über den Einfluss der ECM und ihrer Verfügbarkeit auf das Verhalten von Zellen. Zudem breiten sich Zellen auf homogenen Substraten uneingeschränkt aus, was ihre Vergleichbarkeit untereinander erschwert. Aus all diesen Gründen haben Möglichkeiten der Substratstrukturierung nach ihrer Etablierung schnell Verbreitung gefunden. Von besonderer Bedeutung war von Anfang an das Gold-Thiol-Chemie-basierte *Microcontact Printing* ( $\mu$ CP). Dabei bilden Alkanthiole durch Bindung der Thiolgruppe an Goldatome eines goldbedampften Deckglases eine durchgehende Schicht (*Self-Assembled Monolayer*, SAM). Das freie Ende des Alkanthiols kann nach Wunsch funktionalisiert sein und abwechselnde Muster von

zelladhäsiven und zellabweisenden Bereichen ermöglichen (siehe Kap. 2.2 und (Mrksich and Whitesides, 1996)). Solche Substrate haben viel zum Verständnis des Einflusses der ECM beigetragen. Es zeigte sich, dass eine limitierte ECM zum Absterben von Zellen, der Apoptose, führt (Chen et al., 1997), die Zell-Polarisierung durch die ECM gesteuert werden kann (Théry et al., 2006b), und dass die verfügbare ECM die Differenzierung von Stammzellen beeinflusst (Sun et al., 2012). Strukturierte Substrate wurden aber auch vor allem in den letzten Jahren eingesetzt, um Zellen eine definierte ECM vorzugeben. In diesem Fall sind Zellen gezwungen eine vordefinierte Form, entsprechend der verfügbaren ECM, anzunehmen und werden dadurch selbst standardisiert. Dies ermöglicht die Überlagerung der Bilder mehrerer Zellen und eine statistische Mittelung. Auf so eine Weise konnte eine polarisierte „Modell-Zelle“ gebildet werden, die statistisch zeigt, was die wahrscheinlichste Anordnung von Nukleus, Centrosom und Golgi-Netzwerk entlang der Polarisationsachse ist (Théry et al., 2006b). Ein Bild in der Arbeit von Théry und Kollegen fasste damit die Information von bis zu 95 Einzelbildern zusammen und erreicht damit eine weit höhere Aussagekraft als Bilder einzelner Zellen (Théry et al., 2006b). In gleicher Weise wurden strukturierte Substrate eingesetzt um gemittelte Bilder des Einflusses von verschiedenen Integrinen zu erstellen (Schiller et al., 2013). Weitere Anwendungen zeigten den Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts (Burnette et al., 2014) und entschlüsselten den Einfluss verschiedener Parameter auf die Arbeit, die eine Zelle gegen die ECM ausübt (Oakes et al., 2014). Vor allem in Bezug auf Zellform, -polarität und -differenzierung gibt es noch zahlreiche weitere Arbeiten, die strukturierte Substrate einsetzen (Théry, 2010). Bei all diesen Anwendungen kamen Strukturen von Zellgröße zum Einsatz. Im Vergleich gibt es weit weniger Arbeiten, bei denen Strukturen subzellulärer Größe eingesetzt wurden. Lehnert und Kollegen (Lehnert et al., 2004) zeigten den Einfluss des Abstandes von ECM-Liganden für erfolgreiches Zellspreading und den Einfluss der verfügbaren ECM auf die Zellgröße. Coyer und Kollegen (Coyer et al., 2012) erweiterten dies zu einem dynamischen Modell, unter Berücksichtigung von Parametern wie Integrin-Aktivierung, Aktomyosin-Kräften und Verfügbarkeit von CMA-Proteinen. In einer weiteren Arbeit wurden Gradienten von subzellulären ECM-Punkten genutzt, um haptotaktische Migration, also die Wanderung zur höheren Bedeckung in einem adhäsiven ECM-Proteingradienten, zu untersuchen (Autenrieth, 2012). Die gleichen Substrate wie bei Lehnert und Kollegen wurden genutzt um ein neues biophysikalisches Modell zur Beschreibung von Zellformen aufzustellen (Bischofs et al., 2008). In noch weniger Fällen wurden solche Substrate mit Zeitrafferaufnahmen kombiniert (Xia et al., 2008). Dafür sind in erster Linie technische Schwierigkeiten verantwortlich, da derzeitige Methoden für strukturierte Substrate subzellulärer Größe häufig nicht mit inverser Mikroskopie und Zeitrafferaufnahmen kompatibel sind. Coyer und Kollegen beklagen dies in ihrer Arbeit explizit (Coyer et al., 2012).

Die vergleichsweise geringe Nutzung von strukturierten Substraten subzellulärer Größe lassen noch viele interessante Fragen zur Wechselwirkung zwischen ECM und CMAs offen. So ist beispielsweise eine Standardisierung auf CMA-Ebene, wie sie auf Zell-Ebene erfolgte (Théry et al., 2006b), bisher unterblieben. Die Kombination mit Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen ist dabei von großer Wichtigkeit, um die Entwicklung und Reifung von CMAs vollständig zu erfassen. Die Reduzierung der Komplexität der CMA-Entstehung durch eine definierte Umgebung sollte ebenfalls zu einem besseren Verständnis beitragen.

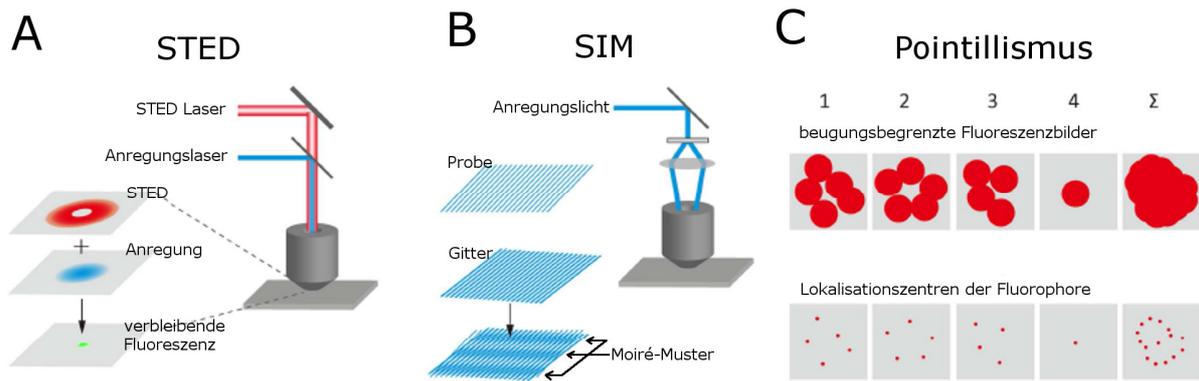
Eine weitere Anwendung von strukturierten Substraten sind sogenannte *binary choice* Substrate. Dabei wird eine Oberfläche mit zwei verschiedenen Proteinen beschichtet, die in getrennten, spezifischen Bereichen vorliegen. Zellen auf solchen Oberflächen können während der Inkubationszeit zwischen diesen Substraten wählen und die Präferenz für verschiedene Oberflächen kann untersucht werden. Solche Substrate wurden bisher vor allem für die Untersuchung der Axonlenkung (Gebhardt et al., 2012; Weschenfelder et al., 2013) und in geringem Umfang für Integrinanalysen (Dao et al., 2012) genutzt. In beiden Fällen handelte es sich aber um Strukturen von Zellgröße. Binary Choice Substrate subzellulärer Größe könnten vor allem für Integrinanalysen interessant sein, da sie nicht der Zelle, sondern einzelnen Integrinen eine Wahl zwischen zwei Liganden ermöglichen.

## 1.7 Nanoskopie

1873 veröffentlichte Ernst Abbe seine Formel, nach der die Auflösung von Mikroskopen ( $d$ ) bei zentraler Beleuchtung von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ( $\lambda$ ) und dem Öffnungswinkel des benutzten Objektivs ( $\alpha$ ) abhängt. Wenn Objektiv und Kondensator gleich sind ergibt sich:

$$d = \frac{\lambda}{2n * \sin(\alpha)}$$

Neben der Produktion von Objektiven mit größerem Öffnungswinkel kann die Auflösung daher durch Licht kürzerer Wellenlänge verbessert werden. Diese Überlegung führte zur Entwicklung des Elektronenmikroskops (EM). Im Vergleich zum Lichtmikroskop bringt das EM aber vor allem bei biologischen Proben einige Nachteile mit sich. Es können nur fixierte Proben betrachtet werden, die Probenpräparation ist sehr aufwendig, und die Markierung und Identifizierung von Strukturen ist schwieriger. Daher haben neue lichtmikroskopische Methoden, die vor allem zu Beginn des neuen Jahrtausends vorgestellt wurden, große Aufmerksamkeit erregt (Betzig et al., 2006; Gustafsson, 2000; Hell and Wichmann, 1994; Rust et al., 2006). Dies führte bereits 2014 zur Vergabe des Nobelpreises in Chemie an William E. Moerner, Eric Betzig und Stefan W. Hell für die Entwicklung dieser Techniken, die auch als Nanoskopie zusammengefasst werden. Sämtliche großen Mikroskopiefirmen haben in der Zwischenzeit jeweils mindestens eine dieser Methoden kommerzialisiert. Allen Methoden ist gemein, dass sie mindestens doppelt so gut auflösen, wie es bei der gegebenen Wellenlänge nach Abbe möglich wäre. Nach der Art, wie dies erreicht wird, können die bedeutendsten Methoden in drei Gruppen eingeteilt werden (siehe Abb. 1.4). Für einen Überblick über genauere Details und weitere, hier nicht genannte Methoden, wird auf Übersichtsartikel verwiesen (Habuchi, 2014; Hedde and Nienhaus, 2010; Huisken and Stainier, 2009; Patterson, 2009; Schermelleh et al., 2010).



**Abb. 1.4: Schema verschiedener nanoskopischer Techniken.** (A) *Stimulated Emission Depletion (STED)* beruht auf einem klassischen konfokalen Laserscanningmikroskop. Zusätzlich gibt es aber einen sogenannten STED Laser mit einem ringförmigen Strahlprofil. Dieses wird dem Anregungslaser überlagert. Nur im STED-freien Bereich, im Zentrum von dessen Ringprofil, kommt es zur Fluoreszenz. In allen anderen Bereichen wird Fluoreszenz durch stimulierte Emission unterdrückt. Da der verbleibende, fluoreszierende Bereich viel kleiner ist, als er es ohne STED-Laser wäre, kommt es zur Auflösungsverbesserung. (B) Bei *Superresolution Structured Illumination Microscopy (SIM)* wird eine Weitfeldbeleuchtung der Probe strukturiert; typischerweise mit einem Gitter. Die Probe kann als zweites Gitter angesehen werden. Ähnliche Ortsfrequenzen der beiden Gitter interferieren zu einem Moiré-Muster mit niedrigerer Frequenz, bzw. größeren Strukturen. Dieses ist daher detektierbar, auch wenn es Informationen der Probe nicht waren. Algorithmen rechnen aus dem Moiré-Muster auf die Hochauflösungsinformationen der Probe zurück. (C) **Pointillismus** beruht auf der sequenziellen Lokalisierung von Fluorophoren anhand des Intensitätsmaximums der jeweiligen Beugungsscheibe. Dafür darf innerhalb eines beugungsbegrenzten Bereiches zur gleichen Zeit nur ein Fluorophor aktiv sein. Um dies zu erreichen werden schaltbare Fluorophore benötigt. Diese werden in bis zu Hundertausenden von Zyklen angeschaltet- lokalisiert-ausgeschaltet. Die Addierung sämtlicher Einzellokalisierungen ergibt schließlich ein hochaufgelöstes Bild. Diese Abbildung ist entnommen aus (Habuchi, 2014) und modifiziert.

### **Stimulated Emission Depletion**

*Stimulated Emission Depletion (STED)* wurde bereits 1994 durch Stefan Hell vorgestellt (Hell and Wichmann, 1994). Diese Methode beruht auf einem konventionellen konfokalen Laserscanningmikroskop (CLSM) mit einer entscheidenden Erweiterung. Farbstoffe, die durch den Anregungslaser im angeregten Zustand sind, werden durch einen Laser mit ringförmigem Profil durch stimulierte Emission in den Grundzustand überführt. Durch die Ringform bleibt dabei im Zentrum ein Bereich unbeleuchtet, in dem es zur Fluoreszenz kommt (siehe Abb. 1.4 A). Fluorophore können entsprechend gewählt werden, so dass Fluoreszenz und stimulierte Emission eine unterschiedliche Wellenlänge haben. Dies ermöglicht im Strahlengang die Trennung der beiden Emissionen, so dass nur Fluoreszenz zum Detektor gelangt. Diese stammt im Vergleich zum CLSM aber aus einem deutlich kleineren Bereich, was schließlich zur Auflösungsverbesserung führt. Die Größe des freien Bereiches im Zentrum des ringförmigen Lasers kann durch dessen Intensität gesteuert werden: Je intensiver, desto kleiner der freie Bereich und desto besser die Auflösung. Prinzipiell ist die Auflösung dadurch unbegrenzt steigerbar. Praktisch wirken die verfügbare Laserleistung und bei biologischen Proben vor allem die Photostabilität der verwendeten Fluorophore jedoch begrenzend. Auflösung von 60 nm und weniger sind jedoch ohne weiteres möglich (Donnert et al., 2006). Mit geeigneten Fluorophoren sind auch Auflösungen im einstelligen Nanometerbereich möglich (Rittweger et al., 2009).

## **Structured Illumination Microscopy**

*Superresolution Structured Illumination Microscopy* (SIM) wurde nahezu zeitgleich durch Mats Gustafsson und Rainer Heintzmann vorgestellt (Gustafsson, 2000; Heintzmann and Cremer, 1999). Bei dieser Methode wird eine strukturierte Beleuchtung erzeugt. Dabei handelt es sich üblicherweise um eine sinusförmige Intensitätsmodulation, die durch ein Gitter im Strahlengang erzeugt wird. Diese Gitterstruktur interferiert mit Strukturen der Probe. Durch einen sogenannten Moiré-Effekt entsteht bei einer solchen Überlagerung zweier sehr ähnlicher Gitter ein neues Muster mit größeren Abmessungen (siehe Abb. 1.4 B). Liegt die Periodizität der Gitterstruktur möglichst nahe am klassischen Auflösungslimit, interferiert es auch mit nicht auflösbaren Strukturen der Zelle (dem zweiten „Gitter“, das für den Moiré-Effekt nötig ist). Da das daraus folgende Moiré-Muster größere Strukturen aufweist als die Ursprungsmuster, ist es auflösbar, obwohl es die Ursprungsmuster nicht waren. Algorithmen können anschließend aus dem Moiré-Muster, und mit möglichst genauen Informationen über die Parameter der strukturierten Beleuchtung, das SIM-Bild der Zelle errechnen. Dieses enthält dank des Moiré-Musters Strukturen, die mit klassischer Fluoreszenzmikroskopie nicht auflösbar wären. Eine exakte Beschreibung der Auflösungsverbesserung durch SIM erfordert jedoch die Betrachtung der optischen Transferfunktion und des Frequenzraumes (Allen et al., 2014). Mit entsprechender Strukturierung der Beleuchtung ist eine Auflösungsverbesserung analog auch für die axiale Richtung möglich (Gustafsson et al., 2008). Generell findet eine Verbesserung um den Faktor zwei statt im Vergleich zur klassischen Mikroskopie. Das heißt SIM ist immer noch auflösungsbegrenzt, die Auflösung in axialer Richtung ist schlechter als in lateraler Richtung und sie ist wellenlängenabhängig. Allerdings liegt das Auflösungslimit für SIM bei etwa 100 nm in lateraler und 250 nm in axialer Richtung. Im Gegensatz zu anderen nanoskopischen Techniken beruht SIM nicht auf den photochemischen Eigenschaften von Fluorophoren oder überhaupt Fluoreszenz an sich. Dies erlaubt zum einen die Nutzung von Autofluoreszenz der Probe (Best et al., 2011) oder Kombinationen mit anderen, nicht-fluoreszierenden Mikroskopietechniken wie Differential-Interferenz-Kontrast-Mikroskopie (Chen et al., 2013). Zum anderen sind damit aber bei geeigneten Anregungswellenlängen und Filtern sämtliche etablierten Fluorophore geeignet. Dies macht SIM kompatibel mit erprobten Protokollen der Probenvorbereitung und -färbung und somit besonders anwenderfreundlich.

## **Pointillismus**

Die dritte Kategorie umfasst Methoden mit einer Vielzahl an Abkürzungen, die prinzipiell alle auf dem gleichen Prinzip beruhen. Die wichtigsten wurden zeitgleich von drei Gruppen unabhängig vorgestellt (Betzig et al., 2006; Hess et al., 2006; Rust et al., 2006). In allen Fällen benötigt man Fluorophore, die zwischen zwei Zuständen, typischerweise fluoreszent und nicht-fluoreszent, schaltbar sind. In einer Probe, die mit solchen Fluorophoren markiert ist, kann dann eingestellt werden, wie viele Fluorophore zur gleichen Zeit aktiv sind. Dabei wird ein Verhältnis angestrebt, bei dem nur so viele aktiv sind, dass im auflösungslimitierten Bereich nur einer gleichzeitig aktiv ist. In diesem Fall entspricht der Ort des Intensitätsmaximums der Beugungsscheibe dieses Fluorophors gleichzeitig

seiner Lokalisation in der Probe. Dieser Ort kann mit weit höherer Präzision festgelegt werden, als dem Durchmesser der Beugungsscheibe (siehe Abb. 1.4 C). Wie genau dies möglich ist hängt wesentlich von der Anzahl der detektierten Photonen ab (Thompson et al., 2002). Je nach Fluorophor können dies leicht einige Tausend Photonen sein (Dempsey et al., 2011). Sind dagegen mehrere Fluorophore gleichzeitig in diesem Bereich aktiv, entspricht das Maximum keiner der Lokalisationen der einzelnen Fluorophore und ist artifiziell. Dies kann leicht zu falschen Interpretationen führen (Sauer, 2013) und daher muss eine zu hohe Dichte aktiver Fluorophore vermieden werden. Nach der Lokalisation des Fluorophors muss dieses ausgeschaltet werden. Ist dies erfolgt, können nach diesem Muster in zahlreichen Zyklen andere Fluorophore angeschaltet, detektiert und ausgeschaltet werden. Im Idealfall würden nach und nach sämtliche Fluorophore der Probe betrachtet und lokalisiert. Schließlich kann aus der Summe sämtlicher Einzellokalisierungen ein neues Bild errechnet werden. Jeder einzelner Fluorophor ist darin nicht mehr durch die auflösungsbestimmte Beugungsscheibe, sondern durch seine Lokalisationsgenauigkeit repräsentiert. Solche Bilder erreichen bei geeigneten Fluorophoren eine Auflösung unter 20 nm (Vaughan et al., 2012). Da bei all diesen Methoden Bilder aus vielen Einzelpunkten zusammengesetzt werden, wurde entsprechend einer analogen Kunstrichtung, der Name Pointillismus als Überbegriff vorgeschlagen (Lidke et al., 2005b). Ein anderer, häufig gebrauchter Überbegriff ist *Single Molecule Localization Microscopy* (Allen et al., 2014). Das erforderliche Signal-Rausch-Verhältnis, um einzelne Fluorophore zu detektieren wird häufig mit einer Totalreflexionsbeleuchtung (TIRF-Beleuchtung) erreicht. Dies macht Pointillismus inkompatibel mit Mikroskopie tief in einer Zelle und mit 3D-Rekonstruktionen. Mittlerweile gibt es aber eine Vielzahl alternativer Methoden, die teilweise zusätzlich die Auflösung in axialer Richtung verbessern (Huang et al., 2008; Shtengel et al., 2009; York et al., 2011).

Der Punkt, in dem sich die verschiedenen Methoden jeweils unterscheiden, ist die Art der Fluorophore, bzw. wie Fluorophore geschaltet werden. Ursprünglich wurde für Antikörpergekoppelte organische Fluorophore der Begriff *Stochastic Optically Reconstruction Microscopy* (STORM) geprägt (Rust et al., 2006). Die Methode wurde später von einer weiteren Gruppe verbessert und in *direct STORM* (dSTORM) umgetauft (Heilemann et al., 2009; Heilemann et al., 2008). Bei diesem Verfahren werden angeregte Fluorophore durch hohe Laserintensitäten in nicht-fluoreszente Triplettzustände überführt. Nur ein Bruchteil der Fluorophore bleibt im angeregten Singlett-Zustand und geht von dort durch Fluoreszenz wieder in den Grundzustand über. Diese Fluorophore sind nach dem oben ausgeführten Schema von Pointillismus im aktiven Zustand. Für Fluorophore im Triplettzustand dagegen erfolgt durch Zugabe von Reduktionsmitteln in das Medium eine weitere Umwandlung in Radikalzustände. Fluorophore im Triplett- und im Radikalzustand können nicht durch Fluoreszenz in den Grundzustand zurückkehren und sind daher im inaktiven Zustand. Der Übergang in den Grundzustand geschieht stattdessen durch Oxidation. Von dort aus stehen sie für eine erneute Anregung wieder zur Verfügung. Das richtige Verhältnis von Fluorophoren im aktiven und inaktiven Zustand kann durch die Laserintensität und die Art und Konzentration des Reduktionsmittels eingestellt werden.

Im Gegensatz dazu nutzten zwei Gruppen schaltbare fluoreszente Proteine (FP), um Pointillismus zu etablieren. Diese Technik wurde je nach Gruppe *Photoactivated Localisation Microscopy* (Betzig et al., 2006) oder *Fluorescence Photoactivated Localisation Microscopy* (Hess et al., 2006) genannt

(PALM, bzw. FPALM). Die benutzten FPs standen zum Teil schon früher zur Verfügung (Lukyanov et al., 2005; Patterson and Lippincott-Schwartz, 2002). Erst Eric Betzig und Kollegen, sowie Samuel Hess und Kollegen erkannten, dass diese FPs zwei Zustände aufweisen, die sie für Pointillismus nutzbar machen. Das Anschalten der FPs geschieht dabei in vielen Fällen durch ultraviolettes Licht (UV). Dies führt zu einer Umbildung von chemischen Bindungen des Chromophors und damit zu veränderten photophysikalischen Eigenschaften (Gayda et al., 2012; Hedde and Nienhaus, 2014). Bei dem für PALM sehr gebräuchlichen schaltbaren FP EOS beispielsweise führt eine Beleuchtung mit UV zu einem Spektshift von grüner zu roter Fluoreszenz (Wiedenmann and Nienhaus, 2006). Damit ist das Protein in Bezug auf den roten Fluoreszenzkanal, und damit nach dem obigen Schema von Pointillismus, angeschaltet. Das Ausschalten geschieht in den meisten Fällen durch Bleichen des Fluorophors mittels hoher Intensitäten des Anregungslichtes. Je nach verwendetem FP kann die genaue Ausgestaltung des Schaltvorganges aber leicht variieren (Hedde and Nienhaus, 2014).

Teilweise verschwimmen die Grenzen zwischen (d)STORM und PALM, da einige nicht-schaltbare FPs in einem dSTORM ähnlichen Prozess für Pointillismus genutzt werden können (Donnert et al., 2007).

Nach der Entwicklung aller nanoskopischer Techniken haben sich viele Gruppen der weiteren Verbesserung der Techniken gewidmet. Dies hat dazu geführt, dass die Techniken schneller (Cox et al., 2012; Hedde et al., 2009; Kner et al., 2009) und die Auflösung besser wurde (Rego et al., 2012; Vicidomini et al., 2011). Nach Möglichkeit wurden nanoskopische Methoden mit fluoreszenzmikroskopischen Techniken wie *Fluorescence Correlation Spectroscopy* (Honigmann et al., 2014), Rasterkorrelationsspektroskopie (Hedde et al., 2013), oder *Speckle Microscopy* (Manley et al., 2008) kombiniert. Besonders vielversprechend für biologische Fragestellungen war die Kombination mit Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen (Jones et al., 2011; Kner et al., 2009; Nägerl et al., 2008; Shroff et al., 2008).

Der Aufstieg und der Beginn des großen Interesses in Nanoskopie liegen noch keine zehn Jahre zurück. Trotzdem werden sie in vielen hochrangigen Publikationen genutzt, ohne dass der Name der Methode noch extra im Titel erwähnt werden würde (Lawo et al., 2012; Sišková et al., 2014; Xu et al., 2013). Dies zeigt wie sehr Nanoskopie mittlerweile in der biologischen Forschung etabliert ist, und wie sehr sie zur Klärung wichtiger Fragestellungen beiträgt.

## 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Nach Ernst Abbé liegt das Auflösungslimit von Fluoreszenzmikroskopie bei etwa 200 nm in lateraler Richtung. Dies ist eine deutliche Einschränkung für die Untersuchung biologischer Proben, da viele subzelluläre Strukturen deutlich kleiner sind. Ein Lösungsansatz für dieses Problem war die Entwicklung von Elektronenmikroskopen. Diese weisen eine deutlich höhere Auflösung auf, die Probenpräparation ist aber sehr aufwendig und bringt zahlreiche Einschränkungen mit sich. Insbesondere ist keine Untersuchung lebender Zellen und dynamischer Vorgänge möglich. Für das Verständnis zellulärer Abläufe und Interaktionen ist dies jedoch eine wichtige Voraussetzung. Die Entwicklung neuer hochaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie (als Nanoskopie zusammengefasst (Stelzer, 2014)), mit zum Teil Auflösungen im einstelligen Nanometer-Bereich, haben daher vor allem in der Biologie großes Interesse ausgelöst und wurden 2014 mit dem Nobelpreis in Chemie gewürdigt. Für diese Arbeit stand bereits seit 2010 ein Prototyp eines solchen Mikroskops zur Verfügung. Es konnten damit von einem sehr frühen Zeitpunkt an die Möglichkeiten nanoskopischer Methoden für die Beantwortung biologischer Fragestellungen untersucht werden. Von Interesse ist dabei vor allem der Vergleich etablierter Proben zwischen klassischer Fluoreszenzmikroskopie und Nanoskopie um einzuschätzen, was die neuen Methoden leisten können und was nicht.

Als zellbiologische Untersuchungsobjekte bieten sich das Zytoskelett und Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Adhäsionen (CMAs) an. Beide Strukturen sind von ihrer Größe an oder unter dem klassischen Auflösungslimit für Fluoreszenzmikroskopie. Gleichzeitig sind sie von enormer physiologischer Bedeutung, durch die Vielzahl an Prozessen, an denen sie beteiligt sind. CMAs sind entscheidend für Zelladhäsion und -migration, und üben darüber hinaus auch Einfluss auf Differenzierung, Proliferation, Metastasierung und Apoptose aus. Dies macht sie zu idealen Untersuchungsobjekten für nanoskopische Methoden. Neben der Größe macht aber auch ihr komplexer Aufbau das Studium von CMAs schwierig. 150 verschiedene Proteine mit mehr als 650 wechselseitigen Interaktionen sind daran beteiligt. Bereits auf der Ebene der Integrine ist ein Verständnis schwierig, da sie vielfach redundant vorliegen was das Studium spezifischer Effekte einzelner Integrine erschwert. Zudem unterliegen Integrine einer komplexen Regulation und sind gleichzeitig an Adhäsion und Signaling beteiligt; bisher ist es kaum gelungen diese beiden Prozesse auf Integrinebene zu trennen.

Mikrostrukturierte Substrate bieten eine Möglichkeit die Komplexität von CMAs zu reduzieren und ihre Analyse zu vereinfachen. Einerseits bieten sie mit definierten subzellulären Bereichen von ECM-Proteinen eine standardisierte Umgebung. Andererseits sollten sogenannte binary choice Substrate mit subzellulärer Strukturierung es ermöglichen, Integrine zu trennen und dadurch spezifische Effekte zu studieren. Allerdings sind bisherige Strukturierungsmethoden häufig weder mit Nanoskopie, noch mit Zeitrafferaufnahmen kompatibel.

Die Ziele dieser Arbeit sind daher:

- 1) Etablierung hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie für die Analysierung von CMAs und die Kombination mit Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen.
- 2) Verbesserung der bisherigen Strukturierungsmethoden, um diese mit hochauflösenden Zeitrafferaufnahmen kombinieren zu können.
- 3) Optimierung und Erprobung von binary choice Substraten subzellulärer Größe für die Untersuchung von Integrin-spezifischen Effekten.
- 4) Die Kombination dieser Methoden zur Untersuchung von Integrinen und CMAs auf binary choice Substraten. Dies soll insbesondere unter Verwendung neuer Integrin-Mutationen erfolgen, die die Trennung von Integrin-Adhäsion und –Signaling erlauben. Für Signaling-inkompetente Integrine soll untersucht werden, welche intrazellulären Adaptoren für die Integrin-vermittelte Signalkaskade wichtig sind.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Tab. 2.1 Verwendete Chemikalien und Lösungsmittel

Name und evtl. Abkürzung	Angaben	Hersteller
Ammoniak / NH <sub>3</sub>	25 % Lösung	Carl Roth
Ampicillin		Carl Roth
β-mercaptoethanol	1 % v/v in PBS	Sigma-Aldrich
β-mercaptoethylamin	100 mM in PBS	Sigma-Aldrich
<i>Bovine Serum Albumine</i> / BSA	1 % oder 3 % w/v gelöst in PBS	Sigma-Aldrich
<i>Chicken Serum</i> / CS	5 % v/v in F12	Life technologies
Dikaliumhydrogenphosphat / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	mit KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in Elektroporationspuffer	Carl Roth
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (high glucose)</i> / DMEM	1 x high glucose	Life technologies oder Pan-Biotech
Entsalzungssäulen ( <i>PD10 Desalting Columns</i> )		GE Healthcare
Essigsäure	100 %	Carl Roth
Ethylenglykol-bis(aminoethylether)- tetraessigsäure/ EGTA		Sigma-Aldrich
Ethanol reinst. / EtOH		Carl Roth
Ethylenglycol-6O-Mercaptan / EG6OMe	1 mM in EtOH	Prochimia
Ethylenglycol-3O-Hydroxid / EG3OH	1 mM in EtOH	Prochimia
<i>F-12 Nutrient Mixture Kaighn's Modification</i> / F12	+ L-Glutamin, 20 mM	Life technologies
<i>Foetal Bovine Serum</i> / FBS	10 % v/v in Medium	PAA
<i>Foetal Calf Serum</i>	10 % v/v in DMEM	HyClone
bovines FN / bFN (für Fluoreszenzmarkierung)	<i>from bovine plasma</i> ; Lyophilisat in ddH <sub>2</sub> O;	Sigma-Aldrich
Fibronectin / FN	<i>from human plasma</i> ; Lyophilisat in ddH <sub>2</sub> O; Stock 1 mg/ml	Sigma-Aldrich
Ficoll 400		Sigma-Aldrich
Glukose		Carl-Roth
Glutaraldehyd / GA	gelöst in PBS	Sigma-Aldrich
Goldbeads, 80 nm	10 % v/v in ddH <sub>2</sub> O	BB International
<i>Hanks balanced salt solution</i> /HBSS		Life technologies
2-[4-(2-Hydroxyethyl-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure / HEPES		Carl-Roth
Heptan		Carl Roth
Isopropanol		Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	mit K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in Elektroporationspuffer	Carl Roth
Kaliumchlorid / KCl		Carl Roth
Kanamycin		Carl Roth
LB Medium	5 g Pepton, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in 500 ml ddH <sub>2</sub> O	Carl Roth

Lipofectamine 2000		Life technologies
Magnesiumchlorid / MgCl <sub>2</sub>		Carl-Roth
MES		Carl-Roth
Mowiol	20 %	Hoechst
Natriumchlorid / NaCl		Carl-Roth
Natriumborhydrid / NaBH <sub>4</sub>		Carl Roth
n-Propylgallat	1 Spatelspitze auf 10 ml Mowiol	Sigma-Aldrich
Octadecylmercaptan / ODM	1,5 mM in EtOH	Sigma-Aldrich
Octadecyltrichlorosilan / OTS	1 mM in Heptan	Sigma-Aldrich
OptiMEM		Life technologies
Paraformaldehyd / PFA	4 % in PBS	Sigma-Aldrich
Plasmid QIAprep Spin Miniprep Kit		Qiagen
Plasmid Plus Midi Kit		Qiagen
Penicillin-Streptomycin	10 U/ml	Life technologies
Phosphate Buffered Saline / PBS	1 x, ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Life technologies oder Pan-Biotech
Polydimethylsiloxan: Sylgard 184 / PDMS	1 : 9	Dow Corning
Poly-L-Lysin-Polyethylenglykol / PLL-PEG	1 mg/ml in 10 mMHEPES	SuSoS
Protein Labeling Kit, Alexa Fluor 568 und Alexa Fluor 647	568: für rVN 647: für bFN	Life technologies
Puromycin	10 µg/ml DMEM Medium	Sigma-Aldrich
Salzsäure / HCl		Carl-Roth
Soybean Trypsin Inhibitor /STI	0,5 mg/ml in PBS	Sigma-Aldrich
Stickstoff / N <sub>2</sub>	Reinheit 5.0	Linde
TritonX-100	0,1 % in PBS	Carl Roth
Trypsin/EDTA	1:5 und 1:10 in PBS	Life technologies
Vitronektin / VN	From human plasma; Lyophilisat in ddH <sub>2</sub> O; Stock 50 µg/ml	Sigma-Aldrich
Vitronektin, rekombinant / rVN (für Fluoreszenzmarkierung)	rekombinant in HEK-Zellen; Lyophilisat in ddH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid / H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30 % Lösung	Carl-Roth
zweifach destilliertes Wasser / ddH <sub>2</sub> O		Millipore

## 2.2 Herstellung mikrostrukturierter Substrate

Zur Herstellung mikrostrukturierter Substrate wurden zwei Verfahren des *Microcontact Printings* ( $\mu$ CP) modifiziert, um sie für inverse Mikroskopie kompatibel zu machen. Die Art des Proteintransfers auf die Deckglasoberfläche war dabei jeweils unterschiedlich. Im ersten Verfahren wurde ein Gold-Thiol-basiertes Verfahren benutzt. Die Proteinadsorption findet nach dem Stempeln durch selektive Adsorption aus der Proteinlösung an ein Thiol statt (siehe unten). Im zweiten wurden Stempel mit einer Proteinlösung beschichtet, die nachfolgend direkt auf das Deckglas übertragen

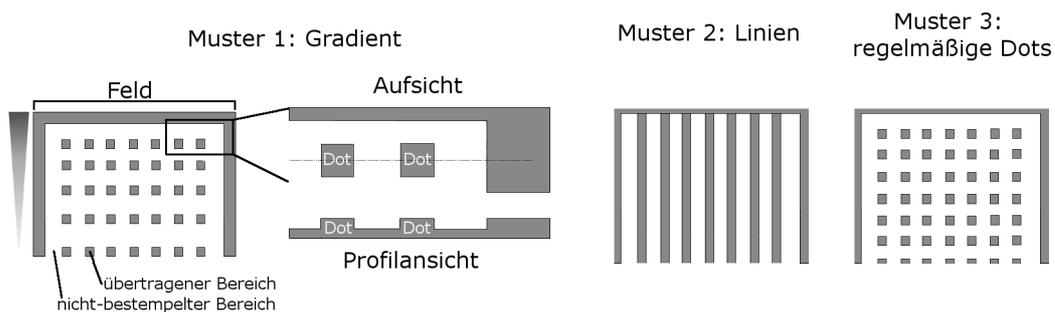
wurde. Die benutzten Master und Stempel konnten aber für beide Methoden benutzt werden. Sowohl der Master, als auch der Stempel haben eine topografische Oberfläche, wobei der Master das inverse Muster des Stempels aufweist. Die hervorstehenden Bereiche des Stempels werden auf das Substrat übertragen. Damit gleicht das Muster des Stempels dem späteren Muster auf dem Substrat. Beide in dieser Arbeit optimierten Verfahren können prinzipiell für strukturierte Substrate mit vielen verschiedenen Proteinen eingesetzt werden. Hier kamen aber ausschließlich Fibronectin (FN) und Vitronectin (VN) zum Einsatz.

## Muster

Es wurden generell drei Arten von Mustern für strukturierte Substrate eingesetzt (siehe Abb. 2.1).

- 1) Gradienten von Dots (Dots = Punkte). Der Abstand in x-Richtung bleibt dabei konstant, während der Abstand in y-Richtung immer weiter verkleinert wurde, so dass effektiv ein Gradient in y-Richtung entstand.
- 2) Durchgängige Linien in y-Richtung mit konstantem Abstand in x-Richtung.
- 3) Quadratische FN-Dots einer bestimmten Größe in einem in x- und in y-Richtung gleich großen Abstand zu benachbarten Dots.

Alle Muster waren in Feldern organisiert, die von einem homogenen Steg umgeben sind. Diese Stege sind für die mechanische Stabilität der Stempel beim Stempelvorgang erforderlich. Ein Stempel hatte stets mehrere Felder und konnte so auch verschiedene Muster aufweisen. Die durchgängigen Linien (Muster (ii)) waren nicht in eigenen Feldern organisiert, sondern bildeten den Abschluss des Gradientenmusters (Muster (i)). Bei diesem Muster wird der Abstand am Ende so gering, dass die Dots in durchgehende Linien übergehen.



**Abb. 2.1: Verwendete Stempelmuster.** Gezeigt ist der schematische Aufbau der verwendeten Stempelmuster. Wie bei Muster 1 gezeigt bestanden alle Stempel aus mehreren Feldern. Diese waren von einem homogenen Bereich umgeben. Innerhalb des Feldes war der Stempel topografisch strukturiert. Die beim Stempeln zu übertragenden Bereiche standen hervor (vgl. Aufsicht und Profilsicht bei Muster 1). **Muster 1** bildete durch enger werdende Abstände der Dots in y-Richtung einen Gradienten in diese Richtung; dies wird zusätzlich durch den grauen Keil links neben dem Feld schematisch verdeutlicht. **Muster 2** bestand aus durchgehenden Linien mit konstanten Abständen in x-Richtung. **Muster 3** ist ähnlich aufgebaut wie Muster 1, allerdings ohne Gradient.

## Herstellung der Master

Die benötigten Stempel für  $\mu$ CP müssen von dauerhaften Mastern abgeformt werden. Dafür standen Siliziummaster bereit, die mittels Elektronenstrahlolithographie hergestellt wurden (Muster (i) und (ii): Dr. Torsten Beck, Institut für Angewandte Physik, KIT; Muster (iii): Dr. Ralf Bubeck, LS Leiderer, Universität Konstanz). Das gewünschte Muster wird dabei als inverses topografisches Muster in das Silizium eingätzt. Abgeformte Stempel weisen dann das gewünschte Muster auf. Gold-Thiol-Chemie basierte Verfahren für  $\mu$ CP führen durch Diffusion des ersten Thiols (siehe unten, „*Strukturierte Substrate mit Gold-Thiol-Chemie*“) zu einer Verbreiterung des Stempelmusters. Dies ist bei direktem Proteinstempeln (siehe unten, „*Direktes Proteinstempeln*“) nicht der Fall. Dadurch hatte bei Benutzung des gleichen Stempels der Proteingradient bei direktem Stempeln nicht die gleichen Abmessungen, wie es beim Gold-Thiol-basierten  $\mu$ CP der Fall war. Die verringerte Dotgröße in den Gradienten (Muster (i)) hat Einfluss auf die Zellmigration (Autenrieth, 2012) und erschwerte die Vergleichbarkeit der Methoden. Daher wurde von Dr. Benjamin Richter (Zoologisches Institut, KIT) ein entsprechend angepasster Master produziert, der bei direktem Stempeln zu einem vergleichbaren Proteinmuster wie bei Gold-Thiol-Chemie führt. Dieser wurde mittels *Direct Laser Writing* (DLW) hergestellt. Dabei wird mittels eines Lasers in einen Fotolack geschrieben. Dies ist möglich, da der Lack durch Absorption von Photonen härtet. Da es sich um einen 2-Photonen-Prozess handelt, findet dieser Prozess ausschließlich im Fokus des Lasers statt. Damit können topografische Strukturen geschrieben werden, die analog zu Siliziummastern als Vorlage für Stempel dienen können. Nach Schreiben der Struktur folgt eine Passivierung mit PEG-CP (Polyethylenglykol-Cyclopentadienyl), um später den Stempel vom Master ablösen zu können.

## Reinigung und Silanisierung der Siliziummaster

Zur Reinigung wurden Master mehrfach mit Klebeband in Kontakt gebracht, der anschließend vorsichtig wieder abgezogen wurde. Um Klebereste und hartnäckigere Verschmutzung zu entfernen wurden die Master für 15 min in EtOH in ein Ultraschallbad gelegt. Bei starker Verschmutzung wurde dieser Prozess mehrfach wiederholt. Zum Schluss wurde der Master mit ddH<sub>2</sub>O gespült und mit N<sub>2</sub> getrocknet. Um den späteren Stempel gut vom Master ablösen zu können, wurde dieser mit Octadecyltrichlorosilan (OTS) beschichtet. Dies erfolgte in einer 1mM OTS-Lösung in n-Hexan für 10 min unter einer N<sub>2</sub>-Atmosphäre. Anschließend wurde der Master entnommen und mit N<sub>2</sub> trocken geblasen. Eine erfolgreiche Silanisierung wurde anhand der Hydrophobizität des Masters getestet (silanierte Master sind sehr hydrophob; ein Wassertropfen auf dieser Oberfläche bleibt kugelig und flacht kaum ab). In gleicher Weise wurde die Silanisierung der Master vor jeder Erstellung eines Stempels geprüft. Für DLW-erstellte Master wurde eine Passivierung bereits mit PEG-CP durch Dr. Benjamin Richter durchgeführt. Eine erneute Passivierung mit OTS oder in anderer Weise war daher nicht erforderlich.

## **Herstellung und Reinigung der Stempel**

Die Herstellung der Stempel erfolgte mit dem für diesen Zweck verbreiteten Silikon Polydimethylsiloxan (PDMS) Sylgard 184. Durch Variation der Menge von Polymer und Härter können Silikone mit verschiedenen Eigenschaften erstellt werden. Für die in dieser Arbeit verwendeten Stempel hat sich eine Mischung von 900 µg Polymer und 100 µg Härter als geeignet erwiesen. Beide wurden vermischt und ca. 30 min zur Seite gestellt, damit Luftblasen ausgasen können. Etwa 50 µl wurden anschließend auf den gemusterten Bereich des Masters gegeben. Ein ca. 1 cm breiter Objektträger-Streifen wurde mit Isopropanol gereinigt und auf den Tropfen PDMS gelegt. Auf den Glasstreifen wurde ein 52 g schwerer Messingklotz gelegt, um die PDMS-Dicke einzustellen. Glasstreifen und Master wurden anschließend stabilisiert, um ein Verrutschen zu verhindern. Die Polymerisierung erfolgte dann bei 60°C über Nacht in einem Inkubator. Danach wurden beide voneinander gelöst. PDMS und Glasstreifen wurden nun passend zugeschnitten und auf einen Kunststoffblock geklebt, der als Haltegriff diente.

Vor und nach jeder Benutzung wurden die Stempel stets in gleicher Weise gereinigt. Dazu wurde mindestens dreimal ein Klebstreifen in Kontakt zum Stempel gebracht und vorsichtig abgelöst. Anschließend wurde er mit EtOH inkubiert, um Kleberreste zu lösen. Vor einer weiteren Benutzung war darauf zu achten, dass kein EtOH auf dem Stempel zurück blieb. Im Fall von intensiveren Verschmutzungen wurden Stempel 15 min in EtOH in einem Ultraschallbad behandelt.

## **Reinigung und Goldbedampfung der Deckgläser**

Für die Gold-Thiol-basierte Strukturierungsmethode waren goldbeschichtete Deckgläser nötig. Diese wurden zu Beginn in einer Lösung aus  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{ddH}_2\text{O}$  (1:1:5) gereinigt, um später eine bestmögliche Goldbeschichtung zu ermöglichen. Die Deckgläser wurden in dieser Lösung für 15 min auf 80 °C erhitzt. Danach folgten mehrere Spülschritte mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  und eine Trocknung mit  $\text{N}_2$ . Für die Bedampfung wurden die Deckgläser in einer Haltevorrichtung in die Bedampfungsanlage überführt. Bei Unterdruck ( $< 1 \times 10^{-6}$  mbar) wurde zuerst eine Schicht Titan appliziert, die als Haftvermittler für die Goldbeschichtung dient. Diese erfolgt direkt im Anschluss. Beim etablierten Gold-Thiol-Chemie-basierter Strukturierung wird eine 3-5 nm dicke Titanschicht und eine 15-20 nm dicke Goldschicht appliziert. Diese Deckgläser sind deutlich goldfarben und reflektieren einfallendes Licht nahezu vollständig. In dieser Arbeit wurden auch dünnere Beschichtungen mit ca. 0,5 nm Titan und 2 nm Gold eingesetzt. Diese haben eine eher gräulich-goldene Farbe und sind deutlich transparenter. Für Vergleiche dieser dünnen Goldbeschichtung und unbeschichteter Glasoberflächen wurden Deckgläser beim Bedampfungsprozess zur Hälfte mit einem Metallstreifen bedeckt. Die bedeckte Deckglashälfte konnte so als direkt Kontrolle zur dünnen Goldbeschichtung auf dem gleichen Deckglas dienen.

## Proteinlabeln

Die Visualisierung strukturierter Substrate erfolgte in dieser Arbeit stets durch Beimischen einer Fraktion direkt gelabelten Proteins. Dazu wurden *Protein Labeling Kits* der Firma Life technologies genutzt. FN wurde mit dem entsprechenden Kit mit Alexa Fluor 647 markiert, VN mit Alexa Fluor 568. Ausnahmsweise wurde hierfür kein FN, bzw. VN aus humanem Blutplasma genutzt. FN stammte aus bovinem Plasma und VN aus einer rekombinanten Expression in HEK Zellen. Laut Protokoll der Labeling Kits sollte die benutzte Proteinlösung keine Amine enthalten, um eine optimale Markierung zu erhalten. Da dies für die verwendeten Proteine nicht ausgeschlossen werden kann wurden diese zuerst mit Entsalzungssäulen gereinigt und in PBS aufgenommen. Mittels einem NanoDrop (Thermo Scientific) wurde von den erhaltenen Fraktionen (jeweils 500 µl) der Proteingehalt gemessen und die beiden Fraktionen mit dem höchsten Gehalt für den Labelvorgang genutzt. Dieser erfolgte entsprechend der Anleitung des Herstellers. Das gelabelte Protein wurde stets einer Lösung unbehandelten FNs oder VNs (jeweils von humanem Plasma) beigemischt. Die angegebenen Verdünnungen beziehen sich stets auf das Gesamtvolumen der benutzten FN- oder VN-Lösung (beispielsweise wurde zur Beschichtung eines Stempels 50 µl einer 5 µg/ml Lösung von unbehandeltem FN benötigt; bei direktem Stempel wurde dieser Lösung 1/40, also 6,25 µl gelabelten FNs beigemischt).

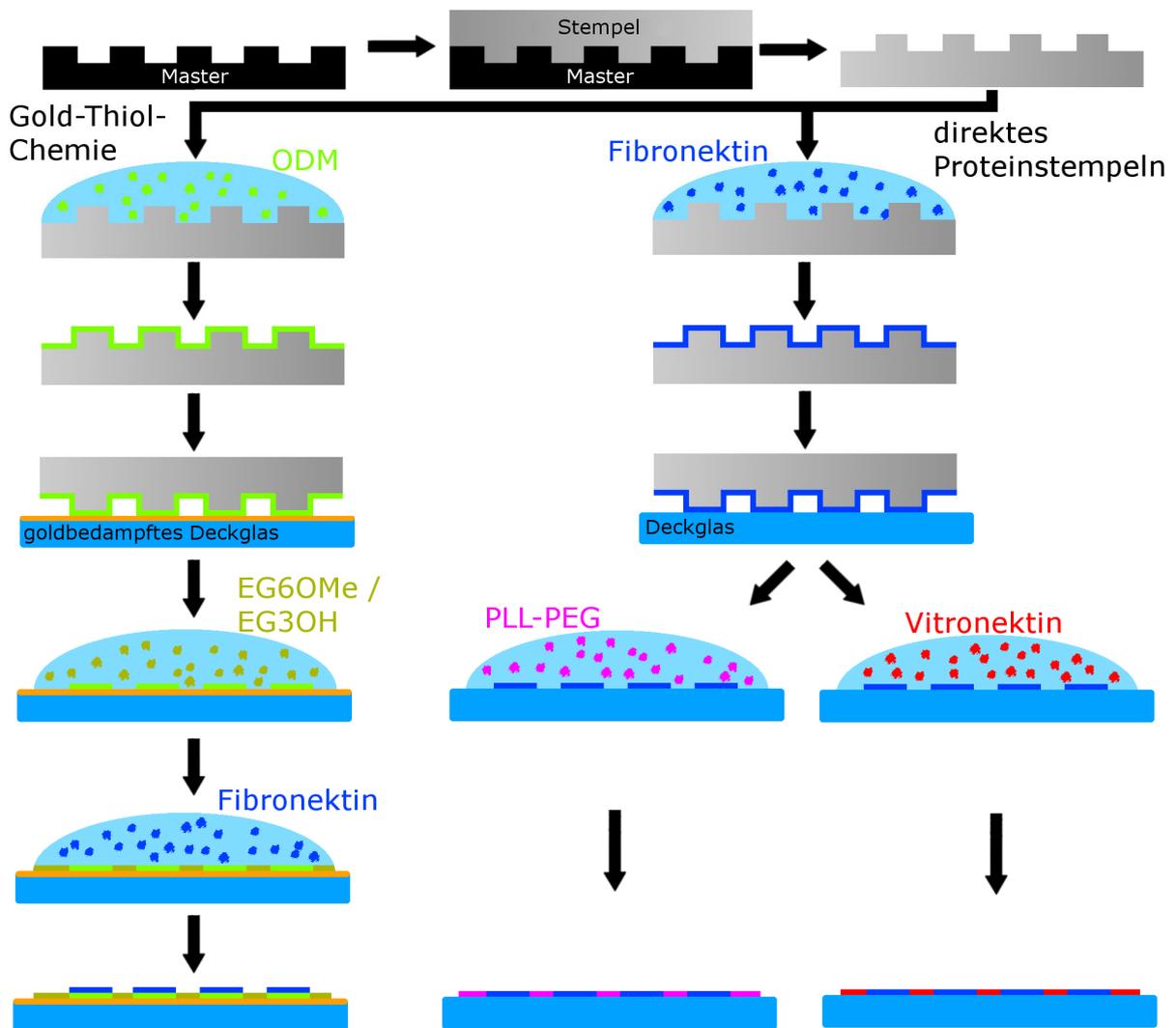
## Strukturierte Substrate mit Gold-Thiol-Chemie

Die zweite in dieser Arbeit benutzte Methode zur Herstellung mikrostrukturierter Substrate beruht auf Gold-Thiol-Chemie. Der Stempelvorgang war für beide Golddicken (siehe oben, „*Reinigung und Goldbedampfung der Deckgläser*“) gleich. Der Stempel wurde für 15-20 Sekunden mit einer 1,5 mM Octadecylmercaptan (ODM) –Lösung inkubiert. ODM ist ein hydrophobes Thiol, an das später das gewünschte Protein (in dieser Arbeit bei diesem Verfahren immer FN) bindet. Nach der Inkubation wurde der Stempel mit N<sub>2</sub> trocken geblasen und in Kontakt mit einem Gold-bedampften Deckglas gebracht. Auch hier zeigten Interferenzfarben den erforderlichen Kontakt von Deckglas und Stempel an. Falls dies nicht von selbst erfolgte, wurde mit einer Pinzette leichter Druck auf das Deckglas ausgeübt. Direkt nach einem erfolgreichen Kontakt kann der Stempel vom Deckglas gelöst werden. Das Deckglas kann bei zügigem Arbeiten mehrere Male bestempelt werden. Anschließend wurde es mit EtOH gereinigt und mit N<sub>2</sub> getrocknet. Die Passivierung der nicht-bestempelten Bereiche erfolgte durch Überschichtung des Deckglases mit einem hydrophilen Thiol. Dazu standen zwei Thiole zur Auswahl: EG3OH (0,1 mM in EtOH) oder EG6OMe (2,5 mM in EtOH). In beiden Fällen erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation mit dem passivierenden Thiol wurden die Deckgläser mit EtOH gewaschen und mit N<sub>2</sub> trocken geblasen. Die Deckgläser wurden nun mit der gewünschten Proteinlösung beschichtet. In dieser Arbeit wurde immer eine 5 µg/ml – FN-Lösung eingesetzt. Zur Visualisierung wurde zur Gesamtmenge 1/20 von Alexa Fluor 647 markiertem FN beigemischt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 4 °C. Danach wurden die Deckgläser mit PBS gewaschen und direkt für die Zellaussaat genutzt.

## Direktes Proteinstempeln

Bei diesem Verfahren wurde der Stempel direkt mit einer Proteinlösung inkubiert. Bei allen Versuchen wurde eine Proteinkonzentration von 5 µg/ml (verdünnt in PBS) gewählt. Etwa 50 µl waren ausreichend für die Beschichtung eines Stempels. Die Inkubation erfolgte für 10 min. In dieser Arbeit wurde stets FN gestempelt. Die Visualisierung erfolgte durch Beimischen von bovinem FN, das mit Alexa Fluor 647 markiert wurde (siehe oben, „Proteinlabeln“). Der unmarkierten Proteinlösung wurde 1/40 – 1/50 des Gesamtvolumens an markiertem FN beigemischt. Nach der Inkubation wurde der Stempel mit N<sub>2</sub> trocken geblasen. Mit EtOH gereinigte Deckgläser wurden in Kontakt mit dem Stempelmuster gebracht. Es zeigte sich, dass die deutliche Sichtbarkeit von Interferenzfarben zwischen Stempel und Deckglas entscheidend ist, um einen erfolgreichen Proteintransfer von Stempel zu Deckglas zu ermöglichen. Um dies sicher zu stellen, wurde mit einer Pinzette vorsichtig Druck auf das Deckglas ausgeübt, bis Interferenzfarben deutlich sichtbar waren. Dann erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min. In Kontrollversuchen zeigte sich, dass längere Inkubationszeiten bis zu einer Stunde (sowohl der Proteinlösung auf dem Stempel, als auch dem Deckglas auf dem Stempel) das Ergebnis nicht verbessern. Höhere Konzentrationen an Proteinen bei der Beschichtung des Stempels verbesserten dagegen den Übertrag an Protein und führten zu gleichmäßigeren Dots. Allerdings sinkt bei hohen Proteinkonzentrationen auf dem Substrat die Migrationsrate von Zellen (Autenrieth, 2012). Konzentrationen unter 5 µg/ml führten dagegen dazu, dass der Stempel nicht mehr „klebrig“ genug war, um am Deckglas zu adhären. Daher wurde eine Proteinkonzentration von 5 µg/ml mit jeweils 10 min Inkubationen als bester Kompromiss gewählt.

Nach dem zweiten Inkubationsschritt (Deckglas auf Stempel) wurden diese voneinander getrennt und das Deckglas in einer feuchten Kammer auf einer hydrophoben Oberfläche platziert. Für eine proteinabweisende Passivierung um die Dots wurde eine Poly-L-Lysin-Polyethylenglykol (PLL-PEG) – Lösung hergestellt (1 mg/ml in 10 mM HEPES). Die Mischung wurde stets frisch angesetzt, beziehungsweise maximal nach zwei Woche bei -20 °C noch genutzt. Der gestempelte Bereich eines Deckglases wurde mit dieser Lösung überschichtet und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach folgte ein Waschschrift mit PBS. Solche Substrate wurden direkt für die Zellaussaat genutzt. Falls statt einer Passivierung eine zweite Proteinschicht um die zuvor gestempelten Dots erwünscht war, wurde eine 5µg/ml-Lösung des zweiten Proteins hergestellt und das FN-Muster damit überschichtet. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur für eine Stunde. Es folgte ein Waschschrift mit PBS und die direkte Nutzung der Substrate. In dieser Arbeit wurde gestempeltes FN mit VN überschichtet, um differenzielle FN/VN-Substrate zu erhalten. Falls eine Visualisierung von VN erforderlich war, wurde der unmarkierten VN-Lösung 1/20 des Gesamtvolumens an markiertem VN beigemischt. Dabei handelte es sich um rekombinantes VN, das direkt mit Alexa Fluor 568 markiert wurde (siehe oben, „Proteinlabeln“).



**Abb. 2.2: Schema der verschiedenen Strukturierungsmethoden.** Die in dieser Arbeit hergestellten strukturierten Substrate wurden nach einem dieser Schemata hergestellt. In allen Fällen wird zuerst ein Stempel benötigt, der von einem Master abgeformt wird. Dieser wird anschließend entweder für Gold-Thiol-Chemie (linker Pfad der Abb.) mit dem Thiol ODM oder für direktes Proteinstempeln (rechter Pfad der Abb.) mit Fibronektin (FN) beschichtet. Nach der Inkubation wird der Stempel in beiden Fällen mit Stickstoff getrocknet. Bei ODM-Beschichtung wird der Stempel mit einem goldbedampften Deckglas in Kontakt gebracht. Die erhabenen Bereiche des Stempels kommen in Kontakt mit Gold; es kommt hier zum Übertrag von ODM. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem zweiten, passivierenden Thiol. Dieses bindet in die freien Bereiche. Bei der folgenden Beschichtung mit FN bindet das Protein nur an ODM, aber nicht an das zweite Passivierungsthiol. Zellen können später ebenfalls nicht an das Passivierungsthiol binden, sondern nur an FN adhären. Beim direkten Proteinstempeln wird der FN-beschichtete Stempel mit einem unbehandeltem Deckglas in Kontakt gebracht und an den erhabenen Stellen übertragen. Danach erfolgt entweder eine Beschichtung mit passivierendem PLL-PEG oder dem ECM-Protein Vitronektin (VN). Beide Moleküle binden nur in den freien Bereichen. Bei PLL-Beschichtung erhält man analog zur Gold-Thiol-Chemie-basierten Strukturierung abwechselnd adhäsive FN-Bereiche und passivierte Bereiche. Bei VN-Beschichtung erhält man dagegen ein differenzielles FN/VN-Substrat.

## **Epoxy-silanisierte Deckgläser und Vergleich zu nicht-kovalenter Bindung**

Für den Vergleich kovalenter und nicht-kovalenter Bindung von FN an Glasoberflächen (siehe Abb. 3.6) wurde FN direkt gestempelt. Als nicht-kovalente Kontrolle diente ein unbehandeltes, EtOH-gereinigtes Deckglas. Für eine kovalente Bindung wurden Deckgläser mit Epoxy-silan ((3-Glycidoxypropyl)trimethoxysilane) silanisiert. Dazu wurde eine 1 % v/v Epoxy-silanlösung in EtOH angesetzt und mit Essigsäure auf pH 5 eingestellt. Diese wurde für fünf min gerührt und anschließend die Deckgläser für 2 min in dieser Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit EtOH gereinigt und über Nacht bei 60 °C getrocknet. Da PLL-PEG auf epoxy-silanierten Deckgläsern zu keiner zufriedenstellenden Passivierung führte, wurde für dieses Experiment in beiden Fällen (kovalent und nicht-kovalent) mit einer 3%-BSA-Lösung passiviert. Die Epoxy-silanisierung der Deckgläser wurde durch Felix Fiederling (Zoologisches Institut, KIT) durchgeführt.

## **2.3 Zellkultur**

### **Zelltypen**

In dieser Arbeit wurden mehrere Zell-Linien mit verschiedenen Ursprüngen eingesetzt. Bei allen Zell-Linien handelte es sich um adhärenz Zellen.

Das Labor von Bernhard Wehrle-Haller (Uni Genf) hat aus einer NIH 3T3 – Mausfibroblastenzell-Linie eine Subpopulation kultiviert, die besonders geringe Mengen an  $\beta$ 3-Integrin exprimiert (Pinon et al., 2014). Diese wird in dieser Arbeit durchgehend 3T3  $\beta$ 3low genannt. Entsprechend der Ursprungspopulation handelt es sich um eine murine Zell-Linie mit fibroblastenartigem Verhalten.

Bei GD25 wt Zellen handelt es sich um differenzierte Zellen aus murinen embryonalen Stammzellen, deren  $\beta$ 1-Integrin-Gen entfernt wurde (Fässler et al., 1995). Entsprechend exprimieren diese Zellen kein endogenes  $\beta$ 1-Integrin. Ihr Verhalten wird als fibroblastenartig beschrieben (Gimond et al., 1999).

Das Labor von Wehrle-Haller hat durch stabile Transfektion von GD25wt Zellen zwei weitere Zell-Linien geschaffen. Eine, GD25  $\beta$ 1A-GFP, exprimiert  $\beta$ 1A-Integrin gekoppelt mit einem GFP. Bei  $\beta$ 1A-Integrin handelt es sich um die ubiquitär exprimierte  $\beta$ 1-Integrin-Variante. Die andere Zell-Linie, GD25  $\beta$ 1D-GFP, exprimiert eine muskelspezifische Spleißisoform, nämlich  $\beta$ 1D-Integrin, ebenfalls an GFP gekoppelt. Entsprechend ihrem Ursprung zeigen sie ein fibroblastenartiges Verhalten.

HFFs werden aus humanen Vorhautzellen kultiviert. Im Gegensatz zu den vorherigen Zell-Linien ist diese nicht immortalisiert. Sie verhalten sich ebenfalls fibroblastenartig.

In gleicher Weise sind PCFs eine fibroblastenartige primäre Zell-Linie. Sie wurden im Zoologischen Institut aus der Rückenhaut von Hühnerembryonen gewonnen (siehe unten, „*Präparation primärer Hühnerfibroblasten*“).

REF52s sind immortalisierte, fibroblastenartige Zellen, die aus Rattenembryonen gewonnen werden (Logan et al., 1981).

**Tab. 2.2 Verwendete Zell-Linien**

Linie	Zelltyp/-ursprung	Eigenschaften	Medium	Herkunft
3T3 $\beta$ 3low	selektierte NIH 3T3 Zellen (Maus)	fibroblastenartig	DMEM + 10 % FCS	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
GD25 wt	differenzierte ES (Maus)	fibroblastenartig	DMEM + 10 % FCS	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
GD25 $\beta$ 1A-GFP	stabil transfizierte GD25wt	fibroblastenartig	DMEM + 10 % FCS + 10 $\mu$ g/ml Puromycin	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
GD25 $\beta$ 1D-GFP	stabil transfizierte GD25wt	fibroblastenartig	DMEM + 10 % FCS + 10 $\mu$ g/ml Puromycin	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
HFF	<i>Human Foreskin Fibroblast</i>	fibroblastenartig	DMEM + 10 % FCS	PromoCell, primär
PCF	<i>Primary Chicken Fibroblast</i>	fibroblastenartig	F12 + 10 % FCS + 2 % CS	primär
REF52	<i>Rat Embryonic Fibroblast</i>	fibroblastenartig	DMEM + 10 % FCS	Benny Geiger, Weizmann Institute

### Präparation primärer Hühnerfibroblasten

In einem Inkubator (37 °C, 60 % Luftfeuchte) wurden Hühnereier für acht Tage bebrütet. Dann wurden die Embryonen unter sterilen Bedingungen entnommen und in kaltes Hanksmedium überführt. Mit einer Pinzette wurde vorsichtig Rückenhaut abgelöst und in eine neue Schale mit Hanksmedium gegeben. Die Hautstücke wurden mit einem Skalpell in kleinere Stücke geschnitten und mit der Pinzette vereinzelt. Schließlich wurde noch einmal mit Hanksmedium gespült und schließlich durch F12-Medium (10 % FCS, 2 % CS) zur weiteren Kultivierung ersetzt. Diese erfolgte in einem Inkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 98 % Luftfeuchte) über eine Woche. In dieser Zeit wuchsen Fibroblasten aus den Gewebstücken aus. Die weitere Kultivierung konnte unter Standardbedingungen erfolgen (siehe unten, „Routinezellkultur“). Für PCFs wurde dies von Stephanie Frank übernommen (Zoologisches Institut, KIT). Diese Zellen wurden maximal bis Passage 12 benutzt.

### Routine Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in Inkubatoren unter Standardbedingungen kultiviert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 98 % Luftfeuchte). Zellen wurden in einer Dichte ausgesät, so dass nach 2-3 Tagen die Kulturflaschen (Greiner, 25 cm<sup>2</sup>) mit einem konfluenten Zellrasen bedeckt sind. Entsprechend wurden Zellen dreimal pro Woche passagiert. Außer den PCFs wurden alle Zellen in DMEM + 10 % FCS kultiviert. Bei den stabil transfizierten GD25  $\beta$ 1A-GFP und GD25  $\beta$ 1D-GFP wurde außerdem noch das

Selektionsantibiotikum Puromycin in einer Konzentration von 10 µg/ml dem Medium beigesetzt. PCFs wurden in F12-Medium + 10 % FCS + 2 % CS kultiviert.

Für die Passagierung wurden Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl Trypsin/EDTA inkubiert. Nach 2 – 4 min lösten sich Zellen vom Flaschenboden ab. Die Wirkung von Trypsin/EDTA wurde durch Zugabe von Medium mit Serum gestoppt. Die Zell-Lösung wurde dann in ein Falcon überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in frischem Medium aufgenommen. Eine entsprechende Verdünnung der Zellen (1:5 – 1:10) wurde in neue Kulturflaschen mit frischem Medium überführt und im Inkubator weiter kultiviert.

Für Experimente mit strukturierten Substraten wurde eine definierte Zellzahl benutzt, um die ideale Zelldichte zu erreichen. Das Auszählen erfolgte mit einer Zählkammer nach Neubauer.

## 2.4 Transfektion von Zellen

### Plasmide und Plasmidvermehrung

Bei der transienten Transfektion werden Plasmide nur zeitweilig in Wirtszellen eingebracht. Im Gegensatz dazu verbleibt das Plasmid bei einer stabil transfizierten Zell-Linie wie den hier benutzten GD25 β1A-GFP und GD25 β1D-GFP dauerhaft in der Zelle. Dies erfolgte bei diesen Zell-Linien durch das Selektionsantibiotikum Puromycin, das die eukaryotische Translation hemmt. Für eine stabile Transfektion werden Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das bei Expression gleichzeitig eine Resistenz gegen Puromycin vermittelt. Zellen mit Resistenz können damit schneller proliferieren, als Zellen ohne Plasmid und werden dadurch aufkonzentriert.

Entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit wurden viele Plasmide für verschiedene CMA-Proteine und für Aktin eingesetzt. Die gewünschten Proteine sind dabei stets an ein fluoreszentes Protein (FP) gekoppelt. Für Aktin hat es sich dagegen durchgesetzt nicht Aktin selbst zu transfizieren. Stattdessen wird die Aktinbindedomäne eines anderen Proteins an ein FP gekoppelt und transfiziert. Dies hat den Vorteil, dass die Dynamik von Aktinpolymerisation und –depolymerisation weniger gestört ist. Weit verbreitet ist Lifeact, das aus den ersten 17 Aminosäuren des Proteins Abp140 aus *Saccharomyces cerevisiae* besteht (Riedl et al., 2008). Ein neueres Konstrukt nutzt die Aktinbindedomäne von Inositol-triphosphat-3-kinase A und beeinflusst die Eigenschaften von Aktin noch weniger als lifeact (Johnson and Schell, 2009). Solch eine indirekte Art der Markierung stand nur für Aktin zur Verfügung.

**Tab. 2.3 Verwendete Plasmide**

Plasmid	FP	Herkunft
$\beta$ 3-D <sup>723</sup> A/S <sup>752</sup> P	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
$\beta$ 3-D <sup>723</sup> A/Y <sup>759</sup> A	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
$\beta$ 3-S <sup>752</sup> P	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
$\beta$ 3-SPLH	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
$\beta$ 3-VE	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
$\beta$ 3-VEYA	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
$\beta$ 3-wt	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
$\beta$ 3-Y <sup>759</sup> A	EGFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
FAK	RFP	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
F-Tractin	EGFP	Michael Schell, Washington
F-Tractin	tdTomato	Michael Schell, Washington
ILK	mCherry	Addgene
Lifeact	EGFP	Michael Sixt, München
Lifeact	mCherry	Jubin Kashef, Karlsruhe
Paxillin	EGFP	Clare Waterman, NIH
Paxillin	mCherry	Bernhard Wehrle-Haller, Genf
Vinculin	mCherry	Christoph Ballestrem, Manchester

Die Vermehrung von Plasmiden erfolgte durch Transformation chemokompetener *E. coli* statt. Diese wurden mit Plasmiden auf Eis vermischt und für 1 Stunde inkubiert. Dann folgte ein Hitzeschock (42 °C, 45 Sekunden), um die Aufnahme der Plasmide zu befördern. Zur Vermehrung der Bakterien wurden diese erst eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Ausstrich auf LB-Agarplatten mit dem erforderlichen Selektionsantibiotikum (Kanamycin mit 50 µg/ml oder Ampicilin mit 100 µg/ml). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Transformierte Bakterien haben eine Resistenz gegen das Selektionsantibiotikum und können erfolgreich Kolonien bilden. Solche Kolonien wurden gepickt und in flüssigem LB-Medium mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum (Kanamycin mit 50 µg/ml oder Ampicilin mit 100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA-Aufreinigung erfolgte mit „Plasmid QIAPrep Spin Miniprep Kit“ oder mit „Plasmid Plus Midi Kit“ der Firma Qiagen entsprechend der Anleitung des Herstellers. Abschließend wurde die Konzentration der DNA durch Messung an einem NanoDrop (Thermo Scientific) festgestellt. Plasmide wurden anschließend bei -20 °C gelagert.

## **Lipofektion**

3T3  $\beta$ 3low, HFF und REF Zellen wurden mittels Lipofectamine 2000 (Life technologies) transfiziert. Dabei bilden kationische Lipide und anionische Nukleinsäuren einen Komplex und werden durch Endozytose von Zellen aufgenommen. Damit die DNA auch in den Kern gelangt und transkribiert wird, ist es am erfolgreichsten wenn eine Zelle eine Teilung unterläuft, während Plasmide im Zytoplasma vorliegen. Bei der Neubildung der Kernmembran werden die Plasmide in den Nukleus eingeschlossen und anschließend transkribiert. Daher ist die Zelldichte im Moment der Lipofektion sehr entscheidend für einen hohen Transfektionsgrad. Dazu wurden Zellen vormittags in eine Kammer einer 6-well Platte ausgesät (1:5 bei REF52 und HFF, 1:10 bei 3T3  $\beta$ 3low, jeweils von einer vollen Kulturflasche) und nachmittags transfiziert. Die Konfluenz betrug dann etwa 70%. Für die Transfektion wurden 5  $\mu$ l Lipofectamine 2000 und 2-3  $\mu$ g DNA getrennt in 250  $\mu$ l OptiMEM für 5 min inkubiert. Im Fall einer Doppeltransfektion wurden 2-3  $\mu$ g DNA pro Plasmid eingesetzt. Dann wurden beide Ansätze durch vorsichtiges pipettieren kombiniert und vermischt, und für 30 – 60 min inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz auf die Zellen in der 6-well Platte pipettiert. Am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel mit normalem Kulturmedium. Am zweiten Tag wurden Zellen trypsinisiert und für Experimente eingesetzt.

## **Elektroporation**

PCFs wurden nicht mittels Lipofektion, sondern mittels Elektroporation transfiziert. Dabei sorgt eine angelegte Spannung für die Permeabilisierung der Membran und die Aufnahme der DNA. Trypsinierte Zellen einer konfluenten Kulturflasche wurden zentrifugiert, das Pellet in eiskaltem hypotonischem Elektroporationspuffer (120 mM KCl, 10 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ,  $MgCl_2$ , 25 mM HEPES, 0,5 % Ficoll 400, in  $ddH_2O$ , pH 7,6) gewaschen, wieder zentrifugiert und in 500  $\mu$ l Elektroporationspuffer aufgenommen. Dieser Zellsuspension wurde auf zwei Küvetten verteilt und jeweils etwa 5  $\mu$ g DNA zugegeben. Die Elektroporation erfolgte mit einem exponentiell abfallenden Spannungsverlauf (250 V, 900  $\mu$ F, BioRad Elektroporator). Vor und nach der Elektroporation erfolgte jeweils eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Nach der letzten Inkubation wurden Zellen in 2 ml Zellkulturmedium in einer Kammer einer 6-well Platte überführt. Am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel. Am Tag darauf konnten Zellen für Versuche benutzt werden.

## 2.5 Immunhistochemie und Zellexperimente

### Standardfärbung

Die Standardmethode zur Fixierung von Zellen für eine nachfolgende immunhistochemische Färbung bestand in einer 10 minütigen Inkubation mit einer 4 % Paraformaldehyd-Lösung (PFA-Lösung) in PBS. Diese wurde auf 37 °C erwärmt und auf die Substrate mit Zellen appliziert. Nach Ablauf der Inkubation folgten drei Waschschrte für je fünf Minuten mit PBS + 0,1 % Tritonx-100 (Waschpuffer) zur Permeabilisierung der Zellmembran. Danach folgten die primären Antikörper gegen das Protein von Interesse. Diese wurden in der angegebenen Verdünnung (siehe Tab. 2.4) in PBS + 1 % BSA angesetzt. BSA diente dabei der Blockierung unspezifischer Bindestellen. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Danach folgten wiederum drei Waschschrte in gleicher Weise wie zuvor. Dem schloss sich die Inkubation mit den sekundären Antikörpern an. Diese sind mit Fluorophoren markiert und binden an die primären Antikörper. Damit erfolgt die indirekte Markierung des Proteins von Interesse. Falls Affinitätsmarkierungen genutzt wurden, wurden diese zusammen mit den sekundären Antikörpern eingesetzt. Diese Inkubation erfolgte wie zuvor für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Abschließend wurden Proben erneut dreimal für je fünf Minuten mit dem Waschpuffer gewaschen um unspezifische Markierungen zu reduzieren. Je nach weiterer Verwendung wurden die Substrate entweder in PBS gelagert (TIRF- oder dSTORM-Aufnahmen) oder in einer Mowiol-Lösung eingebettet.

**Tab. 2.4 Verwendete primäre Antikörper** (mkl = monoklonal; pkl = polyklonal). Die Verdünnung wurde jeweils in 1 % BSA in PBS erstellt.

Antigen	Antikörper-Typ	Organismus	Firma	Verdünnung
β1-Integrin (9EG7-Klon)	IgG mkl	Ratte	BD Transduction	1:100
Clathrin Coated Pits	IgG pkl	Kaninchen	Sigma-Aldrich	1:500
Fibronektin	IgG pkl	Kaninchen	Sigma-Aldrich	1:500
GFP	IgG pkl	Kaninchen	abcam	1:100
Paxillin	IgG mkl	Maus	BD Transduction	1:500
Talin	IgG mkl	Maus	Sigma-Aldrich	1:100
Tubulin	IgG mkl	Maus	Sigma-Aldrich	1:2000

**Tab. 2.5 Verwendete sekundäre Antikörper.** Die Verdünnung wurde jeweils in 1 % BSA in PBS erstellt.

Antigen	Farbstoff	Organismus	Firma	Verdünnung
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	Life technologies	1:200
Kaninchen IgG	Alexa Fluor 647	Ziege	Life technologies	1:200
Maus IgG	Alexa Fluor 488	Ziege	Life technologies	1:200
Maus IgG	Cy3	Ziege	Dianova	1:500
Maus IgG	Alexa Fluor 568	Ziege	Life technologies	1:200
Ratte IgG	Alexa Fluor 568	Ziege	Life technologies	1:200

**Tab. 2.6 Verwendete Affinitätsmarkierungen.** Die Verdünnung wurde jeweils in 1 % BSA in PBS erstellt.

Bindungspartner	Farbstoff	Firma	Verdünnung
Phalloidin	Alexa Fluor 488	Life technologies	1:200
Phalloidin	Alexa Fluor 568	Life technologies	1:200
DNA	DAPI	Hoechst	1:1000

### **Aktinfixierung für dSTORM-Aufnahmen**

Für dSTORM-Aufnahmen von Phalloidin gefärbten Aktin wurde ein angepasstes Fixierungs- und Markierungsprotokoll angewandt. Die Fixierung erfolgte dabei nach einem Protokoll aus der Elektronenmikroskopie (Rinnerthaler et al., 1988; Xu et al., 2012). Dazu wurden Zellen in einem ersten Schritt für 2 Minuten vorfixiert mit 0,3 % Glutaraldehyd und 0,25 % Tritonx-100 in einem Zytoskelett-Puffer (10 mM MES, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM Glukose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,6 in ddH<sub>2</sub>O). Danach folgte eine finale Fixierung mit 2 % Glutaraldehyd in Zytoskelett-Puffer für 10 min. Die Fixierung durch Glutaraldehyd verursacht eine Autofluoreszenz im grün – roten Spektrum. Um dies zu reduzieren folgte eine Inkubation mit einer frisch angesetzten NaBH<sub>4</sub>-Lösung (eine Spatelspitze in etwa 5 ml PBS) für 5 Minuten. Im Anschluss folgte eine indirekte Immunmarkierung gegen weitere Proteine außer Aktin (siehe Abb. 3.3, Paxillin in diesem Fall). Phalloidin wurde in einem separaten Schritt nach dem letzten Waschschrift der indirekten Immunmarkierung zugegeben. Andernfalls würden die intensiven Waschschrift der Immunfärbung Phalloidin zu stark auswaschen. Nach der Inkubation mit Phalloidin folgte entsprechend nur ein letzter Waschschrift.

## **dSTORM-Probenvorbereitung**

Unabhängig davon, ob Präparate nach dem Standardverfahren oder mit einer Fixierung aus der Elektronenmikroskopie fixiert wurden, erfordert eine dSTORM-Aufnahme wenigstens zwei zusätzliche Schritte in der Vorbereitung der Präparate. Zum einen müssen dSTORM-Rohdaten für eine laterale Drift während der Aufnahmedauer korrigiert werden. Dafür benötigt man nicht-blinkende, fluoreszierende Partikel unter der klassischen Auflösungsgrenze. In der späteren Auswertung erkennt ein Algorithmus, dass es sich um „Korrekturfluorophore“ handelt. Diese sollten immer an der gleichen Stelle in den Rohdaten sein. Die Rohdaten werden dann entsprechend angepasst, bzw. verschoben um dies zu gewährleisten. Als „Korrekturfluorophore“ wurden Goldbeads mit einem Durchmesser von 80 nm genutzt. Dafür wurden die letzten Waschschrte im Färbeprotokoll durch eine Inkubation von 10 % v/v Goldbeads in ddH<sub>2</sub>O für 30 min ersetzt. Dann folgten zwei Waschschrte für je 5 min mit PBS. Für die Verdünnung der Goldbeads wurde ddH<sub>2</sub>O benutzt, da Erfahrungswerte darauf hindeuteten, dass die Goldbeads in diesem Fall besser absinken.

Zum anderen muss dem Probenpuffer (für dSTORM-Aufnahmen hier immer PBS) ein Reduktionsmittel beigeetzt werden. Dafür wurden entweder 100 mM  $\beta$ -mercaptoethylamin oder 1 % v/v  $\beta$ -mercaptoethanol eingesetzt. Die Lösung wurde immer direkt vor der Aufnahme angeetzt. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,6 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer in dem die Substrate aufbewahrt wurden durch diesen Reduktionsmittel-haltigen Puffer ersetzt.

## **Experimente mit differenziellen FN/VN-Substraten**

Viele Experimente dieser Arbeit wurden mit 3T3  $\beta$ 3low Zellen durchgeführt, die für verschiedene  $\beta$ 3-Integrin-Mutationen oder  $\beta$ 3-Integrin-wt transfiziert und auf differenziellen FN/VN-Substraten kultiviert wurden. Dazu wurden Zellen wie oben (Kap. 2.4, „Lipofektion“) beschrieben transfiziert. In fast allen Fällen sollte ein zweites Protein visualisiert werden. Dies erfolgte entweder durch Transfektion (in einem Ansatz mit dem jeweiligen  $\beta$ 3-Plasmid) oder durch Immunhistochemie (Kap. 2.5). Am zweiten Tag nach dem Start der Transfektion wurden Zellen trypsinisiert wie beschrieben (Kap. 2.3, „Routine-Zellkultur“). Allerdings wurde die Trypsinierung nicht durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, sondern durch eine *soybean trypsin inhibitor* – Lösung (STI-Lösung; 0,5 mg/ml). 250  $\mu$ l Trypsin/EDTA wurden durch Zugabe von 4,75 ml STI-Lösung inhibiert. Das folgende Experiment fand in serumfreien Medium statt. Beides hat zum Ziel Anlagerung von Serumproteinen aus dem Medium an das FN/VN-Substrat zu verhindern. Auf ein Deckglas mit einem FN/VN-Muster wurden 150 00 (3T3  $\beta$ 3low) oder 250 000 (GD25 Linien) Zellen ausgesät. Die Kultivierung erfolgte für zwei (3T3  $\beta$ 3low), bzw. vier Stunden (GD25 Linien). FN/VN-Substrate wurden mittels direktem Proteinstempeln (Kap. 2.2, „Direktes Proteinstempeln“) hergestellt, wobei FN (vermischt mit FN Alexa Fluor 647, siehe Kap. 2.2, „Proteinlabeln“) gestempelt wurde und anschließend mit einer VN-Lösung überschichtet wurde. Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurden die Proben mit 4 % PFA fixiert und falls erforderlich mittels Immunhistochemie (siehe oben, „Standardfärbung“) für ein weiteres Protein gefärbt. Anschließend wurden die Proben mit Mowiol

eingebettet und nach dessen Aushärten mikroskopisch analysiert (mittels SIM (siehe Kap. 1.7, „*Structured Illumination Microscopy*“) oder mit einem Apotom mit optischem Schnitt und anschließender Dekonvolution).

### **Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen**

Die Zeitrafferaufnahmen in dieser Arbeit wurden alle mit einem Zeiss Elyra PS.1 (siehe Kap. 2.6) mit SIM oder TIRF-Beleuchtung erstellt. Zellen wurden dafür entweder mit Lipofektion (Kap. 2.4, „*Lipofektion*“) oder mit Elektroporation (Kap. 2.4, „*Elektroporation*“) mit dem gewünschten Plasmid, bzw. den gewünschten Plasmiden transfiziert. Die mikroskopische Analyse erfolgte am zweiten Tag nach dem Start der Transfektion. Als Substrate wurden stets Deckgläser mit 24 mm Durchmesser benutzt. Diese konnten in magnetischen Deckglashaltern (hergestellt von der Werkstatt des Instituts für Angewandte Physik, KIT) eingespannt und mit Medium überschichtet werden. Als Medium für Zeitrafferaufnahmen wurde ein *Imagingmedium* (F12-Medium + 25 mM HEPES + 200 mM L-Glutamin + 1 % Pen/Strep, + 10 % FCS, pH 7,2) benutzt. Deckgläser im Halter wurden mit diesem Medium (bereits auf 37 °C vorgewärmt) überschichtet und im Mikroskop auf dem Objektisch positioniert. Die Inkubationsbox des Mikroskops wurde zuvor auf 37 °C aufgeheizt. Frühestens nach 30 min wurden dann trypsinierte Zellen auf die Substrate pipettiert. Sobald Zellen sich ausreichend abgesetzt hatten wurde mit der Mikroskopie begonnen.

## **2.6 Mikroskopie und Auswertung**

### **Mikroskope und Bilderstellung**

Apotom Imager Z1, Carl Zeiss:	aufrechtes Mikroskop, optischer Schnitt durch Gitterprojektion in die Fokusebene  Plan Apochromat 63x/1.4 Ölimmersion  Filter 38 HE, 43 HE, 50, 49 HE
LSM 510 Meta, Carl Zeiss:	inverses konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM)  Plan Apochromat 63x/1.4 Ölimmersion  Filter BP 505-550, BP 575-615, LP 650, BP 420-480
Elyra PS.1, Carl Zeiss:	inverses Fluoreszenzmikroskop für Hocharlösung  Plan Apochromat 63x/1.4 Ölimmersion

Plan Apochromat 100x/1.46 Ölimmersion

Filter BP 500-550, Doppel-BP 420-545 / 575-640, LP 650

Beim hier verwendeten Zeiss Elyra PS.1 handelte es sich um einen Prototyp des späteren Seriengerätes. Insbesondere die Ausstattung der Hardware entsprach nahezu vollständig den späteren Seriengeräten. Abweichungen betrafen die Leistung der Laser (488 nm: 100 mW; 568 nm: 50 mW; 633 nm: 50 mW; 405 nm: 50 mW) und die Anzahl der Gitter für die strukturierte Beleuchtung. Der Prototyp hatte ein Gitter für den Wellenlängenbereich 405 – 488 nm, und eines für den Bereich 568 – 633 nm. Spätere Geräte haben mehr Gitter, um für verschiedene Experimente eine größere Flexibilität zu bieten.

Größere Unterschiede gab es bei der Software. Viele Möglichkeiten zum Erstellen von Experimenten mit automatischen Routinen waren beim Prototypen nicht vorhanden. Daher musste beispielsweise bei Zeitrafferaufnahmen der jeweils nächste Zeitpunkt manuell aufgenommen werden. Ebenso musste der Kanalwechsel manuell erfolgen. Dadurch kam es zu einem zeitlichen Abstand zweier Fluoreszenzkanäle von bis zu 5 Sekunden.

SIM-Aufnahmen für quantitative und qualitative Vergleiche zwischen SIM und anderen Mikroskopiemethoden wurden mit fünf Rotationen des Gitters erstellt, um eine bestmögliche Auflösung zu erhalten. Alle anderen Experimente, insbesondere Zeitrafferaufnahmen, wurden mit drei Rotationen erstellt.

Für dSTORM-Aufnahmen wurden möglichst hohe Laserintensitäten eingesetzt und Belichtungszeiten von 30 – 50 ms gewählt. Ziel war es, Überbelichtung zu vermeiden und die Dichte an aktiven Fluorophoren gering genug zu halten, um eine klare Trennung der Intensitätscenter zu ermöglichen. Es wurden zwischen 25 000 – 75 000 Aufnahmen für ein dSTORM-Bild erstellt.

Die Erstellung der Bilder und Filme aus Rohdaten (SIM und dSTORM) erfolgte, wenn nicht anders, angegeben mit der Zeiss-Software ZEN. Mehrere Auswertungen (Intensitätsmessungen in Abb. 3.7, Heatmaps in Abb. 3.9) wurden mit dem Programm ImageJ (NIH, USA) erstellt. Messungen von Halbwertsbreiten (siehe Abb. 3.1 und 3.7) und eine Untersuchung mittels der sogenannten Ripley-Funktion (Abb. 3.4) wurden mit Matlab (MathWorks, USA) durchgeführt. Das Programm zur Kalkulation von Halbwertsbreiten wurde von Dr. Sven Heider (Geophysikalisches Institut, KIT) erstellt. Analysen mittels der Ripley-Funktion wurden durch Felix Fiederling (Zoologisches Institut, KIT) durchgeführt. Diagramme wurden mittels Microsoft Excel (Microsoft) erstellt. Die Abbildungen dieser Arbeit wurden mittels GIMP (freies Bildbearbeitungsprogramm) erstellt.

## 3 Ergebnisse

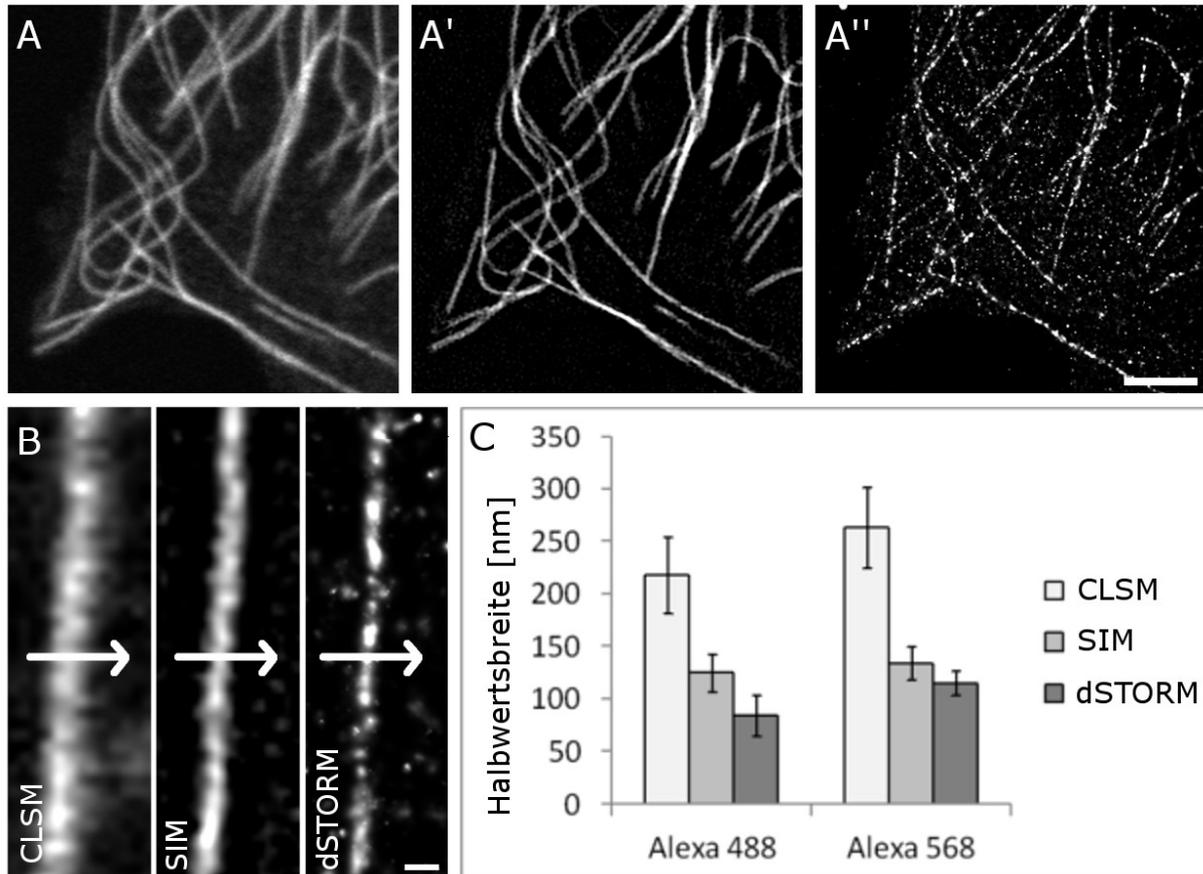
### 3.1 Hochaufgelöste Fluoreszenzmikroskopie und strukturierte Substrate für die Zellbiologie

Entstehende Zell-Matrix-Adhäsionen (*cell matrix adhesions*, CMAs) sind von ihrer Größe an oder unter der Abbeschen Beugungsgrenze. Daher sind neue mikroskopische Hochauflösungsmethoden von besonderem Interesse für die Untersuchung dieser Strukturen. Für diese Arbeit stand ein Prototyp des Zeiss Elyra PS.1 Mikroskops zur Verfügung, das die Hochauflösungsmethoden *Superresolution Structured Illumination Microscopy* (SIM) und *direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* (dSTORM) vereint. Um die Möglichkeiten und eventuellen Limitationen dieser neuen Techniken in biologischen Proben zu untersuchen, wurden vergleichende Aufnahmen mit etablierter konfokaler Laserscanningmikroskopie (CLSM), SIM und einem Vertreter der pointillistischen Einzellokalisierungsmethoden, dSTORM, an verschiedenen biologischen Strukturen durchgeführt.

#### 3.1.1 Vergleich von CLSM, SIM und dSTORM in biologischen Proben

Einzelne Mikrotubuli (MT) haben einen Durchmesser von ca. 25 nm und liegen zumindest in der Peripherie einer Zelle häufig als Einzelfilamente vor (Abb. 3.1, A-A''). Dadurch haben MT eine weite Verbreitung als biologische Testobjekte für neue Mikroskopiemethoden erreicht (Burnette et al., 2011b; Dempsey et al., 2011). Die Färbung der MT in primären Hühnerfibroblasten (*primary chicken fibroblast*, PCF) erfolgte durch indirekte Immunmarkierung mit den Fluorophoren Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 568. Um die Vergleichbarkeit der Messungen zu verbessern, wurden jeweils die gleichen Zellen aufgenommen und Intensitätsprofile an der gleichen Stelle der jeweiligen MT gemessen (Abb. 3.1, B). Aus dem Intensitätsprofil kann die Halbwertsbreite als Maß für den MT-Durchmesser bestimmt werden (Abb. 3.1, C, 62 Einzelmessungen für Alexa Fluor 488 und 14 Einzelmessungen für Alexa Fluor 568). Mit CLSM ergeben sich 217 nm für Alexa Fluor 488 und 263 nm für Alexa Fluor 568 gefärbte MT. SIM zeigt im Vergleich eine deutliche Verbesserung der Auflösung mit Halbwertsbreiten von 125 nm für Alexa Fluor 488 und 134 nm für Alexa Fluor 568. SIM zeigt damit eine 1,7 – 2-fache Verbesserung der Auflösung gegenüber CLSM, was im Bereich der theoretischen Vorhersagen liegt (Gustafsson, 2000). Im Vergleich dazu führt dSTORM zu einer weiteren Verbesserung der Auflösung mit 84 nm im Fall von Alexa Fluor 488 und 115 nm für Alexa Fluor 568. Diese Werte liegen deutlich über den 27 nm, die mit pointillistischen Methoden für die Messung von MT – Halbwertsbreiten prinzipiell möglich sind (Vaughan et al., 2012). Allerdings entscheiden bei diesen Methoden in erster Linie Lokalisierungsgenauigkeit, Labelgröße und Labeldichte über die Auflösung. Für indirekte Immunfluoreszenz sind daher aufgrund der Größe der

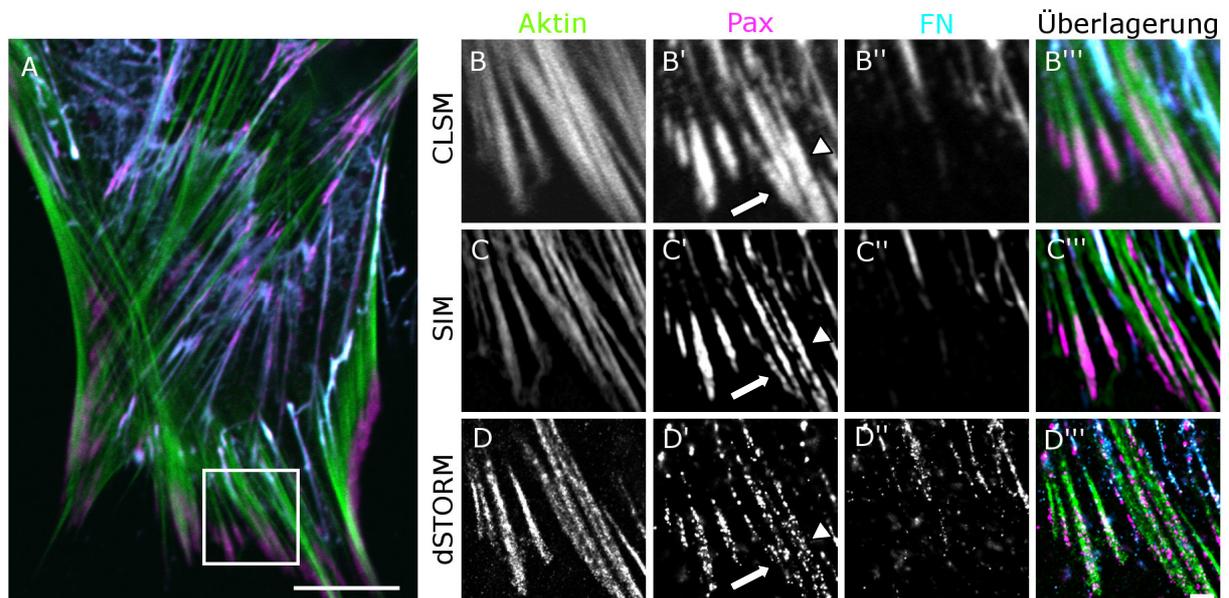
primären und sekundären Antikörper (je 7 – 10 nm) deutliche Zunahmen des MT-Durchmessers zu erwarten.



**Abb. 3.1: Quantitativer Vergleich von CLSM, SIM und dSTORM anhand von Mikrotubuli-Halbwertsbreiten.** Zellen wurden mit indirekter Immunohistochemie für Mikrotubuli (MT) gefärbt. Als Fluorophor wurde entweder Alexa Fluor 488 (Alexa 488) oder Alexa Fluor 568 (Alexa 568) benutzt. Die gleichen Stellen wurden für die jeweiligen Färbungen mit (A) konfokaler Laserscanningmikroskopie (CLSM), (A') Superresolution Structured Illumination Microscopy (SIM) und (A'') direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM) untersucht. (B) An der gleichen Stelle von einzelnen MTs in einer Zelle wurde quer zur MT-Ausrichtung mit allen drei Techniken das Intensitätsprofil gemessen. (C) Aus dem Profil wurde die Halbwertsbreite errechnet und das arithmetische Mittel und die Standardabweichung von 62 Messungen für Alexa 488 Proben und 14 Messungen für Alexa 568 Proben bestimmt. Maßstabsbalken: (A'') 2  $\mu$ m, (B) 200 nm.

Im Weiteren wurde untersucht inwiefern SIM und dSTORM zur Darstellung von Bestandteilen von CMAs geeignet sind. Dazu wurden bei PCF Zellen Fibronectin (FN) als Protein der ECM gewählt, Paxillin als klassischer Marker für CMAs und Aktin als Bestandteil des Zytoskeletts, das CMAs miteinander und dem Rest der Zelle verbindet (Abb. 3.2). Es wurde erneut darauf geachtet, die gleichen Zellen und die gleichen Ausschnitte in den jeweiligen Zellen zu wählen, um eine bestmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen. Die vergleichenden Aufnahmen zeigen, dass alle drei Proteine mit SIM und dSTORM darstellbar sind. Sämtliche mit CLSM erkennbaren Strukturen sind auch mit den nanoskopischen Methoden zu erkennen. Abgesehen von der erwarteten höheren Auflösung gibt es keine Abweichungen oder fehlenden Strukturen im Vergleich zur CLSM. Für alle Proteine lassen sich im Vergleich zur CLSM jedoch mehr Details erkennen. Insbesondere bei Paxillin wird dies deutlich. Während ein CMA mit CLSM als ein großer, zusammenhängender Kontakt

erscheint, zerfällt er mit SIM in kleinere Subkontakte (Abb. 3.2, B, Pfeile). Betrachtet man einzelne Kontakte mit dSTORM genauer fällt auf, dass diese sich in noch kleinere Substrukturen gliedern (Abb. 3.2, B, Pfeilspitzen, vgl. auch (Shroff et al., 2007)).



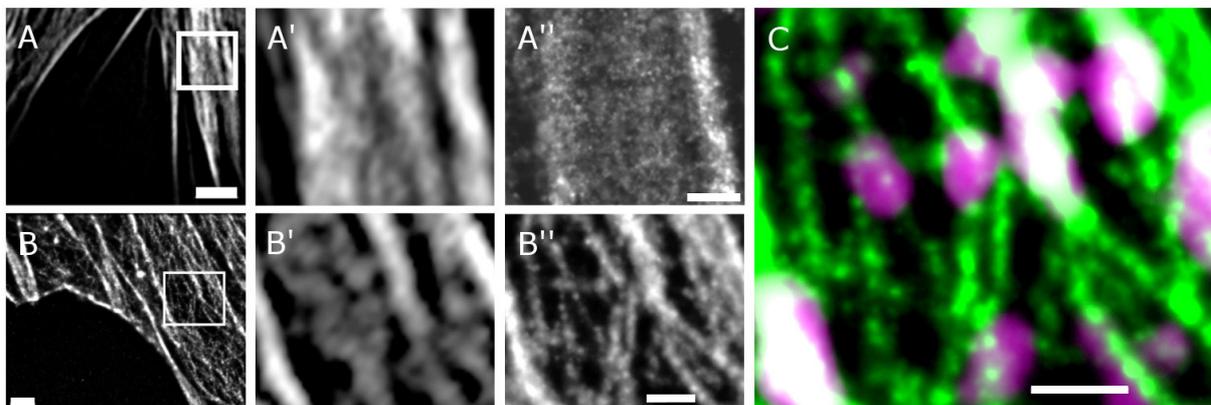
**Abb. 3.2: Qualitativer Vergleich von CLSM, SIM und dSTORM anhand von Cell-Matrix-Adhesions (CMA) Bestandteilen.** (A) Hühnerfibroblasten wurden mit Phalloidin Alexa Fluor 488 für Aktin (grün), mit indirekter Immunhistochemie für Paxillin (magenta) (Pax) mit Alexa Fluor 568 und für Fibronectin (cyan) (FN) mit Cy5 gefärbt. Die gleiche Zelle wurde mit konfokaler Laserscanningmikroskopie (CLSM), mit Superresolution Structured Illumination Microscopy (SIM) und mit direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM) aufgenommen. Die weiße Box in (A) ist vergrößert und in Graustufen separat für (B, C, D) Aktin, für (B', C', D') Pax, für (B'', C'', D'') FN und (B''', C''', D''') als Überlagerung gezeigt. Die weißen Pfeile (B', C', D') zeigen wie durch verbesserte Auflösung ein CMA in kleinere Substrukturen zerfällt. Weiße Pfeilspitzen (B'', C'', D'') zeigen wie diese bei weiterer Auflösungsverbesserung in noch kleinere Strukturen zerfallen. Maßstabsbalken: (A) 10  $\mu\text{m}$ , (D''') 1  $\mu\text{m}$ .

Einzellokalisierungstechniken wie dSTORM beruhen stark auf den photophysikalischen Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe (Dempsey et al., 2011). Daher kann es schwierig sein, Mehrfachfärbungen mit dieser Technik darzustellen. Die für Aktin und Paxillin verwendeten Fluorophore Alexa Fluor 488 und Alexa Fluor 568 sind ohne weiteres kombinierbar, der für die Darstellung von FN verwendete Cy5 Fluorophor benötigt jedoch eine andere Zusammensetzung des Puffers während der Aufnahme (Heilemann et al., 2009). Trotzdem war es möglich für FN ein dSTORM-Bild zu erzeugen, das zur entsprechenden CLSM Aufnahme vergleichbar ist und eine höhere Auflösung zeigt. (Abb. 3.2, D'')

Zusammengefasst zeigen sowohl der quantitative (Abb. 3.1), als auch der qualitative (Abb. 3.2) Vergleich, dass SIM und dSTORM in biologischen Proben entsprechend den theoretischen Erwartungen zu höheren Auflösungen führen. dSTORM zeigt dabei im Vergleich zu allen Methoden die größte Steigerung. Während für SIM die Probenpräparation aber komplett anhand der etablierten Protokolle für bisherige Methoden erfolgen kann, erfordert dSTORM verschiedene Anpassungen (vgl. auch Kap. 2.5, „dSTORM-Probenvorbereitung“). Wie bereits erwähnt ist nicht jede Farbstoffkombination möglich und die Zusammensetzung des Puffers während der Aufnahme muss

auf die Farbstoffe abgestimmt sein. Außerdem waren zumindest bei dem verwendeten Mikroskop Korrekturbeads in der Probe erforderlich um laterale Drift zu korrigieren. Und schließlich dauert die Aufnahme der Rohdaten mehrere Minuten und die Verarbeitung der Daten erfordert Zeit und Erfahrung bei der Wahl geeigneter Parameter.

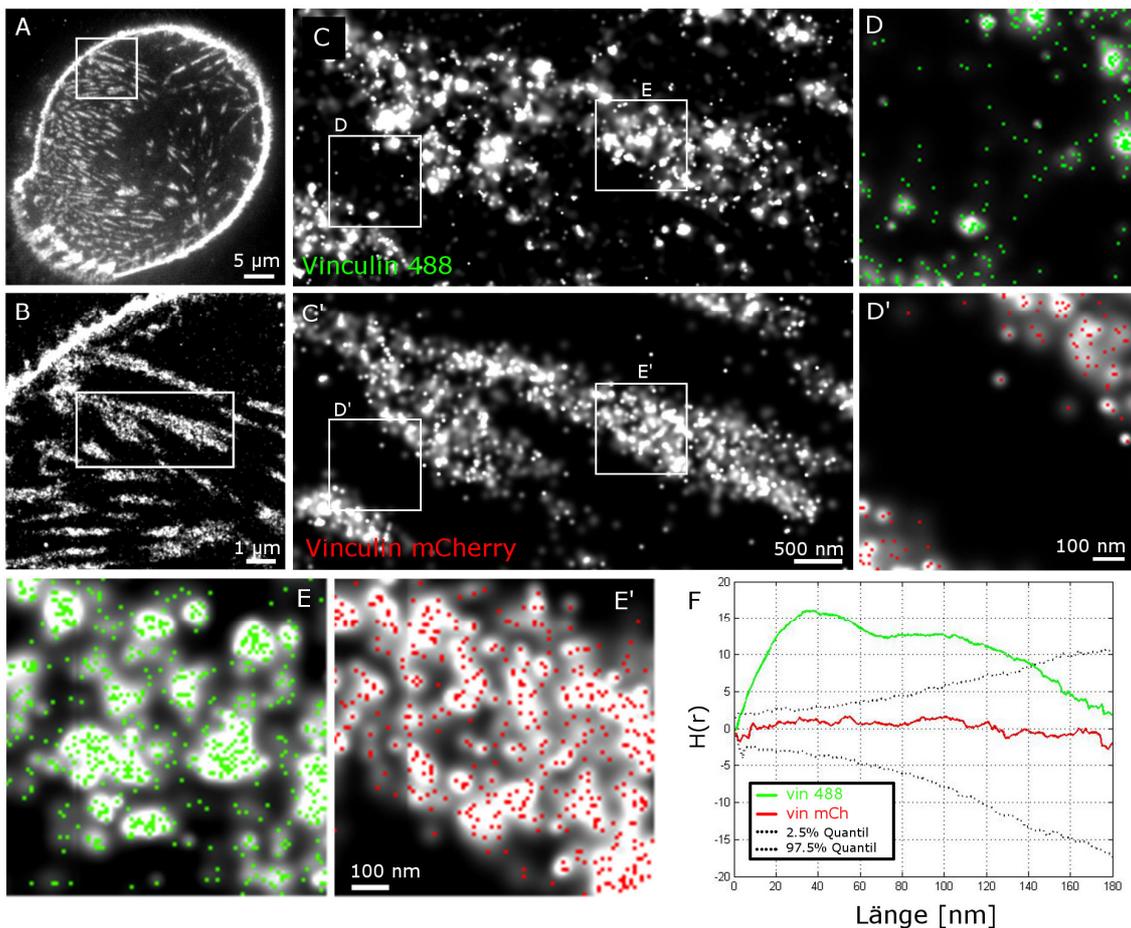
Bei genauer Betrachtung von Aktin-Aufnahmen mit dSTORM zeigt sich ein weiteres Problem der Technik. Im Vergleich zu SIM Aufnahmen ist kein wesentlicher Zugewinn an Auflösung zu erkennen (Abb 3.2, C, D, Abb. 3.3 A', A''). Diese Proben wurden mit einer gebräuchlichen 4 % Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Im Vergleich zu SIM Aufnahmen erkennt man hier in den dSTORM entgegen der Erwartung Aufnahmen weniger Details. Benutzt man aber statt Paraformaldehyd eine in der Elektronenmikroskopie gebräuchliche Glutaraldehyd-basierte Fixierung (Rinnerthaler et al., 1988; Xu et al., 2012), zeigen sich in dSTORM Aufnahmen selbst feine Aktinfilamente, die mit SIM nicht aufzulösen sind (Abb. 3.3, B', B''). Ein Problem einer starken Fixierung kann der Verlust der Antigenität sein. Es war trotzdem möglich Paxillin anzufärben und mittels SIM nachzuweisen (Abb. 3.3, C).



**Abb. 3.3: Elektronenmikroskopische Fixierungsmethode ist notwendig zur Darstellung von Aktin mittels dSTORM.** Hühnerfibroblasten wurden entweder (A-A'') mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) oder (B-B'', C) mit einer Glutaraldehyd-basierten (GA) Methode fixiert. Anschließend erfolgte eine Färbung von Aktin mit Phalloidin Alexa Fluor 488. Die Vergrößerung der weißen Box in (A) zeigt, dass bei einer PFA-Fixierung im Vergleich zur (A') Superresolution Structured Illumination Microscopy (SIM) Aufnahme keine Auflösungssteigerung durch (A'') direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (dSTORM) möglich ist. Im Vergleich zeigt die Vergrößerung der (B) GA-Fixierung eine deutliche Auflösungssteigerung von der (B') SIM- zur (B'') dSTORM-Aufnahme. (C) Eine indirekte immunhistochemische Färbung für Paxillin (magenta) ist auch mit GA-Fixierung und Aktinfärbung (grün) möglich. (C) ist die vergrößerte Aktin-dSTORM Darstellung (B''); die Paxillinaufnahme wurde mit SIM erstellt. Maßstabsbalken: (A, B) 1  $\mu$ m, (A'', B'', C) 500 nm.

Pointillistische Aufnahmen sind sehr sensitiv und weisen selbst Einzelmoleküle nach. Gleichzeitig entstehen bei der Erstellung des Bildes Datentabellen über die Farbstofflokalisierung, die sich zur Quantifizierung eignen. Die Interpretation solcher Daten kann aber erschwert oder verfälscht werden, falls Farbstoffe durch mangelnde Spezifität nicht an die Struktur von Interesse gekoppelt sind. Um dies zu untersuchen, wurde eine Antikörperfärbung direkt mit einem genetischen Labeling verglichen (Abb. 3.4). Eine PCF Zelle wurde für Vinculin-mCherry transfiziert und nach einer 48h Inkubationszeit fixiert und mit einer indirekten Immunfärbung gegen Vinculin mit Alexa Fluor 488 gefärbt. Anschließend wurden von beiden Fluorophoren pointillistische Aufnahmen erstellt. mCherry ist kein schaltbares fluoreszentes Protein (FP), wie es sonst für *Photoactivated Localization*

*Microscopy* (PALM) verwendet wird. Mit den Bedingungen für Alexa Fluor 488 (1 % v/v  $\beta$ -mercaptoethanol in PBS als Puffer) war es dennoch möglich, eine hochaufgelöste pointillistische Aufnahme zu erstellen (Abb. 3.4, A, B, C'). Vergleicht man beide Aufnahmen sieht man außerhalb von CMAs viele Lokalisierungen von Alexa Fluor 488 Farbstoffen, ohne dass es eine vergleichbare Anzahl an Vinculin-mCherry Lokalisationen an dieser Stelle gäbe (Abb. 3.4, D, D'). Da Vinculin weder ein Transmembranprotein ist, noch direkt an solche bindet, sollte es in einer mit TIRF-Beleuchtung erstellten dSTORM-Aufnahme nur in CMAs zu sehen sein. Bei reinen Alexa Fluor 488 - Lokalisierungen außerhalb von CMAs handelt es sich daher eher um Signale unspezifisch gebundener Antikörper. Quantifiziert man an je drei Stellen innerhalb und außerhalb eines CMAs die Anzahl der Fluorophorlokalisierungen sieht man, dass es innerhalb etwa 2-mal mehr Lokalisationen bei einer Alexa Fluor 488 - Färbung, als bei einer mCherry-Färbung gibt (Tab. 3.1). Die Anzahl der Lokalisationen außerhalb eines CMAs liegt dagegen ca. 17-mal höher. Weitere Optimierungsschritte mit zusätzlichen Blockierungs- und Waschschrritten könnten diesen Unterschied reduzieren. Es ist aber nicht davon auszugehen, dass mit Antikörpern eine ähnlich spezifische Färbung wie mit genetischem Labeling mit FPs möglich ist.



**Abb. 3.4: Indirekte Immunmarkierung zeigt eine veränderte Lokalisation von Vinculin im Vergleich zu fluoreszenten Proteinen.** Hühnerfibroblasten wurden für (A, B, C', D', E') Vinculin-mCherry transfiziert und (C, D, E) mit indirekter Immunhistochemie mit Alexa Fluor 488 gegen Vinculin (Vinculin 488) gefärbt. Beide Färbungen wurden in Anwesenheit von 1 % v/v Mercaptoethanol mit pointillistischer Technik aufgenommen. (D, E) Grüne Punkte zeigen das Lokalisationszentrum von Alexa Fluor 488, (C', D') während rote Punkte das Lokalisationszentrum von mCherry zeigen. (F) Die Verteilung von Lokalisationszentren aus jeweils zehn 600 x

600 nm Ausschnitten für Vinculin 488 (grüne Linie), bzw. Vinculin-mCherry (rote Linie) wurde mit einer Ripley-Funktion  $H(R)$  für eine Poisson-Normalverteilung getestet. Gestrichelte Linien entsprechen 0,025 und 0,975 Quantilen von 999 Simulationen. Der Verlauf der Kurven zeigt eine Clustering für Vinculin 488, während die Verteilung von Vinculin mCherry einer Poisson-Normalverteilung entspricht. Maßstabsbalken: (A) 5  $\mu\text{m}$ , (B) 1  $\mu\text{m}$ , (C') 500 nm, (D', E') 100 nm.

**Tab. 3.1: Indirekte Immunmarkierung führt bei dSTORM zu mehr Hintergrund.** An drei verschiedenen Stellen innerhalb und außerhalb von CMA wurden jeweils 600 x 600 nm Quadrate gewählt und die Anzahl der Lokalisationen von Fluorophoren quantifiziert.

Messung	Hintergrund		CMA	
	Alexa Fluor 488	mCherry	Alexa Fluor 488	mCherry
#1	23	0	194	93
#2	15	1	156	120
#3	27	3	225	75
Mittelwert	21,7	1,3	191,7	96
1/ $\mu\text{m}^2$	60,2	3,7	532,4	266,7

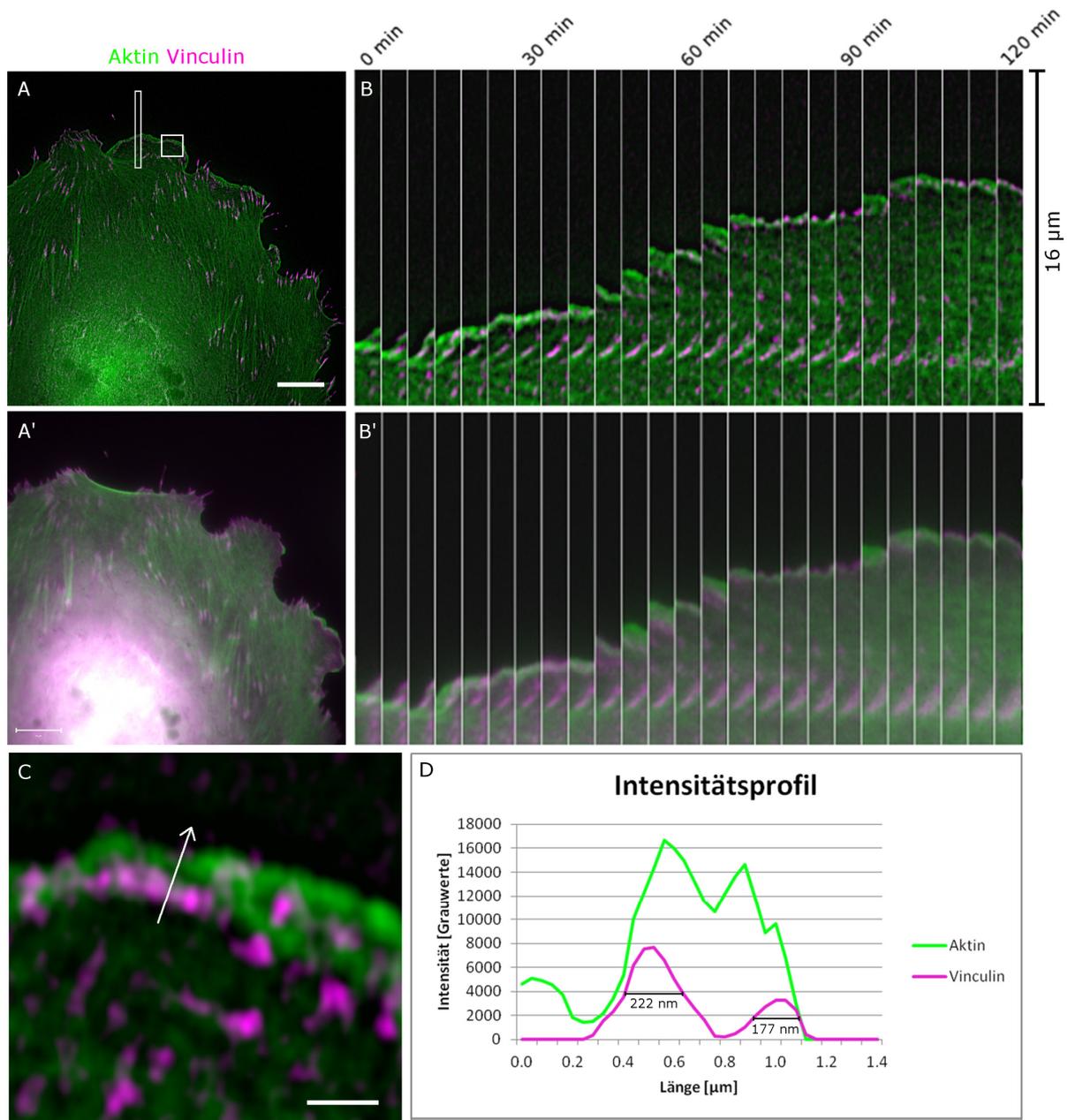
Ein weiterer Unterschied, der im Vergleich der beiden Färbungen sichtbar wird, ist, dass in der Alexa Fluor 488 - Färbung deutlich mehr Cluster für die Lokalisierungszentren der Fluorophore zu sehen sind (Abb. 3.4, E, E'). Um dies quantitativ zu analysieren wurde die sogenannte Ripley-Funktion gewählt (Dixon, 2002; Kiskowski et al., 2009). In der hier verwendeten Form zeigt dabei ein Funktionswert von Null eine Poisson-Normalverteilung an, während eine Abweichung zu positiven Funktionswerten einen Cluster und eine Abweichung zu negativen Werten eine Dispersion anzeigt. Der x-Wert, bei dem der Funktionswert sein Maximum hat ist ein Indikator für die Cluster-, bzw. Dispersionsgröße (Kiskowski et al., 2009). Wie man in der Analyse sieht (Abb. 3.4, F), zeigt mit Alexa Fluor 488 gefärbtes Vinculin Cluster mit einer Größe von ca. 38 nm, während diese für Vinculin-mCherry nicht zu detektieren sind. Das verwendete Plasmid für Vinculin-mCherry wurde bereits in Publikationen benutzt und hat sowohl in fixierten Proben, als auch in Zeitrafferaufnahmen ein physiologisches Verhalten gezeigt (Carisey et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass die Cluster eher ein Effekt der Färbungsmethode sind, als das sie der tatsächlichen Verteilung des Proteins entsprechen.

Damit zeigt sich, dass dSTORM zwar eine sehr gute Auflösung aufweist. Dafür erfordert aber die Probenpräparation besondere Aufmerksamkeit. Zum einen sind etablierte Fixiermethoden unter Umständen nicht ausreichend um Feinstrukturen für eine Auflösung unter 100 nm zu erhalten. Zum anderen ist eine indirekte Immunfärbung nicht nur wegen Labelgröße und -dichte problematisch, sondern kann auch wegen unspezifischer Bindung und einer falschen Wiedergabe der Proteinverteilung die Interpretation von dSTORM-Daten erschweren.

### 3.1.2 Zeitrafferaufnahmen mit SIM

Mikroskopie an fixierten Proben ist ein wichtiger Bestandteil biologischer Forschung. Viele Fragestellungen können aber nur durch Mikroskopie lebender Zellen zufriedenstellend beantwortet werden. Daher ist es auch für den neuen Bereich der Hochauflösungsmikroskopie entscheidend eine Kombination mit Zeitrafferaufnahmen an lebenden Zellen zu ermöglichen. Im Folgenden wurde untersucht inwiefern SIM dafür geeignet ist. Entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit standen dabei CMAs und ihre Verbindung zum Aktin-Zytoskelett im Vordergrund. Humane Fibroblasten (*Human Foreskin Fibroblast*, HFF) wurden für Vinculin-mCherry und lifeact-EGFP transfiziert und nach 48h Expressionszeit auf FN beschichtete Deckgläser ausgesät (Abb. 3.5, A). Bei einer Aufnahmezeit von 1 Bild alle 5 Minuten waren Aufnahmen über 120 min möglich, ohne dass ein Bleichen der Farbstoffe erkennbar wäre. In dieser Zeit hat die Zelle wiederholt Ausläufer gebildet und zurück gebildet (Abb. 3.5, B, Video 1), was als Maß für ein physiologisches Verhalten angenommen wird (Jones et al., 2011). Werden Zellen durch zu intensives Anregungslicht oder auf andere Arten gestresst zieht sich die Zelle zusammen, ohne dass es zu wiederholten Zyklen der Bildung neuer Ausläufer kommt. Epifluoreszenzbilder, bzw. -kymographen zeigen im Vergleich den deutlichen Gewinn an Auflösung, den SIM auch bei Zeitrafferaufnahmen liefert (Abb. 3.5 A', B').

Vor der Hochauflösungsmikroskopie war TIRF-Mikroskopie der Standard für die Zeitrafferaufnahmen von CMAs und ihrer Entstehung. *Nascent adhesions* (NA) wurden unter anderem mit dieser Methode eingehend studiert (Choi et al., 2008). Eines der wichtigsten Kriterien für NAs ist ihre kreisrunde Form und ein Durchmesser von 200 nm. Da dies an der Beugungsgrenze von TIRF-Mikroskopen liegt, ist allerdings unklar, ob dies die wahre Größe von NAs ist, oder ob sie wesentlich kleiner sein können (Choi et al., 2008). Beispielhafte Messungen der NA-Größe in diesen SIM-Daten zeigen, dass NAs mit 222 nm, bzw. 177 nm unter dem klassischen Auflösungslimit bei dieser Wellenlänge liegen (Abb. 3.5 C, D; vgl. Abb. 3.1 C, 263 nm Durchmesser für Alexa Fluor 568 – gefärbte Mikrotubuli bei CLSM-Messungen). Zeitrafferaufnahmen machen es möglich, zu verfolgen wie solche ersten Vinculincluster zu CMAs reifen. Damit kann man sicher sein, dass es sich wirklich um NAs handelt. Dies zeigt die prinzipielle Eignung und Nützlichkeit von SIM für Zeitrafferaufnahmen bei der Entstehung von CMAs.



**Abb.3.5: SR-SIM ist geeignet für Zeitrafferaufnahmen von CMA-Entstehung und -Reifung.** (A) Für lifeact-GFP (grün) und Vinculin-mCherry (magenta) transfizierte humane Fibroblastenzellen wurden auf einer homogenen FN-Beschichtung ausgesät und mit einer Bildrate von 1 pro 5 Minuten mittels SR-SIM aufgenommen. (A') Das Epifluoreszenzbild von (A) zeigt weniger Details und ist mangels optischem Schnitt im Zellzentrum überstrahlt. (B) Das schmale Rechteck aus (A) als Kymograph (Zeitachse in x-Richtung) zeigt die Bildung von Zellausläufern mit Lamellipodien und anschließende Retraktion mit Reifung von CMAs. Bemerkenswerterweise zeigt die Zelle über den kompletten Aufnahmezeitraum ein physiologisches Verhalten und es tritt kein nennenswertes Bleichen der Fluorophore auf. (B') Der gleiche Kymograph gebildet aus Epifluoreszenzdaten zeigt eine deutlich schlechtere Auflösung. (C) Die Vergrößerung des weißen Quadrates aus (A) zeigt entstehende *nascent adhesions* im Lamellipodium. (D) Die Profilmessung entlang des weißen Pfeils in (C) zeigt den Intensitätsverlauf von Aktin und Vinculin. Das Lamellipodium ist durch eine hohe Intensität im Vergleich zum proximalen Lamellum klar abgegrenzt. Im Lamellipodium zeigt Vinculin zwei Intensitätsmaxima, die potenzielle *nascent adhesions* darstellen. Angesichts der Wellenlänge von mCherry liegt die jeweilige Halbwertsbreite der Intensitätsverläufe unter der klassischen Auflösungsgrenze (vgl. Abb. 3.1). Maßstabsbalken: (A) 10  $\mu\text{m}$ , (A'') 1  $\mu\text{m}$ .

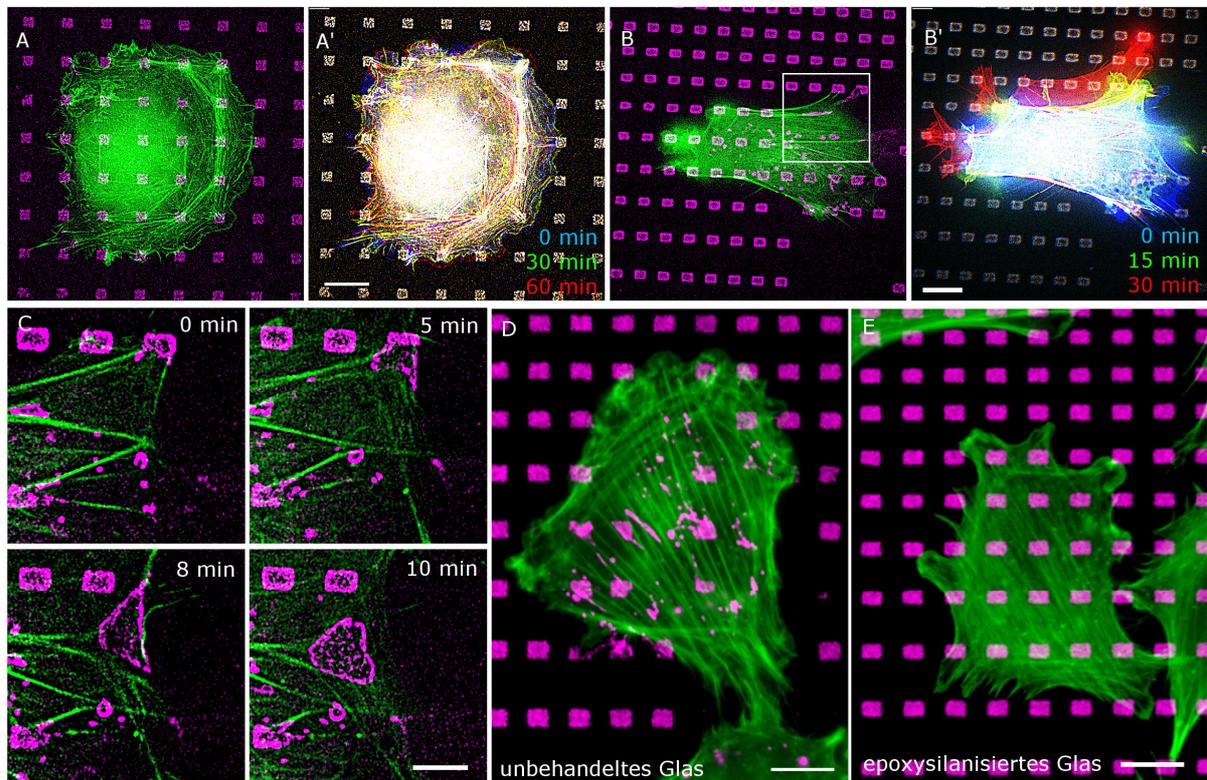
### 3.1.3 Kombination von Microcontact-Printing und inverser Mikroskopie

Strukturierte Substrate haben eine weite Verbreitung in zellbiologischen Studien gefunden. Strukturen in der Größenordnung von Einzelzellen haben z.B. zu neuen Einsichten über die Orientierung der Zellteilungsebene in der Mitose geführt (Théry et al., 2005). Subzelluläre Strukturen dagegen werden häufig benutzt, um räumliche Limitierungen für die Bildung von CMAs zu untersuchen (Lehnert et al., 2004). Für die Zielsetzung dieser Arbeit war es wichtig strukturierte Substrate zu erhalten, die einerseits Zellen in ihrem physiologischen Verhalten nicht einschränken, und andererseits hochauflösende Mikroskopie ermöglichen. Letzteres erfordert die Benutzung hochaperturiger Objektive und inverser Mikroskope. Dies ist nur möglich für transparente Substrate. Gleichzeitig würden solche Substrate Zeitrafferaufnahmen deutlich vereinfachen, da auch in diesem Fall die Untersuchung mit hochaperturigen Objektiven durch transparente Substrate zu den besten Ergebnissen führt.

Eine naheliegende Methode ist das direkte Stempeln von Proteinen auf Glasoberflächen mittels mikrostrukturierter Stempel (*direct Microcontact Printing*,  $\mu$ CP). Die nicht bestempelten Bereiche müssen dann anschließend mit einer geeigneten Chemikalie passiviert werden. Durch Optimierung der Parameter war es möglich entsprechende Substrate herzustellen. Als ECM Protein wurde FN in einer Konzentration von 5  $\mu$ g/ml gestempelt. Die Passivierung erfolgte mit PLL-PEG mit 1 mg/ml. Abbildung 3.6 A zeigt ein Beispiel für ein solches Experiment. Für den Aktinmarker lifeact-GFP transfizierte embryonale Rattenfibroblasten (*Rat Embryonic Fibroblast*, REF) wurde auf einem mit  $\mu$ CP hergestellten Substrat ausgesät und mittels SIM über 60 min hinweg aufgenommen (Video 2). Am Verlauf der Aktin-Stressfasern erkennt man deutlich, dass die Zelle ihre Form an den vorgegebenen FN-Quadraten ausrichtet. Die SFs verbinden mehrere adhäsive FN-Bereiche und überbrücken passivierte Bereiche. Um die Dynamik von Aktin über den Aufnahmezeitraum hinweg darzustellen, wurde der Zeitverlauf farbkodiert (Abb. 3.6 A'). Der Beginn der Zeitrafferaufnahme wird dabei blau dargestellt, gefolgt von den Farben entsprechend des Lichtspektrums mit rot für den letzten Zeitpunkt. Stationäre Strukturen werden als Überlagerung aller Farben in Weiß dargestellt. Wie man an der Farbkodierung erkennt, behält die Zelle über den gesamten Zeitraum ihre Form im Wesentlichen bei, während es in der Peripherie zur Ausbildung und Rückbildung von Zellausläufern kommt (Video 2). Wie auch schon bei SIM auf homogenen Substraten (Abb. 3.5, A'), ist dies ein Hinweis, dass die Zelle über den Aufnahmezeitraum hinweg durch die Experimentbedingungen nicht in ihrem physiologischen Verhalten eingeschränkt wird. Allerdings fällt auf, dass es zu keiner klaren Polarisierung der Zelle kommt und sie keinerlei Migrationsverhalten zeigt. Dies kann für viele Fragestellungen eine Einschränkung darstellen. Durch die Erzeugung eines Substratmusters, bei dem die FN Quadrate in einer Richtung in immer kleineren Abständen folgen, konnte dieses Problem umgangen werden (Abb. 3.6 B). Wie in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe (Autenrieth, 2012) gezeigt wurde, führt ein solcher FN-Gradient zur Haptotaxis in Richtung höherer Proteinbedeckung. Diese Migration lässt sich mit einem durch  $\mu$ CP hergestellten FN-Gradient reproduzieren. Innerhalb von 30 Minuten sieht man eine deutliche Verschiebung des Zellkörpers (Abb. 3.6 B', Video 3). Es fällt dabei im Vergleich zum Muster ohne Gradient auf, dass die Zelle FN Quadrate vom Substrat abreißt

und verformt (Abb. 3.6 C). Tatjana Autenrieth zeigte, dass das herausgerissene FN als Indiz für die Richtung der Zellen bei einer haptotaktischen Migration dienen kann.

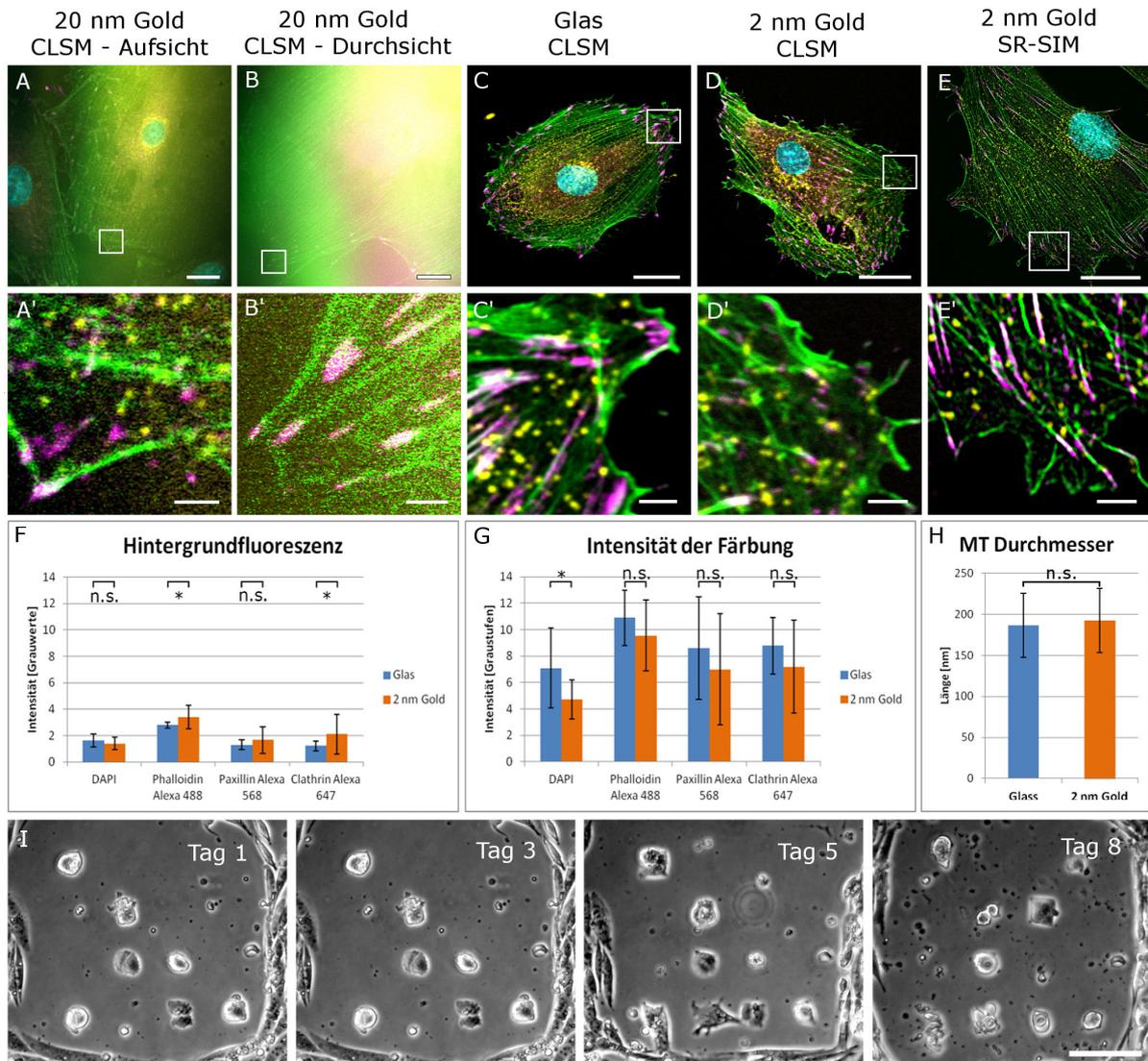
Für viele etablierte Strukturierungsmethoden werden Deckgläser in einer Art funktionalisiert, die zur kovalenten Bindung von Proteinen an die Oberfläche führt (Burnette et al., 2011a; Théry et al., 2005). Dies kann zu besser definierten Mustern führen. Eine Methode für eine solche Funktionalisierung ist die Epoxysilanisierung von Deckgläsern. Während FN nicht-kovalent an unbehandeltes Glas bindet, führt die Epoxysilanisierung zu einer kovalenten Bindung. Um den Einfluss der Bindungsart auf das Zellverhalten zu untersuchen, wurden Zellen jeweils auf identische FN – Gradienten auf unbehandeltem Glas und auf epoxysilanisiertem Glas kultiviert (Abb. 3.6 D, E). Im Vergleich sieht



**Abb. 3.6: direct  $\mu$ Contact-Printing (d $\mu$ CP) ermöglicht Zeitrafferaufnahmen von Zellmigration.** (A) Für lifeact-GFP transfizierte Rattenfibroblasten (grün) wurden auf einem mit d $\mu$ CP hergestelltem FN-Muster (magenta) kultiviert und eine Zeitrafferaufnahme erstellt. (A') Alle Zeitpunkte des Videos wurden mit Farben für den Zeitverlauf in Falschfarben dargestellt. Blau zeigt den Startpunkt, gefolgt von den Farben des Lichtspektrums, bis zu rot für den letzten Zeitpunkt. Der mittlere Zeitpunkt, 30 min, wird grün dargestellt. Weiß, als Überlagerung aller Farben, zeigt daher stationäre Strukturen an, wie etwa die FN-Quadrate des Substrates. (B) Für F-Tractin tdTomato (grün) transfizierte Hühnerfibroblasten wurden auf einem mit d $\mu$ CP hergestellten FN-Gradienten kultiviert und eine Zeitrafferaufnahme erstellt. Der Gradient zeigt in  $y$ -Richtung. (B') Analog zu (A') wurde eine Falschfarbendarstellung für den Zeitverlauf erstellt. (C) Die Vergrößerung der weißen Box in (B) zeigt das Herausreißen und Umformen der FN-Inseln durch die Zelle. (D und E) Rattenfibroblasten wurden unter identischen Bedingungen auf FN-Gradienten kultiviert, die mittels d $\mu$ CP hergestell und mit bovinem Serumalbumin passiviert wurden. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Phalloidin Alexa Fluor 488 (grün) gefärbt. Der einzige Unterschied war die Beschichtung des Deckglases: (D) war unbeschichtet, (E) war epoxysilanisiert. Dies führt zu einer kovalenten Bindung von Fibronectin. Die Art der Oberflächenbehandlung scheint deutliche Auswirkungen auf die Fähigkeit zum Umbilden des FN-Musters zu haben. Maßstabsbalken: (A', B', D, E) 10  $\mu$ m, (C) 2  $\mu$ m.

man, dass die Zelle nicht-kovalent gebundenes FN abreißt und umformt. Die Position des herausgerissenen FNs lässt vermuten, dass die Zelle zur höheren Bedeckung migrierte. Kovalent gebundenes FN dagegen konnte von der Zelle nicht umgeformt werden. Da dies aber, wie gezeigt (Abb. 3.6 B, C; Autenrieth 2012, Geiger et al., 2001), eine Voraussetzung für Zellmigration auf FN ist scheint die kovalente Bindung Zellmigration zu verhindern. Dies ist eine deutliche Einschränkung solcher Substrate und war ein zusätzlicher Anreiz, nicht-kovalente Strukturierungsmethoden zu entwickeln.

Eine weitere, etablierte Methode um  $\mu$ CP Substrate mit nicht-kovalent gebundenen Proteinen herzustellen, ist die Strukturierung mittels Gold-Thiol-Chemie (Mrksich and Whitesides, 1996; Prime and Whitesides, 1991). Bringt man Thiolverbindungen in Kontakt mit einer goldbedampften Deckglasoberfläche, bilden diese auf dem Gold einen sogenannten *Self-Assembled-Monolayer* (SAM). Durch geeignete Kombination von Protein-bindenden und Protein-abweisenden Thiolen ist es dadurch möglich FN Quadrate mit umgebender Passivierung zu erstellen (Lehnert et al., 2004). Allerdings sind diese Substrate nicht für die inverse Mikroskopie geeignet. Typischerweise wird eine 20 nm dicke Goldschicht benutzt. Diese absorbiert und reflektiert so viel Anregungs- und Fluoreszenzlicht, dass Mikroskopie durch die Goldschicht kaum möglich ist (Abb. 3.7 B, B'). Kleine Bereiche können zwar dargestellt werden, aber nur bei deutlichem Anstieg des Hintergrundes und bei Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Bei CLSM verschlechtert sich die Qualität selbst dann, wenn das Substrat gedreht wird und nicht durch Gold mikroskopiert wird (Abb. 3.7 A, A'). Auch hier kommt es zu einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses. Diese Probleme können umgangen werden, wenn eine sehr dünne Goldbeschichtung gewählt wird. Dieses Vorgehen wurde in der Vergangenheit bereits vorgeschlagen, aber bisher kaum für biologische Studien angewandt (DiMilla et al., 1994; Gautrot et al., 2010). Vor allem gibt es meines Wissens keine Studien, bei denen dünnes Gold für subzelluläre Strukturen verwendet wird. Mikroskopiert man durch eine solche Schicht hindurch, ist das Ergebnis mit einem unbehandelten Glassubstrat vergleichbar (Abb. 3.7 C, C', D, D'). Auch hochauflösende SIM Aufnahmen sind ohne erkennbaren Qualitätsverlust möglich (Abb. 3.7 E, E'). Für einen quantitativen Vergleich des Einflusses der Goldschicht auf die Mikroskopie von biologischen Standardproben wurden REF Zellen auf Deckgläsern kultiviert, deren eine Hälfte mit einer dünnen Goldschicht bedampft war, während die andere Hälfte unbehandelt blieb. Damit konnte in der gleichen Probe der Einfluss der dünnen Goldschicht auf mikroskopische Analysen ermittelt werden. REF Zellen wurden für den Nukleus (DAPI), Aktin (Phalloidin 488), Paxillin (Alexa Fluor 568) und *Clathrin Coated Pits* (Alexa Fluor 647) gefärbt. Von drei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 5 Bilder mit CLSM aufgenommen. Die Einstellungen wurden für alle Bilder gleich gehalten. Anschließend wurde die Intensität in den jeweiligen Kanälen innerhalb von Zellen (Abb. 3.7 G), bzw. außerhalb (Abb. 3.7 F) gemessen und gemittelt. Diese Analyse zeigt zwar, dass die Intensität der Färbung für 405 nm Anregung signifikant sinkt, allerdings gibt es für die Kanäle mit 488 nm, 561 nm und 633 nm Anregung keinen signifikanten Abfall (Abb. 3.7 G). Die Hintergrundintensität für diese Kanäle steigt leicht an (Abb. 3.7 F). Für einen Vergleich der Auflösung wurden Mikrotubuli in REF-Zellen angefärbt und wie zuvor (Abb. 1.1) deren Halbwertsbreite für Zellen auf einer dünnen Goldschicht und auf Glas bestimmt und verglichen (drei



**Abb. 3.7: Eine dünne Goldbeschichtung ermöglicht inverse Mikroskopie und ist kompatibel mit Gold-Thiol-Chemie für Microcontact Printing ( $\mu$ CP).** (A-E) Deckgläser wurden mit Fibronectin (FN) inkubiert. Anschließend wurden Rattenfibroblasten darauf kultiviert und später mit Phalloidin Alexa Fluor 488 für Aktin (grün), DAPI für den Nucleus (cyan) und immunhistochemisch für Paxillin mit Alexa Fluor 568 (magenta) und Clathrin mit Alexa Fluor 647 (gelb) gefärbt. (A'-E') zeigt jeweils die Vergrößerung der entsprechenden weißen Box in (A-E). Bei einer 20 nm dicken Goldbeschichtung liefert weder die Mikroskopie (B, B') durch die Goldschicht, noch die Invertierung und Mikroskopie (A, A') auf das Präparat Ergebnisse, die mit Mikroskopie (C, C') durch ein unbehandeltes Deckglas vergleichbar sind. Im Gegensatz dazu erhält man bei (D, D') CLSM und bei (E, E') SR-SIM Ergebnisse ähnlicher Qualität bei der Mikroskopie durch eine dünne Goldschicht von etwa 2 nm. (F) Die Fluoreszenz in zellfreien Bereichen liegt bei allen Fluoreszenzkanälen nur unwesentlich oder gar nicht über dem Niveau eines Glasdeckglases, während (G) die Intensität der Färbung nur für den DAPI-Kanal signifikant abfällt. (H) Die Messung des Mikrotubuli-Durchmessers anhand der Halbwertsbreite der Intensitätsprofile von CLSM Bildern zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Messungen durch eine dünne Goldbeschichtung oder durch unbehandeltes Glas. Die Mikrotubuli wurden mit indirekter Immunhistochemie und Alexa Fluor 488 angefärbt. (I) FN-Inseln von 35 x 35  $\mu$ m mit umgebender Passivierung erlauben die Adhäsion einzelner NIH 3T3 Fibroblasten. Die Passivierung und die FN-Beschichtung bleiben über 8 Tage stabil; Zellen können bis zum Schluss auf den FN-Inseln adherieren, während gleichzeitig die umgebenden Zellen nicht die Passivierung überwinden können. Maßstabsbalken: (A-E) 10  $\mu$ m, (A'-E') 2  $\mu$ m, (I) 100  $\mu$ m. Statistik: (F-H) Balken geben arithmetische Mittelwerte an, Fehlerbalken die Standardabweichung. Signifikanz wurde mit dem t-Test ermittelt ( $p > 0,1$  : nicht signifikant / n.s. ;  $0,1 \geq p \geq 0,05$  : \*) aus 3 unabhängigen Experimenten mit (F, G) 45, bzw. (H) 90 Einzelmessungen.

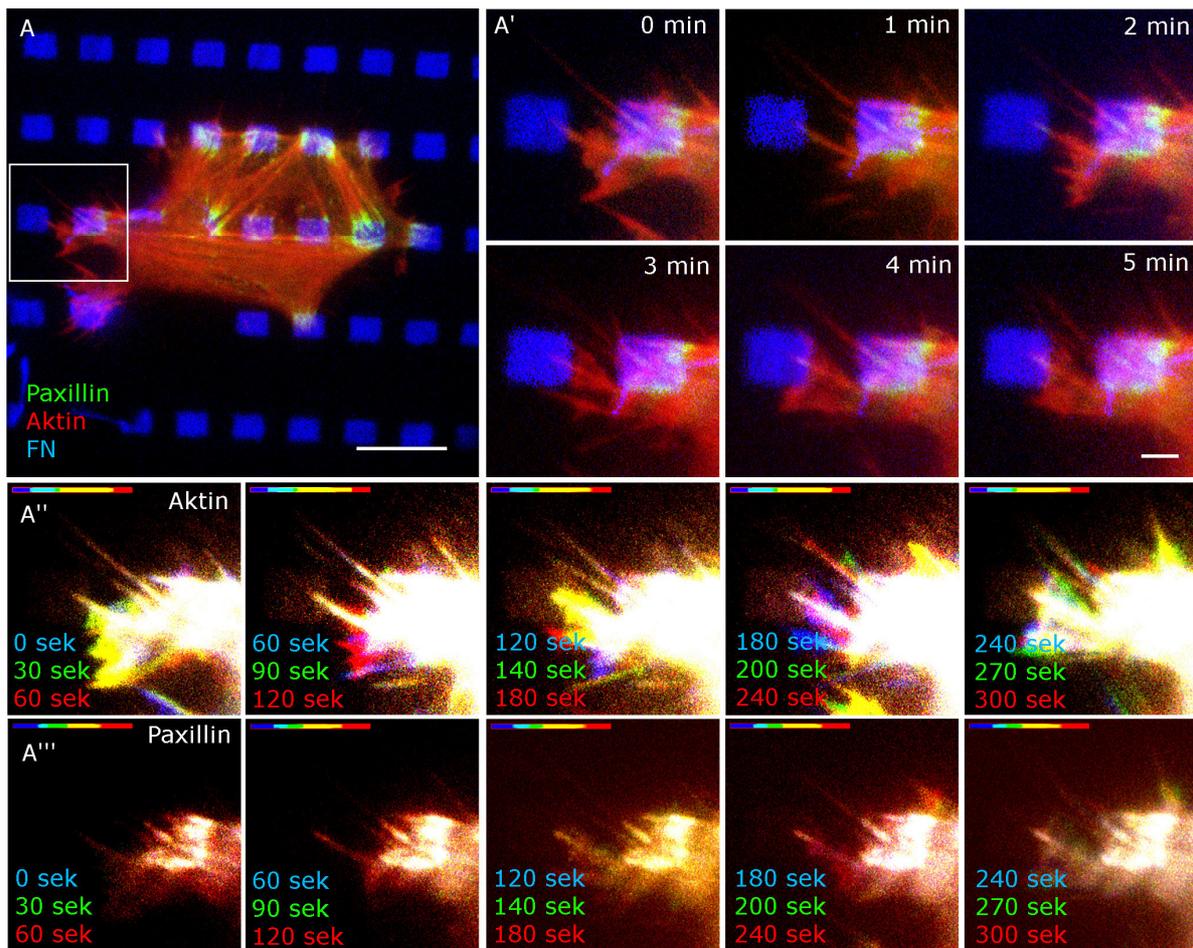
unabhängige Experimente mit insgesamt 90 Messungen). Diese Zellen wurden ebenfalls auf Deckgläsern kultiviert, bei denen nur eine Hälfte mit Gold bedampft war.

Vergleicht man die MT Durchmesser mit CLSM, wiederum gemessen anhand der Halbwertsbreite von Intensitätsprofilen, ist kein signifikanter Unterschied zwischen Glas und dünnem Gold zu erkennen (Abb. 3.7 H). Insgesamt scheint also eine dünne Goldschicht als Substrat für inverse Mikroskopie weder die Intensität der Färbung, noch die erreichbare Auflösung deutlich zu beeinflussen.

Es wäre vorstellbar, dass solch eine dünne Goldschicht instabiler ist und damit auch die Strukturierung der Oberfläche insgesamt schneller degradiert. Um dies zu untersuchen wurde ein Langzeitpassivierungstest durchgeführt. Wie sich zeigte, blieben Zellen über 8 Tage auf 35 x 35 µm große FN Bereiche beschränkt und waren nicht in der Lage, die umgebende Passivierung zu überwinden (Abb. 3.7 I). Eine Strukturierung auf dünnen Goldsubstraten kann also auch über Tage hinweg stabil bleiben.

### **3.1.4 Zeitliche Auflösung für die Untersuchung von Aktin - und CMA - Dynamiken**

Mit dem vorhandenen Prototyp ist es für SIM schwierig Zeitrafferaufnahmen mit einer schnelleren zeitlichen Auflösung als 1 Bild pro Minute anzufertigen. Um zu untersuchen, ob dies für die Untersuchung der Entstehung und Reifung von CMAs und ihrer Verbindung zu Aktin ausreichend ist, wurden Zeitrafferaufnahmen mit TIRF-Mikroskopie angefertigt. Für Paxillin-EGFP und F-Tractin-tdTomato transfizierte Zellen wurden auf mittels  $\mu$ CP hergestellten FN – Gradienten kultiviert und während der Bildung neuer CMAs untersucht (Video 4). Betrachtet man TIRF-Aufnahmen mit einer reduzierten Bildrate von 1 Bild pro Minute ist die Entstehung neuer CMAs gut zu erkennen (Abb. 3.8 A'). Allerdings könnten bei schnelleren Dynamiken von Aktin und Paxillin Strukturen durch die geringe zeitliche Auflösung verloren gehen. Um dies zu untersuchen wurden die in 10 Sekundenschritten aufgenommenen Bilder jeweils für Aktin und Paxillin minutenweise zusammengefasst und der zeitliche Verlauf farbcodiert (Abb. 3.8 A'', A'''). Im Aktinkanal sind teilweise farbig dargestellte Zellausläufer zu erkennen, die bei einer Aufnahmezeit von 1 Bild pro Minute nicht sichtbar wären. Allerdings werden durch diese Strukturen anscheinend keine CMAs gebildet. Betrachtet man zudem Filopodien sieht man, dass deren Form und Ausrichtung über Minuten hinweg relativ persistent ist. Bei Paxillin schließlich sind alle CMAs in der Farbkodierung weiß dargestellt. Eine Aufnahmezeit von 1 Bild pro Minute scheint also ausreichend zu sein um die Dynamik von Paxillin bei der Bildung und Reifung von CMAs festzuhalten. Schnelle, transiente Aktinstrukturen werden eventuell nicht beobachtet. Der für diese Arbeit interessante Prozess, die Bildung und Reifung von CMAs, führt aber durch die Verbindung zum Aktinzytoskelett zu dessen Stabilisierung. Damit sind auch diese Strukturen durch die gewählte Bildrate ausreichend darstellbar.



**Abb. 3.8: Eine Bildrate von 1 pro min ist ausreichend zur Untersuchung der CMA Entstehung.** (A) Für F-Actin-tdTomato (rot) und Paxillin-EGFP (grün) transfizierte Hühnerfibroblasten wurden auf einem Fibronectin (FN) – Gradienten (blau) kultiviert und mittels Totalreflexionsmikroskopie (TIRF-Mikroskopie) mit einer Bildrate von 1 pro 10 sek untersucht. Der Gradient wurde mittels direct Microcontact-Printing (d $\mu$ CP) hergestellt, wobei Alexa Fluor 647 gelabeltes bovines FN mit humanem Plasma-FN vermischt wurde um FN zu visualisieren. (A') Vergrößerung des weißen Quadrates in (A). Gezeigt ist jeweils nur eine reduzierte Bildrate von 1 pro Minute. (A'', A''') Gleicher Ausschnitt wie in (A') nur für (A'') Aktin oder nur für (A''') Paxillin. Sechs aufeinanderfolgende Bilder sind jeweils zu einem Zeitpunkt zusammengefasst und in Falschfarben für den Zeitverlauf dargestellt. Der jeweils erste Zeitpunkt ist in blau dargestellt, die folgenden entsprechend den Farben des Lichtspektrums bis zu rot für den letzten Zeitpunkt. Weiß, als Überlagerung aller Farben, zeigt stationäre Strukturen an. Im Vergleich zeigt sich, dass eine reduzierte Bildrate von 1 pro Minute die Dynamik von Paxillin ausreichend wiedergibt. Aktinstrukturen, die mit Paxillin verbunden sind werden ebenfalls korrekt wiedergegeben. Maßstabsbalken: (A) 10  $\mu$ m, (A') 2  $\mu$ m.

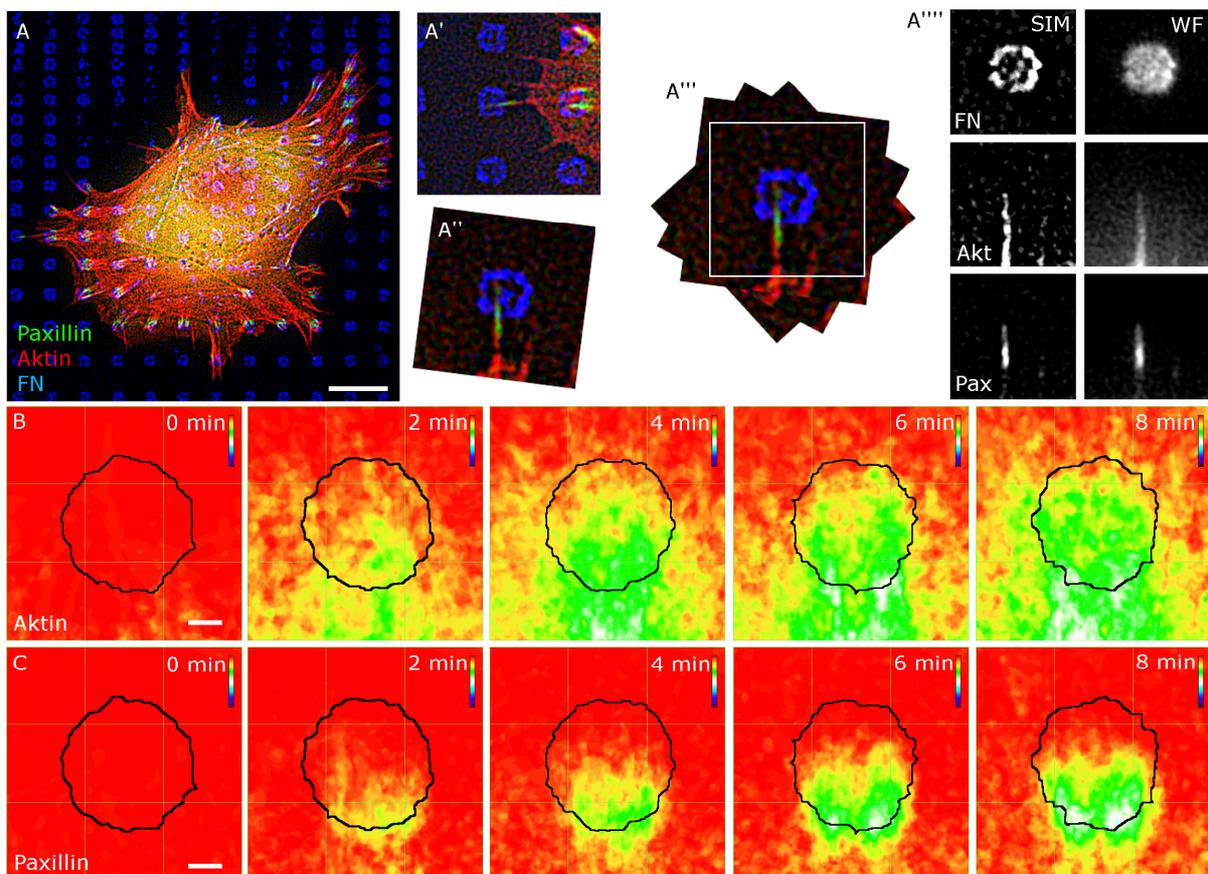
## 3.2 Aktin – CMA – Interaktion bei der Kontaktentstehung

CMAs verbinden über Integrine und die Proteine des Adhäsoms die ECM mit dem Aktin-Zytoskelett. Die Zusammensetzung des Adhäsoms beeinflusst einerseits den Aufbau und die Art der Verknüpfung mit Aktin, andererseits hat die Aktin-Struktur Einfluss auf Bildung und Reifung der CMAs (siehe Kap. 1.5). Zeitrafferaufnahmen der CMA –Aktin-Interaktion werden typischerweise auf homogenen Substraten und mit TIRF durchgeführt. Eine gleichmäßig verfügbare ECM gibt aber nicht unbedingt eine physiologische Situation wieder. So haben wichtige 3D Kultursysteme wie Kollagengele oder *Cell Derived Matrices* (CDMs) stets einen porösen Aufbau aus ECM-Fibrillen, die von Poren unterbrochen werden. Gleichzeitig ermöglichen strukturierte Substrate aber auch die Standardisierung der Zellumgebung. Aus mikroskopischer Sicht ist SIM, wie gezeigt (Kap. 3.1), für Zeitrafferaufnahmen von CMAs und Aktin bestens geeignet und TIRF mit Blick auf die laterale Auflösung überlegen. Daher wurden die entwickelten Methoden der Strukturierung und der Mikroskopie kombiniert, um die Interaktion von Aktin und CMAs zu untersuchen.

### 3.2.1 Bildung eines „Modell-CMA“ durch strukturierte Substrate und SIM

Ein Vorteil strukturierter Substrate ist, dass sie eine definierte Umgebung für die Zelle vorgeben. Für Strukturen von Zellgröße wurde dies mehrfach benutzt, um „standardisierte“ Zellen zu erhalten (Théry et al., 2006a). Bilder solcher Zellen können anschließend gemittelt werden, um statistisch signifikante Effekte zu erkennen. Subzelluläre Strukturen, wie sie mit den hier vorgestellten Strukturierungsmethoden möglich sind, sollten prinzipiell in einer ähnlichen Weise nutzbar sein. Um dies zu testen wurden für Paxillin-EGFP und F-Tractin-tdTomato transfizierte PCF auf einem mittels  $\mu$ CP erstellten FN Gradient auf dünnem Gold kultiviert und mittels SIM Zeitrafferaufnahmen untersucht (Abb. 3.9 A, Video 5). Während der Beobachtungsdauer ist die hier gezeigte Zelle migriert und hat zahlreiche neue CMAs gebildet. Diese wurden gemittelt, um die Entstehung und Reifung eines Modell-CMA zu untersuchen. Dazu wurden Bereiche, in denen ein neuer Kontakt entsteht ausgeschnitten und so ausgerichtet, dass sich die Zelle dem jeweiligen FN Dot im Bildausschnitt von unten nähert (Abb. 3.9 A' - A'''). Insgesamt konnten von der Aufnahme dieser Zelle 49 Bereiche für diese Analyse genutzt werden. Sämtliche Ausschnitte wurden anschließend anhand des FN-Dots ausgerichtet, so dass diese bestmöglich überlappen. Dann wurden alle Ausschnitte noch zeitlich angeglichen, so dass bei Zeitpunkt null noch kein CMA sichtbar ist. Einen Zeitpunkt später ist dann durch Paxillin der erste sichtbare CMA auf diesem FN Dot zu erkennen. Nun wurde mit dem ImageJ Plugin „Heatmap“ getrennt für die einzelnen Kanäle für FN, Aktin und Paxillin jeweils ein gemittelt Bild zu den verschiedenen Zeitpunkten erstellt (Abb.3.9 B, C). Diese können schließlich zu einer Zeitrafferaufnahme zusammengefügt werden (Video 6, 7). Um Intensitätsunterschiede deutlicher zu machen wurde das Ergebnis in Falschfarben dargestellt. Die Grenzen des gemittelten FN Dots wurden als schwarze Linie in die gemittelten Bilder für Aktin und Paxillin übertragen, um ihre Lokalisierung im Verhältnis zu FN deutlich zu machen.

Anhand des Paxillinkanals (Abb. 3.9 C) sieht man, dass CMAs an der Stelle eines FN Dots entstehen, der der Zelle am nächsten liegt. Von dort aus wächst und verbreitert sich ein CMA und bedeckt immer größere Bereiche des FN-Dots. Ab Minute fünf nach der Kontaktentstehung (Video 7) sind bei der Reifung zwei Intensitätsschwerpunkte zu erkennen. Auffällig ist, dass Paxillin nicht komplett in den Grenzen des FN Dots bleibt. Dies kann an statistischen Schwankungen liegen. Allerdings kann sich Paxillin auch an Aktin-Stressfasern unter Zugspannung anlagern (Smith et al., 2013). Dies würde im Zusammenhang mit diesen Daten ein Gleiten von Paxillin in Integrin-vermittelten CMAs zu Aktin-Stressfasern hin nahelegen. Anhand des Aktinkanals erkennt man, dass der entstehende CMA zeitgleich mit dem Erreichen des FN-Dots durch Aktin gebildet wird.



**Abb. 3.9: Strukturierter Substrate ermöglichen die Bildung von „Modell-CMAs“.** (A) Für F-Actin-tdTomato (rot) und Paxillin-EGFP (grün) transfizierte Hühnerfibroblasten wurden auf Fibronektin (FN) – Gradienten (blau) kultiviert und mittels SIM Zeitrafferaufnahmen erstellt mit einer Bildrate von 1 pro Minute. (A') Bereiche, in denen neue CMAs entstanden wurden ausgeschnitten und (A'') entsprechend rotiert, so dass die Zelle den FN-Dot immer von unten erreicht. (A''') Alle derart rotierten Videobereiche wurden überlagert und anhand der FN-Dots ausgerichtet. Außerdem erfolgte eine zeitliche Sortierung so, dass zum Zeitpunkt null noch kein CMA sichtbar ist, aber eine Minute später der erste Paxillin-Cluster zu sehen ist. (A''') Die zugeschnittenen Videobereiche wurden nach Farbkanälen für FN, Aktin (Akt) und Paxillin (Pax) getrennt. Die linke Spalte zeigt SIM-Bilder. Zum Vergleich sind in der rechten Spalte die gleichen Bilder für Epifluoreszenz (WF) gezeigt. (B, C) Mit dem ImageJ Plugin Heatmap wurden aus den jeweiligen Stapeln gemittelte Videos der CMA-Entwicklung erstellt. Intensität wurde dabei in Falschfarben dargestellt um den Kontrast zu optimieren. Rot zeigt die niedrigste, blau die höchste Intensität an. Vom FN-Video wurde der Umriss des FN-Dots in die Videos von (B) Aktin und (C) Paxillin als schwarze Linie übertragen. Maßstabsbalken: (A) 10  $\mu$ m, (B, C) 500 nm.

Über den Beobachtungszeitraum bleibt die Aktinintensität in einem zentralen „Kanal“ von der Zelle zum FN Dot am höchsten. Zählt man, wie viele der 49 CMAs in einem Lamellipodium und wie viele in einem filopodialen Zellausläufer entstehen, sieht man, dass 7 nach Lamellipodien und 45 nach filopodialen Ausläufern entstehen (entsprechend 13 % und 87 %). Insofern belegt der „Kanal“ von hoher Aktinintensität die Häufigkeit von filopodialen Ausläufern.

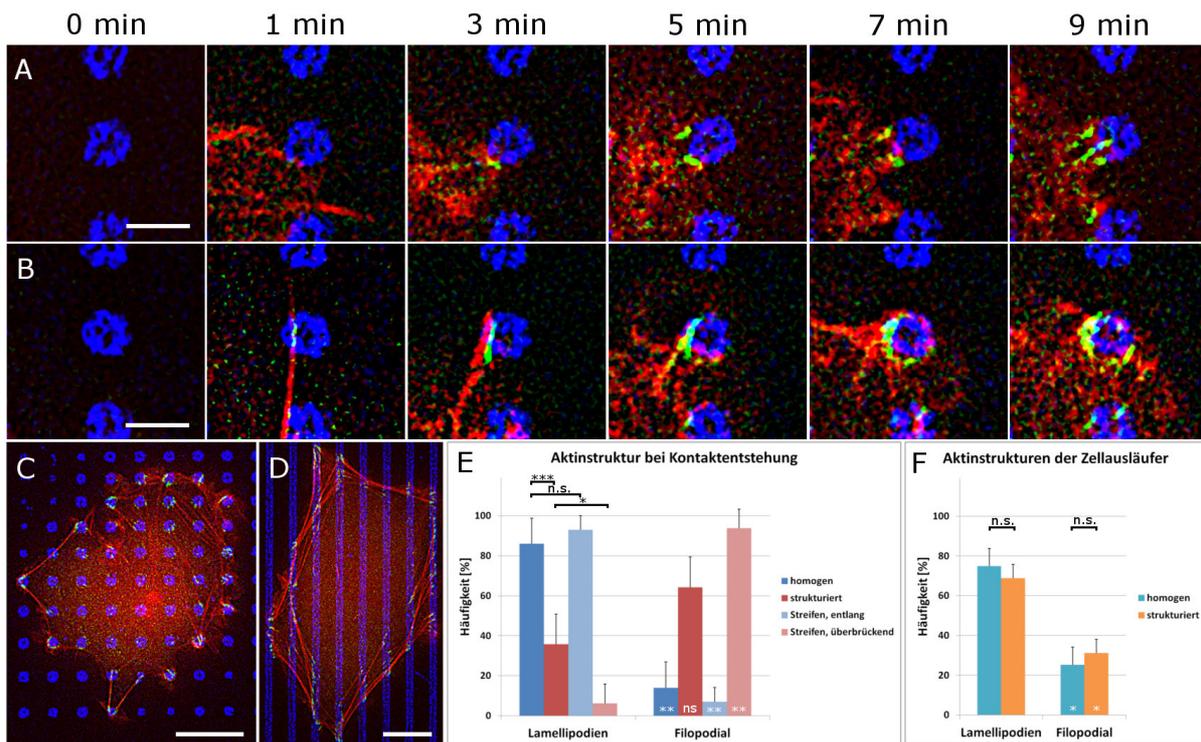
Mit nur einer Zelle stellt dieser Modell-CMA nur eine Machbarkeitsstudie dar. Es zeigen sich aber bereits mehrere interessante Ergebnisse und Fragestellungen für zukünftige Studien. Damit ist dieser Modell-CMA ein Beispiel für die erfolgreiche Kombination von hochaufgelösten Zeitrafferaufnahmen für Zellen auf Substraten mit subzellulärer Strukturierung.

### **3.2.2 CMAs auf strukturierten Substraten werden bevorzugt durch Filopodien vermittelt**

REF Zellen wurden für F-Tractin-tdTomato transfiziert, um das Aktin-Zytoskelett sichtbar zu machen und für Paxillin-EGFP, um CMAs darzustellen. Die Zellen wurden auf FN-Gradienten kultiviert, die auf Deckgläsern mit dünner Goldbeschichtung mittels  $\mu$ CP hergestellt wurden (Abb. 3.10 A-C). Die Untersuchung erfolgte mit SIM Aufnahmen mit einer Bildrate von einem Bild pro min. Eine Zelle wurde typischerweise 30 – 60 min lang untersucht. Bei Analyse der Aufnahmen fiel auf, dass die Zellen scheinbar mehr Filopodien aufwiesen, bzw. CMAs eher nach einem filopodialen Aktinausläufer entstehen als nach einem lamellipodialen (Abb. 3.10 A, B). Um dies näher zu untersuchen wurden zum Vergleich in gleicher Weise transfizierte Zellen auf homogenen FN Substraten untersucht. Eine Quantifizierung der Art der Aktinausläufer, nach denen ein CMA entsteht zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen homogenen und strukturierten Substraten (Abb. 3.10 E, jeweils vier unabhängige Experimente, 50 Einzelmessungen für homogen, 26 Einzelmessungen für strukturiert). Als filopodialer Ausläufer wurden dabei klassische Filopodien, sowie Mikrospikes zusammengefasst. Während Filopodien mehrere  $\mu$ m lang und dünner als 500 nm sind, haben Mikrospikes zwar einen ähnlichen Durchmesser und ragen deutlich aus der Zelle, werden aber nicht länger als 1  $\mu$ m. Während auf homogener FN-Beschichtung die große Mehrheit, 86 %, aller CMAs durch ein Lamellipodium vermittelt werden sind es auf strukturierten Substraten nur 36 %. Um zu untersuchen, ob es sich dabei um einen globalen Wechsel einer Zelle von einem „Lamellipodia-Modus“ zu einem „Filopodien-Modus“ handelt, wurden diese Ergebnisse zum Verhalten von Zellen verglichen, die auf einem FN-Linienmuster kultiviert wurden (Abb. 3.10 D). Durchgängige Linien können lokal als homogen betrachtet werden, während der Übergang zwischen zwei Linien vergleichbar zum Übergang zwischen zwei FN-Dots in den zuvor benutzten strukturierten Substraten ist. Es zeigt sich in der Quantifizierung, dass die Bildung neuer CMAs entlang einer FN Linie ähnlich wie auf homogenen FN-Substraten erfolgt; es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Konditionen (Abb. 3.10 E, drei unabhängige Experimente mit 57 Einzelmessungen für „Streifen, entlang“). Im Gegensatz dazu erfolgt die Bildung neuer CMAs, bei denen die passivierte Lücke zwischen den FN Linien überbrückt wurde, sogar noch häufiger per filopodialer Ausläufer, als dass auf den strukturierten FN-Gradienten der Fall war (Abb. 3.10 E, 3 unabhängige Experimente mit 16

Einzelmessungen für „Streifen, überbrückend“). Welcher Aktinausläufer zur Bildung von CMAs führt scheint also eine lokale Entscheidung zu sein.

Als Grund für die vermehrte Entstehung von CMAs durch filopodiale Ausläufer auf strukturierten Substraten könnte man sich entweder eine vermehrte Bildung von Filopodien vorstellen, oder dass solche Ausläufer in dieser Umgebung erfolgreicher bei der Bildung von neuen CMAs sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Anzahl gebildeter Ausläufer quantifiziert, unabhängig davon ob diese Ausläufer zur Bildung von CMAs führen. Wie sich zeigt, gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Bildung von Lamellipodien und filopodialen Ausläufern auf homogenen und strukturierten Substraten (Abb. 3.10 F, jeweils vier unabhängige Experimente mit 50 Einzelmessungen für homogen und 28 Einzelmessungen für strukturiert). Es scheint also, dass die Produktionsrate verschiedener Aktinausläufer nicht von der Strukturierung der ECM abhängt. Für die Bildung neuer CMAs in Bereichen mit geringer verfügbarer ECM werden aber filopodiale Ausläufer Lamellipodien bevorzugt.



**Abb. 3.10: Überbrückung passivierter Bereiche erfolgt bevorzugt durch filopodiale Aktinausläufer.** (A-D) Rattenfibroblasten wurden für F-Actin-tdTomato (rot) und Paxillin-GFP (grün) transfiziert. (C) Fibronectin-Gradienten (blau) (FN), bzw. (D) FN-Linienmuster wurden mit Microcontact Printing ( $\mu$ CP) auf dünnen Goldsubstraten hergestellt. Zellen wurden darauf ausgesät und es wurde mit Superresolution Structured Illumination Microscopy (SIM) Zeitrafferaufnahmen erstellt. Der zelluläre Kontakt von FN-Dots, auf denen später ein Cell-Matrix-Adhesion (CMA) entsteht, erfolgt entweder nach (A) einem lamellipodalen oder (B) einem filopodalen Kontakt. (E) Die Art der Entstehung wurde für Zellen auf homogenen FN-Substraten, auf FN-Gradienten und auf FN-Linienmustern quantifiziert. Für FN-Linienmuster wurde unterschieden, ob neue CMAs in einer FN-Linie zu bereits bestehenden CMAs entstehen („Streifen, entlang“) oder ob Zellen den passivierten Bereich zwischen zwei FN-Linien überwinden („Streifen, überbrückend“), um neue CMAs zu bilden. (F) In einer weiteren Untersuchung wurde für Zellen auf homogenen FN-Substraten und auf FN-Gradienten die Anzahl der gebildeten Zellausläufer quantifiziert, ohne zu berücksichtigen, ob diese zur Bildung eines CMAs führen oder nicht. Maßstabsbalken: (A, B) 2  $\mu$ m, (C, D) 10  $\mu$ m. Statistik: (E, F) Balken geben arithmetische Mittelwerte an, Fehlerbalken die Standardabweichung. Signifikanz wurde mit dem t-Test ( $p > 0,1$  : nicht signifikant / n.s. ;  $0,1 \geq p \geq 0,05$  : \*,  $0,05 > p \geq 0,01$  : \*\*,  $p < 0,01$  : \*\*\*) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit mindestens 26 Einzelmessungen ermittelt. Signifikanzzeichen am Fuß von Balken der Kategorie „Filopodial“ geben jeweils die Signifikanz im Vergleich zum entsprechenden Balken in der Kategorie „Lamellipodien“ an.

### 3.3 Differenzielle Fibronektin/Vitronektin Substrate zur *in cellula* Separierung verschiedener Integrine

Wie beschrieben gibt es zwischen den 24 Integrinen in Säugetieren vielfältige Redundanzen (siehe Kap. 1.3). Viele Integrine binden an mehrere Liganden und viele Liganden werden von mehreren Integrinen erkannt. Anhand der Erkennungssequenz der Liganden können Klassen von Liganden-Integrin-Kombinationen erstellt werden. Eine dieser Klassen beinhaltet ECM-Moleküle mit einer RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure, RGD im Einbuchstabencode). Von den RGD-bindenden Integrinen sind die ubiquitär exprimierten  $\alpha V\beta 3$ - und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine von besonderer Bedeutung. Beide binden an FN. Eine wichtige Frage ist dabei in wie weit diese beiden Integrine redundant vorliegen, oder wie sehr sie spezifische Funktionen haben. Da beide gemeinsam in CMAs vorliegen, ist diese Frage in Zellen aber nicht ohne weiteres zu beantworten. Eine Strategie war bisher eines der Integrine durch spezifische Inhibitoren zu blockieren (Roca-Cusachs et al., 2009). Bei einer anderen wird eine Knockout-Zelllinie für  $\alpha V$  und  $\beta 1$  Integrine entwickelt. Anschließend wurde nur eines der beiden Integrine in diese Zell-Linie transfiziert (Schiller et al., 2013). In beiden Fällen untersucht man also Zellen, die komplett auf eine Integrinart verzichten müssen. Beide Methoden haben zu Einsichten über spezifische Funktionen dieser Integrine geführt, haben aber auch Nachteile. Unter anderem kann es durch Ausschalten eines der beiden Integrine zu einer Kompensation kommen, die in unbehandelten Zellen nicht vorkommt. Die Aussagekraft solcher Studien für die *in vivo* Situation kann also begrenzt sein.

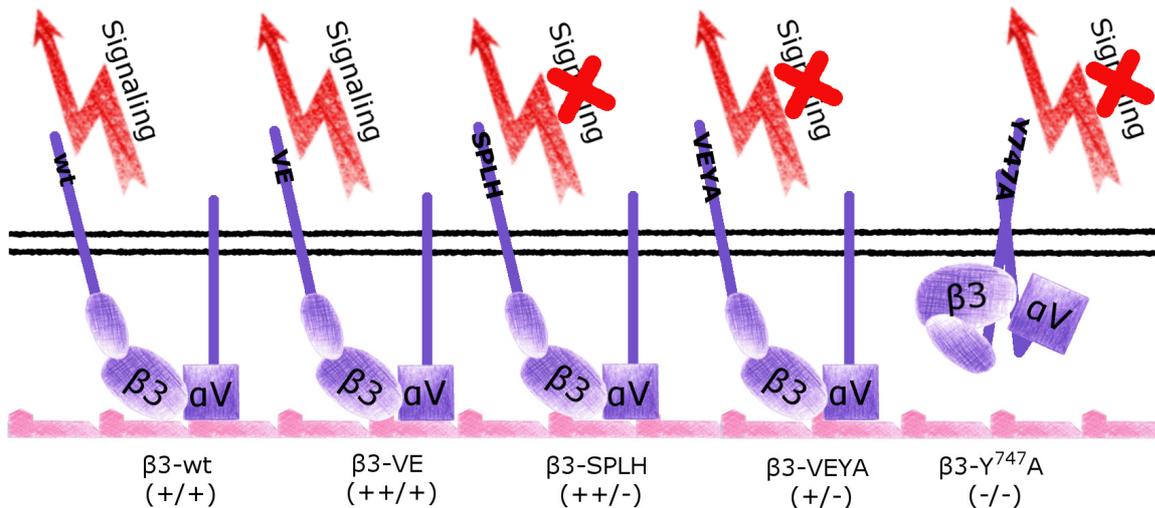
Die in dieser Arbeit entwickelten, bzw. verbesserten Methoden der Substraktstrukturierung und der hochaufgelösten Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere in Kombination mit Zeitrafferaufnahmen, bieten eine Möglichkeit, die oben angesprochenen Probleme bei der Analyse von spezifischen Integrinen zu umgehen. Vor allem die Entwicklung von *binary choice* Substraten (siehe Kap. 1.6) erschien vielversprechend. Solche Substrate mit einer subzellulären Strukturierung von FN und VN sollten geeignet sein,  $\alpha V\beta 3$ - und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine zu trennen.  $\alpha 5\beta 1$  bindet nur an FN, während  $\alpha V\beta 3$  auch an VN binden kann. Damit sollten sich für solche differenziellen FN/VN-Substrate zahlreiche Vorteile ergeben:

- „Co-clustern“ von  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin auf VN wird verhindert, da dieses entsprechend seiner Affinität an vorhandenes FN binden kann. Auf homogenem VN erschwert Co-clustern die Analyse von  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen (Pinon et al., 2014). Eine möglichst vollständige Trennung der Integrine, zumindest auf einem Ligand der FN/VN-Substrate, ist aber die Grundlage für eine spätere Aussage über spezifische Effekte eines Integrins.
- $\beta 3$ -Integrin-Mutationen, die auf homogenen VN Substraten Zellspreading erschweren oder verhindern, können auf FN/VN-Substraten analysiert werden. Endogenes  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin kann durch Bindung an FN den  $\beta 3$ -Integrin-Defekt kompensieren.
- Durch endogenes  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin liegt auf den FN-Bereichen direkt eine Kontrolle zu  $\beta 3$ -Integrin-Varianten (bzw. den durch sie verursachten Effekten) auf VN vor.
- Die Wahrscheinlichkeit von Kompensationsmechanismen sinkt. Durch die subzelluläre Größe der Strukturierung sind  $\beta 1$ -Integrin und  $\beta 3$ -Integrin

- Die „Wahlfreiheit“ von Integrinen in Bezug auf ihren Liganden ermöglicht *in cellula* Abschätzungen über Affinitäten von Integrinen.
- Es findet keine Limitierung der ECM statt, die das Verhalten einer Zelle beeinflussen kann (siehe Kap. 3.1). Dies verbessert die Vergleichbarkeit zu Studien auf homogenen, ECM-unlimitierten Substraten erschweren.
- Neben der Kombination FN/VN sind für andere Fragestellungen auch Kombinationen von anderen ECM-Proteinen (z.B. Kollagen und Laminin zur Trennung von  $\alpha$ -Untereinheiten) oder anderen adhäsiven Proteinen denkbar (VCAM, ICAM, Cadherine, NCAM, Selektine, ...).

Diese differenziellen FN/VN-Substrate wurden mit einer speziellen Zell-Linie und Plasmiden für  $\beta$ 3-Integrin-Mutationen kombiniert. Beides wurde in der Gruppe von Bernhard Wehrle-Haller, Universität Genf, entwickelt. Dabei wurde in einer Population von NIH 3T3 Zellen eine Subpopulation extrahiert, die einen sehr niedrigen Level an endogenem  $\beta$ 3-Integrin aufweist. Bei einer Analyse mit *Fluorescence Assisted Cell Sorting* (FACS) zeigte sich, dass diese Subpopulation nur ca. 1 % der Menge von  $\beta$ 3-Integrin der Gesamtpopulation exprimiert (Pinon et al., 2014). Im Folgenden wird diese Zell-Linie daher immer „3T3  $\beta$ 3low“ genannt. Diese Zellen bieten damit die nötige Spezifität, um den Effekt von  $\beta$ 3-Integrin Mutationen zu untersuchen. Wenn nicht anders angegeben wurden alle folgenden Experimente mit dieser Zelllinie durchgeführt. Weitere Analysen zeigten zudem, dass diese Zell-Linie nahezu kein  $\alpha$ V $\beta$ 5-Integrin exprimiert (Bernhard Wehrle-Haller, persönliche Kommunikation), und damit  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin der entscheidende VN-Rezeptor ist.

Bei einer Klasse von Mutationen wurde die Affinität des zytoplasmatischen  $\beta$ 3-Integrin C-Terminus für Talin beeinflusst (proximales NPLY-Motiv). Bei einer bereits bekannten Mutation wird ein Tyrosin an Stelle 747 durch Alanin ersetzt ( $\beta$ 3-Y<sup>747</sup>A), was die Bindung von Talin an  $\beta$ 3-Integrin unterbindet (Tadokoro et al., 2003). Diese Mutation verhindert sowohl die vollständige Aktivierung von  $\beta$ 3-Integrin, als auch die Signalweiterleitung durch dieses Integrin (Pinon et al., 2014). Es ist somit nicht möglich, Integrin-Aktivierung von Integrin-Signalisierung zu trennen. Dies erschwert die Untersuchung dieser beiden Effekte. Das Labor von Bernhard Wehrle-Haller hat dafür drei  $\beta$ 3-Integrin Mutationen entwickelt, bei der mehrere Aminosäuren im Bereich des Talin-bindenden NPLY-Motivs ersetzt wurden ( $\beta$ 3-VE,  $\beta$ 3-VEYA,  $\beta$ 3-SPLH, siehe Abb. 3.11 und (Pinon et al., 2014). Alle drei Mutationen führen zu einer stärkeren Aktivierung als es bei  $\beta$ 3-wt der Fall ist. Interessanterweise sind zwei Mutationen,  $\beta$ 3-VEYA und  $\beta$ 3-SPLH, aber nicht in der Lage Zellspreading auszulösen, was in der Arbeit von Pinon und Kollegen als Auslesemechanismus für aktives, intrazelluläres Signaling genutzt wird. Erstmals liegen damit  $\beta$ 3-Integrin-Mutationen vor, mit denen es möglich ist Integrin-Aktivierung von Integrin-Signalisierung zu trennen. Diese Mutationen und ihre Eigenschaften sind in Abbildung 3.11 zusammengefasst.

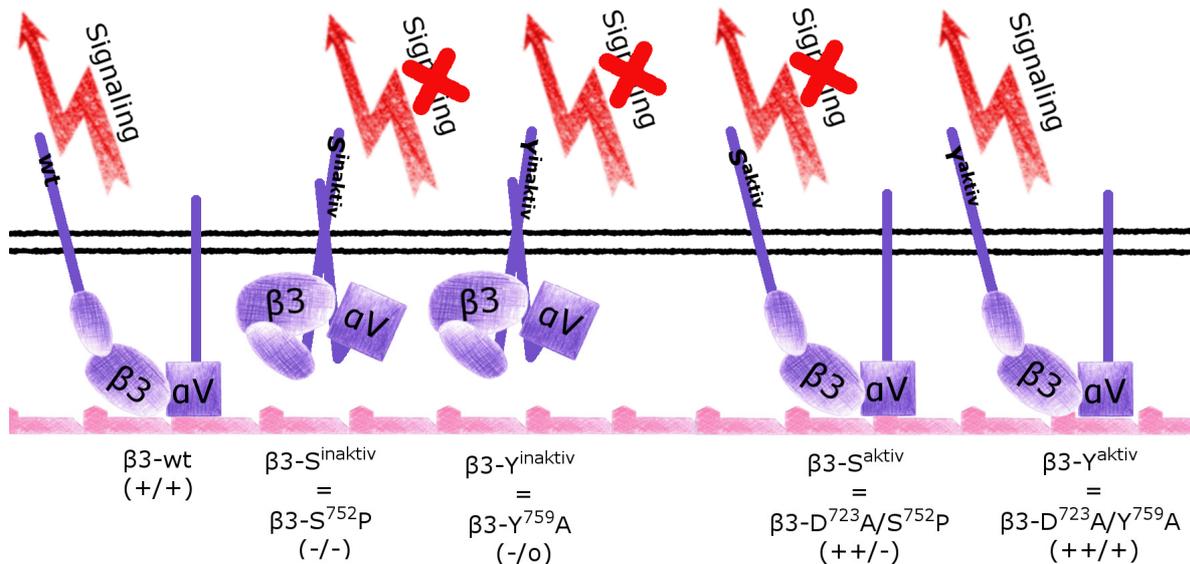


**Abb. 3.11: Aktivität und Signaling Talin-betreffender  $\beta 3$ -Integrinmutationen:** Schematische Zusammenfassung der Aktivitäts- und Signalingmessungen der in der Abbildung genannten  $\beta 3$ -Integrinmutationen von Pinon und Kollegen (Pinon et al., 2014). Die Aktivität wird durch die Konformation der Integrine (vgl. Abb. 1.2) angezeigt, Signaling durch die Pfeile, bzw. deren Beschriftung an der  $\beta 3$ -Untereinheit. In den Klammern unter der Beschriftung der jeweiligen Integrin-Varianten am unteren Bildrand sind Aktivität und Signaling ein weiteres Mal zusammengefasst. Diese Klammern sind auch bei folgenden Abbildungen angegeben. Das erste Zeichen bezieht sich auf die Aktivität, die zweite auf Signaling.

Bei einer weiteren Reihe von  $\beta 3$ -Integrin Mutationen wird die Bindung von Kindlin an den  $\beta 3$ -Integrin C-Terminus verhindert (inter-NxxY-Motiv bei  $\beta 3$ -S<sup>752</sup>P und distales NxxY-Motiv bei  $\beta 3$ -Y<sup>759</sup>A). Die Talinbindung wird durch diese Mutationen jedoch nicht beeinflusst (Moser et al., 2008). Die fehlende Kindlinbindung führt trotzdem bei beiden Mutationen zu einer verringerten Integrin-Aktivierung und –Signalisierung (Pinon et al., 2014). Diese Mutationen wurden jeweils mit einem weiteren Aminosäure-Austausch kombiniert,  $\beta 3$ -D<sup>723</sup>A, der als alleinige Mutation zu stärkerer Integrin-Aktivierung führt (Cluzel et al., 2005). Die entstandenen Mutationen,  $\beta 3$ -D<sup>723</sup>A/S<sup>752</sup>P und  $\beta 3$ -D<sup>723</sup>A/Y<sup>759</sup>A, führen beide zu stärkerer Aktivierung als  $\beta 3$ -wt, aber nur  $\beta 3$ -D<sup>723</sup>A/Y<sup>759</sup>A führt zu einem zu  $\beta 3$ -wt vergleichbaren Spreadingssignal (Pinon et al., 2014). Also ist es auch durch diese die Kindlin-Bindung betreffende Mutation möglich Integrin-Aktivierung und –Signalisierung zu trennen. Im Folgenden werden für diese Mutationen Synonyme für die bessere Verständlichkeit eingeführt:

- $\beta 3$ -S<sup>752</sup>P                      →      $\beta 3$ -S<sup>inaktiv</sup>
- $\beta 3$ -Y<sup>759</sup>A                      →      $\beta 3$ -Y<sup>inaktiv</sup>
- $\beta 3$ -D<sup>723</sup>A/S<sup>752</sup>P                →      $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup>
- $\beta 3$ -D<sup>723</sup>A/Y<sup>759</sup>A                →      $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup>

Wie bereits für die Talin-betreffenden  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen (Abb. 3.11), sind auch diese Kindlin-betreffenden  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen grafisch zusammengefasst (Abb. 3.12).



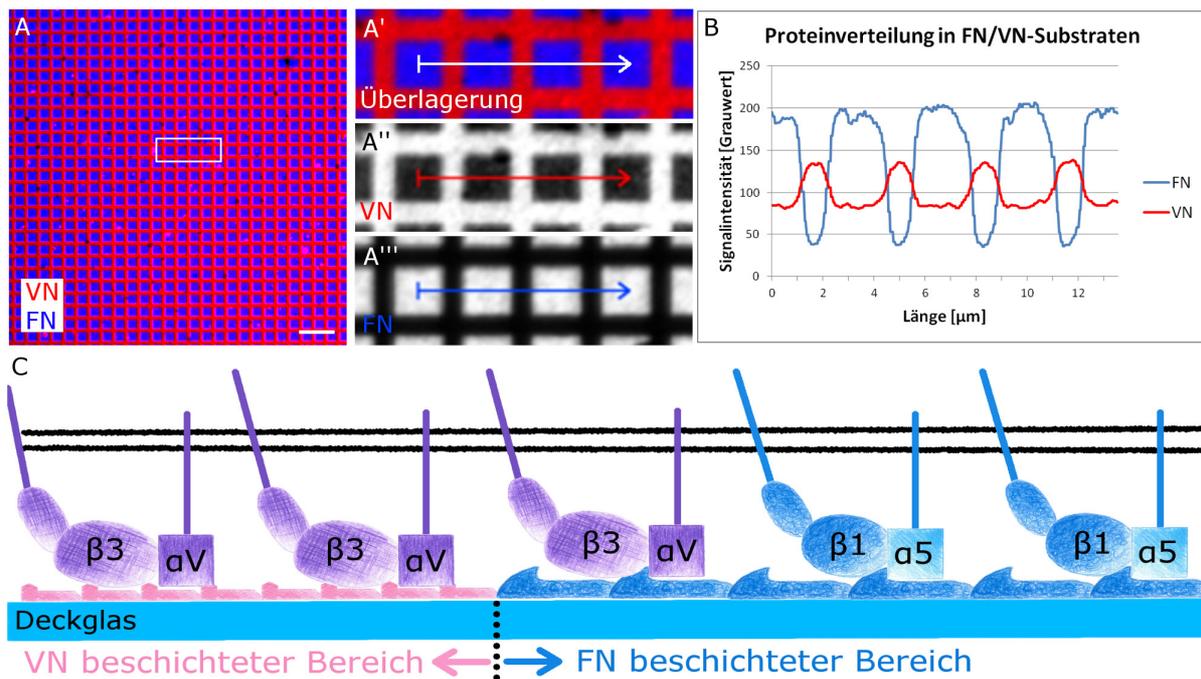
**Abb. 3.12: Aktivität und Signaling Kindlin-betreffender  $\beta 3$ -Integrinmutationen:** Schematische Zusammenfassung der Aktivitäts- und Signalingmessungen der in der Abbildung genannten  $\beta 3$ -Integrinmutationen von Pinon und Kollegen (Pinon et al., 2014). Die Aktivität wird durch die Konformation der Integrine (vgl. Abb. 1.2) angezeigt, Signaling durch die Pfeile, bzw. deren Beschriftung an der  $\beta 3$ -Untereinheit. In den Klammern unter der Beschriftung der jeweiligen Integrin-Varianten am unteren Bildrand sind Aktivität und Signaling ein weiteres Mal zusammengefasst. Diese Klammern sind auch bei folgenden Abbildungen angegeben. Das erste Zeichen bezieht sich auf die Aktivität, die zweite auf Signaling. Zur Übersichtlichkeit werden im Rest der Arbeit die exakten Namen der jeweiligen Mutationen, wie in der obigen Abbildung angezeigt, abgekürzt.

Die aktivierten, aber Spreading inkompetenten Mutationen ermöglichen es, *in cellula* die Signalweiterleitung Integrin-vermittelter ECM-Signale genauer zu untersuchen. Während die Abwesenheit endogener  $\beta 3$ -wt Integrine in den 3T3  $\beta 3$ low-Zellen die Grundlage ist, um die Effekte der Mutationen zu beobachten, erlauben die in dieser Arbeit entwickelten Substrate die Trennung von  $\alpha V\beta 3$ -Integrin und  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin. Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie schließlich liefert die nötige Auflösung, um auch kleine CMA-Strukturen sichtbar zu machen.

### 3.3.1 FN/VN Substrate zur *in cellula* Trennung von $\beta 1$ - und $\beta 3$ - Integrinen

Um FN/VN Substrate zu erstellen, wurde das Protokoll für *direct Microcontact Printing* ( $d\mu CP$ ) modifiziert. Es wurde direkt FN gestempelt, allerdings wurde das Deckglas danach statt mit einer passivierenden Chemikalie mit einer VN-Lösung überschichtet. Beide Proteine wurden in einer Konzentration von 5  $\mu g/ml$  eingesetzt. Zur Darstellung der Proteinverteilung wurden mit Farbstoffen gekoppelte Proteine in einem Verhältnis von 1/40 mit unbehandeltem Protein vermischt. Wie zu sehen ist, bindet VN bevorzugt an die freien Bereiche zwischen den gestempelten FN-Feldern (Abb. 3.13). Das benutzte Muster führt zu FN-Quadraten mit einer Seitenlänge von ca. 2,5  $\mu m$  und einem freien Bereich dazwischen von ca. 1  $\mu m$ . Insgesamt führt dies zu einem Verhältnis von 56 % FN zu 44 % VN. Wie die Intensitätsverteilung für die FN- und die VN-Färbung zeigt, sind die Proteine deutlich

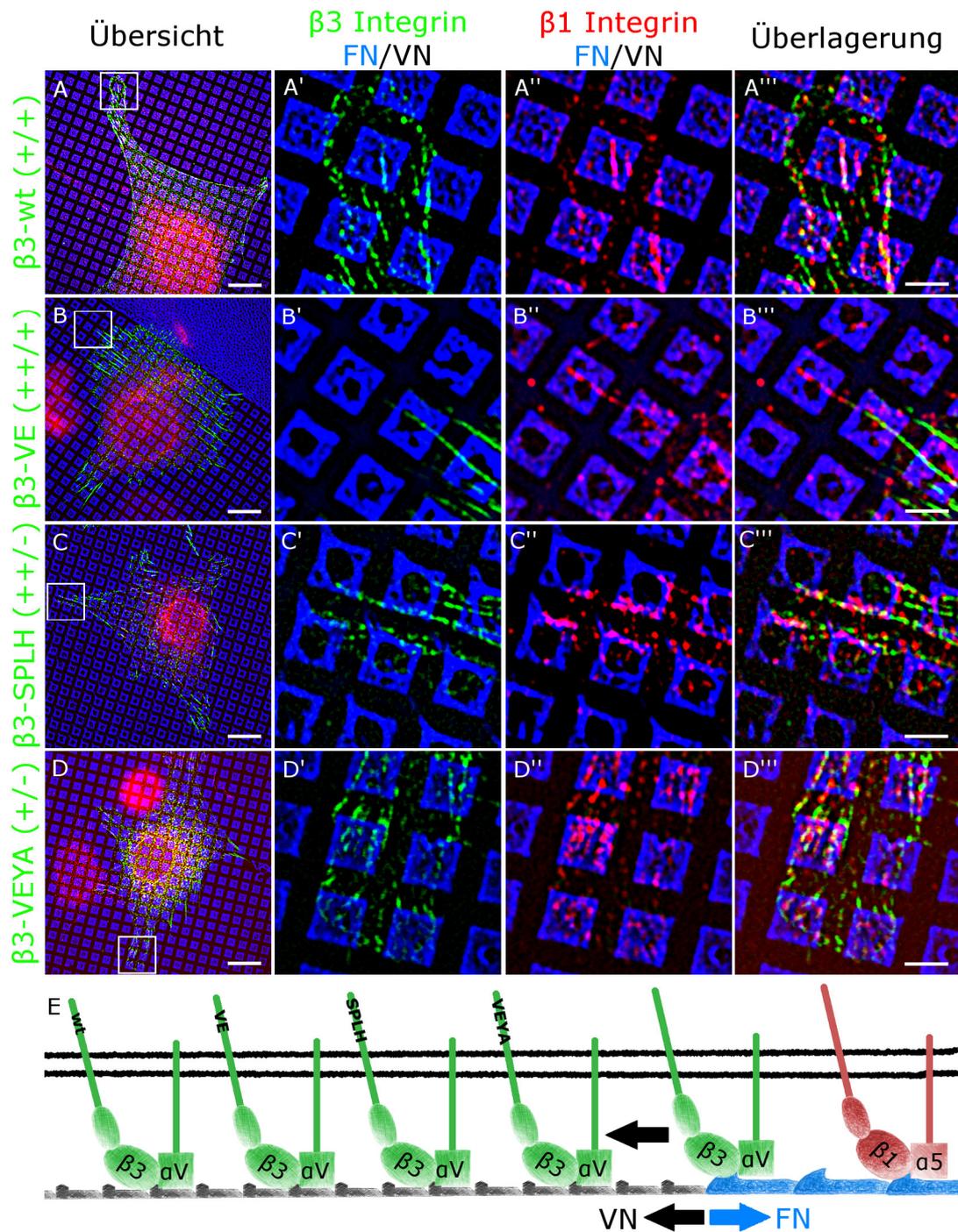
voneinander getrennt (Abb.3.13 B). Man sieht aber, dass das gestempelte FN einen deutlicheren Unterschied zwischen Minima und Maxima aufweist als VN. Die FN-Färbung ist an ihren Maxima 5,9x intensiver als an ihren Minima, während die VN-Färbung nur 1,7x intensiver ist. Dies kann aber dadurch erklärt werden, dass das gestempelte FN bei  $\mu$ CP auf die Stelle des Stempelmusters beschränkt bleibt, während VN bei der anschließenden Bedeckung des Musters alle Stellen erreichen kann und teilweise auch im Bereich der FN-Quadrate binden könnte. Darüber hinaus ist VN mit 75 kDa deutlich kleiner als FN mit 440 kDa und kann daher eventuell auch leichter in Lücken von FN binden. Dies sollte aber die erfolgreiche Trennung von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin nicht behindern. Entsprechend den jeweiligen Bindungspartnern (Humphries et al., 2006) kann  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin nur an FN binden und bleibt auf diese Bereiche beschränkt. Da  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin dagegen sowohl FN, als auch VN binden kann, sollte es in beiden Bereichen CMA's ausbilden. Damit sind beide Integrine getrennt und der Effekt von einer  $\beta$ 3-Mutation kann in 3T3  $\beta$ 3low Zellen unabhängig von anderen Integrienen in den VN-Bereichen analysiert werden (Abb. 3.13 C).



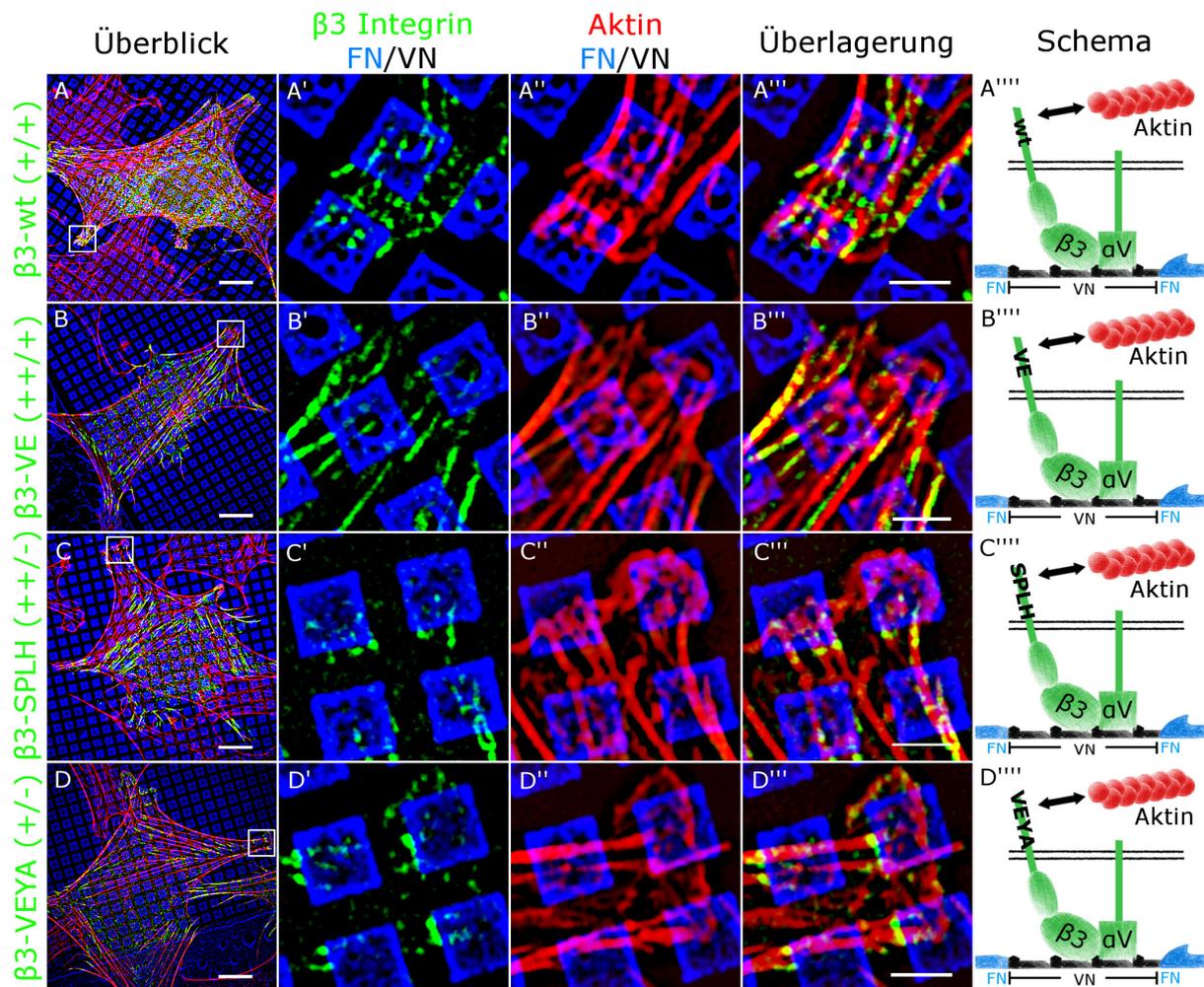
**Abb. 3.13: Differenzielle FN/VN Substrate zur *in cellula* Separierung von Integrinen.** (A) Ähnlich zu direct Microcontact Printing wurde ein PDMS Stempel mit einer 5  $\mu$ g/ml Lösung Fibronectin (FN) (blau) beschichtet und sein Muster auf ein Deckglas übertragen. FN wurde zur Visualisierung mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt. Statt einer Passivierung erfolgte eine Inkubation des Musters mit einer 5  $\mu$ g/ml Lösung Vitronectin (VN) (rot). VN wurde mit Alexa Fluor 568 gelabeltem VN vermischt. VN bindet nur in die freien Bereiche zwischen den FN-Dots. Die Aufnahme erfolgte mit Epifluoreszenzmikroskopie. Insgesamt ergibt sich eine Bedeckung von 56 % FN zu 44 % VN. (A'-A''') Die Vergrößerung des weißen Rechteckes in (A) zeigt die klare Trennung von FN und VN. (B) Das Intensitätsprofil entlang des Pfeils in (A'-A''') bestätigt dies zusätzlich. (C) Schema für die zu erwartende Verteilung von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin auf FN und VN.  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin sollte nur auf FN zu finden sein, während  $\alpha$ V $\beta$ 3 an FN und VN binden sollte (jeweils angezeigt durch die Farbkodierung der Integrine; lila als Mischfarbe von blau (FN) und VN (rot)). Dadurch sollte eine räumliche Trennung der Integrine möglich sein. Maßstabsbalken: (A) 10  $\mu$ m.

Nach Herstellung der Substrate wurden diese mit 3T3  $\beta$ 3low Zellen getestet, die für eine  $\beta$ 3-Integrin-Variante und gegebenenfalls ein weiteres Protein transfiziert wurden. Dabei waren alle Integrin-Mutationen an ein GFP gekoppelt, während im Fall einer Doppeltransfektion das zweite Protein an ein rot fluoreszierendes Protein gekoppelt war. Wenn nicht anders erwähnt wurden Zellen für alle folgenden Experimente auf FN/VN-Substraten für 2h in serumfreiem Medium kultiviert. Dies soll möglichst eine Bedeckung des FN/VN Musters durch andere, in Serum enthaltene Plasmaproteine verhindern. Nach 2h wurden die Proben fixiert und falls erforderlich gegen ein Protein von Interesse mit indirekter Immunfärbung angefärbt. Wenn nicht anders erwähnt wurde SIM zur Untersuchung genutzt.

Eine Färbung für endogenes, aktives  $\beta$ 1-Integrin zeigt, dass Zellen auf den vorhandenen FN-Quadraten mittels dieses Integrins adherieren und spreaden (Abb. 3.14). Dies ist auch für  $\beta$ 3-VEYA und  $\beta$ 3-SPLH möglich, die auf homogenem VN Spreading inkompetent sind (Pinon et al., 2014). Da  $\beta$ 1 einerseits recht strikt auf FN beschränkt ist und alle  $\beta$ 3-Arten ( $\beta$ 3-wt,  $\beta$ 3-VE,  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA) eher auf VN zu finden sind, zeigt sich, dass wie erwartet mit FN/VN-Substraten eine *in cellula* Trennung dieser Integrine möglich ist (Abb. 3.14 A'''-D'''). Da auf der von einer Zelle abgedeckten Fläche in keinem Experiment die FN- oder VN-Bereiche komplett mit CMAs bedeckt sind, scheint die verfügbare ECM kein limitierender Faktor zu sein. Keines der beiden Integrine sollte also in dieser Beziehung, insbesondere in Bezug auf die Fähigkeit zur Signalerzeugung und –weiterleitung, einer Einschränkung unterliegen. Dass  $\beta$ 1-Integrine fast ausschließlich auf FN vorkommen ist ein weiterer Beleg, dass sie kein VN binden können. Dies ist entscheidend für die Interpretation späterer Experimente. Nur so kann man sicher sein, dass auf VN beobachtete Effekte durch das jeweilige  $\beta$ 3-Integrin zustande kommen und nicht durch endogenes  $\beta$ 1-Integrin beeinflusst werden. Die Lokalisation von  $\beta$ 1-Integrinen auf FN zeigt sich unabhängig von der vorliegenden  $\beta$ 3-Integrin Mutationen.



**Abb. 3.14: Differenzielle FN/VN Substrate ermöglichen Spreading mittels endogenem  $\beta 1$ -Integrin.** (A-D) 3T3  $\beta 3$ low Zellen wurden für das links an den Reihen jeweils angegebene, GFP gekoppelte  $\beta 3$ -Integrin transfiziert (grün) und für zwei Stunden auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die Zeichen in Klammern am linken Rand beziehen sich auf die Integrin-Aktivierung (erstes Zeichen), bzw. auf die Spreading-Kompetenz (zweites Zeichen). Gezeigt ist nur Fibronektin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. Anschließend erfolgte eine indirekte immunhistochemische Markierung gegen aktives  $\beta 1$ -Integrin (9EG7-Klon) mit Alexa Fluor 568 (rot). (A'-D') Die Vergrößerung der weißen Quadrate in (A-D) zeigen, dass alle  $\beta 3$ -Integrine vornehmlich an VN, teilweise aber auch an FN binden. (A''-D'')  $\beta 1$ -Integrin im Vergleich ist deutlich auf FN beschränkt, sodass (A'''-D''') in der Überlagerung kaum eine Kolo-kalisation von  $\beta 3$ - und  $\beta 1$ -Integrin zu sehen ist. (E) Das Schema fasst die Ergebnisse zusammen und verdeutlicht die vornehmliche Lokalisation von  $\beta 3$ -Integrin auf VN entgegen der vorherigen Erwartung (Abb. 3.13). Maßstabsbalken: (A-D) 10  $\mu$ m, (A'''-D''') 2  $\mu$ m.



**Abb. 3.15:  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA haben keinen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett.** (A-D) 3T3  $\beta 3$ low Zellen wurden für das links an den Reihen jeweils angegebene, GFP gekoppelte  $\beta 3$ -Integrin transfiziert (grün) und für zwei Stunden auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die Zeichen in Klammern am linken Rand beziehen sich auf die Integrin-Aktivierung (erstes Zeichen), bzw. auf die Spreading-Kompetenz (zweites Zeichen). Gezeigt ist nur Fibronectin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronectin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots.. Anschließend erfolgte eine Färbung des Aktin-Zytoskelettes mit Phalloidin Alexa Fluor 568 (rot). Sowohl die (A-D) Übersichtsbilder, als auch (A''-D'') die Vergrößerungen zeigen eine vergleichbare Aktin-Organisation zwischen  $\beta 3$ -wt und den  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen. (A''''-D''') Ebenso scheint es keine Unterschiede in der Verbindung der  $\beta 3$ -Integrin-vermittelten CMAs zum Aktinzytoskelett zu geben. (A''''-D''') Die Ergebnisse sind schematisch zusammengefasst. Maßstabsbalken: (A-D) 10  $\mu$ m, (A''''-D''') 2  $\mu$ m.

Ein weiterer Beleg, dass Zellen auf differentiellen FN/VN Substraten unabhängig von  $\beta 3$  -Integrin Mutationen zu normalem Spreading fähig sind, ist eine Färbung für das Aktin-Zytoskelett. Dieses ist zum einen ein Indiz für die Zellform, zum anderen bietet eine Aktinfärbung aber auch Hinweise, ob Aktin betreffende Signale durch die jeweilige Mutation beeinflusst sind. Gerade die Form und Struktur des Aktin-Zytoskeletts unterliegt den Signalen von Rho-GTPasen wie RhoA, Rac1 und Cdc42, deren Aktivität wiederum stark durch Integrin-vermittelte Signale beeinflusst wird (siehe Kap. 1.5). Wie sich zeigt sind jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen  $\beta 3$ -wt und den jeweiligen Mutationen zu erkennen (Abb. 3.15). Die Zellformen erscheinen ähnlich zu  $\beta 3$ -wt: Ausläufer der Zelle mit vermehrter Anzahl von CMAs sind durch geschwungene Bögen mit dicken Aktinbündeln

verbunden. Bei jeder Zelle finden sich zudem Aktin-Stressfasern, die durch die Zelle gespannt sind. Ein genauere Blick zeigt, dass größere  $\beta 3$ -VE-,  $\beta 3$ -SPLH- und  $\beta 3$ -VEYA-Cluster in einer ähnlichen Weise wie  $\beta 3$ -wt-Cluster mit Aktinfasern verbunden sind (Abb. 3.15. A''', B''', C''', D'''). Dies ist ein Indiz, dass die vorliegenden Mutationen die indirekte Verbindung von Integrinen mit dem Aktin-Zytoskelett nicht unterbinden.

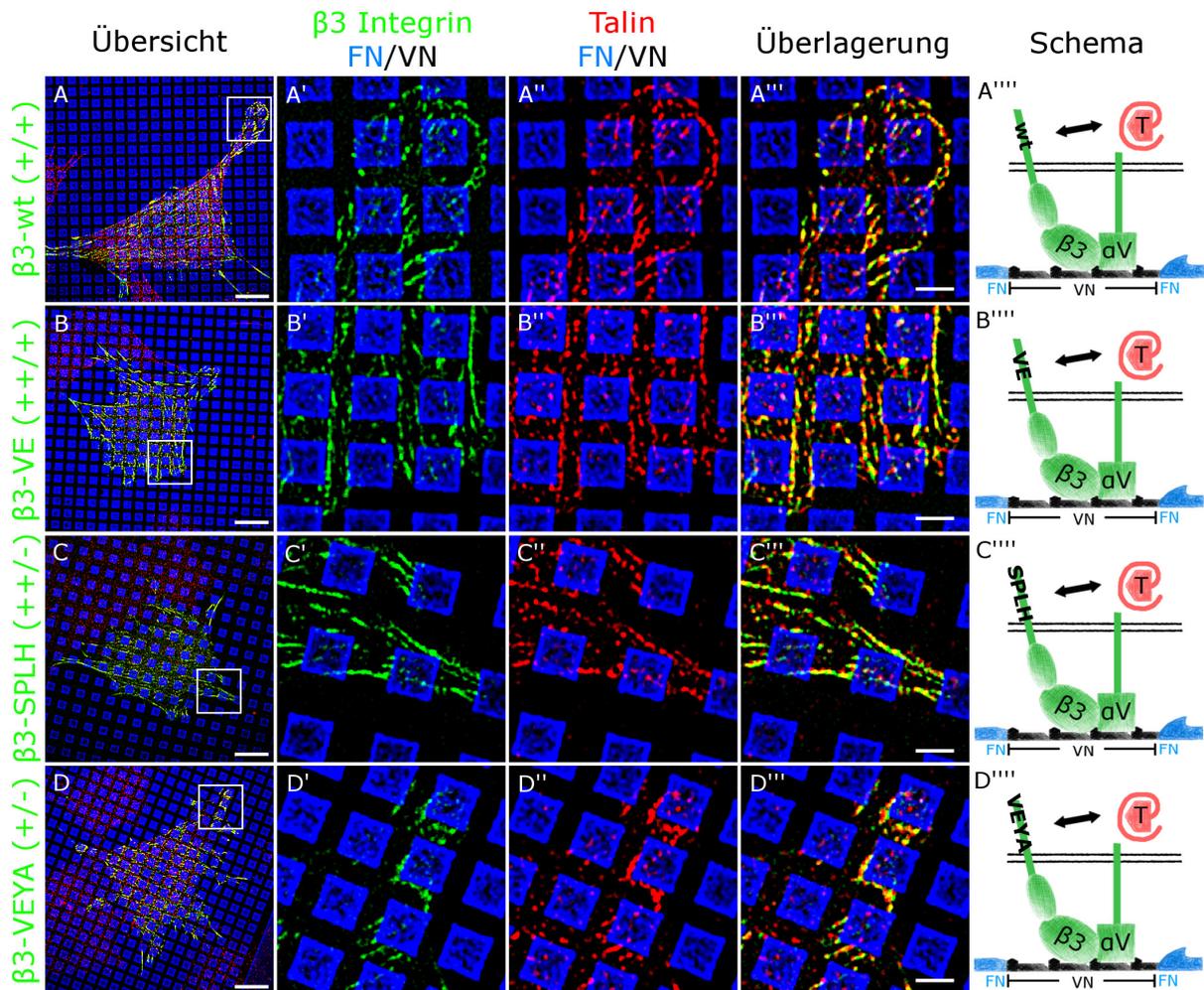
Durch differenzielle FN/VN Substrate ist es also möglich  $\beta 1$ - und  $\beta 3$ -Integrine *in cellula* zu trennen und ihre Effekte getrennt zu studieren. Durch endogenes  $\beta 1$ -wt Integrin können Zellen trotz Spreading inkompetenter  $\beta 3$ -Integrin Mutationen spreaden.

### **3.3.2 Spreading inkompetente Integrine binden Talin und Vinculin, aber weder Paxillin noch FAK**

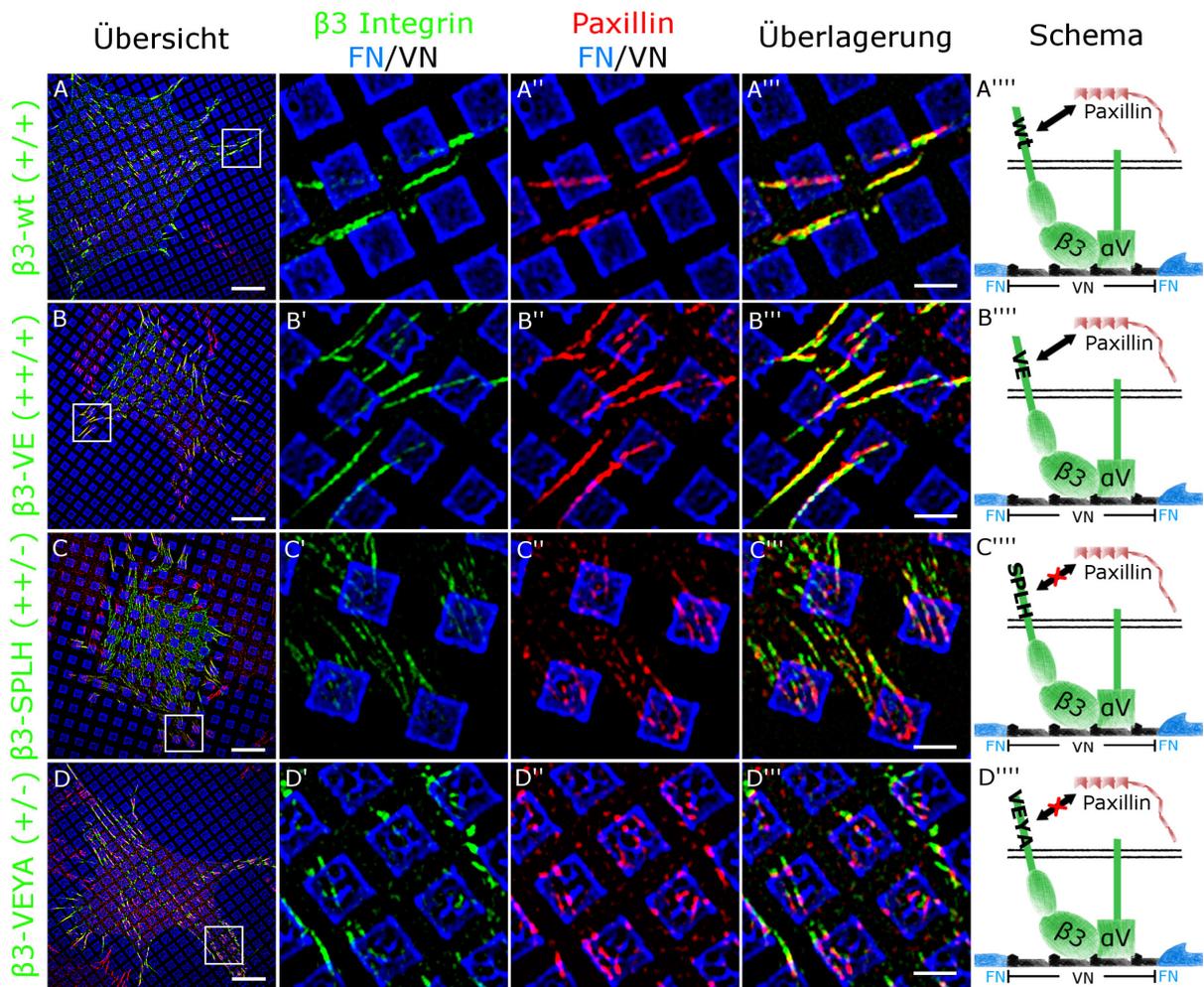
Talin und Kindlin aktivieren Integrine zytoplasmatisch und führen zu einer Konformationsänderung, die die Bindung von Liganden durch Integrine befördert (Shattil et al., 2010). Daher stehen diese Proteine sowohl am Beginn der Zell-Matrix-Adhäsion durch Integrin-Aktivierung, als auch der nachfolgenden Integrin-vermittelten Signalkaskade. Um zu untersuchen, wie sich die verschiedenen  $\beta 3$ -Integrin Mutationen auf die Bindung von Talin auswirken, wurden entsprechend transfizierte 3T3  $\beta 3$ low Zellen auf differenziellen FN/VN Substraten ausgesät und für endogenes Talin markiert (Abb. 3.16). Es zeigt sich, dass alle verwendeten  $\beta 3$ -Integrin-Arten eine ausgeprägte Kollokalisierung mit Talin aufweisen. Der Unterschied in der Spreading-Kompetenz der verschiedenen Mutanten scheint also nicht durch die Rekrutierung von Talin erklärbar zu sein. Dieses Ergebnis stimmt mit GST-Pulldown Assays und Affinitätsmessungen der Gruppe von Bernhard Wehrle-Haller für diese  $\beta 3$ -Mutationen und Talin überein (Pinon et al., 2014).

Paxillin ist sowohl durch seine Bindungsstellen für andere Proteine, als auch durch seine Phosphorylierungsstellen eines der wichtigsten Adapterproteine in CMAs. Durch seine Bindungspartner, insbesondere im phosphorylierten Zustand, ist Paxillin am Zellspreading beteiligt. Daher wurde die Paxillinrekrutierung der verwendeten  $\beta 3$ -Integrin Mutationen näher untersucht. Wie sich zeigt gibt es für Paxillin einen deutlichen Unterschied zwischen den Spreading kompetenten  $\beta 3$ -wt und  $\beta 3$ -VE einerseits, und den Spreading inkompetenten  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA andererseits (Abb. 3.17). Während  $\beta 3$ -wt und  $\beta 3$ -VE eine nahezu durchgängige Kollokalisierung mit Paxillin zeigen (Abb. 3.17 A''', B'''), ist eine solche für  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA in keinem vergleichbaren Maß zu erkennen (Abb. 3.17 C''', D'''). Bei  $\beta 3$ -SPLH gibt es auf VN an wenigen Stellen eine Kollokalisierung mit Paxillin (Abb. 3.17 C'''). Dies scheint vor allem bei CMAs der Fall zu sein, die sich nicht ausschließlich auf VN befinden, sondern sich auch auf FN erstrecken. Bei  $\beta 3$ -VEYA dagegen ist auf VN keine Kollokalisierung mit Paxillin zu erkennen (Abb. 3.17 D'''). Nur auf FN oder an den Rändern von FN zu VN ist teilweise eine Überlappung der Färbungen zu erkennen. Da an diesen Stellen aber auch endogenes  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vorliegt, kann Paxillin hier auch durch dieses Integrin rekrutiert werden. Für alle verwendeten  $\beta 3$ -Integrin-Varianten sind Paxillin-positive, aber  $\beta 3$ -Integrin freie CMAs auf FN zu

sehen. Dies deutet auf eine Rekrutierung durch endogenes  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin, aber auch auf eine geringe Affinität der  $\beta 3$ -Integrine für FN hin.

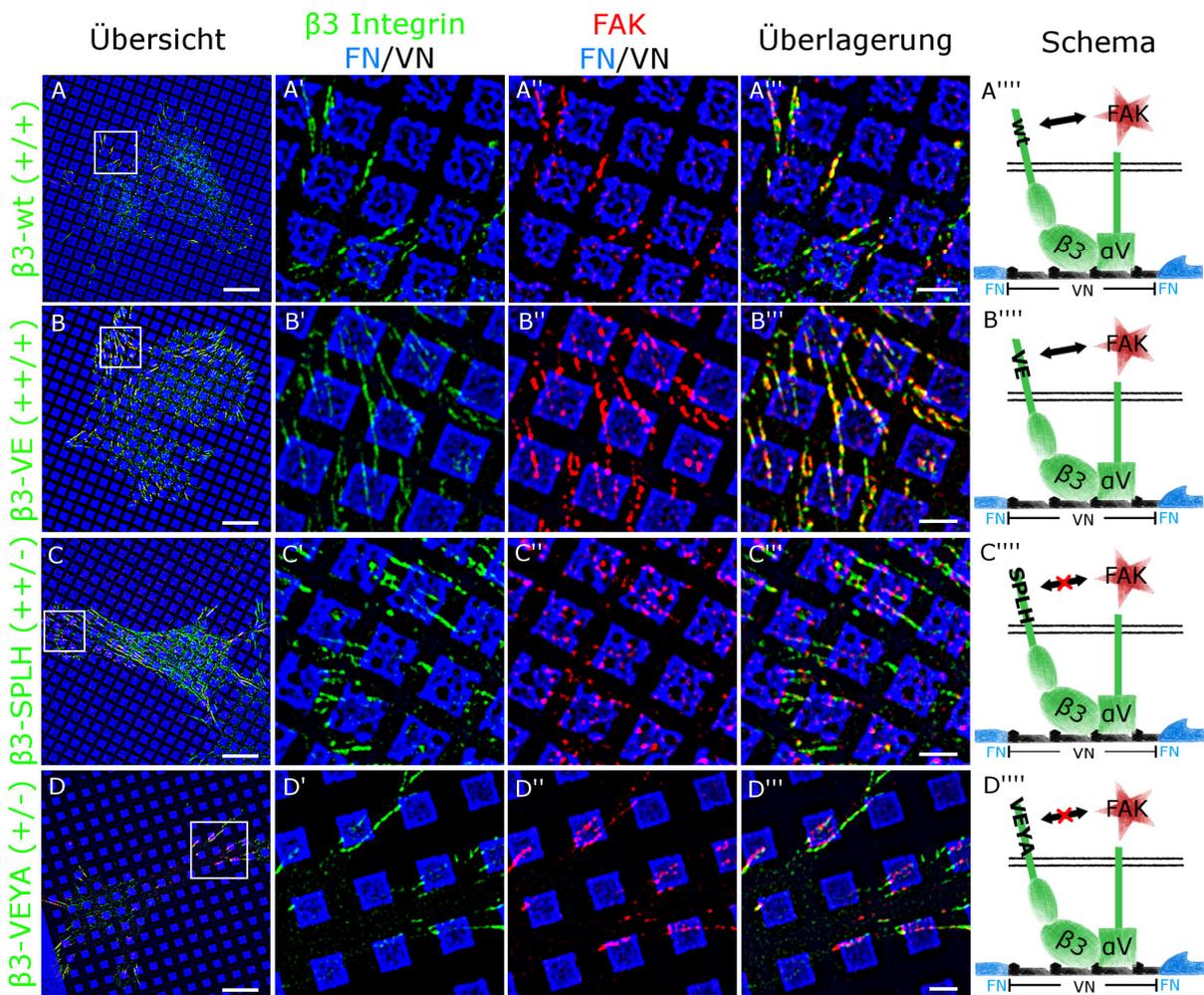


**Abb. 3.16: Talin kolokalisiert mit  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA vergleichbar zu  $\beta 3$ -wt.** (A-D) 3T3  $\beta 3$ low Zellen wurden für das links an den Reihen jeweils angegebene, GFP gekoppelte  $\beta 3$ -Integrin transfiziert (grün) und für zwei Stunden auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die Zeichen in Klammern am linken Rand beziehen sich auf die Integrin-Aktivierung (erstes Zeichen), bzw. auf die Spreading-Kompetenz (zweites Zeichen). Gezeigt ist nur Fibronektin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. Anschließend erfolgte eine indirekte immunhistochemische Markierung gegen Talin mit Cy3 (rot). Die Vergrößerungen (A'-D'') zeigen, dass alle  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen vergleichbar zu  $\beta 3$ -wt mit Talin kolokalisieren. (A''''-D''') Die Ergebnisse sind schematisch zusammengefasst. Maßstabsbalken: (A-D) 10  $\mu$ m, (A''''-D''') 2  $\mu$ m.



**Abb. 3.17: Spreading inkompetente  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA Mutationen kolokalisieren nicht mit Paxillin.** (A-D) 3T3  $\beta$ 3low Zellen wurden für das links an den Reihen jeweils angegebene, GFP gekoppelte  $\beta$ 3-Integrin transfiziert (grün) und für zwei Stunden auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die Zeichen in Klammern am linken Rand beziehen sich auf die Integrin-Aktivierung (erstes Zeichen), bzw. auf die Spreading-Kompetenz (zweites Zeichen). Gezeigt ist nur Fibronektin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. Anschließend erfolgte eine indirekte immunhistochemische Markierung gegen Paxillin mit Cy3 (rot). Die Vergrößerungen (A'-B''') zeigen, dass  $\beta$ 3-wt und  $\beta$ 3-VE deutlich mit Paxillin kolokalisieren. (C'-D''') Im Gegensatz zeigen die Färbungen von  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA keine vergleichbare Übereinstimmung mit der von Paxillin. (A''''-D''') Die Ergebnisse sind schematisch zusammengefasst. Maßstabsbalken: (A-D) 10  $\mu$ m, (A''''-D''') 2  $\mu$ m.

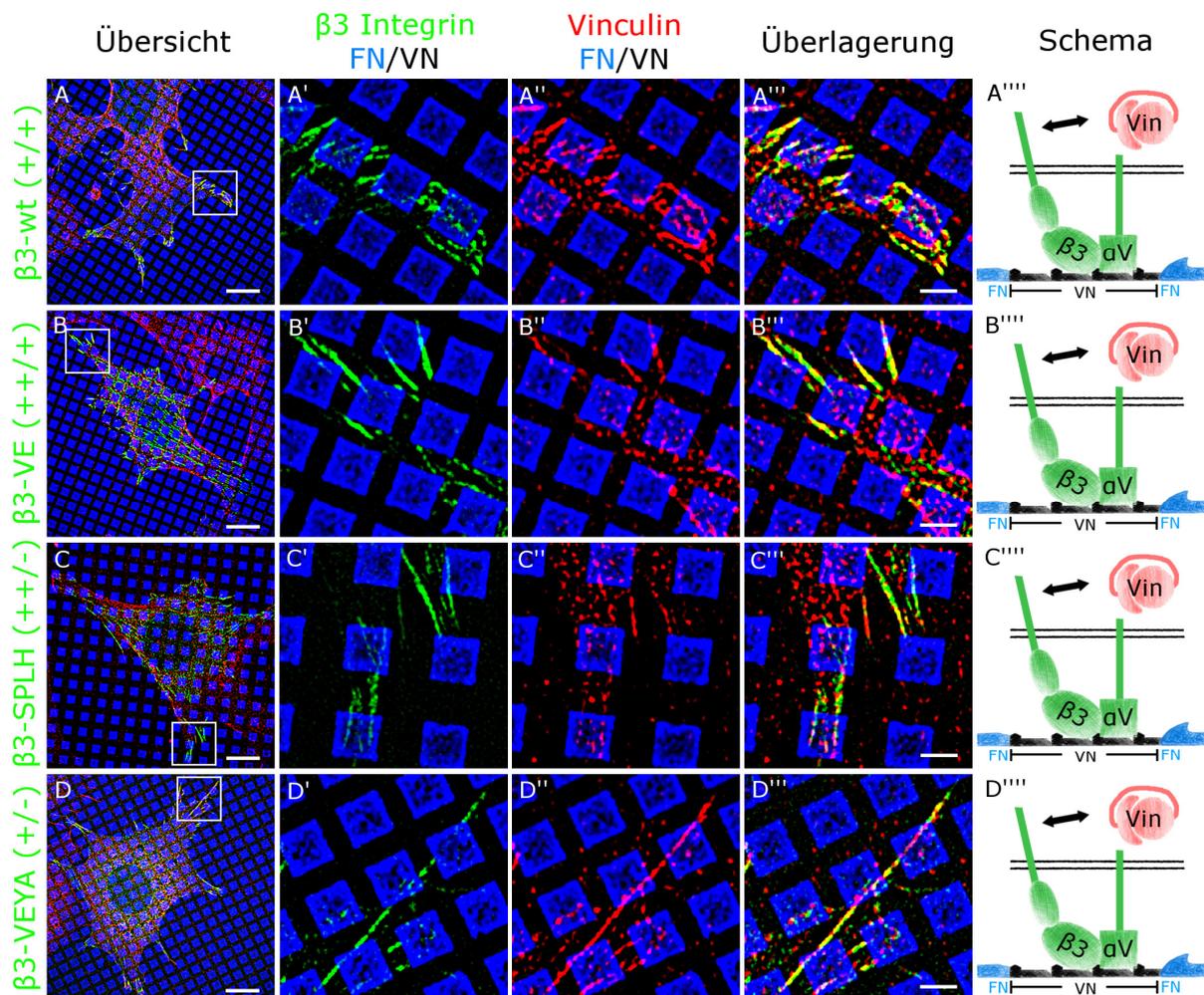
Wie erwähnt, spielt phosphoryliertes Paxillin beim Zellspreading eine wichtige Rolle. Die Tyrosine 31 und 118 (Y31 und Y118), führen im phosphorylierten Zustand entweder zur Rac1-Aktivierung oder zur RhoA-Inhibierung, was wichtig für ein erfolgreiches Zellspreading ist (Deakin and Turner, 2008). Die Phosphorylierung von Y31 und Y118 geschieht durch einen Kinasekomplex von Src und *Focal Adhesion Kinase* (FAK). Daher wurde mit einer Doppeltransfektion der untersuchten  $\beta$ 3-Integrin-Arten mit FAK die jeweilige Interaktion untersucht. Die Färbung zeigt, dass die Rekrutierung von FAK sich wie die von Paxillin verhält (Abb. 3.18).  $\beta$ 3-wt und  $\beta$ 3-VE kolokalisieren deutlich mit FAK (Abb. 3.18 A''', B'''). Für  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA ist dies nicht der Fall (Abb. 3.18 C''', D''').



**Abb. 3.18: FAK kolokalisiert analog zu Paxillin nicht mit Spreading inkompetenten  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA Mutationen.** (A-D) 3T3  $\beta$ 3low Zellen wurden für das links an den Reihen jeweils angegebene, GFP gekoppelte  $\beta$ 3-Integrin (grün) und für FAK-RFP (rot) transfiziert und für zwei Stunden auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die Zeichen in Klammern am linken Rand beziehen sich auf die Integrin-Aktivierung (erstes Zeichen), bzw. auf die Spreading-Kompetenz (zweites Zeichen). Gezeigt ist nur Fibronektin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. Die Vergrößerungen (A'-B''') zeigen, dass  $\beta$ 3-wt und  $\beta$ 3-VE deutlich mit FAK kolokalisieren. (C'-D''') Im Gegensatz zeigen die Färbungen von  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA keine vergleichbare Übereinstimmung mit der von FAK. (A''''-D''') Die Ergebnisse sind schematisch zusammengefasst. Maßstabsbalken: (A-D) 10  $\mu$ m, (A''''-D''') 2  $\mu$ m.

Ein wichtiges Protein für die Reifung von CMAs ist Vinculin. Vinculin hat zum einen Bindungsstellen für viele an CMAs beteiligte Proteine und wird zum anderen als wichtiges Protein für die Wahrnehmung und Verarbeitung von auf CMAs einwirkenden Kräften angesehen (Ziegler et al., 2006). Vinculin hat eine Paxillin-Bindungsstelle. Diese bindet Teile des Bereiches von Paxillin, an den auch FAK bindet (Brown et al., 1996). Untersuchungen von Proteininteraktionen des Adhäsoms legen nahe, dass die Bindung von Vinculin und FAK an Paxillin beide *in cellula* umgesetzt sind, sich aber gegenseitig ausschließen (Hoffmann et al., 2014), und dass der Phosphorylierung von Paxillin eine wichtige Rolle bei der Vinculinrekrutierung zukommt (Pasapera et al., 2010). Andere Studien deuten dagegen darauf hin, dass die Paxillin-Bindungsstelle in Vinculin sowohl für die Lokalisierung von

Vinculin, als auch von Paxillin in CMAs verzichtbar ist (Carisey et al., 2013). Um dies näher zu untersuchen wurden Doppeltransfektionen der  $\beta 3$ -Integrin Mutationen mit Vinculin mCherry durchgeführt (Abb. 3.19). Es zeigte sich kein Einfluss der Mutationen auf die Vinculin-Rekrutierung in CMAs. Bei allen verwendeten  $\beta 3$ -Integrinen sieht man längliche Vinculin Cluster, die sich über FN und VN erstrecken. Da dies auch  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA CMAs gilt, die kein Paxillin rekrutieren (Abb. 3.17), findet zumindest auf VN eine Paxillin-unabhängige Rekrutierung von Vinculin statt. Damit scheint Vinculin auch nicht direkt für Integrin-Signaling nötig zu sein, das zu Zellspreading führt.

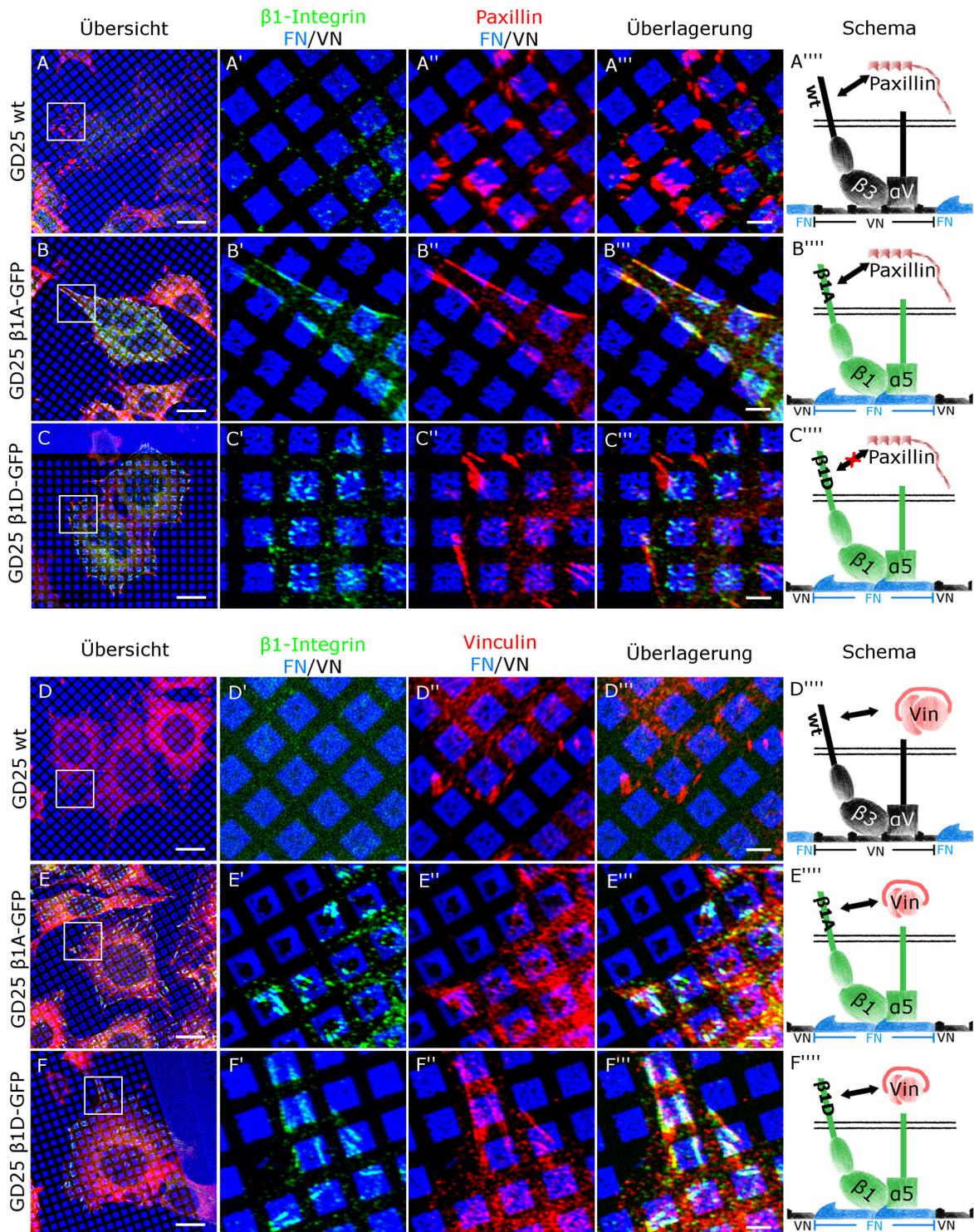


**Abb. 3.19: Vinculin kolokalisiert mit Spreading inkompetente  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA Mutationen.** (A-D) 3T3  $\beta 3$ low Zellen wurden für das links an den Reihen jeweils angegebene, GFP gekoppelte  $\beta 3$ -Integrin transfiziert (grün) und für zwei Stunden auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die Zeichen in Klammern am linken Rand beziehen sich auf die Integrin-Aktivierung (erstes Zeichen), bzw. auf die Spreading-Kompetenz (zweites Zeichen). Gezeigt ist nur Fibronektin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. Anschließend erfolgte eine indirekte immunhistochemische Markierung gegen Vinculin mit Cy3 (rot). Die Vergrößerungen (A'-D''') zeigen, dass alle  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen im gleichen Maß wie  $\beta 3$ -wt mit Vinculin kolokalisieren. (A''''-D''''') Die Ergebnisse sind schematisch zusammengefasst. Maßstabsbalken: (A-D) 10  $\mu$ m, (A''''-D''''') 2  $\mu$ m.

### 3.3.3 Vergleich zu $\beta$ 1-Integrin-Spleißvarianten

$\beta$ 1-Integrin kommt in verschiedenen Spleißvarianten vor. Während  $\beta$ 1A ubiquitär exprimiert wird, ist  $\beta$ 1D eine muskelspezifische Isoform von Herzmuskelzellen und quergestreiften Muskelzellen (Belkin et al., 1996). Neben der unterschiedlichen Expression sind, vor allem in funktioneller Hinsicht, nur wenige Unterschiede bekannt. Ein deutlicher Unterschied besteht in der unterschiedlichen Affinität für Talin, die bei  $\beta$ 1D-Integrin um ein vielfaches über der von  $\beta$ 1A-Integrin liegt (Anthis et al., 2010). Die Gruppe von Bernhard Wehrle-Haller hat für diese Zell-Linien zur Verfügung gestellt, die genauere Untersuchungen von Unterschieden zwischen  $\beta$ 1A und  $\beta$ 1D erlauben. Diese basieren auf einer GD25wt-Zell-Linie, die kein  $\beta$ 1-Integrin-Gen aufweist (Fässler et al., 1995). Diese Zellen wurden entweder stabil für  $\beta$ 1A-Integrin (GD25  $\beta$ 1A-GFP) oder für  $\beta$ 1D-Integrin (GD25  $\beta$ 1D-GFP) transfiziert. Beide Proteine sind jeweils an ein GFP gekoppelt. Zellen von allen drei Zell-Linien wurden analog zu den vorherigen Versuchen mit 3T3  $\beta$ 3low-Zellen auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die Kultivierungszeit betrug hier allerdings vier Stunden. Anschließend erfolgte eine immunhistochemische Markierung von Paxillin (Abb. 3.20 A-C''), bzw. von Vinculin (Abb. 3.20 D-F''). Um das GFP-Signal zu verstärken erfolgte in diesem Experiment zusätzliche eine immunhistochemische Markierung von GFP. GD25wt-Zellen zeigen mangels GFP-Expression nur unspezifische Färbung oder Rauschen (Abb. 3.20 A', D'). Allerdings sind, vorwiegend auf VN, deutliche CMAs zu sehen (Abb. 3.20 A'', D''). Dies legt nahe, dass diese Zellen mit  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin adherieren. Im Gegensatz dazu, zeigen die  $\beta$ 1-Integrin exprimierenden Zell-Linien deutliche Integrincluster auf FN (Abb. 3.20 B', C', E', F') und damit, dass  $\beta$ 1A und  $\beta$ 1D beide in der Lage sind FN zu binden und CMAs zu bilden. Ein Unterschied zwischen beiden Integrinen zeigt sich aber in der Kolo-kalisation mit Paxillin. Während  $\beta$ 1A-Integrin deutlich kolo-kalisiert (Abb. 3.20 B''), ist Paxillin bei  $\beta$ 1D-Integrinexpression nahezu ausschließlich auf VN zu sehen (Abb. 3.20 C''). Damit gleicht die Paxillinlokalisation eher der von  $\beta$ 1-Integrin-freien GD25wt-Zellen und legt nahe, dass Paxillin durch  $\beta$ 1D-Integrin nicht rekrutiert wird. Die Rekrutierung von Vinculin dagegen, scheint von der Art der exprimierten  $\beta$ 1-Integrinform unabhängig zu sein. Sowohl für  $\beta$ 1A-Integrin, als auch für  $\beta$ 1D-Integrin ist jeweils eine deutliche Kolo-kalisation zu sehen.

Damit gibt es eine auffällige Analogie zu den zuvor untersuchten  $\beta$ 3-Integrin-Mutationen. Während sich  $\beta$ 1A-Integrin analog zu  $\beta$ 3-wt und  $\beta$ 3-VE zu verhalten scheint, gleicht  $\beta$ 1D-Integrin den Signaling-defizitären  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA.

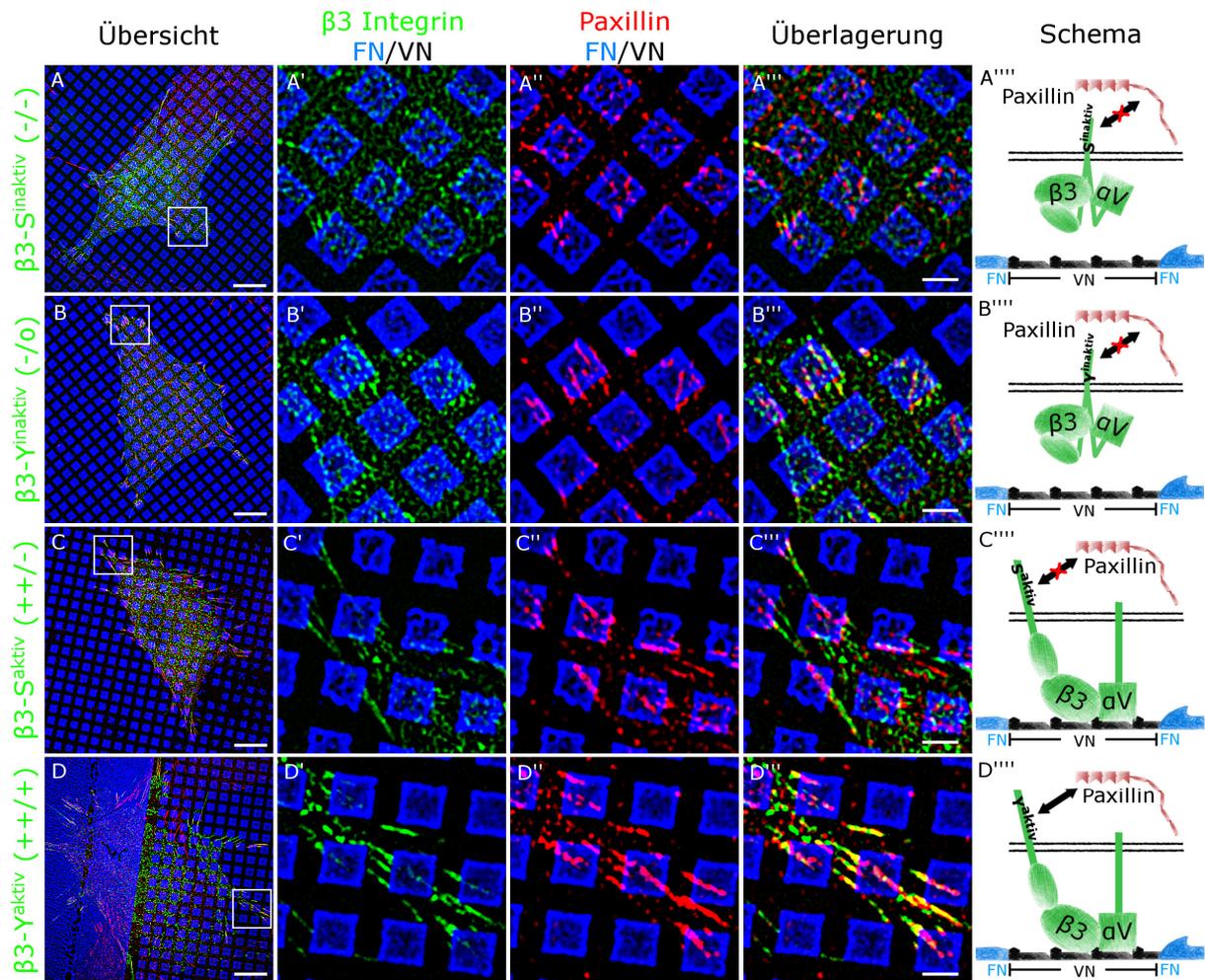


**Abb. 3.20:  $\beta 1D$ -Integrin kolokalisiert mit Vinculin, aber nicht mit Paxillin.** (A-F) Verschiedene GD25 Zell-Linien wurden für vier Stunden auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die jeweilige Zell-Linie ist am linken Rand angegeben. GD25wt exprimiert kein  $\beta 1$ -Integrin, GD25  $\beta 1A$ -GFP exprimiert stabil an GFP gekoppeltes  $\beta 1A$ -Integrin, GD25  $\beta 1D$ -GFP analog dazu  $\beta 1D$ -Integrin. Gezeigt ist nur Fibronectin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronectin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. Anschließend erfolgte eine indirekte immunhistochemische Markierung gegen (A-C''') Paxillin, bzw. (D-F''') gegen Vinculin, jeweils mit Cy3 (rot) und in allen Fällen gegen GFP mit Alexa Fluor 488. Während  $\beta 1A$  mit Paxillin und mit Vinculin kolokalisiert, ist dies für  $\beta 1D$  nur bei Vinculin der Fall. Die Aufnahmen wurden mit strukturierter Beleuchtung (Zeiss ApoTome) erstellt. (A''''-F''') Die Ergebnisse sind schematisch zusammengefasst. Maßstabsbalken: (A-F) 10  $\mu m$ , (A''''-F''') 2  $\mu m$ .

### 3.3.4 Kindlinbindung an $\beta 3$ -Integrin beeinflusst Integrin-Aktivierung und -Signaling

Auf zytoplasmatischer Seite ist für die Integrin-Aktivierung sowohl Talin, als auch Kindlin verantwortlich (Shattil et al., 2010). Im Vergleich ist über den Einfluss und die Bindungspartner von Kindlin weniger bekannt, als im Fall von Talin. FN/VN-Substrate eignen sich zusammen mit 3T3  $\beta 3$ low Zellen und entsprechenden  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen (Abb. 3.13) auch zur Untersuchung des Einflusses von Kindlin auf Signaling und Adapterrekrutierung. Dazu stehen die zuvor beschriebenen  $\beta 3$ -S<sup>inaktiv</sup>,  $\beta 3$ -Y<sup>inaktiv</sup>,  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> und  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> Mutationen zur Verfügung. Während  $\beta 3$ -S<sup>inaktiv</sup> und  $\beta 3$ -Y<sup>inaktiv</sup> eine verringerte Integrinaktivierung zeigen, ist diese bei  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> und  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> vergleichbar zu  $\beta 3$ -wt. Allerdings führt bei  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> die Integrin-Aktivierung nicht zu einem Spreading der transfizierten Zellen auf homogenem VN. Damit ist diese Mutation vom Phänotyp her vergleichbar zu  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA. Im Gegensatz dazu zeigt  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> ein vergleichbares Zellspreading wie  $\beta 3$ -wt (Pinon et al., 2014).

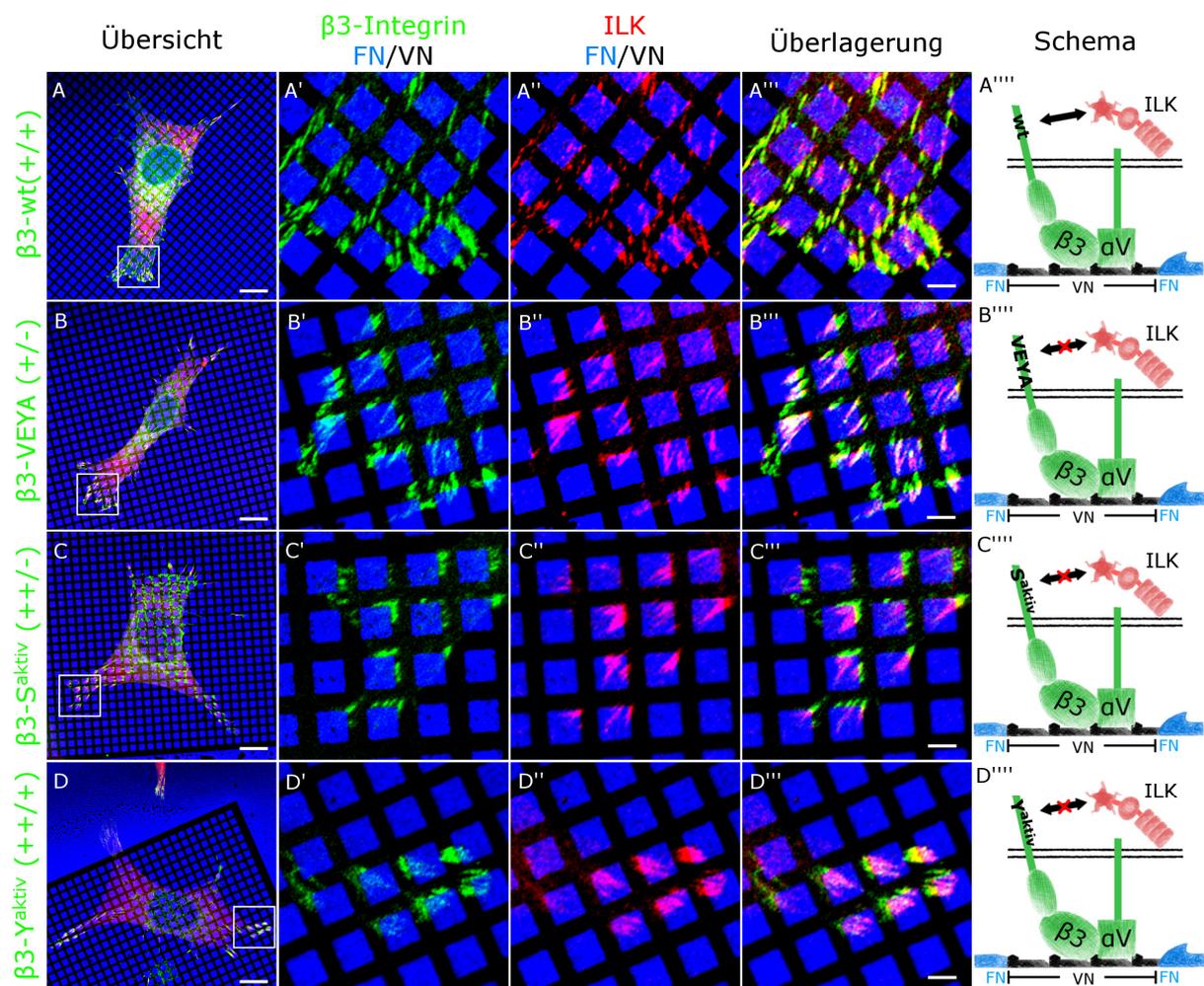
Insbesondere in Hinblick auf den zu  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA vergleichbaren Phänotyp der  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> Mutation wurde die Koloalysierung mit Paxillin untersucht (Abb. 3.21). Es zeigt sich, dass die Ähnlichkeit der Phänotypen auch bei der Paxillinrekrutierung erhalten bleibt. Die  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> Mutation führt auf VN zu keiner Rekrutierung von Paxillin (Abb. 3.21 C''). Im Vergleich dazu sieht man bei der Spreading kompetenten  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> Mutation eine deutliche Koloalysierung mit Paxillin (Abb. 3.21 D''). Von den inaktiven Mutationen zeigt  $\beta 3$ -Y<sup>inaktiv</sup> nur in geringem Umfang (Ab. 3.21 B''), und  $\beta 3$ -S<sup>inaktiv</sup> keine Überlagerung mit Paxillin (Abb. 3.21 A''). Mangels Aktivierung zeigen die inaktiven Mutationen auch wenig bis gar kein Clustering (Abb. 3.21 A', B'). Entsprechend ist Paxillin vor allem auf FN, bei endogenem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, lokalisiert (Abb. 3.21 A'', B'').



**Abb. 3.21: Die Rekrutierung von Paxillin wird durch die  $\beta 3$ -Integrin-Kindlin Interaktion beeinflusst.** (A-D) 3T3  $\beta 3^{\text{low}}$  Zellen wurden für das links an den Reihen jeweils angegebene, GFP gekoppelte  $\beta 3$ -Integrin transfiziert (grün) und für zwei Stunden auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die Zeichen in Klammern am linken Rand beziehen sich auf die Integrin-Aktivierung (erstes Zeichen), bzw. auf die Spreading-Kompetenz (zweites Zeichen). Gezeigt ist nur Fibronektin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. Anschließend erfolgte eine indirekte immunhistochemische Markierung gegen Paxillin mit Cy3 (rot). Die Vergrößerungen (A'-D'') zeigen, dass nur  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> mit Paxillin kolokalisiert, während bei allen anderen  $\beta 3$ -Integrinen keine Kolokalisation mit Paxillin auftritt. (A''''-D''') Die Ergebnisse sind schematisch zusammengefasst. Maßstabsbalken: (A-D) 10  $\mu\text{m}$ , (A''''-D''') 2  $\mu\text{m}$ .

Der ILK-Pinch-Parvin-Komplex (IPP-Komplex) ist neben Integrin einer der wenigen bekannten Interaktionspartner von Kindlin (Kap. 1.4). Es findet aber auch eine Interaktion mit Paxillin statt, die insbesondere für den Einfluss des IPP-Komplexes auf Signalkaskaden wichtig ist. Der IPP-Komplex ist beteiligt an der Reifung von CMAs und hat dadurch Einfluss auf Fibrillogenese, Zelladhäsion, Spreading und Migration (Wickström et al., 2010b). Wie genau der IPP-Komplex *in cellula* in CMAs rekrutiert wird, ist aber noch nicht eindeutig geklärt. Um die näher zu untersuchen wurden Doppeltransfektionen für  $\beta 3$ -wt,  $\beta 3$ -VEYA,  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> und  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> und ILK-mCherry durchgeführt. Der IPP-Komplex wird gebildet, noch bevor die Einzelkomponenten in CMAs rekrutiert werden (Zhang et al., 2002). Daher zeigt eine Färbung für ILK den gesamten IPP-Komplex an. Entsprechend wird im

Folgendes von der Rekrutierung des IPP-Komplexes gesprochen, auch wenn nur ILK angefärbt wurde. Wie sich deutlich zeigt, ist  $\beta 3$ -VEYA nicht in der Lage den IPP-Komplex zu rekrutieren (Abb. 3.22 B'''), da ILK nahezu ausschließlich auf FN zu finden ist. Da  $\beta 3$ -VEYA kein Paxillin rekrutiert (Abb. 3.17 D'''), zeigt sich hier ein Einfluss von Paxillin auf die Rekrutierung von ILK, bzw. des IPP-Komplexes.  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> kolokalisiert ebenfalls nicht mit ILK (Abb. 3.22 C'''). Da  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> kein Kindlin (Moser et al., 2008), aber auch kein Paxillin rekrutiert (Abb. 3.21 C'''), sagt dieses Ergebnis noch nichts über die Kindlin-Abhängigkeit der IPP-Rekrutierung aus. Gleichzeitig scheint aber auch  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> nicht in der Lage zu sein, den IPP-Komplex zu rekrutieren (Abb. 3.22 D'''). Diese Mutation rekrutiert zwar ebenfalls kein Kindlin (Moser et al., 2008), aber Paxillin (Abb. 3.21 D'''). Also ist  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> trotz der Anwesenheit von Paxillin nicht in der Lage, den IPP-Komplex zu rekrutieren. Damit zeigt sich eine Rekrutierung des IPP-Komplexes, die auf die gleichzeitige Anwesenheit von Paxillin und Kindlin angewiesen ist.

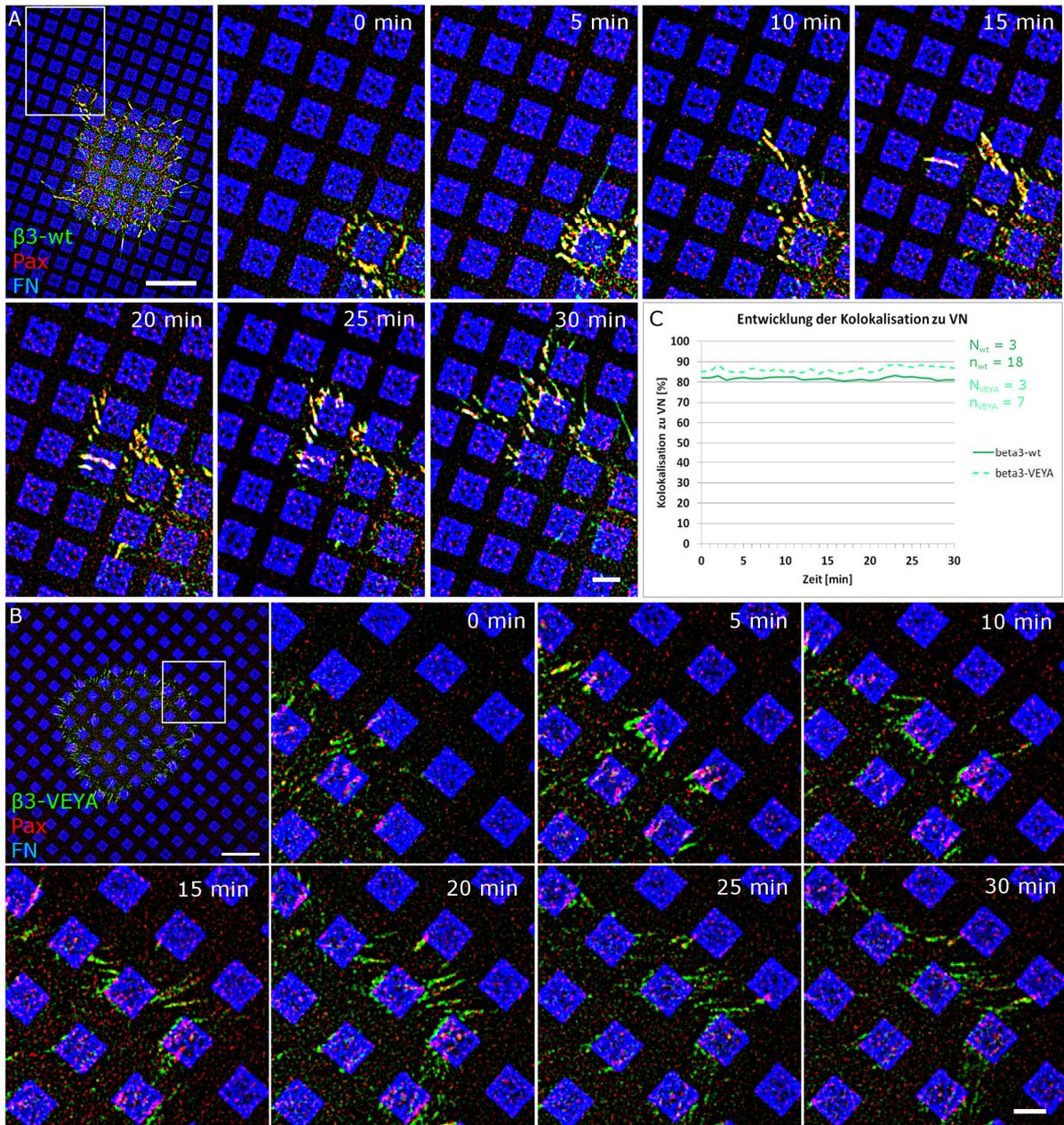


**Abb. 3.22: Weder Kindlin-, noch Paxillin-defizitäre  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen kolokalisieren mit ILK.** (A-D) 3T3  $\beta 3$ low Zellen wurden für das links an den Reihen jeweils angegebene, GFP gekoppelte  $\beta 3$ -Integrin (grün) und für ILK-mCherry (rot) transfiziert und zwei Stunden auf FN/VN-Substraten kultiviert. Die Zeichen in Klammern am linken Rand beziehen sich auf die Integrin-Aktivierung (erstes Zeichen), bzw. auf die Spreading-Kompetenz (zweites Zeichen). Gezeigt ist nur Fibronektin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. Die Aufnahmen wurden mit strukturierter Beleuchtung (Zeiss ApoTome) erstellt. Die Vergrößerungen (A'-D'') zeigen, dass nur  $\beta 3$ -wt mit ILK kolokalisiert. Weder die Paxillin-defizitäre  $\beta 3$ -VEYA Mutation, noch die Kindlin-defizitären  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> und  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> Mutationen kolokalisieren mit ILK. (A''''-D'') Die Ergebnisse sind schematisch zusammengefasst. Maßstabsbalken: (A-D) 10  $\mu$ m, (A''''-D'') 2  $\mu$ m.

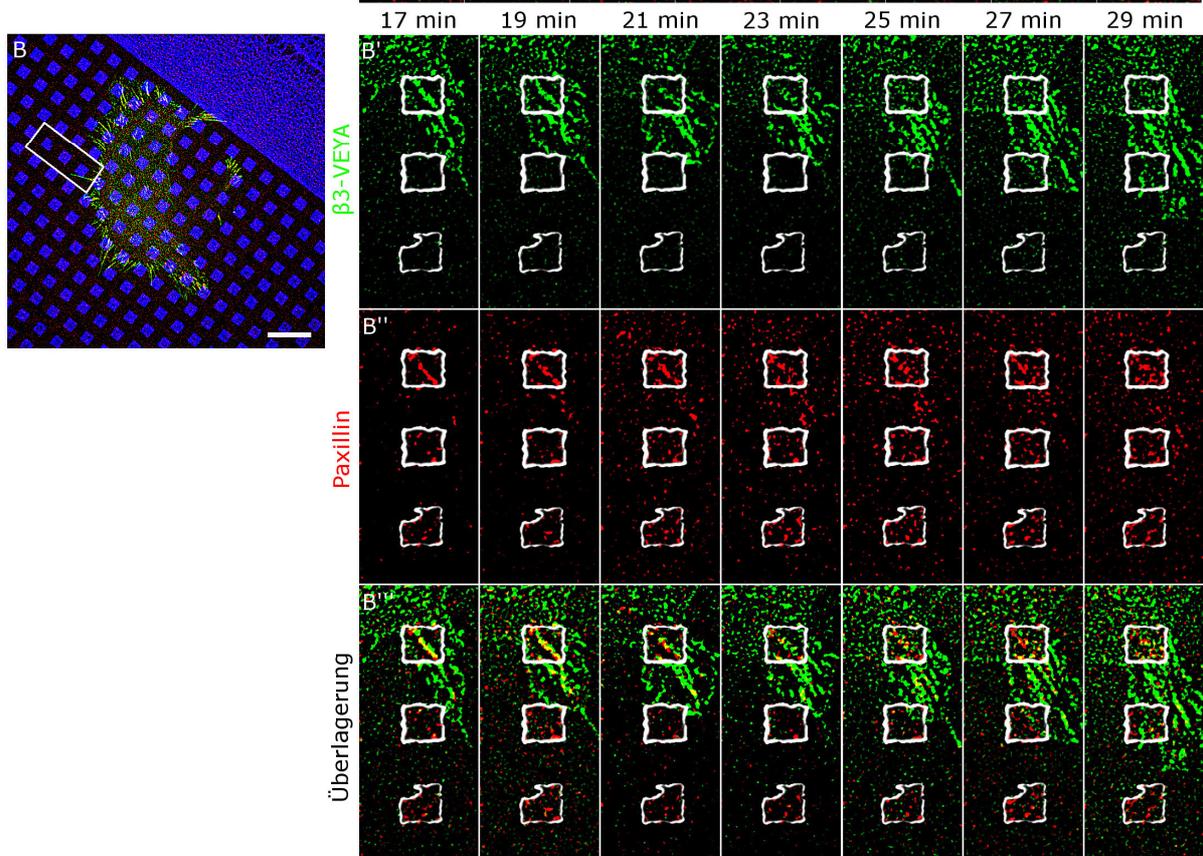
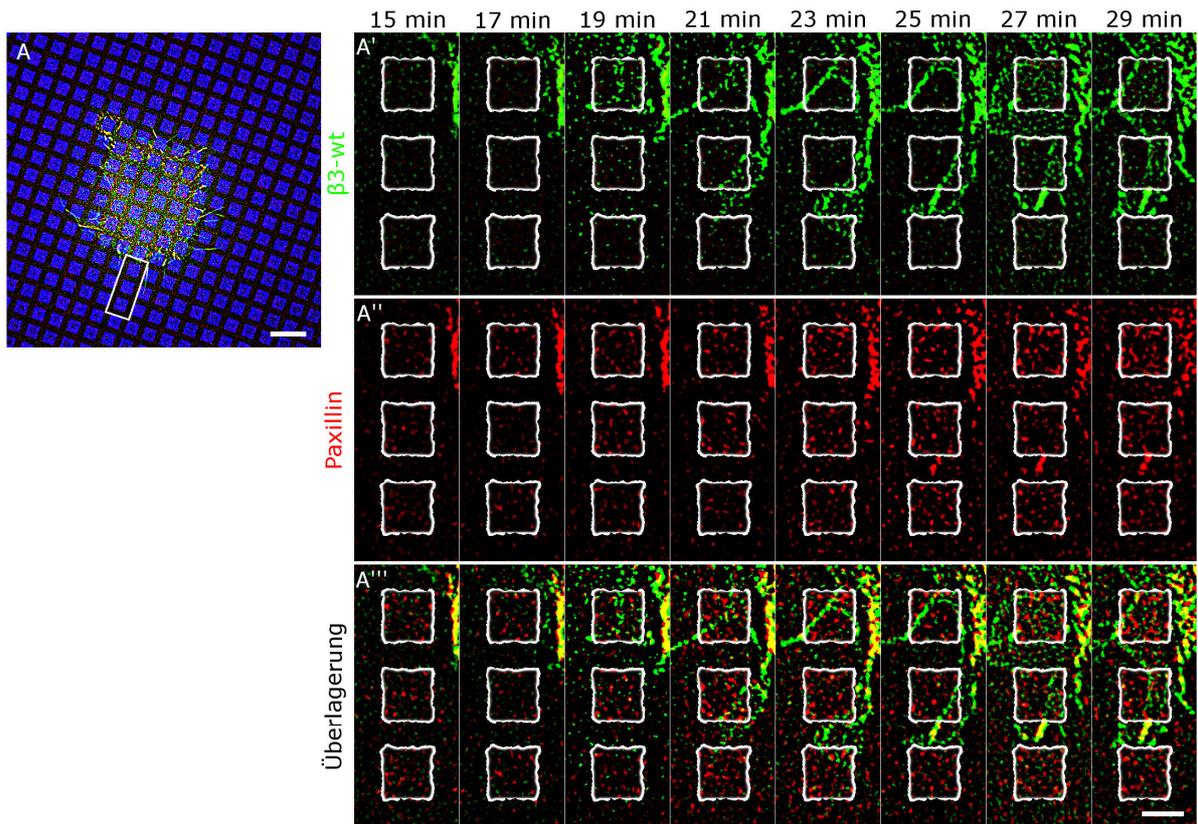
### 3.3.5 Zeitrafferaufnahmen von $\beta$ 3-Integrin zeigen bevorzugte Kolokalisation mit VN

Um den Unterschied der Paxillinrekrutierung durch  $\beta$ 3-wt und  $\beta$ 3-VEYA näher zu untersuchen, wurden auf FN/VN-Substraten Zeitrafferaufnahmen mit SIM durchgeführt. 3T3  $\beta$ 3low Zellen wurden jeweils für eines der beiden Integrine und Paxillin-mCherry transfiziert und mit einer Bildrate von 1 Bild pro Minute aufgenommen. Zusätzlich erlauben diese Zeitrafferaufnahmen Einblicke in mögliche Unterschiede dieser beiden Integrine bei Reifung und Entstehung von CMAs, bzw. bei der Interaktion mit FN und VN. Während der Aufnahme wurden die Zellen in F12 – Imaging Medium mit 10 % FCS kultiviert. Da Zellen wie zuvor gezeigt auf strukturierten Substraten ohne Gradient kaum Migration zeigen, wurden für diese Experiment Zellen während der Spreadingphase untersucht. Im Vergleich zwischen Zeitrafferaufnahmen für  $\beta$ 3-wt und  $\beta$ 3-VEYA zeigt sich ein dramatischer Unterschied in Bezug auf die Paxillinrekrutierung (Abb. 3.23, Video 8 und 9). Während Paxillin durchgängig mit  $\beta$ 3-wt kolokalisiert ist, sind bei  $\beta$ 3-VEYA transfizierten Zellen Paxillin-Cluster nur auf FN zu sehen, aber nicht auf VN, wo nur  $\beta$ 3-VEYA bindet. Damit zeigt sich erneut deutlich, dass  $\beta$ 3-VEYA nicht in der Lage ist Paxillin zu rekrutieren. Für beide Integrine sieht man aber unabhängig von der Paxillinrekrutierung eine deutliche Präferenz für VN. Eine Quantifizierung der Kolokalisation von  $\beta$ 3-wt (18 Zellausläufern), bzw. von  $\beta$ 3-VEYA (7 Zellausläufern) mit VN zeigt über 30 Minuten hinweg eine gleichbleibend hohe Präsenz der  $\beta$ 3-Integrine auf VN;  $\beta$ 3-wt schwankt zwischen 81 % und 83 %,  $\beta$ 3-VEYA zwischen 84 % und 89 % (Abb. 3.23 C). Da die nicht von VN bedeckten Bereiche von FN bedeckt sind, ergibt sich im Umkehrschluss direkt eine Lokalisation von  $\beta$ 3-wt auf FN zwischen 17 % und 19 %. Für  $\beta$ 3-VEYA ergeben sich auf gleiche Weise zwischen 11 % und 16 % Kolokalisation mit mit FN. Bei Betrachtung einzelner Zellausläufer zu einem einzelnen Zeitpunkt gibt es teilweise deutliche Abweichungen von diesen Werten mit Kolokalisationen zu VN zwischen 54,5 % - 96,3 %. Im Mittel mehrerer Ausläufer verschiedener Zellen ergibt sich aber die konstant hohe Kolokalisation.

Bei starker Anhebung des Kontrastes sieht man für  $\beta$ 3-wt und  $\beta$ 3-VEYA in sich neu bildenden Zellausläufern kleine, kurzlebige Cluster der jeweiligen  $\beta$ 3-Integrine (Abb. 3.24, Video 10 und 11). Diese sind konstant zu sehen, während sich Zellausläufer über das Substrat ausbreiten, unabhängig davon ob sie sich gerade auf FN oder VN befinden. Allerdings sind diese  $\beta$ 3-Cluster nicht mit Paxillin assoziiert, weder für  $\beta$ 3-wt, noch für  $\beta$ 3-VEYA. Sobald die Cluster VN erreichen, vergrößern sich einige und rekrutieren im Fall von  $\beta$ 3-wt auch Paxillin. Bei  $\beta$ 3-VEYA kommt es auf VN ebenfalls zur Vergrößerung und Reifung, allerdings bleibt Paxillin dabei auf FN beschränkt. Da diese transienten Cluster kein Paxillin enthalten, handelt es sich nicht um *nascent adhesions* (Gardel et al., 2010). Publikationen zeigten in der Vergangenheit ähnliche Zonen von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin, die dort bereits in einer aktiven Konformation vorliegen (Kiosses et al., 2001). Das schnelle Gleiten über das Substrat, ohne dass es zum Clustern kommt, legt nahe, dass diese Minicluster keinen Liganden gebunden haben.



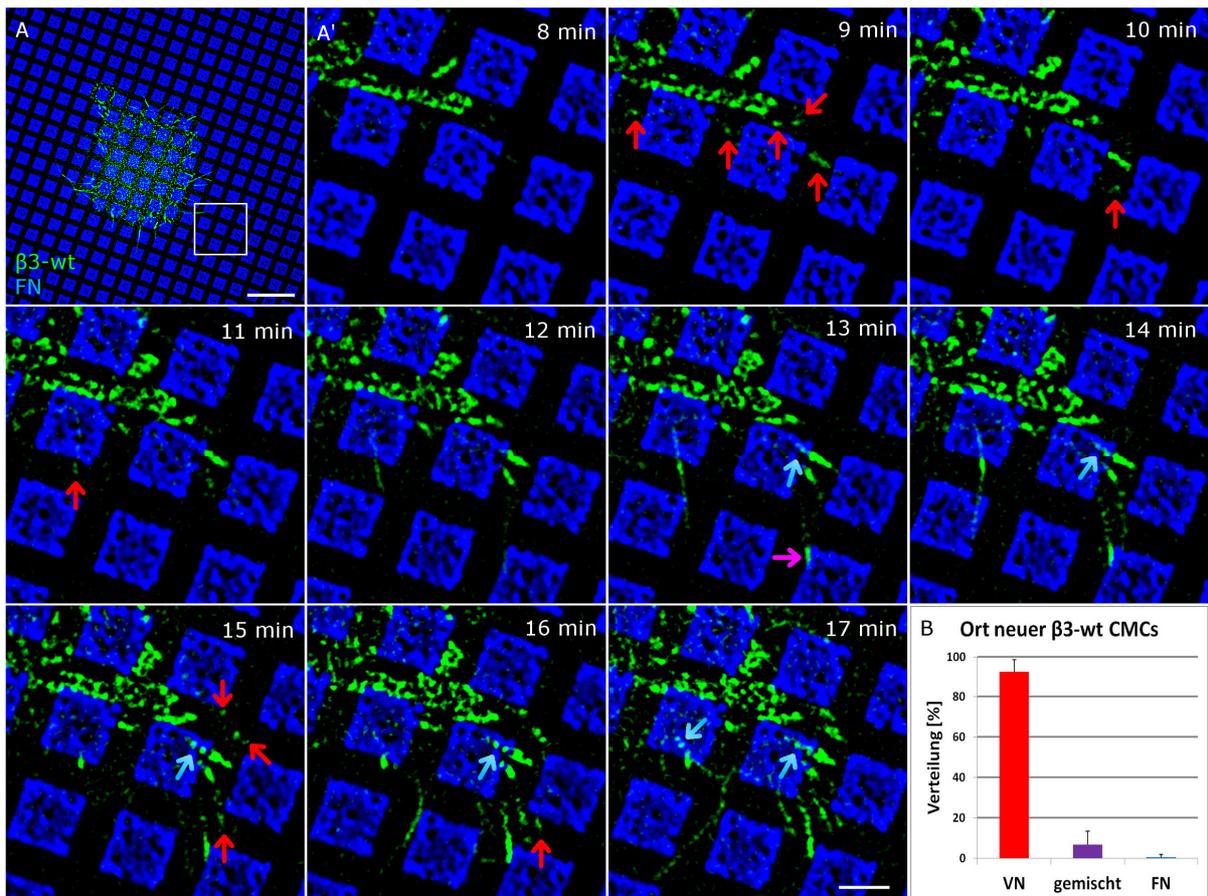
**Abb. 3.23:  $\beta$ 3-Integrin-vermittelte CMAs kolokalisieren unabhängig von Paxillin konstant mit Vitronektin (VN).** 3T3  $\beta$ 3low Zellen wurden für (A) GFP gekoppeltes  $\beta$ 3-wt-Integrin (grün) oder (B) für GFP gekoppeltes  $\beta$ 3-VEYA-Integrin transfiziert. Zusätzlich wurde in beiden Fällen für Paxillin-mCherry (rot) transfiziert. Die Zellen wurden auf FN/VN-Substraten kultiviert und es wurden mit *Superresolution Structured Illumination Microscopy* (SIM) Zeitrafferaufnahmen erstellt. Gezeigt ist nur Fibronektin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. (A)  $\beta$ 3-wt zeigt eine durchgehende Kolokalisation mit Paxillin an, während (B) Paxillin im Fall von  $\beta$ 3-VEYA auf FN beschränkt bleibt und nicht kolokalisiert. (C) Eine Quantifizierung für die jeweilige Kolokalisation von  $\beta$ 3-wt und  $\beta$ 3-VEYA mit VN in Zeitrafferaufnahmen mehrerer Zellen (jeweils  $N = 3$  unabhängige Experimente,  $n = 18$  Zellausläufer für  $\beta$ 3-wt und  $n = 7$  für  $\beta$ 3-VEYA) zeigt für das arithmetische Mittel jeweils einen relativ konstanten Wert zwischen 80 – 90 %. Maßstabsbalken: (A, B) 10  $\mu$ m, (A 30 min, B 30 min) 2  $\mu$ m.



**Abb. 3.24: Die Zellperipherie enthält transiente  $\beta$ 3-Cluster, die sich auf Vitronektin (VN) zu CMAs wandeln** (gegenüberliegende Seite). 3T3  $\beta$ 3low Zellen wurden für (A) GFP gekoppeltes  $\beta$ 3-wt-Integrin (grün) oder (B) für GFP gekoppeltes  $\beta$ 3-VEYA-Integrin transfiziert. Zusätzlich wurde in beiden Fällen für Paxillin-mCherry (rot) transfiziert. Die Zellen wurden auf FN/VN-Substraten kultiviert und es wurden mit *Superresolution Structured Illumination Microscopy* (SIM) Zeitrafferaufnahmen erstellt. Gezeigt ist nur Fibronectin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. (A'-B'') Eine starke Anhebung des Kontrastes zeigt sowohl für (A', A'')  $\beta$ 3-wt, als auch für (B', B'')  $\beta$ 3-VEYA einen Ring von transienten Miniclustern in der Peripherie von Zellausläufern. Diese breiten sich unabhängig vom darunter liegenden Ligand aus, reifen aber bevorzugt auf VN zu CMAs. Von FN-Dots wird nur der Umriss als weiße Linie gezeigt. (A'', A'') Eine Kolokalisation mit Paxillin findet nur für  $\beta$ 3-wt, aber nicht für (B'', B'')  $\beta$ 3-VEYA statt. Maßstabsbalken: (A, B) 10  $\mu$ m, (A'', B'') 2  $\mu$ m.

---

Unter dieser Annahme wurde im Folgenden der Ort der Entstehung von  $\beta$ 3-wt Clustern quantifiziert. Dafür wurden nur Cluster in Betracht gezogen, die später zu CMAs reifen, um sie von obigen transienten Clustern zu unterscheiden. Es wurde ohne gleichzeitige Betrachtung des FN/VN Musters markiert, wo neue CMAs entstehen. Anschließend wurde der FN Kanal zugeschaltet und kontrolliert, ob die neu entstandenen CMAs rein auf VN oder rein auf FN lokalisiert sind (Video 12). Falls der neue CMA sowohl auf FN, als auch VN liegt wurde er als „gemischt“ eingetragen. Nach dieser Quantifizierung zeigt sich, dass 92,6 % auf VN und 0,6 % auf FN entstehen (Abb. 3.25 B, drei unabhängige Experimente, 260 ausgewertete CMAs). Weitere 6,8 % wurden der Kategorie „gemischt“ zugerechnet. Damit zeigt sich eine sehr viel höhere Neigung von  $\beta$ 3-wt neue Bindungen mit VN, als mit FN einzugehen. Da die gemessenen Zellen auf Substraten mit einem FN/VN Verhältnis von 56 % zu 44 % kultiviert wurden und das Verhältnis neuer Kontakte auf VN zu anderen Kontakten (gemischt und FN addiert) 93 % zu 7 % beträgt, ergibt sich eine mehr als 10-mal höhere Wahrscheinlichkeit, dass  $\beta$ 3-wt neue CMAs auf VN bildet. Vergleicht man nur neue Kontakte auf VN und auf FN (93 % zu 0,6 %) ohne CMAs der Kategorie „gemischt“, kommt man sogar auf eine mehr als 120-fache Wahrscheinlichkeit, dass neue Kontakte auf VN entstehen. Damit stellt sich jedoch die Frage wie es zu einer davon abweichenden Kolokalisation von nur 80 – 85% der Gesamtmenge von  $\beta$ 3-Integrin CMAs mit VN kommt (Abb. 3.23 C). Wie man bei genauer Betrachtung sieht, gibt es auf VN entstandene CMAs die sich bei ihrer Reifung zunehmend in Richtung FN orientieren (Abb. 3.25 A, hellblauer Pfeil, ab Minute 13). Diese Bewegung erfolgt dabei stets in Richtung Zellzentrum. Durch diese Verschiebung der  $\beta$ 3-wt CMAs, von ihrem Entstehungsort auf VN hin zu FN, entsteht daher für die Gesamtmenge an CMAs die verringerte Kolokalisation von ca. 80 – 85 % mit VN.



**Abb. 3.25: Neue  $\beta 3$ -wt-vermittelte CMCs entstehen auf Vitronektin (VN).** (A) 3T3  $\beta 3$ low Zellen wurden für GFP gekoppeltes  $\beta 3$ -wt-Integrin (grün) transfiziert. Die Zellen wurden auf FN/VN-Substraten kultiviert und es wurden mit *Superresolution Structured Illumination Microscopy* (SIM) Zeitrafferaufnahmen erstellt (Video 12). Gezeigt ist nur Fibronektin (FN), das mit Alexa Fluor 647 gelabeltem FN gemischt wurde (blau); Vitronektin (VN) befindet sich in den schwarzen Bereichen zwischen den FN-Dots. (A') In der Vergrößerung eines Ausschnittes von Video 12 zeigen rote Pfeile die Entstehung neuer CMCs auf VN und lila Pfeile die Entstehung von CMCs an der Grenze von FN und VN (bei 13 min). Hellblaue Pfeile zeigen das zunehmende Gleiten eines auf VN entstandenen CMCs auf FN. Es wurde kein CMC gefunden, der rein auf FN entstanden wäre. (B) Eine Quantifizierung (3 unabhängige Experimente, 260 gemessene CMCs) zeigt die Entstehung neuer CMCs in 92,6 % aller Fälle auf VN, in 0,6 % auf FN und in 6,8 % an der Grenze von FN/VN an. Maßstabsbalken: (A) 10  $\mu$ m, (A') 2  $\mu$ m.

## 4 Diskussion

### 4.1 Hochauflösungsmikroskopie für die Analyse von CMAs

Neue mikroskopische Techniken haben stets auch zu neuen biologischen Einsichten über CMAs geführt. Ihre Lokalisation direkt an der Substrat-Zell-Grenze vereinfacht zudem in vielen Fällen die mikroskopische Untersuchung, oder ist sogar, wie im Fall von TIRF-Mikroskopie, die Voraussetzung, dass Aufnahmen überhaupt möglich sind. Insofern ist es nicht überraschend, dass CMAs unter den ersten Strukturen waren, die mit neuen mikroskopischen Hochauflösungsmethoden (zusammengefasst als Nanoskopie) untersucht wurden (Shroff et al., 2007). Die Unterschiedlichkeit der Methoden hat das Interesse an Vergleichen verschiedener neuer Methoden geweckt, vor allem auch im Vergleich zu etablierter konfokaler Laserscanningmikroskopie. Diese Methode arbeitet eher an der Abbeschen Beugungsgrenze als Fluoreszenz-Weitfeldaufnahmen, mit denen Hochauflösungsmethoden häufig verglichen werden. Durch einen zur Verfügung stehenden Prototyp des Zeiss Elyra PS.1 Mikroskops und eines Zeiss LSM Meta 510 war es möglich solch einen Vergleich von CLSM mit den nanoskopischen Techniken SIM und dSTORM anzufertigen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein besonderer Fokus auf CMAs und ihre Verbindung zum Aktin-Zytoskelett gelegt. Wie sich sowohl in qualitativen, als auch in quantitativen Vergleichen zeigte, lösen beide nanoskopischen Techniken besser auf als CLSM (Abb. 3.1 und Abb. 3.2). Bei der pointillistischen Technik dSTORM musste aber ein besonderes Augenmerk auf die Probenpräparation gelegt werden. Etablierte, lichtmikroskopische Protokolle sowohl für die Fixierung, als auch für die Fluoreszenzmarkierung müssen teilweise angepasst werden (Abb. 3.3). Eine indirekte Immunfärbung für Vinculin hat ein Clustering dieses Proteins in CMAs gezeigt, das mit einem Vinculin – mCherry Fusionsprotein nicht nachzuweisen war (Abb. 3.4). Man kann vermuten, dass bei dicht gepackten Proteinagglomeraten wie CMAs ein sterisches Problem auftritt: Antikörper erreichen ihr Epitop nicht, da es durch andere Proteine verdeckt ist. Entsprechend dieser Erwartung zeigt eine vergleichbare indirekte Immunfärbung kein Clustering bei einer Tubulinfärbung (unveröffentlichte Daten). Trotzdem wirft dieses Experiment die Frage auf, wie sehr man sich auf Antikörper-basierten Färbungen im Falle von pointillistischen Aufnahmen verlassen kann. Allerdings haben auch fluoreszente Proteine (FPs) für solche Aufnahmen einen Nachteil. Sie emittieren bisher deutlich weniger Photonen, als organische Farbstoffe (Jones et al., 2011). Da sich dadurch aber die Lokalisationsgenauigkeit bestimmt, können FPs im Moment prinzipiell nicht zu einer ähnlich hohen Auflösung wie organische Farbstoffe führen. Je nach Experiment mag dies allerdings ausreichend sein. Um jedoch höchste Auflösung mit kleinen Labelstrukturen zu erreichen, scheinen alternative Strategien wie SNAP-tags am besten geeignet (Keppler et al., 2003). Während die Labelstruktur im Größenbereich von FPs liegt, wird als Fluorophor ein organischer Farbstoff benutzt. Somit kann also der Vorteil von genetischem Labeling (hohe Spezifität) mit der von kleiner Labelgröße (geringere Gefahr sterischer Hinderung) und dem von organischen Farbstoffen (emittiert viele Photonen) kombiniert werden.

Die hier gezeigten Vergleiche zeigen, dass SIM entsprechend den theoretischen Vorhersagen etwa zweimal besser auflöst (Gustafsson, 2000). Von Bedeutung ist dabei, dass dies in Proben möglich ist,

die mit etablierten Protokollen erstellt wurden. Weiterhin sind für die Art der verwendeten Farbstoffe und für Mehrfachfärbungen nur die zur Verfügung stehende Lichtquelle und passende Filtersets wichtig. Pointillistische Techniken, und auch STED, dagegen beruhen auf photochemischen oder photophysikalischen Eigenschaften der Farbstoffe, um diese zwischen zwei Zuständen, typischerweise fluoreszierend und nicht fluoreszierend, zu schalten. Damit ist man bei der Probenpräparation nicht mehr vollständig frei, was die Wahl der Fluorophore angeht. Gerade bei FPs als Fluorophor kann dies eine größere Einschränkung darstellen. Andererseits ist bei linearer SIM keine weitere Verbesserung der Auflösung möglich, während pointillistische Techniken mit geeigneten Farbstoffen und kleinen Labelstrukturen schon jetzt deutlich unter 20 nm auflösen können.

Für die Untersuchung der Entstehung und Reifung von CMAs sind Zeitrafferaufnahmen mit hochauflösender Mikroskopie erforderlich. Für alle nanoskopischen Methoden sind bereits erfolgreiche Zeitrafferaufnahmen an lebenden Zellen oder Organismen publiziert (Jones et al., 2011; Kner et al., 2009; Shroff et al., 2008; Westphal et al., 2008). Aufgrund der Vielseitigkeit und der niedrigen Anregungsenergie von SIM im Vergleich zu pointillistischen Techniken wurde in dieser Arbeit SIM für diese Aufgabe gewählt. Vorstudien mit humanen Fibroblasten (*human foreskin fibroblast*, HFF) zeigten die generelle Eignung dieses Ansatzes (Abb. 3.5). Zellen wurden für den Aktinmarker lifeact-GFP und für das CMA – Protein Vinculin mCherry transfiziert. Zellen zeigten wiederholte Zyklen der Bildung von Zellausläufern und ihre Rückbildung, was in mehreren Publikationen zu diesem Thema als ein Zeichen für ein physiologisches Verhalten von Zellen interpretiert wird (Jones et al., 2011; Shroff et al., 2008). Wenn erforderlich, war es bei Zeitrafferaufnahmen stets möglich, wenigstens 60 Zeitpunkte aufzunehmen. Zudem musste in keinem der in dieser Arbeit gezeigten Filme für ein Bleichen von Fluorophoren im Laufe der Aufnahme korrigiert werden. Dies verdeutlicht zusätzlich, dass die erforderliche Anregungsenergie, und damit auch die potenzielle Phototoxizität, gering ist. Die Bildung neuer CMAs und ihre Verknüpfung zum Aktin-Zytoskelett konnte durch die höhere Auflösung wesentlich besser verfolgt werden, als das mit Weitfeldaufnahmen möglich wäre. Bisher werden Zeitrafferaufnahmen von CMAs typischerweise mit TIRF-Mikroskopie durchgeführt. Im Vergleich weist diese eine bessere axiale Auflösung als SIM auf. Es stellt sich damit die Frage, ob SIM mit der besseren lateralen, aber schlechteren axialen Auflösung, TIRF-Mikroskopie überhaupt überlegen ist. Die Größenmessung neuer CMAs (*nascent adhesions*, NA) ist eine Möglichkeit dies zu untersuchen. Die Klassifizierung der Reifungsstadien von CMAs erfolgt mangels zuverlässiger Marker häufig nach ihrer Größe. NAs zeigen dabei nach Colin Choi und Kollegen mit  $0,19 \pm 0,01 \mu\text{m}^2$  eine Größe nahe an der Beugungsgrenze, wenn sie mit TIRF-Zeitrafferaufnahmen untersucht werden (Choi et al., 2008). Im Vergleich dazu kann man mit SIM Zeitrafferaufnahmen auch kleinere Strukturen mit Halbwertsbreiten von deutlich weniger als 200 nm detektieren (Abb. 3.5). Damit zeigt sich, dass das Auflösungsvermögen von SIM gegenüber dem von TIRF-Mikroskopie eine genauere Analyse biologischer Strukturen ermöglicht.

Wie gezeigt, war der für diese Arbeit verwendete Prototyp in der Lage entsprechend den theoretischen Erwartungen für SIM aufzulösen. Allerdings unterlag die Bedienung des Mikroskops gewissen Einschränkungen, da die Prototyp-Software noch nicht entsprechend ausgereift war. Daher war es kaum möglich Mehrkanal – Zeitrafferaufnahmen mit einer schnelleren Bildrate als etwa einem

Bild pro 30 Sekunden zu erstellen. Der Wechsel zwischen den Kanälen musste jedes Mal manuell erfolgen. Der dafür erforderliche zeitliche Aufwand verhindert schnellere zeitliche Aufnahmezeiten. Prinzipiell, und vor allem bei veränderter Erzeugung der strukturierten Beleuchtung, ist es jedoch möglich mit deutlich schnelleren Bildraten zu arbeiten (Kner et al., 2009; Shao et al., 2011). Dies macht SIM zu einer sehr geeigneten nanoskopischen Methode für die Mikroskopie lebender Zellen. Zudem sind weitere Verbesserungen möglich, die SIM noch weiter für Lebendzellbeobachtungen verbessern würden. Dazu gehört eine veränderte Erzeugung der strukturierten Beleuchtung ebenso, wie auch die Kombination mit einer Beleuchtung im TIRF-Modus, die die Vorteile der guten axialen Auflösung von TIRF mit der guten lateralen Auflösung von SIM verknüpft (Kner et al., 2009).

## **4.2 Strukturierte Substrate für inverse Mikroskopie und Zeitrafferaufnahmen**

Strukturierte Substrate haben über viele Jahre ein großes Interesse in der Zellbiologie hervorgerufen (Théry, 2010). Sie haben es ermöglicht grundlegende Interaktionen zwischen der ECM und Zellen aufzudecken. Der Einfluss der ECM auf die Zellmorphologie, auf Apoptose oder die Zellteilungsebene konnte mit strukturierten Substraten von Zellgröße gezeigt werden (Chen et al., 1997; Théry et al., 2006b; Théry et al., 2005). Kleinere, subzelluläre Strukturen wurden genutzt um den Einfluss der ECM-Verteilung auf CMAs zu untersuchen (Lehnert et al., 2004). Es sind aber bisher kaum Studien publiziert, die Substrate mit subzellulären Strukturen und Lebendzellmikroskopie verknüpfen (Xia et al., 2008). Im Laufe dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Verfahren optimiert um dies in Verbindung mit SIM zu ermöglichen.

### **4.2.1 Strukturierte Substrate auf unbehandeltem Glas für inverse Mikroskopie und Zeitrafferaufnahmen**

Beim ersten Ansatz wurde eine Proteinlösung direkt mittels Microcontact-Printing auf ein Deckglas übertragen (d $\mu$ CP). Das Verfahren wurde hinsichtlich der Proteinkonzentrationen, der Deckglasbehandlung, der Inkubationszeit und der Passivierung optimiert, um eine verlässliche Produktion von strukturierten Substraten zu ermöglichen. Wie gezeigt, können Zellen auf solchen Substraten auf FN-Dots adhären und über viele Minuten mit SIM untersucht werden (Abb. 3.6 A, A', Video 2). Allerdings zeigten solche Zellen keine Migration. Zwar zeigten frühere Arbeiten Zellmigration auf diesen Substraten bei Verwendung der Krebszelllinie B16 (Dirk Lehnert, persönliche Kommunikation). Bei den hier verwendeten Zelllinien kam es jedoch in keinem Fall zu einer Migration. Damit kann nach dem initialen Zellspreading weder die Ausbreitung der Zelle über neue ECM Bereiche, die Bildung neuer CMAs, noch Zellmigration untersucht werden. Dies stellt für viele Fragestellungen eine deutliche Einschränkung dar. Dieses Problem konnte erfolgreich durch strukturierte Substrate mit einem Gradient der FN Bedeckung umgangen werden (Abb. 3.6 B, B', C, Video 3). Zellen zeigten dabei eine elongierte, polarisierte Morphologie, die in diesem Ausmaß auf Substraten ohne Gradient nicht zu erkennen war. Es war dabei auffällig, wie sehr Zellen bei der Migration FN Dots herausreißen und umbilden (Abb. 3.6 C). In früheren Studien der Arbeitsgruppe wurde mittels  $\mu$ CP Substraten erstens gezeigt, dass solche FN Gradienten wie hier zu haptotaktischer Migration in Richtung der höheren ECM Bedeckung führen (Autenrieth, 2012). Zweitens wurde gezeigt, dass dabei FN ähnlich wie auch bei homogener FN-Bedeckung herausgerissen wird. Die hier vorgestellten d $\mu$ CP Substrate scheinen also ebenfalls für die Untersuchung der Haptotaxis geeignet zu sein.

In vielen Protokollen für die Erstellung strukturierter Substrate werden Oberflächen in einer Weise funktionalisiert, die zur kovalenten Bindung von ECM-Proteinen führt (Schiller et al., 2013; Théry et al., 2006b). Es stellte sich die Frage, ob ein Herausreißen von Proteinen wie zuvor beobachtet auch

mit kovalent gebundenem FN möglich ist. Dies war jedoch nicht der Fall. Bei sonst identischen Bedingungen, war für kovalent gebundenes FN keine Änderung des Substrates durch die Zelle zu erkennen (Abb. 3.6 E). Dies ist in starkem Kontrast zur Zelle, die auf nicht-kovalent gebundenen FN Bereichen kultiviert wurde (Abb. 3.6 D). Es ist nicht nur ein deutliches abreißen und umformen von FN zu erkennen, die Zelle scheint auch polarisierter und in Richtung der höheren FN Bedeckung gewandert zu sein.

Somit kann festgehalten werden, dass  $\mu$ CP Substrate mit Gradienten von nicht-kovalent gebundenem FN Zeitrafferaufnahmen mit SIM über einen ausgedehnten Beobachtungszeitraum erlauben. Das Herausreißen und umformen von FN ist dabei entscheidend für Migration von Zellen (Autenrieth, 2012). In diesem Zusammenhang stellen sich aber weitere Fragen, die in dieser Arbeit noch nicht beantwortet werden konnten:

- Es wurde nicht geklärt, ob eine kovalente Bindung von FN auch auf homogenen Substraten Migration verhindert. Bei elastischen Substraten für die Imitierung einer weichen ECM oder für Kraftmessungen mittels *traction force microscopy* (TFM) wird FN typischerweise mit kovalenter Bindung an die Oberfläche eines Polyacrylamidgels gebunden (Pinon et al., 2014; Plotnikov et al., 2012). Dies könnte für migrierende Zellen die Messung beeinflussen oder erschweren.
- FN ist ein sehr dehnbares ECM Protein (Singh et al., 2010). Es ist nicht klar, in wie weit diese mechanische Eigenschaft Voraussetzung für Zellmigration auf strukturierten Substraten ist und ob andere, weniger dehnbare ECM-Proteine, die Migration auf strukturierten Substraten auch erlauben. Bei der Streckung von FN werden insbesondere auch versteckte Bindungsstellen offen gelegt (Vogel, 2006). Dies könnte Einfluss auf die Zellmigration nehmen.
- Es ist weiterhin nicht klar, ob Zellen nach herausgerissenes FN internalisieren. Falls dem so ist, stellt sich Frage, ob dies zusammen mit der Internalisierung von CMA-Proteinen, insbesondere Integrinen, geschieht. Für Integrine ist die Bedeutung von Endozytose für die zelluläre Lokalisierung und Migration belegt (Ivaska and Heino, 2011). Eventuell funktioniert dies für kovalent gebundenes FN nicht oder nur sehr eingeschränkt und hätte entsprechende Beeinflussung Integrin-abhängiger Prozesse zur Folge.

In jedem Fall sind  $\mu$ CP Substrate entsprechend der Zielsetzung dieser Arbeit geeignet für die Untersuchung der CMA Entstehung und Reifung (Abb. 3.8) und der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts bei diesem Vorgang (Abb. 3.6 und Abb. 3.8). Durch Verwendung unbeschichteter, transparenter Deckgläser kann man für diese Experimente nanoskopischen Methoden nutzen und mit Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen kombinieren. Allerdings unterliegt die Methode zwei Einschränkungen: Erstens ist der zeitliche Durchsatz an Substraten gering, da pro Deckglas nur einmal gestempelt werden kann (siehe Material und Methoden). Und zum zweiten kann es nicht ausgeschlossen werden, dass der Stempelvorgang zu einer Konformationsänderung von Proteinen führt. Diese Probleme bestehen bei etablierten, Gold-Thiol-Chemie basierten,  $\mu$ CP Substraten nicht. Allerdings sind diese aufgrund der ca. 20 nm dicken Goldbeschichtung der Deckgläser nicht für

inverse Mikroskopie geeignet. Die Methode wurde daher durch Verwendung einer dünneren Goldschicht optimiert und die Eignung dieser Substrate für die inverse Mikroskopie untersucht.

#### **4.2.2 Strukturierte Substrate auf dünnem Gold für inverse Mikroskopie und Zeitrafferaufnahmen**

Gold-Thiol-Chemie basierte  $\mu$ CP Substrate sind etabliert und wurden zur Beantwortung verschiedener Fragestellungen genutzt (Chen et al., 1997; Lehnert et al., 2004). Typischerweise werden dazu Deckgläser mit einer 20 nm dicken Goldschicht benutzt. Allerdings ist mit diesen Substraten keine inverse Mikroskopie möglich, da dazu durch die Goldschicht hindurch mikroskopiert werden müsste (Abb. 3.7 B). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, führt das zu einem starken Anstieg der Hintergrundfluoreszenz und einer Verschlechterung des Signal-Rausch-Verhältnisses (*Signal to Noise ratio*, SNR). Selbst wenn man nicht durch die Goldschicht mikroskopiert, führt bereits die Anwesenheit der Goldschicht bei CLSM ebenfalls zu einer Verschlechterung (Abb. 3.7 A). Dafür kommt zum einen Reflexion durch die Goldbeschichtung in Frage. Gleichzeitig führt Gold aber auch zum *Quenching* von Fluoreszenz und reduziert damit die Intensität der Fluoreszenz. Somit stellt die Goldbeschichtung eine deutliche Einschränkung für mikroskopische Untersuchungen dar. In der Vergangenheit wurde bereits vereinzelt eine dünnere Goldbeschichtung gewählt, um diesem Problem zu entgehen (DiMilla et al., 1994; Gautrot et al., 2010). Die Methode wurde dabei aber nicht detailliert für ihre Eignung für zellbiologische Studien und inverse Mikroskopie getestet. Insbesondere wurde nicht untersucht, ob dünnes Gold für strukturierte Substrate mit subzellulären Strukturen geeignet ist. Dies wurde in dieser Arbeit nachgeholt. Sowohl qualitative, als auch quantitative Vergleiche zeigen die generelle Eignung einer 2 nm dünnen Goldbeschichtung für die inverse Mikroskopie (Abb. 3.7). Zwar kommt es bei einer DAPI Färbung und 405 nm Anregung zu einem signifikanten Abfall der Fluoreszenzintensität. Allerdings stellt die Verschlechterung durch dünnes Gold bei 405 nm Anregung kein Nachteil für die Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen da. Außerdem ist es für diese Arbeit von großer Bedeutung, dass die Auflösung durch dünnes Gold nicht verschlechtert wird und SIM damit zu einer Auflösungsverbesserung beitragen kann (Abb. 3.7 H). Damit ist gezeigt, dass man durch eine dünne Goldbeschichtung hindurch mikroskopieren kann, ohne dass dies bei einer mikroskopischen Untersuchung deutlich stört. In allen weiteren Experimenten, in denen dünnes Gold mit  $\mu$ CP kombiniert wurde, kamen Strukturen subzellulärer Größe zum Einsatz (Abb. 3.9, Abb. 3.10). Dies zeigt, dass auch diese Methode geeignet ist, um Substrate mit Strukturen subzellulärer Größe herzustellen, die für inverse Mikroskopie lebender Zellen geeignet sind. Damit stehen zwei Methoden zur Verfügung, die im Sinne der Fragestellung dieser Arbeit geeignet sind, um die Entstehung und Reifung von CMAs in einer definierten Umgebung mit Hochauflösungsmikroskopie zu untersuchen. Die einzige Abwandlung zur etablierten Gold-Thiol-Chemie und  $\mu$ CP ist die dünnere Goldbeschichtung, die an der Goldbedampfungsanlage geregelt werden kann. Damit steht allen Instituten, die diese Methoden bereits bisher genutzt haben, direkt die Möglichkeit offen, dünne Goldsubstrate herzustellen und für Zeitrafferaufnahmen zu nutzen. Dies sollte die Verbreitung und Anwendbarkeit dieser Technik in Zukunft befördern.

## 4.3 Wechselwirkung von Aktin und CMAs auf strukturierten Substraten

### 4.3.1 Lebendzellmikroskopie mit SIM und strukturierten Substraten

In weiteren Experimenten wurde die Eignung beider Methoden,  $d\mu$ CP (Abb. 3.8, Video 4) und  $\mu$ CP mit dünnen Goldsubstraten (Abb. 3.9, Video 5), für Zeitrafferaufnahmen von CMAs und dem Aktin-Zytoskelett gezeigt. Es wurde gezeigt, dass die später verwendete Aufnahmezeit von 1 Bild pro Minute ausreichend ist, um die Entstehung von CMAs und ihre Interaktion mit Aktin zu untersuchen (Abb. 3.8). In einem weiteren Experiment wurde die Errechnung einer gemittelten „Standardzelle“ durch strukturierte Substrate (Théry et al., 2006b) auf das subzelluläre Level und auf CMAs erweitert und eine „Modell-CMA“ gebildet (Abb. 3.9, Video 5, 6, 7). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies aber nur für eine Zelle durchgeführt werden und stellt daher eher eine Machbarkeitsstudie dar. Es zeigten sich aber bereits interessante Effekte, wie das gleichzeitige Auftreten von ersten Aktinstrukturen und Paxillin-CMAs auf FN-Inseln. Dies deutet bereits an, dass Filopodien durch voraktivierte Rezeptoren (siehe auch Kap. 4.4.4) oder ihre geometrische Form (siehe auch Kap. 4.3.2) in der Lage sind, sehr schnell eine Bindung zur ECM einzugehen und anschließend CMAs zu bilden. Die Anwesenheit von Paxillin außerhalb von FN-Bereichen in Richtung des Zellinneren ist auch in fixierten Substraten zu beobachten (Coyer et al., 2012). Erst Zeitrafferaufnahmen der CMA-Reifung legen aber deutlich einen Zusammenhang mit der CMA-Reifung nahe. Wie Smith und Kollegen zeigten, lagert sich nicht nur Zyxin, sondern auch Paxillin an Aktin-Stressfasern unter Zugspannung an (Smith et al., 2013). Beides sind LIM-Domänenproteine; dieses Bindemotiv ist bekannt für die Vermittlung einer Protein-Aktin-Interaktion. Es wäre interessant in Zukunft ähnliche Modell-CMAs auch für Integrine und andere CMA-Proteine ohne LIM-Domäne zu erstellen. Dies könnte neue Aufschlüsse über die Interaktion von CMAs und Aktinfasern während der CMA-Reifung liefern. Weiterhin fällt auf, dass es mit zunehmender Reifung zwei Intensitätszentren von Paxillin gibt (Abb. 3.9 C). Diese korrelieren direkt mit Aktinstrukturen. Die große Bedeutung von Aktin und Aktinorganisation für die Reifung von CMAs ist gut dokumentiert (Choi et al., 2008; Oakes et al., 2012; Stricker et al., 2013). Die Intensitätszentren könnten einen Fall lokaler Inhibierung darstellen, der zur Strukturbildung von CMAs beitragen könnte (Meinhardt, 2012). Dies könnte entweder auf Ebene des CMAs, oder auf der Ebene der Aktinorganisation, insbesondere der Quervernetzung, ablaufen.

Es ist allerdings zu bedenken, dass die verwendete PCF-Zelllinie zur Bildung von Filopodien neigt. Die beobachtete Zelle hat entsprechend in 87 % aller Fälle ein CMA nach einem filopodialen Ausläufer gebildet. Dies ist im Vergleich zu einem Lamellipodium eine definiertere Struktur. Für die statistische Mittelung vieler CMA-Entstehungen könnte dies ein Vorteil sein. Daher sollten einerseits bevorzugt CMAs nach filopodialen Ausläufern untersucht werden, was andererseits aber auch bedeutet, dass die Ergebnisse nicht in jedem Fall auf CMA-Bildung durch Lamellipodien übertragbar sind.

### 4.3.2 Geringe ECM Verfügbarkeit fördert filopodiale CMA-Entstehung

Aktin ist in vielfältiger Form an der Entstehung und Reifung von CMAs beteiligt. Eine Verbindung zu Aktin und Aktin-vermittelter Zug ist wichtig für die Stabilisierung von Integrinen und CMAs. Verschiedene Publikationen zeigen, dass quervernetzte Aktinfasern eine Matrix bilden, die für die Reifung von CMAs entscheidend ist (Choi et al., 2008; Oakes et al., 2012). Um die Interaktion des Aktinzytoskelettes mit entstehenden CMAs näher zu untersuchen wurden REF-Zellen auf FN-Gradienten auf dünnem Gold kultiviert und mittels SR-SIM Zeitrafferaufnahmen untersucht (Abb. 3.10). Die Zellen waren transfiziert für den Aktinmarker F-Tractin-tdTomato und Paxillin-EGFP. Es zeigte sich ein deutlicher Effekt des strukturierten Substrates auf die Art, wie neue CMAs entstehen. Während auf dem FN-Gradienten die meisten CMAs nach einem filopodialen Ausläufer entstehen, werden sie auf homogenen FN-Beschichtungen in der Mehrzahl durch Lamellipodien vermittelt (Abb. 3.10 E). Weitere Untersuchungen zeigten, dass es sich um einen lokalen Effekt handelt. Zellen auf FN-Streifen zeigten ein Verhalten wie auf homogenen Substraten, wenn ein neuer CMA nach einem Aktinausläufer auf dem gleichen FN-Streifen gebildet wird (Abb. 3.10 E, Kategorie „Streifen, entlang“). Die gleiche Zelle benutzt aber bevorzugt Filopodien, um passivierte Bereiche zwischen zwei FN-Streifen für die Bildung neuer CMAs zu überbrücken (Abb. 3.10 E, Kategorie „Streifen, überbrückend“). Weiterhin wurde gezeigt, dass die generelle Produktionsrate von Filopodien und Lamellipodien nicht durch die Strukturierung des Substrates variiert wird (Abb. 3.10. F).

Der Abstand zwischen zwei Reihen von FN-Inseln in x-Richtung beträgt etwa 3  $\mu\text{m}$ , während er in der gleichen Richtung in y-Richtung abnimmt und schließlich in eine durchgängige Linie übergeht. Im beobachteten Bereich war der Abstand in y-Richtung zwischen 3  $\mu\text{m}$  und 0,5  $\mu\text{m}$ . Filopodien können mehrere  $\mu\text{m}$  lang sein und damit die Distanz zwischen zwei benachbarten FN Inseln in jede Richtung problemlos überbrücken (Bornschlögl, 2013). Lamellipodien dagegen sind häufig nur wenige Mikrometer lang und könnten seltener in der Lage sein, den Abstand zwischen zwei Reihen in x-Richtung zu überbrücken. Da der Abstand in y-Richtung aber zum Teil deutlich kleiner ist, kann die vermehrte Bildung von CMAs durch Filopodien zumindest nicht vollständig dadurch erklärt werden, dass Lamellipodien generell nicht in der Lage sind benachbarte FN-Inseln zu erreichen. Allerdings könnte dies den Unterschied zwischen FN-Gradienten und der Kategorie „Streifen, überbrückend“ erklären, bei der im Verhältnis noch mehr CMAs nach einem filopodialen Ausläufer gebildet werden. Der zu überbrückende Abstand beträgt hier immer 3  $\mu\text{m}$  und scheint für Lamellipodien schwieriger zu überwinden zu sein, als für Filopodien.

Ein offensichtlicher Effekt der Strukturierung ist die Limitierung der verfügbaren ECM. Während die gleiche Proteinkonzentration für die Beschichtung homogener und strukturierter Substrate benutzt wurde, ist die geometrische Bedeckung auf den strukturierten Substraten wesentlich geringer. Sie bewegt sich, je nach dem wo genau im Gradienten sich die Zelle befindet, im Bereich von 10 % und liegt damit deutlich unter einer 100 % Bedeckung auf homogenen Substraten (Autenrieth, 2012). Daher zeigen diese Experimente, dass bei geringer verfügbarer ECM Filopodien geeigneter sind, um neue CMAs zu etablieren. Mehrere Faktoren könnten zu diesem Effekt führen. Theoretische Vorhersagen, sowie experimentelle Untersuchungen zeigten, dass die extrazelluläre Ausdehnung der

Glykokalyx einem Integrin-Clustering und damit der CMA-Entstehung entgegen wirken (Paszek et al., 2009; Paszek et al., 2014). Die Glykokalyx ist weiter ausgedehnt als die extrazelluläre Integrindomäne und erschwert damit Integrinen die Bindung an den Ligand. Bei einem Filopodium könnte aber die Oberflächenkrümmung dazu beitragen, dass die Glykokalyx eher zur Seite zeigt und Integrine an der Filopodien-Unterseite leichter Kontakt zu ihrem Liganden erhalten (Wehrle-Haller, 2012b). Auf strukturierten Substraten mit einer reduzierten ECM-Bedeckung könnte dies ein entscheidender Vorteil sein, um erfolgreich CMAs zu etablieren, sobald ein Filopodium eine der vergleichsweise seltenen FN-Dots erreicht. Auf homogenen Substraten dagegen sind Bindungsstellen für Integrine nahezu unbegrenzt verfügbar. In dieser Umgebung ist die geringere Wahrscheinlichkeit, dass es in einem Lamellipodium zu Integrin-Clustering kommt trotzdem ausreichend. Ein weiterer Effekt, der zur erleichterten CMA-Bildung durch Filopodien beitragen kann ist deren gerichteter Aktinfluss. Wie erwähnt wirkt lateraler Zug, wie er durch retrograden Aktinfluss erfolgt, aktivierend auf Integrine (Zhu et al., 2008). In Filopodien liegt durch den linearen Aufbau im Vergleich zu Lamellipodien ein sehr geordneter retrograder Aktinfluss vor (Medalia et al., 2007). Dies kann eine Kraft-vermittelte Aktivierung von Integrinen erleichtern. Zusätzlich gelangen durch spezielle Motorproteine wie Myosin-X gezielt Integrine an die Spitze von Filopodien (Zhang et al., 2004). Da diese außerdem wenigstens teilweise voraktiviert sind (Galbraith et al., 2007; Kiosses et al., 2001), bestätigt sich die Charakterisierung von Filopodien als *sticky fingers* (Mattila and Lappalainen, 2008). Dies zeigt sich auch beim „Modell-CMA“ (Abb. 3.9) einer PCF-Zelle, die sogar in 87 % der Fälle CMAs nach filopodialen Ausläufern gebildet hat. Das innerhalb der zeitlichen Auflösung gleichzeitige Erscheinen von Aktin und CMAs auf FN-Dots belegt zusätzlich, dass Filopodien für die Entstehung und rasche Etablierung von CMAs in besonderem Maße geeignet sind. Bei der Reifung von CMAs kann die oben angesprochene, kraftabhängige Integrinaktivierung und Stabilisierung der Talin-Vinculin-Interaktion durch einen geordneten retrograden Aktinfluss verstärkt werden und zu einer schnelleren CMA-Reifung führen.

Filopodien haben eine zelluläre Doppelrolle. Einerseits sind sie in der Lage extrazelluläre Signale über vergleichsweise weite Strecken wahrzunehmen. Dies spielt eine Rolle bei der Wahrnehmung von Lenkungsmolekülen durch neuronale Wachstumskegel (Zheng et al., 1996), von Wachstumsfaktoren wie EGF (Lidke et al., 2005a) oder bei der Erkennung anderer Zellen (Vasioukhin et al., 2000). Andererseits sind Filopodien in der Lage Kraft auf ihre Umgebung auszuüben. Die Verankerung an die ECM oder mit anderen Zellen in Kombination mit Aktin-Myosin-vermittelten Kräften erlaubt die Verformung des Substrates (Iwadate and Yumura, 2008), fördert die Bewegung in Richtung der kraftausübenden Filopodien (Gautrot et al., 2010; Partridge and Marcantonio, 2006) und hilft damit z.B. bei *Drosophila melanogaster* den Führungszellen den Dorsalschluss zu vollziehen (Jacinto et al., 2000). Der hier gezeigte Effekt der bevorzugten CMA-Entstehung durch Filopodien in einer ECM mit limitierter Menge und/oder Erreichbarkeit von Liganden vervollständigt dieses Bild. Filopodien nehmen geringe Mengen an ECM wahr und bilden durch die Adhäsion an diese ECM-Stellen die Grundlage, um in diese Richtung zu migrieren. Damit sind Filopodien beispielsweise in besonderem Maße geeignet, um Gradienten der ECM wahrzunehmen und in Richtung der höheren Bedeckung, also haptotaktisch, zu migrieren. In 3D-Kollagengelen, die eine *in vivo* – Gewebssituation besser imitieren als 2D-Deckgläser, sind die als Liganden dienenden Kollagenfasern ebenfalls nur begrenzt

verfügbar. Es wurde gezeigt, dass Zellen in diesen Substraten Filopodien-ähnliche Strukturen ausbilden (Starke et al., 2013). Damit zeigt sich, dass der hier vorgestellte Effekt auch für 3D-Situationen gültig ist und potenziell auf die *in vivo* – Situation übertragbar ist. In vielen Krebsarten sind Filopodienmarker wie Fascin hochreguliert (Arjonen et al., 2011). Gleichzeitig wurde für Krebszellen eine haptotaktische Migration gezeigt (Aznavoorian et al., 1996). Da Serumproteine wie FN aus Blutgefäßen austreten und einen Gradienten in Richtung der Gefäße bilden (McDonald and Baluk, 2002), hilft dies Krebszellen in die Blutbahn zu gelangen und damit an weiter entfernte Stellen des Körpers zu migrieren. Damit sind das Verständnis von Filopodien und ihre Rolle für Zelladhäsion und –migration sowohl von wissenschaftlichem, als auch medizinischem Interesse.

#### **4.4 Integrinseparierung *in cellula* zur Untersuchung der CMA-Adapterrekrutierung**

Die Untersuchung Integrin-vermittelter Signalings wird durch zwei Probleme erschwert. Erstens ist es bisher nicht möglich Integrin-Aktivierung von Integrin-Signaling zu trennen. Integrin-Mutationen, die eine Verringerung des Integrin-Signalings verursachen, führen gleichzeitig auch zu einer Verringerung der Integrin-Aktivierung (Pinon et al., 2014). Dies ist nicht nur ein konzeptionelles Problem für das Verständnis dieser beiden Prozesse. Es ist auch ein methodisches Problem, da solche nicht-aktivierten und nicht-signalisierenden Integrine zu verringerter Adhäsion und verringertem Zellspreading führen. Damit sind Zellen schlecht mit unbeeinflussten Kontrollen vergleichbar und die Analyse der Mutation ist erschwert. Zweitens scheinen Integrine redundant vorzuliegen. Die 24 verschiedenen Integrine in Säugetieren unterteilen sich zwar anhand ihrer Liganden in verschiedene Klassen; aber selbst in den jeweiligen Klassen gibt es teils mehrere Integrine, die die gleiche Aufgabe zu erfüllen scheinen (Hynes, 2002). So werden  $\alpha\beta3$ - und  $\alpha5\beta1$ -Integrine auf FN als weitestgehend redundant angesehen, mit wenigen bekannten spezifischen Aufgaben (Roca-Cusachs et al., 2009; Schiller et al., 2013). Um den Effekt eines dieser beiden Integrine zu untersuchen, wurde bisher das andere durch Inhibitoren oder genetischen Knockout ausgeschaltet. Dies kann aber durch Kompensationsmechanismen eigentliche Aufgaben der jeweiligen Integrine verdecken. Studien zum Effekt von Mutationen eines dieser beiden Integrine werden vollends erschwert. Will man beispielsweise eine Mutation der  $\beta3$ -Untereinheit untersuchen, müsste man idealerweise sowohl  $\beta3$ -wt, als auch  $\alpha5\beta1$ -wt ausschalten. Nur dann wäre sichergestellt, dass weder  $\alpha5\beta1$ -Integrin aufgrund redundanter Aufgaben oder durch Kompensationsmechanismen, noch endogenes  $\beta3$ -Integrin den Mutationseffekt maskiert. Eine andere Möglichkeit  $\beta3$ -Integrin-Mutationen ohne den Einfluss von  $\alpha5\beta1$ -Integrin zu untersuchen, ist es Zellen auf VN zu untersuchen, da  $\beta1$ -Integrine nicht an VN binden. Allerdings zeigt sich in der praktischen Ausführung, dass bereits nach einer Stunde  $\beta1$ -Cluster auf VN zu finden sind (Pinon et al., 2014). Entweder wird dafür in der Zwischenzeit von Zellen sekretiertes FN genutzt, oder  $\beta1$ -Integrin wird in bestehende  $\alpha\beta3$ -Integrin Cluster eingelagert („co-clustern“). In jedem Fall erschwert es die Analyse, da anwesendes  $\beta1$ -Integrin den Effekt einer  $\beta3$ -Mutation maskieren kann.

Spezielle, strukturierte Substrate in Kombination mit einem geeigneten Zellsystem und neuen Mutationen von  $\beta3$ -Integrin ermöglichten es, diese Probleme zu lösen. Es war dadurch nicht nur möglich Paxillin-abhängige Adapterrekrutierung genauer zu untersuchen, sondern auch Abschätzungen über die Affinität von  $\alpha\beta3$ -Integrin für VN im Vergleich zu FN anzustellen. Zusätzlich konnten die gleichen Substrate auch genutzt werden, um neue Details über Unterschiede zwischen ubiquitär exprimiertem  $\beta1A$ -Integrin und muskelspezifischem  $\beta1D$ -Integrin zu gewinnen.

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die verwendeten  $\beta3$ -Integrin-Mutationen mit den in dieser Arbeit festgestellten Ergebnissen hier noch einmal tabellarisch aufgeführt. Die Ergebnisse für  $\beta1$ -Integrin-Spleißvarianten sind ebenfalls aufgeführt.

**Tab. 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Experimente auf FN/VN-Substraten.** Alle Daten in Klammern sind aus Pinon et al., 2014, entnommen und wurden von der Arbeitsgruppe von Bernhard Wehrle-Haller gewonnen.

Integrinart	Aktivierung	Spreading	Talin	Paxillin	FAK	Vinculin	ILK
$\beta 3$ -wt	(+)	(+)	+	+	+	+	+
$\beta 3$ -Y <sup>747</sup> A	(-)	(-)	(-)				
$\beta 3$ -VE	(++)	(+)	+	+	+	+	
$\beta 3$ -SPLH	(++)	(-)	+	-	-	+	
$\beta 3$ -VEYA	(+)	(-)	+	-	-	+	-
$\beta 3$ -S <sup>inaktiv</sup>	(-)	(-)	(+)	-			
$\beta 3$ -Y <sup>inaktiv</sup>	(-)	(o)	(+)	-			
$\beta 3$ -S <sup>aktiv</sup>	(++)	(-)	(+)	-			-
$\beta 3$ -Y <sup>aktiv</sup>	(++)	(+)	(+)	+			-
$\beta 1$ A	+			+		+	
$\beta 1$ D	+			-		+	

#### 4.4.1 differenzielle FN/VN Substrate (dFVS)

In dieser Arbeit entwickelte differenzielle FN/VN Substrate, in Kombination mit neuen  $\beta 3$ -Mutationen aus der Arbeitsgruppe von Bernhard Wehrle-Haller (Universität Genf, Schweiz), liefern eine Lösung für beide oben angesprochene Probleme. Ein von Bernhard Wehrle-Haller und seiner Gruppe entwickeltes Zellsystem (basierend auf NIH 3T3, Mausfibroblasten) weist eine besonders geringe Menge an endogenem  $\beta 3$ -Integrin auf und wird daher im Folgenden „3T3  $\beta 3$ low“ genannt. Dies liefert die nötige Basis um spezifische Effekte von  $\beta 3$ -Mutationen in Abwesenheit von endogenem  $\beta 3$ -wt zu untersuchen. Da  $\alpha 1b$ , neben  $\alpha V$  die einzige andere  $\alpha$ -Integrin Untereinheit, die mit  $\beta 3$ -Integrin einen Heterodimer bildet, nur in Thrombozyten exprimiert wird, sind die hier für die  $\beta 3$ -Integrin Untereinheit gefundenen Effekte voll für  $\alpha V\beta 3$ -Integrin gültig (Humphries et al., 2006). Weitere Analysen zeigten zudem, dass 3T3  $\beta 3$ low-Zellen nahezu kein  $\alpha V\beta 5$ -Integrin exprimieren (Bernhard Wehrle-Haller, persönliche Kommunikation), so dass die beobachteten Effekte von  $\beta 3$ -

Integrin nicht durch andere, endogene VN-Rezeptoren maskiert werden. Zusätzlich entwickelte die Gruppe neue Mutanten, die erstmals Integrin-Aktivierung von Integrin-Signaling trennen (Pinon et al., 2014). Damit bleibt noch das Problem des endogenen  $\alpha 5\beta 1$ -Integrins. Dies kann durch FN/VN-Substrate elegant umgangen werden (Abb. 3.13), bei denen diskrete, subzelluläre FN Punkte von VN umgeben sind. Entsprechend den hier gezeigten Resultaten bleibt in einer solchen Umgebung  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, mangels Bindungsfähigkeit für VN (Pytela et al., 1985), auf FN beschränkt (Abb. 3.14). Solche Substrate und die dadurch ermöglichte Separierung von Integrinen in Kombination mit 3T3  $\beta 3$ low Zellen und den jeweiligen  $\beta 3$ -Integrin-Varianten haben die erwarteten Vorteile (Kap. 3.2) voll bestätigt.

Für die meisten Resultate dieser Arbeit waren FN/VN-Substrate in Kombination mit einem geeigneten Zellsystem und den benutzten Mutanten die Voraussetzung zur Beantwortung wichtiger Fragen in Bezug auf Entstehung und Reifung von CMAs. Durch Nutzung anderer Kombinationen von adhäsiven Proteinen könnten ähnlich aufgebaute Substrate in Zukunft für die Beantwortung vieler Fragestellungen hilfreich sein. Zwar wurden vergleichbare Substrate in ähnlicher Weise schon hergestellt (z.B. Laminin im Vergleich zu Kollagen (Dao et al., 2012), Streifenassays für neuronale Wachstumskegel (Gebhardt et al., 2012)). Allerdings handelte sich hierbei um Strukturen von Zellgröße und größer. Diese können beispielsweise, wie geschehen, zur vergleichenden Untersuchung der Integrinexpression kompletter Zellen genutzt werden (Dao et al., 2012). In Bezug auf subzelluläre Fragestellungen, wie eben das Verhalten einzelner CMAs, sind jedoch kleinere Strukturen nötig, wie sie in dieser Arbeit entwickelt wurden.

Verschiedene Experimente belegen, dass das Zellsystem und die verwendeten  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen keine toxischen oder sonstigen negativen Effekt verursachen. Zum einen zeigen Spreadingversuche von Pinon und Kollegen für 3T3  $\beta 3$ low Zellen auf FN, dass weder fehlendes  $\beta 3$ -Integrin, noch fehlendes  $\beta 3$ -Integrin-Signaling ( $\beta 3$ -Y<sup>747</sup>A - Mutation), sich negativ auswirken. Spreading erfolgt in diesem Fall - da auf FN - durch  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vermitteltes Signaling. Zum anderen zeigen bei einer Aktinfärbung auf FN/VN-Substraten Zellen mit einer  $\beta 3$ -Integrin Mutation keine Abweichung von der  $\beta 3$ -wt-Situation (Abb. 3.15 A-D). Größe und Form der Zellen scheinen vergleichbar. Auch die Struktur des Aktin-Zytoskeletts scheint unbeeinflusst: in allen Fällen sind Zellen von Aktin-Stressfasern durchspannt und Ausläufer der Zellen mit Lamellipodien und Filopodien sind durch gebündelte Aktinbögen miteinander verbunden. Das bei diesem qualitativen Vergleich keine Unterschiede der  $\beta 3$ -Integrin-Varianten auftreten, ist nicht selbstverständlich. Wie gezeigt rekrutieren  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA kein Paxillin (Abb. 3.17) und kein FAK (Abb. 3.18). Damit fehlt solcherart vermittelten CMAs phosphoryliertes Paxillin, was über die Rekrutierung von Rac1-GEFs und RhoA-GAPs ein wichtiger Faktor für ein erfolgreiches Zellspreading ist und dabei deutlichen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett nimmt (siehe Kap. 1.4 und Kap. 1.5). Dass unabhängig von der jeweils vorliegenden  $\beta 3$ -Integrin-Variante immer ein vergleichbares Spreading erfolgt, ist ein weiteres Indiz, dass die Anwesenheit von endogenem  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (und den dadurch vermittelten CMAs) ausreichend ist, um für fehlendes Signaling durch  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen zu kompensieren. Weiterhin ist es von Bedeutung, dass größere CMAs auf VN bei jeder  $\beta 3$ -Integrin-Variante mit Aktin-Stressfasern verknüpft sind (Abb. 3.15 A''', B''', C''', D'''). Dies legt bereits nahe, dass die Verknüpfung zwischen CMAs und Aktin auch für  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA funktioniert, und dass die bei diesen

Mutationen nicht rekrutierten CMA-Proteine nicht notwendig für diese Verknüpfung sind. Wie später noch ausführlicher diskutiert wird, ist es plausibel, dass die Anwesenheit von Talin und Vinculin bei  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA ausreicht, um die Verbindung zu Aktin sicherzustellen.

Zusammenfassend ist gezeigt, dass FN/VN-Substrate geeignet sind, um 3T3  $\beta 3$ low Zellen mit Signaling inkompetenten  $\beta 3$ -Integrin Mutanten zu untersuchen. Zellen zeigen dabei ein physiologisches Verhalten und Effekte der Mutationen bleiben auf Einzel-CMAs beschränkt. Darüber hinaus scheinen FN/VN-Substrate für weitere Fragestellungen, auch über CMAs und Integrin-Interaktionen hinaus, geeignet zu sein.

#### 4.4.2 Ein $\beta 3$ -Integrin-Y<sup>747</sup>-Talin-Komplex rekrutiert Paxillin und FAK, aber kein Vinculin

Die  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen  $\beta 3$ -VE,  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA sind auf Basis der Talin-bindenden Motive von Layilin ( $\beta 3$ -VE und  $\beta 3$ -VEYA), bzw. von PIPKI- $\gamma$  ( $\beta 3$ -SPLH) entstanden (Pinon et al., 2014). Beide haben für Talin eine höhere Affinität, als das W/NPLY<sup>747</sup> Motiv in  $\beta 3$ -Integrin. Folgerichtig wiesen alle drei Mutationen sowohl in einem *pull-down-assay* mit GST-Talin-Kopfdomäne, als auch bei Immunmarkierung in einem dFVS-Experiment gebundenes Talin auf. Quantitative Messungen (Octet Biosensor Analyse mit einem Fortebio Octet RED384 Instrument) bestätigten zudem für  $\beta 3$ -VE und  $\beta 3$ -VEYA eine erhöhte Affinität für Talin im Vergleich zu  $\beta 3$ -wt und  $\beta 3$ -Y<sup>747</sup>A (Pinon et al., 2014). Die reine Präsenz von Talin ist also offensichtlich nicht die Erklärung für die unterschiedliche Signaling-Kompetenz der  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen. Im Gegensatz dazu zeigten weitere FN/VN-Experimente für Paxillin und FAK, dass die Rekrutierung dieser beiden CMA-Proteine nur für  $\beta 3$ -Integrin-Varianten erfolgt, die auch Spreading, und damit Integrin-Signaling aufweisen. Die aus der Literatur bekannten Bindungspartner von Paxillin, vor allem im phosphorylierten Zustand, und FAK lassen vermuten, dass es sich dabei nicht nur um eine zufällige Korrelation handelt. Phosphorylierung, durch einen FAK-Src-Komplex, von Paxillin an den Tyrosinen 31 und 118 führt zur Bindung des CrkII-Dock180-Elmo Proteinkomplexes, der als GEF für Rac1 und Cdc42 wirkt (Deakin and Turner, 2008). Alternativ verursacht diese Phosphorylierung indirekt eine Inaktivierung von RhoA durch p190RhoGAP. Eine weitere wichtige Phosphorylierungsstelle ist Serin 273. Dessen Phosphorylierung führt zur Bindung des PAK-PIX-GIT-Komplexes, der ebenfalls als GEF für Cdc42 und Rac1 wirkt (Kutys and Yamada, 2014). In beiden Fällen führt also die Phosphorylierung von Paxillin zu einer Steigerung der Rac1- und Cdc42-Aktivität im Vergleich zur RhoA-Aktivität. Dies führt durch die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien, sowie durch reduzierte Kontraktilität zu einer Ausbreitung einer Zelle und damit zu einem erfolgreichen Zellspreading.

Neue Studien zeigen, dass Talin durch die Bindung an FAK in *nascent adhesions* (NAs) rekrutiert wird (Lawson et al., 2012). Danach könnte man wegen der Rekrutierung von Talin bei  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA auch eine Kolo-kalisation mit FAK erwarten. Die Studie von Lawson et al., 2012, steht aber nicht zwangsläufig in Widerspruch zu der hier gemachten Beobachtung. Die hier untersuchten CMAs sind keine NAs, sondern anhand ihrer Größe und Form eher als maturierte *focal adhesions* (FAs) einzuordnen. Weitere Experimente, beispielsweise mit Zeitrafferaufnahmen oder mit kurzen

Kultivierungszeiten, sind nötig, um die Interaktion von FAK und Talin zu untersuchen. Für FAs legen jedoch verschiedene Studien eine enge Paxillin-FAK – Interaktion nahe (Choi et al., 2011; Hoffmann et al., 2014), was im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen dieser Studie steht.

Rekrutiert Paxillin FAK zum  $\beta$ 3-Integrin-Talin-Komplex oder umgekehrt? Diese Fragen kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Allerdings legen Ergebnisse aus der Literatur nahe, dass Paxillin unabhängig von FAK rekrutiert wird. So sind die C-terminalen LIM-Domänen von Paxillin (ohne Bindungsstellen für FAK) entscheidend für dessen Lokalisierung in CMAs (Brown et al., 1996; Brown et al., 1998) und Paxillin ist auch in FAK -/- Zellen in CMAs zu finden (Lawson et al., 2012). Demnach rekrutiert also Paxillin FAK über seine LD-Domänen und wird selbst durch seine LIM-Domänen 2 und 3 an einen  $\beta$ 3-Integrin-Talin-Komplex rekrutiert. Bei diesem führt die  $\beta$ 3-Integrin-Talin-Interaktion zu einer Exposition von  $\beta$ 3-Y<sup>747</sup>, die eine folgende Paxillinrekrutierung ermöglicht (Bernhard Wehrle-Haller, persönliche Kommunikation). Genauere Aussagen über die Paxillinrekrutierung sind aber schwierig, da für LIM-Domänen nach wie vor schlecht verstanden ist, wie sie Proteininteraktion exakt vermitteln (Kadmas and Beckerle, 2004; Schiller and Fässler, 2013). Solange dies nicht geklärt ist, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein bisher unbekanntes Protein an der Paxillin-Rekrutierung beteiligt ist. FAK dagegen kann auch durch andere Interaktionen in CMAs rekrutiert werden, um anschließend durch die Paxillin-Interaktion im CMA stabilisiert zu werden (Kap. 1.4). Im Vergleich zeigen diese Experimente aber auch Details über den Einfluss von Talin im Prozess von Integrin-Aktivierung → Integrin-Clustering → Integrin-Signaling. Da  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA sowohl aktiviert sind, Adhäsion vermitteln und clustern zeigt sich ein direkter Einfluss von Talin auf diese Prozesse (Cluzel et al., 2005). Die Integrinmutation  $\beta$ 3-Y<sup>747</sup>A bindet kein Talin und ist weder aktiviert, noch clustert sie (Pinon et al., 2014). Gleichzeitig ist die Anwesenheit von Talin aber nicht hinreichend um Integrin-Signaling auszulösen. Durch die Interaktion mit  $\beta$ 3-Integrin, die zur Adapterrekrutierung führt, ist sie aber notwendig.

Die Abwesenheit von Paxillin in  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA vermittelten CMAs kann genutzt werden, um die Paxillin-abhängige Rekrutierung weiterer CMA-Proteine zu untersuchen. Vinculin etwa hat eine Paxillinbindungsstelle, Vinculin-Mutationen ohne diese Bindungsstelle werden aber anscheinend problemlos in CMAs rekrutiert (Carisey et al., 2013; Humphries et al., 2006; Humphries et al., 2007). Ein FN/VN-Experiment zeigte eine durchgehende Vinculin-Rekrutierung für alle  $\beta$ 3-Integrin-Varianten, inklusive der Paxillin-defizitären  $\beta$ 3-SPLH und  $\beta$ 3-VEYA (Abb. 3.19). Dies ist ein weiterer Beleg, dass Vinculin unabhängig von Paxillin rekrutiert werden kann. Gleichzeitig bedeutet es auch, dass die Exposition von  $\beta$ 3-Integrin-Y<sup>747</sup> keine Bedeutung für die Rekrutierung von Vinculin hat. Dagegen unterstreicht es die Bedeutung der Talin-Vinculin-Interaktion (Goult et al., 2013). Zwar stellt bereits Talin durch eine Verbindung von Integrinen und Aktin eine Anbindung von CMAs an das Aktin-Zytoskelett und damit auch an Aktin-Myosin abhängige Zugspannung her. Vinculin führt aber durch eine zusätzliche Verknüpfung von Talin und Aktin zu einer weiteren Stabilisierung dieser Verbindung (Ziegler et al., 2006). Vinculin nutzt dafür verdeckte Bindungsstellen in Talin, die nur nach mechanischer Streckung von Talin frei werden. Daher liegt es nahe, dass Vinculin selektiv rekrutiert wird, um CMAs mechanisch zu verstärken, bzw. die Ausübung größerer Kräfte auf CMAs überhaupt zu ermöglichen. Weitere Studien mit FP-markierten, aber nicht mutierten Vinculin- und Paxillin-Fusionsproteinen legen *in cellula* anhand des axialen CMA-Aufbaus ebenfalls keine enge Vinculin-

Paxillin-Interaktion nahe (Kanchanawong et al., 2010). Die Vinculin-Rekrutierung unabhängig von Paxillin erklärt auch, warum für  $\beta 3$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA vermittelte CMAs eine vergleichbare Verknüpfung mit Aktin-Stressfasern zu sehen ist wie für  $\beta 3$ -wt und  $\beta 3$ -VE.

#### 4.4.3 Adapterrekrutierung von $\beta 1A$ -Integrin und muskelspezifischem $\beta 1D$ -Integrin

Von besonderem Interesse sind die Experimente mit  $\beta 1A$ -Integrin und  $\beta 1D$ -Integrin. Während  $\beta 1A$  ubiquitär exprimiert wird, ist  $\beta 1D$  eine muskelspezifische Spleißvariante (Belkin et al., 1996). Für das hohe Maß an ausgeübter Kraft brauchen Muskelzellen eine besonders stabile Verankerung mit ihrer Umgebung. Große CMAs verursachen aber ebenso viel Signaling, was auch zu CMA-turnover führt. Dies steht den speziellen Anforderungen einer Muskelzelle entgegen. Wie Experimente auf FN/VN-Substraten zeigen, rekrutiert  $\beta 1D$ -Integrin Vinculin, aber kein Paxillin (Abb. 3.20).  $\beta 1A$ -Integrin dagegen rekrutiert beide CMA-Proteine. Wie zuvor bei  $\beta 3$ -Mutationen verhält sich auch bei  $\beta 1A$  und  $\beta 1D$  die Rekrutierung von FAK analog zu der von Paxillin (Michael Bachmann, unveröffentlichte Daten). Damit rekrutiert  $\beta 1D$ -Integrin Talin (Anthis et al., 2010) und Vinculin (Abb. 3.20) und kann damit eine stabile Verbindung zwischen CMA und Aktin aufbauen (vgl. Kap. 4.4.5). Gleichzeitig rekrutiert es aber nicht die beiden Signaling-auslösenden Proteine Paxillin und FAK. Damit bietet  $\beta 1D$ -Integrin durch selektive Rekrutierung von CMA-Adapterproteinen eine elegante Möglichkeit Muskelzellen stabil mit der Umgebung zu verankern, ohne ständiges Signaling auszulösen.

Diese Ergebnisse sind durch ihren Bezug zu einem Aspekt der Funktionsweise von Muskeln von großem Interesse. Es ist aber auffällig, dass für  $\beta 1$ -Integrine eine Talin-Vinculin-Rekrutierung, separat von einer Paxillin-FAK-Rekrutierung, physiologisch genau gleich umgesetzt ist, wie für künstliche Mutationen von  $\beta 3$ -Integrinen (Kap. 4.4.2). Dies weist möglicherweise auf eine generelle Eigenschaft von CMAs hin. Es deutet sich ein Aufbau von CMAs in funktionellen Modulen an (vgl. Kap. 4.5).

#### 4.4.4 Einfluss von Kindlin für Spreading und Adapterrekrutierung

Wie sich in den letzten Jahren gezeigt hat, ist neben Talin auch Kindlin an der Aktivierung von Integrinen beteiligt (Calderwood et al., 2013). Es ist nötig, damit Talin Integrine vollständig aktivieren kann und scheint damit die Talin-abhängige Integrinaktivierung zu modulieren. Im Vergleich zu Talin ist über Kindlin, seine Interaktion mit Integrinen und Kindlin-abhängige Adapterrekrutierung viel weniger bekannt. In dieser Arbeit standen  $\beta 3$ -Integrin-Mutationen zur Verfügung, die die Bindung von Kindlin an  $\beta 3$ -Integrin beeinflussen (Abb. 3.12). Analog zu einer  $\beta 3$ -Y<sup>747</sup>A Mutation, die die Talinbindung unterbindet (Abb. 3.11), zeigen  $\beta 3$ -S<sup>752</sup>P (=  $\beta 3$ -S<sup>inaktiv</sup>) und  $\beta 3$ -Y<sup>759</sup>A (=  $\beta 3$ -Y<sup>inaktiv</sup>) keine Kindlin-Bindung (Moser et al., 2008). Ebenso analog zeigen sie eine verringerte Aktivierung und ein verringertes Signaling im Vergleich zu  $\beta 3$ -wt (Pinon et al., 2014). Wie bei  $\beta 3$ -Y<sup>747</sup>A wird bei  $\beta 3$ -S<sup>inaktiv</sup> kein Paxillin gebunden;  $\beta 3$ -Y<sup>inaktiv</sup> zeigt in einem sehr geringem Umfang Paxillinrekrutierung (Abb.

3.21). Beide Kindlin-betreffenden Mutation haben aber Talin gebunden (Moser et al., 2008). Effekte dieser Mutation sind also nicht durch fehlendes Talin zu erklären.

Die verringerte Integrinaktivierung kann jedoch durch eine  $\beta 3$ -D<sup>723</sup>A-Mutation aufgehoben werden. Bei  $\beta 3$ -D<sup>723</sup>A/S<sup>752</sup>P (=  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup>) führt die gesteigerte Aktivierung aber nicht zu mehr Signaling. Dies steht im Gegensatz zur  $\beta 3$ -D<sup>723</sup>A/Y<sup>759</sup>A (=  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup>) Mutation. Interessanterweise verhält sich bei diesen Kindlin-Mutationen die Paxillinrekrutierung analog zu den Talin-betreffenden Mutationen  $\beta 3$ -VE,  $\beta$ -SPLH und  $\beta 3$ -VEYA: Signaling erfolgt nur bei erfolgreicher Paxillin-Rekrutierung (Abb. 3.21). Dies unterstreicht erneut die große Bedeutung von Paxillin für die Integrin-vermittelte Signalkaskade, die zu Spreading führt. Derzeit ist keine direkte Kindlin-Paxillin-Interaktion bekannt. Daher, und da Talin bei den Kindlin-betreffenden Mutationen gebunden ist (Moser et al., 2008), kann man vermuten, dass Kindlin daran beteiligt ist, den C-terminus der  $\beta 3$ -Integrin-Untereinheit in eine geeignete Konformation für die Rekrutierung von Paxillin zu bringen. Neueste Studien legen zudem nahe, dass Kindlin vor Talin an Integrin bindet (Bachir et al., 2014). Daher scheint Kindlin Integrin in eine geeignete Anordnung für die nachfolgende Talin-Bindung zu bringen.

Es stellt sich die Frage, wieso die  $\beta 3$ -Integrin-Aminosäuren S<sup>752</sup> und Y<sup>759</sup> unterschiedlichen Einfluss auf Signaling und Paxillinrekrutierung haben. In Anbetracht der Hypothese, dass die Talin-vermittelte Exposition von Y<sup>747</sup> zur Rekrutierung von Paxillin nötig ist, wäre denkbar, dass S<sup>752</sup> zusätzlich für eine Rekrutierung an ein erweitertes Integrin-Talin-Kindlin-Motiv entscheidend ist. Es fällt in diesem Zusammenhang auf, dass Paxillin zwei LIM-Domänen (LIM2 und LIM3) benötigt um in CMAs rekrutiert zu werden (Brown et al., 1996; Brown et al., 1998). Man kann daher die erweiterte Hypothese aufstellen, dass Y<sup>747</sup> und S<sup>752</sup> die entscheidenden Interaktionspartner der beiden LIM-Domänen sind. Ihre Exposition durch eine Talin-, bzw. Kindlin-Bindung an den  $\beta 3$ -Integrin-C-terminus ermöglicht nachfolgend die Bindung von Paxillin. Mangelnde Kenntnisse über die genaue Struktur von LIM-Domänen erlauben leider keine genaueren Aussagen. Die etwas weiter entfernte Aminosäure Y<sup>759</sup> dagegen wäre dann an der Rekrutierung von Kindlin und/oder der Rekrutierung weiterer Adaptoren beteiligt. Ein aus der Literatur bekannter Kandidat für eine Interaktion mit Kindlin ist das LIM-Domänen Protein Migfilin (Brahme et al., 2013). Wie gezeigt wurde, benötigt auch dieses Protein zwei LIM-Domänen um in CMAs rekrutiert zu werden. Eventuell erfüllt also bei Migfilin Y<sup>759</sup> die Funktion von Y<sup>747</sup> bei Paxillin. Um die Analogie komplett zu machen wäre noch eine analoge Aminosäure zu S<sup>752</sup> nötig. Bei  $\beta 3$ -Integrin folgen in C-terminale Richtung nach Y<sup>759</sup> nur noch Arg-Gly-Thr. Falls die Analogie gültig ist, könnte T<sup>762</sup> für Migfilin das Analog zu S<sup>752</sup> bei der Paxillinrekrutierung sein, auch wenn der Abstand (sechs Aminosäuren Abstand bei Y<sup>747</sup>-S<sup>752</sup>; vier Aminosäuren bei Y<sup>759</sup>-T<sup>762</sup>) ein anderer ist. Von den distalen Aminosäuren und funktionellen Gruppen des  $\beta$ -Integrin-C-terminus ist bisher nur bekannt, dass die C-terminale Carboxygruppe von  $\beta 1$ -Integrin wichtig für die Rekrutierung von Kindlin-2 ist (Fitzpatrick et al., 2014). Um einen Einfluss von  $\beta 3$ -Integrin-T<sup>762</sup> näher zu untersuchen sind weitere Experimente mit geeigneten  $\beta 3$ -Mutationen erforderlich, die in dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung standen. Alternativ könnten auch andere LIM-Domänenproteine das Kindlin- $\beta 3$ -Y<sup>759</sup>/T<sup>762</sup>-Motiv nutzen. Es könnte sich hier eine Modularität des CMA-Aufbaus zeigen, der für die Anpassung an verschiedene Situationen und die Erfüllung verschiedener Aufgaben erforderlich ist.

Eines der wenigen, weiteren CMA-Proteine, für das eine Interaktion mit Kindlin derzeit bekannt ist, ist die Pseudokinase *Integrin Linked Kinase* (ILK) (Huet-Calderwood et al., 2014). ILK liegt zellulär als Komplex mit den Proteinen PINCH und Parvin vor (IPP-Komplex). Der IPP-Komplex ist an Zelladhäsion, Spreading, Zellmigration und Fibrillogenese beteiligt (Wickström et al., 2010b). Sowohl ILK, als auch Parvin enthalten Paxillinbindungsstellen, die mit LD-Domänen von Paxillin interagieren (Böttcher et al., 2009). Eine Paxillin-abhängige Rekrutierung von ILK wurde lange angenommen, steht derzeit aber zur Debatte (Moik et al., 2013). In Experimenten in dieser Arbeit zeigt sich weder bei  $\beta 3$ -VEYA, noch bei  $\beta 3$ -S<sup>aktiv</sup> eine Rekrutierung von ILK. Bei  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> ist in vereinzelt CMA eine ILK-Rekrutierung zu sehen, die jedoch nicht mit der  $\beta 3$ -wt-Situation vergleichbar ist (Abb. 3.22). Da ILK in CMA jedoch als IPP-Komplex vorliegt, zeigt dieses Experiment eher die Rekrutierung des IPP-Komplexes, als die von ILK selbst an. Da  $\beta 3$ -VEYA kein Paxillin, aber Kindlin bindet, legt dieses Experiment eine Paxillin-abhängige Rekrutierung des IPP-Komplexes nahe. Da aber gleichzeitig  $\beta 3$ -Y<sup>aktiv</sup> Paxillin, aber kein Kindlin bindet, deutet dieses Experiment insgesamt eine synergistische Rekrutierung des IPP-Komplexes durch Paxillin und durch Kindlin an. Ob und wer von ILK, PINCH und Parvin jeweils an Kindlin oder Paxillin bindet, ist nicht abschließend mit Sicherheit zu sagen. Wie gesagt, könnte die Paxillin-Interaktion eher über Parvin, als über ILK erfolgen (Stiegler et al., 2012). Für die Kindlin-Interaktion dagegen ist eine Bindung zwischen der ILK-Kinasedomäne und der Kindlin-F2PH-Domäne publiziert (Huet-Calderwood et al., 2014). PINCH, zusammengesetzt aus fünf LIM-Domänen, schließlich bindet mit LIM1 an die Ankyrin-Domäne von ILK (Kovalevich et al., 2011). Wenn auch nicht publiziert, wäre es im Rahmen der oben aufgestellten Hypothese denkbar, dass PINCH statt Migfilin an ein  $\beta 3$ -Y<sup>759</sup>/T<sup>762</sup>-Kindlin-Motiv bindet. Generell sind die exakte CMA-Rekrutierung und der Einfluss der verschiedenen Bindungsstellen des IPP-Komplexes nach wie vor relativ unklar. Weitere Experimente mit mutierten Paxillin-, oder Kindlin-Bindungsstellen von ILK, Parvin und PINCH mit FN/VN-Substraten könnten hier in Zukunft genauere Aussagen ermöglichen.

#### 4.4.5 $\beta 3$ -Integrin Dynamik auf FN/VN-Substraten

Wie beschrieben (Kap. 3.2), besteht ein Vorteil von FN/VN-Substraten darin, dass damit Abschätzungen über die Affinität eines Integrin-vermittelten CMA für einen Liganden im Vergleich zu einem anderen Liganden möglich sind. Färbungen für endogenes  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin haben bereits gezeigt, dass dieses Integrin nahezu vollständig auf FN rekrutiert wird (Abb. 3.14). Bei Experimenten auf FN/VN-Substraten entstand zusätzlich der Eindruck, dass  $\alpha V \beta 3$ -Integrin eher auf VN lokalisiert. Dies ist nicht so deutlich, wie für  $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin auf FN. Es ist aber erstaunlich, da  $\alpha V \beta 3$ -Integrin häufig gleichwertig zu seiner Funktion als VN-Rezeptor, als FN-Rezeptor angesehen wird (Humphries et al., 2006). Um dies näher zu untersuchen, wurde mit Zeitrafferaufnahmen auf FN/VN-Substraten die CMA-Entstehung von  $\beta 3$ -wt transfizierten 3T3  $\beta 3$ low Zellen analysiert (Abb. 3.23 A, Video 8). Zeitrafferaufnahmen ermöglichten es nicht nur die Entstehung, sondern auch die Reifung und Änderungen während dieser Reifung zu verfolgen. Um den Effekt von rekrutiertem Paxillin bei diesen Prozessen zu untersuchen, wurde  $\beta 3$ -wt außerdem mit  $\beta 3$ -VEYA verglichen (Abb. 3.23 B, Video 9). Diese Experimente zeigten für Bildausschnitte mit zellulären Ausläufern während des Spreadings unabhängig von der verwendeten  $\beta 3$ -Integrin-Variante eine Kolo-kalisation mit VN von mehr als 80 %

(Abb. 3.23 C). Dies steht in klarem Widerspruch zu einer Annahme, dass  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrine in gleichem Maße wie  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin ein geeigneter FN-Rezeptor ist. Eine zusätzlich durchgeführte Transfektion für Paxillin-mCherry zeigt eine durchgängige Kolo-kalisation mit  $\beta$ 3-wt, aber nicht für  $\beta$ 3-VEYA. In letzterem Fall entstehen Paxillin-CMAs ausschließlich auf FN. Dies ist ein zusätzlicher, eindrucksvoller Beleg, dass  $\beta$ 3-VEYA kein Paxillin rekrutiert.

Um die Affinität von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin für VN im Vergleich zu FN näher zu untersuchen, wurden besonders entstehende CMAs näher untersucht. Bei entsprechender Anhebung des Kontrastes zeigte sich in den SIM Zeitrafferaufnahmen sowohl für  $\beta$ 3-wt, als auch für  $\beta$ 3-VEYA ein schmaler Ring an  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin – Clustern in der Peripherie der Zelle (Abb. 3.24, Video 10 und 11). Da Paxillin in diesen Clustern fehlt, handelt es sich nicht um klassische *nascent adhesions*; sie werden daher im folgenden Microcluster genannt. Der Ring von Microclustern breitet sich unabhängig vom darunter befindlichen Substrat aus. Allerdings scheint die Bildung neuer CMAs nur auf VN stattzufinden. Untersuchungen mit konformationsspezifischen Antikörpern gegen aktives  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin zeigten in früheren Arbeiten einen ähnlichen Ring in der Zellperipherie von Endothelzellen (Kiosses et al., 2001). Andere Studien mit NIH 3T3 Fibroblasten sahen aktiviertes  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin in der Zellperipherie, konnten aber laut eigener Aussage das gleiche nicht für  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin zeigen (Galbraith et al., 2007). Allerdings erfolgte diese Aussage bei Galbraith und Kollegen nicht auf vergleichbar ausführliche Weise wie bei  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin. Daher kann man auf Basis dieser Publikationen und den Ergebnissen dieser Arbeit davon ausgehen, dass  $\alpha$ 5 $\beta$ 1- und  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin in der Zellperipherie als Microcluster vorliegen. Ihre Rekrutierung an die Zellperipherie wird laut Kiosses und Kollegen durch die RhoGTPase Rac1 vermittelt (Kiosses et al., 2001). Andere Studien legen eine Involvierung von  $\alpha$ -actinin (Wiseman et al., 2004), bzw. für Filopodien von Myosin-X nahe (Kerber and Cheney, 2011; Zhang et al., 2005). Integrine in diesen Microclustern sind also bereits voraktiviert (*primed*), um bei Kontakt eine Bindung zur ECM eingehen zu können. Ein Clustering von Integrinen und eine Reifung zu CMAs erfolgt aber nur bei geeigneten ECM-Liganden (Abb. 3.24). Bemerkenswerterweise scheint  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin trotz dieser Aktivierung VN im Vergleich zu FN zu bevorzugen. Die schnelle Ausbreitung über Liganden ohne Beachtung der Affinität und das fehlende Clustern und Reifen zu größeren CMAs legt nahe, dass Integrine in solchen transienten Clustern keinen Liganden gebunden haben. Entsprechend den Modellen von Inside-Out- und Outside-In-Signaling kann man daher vermuten, dass solche voraktivierten Integrine Talin und/oder Kindlin gebunden haben. Für Integrin-Clustering - nach Integrin-Aktivierung der nächste Schritt der CMA-Entstehung - scheint dann aber der jeweilige Ligand entscheidend zu sein, da größere, stabile Cluster bevorzugt auf VN entstehen.

Eine Quantifizierung der entstehenden CMAs ergab für 92,6 % eine Entstehung auf VN, für 0,6 % auf FN und 6,8 % wurden der Kategorie „gemischt“ zugeordnet, da sie auf der Grenze von FN und VN entstanden sind und keinem der Bereiche klar zugeordnet werden konnten (Abb. 3.25). Da die geometrische Bedeckung in den für diese Auswertung genutzten Bereichen etwa 56 % FN und 44 % VN beträgt, ergibt sich daraus eine 10-mal häufigere Bildung von  $\beta$ 3-wt vermittelten CMAs auf VN im Vergleich zur Umgebung. Allerdings wurde bei dieser Rechnung FN und „gemischt“ als eine Kategorie betrachtet. Verwirft man die Kategorie „gemischt“ und vergleicht nur klare Lokalisationen neuer CMAs auf FN oder VN ergibt sich, dass  $\beta$ 3-wt vermittelte CMAs mehr als 120-mal eher auf VN statt auf FN entstehen. Jedoch muss an hierbei beachten, dass VN wesentlich kleiner als FN ist und

dadurch auf der gleichen Fläche mehr Bindungsstellen zur Verfügung stellt als FN. Korrigiert man um die Molekulargewichte ( $M_{FN} = 440$  kDa,  $M_{VN} = 75$  kDa,  $M_{FN}/M_{VN} = 5,9$ ), werden nur noch 20-mal so viele CMAs durch  $\beta 3$ -wt auf VN, als auf FN gebildet. Dies widerspricht aber in jedem Fall einer Annahme von  $\alpha V\beta 3$ -Integrin als einem zu  $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vergleichbaren FN-Rezeptor. Wie konnte es zu einer solchen Einschätzung kommen? Es ist bemerkenswert, dass im ersten Bericht über  $\alpha V\beta 3$ -Integrin mittels *in vitro* Experimenten klar gezeigt ist, dass dieses Integrin VN bevorzugt und FN nahezu gar nicht bindet (Pytela et al., 1985). Allerdings zeigt  $\alpha V\beta 3$ -Integrin auf FN ganz klar funktionelle CMAs. Dies zeigt sich auch in den Experimenten dieser Arbeit. Wie man aber in Abbildung 3.25 sieht, sind  $\alpha V\beta 3$ -Integrin CMAs auf FN typischerweise nicht auf FN entstanden; dies geschieht auf VN. Erst bei einem anschließenden Gleiten des CMAs in Richtung des Zellzentrums (Abb. 3.25, blauer Pfeil) findet gegebenenfalls eine Verlagerung von VN auf FN statt. Bemerkenswerterweise kommt es dabei nicht zur Auflösung der  $\alpha V\beta 3$ -CMAs, obwohl dieses Integrin ursprünglich kaum einen neuen CMA auf FN ausbilden konnte. Die Verlagerung von CMAs von VN auf FN erklärt auch die Diskrepanz zwischen der hohen Zahl der auf VN entstehenden CMAs (Abb. 3.25) und der vergleichsweise reduzierten Kolo-kalisation aller CMAs mit VN (Abb. 3.23).

Es bleibt damit festzuhalten, dass  $\alpha V\beta 3$ -Integrin in neu entstehenden CMAs gegenüber FN eine höhere Affinität für VN aufweist. Etablierte CMAs können aber diesen Affinitätsunterschied überwinden. Dies spricht klar für eine Beteiligung nachträglich rekrutierter zytoplasmatischer Adaptoren. Damit würde sich auch erklären, warum Pytela und Kollegen in ihrer *in vitro* Analyse für  $\alpha V\beta 3$ -Integrin nur eine Bindung an VN, aber nicht für FN feststellen konnten (Pytela et al., 1985), da dort zytoplasmatische Adaptoren nicht vorhanden waren. Diese Ergebnisse unterstreichen klar die Wichtigkeit von *in cellula* Experimenten, die die Anwesenheit aller zytoplasmatischer Integrin-Bindungspartner ermöglicht. Weiterhin zeigt sich die Bedeutung von Experimenten auf FN/VN-Substraten in Kombination mit SIM Zeitrafferaufnahmen. Nur damit konnte diese Änderung in der Ligandenaffinität von  $\alpha V\beta 3$ -Integrin während der CMA-Reifung gezeigt werden.

Die Frage welche Adaptoren nötig sind, damit  $\alpha V\beta 3$ -Integrin CMAs von VN auf FN gleiten können, kann nicht abschließend beantwortet werden. Die sehr ähnliche Kolo-kalisation von  $\beta 3$ -wt- und  $\beta 3$ -VEYA-vermittelten CMAs mit VN (Abb. 3.23) scheint Paxillin und Paxillin-abhängig rekrutierte Adaptoren eher auszuschließen. Ein möglicher Kandidat ist die Integrin-Talin-Vinculin-Aktin Verbindung. Strukturanalysen zeigen eine Stabilisierung der aktiven Konformation von  $\beta 3$ -Integrin bei lateralem Zug, wie er durch retrograden Aktinfluss zu erwarten ist (Zhu et al., 2008). Die Interaktion von Talin und Vinculin scheint die aktive Konformation von Talin, und damit indirekt von Integrinen, zu stabilisieren (Humphries et al., 2007; Yao et al., 2014). Und schließlich werden unter Zugspannung in Talin mehrere Vinculin-Bindungsstellen freigelegt, die eine verstärkte Interaktion ermöglichen (Goult et al., 2013). Dies legt nahe, dass der Aktin-Myosin vermittelte Zug über die „Kraftachse“ zwischen Integrin und Aktin zu einer Stabilisierung des gesamten CMAs führt. In dieser zytoplasmatisch stabilisierten Konformation wäre es einem auf VN entstandenen,  $\beta 3$ -Integrin vermittelten CMA anschließend möglich, auf FN zu bestehen. Die Stabilisierung des Integrins in der aktiven Konformation durch Adaptoren würde die Affinität des alleinigen Integrins „überschreiben“. Zukünftige Experimente, beispielsweise mit Vinculin-Knockout-Zellen, können diese Hypothese weiter überprüfen.

Dies hat weitreichende Konsequenzen für die Interpretation der Funktionen von  $\alpha$ V $\beta$ 3- und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin. Es stellt sich allgemein die Frage, ob bisher aufgedeckte Unterschiede zwischen  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin wirklich auf generelle Unterschiede der Integrine zurückzuführen sind, oder ob es sich nicht um Effekte handelt, die auf das Zusammenwirken von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin und seinem suboptimalen Ligand FN zurückzuführen sind, bzw. überhaupt nur bei dieser Kombination auftreten. Bedauerlicherweise haben wichtige Studien über die Unterschiede zwischen diesen beiden Integrine nur FN als Ligand benutzt (Morgan et al., 2009; Roca-Cusachs et al., 2009; Schiller et al., 2013). Daher ist für viele der beobachteten Unterschiede von  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin und  $\alpha$ 5 $\beta$ 1-Integrin nicht klar, ob es sich wirklich um intrinsische Eigenschaften dieser Integrine handelt, oder ob die für  $\alpha$ V $\beta$ 3-Integrin beobachteten Effekte nicht in Wirklichkeit auf die Kombination dieses Integrins mit FN als Ligand limitiert sind. Beispielsweise wurde aus der Beobachtung, dass  $\alpha$ V-Integrin-vermittelte CMAs sich nach Blebbistatin-Behandlung (im Gegensatz zu  $\beta$ 1-Integrin-vermittelten CMAs) komplett auflösen, geschlossen, dass diese sensitiver auf Zugkräfte reagieren (Schiller et al., 2013). In Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit und der aufgestellten Hypothese kann man sich leicht vorstellen, dass es sich hierbei um einen auf FN limitierten Effekt handelt: Die Blebbistatin-Behandlung hebt die kraftabhängige Stabilisierung von  $\beta$ 3-Integrin durch Talin-Vinculin-Aktin auf. Dann ist die Affinität für FN aber zu gering, um auf diesem Liganden zu clustern und CMAs zu bilden.

Dies zeigt, wie wichtig die Ligand-Integrin-Beziehung nicht nur für Adhäsion, sondern auch für Signaling ist. Experimente mit FN/VN-Substraten sind hervorragend für solche Untersuchungen geeignet und erlauben wie hier gezeigt ein besseres Verständnis der Wechselwirkung von ECM-Proteinen und Integrinen.

## 4.5 Model der CMA-Entstehung und der modulabhängigen Reifung

Die Ergebnisse dieser Arbeit betreffen den Einfluss des Aktin-Zytoskeletts für die Bildung neuer CMAs (Abb. 3.10), den Aktivierungsstatus von Integrinen und die Lokalisierung dieser voraktivierten Integrine (Abb. 3.24), den Einfluss von Talin und Kindlin bei der Integrinaktivierung (Abb. 3.16, Abb. 3.21) und die Rekrutierung eines Paxillin/FAK-Signaling-Moduls (Abb. 3.17, 3.18), sowie eines Aktinvernetzungs-Moduls (Abb. 3.19), das auf der Interaktion von Talin und Vinculin mit Integrinen und Aktin beruht und in Muskeln auch eine physiologische Bedeutung hat (Abb. 3.20). Es wurde auf Basis von Publikationen und den Ergebnissen dieser Arbeit ein Model erstellt, um diese Prozesse in einen Zusammenhang zu setzen (Abb. 4.1) und die Module gegeneinander abzugrenzen.

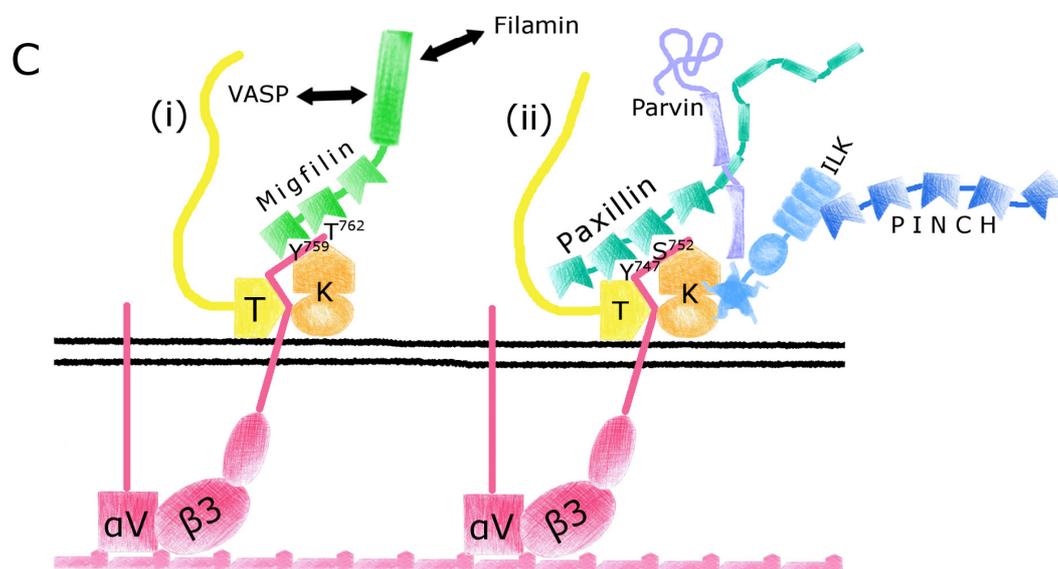
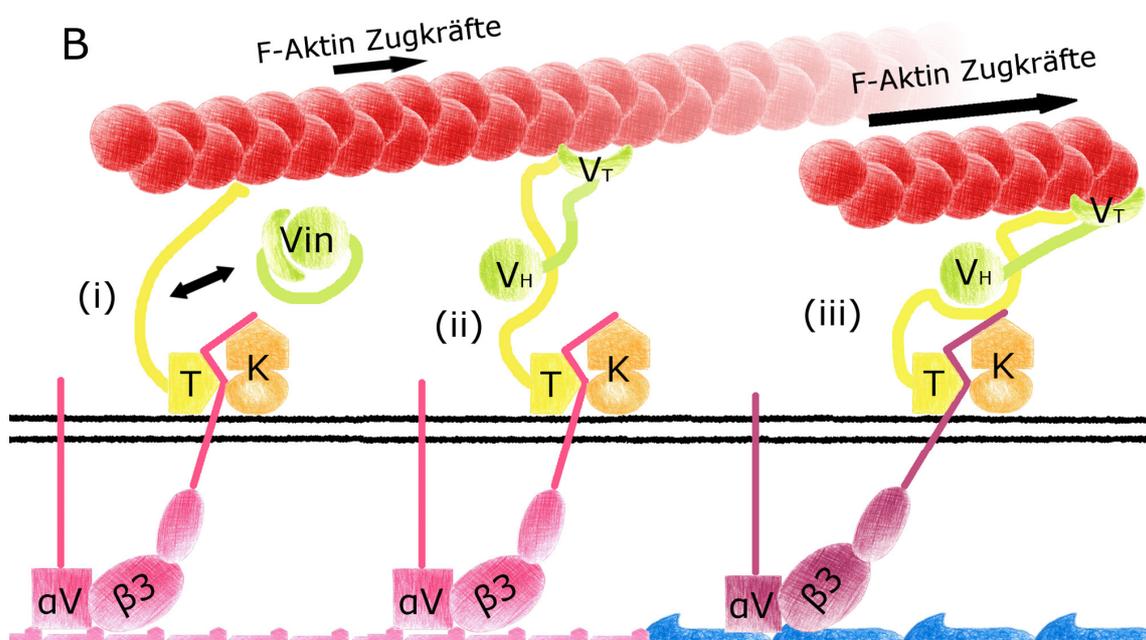
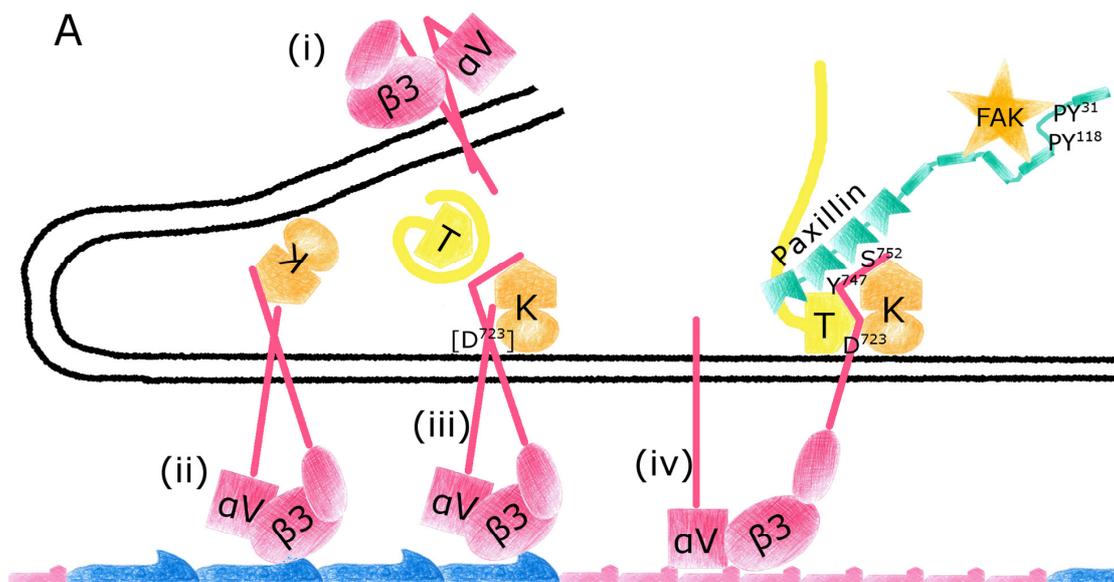
Im Integrin-Signalingmodul befindet sich  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin zunächst in einer inaktiven Konformation in der Zellmembran (Abb. 4.1 A (i)). In der Peripherie der Zelle liegen diese jedoch in einer voraktivierten Konformation vor ((Kiosses et al., 2001). Kindlin bindet vor Talin (Bachir et al., 2014) und bringt die  $\beta$ -Integrin Untereinheit in eine geeignete Konformation für eine spätere Talinbindung (Abb. 4.1 A (ii) – (iii), (Wehrle-Haller and Bastmeyer, 2014)). Kindlin ist damit ein Kandidat für eine solche Voraktivierung, ohne dass gleichzeitig bereits ein Ligand gebunden ist (Abb. 3.24, Kap. 4.4.5). Entsprechend gibt es auf dem ungeeigneten Ligand FN (Abb. 3.25 B) keine über Microcluster hinausgehende Integrin-Cluster und keine CMA-Etablierung (Abb. 4.1 A (ii)). Auf VN dagegen kommt es Ligand-bedingt zu Clustering und Talin-Bindung (Abb. 4.1 A (iv)). Talin geht dabei in eine aktive Konformation, unterbindet die inhibitorische Interaktion zwischen  $\alpha\text{V}$ -Integrin- $\text{R}^{995}$  und  $\beta\text{3}$ -Integrin- $\text{D}^{723}$  und führt zur Separierung der Untereinheiten (Saltel et al., 2009). Dies bringt durch Talin-Bindung  $\beta\text{3}$ -Integrin- $\text{Y}^{747}$  und, eventuell durch Kindlin-Bindung,  $\beta\text{3}$ -Integrin- $\text{S}^{752}$  in eine geeignete Konformation, damit Paxillin mit seinen LIM Domänen 2 und 3 binden kann. Im Folgenden kommt es durch einen FAK-*Src*-Komplex zur Phosphorylierung von Paxillin an den Tyrosinen Y31 und Y118, die gemeinsam mit weiteren Paxillin-Phosphorylierungsstellen zum Spreading beitragen (Deakin and Turner, 2008).

Das zweite Modul, das über Integrin-Talin-Vinculin CMAs mit Aktin verbindet, startet mit aktivem, Talin- und Kindlin-gebundenen,  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin (Abb. 4.1 B (i)). Während die N-terminale Talin *head* Domäne an Integrin bindet (Bouaouina et al., 2008), stellt die C-terminale Talin *tail* Domäne eine Verbindung mit Aktin her (Kopp et al., 2010). Vinculin kann durch die kombinatorische Interaktion mit der Talin *tail* Domäne und F-Aktin aktiviert werden (Janssen et al., 2006), was zur Dissoziation von Vinculin *head* (VH) und Vinculin *tail* (VT) führt (Abb. 4.1 B (ii)). In dieser Konformation bindet Vinculin F-Aktin. Diese Verbindung zwischen Integrin-Talin-Vinculin-Aktin wirkt auf mehreren Ebenen selbstverstärkend: Retrograder Aktinfluss verstärkt die Integrin-Aktivierung (Zhu et al., 2008), Kraft öffnet Vinculin-Bindungsstellen in Talin (Goult et al., 2013), Vinculinbindung sperrt Talin in der aktiven Konformation (Humphries et al., 2007; Yao et al., 2014). Insgesamt ist damit das komplette Integrin-Aktinvernetzungs-Modul in einer aktiven Form gesperrt und kann so bei Umlagerung des CMAs auf FN aktiv bleiben (Abb. 4.1 B (iii)), obwohl die Affinität eines  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrins ohne zytoplasmatische Adaptoren dies nicht erlauben würde (Abb. 3.25).

Entsprechend dieser verstärkenden, mechanischen Rolle von Vinculin für bereits etablierte CMAs, sind Zellen ohne Vinculin sowohl in der Lage CMAs, als auch Aktin-Stressfasern zu bilden (Saunders et al., 2006). Die große Bedeutung für eine mechanische Stabilisierung durch Vinculin zeigt sich aber, da die Rekrutierung von Vinculin mit der auf das Substrat ausgeübten Kraft korreliert (Balaban et al., 2001), Vinculin für die Stabilisierung von CMAs unter Zugspannung benötigt wird (Grashoff et al., 2010) und die Adhäsionsstärke von Vinculin-Knockout-Zellen auf dem Level von Blebbistatin-behandelten wt-Zellen liegt (Dumbauld et al., 2013). Darüber hinaus legt die große Anzahl an Bindungspartnern von Vinculin, die selbst entweder an Aktin binden oder Aktin regulieren, eine besondere Rolle von Vinculin in der CMA-Aktin-Interaktion nahe (Carisey and Ballestrem, 2011).

Beide Module arbeiten in diesem Modell ohne eine direkte Interaktion. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist dies für die jeweilige Funktion der Module in diesem Modell auch nicht erforderlich. Allerdings schließt dies eine gegenseitige Beeinflussung, insbesondere bei anderen Aufgaben als Spreading und Aktinvernetzung, nicht aus. So hat FAK einen negativen Einfluss auf die Rekrutierung von Vinculin in CMAs (Dumbauld et al., 2010), während umgekehrt Vinculin-Knockout Zellen eine erhöhte Paxillin-Phosphorylierung durch FAK aufweisen (Subauste et al., 2004). Inwiefern diese Effekte durch direkte oder indirekte Interaktionen zustande kommen, ist aber nicht geklärt. Die obigen Beispiele für die Bedeutung von Talin-Vinculin-Aktin-Interaktionen im Rahmen des Aktinvernetzungs-Modul einerseits, und die Beteiligung von Paxillin und FAK an einer Vielzahl von Signalkaskaden (Mitra et al., 2005) andererseits, legen aber nahe, dass diese modulare Sichtweise mit jeweils spezifischen Aufgaben gerechtfertigt ist.

Aus weiteren Experimenten in dieser Arbeit wären weitere Module denkbar (Abb. 4.1 C). Ausgehend von einer Analogie zur  $\beta 3$ -Integrin-Y<sup>747</sup>/S<sup>752</sup> Interaktion mit LIM-Domänen von Paxillin wird eine Bedeutung von  $\beta 3$ -Integrin-Y759/T762 für die Rekrutierung anderer LIM-Domänproteine vorgeschlagen (Abb. 4.1 C (i)). Ein Kandidat wäre Migfilin, das ähnlich wie Paxillin zwei LIM-Domänen zur Bindung benötigt (Brahme et al., 2013). Migfilin beendet einerseits durch Bindung an Filamin dessen Inhibierung von Integrinen (Das et al., 2011), und kann andererseits durch Bindung an VASP Einfluss auf Aktin nehmen (Zhang et al., 2006). Ein weiteres mögliches Modul beruht auf Interaktion des IPP-Komplexes mit Paxillin und Kindlin. Da für ILK eine Bindung an die F2-PH-Domäne von Kindlin (Huet-Calderwood et al., 2014), und für Parvin eine an ein LD-Motiv von Paxillin (Stiegler et al., 2012) gezeigt ist, wird im Modul die experimentell gefundene synergistische Rekrutierung des IPP-Komplexes durch Paxillin und Kindlin in dieser Art dargestellt. Der IPP-Komplex, und entsprechend dieses Modul, kann durch ILK an Fibrillogenese, durch PINCH an der Phosphorylierung von Akt und durch Parvin an der Regulation von Aktin beteiligt sein (Wickström et al., 2010b).



Die Vielzahl an Proteinen im Adhäsom, 150 nach neuesten proteomischen Analysen, ihre Interaktionen und zusätzliche, wechselseitige Phosphorylierungen machen das Verständnis von CMAs zu einer Tortur für jeden, der die Funktionsweise dieser zellulären Maschinerie verstehen will. Vor allem ist es aber auch nicht sehr plausibel, dass alle möglichen Interaktionen und Phosphorylierungen zur gleichen Zeit und unter gleichen Umständen eintreten. Genauso wenig wahrscheinlich ist eine gleichwertige zelluläre Bedeutung all dieser Interaktionen. Eine modulare Bauweise, wie sie im hier vorgestellten Modell vorgeschlagen wird, könnte auf dieses Probleme eine Antwort liefern. Sie bringt automatisch ein Bewertungskriterium für die Wahrscheinlichkeit, dass eine theoretisch mögliche Interaktion in der Zelle umgesetzt wird, mit sich. Interaktionen, die der Aufgabe des Moduls dienen sind eher wahrscheinlich, als solche, die der Aufgabe des Moduls entgegenstehen. Allerdings muss man beachten, dass die hier vorgestellten Experimente für spezielle zelluläre Situationen aufgestellt wurden und ihre Gültigkeit auch auf diese Situationen limitiert sein kann. Die zugrundeliegenden Experimente beziehen sich im Wesentlichen auf *focal adhesions*. Für CMAs in anderen Reifungsstadien, insbesondere *fibrillar adhesions*, können ganz andere Module von Bedeutung sein. Der Abbau von CMAs wird ebenfalls über gänzlich andere Module bewerkstelligt werden. In jedem Fall würde eine modulare Bauweise aber zu einem besseren Verständnis von CMAs beitragen. Sie gliedert die Vielzahl von Interaktionen in kleinere Einheiten, deren einzelnes Verständnis leichter fällt und schließlich das Verstehen der Funktionsweise des gesamten CMAs ermöglicht. Und schließlich macht es auch im Vergleich mit anderen biologischen Systemen Sinn, dass sich spezialisierte Module bilden, die an eine konkrete Funktion angepasst sind. So wie ein Organismus aus Organen mit spezialisierten Aufgaben, so wie ein Organ aus spezialisierten Geweben und Teilbereichen, so wie eine Zelle aus spezialisierten Organellen, so könnte ein CMA aus spezialisierten Modulen bestehen.

---

**Abb. 4.1: Modell der CMA Entstehung und Reifung mittels spezialisierter Module für  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin** (gegenüberliegende Seite). **(A)** Im Integrin-Aktivierungs/Signaling-Modul startet die Integrinaktivierung mit **(i)** inaktivem  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin, das sich in einer inaktiven Konformation befindet. In der Zellperipherie liegen **(ii)** voraktivierte Integrine vor, die bereits Kindlin (K) gebunden haben. **(iii)** Kindlin bringt den  $\beta\text{3}$ -Integrin-C-terminus in eine geeignete Konformation für die Bindung von Talin (T). **(iv)** Die vollständige Aktivierung erfolgt durch die Beendigung der inhibitorischen  $\alpha\text{V-R}^{995}/\beta\text{3-D}^{723}$  Interaktion durch Talin und erfolgt mit anschließendem Clustering nur auf Vitronektin (VN, rosa Liganden), nicht auf Fibronektin (FN, blaue Liganden). Die Bindung von Talin an die  $\beta\text{3}$ -Untereinheit führt zur Exposition von  $\beta\text{3-Integrin-Y}^{747}$ . Gleichzeitig wird unter Mitwirkung von Kindlin  $\beta\text{3-Integrin-S}^{752}$  freigelegt. Dies ermöglicht die Bindung von Paxillin an das  $\beta\text{3-Integrin-Talin-Kindlin}$ -Motiv mittels der Paxillin-LIM-Domänen. FAK bindet an die LD-Domänen von Paxillin und führt zur Phosphorylierung von Paxillin-Y<sup>31</sup> und Paxillin-Y<sup>118</sup>. Dies führt zur Rekrutierung von GEFs und GAPs und zu nachfolgendem Signaling durch Rho-GTPasen. **(B)** Im Aktinvernetzungsmodul **(i)** bindet das *tail* von Integrin-gebundenem Talin an Aktin. **(ii)** Aktives Vinculin kann anschließend mit der Vinculin *head* Domäne (VH) an das Talin *tail* binden, während die Vinculin *tail* Domäne (VT) an Aktin bindet. **(iii)** Gegenseitige Verstärkung der Talin-Vinculin-Aktin-Interaktion und verstärkte Integrinaktivierung durch retrograden Aktinfluss halten den  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin-CMA-Komplex in einer aktiven Konformation und erlauben so das Gleiten auf FN. **(C (i))** In einem weiteren hypothetischen Migfilin-Modul führt die Kindlin-Bindung an  $\beta\text{3-Integrin}$  zur Exposition von Y<sup>759</sup> und T<sup>762</sup>, was die folgende Migfilinbindung ermöglicht. Migfilin ist wie Paxillin ein LIM-Domänen-Protein und benötigt ebenfalls zwei LIM-Domänen, um zu binden. Durch die Interaktion mit VASP hat Migfilin Einfluss auf die Aktinregulation, während die Bindung an Filamin die Integrinaktivierung beeinflusst. **(C (ii))** Ein weiteres Modul stellt die Rekrutierung des ILK-PINCH-Parvin-Komplexes (IPP-Komplex) dar. Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine kombinatorische Rekrutierung durch Kindlin und Paxillin. In Verbindung mit weiteren, publizierten Studien ist eine Rekrutierung durch eine ILK-Kindlin-, in Verbindung mit einer Parvin-Paxillin-Bindung möglich. Dieses Modul beeinflusst Fibrillogenese, Signaling und Aktinorganisation.



## Literaturverzeichnis

- Abrams, C., Y.J. Deng, B. Steiner, T. O'Toole, and S.J. Shattil. 1994. Determinants of specificity of a baculovirus-expressed antibody Fab fragment that binds selectively to the activated form of integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem.* 269:18781-18788.
- Akhtar, N., and C.H. Streuli. 2013. An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nat Cell Biol.* 15:17-27.
- Allen, J.R., S.T. Ross, and M.W. Davidson. 2014. Structured illumination microscopy for superresolution. *Chemphyschem.* 15:566-576.
- Anthis, N.J., K.L. Wegener, D.R. Critchley, and I.D. Campbell. 2010. Structural diversity in integrin/talin interactions. *Structure.* 18:1654-1666.
- Arias-Salgado, E.G., S. Lizano, S. Sarkar, J.S. Brugge, M.H. Ginsberg, and S.J. Shattil. 2003. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:13298-13302.
- Arjonen, A., R. Kaukonen, and J. Ivaska. 2011. Filopodia and adhesion in cancer cell motility. *Cell Adh Migr.* 5:421-430.
- Arold, S.T. 2011. How focal adhesion kinase achieves regulation by linking ligand binding, localization and action. *Curr Opin Struct Biol.* 21:808-813.
- Autenrieth, T. 2012. Zellpolarisierung und Haptotaxis auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten. In Fakultät für Chemie und Biowissenschaften. Vol. Dr. rer. nat. Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe. 161.
- Aznavoorian, S., M.L. Stracke, J. Parsons, J. McClanahan, and L.A. Liotta. 1996. Integrin alphavbeta3 mediates chemotactic and haptotactic motility in human melanoma cells through different signaling pathways. *J Biol Chem.* 271:3247-3254.
- Bachir, A.I., J. Zareno, K. Moissoglu, E.F. Plow, E. Gratton, and A.R. Horwitz. 2014. Integrin-associated complexes form hierarchically with variable stoichiometry in nascent adhesions. *Curr Biol.* 24:1845-1853.
- Balaban, N.Q., U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, and B. Geiger. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat Cell Biol.* 3:466-472.
- Barsukov, I.L., A. Prescott, N. Bate, B. Patel, D.N. Floyd, N. Bhanji, C.R. Bagshaw, K. Letinic, G. Di Paolo, P. De Camilli, G.C. Roberts, and D.R. Critchley. 2003. Phosphatidylinositol phosphate kinase type 1gamma and beta1-integrin cytoplasmic domain bind to the same region in the talin FERM domain. *J Biol Chem.* 278:31202-31209.
- Bays, J.L., X. Peng, C.E. Tolbert, C. Guilluy, A.E. Angell, Y. Pan, R. Superfine, K. Burrige, and K.A. DeMali. 2014. Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell-cell and cell-matrix adhesions. *J Cell Biol.* 205:251-263.
- Beauvais, D.M., B.J. Burbach, and A.C. Rapraeger. 2004. The syndecan-1 ectodomain regulates alphavbeta3 integrin activity in human mammary carcinoma cells. *J Cell Biol.* 167:171-181.
- Belkin, A.M., N.I. Zhidkova, F. Balzac, F. Altruda, D. Tomatis, A. Maier, G. Tarone, V.E. Kotliansky, and K. Burrige. 1996. Beta 1D integrin displaces the beta 1A isoform in striated muscles: localization at junctional structures and signaling potential in nonmuscle cells. *J Cell Biol.* 132:211-226.
- Best, G., R. Amberger, D. Baddeley, T. Ach, S. Dithmar, R. Heintzmann, and C. Cremer. 2011. Structured illumination microscopy of autofluorescent aggregations in human tissue. *Micron.* 42:330-335.
- Betzig, E., G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H.F. Hess. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science.* 313:1642-1645.
- Bischofs, I.B., F. Klein, D. Lehnert, M. Bastmeyer, and U.S. Schwarz. 2008. Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape. *Biophys J.* 95:3488-3496.

- Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, and J. Plastino. 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev.* 94:235-263.
- Bledzka, K., J. Liu, Z. Xu, H.D. Perera, S.P. Yadav, K. Bialkowska, J. Qin, Y.Q. Ma, and E.F. Plow. 2012. Spatial coordination of kindlin-2 with talin head domain in interaction with integrin  $\beta$  cytoplasmic tails. *J Biol Chem.* 287:24585-24594.
- Blystone, S.D., F.P. Lindberg, S.E. LaFlamme, and E.J. Brown. 1995. Integrin beta 3 cytoplasmic tail is necessary and sufficient for regulation of alpha 5 beta 1 phagocytosis by alpha v beta 3 and integrin-associated protein. *J Cell Biol.* 130:745-754.
- Blystone, S.D., S.E. Slater, M.P. Williams, M.T. Crow, and E.J. Brown. 1999. A molecular mechanism of integrin crosstalk: alphavbeta3 suppression of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulates alpha5beta1 function. *J Cell Biol.* 145:889-897.
- Bornschlöggl, T. 2013. How filopodia pull: what we know about the mechanics and dynamics of filopodia. *Cytoskeleton (Hoboken).* 70:590-603.
- Bouaouina, M., Y. Lad, and D.A. Calderwood. 2008. The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins. *J Biol Chem.* 283:6118-6125.
- Brahme, N.N., D.S. Harburger, K. Kemp-O'Brien, R. Stewart, S. Raghavan, M. Parsons, and D.A. Calderwood. 2013. Kindlin binds migfilin tandem LIM domains and regulates migfilin focal adhesion localization and recruitment dynamics. *J Biol Chem.* 288:35604-35616.
- Brown, M.C., J.A. Perrotta, and C.E. Turner. 1996. Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol.* 135:1109-1123.
- Brown, M.C., J.A. Perrotta, and C.E. Turner. 1998. Serine and threonine phosphorylation of the paxillin LIM domains regulates paxillin focal adhesion localization and cell adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell.* 9:1803-1816.
- Burnette, D.T., S. Manley, P. Sengupta, R. Sougrat, M.W. Davidson, B. Kachar, and J. Lippincott-Schwartz. 2011a. A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat Cell Biol.* 13:371-381.
- Burnette, D.T., P. Sengupta, Y. Dai, J. Lippincott-Schwartz, and B. Kachar. 2011b. Bleaching/blinking assisted localization microscopy for superresolution imaging using standard fluorescent molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:21081-21086.
- Burnette, D.T., L. Shao, C. Ott, A.M. Pasapera, R.S. Fischer, M.A. Baird, C. Der Loughian, H. Delanoë-Ayari, M.J. Paszek, M.W. Davidson, E. Betzig, and J. Lippincott-Schwartz. 2014. A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells. *J Cell Biol.* 205:83-96.
- Böttcher, R.T., A. Lange, and R. Fässler. 2009. How ILK and kindlins cooperate to orchestrate integrin signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 21:670-675.
- Calderwood, D.A., I.D. Campbell, and D.R. Critchley. 2013. Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14:503-517.
- Calderwood, D.A., B. Yan, J.M. de Pereda, B.G. Alvarez, Y. Fujioka, R.C. Liddington, and M.H. Ginsberg. 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *J Biol Chem.* 277:21749-21758.
- Carisey, A., and C. Ballestrem. 2011. Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur J Cell Biol.* 90:157-163.
- Carisey, A., R. Tsang, A.M. Greiner, N. Nijenhuis, N. Heath, A. Nazgiewicz, R. Kemkemer, B. Derby, J. Spatz, and C. Ballestrem. 2013. Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Curr Biol.* 23:271-281.
- Carter, S.B. 1965. Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. *Nature.* 208:1183-1187.
- Chang, D.D., C. Wong, H. Smith, and J. Liu. 1997. ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol.* 138:1149-1157.

- 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, H., D.M. Cohen, D.M. Choudhury, N. Kioka, and S.W. Craig. 2005. Spatial distribution and functional significance of activated vinculin in living cells. *J Cell Biol*. 169:459-470.
- Chen, J., Y. Xu, X. Lv, X. Lai, and S. Zeng. 2013. Super-resolution differential interference contrast microscopy by structured illumination. *Optics Express*. 21:10.
- Choi, C.K., M. Vicente-Manzanares, J. Zareno, L.A. Whitmore, A. Mogilner, and A.R. Horwitz. 2008. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol*. 10:1039-1050.
- Choi, C.K., J. Zareno, M.A. Digman, E. Gratton, and A.R. Horwitz. 2011. Cross-correlated fluctuation analysis reveals phosphorylation-regulated paxillin-FAK complexes in nascent adhesions. *Biophys J*. 100:583-592.
- Cluzel, C., F. Saltel, J. Lussi, F. Paulhe, B.A. Imhof, and B. Wehrle-Haller. 2005. The mechanisms and dynamics of  $(\alpha)v(\beta)3$  integrin clustering in living cells. *J Cell Biol*. 171:383-392.
- Colombelli, J., A. Besser, H. Kress, E.G. Reynaud, P. Girard, E. Caussinus, U. Haselmann, J.V. Small, U.S. Schwarz, and E.H. Stelzer. 2009. Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *J Cell Sci*. 122:1665-1679.
- Cox, S., E. Rosten, J. Monypenny, T. Jovanovic-Talisman, D.T. Burnette, J. Lippincott-Schwartz, G.E. Jones, and R. Heintzmann. 2012. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. *Nat Methods*. 9:195-200.
- Coyer, S.R., A. Singh, D.W. Dumbauld, D.A. Calderwood, S.W. Craig, E. Delamarche, and A.J. García. 2012. Nanopatterning reveals an ECM area threshold for focal adhesion assembly and force transmission that is regulated by integrin activation and cytoskeleton tension. *J Cell Sci*. 125:5110-5123.
- Cukierman, E., R. Pankov, D.R. Stevens, and K.M. Yamada. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 294:1708-1712.
- Danen, E.H., P. Sonneveld, C. Brakebusch, R. Fassler, and A. Sonnenberg. 2002. The fibronectin-binding integrins  $\alpha5\beta1$  and  $\alpha v\beta3$  differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol*. 159:1071-1086.
- Danen, E.H., J. van Rheenen, W. Franken, S. Huveneers, P. Sonneveld, K. Jalink, and A. Sonnenberg. 2005. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway. *J Cell Biol*. 169:515-526.
- Dao, L., U. Weiland, M. Hauser, I. Nazarenko, H. Kalt, M. Bastmeyer, and C.M. Franz. 2012. Revealing non-genetic adhesive variations in clonal populations by comparative single-cell force spectroscopy. *Exp Cell Res*. 318:2155-2167.
- Das, M., S.S. Ithychanda, J. Qin, and E.F. Plow. 2011. Migfilin and filamin as regulators of integrin activation in endothelial cells and neutrophils. *PLoS One*. 6:e26355.
- Deakin, N.O., and C.E. Turner. 2008. Paxillin comes of age. *J Cell Sci*. 121:2435-2444.
- del Rio, A., R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J.M. Fernandez, and M.P. Sheetz. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*. 323:638-641.
- DeMali, K.A., C.A. Barlow, and K. Burridge. 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *J Cell Biol*. 159:881-891.
- Dempsey, G.T., J.C. Vaughan, K.H. Chen, M. Bates, and X. Zhuang. 2011. Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat Methods*. 8:1027-1036.
- DiMilla, P.A., J.P. Folkers, H.A. Biebuyck, R. Härter, G.P. Lopez, and G.M. Whitesides. 1994. Wetting and Protein Adsorption of Self-Assembled Monolayers of Alkanethiolates Supported on Transparent Films of Gold. *Journal of the American Chemical Society*. 116:2225-2226.
- Dixon, P.M. 2002. Ripley's K function. In *Encyclopedia of Environmetrics*. Vol. 3. A.H. El-Shaarawi and W.W. Piegorisch, editors. John Wiley & Sons. 1796-1803.

- Donnert, G., C. Eggeling, and S.W. Hell. 2007. Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation. *Nat Methods*. 4:81-86.
- Donnert, G., J. Keller, R. Medda, M.A. Andrei, S.O. Rizzoli, R. Lührmann, R. Jahn, C. Eggeling, and S.W. Hell. 2006. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:11440-11445.
- Dumbauld, D.W., T.T. Lee, A. Singh, J. Scrimgeour, C.A. Gersbach, E.A. Zamir, J. Fu, C.S. Chen, J.E. Curtis, S.W. Craig, and A.J. García. 2013. How vinculin regulates force transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:9788-9793.
- Dumbauld, D.W., K.E. Michael, S.K. Hanks, and A.J. García. 2010. Focal adhesion kinase-dependent regulation of adhesive forces involves vinculin recruitment to focal adhesions. *Biol Cell*. 102:203-213.
- Efimov, A., N. Schiefermeier, I. Grigoriev, R. Ohi, M.C. Brown, C.E. Turner, J.V. Small, and I. Kaverina. 2008. Paxillin-dependent stimulation of microtubule catastrophes at focal adhesion sites. *J Cell Sci*. 121:196-204.
- Elad, N., T. Volberg, I. Patla, V. Hirschfeld-Warneken, C. Grashoff, J.P. Spatz, R. Fässler, B. Geiger, and O. Medalia. 2013. The role of integrin-linked kinase in the molecular architecture of focal adhesions. *J Cell Sci*. 126:4099-4107.
- 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.
- Fitzpatrick, P., S.J. Shattil, and A.J. Ablooglu. 2014. C-terminal COOH of integrin  $\beta 1$  is necessary for  $\beta 1$  association with the kindlin-2 adapter protein. *J Biol Chem*. 289:11183-11193.
- Frame, M.C., H. Patel, B. Serrels, D. Lietha, and M.J. Eck. 2010. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:802-814.
- Fukuda, T., K. Chen, X. Shi, and C. Wu. 2003. PINCH-1 is an obligate partner of integrin-linked kinase (ILK) functioning in cell shape modulation, motility, and survival. *J Biol Chem*. 278:51324-51333.
- Fässler, R., M. Pfaff, J. Murphy, A.A. Noegel, S. Johansson, R. Timpl, and R. Albrecht. 1995. Lack of beta 1 integrin gene in embryonic stem cells affects morphology, adhesion, and migration but not integration into the inner cell mass of blastocysts. *J Cell Biol*. 128:979-988.
- Galbraith, C.G., K.M. Yamada, and J.A. Galbraith. 2007. Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science*. 315:992-995.
- 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.
- Gautrot, J.E., B. Trappmann, F. Oceguera-Yanez, J. Connelly, X. He, F.M. Watt, and W.T. Huck. 2010. Exploiting the superior protein resistance of polymer brushes to control single cell adhesion and polarisation at the micron scale. *Biomaterials*. 31:5030-5041.
- Gayda, S., K. Nienhaus, and G.U. Nienhaus. 2012. Mechanistic insights into reversible photoactivation in proteins of the GFP family. *Biophys J*. 103:2521-2531.
- Gebhardt, C., M. Bastmeyer, and F. Weth. 2012. Balancing of ephrin/Eph forward and reverse signaling as the driving force of adaptive topographic mapping. *Development*. 139:335-345.
- 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.
- Gimond, C., A. van Der Flier, S. van Delft, C. Brakebusch, I. Kuikman, J.G. Collard, R. Fässler, and A. Sonnenberg. 1999. Induction of cell scattering by expression of beta1 integrins in beta1-deficient epithelial cells requires activation of members of the rho family of GTPases and downregulation of cadherin and catenin function. *J Cell Biol*. 147:1325-1340.
- Gingras, A.R., N. Bate, B.T. Goult, L. Hazelwood, I. Canestrelli, J.G. Grossmann, H. Liu, N.S. Putz, G.C. Roberts, N. Volkman, D. Hanein, I.L. Barsukov, and D.R. Critchley. 2008. The structure of the C-terminal actin-binding domain of talin. *EMBO J*. 27:458-469.
- Goult, B.T., T. Zacharchenko, N. Bate, R. Tsang, F. Hey, A.R. Gingras, P.R. Elliott, G.C. Roberts, C. Ballestrem, D.R. Critchley, and I.L. Barsukov. 2013. RIAM and vinculin binding to talin are

- mutually exclusive and regulate adhesion assembly and turnover. *J Biol Chem.* 288:8238-8249.
- Grashoff, C., B.D. Hoffman, M.D. Brenner, R. Zhou, M. Parsons, M.T. Yang, M.A. McLean, S.G. Sligar, C.S. Chen, T. Ha, and M.A. Schwartz. 2010. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature.* 466:263-266.
- Gustafsson, M.G. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc.* 198:82-87.
- Gustafsson, M.G., L. Shao, P.M. Carlton, C.J. Wang, I.N. Golubovskaya, W.Z. Cande, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 2008. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophys J.* 94:4957-4970.
- Habuchi, S. 2014. Super-resolution molecular and functional imaging of nanoscale architectures in life and materials science. *Front Bioeng Biotechnol.* 2:20.
- Hannigan, G.E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M.G. Coppelino, G. Radeva, J. Filmus, J.C. Bell, and S. Dedhar. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature.* 379:91-96.
- Hedde, P.N., R.M. Dörlich, R. Blomley, D. Gradl, E. Oppong, A.C. Cato, and G.U. Nienhaus. 2013. Stimulated emission depletion-based raster image correlation spectroscopy reveals biomolecular dynamics in live cells. *Nat Commun.* 4:2093.
- Hedde, P.N., J. Fuchs, F. Oswald, J. Wiedenmann, and G.U. Nienhaus. 2009. Online image analysis software for photoactivation localization microscopy. *Nat Methods.* 6:689-690.
- Hedde, P.N., and G.U. Nienhaus. 2010. Optical imaging of nanoscale cellular structures. *Biophysical Review.* 2.
- Hedde, P.N., and G.U. Nienhaus. 2014. Super-resolution localization microscopy with photoactivatable fluorescent marker proteins. *Protoplasma.* 251:349-362.
- Heilemann, M., S. van de Linde, A. Mukherjee, and M. Sauer. 2009. Super-resolution imaging with small organic fluorophores. *Angew Chem Int Ed Engl.* 48:6903-6908.
- Heilemann, M., S. van de Linde, M. Schüttpeitz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, and M. Sauer. 2008. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Ed Engl.* 47:6172-6176.
- Heintzmann, R., and C. Cremer. 1999. Lateral modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. In *Optical Biopsies and Microscopic Techniques III*. Vol. 3568. I.J. Bigio, H. Schneckenburger, J. Slavik, K. Svanberg, and P.M. Viallet, editors. Proc. SPIE, Stockholm, Sweden. 185-196.
- Hell, S.W., and J. Wichmann. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett.* 19:780-782.
- Hess, S.T., T.P. Girirajan, and M.D. Mason. 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J.* 91:4258-4272.
- Hoffmann, J.E., Y. Fermin, R.L. Stricker, K. Ickstadt, and E. Zamir. 2014. Symmetric exchange of multi-protein building blocks between stationary focal adhesions and the cytosol. *Elife.* 3:e02257.
- Honigsmann, A., V. Mueller, H. Ta, A. Schoenle, E. Sezgin, S.W. Hell, and C. Eggeling. 2014. Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nat Commun.* 5:5412.
- Huang, B., W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang. 2008. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science.* 319:810-813.
- Huet-Calderwood, C., N.N. Brahme, N. Kumar, A.L. Stiegler, S. Raghavan, T.J. Boggon, and D.A. Calderwood. 2014. Differences in binding to the ILK complex determines kindlin isoform adhesion localization and integrin activation. *J Cell Sci.* 127:4308-4321.
- Huisken, J., and D.Y. Stainier. 2009. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development.* 136:1963-1975.
- Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci.* 119:3901-3903.

- Humphries, J.D., P. Wang, C. Streuli, B. Geiger, M.J. Humphries, and C. Ballestrem. 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol.* 179:1043-1057.
- Huveneers, S., and E.H. Danen. 2009. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *J Cell Sci.* 122:1059-1069.
- Huveneers, S., H. Truong, R. Fässler, A. Sonnenberg, and E.H. Danen. 2008. Binding of soluble fibronectin to integrin alpha5 beta1 - link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *J Cell Sci.* 121:2452-2462.
- Hynes, R.O. 1996. Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? *Dev Biol.* 180:402-412.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110:673-687.
- Hynes, R.O. 2012. The evolution of metazoan extracellular matrix. *J Cell Biol.* 196:671-679.
- Ivaska, J., and J. Heino. 2011. Cooperation between integrins and growth factor receptors in signaling and endocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 27:291-320.
- Iwadate, Y., and S. Yumura. 2008. Molecular dynamics and forces of a motile cell simultaneously visualized by TIRF and force microscopies. *Biotechniques.* 44:739-750.
- Jacinto, A., W. Wood, T. Balayo, M. Turmaine, A. Martinez-Arias, and P. Martin. 2000. Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during *Drosophila* dorsal closure. *Curr Biol.* 10:1420-1426.
- Jang, Y.C., R. Tsou, N.S. Gibran, and F.F. Isik. 2000. Vitronectin deficiency is associated with increased wound fibrinolysis and decreased microvascular angiogenesis in mice. *Surgery.* 127:696-704.
- Janssen, M.E., E. Kim, H. Liu, L.M. Fujimoto, A. Bobkov, N. Volkmann, and D. Hanein. 2006. Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Mol Cell.* 21:271-281.
- Johnson, H.W., and M.J. Schell. 2009. Neuronal IP3 3-kinase is an F-actin-bundling protein: role in dendritic targeting and regulation of spine morphology. *Mol Biol Cell.* 20:5166-5180.
- Jones, S.A., S.H. Shim, J. He, and X. Zhuang. 2011. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nat Methods.* 8:499-508.
- Kadmas, J.L., and M.C. Beckerle. 2004. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:920-931.
- Kanchanawong, P., G. Shtengel, A.M. Pasapera, E.B. Ramko, M.W. Davidson, H.F. Hess, and C.M. Waterman. 2010. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature.* 468:580-584.
- Keppler, A., S. Gendreizig, T. Gronemeyer, H. Pick, H. Vogel, and K. Johnsson. 2003. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol.* 21:86-89.
- Kerber, M.L., and R.E. Cheney. 2011. Myosin-X: a MyTH-FERM myosin at the tips of filopodia. *J Cell Sci.* 124:3733-3741.
- Kinsey, R., M.R. Williamson, S. Chaudhry, K.T. Melody, A. McGovern, S. Takahashi, C.A. Shuttleworth, and C.M. Kielty. 2008. Fibrillin-1 microfibril deposition is dependent on fibronectin assembly. *J Cell Sci.* 121:2696-2704.
- Kiosses, W.B., S.J. Shattil, N. Pampori, and M.A. Schwartz. 2001. Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat Cell Biol.* 3:316-320.
- Kiskowski, M.A., J.F. Hancock, and A.K. Kenworthy. 2009. On the use of Ripley's K-function and its derivatives to analyze domain size. *Biophys J.* 97:1095-1103.
- Kner, P., B.B. Chhun, E.R. Griffis, L. Winoto, and M.G. Gustafsson. 2009. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nat Methods.* 6:339-342.
- Kopp, P.M., N. Bate, T.M. Hansen, N.P. Brindle, U. Praekelt, E. Debrand, S. Coleman, D. Mazzeo, B.T. Goult, A.R. Gingras, C.A. Pritchard, D.R. Critchley, and S.J. Monkley. 2010. Studies on the morphology and spreading of human endothelial cells define key inter- and intramolecular interactions for talin1. *Eur J Cell Biol.* 89:661-673.
- Kovalevich, J., B. Tracy, and D. Langford. 2011. PINCH: More than just an adaptor protein in cellular response. *J Cell Physiol.* 226:940-947.

- Kutys, M.L., and K.M. Yamada. 2014. An extracellular-matrix-specific GEF-GAP interaction regulates Rho GTPase crosstalk for 3D collagen migration. *Nat Cell Biol.* 16:909-917.
- Lawo, S., M. Hasegan, G.D. Gupta, and L. Pelletier. 2012. Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat Cell Biol.* 14:1148-1158.
- Lawson, C., S.T. Lim, S. Uryu, X.L. Chen, D.A. Calderwood, and D.D. Schlaepfer. 2012. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J Cell Biol.* 196:223-232.
- Leavesley, D.I., A.S. Kashyap, T. Croll, M. Sivaramakrishnan, A. Shokohmand, B.G. Hollier, and Z. Upton. 2013. Vitronectin--master controller or micromanager? *IUBMB Life.* 65:807-818.
- Lee, H.S., P. Anekal, C.J. Lim, C.C. Liu, and M.H. Ginsberg. 2013. Two modes of integrin activation form a binary molecular switch in adhesion maturation. *Mol Biol Cell.* 24:1354-1362.
- Legate, K.R., and R. Fässler. 2009. Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails. *J Cell Sci.* 122:187-198.
- 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. Giros, M. Costell, and R. Fassler. 2008. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol.* 20:502-507.
- Leube, R.E., M. Moch, and R. Windoffer. 2014. Intermediate filaments and the regulation of focal adhesion. *Curr Opin Cell Biol.* 32C:13-20.
- Lidke, D.S., K.A. Lidke, B. Rieger, T.M. Jovin, and D.J. Arndt-Jovin. 2005a. Reaching out for signals: filopodia sense EGF and respond by directed retrograde transport of activated receptors. *J Cell Biol.* 170:619-626.
- Lidke, K., B. Rieger, T. Jovin, and R. Heintzmann. 2005b. Superresolution by localization of quantum dots using blinking statistics. *Opt Express.* 13:7052-7062.
- Ling, K., R.L. Doughman, A.J. Firestone, M.W. Bunce, and R.A. Anderson. 2002. Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature.* 420:89-93.
- Liu, J., K. Fukuda, Z. Xu, Y.Q. Ma, J. Hirbawi, X. Mao, C. Wu, E.F. Plow, and J. Qin. 2011. Structural basis of phosphoinositide binding to kindlin-2 protein pleckstrin homology domain in regulating integrin activation. *J Biol Chem.* 286:43334-43342.
- Logan, J., J.C. Nicolas, W.C. Topp, M. Girard, T. Shenk, and A.J. Levine. 1981. Transformation by adenovirus early region 2A temperature-sensitive mutants and their revertants. *Virology.* 115:419-422.
- Lukyanov, K.A., D.M. Chudakov, S. Lukyanov, and V.V. Verkhusha. 2005. Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:885-891.
- Manley, S., J.M. Gillette, G.H. Patterson, H. Shroff, H.F. Hess, E. Betzig, and J. Lippincott-Schwartz. 2008. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods.* 5:155-157.
- Mattila, P.K., and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:446-454.
- McDonald, D.M., and P. Baluk. 2002. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res.* 62:5381-5385.
- Medalia, O., M. Beck, M. Ecke, I. Weber, R. Neujahr, W. Baumeister, and G. Gerisch. 2007. Organization of actin networks in intact filopodia. *Curr Biol.* 17:79-84.
- Meinhardt, H. 2012. Turing's theory of morphogenesis of 1952 and the subsequent discovery of the crucial role of local self-enhancement and long-range inhibition. *Interface Focus.* 2:407-416.
- Meller, J., I.B. Rogozin, E. Poliakov, N. Meller, M. Bedanov-Pack, E.F. Plow, J. Qin, E.A. Podrez, and T.V. Byzova. 2014. Emergence and subsequent functional specialization of Kindlins during evolution of cell adhesiveness. *Mol Biol Cell.*
- Mitra, S.K., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6:56-68.

- Moik, D., A. Böttcher, T. Makhina, C. Grashoff, N. Bulus, R. Zent, and R. Fässler. 2013. Mutations in the paxillin-binding site of integrin-linked kinase (ILK) destabilize the pseudokinase domain and cause embryonic lethality in mice. *J Biol Chem.* 288:18863-18871.
- Morgan, M.R., A. Byron, M.J. Humphries, and M.D. Bass. 2009. Giving off mixed signals--distinct functions of alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins in regulating cell behaviour. *IUBMB Life.* 61:731-738.
- Moser, M., B. Nieswandt, S. Ussar, M. Pozgajova, and R. Fässler. 2008. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med.* 14:325-330.
- Mrksich, M., and G.M. Whitesides. 1996. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 25:55-78.
- Nägerl, U.V., K.I. Willig, B. Hein, S.W. Hell, and T. Bonhoeffer. 2008. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:18982-18987.
- Oakes, P.W., S. Banerjee, M.C. Marchetti, and M.L. Gardel. 2014. Geometry regulates traction stresses in adherent cells. *Biophys J.* 107:825-833.
- Oakes, P.W., Y. Beckham, J. Stricker, and M.L. Gardel. 2012. Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J Cell Biol.* 196:363-374.
- Pankov, R., and K.M. Yamada. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 115:3861-3863.
- Partridge, M.A., and E.E. Marcantonio. 2006. Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Mol Biol Cell.* 17:4237-4248.
- Pasapera, A.M., I.C. Schneider, E. Rericha, D.D. Schlaepfer, and C.M. Waterman. 2010. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J Cell Biol.* 188:877-890.
- Paszek, M.J., D. Boettiger, V.M. Weaver, and D.A. Hammer. 2009. Integrin clustering is driven by mechanical resistance from the glycocalyx and the substrate. *PLoS Comput Biol.* 5:e1000604.
- Paszek, M.J., C.C. DuFort, O. Rossier, R. Bainer, J.K. Mouw, K. Godula, J.E. Hudak, J.N. Lakins, A.C. Wijekoon, L. Cassereau, M.G. Rubashkin, M.J. Magbanua, K.S. Thorn, M.W. Davidson, H.S. Rugo, J.W. Park, D.A. Hammer, G. Giannone, C.R. Bertozzi, and V.M. Weaver. 2014. The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature.* 511:319-325.
- Patterson, G.H. 2009. Fluorescence microscopy below the diffraction limit. *Semin Cell Dev Biol.* 20:886-893.
- Patterson, G.H., and J. Lippincott-Schwartz. 2002. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science.* 297:1873-1877.
- Pertz, O. 2010. Spatio-temporal Rho GTPase signaling - where are we now? *J Cell Sci.* 123:1841-1850.
- Pinon, P., J. Pärssinen, P. Vazquez, M. Bachmann, R. Rahikainen, M.C. Jacquier, L. Azizi, J.A. Määttä, M. Bastmeyer, V.P. Hytönen, and B. Wehrle-Haller. 2014. Talin-bound NPLY motif recruits integrin-signaling adapters to regulate cell spreading and mechanosensing. *J Cell Biol.* 205:265-281.
- Plotnikov, S.V., A.M. Pasapera, B. Sabass, and C.M. Waterman. 2012. Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell.* 151:1513-1527.
- Preissner, K.T., and U. Reuning. 2011. Vitronectin in vascular context: facets of a multitasking matricellular protein. *Semin Thromb Hemost.* 37:408-424.
- Prime, K.L., and G.M. Whitesides. 1991. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science.* 252:1164-1167.
- Pytela, R., M.D. Pierschbacher, and E. Ruoslahti. 1985. A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginine-glycine-aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:5766-5770.
- Rego, E.H., L. Shao, J.J. Macklin, L. Winoto, G.A. Johansson, N. Kamps-Hughes, M.W. Davidson, and M.G. Gustafsson. 2012. Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:E135-143.

- Riedl, J., A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, and R. Wedlich-Soldner. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods*. 5:605-607.
- Rinnerthaler, G., B. Geiger, and J.V. Small. 1988. Contact formation during fibroblast locomotion: involvement of membrane ruffles and microtubules. *J Cell Biol*. 106:747-760.
- Rittweger, E., K.Y. Han, S.E. Irvine, C. Eggeling, and S.W. Hell. 2009. STED microscopy reveals crystal colour centres with nanometric resolution. *Nature Photonics*. 3:4.
- Roca-Cusachs, P., A. del Rio, E. Puklin-Faucher, N.C. Gauthier, N. Biais, and M.P. Sheetz. 2013. Integrin-dependent force transmission to the extracellular matrix by  $\alpha$ -actinin triggers adhesion maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:E1361-1370.
- Roca-Cusachs, P., N.C. Gauthier, A. Del Rio, and M.P. Sheetz. 2009. Clustering of  $\alpha(5)\beta(1)$  integrins determines adhesion strength whereas  $\alpha(v)\beta(3)$  and talin enable mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:16245-16250.
- Rooney, N., and C.H. Streuli. 2011. How integrins control mammary epithelial differentiation: a possible role for the ILK-PINCH-Parvin complex. *FEBS Lett*. 585:1663-1672.
- Rossier, O., V. Oceau, J.B. Sibarita, C. Leduc, B. Tessier, D. Nair, V. Gatterdam, O. Destaing, C. Albigès-Rizo, R. Tampé, L. Cagnet, D. Choquet, B. Lounis, and G. Giannone. 2012. Integrins  $\beta(1)$  and  $\beta(3)$  exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat Cell Biol*. 14:1057-1067.
- Rust, M.J., M. Bates, and X. Zhuang. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*. 3:793-795.
- Saltel, F., E. Mortier, V.P. Hytönen, M.C. Jacquier, P. Zimmermann, V. Vogel, W. Liu, and B. Wehrle-Haller. 2009. New PI(4,5)P<sub>2</sub>- and membrane proximal integrin-binding motifs in the talin head control  $\beta(3)$ -integrin clustering. *J Cell Biol*. 187:715-731.
- Sauer, M. 2013. Localization microscopy coming of age: from concepts to biological impact. *J Cell Sci*. 126:3505-3513.
- Saunders, R.M., M.R. Holt, L. Jennings, D.H. Sutton, I.L. Barsukov, A. Bobkov, R.C. Liddington, E.A. Adamson, G.A. Dunn, and D.R. Critchley. 2006. Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover. *Eur J Cell Biol*. 85:487-500.
- Schermelleh, L., R. Heintzmann, and H. Leonhardt. 2010. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J Cell Biol*. 190:165-175.
- Schiller, H.B., and R. Fässler. 2013. Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions. *EMBO Rep*. 14:509-519.
- Schiller, H.B., M.R. Hermann, J. Polleux, T. Vignaud, S. Zanivan, C.C. Friedel, Z. Sun, A. Raducanu, K.E. Gottschalk, M. Théry, M. Mann, and R. Fässler. 2013.  $\beta(1)$ - and  $\alpha(v)$ -class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat Cell Biol*. 15:625-636.
- Schlaepfer, D.D., and S.K. Mitra. 2004. Multiple connections link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin Genet Dev*. 14:92-101.
- Schwartz, I., D. Seger, and S. Shaltiel. 1999. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol*. 31:539-544.
- Schwartz, M.A., and D.W. DeSimone. 2008. Cell adhesion receptors in mechanotransduction. *Curr Opin Cell Biol*. 20:551-556.
- Sero, J.E., C.K. Thodeti, A. Mammoto, C. Bakal, S. Thomas, and D.E. Ingber. 2011. Paxillin mediates sensing of physical cues and regulates directional cell motility by controlling lamellipodia positioning. *PLoS One*. 6:e28303.
- Shao, L., P. Kner, E.H. Rego, and M.G. Gustafsson. 2011. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination. *Nat Methods*.
- Shattil, S.J., C. Kim, and M.H. Ginsberg. 2010. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:288-300.
- Shemesh, T., A.D. Bershadsky, and M.M. Kozlov. 2012. Physical model for self-organization of actin cytoskeleton and adhesion complexes at the cell front. *Biophys J*. 102:1746-1756.

- Shroff, H., C.G. Galbraith, J.A. Galbraith, and E. Betzig. 2008. Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Methods*. 5:417-423.
- Shroff, H., C.G. Galbraith, J.A. Galbraith, H. White, J. Gillette, S. Olenych, M.W. Davidson, and E. Betzig. 2007. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:20308-20313.
- Shtengel, G., J.A. Galbraith, C.G. Galbraith, J. Lippincott-Schwartz, J.M. Gillette, S. Manley, R. Sougrat, C.M. Waterman, P. Kanchanawong, M.W. Davidson, R.D. Fetter, and H.F. Hess. 2009. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:3125-3130.
- Simon, K.O., E.M. Nutt, D.G. Abraham, G.A. Rodan, and L.T. Duong. 1997. The alphavbeta3 integrin regulates alpha5beta1-mediated cell migration toward fibronectin. *J Biol Chem*. 272:29380-29389.
- Singh, P., C. Carraher, and J.E. Schwarzbauer. 2010. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 26:397-419.
- Sišková, Z., D. Justus, H. Kaneko, D. Friedrichs, N. Henneberg, T. Beutel, J. Pitsch, S. Schoch, A. Becker, H. von der Kammer, and S. Remy. 2014. Dendritic structural degeneration is functionally linked to cellular hyperexcitability in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*. 84:1023-1033.
- Smith, H.W., and C.J. Marshall. 2010. Regulation of cell signalling by uPAR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:23-36.
- Smith, M.A., E. Blankman, N.O. Deakin, L.M. Hoffman, C.C. Jensen, C.E. Turner, and M.C. Beckerle. 2013. LIM domains target actin regulators paxillin and zyxin to sites of stress fiber strain. *PLoS One*. 8:e69378.
- Smith, M.A., E. Blankman, M.L. Gardel, L. Luettjohann, C.M. Waterman, and M.C. Beckerle. 2010. A zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair. *Dev Cell*. 19:365-376.
- Stanchi, F., C. Grashoff, C.F. Nguemni Yonga, D. Grall, R. Fässler, and E. Van Obberghen-Schilling. 2009. Molecular dissection of the ILK-PINCH-parvin triad reveals a fundamental role for the ILK kinase domain in the late stages of focal-adhesion maturation. *J Cell Sci*. 122:1800-1811.
- Starke, J., K. Maaser, B. Wehrle-Haller, and P. Friedl. 2013. Mechanotransduction of mesenchymal melanoma cell invasion into 3D collagen lattices: filopod-mediated extension-relaxation cycles and force anisotropy. *Exp Cell Res*. 319:2424-2433.
- Stehbens, S., and T. Wittmann. 2012. Targeting and transport: how microtubules control focal adhesion dynamics. *J Cell Biol*. 198:481-489.
- Stelzer, E.H. 2014. Better Imaging through Chemistry. *Cell*. 159:1243-1246.
- Stiegler, A.L., K.M. Draheim, X. Li, N.E. Chayen, D.A. Calderwood, and T.J. Boggon. 2012. Structural basis for paxillin binding and focal adhesion targeting of  $\beta$ -parvin. *J Biol Chem*. 287:32566-32577.
- Stricker, J., Y. Aratyn-Schaus, P.W. Oakes, and M.L. Gardel. 2011. Spatiotemporal constraints on the force-dependent growth of focal adhesions. *Biophys J*. 100:2883-2893.
- Stricker, J., Y. Beckham, M.W. Davidson, and M.L. Gardel. 2013. Myosin II-mediated focal adhesion maturation is tension insensitive. *PLoS One*. 8:e70652.
- Subauste, M.C., O. Pertz, E.D. Adamson, C.E. Turner, S. Junger, and K.M. Hahn. 2004. Vinculin modulation of paxillin-FAK interactions regulates ERK to control survival and motility. *J Cell Biol*. 165:371-381.
- Sulzmaier, F.J., C. Jean, and D.D. Schlaepfer. 2014. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer*. 14:598-610.
- Sun, Y., C.S. Chen, and J. Fu. 2012. Forcing stem cells to behave: a biophysical perspective of the cellular microenvironment. *Annu Rev Biophys*. 41:519-542.
- Tadokoro, S., S.J. Shattil, K. Eto, V. Tai, R.C. Liddington, J.M. de Pereda, M.H. Ginsberg, and D.A. Calderwood. 2003. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science*. 302:103-106.

- Thievessen, I., P.M. Thompson, S. Berlemont, K.M. Plevock, S.V. Plotnikov, A. Zemljic-Harpf, R.S. Ross, M.W. Davidson, G. Danuser, S.L. Campbell, and C.M. Waterman. 2013. Vinculin-actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth. *J Cell Biol.* 202:163-177.
- Thompson, R.E., D.R. Larson, and W.W. Webb. 2002. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys J.* 82:2775-2783.
- Théry, M. 2010. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci.* 123:4201-4213.
- 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.
- Théry, M., V. Racine, A. Pépin, M. Piel, Y. Chen, J.B. Sibarita, and M. Bornens. 2005. The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat Cell Biol.* 7:947-953.
- Vasioukhin, V., C. Bauer, M. Yin, and E. Fuchs. 2000. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell.* 100:209-219.
- Vaughan, J.C., S. Jia, and X. Zhuang. 2012. Ultrabright photoactivatable fluorophores created by reductive caging. *Nat Methods.* 9:1181-1184.
- Vicidomini, G., G. Moneron, K.Y. Han, V. Westphal, H. Ta, M. Reuss, J. Engelhardt, C. Eggeling, and S.W. Hell. 2011. Sharper low-power STED nanoscopy by time gating. *Nat Methods.* 8:571-573.
- Vogel, V. 2006. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:459-488.
- Webb, D.J., K. Donais, L.A. Whitmore, S.M. Thomas, C.E. Turner, J.T. Parsons, and A.F. Horwitz. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol.* 6:154-161.
- Weber, G.F., M.A. Bjerke, and D.W. DeSimone. 2011. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J Cell Sci.* 124:1183-1193.
- Wegener, K.L., J. Basran, C.R. Bagshaw, I.D. Campbell, G.C. Roberts, D.R. Critchley, and I.L. Barsukov. 2008. Structural basis for the interaction between the cytoplasmic domain of the hyaluronate receptor layilin and the talin F3 subdomain. *J Mol Biol.* 382:112-126.
- Wehrle-Haller, B. 2012a. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* 24:569-581.
- Wehrle-Haller, B. 2012b. Structure and function of focal adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* 24:116-124.
- Wehrle-Haller, B., and M. Bastmeyer. 2014. Intracellular signaling and perception of neuronal scaffold through integrins and their adapter proteins. *Prog Brain Res.* 214:443-460.
- Weschenfelder, M., F. Weth, B. Knöll, and M. Bastmeyer. 2013. The stripe assay: studying growth preference and axon guidance on binary choice substrates in vitro. *Methods Mol Biol.* 1018:229-246.
- Westphal, V., S.O. Rizzoli, M.A. Lauterbach, D. Kamin, R. Jahn, and S.W. Hell. 2008. Video-rate far-field optical nanoscopy dissects synaptic vesicle movement. *Science.* 320:246-249.
- White, D.P., P.T. Caswell, and J.C. Norman. 2007. alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J Cell Biol.* 177:515-525.
- Wickström, S.A., A. Lange, M.W. Hess, J. Polleux, J.P. Spatz, M. Krüger, K. Pfaller, A. Lambacher, W. Bloch, M. Mann, L.A. Huber, and R. Fässler. 2010a. Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. *Dev Cell.* 19:574-588.
- Wickström, S.A., A. Lange, E. Montanez, and R. Fässler. 2010b. The ILK/PINCH/parvin complex: the kinase is dead, long live the pseudokinase! *EMBO J.* 29:281-291.

- Wiedenmann, J., and G.U. Nienhaus. 2006. Live-cell imaging with EosFP and other photoactivatable marker proteins of the GFP family. *Expert Rev Proteomics*. 3:361-374.
- Wiseman, P.W., C.M. Brown, D.J. Webb, B. Hebert, N.L. Johnson, J.A. Squier, M.H. Ellisman, and A.F. Horwitz. 2004. Spatial mapping of integrin interactions and dynamics during cell migration by image correlation microscopy. *J Cell Sci*. 117:5521-5534.
- Xia, N., C.K. Thodeti, T.P. Hunt, Q. Xu, M. Ho, G.M. Whitesides, R. Westervelt, and D.E. Ingber. 2008. Directional control of cell motility through focal adhesion positioning and spatial control of Rac activation. *FASEB J*. 22:1649-1659.
- Xu, K., H.P. Babcock, and X. Zhuang. 2012. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat Methods*. 9:185-188.
- Xu, K., G. Zhong, and X. Zhuang. 2013. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*. 339:452-456.
- Yang, J.T., B.L. Bader, J.A. Kreidberg, M. Ullman-Culleré, J.E. Trevithick, and R.O. Hynes. 1999. Overlapping and independent functions of fibronectin receptor integrins in early mesodermal development. *Dev Biol*. 215:264-277.
- Yao, M., B.T. Goult, H. Chen, P. Cong, M.P. Sheetz, and J. Yan. 2014. Mechanical activation of vinculin binding to talin locks talin in an unfolded conformation. *Sci Rep*. 4:4610.
- Ye, F., B.G. Petrich, P. Anekal, C.T. Lefort, A. Kasirer-Friede, S.J. Shattil, R. Ruppert, M. Moser, R. Fässler, and M.H. Ginsberg. 2013. The mechanism of kindlin-mediated activation of integrin  $\alpha 11\beta 3$ . *Curr Biol*. 23:2288-2295.
- Ye, F., A.K. Snider, and M.H. Ginsberg. 2014. Talin and kindlin: the one-two punch in integrin activation. *Front Med*. 8:6-16.
- York, A.G., A. Ghitani, A. Vaziri, M.W. Davidson, and H. Shroff. 2011. Confined activation and subdiffractional localization enables whole-cell PALM with genetically expressed probes. *Nat Methods*. 8:327-333.
- Zaidel-Bar, R. 2013. Job-splitting among integrins. *Nat Cell Biol*. 15:575-577.
- Zaidel-Bar, R., S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, and B. Geiger. 2007a. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol*. 9:858-867.
- Zaidel-Bar, R., R. Milo, Z. Kam, and B. Geiger. 2007b. A paxillin tyrosine phosphorylation switch regulates the assembly and form of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci*. 120:137-148.
- Zervas, C.G., E. Psarra, V. Williams, E. Solomon, K.M. Vakaloglou, and N.H. Brown. 2011. A central multifunctional role of integrin-linked kinase at muscle attachment sites. *J Cell Sci*. 124:1316-1327.
- Zhang, H., J.S. Berg, Z. Li, Y. Wang, P. Lång, A.D. Sousa, A. Bhaskar, R.E. Cheney, and S. Strömblad. 2004. Myosin-X provides a motor-based link between integrins and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*. 6:523-531.
- Zhang, H., D.J. Webb, H. Asmussen, S. Niu, and A.F. Horwitz. 2005. A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci*. 25:3379-3388.
- Zhang, Y., K. Chen, Y. Tu, A. Velyvis, Y. Yang, J. Qin, and C. Wu. 2002. Assembly of the PINCH-ILK-CH-ILKBP complex precedes and is essential for localization of each component to cell-matrix adhesion sites. *J Cell Sci*. 115:4777-4786.
- Zhang, Y., Y. Tu, V. Gkretsi, and C. Wu. 2006. Migfilin interacts with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and regulates VASP localization to cell-matrix adhesions and migration. *J Biol Chem*. 281:12397-12407.
- Zheng, J.Q., J.J. Wan, and M.M. Poo. 1996. Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *J Neurosci*. 16:1140-1149.
- Zheng, X., T.L. Saunders, S.A. Camper, L.C. Samuelson, and D. Ginsburg. 1995. Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:12426-12430.

- Zhu, J., B.H. Luo, T. Xiao, C. Zhang, N. Nishida, and T.A. Springer. 2008. Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell*. 32:849-861.
- Ziegler, W.H., R.C. Liddington, and D.R. Critchley. 2006. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol*. 16:453-460.



## Publikationen

### Veröffentlichungen und Manuskripte

Pinon P., Pärssinen J., Vazquez P., **Bachmann M.**, Rahikainen R., Jacquier M.C., Azizi L., Määttä J.A., Bastmeyer M., Hytönen V.P., Wehrle-Haller B.

Talin-bound NPLY motif recruits integrin-signaling adapters to regulate cell spreading and mechanosensing.

J Cell Biol. 2014 Apr 28;205(2):265-81. doi: 10.1083/jcb.201308136.

Stephan C., Schlawne C., Grass S., Waack I.N., Ferez K.B., **Bachmann M.**, Barnert S., Schubert R., Bastmeyer M., de Groot H, Mayer C.

Artificial oxygen carriers based on perfluorodecalin-filled poly(n-butyl-cyanoacrylate) nanocapsules. J Microencapsul. 2014;31(3):284-92. doi: 10.3109/02652048.2013.843600. Epub 2013 Oct 14.

Rodriguez-Emmenegger C., Preuss C.M., Yameen B., Pop-Georgievski O., **Bachmann M.**, Mueller J.O., Bruns M., Goldmann A.S., Bastmeyer M. and Barner-Kowollik C.

Controlled Cell Adhesion on Poly(dopamine) Interfaces Photo-Patterned with Non-Fouling Brushes.

Adv Mater. 2013 Nov 13;25(42):6123-7. doi: 10.1002/adma.201302492. Epub 2013 Sep 3.

Langhe R.P., Grabovskij, T., **Bachmann M.**, Franz C.M., Kashef J.

Cadherin-11 localizes to focal adhesions and promotes cell-substrate adhesion.

Nat Comm., in Begutachtung

**Bachmann M.**, Fiederling F., Bastmeyer M.

A direct comparison of two superresolution microscopy techniques with laser scanning microscopy.

In Vorbereitung

Soto-Ribeiro M., Kastberger B., **Bachmann M.**, Kukkarainen S., Hytönen V., Bastmeyer M., Boettiger D., Wehrle-Haller B.

Alternative splicing of beta1-integrin modifies exchange dynamics and integrin signaling

In Vorbereitung

Kastberger B., Soto-Ribeiro M., **Bachmann M.**, Kukkarainen S., Hytönen V., Bastmeyer M., Wehrle-Haller B.

Acetylation of beta1A-integrin modifies integrin dynamics, activation and fibrillar adhesion formation

In Vorbereitung

### Konferenzverzeichnis:

**Bachmann M.**, Bastmeyer M.

Ein direkter Vergleich von SR-SIM, dSTORM und LSM mit dem Zeiss Elyra PS.1. (eingeladener Vortrag)

Dezember 2011, PhotonikNet Forum Mikroskopietrends, Wetzlar

**Bachmann M.**, Greiner A.M., Bastmeyer M.

Development and maturation of nascent adhesions visualized with superresolution microscopy. (Vortrag und Poster)

Juni 2012, Gordon Research Seminar/Conference "Signaling by Adhesion Receptors", Waterville, Maine

**Bachmann M.**, Greiner A.M., Bastmeyer M.

Superresolution Microscopy – a direct comparison of SR-SIM, dSTORM, and LSM with Zeiss Elyra PS.1 (eingeladener Vortrag)

September 2012, NMI Workshop "Optical Sectioning and beyond: Possibilities and Advances in Light Microscopy", Reutlingen

**Bachmann M.**, Greiner A.M., Bastmeyer M.

Superresolution Microscopy - a direct comparison of SR-SIM, dSTORM, and LSM with Zeiss Elyra PS.1 (eingeladener Vortrag)

Juni 2013, First Nordic Superresolution Workshop, Stockholm

**Bachmann M.**, Autenrieth T., Bastmeyer M.

Maturation of Focal Contacts Visualized with Superresolution Microscopy. (Poster)

Oktober 2013, EMBL conference "Seeing is Believing", Heidelberg

**Bachmann M.**, Bastmeyer M.

Development and Maturation of Cell Matrix Adhesions Visualized with Superresolution Microscopy. (Poster)

Juni 2014, Gordon Research Seminar/Conference "Signaling by Adhesion Receptors", Lewiston, Maine

## Danksagung

Vielen Dank an alle, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht und mich bei deren Anfertigung unterstützt haben.

Zunächst möchte ich meinem Referenten und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer dafür danken, dass er mir die Möglichkeit zur Promotion am Zoologischen Institut ermöglicht und mich bei ihrer Ausarbeitung unterstützt hat. Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. G. Ulrich Nienhaus für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. „Berni“ Wehrle-Haller und Dr. Franco Weth. Beide haben mich in einem weit höheren Maß unterstützt, als es ihre „Funktion“ im Rahmen meiner Doktorarbeit erfordert hätte.

Ohne die Kollaboration mit Berni und seiner Arbeitsgruppe wäre diese Arbeit eine deutlich andere. Aus Genf kamen nicht nur entscheidende Reagenzien. Die Gespräche und Emails mit Berni haben entscheidend dazu beigetragen, dass CMAs für mich nicht mehr einen chaotischen Haufen von Molekülen darstellen. Ich hoffe, dass man es beim Lesen dieser Arbeit merkt.

Franco war „nur“ mein KSOP-Betreuer, hat mich aber weit darüber hinaus unterstützt. Er hat stets großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt und wichtige Impulse geliefert. Leider haben die letzten Details über Filopodien und die Verrücktheiten der Paxillin-Phosphorylierung keinen Eingang in diese Arbeit gefunden. Genauso wichtig für mich waren aber auch die Gespräche über Wissenschaft an sich und all die weiteren Themen die wir mindestens gestreift haben. Danke dafür.

Außerdem möchte ich meinen weiteren Kollaborationspartnern, vor allem aber Cesar Rodriguez-Emmenegger, danken. Cesar hat entscheidend zur Verwirklichung von dünnen Gold-Substraten beigetragen.

Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Zoologie für die wirklich schöne Zeit bedanken. Die Atmosphäre war klasse und es war toll, dass man wirklich jeden um Hilfe und Rat fragen konnte. Mein besonderer Dank gilt Stephanie Frank für die Unterstützung mit PCFs, Tanja Landmann für ihre Unterstützung in der Zellkultur, Felix Fiederling für Matlab-Analysen und epoxysilanisierte Deckgläser, Benjamin Richter für die Erstellung von Mastern und 3D-Strukturen, Sven Heider ebenfalls für Matlab-Analysen und meinem Masterstudenten, Artiom Skripka. Außerdem geht mein Dank an zahlreiche Mitarbeiter der Firma Zeiss, die in Rekordzeit für Abhilfe gesorgt haben, wenn der Prototyp Zicken machte.

Ich danke der KSOP, dass sie mir erlaubt hat einen Rekord in der Stipendiatsdauer aufzustellen.

Das Wichtigste zum Schluss: Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und ihr Verständnis. Wie vielleicht jede Doktorarbeit, hatte auch diese ihre Durchhänger. Ich danke euch, dass ihr mir durch frustrierende Zeiten geholfen und diese Arbeit möglich gemacht habt!