

**Zytoskelett-Dynamik und differenzielle
Funktionen von $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrinen bei
der gerichteten Zellmigration**

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

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

genehmigte
DISSERTATION
von
Stephanie Frank
aus
Ostfildern-Ruit

Dekan: Prof. Dr. Peter Roesky

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: PD Dr. Dietmar Gradl

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2015

DOI: 10.5445/IR/1000048683

ERKLÄRUNG

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2012 bis Juni 2015 am Zoologischen Institut, 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. Zudem liegen keine anderen, außerhalb der Fakultät noch anhängige oder erfolglos beendete, Promotionsverfahren vor.

Stephanie Frank

Karlsruhe, den 02.06.2015

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ZUSAMMENFASSUNG.....	III
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die extrazelluläre Matrix.....	2
1.2 Fibronectin und Vitronectin.....	3
1.3 Das Zytoskelett.....	5
1.4 Zell-Matrix-Adhäsionen.....	8
1.5 Integrine.....	10
1.6 Rho-GTPasen.....	14
1.7 Zellmigration.....	16
1.8 Der Einsatz strukturierter Substrate.....	18
1.9 Zielsetzung.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1 Lösungsmittel und Chemikalien.....	23
2.2 Herstellung mikrostrukturierter Dotgradienten.....	25
2.2.1 Microcontact-Printing.....	28
2.3 Zellkultur.....	32
2.4 Stabile und transiente Transfektion von Zellen.....	35
2.5 Experimente auf mikrostrukturierten Substraten.....	37
2.6 Immunhistochemie.....	39
2.7 Quantifizierung.....	41
3 ERGEBNISSE.....	47
3.1 Die pharmakologische Inhibition zytoskelett-assoziiertes Proteine führt zu einer Abnahme der gerichteten Migration.....	49
3.1.1 Inhibition der Rho-GTPase Rac.....	50
3.1.2 Inhibition des Arp2/3-Komplexes.....	52
3.1.3 Inhibition der FH2-Domäne von Formin.....	54
3.1.4 Inhibition der <i>Integrin-linked-kinase</i>	56
3.2 Die unterliegende Substratgeometrie beeinflusst die Mikrotubuli-Dynamik.....	59
3.3 Die Funktionen von $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrin unterscheiden sich bei der Migration auf FN-Dotgradienten.....	62
3.3.1 Unterschiedliche Proteingradienten induzieren ein differenzielles Migrationsverhalten.....	62

3.3.2	Die α V-Untereinheit ist für die Migration auf FN-Dotgradienten verzichtbar	65
3.3.3	Die β 1-Untereinheit ist notwendig für die Migration auf FN-Dotgradienten	66
3.3.4	Die intrazelluläre β 1-Domäne befähigt Fibroblasten zur Migration auf VN-Dotgradienten.....	70
3.3.5	Der Verlust des zytoplasmatischen β 1-Integrin Inhibitors ICAP-1 begünstigt die Migration auf FN-Dotgradienten.....	72
3.3.6	Die Acetylierung von Lysin-794 an β 1-Integrin stellt die reguläre Migration auf FN-Dotgradienten sicher.....	74
3.3.7	Differenzielle FN/VN-Substrate ermöglichen eine selektive Proteinwahrnehmung.....	78
4	DISKUSSION.....	81
4.1	Zytoskelett-assoziierte Proteine bei der gerichteten Migration auf FN-Dotgradienten.....	82
4.2	Mikrotubuli-Dynamik und die Substratgeometrie	91
4.3	Integrine α 5 β 1 und α V β 3 bei der Migration auf FN-Dotgradienten.....	93
4.4	Ausblick.....	105
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	109
	LITERATURVERZEICHNIS.....	111
	PUBLIKATIONEN	129
	DANKSAGUNG.....	131

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AMCA	Aminomethylcoumarin-Acetat
Arp2/3	<i>Actin-related protein 2/3</i>
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
CEF	<i>Chicken embryonic fibroblast</i>
EB3	<i>End binding protein 3</i>
EG ₆ -OMe	Ethylenglykol-6-O-Mercaptan
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	<i>Focal-adhesion-kinase</i>
FN	Fibronektin
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GDI	<i>Guanine nucleotide dissociation inhibitors</i>
GEF	<i>Guanine exchange factor</i>
ICAP-1	<i>Integrin cytoplasmic domain-associated protein 1</i>
IgG	Immunglobulin G Antikörper
IgM	Immunglobulin M Antikörper
ILK	<i>Integrin-linked-kinase</i>
mkl	Monoklonal
MTOC	<i>Microtubule organizing center</i>
N	Anzahl unabhängiger Experimente
n	Anzahl ausgewerteter Zellen
NPXY	Asparagin-Prolin-X-Tyrosin
ODM	Octadecylmercaptan
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
pkl	Polyklonal
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
REF	<i>Rat embryonic fibroblast</i>
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
VN	Vitronektin
WT	Wildtyp

ZUSAMMENFASSUNG

Haptotaxis, die gerichtete Zellmigration entlang eines substratgebundenen Adhäsionsgradienten, spielt in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Hierbei sind Zell-Matrix-Adhäsionen unverzichtbar, in denen geclusterte Integrinrezeptoren die essentielle Verbindung zwischen der extrazellulären Matrix (EZM) und dem Zytoskelett der Zelle bilden. Integrine übertragen an diesen Kontaktstellen mechanische Kräfte, welche durch die intrazelluläre Aktin-/Myosin-Kontraktilität generiert werden und stellen die bidirektionale Signaltransduktion sicher. In Vertebraten umfasst die Integrinfamilie 24 Kombinationen aus 18 α - und 8 β -Untereinheiten. Dabei sind die Interaktionen zwischen einzelnen Liganden und Integrinen nicht zwingend spezifisch, sondern können eine gewisse Redundanz aufweisen.

Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass primäre Fibroblasten einen diskontinuierlichen Fibronektin (FN)-Dotgradienten erkennen und zu 80% in Richtung der höheren Proteinbedeckung migrieren. Ein funktionelles Aktin-/Myosin-System ist dabei unverzichtbar. Um weitere Erkenntnisse über den Mechanismus der Haptotaxis zu gewinnen, wurden im ersten Teil dieser Arbeit zytoskelett-assoziierte Proteine pharmakologisch inhibiert. Die Störung der Funktion dieser Proteine führte dabei in allen Fällen zu einem allgemeinen Rückgang der Migration, ohne die Direktionalität der Haptotaxis zu beeinträchtigen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die unterliegende Substratgeometrie die dynamische Instabilität der Mikrotubuli beeinflusst. Neben den Untersuchungen zur Zytoskelett-Dynamik setzte sich diese Dissertation zudem mit der Funktion bestimmter Integrine bei der Zellmigration auseinander. FN kann von α V β 3- und α 5 β 1-Integrin gebunden werden, während Vitronektin (VN) nur durch α V β 3 erkannt wird. Es konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-Fibroblasten, die α V β 3- und α 5 β 1-Integrin exprimieren, nicht in der Lage sind, auf VN-Dotgradienten zu migrieren. α V β 3-Integrin reicht also nicht für die Haptotaxis aus, während α 5 β 1-Integrin das zentrale Integrin für die Migration auf FN-Dotgradienten ist. Experimente mit β 1-Knockout-Zellen unterstützen diese Hypothese, da die Zellen eine reduzierte Migration auf FN-Dotgradienten zeigten. Um herauszufinden, welche der β 1-Domänen für die Migration wichtig sind, wurde eine NIH3T3-Zelllinie, die ein niedriges endogenes Level an β 3-Integrin aufweist, mit einem chimären β 3-Integrin transfiziert. Dieses chimäre Integrin besitzt die extrazelluläre Domäne von β 3- und die zytoplasmatische Domäne von β 1-Integrin. Dadurch erwarben die Fibroblasten die Fähigkeit, auf VN zu migrieren. Dies belegt, dass die intrazelluläre β 1-Domäne wichtig für die Migration auf FN- und VN-Dotgradienten ist. Im Gegensatz zu β 3-, besitzt β 1-Integrin ein Lysin in der intrazellulären Domäne, das nach Acetylierung seine positive Ladung verliert. Ein Aminosäureaustausch an dieser Position durch Arginin, das ein nicht-acetyliertes Lysin simuliert, führte zu einer reduzierten Migration. Glutamin hingegen, das ein acetyliertes Lysin simuliert, beeinträchtigte die Migration auf FN-Dotgradienten nicht.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre β 1-Domäne von α 5 β 1-Integrin die zentrale Integrindomäne zur Befähigung einer Migration auf FN-Dotgradienten ist. Diese Erkenntnis verdeutlicht, dass unterschiedliche Integrine, die an denselben EZM-Liganden binden, dennoch verschiedene Funktionen in vielen biologischen Prozessen ausüben können.

1 EINLEITUNG

Die Zellmigration ist ein zentraler Prozess in allen lebenden Organismen. Sie findet in Einzellern wie Amöben, bis hin zu multizellulären Organismen, wie den Säugetieren, statt. Abhängig vom Zelltyp kann die Migration in verschiedenen Modi ablaufen. So können sich Zellen als Kollektiv, oder aber auch als Einzelzellen in einer amöboiden oder mesenchymalen Art und Weise fortbewegen. Intra- und extrazelluläre Signale haben darauf einen großen Einfluss und induzieren die gerichtete Migration. *In vitro* bedient man sich definierten Zellkultursubstraten die Zellmigrationseffekte beeinflussen und so tiefere Einblicke in den Migrationsmechanismus erlauben. Zellen können abhängig von ihrer Adhäsionsstärke, der Steifheit des Substrates, oder dem Beisein ausgewählter Liganden der extrazellulären Matrix auf dem Substrat reagieren. Unverzichtbar sind für die mesenchymale Einzelzellmigration eine asymmetrische Zellpolarisierung mit einer ausgeprägten Zellfront, ein dynamisch reguliertes Aktinzytoskelett, streng kontrollierte Zell-Matrix-Adhäsionen und die Anwesenheit von Integrinen, die Liganden der extrazellulären Matrix (EZM) mit dem intrazellulären Zytoskelett verknüpft. Diese Verbindung ist eine Voraussetzung für die bidirektionale Signaltransduktion der Integrine. Es ermöglicht der Zelle auf extrazelluläre und intrazelluläre Faktoren zu reagieren und die Zellmigration zu regulieren. Auch wenn in den letzten 15 Jahren zahlreiche Studien zur Zellmigration erhoben wurden, ist der komplexe regulatorische Mechanismus der hinter der Zellmigration steht, noch immer nicht ganz verstanden. Dies trifft auch auf die Haptotaxis, eine spezielle Art der Migration entlang eines substratgebundenen Adhäsionsgradienten zu. Obwohl sie eine tragende Rolle in der Wundheilung, der Angiogenese und der Embryonalentwicklung spielt, ist im Gegensatz zur Chemotaxis noch sehr wenig über diese Art der Migration bekannt. Vorherige Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits anhand von diskontinuierlichen Dotgradienten zeigen, dass ein funktionierendes Aktin-Myosin/System und die Mikrotubuli-Dynamik für die Haptotaxis unverzichtbar sind. In dieser Arbeit soll aufbauend auf diese Erkenntnisse der

Einfluss verschiedener zytoskelett-assoziiierter Proteine auf die Haptotaxis näher untersucht werden. Das zweite zentrale Thema dieser Arbeit ist die Analyse der Funktionen bestimmter Integrine in der Migration auf substratgebundenen Adhäsionsgradienten. Hierbei wird gezeigt, dass auch wenn Integrine mit denselben Liganden der extrazellulären Matrix interagieren, sie dabei unterschiedliche Funktionen in der Migration auf FN-Dotgradienten haben können.

In diesem Kapitel soll ein Einblick in bisherige Kenntnisse der für diese Arbeit relevanten Themen geschaffen werden. Beginnend mit den Komponenten der extrazellulären Matrix und des Zytoskeletts, werden Zell-Matrix-Adhäsionen sowie die Familie der Integrine beschrieben. Die Regulation durch Rho-GTPasen, die Zellmigration und ihre Analyse mithilfe strukturierter Substrate sind nachfolgend weitere Bestandteile dieser Einleitung.

1.1 Die extrazelluläre Matrix

Die meisten tierischen Zellen sind von einer EZM umgeben, mit der sie interagieren können. In diese komplexe, strukturgebende Umgebung können sich Zellen verankern, wodurch die gesamte Gewebearchitektur geprägt wird. Sie gewährleistet außerdem einen dreidimensionalen Raum für den Transport verschiedenster Moleküle, für den Zusammenhalt und den Schutz. Durch die Interaktion mit Zelloberflächenrezeptoren, wie den Integrinen und der Bindung von Wachstumsfaktoren, nimmt die EZM außerdem Einfluss auf die Genregulation und die Signaltransduktion. Dadurch werden biologische Prozesse, wie die Proliferation, die Adhäsion und die Zellmigration, ermöglicht. Die EZM stellt dabei keine starre Form dar, sondern ist ein sehr dynamisches Gerüst. Der Umbau und die Degradierung der EZM geschieht entweder enzymatisch oder durch Zellinteraktionen und ist für die Wundheilung, die Metastasierung und die Embryogenese essentiell (Davis and Senger, 2005). Deshalb führen Störungen im Umbau der EZM auch zu Erkrankungen wie Arthritis, Fibrose oder Krebs (Mutsaers et al., 1997; Poole et al., 2003). Sezerniert wird die EZM mit ihrer gewebespezifischen Zusammensetzung von Fibroblasten und Epithelzellen. Zu den drei Hauptkomponenten der EZM gehören dabei Proteoglykane, Kollagene und Glykoproteine. Bekannte Vertreter der Glykoproteine sind unter anderem Fibronectin (FN) und Vitronectin (VN) (Frantz et al., 2010; Gumbiner and Yamada, 1995; Järveläinen et al., 2009).

1.2 Fibronektin und Vitronektin

Viele Zellen interagieren mit Komponenten der EZM, die ein Substrat für die Zelladhäsion darstellen, darunter mit FN und VN. FN ist ein glykosiliertes Protein, das von Fibroblasten als Dimer mit zwei C-terminalen Disulfidbrücken (230-270 kDA) sezerniert wird. Jede Domäne enthält dabei drei Typen sich wiederholender Module (Petersen et al., 1983). Diese Module enthalten funktionelle Domänen, welche die Interaktion mit unterschiedlichen Zelloberflächenrezeptoren, wie Integrinen, aber auch Kollagenen oder anderen FN-Dimeren, vermitteln. Von den etwa 20 bekannten FN-Spleißvarianten ist jede etwa 130 nm lang und 2-3 nm dick (Engel et al., 1981). Die kürzeste bekannte Aminosäuresequenz, welche als Adhäsionsmotiv für Zellen wie Neurone oder Fibroblasten dient, ist die RGD-Sequenz (Arginin-Glycin-Asparaginsäure). Diese Sequenz befindet sich in der FNIII₁₀-Domäne und ist unter anderem eine Bindungsstelle für $\alpha 5\beta 1$ -, $\alpha 11\beta 3$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrin (Humphries et al., 2006; Pierschbacher and Ruoslahti, 1984). Während die RGD Sequenz im nativen Zustand eine ringartige Struktur aufweist, kann sie unter Zugkraft durch Integrin-vermittelte Adhäsion entfaltet werden (Gao et al., 2002). Kodiert von einem einzigen Gen, entstehen durch alternatives Spleißen die zwei Hauptformen in denen FN vorliegt: Das Plasma-FN und das zelluläre FN (Edsall, 1978). Das zelluläre FN wird von Fibroblasten und anderen Zelltypen sezerniert und kommt hauptsächlich in Bindegeweben und auf Zelloberflächen vor (Hynes and Research, 1990). Zelluläre FN-Dimere werden durch die Integrin-abhängige Fibrillogenese schrittweise in die EZM eingearbeitet, bis unlösliche FN-Fibrillen entstehen (Ali and Hynes, 1977; McKeown-Longo and Mosher, 1983; Wu et al., 1993). Dies wird durch mechanischen Zug induziert, der zu einem Entfalten von kryptischen FN-Bindungsstellen führt. Diese unterstützen die Quervernetzung durch weitere FN-Moleküle und verstärken die Inkorporation von Dimeren in Fibrillen (Singh et al., 2010; Vogel, 2006; Zhong et al., 1998). Der Matrixaufbau durch die Fibrillogenese hat unter anderem für die Wundheilung eine große Bedeutung. Dabei entsteht eine provisorische EZM, die es Zellen ermöglicht, in die Wunde einzuwandern und sie zu schließen. Die Zellen migrieren hierbei entlang der FN-Fibrillen, die in einem adhäsiven Gradienten vorliegen. Eine haptotaktische Migration findet statt (Carter, 1965). Doch auch während der embryonalen Entwicklung ist die Fibrillogenese für die Migration mesodermaler Zellen unverzichtbar (Boucaut et al., 1985; Boucaut et al., 1984). Dem $\alpha 5\beta 1$ -Integrin wird hierbei die entscheidende Rolle des Matrixaufbaus durch Fibrillogenese zugesprochen. Andere Integrine sind *in vitro* nur nach Mn^{2+} Stimulation oder durch aktivierende Antikörper dazu in der Lage, FN-Fibrillen zu formen (Wennerberg et al., 1996).

Neben der Fibrillogenese von FN findet auch eine zelluläre Segregation von FN statt. Diese lysosomale Segregation wird von dem Aktinbindeprotein Cortactin reguliert. Dabei werden lösliches FN oder proteolytierte FN-Fibrillen in Endosomen internalisiert und dort mithilfe von lysosomalen Enzymen in adhäsive Fragmente gespalten. Diese Fragmente werden an der basalen Zellseite neben den Lamellipodien segregiert, um die gerichtete Zellbewegung zu unterstützen. Diese neu entdeckte Art der Bereitstellung erfolgt um einiges schneller als die FN-Deposition über den Golgi Apparat (Sung and Weaver, 2011).

Im Gegensatz zum zellulären FN wird das Plasma-FN von Hepatocyten exprimiert und findet sich gelöst in Körperflüssigkeiten wie Blut wieder (Hynes and Research, 1990; Pankov and Yamada, 2002). In dieser gelösten Form spielt es eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung und kann während der Wundheilung in die EZM eingebaut werden (Moretti et al., 2007).

FN kann direkten Einfluss auf das Zellverhalten ausüben, indem es, unter anderem durch seine gradierte Verteilung, intrazelluläre Signalkaskaden induziert und Zelladhäsion vermittelt (Pankov and Yamada, 2002). Dabei wird das FN über spezifische Sequenzen von Integrinen gebunden, welche daraufhin über Adapterproteine, wie etwa Vinculin und Paxillin, in Interaktion mit dem Aktinzytoskelett treten können. Extrazelluläre Signale werden auf diese Weise in intrazelluläre Signale umgewandelt, auf welche die Zelle mit einer Reorganisation des Zytoskeletts reagieren kann. FN-*Knockout*-Mäuse zeigen, dass FN essentiell für viele biologische Prozesse ist, da die Mäuse embryonal letal sind (George et al., 1993).

VN stellt ein weiteres Glykoprotein der EZM dar und ermöglicht die Adhäsion und Migration von Zellen in vielen verschiedenen Zelltypen. Außerdem bindet es an zahlreiche andere EZM-Proteine, wie Fibrinogen, FN und den Sialoproteinen. Das Molekulargewicht von VN beträgt 75 kDa und enthält drei Glykosilierungsstellen. Es ist zu 95% im Blutplasma (200-400 µg/ml) zu finden und wird hauptsächlich in der Leber produziert und sezerniert (Izumi et al., 1989). Neben dem Plasma kommen geringe Mengen VN auch assoziiert an Zelloberflächen oder immobilisiert an der EZM vor. Vergleichbar mit Fibroblasten sind spezielle Zelltypen wie Hepatomzellen, arterielle glatte Muskelzellen und Glioblastomzellen in der Lage, VN in Kultur zu synthetisieren und zu sekretieren (Preissner, 1991).

VN enthält, wie FN, eine RGD-Sequenz, über die es Adhäsion und *Spreading* von Zellen an die EZM über spezifische Integrine vermittelt. Dabei sind mindestens vier Integrinrezeptoren bekannt, die mit VN interagieren können: $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha1b\beta3$ und $\alpha\beta1$. Unter diesen gilt das Integrin $\alpha\beta3$ als der klassische Rezeptor für VN (Defilippi et al., 1991; Felding-Habermann and Chersesh, 1993). VN kommt in den meisten Geweben nach traumatischem Stress vor, wo es seiner Rolle als „biologischer Kleber“ nachkommt. Hier ist VN als Steuereinheit bei der Gewebereparatur bekannt (Preissner and Seiffert, 1998; Seiffert, 1997). Studien haben $\alpha\beta3$ -Integrin außerdem eine zentrale Rolle in der Angiogenese zugewiesen und eine

Hochregulierung von VN und $\alpha v\beta 3$ -Integrin in diversen Tumorarten gezeigt (Brooks et al., 1994; Engebraaten et al., 2009; Erdreich-Epstein et al., 2000; Petitclerc et al., 1999; Zhu et al., 2015). Deshalb wird Krebs als „Wunde, die niemals heilt“ bezeichnet (Dvorak, 1986). Für die Metastasierung und das Überleben eines Tumors ist es wichtig, ein mitwachsendes Kapillarnetzwerk zu haben, das ihn versorgt (Brooks et al., 1994). Durch die starke Expressierung von $\alpha v\beta 3$ -Integrin in Krebszellen und seiner zentralen Rolle in der Angiogenese, gilt dieses Integrin mittlerweile als das wichtigste für therapeutische $\alpha v\beta 3$ -Integrin Hemmer. Diese unterdrücken die $\alpha v\beta 3$ -Integrin vermittelte Angiogenese und hungern so den Tumor aus (Kumar, 2003; Nisato et al., 2003). Ein spezifischer Inhibitor der αv -Domäne, das zyklische Pentapeptid Cilengitide, wird auch in dieser Arbeit verwendet und kommt in aktuellen klinischen Studien zum Einsatz (Liu et al., 2008; Mas-Moruno et al., 2010; Reardon and Cheresch, 2011). Auch wenn VN in vielen biologischen Prozessen, wie der Wundheilung oder der Tumorprogression, eine wichtige Rolle spielt, sind Mäuse mit einem VN-*Knockout* im Gegensatz zu jenen mit einem FN-*Knockout*, lebensfähig (Zheng et al., 1995). Mängel sind lediglich im Bereich verspäteter Wundheilung und verringerter Thrombogenese bekannt (Jang et al., 2000). Daraus lässt sich schließen, dass das Protein entweder verzichtbar ist oder seine Funktionen durch andere Proteine kompensiert werden können (Leavesley et al., 2013; Zheng et al., 1995).

1.3 Das Zytoskelett

Um die Zellarchitektur zu gewährleisten, benötigen Zellen interne Strukturen, die ihnen als eine Art Gerüst dienen. Diese Aufgabe erfüllt das Zytoskelett, indem es die eukaryotische Zelle bei der Aufrechterhaltung und Änderung der Zellmorphologie, dem intrazellulären Transport und der Zellteilung unterstützt. Verbunden mit Organellen und der Plasmamembran, unterliegt das Filament- und Fasersystem des Zytoskeletts einem ständigen Auf- und Abbau. Biologische Prozesse wie die Zellmigration, die embryonale Entwicklung oder die Zellteilung, sind auf das dynamische Zytoskelett angewiesen. Dieses umfasst die drei Hauptkomponenten Mikrotubuli, Intermediär- und Aktinfilamente. Während die Intermediärfilamente relativ stabil sind, unterliegen Mikrotubuli und Aktinfilamente einem stetigen An- und Abbau von Untereinheiten, der (De)polymerisation. Tubulin und Aktin sind phylogenetisch konserviert, während Intermediärfilamente phylogenetisch instabil sind und gewebsspezifisch exprimiert werden. Jede Komponente ist aus einer individuellen Proteinuntereinheit aufgebaut und erfüllt spezifische Aufgaben. Nur das Zusammenspiel

ermöglicht es, Wunden zu schließen, Muskeln zu kontrahieren oder zelluläre Strukturen zu transportieren (Plattner and Hentschel, 2011). In dieser Arbeit wird verstärkt auf die Aktinfilamente und die Mikrotubuli eingegangen.

Aktinfilamente

Aktin ist das am häufigsten vorkommende Protein in eukaryotischen Zellen und nimmt an den meisten Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle teil. Das Aktinzytoskelett ist im Aufbau sehr dynamisch und beinhaltet Filamente unterschiedlicher Organisation und Länge. Diese ermöglichen es, die Zellmorphologie sehr schnell auf die verschiedensten Bedingungen anzupassen. Um dies zu gewährleisten, ist eine Fülle an Hilfsproteinen notwendig, welche die Filamente untereinander oder mit anderen Zellbestandteilen verknüpfen (Alberts B., 1994; Lodish H., 2000). Innerhalb einer Zelle werden die einzelnen Aktinfilamente in höhere Strukturen organisiert. Durch zahlreiche aktinbindende Proteine entstehen entweder gelartige Netzwerke oder Aktinfilamentbündel, die in der Zelle unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Die am häufigsten untersuchten Aktinstrukturen in motilen Zellen sind Lamellipodien, Filopodien und Stressfasern (Taylor and Condeelis, 1979). Das Lamellipodium besteht aus unipolaren Aktinfilamenten, die über den Proteinkomplex Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*) im 70° Winkel miteinander verknüpft sind und auf diese Weise ein planares Netzwerk bilden (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Welch et al., 1997). Während der Arp2/3-Komplex ein Keimbildner der verzweigten Aktinnetzwerke darstellt, spielt die FH2-Domäne von Forminen eine wichtige Rolle in der Keimbildung von linearen Aktinfilamenten welche für Strukturen wie Filopodien unverzichtbar sind (Pruyne et al., 2002). Formine sind eine Familie von 15 ubiquitär vorkommenden Proteinen, die sich in 8 verschiedene Unterfamilien einteilen lassen und deren FH2-Domäne für die Keimbildung von Aktinfilamenten *in vitro* notwendig ist (Pruyne et al., 2002; Schönichen and Geyer, 2010; Trumpp et al., 1992). Filopodien weisen eine fingerartige Struktur auf. Mithilfe ihrer unverzweigten, parallelen Aktinfilamente ist es den Zellen möglich, ihre Umgebung abzutasten, womit sie eine tragende Rolle in der Wahrnehmung der Mikroumgebung spielen (Chhabra and Higgs, 2007). Stressfasern weisen eine bipolare Anordnung der Aktinfilamente auf. Sie sind auf eine Verankerung an der ventralen Zellseite mittels fokalen Adhäsionen mit dem Substrat angewiesen. Auf diese Weise kann Zugkraft erzeugt werden, was für die Kontraktilität der Zelle essentiell ist. Ohne diese wäre es der Zelle nicht möglich, sich fortzubewegen. In diesem Zusammenhang ist das Zusammenspiel zwischen Aktin und Myosin wichtig. Myosine stellen die aktin-basierenden Motorproteine in der Zelle dar. Sie spielen unter anderem eine tragende Rolle in der Kontraktion von Skelettmuskeln, welche ATP-

abhängiges Gleiten von Myosinfilamenten entlang von Aktinfilamenten hervorruft. (Alberts B., 1994; Cooper, 2000; Lodish H., 2000).

Aktinfilamente sind somit bedeutsame Komponenten des Zytoskeletts, welche durch ihre Organisation der Zellausläufer und Stressfasern sowie der Fähigkeit in Kooperation mit Myosin Kontraktilität zu erschaffen, maßgeblich zur Zellmigration beitragen.

Mikrotubuli

Mikrotubuli stellen neben den Intermediär- und Aktinfilamenten die dritte strukturelle Hauptkomponente des Zytoskeletts dar. Sie spielen neben der Zellteilung auch eine wichtige Rolle in der Polarisierung und der gerichteten Zellmigration (Small et al., 2002; Vasiliev et al., 1970). Die Polymerisierung der Mikrotubuli beginnt am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC), indem Mikrotubuli mit ihrem Minusende verankert sind. Von dort durchziehen sie die Zelle bis hin zur Peripherie. In einigen Zelltypen werden Mikrotubuli neben dem MTOC auch noch im Golgi Apparat polymerisiert (Vinogradova et al., 2009). Mikrotubuli unterliegen einem ständigen dynamischen Wechsel zwischen Wachstums- und Schrumpfungsphasen, der sogenannten dynamischen Instabilität. Dieses *search and capture* Verhalten dient den Mikrotubuli dazu, mit zellulären Organellen oder fokalen Adhäsionen zu interagieren (Lansbergen and Akhmanova, 2006). An der Regulation der dynamischen Instabilität sind zahlreiche Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAPs) beteiligt, die hauptsächlich durch ihre Bindung an das Plus-Ende oder aber durch Bindung entlang der Mikrotubulstruktur zur Regulation beitragen. Bekannte Plus-End-Proteine sind die Familie der EB-Proteine (*End-binding protein*), wie das in dieser Arbeit untersuchte Protein EB3.

Um Migration zu unterstützen, weist das Mikrotubulinetzwerk einer migrierenden Zelle die gleiche Polarisierung wie die Zelle selbst auf. Während stationäre Zellen ein Netzwerk aufweisen, das sich radiärsymmetrisch vom MTOC über die Zelle erstreckt, weist in migrierenden Zellen die Mehrheit der Mikrotubuli Richtung Zellfront, wo sie diese unter anderem mit neuen Membranbausteinen und Integrinen versorgen (Etienne-Manneville, 2013).

Dem Großteil der Mikrotubuli ist es dabei nicht möglich, in Zellausläufer wie Lamellipodien vorzudringen, da es von einem dichten Aktinnetzwerk durchzogen ist und der retrograde Aktinfluss ein Eindringen verhindert (Waterman-Storer and Salmon, 1997). Nur eine kleine Gruppe, die sogenannten Pionier-Mikrotubuli, ist dennoch dazu in der Lage und spielt dort bei der Ausbildung von Zellausläufern und in der Migration eine Rolle. Das geschieht durch ihre mechanischen Eigenschaften, durch ihren Beitrag zum zellulären Transport und durch ihre Fähigkeiten zur Signaltransduktion. Weit weniger Mikrotubuli weisen in Richtung des

Zellendes als in Richtung der Zellfront. An diesem tragen sie unter anderem zum Abbau von fokalen Adhäsionen bei, welcher für das Nachziehen des Zellendes während der Migration von großer Bedeutung ist (Bretscher and Aguado-Velasco, 1998; Kaverina et al., 1999; Rid et al., 2005).

Mikrotubuli stellen somit, ebenso wie die Aktinfilamente, eine wichtige Komponente des Zytoskeletts dar, die einen zentralen Beitrag zur Zellmigration leisten.

1.4 Zell-Matrix-Adhäsionen

Mehr als 150 verschiedene Proteine, die zusammen das sogenannte Adhäsom bilden, sind in den Aufbau von Zell-Matrix-Adhäsionen involviert (Schiller and Fässler, 2013). Zell-Matrix-Adhäsionen unterliegen dabei einem Integrin-vermittelten Reifeprozess. Im Laufe dieses Prozesses können sie von unreifen Adhäsionen über fokale Komplexe zu fokalen Adhäsionen bis hin zu fibrillären Adhäsionen reifen. Diese Reifung ist unter anderem von diversen Adhäsionsproteinen, Myosin II sowie der biphasischen Aktivität der Rho-GTPasen Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) und RhoA (*Ras homolog gene family, member A*) abhängig (Arthur et al., 2000; Price et al., 1998).

Die ersten Zell-Matrix-Adhäsionen, die sich in migrierenden Zellen bilden, sind unreife Adhäsionen. Gefördert von einer hohen Rac- und niedrigen RhoA-Aktivität, stellen sie Myosin II-unabhängige Strukturen mit zwei Schicksalen dar: Dem Abbau oder der Reifung in fokale Komplexe. Diese fokalen Komplexe sind Myosin II-abhängig und befinden sich zwischen Lamellum und Lamellipodium (s. Abbildung 1.1). Sie sind über die intrazelluläre Integrinbindung von Adapterproteinen, wie beispielsweise Talin, α -actinin und Vinculin, mit dem Aktinzytoskelett verbunden (Bouvard et al., 2013; Choi et al., 2008). Ändert sich die biphasische Aktivität der Rho-GTPasen Rac und RhoA gegenläufig, reifen fokale Komplexe als Antwort auf Myosin II-vermittelte Zugkräfte weiter zu fokalen Adhäsionen (Clark et al., 1998). Gegebenenfalls können in einem weiteren Schritt aus fokalen Adhäsionen fibrilläre Adhäsionen entstehen.

Fibrilläre Adhäsionen sind $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vermittelte, elongierte Adhäsionen, die eng mit dem Aufbau der FN-Matrix assoziiert sind und im hohen Maße das Adapterprotein Tensin aufweisen (Pankov et al., 2000; Zamir et al., 2000). Neben Myosin-II beeinflusst auch die Aktinorganisation die Reifung der Zell-Matrix-Adhäsionen (Choi et al., 2008; Oakes et al., 2012; Stricker et al., 2013). Der retrograde Aktinfluss korreliert dabei direkt mit dem Wachstum der Zell-Matrix-Adhäsionen (Thievensen et al., 2013).

Auch wenn die verschiedenen Typen der Zell-Matrix-Adhäsionen untereinander differenzierbar sind, stellen sie ein Kontinuum dar, in dem es einen fließenden Übergang gibt und sich verschiedene Adhäsions- und Signalproteine in ihrer Anwesenheit überlappen (Parsons et al., 2010; Zamir and Geiger, 2001).

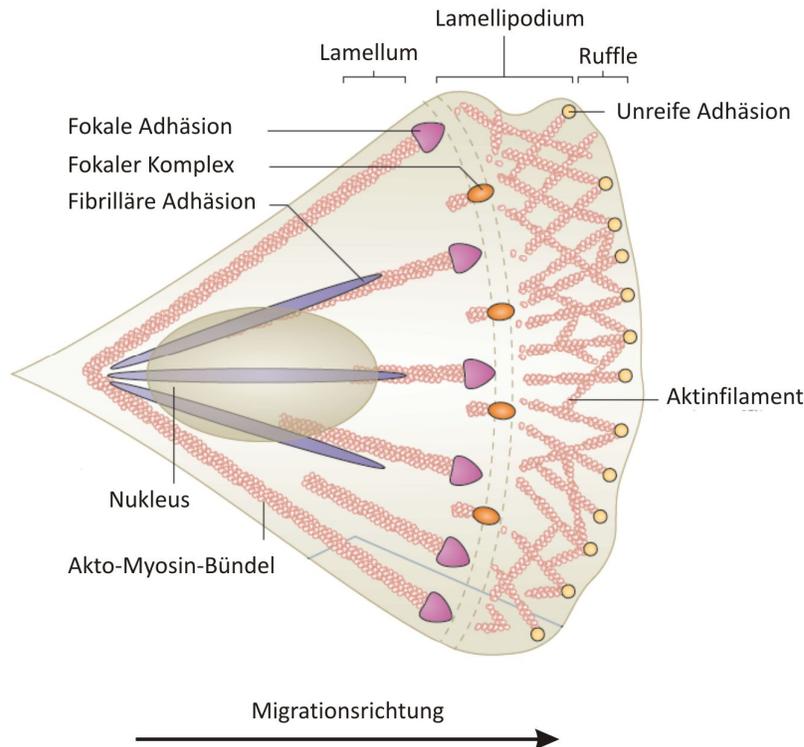


Abbildung 1.1: Integrin-vermittelte Adhäsionsreifung

An der Zellfront einer migrierenden Zelle tragen verzweigte Aktinfilamente zur Entstehung eines Lamellipodiums bei. Unabhängig von Myosin II und unter niedriger RhoA-Aktivität bilden sich an der Zellfront zuerst unreife Adhäsionen die FAK und Paxillin enthalten. Diese werden entweder abgebaut oder reifen weiter zu fokalen Komplexen. Fokale Komplexe sind am Übergang von Lamellipodium und Lamellum lokalisiert und sind über diverse Adapterproteine wie Talin, Vinculin und α -actinin mit dem Aktinzytoskelett verbunden. Ihre Reifung ist Myosin-II-abhängig und wird durch eine hohe RhoA-Aktivität gefördert. Eine weitere Reifung der fokalen Komplexe führt zu fokalen Adhäsionen mit zusätzlichen Adapterproteinen wie Zyxin und VASP. Schlussendlich können aus diesen fibrilläre Adhäsionen hervorgehen, in denen Tensin vorhanden ist und die in die FN-Fibrillogenese involviert sind. Modifiziert nach (Bouvard et al., 2013).

Für die Zellmigration ist neben der Ausbildung von Integrin-vermittelten Zell-Matrix-Adhäsionen auch der Abbau spezifischer Adhäsionen am Zellende notwendig, um eine Fortbewegung der Zelle zu ermöglichen. Zellen, die verschiedene Integrine exprimieren, welche mit demselben Liganden interagieren, können dabei gezielt die Aktivität bestimmter Integrine herunterregulieren, um auf die Interaktion mit der EZM Einfluss zu nehmen.

1.5 Integrine

Die Interaktion von Zellen mit ihrer Umgebung wird durch verschiedene Klassen von Zelladhäsionsrezeptoren vermittelt. Während Zell-Zell-Interaktionen hauptsächlich durch die Familie der Cadherine sichergestellt wird (Oda and Takeichi, 2011), werden Interaktionen zwischen Zellen und der umliegenden EZM entscheidend durch die Familie der Integrine reguliert. Die Integrin-vermittelte Adhäsion an die EZM stellt eine wichtige physikalische Schnittstelle zwischen der EZM und dem intrazellulären Zytoskelett dar. Diese dient nicht nur als Ankerpunkt für die Zelle während der Translokation, sondern sie ist zudem unerlässlich für die Weiterleitung mechanischer Zugkraft, welche durch die Aktin-/Myosin-Kontraktilität generiert wird. Neben der strukturellen Verbindung spielt auch die Signaltransduktion in Adhäsionen eine bedeutende Rolle.

Integrine sind heterodimere, transmembrane Rezeptoren, die eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Prozessen, wie der Zellproliferation und Migration, aber auch in pathologischen Prozessen, wie der Tumordinvasion oder bei Entzündungen, spielen. Der Name „Integrin“ bezieht sich auf dessen Funktion, die Umgebung, also das Exterieur der Zelle, mit dem Interieur zu integrieren. Seit ihrer Beschreibung als Integrine vor 27 Jahren gehören sie zu den am besten verstandenen Zelladhäsionsrezeptoren (Hynes, 1987). Sie sind von niederen Organismen wie Schwämmen bis hin zu Menschen hoch konserviert. Ihre funktionelle Redundanz hat dabei während der Evolution zugenommen (Burke, 1999; Hynes and Zhao, 2000). Da sich Integrine auf das Taxon der Metazoa beschränken, existieren in Pflanzen oder Pilzen keine Gene für tierische Integrine. Studien zeigen jedoch, dass es in Pflanzen Integrin-ähnliche Proteine gibt, welche die Adhäsion zwischen Plasmamembran und Zellwand vermitteln (Faik et al., 1998; Knepper et al., 2011; Sun et al., 2000). Auch in Hefepilzen wie *Candida albicans* gibt es Integrin-ähnliche Proteine wie F-CAM, welches der Hefe dazu verhilft, am Wirt zu adhären (Tronchin et al., 1991).

Integrine bestehen aus 1600 Aminosäuren. Der Großteil umfasst die extrazelluläre Domäne, die Liganden, wie FN und VN, bindet. Die zytoplasmatische Integrindomäne ist mit jeweils 20-50 Aminosäuren vergleichsweise kurz und bildet über diverse Adapterproteine eine Verbindung zu zytoskeletalen Elementen (Hynes, 2002). Diese Adapterproteine sind für die Signaltransduktion von großer Bedeutung, da Integrine keine eigene enzymatische Aktivität aufweisen. Auf der Zelloberfläche befinden sich Integrine in einer von drei möglichen Konformationen: gebeugt inaktiv, aufgerichtet und vollständig aktiviert. Die Informationsweiterleitung erfolgt bei Integrinen bidirektional über die Plasmamembran: neben einer *outside-in*, existiert eine *inside-out* Signaltransduktion, die räumlich und zeitlich strikt reguliert werden muss (Hynes, 2002). Die *outside-in* Signaltransduktion beschreibt die

Wirkung von extrazellulären Kräften auf den Kopfbereich von Integrinen, was zu einer Verstärkung der Integrinaktivität, zum *Clustering*, zum Wachstum von Zell-Matrix-Adhäsionen und zum Umbau des Zytoskeletts führt. Bei der *inside-out* Signaltransduktion wird die Bindung der Integrine an die EZM durch Aktin-/Myosin-vermittelte Kräfte verstärkt und durch intrazelluläre Adapterproteine reguliert (Choquet et al., 1997; Friedland et al., 2009; Roca-Cusachs et al., 2012).

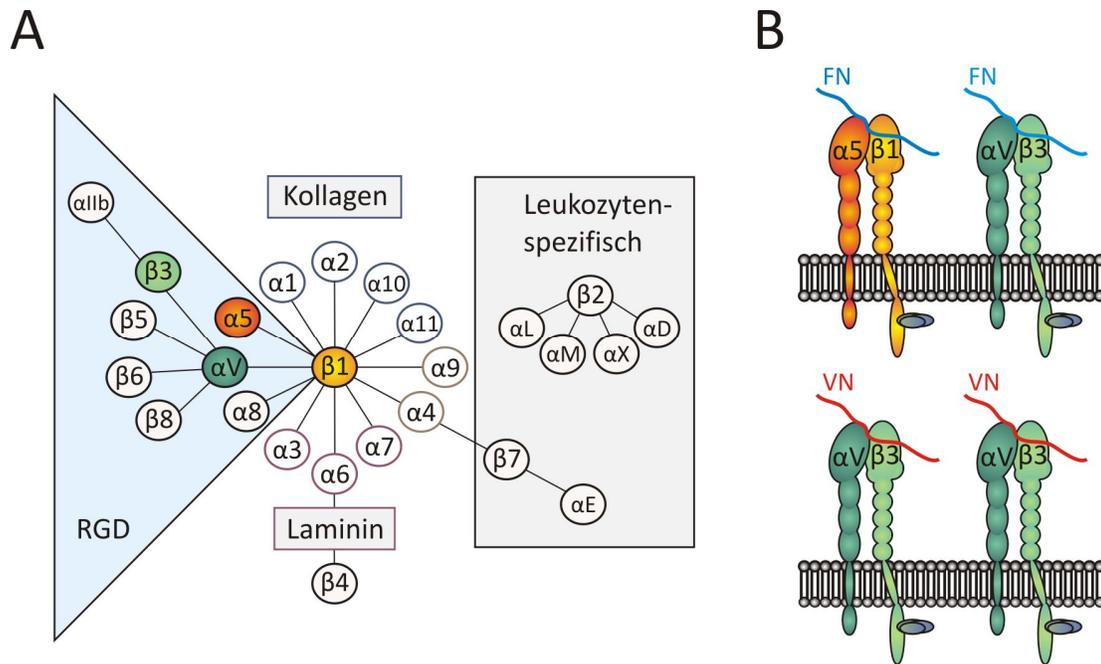


Abbildung 1.2: Die Integrin-Familie

[A] Dargestellt ist die Integrinfamilie der Vertebraten mit ihren 18 α und 8 β Untereinheiten. Diese 24 Integrine können in vier Untergruppen eingeteilt werden: RGD-Rezeptoren, Laminin-Rezeptoren, Kollagen-Rezeptoren und Leukozytenspezifische-Rezeptoren. Die Farbcodierung der α -Domäne zeigt die evolutionäre Verwandtschaft und gibt den bevorzugten Liganden an. Farblich in orange und grün hervorgehoben, sind die Integrine $\alpha5\beta1$ und $\alpha V\beta3$, mit der sich diese Arbeit näher beschäftigt und die in **[B]** detaillierter dargestellt sind. Hier gezeigt ist die Interaktion der beiden Integrine mit FN (oben) und VN (unten). Während $\alpha5\beta1$ - und $\alpha V\beta3$ -Integrin mit FN interagieren können, kann nur $\alpha V\beta3$ -Integrin mit VN interagieren. **[A]** wurde modifiziert nach (Hynes, 2002).

Die 24 in Vertebraten bekannten Integrine setzen sich aus 18 α - und 8 β -Untereinheiten zu Heterodimeren zusammen. Die Kombination der Integrinuntereinheiten entscheidet dabei über die Ligandenspezifität. Die Erforschung von Integrinen wird dadurch erschwert, dass mehrere Integrine überlappende Ligandenspezifitäten und manche Liganden überlappende Rezeptorspezifitäten aufweisen können (van der Flier and Sonnenberg, 2001). Integrine lassen sich, basierend auf ihrer Ligandenspezifität, ihrer Expressionsspezifität und ihrer evolutionären Verwandtschaft, in vier Gruppen einteilen: RGD-Rezeptoren, Kollagen-Rezeptoren, Laminin-Rezeptoren und Leukozytenspezifische-Rezeptoren (s. Abbildung 1.2 A). Obwohl Laminine und Kollagene vergleichbar mit FN und VN ebenfalls über eine RGD-

Bindestelle verfügen, ist diese normalerweise kryptisch und unzugänglich (Humphries, 1990; Plow et al., 2000; van der Flier and Sonnenberg, 2001).

Die bedeutendsten Integrine für eine Adhäsion auf FN sind $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrin aus der Gruppe der RGD-Rezeptoren (s. Abbildung 1.2 B). Nur ein Doppel-*Knockout* von $\alpha 5$ -Integrin zusammen mit αV -Integrin kann einen embryonal letalen *Knockout* von FN nachahmen (Yang et al., 1999). Dies zeigt, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrin zwar der Hauptrezeptor für FN ist, $\alpha V\beta 3$ -Integrin jedoch ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Während $\alpha 5\beta 1$ -Integrin ein spezifischer FN Rezeptor ist, kann $\alpha V\beta 3$ -Integrin eine Vielzahl von weiteren Liganden, wie z.B. FN, VN und Fibrinogen binden. Es gilt dabei jedoch als der Hauptrezeptor für Interaktionen mit VN (Horton, 1997). Einige Studien haben sich bereits mit diesen zwei Integrinkombinationen beschäftigt. Die meisten wurden allerdings auf homogen beschichtetem Substrat und dabei mehrheitlich auf FN und nicht auf VN erhoben.

Inaktivierung von Integrinen

Eine kontrollierte Aktivierung von Integrinen ist eine wichtige Voraussetzung für den korrekten Ablauf biologischer Vorgänge. Ist diese Aktivierung beeinträchtigt, können Krankheiten wie Blutungsstörungen oder Immunabwehrschwäche die Folge sein (Hogg and Bates, 2000). Im Gegensatz dazu führt eine Überaktivierung zu Thrombose, Krebs und chronischen Entzündungen (Moser et al., 2009a; Shattil et al., 2010). Deshalb ist nicht nur die Aktivierung von Integrinen räumlich und zeitlich streng kontrolliert, auch die Inaktivierung ist keinesfalls ein passiver Zustand, sondern unterliegt ebenfalls einer aktiven Abwicklung. In nicht-adhären Zellen, wie zirkulierenden Thrombozyten, ist es obligatorisch, dass Integrine wie $\alpha IIb\beta 3$ inaktiv bleiben und nur durch extrazelluläre Stimulation aktiviert werden. Eine Aktivierung hätte eine Bindung von Fibrinogen aus dem Plasma, eine Aggregation und somit eine Thrombose zur Folge (Bouvard et al., 2013). In der Vergangenheit lag der Schwerpunkt der Forschung auf der Untersuchung der Integrinaktivierung, während über Proteine, die an der Inaktivierung beteiligt sind, kaum etwas bekannt ist. In den letzten Jahren gewann die Integrininaktivierung an Aufmerksamkeit, wodurch einige negative Regulatoren bekannt wurden, deren Mechanismen man in drei Klassen unterteilen kann: i) Eingriff in die *Clasp* Interaktion, ii) Abnahme der Integrinmenge an der Plasmamembran durch Modifizierung des Integrintransports und iii) Konkurrenz mit den Adapterproteinen Talin und Kindlin um die Bindung an die zytoplasmatische Integrindomäne (Pouwels et al., 2012). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem dritten Mechanismus. Die direkte Inhibierung der Integrinaktivierung erfolgt über die spezifische Bindung von Proteinen an die zytoplasmatische α - oder β -Domäne (Liu et al.,

2000). Negative Regulatoren der β -Domäne sind unter anderem Filamin und ICAP-1 (Kiema et al., 2006).

Der zytoplasmatische β 1-Integrin Inhibitor ICAP-1

Zytoplasmatische β -Integrindomänen verfügen über zwei sogenannte NPXY (Asparagin-Prolin-X-Tyrosin) Motive. Während das proximale NPXY Motiv bei der Bindung von Talin eine Rolle spielt, ist das distale Motiv in die Bindung von Kindlin involviert (Anthis et al., 2009; Margadant et al., 2012). Hierbei interagieren sie mit Proteinen, die eine Phosphotyrosin-Bindedomäne (PTB-Domäne) aufweisen, das zu einer Integrinaktivierung führen kann (Calderwood et al., 2003; O'Toole et al., 1995).

ICAP-1 (*Integrin cytoplasmic domain-associated protein 1*) ist ein zytoplasmatischer β 1-Integrin Inhibitor und besteht aus 200 Aminosäuren, die in zwei separate Domänen unterteilt werden können: Während das kurze N-terminale Ende reich an Serin/Threoninresten und Konsensusseiten für Proteinkinasen ist, enthält das C-terminale Ende eine PTB-Domäne, über die es mit dem distalen NPXY Motiv der β -Domäne interagiert (Chang et al., 2002). ICAP-1 konkurriert somit mit Kindlin um die Bindung an die zytoplasmatische β 1-Domäne von Integrin (Bouvard et al., 2003). Durch die fehlende Kindlinbindung bleibt eine Talin-abhängige Integrinaktivierung aus (Moser et al., 2009b). Studien haben gezeigt, dass ICAP-1 spezifisch an β 1- und nicht an β 3-Integrin bindet. Ausschlaggebend für diese Spezifität soll die Aminosäure Valin sein, die sich bei β 1-Integrin proximal des distalen NPXY Motivs befindet. Anstelle von Valin weist β 3-Integrin dort die Aminosäure Threonin auf (Bouvard et al., 2006; Chang et al., 1997).

Interessanterweise ist ein Verlust von ICAP-1 nicht embryonal letal, was in der Vielzahl von Integrinaktivatoren liegen könnte, welche möglicherweise einen Verlust kompensieren können. Aufgrund der veränderten Funktion der Osteoblasten beschränken sich phenotypische Auswirkungen auf Kleinwüchsigkeit und kraniofaziale Dysmorphien. ICAP-1 *Knockout*-Mäuse zeigen zudem Störungen in der Proliferation von Osteoklasten (Bouvard et al., 2006). Wie sich ein Verlust von ICAP-1 auf das Migrationsverhalten von Präosteoblasten auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten auswirkt, wird in dieser Arbeit in Kapitel 3.3.5 näher untersucht.

Die Acetylierung von Lysin

Viele zelluläre Funktionen werden durch reversible posttranslationale Modifikationen reguliert. Neben zahlreichen identifizierten Modifikationen, wie der Phosphorylierung, der

Methylierung und der Glykosylierung, ist die Acetylierung hauptsächlich durch die Regulierung der Genexpression bekannt (Uy and Wold, 1977). Viele Jahrzehnte lang war der Begriff Acetylierung gleichbedeutend für die Acetylierung von Lysin an Histonen. Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass die Mehrzahl der acetylierten Proteine nicht nuklear lokalisiert sind (Choudhary et al., 2009). Die Erforschung der Acetylierung erfolgt jedoch im Gegensatz zur später entdeckten Phosphorylierung um ein Vielfaches langsamer. Während es 20 Jahre dauerte, bis das erste, nicht nukleare Zielprotein der Acetylierung, Tubulin entdeckt wurde, verstrichen weitere 12 Jahre bis zur Entdeckung der nächsten zwei Zielproteine, p53 und Tat (Gu and Roeder, 1997; L'Hernault and Rosenbaum, 1985). Acetylierung spielt eine Rolle von Bakterien bis hin zum Menschen und ist somit hoch konserviert (Kim and Yang, 2011). Bei der Acetylierung wird, mithilfe von Acetyltransferasen, eine negative Ladung an die betroffene Aminosäure, meist Lysin, angehängt. Da das Acetylierungslevel von dem Level des Kofaktors Acetyl-CoA reguliert wird, gibt es einen Metabolismus-abhängigen Wechsel des β -Integrinverhaltens, was jedoch noch unzureichend erforscht ist (Persönliche Kommunikation mit B. Wehrle-Haller)(Wellen et al., 2009; Wellen and Thompson, 2012). Neben Tubulin, p53 und zahlreichen anderen Proteinen besitzt die intrazelluläre β 1-Domäne ein acetyliertes Lysin, was sich in dieser Form an keiner anderen β -Domäne zeigen lässt (Choudhary et al., 2009). Diese Individualität ermöglicht nähere Studien zu β 1- und β 3-Integrin. In dieser Dissertation soll in Kapitel 3.3.6 untersucht werden, welchen Einfluss ein Aminosäureaustausch von Lysin-794 innerhalb der intrazellulären β 1-Domäne auf das Migrationsverhalten von Zellen auf FN-Dotgradienten hat.

1.6 Rho-GTPasen

Da Zellen *in vivo* auf verschiedenste biochemische und physikalische Eigenschaften der EZM reagieren müssen, erfordert die Zellmigration räumlich und zeitlich exakt koordinierte Signalnetzwerke. Rho-GTPasen spielen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion indem sie Signale von Rezeptoren an ihre Effektoren weiterleiten. Sie sind am besten für ihren Einfluss auf den Umbau des Aktinzytoskeletts bekannt und spielen dadurch auch eine wichtige Rolle in der Zellpolarisierung und der Migration (Etienne-Manneville and Hall, 2002). Hauptvertreter der Familie der kleinen Rho-GTPasen sind RhoA, Cdc42 (*Cell division control protein 42 homolog*) und Rac. Sie fungieren als molekulare Schalter, indem sie zyklisch zwischen zwei Aktivierungsstadien pendeln. Zum einen in einer aktiven, GTP-gebundenen Form, in der sie zahlreiche *downstream* Effektoren regulieren, zum anderen in einer

inaktiven, GDP-gebunden, Form. Rho-GTPasen werden einerseits von GAPs (*GTPase activating factor*) inaktiviert, welche die Hydrolyse von GDP zu GTP stimulieren, andererseits von GEFs (*Guanine nucleotide exchange factor*) aktiviert, welche die Freisetzung von GDP unterstützen (Overbeck et al., 1995). Inaktive Rho-GTPasen verbleiben im Zytosol durch GDIs (*Guanine nucleotide dissociation inhibitors*), die sowohl eine Membran-Assoziation als auch eine Degradierung verhindern und Rho-GTPasen zusätzlich auf diese Weise regulieren (Fukumoto et al., 1990). Die 80 verschiedenen GEFs und über 70 GAPs lassen auf eine komplexe Regulierung der Rho-GTPasen schließen. RhoA ist an der Regulierung von kontraktilem Aktin und Myosin beteiligt, was zu einer Kontraktion des Zellendes führt sowie fokale Adhäsionen und Stressfasern ausbildet (Hotchin and Hall, 1995). Rac generiert dabei hauptsächlich Lamellipodien und Membranruffles an der Zellfront, lose Aktinbündel in der Peripherie und die protrusive Kraft an der Zellfront (Ridley et al., 1992; Rottner et al., 1999). Cdc42 ist entscheidend an der Bildung von Filopodien beteiligt und stellt unter anderem den Schlüsselregulator in der Zellpolarisierung dar. Induziert durch die lokale Aktivierung von Cdc42 erfolgt die Ausbildung einer definierten Zellfront, welche für die Zellmigration unverzichtbar ist. Im Zuge dieser Zellpolarisierung erfolgt eine Relokalisierung des Golgi Apparates und des Zentrosoms sowie eine Reorganisation des Mikrotubulinnetzwerkes (Nobes and Hall, 1995; Nobes and Hall, 1999; Wu et al., 2007).

Fibroblasten auf zweidimensionalen Substraten weisen eine frühe Aktivierung von Cdc42 und Rac sowie eine verspätete Aktivierung von RhoA auf, was darauf hinweist, dass diese Rho-GTPasen getrennt voneinander reguliert werden (Price et al., 1998). Während frühe Adhäsionen abhängig von aktivem Rac sind und eine Unterdrückung der RhoA-Aktivität stattfindet, benötigt die Reifung von späteren Adhäsionen eine erhöhte RhoA-Aktivität mit einer Inhibition von Rac (Arthur et al., 2000; Price et al., 1998). Diese Regulierung wird unter anderem durch GEFs und GAPs bestimmt. GEFs, wie beispielsweise β -Pix, Vav2 und Tiam1, aktivieren Rac während des *Zellspreadings*. GAPs wie p190RhoGAP führen währenddessen Src-abhängig zur Inhibition von RhoA. Nach Bindung an FN wird die Tyrosinphosphorylierung von p190RhoGAP durch β 1-Integrin vermittelt, wohingegen Syndecan-4 die p190RhoGAP Lokalisierung steuert (Arthur et al., 2000; Bass et al., 2008). Im Anschluss an die initiale Adhäsion steigt die RhoA-Aktivität durch GEFs, wie p115RhoGEF und GEF-H1 an, während die Rac-Aktivität abnimmt (Lim et al., 2008; Miller et al., 2012). Es bilden sich RhoA-abhängige Stressfasern und fokale Adhäsionen reifen mittels ROCK-induzierter Myosin-Aktivität (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Die ansteigende RhoA-Aktivität stellt die Kontraktilität am Zellende sicher, die für die Retraktion des Zellendes während der Migration unverzichtbar ist. Die Inhibition von Rac wird unter anderem durch filGAP ausgeführt, das durch die Phosphorylierung von ROCK aktiviert wird (Jacquemet and Humphries, 2013; Ohta et al., 2006). Neben GEFs und GAPs können Rho-

GTPasen auch von Integrinen und Mikrotubuli aktiviert werden und *vice versa* auch regulativ auf diese Komponenten wirken (Clark et al., 1998; Hotchin and Hall, 1995; Nalbant et al., 2009; Price et al., 1998). Durch ihre Effekte auf verschiedenste Elemente des Zytoskeletts und Zell-Matrix-Adhäsionen regulieren Rho-GTPasen in einem komplexen Zusammenspiel verschiedene Aspekte die für die Zellmigration bedeutsam sind.

1.7 Zellmigration

Die Zellmigration beschreibt einen grundlegenden physiologischen Prozess, welcher aus der Nettobewegung des Zellkörpers resultiert und für eine Vielzahl von biologischen Vorgängen von großer Bedeutung ist. So spielt insbesondere die gerichtete Migration nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch bei der Wundheilung, der Immunüberwachung oder bei der Metastasierung eine wichtige Rolle. In multizellulären Organismen müssen sich Zellen in Gewebe einen Weg zwischen anderen Zellen hindurch bahnen, indem sie Kontakte mit ihnen eingehen, um sich selbst vorwärts bewegen zu können. *In vitro* wird die mesenchymale Einzelzellmigration in vier Schritten beschrieben: die Zellpolarisierung, die Ausbildung von Zellausläufern, die Generierung von Zugkraft und der abschließende Abbau von Adhäsionen am Zellende (Abercrombie et al., 1970). Fibroblasten migrieren, indem sie Zellausläufer bilden, mit denen sie ihre Umgebung wahrnehmen und detektieren können. Diese Zellausläufer wie Filopodien und Lamellipodien definieren die polarisierte Zellfront, die für eine Fortbewegung unverzichtbar ist. In diesen zellulären Strukturen befinden sich kleine, Integrin-reiche Adhäsionen, welche die Verankerung zum unterliegenden Substrat gewährleisten. Mithilfe der zelleigenen Aktin-/Myosin-Kontraktilität werden Kräfte generiert, mit der die Zelle über die Adhäsionen hinweg nach vorne gleiten kann. Der *turnover* der Zell-Matrix-Adhäsionen ist dabei räumlich und zeitlich streng kontrolliert (Ballestrem et al., 2000). Neue Adhäsionen entstehen an der Zellfront, während Adhäsionen am Zellhinterende abgebaut werden, um dieses während der Translokation nachzuziehen. Diese Balance zwischen Auf- und Abbau ist für die Zellmigration elementar (Abercrombie et al., 1970; Lauffenburger and Horwitz, 1996).

Haptotaxis

Unterschieden wird die Zellmigration in gerichtete und ungerichtete Migration. Bei der gerichteten Migration können die Signale, die auf die Richtung Einfluss nehmen, unterschiedlicher Herkunft sein und von einer Vielzahl von extrazellulären Signalen die entweder repulsiv oder anlockend wirken können, ausgelöst werden (Leng et al., 1999). Extrazelluläre Signale können beispielsweise in Form von gelösten oder substratgebundenen Signalen auftreten. Während es schon seit über einem Jahrhundert Studien über die Chemotaxis gibt, bei der biochemische Signale in Lösung vorliegen, ist über die Haptotaxis sehr wenig bekannt (Jennings, 1908). Die Haptotaxis beschreibt dabei die Migration entlang eines substratgebundenen Adhäsionsgradienten, der meist aus FN erzeugt wird (Carter, 1967). Haptotaxis spielt eine wichtige Rolle in der Wundheilung, bei der die Zellmigration neben löslichen Stoffen auch über das Adhäsionsprotein FN vermittelt wird. Im Granulationsgewebe ist FN sehr früh lokalisiert und induziert dort die Einwanderung von Fibroblasten in die Wunde und die Kollagensynthese (Kurkinen et al., 1980; Reese et al., 1982; Repesh et al., 1982). Mithilfe eines FN-Konzentrationsgefälles wandern neben Fibroblasten auch T-Zellen, Monozyten und andere Komponenten der Immunabwehr, in die Wunde ein (Hauzenberger et al., 1995). FN kann im Falle einer Verletzung auch von den Blutgefäßen selbst produziert werden (Clark et al., 1982). Zudem ist die Haptotaxis in die Entstehung der Hühnerretina, die Angiogenese, die Wanderung von Neuralleistenzellen, die Myogenese und in die Gastrulation bei *Xenopus laevis* involviert (Collins and Lee, 1984; Eming and Hubbell, 2011; Erickson, 1985; Gottlieb et al., 1976; Li et al., 2005; Moskal et al., 1986; Vaz et al., 2012; Winklbauer and Nagel, 1991). Herzvorläuferzellen aus Hühnerembryonen migrieren ebenfalls haptotaktisch entlang eines anterior/posterior verlaufenden FN-Gradienten zur Embryomitte hin (Linask and Lash, 1986). Neben der Entstehung von Geweben und zahlreichen Umgestaltungsprozessen, spielt die Haptotaxis auch eine Rolle in der Metastasierung von Tumorzellen (McCarthy and Furcht, 1984; McCarthy et al., 1983; Roos, 1984). Der genaue Mechanismus der Haptotaxis ist dabei noch sehr unerforscht. Verschiedene EZM-Proteine wie, Laminin, FN oder Kollagen, wurden bisher für Studien hinzugezogen und zelluläre Reaktionen untersucht. So konnte gezeigt werden, dass sich Zellen wie, Fibroblasten, Osteoblasten oder Epithelzellen, morphologisch entlang der FN-Gradientenachse ausrichten und migrieren (Arnold et al., 2008; Hirschfeld-Warneken et al., 2008; Kang et al., 2004; Smith et al., 2006; Smith et al., 2009). Werden Neurone auf Laminin-Gradienten kultiviert, orientieren sie ihre Axone in Richtung höherer Bedeckung (Adams et al., 2005; Dertinger et al., 2002). Die meisten Studien zur Haptotaxis wurden jedoch mithilfe von kontinuierlichen Adhäsionsgradienten erhoben. Hierbei entspricht die homogene Verteilung der Proteine jedoch nicht der *in vivo* Situation, in der die Proteine räumlich

geometrisch verteilt vorliegen. Diese geometrische Verteilung der Kontaktpunkte ist der Grund für den Einsatz von mikrostrukturierten Dotgradienten.

1.8 Der Einsatz strukturierter Substrate

Innerhalb der EZM sind Zellen in einer strukturierten Umgebung eingebettet. Nicht nur biochemische Signale beeinflussen das Zellverhalten, sondern insbesondere physikalische und mechanische Eigenschaften der EZM wie Steifheit, Topografie und geometrische Verteilung von Glykoproteinen. In klassischen Zellexperimenten auf homogenen Substraten fehlen diese Eigenschaften der strukturierten Umgebung, die einen großen Einfluss auf das Zellverhalten und die Zellarchitektur haben. Mikrostrukturierte Substrate können deshalb eine *in vivo* Situation auf vereinfachter Ebene besser simulieren (Bell et al., 1979). Erste Studien zur Zellmigration auf definierten Substraten wurden bereits 1914 auf Fasern aus Spinnenweben durchgeführt, um die Bedeutung eines strukturierten Substrates zu postulieren (Harrison, 1914). Heutzutage gibt es eine Vielzahl an Methoden, um strukturierte Substrate herzustellen. Dabei basieren die meisten auf dem Grundprinzip ein EZM-Protein oder deren funktionelle Homologe auf Trägermaterialien wie Glas- oder Goldsubstrate aufzubringen, an welche Zellen dann adhären können. Die strukturierten Substrate können dabei zwei- oder dreidimensional sein, wobei sich gezeigt hat, dass eine Aussage über die gezielte geometrische Verteilung der Proteine in 3D schwer ist (Lehnert et al., 2004). Bekannte Methoden zur Herstellung von 2D-Substraten sind z.B. photolithographische Techniken oder das *Microcontact-printing* (Mrksich et al., 1996; Sorribas et al., 2002). Das *Microcontact-printing* findet, aufgrund des positiven Gleichgewichts zwischen einer einfachen und kostengünstigen Methode zur Erstellung mikrostrukturierter Substrate, bis heute noch Anwendung. Kombiniert mit der Gold-Thiol-Chemie findet diese Methode auch in der hier vorliegenden Arbeit Einsatz. Mit dieser Methode wird ein geometrisches Muster eines strukturierten, mit einem hydrophoben Thiol beschichteten PDMS-Stempels, auf ein goldbedampftes Deckglas aufgebracht. Bereiche, auf denen keine Zellkontakte ausgebildet werden sollen, werden mithilfe eines zweiten hydrophilen Thiols in antiadhäsive Bereiche verwandelt. In einem abschließenden Schritt wird das Deckglas mit einer Proteinlösung inkubiert, bei der die Proteine selektiv an das geometrisch vorliegende hydrophobe Thiol binden. Das *Microcontact-printing* ermöglicht, die Bedingungen der Zellexperimente vielfältig zu variieren. So kann nicht nur der Abstand zwischen Mikroinseln variiert werden, sondern auch die Größe und die Form der Zelladhäsionsmuster. Diese Geometrie der EZM-Proteine

kann dabei das Zellverhalten und die Zellmorphologie stark beeinflussen. Vergleicht man das Aktinzytoskelett zwischen Zellen auf homogenem Substrat und jenen auf strukturiertem Substrat wird deutlich, dass die unterliegende Substratgeometrie das Zytoskelett beeinflusst, indem es in Richtung des Dotgradienten ausgerichtet ist. Dies rührt vor allem von der geometrischen Limitation der Zelladhäsionskontakte her, die nun räumlich konzentrierter vorliegen, als dies willkürlich verteilt auf homogenem Substrat der Fall ist (Autenrieth, 2012). Auch der Abstand von Mikroinseln kann Einfluss auf das Zellverhalten nehmen. Studien haben gezeigt, dass Zellen kleine Mikroinseln bis zu einem Abstand von 20 μm annehmen und sich zwischen ihnen aufspannen. Bei einem größeren Abstand adhärieren sie lediglich auf einer einzigen Insel. (Chen et al., 1997; Lehnert et al., 2004). Nicht nur das Aufspannen zwischen Mikroinseln, auch die Zellmigration wird durch die Geometrie der Mikrostrukturen beeinflusst. Ändert man bei Dotgradienten die Dotmorphologie von quadratisch zu rechteckig, migrieren die Zellen nicht mehr präferiert uphill, sondern lateral. Werden die Kantenlängen der Dots von 2 μm auf 3.5 μm vergrößert, führt dies zu einer Einstellung der Migration (Autenrieth, 2012). Nicht nur entlang von Dots findet eine Migration statt, auch FN-Linien können eine gerichtete Migration induzieren (Doyle et al., 2009). Dies zeigt, dass die Proteingeometrie strukturierter Substrate einen großen Einfluss auf das Zellverhalten haben kann.

In vorliegender Arbeit wird die Zellmigration auf mikrostrukturierten Dotgradienten untersucht. Hierbei bilden Zellen Zell-Matrix-Adhäsionen auf den Protein-Dots aus, die mit dem Aktinzytoskelett verknüpft sind. Durch diese Verbindung können Kräfte der Aktin-/Myosin-Kontraktilität effektiv auf das Substrat übertragen werden. Die Zelle kann an den einzelnen Adhäsionskontakten Kräfte entwickeln, die durch die asymmetrische Verteilung der Dots innerhalb des Gradienten eine asymmetrische Kräfteverteilung im Zellinneren bewirkt (Roca-Cusachs et al., 2009).

1.9 Zielsetzung

Vorhergegangene Studien unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass primäre Hühnerfibroblasten einen mikrostrukturierten FN-Dotgradienten erkennen und zu 80% in Richtung der höheren Bedeckung migrieren. Dabei messen sie die FN-Menge des Gradienten nicht nur zu Beginn der Migration, sondern kontinuierlich während der gesamten Fortbewegung. Die initiale Zellpolarisierung auf dem Dotgradienten ist für die Haptotaxis von zentraler Bedeutung. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass für eine unidirektionale, haptotaktische Migration ein funktionelles Aktin-/Myosin- und Mikrotubulisystem unverzichtbar ist (s. Abbildung 1.3 A).

Wird das Aktin-/Myosin-System einer Zelle mit Y-27632 oder Blebbistatin behandelt, führt dies zu einer ungerichteten Migration auf FN-Dotgradienten. Da die Zellen den Dotgradienten nicht mehr erkennen können, migrieren sie gleichwertig in jede Richtung: uphill, downhill und lateral (s. Abbildung 1.3 C).

Greift man in das Mikrotubulisystem ein, indem Zellen mit Taxol oder Nocodazol behandelt werden, migrieren Fibroblasten zu gleichen Teilen uphill und downhill. Die Zellen sind noch in der Lage, den Gradienten zu erkennen, können dabei aber nicht mehr zwischen hoher und niedriger Proteinbedeckung unterscheiden.

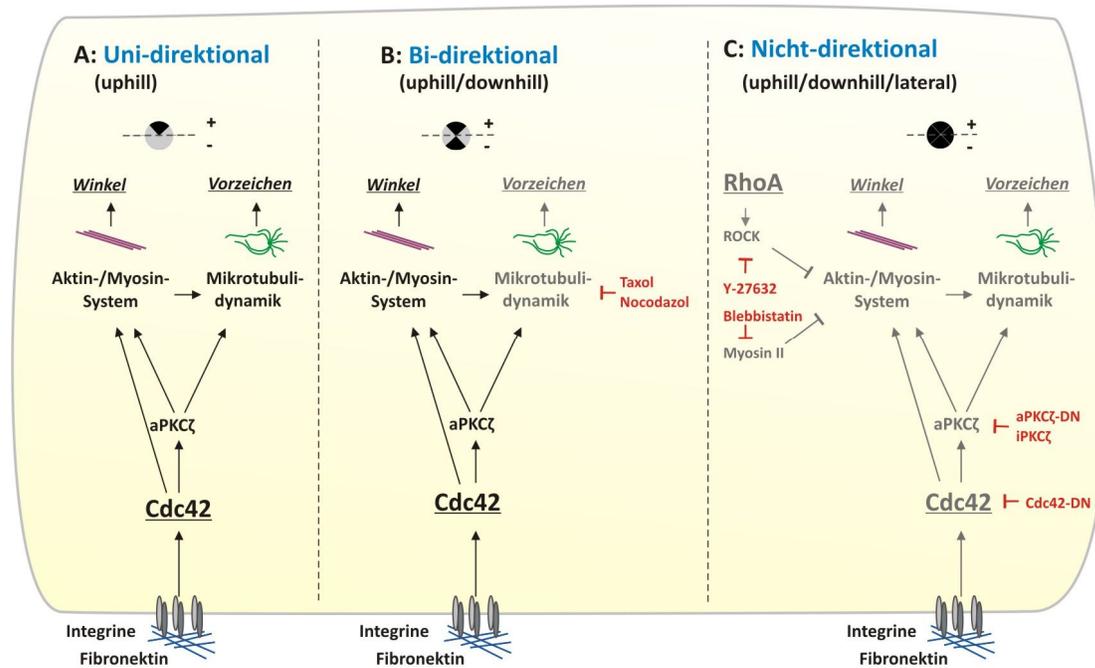


Abbildung 1.3: Modell zur Haptotaxis

[A] Um unidirektional in Richtung der höheren FN Bedeckung (uphill/+) migrieren zu können, ist ein funktionelles Zusammenspiel des Aktin-/Myosin- und Mikrotubulsystems unverzichtbar. **[B]** Durch die Zugabe von Taxol und Nocodazol erfolgt ein Eingriff in das Mikrotubulsystem, das in einer bidirektionalen Migration resultiert. Die Zellen können die Gradientenachse erkennen, jedoch nicht mehr zwischen höherer und niedrigerer Bedeckung differenzieren. Dies resultiert in einer uphill (+) und downhill (-) Migration. Dieser Effekt lässt daraus schließen, dass das Aktin-/Myosin-System durch die Erkennung der Gradientenachse den Winkel bestimmt und das Mikrotubulsystem die Entscheidung für das Vorzeichen der Migration festlegt. **[C]** Ein Eingriff in das Aktin-/Myosin-System durch die Beeinträchtigung von ROCK, Myosin II oder Cdc42 und deren Effektor PKC ζ resultiert in einer ungerichteten Zellmigration. Die Zellen wandern in uphill, downhill und lateraler Richtung. Diese ungerichtete Migration lässt vermuten, dass das Aktin-/Myosin-System das Mikrotubulsystem beeinflusst, da ansonsten eine Entscheidung über das Vorzeichen zu erwarten wäre. Modifiziert nach (Autenrieth, 2012).

Die Beeinträchtigung des Mikrotubulsystems resultiert somit in einer bidirektionalen Migration (s. Abbildung 1.3 B). Hierbei wurden stets niedrige Inhibitorkonzentrationen eingesetzt, um die Dynamik etwas herabzusetzen und nicht vollständig zu inhibieren. Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass die intrazelluläre Zugkraftentwicklung für die Erkennung der Gradientenachse von zentraler Bedeutung ist und damit die

Winkelentscheidung bei der Migration auf FN-Dotgradienten übernimmt. Die Mikrotubuli-Dynamik entscheidet hingegen über das Vorzeichen (+/-) der Migration, da die Zellen nach der Störung ihrer Mikrotubuli-Dynamik sowohl uphill (+) als auch downhill (-) migrieren. Wird die Aktin-/Myosin-Kontraktilität gestört, migrieren die Zellen ungerichtet. Dies lässt vermuten, dass das beeinträchtigte Aktin-/Myosin-System einen direkten Einfluss auf die Mikrotubuli-Dynamik hat, da die Zellen ansonsten nur in y-Richtung migrieren würden. Das aktuelle Modell der Haptotaxis zeigt demnach, dass Zellen den Gradienten initial durch die Aktin-/Myosin-Kontraktilität detektieren und darauf reagieren (Autenrieth, 2012).

Da es bislang nur sehr wenige Studien zur Haptotaxis gibt, sollen in dieser Arbeit weitere Erkenntnisse über die Migration auf FN-Dotgradienten gewonnen werden. Dazu werden zytoskelett-assoziierte Proteine pharmakologisch inhibiert und der Effekt auf die Haptotaxis untersucht. Hierbei werden Schlüsselproteine wie die Rho-GTPase Rac, der Arp2/3-Komplex, die FH2-Domäne von Forminen und die *Integrin-linked-kinase* (ILK) diversen Inhibitor-konzentrationen ausgesetzt und das Migrationsverhalten auf FN-Dotgradienten quantifiziert. Frühere Studien haben zudem gezeigt, dass das Mikrotubulinetzwerk eine wichtige Rolle in der Haptotaxis spielt. Experimente dieser Arbeit befassen sich deshalb, mit der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli. Hierbei soll analysiert werden, inwieweit sich die Mikrotubuli-Dynamik in migrierenden und stationären Zellen abhängig von der unterliegenden Substratgeometrie unterscheidet und welchen Einfluss sie auf die Haptotaxis hat.

Die Haptotaxis ist eine Integrin-vermittelte Art der Migration, bei welcher Integrine die bidirektionale Signaltransduktion zwischen dem Zytoskelett und den EZM-Liganden sicherstellen. Charakteristisch für Integrine sind eine häufig überlappende Ligandenspezifität, sowie für einige Liganden eine überlappende Rezeptorspezifität. Um tiefere Einblicke in die Regulation der Integrin-vermittelten Migration auf FN-Dotgradienten zu erhalten, soll in dieser Arbeit untersucht werden, welchen Einfluss die mit FN interagierenden Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$ auf die directionale Migration in adhäsiven Dotgradienten haben. Hierfür werden diverse *Knockout*-Zelllinien verwendet, die den Effekt der einzelnen Domänen auf die Migration zum Ausdruck bringen und interessante Einblicke ermöglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Lösungsmittel und Chemikalien

Tabelle 2.1: Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien <wird fortgesetzt>

Name	Angaben	Hersteller
Ammoniak	>25%	Carl Roth
Ampicillin		Carl Roth
Bovines FN	From bovine plasma; Lyophilisat in ddH ₂ O; 1 mg/ml Stock	Sigma-Aldrich
<i>Chicken serum</i>		Life Technologies
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	high glucose	Life technologies / Pan biotech
Ethanol	99,8%	Carl Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	5% in HBSS	Life Technologies
Ethylenglycol-3-O-Mercaptan (EG ₃ -OMe)	1 mM in EtOH	Prochimia
Ethylenglycol-6-O-Mercaptan (EG ₆ -OMe)	2,5 mM in EtOH	Prochimia
<i>F-12 Nutrient Mixture Kaighn's Modification</i>		Life Technologies
Fetales Kälberserum	10% v/v in DMEM	HyClone
Fibronektin	From human plasma; Lyophilisat in ddH ₂ O, 1 mg/ml Stock	Sigma-Aldrich
Gentamycin	0,02 mg/ml	Sigma-Aldrich
Glutaraldehyd	Gelöst in PBS	Sigma-Aldrich
<i>Hanks balanced salt solution</i>	(HBSS)	Life Technologies
Isopropanol	99,9%	Carl Roth
Kanamycin		Carl Roth

Name	Angaben	Hersteller
L-Glutamin	200 nM	Life Technologies
LB Medium	5 g Pepton, 2.5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in 500 ml ddH ₂ O	Carl Roth
Lipofectamine 2000		Life technologies
Methanol	99,9%	Carl Roth
Mowiol	20%	Hoechst
Natriumhydrogencarbonat		Carl Roth
n-Propylgallat	In Mowiol	Sigma-Aldrich
Octadecylmercaptan (ODM)	1,5 mM in EtOH	Sigma-Aldrich
OptiMEM		Life technologies
Paraformaldehyd	4% in PBS	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	10 U/ml	Life technologies
<i>Phosphate buffered saline</i>	1x, (-)Ca ²⁺ , (-)Mg ²⁺	Pan Biotech
Plasmid Plus Midi Kit		Qiagen
Plasmid QIAprep Spin	Miniprep Kit	Qiagen
Polydimethylsiloxan: Sylgard 184	1:9	Dow Corning
Puromycin	10 µg/ml in DMEM	
Salpetersäure	>65%	Carl Roth
Schwefelsäure	>95%	Carl Roth
Stickstoff	Reinheit 5.0	Linde
Triton X-100	0,1% in PBS	Carl Roth
Trypanblau	1:2	Carl Roth
Vitronektin	From human plasma; Lyophilisat in ddH ₂ O; 50 µg/ml Stock	Sigma-Aldrich
Wasserstoffperoxid	>30%	Carl Roth

Fortsetzung

Zusammensetzung des F12-Mediums

Tabelle 2.2: Zusammensetzung des F12-Mediums

Komponente	Volumen	Bemerkung	Hersteller
200 mM L-Glutamin	10 ml	2 mM	Life Technologies
<i>Chicken Serum</i>	20 ml	2% V/V	Life Technologies
F12 nutrient mixture	10,63 g		Life Technologies
Fetales Kälberserum	100 ml	10% V/V	Thermo Scientific
Gentamycin	0,4 ml	1:2500	Sigma-Aldrich
Natriumhydrogencarbonat	1,176 g	≥99,9%	Carl Roth
Penicillin/Streptomycin	2 ml	10 U/ml; 1:500	Sigma-Aldrich
Steriles TKA H ₂ O	700 ml		

2.2 Herstellung mikrostrukturierter Dotgradienten

Mikrostrukturierte FN-Dotgradienten ermöglichen es, gerichtete Zellmigration zu induzieren und zu analysieren. Hergestellt werden die mikrostrukturierten Substrate mithilfe des indirekten Proteinstempels (*Microcontact-Printing*) (Mirsich and Whitesides, 1996). Diese Methode basiert auf der Gold-Thiol-Chemie, bei der über einen Stempelvorgang hervorstehender Silikonstrukturen, ein geometrisches Muster auf ein goldbedampftes Deckglas übertragen wird. Die Silikonstrukturen werden dabei zuvor mit einem hydrophoben Thiol inkubiert. Durch anschließende Bedeckung der Deckgläser mit einem hydrophilen Thiol, sorgt dessen passivierende Eigenschaft für die Entstehung von antiadhäsiven Bereichen zwischen den gestempelten Strukturen. Im nächsten Schritt erfolgt die Proteinbeschichtung, bei der das gewählte Protein selektiv an das gestempelte Muster des hydrophoben Thiols bindet. Zellen können nur auf diesen adhäsiven Flächen der Protein-Dots Kontakte ausbilden und migrieren.

Stempelmuster

Der verwendete Dotgradient besteht aus kleinen quadratischen Mikroinseln, sogenannten Dots, mit Kantenlängen von $2 \times 2 \mu\text{m}$. Der Abstand der Dots beträgt in x-Richtung $6 \mu\text{m}$, während die Distanz der Dotreihen in y-Richtung kontinuierlich von $20 \mu\text{m}$ auf $0 \mu\text{m}$ abnimmt. Dies ergibt eine Steigung des Adhäsionsgradienten von 6%. Bereiche mit geringen Abständen der Protein-Dots korrelieren dabei mit einer hohen Proteinbedeckung. Für die Auswertung wird der in Abbildung 2.1 durch einen grünen Rahmen dargestellte Bereich hinzugezogen, da die gegebenen Bedingungen eine effektive Zellbewegung in Richtung höherer Proteinbedeckung begünstigen.

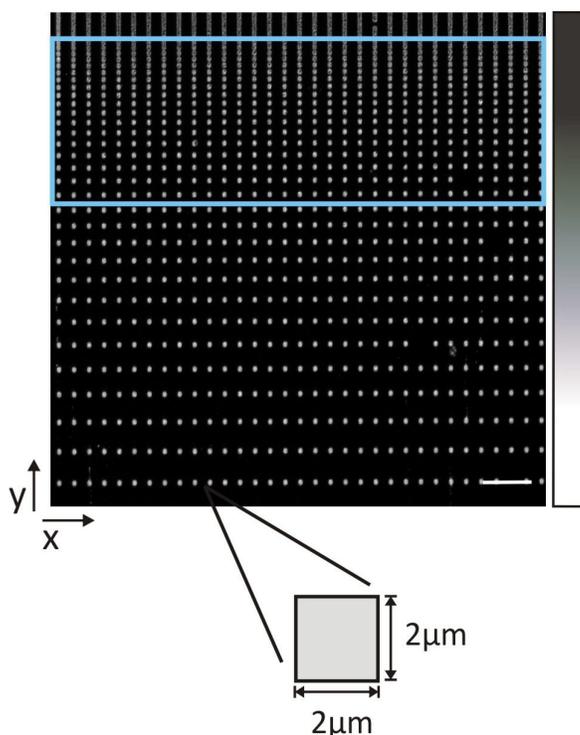


Abbildung 2.1: Übersicht des verwendeten Protein-Dotgradienten

Übersicht über die Morphologie des verwendeten Protein-Dotgradienten mit Kantenlängen der Dots von $2 \times 2 \mu\text{m}$. Mithilfe des *Microcontact-Printings* können diese adhäsiven, mikrostrukturierten Substrate erzeugt werden. Weiße Dots signalisieren die adhäsiven Bereiche an die Zellen in einem späteren Schritt binden und migrieren können. Die schwarzen Bereiche stellen die antiadhäsiven Bereiche dar auf denen keine Zellkontakte ausgebildet werden können. In y-Richtung nimmt der Abstand zwischen den Dotreihen kontinuierlich von $20 \mu\text{m}$ auf $0 \mu\text{m}$ ab während er in x-Richtung konstant bleibt. Daraus ergibt sich ein Gradient mit einer Steigung von 6%. Die höchste Proteinbedeckung des Gradienten befindet sich am oberen Bildrand, was zusätzlich durch den Gradientenbalken am rechten Bildrand dargestellt wird. Der grüne Rahmen signalisiert den Interessensbereich indem die Einzelzellen in die Auswertung einfließen. Axio Imager.Z1 40x, Maßstab $20 \mu\text{m}$.

Herstellung der Master

Die Herstellung der Master, der Abgussform für den verwendeten Silikonstempel, erfolgt in Kooperation mit Benjamin Richter, Torsten Beck und Sarah Krämmer am Institut für angewandte Physik des Karlsruher Instituts für Technologie. Mithilfe des direkten Laserschreibens können gewünschte geometrische Strukturen, wie in dieser Arbeit ein Dotgradient, invers auf Silizium erzeugt werden. Dabei wird ein Lichtstrahl, welcher im Fokus eine 2-Photonenabsorption induziert, auf ein funktionalisiertes Deckglas mit PETA, einem Fotolack, gerichtet. Durch diesen Prozess kommt es zur Polymerisierung des Lackes. Im Anschluss an eine Passivierung, die eine zu starke Haftung von Siliziummaster und verwendetem Silikon verhindert, ist der Master bereit für die weitere Verarbeitung.

Reinigung der Glasstreifen

Um einen Stempel aus einem Siliziummaster herzustellen, benötigt dieser zur Stabilisierung ein Rückgrat in Form eines Glasstreifens. Dieser 1 cm breite Glasstreifen wird aus Objektträgern mithilfe eines Diamantstiftes zurechtgeschnitten, mit Isopropanol gereinigt und mit Stickstoff getrocknet.

Herstellung der Stempel

Das im auspolymerisierten Zustand elastische Silikon dient als Abgussmaterial zur Erstellung der Stempelstruktur. Die optimale Steifheit erhält man durch Zugabe von 0,9 g Silikon und 0,1 g Aushärter. Nach einer Inkubationszeit von 20 min ist das Silikon bereit zur weiteren Verarbeitung. Ein Tropfen der frisch hergestellten Silikonmischung wird nun auf die Struktur des Siliziummasters getropft, der gereinigte Glasstreifen aufgelegt und zur Polymerisierung über Nacht bei 60 °C inkubiert. Kleine Messingklötzchen, die die Struktur zu allen Seiten stützen, verhindern ein Verrutschen des Glasstreifens. Auf den Bereich des Glasstreifens, der sich unmittelbar über der Zielstruktur auf dem Master befindet, wird ein 12 g schwerer Messingklotz gesetzt, der durch das Gewicht einen standardisierten Druck auf die Struktur ausübt und zu definierten Größen der Dots führt. Nach der Polymerisierung des Silikons wird der Glasstreifen behutsam vom Siliziummaster gelöst, wobei die eingesetzte Kraft gleichmäßig diagonal zu den Bruchkanten ausgeübt wird. Dies vermindert einen Bruch des Glasstreifens. Das Silikon, das am Glasstreifen haftet, enthält nun die inverse Zielstruktur des Siliziummasters. Vorsichtig wird in einem nächsten Schritt überschüssiges Silikon mit einer Rasierklinge rund um die Struktur entfernt, was eine lange Haltbarkeit des Stempels gewährleistet. Mithilfe eines Diamantschneiders wird der Glasstreifen so zurechtgeschnitten, dass sich die Struktur nunmehr auf einem Glasquadrat befindet. Dieses Glasquadrat wird nun mithilfe eines Zweikomponentenklebers auf einen Glaszylinder geklebt, der fortan als Haltegriff dient. Der Stempel ist nun einsatzbereit.

Reinigung und Goldbedampfung der Deckgläser

Bevor die Deckgläser mit Titan und Gold bedampft werden, müssen sie einer gründlichen Reinigung unterzogen werden. Dazu werden sie für 15 min in einer Lösung aus Ammoniak, Wasserstoffperoxid und bidestilliertem Wasser (1:1:5) auf 80 °C erhitzt und nach 15 min mit destilliertem Wasser gespült. Anschließend werden die Deckgläser in eine Haltevorrichtung überführt und mit einer Titanschicht bei einem Druck von $< 1 \times 10^{-6}$ mbar bedampft. Eine etwa 3-5 nm dicke Titanschicht dient hier als Haftvermittler für das Gold, welches anschließend in einer Stärke von ca. 20 nm bedampft wird. In dieser Arbeit wurden auch dünner bedampfte Golddeckgläser verwendet (0,5 nm Titan, 2 nm Gold), die keine funktionellen Unterschiede aufweisen. Diese dünnen Golddeckgläser haben den Vorteil, dass man im Gegensatz zu den dicken Golddeckgläsern, durch sie hindurch mikroskopieren kann. Dies ermöglicht die inverse Aufnahme von Zeitrafferaufnahmen, die sonst nur an einem aufrechten Mikroskop durchgeführt werden konnten. Im Anschluss an die Bedampfung können die Golddeckgläser für Experimente verwendet werden.

2.2.1 *Microcontact-Printing*

Das *Microcontact-Printing* mittels Gold-Thiol-Chemie ermöglicht die Herstellung mikrostrukturierter Substrate für Zellversuche. Mithilfe eines Stempels wird ein hydrophobes Thiol in geometrischer Form auf ein Golddeckglas übertragen, welches im weiteren Verlauf mit einem Protein beschichtet wird. Auf diese Weise entstehen adhäsive Flächen, an die im Zellexperiment Zellen gezielt adhäreren können. Die Bereiche zwischen dem Muster, hier ein Dotgradient, wird mithilfe eines hydrophilen Thiols passiviert, wodurch antiadhäsive Bereiche entstehen.

Zu Beginn der Prozedur wird ein Stempel vorsichtig mit Tesafilm® abgezogen, um auskristallisiertes Thiol und Staubpartikel zu entfernen. Anschließend wird der Stempel für 10 min mit reinem Ethanol überlagert. Der Stempelvorgang beginnt mit einer 20 sekündigen Inkubation des ersten Thiols, Octadecylmercaptan (ODM), in EtOH. ODM ist ein methylterminiertes, hydrophobes Alkanthiol, an welches sich später das Protein anlagert. Der Stempel wird mit Stickstoff getrocknet und vorsichtig auf das mit Ethanol gereinigte Golddeckglas gedrückt. Mit einer Pinzette wird auf der Rückseite des Golddeckglases leichter Druck ausgeübt, bis die Bildung Newton'scher Ringe einen erfolgreichen Übertrag signalisiert. Nach jedem zweiten Stempelabdruck wird die Stempelfläche erneut für 5

Sekunden mit ODM überlagert und mit Stickstoff getrocknet. Um eine selektive Proteinbindung zu gewährleisten, werden die Bereiche zwischen dem Dotgradienten mit einem hydrophilen Thiol, Ethylenglycol-6-O-Mercaptan (EG₆-OMe), in EtOH passiviert. Dazu wird das Golddeckglas in einer Feuchtekammer für 18 min mit 120 µl des Thiols überschichtet und anschließend mit Ethanol abgespült und getrocknet. Das Deckglas kann nun innerhalb der nächsten 20 Stunden für die Proteinbeschichtung verwendet werden.

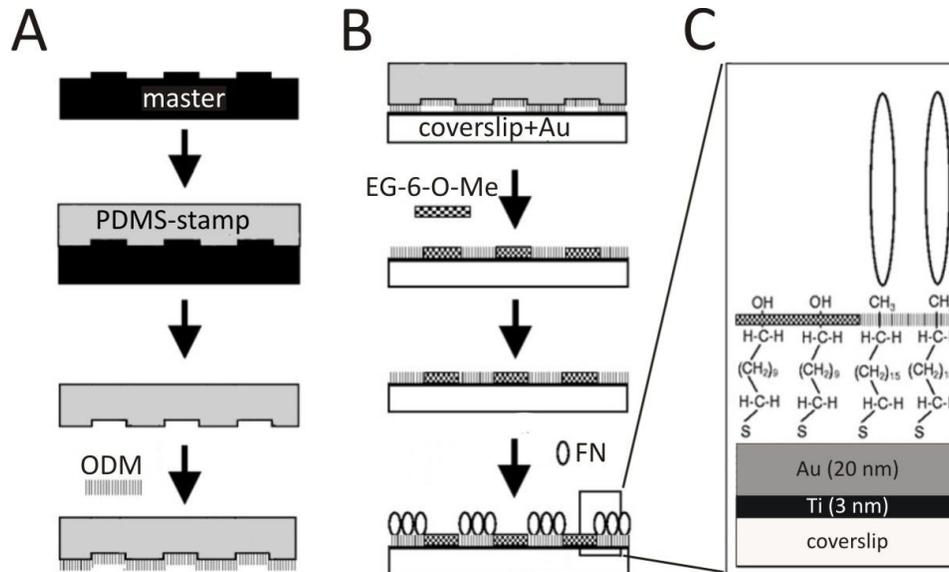


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Stempelanfertigung und des *Microcontact-Printings* mittels Gold-Thiol-Chemie

[A] Dargestellt ist die Herstellung eines PDMS Stempels (grau) aus dem inversen Muster eines Masters (schwarz). **[B]** Während des *Microcontact-Printings* wird dieser PDMS Stempel mit einem hydrophoben Alkanthiol, ODM (Octadecylmercaptan), überlagert. Durch Aufbringen des Stempels auf ein goldbedampftes Deckglas werden die Zielstrukturen über die hervorstehenden Strukturen des Stempels übertragen. Um die nicht gestempelten Bereiche für die Zelladhäsion und Proteinadsorption zu blockieren, wird das Deckglas in einem nächsten Schritt mit einem hydrophilen Alkanthiol, EG-6-OMe (Ethylenglycol-6-O-Mercaptan), überschichtet und für 18 min inkubiert. Während der anschließenden Proteinbeschichtung adsorbiert das Protein selektiv an die hydrophob terminierten Thiolstrukturen des ODM. **[C]** Detaillierte Darstellung des Aufbaus der goldbedampften Deckgläser mit Titan als Haftvermittler und Bindung der diversen Thiolen an der Goldoberfläche. Modifiziert nach (Lehnert et al., 2004).

Proteinbeschichtung

Strukturierte Substrate

Proteine der EZM binden selektiv aus der Lösung an das gestempelte ODM. Die Proteinlösung wird dafür in PBS auf die gewünschte Endkonzentration gebracht. Für strukturierte FN-Substrate wird eine Konzentration von 1 µg/ml verwendet, für VN-Substrate 3 µg/ml. 150 µl der Proteinlösung werden pro Golddeckglas in eine kleine Petrischale vorgelegt. Anschließend wird das Golddeckglas mit der Struktur nach unten blasenfrei auf die Lösung gelegt. Die Inkubation der FN-Substrate erfolgt für 60 min bei 8 °C, VN-Substrate werden für 60 min bei 37°C inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift sind die Golddeckgläser für die Aufnahme von Zellen bereit.

Homogen beschichtete Substrate

Im Unterschied zu strukturierten Substraten erfolgt die Beschichtung der homogenen Substrate auf Deckgläsern in einer 12-well Platte für 45 min bei Raumtemperatur.

Direktes Proteinstempeln

Im Gegensatz zum *Microcontact-Printing* mit Gold-Thiol-Chemie wird das Protein beim direkten Proteinstempeln ohne ein Thiol auf ein Deckglas übertragen. In diesem Experiment wird der FN-Dotgradient direkt gestempelt und die Bereiche zwischen den Dots entweder mit BSA blockiert, oder mit VN geflutet, um differenzierte FN/VN-Substrate zu erhalten. VN bindet dabei nicht an das gestempelte FN (s. Abbildung 2.3). Zur Herstellung der Substrate werden Deckgläser mit EtOH abgerieben und eine FN-Proteinlösung mit 5µg/ml in PBS angesetzt. Der Stempel wird für 10 min mit der FN-Proteinlösung inkubiert, trockengeblasen und anschließend mit dem Deckglas für 10 min in Kontakt gebracht. Eine erfolgreiche Übertragung der gestempelten Struktur wird durch Interferenzfarben an der Kontaktstelle zwischen Stempel und Deckglas sichtbar. Um dies zu erreichen, wird mit einer Pinzette auf der Rückseite des Deckglases vorsichtig Druck ausgeübt. Im Anschluss an die Inkubation wird das Deckglas vorsichtig vom Stempel getrennt und in einer Feuchtekammer auf einer hydrophoben Oberfläche platziert. Dort erfolgt nun entweder eine proteinabweisende Blockierung mit 10% BSA oder eine Übersichtung mit 5µg/ml VN für 1 h bei Raumtemperatur (Bachmann, 2015). Nach der Inkubationszeit werden die Substrate mit PBS gewaschen und sind nun für die Aufnahme der Zellen bereit.

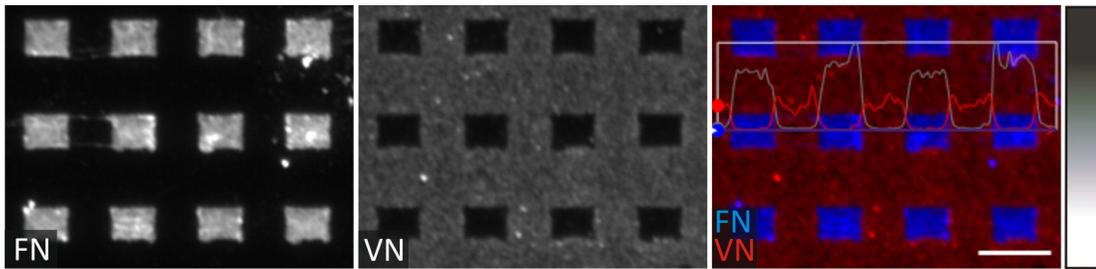


Abbildung 2.3: Direktes *Microcontact-Printing* erlaubt die Herstellung von differenziellen FN/VN-Substraten

Darstellung der Einzelkanäle eines mit direktem Proteinstempeln hergestellten Substrates. Ein PDMS-Stempel wird mit einer FN-Lösung (5 µg/ml) beschichtet und mit einem Deckglas in Kontakt gebracht. Im Anschluss wird das gesamte Deckglas mit einer VN-Lösung (5 µg/ml) überlagert. Dabei bindet VN selektiv an die Bereiche zwischen den FN-Mikrostrukturen. Diese selektive Bindung wird durch das Intensitätsprofil rechts, dargestellt. FN und VN wurden im Anschluss an den Stempelvorgang beschichtet und für FN mit Alexa Fluor 488 (blau) und für VN mit Alexa Fluor 568 (rot) angefärbt. Axio Imager.Z1, Maßstab 3 µm.

2.3 Zellkultur

Zelllinien

Tabelle 2.3: Verwendete Zelllinien, ihre Zellkulturmedien und Herkunft

Zell- linie	Zelltyp/-Ursprung	Zellkulturmedium	Herkunft
CEFs	Chicken embryonic fibroblasts	F12 + 10% FCS + 2% CS	Präparierte Primärzellen
REFs	Rat embryonic fibroblasts (REF52)	DMEM + 10% FCS	Benny Geiger, Weizmann Institut
NIH3T3	Murine Fibroblasten	DMEM + 10% FCS	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
NIH3T3- β3low	Selektierte NIH3T3 mit niedrigem endogenem Level an β3-Integrin	DMEM + 10% FCS	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
GD25-wt	Murine Zellen aus β1-null embryonalen Stammzellen ES-D3	DMEM + 10% FCS	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
GD25- β1A	Murine Zellen aus β1-null embryonalen Stammzellen ES-D3, stabil transfiziert mit β1A-Integrin	DMEM + 10% FCS + 10 µg/ml Puromycin	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
GD25- β1D	Murine Zellen aus β1-null embryonalen Stammzellen ES-D3, stabil transfiziert mit β1D-Integrin	DMEM + 10% FCS + 10 µg/ml Puromycin	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
GD25- K794R	GD25-β1A mit Aminosäureaustausch von Lysin- 794 durch Arginin	DMEM + 10% FCS + 10 µg/ml Puromycin	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
GD25- K794Q	GD25-β1A mit Aminosäureaustausch von Lysin- 794 durch Glutamin	DMEM + 10% FCS + 10 µg/ml Puromycin	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
ICAP-1- /-	Immortalisierte Präosteoblasten von ICAP-1-/- Mäusen	DMEM + 10% FCS	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf
ICAP- 1+/+	Immortalisierte Präosteoblasten von ICAP-1-/- Mäusen transfiziert mit ICAP-1 über retrovirale Infektion	DMEM + 10% FCS	Bernhard Wehrle-Haller, Uni Genf

Präparation primärer Hühnerfibroblasten

Für die Präparation primärer Hühnerfibroblasten (*chicken embryonic fibroblasts*, CEFs) werden acht Tage alte Hühnerembryonen aus pathogenfreien Eiern (Geflügelzucht Hockenberger Eppingen-Elsenz) verwendet. Die Bebrütung erfolgt in einem Brutschrank mit Wendevorrichtung bei 37 °C und 60% Luftfeuchtigkeit. Für die Präparation unter sterilen Bedingungen wird das Ei zu Beginn mit EtOH abgerieben und aufgeschlagen. Der Embryo wird von Dottersack und Chorion befreit und der Körper in eine Petrischale mit eiskaltem Hanksmedium überführt. Mit einer Pinzette wird der Embryo ventral fixiert, mit der anderen Pinzette vorsichtig die Rückenhaut entfernt. Diese Rückenhaut enthält die später auswandernden Fibroblasten. Die isolierten Teile der Rückenhaut werden in einer Petrischale mit F12 Medium gesammelt, mithilfe der Pinzette zerkleinert und in kleinen Stücken am Boden der Petrischale fixiert (s. Abbildung 2.4 C). Innerhalb einer Woche wandern die Fibroblasten aus den Hautstücken aus und können fortan in Zellkulturflaschen kultiviert werden.

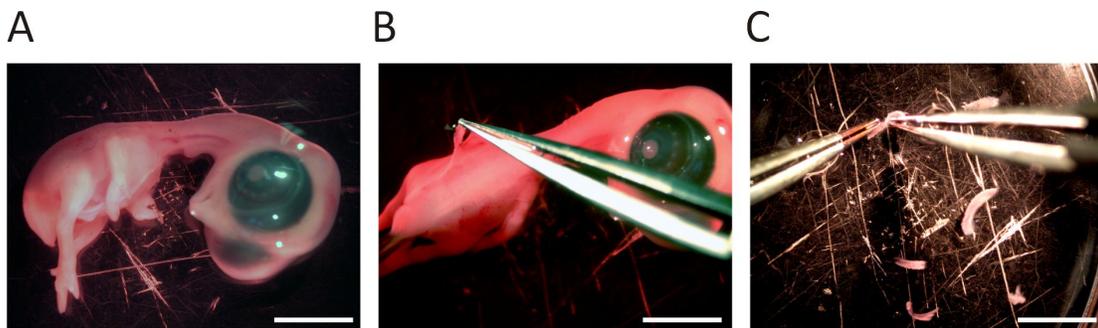


Abbildung 2.4: Präparation primärer Hühnerfibroblasten (CEFs)

[A] Seitenansicht eines acht Tage alten Hühnerembryos. **[B]** Entfernung der obersten Schicht der Rückenhaut mit einer Pinzette. **[C]** Überführung der präparierten Rückenhautstücke in eine Petrischale mit temperiertem F12-Medium. Die Hautstücke werden in kleine Teile zerteilt. Um ein besseres Auswachsen der Fibroblasten zu gewährleisten, werden sie am Boden der Petrischale fixiert. Während der einwöchigen Inkubationszeit wandern die Fibroblasten aus den Hautstücken aus und können fortan in die Routine-Zellkultur übernommen werden. Binokular 5x, Maßstab 500 µm

Kultivierung der Zelllinien

Die Versorgung der einzelnen Zelllinien erfolgt dreimal wöchentlich, wobei die Zellen je nach Dichte der Zellkulturflasche passagiert oder einem Mediumwechsel unterzogen werden. Primärzellen werden in dieser Arbeit zwischen Passage 5 und Passage 10 für Experimente verwendet, wobei sich die Passagenzahl dreimal die Woche erhöht. Die Passagenzählung beginnt mit dem Umsetzen der ausgewanderten Fibroblasten aus den Kulturschalen in Zellkulturflaschen. Diese Einschränkung gilt nicht für die anderen Zelllinien, welche theoretisch unbegrenzt verwendet werden können.

Die Standardbedingungen für die hier verwendeten Zelllinien liegen bei 37 °C, 98% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂. Zu Beginn der Passage wird das alte Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. PBS enthält keine zweiwertigen Kationen, welche die Zellen zur Adhäsion benötigen. Diese würden bei der anschließenden Behandlung mit 150 µl Trypsin/EDTA in HBSS (1:5) stören, was dem Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden dient. Die Behandlung erfolgt für 2 min im Brutschrank und wird durch die Zugabe von 5 ml temperiertem Zellkulturmedium + Serum gestoppt. Die Zellsuspension wird in ein Falcon überführt und für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 5 ml Medium + Serum resuspendiert. Je nach gewünschter Zelldichte wird die Zellsuspension auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Außer den Primärzellen (F12 Medium) werden alle Zelllinien in DMEM+10% FCS kultiviert. Dem Medium der Zelllinien GD25-β1A, GD25-β1D, GD25-K794R und GD25-K794Q wurde zusätzlich noch 10 µg/ml Puromycin als Selektionsantibiotikum beigelegt.

Bestimmung der Zellzahl

Um eine definierte Anzahl an Zellen und somit stets gleichbleibende Bedingungen der Experimente zu gewährleisten, wird die Zellzahl vor der Aussaat auf die strukturierten Substrate bestimmt. Hierzu wird die Neubauer-Zählkammer verwendet, deren Quadrate eine Auszählung ermöglichen. Bevor die Zählkammer befüllt wird, werden 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung (50% w/v in PBS) versetzt. Das Trypanblau färbt tote Zellen, welche daraufhin nicht in die Auszählung mit einfließen. Im Anschluss werden 9 µl der Zellsuspension in die Kammer pipettiert und Zellen aller vier Kleinquadrate addiert und gemittelt. Mithilfe der nachfolgenden Formel kann über die Anzahl der ausgezählten Zellen Rückschlüsse auf die Zellzahl pro ml gezogen werden.

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

In Abhängigkeit der unterschiedlichen Zellgrößen, wurde die Zellzahl pro FN-Dotgradient individuell angepasst. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendete Zellzahl pro mikrostrukturiertem Substrat in einer 6-well Kammer.

Tabelle 2.4: Verwendete Zellzahl der verschiedenen Zelllinien auf mikrostrukturierten Dotgradienten

Zellzahl/Substrat in einer 6-well Kammer	Zelllinien
280.000	CEFs
250.000	NIH3T3, NIH3T3- β 3low, GD25-Zelllinien, ICAP-1 Zelllinien
110.000	REFs

2.4 Stabile und transiente Transfektion von Zellen

In dieser Arbeit wurden vier stabil transfizierte Zelllinien verwendet: GD25- β 1A, GD25- β 1D, GD25-K794R und GD25-K794Q (Wehrle-Haller, Genf). Bei einer stabil transfizierten Zelllinie bleibt der Plasmid dauerhaft in der Zelle. Jene Zellen werden fortan mit einem Selektionsmarker kultiviert, der die eukaryotische Translation hemmt. Zellen, die das Plasmid exprimieren, erhalten eine Antibiotikaresistenz. Sie proliferieren schneller als Zellen ohne Plasmid, wodurch es zu einer Ausdünnung untransfizierter Zellen kommt. Unter transienter Transfektion hingegen versteht man das zeitweilige Einbringen eines Plasmids in eine Wirtszelle. In dieser Arbeit wurde die Elektroporation und Lipofektion angewendet.

Plasmide

Um dynamische Prozesse der Mikrotubuli während der Haptotaxis detaillierter untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit primäre Hühnerfibroblasten mit EB3-GFP (Anna Akhmanova, Amsterdam) transient transfiziert und anschließend in Zeitrafferaufnahmen untersucht. Dazu werden Zellen mit Plasmiden, welche für Fluoreszenz-gekoppelte Zielproteine kodieren, transfiziert.

Plasmidvermehrung und -isolation

Um Plasmide zu vermehren, wird eine Transformation mit kompetenten E.coli durchgeführt. Hierzu werden die Bakterien mit dem zu vermehrendem Plasmid auf Eis gemischt und anschließend einem 30 sekundigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Daraufhin wird ein Ausstrich auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum (50 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicilin) angefertigt. Nach einer 16 stündigen Inkubationszeit bei 37 °C, wird eine Kolonie gepickt und als Vorkultur in 5 ml LB/Kan bzw. LB/Amp überführt. Nach 8 h Inkubation auf dem Schüttler werden 1 ml der Vorkultur in 50 ml LB-Kan bzw. LB/Amp Medium eines Erlenmeyerkolbens pipettiert. Dort schüttelt die Lösung über Nacht. Die Plasmid-DNA-Aufreinigung erfolgt mit dem „*Plasmid Plus Midi Kit*“ (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben. Im Anschluss wird die Konzentration an einem NanoDrop (Thermo Scientific) bestimmt. Die Lagerung der Plasmide erfolgt bei -20 °C.

Elektroporation

Die Elektroporation von Zellen ermöglicht eine transiente Transfektion von Zellen mithilfe eines elektrischen Feldes. Zellen, die sich in speziellen Elektroporationsküvetten befinden, werden kurzzeitig einem elektrischen Feld und kurzen elektrischen Impulsen durch das Elektroporationsgerät ausgesetzt, welche zu temporären Poren in der Zellmembran führen. Dadurch kann DNA in die Zelle gelangen. Zellen werden, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, abgelöst und abzentrifugiert. Die Aufnahme des Pellets erfolgt in eiskaltem Elektroporationspuffer, wonach ein weiterer Zentrifugationsschritt folgt. Im Anschluss wird das Pellet in 1 ml E-Puffer resuspendiert. Die Küvetten werden mit der gewünschten Menge DNA (hier: 2 µg) bestückt und mit 250 µl der Zellsuspension gemischt. Nach einer 2 minütigen Inkubationszeit auf Eis, werden die Küvetten von Eis befreit und nacheinander in das Elektroporiergerät gesetzt. Die Elektroporation wird mit einem exponentiell abfallenden Spannungsverlauf (250 V, 900 µF, BioRad) durchgeführt und die Küvetten werden erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Durch diese Inkubation bleiben die Poren noch etwas länger geöffnet, wodurch die Transfektionseffizienz erhöht werden kann. Dies führt jedoch auch zum Absterben einiger Zellen. Jeweils 150 µl temperiertes Medium wird zu der Zellsuspension in den Küvetten gegeben und der Inhalt in eine 6-well Kammer überführt. Dort werden die Zellen, abhängig von der Transfektionszeit des Plasmids (hier: 19 h) bei 37°C inkubiert, bis sie für das Experiment abgelöst und ausgesät werden.

Lipofektion

NIH3T3- β 3low Zellen wurden mittels Lipofectamine 2000 mit dem chimären β 3-Integrin transient transfiziert. Dabei bilden kationische Lipide und anionische Nukleinsäuren einen Komplex, der durch Endozytose in die Zellen aufgenommen wird. Hierzu werden Zellen vormittags in eine Kammer einer 6-well Platte gesät und bis zum Nachmittag kultiviert. Die Konfluenz der Kammer beträgt dann etwa 70%. Für die Lipofektion werden 250 μ l Opti-Mem in ein Reaktionsgefäß pipettiert und mit einer plasmidabhängigen Menge an DNA gemischt. In diesem Experiment wurden 2,5 μ g DNA eingesetzt. In ein zweites Reaktionsgefäß werden 250 μ l Opti-Mem mit 5 μ l Lipofectamine 2000 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min werden die zwei angesetzten Lösungen für weitere 50 min vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss werden die 500 μ l auf die ausgesäten Fibroblasten pipettiert und bis zum nächsten Morgen inkubiert. Es folgt ein Mediumwechsel zu standardisiertem Kultivierungsmedium, nach welchem die Zellen abhängig von der Transfektionszeit des Plasmids weiter inkubiert werden. Im Fall des chimären Integrins wurden die Zellen 72 h lang kultiviert, bevor sie aus der Kammer abgelöst und auf das strukturierte Substrat ausgesät wurden.

2.5 Experimente auf mikrostrukturierten Substraten

Um das Verhalten diverser Zelllinien auf mikrostrukturierten Substraten zu untersuchen, werden Zellen zu Beginn zweimal mit 5 ml PBS in der Zellkulturflasche gewaschen und mit 150 μ l Trypsin abgelöst. Die gelösten Zellen werden in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das gelöste Pellet in 5 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Im Anschluss wird die Zellzahl wie in Kapitel 2.3 beschrieben, bestimmt. Die proteinbeschichteten mikrostrukturierten Substrate werden, mit der Struktur nach oben gerichtet, in je eine 6-well Kammer gelegt, in der sich 2 ml Zellkulturmedium befinden. Das definierte Zellvolumen, das für die gewünschte Zellzahl berechnet wurde, wird nun auf das Substrat getropft und die Proben für 3-5 h bei 37 °C inkubiert.

Inhibitionsexperimente auf mikrostrukturierten Substraten

Um den Einfluss pharmakologisch inhibierter Proteine auf das Migrationsverhalten von Zellen auf mikrostrukturierten Substraten zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Inhibitionsexperimente durchgeführt. Hierzu werden die Zellen nach Protokoll aus der Zellkulturflasche abgelöst (s. Kapitel 2.3), die zu 90% konfluent sind. Danach wird die Zellzahl bestimmt und mit einem Endvolumen von jeweils 2 ml in einem Eppendorfggefäß, je nach Anzahl der untersuchten Konditionen, separat gesammelt. Anhand des Endvolumens von 2 ml wird die eingesetzte Konzentration des Inhibitors berechnet und in das jeweilige Eppendorfggefäß pipettiert. Die Kontrolle enthält in jedem Experiment das Volumen an DMSO, das dem eingesetzten Volumen der Inhibitorlösung entspricht. Dies schließt zytotoxische Einflüsse des DMSOs auf das Zellverhalten aus. Die angefertigte Zell-Inhibitor-Suspension wird pro Kammer einer 6-Well-Kulturplatte auf frisch hergestellte und akklimatisierte Substrate ausplattiert. Die Inkubation erfolgt unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 98% Luftfeuchtigkeit) für 3 h. Im Anschluss erfolgt die Fixierung und immunhistochemische Färbung.

Tabelle 2.5: Eingesetzte Inhibitoren und ihre Zielstrukturen

Inhibitor	Zielstruktur	Hersteller	Artikelnummer
Cilengitide	α V-Integrin	Selleckchem	S7077
CK-666	Arp2/3	Merckmillipore	182515
Cpd22	ILK	Merckmillipore	407331
EHop-016	Rac	Sigma-Aldrich	SML0526
EHT-1864	Rac	Tocris	3872
SMIFH2	FH2-Domäne von Forminen	Merckmillipore	344092

Fixierung

Die Fixierung der Zellen durch Paraformaldehyd erfolgt im Wesentlichen durch die Quervernetzung der Proteine unter Beteiligung der Aldehydgruppen. Sie dient dem Abtöten der Zellen und dem Erhalt der Zellform. Zellen, deren Aktinzytoskelett im Anschluss an die Fixierung angefärbt werden soll, werden für 10 min mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Hierfür werden die Deckgläser mit temperiertem PFA für 10 Minuten beschichtet. Möchte man Mikrotubuli färben, so werden die Proben mit eiskaltem Methanol für 10 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert.

2.6 Immunhistochemie

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht die Visualisierung von Proteinen mithilfe der Antikörperkopplung. In einem ersten Schritt binden dabei primäre Antikörper an ein spezifisches Epitop des Zielproteins. Ein sekundärer Antikörper, der gegen den Wirt des Primärantikörpers gerichtet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, ermöglicht die mikroskopische Visualisierung des Zielproteins durch Bindung an den Primärantikörper. Um den Eintritt der Antikörper durch Permeabilisierung der Zellmembran zu ermöglichen, werden die fixierten Präparate vor der Färbung innerhalb 15 min drei Mal mit $1\times\text{ PBS} + 0,1\%$ Triton X100 gewaschen. Daraufhin werden jeweils $150\text{ }\mu\text{l}$ des in 1% Bovine Serum Albumin (BSA) in PBS verdünnten Primärantikörpers auf die Golddeckgläser gegeben und entweder für eine Stunde bei Raumtemperatur, oder bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht inkubiert. Um unspezifische Bindungen durch ungebundene Primärantikörper zu verhindern, werden die Präparate nach dieser Inkubation durch dreimaliges Waschen im Abstand von fünf Minuten mit $\text{PBS} + 0,1\%$ Triton auf die Sekundärantikörperfärbung vorbereitet. Der Ablauf ist dabei identisch zur Färbung mit dem Primärantikörper. Im Anschluss werden die Präparate erneut gewaschen und mithilfe des Einbettmediums Mowiol auf Objektträgern eingebettet. Die Lagerung der Präparate erfolgt bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Dunkeln.

Verwendete Antikörper und Färbesubstanzen

Tabelle 2.6: Verwendete Primärantikörper.

Die eingesetzte Verdünnung erfolgt in 1% BSA in PBS

Antigen	Organismus	Antikörper - Typ	Stamm- lösung	Verdün- nung	Hersteller	Artikel- nummer
Fibronektin	Kaninchen	IgG pkl	0,5 mg/ml	1:500	Sigma- Aldrich	F3648
Fibronektin	Maus	IgG mkl	0,25 mg/ ml	1:500	BD Bioscience	610078
GFP	Kaninchen	IgG pkl	0,5 mg/ml	1:100	Abcam	ab6556
GM 130	Maus	IgG mkl	0,25 mg/ml	1:500	BD Bioscience	612009
Paxillin	Maus	IgG mkl	1 mg/ml	1:500	BD Bioscience	610052
VN	Maus	IgM mkl	keine Angabe	1:1000	Sigma- Aldrich	V-7881
α -Tubulin	Maus	IgG mkl	0,5 mg/ml	1:2000	AbD Serotec	MCA78G
β 1-Integrin (9EG7-Klon)	Ratte	IgG mkl	31,25 μ g/ml	1:100	BD Bioscience	550531

Tabelle 2.7: Verwendete Sekundärantikörper.

Vorverdünnt 1:1 in Glycerin. Die eingesetzte Verdünnung erfolgt in 1% BSA in PBS

Antigen	Organismus	Farbstoff	Stamm- lösung	Verdün- nung	Hersteller	Artikel- nummer
Kaninchen IgG	Ziege	AMCA	keine Angabe	1:200	Dianova	115-155- 062
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa Fluor 488	2 mg/ml	1:200	Life technologies	A11070
Kaninchen IgG	Ziege	Cy3	2 mg/ml	1:200	Dianova	111-165- 144
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa Fluor 647	2 mg/ml	1:200	Life technologies	A21246
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor 488	2 mg/ml	1:500	Life technologies	A11029
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor 568	2 mg/ml	1:200	Life technologies	A11031
Maus IgG	Ziege	Cy3	0,5 mg/ml	1:500	Dianova	115-165- 166
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor 647	2 mg/ml	1:200	Life technologies	A21236
Ratte IgG	Ziege	Alexa Fluor 488	2 mg/ml	1:200	Life technologies	A11006

Tabelle 2.8: Verwendete Affinitätsmarkierungen.

Phalloidin wurde in 1.5 ml MeOH vorverdünnt. Die eingesetzte Verdünnung erfolgt in 1% BSA in PBS

Bindungs-partner	Farbstoff	Stamm-lösung	Verdün-nung	Hersteller	Artikel-nummer
DNA	DAPI	1 mg/ml	1:3000	Carl Roth	6335.1
Phalloidin	Alexa 488	300 U/ml	1:200	Life technologies	A12379
Phalloidin	Alexa 568	300 U/ml	1:150	Life technologies	A12380
Phalloidin	Alexa 647	300 U/ml	1:70	Life technologies	A22287

2.7 Quantifizierung

Mikrostrukturierte FN-Dotgradienten

Einzelzellen, deren Migrationsverhalten auf FN-Dotgradienten untersucht werden soll, werden für 3-5 h auf adhäsiven, mikrostrukturierten Substraten kultiviert, anschließend fixiert und immunhistochemisch angefärbt. Die Auswertung der Migrationsrichtung erfolgt am Mikroskop Axio Imager.Z1. Hierfür wird ein 40-fach vergrößerndes Objektiv (EC Plan-NEOFLUAR 40x/0,75) verwendet und die Migrationsrichtungen in vier Kategorien eingeteilt: „uphill“, bezeichnet die Migration in Richtung höherer Proteinbedeckung, „downhill“ die Migration entgegengesetzt des Gradienten. Als „lateral“ wird jene Migration bezeichnet, die in x-Richtung des Gradienten erfolgt. „Stationär“ stellt die Kategorie dar, in der keine Migration stattgefunden hat. Da Zellen während ihrer Migration die unterliegenden FN-Dots internalisieren, kann man die Migrationsrichtung aufgrund der Spur, die sich dadurch am Zellhinterende ergibt, exakt bestimmen. In die Auswertung fließen nur Einzelzellen ein, die in dem Interessenbereich des Gradienten lokalisiert sind (s. Abbildung 2.1) und eine Wegstrecke über mindestens zwei Dotreihen zurückgelegt haben. Die Gesamtzahl der unabhängigen Experimente desselben Typs wird in der vorliegenden Arbeit mit „N“ angegeben. Die Zahl, der in die Auswertung eingeflossenen Einzelzellen, wird mit „n“ bezeichnet. Um signifikante Unterschiede innerhalb der Experimente zu belegen, wurde der Chi²-Test und der t-test angewendet.

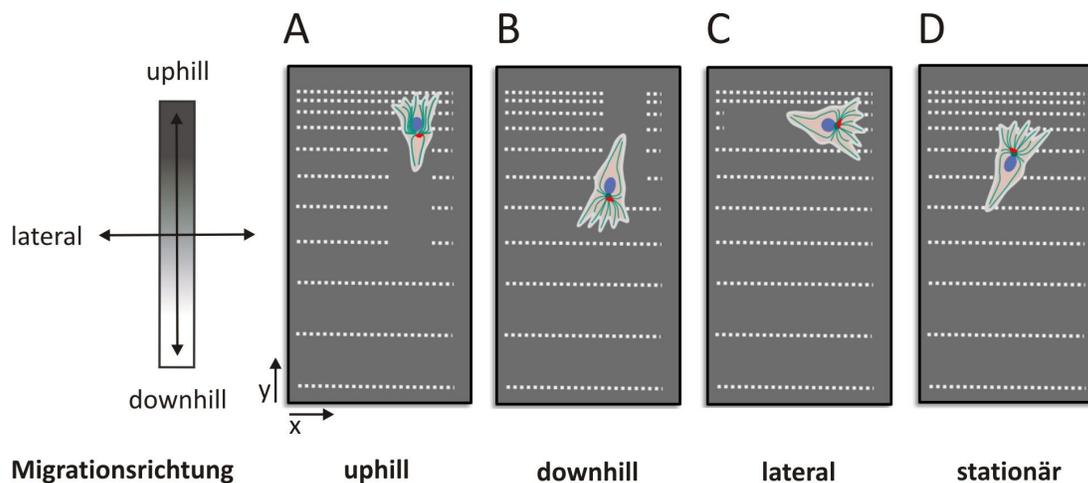


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Migrationsrichtungen

Durch die Abnahme der Dot-Abstände in y-Richtung von $20\ \mu\text{m}$ auf $0\ \mu\text{m}$ entsteht ein Dotgradient. Dieser Gradient verläuft in den Abbildungen von unten nach oben. Die höchste Proteinbedeckung befindet sich an der Bildoberseite. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der prozentualen FN-Bedeckung entlang der y-Achse. Dieser Verlauf wird durch den Gradientenbalken, neben der Abbildung, verdeutlicht. Die Migrationsrichtung der Zellen ist anhand der herausgerissenen und somit fehlenden Dots am Zellende erkennbar. **[A]** Darstellung einer uphill, in Richtung höherer Bedeckung entlang der y-Achse, migrierenden Zelle. **[B]** Eine in Richtung niedriger Bedeckung, downhill, migrierende Zelle. **[C]** Eine sich entlang der x-Achse des Gradienten bewegende, lateral migrierende, Zelle. **[D]** Schematisches Beispiel einer Zelle, die kein Migrationsverhalten aufweist. Dieses Verhalten wird als stationär bezeichnet.

Zeitraffer-Studie von EB-Proteinen

Um Unterschiede in der Dynamik von Mikrotubuli-Plus-End-Proteinen auf homogen beschichtetem und strukturiertem Substrat zu untersuchen, wurden Zeitrafferstudien angefertigt (Axio Observer Z.1, EC Plan-NEOFLUAR 40x/0,75 (Carl Zeiss)). Hierzu werden CEFs transient mit EB3-GFP transfiziert und auf homogen beschichtetem bzw. strukturiertem Substrat ausgesät. Nach einer Adhäsionszeit von 1 h werden Zellen gefilmt, die auf homogenem bzw. strukturiertem Substrat über die Zeit stationär verbleiben oder migrieren. Durch sehr kurze Aufnahmeintervalle von 0,5 s, können die schnellen Trajektorien der Plus-End-Proteine detektiert werden. Im Anschluss werden die erstellten Aufnahmen mithilfe des Matlab-basierten Programmes *PlusTipTracker* ausgewertet (Applegate et al., 2011).

Quantifizierung der Mikrotubulitrajektorien mithilfe des Programms *PlusTipTracker*

Die mikroskopisch erstellten Zeitrafferaufnahmen werden als Einzeltiffs mithilfe der Software Zen Blue (Carl Zeiss) exportiert. Dabei beträgt die Anzahl der exportierten Einzelbilder bei einer Aufnahme­frequenz von 0,5 s immer 100 Bilder. Die Einzelbilder werden anschließend in das Programm *ImageJ* geladen und dort in einen Stapel verarbeitet. Die Orientierung des Substrates erfolgt so, dass sich die höchste Proteinbedeckung stets am oberen Bildrand befindet. Die Projektion der Einzelzelle wird so ausgeschnitten, dass sich keine störenden Strukturen im Bild befinden und als Bildsequenz gespeichert. Diese wird nun in das Matlab-basierte Programm *PlusTipTracker* (Gaudenz Danuser) geladen und, wie in Applegate et al. beschrieben, analysiert (Applegate et al., 2011). Nach erfolgter Analyse erhält man Datensätze und Aufnahmen mit getrackten Mikrotubuli-Trajektorien über die Zeit der 100 Einzelbilder, die unter anderem Aufschluss über die Beständigkeit und Geschwindigkeit geben. Abbildung 2.6 B und C zeigen die analysierten und farbkodierten Bildstapel der Zeitrafferaufnahmen.

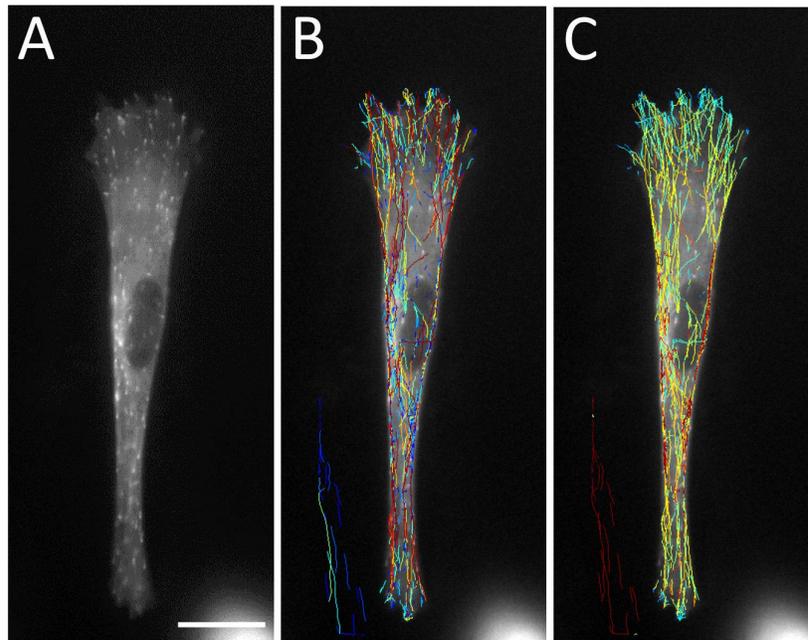


Abbildung 2.6: Mikrotubulitracking mithilfe des Programmes „PlusTipTracker“

[A] Einzelbild der Zeitrafferaufnahme von EB3-GFP transfizierten CEFs auf homogenem Substrat. Die kometenartigen Strukturen stellen das EB3-GFP und somit das Mikrotubuli-Plus-Ende dar. **[B]** Anhand der Projektion der Zeitrafferaufnahme mithilfe des „PlusTipTracker“ (Danuser Lab) analysiertes Bild. Eingefärbt ist die farbcodierte Beständigkeit der Mikrotubulitrajektorien der Zelle über die Zeit. Das Intervall zwischen den Aufnahmen beträgt 0,5 s. Axio Observer.Z1 40x, Maßstab 10 μm . **[C]** Farbcodierte Geschwindigkeit der Mikrotubulitrajektorien über die Zeit.

Statistische Tests

Um signifikante Unterschiede der Ergebnisse statistisch zu belegen, werden der Chi²-Test und der t-Test durchgeführt. Erhält man nach erfolgtem Chi²-Test unter Berücksichtigung der Freiheitsgrade bzw. t-test einen Wert des Signifikanzniveaus (p) kleiner als 0,05, werden die miteinander verglichenen Daten mit einem Stern (*) versehen. Ist der Wert kleiner bzw. gleich 0,01, erhalten die Daten zwei Sterne (**), bei einem Wert kleiner als 0,005 drei Sterne (***), was für einen großen signifikanten Unterschied steht. Besteht kein signifikanter Unterschied, wird dies mit “‡” vermerkt.

Verwendete Software

Zen pro 2011 (Carl Zeiss)

Corel DRAW X3 (Corel)

Gimp 2

ImageJ (Wayne Rasband)

Microsoft Office 2010

PlusTipTracker (Gaudenz Danuser)

Verwendete Mikroskope

Tabelle 2.9: Übersicht der verwendeten Mikroskope

Bezeichnung	Beschreibung	Objektiv(e) und Beleuchtung	Hersteller
	Aufrechtes Mikroskop	Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil	
Axio Imager.Z1 mit Einschubmodul ApoTome	Durch- und Fluoreszenzlicht	EC Plan-NEOFLUAR 40x/0,75	Carl Zeiss
	Zur strukturierten Beleuchtung fähig	HXP 120 (Halogen)	
	Inverses Mikroskop	EC Plan-NEOFLUAR 40x/0,75 (Carl Zeiss)	
Axio Observer.Z1	Temperaturkontrolleinheit (Air-Therm ATX, World Precision Instruments)	Colibri.2 LED- Beleuchtung	Carl Zeiss

3 ERGEBNISSE

Im Gegensatz zur Chemotaxis, gibt es nur wenige Studien zur Haptotaxis, der Migration entlang eines substratgebunden Adhäsionsgradienten (Carter, 1967). In vorliegender Arbeit wird die Haptotaxis mithilfe diskontinuierlicher Proteingradienten untersucht. Diese Dotgradienten weisen Punkte (Dots) mit einer Kantenlänge von $2 \times 2 \mu\text{m}$ auf. Entlang der y-Achse des Gradienten nimmt der Abstand der Dotreihen linear von $20 \mu\text{m}$ auf $0 \mu\text{m}$ ab, was zu einer gegenläufigen Zunahme der geometrischen Proteinbedeckung führt. Der Abstand der Dots entlang der x-Achse bleibt dagegen stets konstant. Die Abbildung 3.1 A veranschaulicht anhand von Fluoreszenzaufnahmen einen FN-Dotgradienten, sowie die schematische Dotgröße. Eine repräsentative Aufnahme einer migrierenden Zelle auf dem FN-Dotgradienten ist in Abbildungsteil B veranschaulicht. In allen Abbildungen dieser Arbeit ist der Gradient vom unteren zum oberen Bildrand orientiert, visualisiert durch einen Gradientenbalken am rechten Abbildungsrand. Hergestellt werden diese Dotgradienten mit dem in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Verfahren des *Microcontact-Printings* und der Gold-Thiol-Chemie. Durch selektive Bindung von Glykoproteinen an ein zuvor geometrisch gestempeltes hydrophobes Thiol werden definierte, adhäsive Muster geschaffen. Bereiche zwischen den Mustern werden mithilfe eines zweiten hydrophilen Thiols zu antiadhäsiven Arealen funktionalisiert. Die für die Experimente ausgesäten Fibroblasten sind lediglich auf den proteinbeschichteten Dots in der Lage, Zelladhäsionskontakte auszubilden und gerichtet zu migrieren. Nach einer Kultivierungsdauer von 3-5 h werden die Proben fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Da die Zellen während der Translokation des Zellkörpers, durch das Ablösen von Kontakten am Zellhinterende, die unterliegenden Dots internalisieren, hinterlassen sie eine Bewegungsspur. Anhand dieser kann die Migrationsrichtung der Zellen mikroskopisch quantifiziert werden (Kapitel 2.7). Die Migrationsrichtung wird dafür in vier Kategorien unterteilt: uphill bezeichnet die Migration in Richtung der höchsten Proteinbedeckung, downhill die Richtung

zu der niedrigsten Proteinbedeckung des Gradienten. Die seitliche Migration - entlang der x-Achse - ist als lateral definiert. Erfolgt während der Kultivierungszeit auf den Dotgradienten keine Migration, geht dies als stationäres Verhalten in die Quantifizierung ein.

Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass primäre Hühnerfibroblasten (CEFs) einen diskontinuierlichen FN-Dotgradienten erkennen und zu 80% in Richtung der höheren Proteinbedeckung migrieren. Dabei ist ein funktionierendes Aktin-/Myosin-System für die Haptotaxis notwendig. Ist dieses System durch die Zugabe von Y-27632 oder Blebbistatin gestört, sind die Zellen nicht mehr in der Lage, gerichtet zu migrieren. Die Zellen wandern dann zu etwa gleichen Teilen uphill, downhill oder lateral. Wird die Mikrotubuli-Dynamik durch Nocodazol oder Taxol gestört, können die Zellen zwar die Gradientenachse, jedoch nicht mehr die Proteinbedeckung, wahrnehmen. Dies führt dazu, dass die Zellen gleichwertig uphill oder downhill migrieren (Autenrieth, 2012). Für die Haptotaxis ist somit ein funktionierendes Aktin-/Myosin- und Mikrotubulisystem unverzichtbar (s. Abbildung 1.3).

Zellausläufer dienen während der Zellmigration als Sensoren für die Wahrnehmung der Umgebung. Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit untersucht, wie sich die gezielte pharmakologische Störung von Zellausläufern, wie Filopodien und Lamellipodien, auf die Detektion des Dotgradienten und somit auf die Haptotaxis auswirkt. Hierbei fokussieren sich die Experimente auf eine Störung der Rho-GTPase Rac, sowie zytoskelett-assoziiierter Proteine. Diese stellen den Arp2/3-Komplex, Formine und die *Integrin-linked-kinase* dar.

Neben dem Aktinzytoskelett hat auch das Mikrotubulisystem eine große Bedeutung für die Haptotaxis. Dabei wurde beobachtet, dass die Mikrotubuliorganisation auf homogenen und strukturierten Substraten unterschiedlich erscheint (Autenrieth, 2012). Diese Beobachtungen sollen, durch eine Analyse der dynamischen Mikrotubulitrajektorien mittels Zeitrafferaufnahmen auf diversen Substratgeometrien, quantifiziert werden.

Abschließend liegt der Fokus dieser Dissertation auf der Familie der Integrine, die als transmembrane Rezeptoren die Verknüpfung der EZM mit dem intrazellulären Aktinzytoskelett gewährleisten und dadurch eine zentrale Rolle in der Zelladhäsion und Zellmigration spielen. Die Untersuchung der Integrine $\alpha5\beta1$ und $\alphaV\beta3$ zeigt, dass zwar beide Integrine mit dem Glykoprotein Fibronectin (FN) interagieren, dabei aber unterschiedliche Funktionen für die Migration auf FN-Dotgradienten ausüben.

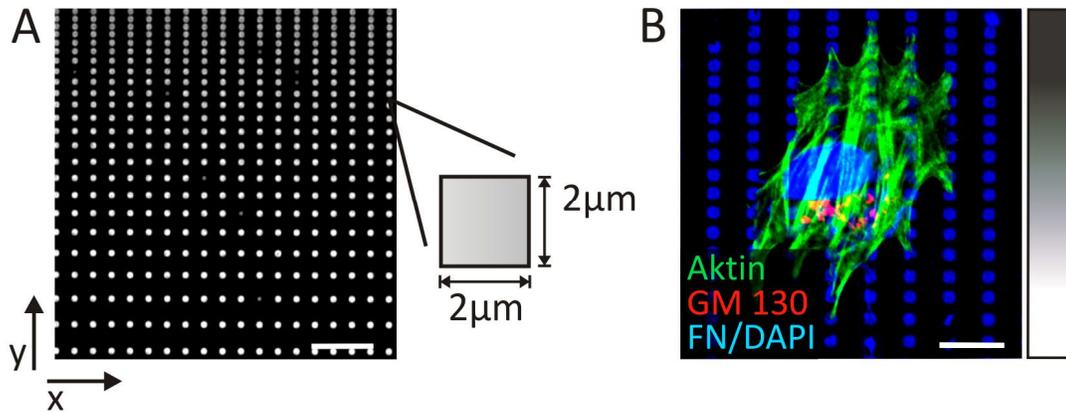


Abbildung 3.1: Darstellung des verwendeten FN-Dotgradienten

[A] Aufsicht auf den verwendeten FN-Dotgradienten. Schwarze Bereiche kennzeichnen den antiadhäsiven Bereich, weiße Muster die mit FN beschichteten Dots, die als adhäsive Stellen dienen. Der Gradient verläuft in allen Abbildungen entlang der y-Achse. Die Skizze veranschaulicht die Maße der einzelnen Dots von $2 \times 2 \mu\text{m}$. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab $20 \mu\text{m}$. **[B]** Fluoreszenzaufnahme einer haptotaktisch migrierenden Zelle (CEF) auf einem FN-Dotgradienten. Die Migrationsrichtung kann durch die internalisierten Dots am Hinterende der Zelle bestimmt werden. CEFs werden 3 h auf dem mikrostrukturierten Substrat kultiviert, fixiert und Aktin (grün), GM 130 (rot), FN und der Nukleus (blau) immunhistochemisch angefärbt. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab $10 \mu\text{m}$. Modifiziert nach (Frank, 2011).

3.1 Die pharmakologische Inhibition zytoskelett-assoziierter Proteine führt zu einer Abnahme der gerichteten Migration

Das Zytoskelett einer Zelle spielt für die Zellmigration eine große Rolle und wird von vielen Proteinen reguliert und beeinflusst. Im ersten Teil dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich eine pharmakologische Störung bestimmter zytoskelett-assoziierter Proteine auf die gerichtete Migration auf FN-Dotgradienten auswirkt. Die Kultivierung von Fibroblasten auf mikrostrukturierten Dotgradienten erlaubt hierbei eine exakte Quantifizierung der Migrationsrichtung. Für die Experimente dieser Arbeit werden REFs (*Rat embryonic fibroblasts*) oder primäre CEFs (*Chicken embryonic fibroblasts*) für 3 h auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten kultiviert, mit definierten Inhibitorkonzentrationen behandelt, fixiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt. Das Migrationsverhalten der Zellen kann daraufhin mikroskopisch analysiert werden und gibt Aufschluss über die Bedeutung des beeinträchtigten Proteins für die Migration auf FN-Dotgradienten.

3.1.1 Inhibition der Rho-GTPase Rac

In vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine Störung von Cdc42 und Effektoren von RhoA in einer ungerichteten Migration auf FN-Dotgradienten resultiert. Dieses Ergebnis zeigt, dass ein funktionierendes Aktin-/Myosin-System für die Haptotaxis unverzichtbar ist (Autenrieth, 2012). Aufbauend auf diese Erkenntnis, soll in diesem Kapitel die Bedeutung der Rho-GTPase Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*) für die Migration auf FN-Dotgradienten näher analysiert werden. Rac spielt durch die Regulierung des Aktinzytoskeletts, neben der Zellteilung und der Zelladhäsion, auch eine wichtige Rolle in der Motilität (Raftopoulou and Hall, 2004). Es liegt in migrierenden Zellen graduell, mit der höchsten Aktivität an der Zellfront, vor und generiert durch Membranausstülpungen die protrusive Kraft (Kraynov et al., 2000). In diesem Experiment wurde die Inhibition von Rac mit zwei unterschiedlichen Inhibitoren durchgeführt. EHT1864 blockiert durch direkte Bindung die Aktivierung von Rac, während EHop-016 die Aktivität der Rac GTPase spezifisch inhibiert. CEFs werden in diesem Versuch für 3 h mit den Inhibitoren definierter Konzentrationen auf FN-Dotgradienten kultiviert, fixiert und Aktin, GM 130 und FN gefärbt. Der Auswertevorgang der Migrationsrichtung ist in Kapitel 2.7 detailliert beschrieben. Betrachtet man die Morphologie des Aktinzytoskeletts, so werden die Auswirkungen der Inhibitoren, vor allem mit EHop-016, deutlich sichtbar (s. Abbildung 3.2 A-C). Die Zellen wirken gestresst, was durch die Anzahl und Ausprägung von Stressfasern deutlich wird. Das quantitative Ergebnis der Inhibitorbehandlungen ist in Abbildung 3.2 D-E übersichtlich dargestellt. Mit zunehmender Konzentration kommt es sowohl unter EHT1864, als auch unter EHop-016 zu einer Abnahme haptotaktisch migrierender Zellen auf dem FN-Dotgradienten. Während die unbehandelten Zellen zwischen 60% und 70% uphill migrieren, können unter der Behandlung der höchsten Dosis EHT1864 nur noch 20% der Zellen uphill migrieren. Mit EHop-016 sind es nur noch 31% der Zellen. Der Anteil stationärer Zellen nimmt währenddessen gegenläufig zu. Die lateral migrierenden Zellen nehmen bei beiden Inhibitoren mit höherer Dosis ab.

Die Resultate zeigen, dass die Rho-GTPase Rac für die Migration auf FN-Dotgradienten bedeutsam ist, für den Mechanismus der Haptotaxis jedoch keine zentrale Rolle einnimmt. (EHT1864: N=3-7; n=2044; EHop-016: N=3-5; n=556; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005)

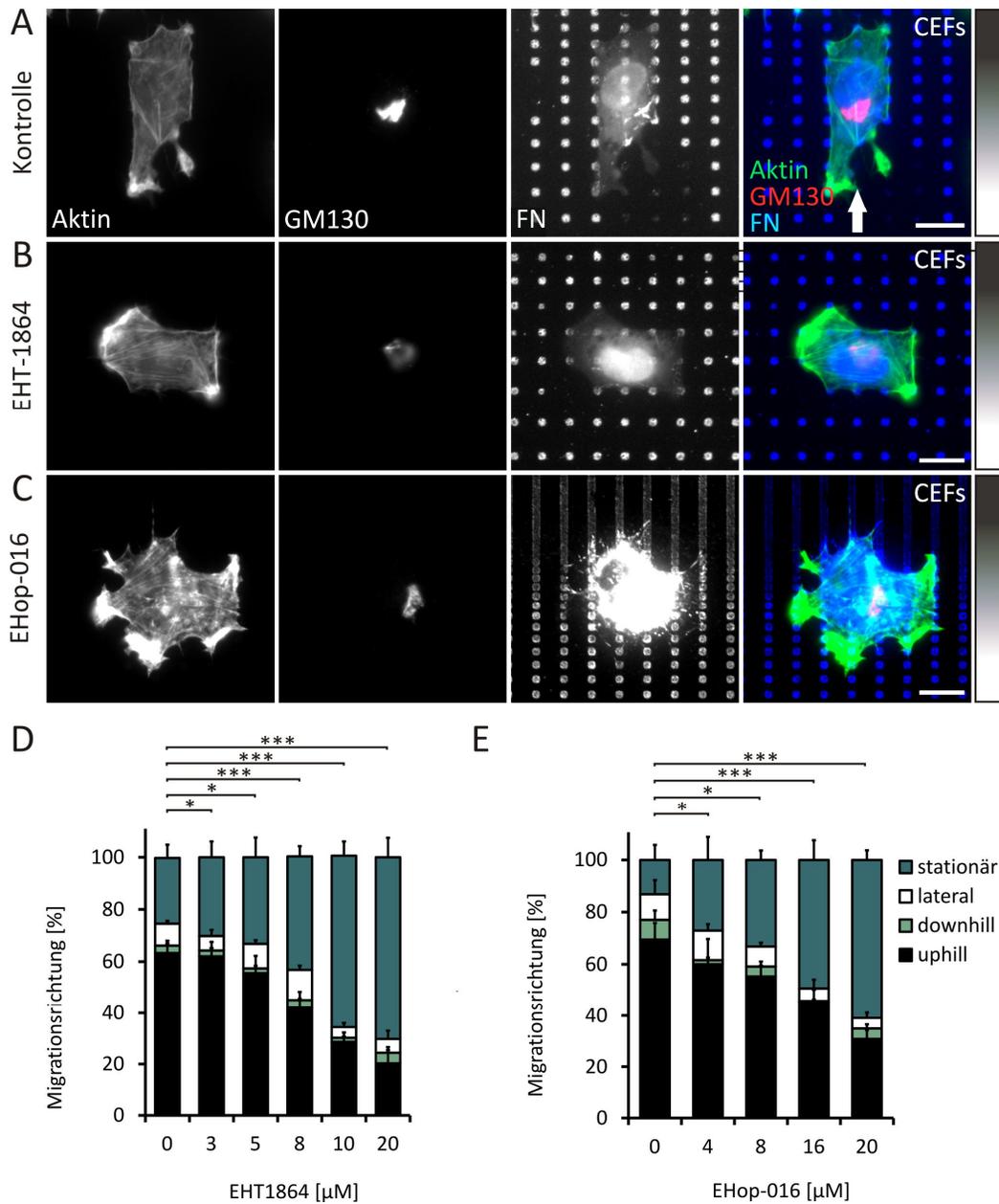


Abbildung 3.2: Migrationsverhalten von CEFs nach Inhibition von Rac mittels EHT1864 und EHop-016 auf FN-Dotgradienten

[A] Repräsentative Fluoreszenzaufnahme einer uphill migrierenden CEF des Kontrolllexperiments. (Pfeil = Migrationsrichtung) **[B]** Stationär verbleibende Zelle nach der Behandlung mit 20 μ M EHT1864. **[C]** Stationäre Zelle nach Behandlung mit dem Rac Inhibitor EHop-016 (20 μ M). **[D]** Quantifizierung des konzentrationsabhängigen Migrationsverhaltens von CEFs nach Behandlung mit dem Inhibitor EHT1864. Der Einfluss des Inhibitors ist deutlich ersichtlich. Mit zunehmender Dosis sinkt die Fähigkeit haptotaktisch zu migrieren von 63% auf 20%. Der Anteil stationärer Zellen steigt gleichzeitig von 25% auf 70%, während weniger als 8% der Zellen lateral und downhill migrieren. CEFs werden 3 h mit Inhibitoren auf strukturiertem Substrat kultiviert, fixiert und Aktin (grün), GM 130 (rot) und FN (blau) immunhistochemisch angefärbt. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 μ m. **[E]** Prozentuale Gegenüberstellung des Migrationsverhaltens von CEFs nach EHop-016 Behandlung. Mit ansteigender Inhibitorkonzentration kommt es zu einem Anstieg an stationären Zellen von 13% auf 61%. Das haptotaktische Migrationsverhalten nimmt gegenläufig hierzu von 69% auf 31% ab. Der Anteil downhill und lateral migrierender Zellen beträgt weniger als 10%. EHT1864: N=3-7; n=2044; EHop-016: N=3-5; n=556; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005.

3.1.2 Inhibition des Arp2/3-Komplexes

Mit dem vorhergehenden Experiment konnte gezeigt werden, dass die Störung der Rho-GTPase Rac einen Einfluss auf die Zellmigration hat, jedoch für den Mechanismus der Haptotaxis keine Rolle spielt. Um eine spezifischere Störung der Lamellipodien zu erreichen, wird in diesem Abschnitt der Arp2/3-Komplex pharmakologisch inhibiert. Dieser Komplex ist für die Verknüpfung der charakteristischen Aktinnetzwerke der Lamellipodien von zentraler Bedeutung (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Welch et al., 1997). Eine Störung dieses Komplexes kann mithilfe des Inhibitors CK-666 hervorgerufen werden. Dieser bindet und stabilisiert die inaktive Form des Arp2/3-Komplexes, wodurch der Übergang in die aktive Konformation verhindert wird (Hetrick et al., 2013). Für die Untersuchung werden Zellen für 3 h mit definierten Konzentrationen von CK-666 auf FN-Dotgradienten inkubiert. Im Anschluss werden Aktin, Nukleus und FN immunhistochemisch gefärbt. Die darauffolgende mikroskopische Bestimmung der Migrationsrichtung wird in Kapitel 2.7 detailliert erläutert. In Abbildung 3.3 A ist eine repräsentative, in Richtung höherer Bedeckung (uphill), migrierende Zelle der Kontrolle dargestellt, in Abbildung 3.3 B eine stationäre Zelle der Inhibitorbehandlung. Die Quantifizierung des Experiments zeigt, dass die Inhibitorbehandlung zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Abnahme der Migrationsfähigkeit führt. Während in der Kontrolle 84% der Zellen uphill migrieren, ist es nach der Behandlung mit 100 μM CK-666 noch 74% der Zellen möglich in Richtung höherer Bedeckung zu migrieren. Nach der Behandlung mit 200 μM sind es dagegen nur noch 43% der Zellen.

Der Anteil stationärer Zellen nimmt dabei gegenläufig zu und steigt von 4% in der Kontrolle auf 15% (100 μM) und 54% (200 μM) an (s. Abbildung 3.3 C). In Richtung niedriger Bedeckung migrieren in allen Konditionen weniger als 3%, lateral weniger als 10% der Zellen. Der Effekt des Inhibitors ist ebenso in der Morphologie des Aktinzytoskeletts ersichtlich. Verglichen mit der unbehandelten Zelle, wirken die Aktinfilamente der behandelten Zelle, ohne das Beisein von Lamellipodien, deutlich beeinträchtigt. In behandelten Zellen wird das unterliegende FN kaum umgebaut. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine pharmakologische Inhibition des Arp2/3-Komplexes zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Migration auf FN-Dotgradienten führt, dabei aber keinen Einfluss auf die Haptotaxis hat. (N=3; n=330; unabhängiger Chi^2 -Test, Signifikanzniveau: ***, $P < 0,005$)

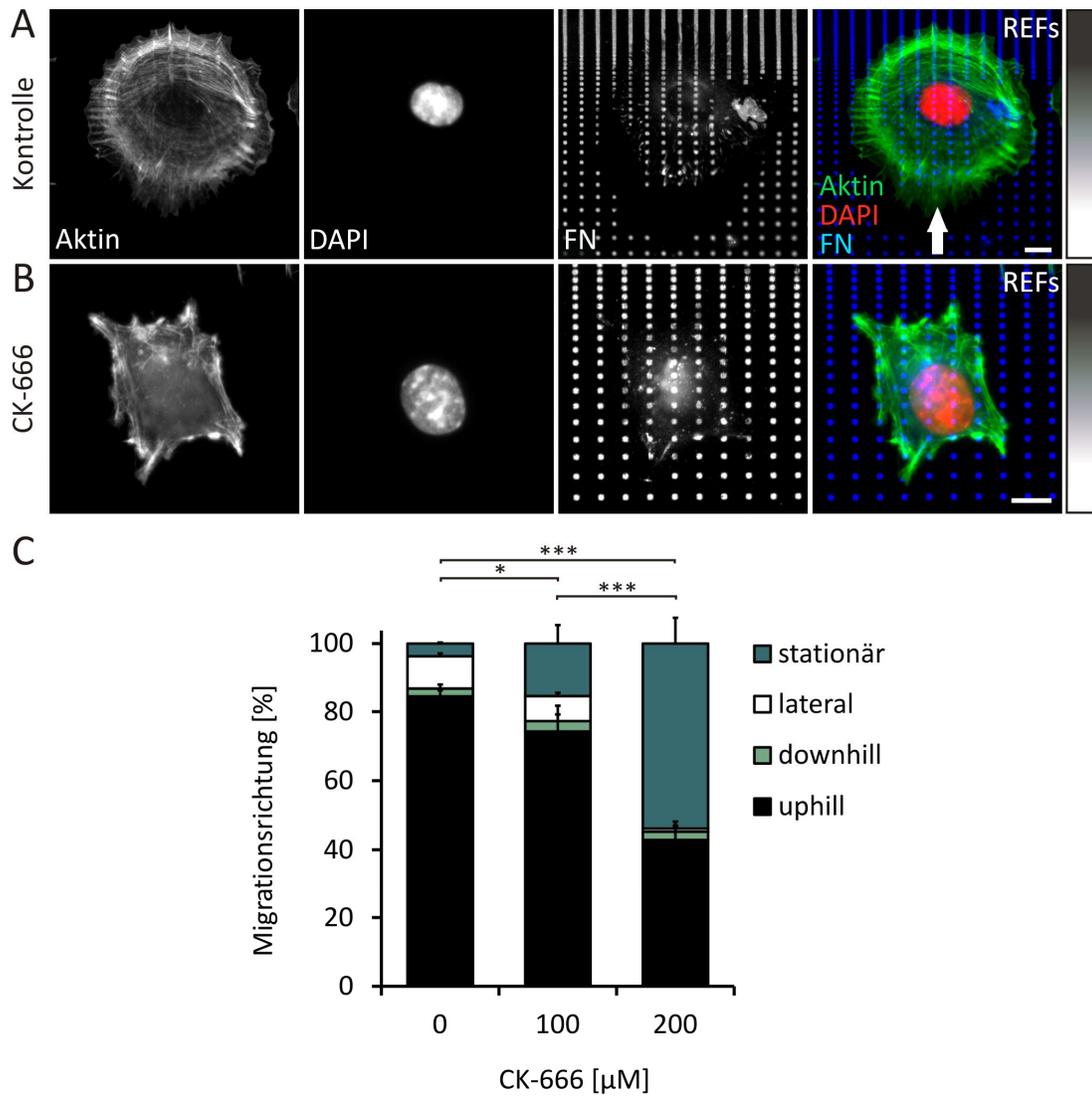


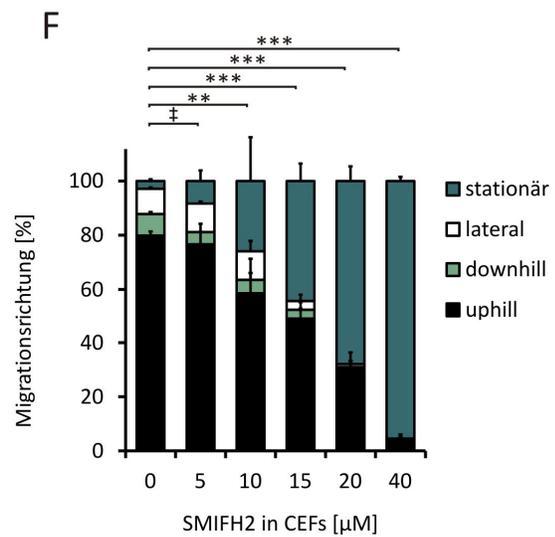
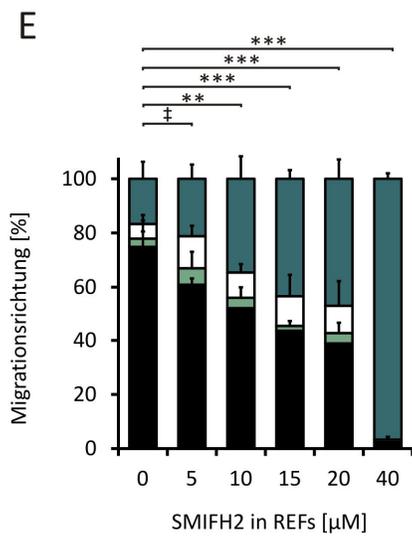
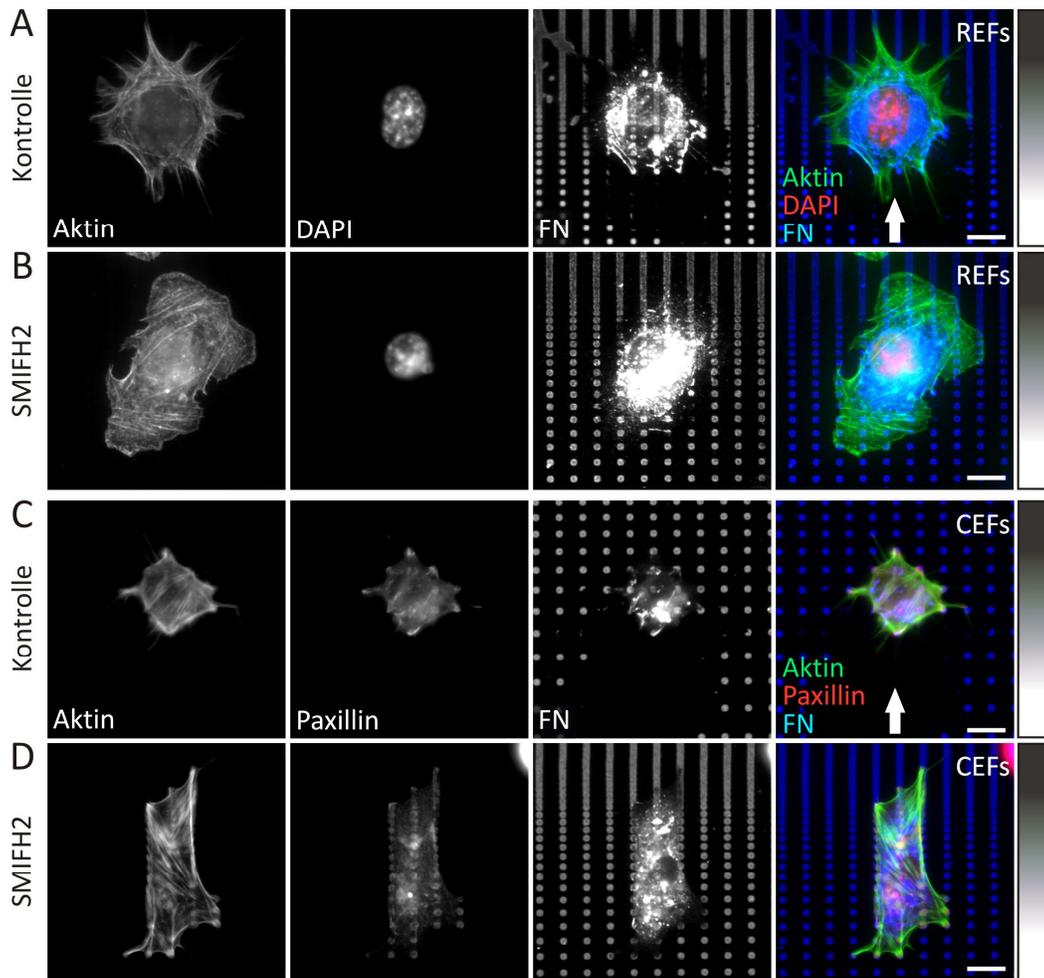
Abbildung 3.3: Migrationsverhalten von REFs nach Inhibition des Arp2/3-Komplexes

[A] Fluoreszenzaufnahme einer uphill migrierenden Zelle (Pfeil = Migrationsrichtung) des Kontrollexperiments. **[B]** Stationäre Zelle des Inhibitor behandelten Experiments (200 μM CK-666). REFs werden 3 h auf einem FN-Dotgradienten kultiviert, fixiert und anschließend Aktin (grün), Nukleus (rot) und FN (blau) immunhistochemisch angefärbt. Die höchste Bedeckung des Gradienten befindet sich in dieser Abbildung in Richtung der y-Achse, dargestellt durch den Gradientenbalken am rechten Bildrand. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 μm . **[C]** Prozentuale Quantifizierung der Migrationsrichtungen, welche auf dem FN-Dotgradienten zurückgelegt wurden. Während 84% der unbehandelten Zellen zur Haptotaxis fähig sind, können bei den behandelten Zellen nur noch 74% (100 μM) und 43% (200 μM) uphill migrieren. Das Verhältnis stationärer Zellen nimmt entgegengesetzt zu. Während der Anteil downhill migrierender Zellen kontinuierlich unter 3% liegt, sinkt der Anteil lateral migrierender Zellen von knapp unter 10% in der Kontrolle und 100 μM behandelten Zellen auf unter 1% mit 200 μM CK-666. N=3; n=330. Chi²-Test: P > 0,05 (≠ nicht signifikant), P < 0,005 (***).

3.1.3 Inhibition der FH2-Domäne von Formin

Neben dem Arp2/3-Komplex stellen Formine einen weiteren Keimbildner aktin-basierender Strukturen dar. Während der Arp2/3-Komplex ein bestehendes Aktinfilament benötigt, um die Verknüpfung eines weiteren Filaments im 70°C Winkel hin zu einem Aktinnetzwerk sicherzustellen, bilden Formine, ausgehend von Aktinmonomeren, lineare, unverzweigte Filamente. Mit ihrer FH2-Domäne sind Formine außerdem in der Lage, an Mikrotubuli zu binden, um diese an der Zellfront in migrierenden Zellen zu stabilisieren (Bartolini et al., 2008). Dadurch spielen sie unter anderem eine tragende Rolle in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts, der Stabilisierung von Mikrotubuli und der Migration (Koka et al., 2003; Yayoshi-Yamamoto et al., 2000; Zigmond, 2004). Während im vorhergehenden Kapitel der Arp2/3-Komplex untersucht wurde, welcher für die Migration auf FN-Dotgradienten eine Rolle spielt, für die Haptotaxis jedoch nicht, soll in diesem Kapitel der Einfluss der FH2-Domäne von Formin auf das Migrationsverhalten von REFs und CEFs auf einem FN-Dotgradienten näher analysiert werden. Eine Störung der FH2-Domäne wird durch den Inhibitor SMIFH2 (*Small Molecule Inhibitor of Formin Homology 2 domain*) erreicht. SMIFH2 inhibiert die Formin-abhängige Bildung von linearen Aktinfilamenten, ohne dabei einen Einfluss auf Formin-unabhängige oder Arp2/3-Komplex-abhängige Aktinassemblierung zu nehmen. Die Zellen werden während der drei-stündigen Inkubationszeit auf FN-Dotgradienten mit definierten Inhibitorkonzentrationen behandelt, im Anschluss fixiert und Aktin, Paxillin bzw. der Nukleus und FN gefärbt. Die darauf folgende Auswertung der Migrationsrichtung ist in Kapitel 2.7 beschrieben. Die Zellmorphologie verändert sich unter der Behandlung von SMIFH2, indem Filopodien-ähnliche Strukturen verschwinden. Vielmehr weisen die behandelten Zellen ausgeprägte Lamellipodien sowie deutlich sichtbare Stressfasern auf (s. Abbildung 3.4 A-D).

Die Inhibition der FH2-Domäne von Formin führt zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme stationärer Zellen. Während unbehandelte REFs zu 75% haptotaktisch migrieren, sind in mit 40 μM SMIFH2 behandelten Zellen nur noch 2% dazu in der Lage. Der Anteil lateral migrierender Zellen steigt von 5% in unbehandelten Zellen auf etwa 10% in behandelten Zellen. Nach Behandlung mit der höchsten Konzentration, gibt es fast keine lateral migrierenden Zellen mehr (1%). In Richtung der niedrigen Proteinbedeckung migrieren weniger als 6% der Zellen, 40 μM SMIFH2 führen zu einem Migrationsstopp (s. Abbildung 3.4 E). In CEFs ist das Ergebnis vergleichbar. Während unbehandelte Zellen zu 80% haptotaktisch migrieren, sind nur noch 4% der mit 40 μM behandelten Zellen dazu in der Lage. Der Anteil stationärer Zellen nimmt mit steigender Dosis von 3% auf 95% zu, während weniger als 4% der Zellen in Richtung niedriger



Bedeckung migrieren. In laterale Richtung reduziert sich die Migrationsfähigkeit mit ansteigender Dosis von etwa 10% auf 3% (s. Abbildung 3.4 F).

Diese Untersuchung zeigt, dass die FH2-Domäne von Forminen zwar für die Zellmigration im Allgemeinen eine bedeutende Rolle spielt, auf die Haptotaxis im Speziellen jedoch keinen Einfluss hat. (REFs: N=3; n=629; CEFs: N=3 ; n=750; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005)

3.1.4 Inhibition der *Integrin-linked-kinase*

Die Pseudokinase *Integrin-linked-kinase* (ILK) ist ein zytoplasmatischer Effektor von Integrinrezeptoren. Sie ist bekannt dafür, in verschiedenste Prozesse, wie etwa auch in die Zellmigration, involviert zu sein. ILK bindet an die intrazelluläre Domäne von β 1- und β 3-Integrin und ist eines der Gerüstproteine, um Integrine mit dem Aktinzytoskelett zu verknüpfen. ILK, vorliegend in einem Komplex mit den Proteinen Pinch und Parvin (IPP Komplex), spielt unter anderem eine Rolle im Einfangen von Mikrotubuli Plus-Enden, um sie mit dem kortikalen Aktinzytoskelett zu verbinden (Hannigan et al., 1996; Tu et al., 1999; Wickström et al., 2010a). ILK stellt somit eine Verbindung zwischen dem Aktinzytoskelett und dem Mikrotubulinetzwerk dar und ist aus diesem Grunde interessant, um den Einfluss dieser Verbindung auf die Zellmigration zu untersuchen. REFs werden in diesem Experiment für 3 h in Anwesenheit definierter Inhibitorkonzentrationen auf einem FN-Dotgradienten kultiviert, anschließend fixiert und gefärbt. Die mikroskopische Auswertung ist in Kapitel 2.7 beschrieben.

Abbildung 3.4: Migrationsverhalten von REFs und CEFs nach Inhibition der FH2-Domäne von Formin

[A] Repräsentative Fluoreszenzaufnahme eines haptotaktisch migrierenden REF auf einem FN-Dotgradienten der Kontrolle. **[B]** Fluoreszenzaufnahme eines stationären REF unter Behandlung von SMIFH2 (40 μ M) auf strukturiertem Substrat. **[C]** Migrierender, un behandelter CEF auf einem FN-Dotgradienten. **[D]** Darstellung einer stationären Zelle behandelt mit 40 μ M SMIFH2 auf strukturiertem Substrat. REFs und CEFs werden im Experiment 3 h kultiviert, fixiert und anschließend Aktin (grün), Paxillin bzw. Nukleus (rot) und FN (blau) immunhistochemisch angefärbt. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 μ m. (Pfeil = Migrationsrichtung). Die höchste Proteinbedeckung des Gradienten befindet sich in Richtung der y-Achse des Gradienten, dargestellt durch den Gradientenbalken am rechten Abbildungsrand. **[E]** Auswertung der Migrationsrichtung unter Behandlung mit SMIFH2, die während der Kultivierungsdauer auf dem FN-Dotgradienten zurückgelegt wurde. Die Behandlung in REFs führt zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme haptotaktisch migrierender Zellen von 75% in un behandelten Zellen auf 2% mit 40 μ M SMIFH2. Der Anteil stationärer Zellen steigt währenddessen konzentrationsabhängig von 17% auf 97%. Weniger als 6% der Zellen migrieren downhill, etwa 10% lateral. N=3; n=629. Chi²-Test: P > 0,05 (\ddagger = nicht signifikant); P < 0,005 (***) **[F]** Auswertung der Migrationsrichtung in CEFs. Konzentrationsabhängige Abnahme uphill migrierender Zellen von 80% auf 4%. Stationäre Zellen steigen unter SMIFH2 Behandlung von 3% auf 95% an. Während der Anteil an downhill migrierenden Zellen kontinuierlich unter 4% liegt, nehmen lateral migrierende Zellen unter der Behandlung von 10% auf 3% ab. N=3; n=750. Chi²-Test: P > 0,05 (\ddagger = nicht signifikant); P < 0,005 (***)

Die Zellmorphologie verändert sich unter der Behandlung des ILK Inhibitors Cpd-22, wie die Färbung der Mikrotubuli erkennen lässt: Das Mikrotubulinetzwerk ist nach der Behandlung dichter arrangiert und erscheint weniger geordnet (s. Abbildung 3.5 A-B). Die quantitative Analyse der Migrationsrichtungen zeigt, dass das Resultat der Störung von ILK ein signifikanter Verlust der Migrationsfähigkeit ist. Unbehandelte Zellen migrieren zu 72% uphill, während nur noch 21% der mit 6 μ M Cpd-22 behandelten Zellen in der Lage sind, haptotaktisch zu migrieren. Diese Abnahme der Migration ist konzentrationsabhängig und verläuft gegenläufig zur Zunahme stationärer Zellen. Die laterale sowie die downhill Migration der Zellen beträgt, mit Ausnahme der Kontrolle, weniger als 6%.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es unter der Behandlung des ILK Inhibitors Cpd-22 zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Migration auf FN-Dotgradienten kommt, sich eine Störung von ILK jedoch nicht auf die Haptotaxis auswirkt (s. Abbildung 3.5 C). (N=3-4; n=562; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005)

Abschließend kann man für das Kapitel 3.1 resümieren, dass die Inhibition der elementaren Schlüsselproteine zwar die Zellmigration auf FN-Dotgradienten einschränkt, dabei aber nicht auf den Mechanismus der Haptotaxis abzielt. Dies hat sich darin gezeigt, dass Zellen, wenn auch stark eingeschränkt, selbst unter hohen Inhibitorkonzentrationen noch in der Lage sind, den Gradienten auszulesen und gerichtet in Richtung der höheren Proteinkonzentration zu migrieren.

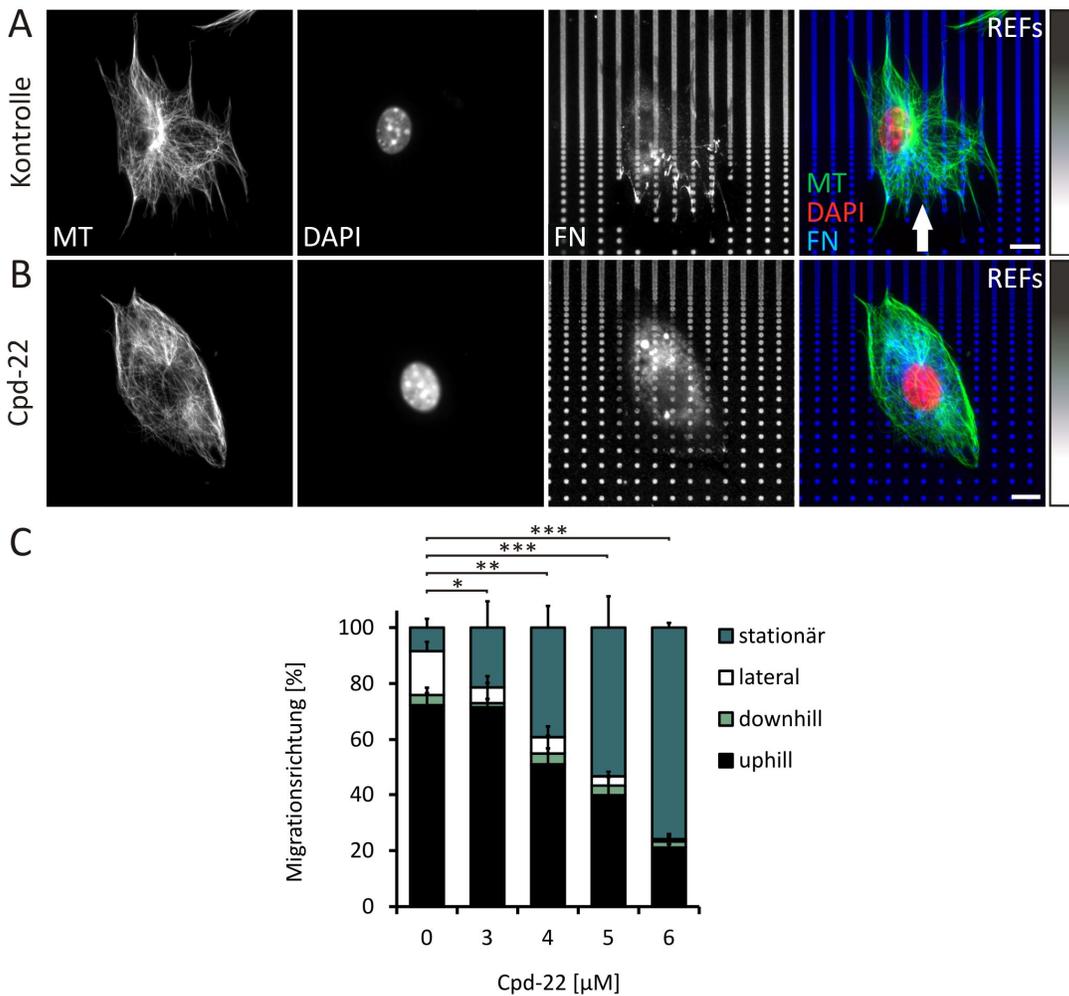


Abbildung 3.5: Migrationsverhalten von REFs nach Inhibition von ILK

[A] Repräsentative Fluoreszenzaufnahme einer haptotaktisch migrierenden Zelle auf einem FN-Dotgradienten der Kontrolle. **[B]** Fluoreszenzaufnahme einer stationären Zelle während der Behandlung mit dem ILK-Inhibitor. REF werden 3 h kultiviert, fixiert und anschließend Mikrotubuli (grün), Nukleus (rot) und FN (blau) immunhistochemisch angefärbt. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 μm , Pfeil=Migrationsrichtung. Die höchste Bedeckung des Gradienten befindet sich in dieser Abbildung in Richtung der y-Achse, dargestellt durch den Gradientenbalken am rechten Bildrand. **[C]** Auswertung der Migrationsrichtung die während der Kultivierungsdauer auf dem FN-Dotgradienten zurückgelegt wurde. Die Behandlung mit Cpd-22 führt zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme haptotaktisch migrierender Zellen von 72% in unbehandelten Zellen auf 21% mit 6 μM Cpd-22. Der Anteil stationärer Zellen steigt konzentrationsabhängig von 8% auf 76%. Mit Ausnahme der Kontrolle liegt der Anteil lateraler und downhill migrierender Zellen unverändert unter 6%. N=3-4; n=562. Chi²-Test: P > 0,05 (‡= nicht signifikant), P < 0,005 (***)

3.2 Die unterliegende Substratgeometrie beeinflusst die Mikrotubuli-Dynamik

Nachdem die vorherigen Störungen der Aktin- und Mikrotubuli-basierenden Strukturen zwar einen deutlichen Effekt auf die allgemeine Zellmigration, jedoch nicht auf die Haptotaxis gezeigt haben, beschäftigt sich dieser Abschnitt der Arbeit mit der Dynamik von Mikrotubuli. Sie entspringen dem Zentrosom und durchziehen die Zelle persistent hin zur Zellperipherie, an der sie häufige Wechsel zwischen Wachstums- und Schrumpfungsphasen aufweisen. Dies wird als dynamische Instabilität bezeichnet (Mitchison and Kirschner, 1984). In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Mikrotubuli einen Einfluss auf die Migration auf FN-Dotgradienten haben und die Organisation der Mikrotubulifilamente durch die unterliegende Substratgeometrie bestimmt wird. Ein beeinträchtigtes Mikrotubulisystem resultierte in einer bidirektionalen Migration auf FN-Dotgradienten. Die Zellen sind im Stande die Gradientenachse, nicht jedoch die Proteinbedeckung zu erkennen, was zu einer gleichverteilten uphill und downhill Migration führt. Zellen, die auf homogen beschichteten FN-Substraten kultiviert wurden, weisen Mikrotubuli mit geordneter, radiärsymmetrischer Morphologie auf. Im Gegensatz dazu erscheint das Mikrotubulinetzwerk in Zellen auf strukturiertem Substrat, hier FN-Dotgradienten, ungeordnet und weniger gebündelt. Dabei konnte mithilfe fixierter Präparate kein Unterschied in der Asymmetrie der Mikrotubuliorganisation zwischen Zellfront und Zellende auf strukturiertem Substrat beobachtet werden (Autenrieth, 2012).

Um neue Erkenntnisse über den dynamische Auf- und Abbau von Mikrotubuli während der Haptotaxis zu gewinnen soll in diesem Experiment die Mikrotubuli-Dynamik mithilfe von Zeitrafferaufnahmen detektiert werden. Hierfür werden Zellen mit dem Protein EB3-GFP (*End-binding protein 3*) transient transfiziert. Analysiert wird die Mikrotubuli-Dynamik in migrierenden und stationären Zellen, auf homogenem und strukturiertem Substrat. Quantifiziert wird der Zeitrafferfilm anschließend mithilfe des Programmes „*PlusTipTracker*“ (Gaudenz Danuser), beschrieben in Kapitel 2.7, welches eine automatisierte Bildanalyse ermöglicht. Mithilfe des Programmes können alle Aufnahmen des Zeitrafferfilms in eine Projektion transferiert werden, um die Beständigkeit und Geschwindigkeit der Pfade der Plus-End-Proteine der Mikrotubuli, fortan als Trajektorien bezeichnet, während der Zeitrafferaufnahme auszuwerten. Abbildung 3.6 A und B illustriert die farbkodierte, zeitliche Beständigkeit bzw. Stabilität aller Trajektorien in migrierenden Zellen auf homogenem bzw. strukturiertem Substrat. In Abbildung 3.6 C und D ist die Beständigkeit der Trajektorien in stationären Zellen auf homogenem bzw. strukturiertem Substrat dargestellt. Die Geschwindigkeit der Trajektorien derselben Zellen wird in Abbildung 3.6 A'-D' abhängig von

der unterliegenden Substratgeometrie und dem Zellverhalten farbkodiert veranschaulicht. Weder in der Beständigkeit, noch in der Geschwindigkeit zeigen sich Asymmetrien in der Mikrotubuli-Dynamik innerhalb der einzelnen Zellen auf den diversen Substraten. Betrachtet man die Quantifizierung der Beständigkeit der Trajektorien auf den unterschiedlichen Substraten in Abbildung 3.6 E, fällt auf, dass Trajektorien auf strukturiertem Substrat eine höhere Lebenszeit aufweisen und stabiler sind, als auf homogenem Substrat. Dabei weisen stationäre Zellen auf strukturiertem Substrat eine höhere Stabilität der Trajektorien auf als migrierende Zellen. Auf homogenem Substrat hat das Zellverhalten keinen Einfluss auf die Beständigkeit. Die Geschwindigkeit der Trajektorien auf strukturiertem Substrat ist, unabhängig vom Zellverhalten, langsamer als auf homogenem Substrat. Auf diesem ist sie in stationären Zellen dagegen signifikant schneller als in migrierenden Zellen (s. Abbildung 3.6 F). Zusammenfassend lässt sich aus diesem Experiment für die Haptotaxis schließen, dass Zellen, die sich auf mikrostrukturierten Dotgradienten befinden, unabhängig von ihrem Verhalten beständigere und langsamere Mikrotubulitrajektorien aufweisen, als Zellen auf homogenem Substrat. Die gesamte Dynamik der Mikrotubuli ist somit weniger instabil als in Zellen auf homogenem Substrat. Innerhalb der Zellen liegen unabhängig von der unterliegenden Substratgeometrie keine Asymmetrien in der Mikrotubuli-Dynamik zwischen Zellfront und Zellende vor. Die erhöhte Proteinbedeckung in Zellen auf strukturiertem Substrat an der Zellfront hat somit keine direkte Auswirkung auf eine asymmetrische Verteilung der Mikrotubuli-Dynamik innerhalb einer Zelle. (N=3; n=11; zweiseitiger t-test, Signifikanzniveau: ***, $P < 0,005$)

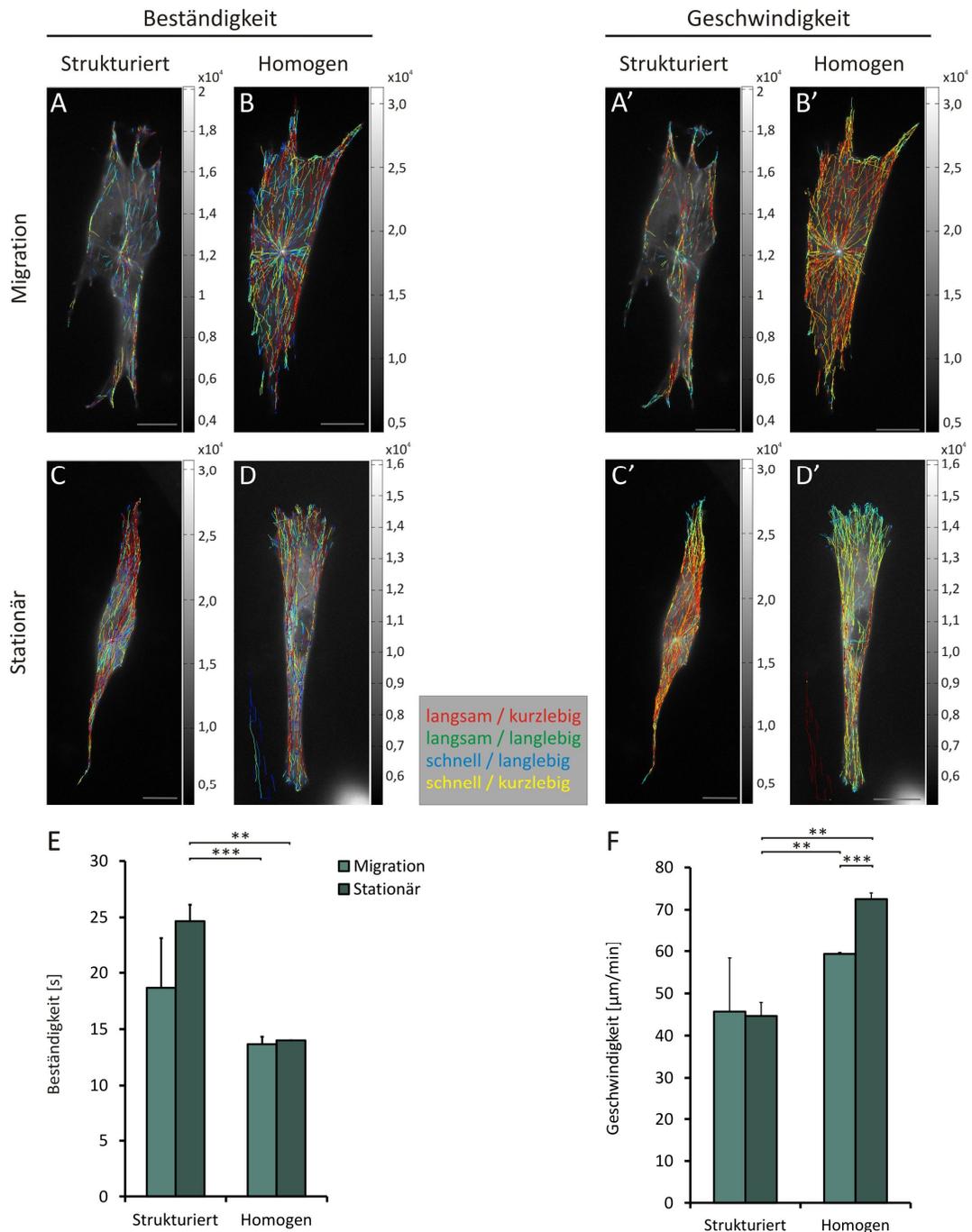


Abbildung 3.6: Mikrotubuli-Dynamik auf unterschiedlichen Substratgeometrien

[A-D] Bildstapel von Zeitrafferaufnahmen deren Trajektorien mithilfe des Programmes „PlusTipTracker“ markiert wurden. Die Beständigkeit der einzelnen Trajektorien ist farbkodiert dargestellt, aufgeschlüsselt in Zellverhalten und unterliegender Substratgeometrie. [A'-D'] Bildstapel der Zellen aus Abbildung A-D, mit farbkodierten Geschwindigkeiten der Trajektorien. [E] Quantitative Analyse der Beständigkeit der Trajektorien. Die längste Beständigkeit weisen stationäre Zellen auf strukturiertem Substrat auf, während Zellen auf homogenem Substrat eine vergleichsweise geringe Beständigkeit aufweisen. [F] Analyse der Geschwindigkeit der Trajektorien stationärer und migrierender Zellen auf homogenem bzw. strukturiertem Substrat. Stationäre Zellen zeigen die schnellsten Trajektorien, während die Mikrotubuli-Dynamik auf strukturiertem Substrat geringer ist. N=3; n=11. Zweiseitiger t-test: $P > 0,05$ (nicht signifikant, nicht gezeigt), $P < 0,005$ (***)

3.3 Die Funktionen von $\alpha5\beta1$ - und $\alphaV\beta3$ -Integrin unterscheiden sich bei der Migration auf FN-Dotgradienten

Während sich die vorherigen Kapitel mit der Zytoskelett-Dynamik beschäftigt haben, liegt der Fokus dieses Kapitels auf den transmembranen Integrinrezeptoren. Integrine sind für den mehrstufigen Zyklus der gerichteten, Integrin-vermittelten Zellmigration unverzichtbar, indem sie die zentrale strukturelle Verbindung zwischen der EZM und dem Aktinzytoskelett der Zelle darstellen. Diese Verankerung der Zelle an das unterliegende Substrat stellt die bidirektionale Signaltransduktion sicher und ermöglicht die Translokation des Zellkörpers durch die Übertragung von Zugkräften, welche durch die Aktin-/Myosin-Kontraktilität generiert werden. Integrine können eine überlappende Ligandenspezifität aufweisen, was dazu führt, dass ein Integrin mit verschiedenen Liganden in Interaktion treten kann. Desweiteren existiert eine überlappende Rezeptorspezifität, welche bedeutet, dass unterschiedliche Integrine beispielsweise mit FN interagieren können. Welche Funktion den Integrinen $\alpha5\beta1$ und $\alphaV\beta3$ in der Migration auf FN- und VN-Dotgradienten zukommt und wie sich eine Störung der einzelnen Domänen auf die Zellmigration auswirkt, soll in diesem Kapitel der Arbeit näher beleuchtet werden.

3.3.1 Unterschiedliche Proteingradienten induzieren ein differenzielles Migrationsverhalten

Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass primäre Fibroblasten einen FN-Dotgradienten erkennen und zu 80% in Richtung der höheren Bedeckung migrieren (Autenrieth, 2012). Für diese haptotaktische Migration auf strukturierten FN-Dotgradienten sind Integrine unverzichtbar. Für eine Interaktion mit FN gelten $\alpha5\beta1$ - und $\alphaV\beta3$ -Integrin als die beiden Hauptrezeptoren. Während $\alpha5\beta1$ -Integrin spezifisch an FN bindet, kann $\alphaV\beta3$ -Integrin unter anderem auch noch VN binden. Hierbei wird $\alphaV\beta3$ -Integrin als der klassische VN-Rezeptor beschrieben (Horton, 1997). Um zu untersuchen welches der beiden genannten Integrine welche Rolle in der Migration auf FN-Dotgradienten einnimmt, werden Zellen auf FN-Dotgradienten sowie auf VN-Dotgradienten ausgesät. Hierdurch können die Integrine

insoweit separiert werden, dass man auf FN-Dotgradienten eine Bindung von $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrin erwartet, auf VN-Dotgradienten jedoch nur $\alpha V\beta 3$ -Integrin bindet. Abbildung 3.7 A-B zeigt repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von Zellen auf FN- und VN-Dotgradienten. Die Zellen unterscheiden sich in der Größe und in der Organisation des Aktinzytoskeletts. Migrierende Zellen auf FN organisieren ihre Aktinfilamente diagonal zur Migrationsrichtung, während Zellen auf VN-Dotgradienten die Aktinfilamente vornehmlich parallel zur Migrationsrichtung ausgerichtet haben. Die Stressfaserbündel in Zellen auf VN-Dotgradienten erscheinen stärker ausgeprägt und zeigen eine deutliche Aufspannung der Zelle zwischen den Dots. Im Zellzentrum wirkt die Organisation des Aktinzytoskeletts wie ausgespart, was nur auf VN-Dotgradienten beobachtet werden kann (s. Abbildung 3.7 B). Wie in den Einzelkanälen deutlich zu erkennen, sind Zellen auf FN in der Lage, das Protein zu internalisieren und dieses umzubauen, während die VN-Dots aufgrund fehlender Migration in ihrem ursprünglichen Zustand bleiben. Nicht nur die fehlende Internalisierung, sondern auch ein Umbau aufgrund dynamischen Zellverhaltens, kann auf VN nicht festgestellt werden. Die Quantifizierung des Migrationsverhaltens zeigt große Unterschiede in der Fähigkeit zur haptotaktischen Migration auf FN-Dotgradienten von 92%, während auf VN-Dotgradienten die Zellen nicht in der Lage sind, zu migrieren (s. Abbildung 3.7 C). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl REFs, als auch NIH3T3-Zellen in der Lage sind, auf homogenem FN-Substrat und homogenem VN-Substrat zu migrieren (eigene Daten, im Rahmen dieser Dissertation nicht dargestellt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das unterliegende Glykoprotein sowie die darauf spezifisch exprimierten Integrine einen Einfluss auf die Migration auf Protein-Dotgradienten nehmen. So erfolgt auf VN mit $\alpha V\beta 3$ -Integrin, als klassischen VN-Rezeptor, keine Migration, während auf FN mit $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und $\alpha V\beta 3$ -Integrin, eine starke Migration stattfindet. (N=3; n=202; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005)

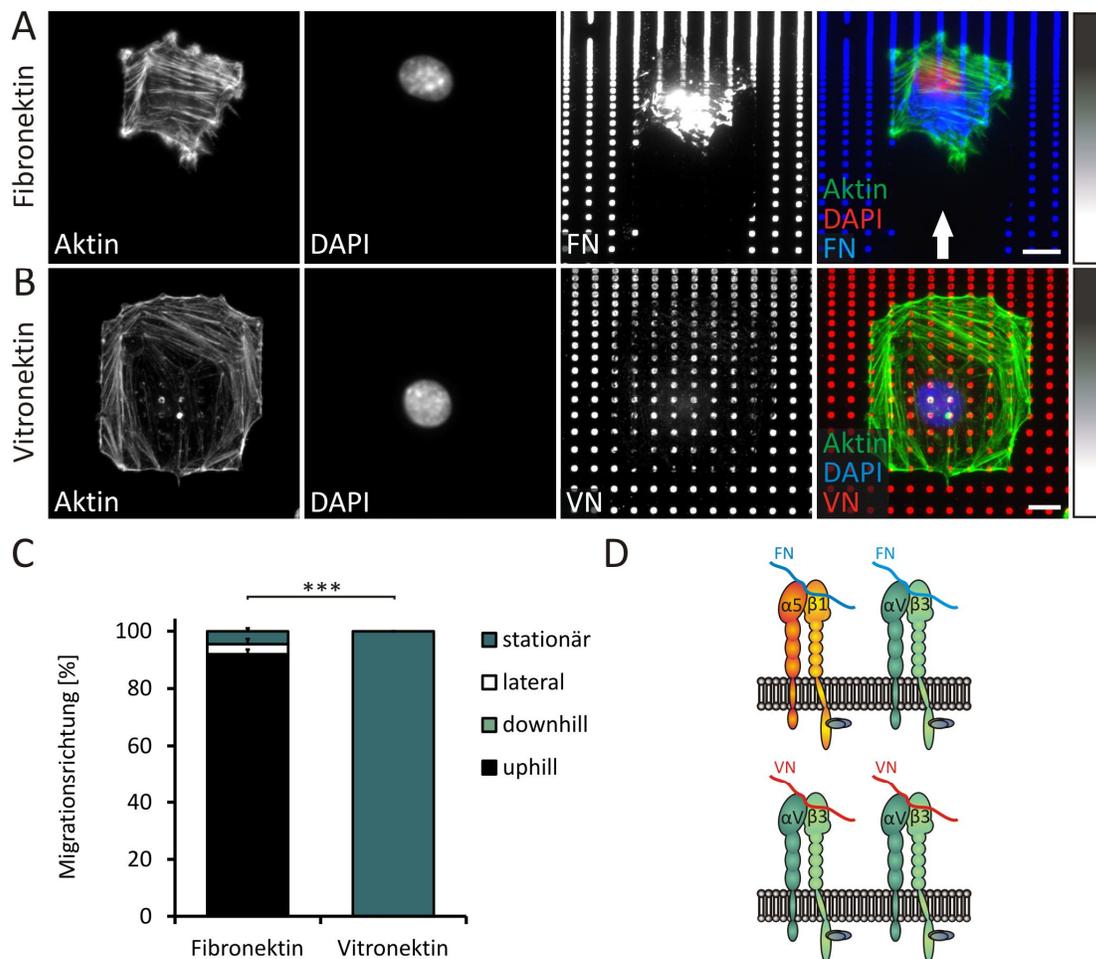


Abbildung 3.7: Migrationsverhalten auf unterschiedlichen Glykoprotein-Dotgradienten

[A] Repräsentative Fluoreszenzaufnahme einer Zelle auf einem FN-Dotgradienten. Die Zelle migriert haptotaktisch in Richtung der höheren Proteinbedeckung. (Pfeil=Migrationsrichtung). **[B]** Repräsentative Fluoreszenzaufnahme einer statischen Zelle auf einem VN-Dotgradienten. REFs werden für 3 h auf FN- bzw. VN-Dotgradienten kultiviert, fixiert und Aktin (grün), Nukleus (rot/blau), FN (blau) bzw. VN (rot) immunhistochemisch angefärbt. Der Gradient verläuft in allen Abbildungen in Richtung des oberen Bildrandes. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 µm. **[C]** Quantitative Analyse der Migrationsrichtung von REFs auf FN- bzw. VN-Dotgradienten. Während REFs auf FN-Dotgradienten zu 92% uphill migrieren, findet auf VN-Dotgradienten keine Migration statt. **[D]** Schematische Darstellung der auf FN- und VN-Substraten gegenwärtigen Integrinkombinationen. N=3; n=202. Chi²-Test: P > 0,05 (‡= nicht signifikant), P < 0,005 (***)

3.3.2 Die α V-Untereinheit ist für die Migration auf FN-Dotgradienten verzichtbar

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass Zellen auf FN-Dotgradienten in der Lage sind zu migrieren, wohingegen auf VN-Dotgradienten keine Migration stattfindet. Während α V β 3-Integrin sowohl auf FN als auch auf VN mit dem Liganden interagiert, ist α 5 β 1-Integrin ein spezifischer FN Rezeptor. Um die Rolle von α V β 3-Integrin während der Haptotaxis auf FN-Dotgradienten näher zu untersuchen, werden Zellen während ihrer Inkubationszeit mit dem spezifischen α V-Inhibitoren Cilengitide behandelt.

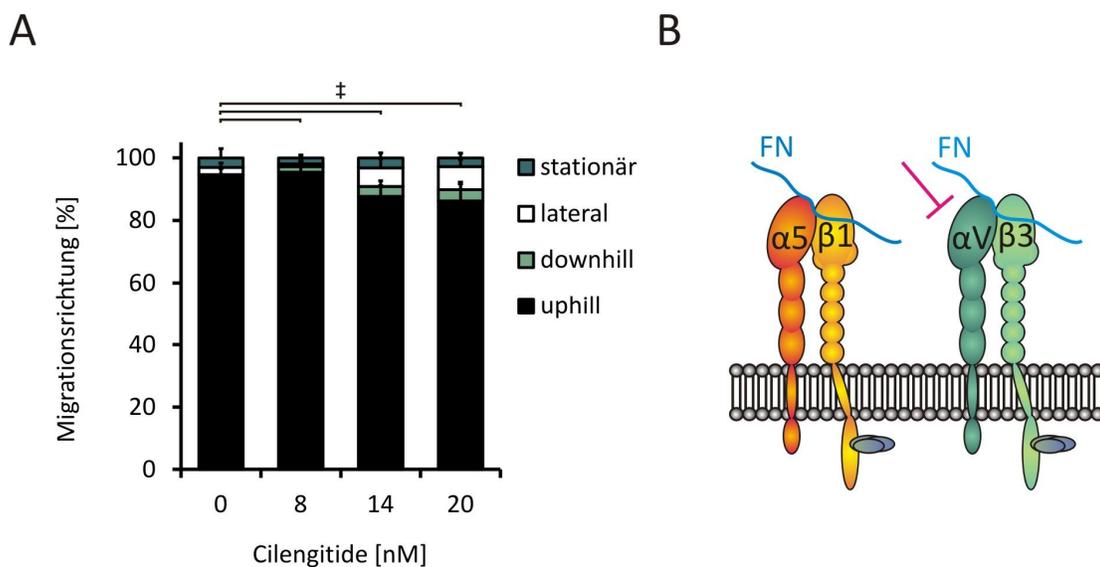


Abbildung 3.8: Migrationsverhalten nach pharmakologischer Inhibition der α V-Untereinheit

[A] Quantitative Analyse der Migrationsrichtung von REFs nach 3 h Kultivierung auf FN-Dotgradienten unter Behandlung des α V-Untereinheiten spezifischen Inhibitors Cilengitide. Unabhängig von der eingesetzten Dosis zeigt sich kein signifikanter Effekt von Cilengitide auf die haptotaktische Migration auf FN-Dotgradienten. Der Anteil uphill migrierender Zellen sinkt von 95% auf 86%. N=3; n=450. Chi²-Test: P > 0,05 (\neq nicht signifikant), P < 0,005 (***) **[B]** Modell zur Veranschaulichung der Interaktion von Cilengitide mit der α V-Untereinheit von α V β 3-Integrin.

Cilengitide ist ein zyklisches Pentapeptid, das mit der RGD-Sequenz um die Integrinbindung konkurriert. Die Inhibition erfolgt spezifisch an der α V-Untereinheit von α V β 3- und α V β 5-Integrin (IC₅₀: α V β 3: 4,1 nM; α V β 5: 79 nM). REFs werden für 3 h auf einem FN-Dotgradienten kultiviert, im Anschluss fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Abbildung 3.8 A zeigt die quantitative Analyse der Inhibitor behandelten Zellen. Unabhängig von der eingesetzten Konzentration hat Cilengitide keinen Einfluss auf die Migration. Der Anteil uphill migrierender Zellen sinkt mit zunehmender Dosis nur leicht von 95% auf 86%. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Störung von α V β 3-Integrin für die Migration der Zellen auf FN-

Dotgradienten keine Rolle spielt. (N=3; n=450; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005). Abbildung 3.8 B veranschaulicht den Interaktionsort von Cilengitide, die extrazelluläre Domäne der α V-Domäne.

3.3.3 Die β 1-Untereinheit ist notwendig für die Migration auf FN-Dotgradienten

Zellmorphologie von β 1-*Knockout*-Zellen auf homogenem FN-Substrat

Da die vorherigen Ergebnisse bereits vermuten lassen, dass das Integrin α 5 β 1 für die Migration auf FN-Dotgradienten eine zentrale Rolle einnimmt, soll diese Hypothese mit einem *Knockout* der β 1-Domäne überprüft werden. Für die kommenden zwei Experimente wurden deshalb drei Zelllinien von Bernhard Wehrle-Haller zur Verfügung gestellt. Diese weisen unterschiedliche Anteile an endogenem β 1-Integrin auf. So handelt es sich bei den Zellen der Zelllinie GD25-wt um murine Zellen, die aus embryonalen Stammzellen gewonnen und deren Gen für β 1-Integrin entfernt wurde (Fässler et al., 1995). Das Labor von Wehrle-Haller hat mit diesen GD25-wt Zellen durch stabile Transfektion von β 1A-GFP und β 1D-GFP zwei weitere Zelllinien erzeugt: GD25- β 1A und GD25- β 1D. β 1A stellt die ubiquitär exprimierte Isoform von β 1-Integrin dar, während β 1D eine Spleißvariante von β 1A ist, die nur in der Skelettmuskulatur exprimiert wird. Alle drei Zelllinien werden im kommenden Experiment zunächst auf homogen beschichteten FN-Substraten untersucht, um einen ersten Eindruck über das Zellverhalten und die Morphologie auf homogen beschichtetem FN zu erhalten. Betrachtet man die Morphologie der GD25-wt Zelle, erkennt man eine stark elongierte, stationäre Zelle (s. Abbildung 3.9 A). Die Zellmorphologie der GD25- β 1A Zelllinie ist repräsentativ in Abbildung 3.9 B dargestellt und zeigt auf homogenem Substrat eine weit aufgespreizte Zelle mit definiertem β 1-GFP-Signal als Transfektionsnachweis. Die Zelle interagiert dynamisch mit dem Substrat, was durch den Umbau des FN sichtbar ist. Die repräsentative GD25- β 1D Zelle zeigt eine unpolarisierte, runde Morphologie ohne Migrationsverhalten (s. Abbildung 3.9 C).

Auf homogen beschichtetem FN gibt es somit bereits erste Unterschiede in der Fähigkeit der Zellen, sich auf dem unterliegenden FN auszubreiten. Hier zeigt sich, dass die mit β 1A transfizierten Zellen, die dadurch dem Wildtyp entsprechen, in der Lage sind, sich großflächig auf dem Substrat auszubreiten. Dagegen sind GD25-wt Zellen zwar in der Lage zu *spreaden*,

die Zellmorphologie sieht jedoch verändert aus. GD25- β 1D Zellen bleiben vergleichsweise klein und rund.

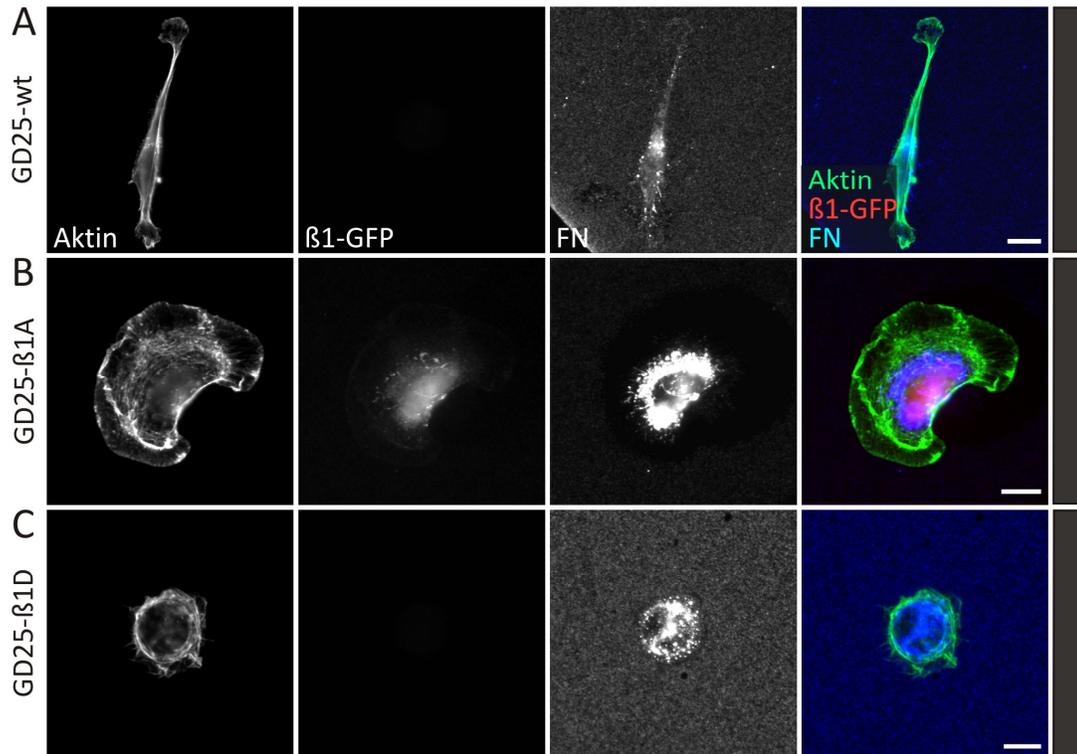


Abbildung 3.9: Zellmorphologie diverser GD25-Zelllinien auf homogenem Substrat

[A] Zelle der Zelllinie GD25-wt auf homogenem FN-Substrat. Die elongierte Zelle zeigt kein Migrationsverhalten. **[B]** Repräsentative GD25- β 1A Zelle auf homogenem FN-Substrat. Die großflächige Zelle migriert auf dem homogenen Substrat während der Kultivierungsdauer von 3 h. Das β 1-GFP Signal zeigt die positiv erfolgte stabile Transfektion von β 1A-GFP. **[C]** Zelle der GD25- β 1D Zelllinie auf homogenem FN. Die unpolarisierte Zellmorphologie geht mit fehlender Migration einher. Angefärbt sind in allen Darstellungen Aktin (grün) und FN (blau). In **[B]** ist zusätzlich noch der β 1-GFP Kanal der stabilen Transfektion dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit dem Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 μ m.

Der Verlust der β 1-Untereinheit führt zu einer starken Beeinträchtigung der Migration auf FN-Dotgradienten

Im vorherigen Abschnitt wurden die drei GD25 Zelllinien, die sich in der β 1-Isoform unterscheiden, bereits auf homogenem FN untersucht. Wie sich diese Zellen auf mikrostrukturierten FN-Dotgradienten verhalten, soll in diesem Abschnitt näher analysiert werden. Für das Experiment werden die Zellen für 3 h auf FN-Dotgradienten kultiviert, anschließend fixiert und gefärbt. Die Quantifizierung der Migrationsrichtungen ist in Kapitel 2.7 ausführlich dargestellt. Die Zellmorphologie der repräsentativen Zelle der GD25-wt Zelllinie zeigt starke, isotropische Zellausläufer (s. Abbildung 3.10 A). Die Morphologie der GD25- β 1A Zelle ist in Abbildung 3.10 B dargestellt und erscheint im Vergleich zu GD25-wt kompakter. Betrachtet man das Aktinzytoskelett, lassen sich keine definierten Stressfasern erkennen. Das β 1-Signal ist über den FN-Dots angereichert und zeigt die erfolgreiche Transfektion von β 1-GFP in die ursprüngliche GD25-wt Zelllinie. Die repräsentative Zelle der GD25- β 1D Linie erscheint klein und rund, mit einer Erschwernis sich großflächig auf dem Substrat auszubreiten (s. Abbildung 3.10 C). In Abbildung 3.10 D ist die Quantifizierung der Migrationsrichtungen der untersuchten Zelllinien aufgetragen. Von den GD25-wt Zellen sind nur 31% in der Lage, uphill, in Richtung höherer Proteinbedeckung, zu migrieren. 66% der Zellen zeigen ein stationäres Verhalten. Die mit β 1A-GFP stabil transfizierten Zellen sind zu 73% zu haptotaktischer Migration auf dem FN-Dotgradient fähig, während 21% der Zellen stationär verbleiben. Betrachtet man das Migrationsverhalten der GD25- β 1D Zellen, so sind nur 2% der Zellen in der Lage uphill zu migrieren, während der größte Teil mit 98% stationär auf dem mikrostrukturierten Substrat verbleibt.

Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von β 1-Integrin für die gerichtete Migration auf FN-Dotgradienten, indem sie zeigen, dass ein Verlust von β 1-Integrin zu einem starken Einbruch in der Migration führt, während die Isoform β 1D eine Migration vollständig unterbindet. Nur das Einbringen der ubiquitär exprimierten Isoform β 1A kann den β 1-*Knockout* retten und zu einer Migrationsfähigkeit, vergleichbar mit dem WT-Migrationsverhalten anderer Zelllinien, führen. (N=3-5; n=671; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005).

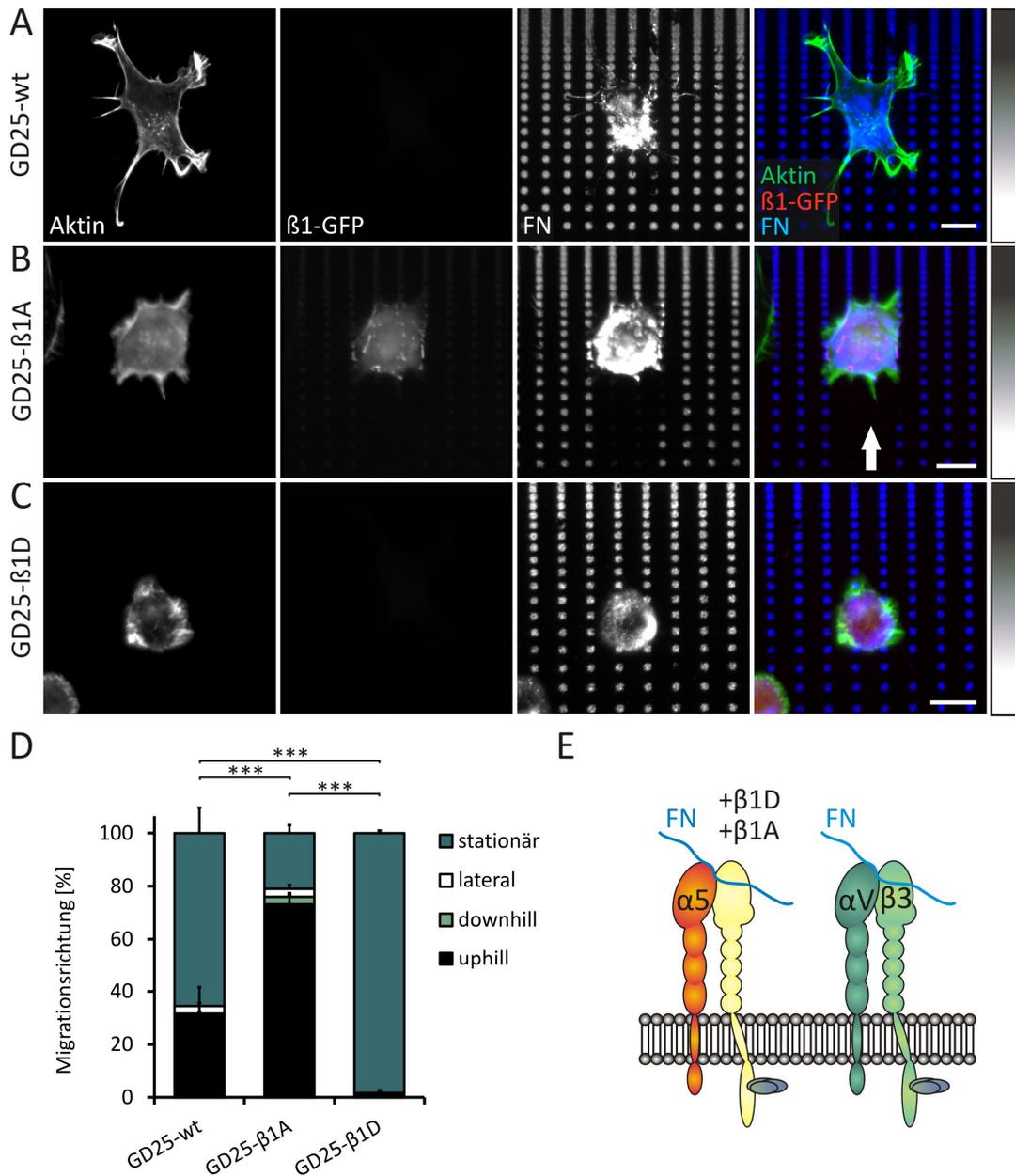


Abbildung 3.10: Der Einfluss von β 1-Integrin auf das Migrationsverhalten auf FN-Dotgradienten

[A] Stationäre Zelle der Zelllinie GD25-wt auf dem FN-Dotgradienten. **[B]** Fluoreszenzaufnahme einer haptotaktisch migrierenden Zelle (Pfeil = Migrationsrichtung) der mit β 1A-GFP stabil transfizierten Zelllinie GD25- β 1A auf einem FN-Dotgradienten. **[C]** Stationäre Zelle der GD25- β 1D Zelllinie auf dem FN-Dotgradienten. Die Zellen werden für 3 h auf einem FN-Dotgradienten kultiviert, fixiert, anschließend Aktin (grün) und FN (blau) immunhistochemisch angefärbt. In rot ist der β 1-GFP Kanal dargestellt. Die höchste Bedeckung des Gradienten befindet sich in dieser Abbildung am oberen Bildrand, signalisiert durch den Gradientenbalken am rechten Bildrand. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 μ m. **[D]** Prozentuale Auswertung der Migrationsrichtungen, welche auf dem FN-Dotgradient zurückgelegt wurden. Während 73% der mit β 1A-GFP stabil transfizierten Zellen zur Haptotaxis fähig sind, können nur 31% der GD25-wt Zellen und 2% der GD25- β 1D Zellen uphill migrieren. Die restlichen Zellen verblieben stationär auf dem Gradient. Der Anteil downhill und lateral migrierender Zellen beträgt in allen Fällen weniger als 3%. N=3-5; n=671. Chi²-Test: P > 0,05 (\neq nicht signifikant), P < 0,005 (***) **[E]** Modell zur Veranschaulichung.

3.3.4 Die intrazelluläre β 1-Domäne befähigt Fibroblasten zur Migration auf VN-Dotgradienten

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es Zellen nicht möglich ist, sich auf VN-Dotgradienten fortzubewegen. Durch den Einsatz von β 1-*Knockout* Zellen konnte zudem gezeigt werden, dass die β 1-Domäne bedeutungsvoll für die Migration auf FN-Dotgradienten ist. GD25- β 1D Zellen, deren intrazelluläre β 1-Signaltransduktion verändert ist (Baudoin et al., 1998; Gimond et al., 2000), konnten ebenfalls nicht auf den FN-Dotgradienten migrieren. Dies deutet auf die Notwendigkeit einer funktionellen zytoplasmatischen β 1-Domäne für die Migration hin. Anhand dieser Erkenntnis soll im folgenden Kapitel untersucht werden, ob Zellen zu einer Migration auf VN-Dotgradienten fähig sind, wenn sie ein intrazelluläres Signal der β 1-Domäne besitzen. Hierzu werden NIH3T3s verwendet, die von der Arbeitsgruppe Bernhard Wehrle-Haller auf eine Subpopulation selektiert wurden. Diese Zellen werden als NIH3T3- β 3lows bezeichnet und weisen ein geringes endogenes Level an β 3-Integrin (<10%) auf, während das Level an β 1-Integrin unverändert bleibt (Pinon et al., 2014). Für das Experiment werden NIH3T3- β 3lows transient mit einem GFP-markierten chimären β 3-Integrin transfiziert. Dieses codiert für die extrazelluläre Integrindomäne von β 3- und die transmembrane und zytoplasmatische Domäne von β 1-Integrin. Durch die Transfektion in NIH3T3- β 3lows kann sichergestellt werden, dass jene Integrine, die auf VN Kontakte ausbilden, auch mehrheitlich das chimäre β 3-Integrin besitzen und dadurch das intrazelluläre Signal von β 1-Integrin weiterleiten. In diesem Experiment werden die transfizierten Zellen für 4 h auf VN kultiviert, anschließend fixiert und Aktin, FN bzw. VN immunhistochemisch angefärbt. In Abbildung 3.11 A ist die WT-Situation von NIH3T3s auf einem FN-Dotgradienten dargestellt. Die Zellen migrieren auf FN gerichtet in Richtung höherer Bedeckung, wie bereits in Kapitel 3.3.1 für REFs gezeigt wurde. Auf VN-Dotgradienten sind NIH3T3s, vergleichbar mit REFs, ebenfalls nicht in der Lage zu migrieren (s. Abbildung 3.11 B). Die Abbildung 3.11 C zeigt das Migrationsverhalten von NIH3T3- β 3lows auf FN. Diese Zellen migrieren wie NIH3T3s haptotaktisch, sie sind deutlich gespreizt und polarisiert. In Abbildung 3.11 D ist die Zellmorphologie einer repräsentativen NIH3T3- β 3low Zelle auf einem VN-Dotgradienten dargestellt. Im Vergleich zu Abbildung 3.11 C ist die Zelle um einiges kleiner und weniger gespreizt. Abbildung 3.11 E zeigt eine repräsentative NIH3T3- β 3low Zelle auf VN, transient transfiziert mit dem chimären β 3-Integrin. Die Zelle migriert auf dem VN-Dotgradienten, was die Internalisierung der VN-Dots am Zellende illustriert und sie ähnelt in Zellverhalten und Zellmorphologie der NIH3T3- β 3low Zelle auf FN in Abbildung 3.11 C.

Dieses Experiment zeigt, dass Zellen durch die transiente Transfektion des chimären $\beta 3$ -Integrins und dem dadurch erlangten intrazellulären Signal von $\beta 1$ -Integrin die Fähigkeit erwerben auf VN-Dotgradienten zu migrieren. Dies unterstreicht die Bedeutung der zytoplasmatischen $\beta 1$ -Domäne für die Migration auf Adhäsionsgradienten.

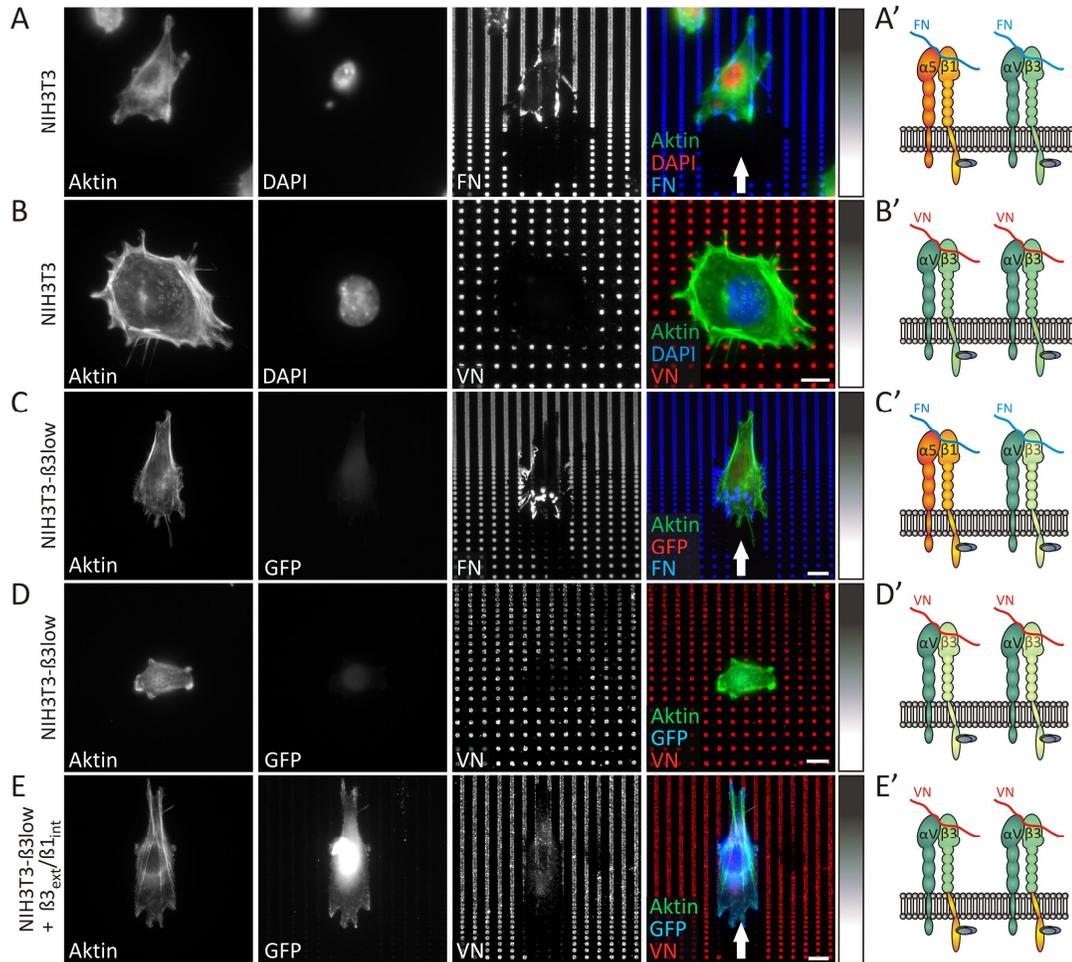


Abbildung 3.11: Intrazelluläres $\beta 1$ -Integrin ermöglicht die Migration auf VN-Dotgradienten

Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen von NIH3T3 und NIH3T3- $\beta 3$ low auf FN- bzw. VN-Dotgradienten nach 4 stündiger Kultivierungszeit. Immunhistochemisch angefärbte Strukturen: Aktin (grün), Nukleus (rot/blau), FN (blau) bzw. VN (rot). Der Gradient verläuft in Richtung der y-Achse. **[A]** Fluoreszenzaufnahme einer NIH3T3 Zelle auf einem FN-Dotgradienten. Die Zelle migriert in Richtung höherer Bedeckung. (Pfeil=Migrationsrichtung). **[B]** Fluoreszenzaufnahme einer stationären NIH3T3 Zelle auf einem VN-Dotgradienten. **[C]** Fluoreszenzaufnahme einer uphill migrierenden NIH3T3- $\beta 3$ low Zelle auf einem FN-Dotgradienten. **[D]** Fluoreszenzaufnahme einer repräsentativen stationären NIH3T3- $\beta 3$ low Zelle auf einem VN-Dotgradienten. **[E]** Fluoreszenzaufnahme einer mit dem chimären $\beta 3$ -Integrin transient transfizierten NIH3T3- $\beta 3$ low Zelle auf einem VN-Dotgradienten. Mithilfe der intrazellulären $\beta 1$ -Signaltransduktion erwerben die Fibroblasten die Fähigkeit auf VN-Dotgradienten zu migrieren. **[A'-E']** Darstellung der in den Abbildungen **[A-E]** beeinflussten Integrindomänen. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 μ m.

3.3.5 Der Verlust des zytoplasmatischen β 1-Integrin Inhibitors ICAP-1 begünstigt die Migration auf FN-Dotgradienten

Neben der Acetylierung von β 1-Integrin gibt es eine weitere individuelle Eigenschaft von β 1- im Vergleich zu β 3-Integrin, nämlich ICAP-1. Bei ICAP-1 handelt es sich um einen intrazellulären Inhibitor, der spezifisch mit der zytoplasmatischen Domäne von β 1-Integrin, jedoch nicht mit der von β 3-Integrin, interagiert. Durch die ICAP-1 Bindestelle, die das Kindlin Bindemotiv einschließt, folgt eine sterische Hemmung der Talinbindung an die zytoplasmatische β 1-Domäne, so dass eine Integrinaktivierung ausbleibt (Moser et al., 2009b). Auf diese Weise wird die Talin und Kindlin Bindung negativ von ICAP-1 reguliert (Brunner et al., 2011). Diese Inaktivierung besteht für die Dauer der Bindung von ICAP-1 an β 1-Integrin. Ausschlaggebend für die Spezifität für β 1- nicht jedoch für β 3-Integrin, ist die Aminosäure Valin, die an der β 1-Domäne proximal des NPXY Motivs von Kindlin lokalisiert ist. Bei β 3-Integrin befindet sich an Stelle des Valins stattdessen Threonin (Bouvard et al., 2006; Chang et al., 1997). Für das folgende Experiment werden Präosteoblasten verwendet, die aus einer ICAP-1-null Maus (ICAP-1 $-/-$) isoliert wurden (Daniel Bouvard, Frankreich). Als Kontrolle dienen ICAP-1 $-/-$ Zellen, stabil transfiziert mit ICAP-1 (ICAP-1 $+/+$). Beide Zelllinien werden für 3 h auf FN-Dotgradienten kultiviert und im Anschluss Aktin, Nukleus und FN immunhistochemisch gefärbt. In Abbildung 3.12 A ist eine repräsentative ICAP-1 $+/+$ Zelle auf einem FN-Dotgradienten dargestellt. Die Zelle migriert uphill, in Richtung höherer Bedeckung. Abbildung 3.12 B stellt eine repräsentative ICAP-1 *Knockout*-Zelle auf einem FN-Dotgradienten dar, welche ebenfalls uphill migriert. In Abbildung 3.12 C ist das prozentuale haptotaktische Migrationsverhalten von ICAP-1 $+/+$ mit 54% dargestellt. 21% der Zellen weisen eine laterale Migration auf, 17% der Zellen verbleiben stationär auf dem Substrat und 7% migrieren downhill. Im Gegensatz dazu zeigen ICAP-1 $-/-$ Zellen eine erhöhte Migration in Richtung zunehmender Proteinbedeckung von 78%. Nur 11% der Zellen migrieren lateral und weniger als 5% der Zellen migrieren downhill bzw. bleiben stationär. (N=3-4; n=342; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass der zytoplasmatische Inhibitor ICAP-1 die Migrationsfähigkeit insofern beeinflusst, dass in Abwesenheit von ICAP-1 mehr Zellen zur haptotaktischen Migration auf FN-Dotgradienten fähig sind. In Abbildung 3.12 D verdeutlicht das Schema die Interaktion von ICAP-1 mit seinem Regulator Krit-1 sowie die spezifische Bindung von ICAP-1 an die zytoplasmatische Domäne von β 1-Integrin, was zur Integrininaktivierung führt.

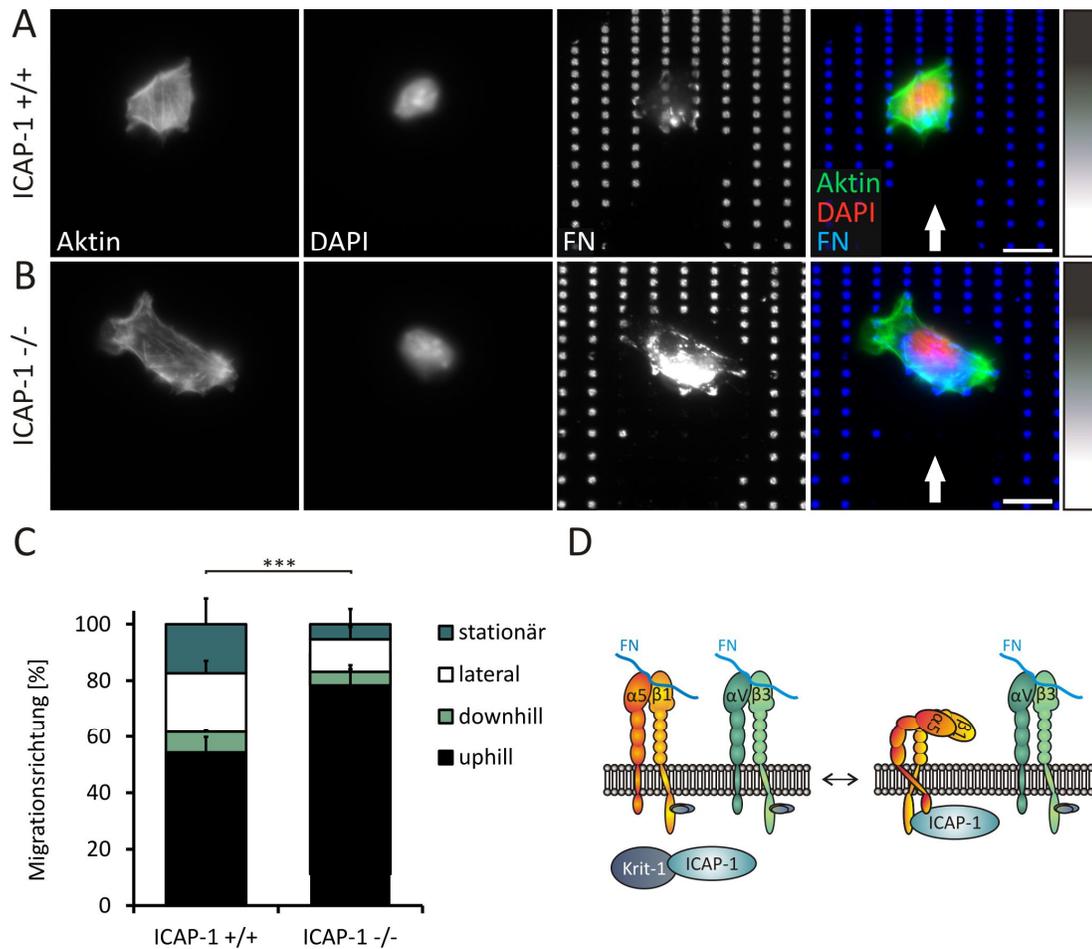


Abbildung 3.12: Migrationsverhalten von ICAP-1-Knockout und ICAP-1 +/+ Zellen auf FN-Dotgradienten

[A] Fluoreszenzaufnahme einer haptotaktisch migrierenden ICAP-1 +/+ Zelle auf einem FN-Dotgradienten. **[B]** Repräsentative Aufnahme einer uphill migrierenden ICAP-1 *Knockout*-Zelle auf einem FN-Dotgradienten. Die Zellen wurden für 3 h auf FN-Dotgradienten kultiviert, fixiert und Aktin (grün), Nukleus (rot) und FN (blau) gefärbt. (Pfeil = Migrationsrichtung). Die höchste Proteinbedeckung befindet sich am oberen Bildrand, signalisiert durch den Gradientenbalken am rechten Bildrand. **[C]** Prozentuale Auswertung der Migrationsrichtungen von ICAP-1 +/+ und ICAP-1 -/- Zellen auf FN-Dotgradienten. ICAP-1 +/+ Zellen migrieren zu 54% uphill, während 17% stationär verbleiben, 21% lateral und 7% downhill migrieren. Die ICAP-1-Knockout-Zellen migrieren zu 78% uphill, zu 11% lateral und weniger als 5% migrieren downhill bzw. verbleiben stationär. (N=3-4; n=342; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005). **[D]** Modell zur Veranschaulichung der Interaktion von ICAP-1 mit dem Regulator Krit-1 und der Interaktion von ICAP-1 mit der zytoplasmatischen β 1-Domäne.

3.3.6 Die Acetylierung von Lysin-794 an β 1-Integrin stellt die reguläre Migration auf FN-Dotgradienten sicher

Die Zellpolarisierung wird durch die Acetylierung von Lysin-794 auf homogenem FN-Substrat beeinflusst

Nachdem im vorherigen Kapitel die Bedeutung der intrazellulären β 1-Domäne für die gerichtete Migration gezeigt wurde, soll im folgenden Kapitel darauf eingegangen werden, welche Besonderheit die zytoplasmatische Domäne von β 1-Integrin im Gegensatz zu der β 3-Domäne aufweist. Ein Unterschied ist die Acetylierung von Lysin-794 innerhalb des distalen NPXY Motivs (Choudhary et al., 2009). Diese reversible posttranslationale Modifikation neutralisiert die Ladung des positiv geladenen Lysins. Für dieses Experiment werden zwei Zelllinien der Gruppe Wehrle-Haller verwendet, die aus der Zelllinie GD25- β 1A hervorgegangen sind: GD25-K794R und GD25-K794Q. Das Lysin an Stelle 794 wurde dabei einerseits durch Arginin, andererseits durch Glutamin ausgetauscht. GD25-K794R Zellen simulieren dabei die positive Ladung eines nicht-acetylierten Lysins, während Zellen der Linie GD25-K794Q die neutrale Ladung eines acetylierten Lysins an der β 1-Domäne simulieren. Im folgenden Experiment wurden diese beiden Zelllinien auf homogen beschichteten FN-Substraten kultiviert, nach 3 h bzw. 5 h fixiert und Aktin sowie FN immunhistochemisch gefärbt. Betrachtet man Abbildung 3.13 A und B fällt auf, dass die repräsentative Zelle der Linie GD25-K794R nach 3 h eine unpolarisierte Morphologie ohne erkennbare Zellfront aufweist, während dieselbe Zelllinie nach 5 h eine deutliche Polarisierung zeigt. In Abbildung 3.13 C und D sind GD25-K794Q auf homogenem FN dargestellt. Ein Unterschied bezüglich der Polarisierung nach 3 h oder 5 h ist hier nicht feststellbar. Die Zellen weisen zu beiden Zeitpunkten eine polarisierte Zellfront auf. Vergleicht man GD25-K794R und GD25-K794Q Zellen nach 5 h auf homogenem Substrat, lässt sich ein stärkerer Umbau des unterliegenden Substrats bei GD25-K794R Zellen feststellen.

Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass es bereits auf homogen beschichtetem FN-Substrat Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien gibt. Während GD25-K794Q bereits nach 3 h eine polarisierte Zellmorphologie entwickelt, ist diese bei GD25-K794R erst nach 5 h festzustellen. Nach 5 h interagieren diese Zellen jedoch stärker mit dem substratgebundenen FN als GD25-K794Q Zellen.

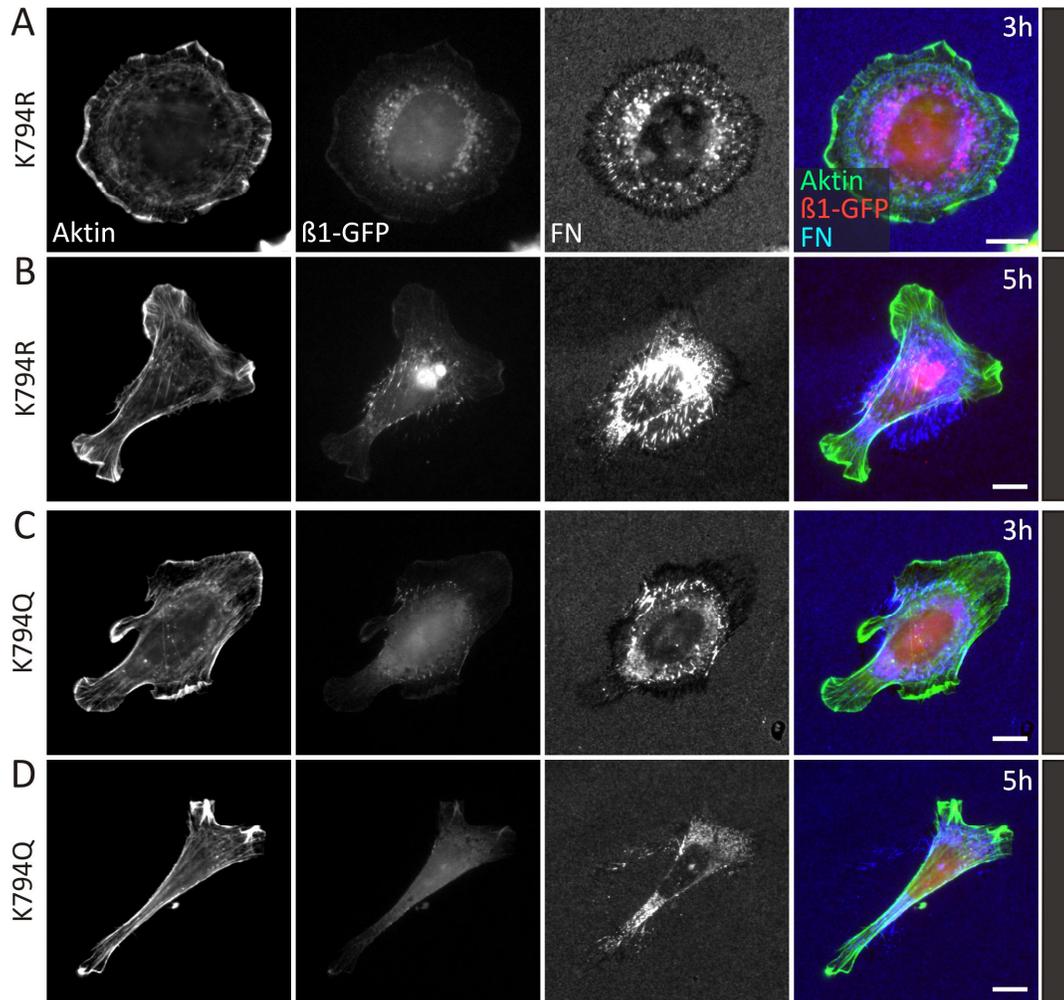


Abbildung 3.13: Zellmorphologie von GD25-K794R und GD25-K794Q auf homogenem FN-Substrat
 GD25-β1A Zellen mit einem Aminosäureaustausch an Lysin794 zu Arginin (R) oder Glutamin (Q) der β1-Domäne resultiert in den Zelllinien GD25-K794R und GD25-K794Q. Diese werden als Einzelzellen für 3 h bzw. 5 h auf homogenem FN-Substrat ausgesät, fixiert und immunhistochemisch gefärbt: Aktin (grün) und FN (blau). **[A]** GD25-K794R zeigen nach 3 h Inkubation eine unpolare Zellmorphologie. **[B]** GD25-K794R weisen nach 5 h Inkubationszeit eine definierte Zellfront auf und interagieren stark mit dem FN. **[C]** GD25-K794Q nach 3 h auf homogenem FN-Substrat mit erkennbarer Zellfront. **[D]** GD25-K794Q nach 5 h Kultivierungszeit mit deutlicher Zellfront. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 µm.

Die Acetylierung von Lysin-794 an β 1-Integrin gewährleistet eine reguläre Migration auf FN-Dotgradienten

Die Ergebnisse des vorangegangenen Abschnittes zeigen, dass GD25-K794Q Zellen nach 3 h vollständig auf homogenem FN-Substrat polarisiert sind, während Zellen der Linie GD25-K794R auf homogenem FN erst nach 5 h eine polarisierte Zellfront aufweisen. Im folgenden Abschnitt soll der Einfluss der Acetylierung des Lysins-794 an β 1-Integrin auf das Migrationsverhalten auf FN-Dotgradienten untersucht werden. Hierzu werden die zwei Zelllinien GD25-K794R (Austausch von Lysin durch Arginin) und GD25-K794Q (Austausch von Lysin durch Glutamin) für 3 h und 5 h auf einem FN-Dotgradienten kultiviert, fixiert und Aktin sowie FN immunhistochemisch gefärbt. In Abbildung 3.14 A und B sind repräsentative Zellen auf einem FN-Dotgradienten beider Zelllinien nach 5 h dargestellt. Wie auch auf homogenem Substrat (s. Abbildung 3.13), ähnelt sich die Zellmorphologie beider Zelllinien nach 5 h Kultivierungszeit. Die quantitative Analyse des Migrationsverhaltens ist in Abbildung 3.14 C zu sehen: Im Gegensatz zu GD25-K794Q zeigen GD25-K794R nach 3 h ein schwaches haptotaktisches Migrationsverhalten von 28%, mit einem leichten Anstieg auf 51% nach 5 h. Das stationäre Zellverhalten nimmt dabei gegenläufig ab. Betrachtet man das Migrationsverhalten von GD25-K794Q Zellen, zeigt die Auswertung nach 3 h und 5 h ein nahezu übereinstimmendes haptotaktisches Migrationsverhalten von etwa 75%. Der Großteil der restlichen Zellen verbleibt stationär. In Abbildung 3.14 D ist ein Modell zu sehen, das einem besseren Verständnis dient. Der Kreis signalisiert hierbei die schematische Lokalisation von Lysin-794 an der zytoplasmatischen β 1-Domäne.

Die Ergebnisse dieses Kapitels zeigen, dass die durch die Acetylierung von Lysin veränderte Ladung einen Einfluss auf die Migration auf FN-Dotgradienten hat, da der Aminosäureaustausch von Lysin zu Arginin und die dadurch positiv erhaltene Ladung zu einer verspäteten und eingeschränkten Migration auf FN-Dotgradienten führt. Die Acetylierung von Lysin an β 1-Integrin spielt somit eine Rolle in der Migration auf FN-Dotgradienten. (N=3; n=908; unabhängiger Chi²-Test, Signifikanzniveau: ***, P < 0,005)

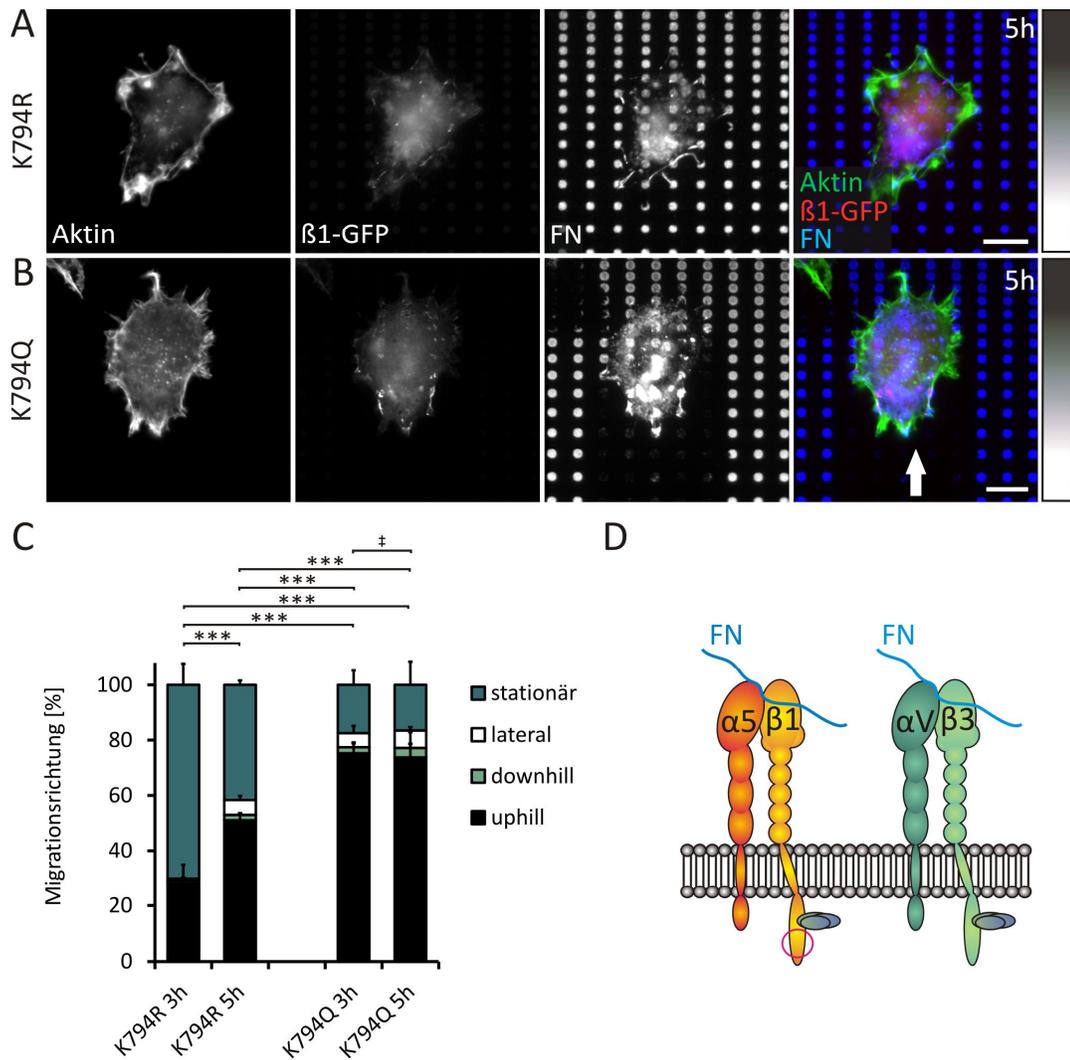


Abbildung 3.14: Einfluss der Acetylierung von Lysin-794 an β 1-Integrin auf die gerichtete Migration

[A] Repräsentative Fluoreszenzaufnahme einer stationären GD25-K794R Zelle nach 5 h Kultivierungsdauer auf einem FN-Dotgradienten. **[B]** Fluoreszenzaufnahme einer uphill migrierenden GD25-K794Q Zelle nach 5 h auf dem FN-Dotgradienten (Pfeil=Migrationsrichtung). Nach Ablauf der Kultivierungszeit wurden die Zellen fixiert und Aktin (grün) und FN (blau) immunhistochemisch angefärbt. In rot ist der β 1-GFP Kanal dargestellt und demonstriert die erfolgreiche Transfektion von β 1A-GFP. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 μ m. Die höchste Proteinbedeckung des Gradienten befindet sich an der Bildoberseite. **[C]** Quantitative Auswertung des Migrationsverhaltens von GD25-K794R und GD25-K794Q nach 3 h und 5 h auf dem FN-Dotgradienten. Während GD25-K794R nach 3 h nur zu 28% uphill migrieren, steigt dies nach 5 h auf 51% an. Das stationäre Verhalten stellt mit 70% nach 3 h und 42% nach 5 h, den gegenläufigen Anteil dar. GD25-K794Q migrieren schon nach 3 h zu 75% uphill. Nach 5 h migrieren 73% der Zellen haptotaktisch, während der Großteil der restlichen Zellen ein stationäres Verhalten aufweist. N=3; n=908. Chi²-Test: P > 0,05 (‡ = nicht signifikant); P < 0,005 (***) . **[D]** Das schematische Modell verdeutlicht die Lokalisation des erfolgten Aminosäureaustauschs.

3.3.7 Differenzielle FN/VN-Substrate ermöglichen eine selektive Proteinwahrnehmung

Wie bereits in Kapitel 1.5 beschrieben, gibt es unter den 24 bekannten Integrinen Überlappungen in der Rezeptor- und Ligandenspezifität. So binden die Integrine $\alpha\text{V}\beta 3$ und $\alpha 5\beta 1$ beide an FN, $\alpha\text{V}\beta 3$ -Integrin jedoch an FN sowie VN. Um die speziellen Aufgaben dieser Integrine zu untersuchen, behelf man sich in früheren Studien entweder *Knockouts* der einzelnen Integrindomänen oder selektiven Inhibitoren (Roca-Cusachs et al., 2009; Schiller and Fässler, 2013). Um ohne diese Eingriffe in die Integrindomänen eine separierte Untersuchung zu ermöglichen, entwickelte Michael Bachmann in unserer Arbeitsgruppe die Methode des direkten Proteinstempeln weiter (Kapitel 2.2.1; (Bachmann, 2015)).

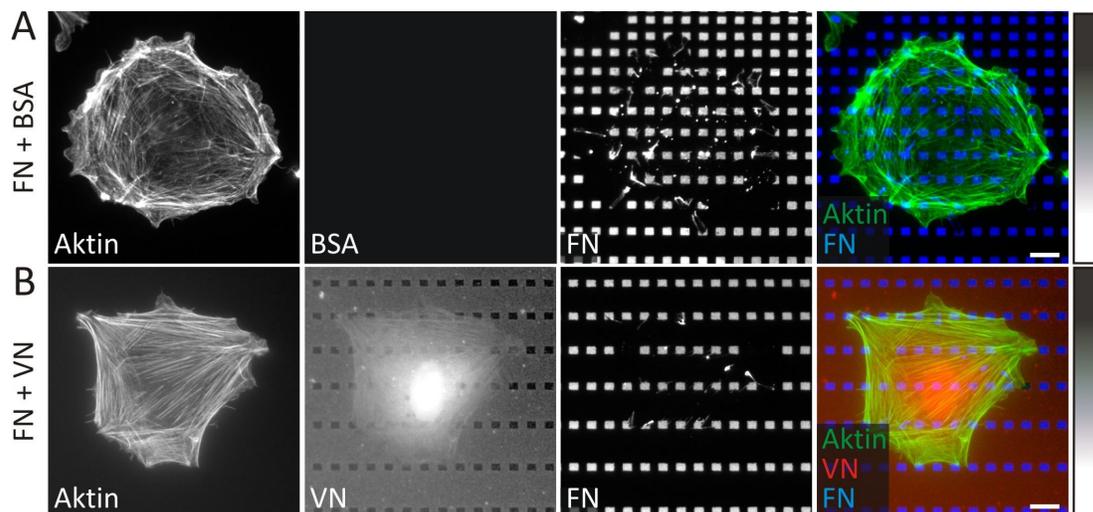


Abbildung 3.15: Separierung von Integrinen auf differenziellen FN/VN-Substraten

[A] REFs auf mittels direktem Proteinstempeln hergestelltem Substrat: FN-Dotgradient, passiviert mit 10% BSA. Die Zellen bilden selektiv Kontakte auf den adhäsiven Bereichen des FNs und bauen es um. Nach 4 h Kultivierungsdauer wurden die Zellen fixiert und Aktin (grün) immunhistochemisch angefärbt. FN und VN wurden zur Visualisierung mit Alexa Fluor 568 (VN, rot) bzw. Alexa Fluor 647 (FN, blau) gelabeltem FN bzw. VN gemischt. **[B]** REFs auf mittels direktem Proteinstempeln hergestelltem Substrat, welches einen FN-Dotgradienten enthält, an dessen Bereiche zwischen dem FN-Muster selektiv VN gebunden hat. Die Zellen spannen sich gezielt zwischen den FN-Dots auf und bauen FN im Gegensatz zu VN um. Nach 4 h wurden die Zellen fixiert und Aktin (grün), VN (rot) und FN (blau) angefärbt. Axio Imager.Z1 63x, Maßstab 10 μm .

In Abbildung 2.3 sind Substrate dargestellt, die mittels direktem Proteinstempeln hergestellt wurden. Dabei wird der FN-Dotgradient nicht mithilfe der Gold-Thiol-Chemie an die Goldoberfläche gebracht, sondern direkt auf ein unbehandeltes Deckglas gestempelt. Anschließend werden die antiadhäsiven Bereiche nicht mittels eines weiteren Thiols erzeugt, sondern mit VN überlagert. VN bindet dabei nur an die Bereiche zwischen den

Mikrostrukturen jedoch nicht an FN. Dadurch entsteht ein differenzielles FN/VN-Substrat, das einen FN-Dotgradienten enthält, dessen Zwischenbereiche mit VN bedeckt sind. Diese räumlich getrennte Präsentation der beiden EZM-Proteine erlaubt die Untersuchung der selektiven Proteinwahrnehmung von Zellen durch die *in cellula* Separierung der Integrine. Abbildung 3.15 A zeigt REFs, welche für 4 h auf einem direkt-gestempelten FN-Dotgradienten kultiviert wurden. Die Bereiche zwischen den Dots wurden als Kontrolle mit BSA passiviert. Die Zellen bilden spezifische Kontakte auf den FN-Dots und sind gut gespreizt. Wie aus dem FN-Kanal hervorgeht, bilden die Zellen das FN deutlich um. Abbildung 3.15 B zeigt REFs, welche 4 h auf einem FN/VN-Substrat kultiviert wurden. Dieses enthält einen FN-Dotgradienten, dessen Bereiche zwischen den Dots mit VN geflutet wurden. Die Zellen erkennen den FN-Dotgradienten, bilden spezifische Adhäsionen auf den FN-Dots und polarisieren in Richtung höherer FN-Bedeckung. Es findet zwar keine Migration statt, dennoch bilden Zellen gezielt das präsentierte FN um, während VN im ursprünglichen Urstand bleibt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Fibroblasten durch ihre Integrine eine selektive Differenzierung der angebotenen Glykoproteine aufweisen und in diesem Fall selektiv über $\alpha 5\beta 1$ -Integrin FN umbauen können, während VN im ursprünglichen Zustand verbleibt.

Zusammenfassend lässt sich über dieses Kapitel der Arbeit sagen, dass $\alpha V\beta 3$ -Integrin nicht in die gerichtete Migration auf FN- sowie auf VN-Dotgradienten involviert zu sein scheint. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse, dass die intrazelluläre $\beta 1$ -Domäne von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin die essentielle Integrindomäne ist, welche die gerichtete Zellmigration auf diskontinuierlichen FN-Dotgradienten ermöglicht. Diese Resultate verdeutlichen, dass selbst wenn unterschiedliche Integrine mit demselben Liganden interagieren, sie dennoch abweichende Funktionen in biologischen Prozessen haben können.

4 DISKUSSION

Von der Embryogenese über die Wundheilung bis hin zur Entwicklung des Nervensystems ist eine orientierte, gerichtete Migration unverzichtbar. Diverse, inhomogen verteilte intra- wie auch extrazelluläre Signale können dabei die Richtung der Migration dirigieren. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Haptotaxis, der Migration entlang eines substratgebundenen Adhäsionsgradienten (Carter, 1967). Im Gegensatz zur Chemotaxis, der Migration entlang von biochemischen Signalen die in Lösung vorliegen, wurden zur Haptotaxis bisher nur wenige Studien durchgeführt. Die verwendeten Substrate stellten in den meisten Fällen kontinuierliche Adhäsionsgradienten dar, die meist mit mikrofluidischen Systemen hergestellt wurden. Hierbei mischen sich zwei Proteinlösungen durch Diffusion und lagern sich über Adsorption an die Trägerfläche an. Dies ist jedoch insofern eine störungsanfällige Methode, als dass Luftblasen den Fluss behindern oder eine mehrschichtige Überlagerung der Proteine die Gradientengeometrie verändern kann (Burdick et al., 2004; Gunawan et al., 2006; Squires et al., 2008). *In vivo* sind Proteine der EZM zumal nicht homogen, sondern vielmehr geometrisch verteilt. Dies kann in einem Maschennetzwerk aus kleinsten Nanostrukturen bis hin zu Fasern im Mikrometerbereich der Fall sein. Aufgrund dieser räumlichen Verteilung der Kontaktpunkte, ist in dieser Arbeit das Substrat der Wahl ein diskontinuierlicher Dotgradient. Dieser lässt sich mit Verfahren wie beispielsweise der Dip-Pen-Lithografie herstellen, welches allerdings sehr zeitaufwändig ist, da Nanovolumen an Proteinlösung mit einem AFM *Cantilever* an die Substratoberflächen gebracht werden müssen (Huo et al., 2008). Weniger zeitaufwendig ist hingegen die Photolithografie, bei der das Substrat über eine Metallmaske mit dem gewünschten Muster einer UV Beleuchtung ausgesetzt ist. Durch das UV-Licht werden nur die bestrahlten Bereiche selektiv funktionalisiert. Allerdings lassen sich mit dieser Prozedur nur größere Strukturen kreieren, da Licht die Auflösung limitiert (Herbert et al., 1997; Ricoult et al., 2015). Die Methode der

Wahl in vorliegender Arbeit ist deshalb das *Microcontact-Printing* (Mrksich and Whitesides, 1996). Es erlaubt kostengünstig, schnell und gut reproduzierbar, geometrische Proteinmuster bis zu einer Größe von 0,5 μm auf eine Oberfläche zu bringen. Da die Zellen im Zuge ihrer Migration die Proteindots am Zellende ablösen und internalisieren, lässt sich die Migrationsrichtung auf den in dieser Arbeit verwendeten Dotgradienten exakt bestimmen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Zugkräfte der Zellen größer sind als die Adsorptionskräfte der Proteine auf dem Substrat.

Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass primäre Hühnerfibroblasten einen FN-Dotgradienten erkennen und zu 80% in Richtung höherer Proteinbedeckung migrieren. Dabei ist ein funktionierendes Aktin-/Myosin- sowie Mikrotubulisystem für die Haptotaxis unverzichtbar. Greift man in das Aktin-/Myosin-System mit Y-27632 oder Blebbistatin ein, resultiert daraus eine ungerichtete Migration. Dabei migrieren die Zellen gleichverteilt uphill, downhill und lateral (s. Abbildung 1.3 B). Wird das Mikrotubulinetzwerk mit Taxol oder Nocodazol beeinträchtigt, erkennen die Zellen zwar die Gradientenachse, sind aber nicht mehr in der Lage zwischen hoher und niedriger Proteinbedeckung zu differenzieren, woraus eine gleichwertige uphill und downhill Migration resultiert (s. Abbildung 1.3 C) (Autenrieth, 2012). Diese Erkenntnisse waren der Anlass für das Interesse an weiteren Untersuchungen beteiligter Proteine, die tiefere Einblicke in den Mechanismus der Haptotaxis liefern können.

4.1 Zytoskelett-assoziierte Proteine bei der gerichteten Migration auf FN-Dotgradienten

Das Zytoskelett der Zelle unterliegt während der Migration einem ständigen Umbau. Zahlreiche Proteine induzieren, regulieren und koordinieren diese Dynamik. Sie wird vorwiegend durch Reize aus der extrazellulären Umgebung oder intrazellulär durch die zelleigene Aktin-/Myosin-Kontraktilität ausgelöst. Um die Umwelt wahrzunehmen, nutzen Zellen während der Migration Zellausläufer wie Filopodien und Lamellipodien als Sensoren. Durch diese Detektion können sie gezielt auf Änderungen reagieren und so ihre Migrationsrichtung korrigieren. Die kleinen Rho-GTPasen Cdc42, RhoA und Rac spielen in der Regulation der Aktinorganisation und der Zellpolarisierung eine wichtige Rolle. Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine Störung von Cdc42 sowie *downstream* Effektoren von RhoA – durch eine Beeinträchtigung des Aktin-/Myosin-Systems - zu einer ungerichteten Migration innerhalb des Dotgradienten führt (Autenrieth, 2012). Nach den

interessanten Erkenntnissen zu RhoA und Cdc42, war die Untersuchung der kleinen Rho-GTPase Rac von großem Interesse. Innerhalb einer migrierenden Zelle liegt aktives Rac in einem Gradienten, mit der höchsten Aktivität an der Zellfront vor, ist maßgeblich an der Organisation von Lamellipodien beteiligt und generiert die protrusive Kraft (Kraynov et al., 2000).

Die Störung von Rac wurde in vorliegender Arbeit mithilfe zweier unterschiedlicher Inhibitoren erreicht: EHT1864 blockiert die Aktivierung von Rac durch direkte Bindung, während EHop-016 die Interaktion von Rac mit dem GEF Vav2 verhindert. Dadurch soll die Bildung von Lamellipodien und somit die Zellmigration beeinträchtigt werden, wie kürzlich in Mausmodellen für Krebstherapien mit EHop-016 gezeigt werden konnte (Castillo-Pichardo et al., 2014).

Diesen Effekt können die Experimente, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, bestätigen. Mit zunehmender Inhibitorkonzentration ist es immer weniger Zellen möglich zu migrieren. Die Bewegung in Richtung der höchsten Proteinkonzentration, also die Haptotaxis, scheint hiervon jedoch nicht betroffen zu sein (s. Abbildung 3.2).

Rho-GTPasen sind Schlüsselregulatoren der räumlichen und zeitlichen Aktinorganisation sowie der Dynamik von Zell-Matrix-Adhäsionen. Das klassische Modell der Zellmigration in 2D beschreibt aktives Cdc42 und Rac an der Zellfront, während die RhoA-Aktivität am Zellende hauptsächlich die Kontraktilität bestimmt. Für das Ausbreiten (*Spreading*) der Zellen auf einem Substrat und die Bildung früher Adhäsionen wird eine hohe Rac- mit zeitgleich niedriger RhoA-Aktivität benötigt. Da dieses Gleichgewicht durch die Inhibition von Rac nicht gewährleistet werden kann, könnten das *Spreading* und frühe Adhäsionen bereits gestört werden, was sich schließlich auf die Migration auswirken könnte. Zudem zeigen neueste Studien mit FRET (Förster-Resonanzenergietransfer), dass RhoA noch vor der Aktivierung von Rac ebenfalls an der Zellfront lokalisiert ist. Die RhoA-Aktivität nimmt dabei mit ansteigender Rac- und Cdc42-Aktivität wieder ab. Betrachtet man dieses Modell, könnte eine fehlende Rac-Aktivität an der Front wiederum das Herabsetzen der RhoA-Aktivität an der Zellfront beeinflussen, was zusätzlich das System stören könnte (Machacek et al., 2009; Pertz et al., 2006a). Behandelt man Fibroblasten mit PDGF (*platelet-derived growth factor*), findet man RhoA nicht mehr an der Zellfront, was eine veränderte Organisation der Rho-GTPasen zeigt (Pertz et al., 2006b). Abhängig vom Signalgeber werden somit diverse Signalwege von Rho-GTPasen aktiviert, um verschiedene Arten der Zellmigration zu induzieren.

Auch wenn die kleinen Rho-GTPasen mittlerweile seit fast 30 Jahren bekannt sind und viele Studien vorliegen, reichen diese nicht aus, um den Einfluss der zahlreichen GEFs und GAPs auf die Regulation der Signalwege für die Zellmigration zu bestimmen. Gerade diese Vielzahl, die zudem noch zelltypspezifisch sein kann, erschwert die Arbeit, da eine Inhibition zu einer

gleichzeitigen Kompensation durch andere GEFs oder GAPs führen kann und Effekte deshalb maskiert werden könnten. Dies könnte auch bei den eingesetzten Inhibitoren der Fall sein, da zumindest EHop-016 die Inhibition von Rac über die gestörte Interaktion mit einem GEF bewerkstelligt. Möglicherweise kommt es bei einem Ausfall eines GEFs in der Zelle zu einem kompensatorischen Effekt durch andere, in der Zelle exprimierte, GEFs. Ein solcher Mechanismus könnte auch beim Ausfall einzelner GAPs in der Zelle vorliegen. Diese Vermutung wird jedoch dadurch minimiert, dass zwei Inhibitoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen verwendet wurden, die zu demselben Ergebnis gekommen sind. Die Entwicklung von GAP bzw. GEF spezifischen Biosensoren könnte zukünftig weitere Einblicke darüber ermöglichen, wie diese während der Migration räumlich und zeitlich reguliert sind.

Die Regulation von Rho-GTPasen ist zudem abhängig von den physikalischen und biochemischen Eigenschaften der extrazellulären Umgebung und kann sich innerhalb verschiedener Zelltypen unterscheiden. So können Tumorzellen mit zwei verschiedenen Modi migrieren: amöboid oder mesenchymal. Während die amöboide Migration durch eine hohe RhoA-Aktivität gekennzeichnet ist, weist die mesenchymale Migration eine hohe Rac-Aktivität auf (Sanz-Moreno et al., 2008). Dies konnte bei Fibroblasten auf FN-Dotgradienten nicht beobachtet werden.

Rho-GTPasen können jedoch nicht nur über GAPs und GEFs reguliert werden. Ein weiterer Aktivierungsweg von Rac erfolgt beispielsweise über das Mikrotubulinetzwerk, das die gezielte Rac-Aktivierung induzieren kann um die Lamellipodienbildung zu unterstützen (Waterman-Storer et al., 1999). Da eine so große Anzahl an Proteinen Einfluss auf die Aktivierung von Rac nehmen kann, erschwert dies eine eindeutige Folgerung über den Mechanismus und den Effekt der Inhibition.

Eine Möglichkeit wie Rac Lamellipodien reguliert ist, kooperierend mit PIP_3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat), durch Bindung an den SCAR/Wave Komplex wodurch der Arp2/3-Komplex aktiviert wird (Eden et al., 2002; Lebensohn and Kirschner, 2009). Eine Störung des Arp2/3-Komplexes wurde in dieser Arbeit mithilfe des Inhibitors CK-666 hervorgerufen. Dieser bindet und stabilisiert die inaktive Form des Komplexes, wodurch eine Aktivierung verhindert wird (Hetrick et al., 2013). Vergleichbar mit dem konzentrationsabhängigen Anstieg stationärer Zellen durch die Inhibition von Rac, führt auch die Inhibition des Arp2/3-Komplexes zu diesem Resultat. Die Mehrheit der Zellen verliert durch die Behandlung mit CK-666 ihre Fähigkeit zur Migration. Zellen, die dazu noch in der Lage sind, migrieren uphill (s. Abbildung 3.3). Dies weist daraufhin, dass es sich um eine systemische Störung der Migration handelt und eine Inhibition von Arp2/3 keinen Einfluss auf die Haptotaxis hat.

Im Gegensatz hierzu deuten andere Studien darauf hin, dass der Arp2/3-Komplex für die Haptotaxis unverzichtbar ist und Lamellipodien die zentralen Strukturen für das Detektieren

des unterliegenden Proteingradienten sind (Wu et al., 2012). Diese Studien wurden allerdings in kontinuierlichen Proteingradienten erhoben, deren Steigung zudem um ein Vielfaches flacher ist als bei dem hier verwendeten diskontinuierlichen Gradienten. Je flacher ein Gradient, desto kleiner ist der Unterschied in der unterliegenden Proteinbedeckung zwischen Zellfront und Zellende. Zudem korreliert die Stärke des richtungsgebenden Signals positiv mit der Steigung des Gradienten. Dies kann nicht nur auf die Migrationsgeschwindigkeit Einfluss nehmen, sondern sich auch nach einer Störung von Schlüsselproteinen stärker bemerkbar machen (Rhoads and Guan, 2007; Smith et al., 2006). Daraus kann gefolgert werden, dass der Migrationsreiz auf Gradienten mit höherer Steigung und geometrisch definierter Proteinverteilung stärker ist als auf flachen kontinuierlichen Gradienten. Erfolgt auf einem flachen Gradienten eine Störung grundlegender Proteine, könnte dies eher zu einem Migrationsstopp oder einer Beeinträchtigung im Auslesen der Proteinbedeckung führen als auf diskontinuierlichen Dotgradienten. Auf diesen kann die Zelle allein durch das Ausbreiten auf dem unterliegenden Substrat deutliche Unterschiede in der Proteinbedeckung unterhalb der Zellfront und dem Zellende messen. Zudem wurden bei diesen Studien keine ausreichenden Angaben über die Kriterien der Auswertung getroffen. Diese Kriterien könnten die Einzelzellanalyse oder nähere Informationen über die Quantifizierung der Migrationsrichtung beinhalten. Es existieren zudem keine Informationen über den für die Auswertung interessanten Bereich innerhalb des Gradienten und die dort vorherrschende Proteinbedeckung. Studien unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, wie wichtig die Proteinbedeckung in Bezug auf den Abstand der Dots zueinander für die Migration auf FN-Dotgradienten ist. Aus diesem Grund wird in unserer Quantifizierung ein genau definierter Bereich gewählt, indem die Zellen die Steigung des Gradienten detektieren können (s. Abbildung 2.1). Werden die Abstände der Dotreihen im oberen Bereich des Gradienten in y-Richtung zu groß, können Zellen die Dots in x-Richtung des Gradienten besser erreichen, was eine laterale Migration begünstigt (Autenrieth, 2012). Dieser Effekt verdeutlicht die Bedeutung des exakten Auswertebereichs.

Studien von Wu zeigen eine veränderte Anordnung von Stressfasern infolge des Verlustes der Aktinnetzwerke durch Arp2/3, da Lamellipodien auch dafür sorgen, dass fokale Adhäsionen und demzufolge auch Stressfasern ausgerichtet sind (Wu et al. 2012). Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit durch die beeinträchtigte Morphologie der behandelten Zellen, bestätigt werden.

Martin et al. untersuchte ebenfalls den Effekt von CK-666 auf die haptotaktische Migration. Wie zuvor von Wu beschrieben, führte die Inhibitorbehandlung hierbei ebenso zu stachelförmigen Zellausläufern, auf die Haptotaxis hatte diese Behandlung allerdings keinen Einfluss. Das Substrat für das Haptotaxis-Experiment waren in dieser Studie jedoch 20µm breite FN-Streifen, auf denen die Fibroblasten kultiviert wurden (Martin et al., 2014). Diese

Streifen sorgen zwar für eine Polarisierung und uniforme Zellmorphologie, die Migration wird jedoch nicht durch einen substratgebundenen Adhäsionsgradienten, wie in den Experimenten dieser Arbeit, stimuliert. Im Gegensatz zu haptotaktisch migrierenden Zellen zeigten chemotaktisch migrierende Fibroblasten nach einstündiger Behandlung mit CK-666 eine anormale Migration. Dies widerspricht der Studie von Wu, die zeigte, dass der Arp2/3-Komplex für die Haptotaxis notwendig, für die Chemotaxis allerdings verzichtbar sei (Martin et al., 2014; Wu et al., 2012). In der Studie von Martin führte die Behandlung der Fibroblasten mit Blebbistatin zu einem Verlust der Polarisierung durch Membranausstülpungen, welche entlang der Zellperipherie verteilt waren. Dieser Verlust der Migration und der Bildung von Blebs liegt jedoch vermutlich an der hohen Konzentration an Blebbistatin, die in dieser Studie bei 10 μ M lag. Die vorhergehende Studie unserer Arbeitsgruppe mit Blebbistatin (500 nM) führte zu einem bidirektionalen Migrationsverhalten auf FN-Dotgradienten (s. Abbildung 1.3 C), auf welchem die Zellen zu gleichen Teilen uphill und downhill migrierten. Die Fibroblasten waren noch in der Lage den Gradienten auszulesen, konnten allerdings nicht mehr zwischen niedriger und hoher Proteinbedeckung differenzieren (Autenrieth, 2012). Mit 10 μ M Blebbistatin, wären die Fibroblasten in diesem Experiment vermutlich genauso wenig migriert und hätten die typischen Blebs entwickelt.

Studien, in denen ARPC3, eine Untereinheit des Arp2/3-Komplexes, ausgeschaltet wurde, haben gezeigt, dass dies zu einer Kompensation des Aktinnetzwerkes durch Formin-abhängige, dynamische Aktinfilamentstrukturen an der Zellfront führt (Suraneni et al., 2015). Diese Beobachtung wird durch eine Studie in der Hefe gestützt, bei der das Aktinnetzwerk nach einem *Knockout* von Arp2/3 Formin-abhängige Strukturen aufwies. Dieser Effekt tritt ebenfalls bei einem *Knockout* von Formin-abhängigen Strukturen und der damit einhergehenden Kompensation durch Arp2/3 abhängige Netzwerke auf (Burke et al., 2014). Auf diese Weise könnte ein Verlust von Arp2/3 mit Formin-abhängigen Strukturen kompensiert werden, wodurch in unseren Experimenten zwar Haptotaxis stattfinden kann, die Migration jedoch zunehmend beeinträchtigt ist. Formin-abhängige Strukturen in der Zelle sind unter anderem Filopodien, die durch lineare Aktinfilamente entstehen. Sie sind dafür bekannt, der Zelle als Sensoren zu dienen, mit denen sie ihre Umgebung erkunden. Filopodien können mehrere Mikrometer lang sein, wohingegen Lamellipodien nur wenige Mikrometer überspannen können (Bornschlögl, 2013). Dadurch sind sie in der Lage, den hier verwendeten Dotgradienten auf eine längere Distanz zu überbrücken, was eine Detektion der Proteinbedeckung begünstigen könnte. Um die Bedeutung von Formin-abhängigen Strukturen zu untersuchen, wurden Zellen mit SMIFH2 behandelt, einem Inhibitor der FH2-Domäne von Forminen. Dabei zeigt die Störung der FH2-Domäne einen ähnlichen Phänotyp wie die Inhibition von Rac und Arp2/3: Die Zellen migrieren auch unter hohen

Konzentrationen uphill, während das systemische Migrationsvermögen mit zunehmender InhibitorKonzentration abnimmt (s. Abbildung 3.4). Durch die Detektion der Umgebung tragen Filopodien somit maßgeblich zur Zellmigration bei, was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. Im Gegensatz zu Studien, welche die Notwendigkeit von Filopodien durch Störung des Proteins Fascin-1 für die Haptotaxis postulieren (Johnson et al., 2015), hat eine Störung von Forminen, wie in dieser Arbeit gezeigt, keinen Einfluss auf die Haptotaxis. Die Arbeiten von Johnson wurden jedoch erneut mit dem bereits beschriebenen flachen, kontinuierlichen Gradienten durchgeführt. Sie sind deshalb mit unseren steileren, diskontinuierlichen Gradienten nicht vergleichbar. Während filopodiale Strukturen in vielen Studien wichtig erscheinen, gibt es dagegen auch Studien in axonalen Wachstumskegeln, die zeigen, dass *tissue guidance* auch ohne die Anwesenheit von Filopodien stattfinden kann (Wacker et al., 2014).

Da viele Proteine der Formin Familie die FH2-Domäne enthalten wie z.B. Dia1, Daam1 und FHOD1, ist der Effekt der Inhibition der FH2-Domäne allerdings nicht spezifisch für Filopodien. MDia, aus der Dia1 Familie, sind ebenso in die Entstehung von Stressfasern involviert, die über RhoA reguliert werden. Daraus ergibt sich ebenfalls ein Effekt auf die Kontraktilität. Zudem interagieren Formine wie mDia1 mit Mikrotubuli und spielen eine Rolle im Vesikeltransport. Durch die Störung der FH2-Domäne lässt sich also kein Fazit zur Notwendigkeit von Filopodien ziehen, es zeigt vielmehr den Bedarf dieser Familie für viele, bei der Zellmigration wichtige Prozesse.

Da vorhergehende Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass ein funktionierendes Mikrotubulisystem sowie ein funktionierendes Aktin-/Myosin-System von großer Bedeutung für die Haptotaxis sind, wurde in dieser Arbeit die Bedeutung der *Integrin-linked-kinase* (ILK) untersucht. ILK stellt als Protein im Komplex mit Pinch und Parvin (IPP-Komplex) ein Gerüstprotein dar, dass durch Bindung an β 1- und β 3-Integrin eine Verbindung mit dem Aktinzytoskelett herstellt. Neben der Verknüpfung mit Aktin, hat ILK auch einen Einfluss auf das Mikrotubulisystem, indem es mit Mikrotubuli Plus-End-Proteinen interagiert und dadurch wachsende Plus-Enden am Zellkortex abfängt (Akhtar and Streuli, 2012; Wickström et al., 2010b). Diese Involvierung in beide Systeme, in das Aktin-/Myosin-System und in das Mikrotubulisystem, machten ILK zu einem interessanten Kandidaten, um dessen Einfluss auf die Haptotaxis zu untersuchen. Zudem reguliert ILK die Aktivität kleiner Rho-GTPasen wie RhoA und Rac, dessen molekularer Mechanismus allerdings noch unbekannt ist (Blumbach et al., 2010; Boulter et al., 2006).

Die Experimente dieser Arbeit zeigten, dass auch die Störung von ILK in einer mit steigender InhibitorKonzentration abnehmenden Migrationsfähigkeit resultiert. Die Zellen, die zu einer Migration in der Lage waren, vollzogen Haptotaxis (s. Abbildung 3.5). Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass ILK eine Rolle im Mechanismus der Haptotaxis spielt. Da ILK

sowohl auf Cdc42 als auch auf Rac einen Einfluss nehmen kann, hat die Störung von ILK in diesen Experimenten der Arbeit keine Folge für Cdc42 und dessen *downstream* Effektoren. Andernfalls hätte man ein ungerichtetes Migrationsverhalten erwartet, wie es in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt und in Abbildung 1.3 C dargestellt ist. Hierbei führte eine Störung von Cdc42 und dessen Effektoren zu einer ungerichteten Migration in FN-Dotgradienten (Autenrieth, 2012). Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Zellen ohne ILK Defekte in der Migration aufweisen, da sie nicht mehr in der Lage sind, Kraft auf die EZM auszuüben (Radovanac et al., 2013; Tan et al., 2004; Zheng et al., 2015). Da ILK im IPP-Komplex vorliegt, ist es allerdings schwierig zu beurteilen, welche Funktionen von Pinch und Parvin abgefangen und kompensiert werden können.

Vorhergehende Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass viele substratspezifische-Faktoren Einfluss auf die Zellmigration auf FN-Dotgradienten nehmen können. So spielt die Proteinkonzentration der Dotgradienten eine wichtige Rolle, da Zellen ein biphasisches Migrationsverhalten auf FN-Dotgradienten zeigten. Die optimale Migration findet bei 1 µg/ml FN statt, während die Migrationsfähigkeit bei höherer oder niedriger Proteinkonzentration abnahm. Viele Studien anderer Arbeitsgruppen verwenden jedoch andere, meist höhere Proteinkonzentrationen, was die Migration beeinflussen kann.

Neben der Proteinkonzentration spielt für die Zellmigration auch die Proteinbindung an das Substrat eine wichtige Rolle. Hierbei bestehen große Unterschiede darin, ob das FN kovalent oder nicht-kovalent an die Substratoberfläche bindet. Bei vielen Strukturierungsmethoden werden Deckgläser so funktionalisiert, dass die verwendeten Proteine kovalent an die Oberfläche binden (Burnette et al., 2011; Théry et al., 2005). Dies kann beispielsweise mit Hilfe von epoxysilanisierten Deckgläsern erreicht werden, was meist zu definierteren Mustern führt. Im Gegensatz zur kovalenten Bindung an epoxysilanisiertes Glas bindet FN an unbehandeltes Glas nicht-kovalent. Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Zellen auf unbehandeltem Glas das FN umformen und herausreißen können, während ein FN-Umbau auf kovalent-gebundenem FN nicht möglich ist. Dadurch bleibt eine Zellmigration auf diesen Substraten aus. Wie bereits gezeigt wurde, ist dieses Herausreißen und Umformen des Proteins für die Zellmigration notwendig, weshalb die Migration auf kovalent-gebundenem FN ausbleibt (Autenrieth, 2012; Bachmann, 2015; Geiger et al., 2001). In vorliegender Arbeit wird die Proteinbindung der Dotgradienten über ein Thiol vermittelt und ist nicht-kovalent. Thiole binden hierbei einerseits an das goldbedampfte Deckglas, andererseits an das FN. Die Kraft, die nötig wäre, um die Gold-Thiol-Bindung zu lösen, liegt bei etwa 1,4 nN (Fenter et al., 1994). Die Bindungsstärke zwischen Thiol und FN bei etwa 10-100pN (Lehnert, 2003). Kraftmessungen zwischen $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und FN ergaben, dass die Wechselwirkung mehr als 90 pN beträgt, weshalb Zellen das FN vom Thiol ablösen können (Li et al., 2003). Je nachdem

wie Proteine in Studien anderer Arbeitsgruppen an das Substrat gebracht werden, können unterschiedliche Zellreaktionen und Zellmigrationseffekte auftreten.

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Zellmigration nehmen kann, ist die Substratgeometrie, in der die Dots angeordnet sind. Während $2 \times 2 \mu\text{m}$ große Dots zu einer uphill Migration von 80% führten, zeigten Fibroblasten auf $3,5 \times 3,5 \mu\text{m}$ großen Dots keine Migration. Weisen die Dots statt einer quadratischen eine rechteckige Geometrie von $3 \times 2 \mu\text{m}$ auf, führte dies zu einer lateralen Migration, da die Abstände in x-Richtung in gewissen Bereichen des Gradienten geringer sind als in y-Richtung. Dies zeigt den großen Einfluss der Substratgeometrie auf die Migration von Fibroblasten in FN-Dotgradienten. Auch die Steilheit des Gradienten kann die Migration beeinflussen, indem sich die unterliegende Proteinbedeckung auf steilen Gradienten stärker zwischen Zellfront und -ende unterscheidet als auf flachen Gradienten. Eigene Beobachtungen zeigten, dass Fibroblasten auf 2% statt 6% Gradienten nur zu 50% uphill migrieren. Ein steiler Gradient führte somit zu einer Zunahme der Migration auf 80% im Vergleich zu einem flachen Gradienten.

Diese Faktoren spielen somit auch eine Rolle und müssen für Untersuchungen der Migration auf FN-Dotgradienten beachtet werden.

Die Experimente dieser Arbeit konnten somit zeigen, dass sich eine Störung der zytoskelett-assoziierten Proteine Rac und Arp2/3, der Formine sowie ILK auf die Aktin-Dynamik und dadurch auf die systemische Zellmigration auswirkt. Der Mechanismus, der für die gerichtete Migration entlang eines substratgebundenen Adhäsionsgradienten benötigt wird, ist hiervon jedoch nicht betroffen (s. Abbildung 4.1).

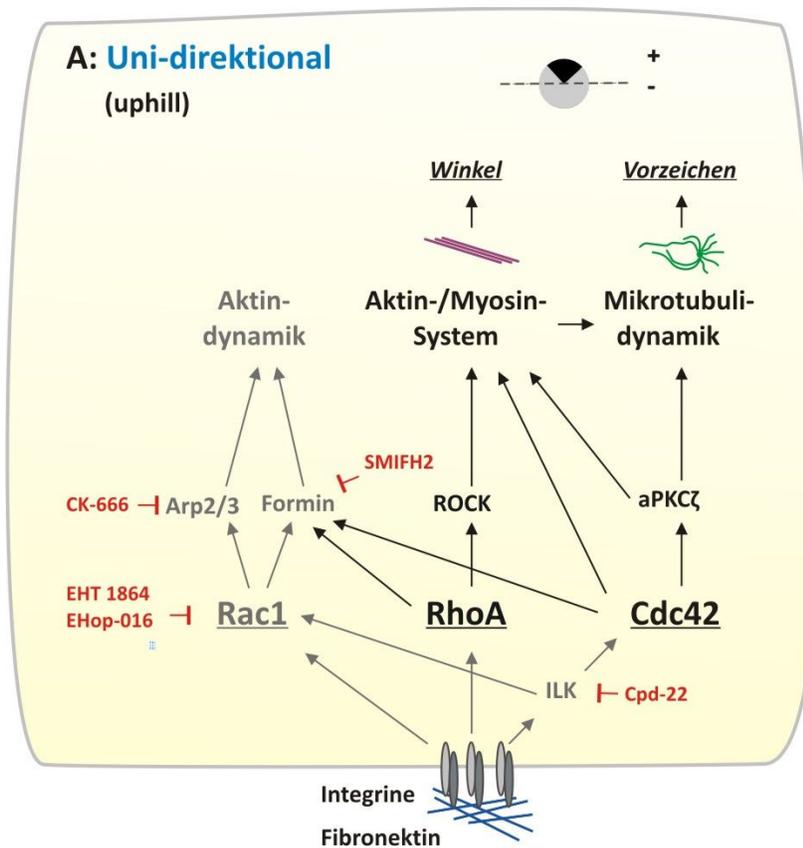


Abbildung 4.1: Grafische Zusammenfassung der Störung zytoskeletal-assoziiierter Proteine während der Haptotaxis

Für die uni-direktionale Migration auf FN-Dotgradienten ist ein funktionelles Aktin-/Myosin- sowie Mikrotubulisystem von zentraler Bedeutung. Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass eine pharmakologische Störung zytoskelett-assoziiierter Proteine wie ILK, Rac, des Arp2/3-Komplexes oder Formin, zu einer Beeinträchtigung der Aktin-Dynamik führen, jedoch nicht die Aktin-/Myosin-Kontraktibilität oder die Mikrotubuli-Dynamik beeinflussen. Diese Aktin-Dynamik hat Auswirkungen auf die systemische Zellmigration und führt zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Migration auf FN-Dotgradienten. Da die Zellen die unter hohen Inhibitorkonzentrationen noch in der Lage sind, haptotaktisch zu migrieren, ist der Mechanismus der Haptotaxis von der Störung dieser Proteine nicht beeinträchtigt. Modifiziert nach Autenrieth, 2012.

4.2 Mikrotubuli-Dynamik und die Substratgeometrie

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Dynamik von Mikrotubuli in Zellen auf homogenem und strukturiertem Substrat hinsichtlich der Beständigkeit und Geschwindigkeit der Trajektorien unterscheiden. Mikrotubuli in Zellen auf FN-Dotgradienten, verglichen mit Zellen auf homogen beschichtetem Substrat, haben eine höhere Verweildauer in der Zelle und weisen eine langsamere Umbaurate und somit auch eine langsamere Geschwindigkeit auf (s. Abbildung 3.6).

Ein mikrostrukturierter Dotgradient führt dazu, dass Zellen nach erfolgter Polarisierung durch stetiges Detektieren der Umgebung einen anhaltenden, gerichteten Migrationsreiz erfahren. Auf homogenem Substrat gibt es solch einen substratspezifischen Migrationsreiz nicht. Sie lesen die Umgebung, genau wie Zellen auf einem Adhäsionsgradienten, kontinuierlich aus, müssen ihr gesamtes Zytoskelett jedoch während der ungerichteten Migration häufiger umorientieren als polarisierte Zellen auf einem Gradienten. Hierdurch beschleunigen sich die Phasen zwischen Wachstum und Schrumpfen der Mikrotubuli, was zu einer höheren dynamischen Instabilität führt. Dies könnte erklären, warum die Dynamik der Mikrotubuli auf strukturiertem Substrat langsamer abläuft als auf homogenem Substrat.

Das Mikrotubulinetzwerk migrierender Zellen unterscheidet sich insofern von stationären Zellen, dass Mikrotubuli statt radiärsymmetrisch vom MTOC ausgehend, polarisiert in Richtung Zellfront ausgerichtet sind. Dies gewährleistet die kontinuierliche Versorgung der Zellfront mit neuen Membranbausteinen und Integrinen (Bergmann et al., 1983). Die Dynamik von Mikrotubuli und Adhäsionen ist insofern verknüpft, dass Mikrotubuli wiederholend fokale Adhäsionen ansteuern und in die Regulation des Abbaus der Adhäsionen involviert sind (Kaverina et al., 1999). Die unterliegende Substratgeometrie ordnet Adhäsionen auf Dotgradienten zusätzlich in einer räumlich separierteren Art an, als es auf homogenem Substrat der Fall ist. Durch die graduelle Anordnung der Adhäsionen in Richtung der höheren Proteinbedeckung könnte man vermuten, dass Mikrotubuli noch asymmetrischer in Richtung der Zellfront ausgerichtet sind. Daraus ergab sich die Frage, ob sich innerhalb der Zelle eine Asymmetrie in der Mikrotubuli-Dynamik zwischen Zellfront und Zellende erkennen lässt. In dieser Arbeit konnte eine solche intrazelluläre Asymmetrie in der Mikrotubuli-Dynamik nicht festgestellt werden. Dies zeigt, dass es zwar eine Asymmetrie zwischen Front und Zellende in Bezug auf die Anzahl der Mikrotubuli geben mag, die Dynamik, mit der sie in der Zelle zwischen Wachstums- und Schrumpfungsphase wechseln, unterscheidet sich jedoch nicht. Dabei wurde von Kaverina et al. gezeigt, dass Mikrotubuli fünfmal häufiger Adhäsionen ansteuern, die abgebaut werden sollen, als andere Bereiche im Zytosplasma (Kaverina et al., 1999). Mikrotubuli haben somit nicht nur Aufgaben an der Zellfront, auch das Zellhinterende weist eine kontinuierliche Dynamik der Mikrotubuli auf.

Vorhergehende Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Organisation des Mikrotubulinetzwerkes auf homogenem und strukturiertem Substrat in fixierten Proben unterschiedlich erscheint. Dies liegt in der Ausbreitung der Zellen auf dem Substrat begründet. Während Mikrotubuli in Zellen auf homogenem Substrat radiärsymmetrisch vom Zentrosom in die Peripherie verlaufen, wirken Mikrotubuli auf strukturiertem Substrat ungeordneter organisiert. Dies könnte daran liegen, dass sich Zellen auf homogenem Substrat großflächiger und somit flacher ausbreiten als auf strukturiertem Substrat. Auf letzterem sind die Zellen stärker elongiert, was gleichzeitig zu einer Verteilung des Zellvolumens in Richtung der z-Achse führt. Durch die Anordnung zellulärer Bestandteile in die Höhe, könnten einige Trajektorien während der Zeitrafferaufnahme außerhalb der Fokusebene liegen. Im Vergleich zu Zellen auf homogenem Substrat wirken die Mikrotubuli dadurch unorganisierter. Abhilfe würde eine definierte geometrische Limitation des Substrates für die Zellen schaffen, um eine uniforme Morphologie unabhängig von der unterliegenden Substratgeometrie zu erreichen. Mit dieser uniformen Morphologie könnte man die Mikrotubuli-Dynamik in Zellen auf strukturiertem Substrat besser mit jener in Zellen auf homogenem Substrat vergleichen. Dies wurde in einer Studie erreicht, indem Zellen auf mikrostrukturierten FN-Mikroinseln kultiviert wurden, die eine dreieckige Form aufwiesen. In dieser spannten sich die Zellen identisch auf, bildeten fokale Adhäsionen gezielt an den Ecken des Dreieckes und flachten sich ausreichend ab, um Trajektorien ungestört analysieren zu können (Huda et al., 2012). Eine bessere Geometrie stellt in diesem Kontext eine tropfenförmige Mikroinsel dar, welche die Zellen, im Gegensatz zur Dreiecksform, in eine polarisierte Morphologie bringt (Jiang et al., 2005; Théry et al., 2006). Allerdings beschränkt sich diese Methode auf homogenes Substrat, welches der FN-Mikroinsel unterliegt. Eine vergleichbare Geometrie mit strukturiertem Substrat wurde bisher nicht untersucht, zumal mit dieser geometrischen Limitation nur stationäre Zellen analysiert und kein Migrationsverhalten betrachtet werden kann.

Studien haben gezeigt, dass Mikrotubuli während ihrer Elongationsphasen entlang von Aktinfilamentbündeln an fokale Adhäsionen in der Zellperipherie geleitet werden (Salmon et al., 2002). Diese Führung entlang von Aktinfilamenten kann durch zahlreiche Proteine vermittelt werden, darunter das Spektraplakin ACF7, welches Aktinfilamente mit Mikrotubuli verbindet (Suozzi et al., 2012; Wu et al., 2008). Das Aktinzytoskelett ist in Zellen auf strukturiertem Substrat meist parallel zur Migrationsrichtung und definierter als auf homogenem Substrat ausgerichtet. Werden Mikrotubuli nun entlang von Aktinfilamentbündeln geleitet, können die Trajektorien in polarisierten und elongierten Zellen länger bestehen bleiben. Diese Tatsache könnte eine weitere Erklärung für die längere Verweildauer von Mikrotubuli in Zellen auf strukturiertem Substrat sein. Die Anwesenheit

von durch Myosin II gebündelten Aktinfilamenten ist zudem eine wichtige Voraussetzung für gerichtetes Mikrotubuliwachstum (Huda et al., 2012).

Dass die Beständigkeit in migrierenden Zellen unabhängig vom unterliegenden Substrat abnimmt, könnte daran liegen, dass die gesamte Dynamik der Zelle, inklusive der Mikrotubuli-Dynamik, in migrierenden Zellen höher ist und Prozesse wie der *turnover* von fokalen Adhäsionen schneller ablaufen als in stationären Zellen.

In diesem Teil der Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass sich die Mikrotubuli-Dynamik abhängig vom unterliegenden Substrat unterscheidet und sie auf diese Weise einen Einfluss auf die Haptotaxis haben kann.

4.3 Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$ bei der Migration auf FN-Dotgradienten

Die folgende Diskussion beschäftigt sich mit den unterschiedlichen Rollen von $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrin während der gerichteten Migration auf substratgebundenen Adhäsionsgradienten. Die Erforschung von Integrinen wird dadurch erschwert, dass bestimmte Integrine nicht nur überlappende Ligandenspezifitäten, sondern einige Liganden auch überlappende Rezeptorspezifitäten aufweisen können. Für eine Interaktion mit FN gelten $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrin als die zwei bedeutendsten Rezeptoren (Yang et al., 1999). Im Gegensatz zu $\alpha 5\beta 1$ -, das spezifisch für FN ist, kann $\alpha V\beta 3$ -Integrin neben FN auch noch mit VN und anderen EZM-Proteinen in Interaktion treten. Hierbei wird es als der klassische VN-Rezeptor beschrieben (Horton, 1997).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Fibroblasten auf FN-Dotgradienten zu über 80% haptotaktisch migrierten, während sie zu einer Migration auf VN-Dotgradienten nicht in der Lage waren (s. Abbildung 3.7). Da $\alpha V\beta 3$ -Integrin sowohl an FN als auch an VN binden kann, wurde aufgrund der ausbleibenden Migration auf VN-Dotgradienten die Theorie aufgestellt, dass es unterschiedliche Funktionen für die Migration auf FN-Dotgradienten zwischen $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrin gibt und $\alpha V\beta 3$ -Integrin keine Rolle in der Initialisierung der Migration auf FN-Dotgradienten spielt.

Um die Hypothese der zentralen Bedeutung von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, im Gegensatz zu $\alpha V\beta 3$ -Integrin, zu überprüfen, wurden drei Zelllinien verwendet: GD25-wt, GD25- $\beta 1A$ und GD25- $\beta 1D$. Die Zelllinie GD25-wt weist hierbei einen *Knockout* der $\beta 1$ -Domäne auf. Durch stabile Transfektion von zwei verschiedenen $\beta 1$ -Isoformen sind aus der GD25-wt Linie zwei neue Zelllinien hervorgegangen: GD25- $\beta 1A$ und GD25- $\beta 1D$ (Wehrle-Haller, Genf). Während die

β 1A-Isoform ubiquitär in allen Geweben exprimiert wird, ist die Spleißvariante β 1D selektiv in Zellen der gestreiften Muskulatur und in Herzzellen lokalisiert. Im Vergleich zu den mit der β 1A-Isoform transfizierten Zellen, die ein mit den REFs vergleichbares, Migrationsverhalten auf den FN-Dotgradienten zeigten, war bei den GD25-wt Zellen auf FN-Dotgradienten eine starke Abnahme der Migration zu beobachten. Während das Einbringen der β 1A-Isoform eine reguläre Migration ermöglichte, führte die stabile Transfektion mit der muskelspezifischen β 1D-Isoform zu einem vollständigen Verlust der Migration auf FN-Dotgradienten (s. Abbildung 3.10). Dass ein kleiner Teil der GD25-wt Zellen mit dem *Knockout* von β 1-Integrin überhaupt in der Lage ist zu migrieren, liegt womöglich an einer Kompensation durch andere FN-bindende Integrinrezeptoren. Physiologisch relevant ist diese vollständige Abwesenheit von β 1-Integrin allerdings nicht, da ein β 1-Integrin *Knockout in vivo*, ebenso wie ein *Knockout* von α 5-Integrin, embryonal letal ist (Bouvard et al., 2013; Fässler and Meyer, 1995; Stephens et al., 1995).

Studien zeigten ebenfalls, dass die β 1A- und β 1D-Isoformen funktionell nicht gleichwertig sind: Während der Austausch von β 1D zu β 1A keine Folgen in der gestreiften Muskulatur hat und die Expression beider Isoformen zu einer regulären Aktivierung von RhoA führt, resultiert der Austausch von β 1A zu β 1D in einer embryonalen Letalität. Diese wird hauptsächlich durch die anormale Migration der Neuroepithelzellen verursacht. Neben der Einschränkung im Migrationsvermögen weisen Zellen mit dem Austausch durch β 1D-Integrin, eine Störung im *Spreading* und der Proliferation auf (Baudoin et al., 1998; Belkin et al., 1996; Gimond et al., 2000). Dies könnte in der Funktion von β 1D in Muskelzellen begründet liegen. Muskelzellen benötigen aufgrund der hohen Krafteinwirkung eine besonders stabile Verankerung mit ihrer Umgebung. Dies führt zu großen Adhäsionskomplexen, die folglich auch eine starke Signaltransduktion ausüben, das zu einem schnellen *turnover* der Adhäsionen führt. Experimente unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die Expression von β 1D-Integrin diesen schnellen *turnover* beeinflusst, indem β 1D zwar Vinculin, jedoch kein Paxillin und FAK rekrutiert. Somit führen β 1D-vermittelte Adhäsionen zu einer schwachen Signaltransduktion, während die stabile Verankerung bestehen bleibt (unveröffentlichte Daten, Michael Bachmann). Diese irreguläre Signaltransduktion der intrazellulären β 1D-Domäne ist eine mögliche Erklärung für das fehlende Migrationsvermögen der β 1D-Spleißvariante auf FN-Dotgradienten. Dies unterstützt die Hypothese, dass eine funktionelle β 1-Integrindomäne für die Migration auf FN-Dotgradienten von zentraler Bedeutung ist. Da Paxillin und FAK in der Hierarchie des Signalweges weit *upstream* lokalisiert sind, widmeten sich spätere Experimente in vorliegender Arbeit weiteren Unterschieden zwischen der intrazellulären β 1-Integrin und β 3-Integrindomäne.

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit bestärken somit die Annahme, dass $\alpha 5\beta 1$ für die Migration auf FN-Dotgradienten ausschlaggebend ist, da ein *Knockout* von $\beta 1$ -Integrin zu einer Migrationsabnahme führte. Hierbei ist zudem die jeweilige Isoform entscheidend, da die $\beta 1D$ -, im Gegensatz zur $\beta 1A$ -Isoform, den Phänotyp des *Knockouts* von $\beta 1$ -Integrin nicht retten konnte. Zur weiteren Überprüfung der Hypothese, wonach $\alpha V\beta 3$ -Integrin für die Migration auf FN-Dotgradienten verzichtbar ist, wurden Fibroblasten mit dem spezifischen αV -Integrin Inhibitor Cilengitide behandelt. Das Experiment dieser Arbeit konnte zeigen, dass der Inhibitor keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit von Fibroblasten auf FN-Dotgradienten hat (s. Abbildung 3.8). Wird die αV -Domäne im Gegensatz zu Fibroblasten in Krebszellen gestört, in denen VN und $\alpha V\beta 3$ -Integrin häufig überexprimiert sind, führt die Inhibition zu eingeschränkter Migration und Invasion von Tumorzellen (Li et al., 2015; Ruffini et al., 2015; van der Horst et al., 2014). Dies zeigt, dass die αV -Domäne zwar eine generelle Rolle in der Migration spielt, jedoch für die Migration auf FN-Dotgradienten keine zentrale Bedeutung hat.

Um auszuschließen, dass die fehlende Migration auf VN-Dotgradienten an der Zelllinie liegt, wurden im nächsten Experiment anstelle von REFs die Zelllinien NIH3T3 und NIH3T3- $\beta 3$ low (NIH3T3s mit einem niedrigen Level an endogenem $\beta 3$ -Integrin) auf FN- und VN-Dotgradienten kultiviert. Das Migrationsverhalten der NIH3T3s ist hierbei vergleichbar mit den zu über 80% haptotaktisch migrierenden REFs auf FN-Dotgradienten und ihrer fehlenden Migrationsfähigkeit auf VN-Dotgradienten. Kultiviert man NIH3T3- $\beta 3$ lows auf FN, migrieren diese ebenfalls haptotaktisch wie NIH3T3s, was belegt, dass die Migration auch hier vornehmlich über $\alpha 5\beta 1$ -Integrin abläuft (s. Abbildung 3.11 A und C). Das Level an $\alpha 5\beta 1$ -Integrin ist dabei in NIH3T3s identisch mit NIH3T3- $\beta 3$ lows (Pinon et al., 2014). Die haptotaktische Migration auf FN-Dotgradienten der NIH3T3- $\beta 3$ lows, die einen niedrigeren Level an $\beta 3$ -Integrin aufweisen, widerspricht Studien von Worth zur transdominanten Inhibition. Diese zeigen, dass $\beta 3$ -Integrin transdominant auf $\beta 1$ -Integrin wirkt. In diesen Studien scheint ein Verlust von $\beta 3$ -Integrin in einem stärkeren *turnover* von fokalen Adhäsionen und einer beeinträchtigten gerichteten Migration zu resultieren (Worth et al., 2010). Diese Beeinträchtigung in der Direktionalität auf FN-Dotgradienten konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht festgestellt werden. Die Kultivierung von NIH3T3- $\beta 3$ lows auf VN-Dotgradienten wies, wie bei REFs (s. Abbildung 3.7 C), ein stationäres Verhalten auf (s. Abbildung 3.11 D). Da die NIH3T3- $\beta 3$ lows wenig endogenes $\beta 3$ -Integrin besitzen, haben sie zudem das Problem, großflächig auf VN zu spreaden.

Die intrazelluläre β 1-Domäne bei der Migration auf VN-Dotgradienten

In den vorherigen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die β 1-Domäne für die Migration auf FN-Dotgradienten notwendig ist und Zellen mit einer irregulären intrazellulären β 1-Signaltransduktion (GD25- β 1D) zu keiner Migration fähig sind. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass der zytoplasmatische Teil die Migration auf FN-Dotgradienten induziert. Mithilfe des folgenden Experiments sollte diese Bedeutung des zytoplasmatischen β 1-Bereichs insofern geprüft werden, dass man Zellen, die unter normalen Bedingungen nicht auf VN migrieren können, zu einem intrazellulären β 1-Signal verhilft. So wird geprüft, ob sie dadurch zu einer Migration in der Lage sind. Hierfür wurden NIH3T3- β 3lows transient mit einem GFP-gekoppelten chimären β 3-Integrin transfiziert. Die Verwendung dieser Zelllinie stellte sicher, dass jenes β 3-Integrin, das mit VN interagiert, das chimäre β 3-Integrin aufweist und dadurch eine Bindekonkurrenz mit endogenem β 3-Integrin minimiert wird. Das chimäre β 3-Integrin kodiert für die extrazelluläre Domäne von β 3- und den transmembranen sowie zytoplasmatischen Bereich von β 1-Integrin. Dadurch ergibt sich ein Integrin, das die α V-Domäne, kombiniert mit dem extrazellulären Bereich von β 3- und der intrazellulären Domäne von β 1-Integrin, aufweist. Auf diese Weise kann das chimäre β 3-Integrin extrazellulär mit VN interagieren, während die intrazelluläre Signaltransduktion über die β 1-Domäne abläuft. Das Experiment ergab, dass die Zellen mithilfe dieser intrazellulären Signaltransduktion der zytoplasmatischen β 1-Domäne erstmals die Fähigkeit erwarben, auf VN-Dotgradienten zu migrieren (s. Abbildung 3.11 E). Dies ist ein klarer Beleg dafür, dass die intrazelluläre Signaltransduktion von β 1-Integrin ausschlaggebend ist und nicht die Integrin-Liganden-Interaktion.

Experimente mit chimären Integrinen wurden bereits in früheren Studien von Danen und Miao auf homogenen FN-Substraten durchgeführt. In diesen wurde die zytoplasmatische Domäne von β 1- durch β 3-Integrin ausgetauscht, während der extrazelluläre Teil von α 5 β 1-Integrin unverändert blieb. Auf homogenem FN-Substrat zeigte dieses chimäre β 1-Integrin ein reguläres Migrationsverhalten, bei der sich die Aktivität von RhoA durch den Austausch nicht veränderte (Danen et al., 2002; Truong and Danen, 2009). Dies würde bedeuten, dass die Interaktion mit dem Ligand wichtiger ist als die intrazelluläre Signaltransduktion der β 1-Integrindomäne und diese Domäne keinen Einfluss auf die RhoA-Aktivität nimmt. Andere Studien ersetzten in α 5 β 1-Integrin die extrazelluläre β 1-Domäne durch die extrazelluläre β 3-Domäne, während die restlichen Integrindomänen unverändert blieben. Das Resultat war eine Erhöhung der RhoA-Aktivität, die bekannter Weise durch die Expression von α 5 β 1-Integrin gefördert wird (Miao et al., 2002). Dies würde bedeuten, dass die intrazelluläre Domäne die Aktivität von Rho-GTPasen reguliert, was einen Widerspruch zu der Studie von

Danen darstellt. Beide Studien kann man allerdings nicht mit den Erkenntnissen dieser Arbeit vergleichen, da diese Studien zum einen mit einem $\alpha 5\beta 1$ - und nicht wie in dieser Arbeit mit einem $\alpha V\beta 3$ chimären Integrin erhoben wurden, zum anderen wurden die Studien auf FN-Substraten und nicht auf VN-Substraten durchgeführt. Des Weiteren scheint es substratspezifische Unterschiede in der Migration auf homogen beschichtetem Substrat und mikrostrukturierten Dotgradienten zu geben. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die $\beta 1$ -Domäne wichtig für die Migration ist (Brakebusch et al., 1997; Gimond et al., 1999; Wennerberg et al., 1996). Diese Studien wurden jedoch alle auf homogen beschichtetem FN-Substrat durchgeführt. Wie eigene Beobachtungen zeigen, sind Zellen sowohl auf homogenem FN als auch auf homogenem VN in der Lage, zu migrieren. Auf Dotgradienten findet jedoch nur auf FN Migration statt. Nur mithilfe der intrazellulären $\beta 1$ -Domäne können Fibroblasten auch auf VN-Dotgradienten migrieren. Dies zeigt eindeutig die große Bedeutung der intrazellulären $\beta 1$ -Domäne für die Migration auf Dotgradienten. Daraus lässt sich schließen, dass die Migration auf mikrostrukturierten Substraten eine komplexere Regulation erfordert als die Migration auf homogen beschichtetem Substrat.

Neben der Migration auf VN-Dotgradienten konnten die Experimente dieser Dissertation zudem zeigen, dass Fibroblasten auch erstmals die Fähigkeit erwarben, das unterliegende VN, vergleichbar mit FN, auf VN-Dotgradienten zu internalisieren (s. Abbildung 3.11 E). Während Studien gezeigt haben, dass $\beta 3$ -Integrin in Fibroblasten nicht in der Lage ist, VN mittels Endozytose zu internalisieren, sind Astrozytomazellen dazu fähig, sofern ein $\alpha 5\beta 1$ -Integrinsignal vorhanden ist (Memmo and McKeown-Longo, 1998; Pijuan-Thompson and Gladson, 1997). Überträgt man diese Beobachtung auf das Experiment dieser Arbeit, könnte das Einbringen des $\beta 1$ -Signals des chimären $\beta 3$ -Integrins in $\alpha V\beta 3$ zu der Internalisierung von VN führen. Ob sich dieses Signal auf den zytoplasmatischen Teil bezieht, wie das im chimären Integrin der Fall ist, bleibt unklar. Wahrscheinlicher ist die Tatsache, dass der zytoplasmatische Teil von $\beta 1$ -Integrin in diesem Kontext charakteristische Merkmale enthält, die für die Migration auf FN-Dotgradienten und die Signaltransduktion einzigartig sind. Dies wird in Kapitel 4.3 näher diskutiert.

Rho-GTPasen

Viele Integrine können mit FN interagieren, die sich je nach Gewebetyp und biologischen Prozessen wie Angiogenese, Migration oder Tumorentwicklung, in ihrer relativen Zusammensetzung unterscheiden und verändern können (Bouvard et al., 2013; Desgrosellier and Cheresch, 2010; Wolfenson et al., 2013). Dieser Wandel zieht wiederum Änderungen im Rho-GTPasen *signaling* nach sich, welche die Integrinzusammensetzung von Zell-Matrix-Adhäsionen und das Migrationsverhalten beeinflussen. Integrin $\alpha 5\beta 1$ soll dabei für eine kontraktile, fibroblastenartige Morphologie mit hoher RhoA-Aktivität und ungerichteter Migration von Zellen auf homogenem FN verantwortlich sein. Des Weiteren wird die Rekrutierung von Tensin in fibrillären Adhäsionen und die FN-Fibrillogenese durch $\alpha 5\beta 1$ -Integrin begünstigt. Die Expression von $\alpha V\beta 3$ -Integrin hingegen, soll eine niedrige RhoA- mit hoher Rac-Aktivität unterstützen, welche eine gerichtete Migration zur Folge haben soll (Danen et al., 2002; Danen et al., 2005). Die niedrige RhoA-Aktivität, wie sie von $\alpha V\beta 3$ -vermittelten Zell-Matrix-Adhäsionen verursacht wird, könnte eine Erklärung für die fehlende Migration auf VN-Dotgradienten sein, da RhoA für die Aktin-Myosin-Kontraktilität von großer Bedeutung und für die Haptotaxis unverzichtbar ist (Autenrieth, 2012). Dies unterstützt die Annahme zur zentralen Funktion von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin weiter, da $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vermittelte Zell-Matrix-Adhäsionen eine hohe RhoA-Aktivität aufweisen, welche die Kontraktilität des Aktin-/Myosin-Systems fördern.

In der vorliegenden Dissertation konnte nicht gezeigt werden, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrin eine ungerichtete und $\alpha V\beta 3$ -Integrin eine gerichtete Migration fördert. Hier unterstützten $\alpha 5\beta 1$ -vermittelte Zell-Matrix-Adhäsionen eine gerichtete, haptotaktische Migration.

Mechanotransduktion

Neueste Studien zeigen, dass $\alpha 5\beta 1$ - und $\alpha V\beta 3$ -Integrin eine differenzielle Mechanotransduktion aufweisen. Dies könnte eine weitere Erklärung dafür sein, dass $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, im Gegensatz zu $\alpha V\beta 3$ -Integrin, die zentrale Rolle in der Migration auf FN-Dotgradienten einnimmt.

Während $\alpha 5\beta 1$ -vermittelte Zell-Matrix-Adhäsionen die Bildung langer Aktinfilamente fördern, wird in $\alpha V\beta 3$ -vermittelten Zell-Matrix-Adhäsionen die Bildung kurzer Aktinfilamente unterstützt. Der Einfluss der Aktinorganisation konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, die darauf hindeuten, dass diese für die Reifung der Adhäsionen sogar noch wichtiger ist als Myosin-II vermittelte Zugkraft (Choi et al., 2008; Oakes et al., 2012; Stricker et al., 2013). Neben diesen Unterschieden fördern $\alpha 5\beta 1$ -vermittelte Zell-Matrix-Adhäsionen eine zentripetale Kraftverteilung innerhalb der Zelle, während $\alpha V\beta 3$ -

vermittelte Zell-Matrix-Adhäsionen eine ungerichtete Kraftverteilung unterstützen. (Balcioglu et al., 2015; Schiller and Fässler, 2013). Die längeren Aktinfilamente mit zentripetaler Zugkraftverteilung und einer hohen Aktin-/Myosin-Kontraktilität könnten somit für eine Migration auf FN-Dotgradienten förderlicher sein, als die durch $\alpha\beta3$ -vermittelten Aktinfilamente. Möglicherweise kann durch $\alpha5\beta1$ -Integrin der Dotgradient besser ausgelesen und Zugkräfte auf den geometrisch-verteilten Kontaktpunkten besser ausgeübt werden. Diese These ist adäquat zu den vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, welche die Notwendigkeit eines funktionellen Aktin-/Myosin-Systems für die Migration auf FN-Dotgradienten beschrieben haben (Autenrieth, 2012).

Charakteristische Merkmale der $\beta1$ -Domäne

Interaktion mit ICAP-1

Um noch gezielter Einblicke in die Bedeutung der $\beta1$ -Domäne zu erlangen, wurde geprüft, welche Eigenschaften in diesem Kontext charakteristisch für $\beta1$ - und nicht für $\beta3$ -Integrin sind. Dies ist unter anderem für den zytoplasmatischen Inhibitor ICAP-1 der Fall. Dieser interagiert ausschließlich mit $\beta1$ -Integrin und nicht mit $\beta3$ -Integrin. Durch die Bindung von ICAP-1 an die $\beta1$ -Bindedomäne von Kindlin folgt eine sterische Hinderung der Bindung von Talin, was zu einem Ausbleiben der Integrinaktivierung führt (Bouvard et al., 2013). Ein *Knockout* dieses Inhibitors auf FN-Dotgradienten führte in dieser Arbeit, verglichen mit ICAP-1 $+/+$ Zellen, zu einer Steigerung der Migrationsfähigkeit in Präosteoblasten um 23% (s. Abbildung 3.12). Im Unterschied zum Dotgradienten führte der *Knockout* von ICAP-1 auf homogenem FN-Substrat in Experimenten anderer Arbeitsgruppen zu einer anormalen Migration (Brunner et al., 2011; Millon-Frémillon et al., 2008). Die Folge eines *Knockouts* von ICAP-1 scheint sich somit, abhängig vom unterliegenden Substrat, zu unterscheiden. Während der *Knockout* auf homogenem Substrat in Studien von Bouvard zu einer Abnahme der Zellmigration führte, resultierte der *Knockout* auf mikrostrukturierten Dotgradienten in einer Zunahme der Migration. Betrachtet man die Lokalisation von ICAP-1 in den Aktinruffles an der Zellfront, könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Migrationseffekte darin liegen, dass die ICAP-1 $-/-$ Zellen auf Dotgradienten den Gradienten möglicherweise besser detektieren können als ICAP-1 $+/+$ Zellen. Durch die Abwesenheit von ICAP-1 könnte der Level aktiver $\beta1$ -Integrine in Aktinruffles an der Front höher sein, wo sich Adhäsionen aufgrund der unterliegenden Dotgeometrie anderweitig anordnen. Da Zellen auf homogenem

Substrat keinen gerichteten Migrationsreiz erfahren, die Zellen in der Regel weniger elongiert und polarisiert sind und Adhäsionen keine geometrische Limitation erfahren, wirkt sich ein *Knockout* von ICAP-1 unter Umständen anders aus. Ebenfalls könnte die Kompensation durch andere zytoplasmatische Inhibitoren auf homogenem Substrat abweichend organisiert sein als auf mikrostrukturiertem Substrat. Dass ein *Knockout* von ICAP-1 nicht letal ist, zeigt zudem, dass ICAP-1 für wichtige Prozesse wie die Zellmigration während der Embryogenese entweder nicht zwingend notwendig ist, oder dass andere zytoplasmatische Inhibitoren den *Knockout* von ICAP-1 kompensieren könnten.

Acetylierung von Lysin

Neben der Interaktion mit dem zytoplasmatischen β 1-Integrin Inhibitor ICAP-1 stellt die reversible Acetylierung von Lysin-794 einen weiteren Unterschied der intrazellulären β 1-Domäne im Vergleich zu β 3-Integrin dar (Choudhary et al., 2009). Um den Effekt der Acetylierung auf die Zellmigration auf FN-Dotgradienten zu untersuchen, wurde Lysin an Stelle 794 einerseits durch die Aminosäure Arginin ersetzt, welche die Ladung von nicht-acetyliertem Lysin imitiert, andererseits durch Glutamin, welches die Ladung eines acetylierten Lysins imitiert (Wehrle-Haller, Genf). Der Effekt dieses Austausches demonstrierte die Bedeutung der Lysin Acetylierung für die Zellmigration auf FN-Dotgradienten: Die Anwesenheit der Aminosäure Arginin mit ihrer positiven Ladung, führte zu einer starken Beeinträchtigung der Migration der GD25-K794R Zellen. Diese Beeinträchtigung ist vergleichbar mit dem Migrationsverhalten der β 1-*Knockout*-Zellen GD25-wt auf FN-Dotgradienten. In beiden Fällen können die Zellen nur noch zu etwa 30% uphill migrieren. Der Austausch von Lysin durch Arginin hat demnach denselben schwerwiegenden Effekt wie ein *Knockout* von β 1-Integrin. Der Austausch durch Glutamin mit neutraler Ladung in den GD25-K794Q Zellen hingegen, zeigte eine Migrationsfähigkeit von etwa 75%, vergleichbar mit den GD25- β 1A Zellen (s. Abbildung 3.14).

Interessanterweise ähnelt der Phänotyp von GD25-K794R Zellen dem von α V β 3-Integrin. So sind die Adhäsionen von GD25-K794R Zellen zumeist in der Zellperipherie lokalisiert, die zudem nicht in der Lage sind, fibrilläre Adhäsionen auszubilden (unveröffentlichte Daten, Michael Bachmann). Folglich fehlt es an Tensin, einem Protein, das verstärkt in fibrillären Adhäsionen zu finden ist und nur mit α 5 β 1-Integrin und nicht mit α V β 3-Integrin kolokalisiert. GD25-K794Q Zellen hingegen besitzen zentrale Adhäsionen mit charakteristischen Eigenschaften von α 5 β 1-Integrin, insbesondere die Fähigkeit, fibrilläre Adhäsionen mit detektierbarem Tensin zu bilden (unveröffentlichte Daten, Michael Bachmann). Im Gegensatz zu α 5 β 1- kommt α V β 3-Integrin nicht in fibrillären Adhäsionen vor,

in denen $\alpha 5\beta 1$ -Integrin eine bedeutende Rolle spielt. Dies spiegeln die Ergebnisse der Zelllinien GD25-K794R und GD25-K794Q wider (Cukierman et al., 2001; Pankov et al., 2000; Zamir et al., 2000). Im Gegensatz zu der eingeschränkten Migration von GD25-K794R Zellen, untermauert die reguläre Migration von GD25-K794Q Zellen nicht nur die Bedeutung von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin, sondern weist zusätzlich auf eine zentrale Rolle von fibrillären Adhäsionen und Tensin für die Migration auf FN-Dotgradienten hin. Auf homogenem Substrat zeigen diese Zelllinien ein anderes Verhalten. Hier sind Zellen der Linie GD25-K794R motiler und bauen das unterliegende FN stärker um als GD25-K794Q Zellen (Pers. Kommunikation Wehrle-Haller). Diesen stärkeren Umbau zeigen auch die Beobachtungen in dieser Arbeit (s. Abbildung 3.13). Zwar benötigen GD25-K794R Zellen länger, um zu polarisieren, ihre Interaktion mit dem homogenen Substrat ist jedoch stärker als die der GD25-K794Q Zellen. Dies wäre ein weiteres Beispiel, bei dem sich Effekte auf homogenem Substrat zu FN-Dotgradienten unterscheiden, was mit einer komplexeren Regulation der Migration auf mikrostrukturiertem Substrat erklärt werden könnte.

Fibrilläre Adhäsionen und die Fibrillogenese

Die Fähigkeit, fibrilläre Adhäsionen zu bilden, ist nur $\alpha 5\beta 1$ -Integrin vorbehalten. Dies könnte den entscheidenden Hinweis dafür liefern, dass Zellen auf homogenem FN- und VN-Substrat migrieren, dies jedoch auf strukturiertem Substrat nur auf FN-Dotgradienten und nicht auf VN-Dotgradienten der Fall ist. Möglicherweise sind für die Migration auf strukturiertem Substrat die Bildung von fibrillären Adhäsionen und der damit verbundene Umbau des FNs unverzichtbar, wohingegen Migration auf homogenem Substrat auch ohne fibrilläre Adhäsionen ablaufen kann. Dies würde auch die höhere Motilität von GD25-K794R Zellen auf homogenem Substrat im Vergleich zu FN-Dotgradienten erklären (Persönliche Kommunikation Wehrle-Haller). Auf der einen Seite könnte dies an der geometrischen Anordnung der FN-Dots liegen, die im Gegensatz zu homogenem Substrat auch eine räumliche Limitation der Kontaktpunkte nach sich zieht. Auf der anderen Seite könnte die Internalisierung der FN-Dots, die während der Migration auf FN-Dotgradienten stattfindet, durch den Umbau in Fibrillen unterstützt werden. Wie genau das Ablösen der FN-Dots abläuft, ist noch nicht geklärt. Unveröffentlichte Studien unserer Arbeitsgruppe haben in Zeitrafferfilmen ein Ablösen der FN-Dots gezeigt, bei denen das FN während der Migration extrazellulär an den Integrinen haften bleibt. Eine andere Möglichkeit stellen lysosomale Proteasen dar, die einen wichtigen Beitrag zur Zellmigration leisten sollen. Das Modell von Sung und Weaver beschreibt, dass lösliches FN oder proteolytierte FN-Fibrillen mithilfe von Endosomen internalisiert werden. Dort werden sie durch lysosomale Enzyme in adhäsive

Fragmente gespalten. Im Anschluss werden diese adhäsiven Fragmente als „*ready to adhere*“-Form an der Zellfront neben dem Lamellipodium resegregiert, um die Zellmigration zu unterstützen (Sung and Weaver, 2011). Wie sich eine erneute Sekretion von FN-Fragmenten auf den teils antiadhäsiven Bereichen der FN-Dotgradienten auswirken könnte und ob es während der Migration auf diesen Dotgradienten stattfindet, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Durch die Anwesenheit in fibrillären Adhäsionen spielt $\alpha 5\beta 1$ -Integrin auch eine zentrale Rolle in der FN-Fibrillogenese, die zum Aufbau der Matrix durch den Umbau von löslichem FN in unlösliche FN-Fibrillen führt. Für diesen Prozess ist $\alpha 5\beta 1$ -Integrin erforderlich und kann nicht ohne weiteres durch $\alpha V\beta 3$ -Integrin kompensiert werden (Kinsey et al., 2008). Eine Möglichkeit für die Notwendigkeit von $\alpha 5\beta 1$ -Integrin für die Fibrillogenese ist die Interaktion mit löslichem FN. Während sowohl $\alpha 5\beta 1$ - als auch $\alpha V\beta 3$ -Integrin an immobilisiertem und gestretchtem FN binden können, kann nur $\alpha 5\beta 1$ -Integrin mit löslichem, gefaltetem und dadurch inaktivem FN interagieren. Studien erklären dies mit der unterschiedlichen Erreichbarkeit der RGD-Bindetaschen von $\alpha V\beta 3$ -Integrin (verborgen) und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin (freigelegt) (Huveneers et al., 2008). Hierbei wurde vermutet, dass die RGD-Bindung bei $\alpha V\beta 3$ -Integrin für die mechanische Kopplung ausreicht, bei $\alpha 5\beta 1$ -Integrin jedoch die RGD-Bindung zusätzlich mit der Bindung der synergistischen Bindestelle einhergehen muss, um mechanische Kraft zu gewährleisten (García et al., 2002). Bis heute ist der Mechanismus nicht vollständig geklärt, der von phosphotyrosinreichen, fokalen Adhäsionen zu phosphotyrosinarmen fibrillären Adhäsionen führt. Eine mögliche Erklärung ist der *catch-bond* Mechanismus zwischen $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und FN, der in $\alpha V\beta 3$ -Integrin nicht vorhanden ist (Friedland et al., 2009).

Fazit

Die Experimente dieser Arbeit konnten zeigen, dass die intrazelluläre $\beta 1$ -vermittelte Signaltransduktion für die Migration auf FN-Dotgradienten unverzichtbar ist. Die Tatsache, dass sich die Fähigkeit zur Migration auf FN- und VN-Dotgradienten unterscheidet, war Anlass für die nähere Untersuchung der Integrine $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha V\beta 3$ sowie ihrer unterschiedlichen Funktionen in der Migration auf FN-Dotgradienten (zusammengefasst in Abbildung 4.2).

Das Verhalten der $\beta 1$ -Integrin *Knockout*-Zellen auf FN-Dotgradienten bestärkte die Vermutung, dass $\beta 1$ -Integrin eine wichtige Rolle in der Migration auf adhäsiven FN-Dotgradienten spielt, da diese Zellen kaum in der Lage waren, auf FN-Dotgradienten zu migrieren. Die Transfektion der Spleißvariante $\beta 1D$ konnte, im Gegensatz zu $\beta 1A$, diese Beeinträchtigung nicht umkehren. Die irreguläre intrazelluläre $\beta 1$ -Signaltransduktion der GD25- $\beta 1D$ Zellen mit ihrem Einfluss auf die Migration, legte die Vermutung nahe, dass die intrazelluläre $\beta 1$ -Domäne von großer Bedeutung ist. Um diese Hypothese weiter zu prüfen, wurden Fibroblasten mit einem chimären $\beta 3$ -Integrin transient transfiziert und auf VN-Dotgradienten kultiviert. Im Gegensatz zu WT-Fibroblasten erwarben Fibroblasten mit dem chimären $\beta 3$ -Integrin erstmals die Fähigkeit zur Migration auf VN-Dotgradienten. Während die extrazelluläre Domäne von $\beta 3$ -Integrin die Interaktion mit dem Ligand VN ermöglichte, stellte die intrazelluläre Domäne von $\beta 1$ -Integrin die Migration sicher. Dieses Experiment belegt eindeutig die bedeutende Funktion der intrazellulären $\beta 1$ -Domäne für die Migration auf FN-/VN-Dotgradienten und zeigt, dass die intrazelluläre $\beta 1$ -Signaltransduktion und nicht die Interaktion mit dem Ligand hierfür entscheidend ist.

Da die Notwendigkeit der intrazellulären Domäne von $\beta 1$ -Integrin bestätigt werden konnte, fokussierten sich weitere Experimente auf, in diesem Kontext, charakteristische Unterschiede in den zytoplasmatischen Bereichen von $\beta 1$ - und $\beta 3$ -Integrin. Im Gegensatz zu $\beta 3$ - besitzt $\beta 1$ -Integrin ein acetylierbares Lysin (794) an der zytoplasmatischen Domäne, dessen Einfluss durch einen Aminosäureaustausch von Arginin und Glutamin näher untersucht wurde. Die Simulation eines nicht-acetylierten Lysins durch den Austausch durch Arginin in GD25-K794R Zellen führte zu einer Abnahme der Migrationsfähigkeit, während die Simulation eines acetylierten Lysins durch Glutamin in GD25-K794Q Zellen die Migrationsfähigkeit nicht beeinträchtigte. Diese Erkenntnis verdeutlicht die Notwendigkeit der intrazellulären $\beta 1$ -Integrindomäne für die Migration auf FN-Dotgradienten.

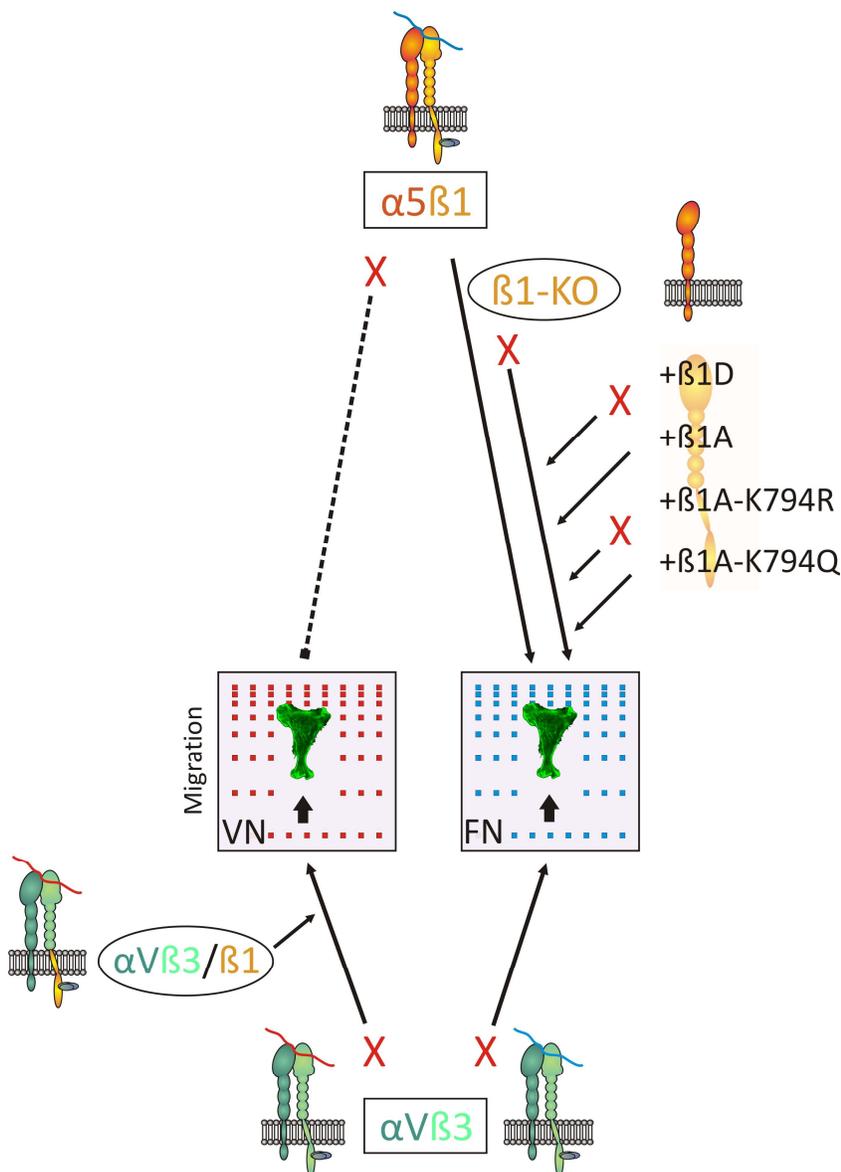


Abbildung 4.2: Grafische Zusammenfassung der $\alpha 5 \beta 1$ - und $\alpha V \beta 3$ -vermittelten Migration auf FN- und VN-Dotgradienten

Während $\alpha V \beta 3$ -Integrin sowohl mit FN als auch mit VN interagieren kann, ist $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin spezifisch für Interaktionen mit FN. Im Gegensatz zu FN-Dotgradienten können sich Wildtyp-Fibroblasten nicht fortbewegen. Durch einen Knockout von $\beta 1$ -Integrin ($\beta 1$ -KO) verlieren die Zellen auch auf FN-Dotgradienten ihre Fähigkeit zur Migration. Da die muskelspezifische Isoform $\beta 1D$ eine irreguläre intrazelluläre Signaltransduktion aufweist, führt die stabile Transfektion von $\beta 1D$ in $\beta 1$ -Knockout-Zellen ebenfalls zu einer anomalen Migration. Erst die ubiquitär exprimierte Isoform $\beta 1A$ ermöglicht eine reguläre haptotaktische Migration vergleichbar mit der des Wildtyps. Diese Erkenntnisse zeigen die Notwendigkeit einer funktionellen intrazellulären $\beta 1$ -Domäne für die Migration auf FN-Dotgradienten. In diesem Kontext charakteristisch für die intrazelluläre $\beta 1$ -Domäne ist ein acetylierbares Lysin, das in $\beta 3$ -Integrin nicht vorzufinden ist. Der Einsatz eines $\beta 1$ -Integrins mit einem Austausch von Lysin zu Arginin ($\beta 1A-K794R$), in den mit $\beta 1A$ transfizierten Zellen, führt dabei zu einer Migrationsabnahme. Ein Austausch von Lysin zu Glutamin ($\beta 1A-K794Q$) hingegen stellt die reguläre Migrationsfähigkeit wieder her. Dies zeigt welchen Einfluss die zytosmatische $\beta 1$ -Domäne auf die Migration auf FN-Dotgradienten nimmt. Durch transiente Transfektion eines chimären $\beta 3$ -Integrins, das die extrazelluläre $\beta 3$ -Domäne, sowie die transmembrane und intrazelluläre $\beta 1$ -Domäne ($\alpha V \beta 3 / \beta 1$) aufweist, erwerben Fibroblasten die Fähigkeit, auf VN-Dotgradienten zu migrieren. Dies ist der klare Beleg dafür, dass die intrazelluläre Signaltransduktion von $\beta 1$ -Integrin die Entscheidende für die Migration auf FN-Dotgradienten ist, während natives $\alpha V \beta 3$ -Integrin verzichtbar für die Migration ist.

Abschließend wurde in dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss ein *Knockout* des β 1-Integrin-spezifischen Inhibitors ICAP-1 auf die Migration auf FN-Dotgradienten hat. Dieser Inhibitor interagiert spezifisch mit β 1- und nicht mit β 3-Integrin, was eine weitere Untersuchung von β 1-Integrin spezifischen Merkmalen erlaubt. Der *Knockout* von ICAP-1 führte zu einem Anstieg der Migration auf FN-Dotgradienten.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass α 5 β 1-Integrin mit seinem Beitrag zu fibrillären Adhäsionen die zentrale Rolle in der Migration auf FN-Dotgradienten einnimmt, während α V β 3-Integrin nicht in der Lage ist, Migration auf VN-Dotgradienten zu initialisieren. Dies zeigt, dass auch wenn verschiedenartige Integrine denselben Liganden binden, sie dennoch unterschiedliche Funktionen in biologischen Prozessen erfüllen.

4.4 Ausblick

In Zukunft könnten weitere Experimente zur Untersuchung von Proteinen angefertigt werden, die in den Mechanismus der Haptotaxis involviert sein könnten. Frühere Studien unserer Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass ein funktionierendes Aktin-Myosin- und Mikrotubulisystem für die Haptotaxis von zentraler Bedeutung sind (Autenrieth, 2012). Proteine, die dabei in beide Systeme involviert sind, stehen somit im Mittelpunkt zukünftiger Experimente. Ein geeigneter Kandidat wäre das Spektraplaklin ACF7, welches Mikrotubuli entlang von Aktinfilamenten an die Zellfront führt (Suozzi et al., 2012; Wu et al., 2008). Hierbei könnten die Störung mit pharmakologischen Inhibitoren und deren Auswirkung auf die Haptotaxis untersucht werden. Diese Experimente ließen sich zudem mit Zeitrafferaufnahmen und TIRF-Mikroskopie kombinieren, um einen besseren Einblick in die Interaktion zu erhalten. In Zukunft wäre es zudem denkbar, wie bei der Gruppe von Wu oder Martin Chemotaxis-Experimente anzufertigen, die ihre Effekte aus den Haptotaxis-Studien direkt mit Chemotaxis-Studien vergleichen. Des Weiteren könnte eine Vielzahl von Experimenten mit unterschiedlichen Substratgeometrien angefertigt werden. Die Methode des *Microcontact-Printings* ermöglicht hierzu eine große Flexibilität der geometrischen Anordnung der Dots in ihrem Muster oder der Steilheit des Dotgradienten.

Bezüglich der Integrine ist bekannt, dass die Endocytose und das Recycling von α 5 β 1- und α V β 3-Integrin unterschiedlich reguliert wird. Genauere Einblicke in diese verschiedenen Wege der Endocytose wären interessant und könnten weitere Informationen über die Funktionen dieser Integrine in der Migration auf FN-Dotgradienten liefern. Während α V β 3-

Integrin über den Rab4-abhängigen „*short-loop*“ recycelt werden, läuft die Endocytose von $\alpha\beta$ 1-Integrin über den Rab11-abhängigen „*long-loop*“ ab. Wie sich eine pharmakologische Inhibition von Komponenten des Rab11-abhängigen Endocytoseweges auf die Migration auf FN-Dotgradienten auswirkt, wäre von großem Interesse. Zudem könnten Zeitrafferaufnahmen angefertigt werden, in denen fluoreszenzmarkierte Rab-Proteine einen Einblick in das Integrinrecycling gewähren. Die Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Acetylierung von Lysin eine bedeutende Rolle in der Migration auf FN-Dotgradienten spielt. Studien von Wellen haben dargelegt, dass das Acetylierungs-Level in Zellen vom Kofaktor der Acetyltransferasen, AcetylCoA, reguliert wird. Aus diesem Grund könnte man in Zukunft Experimente durchführen, die das Acetyl-CoA-Level in der Zelle beeinflussen und den Effekt auf die Migration auf FN-Dotgradienten untersuchen. (Wellen et al., 2009; Wellen and Thompson, 2012). Dies könnte beispielsweise durch niederkonzentrierte Glucose im Zellkulturmedium erreicht werden. Da Acetyl-CoA jedoch an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt ist, ist eine Störung des Acetyl-CoA-Levels ohne eine Kompensation nicht einfach. Bisher ist über die Acetylierung von nicht nuklearen Proteinen nur sehr wenig bekannt. Das meiste Wissen existiert hauptsächlich über die Acetylierung von Histonen oder Tubulin aber nicht über den Einfluss der Acetylierung auf die Integrine. Aus diesem Grund gibt es auf diesem Gebiet noch Vieles zu untersuchen.

Des Weiteren können Fibroblasten mit chimärem β 3-Integrin transfiziert werden, die den Aminosäureaustausch von Arginin und Glutamin am zytoplasmatischen β 1-Integrinbereich aufweisen, um auf VN-Dotgradienten die Bedeutung der Acetylierung des zytoplasmatischen β 1-Integrinbereichs zu analysieren. Neben Studien zur Acetylierung könnten auch noch weitere Experimente zu zytoplasmatischen Inhibitoren, wie Sharpin und FilaminaA, angefertigt werden, um weitere Einblicke in die Bedeutung der Integrininaktivierung für die Migration auf FN-Dotgradienten zu erlangen.

Da gezeigt werden konnte, dass fibrilläre Adhäsionen wichtig für die Migration auf FN-Dotgradienten sind, können Adapterproteine wie Tensin, das verstärkt in fibrillären Adhäsionen zu finden ist, beispielsweise mithilfe eines *Knockdowns* untersucht werden. Außerdem werden während der Migration die unterliegenden FN-Dots internalisiert. Dieser Mechanismus könnte ebenfalls näher untersucht werden, um ein besseres Verständnis darüber zu erlangen, wie diese Internalisierung und das Ablösen der FN-Dots vom Substrat abläuft. Hierzu könnten Zeitrafferfilme angefertigt werden, um zu visualisieren, ob eine lysosomale Resegregation von adhäsiven Proteinfragmenten auf den teils antiadhäsiven Dotgradienten überhaupt stattfindet.

Da eigene Beobachtungen gezeigt haben, dass Migration auf FN-Dotgradienten nur in Anwesenheit von Serumproteinen im Medium stattfindet, könnten zukünftige Untersuchungen genauer analysieren, welche Wachstumsfaktoren für die Migration wichtig

sind. Diese Erkenntnis hätte den Vorteil, dass Zellen für weitere Experimente in Kulturmedium mit definierten, für die Migration notwendigen, Zusätzen kultiviert werden können. EZM-Proteine, die normalerweise im Serum enthalten sind, sind somit nicht vorhanden, und können sich auch nicht auf dem Substrat absetzen bzw. die Integrine beeinflussen. Mit dieser Erkenntnis könnten Zellen in serumfreiem Medium unter der Zugabe von einzelnen wichtigen Wachstumsfaktorkomponenten, wie beispielsweise PDGF, auf den Dotgradienten kultiviert werden.

Viele Arbeitsgruppen verwenden für ihre Experimente homogen beschichtete Substrate oder kontinuierliche Adhäsionsgradienten. Auf diesen sind die Polarisierung der Zellen und die geometrische Anordnung der Kontaktpunkte nicht so ausgeprägt wie in diskontinuierlichen Dotgradienten. Da Proteine *in vivo* nicht homogen, sondern räumlich verteilt vorliegen, repräsentieren diskontinuierliche Dotgradienten die *in vivo* Situation stärker und erlauben eine genauere Quantifizierung der gewonnenen Erkenntnisse. Eine noch deutlichere Simulation der *in vivo* Situation kann mit 3D-Substraten wie beispielsweise Hydrogelen erreicht werden. Zwar können in 3D-Gelen nicht so definierte Proteingeometrien untersucht werden wie dies auf diskontinuierlichen Dotgradienten der Fall ist, dennoch entsprechen sie der *in vivo* Umgebung besser als 2D-Substrate. Studien konnten zudem zeigen, dass sich fokale Adhäsionen in 3D von 2D Adhäsionen unterscheiden. So ist z.B. β 3-Integrin nur in fokalen Adhäsionen in 2D und nicht in 3D Matrix-Adhäsionen zu finden. Dies deutet auf substratspezifische Unterschiede hin, die es näher zu untersuchen gilt.

Studien zeigen, dass eine 1D FN-Linie eher der 3D-Situation entspricht als homogene 2D-Substrate, da die Zellen stärker polarisiert sind und uniaxial migrieren. Außerdem ist das Migrationsverhalten in 3D durch die Abhängigkeit von einer hohen RhoA-Aktivität wie sie von α 5 β 1-vermittelten Adhäsionen unterstützt wird und von der Kontraktilität des Aktin-Myosin/Systems gekennzeichnet (Doyle et al., 2009). Diese Tatsachen lassen vermuten, dass mikrostrukturierte Dotgradienten eher einer 3D-Umgebung entsprechen als homogenen 2D-Substraten. Diese Hypothese könnte die Basis für zukünftige Experimente darstellen, die Effekte auf FN-Dotgradienten mit denen in 3D vergleichen könnten. Beispielsweise könnten Zellen der Zelllinien GD25-K794R und -K794Q in 3D-Matrigelen kultiviert und ihr Migrationsverhalten mittels Zeitrafferaufnahmen untersucht werden. Da sich das Verhalten dieser Zelllinien auf homogenem und mikrostrukturiertem Substrat unterscheidet, könnten die Studien in 3D dazu führen, diesen substratspezifischen Effekt aufzuklären und die Hypothese, dass Dotgradienten eher der 3D Situation entsprechen als homogene Substraten, bestätigen. Dies könnte die Erklärung dafür sein, dass viele in der Literatur beschriebene Effekte auf Dotgradienten, genau wie in 3D, nicht zu finden sind. Bestätigt sich diese Vermutung, würde dies den diskontinuierlichen Protein-Dotgradienten eine völlig neue Bedeutung und einen neuen Einfluss zuweisen, da sich Proteine auf mikrostrukturiertem

Substrat um einiges leichter kontrollieren und Zellen einfacher quantifizieren lassen als in 3D, sie jedoch trotzdem 3D-spezifische Effekte repräsentieren.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1.1: INTEGRIN-VERMITTELTE ADHÄSIONSREIFUNG	9
ABBILDUNG 1.2: DIE INTEGRIN-FAMILIE.....	11
ABBILDUNG 1.3: MODELL ZUR HAPTOTAXIS.....	20
ABBILDUNG 2.1: ÜBERSICHT DES VERWENDETEN PROTEIN-DOTGRADIENTEN.....	26
ABBILDUNG 2.2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER STEMPELANFERTIGUNG UND DES <i>MICROCONTACT-PRINTINGS</i> MITTELS GOLD-THIOL-CHEMIE.....	29
ABBILDUNG 2.3: DIREKTES <i>MICROCONTACT-PRINTING</i> ERLAUBT DIE HERSTELLUNG VON DIFFERENZIELLEN FN/VN-SUBSTRATEN.....	31
ABBILDUNG 2.4: PRÄPARATION PRIMÄRER HÜHNERFIBROBLASTEN (CEFS)	33
ABBILDUNG 2.5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MIGRATIONSRICHTUNGEN	42
ABBILDUNG 2.6: MIKROTUBULITRACKING MITHILFE DES PROGRAMMES „ <i>PLUSTIPTRACKER</i> “	43
ABBILDUNG 3.1: DARSTELLUNG DES VERWENDETEN FN-DOTGRADIENTEN.....	49
ABBILDUNG 3.2: MIGRATIONSVERHALTEN VON CEFS NACH INHIBITION VON RAC MITTELS EHT1864 UND EHOP-016 AUF FN-DOTGRADIENTEN	51
ABBILDUNG 3.3: MIGRATIONSVERHALTEN VON REFS NACH INHIBITION DES ARP2/3- KOMPLEXES.....	53
ABBILDUNG 3.4: MIGRATIONSVERHALTEN VON REFS UND CEFS NACH INHIBITION DER FH2-DOMÄNE VON FORMIN.....	56
ABBILDUNG 3.5: MIGRATIONSVERHALTEN VON REFS NACH INHIBITION VON ILK.....	58
ABBILDUNG 3.6: MIKROTUBULI-DYNAMIK AUF UNTERSCHIEDLICHEN SUBSTRATGEOMETRIEN.....	61
ABBILDUNG 3.7: MIGRATIONSVERHALTEN AUF UNTERSCHIEDLICHEN GLYKOPROTEIN- DOTGRADIENTEN	64
ABBILDUNG 3.8: MIGRATIONSVERHALTEN NACH PHARMAKOLOGISCHER INHIBITION DER AV-UNTEREINHEIT	65
ABBILDUNG 3.9: ZELLMORPHOLOGIE DIVERSER GD25-ZELLINIEN AUF HOMOGENEM SUBSTRAT	67
ABBILDUNG 3.10: DER EINFLUSS VON B1-INTEGRIN AUF DAS MIGRATIONSVERHALTEN AUF FN-DOTGRADIENTEN.....	69
ABBILDUNG 3.11: INTRAZELLULÄRES B1-INTEGRIN ERMÖGLICHT DIE MIGRATION AUF VN- DOTGRADIENTEN	71

ABBILDUNG 3.12: MIGRATIONSVERHALTEN VON ICAP-1- <i>KNOCKOUT</i> UND ICAP-1 +/+ ZELLEN AUF FN-DOTGRADIENTEN.....	73
ABBILDUNG 3.13: ZELLMORPHOLOGIE VON GD25-K794R UND GD25-K794Q AUF HOMOGENEM FN-SUBSTRAT.....	75
ABBILDUNG 3.14: EINFLUSS DER ACETYLIERUNG VON LYSIN-794 AN B1-INTEGRIN AUF DIE GERICHTETE MIGRATION.....	77
ABBILDUNG 3.15: SEPARIERUNG VON INTEGRINEN AUF DIFFERENZIELLEN FN/VN- SUBSTRATEN	78
ABBILDUNG 4.1: GRAFISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER STÖRUNG ZYTOSKELETAL- ASSOZIIERTER PROTEINE WÄHREND DER HAPTOTAXIS.....	90
ABBILDUNG 4.2: GRAFISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER A5B1- UND AVB3-VERMITTELTEN MIGRATION AUF FN- UND VN-DOTGRADIENTEN.....	104

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 2.1: VERWENDETE LÖSUNGSMITTEL UND CHEMIKALIEN	23
TABELLE 2.2: ZUSAMMENSETZUNG DES F12-MEDIUMS.....	24
TABELLE 2.3: VERWENDETE ZELLINIEN, IHRE ZELLKULTURMEDIEN UND HERKUNFT	32
TABELLE 2.4: VERWENDETE ZELLZAHL DER VERSCHIEDENEN ZELLINIEN AUF MIKROSTRUKTURIERTEN DOTGRADIENTEN	35
TABELLE 2.5: EINGESETZTE INHIBITOREN UND IHRE ZIELSTRUKTUREN.....	38
TABELLE 2.6: VERWENDETE PRIMÄRANTIKÖRPER.....	40
TABELLE 2.7: VERWENDETE SEKUNDÄRANTIKÖRPER	40
TABELLE 2.8: VERWENDETE AFFINITÄTSMARKIERUNGEN.....	41
TABELLE 2.9: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN MIKROSKOPE.....	45

LITERATURVERZEICHNIS

- Abercrombie, M., J.E. Heaysman, and S.M. Pegrum. 1970. The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res.* 59:393-398.
- Adams, D.N., E.Y. Kao, C.L. Hypolite, M.D. Distefano, W.S. Hu, and P.C. Letourneau. 2005. Growth cones turn and migrate up an immobilized gradient of the laminin IKVAV peptide. *J Neurobiol.* 62:134-147.
- Akhtar, N., and C.H. Streuli. 2012. An integrin-ILK-microtubule network orients cell polarity and lumen formation in glandular epithelium. *Nat Cell Biol.*
- Alberts B., B.D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. 1994. Molecular Biology of the Cell, 3rd edition.
- Ali, I.U., and R.O. Hynes. 1977. Effects of cytochalasin B and colchicine on attachment of a major surface protein of fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 471:16-24.
- Anthis, N.J., J.R. Haling, C.L. Oxley, M. Memo, K.L. Wegener, C.J. Lim, M.H. Ginsberg, and I.D. Campbell. 2009. Beta integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation. *J Biol Chem.* 284:36700-36710.
- Applegate, K.T., S. Besson, A. Matov, M.H. Bagonis, K. Jaqaman, and G. Danuser. 2011. plusTipTracker: Quantitative image analysis software for the measurement of microtubule dynamics. *J Struct Biol.* 176:168-184.
- Arnold, M., V.C. Hirschfeld-Warneken, T. Lohmüller, P. Heil, J. Blümmel, E.A. Cavalcanti-Adam, M. López-García, P. Walther, H. Kessler, B. Geiger, and J.P. Spatz. 2008. Induction of cell polarization and migration by a gradient of nanoscale variations in adhesive ligand spacing. *Nano Lett.* 8:2063-2069.
- Arthur, W.T., L.A. Petch, and K. Burridge. 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol.* 10:719-722.
- Autenrieth, T. 2012. Zellpolarisierung und Haptotaxis auf mikrostrukturierten Fibronectin-Dotgradienten *In* Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften. Vol. Dr.rer.nat. Karlsruhe Institut für Technologie, Karlsruhe. 161.
- Bachmann, M. 2015. Analyse Integrin-vermittelter Zellkontakte auf differenziellen Fibronectin/Vitronectin-Substraten mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie. *In* Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften. Vol. Dr.rer.nat. Karlsruhe Institut für Technologie (KIT), Karlsruhe. 140.
- Balcioglu, H.E., H. van Hoorn, D.M. Donato, T. Schmidt, and E.H. Danen. 2015. The integrin expression profile modulates orientation and dynamics of force transmission at cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 128:1316-1326.
- Ballestrem, C., B. Wehrle-Haller, B. Hinz, and B.A. Imhof. 2000. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell.* 11:2999-3012.

-
- Bartolini, F., J.B. Moseley, J. Schmoranzler, L. Cassimeris, B.L. Goode, and G.G. Gundersen. 2008. The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity. *J Cell Biol.* 181:523-536.
- Bass, M.D., M.R. Morgan, K.A. Roach, J. Settleman, A.B. Goryachev, and M.J. Humphries. 2008. p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from alpha 5 beta 1 integrin and syndecan-4. *J Cell Biol.* 181:1013-1026.
- Baudoin, C., M.J. Goumans, C. Mummery, and A. Sonnenberg. 1998. Knockout and knockin of the beta1 exon D define distinct roles for integrin splice variants in heart function and embryonic development. *Genes Dev.* 12:1202-1216.
- Belkin, A.M., N.I. Zhidkova, F. Balzac, F. Altruda, D. Tomatis, A. Maier, G. Tarone, V.E. Koteliensky, and K. Burridge. 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.
- Bell, E., B. Ivarsson, and C. Merrill. 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:1274-1278.
- Bergmann, J.E., A. Kupfer, and S.J. Singer. 1983. Membrane insertion at the leading edge of motile fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:1367-1371.
- Blumbach, K., M.C. Zweers, G. Brunner, A.S. Peters, M. Schmitz, J.N. Schulz, A. Schild, C.P. Denton, T. Sakai, R. Fässler, T. Krieg, and B. Eckes. 2010. Defective granulation tissue formation in mice with specific ablation of integrin-linked kinase in fibroblasts - role of TGFβ1 levels and RhoA activity. *J Cell Sci.* 123:3872-3883.
- Bornschiögl, T. 2013. How filopodia pull: What we know about the mechanics and dynamics of filopodia. *Cytoskeleton (Hoboken).*
- Boucaut, J.C., T. Darribere, S.D. Li, H. Boulekbatche, K.M. Yamada, and J.P. Thiery. 1985. Evidence for the role of fibronectin in amphibian gastrulation. *J Embryol Exp Morphol.* 89 Suppl:211-227.
- Boucaut, J.C., T. Darribère, T.J. Poole, H. Aoyama, K.M. Yamada, and J.P. Thiery. 1984. Biologically active synthetic peptides as probes of embryonic development: a competitive peptide inhibitor of fibronectin function inhibits gastrulation in amphibian embryos and neural crest cell migration in avian embryos. *J Cell Biol.* 99:1822-1830.
- Boulter, E., D. Grall, S. Cagnol, and E. Van Obberghen-Schilling. 2006. Regulation of cell-matrix adhesion dynamics and Rac-1 by integrin linked kinase. *FASEB J.* 20:1489-1491.
- Bouvard, D., A. Millon-Fremillon, S. Dupe-Manet, M.R. Block, and C. Albiges-Rizo. 2006. Unraveling ICAP-1 function: toward a new direction? *Eur J Cell Biol.* 85:275-282.
- Bouvard, D., J. Pouwels, N. De Franceschi, and J. Ivaska. 2013. Integrin inactivators: balancing cellular functions in vitro and in vivo. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14:430-442.

-
- Bouvard, D., L. Vignoud, S. Dupé-Manet, N. Abed, H.N. Fournier, C. Vincent-Monegat, S.F. Retta, R. Fassler, and M.R. Block. 2003. Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem.* 278:6567-6574.
- Brakebusch, C., E. Hirsch, A. Potocnik, and R. Fässler. 1997. Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. *J Cell Sci.* 110 (Pt 23):2895-2904.
- Bretscher, M.S., and C. Aguado-Velasco. 1998. Membrane traffic during cell locomotion. *Curr Opin Cell Biol.* 10:537-541.
- Brooks, P.C., R.A. Clark, and D.A. Cheresh. 1994. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 264:569-571.
- Brunner, M., A. Millon-Frémillon, G. Chevalier, I.A. Nakchbandi, D. Mosher, M.R. Block, C. Albigès-Rizo, and D. Bouvard. 2011. Osteoblast mineralization requires beta1 integrin/ICAP-1-dependent fibronectin deposition. *J Cell Biol.* 194:307-322.
- Burdick, J.A., A. Khademhosseini, and R. Langer. 2004. Fabrication of gradient hydrogels using a microfluidics/photopolymerization process. *Langmuir.* 20:5153-5156.
- Burke, R.D. 1999. Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int Rev Cytol.* 191:257-284.
- Burke, T.A., J.R. Christensen, E. Barone, C. Suarez, V. Sirotkin, and D.R. Kovar. 2014. Homeostatic actin cytoskeleton networks are regulated by assembly factor competition for monomers. *Curr Biol.* 24:579-585.
- Burnette, D.T., S. Manley, P. Sengupta, R. Sougrat, M.W. Davidson, B. Kachar, and J. Lippincott-Schwartz. 2011. A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat Cell Biol.* 13:371-381.
- Calderwood, D.A., Y. Fujioka, J.M. de Pereda, B. García-Alvarez, T. Nakamoto, B. Margolis, C.J. McGlade, R.C. Liddington, and M.H. Ginsberg. 2003. Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2272-2277.
- Carter, S.B. 1965. Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion. *Nature.* 208:1183-1187.
- Carter, S.B. 1967. Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature.* 213:256-260.
- Castillo-Pichardo, L., T. Humphries-Bickley, C. De La Parra, I. Forestier-Roman, M. Martinez-Ferrer, E. Hernandez, C. Vlaar, Y. Ferrer-Acosta, A.V. Washington, L.A. Cubano, J. Rodriguez-Orengo, and S. Dharmawardhane. 2014. The Rac Inhibitor EHop-016 Inhibits Mammary Tumor Growth and Metastasis in a Nude Mouse Model. *Transl Oncol.* 7:546-555.
- Chang, D.D., B.Q. Hoang, J. Liu, and T.A. Springer. 2002. Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J Biol Chem.* 277:8140-8145.
- 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 %6:1425-1428 %&.
- Chhabra, E.S., and H.N. Higgs. 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol*. 9:1110-1121.
- 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.
- Choquet, D., D.P. Felsenfeld, and M.P. Sheetz. 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*. 88:39-48.
- Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M.L. Nielsen, M. Rehman, T.C. Walther, J.V. Olsen, and M. Mann. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*. 325:834-840.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burridge. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol*. 133:1403-1415.
- Clark, E.A., W.G. King, J.S. Brugge, M. Symons, and R.O. Hynes. 1998. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol*. 142:573-586.
- Clark, R.A., J.H. Quinn, H.J. Winn, J.M. Lanigan, P. Dellepella, and R.B. Colvin. 1982. Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. *J Exp Med*. 156:646-651.
- Collins, F., and M.R. Lee. 1984. The spatial control of ganglionic neurite growth by the substrate-associated material from conditioned medium: an experimental model of haptotaxis. *J Neurosci*. 4:2823-2829.
- Cooper, G. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sinauer Associates.
- 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 alpha5beta1 and alphavbeta3 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.
- Davis, G.E., and D.R. Senger. 2005. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ Res*. 97:1093-1107.
- Defilippi, P., G. Truffa, G. Stefanuto, F. Altruda, L. Silengo, and G. Tarone. 1991. Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma modulate the expression of the vitronectin receptor (integrin beta 3) in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 266:7638-7645.
- Dertinger, S.K., X. Jiang, Z. Li, V.N. Murthy, and G.M. Whitesides. 2002. Gradients of substrate-bound laminin orient axonal specification of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:12542-12547.

-
- Desgrosellier, J.S., and D.A. Cheresh. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 10:9-22.
- Doyle, A.D., F.W. Wang, K. Matsumoto, and K.M. Yamada. 2009. One-dimensional topography underlies three-dimensional fibrillar cell migration. *J Cell Biol*. 184:481-490.
- Dvorak, H.F. 1986. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 315:1650-1659.
- Eden, S., R. Rohatgi, A.V. Podtelejnikov, M. Mann, and M.W. Kirschner. 2002. Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature*. 418:790-793.
- Edsall, J.T. 1978. Some early history of cold-insoluble globulin. *Ann N Y Acad Sci*. 312:1-10.
- Eming, S.A., and J.A. Hubbell. 2011. Extracellular matrix in angiogenesis: dynamic structures with translational potential. *Exp Dermatol*. 20:605-613.
- Engebraaten, O., M. Trikha, S. Juell, S. Garman-Vik, and Ø. Fodstad. 2009. Inhibition of in vivo tumour growth by the blocking of host alpha(v)beta3 and alphaII(b)beta3 integrins. *Anticancer Res*. 29:131-137.
- 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.
- Erdreich-Epstein, A., H. Shimada, S. Groshen, M. Liu, L.S. Metelitsa, K.S. Kim, M.F. Stins, R.C. Seeger, and D.L. Durden. 2000. Integrins alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 are expressed by endothelium of high-risk neuroblastoma and their inhibition is associated with increased endogenous ceramide. *Cancer Res*. 60:712-721.
- Erickson, C.A. 1985. Control of neural crest cell dispersion in the trunk of the avian embryo. *Dev Biol*. 111:138-157.
- Etienne-Manneville, S. 2013. Microtubules in Cell Migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420:629-635.
- Faik, A., A.M. Labouré, D. Gulino, P. Mandaron, and D. Falconet. 1998. A plant surface protein sharing structural properties with animal integrins. *Eur J Biochem*. 253:552-559.
- Felding-Habermann, B., and D.A. Cheresh. 1993. Vitronectin and its receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 5:864-868.
- Fenter, P., A. Eberhardt, and P. Eisenberger. 1994. Self-Assembly of n-Alkyl Thiols as Disulfides on Au(111). *Science*. 266:1216-1218.
- Frank, S. 2011. Einfluss der Substratgeometrie auf die Haptotaxis und die Zellpolarisierung. In Fakultät für Chemie- und Biowissenschaften. Vol. Diploma. Karlsruhe Institute of Technology (KIT), Karlsruhe. 100.
- Frantz, C., K.M. Stewart, and V.M. Weaver. 2010. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci*. 123:4195-4200.
- Friedland, J.C., M.H. Lee, and D. Boettiger. 2009. Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science*. 323:642-644.

-
- Fukumoto, Y., K. Kaibuchi, Y. Hori, H. Fujioka, S. Araki, T. Ueda, A. Kikuchi, and Y. Takai. 1990. Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene*. 5:1321-1328.
- Fässler, R., and M. Meyer. 1995. Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice. *Genes Dev*. 9:1896-1908.
- 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.
- Gao, M., D. Craig, V. Vogel, and K. Schulten. 2002. Identifying unfolding intermediates of FN-III(10) by steered molecular dynamics. *J Mol Biol*. 323:939-950.
- García, A.J., J.E. Schwarzbauer, and D. Boettiger. 2002. Distinct activation states of alpha5beta1 integrin show differential binding to RGD and synergy domains of fibronectin. *Biochemistry*. 41:9063-9069.
- 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.
- George, E.L., E.N. Georges-Labouesse, R.S. Patel-King, H. Rayburn, and R.O. Hynes. 1993. Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development*. 119:1079-1091.
- Gimond, C., C. Baudoin, and A. Sonnenberg. 2000. Defects in adhesion and migration, but not in proliferation and differentiation, of embryonic stem cells upon replacement of integrin subunit beta1A by beta1D. *Differentiation*. 66:93-105.
- 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.
- Gottlieb, D.I., K. Rock, and L. Glaser. 1976. A gradient of adhesive specificity in developing avian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:410-414.
- Gu, W., and R.G. Roeder. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 90:595-606.
- Gumbiner, B.M., and K.M. Yamada. 1995. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol*. 7:615-618.
- Gunawan, R.C., J. Silvestre, H.R. Gaskins, P.J. Kenis, and D.E. Leckband. 2006. Cell migration and polarity on microfabricated gradients of extracellular matrix proteins. *Langmuir*. 22:4250-4258.
- Hannigan, G.E., C. Leung-Hagesteijn, L. Fitz-Gibbon, M.G. Coppolino, 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.

-
- Harrison, R. 1914. The reaction of embryonic cells to solid structures. *The journal of experimental zoology*. 17.
- Hauzenberger, D., J. Klominek, S.E. Bergström, and K.G. Sundqvist. 1995. T lymphocyte migration: the influence of interactions via adhesion molecules, the T cell receptor, and cytokines. *Crit Rev Immunol*. 15:285-316.
- Herbert, C.B., T.L. McLernon, C.L. Hypolite, D.N. Adams, L. Pikus, C.C. Huang, G.B. Fields, P.C. Letourneau, M.D. Distefano, and W.S. Hu. 1997. Micropatterning gradients and controlling surface densities of photoactivatable biomolecules on self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol) alkanethiolates. *Chem Biol*. 4:731-737.
- Hetrick, B., M.S. Han, L.A. Helgeson, and B.J. Nolen. 2013. Small molecules CK-666 and CK-869 inhibit actin-related protein 2/3 complex by blocking an activating conformational change. *Chem Biol*. 20:701-712.
- Hirschfeld-Warneken, V.C., M. Arnold, A. Cavalcanti-Adam, M. López-García, H. Kessler, and J.P. Spatz. 2008. Cell adhesion and polarisation on molecularly defined spacing gradient surfaces of cyclic RGDfK peptide patches. *Eur J Cell Biol*. 87:743-750.
- Hogg, N., and P.A. Bates. 2000. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biol*. 19:211-222.
- Horton, M.A. 1997. The alpha v beta 3 integrin "vitronectin receptor". *Int J Biochem Cell Biol*. 29:721-725.
- Hotchin, N.A., and A. Hall. 1995. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol*. 131:1857-1865.
- Huda, S., S. Soh, D. Pilans, M. Byrska-Bishop, J. Kim, G. Wilk, G.G. Borisy, K. Kandere-Grzybowska, and B.A. Grzybowski. 2012. Microtubule guidance tested through controlled cell geometry. *J Cell Sci*.
- Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries. 2006. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*. 119:3901-3903.
- Humphries, M.J. 1990. The molecular basis and specificity of integrin-ligand interactions. *J Cell Sci*. 97 (Pt 4):585-592.
- Huo, F., Z. Zheng, G. Zheng, L.R. Giam, H. Zhang, and C.A. Mirkin. 2008. Polymer pen lithography. *Science*. 321:1658-1660.
- 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. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*. 48:549-554.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110:673-687.
- Hynes, R.O., and H.H.M.I.a.C.f.C. Research. 1990. Fibronectin and the Cytoskeleton. Springer New York. 249-280.
- Hynes, R.O., and Q. Zhao. 2000. The evolution of cell adhesion. *J Cell Biol*. 150:F89-96.
- Izumi, M., K.M. Yamada, and M. Hayashi. 1989. Vitronectin exists in two structurally and functionally distinct forms in human plasma. *Biochim Biophys Acta*. 990:101-108.

-
- Jacquemet, G., and M.J. Humphries. 2013. IQGAP1 is a key node within the small GTPase network. *Small GTPases*. 4.
- 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.
- Jennings, H.S. 1908. THE INTERPRETATION OF THE BEHAVIOR OF THE LOWER ORGANISMS. *Science*. 27:698-710.
- Jiang, X., D.A. Bruzewicz, A.P. Wong, M. Piel, and G.M. Whitesides. 2005. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:975-978.
- Johnson, H.E., S.J. King, S.B. Asokan, J.D. Rotty, J.E. Bear, and J.M. Haugh. 2015. F-actin bundles direct the initiation and orientation of lamellipodia through adhesion-based signaling. *J Cell Biol*. 208:443-455.
- Järveläinen, H., A. Sainio, M. Koulu, T.N. Wight, and R. Penttinen. 2009. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev*. 61:198-223.
- Kang, C.E., E.J. Gemeinhart, and R.A. Gemeinhart. 2004. Cellular alignment by grafted adhesion peptide surface density gradients. *J Biomed Mater Res A*. 71:403-411.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol*. 146:1033-1044.
- Kiema, T., Y. Lad, P. Jiang, C.L. Oxley, M. Baldassarre, K.L. Wegener, I.D. Campbell, J. Yläne, and D.A. Calderwood. 2006. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. *Mol Cell*. 21:337-347.
- Kim, G.W., and X.J. Yang. 2011. Comprehensive lysine acetylomes emerging from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci*. 36:211-220.
- Kinsey, R., M.R. Williamson, S. Chaudhry, K.T. Mellody, 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.
- Knepper, C., E.A. Savory, and B. Day. 2011. Arabidopsis NDR1 is an integrin-like protein with a role in fluid loss and plasma membrane-cell wall adhesion. *Plant Physiol*. 156:286-300.
- Koka, S., C.L. Neudauer, X. Li, R.E. Lewis, J.B. McCarthy, and J.J. Westendorf. 2003. The formin-homology-domain-containing protein FHOD1 enhances cell migration. *J Cell Sci*. 116:1745-1755.
- Kraynov, V.S., C. Chamberlain, G.M. Bokoch, M.A. Schwartz, S. Slabaugh, and K.M. Hahn. 2000. Localized Rac Activation Dynamics Visualized in Living Cells.
- Kumar, C.C. 2003. Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis. *Curr Drug Targets*. 4:123-131.
- Kurkinen, M., A. Vaheri, P.J. Roberts, and S. Stenman. 1980. Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest*. 43:47-51.

-
- L'Hernault, S.W., and J.L. Rosenbaum. 1985. Chlamydomonas alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry*. 24:473-478.
- Lansbergen, G., and A. Akhmanova. 2006. Microtubule plus end: a hub of cellular activities. *Traffic*. 7:499-507.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 84:359-369.
- Leavesley, D.I., A.S. Kashyap, T. Croll, M. Sivaramakrishnan, A. Shokoohmand, B.G. Hollier, and Z. Upton. 2013. Vitronectin--master controller or micromanager? *IUBMB Life*. 65:807-818.
- Lebensohn, A.M., and M.W. Kirschner. 2009. Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell*. 36:512-524.
- Lehnert, D. 2003. Einfluss von Mikro- und Nanostrukturen auf Zellwachstum und -migration. Vol. Dissertation. Universität Konstanz.
- Lehnert, D., B. Wehrle-Haller, C. David, U. Weiland, C. Ballestrem, B.A. Imhof, and M. Bastmeyer. 2004. Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *J Cell Sci*. 117:41-52.
- Leng, J., R.L. Klemke, A.C. Reddy, and D.A. Cheresh. 1999. Potentiation of cell migration by adhesion-dependent cooperative signals from the GTPase Rac and Raf kinase. *J Biol Chem*. 274:37855-37861.
- Li, F., S.D. Redick, H.P. Erickson, and V.T. Moy. 2003. Force measurements of the alpha5beta1 integrin-fibronectin interaction. *Biophys J*. 84:1252-1262.
- Li, S., N.F. Huang, and S. Hsu. 2005. Mechanotransduction in endothelial cell migration. *J Cell Biochem*. 96:1110-1126.
- Li, Y., Y. Drabsch, P. Pujuguet, J. Ren, T. van Laar, L. Zhang, H. van Dam, P. Clément-Lacroix, and P. Ten Dijke. 2015. Genetic depletion and pharmacological targeting of α v integrin in breast cancer cells impairs metastasis in zebrafish and mouse xenograft models. *Breast Cancer Res*. 17:28.
- Lim, Y., S.T. Lim, A. Tomar, M. Gardel, J.A. Bernard-Trifilo, X.L. Chen, S.A. Uryu, R. Canete-Soler, J. Zhai, H. Lin, W.W. Schlaepfer, P. Nalbant, G. Bokoch, D. Ilic, C. Waterman-Storer, and D.D. Schlaepfer. 2008. PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *J Cell Biol*. 180:187-203.
- Linask, K.K., and J.W. Lash. 1986. Precardiac cell migration: fibronectin localization at mesoderm-endoderm interface during directional movement. *Dev Biol*. 114:87-101.
- Liu, S., D.A. Calderwood, and M.H. Ginsberg. 2000. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci*. 113 (Pt 20):3563-3571.
- Liu, Z., F. Wang, and X. Chen. 2008. Integrin alpha(v)beta(3)-Targeted Cancer Therapy. *Drug Dev Res*. 69:329-339.

-
- Lodish H., B.A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.
- Machacek, M., L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G.L. Johnson, K.M. Hahn, and G. Danuser. 2009. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*. 461:99-103.
- Margadant, C., M. Kreft, D.J. de Groot, J.C. Norman, and A. Sonnenberg. 2012. Distinct roles of talin and kindlin in regulating integrin $\alpha\beta 1$ function and trafficking. *Curr Biol*. 22:1554-1563.
- Martin, K., M. Vilela, N.L. Jeon, G. Danuser, and O. Pertz. 2014. A growth factor-induced, spatially organizing cytoskeletal module enables rapid and persistent fibroblast migration. *Dev Cell*. 30:701-716.
- Mas-Moruno, C., F. Rechenmacher, and H. Kessler. 2010. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate design, synthesis and clinical evaluation. *Anticancer Agents Med Chem*. 10:753-768.
- McCarthy, J.B., and L.T. Furcht. 1984. Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro. *J Cell Biol*. 98:1474-1480.
- McCarthy, J.B., S.L. Palm, and L.T. Furcht. 1983. Migration by haptotaxis of a Schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. *J Cell Biol*. 97:772-777.
- McKeown-Longo, P.J., and D.F. Mosher. 1983. Binding of plasma fibronectin to cell layers of human skin fibroblasts. *J Cell Biol*. 97:466-472.
- Memmo, L.M., and P. McKeown-Longo. 1998. The $\alpha 5 \beta 1$ integrin functions as an endocytic receptor for vitronectin. *J Cell Sci*. 111 (Pt 4):425-433.
- Miao, H., S. Li, Y.L. Hu, S. Yuan, Y. Zhao, B.P. Chen, W. Puzon-McLaughlin, T. Tarui, J.Y. Shyy, Y. Takada, S. Usami, and S. Chien. 2002. Differential regulation of Rho GTPases by $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins: the role of an extracellular domain of integrin in intracellular signaling. *J Cell Sci*. 115:2199-2206.
- Miller, N.L., C. Lawson, X.L. Chen, S.T. Lim, and D.D. Schlaepfer. 2012. Rgnef (p190RhoGEF) knockout inhibits RhoA activity, focal adhesion establishment, and cell motility downstream of integrins. *PLoS One*. 7:e37830.
- Millon-Frémillon, A., D. Bouvard, A. Grichine, S. Manet-Dupé, M.R. Block, and C. Albiges-Rizo. 2008. Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent $\beta 1$ -integrin affinity. *J Cell Biol*. 180:427-441.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*. 312:237-242.
- Moretti, F.A., A.K. Chauhan, A. Iaconcig, F. Porro, F.E. Baralle, and A.F. Muro. 2007. A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *J Biol Chem*. 282:28057-28062.
- Moser, M., M. Bauer, S. Schmid, R. Ruppert, S. Schmidt, M. Sixt, H.V. Wang, M. Sperandio, and R. Fässler. 2009a. Kindlin-3 is required for $\beta 2$ integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat Med*. 15:300-305.

-
- Moser, M., K.R. Legate, R. Zent, and R. Fässler. 2009b. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science*. 324:895-899.
- Moskal, J.R., D. Trisler, M.D. Schneider, and M. Nirenberg. 1986. Purification of a membrane protein distributed in a topographic gradient in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:4730-4733.
- Mrksich, M., C.S. Chen, Y. Xia, L.E. Dike, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. 1996. Controlling cell attachment on contoured surfaces with self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:10775-10778.
- 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.
- Mutsaers, S.E., J.E. Bishop, G. McGrouther, and G.J. Laurent. 1997. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 29:5-17.
- Nalbant, P., Y.C. Chang, J. Birkenfeld, Z.F. Chang, and G.M. Bokoch. 2009. Guanine nucleotide exchange factor-H1 regulates cell migration via localized activation of RhoA at the leading edge. *Mol Biol Cell*. 20:4070-4082.
- Nisato, R.E., J.C. Tille, A. Jonczyk, S.L. Goodman, and M.S. Pepper. 2003. α 3 and α 5 integrin antagonists inhibit angiogenesis in vitro. *Angiogenesis*. 6:105-119.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 81:53-62.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*. 144:1235-1244.
- O'Toole, T.E., J. Ylanne, and B.M. Culley. 1995. Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 270:8553-8558.
- 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.
- Oda, H., and M. Takeichi. 2011. Evolution: structural and functional diversity of cadherin at the adherens junction. *J Cell Biol*. 193:1137-1146.
- Ohta, Y., J.H. Hartwig, and T.P. Stossel. 2006. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol*. 8:803-814.
- Overbeck, A.F., T.R. Brtva, A.D. Cox, S.M. Graham, S.Y. Huff, R. Khosravi-Far, L.A. Quilliam, P.A. Solski, and C.J. Der. 1995. Guanine nucleotide exchange factors: activators of Ras superfamily proteins. *Mol Reprod Dev*. 42:468-476.
- Pankov, R., E. Cukierman, B.Z. Katz, K. Matsumoto, D.C. Lin, S. Lin, C. Hahn, and K.M. Yamada. 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of α (5) β (1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol*. 148:1075-1090.

-
- Pankov, R., and K.M. Yamada. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 115:3861-3863.
- Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:633-643.
- Pertz, O., L. Hodgson, R.L. Klemke, and K.M. Hahn. 2006a. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature.* 440:1069-1072.
- Pertz, O., L. Hodgson, R.L. Klemke, and K.M. Hahn. 2006b. Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature.* 440:1069-1072.
- Petersen, T.E., H.C. Thøgersen, K. Skorstengaard, K. Vibe-Pedersen, P. Sahl, L. Sottrup-Jensen, and S. Magnusson. 1983. Partial primary structure of bovine plasma fibronectin: three types of internal homology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:137-141.
- Petitclerc, E., S. Strömblad, T.L. von Schalscha, F. Mitjans, J. Piulats, A.M. Montgomery, D.A. Cheresh, and P.C. Brooks. 1999. Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* 59:2724-2730.
- Pierschbacher, M.D., and E. Ruoslahti. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* 309:30-33.
- Pijuan-Thompson, V., and C.L. Gladson. 1997. Ligation of integrin alpha5beta1 is required for internalization of vitronectin by integrin alphavbeta3. *J Biol Chem.* 272:2736-2743.
- 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.
- Plattner, H., and J. Hentschel. 2011. Zellbiologie, New York.
- Plow, E.F., T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, and J.W. Smith. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 275:21785-21788.
- Poole, A.R., F. Nelson, L. Dahlberg, E. Tchetina, M. Kobayashi, T. Yasuda, S. Lavery, G. Squires, T. Kojima, W. Wu, and R.C. Billingham. 2003. Proteolysis of the collagen fibril in osteoarthritis. *Biochem Soc Symp:*115-123.
- Pouwels, J., J. Nevo, T. Pellinen, J. Yläne, and J. Ivaska. 2012. Negative regulators of integrin activity. *J Cell Sci.* 125:3271-3280.
- Preissner, K.T. 1991. Structure and biological role of vitronectin. *Annu Rev Cell Biol.* 7:275-310.
- Preissner, K.T., and D. Seiffert. 1998. Role of vitronectin and its receptors in haemostasis and vascular remodeling. *Thromb Res.* 89:1-21.
- Price, L.S., J. Leng, M.A. Schwartz, and G.M. Bokoch. 1998. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol Biol Cell.* 9:1863-1871.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmond, A. Bretscher, and C. Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science.* 297:612-615.
- Radovanac, K., J. Morgner, J.N. Schulz, K. Blumbach, C. Patterson, T. Geiger, M. Mann, T. Krieg, B. Eckes, R. Fässler, and S.A. Wickström. 2013. Stabilization of integrin-linked kinase

-
- by the Hsp90-CHIP axis impacts cellular force generation, migration and the fibrotic response. *EMBO J.* 32:1409-1424.
- Raftopoulou, M., and A. Hall. 2004. Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol.* 265:23-32.
- Reardon, D.A., and D. Cheresh. 2011. Cilengitide: a prototypic integrin inhibitor for the treatment of glioblastoma and other malignancies. *Genes Cancer.* 2:1159-1165.
- Reese, A.C., J.E. Doran, B.D. Callaway, and A.R. Mansberger. 1982. Sequestration of fibronectin at the site of an injury. *Adv Shock Res.* 8:119-127.
- Repech, L.A., T.J. Fitzgerald, and L.T. Furcht. 1982. Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. *J Histochem Cytochem.* 30:351-358.
- Rhoads, D.S., and J.L. Guan. 2007. Analysis of directional cell migration on defined FN gradients: role of intracellular signaling molecules. *Exp Cell Res.* 313:3859-3867.
- Ricoult, S.G., T.E. Kennedy, and D. Juncker. 2015. Substrate-bound protein gradients to study haptotaxis. *Front Bioeng Biotechnol.* 3:40.
- Rid, R., N. Schiefermeier, I. Grigoriev, J.V. Small, and I. Kaverina. 2005. The last but not the least: the origin and significance of trailing adhesions in fibroblastic cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 61:161-171.
- Ridley, A.J., H.F. Paterson, C.L. Johnston, D. Diekmann, and A. Hall. 1992. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 70:401-410.
- 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.
- Roca-Cusachs, P., T. Iskratsch, and M.P. Sheetz. 2012. Finding the weakest link - exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. *J Cell Sci.*
- Roos, E. 1984. Cellular adhesion, invasion and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 738:263-284.
- Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 9:640-648.
- Ruffini, F., G. Graziani, L. Levati, L. Tentori, S. D'Atri, and P.M. Lacial. 2015. Cilengitide downmodulates invasiveness and vasculogenic mimicry of neuropilin 1 expressing melanoma cells through the inhibition of $\alpha v \beta 5$ integrin. *Int J Cancer.* 136:E545-558.
- Salmon, W.C., M.C. Adams, and C.M. Waterman-Storer. 2002. Dual-wavelength fluorescent speckle microscopy reveals coupling of microtubule and actin movements in migrating cells. *J Cell Biol.* 158:31-37.
- Sanz-Moreno, V., G. Gadea, J. Ahn, H. Paterson, P. Marra, S. Pinner, E. Sahai, and C.J. Marshall. 2008. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell.* 135:510-523.
- Schiller, H.B., and R. Fässler. 2013. Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions. *EMBO Rep.*

-
- Schönichen, A., and M. Geyer. 2010. Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim Biophys Acta*. 1803:152-163.
- Seiffert, D. 1997. Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histol Histopathol*. 12:787-797.
- 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.
- Singh, P., C. Carraher, and J.E. Schwarzbauer. 2010. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 26:397-419.
- Small, J.V., B. Geiger, I. Kaverina, and A. Bershadsky. 2002. How do microtubules guide migrating cells? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:957-964.
- Smith, J.T., J.T. Elkin, and W.M. Reichert. 2006. Directed cell migration on fibronectin gradients: effect of gradient slope. *Exp Cell Res*. 312:2424-2432.
- Smith, J.T., D.H. Kim, and W.M. Reichert. 2009. Haptotactic gradients for directed cell migration: stimulation and inhibition using soluble factors. *Comb Chem High Throughput Screen*. 12:598-603.
- Sorribas, H., C. Padeste, and L. Tiefenauer. 2002. Photolithographic generation of protein micropatterns for neuron culture applications. *Biomaterials*. 23:893-900.
- Squires, T.M., R.J. Messinger, and S.R. Manalis. 2008. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nat Biotechnol*. 26:417-426.
- Stephens, L.E., A.E. Sutherland, I.V. Klimanskaya, A. Andrieux, J. Meneses, R.A. Pedersen, and C.H. Damsky. 1995. Deletion of beta 1 integrins in mice results in inner cell mass failure and peri-implantation lethality. *Genes Dev*. 9:1883-1895.
- 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.
- Sun, Y., H. Qian, X.D. Xu, Y. Han, L.F. Yen, and D.Y. Sun. 2000. Integrin-like proteins in the pollen tube: detection, localization and function. *Plant Cell Physiol*. 41:1136-1142.
- Sung, B.H., and A.M. Weaver. 2011. Regulation of lysosomal secretion by cortactin drives fibronectin deposition and cell motility. *Bioarchitecture*. 1:257-260.
- Suozzi, K.C., X. Wu, and E. Fuchs. 2012. Spectraplakins: master orchestrators of cytoskeletal dynamics. *J Cell Biol*. 197:465-475.
- Suraneni, P., B. Fogelson, B. Rubinstein, P. Noguera, N. Volkmann, D. Hanein, A. Mogilner, and R. Li. 2015. A mechanism of leading-edge protrusion in the absence of Arp2/3 complex. *Mol Biol Cell*. 26:901-912.
- Tan, C., S. Cruet-Hennequart, A. Troussard, L. Fazli, P. Costello, K. Sutton, J. Wheeler, M. Gleave, J. Sanghera, and S. Dedhar. 2004. Regulation of tumor angiogenesis by integrin-linked kinase (ILK). *Cancer Cell*. 5:79-90.
- Taylor, D.L., and J.S. Condeelis. 1979. Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells. *Int Rev Cytol*. 56:57-144.
- Thievensen, 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.
- Théry, M., V. Racine, M. Piel, A. Pépin, A. Dimitrov, Y. Chen, J.B. Sibarita, and M. Bornens. 2006. 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.
- Tronchin, G., J.P. Bouchara, V. Annaix, R. Robert, and J.M. Senet. 1991. Fungal cell adhesion molecules in *Candida albicans*. *Eur J Epidemiol.* 7:23-33.
- Trumpp, A., P.A. Blundell, J.L. de la Pompa, and R. Zeller. 1992. The chicken limb deformity gene encodes nuclear proteins expressed in specific cell types during morphogenesis. *Genes Dev.* 6:14-28.
- Truong, H., and E.H. Danen. 2009. Integrin switching modulates adhesion dynamics and cell migration. *Cell Adh Migr.* 3:179-181.
- Tu, Y., F. Li, S. Goicoechea, and C. Wu. 1999. The LIM-only protein PINCH directly interacts with integrin-linked kinase and is recruited to integrin-rich sites in spreading cells. *Mol Cell Biol.* 19:2425-2434.
- Uy, R., and F. Wold. 1977. Posttranslational covalent modification of proteins. *Science.* 198:890-896.
- van der Flier, A., and A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285-298.
- van der Horst, G., L. Bos, M. van der Mark, H. Cheung, B. Heckmann, P. Clément-Lacroix, G. Lorenzon, R.C. Pelger, R.F. Bevers, and G. van der Pluijm. 2014. Targeting of alpha-v integrins reduces malignancy of bladder carcinoma. *PLoS One.* 9:e108464.
- Vasiliev, J.M., I.M. Gelfand, L.V. Domnina, O.Y. Ivanova, S.G. Komm, and L.V. Olshevskaja. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J Embryol Exp Morphol.* 24:625-640.
- Vaz, R., G.G. Martins, S. Thorsteinsdóttir, and G. Rodrigues. 2012. Fibronectin promotes migration, alignment and fusion in an in vitro myoblast cell model. *Cell Tissue Res.* 348:569-578.
- Vinogradova, T., P.M. Miller, and I. Kaverina. 2009. Microtubule network asymmetry in motile cells: role of Golgi-derived array. *Cell Cycle.* 8:2168-2174.
- Vogel, V. 2006. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 35:459-488.
- Wacker, A., H. Gerhardt, and L.K. Phng. 2014. Tissue guidance without filopodia. *Commun Integr Biol.* 7:e28820.
- Waterman-Storer, C.M., and E.D. Salmon. 1997. Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule

-
- dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J Cell Biol.* 139:417-434.
- Waterman-Storer, C.M., R.A. WorthyLake, B.P. Liu, K. Burridge, and E.D. Salmon. 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 1:45-50.
- Welch, M.D., A.H. DePace, S. Verma, A. Iwamatsu, and T.J. Mitchison. 1997. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol.* 138:375-384.
- Wellen, K.E., G. Hatzivassiliou, U.M. Sachdeva, T.V. Bui, J.R. Cross, and C.B. Thompson. 2009. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science.* 324:1076-1080.
- Wellen, K.E., and C.B. Thompson. 2012. A two-way street: reciprocal regulation of metabolism and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:270-276.
- Wennerberg, K., L. Lohikangas, D. Gullberg, M. Pfaff, S. Johansson, and R. Fässler. 1996. Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. *J Cell Biol.* 132:227-238.
- 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.
- Winklbauer, R., and M. Nagel. 1991. Directional mesoderm cell migration in the *Xenopus* gastrula. *Dev Biol.* 148:573-589.
- Wolfenson, H., I. Lavelin, and B. Geiger. 2013. Dynamic regulation of the structure and functions of integrin adhesions. *Dev Cell.* 24:447-458.
- Worth, D.C., K. Hodivala-Dilke, S.D. Robinson, S.J. King, P.E. Morton, F.B. Gertler, M.J. Humphries, and M. Parsons. 2010. Alpha v beta3 integrin spatially regulates VASP and RIAM to control adhesion dynamics and migration. *J Cell Biol.* 189:369-383.
- Wu, C., S.B. Asokan, M.E. Berginski, E.M. Haynes, N.E. Sharpless, J.D. Griffith, S.M. Gomez, and J.E. Bear. 2012. Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell.* 148:973-987.
- Wu, C., J.S. Bauer, R.L. Juliano, and J.A. McDonald. 1993. The alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor, but not the alpha 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem.* 268:21883-21888.
- Wu, X., A. Kodama, and E. Fuchs. 2008. ACF7 regulates cytoskeletal-focal adhesion dynamics and migration and has ATPase activity. *Cell.* 135:137-148.
- Wu, X., S. Li, A. Chrostek-Grashoff, A. Czuchra, H. Meyer, P.D. Yurchenco, and C. Brakebusch. 2007. Cdc42 is crucial for the establishment of epithelial polarity during early mammalian development. *Dev Dyn.* 236:2767-2778.

-
- Yang, J.T., B.L. Bader, J.A. Kreidberg, M. Ullman-Culleré, J.E. Trevisan, and R.O. Hynes. 1999. Overlapping and independent functions of fibronectin receptor integrins in early mesodermal development. *Dev Biol.* 215:264-277.
- Yayoshi-Yamamoto, S., I. Taniuchi, and T. Watanabe. 2000. FRL, a novel formin-related protein, binds to Rac and regulates cell motility and survival of macrophages. *Mol Cell Biol.* 20:6872-6881.
- Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114:3583-3590.
- Zamir, E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K.M. Yamada, B.Z. Katz, S. Lin, D.C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, and B. Geiger. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2:191-196.
- Zheng, K., G. Wang, C. Li, X. Shan, and H. Liu. 2015. Knockdown of ILK inhibits glioma development via upregulation of E-cadherin and downregulation of cyclin D1. *Oncol Rep.*
- 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.
- Zhong, C., M. Chrzanowska-Wodnicka, J. Brown, A. Shaub, A.M. Belkin, and K. Burridge. 1998. Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J Cell Biol.* 141:539-551.
- Zhu, W., W. Li, G. Yang, C. Fu, G. Jiang, and Q. Hu. 2015. Vitronectin silencing inhibits hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Future Oncol.* 11:251-258.
- Zigmond, S.H. 2004. Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 16:99-105.



PUBLIKATIONEN

VERÖFFENTLICHUNGEN

A.C. Scheiwe*, **S.C. Frank***, T. J. Autenrieth, M. Bastmeyer, and M. Wegener.
Subcellular stretch-induced cytoskeletal response of single fibroblasts within 3D designer scaffolds.

2015. *Biomaterials*. 44:186-194

(*beide Autoren trugen gleichermaßen zu der Studie bei)

T.J. Autenrieth, **S.C. Frank**, A.M. Greiner, D. Klumpp, B. Richter, M. Hauser, S. Lee, J. Levine, and M. Bastmeyer

Actomyosin Contractility and Rho-GTPases affect Cell-Polarity and directional Migration during Haptotaxis.

2015 (in Vorbereitung)

D. Klumpp, **S.C. Frank**, M. Bastmeyer, D. Zips, and S. Huber.

TRPM8 regulated migration and survival of glioblastoma cells in vivo.

2015 (in Vorbereitung)

KONGRESSBEITRÄGE

S.C. Frank, T.J. Autenrieth, M. Bastmeyer

Directional Cell Migration during Haptotaxis is Controlled by Actomyosin Contractility and Dynamic Microtubules

Okt. 2013, *Cell Mechanics* (Oberurgl, Österreich)

S.C. Frank, T. J. Autenrieth, M. Bastmeyer

Directional Cell Migration during Haptotaxis is Controlled by Actomyosin Contractility and Dynamic Microtubules

Mai 2014, *Microtubules: Structure, regulation and function EMBL conference* (Heidelberg, Deutschland)

D. Klumpp, **S.C. Frank**, D. Zips, S. Huber
TRPM8 regulated migration and survival of glioblastoma cells in vivo.
Sept. 2014, *GBS Jahrestagung* (Tübingen, Deutschland)

D. Klumpp, **S.C. Frank**, D. Zips, S. Huber
TRPM8 regulated migration and survival of glioblastoma cells in vivo.
Feb. 2015, *24. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie* (Hamburg, Deutschland)

D. Klumpp, **S.C. Frank**, D. Zips, S. Huber
TRPM8 regulated migration and survival of glioblastoma cells in vivo.
Juni 2015, *14th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology* (Wolfsberg, Deutschland)

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen bedanken, die fachlich und persönlich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ein besonderes Dankeschön geht an

... meinen Doktorvater und Referenten Herrn Prof. Dr. Martin Bastmeyer, der mir die Möglichkeit gab, meine Arbeit am Institut für Zoologie durchzuführen und mich bei ihrer Ausarbeitung unterstützt hat. Dankeschön für das Vertrauen, dass Sie all die Jahre in mich gesetzt haben.

... Herrn Dr. Dietmar Gradl, für die freundliche Übernahme des Korreferats.

... Prof. Dr. Bernhard Wehrle-Haller, der mir jederzeit mit guten Ratschlägen und Informationen zur Seite stand und mich mit Materialien unterstützt hat.

... Michael Bachmann, der in vielen Diskussionen interessante Ideen parat hatte und mir stets ein Ansprechpartner war.

... Dr. Tatjana Autenrieth für die Übergabe des interessanten Themas und die damit verbundene Unterstützung.

... Dr. Franco Weth für seine Hilfsbereitschaft und seine konstruktiven Anregungen.

... meine Kooperationspartner Dr. Benjamin Richter und Torsten Beck für die Herstellung der Masterstrukturen.

... die technischen Mitarbeiter, insbesondere Tanja Landmann und Rainer Müller, für die Versorgung mit Arbeitsmaterialien und die Unterstützung in der Zellkultur. Des Weiteren möchte ich dem Sekretariat für die Unterstützung in administrativen Aufgaben danken.

... die ganze Arbeitsgruppe des zoologischen Instituts für die tolle Arbeitsatmosphäre und die schöne Zeit, die wir auch bei gemeinsamen Unternehmungen außerhalb des Labors miteinander hatten. So ein nettes Kollegium sollte man immer zu schätzen wissen.

... Katharina Adelhelm und Lukas Klumpp für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meinen Freunden für ihren Rückhalt und die vielen schönen Stunden, die eine tolle Abwechslung zum Laboralltag darstellten.

Ein besonderer Dank geht an meinen Freund Dominik, der mich immer liebevoll unterstützt und in meiner Arbeit bestärkt hat.

Meine letzten Worte möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Elke und Klaus widmen. Sie haben in jeder Hinsicht die Grundsteine für diese Arbeit gelegt und immer an mich geglaubt. Vielen Dank dafür.