

**Adaption der Zellmorphologie durch
Aktomyosin-Kontraktilität auf mikrostrukturierten
Zellkultursubstraten**

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

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
genehmigte

DISSERTATION

von
Kai Weißenbruch
aus
Neuburg am Rhein

Dekan: Prof. Dr. Manfred Wilhelm

Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Korreferent: Prof. Dr. Ulrich Schwarz

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2019

Erklärung

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2016 bis September 2019 am Zoologischen Institut, Abteilung für Zell- und Neurobiologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) durchgeführt.

Ich versichere hiermit, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hinweise benutzt habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet und die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis habe ich in der gültigen Fassung beachtet. Diese Arbeit wurde in keiner Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere außerdem, dass die beigelegte elektronische Version der Arbeit mit der schriftlichen übereinstimmt.

Karlsruhe, den 04.11.2019

Name

Zusammenfassung

Die Zellmorphologie wird durch die räumliche Anordnung des Zytoskeletts und der Aktomyosin-Kontraktilität reguliert. In nicht-muskulären Zellen wird die Kontraktilität von drei verschiedenen Isoformen nicht-muskulärer Myosin II Motorproteine (NM IIA, NM IIB und NM IIC) vermittelt. Die NM II-Isoformen assemblieren dabei zu homotypischen oder heterotypischen Minifilamenten. Anhand des Spannungs-Elastizitätsmodells (TEM) wurde deutlich, dass die Zellmorphologie nicht ausschließlich durch kontraktile Zugspannungen erklärt werden kann, sondern dass auch elastische Komponenten in den Aktinstrukturen erforderlich sind. Bisher ist ungeklärt, wie die verschiedenen NM II-Isoformen den Aufbau der Kontraktilität und die Steuerung der Zellmorphologie vermitteln.

Im ersten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe von mikrostrukturierten 3D-Substraten gezeigt, dass die Zellmorphologie auch in 3D durch Spannung und Elastizität in den Aktinfasern gesteuert wird und anhand eines erweiterten TEM beschrieben werden kann. Im Hauptteil der Arbeit wurden mittels CRISPR/Cas9 KO-Zelllinien hergestellt, um die Funktionen der einzelnen NM II-Isoformen zu untersuchen. Der Verlust von NM IIA geht mit drastischen Defekten bei der Morphogenese sowie der Bildung von Aktin-Stressfasern einher und hat Auswirkungen auf Zelladhäsion und Zellmigration. Der Knockout von NM IIB und NM IIC zeigt hingegen keine offensichtlichen Effekte auf den Phänotyp. Für eine quantitative Evaluierung der Phänotypen wurden die Zellen auf strukturierten 2D-Substraten analysiert. Für NM IIA und NM IIB zeigten sich klare Effekte, die anhand des TEM erklärt werden können: NM IIA steuert durch den Aufbau von Spannung die Struktur der Aktin-Stressfasern und die Morphogenese der Zellen. NM IIB fungiert als elastisches Element, wodurch die NM IIA-generierten Spannungen ausbalanciert und die Kontraktilität in den Aktin-Stressfasern aufrechterhalten wird. Dadurch zeigte sich, dass NM IIA und NM IIB komplementäre Funktionen beim Aufbau der Aktomyosin-Kontraktilität in nicht-muskulären Zellen ausüben. Für NM IIC konnten keine Funktionen in diesen Assays gezeigt werden. Die komplementären Funktionen von NM IIA und NM IIB wurden in Kollisionsstudien weiter analysiert. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sich die Aktomyosin-Kontraktilität nicht wie bisher angenommen, durch stochastische Co-Polymerisation von NM IIA und NM IIB zu einzelnen Minifilamenten gleichermaßen aufbaut, sondern durch präferenzielle Aktivierung von NM IIA-Hexameren initiiert wird. NM IIB co-assembliert hingegen in aktivierte NM IIA-Pionierfilamente, wodurch NM IIA und NM IIB permanent zu heterotypischen Filamenten assemblieren und als eine Einheit fungieren.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass NM IIA als Initiator von Minifilamenten und somit der Aktomyosin-Kontraktilität fungiert, wodurch die Bildung von Aktin-Stressfasern und die Morphogenese der Zellen definiert werden. NM IIB nimmt hingegen eine stabilisierende und regulierende Funktion ein, indem es zusätzlich in die Minifilamente eingebaut wird. NM IIB balanciert somit die NM IIA-induzierte Kontraktilität aus und koordiniert dadurch die Dynamik der Aktin-Stressfasern. Die komplementären Funktionen von NM IIA und NM IIB werden dabei durch die direkte Interaktion der Isoformen in heterotypischen Filamenten vermittelt. Auf diese Weise sind Zellen in der Lage, ihre Morphologie zügig und effizient an wechselnde extrazelluläre Gegebenheiten anzupassen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Aktinzytoskelett	1
1.1.1	Der Aktincortex.....	2
1.1.2	Aktin-Stressfasern	3
1.1.3	Stressfaser-Subtypen.....	5
1.2	Myosine	7
1.2.1	Myosine der Klasse II (konventionelle Myosine).....	8
1.2.2	Nicht-muskuläre Myosine der Klasse II (NM II)	10
1.2.3	NM II-Isoformen	10
1.2.4	Regulation der Aktivität, Assemblierung und Disassemblierung	13
1.2.5	NM II-Isoform spezifische Einflüsse auf zelluläre Prozesse	15
1.3	Einfluss der extrazellulären Topographie und Geometrie	17
1.4	Analyse der Aktomyosin-Kontraktilität auf definierten Substraten	18
1.5	Physikalische Beschreibung der Aktomyosin-Kontraktilität	20
2	Motivation und Zielsetzung.....	22
3	Material und Methoden	23
3.1	Chemikalien, Puffer, Antibiotika und Kulturmedien	23
3.2	Nukleinsäuren, DNA-modifizierende Enzyme und Reaktions-Kits	26
3.3	Antikörper und Affinitätsfarbstoffe.....	28
3.4	Geräte und Mikroskope.....	29
3.5	Klonierung, Vermehrung und Aufreinigung von Plasmiden	30
3.6	Verwendete Plasmide und Lipofektion	32
3.7	Verwendete Zelllinien und Zellkultur	33
3.8	Erzeugung von stabilen KO-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9.....	34
3.9	Herstellung mikrostrukturierter Zellkultursubstrate.....	38
3.9.1	Strukturierte 2D-Substrate	38
3.9.2	3D-Mikrostrukturen.....	42
3.10	Probenpräparation und immunhistochemische Färbung	43
3.11	Zeitrafferaufnahmen und FRAP-Messungen	44
3.12	Datenverarbeitung, quantitative Analysen und Modellierungen	45

4	Ergebnisse.....	48
4.1	Spannung und Elastizität tragen zum Zellphänotyp in 3D bei.....	48
4.2	Unterschiedliche Inhibitionen der Aktomyosin-Kontraktilität führen zu unterschiedlichen TEM-Phänotypen.....	53
4.3	Subzelluläre Lokalisation von NM II-Isoformen in U2OS Zellen.....	56
4.4	Einfluss der NM II-Isoformen auf das Aktinzytoskelett, die Zelladhäsion und die Zellmigration.....	58
4.5	Analyse von NM II-defizitären Zellphänotypen auf strukturierten 2D-Substraten.....	67
4.6	Initiierung der Aktomyosin-Kontraktilität durch NM IIA.....	79
5	Diskussion.....	86
5.1	Vergleich von Zellphänotypen und Aktinstrukturen in 2D und 3D.....	86
5.1.1	Spannung und Elastizität tragen zum Zellphänotyp in 3D bei.....	87
5.1.2	Unterschiede in der Aktinstruktur zwischen 2D und 3D.....	88
5.2	Einfluss der NM II-Isoformen auf die Aktinstruktur, Zelladhäsion und Zellmigration.....	90
5.3	Komplementäre Effekte von NM IIA & NM IIB regulieren die SF-Struktur.....	93
5.3.1	NM IIA beeinflusst die Spannung, NM IIB die Elastizität von SF.....	94
5.3.2	Die Überassemblierung von NM IIA führt zum Verlust der positiven Korrelation von R und d in Anwesenheit von NM IIB.....	96
5.3.3	Regulierung der SF-Struktur durch kooperative Effekte.....	98
5.4	NM IIA initiiert das Aktomyosin-System.....	99
5.4.1	Bildung von NM IIA-Pionierfilamenten durch verstärkte Aktivierung.....	99
5.4.2	Bildung von heterotypischen NM IIA/NM IIB Filamenten.....	101
5.5	Spezielle Funktionen von NM IIC?.....	102
5.6	Fazit und Modell.....	104
6	Weiterer Ausblick.....	109
7	Anhang.....	112
8	Literaturverzeichnis.....	117
9	Abbildungsverzeichnis.....	130
10	Tabellenverzeichnis.....	132
11	Abkürzungen.....	133
12	Publikationen und Manuskripte.....	134

1 Einleitung

Die Fähigkeit von eukaryotischen Zellen intrazelluläre Kräfte aufzubauen, ist ein fundamentaler Prozess in der Biologie. Das vermutlich prominenteste Beispiel hierfür ist die Kontraktion von Muskelgeweben. Zunehmend wird jedoch auch die zentrale Rolle intrazellulärer Kräfte in nicht-muskulären Zellen erkannt. Intrazelluläre Kräfte sind essentiell für die Homöostase von Einzelzellen und Geweben. Die vielfältigen Einflüsse der Kräfte manifestieren sich bereits in der frühen Embryonalentwicklung und werden über den kompletten Lebenszyklus eines Organismus aufrechterhalten (Ladoux und Mege, 2017; Vogel und Sheetz, 2006; Zenker et al., 2018). Intrazelluläre Kräfte sind unverzichtbar bei statischen Prozessen, wie der Zellverankerung an der extrazellulären Umgebung (Geiger et al., 2009; Papusheva und Heisenberg, 2010). Gleichzeitig bilden sie den Antrieb für bewegungsgesteuerte Prozesse, beispielsweise während der Zellmigration (Vicente-Manzanares et al., 2009b). Durch die Vielzahl an Prozessen, welche spezifisch und teilweise simultan angesteuert werden, muss die krafterzeugende Maschinerie ein hohes Maß an Stabilität bei gleichzeitiger Flexibilität und Dynamik aufweisen. Die mechanische Grundlage hierfür bildet in eukaryotischen Zellen ein komplexes Zytoskelett.

In Säugetierzellen besteht das Zytoskelett aus drei Faserstrukturen: Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Zusätzlich sind zahlreiche Bindeproteine mit den Fasern assoziiert. Das aus biomechanischer Sicht wichtigste Zytoskelett-Element ist Aktin. Zusammen mit den Aktin-assoziierten Myosin-Motorproteinen fungiert es gleichermaßen als intrazelluläre Stützstruktur und krafterzeugende Funktionseinheit. Die strukturelle Remodellierung des Aktinzytoskelett durch Myosine ist die Grundlage für die morphologische Adaption der Zellen bei der Zellteilung, Zelladhäsion und Zellmigration (Aguilar-Cuenca et al., 2014; Maitre et al., 2016; Murrell et al., 2015). Auf der Einzelzellebene ist bereits die Zerstörung einer einzelnen Aktinfaser ausreichend, um eine Reorganisation der Zellform, des Zytoskeletts oder der Zelladhäsion herbeizuführen (Kumar et al., 2006; Lele et al., 2006).

1.1 Das Aktinzytoskelett

Aktin ist eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in eukaryotischen Zellen (Dominguez und Holmes, 2011). Mit einem Durchmesser von ca. 7 nm repräsentieren Aktinfilamente die dünnsten filamentösen Strukturen des Zytoskelett. Trotzdem ist die Fläche aller Aktinfilamente einer Zelle um ein mehrfaches größer als die Fläche der Zellmembran (Janmey, 1998). Das verdeutlicht die Komplexität des Aktin-Netzwerks, welches in jeder Zelle aufrechterhalten und reguliert wird. Die Grundeinheit bilden globuläre Aktin-Monomere (G-Aktin), welche nicht-kovalent zu Aktinfilamenten (F-Aktin) polymerisieren. Durch den Polymerisationsvorgang entsteht ein doppelkettiges, helikales Aktinfilament mit einer strukturellen Polarität. Die Filamente zeichnen sich dabei durch ein schnellpolymerisierendes Plus-Ende und ein langsam depolymerisierendes Minus-Ende aus. Dieser asymmetrische Auf- und Abbau der Aktinfilamente wird als *Treadmilling* bezeichnet und beruht auf

dem bevorzugten Einbau von ATP-Aktinmonomeren am Plus-Ende des Filaments. Die mechanischen Eigenschaften der Aktinfilamente entsprechen einem flexiblen Kabel, das sowohl Dehnung als auch Kompression toleriert (Wen und Janmey, 2011). Durch diese Eigenschaften verleiht das Aktinzytoskelett mechanische Stabilität, bleibt aber gleichzeitig flexibel und dynamisch genug, um sich schnell an wechselnde Bedingungen anzupassen und extrazelluläre mechanische Impulse abzufedern (Ma und Berro, 2018; Murrell et al., 2015). Intrazelluläre Kräfte können durch das Aktinzytoskelett über zwei grundlegende Mechanismen aufgebaut werden. Durch koordinierte Polymerisation gegen die zelluläre Membran wird eine Druckkraft ausgeübt, die beispielsweise zur Ausbildung von Zellausläufern an der Migrationsfront führt. Der zweite Mechanismus ist der Aufbau von Zugkräften durch die Interaktion von Aktinfilamenten und Myosin-Motorproteinen, was unter dem Begriff Aktomyosin-Kontraktilität zusammengefasst wird (Svitkina, 2018). Grundvoraussetzung für beide Mechanismen ist die Anordnung der Aktinfilamente in höher geordneten Aktin-Strukturen.

Die Verknüpfung einzelner Aktinfilamente zu höher geordneten Strukturen wird durch eine Vielzahl von Aktin-bindenden Proteinen reguliert (dos Remedios et al., 2003). Grob kann dabei zwischen drei Grundtypen unterschieden werden: Verzweigte Netzwerke, parallel-gebündelte Fasern und anti-parallel gebündelte Fasern (Blanchoin et al., 2014). Dichte und Verzweigungsgrad der Strukturen hängen dabei von den entsprechenden Aktin-bindenden Proteinen ab. Eine Quervernetzung durch Fimbrin führt zur Ausbildung eines dichten, kompakten Netzwerks, wie es in Lamellipodien migrierender Zellen vorkommt. Filamin-induzierte Quervernetzungen führen hingegen zu einem weniger dichten Aktin-Netzwerk, wie beispielsweise dem Aktincortex. Parallel gebündelte Fasern zeichnen sich durch eine unipolare, dicht gebündelte Anordnung der Filamente aus, wie beispielsweise bei Fimbrin- oder Fascin-vermittelten Filopodien oder Mikrospikes (Blanchoin et al., 2014). Eine anti-parallel Anordnung von Aktinfilamenten ist vorwiegend in Stressfasern zu finden und wird hauptsächlich durch α -Aktinin vermittelt (Cramer et al., 1997). Für die Aktomyosin-Kontraktilität in nicht-muskulären Zellen sind zwei Aktin-Strukturen aufgrund ihrer Assoziation mit nicht-muskulären Myosin Motorproteinen der Klasse II (NM II) von besonderem Interesse: Der Aktincortex und die Aktin-Stressfasern.

1.1.1 Der Aktincortex

Der Aktincortex ist eine dünne, quervernetzte Aktin-Struktur, die über ERM-Proteine sowie Myosin I Motorproteine direkt mit der Membran verbunden ist (Biro et al., 2013; Bretscher et al., 2002). Des Weiteren assemblieren NM II Motorproteine im Aktincortex, wodurch er kontraktile Eigenschaften aufweist (Henson et al., 2017). Die als Cortexspannung bezeichnete Kontraktilität im Aktincortex spielt eine wichtige Rolle bei der Morphogenese von Einzelzellen und Geweben. Die grundsätzliche Funktion des Aktincortex ist dabei die Minimierung der Zelloberfläche, wodurch Zellen einen energetisch günstigen Zustand einnehmen (Elliott et al., 2015; Murrell et al., 2015). Die Abrundung von Zellen während der Mitose ist auf eine erhöhte Cortexspannung zurückzuführen (Ramanathan et al., 2015; Stewart et al., 2011). Thrombozyten generieren ebenfalls eine uniforme, isotrope Cortexspannung, um ihre Zelloberfläche zu minimieren und eine Verdichtung von Blutgerinnseln herbeizuführen

(Murrell et al., 2015). Lokale Änderungen der Cortexspannung können hingegen zu asymmetrischen Kontraktionen und zellulären Deformierungen führen (Chugh und Paluch, 2018). Bei der Zellmigration trägt eine erhöhte Cortexspannung am Hinterende der Zelle zur Retraktion des Zellkörpers bei (Chabaud et al., 2015). Die Bildung von Membranausstülpungen (*Blebs*), welche während der Zellmigration in dreidimensionalen Umgebungen eine Rolle spielen, ist ebenso auf asymmetrische Cortexspannungen zurückzuführen (Diz-Munoz et al., 2016; Paluch und Raz, 2013; Tinevez et al., 2009). Verschiedene Studien zeigen außerdem, dass durch asymmetrische Cortexspannungen der Aufbau der Zellpolarität beeinflusst wird. So fördert die Ausbildung einer apikalen Cortexspannung beispielsweise die Morphogenese von Epithelzellen (Chugh et al., 2017; Chugh und Paluch, 2018). Während der Einfluss des Aktincortex auf die intrazellulären Prozesse bekannt ist, sind wenige Daten über den strukturellen Aufbau des Aktincortex verfügbar. Dieser Umstand ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Aktincortex eine äußerst heterogene Struktur darstellt, die nur schwer von anderen Aktin-Strukturen abgegrenzt werden kann. Zusätzlich liegt die Substrukturierung des Cortex unterhalb der Auflösungsgrenze konventioneller Lichtmikroskopie, was eine spezifische Analyse des strukturellen Aufbaus anspruchsvoll macht.

Massenspektrometrische Studien haben über 150 Aktin-bindende Proteine im Aktincortex von humanen M2 Zellen nachgewiesen, die je nach Situation Schichtdicke und Vernetzungsgrad des Netzwerks anpassen (Biro et al., 2013). Die Schichtdicke des Cortex ist je nach Publikation mit 100-200 nm angegeben (Clark et al., 2013; Clausen et al., 2017). STED Messungen postulieren zudem eine Lücke von 20 nm zwischen Membran und Cortex (Clausen et al., 2017). Die Dichte des Netzwerks wird zwischen 50-200 nm eingeordnet, wobei der Grad der Quervernetzung von zahlreichen Aktin-bindenden Proteinen beeinflusst wird. Die prominentesten Vertreter sind α -Aktinin, Fascin, Filamin und Fimbrin (Chugh und Paluch, 2018). Die Schichtdicke sowie das Ausmaß der Quervernetzung sind Schlüsselregulatoren der Cortexspannung. In einer Publikation von Chugh und Kollegen wurde gezeigt, dass die maximale Cortexspannung bei einer mittleren Schichtdicke erreicht wird. Wird die Länge der einzelnen Aktinfilamente durch Überexpression oder Reduktion von Nukleationskeimern verändert, sinkt in beiden Fällen die Cortexspannung (Chugh et al., 2017). Chaigne und Kollegen zeigen außerdem, dass die Erhöhung der Schichtdicke durch den Arp2/3-Komplex mit der Exklusion von Myosin-Motorproteinen aus dem Aktincortex und einer Abnahme der Cortexspannung einhergeht (Chaigne et al., 2013). Biophysikalische Modelle untermauern, dass die strukturellen Eigenschaften des Netzwerks maßgeblichen Einfluss auf die kontraktile Eigenschaften ausüben (Belmonte et al., 2017). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Cortexspannung nicht alleine durch die Aktivität der NM II-Motorproteine gesteuert wird.

1.1.2 Aktin-Stressfasern

Aktin-Stressfasern (SF) bestehen aus 10-30 anti-parallel angeordneten Aktinfilamenten, welche durch α -Aktinin gebündelt werden (Cramer et al., 1997; Pellegrin und Mellor, 2007). Die kontraktile Eigenschaften werden auch hier durch die assoziierten NM II Motorproteine generiert. α -Aktinin und

NM II Motorproteine lokalisieren dabei in einem periodischen Muster, wodurch die Substruktur der SF einer quasi-sarkomerischen Anordnung entspricht (Hu et al., 2017; Peterson et al., 2004) (Abb. 1.1). Im Vergleich zu Sarkomer-Einheiten in Muskelzellen zeichnen sich SF in nicht-muskulären Zellen jedoch durch eine höhere Dynamik und variabelere Struktur aus (Hotulainen und Lappalainen, 2006; Pellegrin und Mellor, 2007). Sarkomere besitzen eine stabile Substruktur mit parallel angeordneten Aktinfasern, wodurch reproduzierbare Abfolgen von Kontraktionen/Relaxationen in kurzen Zeitintervallen ausgeführt werden können. Die anti-parallele Anordnung der Aktinfilamente in SF führt hingegen zu weniger geordneten Kontraktionen, Kompressionen und Relaxationen innerhalb der Faser (Murrell et al., 2015). Dabei durchlaufen SF ständige Zyklen von Assemblierung und Disassemblierung, weshalb die Substruktur kontinuierlich remodelliert wird (Naumanen et al., 2008).

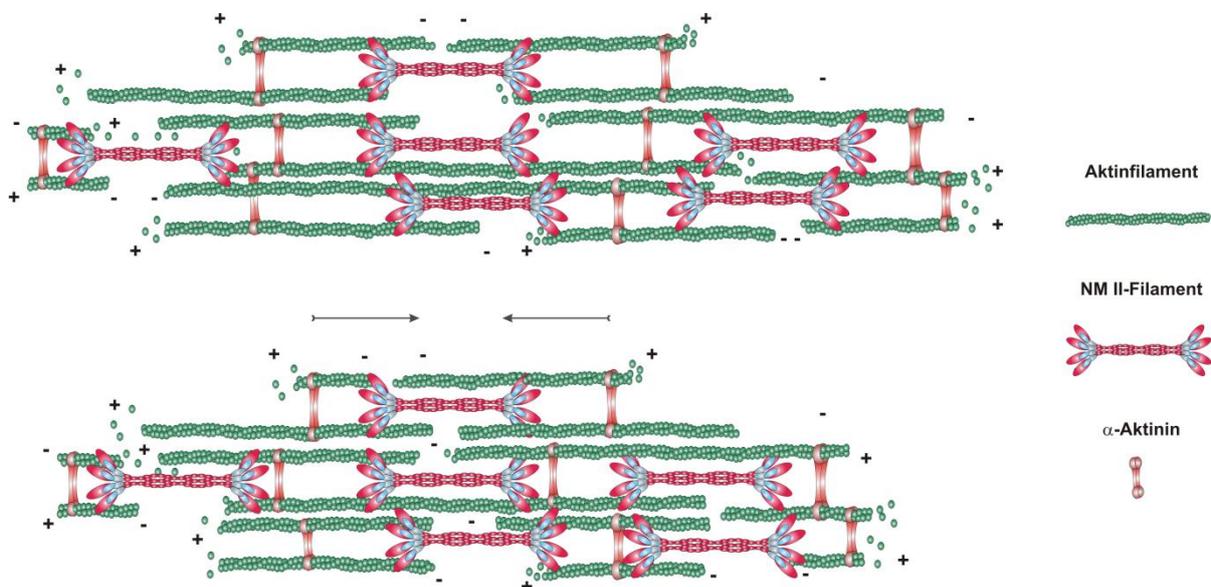


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer SF in nicht-muskulären Zellen.

SF bestehen aus 10-30 Aktinfilamenten, wobei Plus-Enden und Minus-Enden der Filamente alternierend angeordnet sind. Die Aktinfilamente werden durch α -Aktinin gebündelt, die Lokalisation von α -Aktinin tritt dabei in einem periodischen Muster auf. Zwischen den α -Aktinin Molekülen assemblieren NM II Motorproteine, wodurch die SF kontraktile Eigenschaften aufweist. Diese charakteristische Anordnung verleiht SF eine quasi-sarkomerische Struktur.

Eine weitere Eigenschaft von SF ist ihre direkte Verbindung zu den Zell-Matrix-Adhäsionen (Fokalkontakten) der Zelle. Während die Fokalkontakte den Zellkörper an der extrazellulären Matrix (EZM) verankern, durchspannen SF den Zellkörper und verankern die Fokalkontakte wiederum intrazellulär an weiteren Fokalkontakten oder subzellulären Kompartimenten (Vicente-Manzanares et al., 2009a; Vicente-Manzanares et al., 2009b). Der Zellkörper wird auf diese Weise stabilisiert und die morphologische Ausprägung der Zelle kann aufrechterhalten werden. Aufgrund der Verbindung zur EZM sind SF nicht nur in der Lage, Zellen und Geweben mechanische Stabilität zu verleihen, sondern fungieren auch als mechanoresponsive Elemente bei der Konvertierung von mechanischen Impulsen in biochemische Signale (Mechanotransduktion). Durch die Kontraktilität in SF wirken Zugkräfte auf

die Zelladhäsionen, wodurch der Aufbau und die Umstrukturierung der Fokalkontakte beeinflusst wird. Unter normalen Kultivierungsbedingungen liegen die Fokalkontakte als elongierte, maturaerte Strukturen vor, eine Inhibierung der Aktomyosin-Kontraktilität führt hingegen zur Ausbildung von punktförmigen, unreifen Fokalkontakten (Bachmann et al., 2018; Balaban et al., 2001; Schiller et al., 2013). Im Gegenzug dazu führt eine verstärkte Kontraktilität zur Bildung stabilerer Fokalkontakte (Arnaout et al., 2007). SF-vermittelte Zugkräfte können Proteindomänen entfalten und dadurch Bindestellen in Adhäsionsproteinen freilegen, welche ohne Zugspannung nicht zugänglich sind (del Rio et al., 2009). Die Kraftachse wirkt dabei selbstverstärkend. Die Maturierung der Fokalkontakte durch SF-induzierte Zugkräfte führt zur Aktivierung der GTPase RhoA, wodurch die Verstärkung der SF über NM II-Aktivierung und Aktin-Polymerisation induziert wird (Guilluy et al., 2011; Matthews et al., 2006).

Die Mechanotransduktion über SF-vermittelte Zugspannungen ist dabei nicht auf die Zelladhäsion selbst begrenzt. Die Steifigkeit der EZM kann über die Verbindung zu den Fokalkontakten ausgelesen werden und hat einen direkten Einfluss auf die Bildung von SF. Werden Zellen auf Substraten unterschiedlicher Steifigkeit kultiviert, bilden sich auf steiferen Substraten mehr und dicker gebündelte SF als auf weichen Substraten (Prager-Khoutorsky et al., 2011). Die Modulierung der SF-Assemblierung und -Struktur anhand der mechanischen Eigenschaften der EZM, spiegelt die physiologische Funktion der SF wider. Gewebe, die unter beträchtlichem mechanischen Stress stehen, bilden zahlreiche SF aus. Beispielsweise bilden Fibroblasten während ihrer Differenzierung zu Myofibroblasten in dermale Wundgewebe verstärkt SF aus, wodurch die Wundschließung aufgrund von kontraktile Zugspannungen gefördert wird (Sandbo und Dulin, 2011). Ein weiteres prominentes Beispiel stellt die Ausbildung von SF in Endothelzellen dar, welche sich in Abhängigkeit von hydrostatischem Druck und Scherstress in Gefäßen aufbauen (Tzima et al., 2002; Tzima et al., 2005; Wong et al., 1983).

1.1.3 Stressfaser-Subtypen

SF können nach aktuellem Wissensstand in mindestens drei Subtypen klassifiziert werden: Dorsale Stressfasern (dSF), transversale Arcs und ventrale Stressfasern (vSF) (Small et al., 1998). Die Unterscheidung kann anhand der Interaktion mit Fokalkontakten und dem charakteristischen Lokalisationsmuster in polarisierten, motilen Zellen vorgenommen werden (Abb. 1.2). dSF lokalisieren an der Migrationsfront und sind an ihrem distalen Ende mit einem Fokalkontakt verbunden sowie an ihrem proximalen Ende mit transversalen Arcs assoziiert. Transversale Arcs lokalisieren bogenförmig in paralleler Anordnung zur Migrationsfront und sind vor allem im Lamellum vorhanden. Die Arcs sind dabei nicht direkt mit Fokalkontakten verknüpft, sondern nur indirekt über ihre Verbindung zu dSF. vSF lokalisieren im Zellzentrum und sind an beiden Enden mit Fokalkontakten verbunden. Gelegentlich werden zusätzlich vSF, die sich über den Zellkern spannen, als perinukleäre SF beschrieben (Khatau et al., 2009). Die verschiedenen Subtypen treten dabei nicht in allen Zellphänotypen gleichermaßen auf. In motilen Zellen mit polarisiertem Phänotyp sind oftmals alle drei Subtypen gleichzeitig vorhanden, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung und Menge (Hotulainen und Lappalainen, 2006). In stationären Zellen sind hingegen fast ausschließlich vSF vorzufinden (Deguchi und Sato, 2009; Vallenius, 2013).

Weiterhin unterscheiden sich die SF-Subtypen in ihren mechanischen Eigenschaften. dSF selbst sind nicht zur Kontraktion befähigt, da an ihnen keine NM II-Motoren assemblieren (Tojkander et al., 2011). Jedoch sind sie mit transversalen Arcs verbunden, die zur Kontraktion befähigt sind. Durch die Verankerung der dSF am Fokalkontakt werden Kontraktionen der transversalen Arcs auch auf dSF übertragen. vSF weisen ebenfalls einen kontraktile Charakter auf. Aufgrund der unterschiedlichen Kontraktilität sowie der abweichenden Verankerung am Substrat, unterscheidet sich die mechanische Grundspannung der SF-Subtypen. Laserablationsexperimente haben gezeigt, dass die Grundspannung in dSF am geringsten und in vSF am höchsten ist. Transversale Arcs zeigen hingegen eine Retraktion, die zwischen dSF und vSF liegt (Lee et al., 2018).

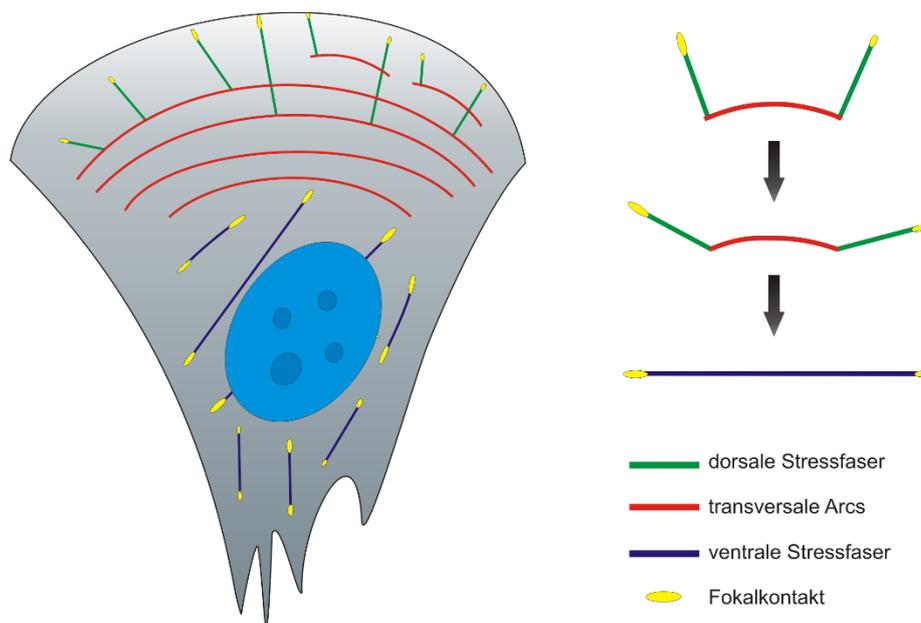


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der SF-Subtypen in polarisierten Zellen.

In polarisierten Zellphänotypen können drei SF-Subtypen unterschieden werden. dSF lokalisieren entlang der Zellfront. Sie sind an ihrem distalen Ende mit einem Fokalkontakt verbunden und an ihrem proximalen Ende mit einem transversalen Arc verknüpft. Transversale Arcs lokalisieren parallel zum Lamellum der Zelle in einem Bogen und sind an keinem Ende mit Fokalkontakten verbunden. vSF lokalisieren im Zellzentrum und sind an beiden Enden mit Fokalkontakten verknüpft. vSF entstehen dabei durch die Verknüpfung von zwei dSF und dem dazwischenliegenden transversalen Arc.

Untersuchungen zur SF-Assemblierung zeigen, dass die Subtypen aus verschiedenen Assemblierungsmechanismen hervorgehen. dSF assemblieren durch mDia1- und Arp2/3-gesteuerte Aktinpolymerisation an der Migrationsfront (Hotulainen und Lappalainen, 2006). Transversale Arcs entstehen aus kurzen, Arp2/3-vermittelten Aktinbündeln, die vermutlich Abkömmlinge des Lamellipodiums sind (Svitkina et al., 1997) und in Abhängigkeit von NM II-Kontraktilität aneinandergelagert sowie miteinander verknüpft werden (Hotulainen und Lappalainen, 2006). vSF entstehen zumindest in polarisierten Zellen durch die Konvertierung von zwei dSF und dem dazwischen assoziierten Fragment des transversalen Arcs. Durch den zentripetalen Aktinfluss und Aktomyosin-Kontraktilität wird der

transversale Arc zwischen die dSF gezogen, wodurch eine gerade vSF mit Fokalkontakten an beiden Enden entsteht (Abb. 1.2) (Hotulainen und Lappalainen, 2006). Da jedoch nicht alle Zellen dSF und transversale Arcs ausbilden, sind für die Assemblierung von vSF alternative Modelle vorhanden. Verkovsky schlägt in seinem Modell eine Aneinanderlagerung kurzer Aktinfragmente durch Myosin-Aktivität und den retrograden Aktinfluss vor (Verkhovsky et al., 1995). Small und Zimmerman schlagen hingegen vor, dass vSF durch die Fusion von kurzen Aktinfasern entstehen, die bereits mit Fokalkontakten verbunden sind (Small et al., 1998; Zimmerman et al., 2004). Über die Disassemblierung der SF ist hingegen weniger bekannt. Die kleinen GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 sind zentrale Regulatoren der Aktindynamik (Heasman und Ridley, 2008), wobei zumindest RhoA einen Einfluss auf die SF-Disassemblierung ausübt. Die RhoA *downstream*-Effektoren mDia1 und ROCK (*Rho-associated protein kinase*) hemmen die ADF-/Cofilin-induzierte Disassemblierung von Aktinfilamenten (Leung et al., 1996; Maekawa et al., 1999). Die meisten Situationen, welche zu einer Disassemblierung von SF führen, sind zudem mit dem Verlust von Spannung verbunden. In einer Publikation von Hayakawa und Kollegen wurde gezeigt, dass der Verlust von Spannung oder Kontraktilität zu einer Cofilin-gesteuerten Disassemblierung der SF führt (Hayakawa et al., 2011).

Inwiefern die verschiedenen SF-Subtypen unterschiedliche physiologische Bedeutungen haben, ist nicht abschließend geklärt. Ein Modell postuliert die Funktion von dSF als eine Art Hebel, der in Abhängigkeit von der Kontraktion transversaler Arcs zu einer Abflachung der Lamella in migrierenden U2OS Zellen führt (Burnette et al., 2014). Die vSF in motilen Fibroblasten sind außerdem oftmals parallel zur Migrationsachse ausgerichtet, was für eine Funktion dieser Fasern bei der Retraktion des Zellendes durch Aktomyosin-Kontraktion spricht (Cramer et al., 1997; Oliver et al., 1994). Diese Ergebnisse deuten auf spezifische Rollen der unterschiedlichen SF während der Zellmigration hin. In nicht-motilen Zellen dienen die vSF hingegen vorwiegend als Stabilisatoren der Zellmorphologie. Experimente auf strukturierten Substraten mit alternierenden adhäsiven und passivierten Bereichen zeigen, dass vSF entlang der Zellkontur lokalisieren und dort die Zellmorphologie stabilisieren. Die vSF wirken dadurch der Oberflächenspannung des Aktincortex entgegen, wodurch die Aufspannung des Zellkörpers über nicht-adhäsiven Bereichen gewährleistet wird (Bischofs et al., 2008; Labouesse et al., 2015; They et al., 2006).

1.2 Myosine

Myosine bilden eine Superfamilie von Aktin-assoziierten Motorproteinen. Stand 2001 umfasst der phylogenetische Stammbaum 18 verschiedene Klassen, die teilweise Organismen- und gewebe-spezifisch exprimiert werden. Das humane Genom enthält ca. 40 Myosin-Gene, die anhand der Kopf- und Tailstruktur in 12 Klassen aufgeteilt werden können (Berg et al., 2001). Grundlegende Eigenschaft aller Myosin-Motorproteine ist die Konvertierung chemischer Energie in eine gerichtete Bewegung entlang der Polarität von Aktinfilamenten (Sellers, 2000). In allen Fällen assoziieren die Kopfregionen der Myosine dabei mit dem Aktinzytoskelett. Kategorisiert man die Myosine anhand ihrer Struktur und Funktion, können grob drei grundlegende Gruppen unterschieden werden. Klassen mit einer oder zwei

Kopfdomänen und kurzen Tailfragmenten, wie beispielsweise die Klasse I oder Klasse VI, sind mit der Tailregion an die Membran oder membranständige Rezeptoren gekoppelt (Hasson, 2003; McIntosh und Ostap, 2016). Die zweite große Gruppe bilden Cargo-transportierende Myosine wie die Klasse V. Die Gruppe zeichnet sich durch zwei Kopfdomänen aus, die prozessiv entlang der Aktinfilamente wandern, während Vesikel oder Organellen mit dem Tailfragment assoziiert sind (Skau et al., 2006; Xie et al., 2006). Die dritte große Gruppe bilden die Myosine der Klasse II, welche durch anti-parallele Tail-Tail-Interaktionen zu bipolaren Myosinfilamenten assemblieren (Abb. 1.3). Myosine der Klasse II sind hauptverantwortlich für die Erzeugung intrazellulärer Kräfte.

1.2.1 Myosine der Klasse II (konventionelle Myosine)

Das erste Myosin wurde 1864 von Willy Kühne in Heidelberg aus Muskelextrakten isoliert und M2 benannt. Aufgrund dieser Erstbeschreibung werden alle Myosine der Klasse II auch als konventionelle Myosine bezeichnet. Die Erzeugung intrazellulärer Kräfte wird durch die strukturelle Anordnung der Myosin-Moleküle ermöglicht. Die strukturelle Grundeinheit aller Klasse II Myosine ist ein Hexamer (Abb. 1.3). Es besteht aus zwei schweren Ketten und vier leichten Ketten, die in jeweils zwei essentielle leichte Ketten (ELC) und zwei regulatorische leichte Ketten (RLC) unterschieden werden (Bushuev et al.). Die ELCs stabilisieren die Hexamerstruktur, während die RLCs sowohl stabilisierende als auch aktivitätsregulierende Funktionen ausüben. Die HC besteht aus vier Domänen: Einer Aktin- und ATP-bindenden Kopfdomäne, einer Nackendomäne, einer helikalen Taildomäne und einer nicht-helikalen Taildomäne (Adelstein et al., 1971; Vicente-Manzanares et al., 2009b). Die beiden schweren Ketten bilden ein Homodimer, indem die helikalen Taildomänen zu einer *supercoiled* Struktur assemblieren. ELCs und RLCs sind nicht-kovalent an den beiden konservierten IQ-Motiven der Nackendomänen gebunden, wobei die ELC das erste und die RLC das zweite IQ-Motiv belegt (Warrick und Spudich, 1987) (Abb. 1.4). Durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den geladenen Resten der ACD-Region (engl. für *assembly competence domain*) findet schließlich eine Multimerisierung der Hexamere zu einem Myosinfilament statt (Breckenridge et al., 2009; Dulyaninova und Bresnick, 2013). Die Anordnung der Hexamere ist dabei jeweils anti-parallel zueinander, sodass ein bipolares Filament mit Kopfregionen an beiden Enden entsteht (Abb. 1.3). Die krafterzeugende Eigenschaft entsteht durch die Bewegung der Köpfe entlang der Aktinfilamente. Unter Energieverbrauch in Form von ATP, findet eine Abfolge von Konformationsänderungen der Kopfregionen statt, die anhand des Querbrückenzyklus beschrieben ist. Die Myosin-Köpfe bewegen sich dabei immer zum Plus-Ende des Aktinfilaments und weisen keine intrinsische Präferenz für kontraktile oder kompressorische Kräfte auf. Für die Erzeugung kontraktiler Kräfte ist daher die anti-parallele Anordnung der Aktinfilamente notwendig (Vgl. Abschnitt 1.1.2). Durch die Bewegung der Kopfregionen zu den Plus-Enden und der Verbindung der Tailregionen untereinander entsteht letztlich eine mechanische Zugspannung, die sowohl auf die Aktinfilamente als auch auf die Myosinfilamente selbst wirkt (Murrell et al., 2015).

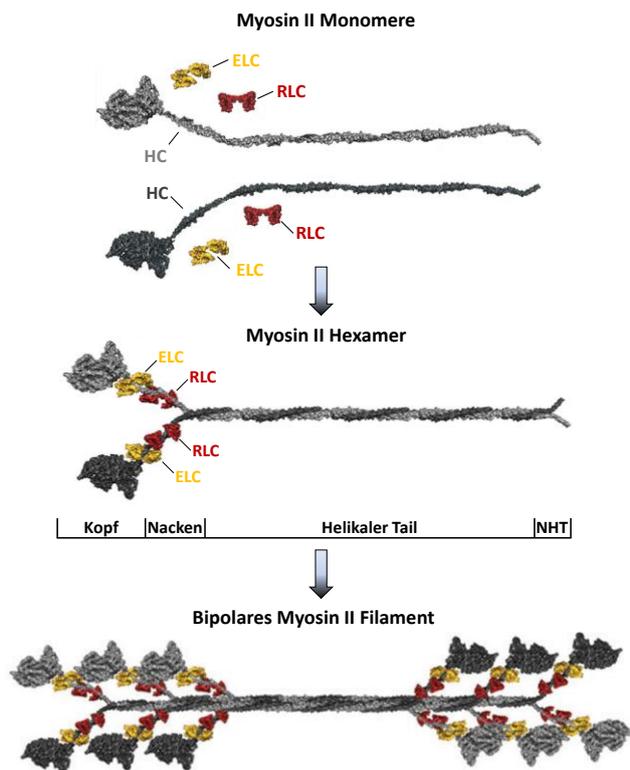


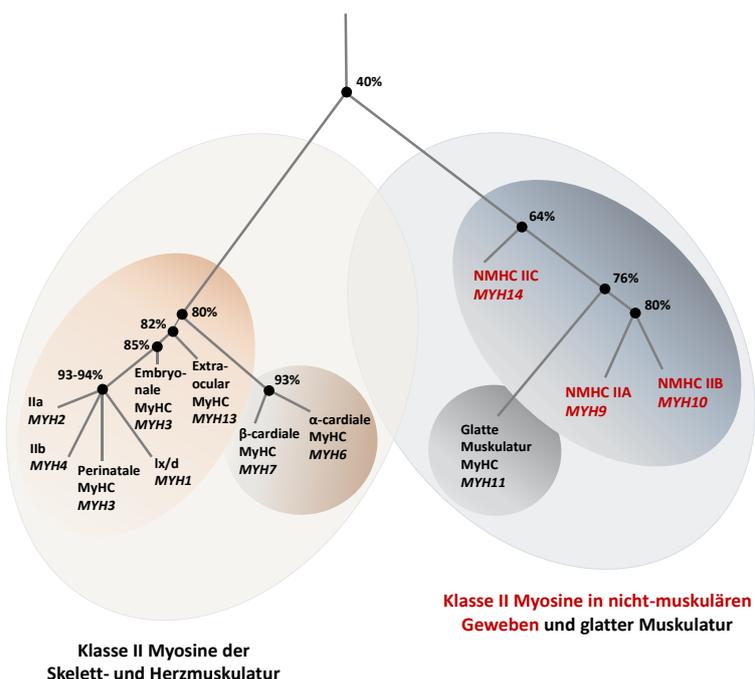
Abbildung 1.3: Hexamer-Struktur und bipolare Anordnung von Myosin II Filamenten.

Die Grundeinheit aller NM II-Isoformen bildet ein Hexamer, welches aus zwei HCs, zwei ELCs und zwei RLCs besteht. Die HCs können in vier Domänen unterteilt werden: Kopfdomäne, Nackendomäne, helikale Taildomäne und nicht-helikale Taildomäne (NHT). Die HCs bilden ein Homodimer und die ELCs sowie RLCs assoziieren nicht-kovalent an die Nackenregion. Einzelne Hexamere assemblieren durch Tail-Tail-Interaktionen zu bipolaren Myosin II-Filamenten. Modifiziert nach (Sellers und Heissler, 2019).

In humanen Zellen kodieren mindestens 12 verschiedene Gene für Myosine der Klasse II (Golomb et al., 2004). Der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 1.4 zeigt die Einteilung der Gene anhand der Struktur und Gewebeexpression des Genprodukts. Myosine der Klasse II werden in Skelettmuskel-Myosin II, Herzmuskel-Myosin II, Myosin II der glatten Muskulatur und nicht-muskuläres Myosin II (NM II) aufgeteilt (Heissler und Manstein, 2013) (Abb. 1.4). Die Rolle der NM II Motorproteine in nicht-muskulären Zellen nimmt einen wesentlichen Anteil dieser Arbeit ein, weshalb diese im Folgenden ausführlich vorgestellt werden.

Abbildung 1.4: Phylogenetischer Stammbaum der Klasse II Myosine nach Golomb et al.

Die Subfamilie kann in Skelettmuskel- und Herzmuskel-Myosin II sowie Myosin II der glatten Muskulatur und nicht-muskuläres Myosin II (NM II) unterteilt werden. NM II-Isoformen sind in Rot hervorgehoben. Die Prozentzahlen geben die Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen an. Modifiziert nach (Golomb et al., 2004; Heissler und Manstein, 2013).



1.2.2 Nicht-muskuläre Myosine der Klasse II (NM II)

NM II-Motorproteine sind hauptverantwortlich für die Aktomyosin-Kontraktilität in nicht-muskulären Zellen. Obwohl die grundlegende Hexamer-Struktur von NM II und Myosin II in Muskelzellen ähnlich ist, unterscheiden sich die Myosinfilamente in Sarkomeren bezüglich ihrer Größe, Kontraktilität und Dynamik deutlich von NM II-Filamenten. In Sarkomeren enthält ein einzelnes Myosinfilament bis zu 300 Hexamere und weist eine Länge von maximal 1600 nm auf (Dasbiswas et al., 2018). NM II Filamente enthalten hingegen nur maximal 30 Hexamere (Verkhovsky und Borisy, 1993), wodurch ihre Länge lediglich ca. 300 nm beträgt. Dieser Umstand hat NM II-Filamenten den Beinamen „Minifilamente“ eingebracht. Die Anzahl der Hexamere, die zu einem Filament zugefügt werden können, ist durch sterische Hinderung limitiert, weshalb nicht nur die Größe, sondern auch Aktin-bindende und Kraft-produzierende Eigenschaften von NM II Filamenten limitiert sind (Billington et al., 2013; Pollard, 1975). Weiterhin zeichnen sich NM II-Filamente durch eine wesentlich höhere Dynamik mit kontinuierlichen Polymerisations-/Depolymerisationszyklen aus, wodurch die Kontraktilität auf subzellulärer Ebene flexibel aufgebaut und angepasst werden kann. Die relativ simple Ansicht von NM II-Filamenten als krafterzeugender Apparat veränderte sich grundlegend durch die Entdeckung verschiedener NM II-Isoformen und deren Spleißvarianten, verschiedener Regulationsstellen in den HCs und RLCs sowie der Beschreibung verschiedener regulierender Kinasen und Phosphatasen (Beach und Hammer, 2015; Heissler und Manstein, 2013).

1.2.3 NM II-Isoformen

➤ Expression und Lokalisation

Nach heutigem Wissensstand werden drei verschiedene Isoformen von NM II-Motorproteinen exprimiert. Die Isoform des Hexamers wird dabei von der HC bestimmt, welche auf unterschiedlichen Genen codiert sind. *MYH9* codiert für die NMHC IIA, *MYH10* für die NMHC IIB und *MYH14* für die NMHC IIC (Vicente-Manzanares et al., 2009b) (Abb. 1.5). Von NMHC IIB und NMHC IIC existieren zusätzlich Spleißvarianten, die ein oder zwei alternative Exons in die mRNA Region der Motordomäne enthalten und vor allem in neuronalen Geweben exprimiert werden (Golomb et al., 2004; Takahashi et al., 1992). Eine Heterodimerisierung verschiedener HCs ist nach aktuellem Wissensstand nicht möglich (Golomb et al., 2004). Die assoziierten RLCs und ELCs binden prinzipiell Isoform-unabhängig an alle drei NMHC II, jedoch werden auch hier verschiedene Isoformen in nicht-muskulären Zellen exprimiert. Ob unterschiedliche RLC- oder ELC-Isoformen bestimmte HC-Isoformen bevorzugt binden, ist nicht bekannt (Heissler und Manstein, 2013). Obwohl lediglich die HCs variieren, werden die Holoenzyme aufgrund der Einfachheit NM IIA, NM IIB und NM IIC benannt. Während NM IIA und NM IIB in diversen Studien gut charakterisiert wurden, ist über NM IIC bisher relativ wenig bekannt. Anhand des phylogenetischen Stammbaums der Klasse II Myosine wird deutlich, dass NM IIA und NM IIB zudem wesentlich höhere Homologien zueinander oder zu Myosin II der glatten Muskulatur aufweisen, als zu NM IIC (Abb. 1.4).

Expressionsanalysen in Gewebeschnitten von Mäusen zeigen, dass alle Paraloge ubiquitär in den Geweben exprimiert werden und jeweils mindestens zwei Isoformen gleichzeitig vorhanden sind. Die Expression von NM IIA ist bis auf wenige Ausnahmen immer vorhanden (Golomb et al., 2004; Sellers, 2000). Auch auf zellulärer Ebene exprimieren fast alle Zelltypen mehrere NM II-Isoformen gleichzeitig. In einer Arbeit von Beach und Kollegen wurde zudem gezeigt, dass Zellen während der epithelialen-mesenchymalen Transition ihr NM II-Expressionsmuster anpassen. Während die meisten epithelialen Zellen der Studie NM IIA und NM IIC coexprimieren, war in mesenchymalen Zelltypen eine verstärkte Coexpression von NM IIA und NM IIB vorhanden. In Zellen, die sich gerade in der Transition befanden, wurde teilweise die Expression aller drei Isoformen nachgewiesen. Zusätzlich konnte die Expression von NM IIC unterdrückt und die Expression von NM IIB eingeleitet werden, wenn in epithelialen Drüsenzellen die epitheliale-mesenchymale Transition stimuliert wurde (Beach et al., 2011).

Die subzelluläre Lokalisation wurde bisher vor allem für NM IIA und NM IIB untersucht. Im Fall von polarisierten Zellen, die einen motilen Phänotyp mit ausgeprägter Migrationsfront aufweisen, ist eine differenzielle Lokalisation von NM IIA und NM IIB zu beobachten (Beach et al., 2014; Kolega, 1998; Shutova et al., 2014). Während NM IIA im Zellkörper homogen verteilt vorliegt, ist eine graduelle Anreicherung von NM IIB im Zellzentrum vorhanden. Die Lokalisationsmuster von NM IIA und NM IIB überlappen dabei zu großen Teilen im Zellzentrum. In stationären Zellen ist die Kolo-kalisation noch ausgeprägter, sodass eine Unterscheidung der Isoformen anhand des Lokalisationsmusters nicht möglich ist (Beach et al., 2014). Ob eine differenzielle Lokalisation der Isoformen an unterschiedlichen Aktinstrukturen vorhanden ist, wurde bisher nicht genau analysiert. Es wird angenommen, dass alle Isoformen im Aktincortex assemblieren (Chugh und Paluch, 2018). Zudem ist bekannt, dass NM IIA und NM IIB in transversalen Arcs und vSF, jedoch nicht in dSF vorhanden sind (Beach et al., 2014; Shutova et al., 2017; Tojkander et al., 2011). Über die subzelluläre Lokalisation von NM IIC ist hingegen nichts bekannt.

➤ Kinetik und Struktur

In vitro Experimente legen nahe, dass alle drei Isoformen die gleichen, grundlegenden molekularen Funktionen ausüben, nämlich in bipolare Filamente zu assemblieren und SF sowie den Aktincortex in Abhängigkeit von ATP zu kontrahieren (Conti und Adelstein, 2008). Allerdings weisen die Isoformen unterschiedliche kinetische und strukturelle Eigenschaften auf. NM IIA hat von allen Isoformen die höchste Aktin-aktivierte Mg^{2+} -ATPase Aktivität, wodurch die Hydrolyse von ATP am schnellsten abläuft. Daraus resultiert eine zwei- bis dreifach schnellere Bewegung entlang der Aktinfilamente als durch NM IIB oder NM IIC (Kim et al., 2005; Kovacs et al., 2003; Wang et al., 2003). NM IIB besitzt hingegen eine sehr hohe ADP-Affinität sowie eine deutlich höhere *duty ratio*. Die *duty ratio* definiert, wie lange innerhalb des kinetischen Zyklus sich ein Myosin-Molekül in einer Konformation befindet, bei der es stabil an ein Aktinfilament bindet. Aufgrund dieser Eigenschaften bleibt NM IIB auch unter größerem mechanischen Stress stabil mit dem Aktinzytoskelett verbunden, wodurch es langanhaltende Zugspannungen aufrechterhält (Milberg et al., 2017; Wang et al., 2003). Kinetische Analysen von NM IIC, vor allem in Relation zu den anderen Isoformen, sind bisher kaum vorhanden. Billington und Kollegen zeigen, dass die Aktin-aktivierte Mg^{2+} -ATPase Aktivität von NM IIC niedriger als bei NM IIA

und NM IIB ist (Billington et al., 2013). Die maximale Geschwindigkeit von NM IIC liegt hingegen zwischen NM IIA und NM IIB. Beide Parameter zusammen deuten darauf hin, dass NM IIC die Aktinfilamente mit einer Geschwindigkeit prozessiert, die vergleichbar zu NM IIB und deutlich langsamer als NM IIA ist (Golomb et al., 2004).

Der strukturelle Aufbau der NM II-Filamente unterscheidet sich im Fall von NM IIA und NM IIB nur geringfügig. NM IIA- oder NM IIB-Filamente bestehen aus 28-30 Hexameren bei einer Länge von ca. 300 nm (Niederman und Pollard, 1975). NM IIC-Filamente bestehen hingegen nur aus 14-16 Hexameren, zeichnen sich aber trotzdem durch eine einheitliche Größe von 300 nm aus (Billington et al., 2013). Die geringe Anzahl der Köpfe hat allerdings negative Auswirkungen auf die prozessiven Eigenschaften des NM IIC-Filaments. Unter Konditionen, bei denen die Mehrheit der NM IIA und NM IIB Filamente an Aktin gebunden sind, assoziieren weniger als die Hälfte der NM IIC Filamente mit Aktinfilamenten. Die querbündelnden Eigenschaften von NM IIC sind dadurch signifikant geringer, wodurch NM IIC-Filamente weniger für die Aufrechterhaltung von mechanischen Zugspannungen geeignet sind (Billington et al., 2013).

➤ **Kombinatorik**

Die Variabilität, Komplexität und Kinetik der NM II-Filamente kann zusätzlich durch die Kombinatorik der bipolaren Filamente gesteigert werden. Die grundlegende Annahme, dass ausschließlich NM II-Hexamere der gleichen Isoform zu homotypischen Filamenten assemblieren, wurde 2014 durch Arbeiten von Beach und Kollegen sowie Shutova und Kollegen widerlegt. Beide Publikationen zeigen unabhängig voneinander, dass auch verschiedene Isoformen zu heterotypischen Filamenten co-assemblieren können (Beach et al., 2014; Shutova et al., 2014). Eine Kombination von NM IIA und NM IIB wurde in beiden Publikationen nachgewiesen, Beach und Kollegen postulieren zusätzlich eine Kombination aus NM IIA und NM IIC. Ob es hingegen heterotypische Filamente gibt, die aus NM IIB und NM IIC oder gar aus allen drei Isoformen gleichzeitig bestehen, ist bisher nicht bekannt. Ebenso ist bisher wenig über die Assemblierung, Dynamik und Funktion dieser heterotypischen Filamente bekannt. Zwei Publikationen postulieren, dass heterotypische NM IIA/NM IIB Filamente möglicherweise regelmäßig auftreten, wobei die Assemblierung von NM IIA ausgeht und NM IIB co-assembliert (Beach et al., 2014; Shutova et al., 2017). Nach wie vor ist jedoch die generelle Annahme, dass der Großteil der NM II-Filamente aus homotypischen Filamenten besteht (Heissler und Manstein, 2013; Kelley et al., 1996; Kolega, 1998).

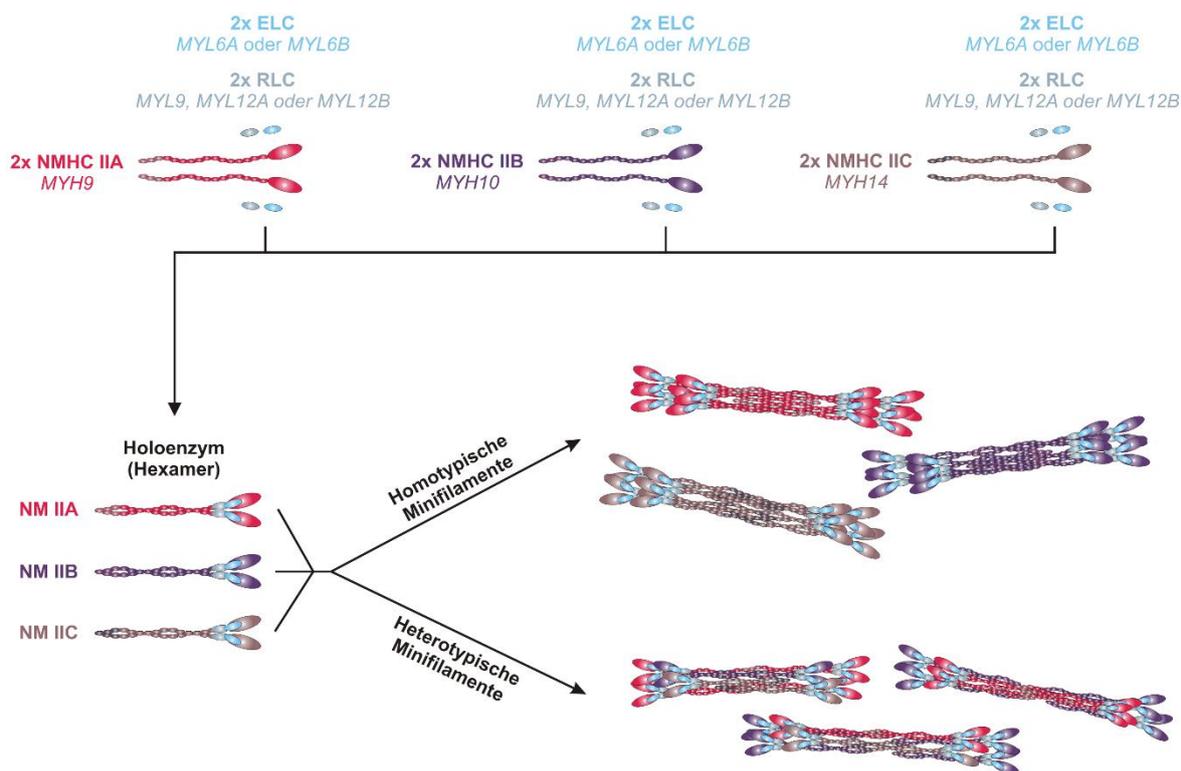


Abbildung 1.5: Hexamer-Struktur und Kombinatorik der NM II-Isoformen.

Die NM II-Isoformen werden durch die HC bestimmt. Es existieren drei HCs (NMHC IIA, NMHC IIB und NMHC IIC), welche auf unterschiedlichen Genen kodiert sind. Die ELCs und RLCs binden unspezifisch alle HCs, sodass sich die Hexamere nur in der HC unterscheiden. Die Isoformen werden der Einfachheit wegen mit NM IIA, NM IIB und NM IIC benannt. NM II-Hexamere können zu homotypischen Filamenten oder heterotypischen Filamenten assemblieren. Dabei wurden die Kombinationen NM IIA/NM IIB und NM IIA/NM IIC nachgewiesen. Ob NM IIB/NM IIC oder heterotypische Filamente mit allen drei Isoformen existieren, ist bisher nicht bekannt. Nach Ansicht der aktuellen Forschung stellen heterotypische Filamente eher die Minderheit dar, während die Hauptpopulation der Filamente homotypischer Natur ist.

1.2.4 Regulation der Aktivität, Assemblierung und Disassemblierung

Um die kontinuierlich ablaufenden Assemblierungs- und Disassemblierungszyklen der NM II-Filamente räumlich und zeitlich zu steuern, beinhalten NM II-Hexamere mehrere molekulare Schalter in den HCs und RLCs. Die enzymatische Aktivität der NM II-Hexamere kann über die Phosphorylierung der RLC am Serin19 und Threonin18 gesteuert werden, wobei die Hauptaktivierung durch die Phosphorylierung am Serin19 stattfindet (Matsumura, 2005; Vicente-Manzanares et al., 2009b). Strukturanalysen zeigen, dass alle drei Isoformen in zwei verschiedenen Konformationen vorliegen (Billington et al., 2013). In der assemblierungsinkompetenten 10S-Konformation ist die RLC nicht phosphoryliert und das Hexamer liegt in einer autoinhibitorischen Konformation vor. Die Interaktion der helikalen Taildomäne mit den Kopfdomänen sowie eine Interaktion der beiden Kopfdomänen untereinander, verhindert dabei die Assemblierung der Hexamere zu höher geordneten Filamenten (Jung et al., 2008). Durch die Phosphorylierung der RLC lösen sich die autoinhibitorischen Interaktionen auf und das Hexamer geht in die assemblierungskompetente 6S-Konformation über, welche eine Zusammenlagerung von

Filamenten ermöglicht. Der Einfluss der RLC-Phosphorylierung auf das Assemblierungsverhalten von NM IIA-Filamenten, wurde in Zellkulturexperimenten weiter analysiert. Die Deletion des IQ-Motivs, welches für die Bindung der RLCs an die NMHCs notwendig ist, führt zu einem NM IIA-Molekül, welches konstitutiv in der assemblierungskompetenten 6S-Konformation vorliegt (Breckenridge et al., 2009; Cheney und Mooseker, 1992). Die Expression der Mutante führt zu einer Überassemblierung der NM IIA-Moleküle in den Filamenten und einer intrazellulären Akkumulierung der NM IIA-Filamente im Zellzentrum (Breckenridge et al., 2009). Phosphorylierungen der RLC werden über verschiedene Kinasen und Phosphatasen reguliert. Eines der Schlüsselenzyme ist ROCK, welches die RLC direkt phosphorylieren kann oder über die Inaktivierung der MLCP (*myosin light chain phosphatase*) indirekt eine Dephosphorylierung der RLC verhindert (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996). Die pharmakologische Inhibierung von ROCK hat einen ähnlich starken Effekt auf die Aktomyosin-Kontraktilität, wie der Myosin II-Inhibitor Blebbistatin (Kovacs et al., 2004). Weitere prominente RLC-phosphorylierende Kinasen sind MLCK (*myosin light chain kinase*) sowie die *citron kinase*, welche die RLC an den gleichen Aminosäuren wie ROCK phosphorylieren. Der Einfluss der unterschiedlichen Kinasen auf die Phosphorylierung ist nicht abschließend geklärt. Insgesamt sind bisher 12 verschiedene Kinasen bekannt, welche die RLC phosphorylieren, eine gewebespezifische und lokalisationspezifische Phosphorylierung ist dabei denkbar.

Weitere Phosphorylierungsstellen befinden sich in den helikalen sowie nicht-helikalen Taildomänen der NMHCs. Das Muster der Phosphorylierungsstellen variiert zwischen den verschiedenen Isoformen. Die Gegenwart von jeweils mindestens fünf verschiedenen Phosphorylierungsstellen, die in unterschiedlichen Mustern angeordnet sind, deutet auf eine komplexe, mehrere Signalkaskaden umfassende Regulation der NMHCs durch die c-terminale Phosphorylierung hin. Der Einfluss c-terminaler Phosphorylierungen ist für NM IIA am besten charakterisiert. Die prominentesten Phosphorylierungsstellen befinden sich bei der NMHC IIA am Serin1916 und am Serin1943. Das Serin 1916 wird durch die Proteinkinase C β (PKC β) phosphoryliert, Serin 1943 hingegen durch die Caseinkinase II (CK II) (Dulyaninova und Bresnick, 2013; Vicente-Manzanares et al., 2009b). In beiden Fällen führt die Phosphorylierung zu einer Disassemblierung der NM IIA-Filamente oder einer Blockierung der Assemblierung *in vitro* (Dulyaninova und Bresnick, 2013; Dulyaninova et al., 2005). Ein ähnlicher Effekt wurde für die Phosphorylierung der NMHC IIB am Serin1937 durch PKC ζ beobachtet, wobei hier die Filamentassemblierung lediglich verlangsamt wurde (Even-Faitelson und Ravid, 2006). Des Weiteren zeigen Experimente mit chimären NM IIA und NM IIB-Mutanten, dass die intrazelluläre Lokalisation der Isoformen in motilen Zellen von der Tailregion abhängig ist. Wird die NM IIA-Kopfregion mit der Taildomäne von NMHC IIB kombiniert, lokalisieren die resultierenden Filamente im Zellzentrum, wie es auch bei NM IIB-Filamenten beobachtet wurde (Sandquist und Means, 2008). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die intrazelluläre Lokalisation der Isoformen vom Phosphorylierungsmuster der NMHC gesteuert werden kann. Im Fall von NM IIC sind bisher wenige Daten verfügbar. Ronen und Ravid zeigen, dass die Phosphorylierung der NMHC IIC ebenfalls einen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation ausübt, sowie die lösliche Fraktion freier NM IIC Hexamere steigert (Ronen und Ravid, 2009). Der komplette Zyklus der Aktivierung, Assemblierung und Disassemblierung ist in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt.

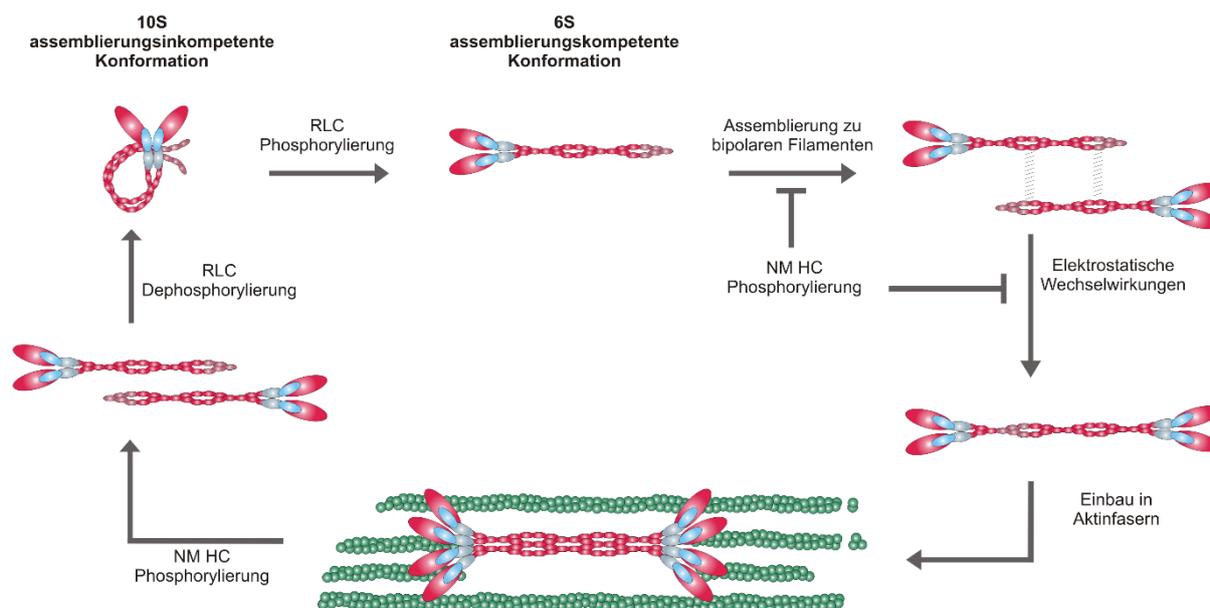


Abbildung 1.6: Aktivierung, Assemblierung und Disassemblierung von NM II-Filamenten.

Gezeigt ist eine schematische Darstellung des Assemblierungs- und Disassemblierungszyklus von NM II-Filamenten, angelehnt am Beispiel von NM IIA. Die Phosphorylierung der RLC überführt das Hexamer von der autoinhibitorischen 10S-Konformation in die aktive 6S-Konformation. Die aktivierten Hexamere assemblieren zu bipolaren Filamenten und binden an Aktinfilamente. Die Phosphorylierung der NMHC II kann sowohl die Assemblierung der Filamente blockieren, als auch die Disassemblierung induzieren.

1.2.5 NM II-Isoform spezifische Einflüsse auf zelluläre Prozesse

Die individuellen kinetischen Eigenschaften und Regulationsmechanismen der NM II-Isoformen lassen darauf schließen, dass diese nicht nur gemeinsame, sondern auch Isoform-spezifische Aufgaben ausüben. Inzwischen haben zahlreiche Studien die Funktionen der NM II-Isoformen auf verschiedenste zelluläre Prozesse charakterisiert. Die Liste umfasst dabei die Zellteilung (im Speziellen die Zytokinese), Zelladhäsion (sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Adhäsionen), Zellmigration und die Morphogenese von Zellen, Geweben sowie subzellulären Kompartimenten (Beach und Hammer, 2015). Interessanterweise wird dabei ein Großteil der Prozesse verhältnismäßig stark durch die Isoform NM IIA beeinflusst, wohingegen die beiden anderen Paraloge weniger offensichtliche Einflüsse ausüben. Um einen Überblick zu erhalten, sind im folgenden Abschnitt die Funktionen der einzelnen NM II-Isoformen auf einige der Prozesse näher beleuchtet.

➤ NM IIA

Der Verlust von NM IIA ist in Mäusen embryonal letal. NM IIA Knockout-Mäuse sterben zwischen E6.5 - E7.5, vermutlich durch die Fehlentwicklung der Keimblätter (Conti et al., 2004). Knockdown Zellen weisen die gravierendsten Defekte in der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Zelladhäsion sowie beim Aufbau der Kontraktilität auf. Die Bildung von SF ist durch die Inhibierung der NM IIA-Aktivität stark beeinträchtigt, insgesamt sind in NM IIA-Knockdown Zellen wesentlich weniger SF

vorhanden (Even-Ram et al., 2007; Shutova et al., 2017). Ebenso wurde in der Arbeit von Cai und Kollegen gezeigt, dass der retrograde Aktinfluss im Lamellum der Zelle durch den Verlust von NM IIA verringert wird (Cai et al., 2006; Ponti et al., 2004). Diese Effekte führen auch zu einer starken Veränderung des zellulären Phänotyps, welche sich in einer runden, flachen Morphologie sowie der Ausbildung langer Zellausläufer widerspiegelt (Even-Ram et al., 2007). In Bezug auf die Zelladhäsion werden sowohl die Bildung von Fokalkontakten als auch die Bildung von Zell-Zell-Adhäsionen durch NM IIA beeinflusst. Fokalkontakte in NM IIA-Knockdown Zellen zeichnen sich durch eine kleine Morphologie aus, was auf unreife Fokalkontakte hinweist (Even-Ram et al., 2007; Sandquist et al., 2006). In embryonalen Stammzellen führt ein Verlust der NM IIA Funktion außerdem zur Mislokalisierung von E-Cadherin, β -Catenin und ZO-2 (Conti et al., 2004), was für eine Funktion von NM IIA beim Aufbau und der Aufrechterhaltung von Adhärenzkontakten und *tight junctions* zwischen benachbarten Zellen spricht. Mehrere Studien haben außerdem den Einfluss von NM IIA auf die Aktomyosin-Kontraktilität untersucht. Messungen der zellulären Kräfte mittels *traction force* Mikroskopie ergaben, dass NM IIA-Knockdown Zellen zwischen 60-100% ihrer Kontraktilität verlieren (Cai et al., 2006; Shutova et al., 2017; Thomas et al., 2015). Die Rolle der Aktomyosin-Kontraktilität während der Zellmigration, ist Gegenstand zahlreicher Studien. NM IIA wird dabei eine Funktion bei der Initiierung des Symmetriebruchs durch Kontraktionen zugeschrieben, was letztlich zur Ausbildung eines polarisierten Phänotyps führt (Sandquist et al., 2006; Vicente-Manzanares et al., 2011). Die Ausbildung langer Zellausläufer am *trailing edge* in NM IIA-Knockdown Zellen, lassen außerdem auf eine Funktion bei der Retraktion des Zellendes schließen. Bezüglich der effektiven Migrationsgeschwindigkeit existieren unterschiedliche Ergebnisse, welche von einer leichten Reduzierung der Geschwindigkeit (Shutova et al., 2017) bis zu einer dreifachen Zunahme der Geschwindigkeit (Even-Ram et al., 2007) reichen.

➤ **NM IIB**

NM IIB-Knockout Mäuse sterben zwischen E14.5 und der Geburt und weisen bis zu diesem Stadium starke Herz- und Gehirndefekte auf (Tullio et al., 1997; Tullio et al., 2001). Analysen der betroffenen Gewebe offenbarten Defekte während der Zytokinese von Kardiomyozyten (Takeda et al., 2003) und eine ungerichtete Zellmigration von Neuronen (Ma et al., 2004). Obwohl ein Verlust von NM IIB drastische Effekte während der Embryonalentwicklung aufweist, sind eindeutige Effekte in nicht-muskulären Geweben wie Epithelien oder dem Bindegewebe, kaum vorhanden. Globale Effekte wie beim Verlust von NM IIA wurden bisher selten beobachtet und viele Studien erzielen unterschiedliche, teils widersprüchliche Ergebnisse.

Eine Arbeit von Vicente-Manzanares und Kollegen postuliert die Stabilisierung von SF und Fokalkontakten durch NM IIB, insbesondere während der Polarisierung und der Zellmigration. Ein Knockdown von NM IIB führt hier zur Ausbildung kürzerer und dünnerer Aktinbündel in epithelialen CHO-K1 Zellen, außerdem sind viele kleine Zellausläufer rund um die Zelle vorhanden (Vicente-Manzanares et al., 2007). Andere Studien weisen hingegen keinen Einfluss auf den Phänotyp oder die Fokalkontakte von Fibroblasten durch den Knockdown von NM IIB nach (Even-Ram et al., 2007; Shutova et al., 2017). Chang und Kumar zeigen außerdem, dass der Knockdown von NM IIB eine

Veränderung der Dynamik von peripheren und zentralen SF herbeiführt. Dabei steigt die Retraktionszeit von zentralen SF an, während die von peripheren reduziert wird (Chang und Kumar, 2015). Eine aktuelle Studie postuliert eine Rolle von NM IIB bei der Organisation von Adhärenzkontakten. Demnach ist NM IIB in das Clustering von E-Cadherin involviert und hält eine quervernetzte Aktinschicht aufrecht, welche die E-Cadherin Komplexe mit Aktinfasern verbindet (Heuze et al., 2019). Die krafterzeugenden Eigenschaften von NM IIB wurden in diversen Studien untersucht und führen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Cai und Kollegen ermitteln eine Reduktion der Kontraktilität von 30% in NM IIB-Knockdown Zellen, in einer Publikation von Shutova und Kollegen führt der Knockdown zu keiner Reduktion der Kontraktilität (Cai et al., 2006; Shutova et al., 2017). In einer weiteren Arbeit wird hingegen eine Anpassung der Kontraktilität über die Zeit beobachtet. Während die Kontraktilität in NM IIB-Knockdown Zellen nach 1 h Inkubation unbeeinträchtigt ist, sind nach 16 h über 90% der Kräfte verloren (Thomas et al., 2015). Insbesondere in Bezug auf die Zellmigration widerspricht sich die Datenlage. Ein Teil der Publikationen spricht für eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit durch den Knockdown von NM IIB (Betapudi et al., 2006; Kim und Adelstein, 2011; Lo et al., 2004; Sandquist et al., 2006; Thomas et al., 2015), andere zeigen hingegen eine unveränderte Migrationsgeschwindigkeit (Doyle et al., 2012; Jorrisch et al., 2013; Shih und Yamada, 2010; Shutova et al., 2017). Einheitlich ist dabei jedoch die Ansicht, dass NM IIB während der Polarisierung und Migration die Struktur des Zellzentrums aufrechterhält (Vicente-Manzanares et al., 2008). Dabei wird nicht nur die Aktinstruktur stabilisiert, sondern auch die Positionierung und Translokation des Zellkerns gesteuert (Thomas et al., 2015; Vicente-Manzanares et al., 2009b).

➤ **NM IIC**

Über die Funktionen von NM IIC ist bisher mit Abstand am wenigsten bekannt. In einer Arbeit von Wylie und Chantler wird NM IIC eine Rolle bei der neuronalen Zelladhäsion und der Bildung axonaler Ausläufer zugeschrieben (Wylie und Chantler, 2008). In epithelialen Zellen wurde zudem gezeigt, dass die alternative Spleißform NM IIC1 für den korrekten Ablauf der Zytokinese notwendig ist (Jana et al., 2006). Dabei wird zwar eine Spaltfurche ausgebildet, jedoch ist die Zytokinese zeitlich verzögert. Da diese Studie bisher nur an kanzerogenen Zellen durchgeführt wurde und NM IIC1 in epithelialen Krebszellen verstärkt exprimiert wird, kann über eine Rolle von NM IIC1 bei der Zellproliferation spekuliert werden. Ebenfalls in epithelialen Zellen von Mäusen wurde zudem eine verstärkte Lokalisation von NM IIC an der apikalen Seite der Zellen beobachtet (Golomb et al., 2004).

1.3 Einfluss der extrazellulären Topographie und Geometrie

Die Ausprägung der Aktomyosin-Kontraktilität wird maßgeblich durch den strukturellen Aufbau der extrazellulären Umgebung beeinflusst. Unter physiologischen Bedingungen besteht die extrazelluläre Umgebung aus einem dreidimensionalen Fasernetzwerk mit variierender Dichte und einer heterogenen Verteilung von adhäsiven und repulsiven Adhäsionsmolekülen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das gleiche EZM-Protein zu unterschiedlichen Phänotypen führt, abhängig davon

ob es in einem 3D-Netzwerk aus Filamenten organisiert ist oder homogen auf einer Oberfläche präsentiert wird (Cukierman et al., 2001; Cukierman et al., 2002; Grinnell et al., 2003; Katz et al., 2000). Die Fähigkeit von Zellen, sich auf einem Substrat abzuflachen oder in einem Netzwerk aufzuspannen, variiert mit dem Abstand der adhäsiven und repulsiven Bereiche, da Aufbau und Verteilung der Zugspannungen von der räumlichen Verankerung an der EZM abhängen (Geiger et al., 2009; Klein et al., 2010; Labouesse et al., 2015; Lehnert et al., 2004). Studien mit mikrostrukturierten 2D-Substraten, die variable Abstände von zellabweisenden und zelladhäsiven Bereichen aufweisen, haben gezeigt, dass kurze Distanzen $<5 \mu\text{m}$ durch quervernetztes Aktin überbrückt werden können, wobei sich Zellausläufer mit konkaver oder konvexer Kontur bilden (Lehnert et al., 2004). Die Überbrückung größerer passiver Bereiche erfordert hingegen eine Konturverstärkung durch gebündelte, kontraktile Aktinfasern. Die Kontraktilität in diesen peripheren Aktinfasern wirkt der Oberflächenspannung des Aktincortex entgegen und gewährleistet die Aufspannung des Zellkörpers zwischen nicht-adhäsiven Bereichen (Bischofs et al., 2008; Thery et al., 2006).

Inwiefern sich diese Beobachtungen auf eine komplexere 3D-Umgebung übertragen lassen, ist Gegenstand aktueller Forschung. Elliot und Kollegen zeigen, dass die Kontraktilität des Aktincortex eine Verzweigung des Zellkörpers in 3D-Kollagengelen limitiert (Elliott et al., 2015). Analog zu Zellen auf 2D-Substraten, führt die Cortexspannung hier zu einer Minimierung der Zelloberfläche. Die Ausbildung und Funktion von SF in 3D-Umgebungen wird hingegen noch immer kontrovers diskutiert. Teilweise wurden SF als Artefakte angesehen, die nur in artifizialen 2D-Situationen wie Zellkulturschalen auftreten (Burridge und Wittchen, 2013; Vallenius, 2013). Aktuelle Publikationen zeigen jedoch, dass SF auch in Zellen vorhanden sind, die in einer 3D-Matrix aus dicken Kollagenbündeln oder Fimbrin kultiviert wurden (Doyle et al., 2015; Gateva et al., 2014; Owen et al., 2017). Die SF in 3D-Umgebungen sind jedoch oftmals dünner und weniger zahlreich (Lee und Kumar, 2016). Owen und Kollegen zeigen zudem, dass SF in 3D zwar intrazelluläre Kontraktilität aufbauen, jedoch eine wesentlich geringere Dynamik als auf flachen 2D-Substraten aufweisen (Owen et al., 2017). Diese Beobachtung spricht dafür, dass SF in 3D ebenfalls zur Stabilisierung des Zellkörpers beitragen. Ob SF in 3D ebenfalls in verschiedene Subtypen klassifiziert werden können, ist bisher nicht bekannt. Ebenso ist bisher die Frage ungeklärt, ob die schwächere Ausprägung und Dynamik von SF in 3D auch zu einer geringeren intrazellulären Kontraktilität führt.

1.4 Analyse der Aktomyosin-Kontraktilität auf definierten Substraten

Viele Studien der Aktinstruktur und der Aktomyosin-Kontraktilität auf homogen beschichteten Substraten haben den Nachteil, dass die Zellmorphologie, Anordnung der Fokalkontakte und Organisation des Aktinzytoskeletts aufgrund der undefinierten Adhäsionsfläche stark variieren. Dadurch ist die Vergleichbarkeit der Zellen untereinander limitiert und eine quantitative Analyse erschwert. Eine Möglichkeit diese Problematik zu umgehen, ist die Zellmorphologie und -adhäsion durch die Verwendung von mikrostrukturierten Substraten zu steuern. Indem die Adhäsionsproteine in einem spezifischen Muster auf der Substratoberfläche vorliegen, werden die Zellen in eine

vordefinierte Form gezwungen. Eine weit verbreitete Methode zur Herstellung solcher Substrate ist das *Microcontact printing* (μ CP), welche die Herstellung von zelladhäsiven und zellabweisenden Bereichen ermöglicht (Mrksich und Whitesides, 1996). Die Einschränkung der Adhäsionsfläche auf solchen Substraten verhindert die Zellmigration und drängt die Zellen in eine standardisierte Morphologie, was eine quantitative Analyse der Zellen vereinfacht (Singhvi et al., 1994).

Diverse Studien haben mikrostrukturierte 2D-Substrate benutzt, um den Einfluss der Aktomyoin-Kontraktilität auf die phänotypische Ausprägung der Zellen zu charakterisieren. They und Kollegen zeigen auf strukturierten Substraten, dass SF entlang der Zellkontur notwendig sind, um nicht-adhäsive Bereiche zu überspannen. Die SF weisen dabei eine charakteristische, konkave Krümmung auf, welche der Oberflächenspannung des Cortex entgegenwirkt (They et al., 2006). Die gleichen konkaven Aktinbögen wurden auch in der Arbeit von Bischofs und Kollegen auf mikrostrukturierten Dot-Substraten beobachtet. Zudem wurde gezeigt, dass die Kontur der peripheren Aktinfasern einem Kreisbogen entspricht, dessen Radius mit zunehmender Distanz zwischen den Adhäsionspunkten linear ansteigt. Des Weiteren ist die Dimension des Radius von der Aktomyosin-Kontraktilität abhängig (Bischofs et al., 2008). Anhand dieser Daten, wurde ein biophysikalisches Modell zur Beschreibung der Zellmorphologie in Abhängigkeit von der Aktomyosin-Kontraktilität aufgestellt. Labouesse und Kollegen nutzen mikrostrukturierte Polyacrylamid-Gele um den Einfluss der ROCK-Aktivität sowie der NM II-Aktivität auf den zellulären Phänotyp zu untersuchen und nutzen diese Ergebnisse ebenfalls, um ein physikalisches Modell darauf aufzubauen (Labouesse et al., 2015). In einer weiteren Arbeit wurden strukturierte Substrate eingesetzt, um die Retraktion einzelner SF mit definierter Länge nach der Laserablation zu quantifizieren, sowie den globalen Effekt auf das gesamte Aktinzytoskelett zu charakterisieren (Kassianidou et al., 2017). Während der globale Einfluss der Aktomyosin-Kontraktilität auf den zellulären Phänotyp durch diese Publikationen inzwischen gut charakterisiert ist, wurden bisher kaum Analysen in Abhängigkeit von den einzelnen NM II-Isoformen durchgeführt.

Die Herstellung mikrostrukturierter 3D-Substrate gestaltet sich hingegen weitaus komplizierter. Um mikrostrukturierte 3D-Substrate herzustellen, hat sich das Verfahren des direkten Laserschreibens (DLS) bewährt (Greiner et al., 2015; Klein et al., 2011; Klein et al., 2010; Richter et al., 2017). Diese Methode ermöglicht die Herstellung von 3D-Polymerstrukturen mit einer Kontrolle über die 3D-Architektur im Mikrometerbereich. Durch die Verwendung von mehreren Polymeren mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften, können zudem Adhäsionsstellen definiert angeordnet werden, was eine Substrukturierung der 3D-Struktur mit adhäsiven und repulsiven Bereichen ermöglicht (Klein et al., 2011) (Vgl. Kapitel 3.9.2). In der Vergangenheit wurden mikrostrukturierte 2D-Substrate bereits genutzt, um neue biophysikalische Modelle zur Beschreibung der Zellmorphologie in Abhängigkeit von der Aktomyosin-Kontraktilität, aufzustellen (Bischofs et al., 2008; Labouesse et al., 2015). Die prinzipiell frei wählbare Geometrie von DLS-Mikrostrukturen erlaubt es, experimentelle Daten für vergleichende Modelle von Zellen in 3D zu generieren.

1.5 Physikalische Beschreibung der Aktomyosin-Kontraktilität

Da die Krafterzeugung durch Aktomyosin-Kontraktilität als ein mechanischer Vorgang beschrieben werden kann, gibt es mittlerweile eine Vielzahl von Modellen mit denen man versucht, die physikalischen Eigenschaften der SF zu simulieren (Kruse und Julicher, 2000; Stachowiak et al., 2012; Yoshinaga et al., 2010; Ziebert und Zimmermann, 2004). Dabei können SF als Kraft-Dipole betrachtet werden (Schwarz et al., 2002; Schwarz und Safran, 2002), wobei ein Kräftegleichgewicht zwischen Zelle und Substrat herrscht. Eines der bekanntesten Modelle zur Erklärung von Form und Zellmechanik ist das sogenannte Tensegrity-Modell (Galli et al., 2005). Nach diesem Modell wird die Zellform durch Ausbalancieren der mechanischen Kräfte zwischen dem kontraktilen Aktinzytoskelett sowie weiteren zytoskelettalen Stützstreben und adhäsiven Verankerungswiderständen bestimmt. Einer aufgrund kontraktiler Filamente einwärts gerichteten Zugspannung wirken starre Mikrotubuli und die Verankerung an der EZM oder anderen Zellen entgegen. Anhand von Experimenten auf strukturierten 2D-Substraten hat sich ein weiteres Modell etabliert, welches die Zellmorphologie nicht nur in Abhängigkeit von der Spannung (Kontraktilität) erklärt, sondern auch Elastizität in den Aktinstrukturen miteinbezieht (Bischofs et al., 2008; Labouesse et al., 2015; They et al., 2006).

➤ **Spannungs-Elastizitätsmodell (engl. *tension-elasticity model*)**

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten beschrieben, ist die Ausbildung von konkaven Aktinfasern entlang der Zellkontur ein deutliches Charakteristikum von Zellen, die passivierte Bereiche auf strukturierten Substraten überbrücken. Die Fasern weisen dabei eine zirkuläre Form auf, wodurch Kreisbögen an die Fasern angelegt werden können. Es ist bekannt, dass die Membran- und Faserkrümmung von zwei unterschiedlichen Spannungen abhängt: Oberflächenspannung und Linienspannung (Bar-Ziv et al., 1999). Die Oberflächenspannung resultiert aus der Membranspannung sowie der Cortexspannung (Sheetz, 2001), während die Linienspannung in den kontraktilen peripheren Aktinbögen aufgebaut wird (Bischofs et al., 2009). Ein einfaches Konturmodell kann die konkaven Aktinbögen beschreiben, indem die Linienspannung λ in den Bögen durch die Oberflächenspannung σ ausbalanciert wird. Im Equilibrium wird der Radius R eines Aktinbogens durch das Verhältnis $R = \lambda/\sigma$ bestimmt. Die Oberflächenspannung minimiert die Zelloberfläche durch nach innen gerichtete Kräfte, was entsprechend des LaPlace-Gesetzes zu einer runden Zellmorphologie führen würde. Da die Zelle jedoch abgeflacht und an den Enden der Aktinfasern über Fokalkontakte am Substrat verankert ist, bilden sich zwischen den Adhäsionen bogenförmige Einbuchtungen. Dem entgegen wirken laterale Kräfte zwischen den Adhäsionen in Form der Linienspannung λ . Die Kräfte werden an jedem Punkt der Kontur ausgeglichen und lassen für alle entstehenden Bögen denselben Radius unabhängig vom Abstand erwarten (Bischofs et al., 2008).

In den Experimenten von Bischofs und Kollegen wurde allerdings ein linearer Anstieg des Kreisradius R mit zunehmender Distanz d zwischen den peripheren Adhäsionspunkten beobachtet. Diese Abhängigkeit von d kann durch Spannung in Form von Aktomyosin-Kontraktilität alleine nicht erklärt werden. Da elastische Effekte von absoluten Abständen abhängig sind, wurde das einfache Konturmodell zu einem Spannungs-Elastizitätsmodell modifiziert (Bischofs et al., 2008). Unter der

Annahme, dass der Oberflächenspannung eine Linienspannung entgegenwirkt, die eine elastische Komponente enthält, kann ein linearer Zusammenhang zwischen R und d hergestellt werden. Computersimulationen mit aktiven Kabelnetzwerken, die unter Zug dehnbar sind, stimmen mit den experimentellen Resultaten überein. Der Einfluss einer elastischen Komponente auf die Aktomyosin-Kontraktilität und den Zellphänotyp wurde in diversen Publikationen und Übersichtsartikeln postuliert und mittels Computergesteuerter Simulationen bestätigt (Albert und Schwarz, 2014; Banerjee und Giomi, 2013; Bischofs et al., 2008; Bischofs et al., 2009; Guthardt Torres et al., 2012). Ob die gleichen physikalischen Parameter auch für Zellformen und Kräfte in 3D zutreffen, ist bisher jedoch nicht untersucht. Auch ist nichts darüber bekannt, ob unterschiedliche NM II-Isoformen variable Einflüsse auf Spannung und Elastizität in den Aktinbögen haben.

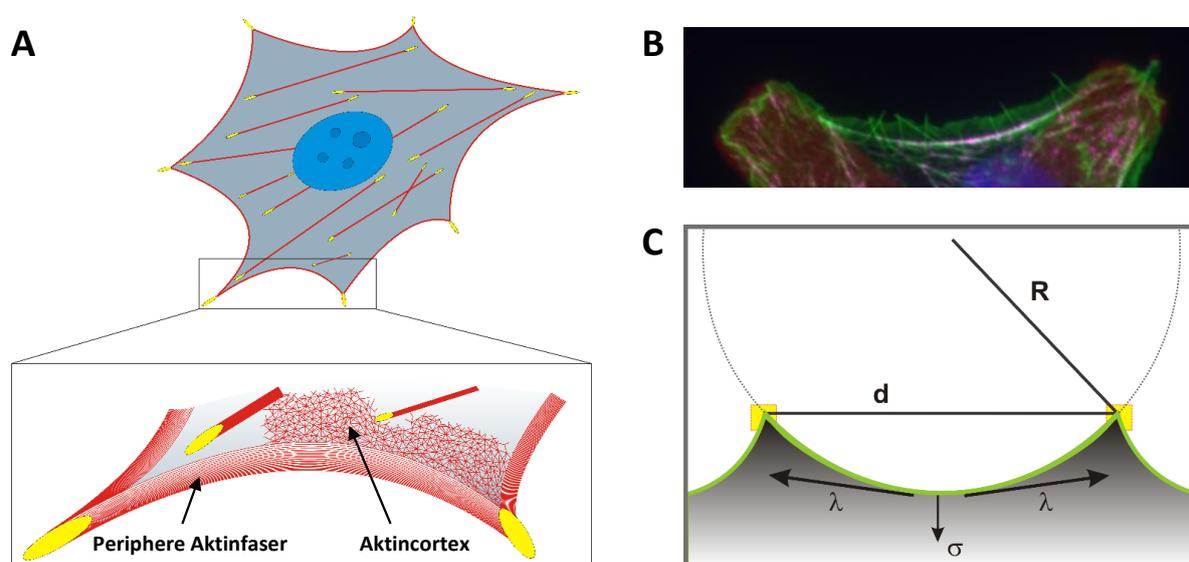


Abbildung 1.7: Konkave Aktinbögen und Spannungs-Elastizitätsmodell nach Bischofs et al.

(A) Schematische Darstellung einer Zelle, die entlang der Zellkontur konkave Aktinbögen ausbildet, um den nicht adhäsiven Bereich zwischen den Fokalkontakten zu überbrücken. Der Aktincortex trägt zur Oberflächenspannung bei und wirkt der Linienspannung in der konkaven Aktinfaser entgegen. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Aktinbogens (grün). (C) Spannungs-Elastizitätsmodell nach Bischofs et al. Die Linienspannung λ wirkt der Oberflächenspannung σ entgegen und führt durch das Verhältnis $R = \lambda / \sigma$ zur Ausbildung von Kreisbögen in der Zellperipherie. Der Radius R der peripheren Aktinbögen nimmt mit steigender Spanndistanz d zwischen den Adhäsionspunkten (gelb) zu, was durch Implementierung einer elastischen Komponente in das Modell erklärt werden kann.

2 Motivation und Zielsetzung

Eine Vielzahl an Studien hat die Bedeutung der Aktomyosin-Kontraktilität in nicht-muskulären Zellen auf fundamentale zelluläre Prozesse charakterisiert. Dabei haben sich neben klassischen zellbiologischen Experimenten auf homogen beschichteten Deckgläsern auch der Einsatz strukturierter Substrate sowie computergesteuerte Simulationen als nützliche Werkzeuge etabliert, um das Aktomyosin-System zu analysieren. Bischofs und Kollegen nutzten diese Methoden, um zu verdeutlichen, dass die Zellmorphologie nicht alleine durch Aktomyosin-Kontraktilität in Form von Spannung erklärt werden kann, sondern auch das Vorhandensein einer elastischen Komponente in den Aktinstrukturen erforderlich ist (Bischofs et al., 2008; Labouesse et al., 2015). Die bisherigen Analysen und Modellierungen stützen sich ausschließlich auf Zellphänotypen in 2D Situationen. In einer physiologischen Umgebung sind die Zellen allerdings in einer komplexen 3D-Matrix eingebettet. Inwiefern Analysen und Modelle aus 2D-Zellkultursystemen auch für eine 3D Situation gültig sind, wurde bisher nicht verglichen.

Weiterhin wird das Aktomyosin-System oftmals als eine Einheit aus Aktinfilamenten und kontraktilen NM II-Motoren angesehen und Beeinflussungen der Myosin-Aktivität werden durch die Verwendung globaler, pharmakologischer Inhibitoren herbeigeführt. In nicht-muskulären Zellen werden jedoch bis zu drei verschiedene Isoformen von NM II-Motorproteinen exprimiert. Die unterschiedlichen kinetischen, strukturellen und dynamischen Eigenschaften der Isoformen deuten darauf hin, dass sie nicht nur redundante Versionen des gleichen Proteins sind, sondern unterschiedlichen Einfluss auf das Aktomyosin-System ausüben können. Nach wie vor ist jedoch nicht klar, wie und in welchem Ausmaß die individuellen NM II-Isoformen den zellulären Phänotyp beeinflussen (Conti und Adelstein, 2008; Vicente-Manzanares et al., 2009b).

Ausgehend von diesen offenen Fragestellungen, gliedert sich die Arbeit in folgende Abschnitte:

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden Zellphänotypen in mikrostrukturierten 3D-Substraten analysiert. Durch einen qualitativen und quantitativen Vergleich zu Zellen auf mikrostrukturierten 2D-Substraten, wurde erörtert, inwiefern sich physikalische Parameter des 2D TEM auf eine 3D Situation übertragen lassen.

Um den Einfluss der einzelnen NM II-Isoformen spezifisch zu analysieren, wurden im zweiten Teil der Arbeit mittels CRISPR/Cas9 KO-Zelllinien für jede Isoform erzeugt und der Einfluss auf den Zellphänotyp, die Aktinstruktur und die Zelladhäsion charakterisiert. Weiterhin wurde mit Hilfe von strukturierten Substraten quantitativ erörtert, welchen Einfluss die unterschiedlichen NM II-Isoformen sowie verschiedene NM IIA-Mutationen auf den zellulären Phänotyp und die von Bischofs und Kollegen etablierten TEM-Gesetzmäßigkeiten ausüben.

In dritten Teil wurde mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie erörtert, wie die Aktivität der NM II-Filamente und der Aufbau des Aktomyosin-Systems durch den Verlust von NM IIA und NM IIB beeinflusst werden, und welche Rolle dabei heterotypische Filamente einnehmen.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Puffer, Antibiotika und Kulturmedien

Standard-Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) mit höchstem analytischem Reinheitsgrad (p.a.) bezogen. Für wässrige Lösungen wurde hochreines Wasser einer Reinstwasser-Anlage von TKA verwendet. Für sterile Anwendungen und die Arbeit mit Nukleinsäuren wurde das Wasser zusätzlich autoklaviert.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Artikel	Hersteller Artikelnummer	Angaben
1-Octadecylmercaptan (ODM)	Sigma-Aldrich Art-Nr.: O1858	98 % 1,5 mM in EtOH
3-Methacryloxypropyl-trimethoxysilan	Sigma-Aldrich Art-Nr.: 440159	1 mM in Toluol
Acrylamid Rotiphorese Gel 30	Carl Roth Art-Nr.: 3029.1	Wässrige 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung (37,5:1)
Agar-Agar Kobe I	Carl Roth Art-Nr.: 5210.2	Herstellung von Agarplatten für die Mikrobiologie
Agarose NEEO Ultra Qualität	Carl Roth Art-Nr.: 2267.4	Herstellung von Agarose-Gelen
Ammoniumpersulfat (APS)	PlusOne Art-Nr.: 17-1311-01	10 % in ddH ₂ O Herstellung von SDS-Gelen
Blebbistatin	Sigma-Aldrich Art-Nr.: B0560	Myosin-Inhibitor 10 mM in DMSO
Bovines Kälberserum (FCS)	HyClone Art-Nr.: SH30541.03	10 % in DMEM
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Art-Nr.: A9418	Antikörperinkubation (1 % in PBS) Substratpassivierung (10 mg/ml)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Art-Nr.: D2650	Lösemittel für Inhibitoren Kryo-Konservierung von Zellen
DMEM (<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>)	PAN Biotech Art-Nr.: P04-03590	Kulturmedium für Routine Zellkultur
DMEM mit HEPES, ohne Phenolrot	ThermoFisher Scientific Art-Nr.: 21063029	Kulturmedium für Zeitraffer- aufnahmen
<i>DNA Gel loading dye</i>	ThermoFisher Scientific Art-Nr.: R0611	6x Stocklösung
Fibronektin aus humanem Plasma	Sigma-Aldrich Art-Nr.: F1056	Beschichtung von Zellsubstraten Stammlösung: 1 mg/ml
Glutaraldehyd (GA)	AppliChem Art-Nr.: A3166	Fixierung von SEM Proben

Artikel	Hersteller Artikelnummer	Angaben
HS-C11-EG6-OH	ProChimia Art-Nr: TH-001-m11.n6	Passivierung von 2D-Substraten 1 mM in EtOH
HS-C11-EG6-OMe	ProChimia Art-Nr.: TH 006-n6-0.1	Passivierung von 2D-Substraten 1 mM in EtOH
Lipofectamine 2000	ThermoFisher Scientific Art-Nr.: 11668027	Lipofektionsreagenz
Magermilchpulver	Fluka Analytical Art-Nr.: 70166	5 % in PBS-Tween-20 Blockierlösung für Western Blot
Mowiol 4-88	Merck Millipore Art-Nr.: 475904	Einbettmedium (31 g/mol)
n-Propylgallat	Sigma-Aldrich Art-Nr.: P-3130	Zusatz zu Einbettmedium
Opti-MEM	ThermoFisher Scientific Art-Nr.: 11058-021	Transfektionsmedium
OrmoComp®	Microresist GmbH -	Fotolack zur Herstellung von 3D-Strukturen
Page Ruler Plus Prestained Protein-Leiter	ThermoFisher Scientific Art-Nr.: 26619	Marker zur Größenbestimmung von Proteinen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck Millipore Art-Nr.: 1040051000	Fixierlösung 4 % in PBS
PBS (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)	PAN Biotech Art-Nr.: P04-36500	Waschlösung für Zellkulturen ohne Calcium und Magnesium
PeqGOLD 1 kb DNA-Leiter Mix	VWR Art-Nr.: 732-3281	Marker zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren
Polydimethylsiloxan Sylgard 184 (PDMS)	Dow Corning Art-Nr: 000105989377	Herstellung von Stempeln für das μCP
Roti® GelStain	Carl Roth Art-Nr.: 3865.1	Fluoreszenz-Färbung von Nukleinsäuren in Agarosegelen.
<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate</i>	ThermoFisher Scientific Art-Nr.: 34080	Chemilumineszenzdetektion von Proteinen auf Western Blots
TEMED	Carl Roth Art-Nr.: 2367.3	Herstellung von SDS-Gelen
Trimethylpropan Ethoxylat Triacrylat (TPE-TA)	Sigma-Aldrich Art-Nr.: 409073	Fotolack zur Herstellung von 3D-Strukturen
Triton X-100	Carl Roth Art-Nr.: 3051	Permeabilisierung von Zellen 0,1 % in PBS
Trypsin/EDTA	Life Technologies Art-Nr.: 15400-054	Ablösen von Zellen
Tween 20	Carl Roth Art-Nr.: 9127	Waschlösung für Western Blots 0,05 % in PBS
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Art-Nr.: M6250	1 % (v/v) in PBS

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Agarose (1 %)	1 % Agarose in 1x TAE (w/v) Vor Gebrauch zugeben: 0,05 % Roti® GelStain	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren
Western Blot-Puffer	146,5 mM Glycin-HCl 19,8 mM Tris H ₂ O:Methanol (3:1)	Western Blot
Laemmli-Puffer (10x)	250 mM Tris 192 mM Glycin 1 % SDS (v/v) pH 8,2	Elektrophorese-Puffer für SDS-PAGE
Mowiol mit n-Propylgallat	20 % Mowiol 4-88 (w/v) 0,2 % Thimerosal (v/v) 1 Spatelspitze n-Propylgallat in 1x PBS:Glycerin (2:1) pH 8	Einbettmedium für Zellpräparate
PBS-Tween-20	0,05 % Tween-20 in 1x PBS pH 7,4	Waschlösung für Western Blots
PBS-Triton X-100	0,1 % Triton X-100 in 1x PBS pH 7,4	Permeabilisieren von Zellen
PFA (4 %)	4 % PFA in 1x PBS pH 7,4	Fixierlösung für Zellen
PFA/GA (2 %)	Je 2 % PFA & GA in 1x PBS pH 7,4	Fixierlösung für REM-Proben
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS (v/v) pH 6,8	Bestandteil von Acrylamid- Sammelgelen
SDS-Probenpuffer (3x)	187,5 mM Tris/HCl 6 % SDS (v/v) 30 % Saccharose (v/w) 0,01 % Bromphenolblau (v/w) 5 % β-Mercaptoethanol (v/v) pH 6,8	Reduzierender Probepuffer für die SDS-PAGE
TAE (10x)	40 mM Tris 20 mM NaOAc 1 mM EDTA pH 8	Elektrophorese-Puffer für Agarose- Gele
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS pH 8,8	Bestandteil von Acrylamid- Trenngelen

Tabelle 3: Antibiotika und Toxine

Handelsname	Hersteller und Artikelnummer	Endkonzentration
Ampicillin	Carl Roth Art-Nr.: HP62.1	100 µg/ml
Kanamycin	Carl Roth Art-Nr.: T832.1	50 µg/ml
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	ThermoFisher Scientific Art-Nr.: 15140122	10 U/ml
Puromycin Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich Art-Nr.:P7255	5 µg/ml

Tabelle 4: Kulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
DMEM-FCS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ DMEM ▪ 10 % FCS 	Medium für Routine Zellkultur
DMEM-FCS für Lebendzellmikroskopie	<ul style="list-style-type: none"> ▪ DMEM ohne Phenolrot ▪ 10 % FCS ▪ 1% Pen/Strep 	Medium für Zeitrafferaufnahmen.
LB-Medium	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 10 g/l Trypton ▪ 5 g/l Hefeextrakt ▪ 10 g/l NaCl ▪ pH 7 <p>Für Plattenkultur:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 15 g/l Agar-Agar <p>Optional:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ampicillin (100 µg/ml) ▪ Kanamycin (50 µg/ml) 	Komplexes Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien

3.2 Nukleinsäuren, DNA-modifizierende Enzyme und Reaktions-Kits

Nukleotide für die Amplifikation von Nukleinsäuren wurden von der Firma Peqlab VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen (peqGOLD dNTP-Mix, Art.-Nr.: 20-3010) und mit einer Endkonzentration von je 0,2 mM eingesetzt.

Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) ohne Modifikationen synthetisiert und in autoklaviertem ddH₂O resuspendiert (Endkonzentration: 100 µM). Kursive Basen in Klammern markieren komplementäre Überhänge zu BbsI Restriktionsschnittstellen für die Ligation in pSPCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Vektoren.

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz
M13 sense Primer	5' GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13 antisense Primer	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'
MYH9_Exon2 sense Primer	5' GCAAAGAGAAGAGGTGTGAGC 3'
MYH9_Exon2 antisense Primer	5' AGTTCAAGGATGTCACCCCA 3'
MYH9 gRNA Sequenz	5' (CACC) GCACGTGCCTCAACGAAGCCT 3'
MYH9 gRNA Sequenz (rc)	5' (AAAC) AGGCTTCGTTGAGGCACGTGC 3'
MYH10_Exon2 sense Primer	5' GTTAGTATGGCTGTGAAGAGGT 3'
MYH10_Exon2 antisense Primer	5' TCAAAGAAAAGCAAGACATGGGT 3'
MYH10 gRNA Sequenz	5' (CACC) GCTGAAGGATCGCTACTATTC 3'
MYH10 gRNA Sequenz (rc)	5' (AAAC) GAATAGTAGCGATCCTTCAGC 3'
MYH14 gRNA Sequenz	5' (CACC) GCGGAGTAGTACCGCTCCCGG 3'
MYH14 gRNA Sequenz (rc)	5' (AAAC) CCGGGAGCGGTACTACTCCGC 3'
U6 Promoter sense Primer	5' CGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGC 3'

Tabelle 6: Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme

Name	Firma	Konzentration
Agel	ThermoFisher Scientific	10 U/ μ l
Alkalische Phosphatase	ThermoFisher Scientific	1 U/ μ l
BbsI (Bpil)	ThermoFisher Scientific	10 U/ μ l
HindIII	ThermoFisher Scientific	10 U/ μ l
SacII (Cfr42I)	ThermoFisher Scientific	10 U/ μ l
Sall	ThermoFisher Scientific	10 U/ μ l
T4 DNA Ligase (<i>Quick Ligase</i>)	New England Biolabs	5 U/ μ l
T4 DNA Polymerase	ThermoFisher Scientific	5 U/ μ l
T4 Polynukleotidkinase	ThermoFisher Scientific	10 U/ μ l
VeraSeq 2.0 DNA Polymerase	QIAGEN	2 U/ μ l

Tabelle 7: Kits

Name	Firma	Verwendung
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN	Aufreinigung von genomischer DNA
QIAGEN Plasmid Plus Midi Kit	QIAGEN	Aufreinigung von Plasmid-DNA
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN	Aufreinigung von Plasmid-DNA
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN	DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen
SigmaSpin Sequencing Reaction Clean-Up	Sigma-Aldrich	Umpuffern von Restriktionsverdau
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit	ThermoFisher	<i>Blunt-End</i> Ligation

3.3 Antikörper und Affinitätsfarbstoffe

Tabelle 8: Primärantikörper

Antigen	Isotyp/Konzentration	Organismus	Verdünnung	Hersteller
α -Tubulin	IgG monoklonal N/A	Maus	1:1000 (IHC) 1:2000 (WB)	Sigma-Aldrich Art-Nr.: T5168
β -Catenin	IgG monoklonal N/A	Maus	1:500	BD Biosciences Art-Nr.: 610153
Fibronektin	IgG monoklonal 250 μ g/ml	Maus	1:500	BD Biosciences Art-Nr.: 610077
NMHC IIA	IgG polyklonal 1 mg/ml	Kaninchen	1:500 (IHC) 1:1000 (WB)	BioLegend Art-Nr.: 909801
NMHC IIB	IgG polyklonal 1 mg/ml	Kaninchen	1:500 (IHC) 1:1000 (WB)	BioLegend Art-Nr.: 909901
NMHC IIC (D4A7)	IgG monoklonal N/A	Kaninchen	1:100 (IHC) 1:1000 (WB)	Cell Signaling Art-Nr.: 8189S
Paxillin	IgG monoklonal 250 μ g/ml	Maus	1:500	BD Biosciences Art-Nr.: 610619
pMLC2 (Ser19)	IgG monoklonal N/A	Maus	1:200	Cell Signaling Art-Nr.: 3671S
pPaxillin (Y31)	IgG polyklonal N/A	Kaninchen	1:200	Abcam Art-Nr.: ab4832

Tabelle 9: Sekundärantikörper

Antigen	Organismus	Konjugat	Konzentration/ Verdünnung	Hersteller
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa Fluor 488	2 mg/ml 1:200	Life technologies Art-Nr.: A11070
Kaninchen IgG	Ziege	Cy3	1,5 mg/ml 1:200	Jackson Immunoresearch Art-Nr.: 111-165-144
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa Fluor 647	2 mg/ml 1:200	Life technologies Art-Nr.: A21246
Kaninchen IgG	Esel	HRP	0,8 mg/ml 1:5000	Jackson Immunoresearch Art-Nr.: 711-036-152
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor 488	2 mg/ml 1:200	Life technologies Art-Nr.: A11029
Maus IgG	Ziege	Cy3	1,5 mg/ml 1:200	Jackson Immunoresearch Art-Nr.: 111-165-166
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor 647	2 mg/ml 1:200	Life technologies Art-Nr.: A21236
Maus IgG	Esel	HRP	0,8 mg/ml 1:5000	Jackson Immunoresearch Art-Nr.: 715-035-150

Tabelle 10: Affinitätsfarbstoffe

Bindungspartner	Sonde	Konjugat	Konzentration/ Verdünnung	Hersteller
Aktin	Phalloidin	Alexa Fluor 488	6,6 µM 1:200	Life technologies Art-Nr.: A12379
Aktin	Phalloidin	Alexa Fluor 568	6,6 µM 1:200	Life technologies Art-Nr.: A12380
Aktin	Phalloidin	Alexa Fluor 647	6,6 µM 1:100	Life technologies Art-Nr.: A22287
DNA	DAPI	-	5 mg/ml 1:1000	Carl Roth Art-Nr.: 6335.1

3.4 Geräte und Mikroskope

Tabelle 11: Geräte

Bezeichnung	Firma	Verwendung
Amersham Imager 600	GE Health Care	Geldokumentation
Mini Protean 3	Bio-Rad	SDS-PAGE und Western Blot
NanoDrop ND-1000	Peqlab	Spektralphotometrie
Nanoscribe Photonic Professional	Nanoscribe	Herstellung von 3D-Strukturen
Thermocycler PTC-200 DNA Engine Peltier Thermal Cycler	MJ Research	PCR-Amplifikation

Tabelle 12: Mikroskope und Objektive

Bezeichnung	Objektive	Funktionalität
Axiolmager Z1 mit ApoTome Modul	EC Plan NEOFLUAR 40x/0.75 Plan Apochromat 63x/1.4 Öl	Optischer Schnitt durch Gitterprojektion in die Fokusebene
AxioObserver Z1	Plan Apochromat 20x/0.8 Ph2 M27	Inkubationskammer mit Heizeinheit, für Zeitrafferaufnahmen lebender Zellen
Elyra PS.1 (Prototyp)	Plan Apochromat 63x/1.4 Öl	Hochauflösung mittels <i>structured illumination microscopy</i> (SIM)
LSM 510 meta	Plan Apochromat 63x/1.4 Öl	Konfokales Laserscanning-Mikroskop
LSM 800 oder 880 mit Airyscan	Plan Apochromat 63x/1.4 Öl DIC II	Konfokales Laserscanning-Mikroskop mit Airyscan-Technologie für Hochauflösung
Supra 55VP	-	Rasterelektronenmikroskop (REM)

Alle verwendeten Mikroskope und Objektive wurden von der Firma Carl Zeiss hergestellt.

3.5 Klonierung, Vermehrung und Aufreinigung von Plasmiden

3.5.1 Klonierung

➤ Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau von Plasmiden wurde 1 µg DNA verdaut. Dabei wurde das vom Hersteller vorgeschlagene Puffersystem verwendet. Um unspezifische Reaktionen der Enzyme zu vermeiden („Star-Activity“), wurden Restriktionsverdaue mit unterschiedlichen Enzymen und Puffersystemen separat voneinander durchgeführt. Zwischen den Schritten wurde der Einzelverdau über *SigmaSpin Sequencing Reaction Clean-Up* Säulen aufgereinigt. Die Reaktion wurde in einem 1% Agarosegel auf Vollständigkeit überprüft.

Für die Herstellung von NMHC IIA wurde eGFP-NMHC IIA mit AgeI und HindIII verdaut, wodurch die kodierende Sequenz (CDS) für eGFP entfernt wurde.

Die Herstellung von eGFP-NMHC IIA-ΔACD erfolgte durch den Verdau von eGFP-NMHC IIA mit SacII und Sall, wodurch die finalen 808 Basenpaare der CDS von NMHC IIA entfernt wurden.

Die Klonierung von gRNA Sequenzen in pSPCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Vektoren erforderte die Entfernung eines 20 Basenpaare großen Fragmentes zwischen zwei BbsI Schnittstellen. Die Effizienz des Verdaus ist aufgrund der Endonuklease-Aktivität von BbsI und der räumlichen Nähe der Schnittstellen gering. Um dennoch einen vollständigen Verdau des Plasmids zu gewährleisten, wurde der Ansatz in einem 10x Überverdau bei 37°C über Nacht inkubiert.

➤ Agarose-Gelelektrophorese

Um Plasmid-Fragmente nach erfolgtem Verdau zu separieren, wurden die Fragmente über 1% Agarosegele aufgetrennt. Für die Färbung der Nukleinsäuren wurde den Gelen 0,05% *RotiSafe Gel Stain* zugesetzt. Die Proben wurden mit 1/6 eines 6x Ladepuffers (*DNA Gel loading dye*) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 90 Volt für 45 min. Linearisierte Plasmid-Fragmente wurden mittels des *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN) aus dem Gel aufgereinigt.

➤ Oligonukleotid-Hybridisierung

Komplementäre Oligonukleotide wurden wie folgt für die Ligation vorbereitet:

Sense Oligosequenz	1 µl
Antisense Oligosequenz	1 µl
10x T4 Ligase Reaktionspuffer	1 µl
Autoklaviertes ddH ₂ O	6,5 µl
T4 Polynukleotidkinase	0,5 µl
Gesamtvolumen	10 µl

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, dann für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend mit einer Rate von -1°C/min auf 25°C abgekühlt. Für die Ligation in pSPCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Vektoren wurde das Produkt auf eine Endkonzentration von 1 µM verdünnt.

➤ **Ligation**

Für Ligationsreaktionen wurde die T4 DNA Ligase aus dem *Quick Ligation* Kit der Firma New England Biolabs verwendet. Die Komponenten der Ligationsreaktion wurden nach dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Für die Ligationsansätze wurden jeweils 50 ng linearisierter Vektor verwendet.

Die Ligation von *guide*-Sequenzen in pSPCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Vektoren über *sticky ends* erfolgte in einem molaren Verhältnis Insert zu Vektor von 3:1. Die Ligationsreaktion wurde für 1 h bei RT inkubiert.

Für die Erzeugung von NMHC IIA und eGFP-NMHC IIA-ΔACD wurden die Restriktionsüberhänge mittels einer T4 DNA Polymerase geglättet. Die Komponenten der Reaktion wurden nach dem Herstellerprotokoll eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 11°C für 20 min inkubiert und anschließend bei 75°C für 10 min hitzeinaktiviert. Die anschließende *blunt end* Ligation erfolgte bei RT über Nacht.

Für die direkte Klonierung aus PCR-Produkten (*blunt end*) ohne vorherigen Restriktionsverdau diente der pCR II-Blunt-TOPO Vektor. Die *blunt end* Ligation erfolgte nach Anleitung des *Zero Blunt TOPO Cloning Vector* Kit, dabei wurden 3 µl des PCR-Produkts eingesetzt.

➤ **Quantitative und qualitative Analyse von Nukleinsäuren**

Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurden spektralphotometrisch über die Optische Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt. Reine DNA zeigt dabei einen Wert von 1,8. Die korrekte Insertion und Religation wurde mittels Sequenzierung nach Sanger von der Firma LGC Genomics (Berlin Charlottenburg, Deutschland) verifiziert. Für die Analyse der Sequenzierungsergebnisse wurde die Software *SnapGene Viewer* verwendet.

3.5.2 Vermehrung von Plasmiden

Für die Vermehrung von Expressions- und Klonierungsvektoren wurden chemokompetente *E. coli* DH5α verwendet. Um die Bakterien mit dem zu vermehrenden Plasmid zu transformieren, wurde ein Hitzeschock-Protokoll angewendet. Hierfür wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 30 µl Bakteriensuspension vermischt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden. Nach 5 min Inkubation bei 4°C wurde 200 µl LB-Medium gegeben. Im Fall einer Ampicillin-Resistenz erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 37°C für 1h. Rekombinante Klone wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten selektioniert. Die Kultivierung positiver Klone erfolgte bei 37°C über Nacht in Flüssig-LB mit entsprechender Antibiotika-Konzentration.

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem *Plasmid QIAprep Spin Miniprep Kit* oder dem *Plasmid plus Midi Kit* der Firma QIAGEN. Bei der Aufreinigung wurde sich an die Angaben des Herstellerprotokolls gehalten. Die DNA-Konzentration wurde anschließend mit Hilfe eines NanoDrop Spectrophotometers (ThermoFisher Scientific) ermittelt. Die Plasmide wurden in ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

3.6 Verwendete Plasmide und Lipofektion

Alle in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Für die transiente Expression der Konstrukte wurden Zellkulturen durch Lipofektion transfiziert. Bei dieser Methode werden kationische Lipidvesikel gebildet, welche die Plasmid-DNA enthalten und von Zellen endozytiert werden. Die Lipofektion erfolgte mittels *Lipofectamine 2000 Transfection Reagent* (ThermoFisher Scientific) nach dem Herstellerprotokoll. Die Zellen wurden vor der Transfektion solange kultiviert, bis ca. 80 % Konfluenz erreicht waren. Für Transfektionen in *6-Well* Platten wurde pro Ansatz 5 µl *Lipofectamine 2000* und 2,5 µg Plasmid DNA verwendet. Nach 12 h Inkubation wurde das Transfektionsmedium durch frisches DMEM + FCS ersetzt. Die Expressionsdauer betrug bei allen Ansätzen 48 h, bevor die Zellen in Experimenten verwendet wurden.

Tabelle 13: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
eGFP-MRLC1	MRLC1 mit C-terminalem eGFP	Tom Egelhoff (Addgene #35680)
eGFP-MRLC1 T18D, S19D	Phosphomimetischer Aminosäureaustausch führt zu konstitutiver Aktivierung von MRLC1	Tom Egelhoff (Addgene #35682)
eGFP-NMHC IIA	NMHC IIA (human) mit N-terminalem eGFP	Robert Adelstein (Addgene #11347)
eGFP-NMHC IIA-3xA	Aminosäureaustausch (S1943A, S1916A, S1915A) verhindert Phosphorylierung durch CK II und PKC β	Tom Egelhoff (Addgene #10104)
eGFP-NMHC IIA-ΔNHT	Eingefügtes Stop Codon nach Aminosäure 1928 eliminiert den NHT	Tom Egelhoff (Addgene #35689)
eGFP-NMHC IIA-ΔACD	Entfernung der letzten 250 Aminosäuren eliminiert die ACD	Kai Weißenbruch
eGFP-NMHC IIA-ΔIQ2	Entfernung der Aminosäuren 804-834 eliminiert das IQ-Bindemotiv für die RLC	Tom Egelhoff (Addgene #35690)
eGFP-NMHC IIB	NMHC IIB (human) mit N-terminalem eGFP	Robert Adelstein (Addgene #11348)
mEmerald-NMHC IIA- mApple	NMHC IIA mit N-terminalem mEmerald und C-terminalem mApple	Jordan Beach, Loyola University Chicago, USA

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
NMHC IIA	NMHC IIA (human); N-terminales eGFP entfernt	Kai Weißenbruch
pSPCas9(BB)-2A-Puro V2.0	Cas9 aus <i>S. pyogenes</i> mit 2A-Puro Resistenz und <i>backbone</i> für sgRNA Klonierung.	Feng Zhang (Addgene #62988)
pSPCas9(BB)-2A-Puro V2.0-MYH9	gRNA Sequenz gegen MYH9 (kodiert für NMHC IIA) implementiert	Kai Weißenbruch
pSPCas9(BB)-2A-Puro V2.0-MYH10	gRNA Sequenz gegen MYH10 (kodiert für NMHC IIB) implementiert	Kai Weißenbruch
pSPCas9(BB)-2A-Puro V2.0-MYH14	gRNA Sequenz gegen MYH14 (kodiert für NMHC IIC) implementiert	Kai Weißenbruch

3.7 Verwendete Zelllinien und Zellkultur

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind immortalisiert und zeichnen sich durch einen adhären Phänotyp aus. Aufgrund des Ursprungs weisen die Zellen entweder einen fibroblastenartigen (NIH 3T3 und COS-7) oder einen epithelialen Charakter (U2OS) auf. COS-7 Zellen zeichnen sich durch ihre fehlende NM IIA-Expression aus, wodurch diese Zelllinie häufig in Untersuchungen zur Aktomyosin-Kontraktibilität Einsatz findet (Bao et al., 2005; Shutova et al., 2017). U2OS Zellen haben sich aufgrund ihres polarisierten Phänotyps und einem prominenten Aktinzytoskelett in zahlreichen Publikationen als Modellsystem für die Untersuchung von SF etabliert (Beach et al., 2014; Hotulainen und Lappalainen, 2006), weshalb sie in dieser Arbeit als parentale Zellen für die Erzeugung von NM II-KO Zelllinien ausgewählt wurde. Die verschiedenen NM II-KO Zelllinien wurden im Zuge dieser Arbeit oder in betreuten Master- und Bachelorarbeiten hergestellt.

Tabelle 14: Verwendete Zelllinien

Name	Ursprung	Herkunft
COS-7	Fibroblastenartige Zellen aus dem Nierengewebe der grünen Meerkatze, SV40 transformiert	Bernhard Wehrle-Haller, Universität Genf, Schweiz
NIH 3T3	Murine embryonale Fibroblasten	ATCC #CRL-1658
U2OS WT	Aus humanem Osteosarkom isolierte Zelllinie mit epithelialem Phänotyp	ATCC #HTB-96
U2OS NM IIA-KO	Aus U2OS WT generierte KO-Zelllinie, defizitär für NM IIA	Kai Weißenbruch
U2OS NM IIB-KO	Aus U2OS WT generierte KO-Zelllinie, defizitär für NM IIB	Kathrin Stricker
U2OS NM IIC-KO	Aus U2OS WT generierte KO-Zelllinie, defizitär für NM IIC	Kai Weißenbruch

Alle verwendeten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchtigkeit in einem bakteriziden Inkubator kultiviert. Die Zellen wurden routinemäßig drei Mal wöchentlich unter sterilen Bedingungen passagiert. Für die Routine-Zellkultur wurde DMEM + 10% FCS zur Kultivierung verwendet. Für das Passagieren der Zellen wurde ein Standard-Zellkultur Protokoll verwendet. Die Zellen wurden mit 1xPBS gewaschen um zweiwertige Kationen wie Mg²⁺ und Ca²⁺ zu entfernen. Anschließend wurden 200 µl Trypsin/EDTA zugegeben, um die adhärenen Zellen von der Kulturflasche abzulösen. Nach einer Inkubationszeit von 2-3 min im Brutschrank wurde die Wirkung von Trypsin/EDTA durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt. Um verbleibendes Trypsin/EDTA zu entfernen, wurde die Zellsuspension bei 1000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert.

Frisch ausgesäte Zellen in Experimenten wurden unabhängig vom Substrat für 2 h im Inkubator kultiviert und anschließend fixiert. Bei Verwendung von Blebbistatin wurde dieses zu Beginn des Experimentes zugegeben. Um Effekte durch das Lösemittel auszuschließen wurde den Kontrollzellen in Blebbistatin-Experimenten ein äquivalentes Volumen DMSO zugegeben. Um eine definierte Zellzahl für vergleichbare Experimentkonditionen zu bestimmen, wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Auf den unterschiedlichen Substraten wurden folgende Zellzahlen ausgesät:

Homogen-beschichtete Substrate	1x10 ⁵ Zellen
Mikrostrukturierte Dot-Substrate	1,25x10 ⁵ Zellen
Mikrostrukturierte Kreuz-Substrate	1x10 ⁵ Zellen
3D Mikrostrukturen	2,5x10 ⁴ Zellen

3.8 Erzeugung von stabilen KO-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9

Die Erzeugung von stabilen KO-Zelllinien kann durch die Manipulation der kodierenden genomischen DNA (gDNA) des Zielgens mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems realisiert werden. Die Arbeitsgruppe um Feng Zhang (Broad Institute, MIT) hat zu diesem Zweck ein Plasmid-System entwickelt, welches alle notwendigen Komponenten in einem Vektor kombiniert (Ran et al., 2013). Das Plasmid enthält die cDNA Sequenzen für die Cas9 Endonuklease und die tracrRNA, welche für die Cas9-Bindung an die *single guide* RNA (sgRNA) notwendig ist. Außerdem ist eine Puromycin-Resistenz vorhanden, welche für die Selektion von positiv-transfizierten Zellen genutzt werden kann.

Um den CRISPR/Cas9-Komplex an das Zielgen zu steuern, muss eine *guide*-Sequenz in das Plasmid kloniert werden, welche komplementär zur Zielsequenz auf dem zu editierenden Gen ist. Mögliche Zielsequenzen wurden mit Hilfe der Online-Programme CCTOP (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>) und CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) ermittelt. Die Algorithmen der Programme berücksichtigen dabei Faktoren wie den GC-Gehalt der *guide*-Sequenz, die Suche nach *off-target* Bindestellen im Genom und das Vorhandensein der notwendigen PAM-Sequenz in der Zielregion. Alle in dieser Arbeit verwendeten *guide*-Sequenzen sind in Tabelle 5, Abschnitt 3.2 aufgeführt. Die Klonierung der

guide-Sequenzen in pSPCas9(BB)-2A-Puro V2.0 Vektoren ist in Abschnitt 3.5.1 beschrieben. Je näher am 5'-Ende des Zielgens eine Mutation eingefügt wird, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer Verschiebung des Leserasters und eines erfolgreichen KO. Aus diesem Grund wurde für alle drei NM II-Isoformen eine *guide*-Sequenz gewählt, welche komplementär zu einer Sequenz im ersten kodierenden Exon (Exon 2) von MYH9, MYH10 oder MYH14 ist. Die *guide*-Sequenzen gegen MYH10 und MYH14 sind komplementär zu allen Spleißformen der Gene.

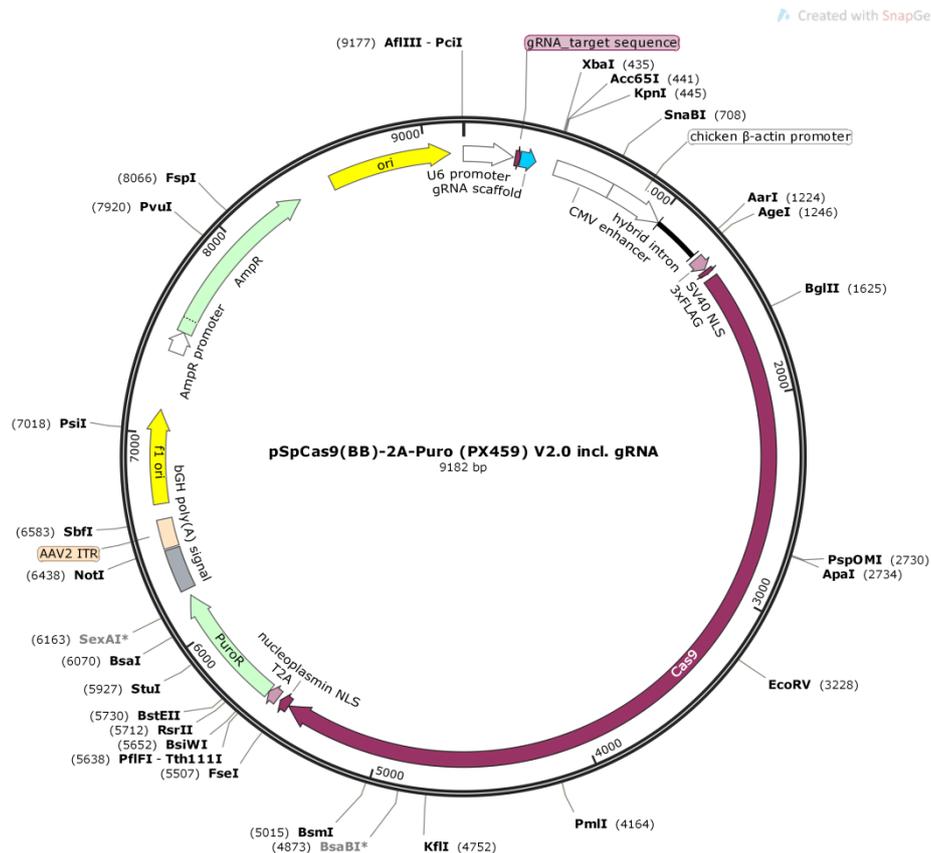


Abbildung 3.1: Plasmid System zur Erzeugung von KO-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9.

Das Plasmid enthält die cDNA Sequenzen für die Cas9 Endonuklease und das gRNA Gerüst (*sgRNA scaffold*). Zusätzlich enthält das Plasmid eine Puromycin-Resistenzkassette für die Selektion transfizierter Zellen. Das Plasmid wurde von Feng Zhang zur Verfügung gestellt (Addgene Plasmid #62988). Eine *guide* Sequenz für die Steuerung der Cas9 Endonuklease an die Zielsequenz der Protein-kodierenden DNA wurde mittels der BbsI Schnittstellen vor das gRNA Gerüst kloniert.

U2OS WT Zellen wurden durch Lipofektion mit den entsprechenden CRISPR/Cas9 Konstrukturen transfiziert (Abschnitt 3.6). Eine Selektion von positiv-transfizierten Zellen wurde durch Zugabe von 5 µg/ml Puromycin für 48 h erreicht. Um isogene Klone aus der heterogenen Zellpopulation zu isolieren, wurden die Zellen nach der Puromycin-Selektion stark verdünnt in Zellkulturschalen ausgesät. Da U2OS Zellen bei zu geringer Zelldichte sterben, ist eine Kultivierung von Einzelzellen zur Gewinnung eines isogenen Klons nicht möglich. Deshalb bleiben die Zellen so lange in Mischkultur, bis einzelne Klone groß genug sind, um gezielt entnommen zu werden. Einzelne Zellklone wurden dazu

markiert und umliegende Zellen mit Pipetten-Spitzen mechanisch entfernt. Die markierten Klone wurden bei ausreichender Größe mit Hilfe von Trypsin/EDTA getränkten Whatman-Papierstücken abgelöst und in neue Zellkulturschalen überführt.

3.8.1 PCR und Sequenzanalyse

Zur genetischen Analyse wurde die gDNA der verschiedenen Zellklone mittels *DNeasy Blood & Tissue* Kit extrahiert. Bei der Durchführung wurde nach dem Herstellerprotokoll für die Aufreinigung von gDNA aus Zellen gearbeitet. Die Zielsequenzen der editierten Gene wurden durch PCR amplifiziert und zur Sequenzierung der PCR-Produkte in pCR II-Blunt-TOPO Vektoren kloniert. Die Zusammensetzung der PCR-Reaktion entspricht den Empfehlungen des Herstellers, alle Komponenten sind in Tabelle 15 aufgelistet. Der Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf die gewünschten Konzentrationen eingestellt. Das verwendete PCR-Programm ist in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der PCR-Reaktionen

Komponente	Stammlösung	Finale Konzentration
5x VeraSeq Puffer II	5x	1x
dNTP Mix	10 mM	Jeweils 200 µM
Sense Primer	10 µM	0,2 µM
Antisense Primer	10 µM	0,2 µM
gDNA	-	30 ng
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM
VeraSeq 2.0 DNA Polymerase	2000 U/ml	1 U

Tabelle 16: PCR-Protokoll

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	1
Denaturierung	98°C	10 s	30
Hybridisierung	62°C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	1

Für die Sequenzanalyse der Zellklone wurden die Sequenzierungsergebnisse mit den entsprechenden WT-Sequenzen verglichen. Die WT-Sequenzen aus den PCR-Produkten wurden zusätzlich durch Datenbankabgleiche anhand von BLAST-Analysen verifiziert. Für das Alignment der Sequenzen wurde der *CLC Sequence Viewer* der Firma QIAGEN verwendet.

3.8.2 SDS-PAGE und Western Blot

Die Zellklone wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot auf den Verlust der jeweiligen NM II-Expression untersucht. Bei der Probenvorbereitung wurden jeweils 2×10^5 Zellen in einem Endvolumen von 30 μ l lysiert. Die Zellen wurden in reduzierendem 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C denaturiert. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm und 4°C für 10 min. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch eine diskontinuierliche SDS-PAGE in Laemmli-Puffer. Die Konzentration der Proteine im Sammelgel erfolgte bei 80 V für 20 min, für die Auftrennung im Trenngel wurde eine Spannung von 180 V für 1h angelegt. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gele wurden wie folgt hergestellt:

Tabelle 17: Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE

Komponente	Zusammensetzung
Acrylamid-Sammelgel	16,6 % Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 25 % Sammelgelpuffer (4x) 1 % APS (10 %) 0,1 % TEMED
Acrylamid-Trenngel (8 %)	27 % Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 25 % Trenngelpuffer (4x) 1 % APS (10 %) 0,04 % TEMED

Zum Nachweis der Proteinexpression wurden die Proteine auf eine PVDF Membran (Bio-Rad, Art-Nr.: 162-077) transferiert und mit Antikörpern nachgewiesen. Die PVDF Membran wird zu Beginn für 1 min in MeOH aktiviert und anschließend für 3 min in Western Blot-Puffer äquilibriert. Der Übertrag fand bei 150 mA und 4°C für 2 h statt. Die Detektion der Proteine wurde nach dem Schema in Tabelle 18 durchgeführt. Die Chemilumineszenz-Detektion wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt und in Amersham 600 Geldokumentationssystem visualisiert.

Tabelle 18: Inkubationsschritte für die Proteindetektion in Western Blots

Vorgang	Lösung/Puffer	Dauer/Temperatur
Blockierung	5% Magermilchpulver in PBS-Tween 20	1 h/RT
Primärantikörper	Antikörper in 5% Magermilchpulver in PBS-Tween 20	Über Nacht/4°C
Waschen	PBS-Tween 20	3x 15 min/RT
Sekundärantikörper	Antikörper in 5% Magermilchpulver in PBS-Tween 20	2 h/RT
Waschen	PBS-Tween 20	3x 15 min/RT
Waschen	PBS	3x 10 min/RT
Lumineszenzreaktion	Chemilumineszenzsubstrat (ThermoFisher Scientific)	3 min

3.9 Herstellung mikrostrukturierter Zellkultursubstrate

In dieser Arbeit wurden neben homogen beschichteten Deckgläsern mikrostrukturierte 2D- und 3D-Substrate verwendet. Als EZM-Protein wurde in allen Fällen FN mit einer Endkonzentration von 10 µg/ml verwendet. Die Beschichtung der Substrate erfolgte jeweils für 60 min bei RT.

3.9.1 Strukturierte 2D-Substrate

Für die Herstellung mikrostrukturierter 2D-Substrate wurden zwei unterschiedliche Verfahren des µCP angewendet (Mirsich und Whitesides, 1996). Beide Methoden basieren auf einem Stempelvorgang, welcher die geometrische Verteilung der Adhäsionsstellen festgelegt wird. Zwischen den Adhäsionsstellen befinden sich proteinabweisende (passivierte) Flächen, wodurch die Zelladhäsion auf die Adhäsionsflächen limitiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Stempelmuster verwendet (Abb. 3.2). Die verwendeten Dot-Muster weisen rechteckige Adhäsionsflächen von circa. 2x2 µm auf, welche in regelmäßigen Abständen, in mehreren Feldern angeordnet sind. Je nach Feld sind zwischen den Dots variable Abstände von 5-20 µm vorhanden. Die Kreuz-Muster bestehen aus Feldern von je 9 Kreuzen. Die einzelnen Kreuze weisen eine Balkenbreite ca. 5 µm und Kantenlängen von 45, 55 oder 65 µm auf. Zusätzlich ist der Schnittpunkt beider Balken zwischen den verschiedenen Reihen jeweils um 3 µm verschoben.

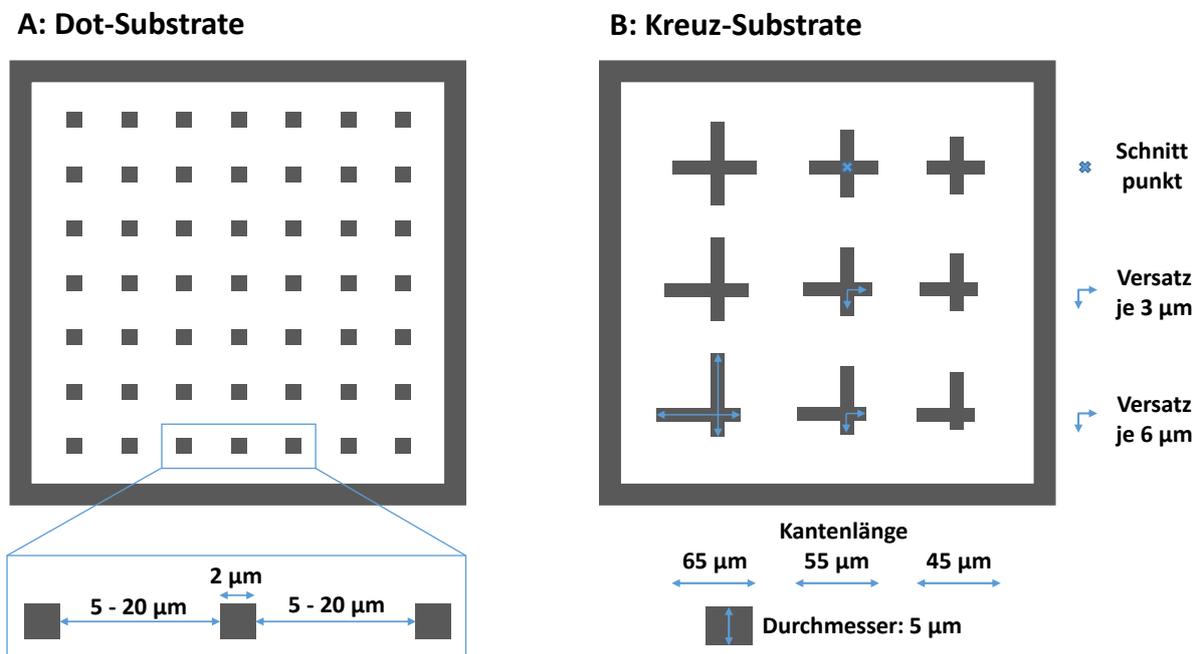


Abbildung 3.2: Verwendete Muster für die Herstellung von mikrostrukturierten 2D-Substraten.

Schematische Darstellung der topographischen Strukturierung verwendeter Stempelmuster. **(A)** Dot-Substrate mit regulären Abständen zwischen den Dots, je nach Feld variiert der Abstand zwischen den Dots. **(B)** Kreuz-Substrate mit variierenden Kantenlängen und unterschiedlichen Schnittpunkten zwischen den Balken. Die Balkenbreite beträgt nach dem Stempeln ca. 5 µm.

➤ **Herstellung der Master und Abformen der Stempel**

Die benötigten Silikonstempel werden von einem permanenten Master abgeformt, welcher die Negativform des späteren Stempels aufweist. Der Silizium-Master für die Dot-Substrate wurde von Dr. Ralf Bubeck (Universität Konstanz) mittels Elektronenstrahlolithographie hergestellt und lag zu Beginn der Arbeit vor. Für die Kreuz-Substrate wurde von Marc Hippler (Institut für angewandte Physik, KIT) ein Master aus PETA-Fotolack mittels DLS geschrieben (Vgl. Abschnitt 3.9.2). Nach dem Schreibprozess wurde der Master mit Aluminiumoxid stabilisiert und mit Octadecyltrichlorsilan passiviert, wodurch ein einfaches Ablösen des Stempels vom Master gewährleistet wird.

Zum Abformen der Stempel wurde Polydimethylsiloxan (PDMS) Sylgard 184 verwendet. In vorausgegangenen Arbeiten der Gruppe hat sich ein Polymer zu Härter Verhältnis von 9:1 als geeignet erwiesen. Beide Komponenten wurden vermischt und zum Ausgasen für 30 min bei RT inkubiert. Ein Tropfen wurde auf den Master gegeben und mit einem gereinigten Objektträger bedeckt. Um ein Verrutschen des Objektträgers zu vermeiden, wurde der Objektträger mit Messingklötzen beschwert und von allen Seiten fixiert. Das PDMS wurde bei 60°C über Nacht polymerisiert. Nach dem Ablösen vom Master wurden das PDMS-Stempelfeld und der Objektträger passend zugeschnitten und zur besseren Handhabung des Stempels auf einen Kunststoffblock geklebt. Vor jeder Benutzung wurde das Stempelfeld mechanisch mit Klebestreifen gereinigt. Um Klebereste zu entfernen, wurde das Stempelfeld danach mit reinst EtOH inkubiert und mit N₂ getrocknet.

Auf diese Weise hergestellte Stempel können für beide Varianten des μ CP eingesetzt werden. Für das direkte Proteinstempeln ($d\mu$ CP) können herkömmliche Deckgläser, welche zuvor mit reinst EtOH gereinigt wurden, verwendet werden. Die klassische Variante des μ CP basiert auf der Gold-Thiol Chemie. Dabei bilden Alkanthiole durch Bindung der Thiolgruppe an Goldatome eine durchgehende Schicht (*Self-Assembled Monolayer*, SAM). Das freie Ende des Alkanthiols kann nach Wunsch funktionalisiert werden, wodurch Muster mit zelladhäsiven und zellabweisenden Bereichen hergestellt werden können (Mrksich und Whitesides, 1996). Um die Bindung der Thiolgruppen an ein Deckglas zu vermitteln, müssen die Deckgläser mit einer Goldschicht bedampft werden.

➤ **Goldbedampfung der Deckgläser**

Die Deckgläser werden zu Beginn in einer Lösung aus NH₃, H₂O₂ und ddH₂O im Verhältnis 1:1:5 gereinigt. Die Inkubation in der Reinigungslösung findet bei 80°C für 15 min statt. Nach der Trocknung der Deckgläser wird in der Bedampfungsanlage bei Unterdruck ($<1 \times 10^{-6}$ mbar) eine Schicht Titan (0,5 nm) aufgebracht, welche als Haftvermittler für das danach applizierte Gold dient. Um starke Reflexionen während der Mikroskopie an inversen Mikroskopen zu vermeiden, wurde lediglich eine dünne Goldschicht (~ 2 nm) aufgebracht. Diese Schichtdicke hat sich als ausreichend erwiesen, um eine stabile Bindung zwischen den Thiolgruppen und dem Gold zu vermitteln (Bachmann, 2015). Die bedampften Deckgläser wurden vor der Verwendung mit reinst EtOH gespült und mit N₂ getrocknet.

➤ **μCP (Gold-Thiol basiertes Verfahren)**

Um einen SAM mit zelladhäsiven und zellabweisenden Bereichen zu generieren, wurden verschiedene Alkanthiole eingesetzt. ODM besitzt eine hydrophobe Thiolgruppe, welche die Proteinadsorption gewährleistet. Das ODM wurde mit dem Stempel auf das Gold-beschichtete Deckglas übertragen, um eine spätere Strukturierung der Proteinadsorption zu ermöglichen. Der Stempel wurde für 20 Sekunden mit einer 1,5 mM ODM-Lösung inkubiert, mit N₂ getrocknet und sofort in Kontakt mit der Gold-beschichteten Seite des Deckglases gebracht. Der Stempelprozess kann mit einem Inkubationsschritt mehrfach wiederholt werden. Nach der Reinigung des Deckglases mit reinst EtOH, erfolgte die Passivierung der nicht-bestempelten Bereiche. Dazu wurde das Deckglas mit einer hydrophilen Thiol-Lösung überschichtet. Das zweite Thiol bindet dabei spezifisch an die freien Goldbereiche und bildet so einen SAM mit alternierenden adhäsiven und passiven Bereichen. Für die Passivierung der Dot-Substrate wurde das Alkanthiol HS-C11-EG6-OMe verwendet, welches eine gute passivierende Eigenschaft aufweist, dabei aber trotzdem das Abflachen der Zellen zwischen den Dots ermöglicht. Für die Passivierung der Kreuz-Substrate wurden die Deckgläser mit HS-C11-EG6-OH überschichtet. Dieses hydrophile Thiol weist sehr starke passivierende Eigenschaften auf, das *Zellspreading* wird jedoch aufgrund der größeren Adhäsionsfläche der Kreuze hier nicht beeinträchtigt. In beiden Fällen erfolgte die Inkubation für 20 min bei RT. Nach einem weiteren Waschschrift in reinst EtOH waren die Deckgläser bereit für die Proteinbeschichtung.

➤ **dμCP (direktes Proteinstempeln)**

Beim direkten Proteinstempeln wird das Protein-Muster vom Stempel direkt auf das Deckglas übertragen. Hierzu wurde zunächst die Stempeloberfläche für 10 min mit der FN-Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Stempel mit N₂ getrocknet und sofort in Kontakt mit einem EtOH-gereinigten Deckglas gebracht. Die Bildung von Interferenzfarben an der Grenzfläche zwischen Deckglas und Stempel gilt als Indikator für eine akkurate Übertragung des Proteinmusters. Zu diesem Zweck wurde der Rand des Stempels mit einer Pinzette vorsichtig angedrückt, bis auf dem kompletten Stempelfeld Interferenzfarben sichtbar waren. Eine weitere Inkubationszeit von 10 min ist ausreichend für die vollständige Übertragung des Proteinmusters. Für die Passivierung der Zwischenräume wurde in diesem Fall eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml verwendet, welche für 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach der Passivierung wurden die Substrate in 1xPBS gewaschen und innerhalb einer Stunde nach der Fertigstellung für Zellkultur-Experimente verwendet.

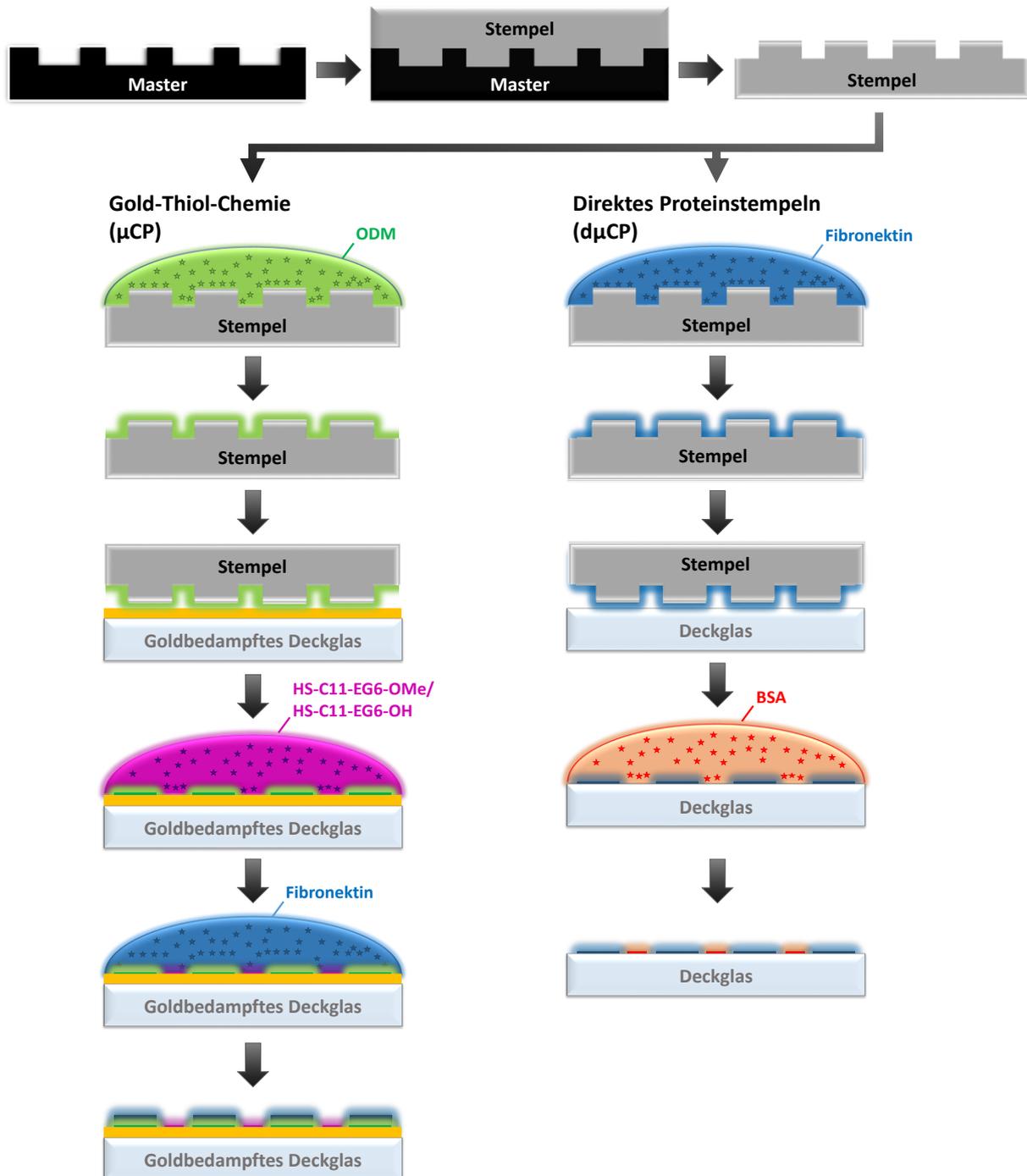


Abbildung 3.3: µCP-basierte Herstellungsmethoden von strukturierten 2D-Substraten.

Für die Herstellung mikrostrukturierter 2D-Substrate wurden Stempel von einem Master abgeformt, welche zur Übertragung des Proteinmusters verwendet wurden. Beim Gold-Thiol-basierten µCP wurde ein Goldbedampftes Deckglas mit dem hydrophoben Alkanthiol ODM bestempelt und die Zwischenbereiche mit hydrophilem HS-C11-EG6-OMe oder HS-C11-EG6-OH passiviert. Das FN adsorbiert anschließend an die hydrophoben Bereiche des SAM. Beim dµCP wurde der Stempel mit FN inkubiert und das Proteinmuster direkt auf ein unbeschichtetes Deckglas übertragen. Zur Passivierung der Zwischenbereiche wurde das Deckglas mit einer BSA-Lösung überschichtet.

3.9.2 3D-Mikrostrukturen

Die Herstellung von 3D-Mikrostrukturen erfolgte durch DLS. Alle in dieser Arbeit verwendeten Strukturen wurden von Dr. Benjamin Richter oder Marc Hippler mittels des Photonic Professional Systems der Firma NanoScribe hergestellt. Der Prozess basiert auf der Verwendung von Fotolacken, welche aufgrund von beigemischten Fotoinitiatoren durch hochenergetisches Licht polymerisiert werden können. Um die polymerisierten Fotolacke stabil an der Glasoberfläche zu verankern, ist eine Vorbehandlung der Deckgläser notwendig.

➤ Silanisierung der Deckgläser

Um eine bessere Haftung der Fotolacke zu erzielen, wurden die Deckgläser vor dem Schreibprozess mit 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan funktionalisiert. Um eine gleichmäßige Silanschicht zu erzielen, werden die Deckgläser mit Isopropanol gereinigt und anschließend für 10 min im Plasmaätzer behandelt. Die Beschichtung mit 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan erfolgte für 1 h bei RT. Danach werden die Deckgläser in ddH₂O gewaschen, wodurch eine vollständige Bedeckung der Glasoberfläche mit Silan gewährleistet wird. Auf diese Weise funktionalisierte Deckgläser vermitteln eine kovalente Bindung zwischen Polymer und Glasoberfläche, da das Methacrylat während der Polymerisation des aufgetragenen Fotolacks an den Acrylaten des Polyethylenglykols bindet.

➤ DLS

Beim DLS wird ein Femtosekunden-gepulster Laser eingesetzt, um Fotolacke gezielt im Fokus des Lasers zu polymerisieren. Der Laserstrahl wird durch ein Objektiv mit möglichst hoher numerischer Apertur in den Fotolack fokussiert. Die Fotolacke besitzen eine spezifische chemische Zusammensetzung, wodurch die Polymerisation erst bei einer gewissen Mindestenergie einsetzt. In diesem Fall ist nur die Energie im Fokus des Lasers hoch genug, um eine Polymerisation des Fotolacks zu initiieren. Das *Photonic Professional* Gerät der Firma NanoScribe nutzt einen 2-Photonen Prozess, wodurch das Energiemaximum für die Polymerisation des Fotolacks lediglich in einem sehr kleinen Voxel vorhanden ist. Auf diese Weise können hochaufgelöste Strukturen erzeugt werden. Die Proben werden dabei durch einen Piezotisch in lateraler und axialer Ebene bewegt, wodurch der Laserfokus in allen drei Dimensionen durch den Fotolack gesteuert werden kann. Die Steuerung erfolgt dabei vollautomatisch durch die Software des Geräts, jedoch ist dazu ein Strukturcode notwendig, der den Ablauf festlegt. Der Code für die verwendeten Strukturen wurde von Dr. Benjamin Richter mit dem Programm MATLAB (MathWorks) erstellt.

➤ Herstellungsprozess von 3D-Mikrostrukturen

Der Fotolack wurde auf ein silanisierendes Deckglas aufgebracht und das Deckglas im Probenhalter fixiert. Die Erzeugung von zelladhäsiven und zellabweisenden Bereichen wurde durch sequentielles Schreiben mit proteinadsorbierenden und proteinabweisenden Fotolacken realisiert. Im ersten Schreibrschritt wurde der Fotolack TPE-TA aufgebracht, welcher proteinabweisende Eigenschaften aufweist und verwendet wurde, um die Grundgerüste der 3D-Strukturen zu schreiben. Anschließend folgte ein Waschschrir, der zur Entwicklung der Strukturen bzw. zur Entfernung des überschüssigen Fotolacks

dient. Die Strukturen wurden dabei zuerst mit Aceton und anschließend mit Isopropanol gespült. Nach der Entfernung des unpolymerisierten Fotolacks wurden die Strukturen mit N_2 getrocknet und der Fotolack für den zweiten Schreibrschritt aufgebracht. Für die Adhäsionspunkte wurde der proteinadsorbierende Fotolack OrmoComp (Microresist technology) verwendet. Nach dem zweiten Schreibrschritt wurden die Strukturen in einer 1:1 Mischung aus Methylisobuthylketon und Isopropanol für 10 min bei RT entwickelt. Nach einem letzten Reinigungsschritt mit Isopropanol wurden die Strukturen mit N_2 getrocknet und für Zellkulturexperimente mit FN beschichtet. Die hier verwendeten 3D-Strukturen bestehen aus Säulen in einer pentagonalen Anordnung, die über Stabilisierungsstreben verbunden sind. Um variable Abstände zu erzeugen, wurde eine der äußeren Säulen versetzt. Zusätzlich ist eine zentrale Säule niedriger Höhe vorhanden, um eine 3D Aufspannung des Zellkörpers zu erreichen. Zur Verdeutlichung sind die Strukturen in Abbildung 3.4 dargestellt.

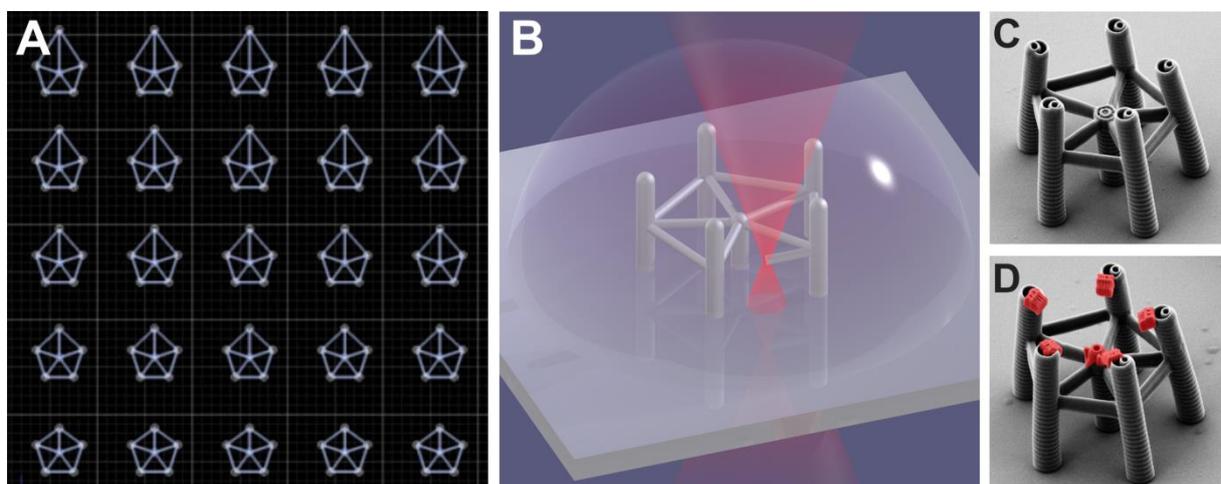


Abbildung 3.4: Herstellung von 3D Mikrostrukturen mittels DLS.

(A) Schematische Darstellung der Strukturen aus der Vogelperspektive. (B) Schematische Darstellung des Schreibprozesses (DLS). (C) REM-Aufnahme einer 3D-Struktur nach dem ersten Schreibrschritt. (D) REM-Aufnahme einer 3D-Struktur nach dem zweiten Schreibrschritt. Die zelladhäsiven Bereiche wurden zur Darstellung rot koloriert.

3.10 Probenpräparation und immunhistochemische Färbung

➤ Probenpräparation für REM-Analysen

Zellproben für REM-Aufnahmen wurden mit 2 % PFA/GA in 1x PBS für 1h bei RT fixiert. Anschließend wurden die Proben in einer Aceton-Konzentrationsreihe mit 10, 30, 50, 70, 90 und 100% Aceton für jeweils 10 min entwässert. Die Entwässerung mit 100% Aceton wurde dreimal wiederholt. Um das Auftreten von Oberflächenspannungen zu vermeiden, erfolgte danach eine Kritische-Punkt-Trocknung mit Aceton als Substitutionsmedium in einem Leica EM CPD030 Kritisch-Punkt-Trockner. Die Proben wurden 6-8x mit flüssigem CO_2 gewaschen und nachfolgend bei 40°C und 75 bar getrocknet. Die getrockneten Proben wurden auf einen Probenhalter mit Leitsilber geklebt und mit einer 3-5 nm

dicken Schicht von leitfähigem Metall beschichtet. Alle REM-Aufnahmen wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie von Dr. Andreas Wickberg oder Dr. Carolin Klusmann (Institut für angewandte Physik, KIT) durchgeführt.

➤ **Probenpräparation für immunhistochemische Färbungen**

Immunhistochemische Färbungen wurden nach dem Protokoll in Tabelle 19 durchgeführt. Alle Schritte erfolgten standardmäßig bei RT.

Tabelle 19: Inkubationsschritte für immunhistochemische Färbungen

Vorgang	Lösung/Puffer	Dauer
Fixierung	4% PFA in 1xPBS	10 min
Permeabilisieren	1x PBS + 0,1% Triton-X 100	3x5 min
Primärantikörper	Antikörper in 1% BSA, gelöst in 1xPBS	1 h
Waschen	1x PBS + 0,1% Triton-X 100	3x5 min
Sekundärantikörper und Affinitätsfarbstoffe	Antikörper in 1% BSA, gelöst in 1xPBS	1 h
Waschen	1x PBS + 0,1% Triton-X 100	3x5 min
Einbetten	20% Mowiol mit n-Propylgallat	Über Nacht

3.11 Zeitrafferaufnahmen und FRAP-Messungen

Für die Mikroskopie lebender Zellen wurden diese aus der Kulturflasche abgelöst, zentrifugiert und in DMEM-FCS ohne Phenolrot mit 1 % Pen/Strep (*Imaging-Medium*) resuspendiert. Zur Kultivierung wurden die Zellen in sterile Glasboden-Kulturschalen (*MatTek Corporation*, 35 mm, No.1.5) ausgesät, welche zuvor mit FN beschichtet wurden. Die Zellen wurden vor dem Beginn der Aufnahmen für 2 h im Inkubator kultiviert, um ein gleichmäßiges Abflachen der Zellen zu gewährleisten. Die Inkubationsboxen der Mikroskope wurden mindestens 3 h vor dem Beginn der Aufnahmen auf 37°C vorgewärmt. Um einen konstanten pH-Wert der Zellen bei Langzeitaufnahmen zu gewährleisten, enthält das *Imaging-Medium* 25 mM HEPES-Puffer. In allen Fällen wurde die Laserintensität und Belichtungszeit so gering wie möglich gehalten, um Phototoxizität zu minimieren.

Für Zellmigrationsanalysen wurden 4×10^4 Zellen ausgesät und nach zweistündiger Inkubationszeit mittels Phasenkontrastmikroskopie Zeitrafferaufnahmen erstellt. Dabei wurden über einen Zeitraum von 4 h Aufnahmen in Intervallen von 3-5 min angefertigt.

Für FRAP Messungen wurden NM IIA-KO Zellen mit eGFP-NMHC IIA, bzw. NM IIB-KO Zellen mit eGFP-NMHC IIB transfiziert (Vgl. Abschnitt 3.6). Nach 48 h Expressionszeit wurden 1×10^5 Zellen auf FN-beschichtete Glasbodenschalen ausgesät und 2 h kultiviert. Alle FRAP-Messungen wurden an einem LSM 800 oder LSM 880 (Carl Zeiss GmbH) im Konfokal-Modus aufgenommen, um eine möglichst hohe

zeitliche Auflösung zu erhalten. Mittels der *Region of interest*-Option wurde ein intrazellulärer Bereich festgelegt, der gebleicht werden sollte. Zum Anregen und Bleichen der GFP-Fluoreszenz wurde ein 488 nm Laser verwendet. Für die Messung der Fluoreszenzintensität wurde die Laserintensität auf ein Minimum reduziert, um gesättigte Pixel und Phototoxizität zu vermeiden. Das Bleichen der Fluorophore erfolgte bei maximaler Laserintensität in der festgelegten Bildregion. Das FRAP-Profil wurde mittels der *Bleaching*-Option festgelegt und enthielt folgende Parameter:

Tabelle 20: FRAP-Profil zur Bestimmung der Dynamik von NM IIA und NM IIB

Schritt	Parameter
Bestimmung der initialen Fluoreszenzintensität	10 Aufnahmen mit einer Bildrate von 2 Bildern pro Sekunde (2 fps)
Bleichen der Fluoreszenz	100 Iterationen bei maximaler Laserpower
Bestimmung der Fluoreszenz-Erhholung	Für eGFP-NMHC IIA: 300 Aufnahmen mit 2 fps Für eGFP-NMHC IIB: 500 Aufnahmen mit 2 fps

3.12 Datenverarbeitung, quantitative Analysen und Modellierungen

➤ **Verwendete Bildbearbeitungsprogramme**

Für die Bearbeitung von fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die Programme ZEN (Carl Zeiss GmbH) und FIJI (*Fiji is just ImageJ, open source*) verwendet. Die Verrechnung der SIM-Aufnahmen wurde mittels der β -Version von ZEN Black des Elyra PS.1 Prototyps durchgeführt. Für die Segmentierung von 3D-Bilderstapeln wurde das Programm Imaris (Bitplane, UK) verwendet.

➤ **Sequenzanalysen und -alignments**

Sequenz- und Restriktionsanalysen für Plasmid-Klonierungen wurden mit dem *SnapGene Viewer* (GSL Biotech LLC) durchgeführt. Die Ermittlung von *guide*-Sequenzen für CRISPR/Cas9 vermittelte Gen-Editierung erfolgte durch die Programme CCTOP (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>) und CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>). *Alignments* wurde Nukleinsäuresequenzen wurden mit dem CLC Sequence viewer (QIAGEN) durchgeführt.

➤ **Bestimmung der Kreisradien R und Spanndistanzen d auf strukturierten Substraten.**

Die Vermessung der Kreisradien R und Spanndistanzen d auf mikrostrukturierten 2D-Substraten erfolgte mit Hilfe von FIJI. Durch manuelles Anlegen der Kreise an die Aktinbögen wurde der Wert R ermittelt. Für die Ermittlung von d wurde die Strecke des Zellkörpers vermessen, die sich über den passivierten Bereichen des Substrats befand. Zellbereiche, die sich durch Aktinpolymerisation auf den adhäsiven Substratbereichen ausbreiteten, wurden nicht in die Spanndistanz miteinbezogen (Abb. 3.5). Die Werte wurden in Streudiagrammen geplottet und eine lineare Trendlinie durch die Punktwolke gelegt. Für quantitative Vergleiche wurde der Korrelationskoeffizient von $R(d)$ bestimmt.

Für die Bestimmung der Verhältnisse zwischen R und d wurde der Quotient gebildet. In den Graphen ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten aufgetragen.

Die Vermessung von R und d bei Zellen in 3D-Mikrostrukturen, wurde von Dr. Marco Linke und Dr. Christoph Brand (Institut für theoretische Physik, Universität Heidelberg) durchgeführt. Dazu wurden die Aktinbögen mit Hilfe der Software Imaris segmentiert und Kreise durch eine automatisierte Software (Benutzerdefinierte Software von Dr. Christoph Brand und Dr. Marco Linke) angelegt. Die Werte R und d können aus den Quellcodes der Software ausgelesen werden.

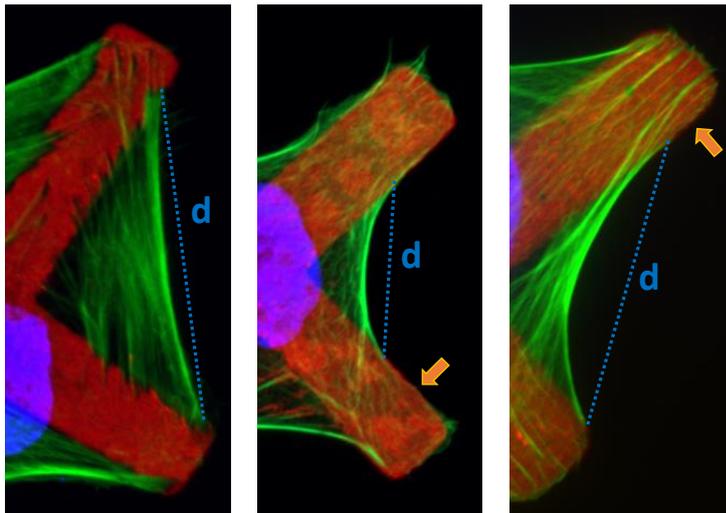


Abbildung 3.5: Bestimmung der Spannweite d auf mikrostrukturierten 2D-Substraten.

Als d wird die Strecke des Zellkörpers über dem passivierten Bereich des Zellsubstrats bestimmt. Teile des Zellkörpers, welche sich durch Aktinpolymerisation auf dem Substrat ausbreiten, jedoch keinen passivierten Bereich überspannen (orange Pfeile), werden nicht in die Strecke miteinbezogen.

➤ Bestimmung der Ordnungsparameter

Die Ordnungsparameter der Aktinfilamente wurden durch Philipp Linke (Physikalisch-chemisches Institut, Universität Heidelberg) quantifiziert. Dazu wurden die Winkel θ der Aktinfilamente in Relation zur Y-Achse des Kreuz-Substrates ermittelt und der Ordnungsparameter entsprechend folgender Gleichung ermittelt (Linke et al., 2019).

$$\langle S_{4\theta} \rangle = \frac{-\sum_i A_i \cos(4\theta_i)}{\sum_i A_i}$$

➤ FRAP-Auswertungen

Die Auswertung der FRAP-Messungen wurde von Justin Grewe (Institut für theoretische Physik, Universität Heidelberg) mit einer MATLAB-basierten Benutzeroberfläche durchgeführt. In allen FRAP-Kurven wurde die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert sowie die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Bleichen und die laterale Drift durch Zellbewegungen korrigiert. Aus den Kurven wurde jeweils die Zeitskala der Fluoreszenz-Erholung sowie die mobile/immobilen Fraktion der eGFP-Moleküle abgeleitet.

➤ **Quantifizierungen der Fluoreszenzintensität von NMHC IIA, NMHC IIB und pRLC**

Intensitätsquantifizierungen wurden durch Anlegen von *Linescans* mit der Software ZEN durchgeführt. Dazu wurde anhand des Aktinsignals manuell ein Linienprofil entlang der SF gezeichnet und jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität der kolocalisierenden NMHC IIA-, NMHC IIB- und pRLC-Signale bestimmt. Im Fall von Abbildung 4.19F wurden die Werte zur besseren Vergleichbarkeit auf den jeweils höchsten Wert der unterschiedlichen Konditionen normalisiert.

Um das Verhältnis von NM IIA und NM IIB in heterotypischen Filamenten zu quantifizieren, wurden die Fluoreszenzintensitäten von einzelnen NM IIA Filamenten an verschiedenen Positionen innerhalb des Zellkörpers bestimmt. Um eine unvoreingenommene Quantifizierung zu garantieren, wurde das NM IIB Signal ausgeschaltet und nur die Intensität ausgelesen. Um das Verhältnis zu bilden, wurden beide Werte aufsummiert und die prozentualen Anteile anhand der Summe berechnet. Die Graphen in Abbildung 4.21C geben jeweils den Mittelwert von 49 ausgewerteten Zellen wider.

➤ **3D-Modelle und Simulationen von Zellen in 3D-Mikrostrukturen**

Alle in dieser Arbeit gezeigten 3D Modelle und Simulationen von Zellen wurden von Dr. Christoph Brand und Dr. Marco Linke (Institut für theoretische Physik, Universität Heidelberg) erstellt. Für die Erzeugung der 3D-Modelle wurde das 2D TEM zu einem kompletten, dreidimensionalen Zellmodell ausgeweitet (Brand et al., 2017). Modelle und Simulationen wurden computergesteuert, anhand einer benutzerdefinierten Software erzeugt.

4 Ergebnisse

4.1 Spannung und Elastizität tragen zum Zellphänotyp in 3D bei

Die Steuerung der Zellmorphologie über NM II-vermittelte Kontraktilität bildet die Basis für zahlreiche kraftabhängige Prozesse in nicht-muskulären Zellen. Die biophysikalischen und biomechanischen Grundlagen dieser Vorgänge haben in der aktuellen Forschung ein interdisziplinäres Interesse in den Bereichen der Biologie und Physik hervorgerufen. Der Einsatz von strukturierten Substraten und theoretischen Modellen bietet dabei die Möglichkeit, die komplexen und vielfältigen Auswirkungen der kontraktilen Maschinerie vereinfacht, mit weniger Variablen abzubilden. Bischofs und Kollegen nutzten einen solchen Ansatz, um Zellphänotypen in Abhängigkeit von Spannung und Elastizität zu beschreiben (Vgl. Kapitel 1.5) (Bischofs et al., 2008). Die Ergebnisse dieser Publikation bilden die Grundlage für den in diesem Kapitel angestrebten Vergleich von analogen Zellphänotypen in 3D. Der experimentelle Ansatz basiert auf der Verwendung von mikrostrukturierten 3D-Zellkultursubstraten mit alternierenden adhäsiven und passivierenden Bereichen. Durch den Einsatz dieser Substrate wird eine Normierung des Zellphänotyps erreicht, welche die quantitative Analyse der Zellmorphologie erlaubt. Die daraus resultierenden Datensätze wurden mit Computersimulationen und theoretischen Modellierungen aus der Biophysik abgeglichen. Alle Simulationen und theoretische Modellierungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ulrich Schwarz realisiert.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von 2D zu 3D zu gewährleisten, sowie Zelltyp-spezifische Unterschiede zu vermeiden, wurden NIH 3T3 Fibroblasten auf identischen mikrostrukturierten 2D-Substraten kultiviert, wie sie bereits in der Arbeit von Bischofs und Kollegen Verwendung fanden. Die Substrate weisen rechteckige Adhäsionsflächen von circa $2 \times 2 \mu\text{m}$ auf, welche im Abstand von $5\text{-}20 \mu\text{m}$ angeordnet sind. Zwischen den Adhäsionspunkten befinden sich proteinabweisende Flächen, wodurch die Zelladhäsion auf die adhäsiven Flächen limitiert wird. Entlang der Zellkontur von NIH 3T3 Fibroblasten bilden sich nach innen gerichtete Aktinbögen, welche die passivierten Bereiche zwischen den Adhäsionsflächen überspannen (Abb.4.1A&B). Eine identische Morphologie wurde von Bischofs und Kollegen für parenchymale BRL Zellen sowie Fibroblastenartige B16-F1 Zellen beschrieben (Bischofs et al., 2008). Um sicherzustellen, dass NIH 3T3 Fibroblasten den gleichen TEM-Gesetzmäßigkeiten folgen, wurden von 152 Aktinbögen aus 30 Zellen jeweils der Radius R und die Spanndistanz d zwischen den FN-Dots vermessen (Abb.4.1B). Der Radius R der Kreisbögen steigt dabei mit zunehmendem Abstand d zwischen den Adhäsionsflächen (Abb. 4.1C), wie bereits in Bischofs et al. 2008 für BRL und B16-F1 Zellen beschrieben. In Kapitel 1.5 wurde erläutert, dass die $R(d)$ -Abhängigkeit mit Hilfe des Spannungs-Elastizitätsmodells beschrieben werden kann. Zur Verdeutlichung ist die Kraftverteilung im Modell in Abbildung 4.1D erneut schematisch dargestellt.

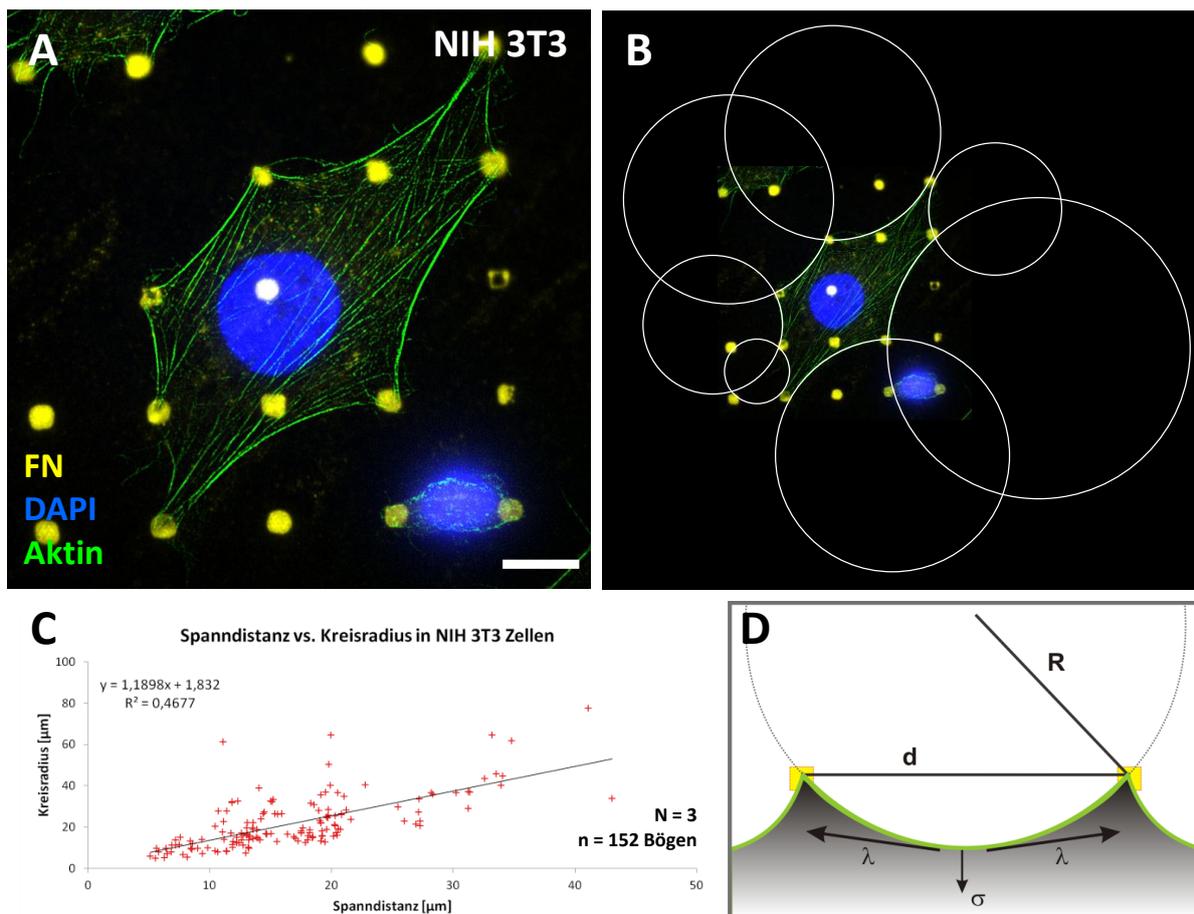


Abbildung 4.1: Kreisbogenförmige Zellkontur und $R(d)$ -Abhängigkeit in NIH 3T3 Fibroblasten.

(A) NIH 3T3 Zellen wurden für 120 min auf mikrostrukturierten FN-Substraten kultiviert und anschließend fixiert. Für die Visualisierung der Zellmorphologie und die folgende Quantifizierung wurde das Aktinzytoskelett mittels Phalloidin markiert (grün) sowie das FN-Dotmuster (gelb) visualisiert. Der Zellkern wurde mittels DAPI markiert (blau). Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm . (B) Entlang der peripheren Aktinbögen wurden Kreisbögen angelegt und die Spanndistanz d zwischen den FN-Dots bestimmt. (C) Der Kreisradius R wurde gegen die Spanndistanz d aufgetragen. R steigt mit zunehmendem d an, wie bereits in Bischofs et al., 2008 für parenchymale und Fibroblastenartige Zellen gezeigt. Dargestellt sind die gepoolten Werte aus drei unabhängigen Experimenten. (D) Schematische Darstellung der Quantifizierung sowie der Spannungsverteilung anhand des TEM (Bischofs et al., 2008).

Das TEM beschreibt in diesem Fall eine 2D Situation, bei der sich Zellen auf einem flachen Substrat ausbreiten, wodurch keine große Z-Ausdehnung des Zellkörpers vorhanden ist. Da Fibroblasten *in vivo* von einer komplexen, dreidimensionalen extrazellulären Matrix umgeben sind, wurde in den folgenden Experimenten untersucht, inwiefern sich die TEM Gesetzmäßigkeiten von einer 2D Situation auf eine 3D Situation übertragen lassen. Zu diesem Zweck wurden 3D-Mikrostrukturen mittels DLS hergestellt, die analog zu den 2D-Substraten eine Zellkultivierung mit definierter Zelladhäsion erlauben (Klein et al., 2011; Richter et al., 2017). Die Grundstruktur besteht aus fünf proteinabweisenden Säulen mit einer identischen Höhe von 25 μm , welche mit einem Abstand von jeweils 10 μm zueinander in einem Pentagon angeordnet sind. Zusätzlich befindet sich im Zentrum des Pentagons eine weitere

Säule mit lediglich 15 μm Höhe, welche eine dreidimensionale zelluläre Verankerung gewährleistet (Abb. 4.2A). Die Adhäsionspunkte wurden an den oberen Enden der Säulen platziert (Abb. 4.2B). Um in den Experimenten eine Varianz der Spanndistanz d zu erhalten, wurde eine der Säulen um 1,5-10 μm nach außen versetzt. Auf diese Weise wird ein einheitlicher Phänotyp mit variablen d -Werten gewährleistet. Abbildung 4.2A zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Strukturen und Abmessungen, der genaue Herstellungsprozess ist in Abschnitt 3.9.2 beschrieben. Abbildung 4.2B zeigt eine REM Aufnahme einer 3D-Struktur nach ihrer Fertigstellung, die FN-beschichteten Adhäsionspunkte sind zur Verdeutlichung rot koloriert. Anhand von REM- sowie fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wird deutlich, dass sich NIH 3T3 Fibroblasten nach 120 min in den Strukturen aufgespannt haben und spezifisch an den Adhäsionspunkten adhären (Abb. 4.2C-I). In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Zellen zur Verdeutlichung grün koloriert. Teilweise wurden nicht alle möglichen Adhäsionspunkte für die Zelladhäsion genutzt, sodass Zellen nur an vier oder fünf von sechs möglichen Adhäsionspunkten Zellkontakte ausbilden (Vgl. Abb. 4.2C&D). Bei Betrachtung der Zellmorphologie zeigt sich, dass Zellen in 3D-Strukturen eine zur 2D Situation ähnliche, nach innen gerichtete Zellkontur aufweisen (Abb. 4.2C & D). Zusätzlich zeigt Abbildung 4.2D, dass sich der Zellkörper aufgrund des zentralen Adhäsionspunktes axial ausdehnt und dabei eine analoge, nach innen gerichtete Zellkontur in der Z-Ebene entsteht.

Um zu untersuchen, ob Zellen in 3D-Strukturen ähnliche Aktinbögen wie Zellen auf mikrostrukturierten 2D-Substraten aufweisen, wurden das Aktinzytoskelett immunhistochemisch markiert und Z-Stapel der Zellen aufgenommen. Die Abbildungen 4.2E&F zeigen den segmentierten 3D-Stapel der Aktinsignale einer Zelle. Das Aktinzytoskelett reflektiert die Zellmorphologie, welche in den REM-Aufnahmen beobachtet wurde (Vgl. Abb. 4.2C-F). 3D Projektionen des Aktinsignals zeigen, dass sich die deutlichsten Aktinbündel zwischen benachbarten Adhäsionspunkten in der lateralen Ebene ausbilden (Abb. 4.2G). Die peripheren Aktinbündel weisen eine morphologische Ähnlichkeit zu ihrem Pendant auf mikrostrukturierten 2D-Substraten auf, sind im Gegensatz dazu jedoch in der horizontalen Ebene geneigt, da der Zellkörper durch den zentralen Adhäsionspunkt nach unten gezogen wird (Abb. 4.2H). Zusätzlich zu Aktinbündeln in der lateralen Ebene, bilden sich Aktinbündel in der axialen Ebene, welche von einem der fünf oberen Adhäsionspunkte zum zentralen, niedrigeren Adhäsionspunkt verlaufen (Pfeile in Abb. 4.2H&I). In Abbildung 4.2I ist die Zelle aus 4.2H auf dem Kopf dargestellt, um den Verlauf der axialen Aktinbündel zu verdeutlichen. Die weißen Kästen markieren die oberen Adhäsionspunkte, der weiße Kreis mit Stern markiert den zentralen, tieferen Adhäsionspunkt. Die axialen Aktinbündel bilden sich weniger regelmäßig als in der lateralen Ebene. In manchen Zellen fehlen sie komplett oder sind nur zwischen einigen Adhäsionspunkten vorhanden (Abb. 4.2I). Unabhängig von der Regelmäßigkeit der Aktinbündel in lateraler und axialer Ebene, nehmen diese auch in 3D die Form eines konkaven Bogens an (Abb. 4.2E).

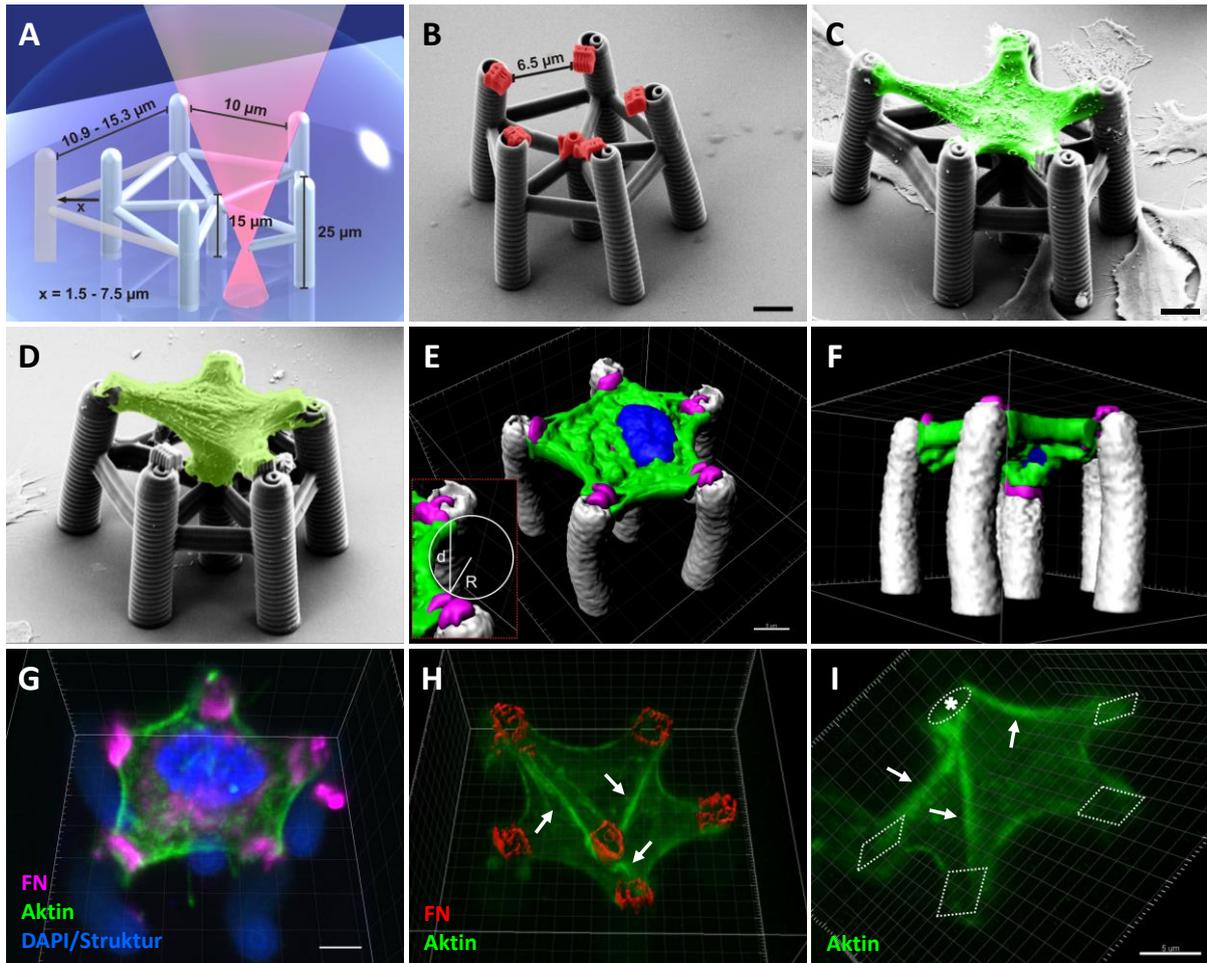


Abbildung 4.2: Zelluläre Phänotypen und Aktinfasern in 3D Mikrostrukturen.

(A) Schematische Darstellung und Abmessungen bei der Herstellung einer 3D Mikrostruktur mittels DLS. **(B)** REM Aufnahme einer 3D Mikrostruktur, die FN-beschichteten Adhäsionspunkte sind in Rot dargestellt. **(C) & (D)** REM Aufnahme einer NIH 3T3 Zelle in einer 3D-Struktur, die Zelle wurde zur Verdeutlichung grün koloriert. Die Zellen zeigen prominente, nach innen gerichtete Zellkonturen, sowohl in lateraler als auch in axialer Ebene. **(E) & (F)** Segmentierter Z-Stapel einer NIH 3T3 Zelle in einer 3D Mikrostruktur. Die Segmentierung wurde ausgehend von den Intensitätssignalen einer immunhistochemischen Markierung erzeugt. Das Aktinsignal ist in grün, das FN-Signal in magenta, der Zellkern in blau und die Mikrostruktur in grau dargestellt. Die Aktinbündel entlang der Zellkontur weisen eine ähnliche Morphologie wie in der 2D Situation auf. **(G)** 3D Projektion einer NIH 3T3 Zelle in einer 3D Mikrostruktur. Aktin (grün), der Zellkern (blau) und FN (magenta) wurden immunhistochemisch markiert. Die 3D Mikrostruktur fluoresziert aufgrund der Autofluoreszenz des Photolackes blau. Es sind deutliche, konkave Aktinbögen entlang der Zellperipherie erkennbar. **(H)** 3D Projektion einer NIH 3T3 Zelle zur Darstellung der unterschiedlichen Aktinbündel (grün) in lateraler und axialer Ebene. Pfeile markieren axiale Aktinbündel. Die lateralen Aktinbündel sind zusätzlich in der horizontalen Ebene geneigt. **(I)** Gekippte Darstellung der selben Zelle aus (H) zur Verdeutlichung der axialen Aktinbündel (grün). Weiße Kästen markieren die oberen Adhäsionspunkte, der weiße Kreis mit Stern markiert den zentralen, tieferen Adhäsionspunkt. Die axialen Aktinbündel bilden sich im Vergleich zu den lateralen unregelmäßiger. Zwischen drei Adhäsionspunkten und dem zentralen Punkt verlaufen axiale Fasern (Pfeile), an einem Adhäsionspunkt ist keine axiale Faser zu erkennen. Der Maßstabsbalken entspricht in allen Abbildungen 5 µm.

Um zu überprüfen, ob die TEM-Gesetzmäßigkeiten aus der 2D Situation nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ mit der 3D Situation übereinstimmen, wurden in der Arbeitsgruppe Schwarz quantitative Bildanalysen, Computersimulationen und theoretische Modellierungen anhand der experimentellen Daten durchgeführt (Abb. 4.3) (Brand et al., 2017). Alle Modelle und Simulationen wurden von Dr. Christoph Brand und Dr. Marco Linke erzeugt.

In einer 2D Situation sind die Kontraktionen des dorsalen und ventralen Aktincortex in dieselbe Richtung orientiert, wodurch sich die effektive Oberflächenspannung σ ergibt (Guthardt Torres et al., 2012). Da die Orientierung des Aktincortex in einer 3D Situation komplexer ist, wurde das vorhandene 2D Modell eines aktiv kontrahierenden Kabelnetzwerkes zu einem kompletten 3D-Zellmodell erweitert, welches die dreidimensionale Orientierung von σ berücksichtigt. Das Modell kombiniert analog zum 2D TEM Spannung und Elastizität, jedoch ohne eine Annahme, wo die Aktinbündel subzellulär lokalisiert sein werden (Brand et al., 2017). Abbildung 4.3A zeigt das Resultat der Simulation für die Adhäsionsgeometrie, welche in den Zellkultur-Experimenten in Abbildung 4.2 verwendet wurde. Die Mikrostruktur ist in grau dargestellt, gelbe Kugeln markieren die Adhäsionspunkte. Die Vektorpfeile zeigen die Balance zwischen den Spannungen σ und λ an den peripheren Zellkonturen (Abb. 4.3A). Der resultierende Phänotyp aus der Simulation stimmt mit den experimentell beobachteten Phänotypen überein. Für eine quantitative Analyse wurden Kreisbögen an segmentierte Aktinbögen aus der lateralen Ebene, entsprechend deren Neigung, angelegt (Abb. 4.3B). Die Quantifizierung in Abbildung 4.3C zeigt, dass der Kreisradius R auch in 3D mit zunehmender Spanndistanz d steigt. Dieses Ergebnis wird sowohl durch den Vergleich zu Werten aus der Simulation als auch durch das 2D TEM unterstützt (Abb. 4.3C). Für axiale Aktinbögen konnte aufgrund der limitierten Z-Auflösung und der damit verbundenen problematischen Segmentierung keine quantitative Evaluation durchgeführt werden. Anhand der Computersimulation kann jedoch eine Vorhersage über die subzelluläre Lokalisation des elastischen Stresses getroffen werden. In Abbildung 4.3D lokalisiert die höchste Linienspannung, respektive der größte elastische Stress, an den peripheren Linien, welche die Adhäsionspunkte in der lateralen Ebene verbinden. Der größte Stress lokalisiert somit dort, wo auch die prominentesten Aktinbögen vorhanden sind. Der elastische Stress in den axialen Ebenen fällt in den Simulationen hingegen geringer aus und spiegelt das unregelmäßige Auftreten der axialen Aktinbögen wider.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die resultierende Zellmorphologie sowohl in 2D als auch in 3D von beiden Größen, Spannung und Elastizität, abhängt. Die phänotypische Ausprägung der Zellen kann anhand des 3D TEM beschrieben werden und folgt dabei analogen physikalischen Gegebenheiten wie in 2D.

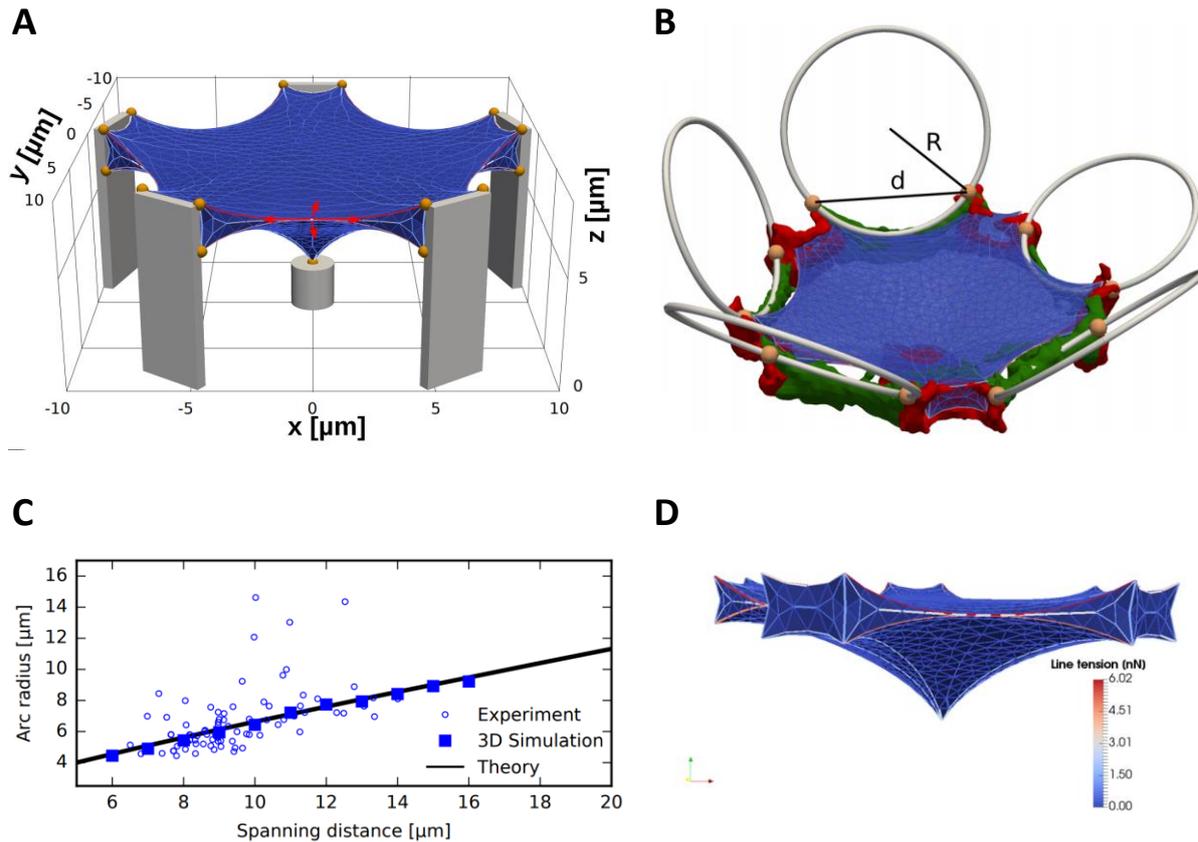


Abbildung 4.3: Quantitative Analyse und Modellierung der Phänotypen in 3D Mikrostrukturen.

(A) Computergesteuertes 3D Modell einer kontrahierenden Zelle entsprechend der experimentellen Adhäsionsgeometrie. Graue Balken stellen die Mikrostruktur dar, gelbe Kugeln die Adhäsionspunkte. Die Zelle ist in blau dargestellt, Vektorpfeile zeigen die Balance zwischen den Spannungen σ und λ an den peripheren Zellkonturen. (B) Überlagerung von segmentierten lateralen Aktinbögen und der entsprechenden Ebene des Computermodells. Die Kreisbögen wurden entsprechend der Neigung der Aktinbögen angelegt und quantitativ ausgewertet. (C) Quantitative Auswertung der Kreisradien R und Spanndistanzen d . Analog zur 2D Situation steigt R mit zunehmendem d . Dieses Ergebnis wird sowohl durch die Computersimulation als auch durch das 2D TEM gestützt. $N_{\text{Zellen}}=35$, $N_{\text{Bögen}}=81$. (D) Simulationsgestützte Vorhersage über die Lokalisation des elastischen Stresses im 3D Modell. Der größte elastische Stress lokalisiert entlang der lateralen Verbindungslinie in der Peripherie, wohingegen die axialen Verbindungslinien geringerem elastischen Stress ausgesetzt sind. Alle Modelle und Simulationen wurden von Dr. Christoph Brand und Dr. Marco Linke erstellt.

4.2 Unterschiedliche Inhibitionen der Aktomyosin-Kontraktilität führen zu unterschiedlichen TEM-Phänotypen

Der Einfluss der Aktomyosin-Kontraktilität auf die Zellmorphologie und das TEM wurde von Bischofs und Kollegen durch die Inhibierung der Myosin-Aktivität mittels Blebbistatin oder Y-27632 weiter untersucht (Bischofs et al., 2008). Beide Inhibitoren führten zu stark nach innen gekrümmten Zellkonturen, was sich in einer Abnahme der Kreisbogenradien widerspiegelte. Anhand des TEM wurde aus diesen Ergebnissen eine direkte Beeinflussung der Linienspannung λ durch die Aktomyosin-

Kontraktilität abgeleitet. Ein Nachteil beim Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren ist jedoch, dass deren Wirkung oftmals sehr unspezifisch ausfällt. Y-27632 ist bekannt als Inhibitor von ROCK, welche neben der Aktomyosin-Kontraktilität auch die Aktinpolymerisation über Dia-Proteine steuert (Amano et al., 2010). Blebbistatin ist hingegen ein Pan Myosin II Inhibitor, welcher unspezifisch alle NM II-Isoformen in nicht-muskulären Zellen inhibiert (Bond et al., 2013). Es kann daher keine Aussage darüber getroffen werden, ob die verschiedenen NM II-Isoformen unterschiedlichen Einfluss auf die TEM-Parameter ausüben. Um zu überprüfen, ob die pharmakologische Inhibition von NM II und der Verlust einzelner NM II-Isoformen zu unterschiedlichen TEM-Phänotypen führen, wurde in Abbildung 4.4 die Morphologie von NIH 3T3 und COS-7 Zellen in Gegenwart oder Abwesenheit von Blebbistatin verglichen. NIH 3T3 Zellen exprimieren NM IIA und NM IIB, jedoch kein NM IIC (Schornick, 2019). COS-7 Zellen zeichnen sich durch eine fehlende NM IIA Expression aus, die Expression von NM IIB und NM IIC ist dagegen stark ausgeprägt (Bao et al., 2005). Beide Zelllinien wurden für 120 min, mit oder ohne Blebbistatin, auf mikrostrukturierten Dot-Substraten kultiviert. Um die NM II-Lokalisation zu verdeutlichen, wurde NM IIA in NIH 3T3 Zellen und NM IIB in COS-7 Zellen immunhistochemisch markiert.

Wie bereits in Abbildung 4.1 gezeigt, bilden NIH 3T3 Zellen konkave Aktinfasern zwischen den Adhäsionspunkten aus. NM IIA lokalisiert dabei entlang der peripheren und zentralen Aktinfasern gleichermaßen. Analog zu den Ergebnissen von Bischofs und Kollegen, führt eine Blebbistatin-Behandlung von NIH 3T3 Zellen zur Ausbildung kleinerer Kreisbögen gegenüber unbehandelten Zellen. Zusätzlich ist eine Reduktion der internen Aktinfasern vorhanden, die NM IIA Lokalisation bleibt hingegen unverändert (Vgl. Abb. 4.4A und B). COS-7 Zellen unterscheiden sich phänotypisch sowohl von unbehandelten, als auch von Blebbistatin-behandelten NIH 3T3 Zellen (Abb. 4.4C). Der Radius peripherer Aktinbögen ist im Fall von COS-7 Zellen oftmals größer als bei NIH 3T3 Zellen, manche Bögen erscheinen fast gerade (Abb. 4.4C). Intrazelluläre Aktinfasern sind kaum vorhanden, stattdessen ist es Netzwerk aus feinen, kurzen Aktinfilamenten erkennbar. Die NM IIB Lokalisation ist auf die peripheren Aktinfasern beschränkt. Werden COS-7 Zellen zusätzlich mit 10 μ M Blebbistatin behandelt, führt dies zu einem kompletten Kollaps des Zellkörpers (Abb. 4.4D). Die verbleibenden Aktinstrukturen lokalisieren in langen, dünnen Zellausläufern, welche sich zwischen den FN-Dots ausbreiten. Eine Kollokalisierung von Aktin und NM IIB ist nur noch bedingt vorhanden.

Der Unterschied zwischen unbehandelten NIH 3T3 und COS-7 Zellen wurde zusätzlich quantitativ ausgewertet. Die $R(d)$ -Abhängigkeit ist in COS-7 Zellen signifikant gegenüber NIH 3T3 Zellen reduziert (Abb. 4.4G). Werden alle Datenpunkte gepoolt und als Streudiagramm dargestellt, wird deutlich, dass die Punktwolke im Fall der COS-7 Zellen hin zu größeren R -Werten streut (Vgl. Abb.4.4E & F). Die Streuung spiegelt dabei die größeren Kreisradien wider, welche in geringerer Abhängigkeit von der Spanndistanz d auftreten. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die pharmakologische Inhibierung der NM II-Aktivität die Spannungsverteilung im TEM auf andere Weise beeinflusst, als eine fehlende NM IIA Expression in COS-7 Zellen.

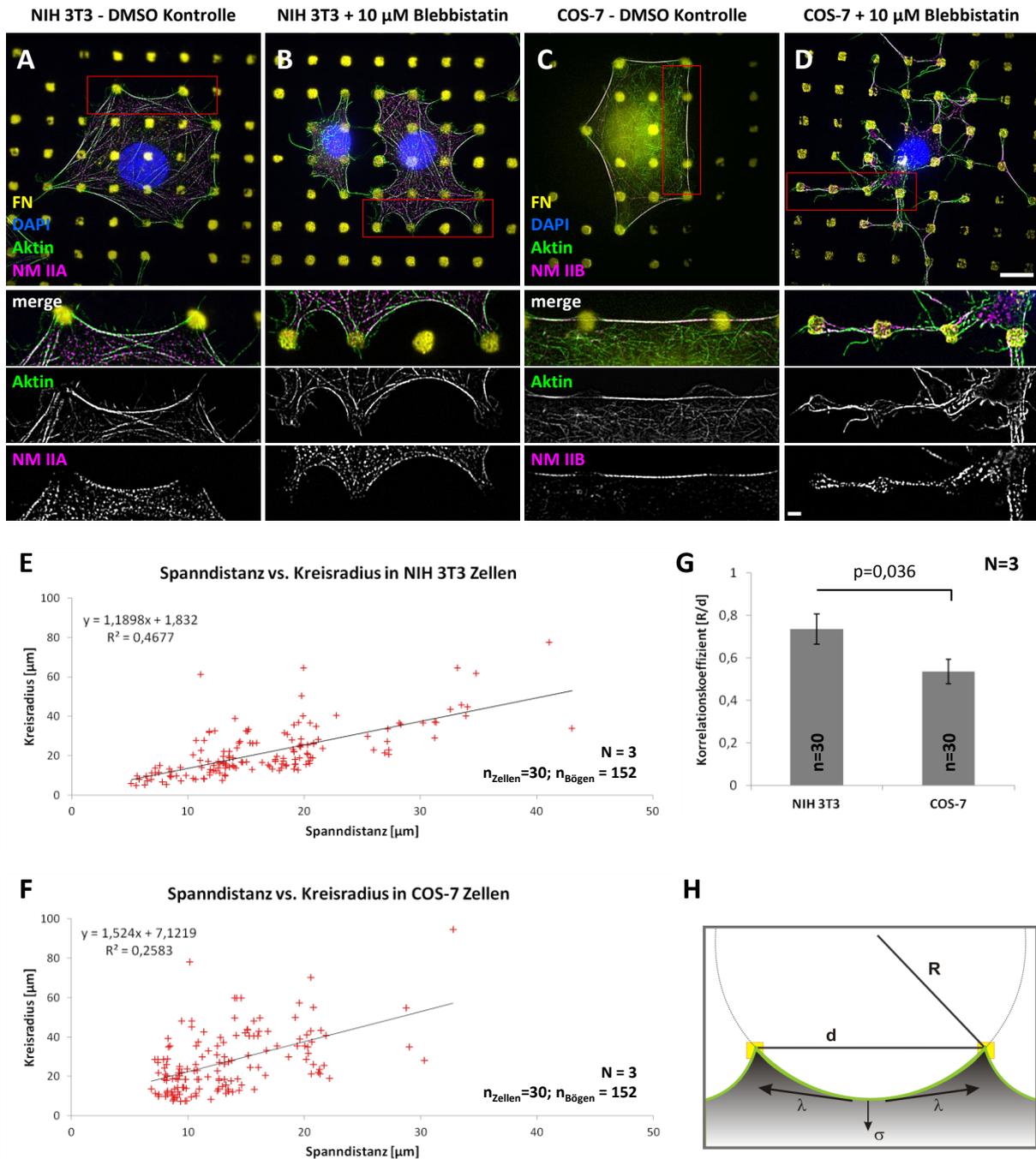


Abbildung 4.4: Vergleich von Blebbistatin-behandelten und NM IIA-defizitären Zellphänotypen.

(A)-(D): NIH 3T3 oder COS-7 Zellen wurden für 120 min auf Dot-Substraten kultiviert. Gezeigt ist Aktin (grün), FN (gelb), der Zellkern (blau) sowie NM IIA oder NM IIB (magenta). **(A)** Unbehandelte NIH 3T3 Zellen zeigen konkave Aktinbögen entlang der Zellkontur. **(B)** Die Zugabe von 10 μ M Blebbistatin führt zur Ausbildung von kleineren Aktinbögen. **(C)** NM IIA-defizitäre COS-7 Zellen bilden hingegen größere Aktinbögen, die sich fast linear zwischen den FN-Dots aufspannen. **(D)** Die Blebbistatinbehandlung von COS-7 Zellen führt zum Kollaps des Zellkörpers. **(E)&(F):** Streudiagramme der gepoolten Datenpunkte aus drei unabhängigen Experimenten. NIH 3T3 Zellen zeigen einen positiven Anstieg von R mit steigender d . COS-7 Zellen zeigen auch einen positiven Anstieg, weisen jedoch eine wesentlich größere Streuung der Datenpunkte auf. **(G)** Die $R(d)$ -Abhängigkeit von COS-7 Zellen ist gegenüber NIH 3T3 Zellen signifikant reduziert. **(H)** Schematische Darstellung der Quantifizierung sowie der Spannungsverteilung anhand des TEM. Maßstab = 10 μ m (Übersicht) bzw. 2 μ m (Detailansicht).

4.3 Subzelluläre Lokalisation von NM II-Isoformen in U2OS Zellen

Der phänotypische Unterschied von Blebbistatin-behandelten NIH 3T3 Zellen und NM IIA-defizitären COS-7 Zellen zeigt, dass eine Differenzierung der Aktomyosin-Kontraktibilität in Bezug auf die einzelnen NM II-Isoformen sinnvoll ist. Um den Einfluss der einzelnen NM II-Isoformen systematisch zu analysieren, wurden die Experimente in den folgenden Kapiteln mit humanen U2OS Zellen durchgeführt. U2OS Zellen haben sich in verschiedenen Studien als Modell-Zelllinie für die Analyse von SF etabliert (Beach et al., 2014; Burnette et al., 2014; Hotulainen und Lappalainen, 2006). Immunhistochemische Färbungen und Western Blot Analysen zeigen zudem, dass U2OS Zellen alle drei NM II-Isoformen exprimieren (Vgl. Abb. 4.7C-E), wodurch sie für die vergleichende Analyse der Isoformen prädestiniert sind. Mittels hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie (SIM oder AiryScan) wurde die subzelluläre Lokalisation der verschiedenen NM II-Isoformen entlang der SF genauer charakterisiert (Abb. 4.5). Einzelne Signalcluster repräsentieren dabei jeweils einzelne NM II-Filamente. Um die Kolokalisation der Isoformen entlang der unterschiedlichen SF-Subtypen zu analysieren, wurde zusätzlich Paxillin als Marker für Fokalkontakte angefärbt (Vgl. Abb. 1.2).

Die Isoform NM IIA zeigt eine homogene Verteilung innerhalb der Zelle (Abb. 4.5A), mit einer gleichbleibenden Signalintensität vom Lamellum bis zum Zellzentrum (Abb. 4.5A'). NM IIA-Cluster kolokalisieren mit transversalen Arcs und vSF, jedoch nicht mit dSF (Abb. 4.5A''). Die intrazelluläre Verteilung von NM IIB variiert gegenüber NM IIA. Statt einer homogenen Verteilung nimmt die Intensität der NM IIB Cluster zum Zellzentrum zu, wodurch das Lokalisationsmuster einem Gradienten entlang der Zellachse entspricht (Abb. 4.5B & B'). NM IIB kolokalisiert ebenfalls mit transversalen Arcs und vSF aber nicht mit dSF. Aufgrund der graduellen Intensitätsverteilung von NM IIB ist die Intensität der Cluster bei den proximalen transversalen Arcs am höchsten, die zentralen vSF weisen keine Unterschiede in der NM IIB-Intensität auf (Abb. 4.5B''). Die intrazelluläre Lokalisation von NM IIC ist nicht auf bestimmte Bereiche beschränkt und weist, ähnlich wie NM IIA, eine homogene Verteilung auf (Abb. 4.5C). Bei der Betrachtung der subzellulären Lokalisation wird jedoch deutlich, dass NM IIC wesentlich weniger mit den Aktinfasern kolokalisiert, als NM IIA und NM IIB (Vgl. Abb. 4.5A'-C'). Die Detailansicht der Kolokalisation von NM IIC und den SF-Subtypen bestätigt diesen Eindruck. Eine Kolokalisation zwischen NM IIC und transversalen Arcs oder vSF ist grundsätzlich vorhanden, wohingegen auch NM IIC nicht mit dSF kolokalisiert (Abb. 4.5C''). Das Signal erscheint jedoch eher diffus verteilt als in einem klaren Muster angeordnet, zahlreiche NM IIC Cluster weisen keine Kolokalisation mit SF auf.

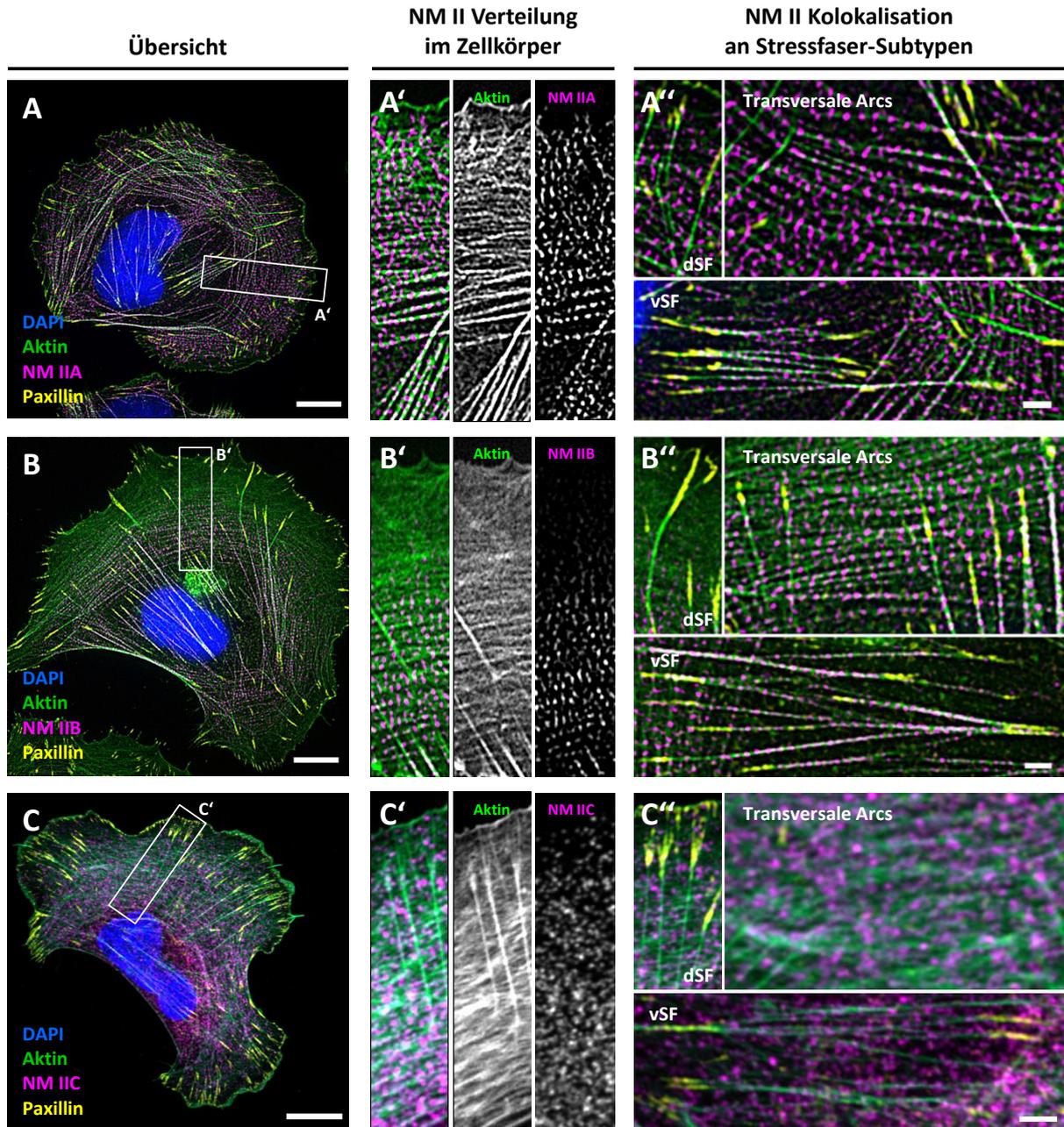


Abbildung 4.5: Expression und subzelluläre Lokalisation der NM II-Isoformen in U2OS Zellen.

U2OS Zellen wurden für 120 min auf FN-beschichteten Deckgläsern kultiviert und fixiert. Der Zellkern (blau), Aktin (grün), Paxillin (gelb) sowie die jeweilige NM II-Isoform (Magenta) wurden immunhistochemisch markiert. Die Paxillinfärbung dient zur Unterscheidung der SF-Subtypen (A''-C''). **(A)** NM IIA ist homogen innerhalb der Zelle verteilt und die Lokalisation orientiert sich entlang der Aktinfasern (A'). Die Kolokalisation entlang der SF-Subtypen beschränkt auf die transversalen Arcs und die vSF, entlang von dSF ist keine Kolokalisation vorhanden (A''). **(B)** Das Lokalisationsmuster von NM IIB entspricht einem Gradienten mit der höchsten Intensität im Zellzentrum (B'). Auch NM IIB kolokalisiert mit transversalen Arcs und vSF aber nicht mit dSF (B''). **(C)** NM IIC lokalisiert ebenfalls homogen verteilt innerhalb der Zelle (C'). Die Lokalisation ist jedoch weniger strikt an den SF orientiert. Eine Kolokalisation mit transversalen Arcs und vSF ist prinzipiell vorhanden, auch NM IIC kolokalisiert nicht mit dSF (C''). Zahlreiche NM IIC Cluster kolokalisieren jedoch mit keiner SF. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 10 µm (Übersicht) bzw. 2 µm (Detailansicht).

Um die Substruktur der NM II-Isoformen genauer zu analysieren, wurde die bipolaren NM II-Filamente immunhistochemisch markiert und mittels AiryScan visualisiert. Eine schematische Darstellung der Markierung sowie der resultierenden Struktur ist in Abbildung 4.6A abgebildet. Ein Antikörper gegen die phosphorylierte RLC (pRLC) dient als Marker für die bipolaren Kopfreionen des Filaments. Da nur phosphorylierte RLCs erkannt werden, sind auch entsprechend nur Moleküle markiert, die sich in der assemblierungskompetenten 6S-Konformation befinden (Vgl. Abb. 1.6). Zudem markieren pRLC Signale jedes bipolare Filament, unabhängig von der Isoform, da die Bindung der RLC an die NMHCs Isoform-unspezifisch ist (Vgl. Abschnitt 1.2.4). Um die verschiedenen Isoformen zu unterscheiden, wurden Antikörper verwendet, welche spezifisch die Tailregionen der NMHCs erkennen. Daraus ergibt sich die charakteristische bipolare Struktur mit einem Isoform-spezifischen Signal, welches von zwei pRLC Signalen flankiert wird (Abb. 4.6A). NM IIA Filamente weisen eine klare bipolare Struktur auf (Abb. 4.6B-B''). Die Intensitätsprofile deuten neben der bipolaren Struktur außerdem auf eine gleichbleibende Intensität der pRLC und der NMHC IIA, unabhängig von der intrazellulären Lokalisation, hin (Vgl. Abb. 4.6B' & B''). Auch NM IIB Filamente weisen eine charakteristische bipolare Struktur auf (Abb. 4.56C-C''). Die Intensitätsprofile verdeutlichen hier die graduelle Zunahme der NMHC IIB Intensität zum Zellzentrum hin, während die pRLC Intensität unverändert bleibt (Vgl. Abb. 4.6C' & C''). Im Fall von NM IIC wurden nur teilweise Filamente mit bipolarer Struktur visualisiert (Abb. 4.6D-D''). Die Mehrheit der Filamente zeigte eine atypische Substruktur, bei der das NMHC IIC Signal mit einer der beiden Kopfreionen kolokalisierte (Abb. 4.6D''). Weiterhin sind zahlreiche pRLC Signale vorhanden, an denen überhaupt kein NMHC IIC Signal vorhanden ist, was der diffusen Lokalisation von NM IIC in Abbildung 4.5 entspricht.

4.4 Einfluss der NM II-Isoformen auf das Aktinzytoskelett, die Zelladhäsion und die Zellmigration

Um den Einfluss der Isoformen auf den zellulären Phänotyp zu untersuchen, wurden Funktionsverlust-Analysen durchgeführt. Da die Isoform-spezifischen NMHCs auf unterschiedlichen Genen kodiert sind, konnten aus U2OS WT Zellen mittels CRISPR/Cas9 stabile KO-Zelllinien hergestellt werden (Ran et al., 2013), die für jeweils eine der Isoformen defizitär sind (Abb. 4.7). Das experimentelle Prozedere ist im Abschnitt 3.5 beschrieben. Im Folgenden werden die einzelnen Zelllinien mit NM IIA-KO, NM IIB-KO und NM IIC-KO bezeichnet. Die NM IIB-KO Zelllinie wurde im Rahmen einer betreuten Masterarbeit erzeugt (Stricker, 2017). Für NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen wurden Sequenzanalysen im Bereich der Mutation durchgeführt. In NM IIA-KO Zellen führt der Verlust von 2 Basenpaaren zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens, wodurch es zum Einbau von Stopcodons im ersten kodierenden Exon kommt (Abb. 4.7A). Der gleiche Effekt tritt bei NM IIB-KO Zellen durch den Verlust von 7 Basenpaaren ein (Abb. 4.7B). Für NM IIC-KO Zellen konnte im Zuge dieser Arbeit keine Sequenzanalyse mehr durchgeführt werden. Der komplette Verlust der Proteinexpression wurde in allen KO-Zelllinien mittels Western Blot kontrolliert (Abb. 4.7C&D). Immunfluoreszenzaufnahmen verdeutlichen zudem den vollständigen Verlust des Proteinsignals in Einzelzellen (Abb. 4.7E).

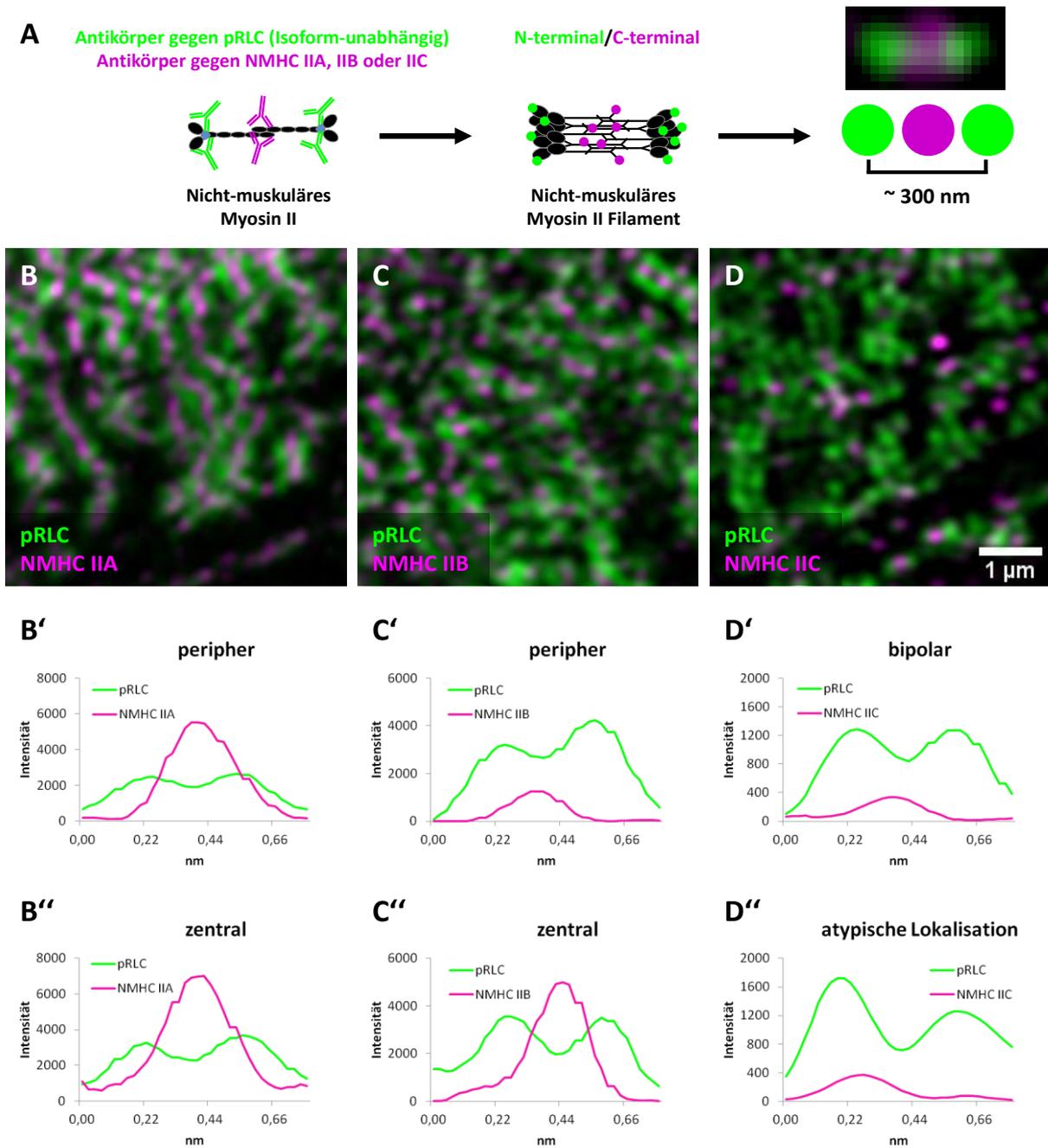


Abbildung 4.6: Bipolare Filament-Strukturen der NM II-Isoformen in U2OS Zellen.

(A) Schematische Darstellung der immunhistochemischen Markierung bipolarer Filamente. Antikörper gegen die pRLC markieren jeweils die Kopfregionen, Antikörper gegen die NMHC II-Isoformen markieren die Tailregionen, wodurch sich ein charakteristisches Muster ergibt. (B) NM IIA Filamente zeigen eine bipolare Struktur, deren Intensität nicht von der Lokalisation innerhalb der Zelle abhängig ist (B' & B''). (C) NM IIB Filamente assemblieren ebenfalls in einer bipolaren Struktur, die Intensität der NMHC IIB nimmt zum Zellzentrum hin zu (C' & C''). (D) NM IIC assembliert nur teilweise in eine bipolare Struktur (D'), oftmals wurden atypische Lokalisationen der NMHC IIC beobachtet (D''). Teilweise sind pRLC Signale vorhanden, mit denen überhaupt kein NMHC IIC Signal assoziiert ist.

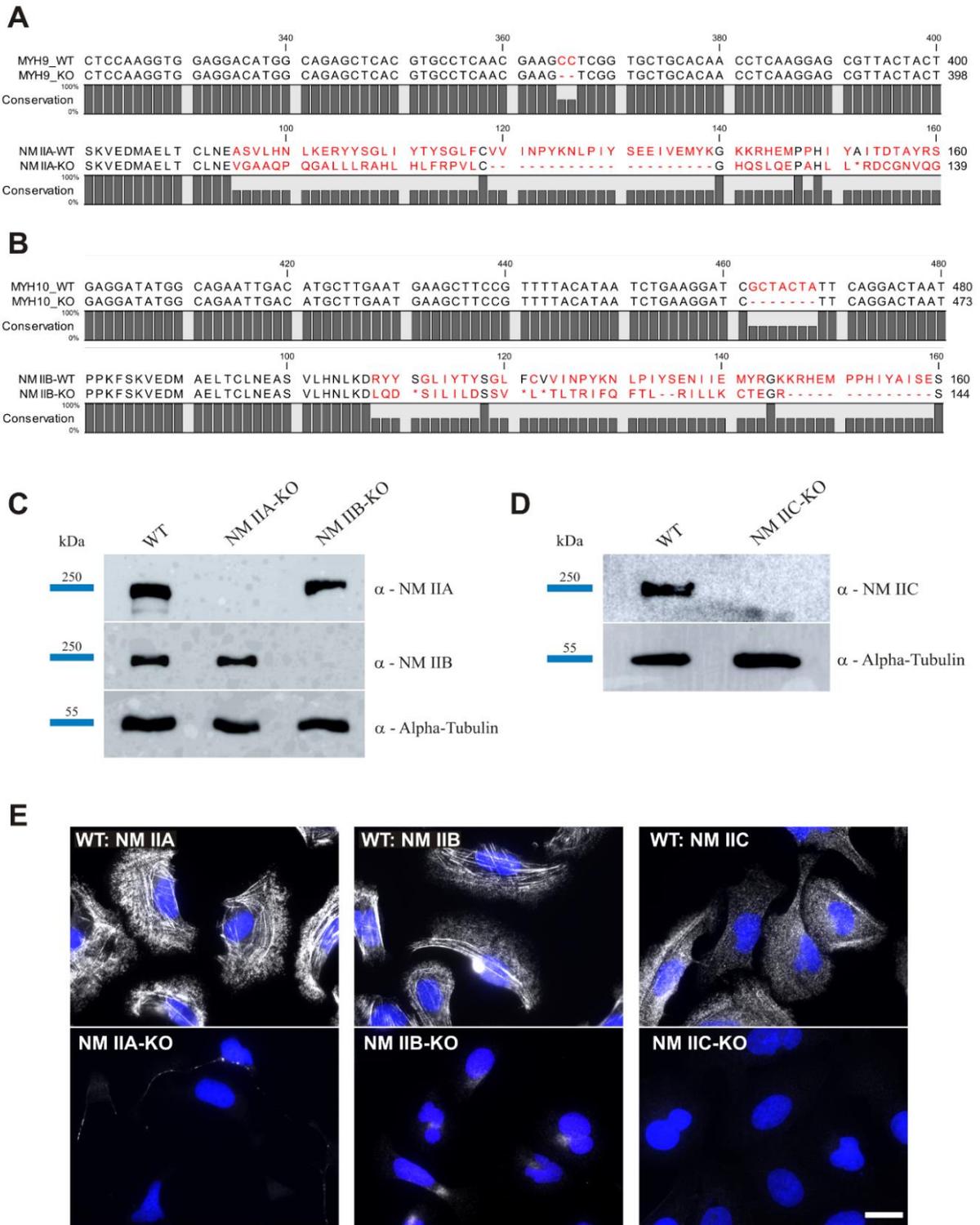


Abbildung 4.7: Erzeugung und Validierung von stabilen NM II-KO Zelllinien mittels CRISPR/Cas9.

(A)&(B) Sequenzalignments der gDNA von WT und NM II-KO Zellen im Bereich der eingeführten Mutation. (A) Der Verlust von 2 Basen führt zur Verschiebung des Leserahmens und zur Bildung von Stopcodons im ersten kodierenden Exon von NM IIA. (B) Eine Deletion von 7 Basen führt im Fall von NM IIB ebenfalls zur Bildung von verfrühten Stopcodons. (C)&(D) Western Blot Analysen zeigen den kompletten Verlust der Proteinexpression in den entsprechenden NM II-KO Zelllinien. α -Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. (E) Immunhistochemischer Nachweis des Verlustes der entsprechenden NM II-Isoformen in Einzelzellen. Der Maßstab entspricht 20 μ m.

Wie bereits aus den vorherigen Kapiteln deutlich wurde, wird die phänotypische Ausprägung von Zellen maßgeblich durch die Struktur und Dynamik des Aktinzytoskeletts beeinflusst. Die Aktivität der NM II-Filamente hat wiederum einen starken Einfluss auf das Aktinzytoskelett (Murrell et al., 2015). In Abbildung 4.8 wurde daher untersucht, wie sich der Verlust der unterschiedlichen NM II-Isoformen auf die Struktur des Aktinzytoskeletts auswirkt. Um die Aktinstruktur und die Bildung von SF-Subtypen in NM II-KO Zellen zu untersuchen, wurden Einzelzellen auf FN-beschichteten Deckgläsern kultiviert und das Aktinzytoskelett sowie die Fokalkontakte immunhistochemisch markiert. WT Zellen zeichnen sich durch das Vorhandensein aller SF-Subtypen sowie deren typischen intrazellulären Verteilung innerhalb einer polarisierten Zelle aus (Abb. 4.8A). dSF in der Zellperipherie (markiert durch Pfeile) sind am distalen Ende mit Fokalkontakten verbunden. Transversale Arcs verlaufen bogenförmig von der Zellperipherie bis zum Zellzentrum und sind mit keinen Fokalkontakten verbunden. vSF lokalisieren im Zellzentrum und sind an beiden Enden mit Fokalkontakten verbunden.

NM IIA-KO Zellen zeigen gegenüber WT Zellen eine drastische phänotypische Veränderung (Abb. 4.8B). Die Zellen verlieren ihren polarisierten Phänotyp und bilden teilweise mehrere Lamellipodien gleichzeitig aus. Am *trailing edge* der Zellen sind dünne Zellausläufer vorhanden, welche sich verzweigen und über kleine Fokalkontakte am Substrat verankert sind (Pfeilköpfe). SF sind kaum noch vorhanden und wenn, nur sehr schwach gebündelt. Der Großteil des Zellkörpers ist durchzogen von dünnen, quervernetzten Aktinfilamenten. Auffällig ist außerdem, dass kaum maturierte, elongierte Fokalkontakte ausgebildet werden, was eine Klassifizierung der verbleibenden SF erschwert. In der Detailansicht wird deutlich, dass einige der verbleibenden Fasern an beiden Enden mit kleinen Fokalkontakten verbunden sind. Aufgrund dieser Verbindung sowie ihrer Lokalisation im Zellzentrum, können diese Fasern am ehesten als vSF kategorisiert werden.

NM IIB-KO Zellen weisen hingegen keinen drastischen phänotypischen Unterschied auf (Abb. 4.8C). Die Zellpolarität ist klar ausgeprägt und eine Migrationsfront mit durchgängigem Lamellipodium ist erkennbar. Bei genauer Betrachtung der Aktinstruktur konnten alle SF-Subtypen identifiziert werden. In vielen Zellen entstand jedoch der Eindruck, dass die SF in NM IIB-KO Zellen gegenüber WT Zellen eine weniger geordnete Verteilung einnehmen (Vgl. Abb. 4.8A und 4.8C). dSF waren in diesen Fällen sehr kurz und schwach ausgeprägt (Abb. 4.8C-Detailansicht), vSF breiteten sich im Gegenzug verstärkt im Zellzentrum aus. Der Übergang zwischen transversalen Arcs und vSF konnte oftmals nicht klar abgegrenzt werden, da beide SF-Subtypen verstärkt im Zellzentrum überlagerten. Diese Charakteristika wurden jeweils nur in Teilen der Zellpopulation deutlich.

NM IIC-KO Zellen weisen keine phänotypischen Unterschiede zu WT Zellen auf (Abb. 4.8D). Die Zellpolarität ist klar ausgeprägt und alle SF-Subtypen sind vorhanden. Elongierte dSF lokalisieren in der Zellfront (siehe Pfeile), transversale Arcs spannen sich parallel zur Zellfront durch das Lamellum und vSF lokalisieren im Zellzentrum.

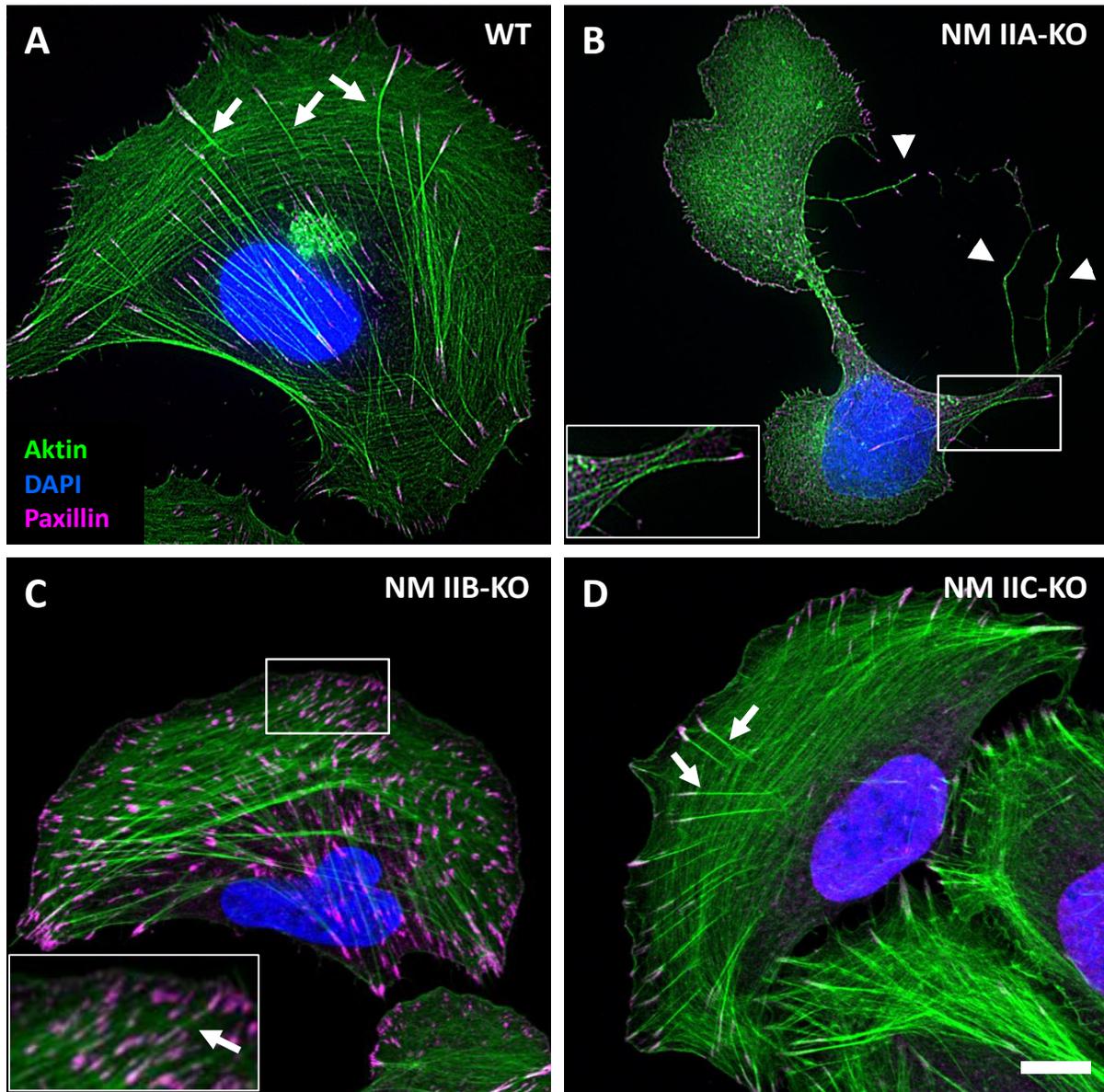


Abbildung 4.8: Phänotypischer Vergleich der Aktinstruktur in NM II-KO Zellen.

Die Zellen wurden für 120 min auf FN-beschichteten Deckgläsern kultiviert und immunhistochemisch markiert. Es ist jeweils der Zellkern (blau), das Aktinzytoskelett (grün) sowie die Fokalkontakte (magenta) gezeigt. **(A)** WT Zellen weisen einen polarisierten Phänotyp auf. Alle SF-Subtypen sind vorhanden und zeigen eine typische Lokalisation innerhalb der Zellachse. dSF lokalisieren an der Zellfront, transversale Arcs parallel zur Zellfront innerhalb des Lamellum und vSF im Zellzentrum. Pfeile markieren dSF. **(B)** NM IIA-KO Zellen verlieren ihren polarisierten Phänotyp, teilweise bilden sich mehrere Lamellipodien. Am *trailing edge* der Zelle bilden sich lange, verzweigte Ausläufer, welche in Fokalkontakten enden (Pfeilköpfe). Die Aktinstruktur zeichnet sich durch eine feinmaschige, quernetzte Morphologie aus (Detailansicht). Gebündelte Aktinfasern sind kaum noch vorhanden. Die wenigen verbleibenden SF lokalisieren im Zellzentrum oder am *trailing edge* und entsprechen am ehesten vSF. **(C)** NM IIB-KO Zellen bilden einen polarisierten Phänotyp und alle SF-Subtypen sind vorhanden. In Teilpopulationen der Zellen ist die Verteilung der SF-Subtypen weniger klar ausgeprägt, als in WT Zellen. dSF sind oftmals sehr kurz (Detailansicht) und vSF lokalisieren weit ins Zellzentrum hinein. Der Übergang zwischen transversalen Arcs und vSF wird aufgrund der überlagernden Lokalisation nicht immer klar. **(D)** NM IIC-KO Zellen weisen keine Unregelmäßigkeiten gegenüber WT Zellen auf. Maßstabsbalken=10 µm.

Wie sich bei der Analyse der SF-Subtypen zeigte, ist ein weiteres Merkmal von NM IIA-KO Zellen das Fehlen von elongierten, maturierten Fokalkontakten. Zelladhäsionen sind als mechanosensitive Elemente bekannt und werden direkt durch die Aktomyosin-Kontraktilität beeinflusst (Vogel und Sheetz, 2006). Um zu überprüfen, ob der Verlust verschiedener NM II-Isoformen zu abweichenden Defekten bei der Zelladhäsion führt, wurde die Morphologie von Fokalkontakten und Zell-Zell-Adhäsionen analysiert.

Für die Charakterisierung von Fokalkontakten wurde neben Paxillin dessen phosphorylierte Form (pPaxillin) markiert. Paxillin fungiert in Fokalkontakten als Adaptorprotein der Signaltransduktion, pPaxillin wird daher als Marker für aktive Fokalkontakte verwendet (Turner et al., 1990). In WT Zellen lokalisieren elongierte Fokalkontakte an den Enden der SF. Paxillin und pPaxillin Signale sind gleichermaßen vorhanden und kolokalisieren in den Adhäsionen (Abb. 4.9A). NM IIA-KO Zellen bilden ausschließlich kleine, punktförmige Fokaladhäsionen entlang der Zellperipherie (Abb. 4.9B). Paxillin und pPaxillin kolokalisieren in diesen unreifen Fokaladhäsionen, allerdings ist im Vergleich zu Paxillin eine höheres pPaxillin Hintergrundsignal vorhanden (Detailansicht 4.9B). Für NM IIB-KO oder NM IIC-KO Zellen konnte kein Unterschied in der Morphologie der Fokalkontakte festgestellt werden. Auch die Lokalisation sowie die Intensität von Paxillin und pPaxillin unterscheiden sich nicht von WT Zellen (Abb.4.9C und D).

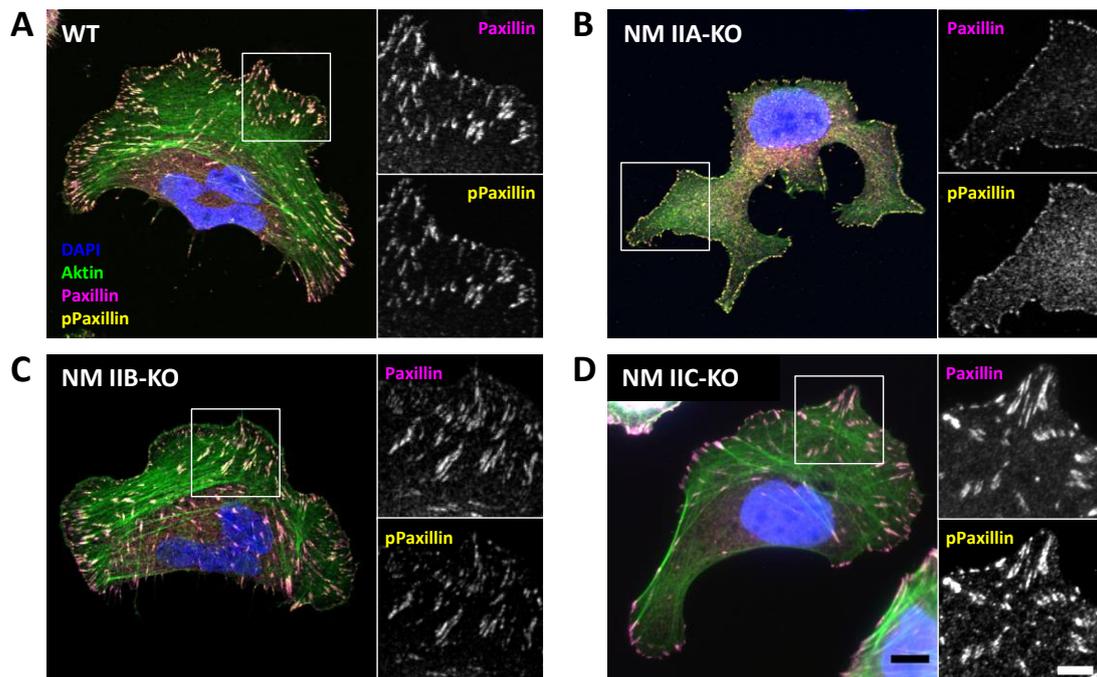


Abbildung 4.9: Phänotypischer Vergleich von Fokalkontakten in NM II-KO Zellen.

Die Zellen wurden 120 min auf FN-beschichteten Deckgläsern kultiviert. Es ist der Zellkern (blau), das Aktinzytoskelett (grün), Paxillin (magenta) und pPaxillin (gelb) dargestellt. pPaxillin dient als Marker für aktive Fokalkontakte. **(A)** In WT Zellen bilden sich in der Peripherie und im Zellzentrum maturierte Fokalkontakte, welche an den Enden der SF lokalisieren. Paxillin und pPaxillin kolokalisieren in den Kontakten. **(B)** NM IIA-KO Zellen bilden ausschließlich kleine, naszente Fokalkontakte in der Zellperipherie. Es ist ein verstärktes pPaxillin Hintergrundsignal vorhanden. Die Fokalkontakte in NM IIB-KO Zellen **(C)** und NM IIC-KO Zellen **(D)** zeigen keine morphologischen Unterschiede zu WT Zellen. Maßstabsbalken = 10 μm (Übersicht); 2 μm (Detailansicht).

Um einen Einfluss der NM II-Isoformen auf die Zell-Zell-Adhäsion zu untersuchen, wurden Zellen auf FN-beschichteten Deckgläsern bis zur Konfluenz kultiviert und das Strukturprotein β -Catenin als Marker für Cadherin-vermittelte Adhärenzkontakte markiert. β -Catenin dient in Adhärenzkontakten als Verbindungsprotein zwischen E-Cadherin und dem Aktin-assoziierten α -Catenin. Es ist somit indirekt an das Aktinzytoskelett gekoppelt und visualisiert eventuelle Veränderungen in den Adhärenzkontakten, die durch Beeinflussung der Aktomyosin-Kontraktilität zustande kommen (Liu und Cheney, 2012). In WT Zellen bilden sich Adhärenzkontakte mit einer Reißverschluss-ähnlichen Morphologie aus, die sich orthogonal zu den überlappenden Zellkanten aufreihen (Abb. 4.10A). Diese Reißverschluss-ähnliche Morphologie ist in NM IIA-KO Zellen nicht mehr zu erkennen, eine Adhäsionsspezifische β -Catenin Lokalisation entlang der überlappenden Zellbereiche ist aber dennoch vorhanden (Abb. 4.10B). Auch bei der Bildung von Adhärenzkontakten zeigen NM IIB-KO oder NM IIC-KO Zellen keinerlei Auffälligkeiten (Abb. 4.10C & D). Die Lokalisation von β -Catenin entlang der überlappenden Zellkanten sowie die Reißverschluss-ähnliche Morphologie der Adhärenzkontakte ist unverändert gegenüber WT Zellen.

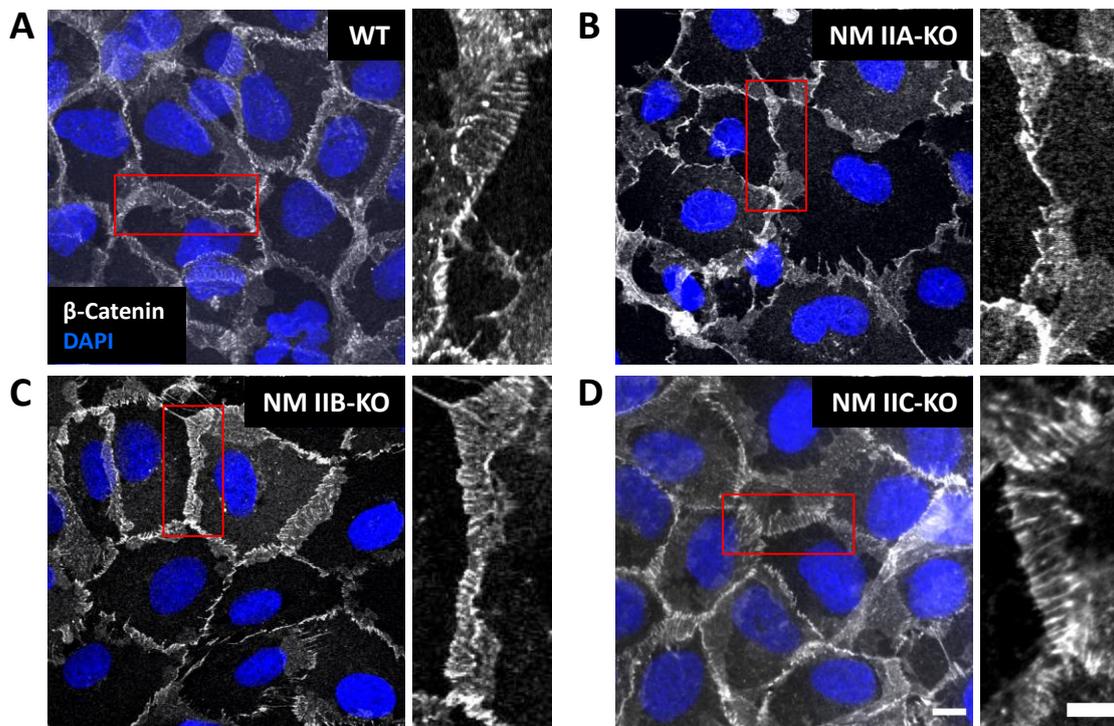


Abbildung 4.10: Phänotypischer Vergleich von Adhärenzkontakten in NM II-KO Zellen.

Die Zellen wurden auf FN-beschichtete Deckgläsern bis zur Konfluenz kultiviert. β -Catenin wurde als Marker für Cadherin-vermittelte Adhärenzkontakte markiert, zusätzlich sind die Zellkerne (blau) visualisiert. **(A)** In WT Zellen lokalisiert β -Catenin zwischen den benachbarten Zellkanten in einer Reißverschluss-ähnliche Morphologie. **(B)** In NM IIA-KO Zellen ist die Reißverschluss-ähnliche Morphologie der Adhärenzkontakte nicht mehr zu erkennen, die Lokalisation von β -Catenin ist aber immer noch auf die Bereiche zwischen den überlappenden Zellkanten beschränkt. In NM IIB-KO Zellen **(C)** oder NM IIC-KO Zellen **(D)** ist kein morphologischer Unterschied zu WT-Zellen zu erkennen. Maßstabsbalken=10 μ m (Übersicht) & 5 μ m (Detailansicht).

Das Fehlen maturierter Fokalkontakte, die Bildung multipler Lamellipodium sowie das Vorhandensein von langen Zellausläufern am *trailing edge* der Zellen, legen nahe, dass die Zellmigration in NM IIA-KO Zellen ebenfalls beeinträchtigt ist. Studien zur Zellmigration in Abhängigkeit von der Aktomyosin-Kontraktibilität sind zahlreich, führen allerdings auch zu unterschiedlichen Ergebnissen (Doyle et al., 2012; Even-Ram et al., 2007; Jorrich et al., 2013; Kim und Adelstein, 2011; Lo et al., 2004; Sandquist et al., 2006; Shih und Yamada, 2010; Shutova et al., 2017). Um etwaige Beeinflussungen der Zellmigration durch den Verlust der einzelnen NM II-Isoformen in U2OS Zellen zu charakterisieren, wurde die Zellbewegung der verschiedenen NM II-KO Zelllinien qualitativ in Zeitrafferaufnahmen analysiert (Abb. 4.11).

Die meisten WT Zellen liegen nach 120 min Kultivierung in einem polarisierten Zustand vor und beginnen zu migrieren. Die Zellmigration in WT Zellen läuft nach dem typischen Bewegungsmuster motiler Zellen ab. An der Migrationsfront wird durch Aktinpolymerisation das Lamellipodium nach vorne geschoben, während der Zellkörper durch Aktomyosin-Kontraktion nachgezogen wird. Die Zelle behält dabei über 135 min ihren polarisierten Phänotyp bei und migriert in Richtung des roten Pfeils (Abb. 4.11A). NM IIA-KO Zellen nehmen nach abgeschlossenem *Zellspreading* zunächst einen polarisierten Phänotyp ein und beginnen zu migrieren (Abb. 4.11B). Sobald die Translokation des Zellkörpers beginnt, bleiben am *trailing edge* lange Zellausläufer zurück, die über den Zeitraum der Aufnahmen nicht nachgezogen werden können (gelbe Pfeilköpfe). Der Zellkörper schiebt sich gleichzeitig stetig nach vorne, wodurch sich die Längsachse zwischen Lamellipodium und Zellkern verkürzt. Die Breite des Lamellipodium nimmt hingegen zu, bis es sich schließlich in mehrere Segmente aufteilt. Über den aufgenommenen Zeitraum von 132 min war die Zelle effektiv nicht in der Lage, eine vollständige Translokation des Zellkörpers abzuschließen, ohne dabei ihre Zellmorphologie zu verlieren.

NM IIB-KO Zellen bilden nach dem *Zellspreading* ebenfalls einen polarisierten Phänotyp aus (Abb. 4.11C). Eine koordinierte Zellmigration wurde jedoch nur in Teilen der Zellpopulation beobachtet. Viele Zellen zeigten eine beeinträchtigte Zellmigration, bei der häufig die Migrationsrichtung wechselt und die Zellen sich effektiv um die eigene Achse drehen (rote Pfeile). Die Polarität wechselt dadurch innerhalb von 135 min mehrfach ihre Orientierung. Eine Vergrößerung des Lamellipodium wurde nicht beobachtet, teilweise wurde jedoch eine verzögerte Retraktion von Zellausläufern bemerkt (gelbe Pfeilköpfe).

NM IIC-KO Zellen bilden einen polarisierten Phänotyp und zeigen über einen Zeitraum von 135 min eine koordinierte Translokation des Zellkörpers (Abb. 4.11D). Es wurde kein Unterschied zwischen dem Migrationsverhalten von WT und NM IIC-KO Zellen festgestellt.

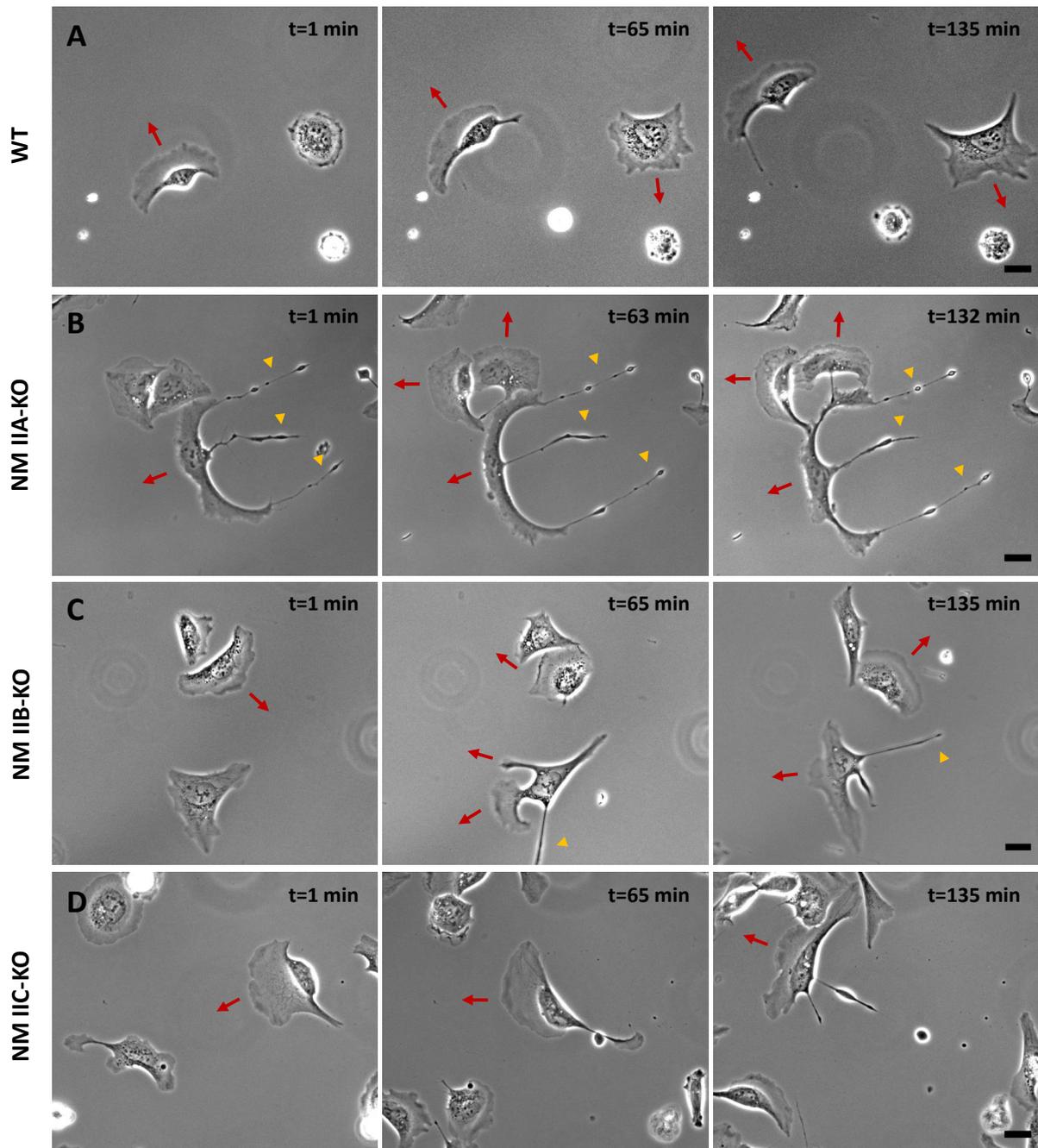


Abbildung 4.11: Vergleich der Zellmigration in NM II-KO Zellen.

Die Zellen wurden für 120 min auf FN-beschichteten Deckgläsern inkubiert, anschließend wurden mittels Phasenkontrastmikroskopie Zeitrafferaufnahmen im Abstand von 3-5 min erstellt. **(A)** WT Zellen zeigen ein typisches Migrationsverhalten mit der Ausbildung eines Lamellipodium an der Migrationsfront (Pfeile) und koordinierter Retraktion des Zellkörpers. **(B)** NM IIA-KO Zellen bilden zunächst einen polarisierten Phänotyp aus, weisen jedoch Defizite bei der Retraktion des Zellkörpers auf (Pfeilköpfe), wodurch sich in Folge mehrere Lamellipodien simultan ausbilden. **(C)** NM IIB-KO Zellen bilden einen polarisierten Phänotyp aus, die Orientierung des Lamellipodiums ändert sich jedoch über den Zeitraum von 135 min mehrfach (Pfeile), wodurch die Zellen effektiv um die eigene Achse rotieren. Teilweise wurde eine verzögerte Retraktion des Zellendes beobachtet (Pfeilköpfe). **(D)** NM IIC-KO Zellen zeigen über einen Zeitraum von 135 min keine Auffälligkeiten während der Zellmigration. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm .

4.5 Analyse von NM II-defizitären Zellphänotypen auf strukturierten 2D-Substraten

In Kapitel 4.4 wurde deutlich, dass der Verlust von NM IIA mit gravierenden zellulären Defekten einhergeht, während der Verlust von NM IIB subtilere Defekte aufweist, welche oftmals schwer zu kategorisieren sind. Im Fall von NM IIC-KO Zellen wurden überhaupt keine Unterschiede zu WT Zellen festgestellt. Zudem erweisen sich quantitative Analysen von Zellen auf homogenen Substraten aufgrund der phänotypischen Varianzen als schwer realisierbar. Im folgenden Kapitel wurden die jeweiligen NM II-KO Zelllinien auf strukturierten 2D-Substraten analysiert, wodurch der Phänotyp normalisiert und eine quantitative Analyse anhand der TEM-Parameter ermöglicht wurde. Wie sich in vorausgegangenen Experimenten zeigte, sind U2OS Zellen nicht in der Lage auf strukturierten Substraten zu *spreaden*, wenn der Abstand zwischen den adhäsiven Flächen 5 μm überschreitet (Daten nicht gezeigt). Das Substrat für die folgenden Experimente wurde daher im Vergleich zu Kapitel 4.2 modifiziert. Das Muster entspricht einer Kreuzform mit einer Balkenbreite von 5 μm . Die Substrate gewährleisten eine ausreichende adhäsive Fläche für das *Zellspreading* von U2OS Zellen und führen zu einem einheitlichen Phänotyp. Um die Varianz der Messwerte in Bezug auf die Spanndistanz d zu erhöhen, bestehen die Substratfelder aus drei unterschiedlich großen Kreuzen mit unterschiedlichen Schnittpunkten (Vgl. Kapitel 3.9.1). Ein komplettes Feld inklusive aller Muster und Abmessungen ist in Abbildung 4.12A gezeigt.

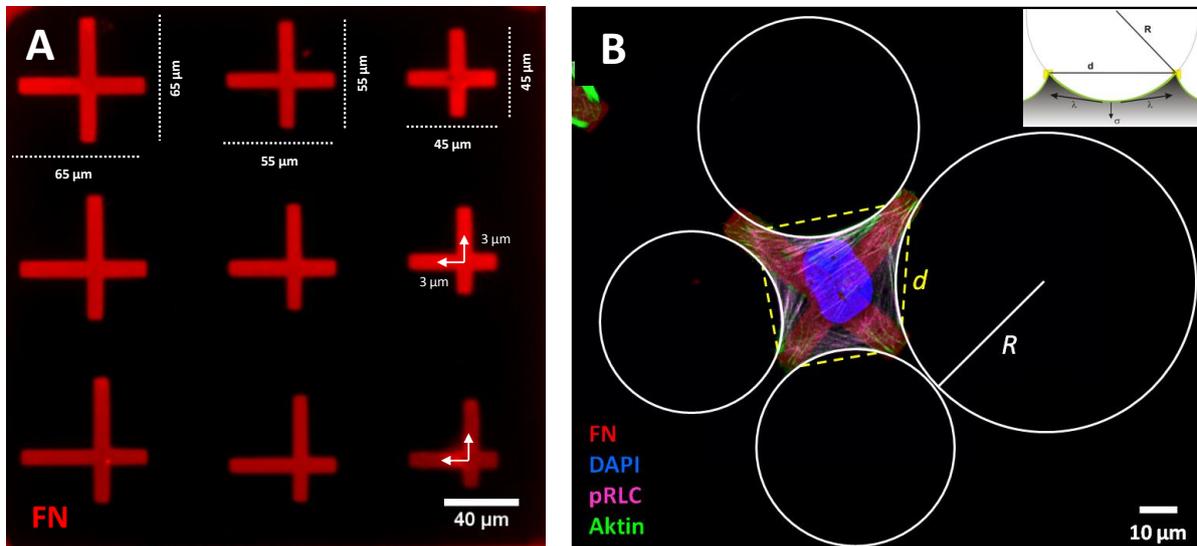


Abbildung 4.12: Darstellung der verwendeten Kreuz-Substrate und der quantitativen Analyse.

(A) Darstellung der verwendeten Kreuz-Substrate inklusive der Abmessungen. (B) Darstellung der quantitativen Analyse des Zellphänotyps. U2OS WT Zellen bilden bei der Überbrückung der passivierten Bereiche ebenfalls konkave Aktinbögen entlang der Zellkontur. Die quantitative Analyse erfolgt daher nach dem gleichen Schema wie in Kapitel 4.1. Als Spandistanz d wird jeweils die Strecke des Zellkörpers über dem passivierten Bereich des Zellsubstrats bestimmt (Vgl. Kapitel 3.12).

Die quantitative Analyse der Kreisradien R und Spanndistanzen d verläuft analog zum Kapitel 4.1 (Abb. 4.12B). Überspannt die Zelle nicht die komplette Kreuzfläche bis zu den äußeren Kanten des Substrates, wird als Spanndistanz d die Strecke des Zellkörpers über der passivierten Fläche ermittelt (Vgl. Kapitel 3.12).

Alle Zelllinien wurden für 120 min auf den Kreuz-Substraten kultiviert und der Phänotyp quantitativ analysiert (Abb. 4.13). Zur Verdeutlichung der $R(d)$ -Abhängigkeit ist jeweils das Streudiagramm aus einem von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. U2OS WT Zellen bilden konkave Aktinbögen entlang der Zellkontur. Des Weiteren sind zentrale, gerade SF zwischen den Kreuzbalken, proximal zu den gebogenen peripheren Fasern zu erkennen. Der Zellkörper endet an den Bereichen, wo die Aktinbögen die passivierte Fläche verlassen, auch wenn noch freie Adhäsionsflächen entlang der Kreuzbalken vorhanden sind. Die quantitative Evaluation zeigt einen positiven Anstieg von R bei zunehmenden d -Werten (Abb. 4.13A'), wie er bereits in den vorherigen Kapiteln bei NIH 3T3 Zellen beobachtet wurde (Vgl. Abb. 4.1).

NM IIA-KO Zellen nehmen grundsätzlich die Kreuzform des Substrats an (Abb.4.13B). Entlang der Zellkontur sind ebenfalls konkave Aktinbögen zu erkennen, der Zellkörper überspannt allerdings häufig nur eine geringere passivierte Fläche zwischen den Kreuzbalken. In diesen Fällen ist eine Ausbreitung des Zellkörpers strikt entlang der adhäsiven Kreuzbalken durch quervernetztes Aktin zu erkennen (Pfeil). Aktinbögen, die bis zum Ende des Zellkörpers reichen, sind teilweise vorhanden (Pfeilkopf), treten allerdings im Vergleich zu WT Zellen nicht zwangsläufig an allen vier Seiten des Zellkörpers auf. Gebündelte Aktinfasern bilden sich fast ausschließlich in der äußeren Zellkontur, zentralere Fasern fehlen entweder komplett oder sind nur schwach ausgeprägt. Trotz der phänotypischen Differenzen, zeigt die quantitative Analyse der Kreisbögen, dass der positive Anstieg von R mit zunehmendem d bestehen bleibt. Die Steigung der Trendlinie ist aufgrund der kleinen Bogenradien gegenüber WT Zellen jedoch geringer (Abb. 4.13B').

NM IIB-KO Zellen unterscheiden sich auf den ersten Blick nur geringfügig von WT Zellen (Abb. 4.13C). Teilweise bilden die Zellen zahlreiche zentrale Fasern zwischen den Kreuzbalken. Wie bei WT Zellen endet der Zellkörper immer an den Bereichen, wo die Aktinbögen den passivierten Bereich verlassen. Aktinpolymerisation entlang von freien Substrat-Flächen, wie im Fall von NM IIA-KO Zellen, wurde in keiner der evaluierten Zellen beobachtet. Durch Anlegen der Kreisbögen wurde jedoch deutlich, dass zahlreiche Aktinbögen über einen sehr großen Radius verfügen (Vgl. angelegter Kreis in Abb.4.13C), das Auftreten solcher Fasern ist dabei nicht an bestimmte Spanndistanzen gekoppelt. Andere Aktinbögen entsprechen wiederum Radien, wie sie in WT Zellen vorkommen. Diese Beobachtung spiegelt sich im Verlust der $R(d)$ -Abhängigkeit wider. Aufgrund der zahlreichen großen Kreisbögen, streuen die Datenpunkte Abb. 4.13C' unabhängig von der Spanndistanz d hin zu großen R -Werten, wodurch eine Punktwolke ohne erkennbare Abhängigkeit von R und d entsteht.

Im Fall von NM IIC-KO Zellen zeigt weder die phänotypische Evaluierung noch die quantitative Analyse der $R(d)$ -Abhängigkeit einen Unterschied zu WT Zellen.

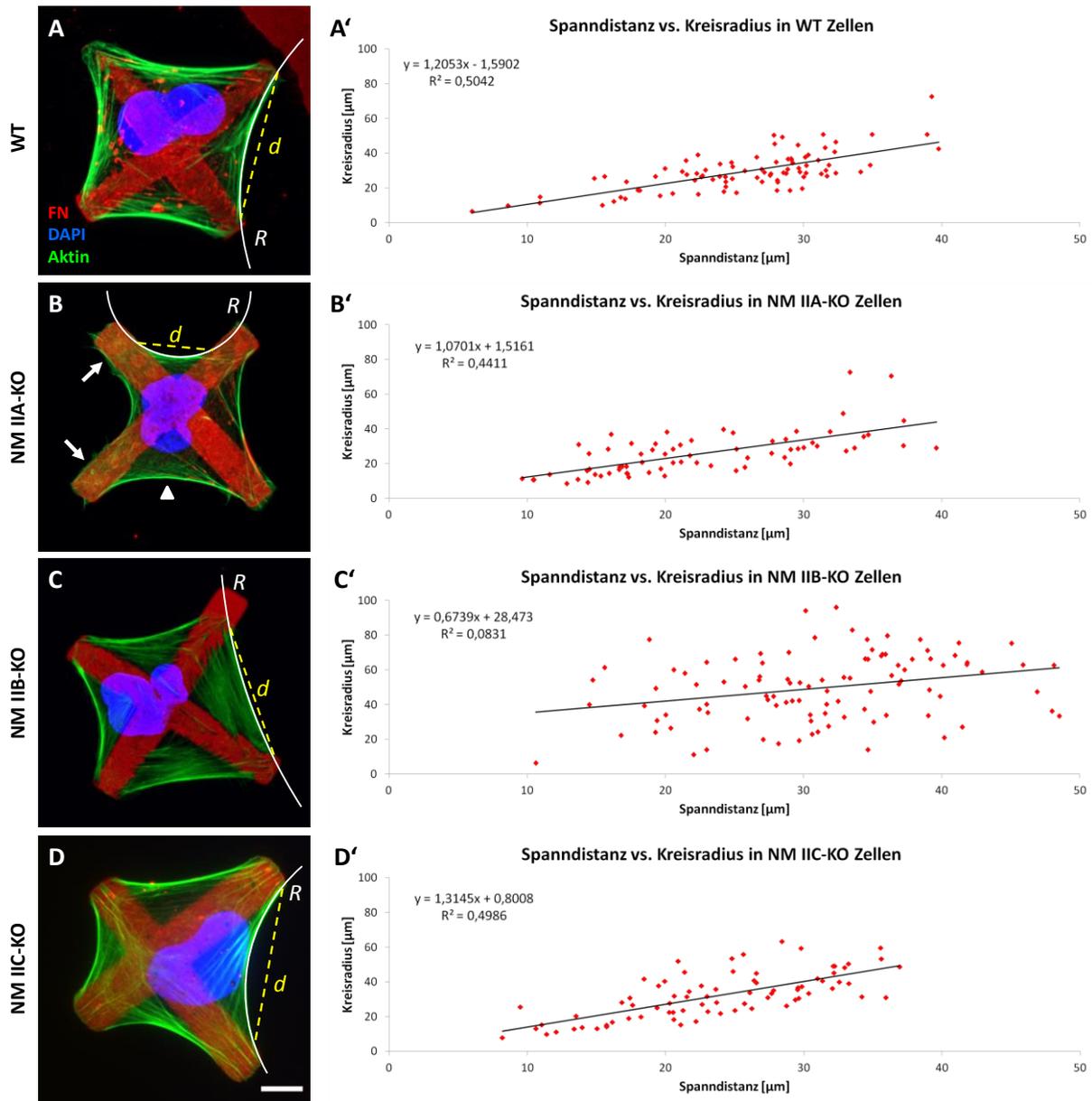


Abbildung 4.13: Phänotypen von NM II-KO Zellen auf strukturierten Kreuz-Substraten.

Die Zellen wurden für 120 min auf den FN-beschichteten Substraten kultiviert und immunhistochemisch markiert. Gezeigt ist das FN-Substrat (rot), der Zellkern (blau) sowie das Aktinzytoskelett (grün). **(A)** WT Zellen bilden konkave Aktinbögen entlang der Zellkontur, wie sie bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben wurden. Proximal zu den gebogenen peripheren Aktinbögen sind zentrale, gerade Aktinfasern zu erkennen. Der Zellkörper endet stets an den Bereichen, wo die Aktinbögen die passivierten Bereiche verlassen. Der Kreisradius R steigt bei zunehmender Spanndistanz d (A'). **(B)** NM IIA-KO Zellen nehmen die Kreuzform des Substrats an und bilden ebenfalls konkave Aktinbögen entlang der Zellkontur. Der Zellkörper überspannt häufig nur eine kleinere passivierte Fläche zwischen den Kreuzbalken und breitet sich stattdessen strikt entlang der adhäsiven Kreuzbalken durch quervernetztes Aktin aus (weißer Pfeil). Gebündelte Aktinfasern bilden sich fast ausschließlich in der äußeren Zellkontur, zentralere Fasern fehlen Großteils. Der positive Anstieg zwischen $R(d)$ bleibt bestehen, die Steigung ist jedoch geringer als bei WT Zellen (B'). **(C)** NM IIB-KO Zellen bilden zahlreiche Aktinbögen mit sehr großen Kreisradien, unabhängig von der Spanndistanz, wodurch ein Verlust der $R(d)$ -Abhängigkeit einhergeht (C'). **(D)** In NM IIC-KO Zellen zeigt weder die phänotypische Evaluierung noch die quantitative Analyse einen Unterschied zu WT Zellen. Maßstabsbalken = 10 μm .

Zur Übersicht sind die quantitativen Analysen aus drei unabhängigen Experimenten in Abbildung 4.14 zusammengefasst dargestellt. Abbildung 4.14A zeigt den Mittelwert des Korrelationskoeffizienten aus drei Experimenten. Nur im Fall von NM IIB-KO Zellen ist aufgrund der breiten Streuung der Datenpunkte ein signifikanter Verlust der Korrelation vorhanden. Der Korrelationskoeffizient ermöglicht lediglich eine Aussage über den linearen Zusammenhang zweier Merkmale. Diese können jedoch auch in nichtlinearer Weise voneinander abhängen. Um zu verdeutlichen, dass der Verlust der $R(d)$ -Abhängigkeit in NM IIB-KO Zellen von großen Bogenradien ausgeht, die unabhängig von der Spanndistanz entstehen, wurde das Verhältnis von R/d quantifiziert (Abb.4.14B). Der Quotient aus dem Kreisradius R und der zugehörigen Spanndistanz d gibt Auskunft über die Größenverhältnisse zwischen R und d . Je größer die Zahl, desto größer der Radius im Verhältnis zur zugehörigen Spanndistanz. NM IIB-KO Zellen zeigen einen deutlich erhöhten Wert gegenüber WT und NM IIA-KO Zellen.

Zusätzlich wurden von Philipp Linke aus der Arbeitsgruppe Tanaka (Physikalisch-Chemisches Institut, Universität Heidelberg) die Ordnungsparameter der Aktinfilamente in WT, NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen quantitativ analysiert (Abb.4.14C-E). Dazu wurden die Winkel θ der Aktinfilamente in Relation zur Y-Achse des Kreuz-Substrates ermittelt und der Ordnungsparameter entsprechend der Gleichung

$$\langle S_{4\theta} \rangle = \frac{-\sum_i A_i \cos(4\theta_i)}{\sum_i A_i}$$

ermittelt (Linke et al., 2019). Ein Wert von $S_{4\theta} = 0$ entspricht dabei einer willkürlichen Anordnung der Aktinfilamente, wohingegen ein Wert $S_{4\theta} = 1$ einer Diagonalen Ausrichtung aller Filamente zwischen den Kreuzbalken entspricht (Abb.4.14D). Während der Ordnungsparameter von WT und NM IIB-KO Zellen nur leicht abweicht, ergab sich für NM IIA-KO Zellen ein signifikant niedrigerer Wert, was auf eine willkürliche Anordnung der Aktinfilamente hinweist (Abb. 4.14E).

Da an dieser Stelle für den Verlust von NM IIA und NM IIB, jedoch nicht für NM IIC, klare phänotypische Defekte beobachtet wurden, fokussieren sich die folgenden Abschnitte auf den Einfluss von NM IIA und NM IIB im Aktomyosin-System.

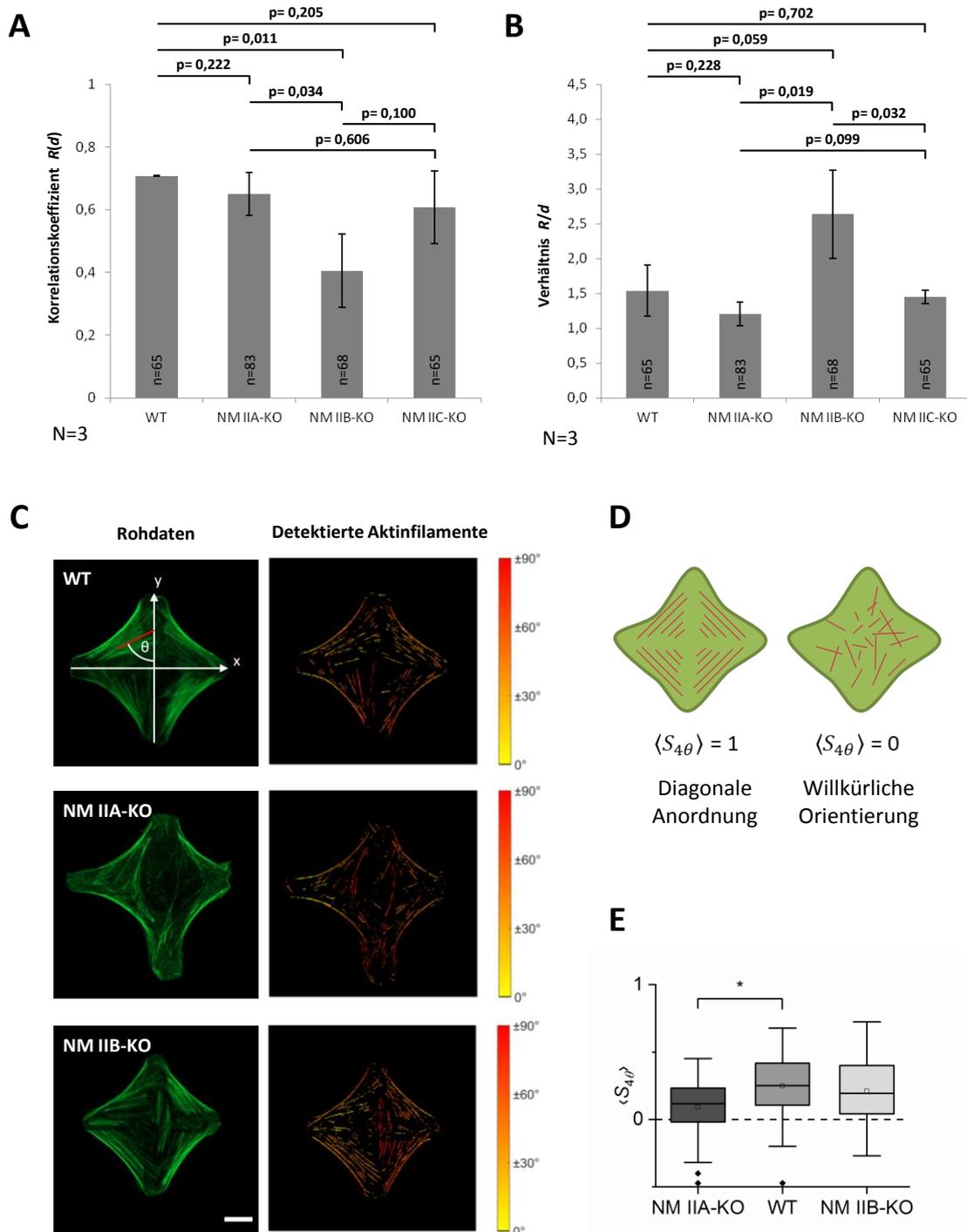


Abbildung 4.14: Quantitative Analyse der NM II-KO Zelllinien auf strukturierten Kreuz-Substraten.

(A) NM IIB-KO Zellen zeigen als einzige NM II-KO Zelllinie eine signifikante Reduktion der positiven Korrelation zwischen R und d . **(B)** Der Quotient aus R/d zeigt, dass NM IIB-KO Zellen im Verhältnis größere Kreisradien in Relation zur Spanndistanz ausbilden, als dies bei WT oder NM IIA-KO Zellen der Fall ist. **(C)** Bestimmung der Ordnungsparameter von Aktinfilamenten in WT, NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen. **(D)** Schematische Darstellung der Anordnung von Aktinfilamenten bei einem Ordnungsparameter von 0 bzw. 1. Der Maßstab entspricht $10 \mu\text{m}$. **(E)** Quantitativer Vergleich der Ordnungsparameter in WT, NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen. Der Wert von NM IIA-KO Zellen ist gegenüber WT und NM IIB-KO Zellen signifikant reduziert, was auf eine willkürlichere Anordnung der Aktinfilamente schließen lässt. **(C-E)** wurde von Philipp Linke (AG Tanaka, Universität Heidelberg) durchgeführt.

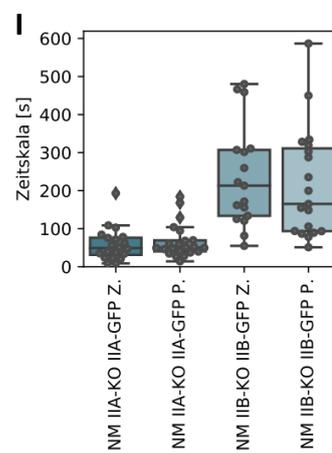
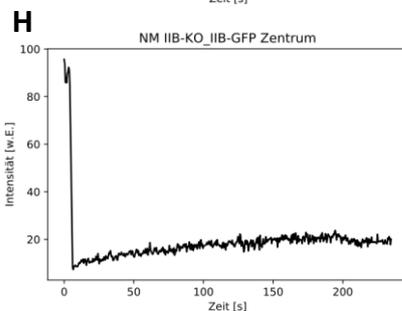
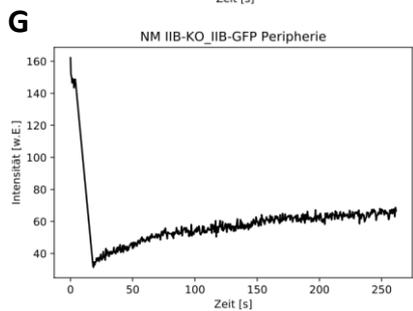
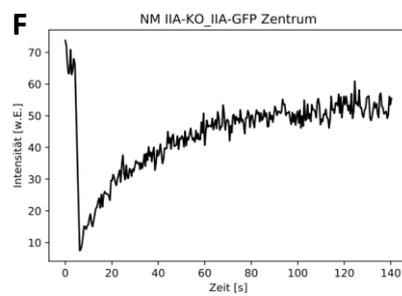
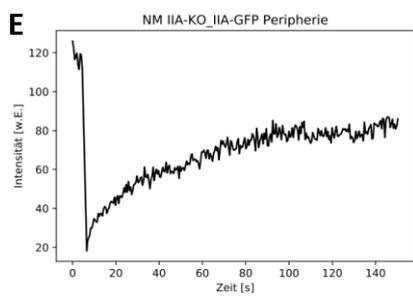
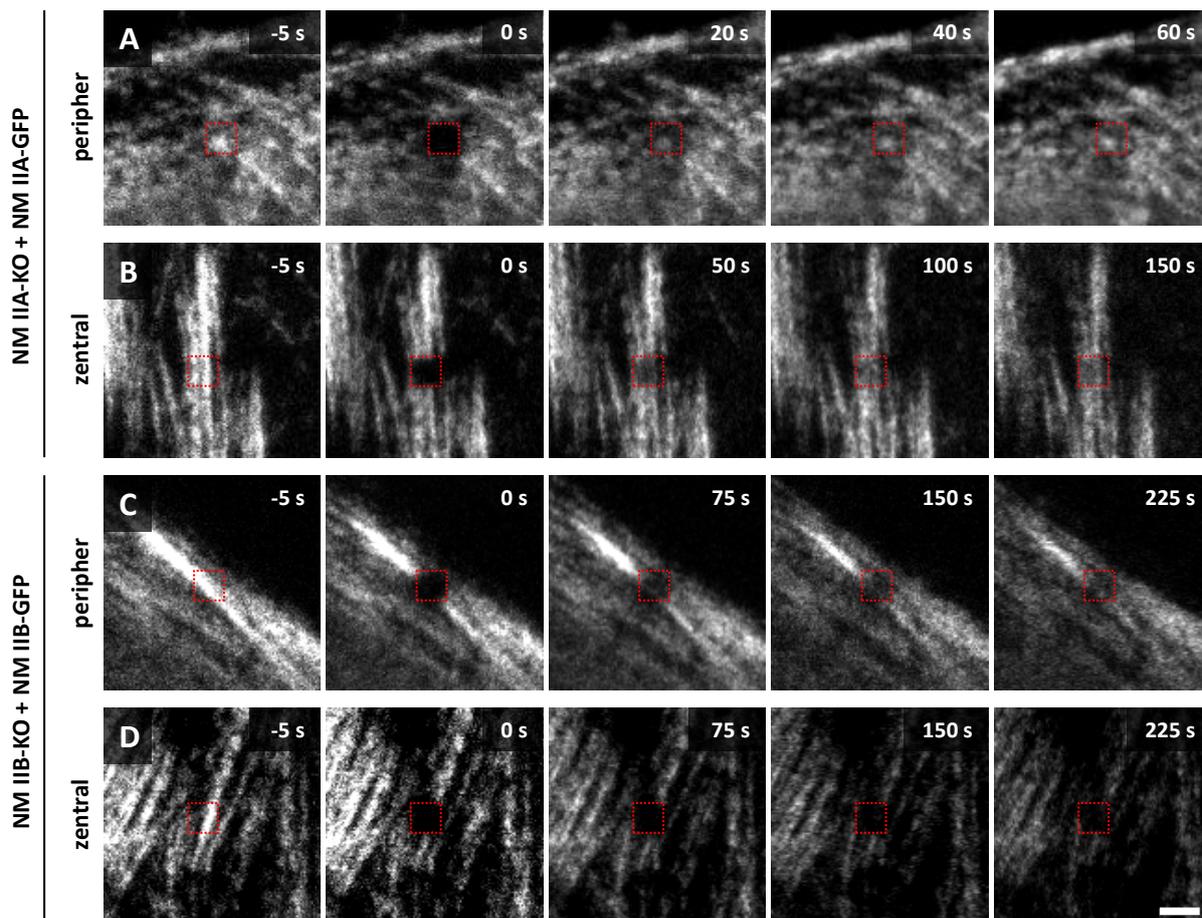
Fasst man die bisherigen Ergebnisse zusammen, ergibt sich durch den Verlust von NM IIA eine starke Beeinflussung der zellulären Morphologie und eine willkürliche Anordnung der Aktinfilamente, jedoch nur eine moderate Beeinflussung der $R(d)$ -Abhängigkeit. Der Verlust von NM IIB bewirkt hingegen keine drastische Beeinflussung des Zellphänotyps, führt aber zu einem Verlust der $R(d)$ -Abhängigkeit. In weiteren Experimenten wurde zudem untersucht, ob eine Überexpression der verbleibenden NM II-Isoform den Verlust des Paralogs kompensieren kann (Anhang: Abbildung A1 und A2). In beiden Fällen ist dies nicht der Fall. Eine Überexpression von NM IIB in NM IIA-KO Zellen ist nicht in der Lage, die SF-Bildung oder Maturierung der Fokalkontakte wiederherzustellen (Abb. A1). Die Überexpression von NM IIA in NM IIB-KO Zellen führt hingegen nicht zur Wiederherstellung der $R(d)$ -Abhängigkeit (Abb. A2). Diese Ergebnisse deuten auf distinkte Funktionen von NM IIA und NM IIB im Aktomyosin-System hin.

Bischofs und Kollegen postulieren anhand des TEM, dass die Abhängigkeit der Kreisbögen von der Spanndistanz durch Elastizität in den peripheren SF gesteuert wird, während Spannung Einfluss auf die Krümmung der Kreisbögen nimmt (Bischofs et al., 2008). Da die Krümmung der Kreisbögen in NM IIB-KO Zellen stark beeinflusst ist, können anhand des TEM verschiedene Funktionen für NM IIA und NM IIB angenommen werden. In diesem Fall steuert NM IIA die morphologische Anpassung der Zellkontur über Spannung, während NM IIB über elastische Eigenschaften die Spannungsverhältnisse zwischen R und d aufrechterhält. Die hohe ATPase Aktivität von NM IIA und die hohe *duty ratio* von NM IIB bestätigen, dass NM IIA für den Aufbau von Kontraktilität geeignet ist, während NM IIB langanhaltende Zugspannungen aufrechterhalten kann (Kim et al., 2005; Kovacs et al., 2003; Wang et al., 2003).

Damit NM IIB über elastische Eigenschaften die Spannung in den Aktinbögen aufrechterhalten kann, muss die Verweildauer der NM IIB-Hexamere in den Filamenten gegenüber NM IIA erhöht sein. Es wurden daher FRAP Messungen durchgeführt, um den dynamischen Austausch der NM IIA- und NM IIB-Hexamere zu untersuchen (Abb. 4.15).

Abbildung 4.15: Molekulare Dynamik von NM IIA und NM IIB.

(A) und **(B)**: NM IIA-KO Zellen wurden mit GFP-NMHC IIA transfiziert. Nach dem Bleichen wurden 300 Zeitrafferaufnahmen im Abstand von 0,5 s aufgenommen. **(A)** Exemplarische Zeitrafferaufnahmen der NM IIA Dynamik in der Zellperipherie, die zugehörige FRAP-Kurve ist in **(E)** abgebildet. **(B)** Zeitrafferaufnahmen der NM IIA Dynamik im Zellzentrum, die zugehörige FRAP-Kurve ist in **(F)** abgebildet. **(C)** und **(D)**: NM IIB-KO Zellen wurden mit GFP-NMHC IIB transfiziert. Nach dem Bleichen wurden 500 Zeitrafferaufnahmen im Abstand von 0,5 s aufgenommen. **(C)** Zeitrafferaufnahmen der NM IIB Dynamik in der Zellperipherie, die zugehörige FRAP-Kurve ist in **(G)** abgebildet. **(D)** Zeitrafferaufnahmen der NM IIB Dynamik im Zellzentrum sowie die zugehörige FRAP-Kurve in **(H)**. Die FRAP-Kurven verdeutlichen, dass eine Erholung der Fluoreszenz von NM IIA wesentlich schneller stattfindet als bei NM IIB, in beiden Fällen ist die mobile Fraktion der NMHC IIA deutlich höher (Vgl. E&F vs. G&H). **(I)** Quantitativer Vergleich der Zeitskalen für die Erholung der Fluoreszenz, die Dynamik von NM IIB ist gegenüber NM IIA wesentlich geringer. Sowohl bei NM IIA als auch bei NM IIB ist kein Unterschied zwischen Zellperipherie und Zellzentrum vorhanden. Der Maßstabsbalken entspricht 2 μm .



Für die FRAP-Messungen wurde die Proteinfunktion der NM II-KO Zellen mit einer GFP-gekoppelten NMHC IIA oder NMHC IIB rekonstituiert. Auf diese Weise können Kompetitionen zwischen endogenem und exogenem Protein sowie Überexpressionsartefakte minimiert werden. Die FRAP-Dynamik wurde dabei jeweils in der Zellperipherie und im Zellzentrum bestimmt. Alle Quantifizierungen wurden von Justin Grewe in der Arbeitsgruppe Schwarz (Institut für theoretische Physik, Universität Heidelberg) durchgeführt. Um präzise Ergebnisse zu erhalten, wurden die einzelnen FRAP-Kurven jeweils für die Hintergrundfluoreszenz, die Abnahme der Fluoreszenzintensität durch Bleichen und die laterale Drift durch Zellbewegungen korrigiert.

NM IIA Moleküle weisen sowohl in der Zellperipherie (Abb. 4.15A & E), als auch im Zellzentrum (Abb. 4.15B & F) eine schnelle Erholung der Fluoreszenz auf (Abb. 4.15I). Die mobile Fraktion liegt im Mittel bei ca. 55-60 % wobei der Austausch dieser Rate auf einer Zeitskala von ca. 50 Sekunden stattfindet. NM IIB Moleküle besitzen demgegenüber eine deutlich langsamere Austauschrate (Abb. 4.15I). Unabhängig von der intrazellulären Position ist nur eine geringe Erholung der Fluoreszenz messbar (Abb. 4.15C, D, G, H). Die mobile Fraktion liegt im Mittel bei ca. 40% und wird auf einer Zeitskala von 150-200 Sekunden ausgetauscht.

Die FRAP-Daten verdeutlichen, dass NM IIB Eigenschaften besitzt, um als elastisches Element in SF zu fungieren, während NM IIA eher kontraktilitätserzeugende Eigenschaften besitzt. Wie sich in der Arbeit von Bischofs und Kollegen zeigte, führt eine Inhibierung der Kontraktilität zur Ausbildung von kleineren Aktinbögen (Bischofs et al., 2008). NM IIB-KO Zellen bilden auf strukturierten Kreuz-Substraten hingegen häufig periphere Aktinbögen mit sehr großen Bogenradien (Abb. 4.13C), was durch erhöhte Kontraktilität in der Linienspannung erklärt werden kann. In den folgenden Experimenten wurde daher analysiert, wie sich eine erhöhte Aktivität von NM IIA auf den Phänotyp der Zellen und die Bildung von peripheren Aktinbögen auswirkt.

Um die NM IIA-Aktivität zu erhöhen, wurden NMHC IIA-Mutanten in NM IIA-KO Zellen rekonstituiert. Alle Mutanten wurden in einer Publikation von Breckenridge und Kollegen beschrieben und führen letztendlich zu einer Überassemblierung von NM IIA und damit zu einer verlängerten Aktivität in den Filamenten (Breckenridge et al., 2009). Zur Verdeutlichung sind alle verwendeten Mutanten in Abb. 4.16 schematisch dargestellt. Wie bereits in Abschnitt 1.2.4 beschrieben, wird das Assemblierungsverhalten der NM IIA-Hexamere über die Phosphorylierung der HC und der assoziierten RLC reguliert. Je stärker die HC an den C-terminalen Bereichen phosphoryliert wird, desto eher disassembliert das Filament (Dulyaninova et al., 2007; Dulyaninova et al., 2005; Vicente-Manzanares et al., 2009b). Bei der Mutante NMHC IIA- Δ NHT wurde ein Stopcodon nach der Aminosäure 1928 eingefügt, wodurch der NHT inklusive der Phosphorylierungsstelle S1943 eliminiert wird. Die HC kann dadurch nur noch an einer der beiden c-terminalen Phosphorylierungsstellen phosphoryliert werden. Die Mutante NMHC IIA-3xA zeichnet sich durch einen dreifachen Aminosäureaustausch in der c-terminalen Region aus. Substitutionen der Serine 1915, 1916 und 1943 zu Alaninen verhindert jegliche c-terminale Phosphorylierung der HC durch CK II oder PKC β . Die Entfernung der c-terminalen Phosphorylierungsstellen bewirkt in beiden Mutanten, dass die Disassemblierung der NM IIA-Hexamere aus der Filament gehemmt wird.

Die RLC kann hingegen die Assemblierung durch eine Konformationsänderung der NM IIA-Hexamere herbeiführen. Wird die RLC phosphoryliert, geht das Hexamer in die assemblierungskompetente 6S-Konformation über. Bei der Mutante NMHC IIA- Δ IQ2 wurden die Aminosäuren 804-834 der HC entfernt, wodurch die IQ-Motive für die RLC Bindung eliminiert werden. Die NM IIA Moleküle sind dadurch nicht mehr in Lage in die assemblierungsinkompetente 10S-Konformation überzugehen und liegen stattdessen konstitutiv assemblierungskompetent vor.

Um einen Masse-spezifischen Effekt durch Überexpression auszuschließen, wurde außerdem eine unveränderte Version der NMHC IIA rekonstituiert, welche im Folgenden als NMHC IIA-WT bezeichnet wird. Als zusätzliche Kontrolle wurde die Mutante NMHC IIA- Δ ACD rekonstituiert. Bei dieser Mutante wurden die letzten 250 Aminosäuren entfernt, wodurch die komplette ACD des Moleküls fehlt. Die Hexamere können dadurch zwar mit der Kopfregion an das Aktinzytoskelett binden, jedoch keine Kontraktilität aufbauen, da eine Tail-Tail Interaktion der Hexamere nicht möglich ist. Rekonstituierte Zellen sollten dadurch in ihrem Verhalten nicht von NM IIA-KO Zellen abweichen.

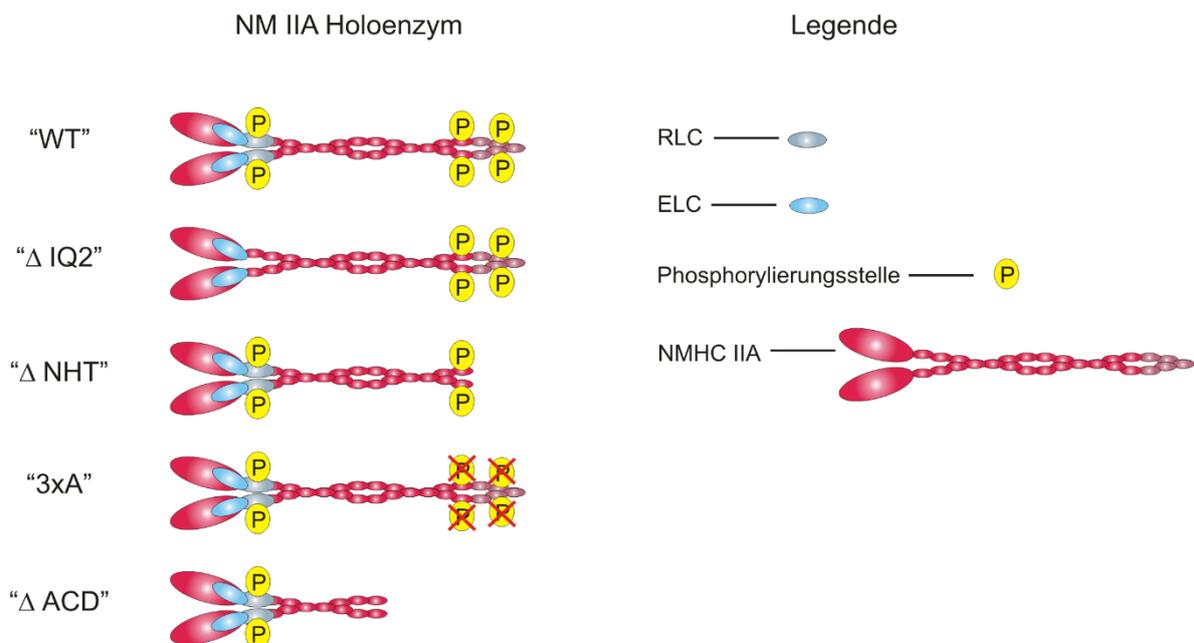


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung der verwendeten NMHC IIA Mutanten.

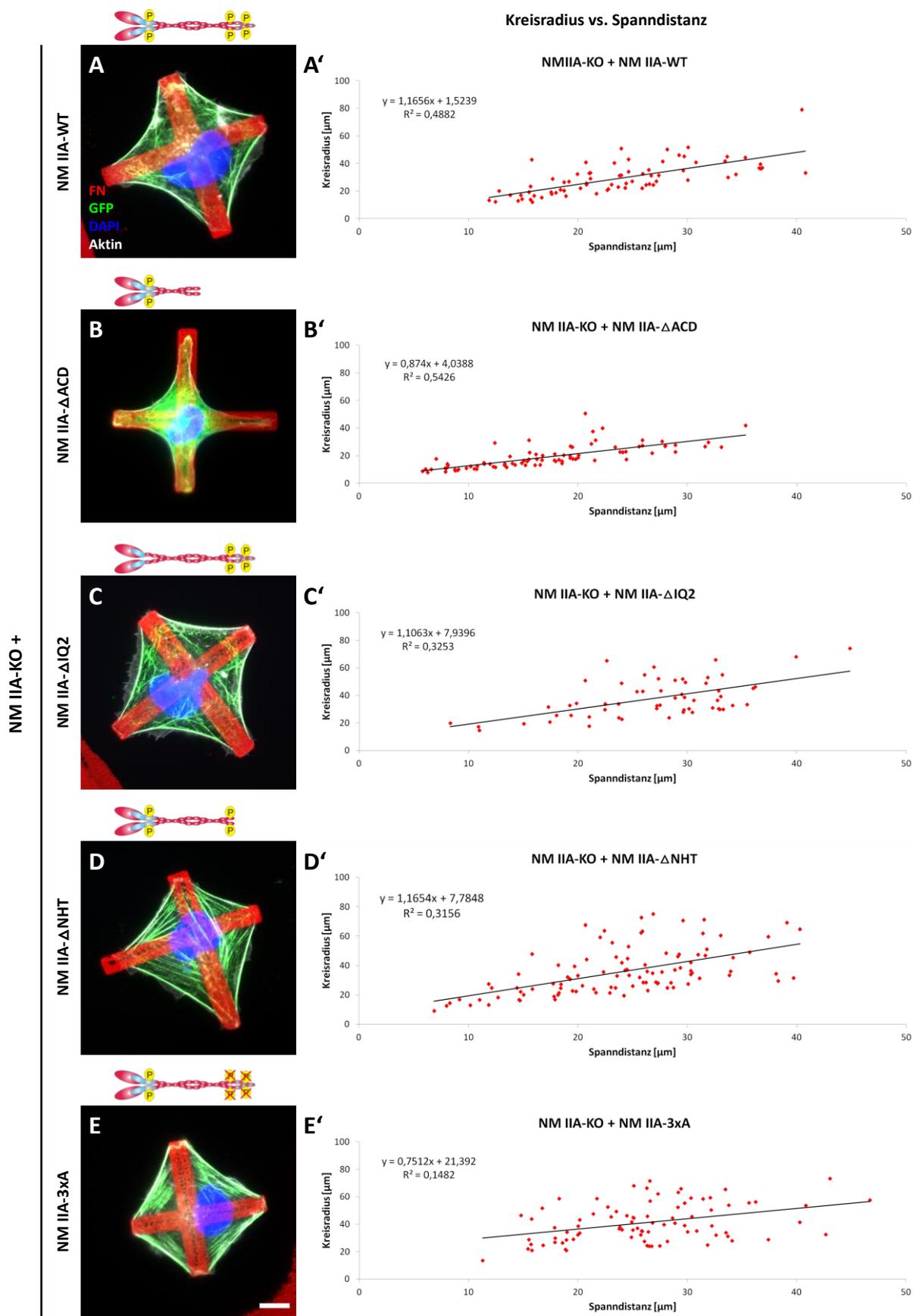
Die unveränderte Form der NMHC IIA wird als NMHC IIA-WT bezeichnet. NMHC IIA- Δ IQ2 fehlt das IQ-Bindemotiv für die RLC, wodurch das Molekül konstitutiv in der assemblierungskompetenten 6S-Konformation vorliegt. NMHC IIA- Δ NHT kann aufgrund des fehlenden NHT nicht mehr am Serin 1943 phosphoryliert werden. NMHC IIA-3xA Hexamere können aufgrund einer dreifachen Aminosäuresubstitution der Serine 1915, 1916 und 1943 zu Alaninen an keiner der c-terminalen Phosphorylierungsstellen mehr phosphoryliert werden. Beide Mutanten verzögern dadurch die Disassemblierung der NM IIA-Moleküle aus dem Filament. Die Mutante NMHC IIA- Δ ACD dient als Kontrolle, da die Hexamere aufgrund der fehlenden ACD keine Tail-Tail Interaktionen mehr eingehen können und sich somit keine bipolaren Filamente bilden können.

Die rekonstituierten Zellen wurden zur phänotypischen Analyse auf Kreuz-Substraten kultiviert und die $R(d)$ -Abhängigkeit quantitativ ausgewertet (Abb. 4.17). Gezeigt ist jeweils ein exemplarisches Streudiagramm aus drei unabhängigen Experimenten. Teile der Experimente sowie der quantitativen Analyse wurden in einer eng betreuten Masterarbeit durchgeführt (Baulesch, 2019).

Eine Rekonstitution von NM IIA-KO Zellen mit der NMHC IIA-WT führt zu einer Wiederherstellung der Morphologie von WT-Zellen (Abb. 4.17A). Die peripheren Aktinfasern zeigen eine nach innen gebogene Kontur, zentrale SF sind vorhanden. Das Streudiagramm zeigt zudem einen positiven Anstieg der R -Werte mit zunehmenden d -Werten (Abb. 4.17A'). NM IIA-KO Zellen, die mit der NMHC IIA- Δ ACD rekonstituiert wurden, gleichen phänotypisch untransfizierten NM IIA-KO Zellen (Abb. 4.17B). Die peripheren Aktinbögen überspannen oftmals nur kleine passivierte Flächen und der Zellkörper breitet sich durch quervernetztes Aktin auf dem Substrat aus. Außer den peripheren Aktinbögen sind keine weiteren gebündelten Aktinfasern zu erkennen. Das Streudiagramm zeigt analog zu NM IIA-KO Zellen, dass die Abhängigkeit zwischen R und d bestehen bleibt (Abb. 4.17B'). Die Steigung der Trendlinie ist auch hier gegenüber der WT-Rekonstitution geringer. Die Expression von NMHC IIA- Δ IQ2 führt zu keinen phänotypischen Differenzen gegenüber der Expression von NMHC IIA-WT (Abb. 4.17C). Die Streuung des Diagramms weitet sich geringfügig aus, dennoch ist ein positiver Anstieg von R in Abhängigkeit von d erkennbar (Abb. 4.17C'). NM IIA-KO Zellen, die mit der NMHC IIA- Δ NHT transfiziert wurden, nähern sich phänotypisch NM IIB-KO Zellen an (Abb. 4.17D). Es bilden sich interne SF und die peripheren Aktinfasern erscheinen oftmals gerade, wodurch große Kreisbögen entstehen. Das zeigt sich auch im Streudiagramm, wo besonders bei großen d -Werten die R -Werte stark streuen. Diese Effekte wirken sich bei einer Rekonstitution mit NMHC IIA-3xA noch drastischer aus (Abb. 4.17E). Es bilden sich ebenfalls zentrale SF und die peripheren Aktinbögen in der Zellkontur ähneln geraden SF. Das Streudiagramm zeigt eine breite Streuung der R -Werte unabhängig von den d -Werten (Abb. 4.17E').

Abbildung 4.17: Die Blockierung der NMHC IIA-Phosphorylierung führt zum Verlust der $R(d)$ -Abhängigkeit.

Die Proteinfunktion von NM IIA wurde mit den angegebenen NMHC IIA-Mutanten oder der WT-Variante rekonstituiert. Die Zellen wurden für 120 min auf den FN-beschichteten Substraten kultiviert, fixiert und immunhistochemisch markiert. Gezeigt ist das FN-Substrat (rot), der Zellkern (blau), die GFP-Expression der NMHC IIA-Konstrukte (grün) sowie das Aktinzytoskelett (grau). **(A)** Eine Rekonstitution mit NMHC IIA-WT stellt den Phänotyp der WT-Zellen wieder her. Analog zu WT Zellen steigt der Kreisradius R bei zunehmender Spanndistanz d (A'). **(B)** NMHC IIA- Δ ACD exprimierende Zellen unterscheiden sich phänotypisch nicht von untransfizierten NM IIA-KO Zellen, auch die Abhängigkeit von R und d bleibt bestehen, wobei die Steigung der Trendlinie gegenüber der WT-Rekonstitution geringer ist (B'). **(C)** Der Expression von NMHC IIA- Δ IQ2 führt zu keinem phänotypischen Unterschied gegenüber NMHC IIA-WT exprimierenden Zellen. (C') Der positive Anstieg von R mit zunehmendem d ist erkennbar, die Werte streuen gegenüber (A') und (B') stärker. **(D)** NMHC IIA- Δ NHT transfizierte Zellen nähern sich phänotypisch NM IIB-KO Zellen an. Es bilden sich interne SF und periphere Aktinbögen mit großen Kreisradien. Die Punktwolke der R -Werte streut besonders bei großen d -Werten stark (D'). **(E)** Die Expression von NMHC IIA-3xA verstärkt die in (D) beobachteten Effekte weiter. Das Streudiagramm zeigt eine breite Streuung der R -Werte unabhängig von den d -Werten (E'). Maßstabsbalken = 10 μ m.



Eine Übersicht der quantitativen Analysen ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert des Korrelationskoeffizienten aus jeweils drei unabhängigen Experimenten. NM IIA-KO Zellen, die mit der NMHC IIA-WT transfiziert wurden, weisen einen identischen Wert zu WT Zellen in Abb. 4.14 auf. Auch bei der Rekonstitution mit der NMHC IIA- Δ ACD oder NMHC IIA- Δ IQ2 ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten. Die Expression von NMHC IIA- Δ NHT bewirkt hingegen eine signifikante Reduktion der Korrelation zwischen R und d gegenüber der WT-Rekonstitution. Das gleiche gilt für NM IIA-KO Zellen, die mit NMHC IIA-3xA transfiziert wurden.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass eine Erhöhung der NM IIA-Aktivität durch Unterdrückung der c-terminalen Phosphorylierung, auch in Gegenwart von NM IIB zum Verlust der Abhängigkeit zwischen R und d führen kann.

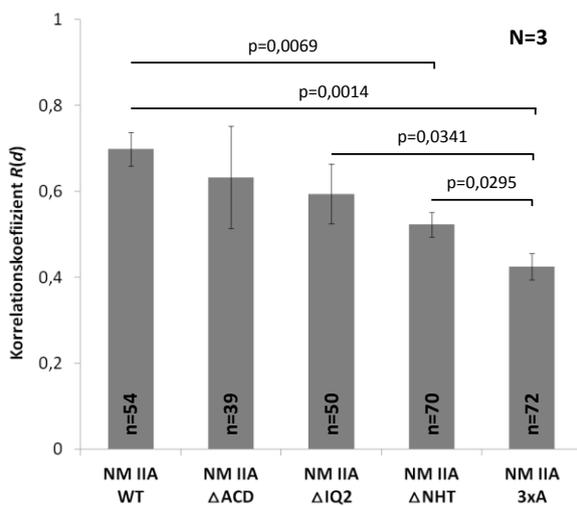


Abbildung 4.18: Quantitativer Vergleich der $R(d)$ -Abhängigkeit aus Abbildung 4.17.

Aufgetragen ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Nur die Blockierung der c-terminalen Phosphorylierung von NM IIA führt zu einer signifikanten Reduktion der Korrelation zwischen R und d . Die Blockierung beider Phosphorylierungsstellen durch NMHC IIA-3xA führt zu einer Reduktion auf dem Level von NM IIB-KO Zellen. Die Blockierung einer Phosphorylierungsstelle durch NMHC IIA- Δ NHT führt zu einer Reduktion um ca. die Hälfte gegenüber WT Zellen.

4.6 Initiierung der Aktomyosin-Kontraktilität durch NM IIA

Wie sich im vorausgegangenen Abschnitt zeigte, führt die Überassemblierung von NM IIA auch in Anwesenheit von NM IIB zu einer Erhöhung der Linienspannung in den Aktinbögen. Diverse Publikationen zeigen zudem, dass ein Knockdown von NM IIA zu einem nahezu kompletten Verlust der Kontraktilität führt, wohingegen der Verlust von NM IIB mit einer moderaten bis nicht vorhandenen Reduktion der Kontraktilität einhergeht (Cai et al., 2006; Shutova et al., 2017; Thomas et al., 2015). Diese Datenlage deutet darauf hin, dass der Aufbau der Aktomyosin-Kontraktilität nicht durch NM IIA und NM IIB gleichermaßen, sondern in einer Isoform-spezifischen Weise stattfindet. In den folgenden Experimenten wurde daher die Initiierung der Aktomyosin-Kontraktilität näher betrachtet. Um zu überprüfen, welchen Einfluss der Verlust von NM IIA oder NM IIB auf die Aktivität der NM II-Gesamtpopulation und die Paralog-Lokalisation ausübt, wurden die Fluoreszenzintensitäten der entsprechenden Proteine in WT, NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen ausgewertet. Die Aktivität der NM II-Gesamtpopulation wurde mittels pRLC als Marker für aktive NM II-Hexamere analysiert. Zur Untersuchung der Paraloge wurden die Intensität und Lokalisation von NM IIA in NM IIB-KO Zellen sowie von NM IIB in NM IIA-KO Zellen verglichen (Abb. 4.19).

Beim visuellen Vergleich des pRLC Signals in WT und NM IIB-KO Zellen ist kein Unterschied erkennbar. Das Signal lokalisiert entlang der SF und ist in beiden Zelllinien gleichmäßig im Zellkörper verteilt. Die Signalintensität in NM IIB-KO Zellen unterscheidet sich nicht von WT Zellen, unabhängig von der intrazellulären Lokalisation (Abb. 4.19E). Beim Vergleich der NM IIA Lokalisation und Expression in WT und NM IIB-KO Zellen konnte ebenfalls keine Differenz festgestellt werden. NM IIA ist in beiden Fällen homogen in der Zelle verteilt und lokalisiert entlang der SF. Die Fluoreszenzintensität von NM IIA zeigt unabhängig von der intrazellulären Position keinen Unterschied in WT und NM IIB-KO Zellen (Abb. 4.19F). Eine Detailaufnahme zeigt zudem, dass NM IIB-KO Zellen bipolare NM IIA-Filamente aufbauen, die sich in der Struktur und Intensität nicht von WT Zellen unterscheiden.

Der Verlust von NM IIA führt hingegen zum nahezu kompletten Verlust des pRLC Signals (Vgl. Abb. 4.19C-E). Auch die Lokalisation und Intensität von NM IIB ist durch den Verlust von NM IIA beeinflusst. Während NM IIB in WT Zellen in der typischen graduellen Verteilung entlang der Zellachse an den SF lokalisiert, ist die Lokalisation in NM IIA-KO Zellen strikt auf die wenigen verbleibenden SF beschränkt, ungeachtet deren Position innerhalb des Zellkörpers. Generell sind nur noch sehr wenige NM IIB-Cluster vorhanden. Der Vergleich der Fluoreszenzintensität zeigt jedoch, dass die wenigen verbleibenden Cluster eine höhere Intensität aufweisen, als die NM IIB Cluster in WT Zellen (Abb. 4.19F). Eine bipolare Struktur von NM IIB-Minifilamenten kann aufgrund der fehlenden pRLC Intensität nicht mehr visualisiert werden.

Ergebnisse

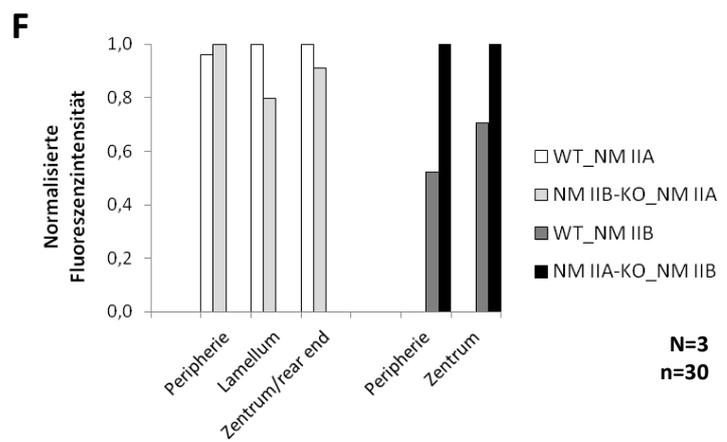
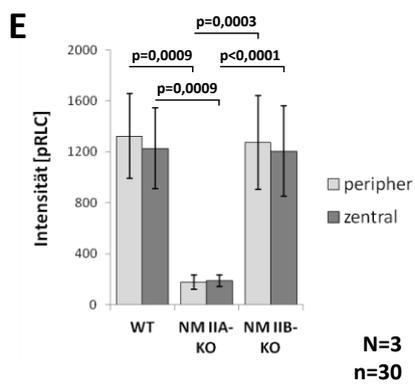
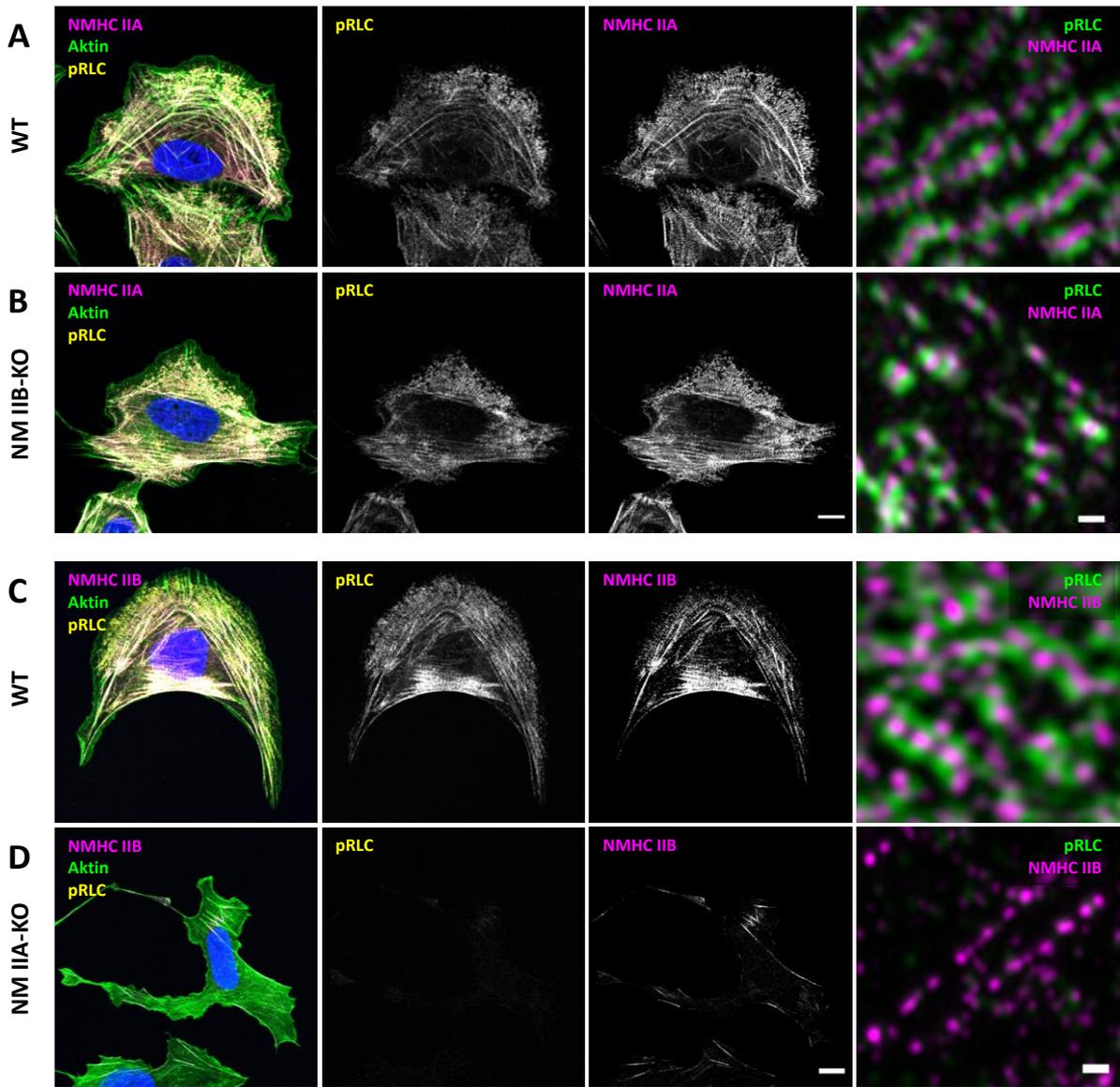


Abbildung 4.19: pRLC-Intensität und Paralog-Lokalisation in NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen.

Die Zellen wurden auf FN-beschichteten Deckgläsern für 120 min kultiviert, fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Gefärbt wurde jeweils der Zellkern (blau), das Aktinzytoskelett (grün), die pRLC (gelb) sowie die NMHC IIA oder NMHC IIB (magenta). **(A)** WT Zellen und NM IIB-KO Zellen **(B)** zeigen keinen Unterschied in der Lokalisation oder Expression der pRLC oder der NMHC IIA. Eine bipolare Struktur der NM IIA-Filamente ist erkennbar. WT Zellen **(C)** und NM IIA-KO Zellen **(D)** zeigen hingegen deutliche Unterschiede. In NM IIA-KO Zellen ist kein pRLC Signal mehr erkennbar und die Lokalisation von NMHC IIB ist deutlich eingeschränkt gegenüber WT Zellen. Nur noch sehr wenige NMHC IIB Cluster sind an den verbleibenden SF erkennbar. Die Cluster weisen jedoch eine höhere Fluoreszenzintensität auf, als in WT Zellen. Eine bipolare Struktur der NM IIB-Filamente ist aufgrund der fehlenden pRLC Intensität nicht mehr zu erkennen. **(E)** Quantifizierung der pRLC Intensität in WT, NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen. NM IIA-KO Zellen zeigen eine signifikante Reduktion der pRLC Intensität. **(F)** Quantifizierung der Paralog-Intensitäten in WT, NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen. NM IIB-Cluster in NM IIA-KO Zellen weisen eine höhere Intensität auf, NM IIA-Cluster in NM IIB-KO Zellen hingegen nicht. Die Intensitäten der verschiedenen Zellen und Lokalisationen wurden zur besseren Übersicht jeweils auf den höchsten gemessenen Wert normalisiert. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm in der Übersicht und 0,5 μm in der Detailansicht.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den beobachteten Resultaten um einen spezifischen Effekt handelt, der durch den Verlust der NMHC IIA ausgelöst wird, wurden Rekonstitutionsexperimente mit NMHC IIA-Mutanten und der WT-NMHC IIA durchgeführt (Abb. 4.20). Die Mutanten NMHC IIA- ΔIQ2 und NMHC IIA- ΔACD wurden bereits in Abbildung 4.16 ausführlich beschrieben. Um den Einfluss der NMHC IIA Expression auf die pRLC Intensität zu untersuchen, wurden die Fluoreszenzintensitäten ermittelt und gegeneinander aufgetragen. Eine Rekonstitution mit der NMHC IIA-WT führt zur Wiederherstellung der pRLC Intensität (Abb. 4.20A-A''). Die pRLC Intensität steigt dabei linear mit der Expressionsstärke der NMHC IIA (Abb. 4.20D).

Da bei der NMHC IIA- ΔIQ2 das Bindemotiv für die RLC entfernt wurde, ist im Fall einer Rekonstitution mit dieser Mutante keine Wiederherstellung des pRLC Signals zu sehen (Abb. 4.20B-B''). Die Quantifizierung zeigt, dass das pRLC Signal ungeachtet der Expressionsstärke von NMHC IIA- ΔIQ2 auf dem gleichen Niveau bleibt (Abb. 4.20E). Die Expression von NMHC IIA- ΔACD resultiert aufgrund der fehlenden bipolaren Struktur in einer diffusen, homogenen Lokalisation innerhalb des Zellkörpers. Die pRLC Lokalisation passt sich dabei der Lokalisation von NMHC IIA- ΔACD an und ist homogen im Zellkörper verteilt, lediglich entlang einiger verbleibender SF ist eine leicht verstärkte Lokalisation von pRLC Clustern zu erkennen (Abb. 4.20C-C''). Die Signalintensität der pRLC ist außerdem gegenüber NM IIA-KO Zellen erhöht, eine Quantifizierung konnte hier aufgrund des diffusen GFP-Signals nicht durchgeführt werden.

Weitere Kontrollexperimente sind im Anhang in Abbildung A3 gezeigt. Weder die Überexpression der RLC, noch eine phosphomimetische Variante der RLC sind in der Lage, den Phänotyp der NM IIA-KO Zellen zu retten. Eine Überexpressionen von NM IIB in NM IIA-KO Zellen ist ebenfalls nicht in der Lage die pRLC Intensität wieder vollständig herzustellen, wenngleich das IQ-Motiv für die RLC-Bindung in allen HC-Isoformen vorhanden ist (Abb. A3).

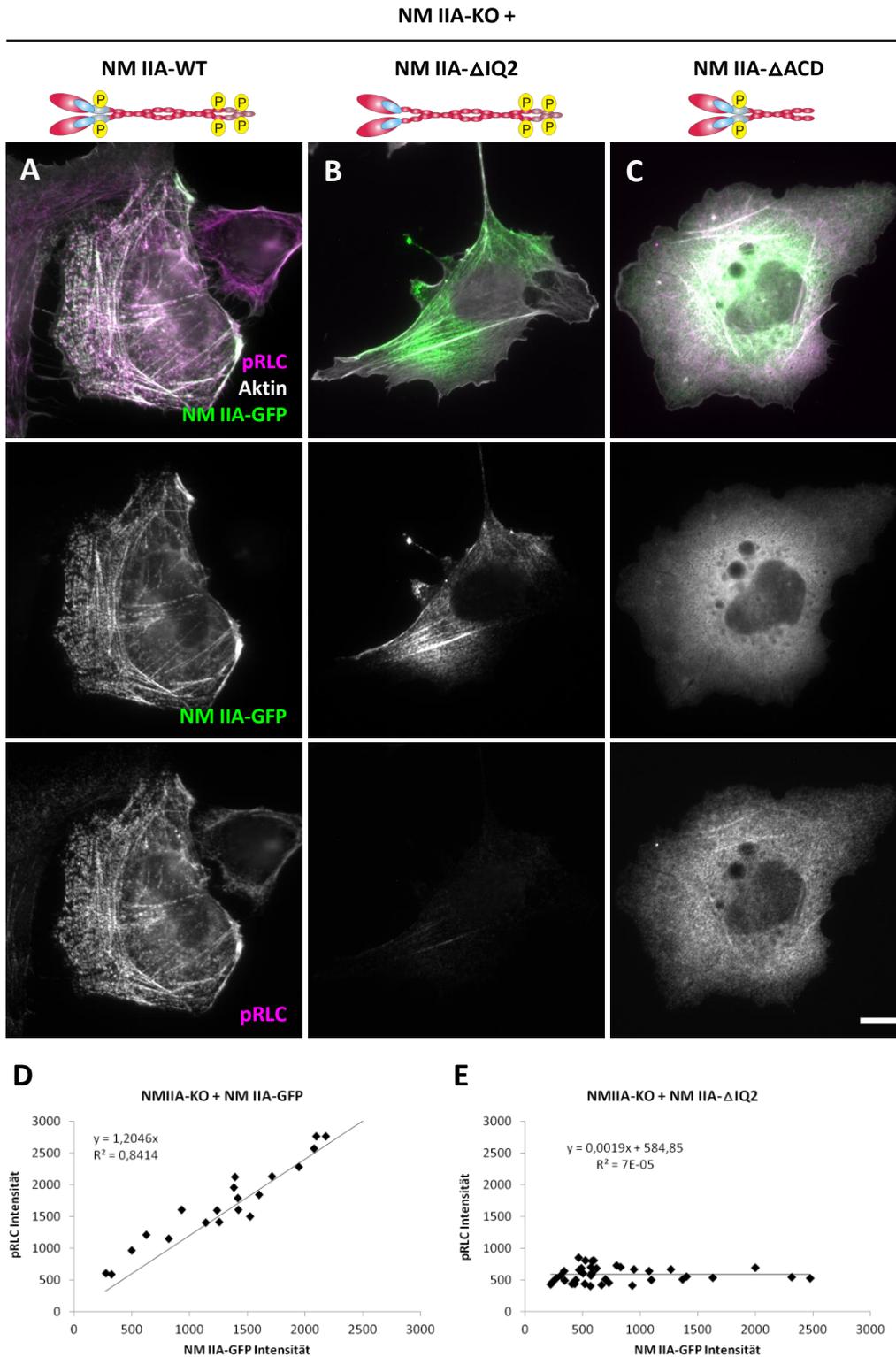


Abbildung 4.20: Das Phosphorylierungslevel der RLC wird durch die NMHC IIA gesteuert.

NM IIA-KO Zellen wurden mit den dargestellten NMHC IIA-Konstrukten (grün) transfiziert und die pRLC Intensität (magenta) analysiert. **(A-A'')** Eine Rekonstitution von NM IIA mit dem WT-Konstrukt führt zur Wiederherstellung des pRLC-Signals. Die pRLC-Intensität steigt dabei linear mit der NMHC IIA-WT Expression **(D)**. **(B)** NMHC IIA-ΔIQ2 enthält kein Bindemotiv für die RLC, wodurch auch kein Anstieg der pRLC Intensität zu sehen ist **(E)**. **(C-C'')** NMHC IIA-ΔACD lokalisiert aufgrund der fehlenden bipolaren Struktur homogen innerhalb des Zellkörpers, die pRLC Lokalisation passt sich dabei dieser homogenen Verteilung an. Maßstab = 10 μm.

Aus Abbildung 4.19 und 4.20 wird ersichtlich, dass die Aktivierung der NM II-Hexamere durch die 6S-10S Transition hauptsächlich über die NMHC IIA gesteuert wird. Gleichzeitig wird durch den Verlust der NMHC IIA die Lokalisation und Intensität NM IIB-Filamente beeinflusst. Da beide Isoformen in heterotypischen Filamenten co-assemblieren können (Beach et al., 2014; Shutova et al., 2014), wurde untersucht, inwiefern die Expression der NMHC IIA die Bildung heterotypischer NM IIA/NM IIB-Filamente beeinflusst (Abb. 4.21). Aufgrund mangelnder Antikörper, die eine gleichzeitige immunhistochemische Visualisierung von NM IIA und NM IIB in WT Zellen erlauben, wurden NM IIA-KO Zellen mit einer c-terminal getaggten NMHC IIA rekonstituiert und das endogene NM IIB immunhistochemisch markiert. Da der Antikörper gegen die NMHC IIB ebenfalls an die c-terminale Region des Proteins bindet, zeigt eine Kolokalisation beider Signale heterotypische Filamente an. Um die Kolokalisationen präzise zu bestimmen, wurden hochaufgelöste Fluoreszenzaufnahmen mittels SIM angefertigt und per Linienscan die Überlappungen der Fluoreszenzsignale ausgewertet.

Abbildung 4.21A zeigt ein Übersichtsbild einer rekonstituierten NM IIA-KO Zelle, die einen polarisierten Phänotyp angenommen hat. Analog zu WT Zellen zeigen diese Zellen eine homogene Verteilung des NM IIA-Signals wohingegen die Intensität von NM IIB zum Zellzentrum zunimmt. Pro Zelle wurde jeweils an der Zellfront, im Zellzentrum und am Zellende die Kolokalisation der Signale gemessen (Abb. 4.21A'-A''). Die Linienscans in Abb. 4.21B gehören dabei jeweils zu den drei zentralen Pfeilen der Bildausschnitte. Blaue Pfeile in den Bildausschnitten markieren Filamente, die ausschließlich ein NM IIA Signal zeigen, Rote Pfeile zeigen eine Kolokalisation beider Isoformen, gelbe Pfeile zeigen Filamente, die ausschließlich aus NM IIB bestehen. An der Zellfront finden sich Großteils Filamente, die nur aus NM IIA bestehen. Je näher die Filamente am Zellzentrum liegen, desto stärker co-assembliert NM IIB in die NM IIA-Filamente (Abb. 4.21A'). In den Ausschnitten im Zellzentrum und am *trailing edge* der Zelle sind fast ausschließlich heterotypische Filamente vorhanden (4.21A'' & A'''). Homotypische NM IIB Filamente sind selten vorzufinden. Bei genauer Betrachtung der Linienscans in Abbildung 4.21B wird deutlich, dass sich das Verhältnis der Signale von NM IIA und NM IIB mit zunehmender Entfernung von der Zellfront immer mehr ausbalanciert. Eine quantitative Analyse der Verhältnisse von NM IIA zu NM IIB bestätigt diesen Eindruck. Zellen, die hingegen keinen polarisierten Phänotyp annehmen, zeigen keine graduelle Verteilung von NM IIB und das Verhältnis von NM IIA zu NM IIB bleibt unabhängig von der intrazellulären Position konstant (Abb. 4.21C). Eine quantitative Analyse der Fluoreszenzintensitäten von NM IIA und NM IIB anhand von AiryScan Aufnahmen zeigt weiterhin, dass keine positive Korrelation zwischen den Intensitäten der beiden Isoformen besteht (Abb. 4.21D).

Eine Rekonstitution von NM IIA-KO Zellen mit NMHC IIA- Δ IQ2 verdeutlicht, dass die Initiierung heterotypischer Filamente von der NMHC IIA Expression abhängig ist und unabhängig von der RLC stattfindet. Mit Ausnahme der NMHC IIA- Δ ACD, welche keine bipolare Struktur aufbauen kann, sind auch alle c-terminalen Phosphorylierungsmutanten der NMHC IIA in der Lage, heterotypische Filamente zu initiieren. Die Expressionsstärke der Konstrukte beeinflusst jedoch nie die Intensität der NM IIB-Signale (Abbildung A4 im Anhang).

Ergebnisse

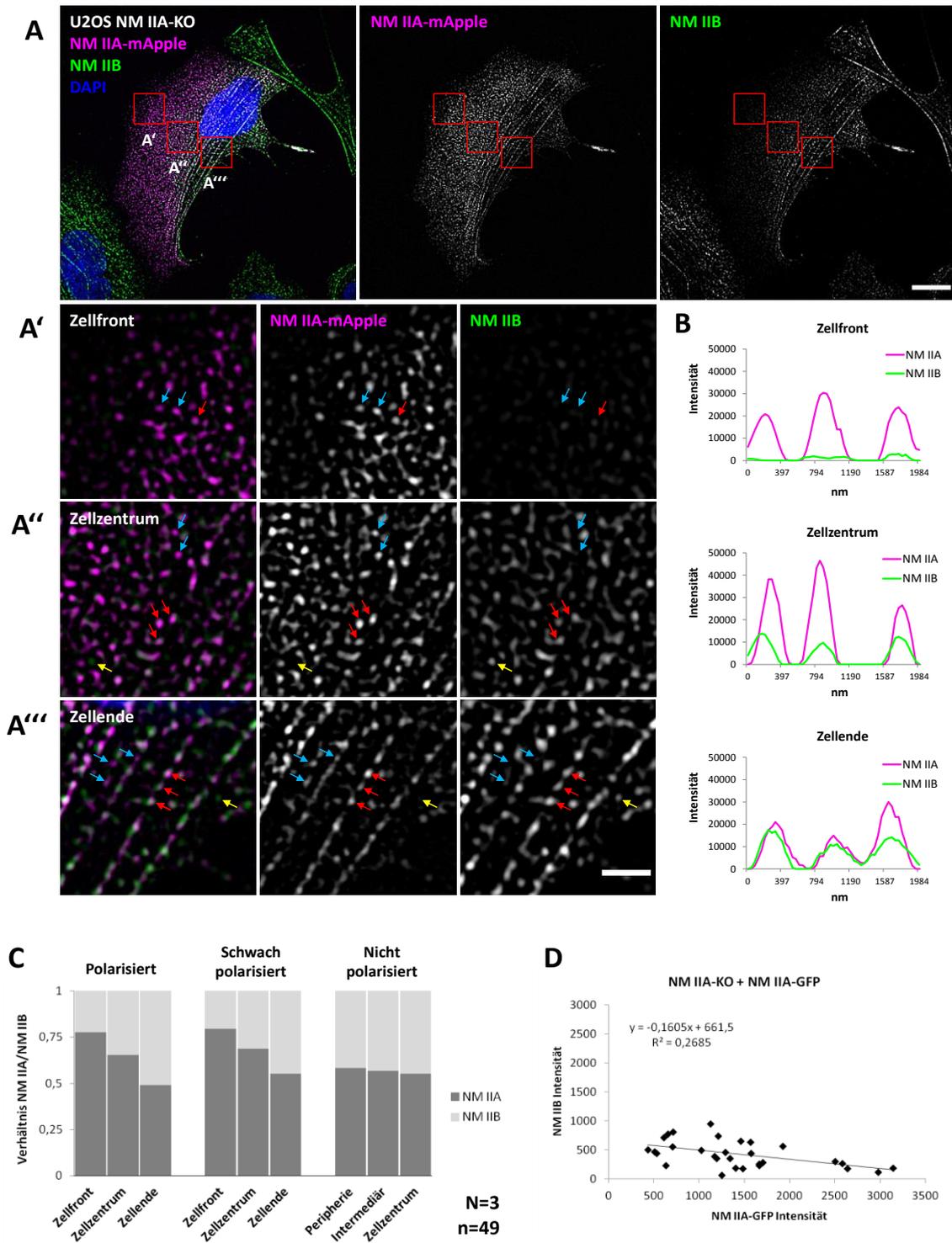


Abbildung 4.21: NM IIA initiiert die Bildung heterotypischer Filamente.

NM IIA-KO Zellen wurden mit c-terminal getaggttem NM IIA transfiziert (grün) und NM IIB immunhistochemisch markiert (magenta). Zusätzlich wurde der Zellkern (blau) markiert. **(A)** Übersicht einer transfizierten Zelle, die einen polarisierten Phänotyp angenommen hat. Die Verteilung von NM IIA und NM IIB ist analog zu WT Zellen. **(A'-A''')** Detailansichten aus der Zellfront, dem Zellzentrum und dem Zellende. Blaue Pfeile markieren Filamente, die nur aus NM IIA bestehen, rote Pfeile markieren heterotypische Filamente, gelbe Pfeile Filamente die nur aus NM IIB bestehen. In der Zellfront (A') sind hauptsächlich NM IIA-Signale vorhanden. Im Zellzentrum (A'') und am Hinterende der Zelle (A''') sind fast ausschließlich heterotypische Filamente vorzufinden. Homotypische NM IIB Filamente sind selten vorzufinden. **(B)** Linienscans entlang der drei zentralen Pfeile in den Bildausschnitten. Mit zunehmender Entfernung zur Zellfront balancieren sich die Verhältnisse von NM IIA und NM IIB aus. **(C)** Quantitative Analyse der Verhältnisse von NM IIA zu NM IIB. In polarisierten Zellen gleicht sich das Verhältnis von NM IIA und NM IIB mit zunehmender Entfernung von der Zellfront aus. In nicht-polarisierten Zellen bleibt das Verhältnis konstant, unabhängig von der intrazellulären Position. **(D)** Es besteht keine positive Korrelation zwischen der NM IIA Expression und der NM IIB-Intensität. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 μm in der Übersicht und 2 μm in der Detailansicht.

5 Diskussion

Die Analyse NM II-vermittelter Kontraktilität stellt aufgrund der komplexen Struktur und zahlreichen Komponenten des Systems eine Herausforderung dar. Eine bisher weitgehend unerforschte Frage ist, inwiefern sich Mechanismen der kontraktilitätsabhängigen Zellmorphogenese von flachen 2D-Substraten auf eine 3D Umgebung übertragen lassen. Bisherige Analysen wurden fast ausschließlich auf flachen, homogen-beschichteten Zellkultursubstraten durchgeführt, welche die 3D-Geometrie der EZM nicht widerspiegeln. Die meisten verfügbaren 3D-Substrate haben zudem das Problem, dass sie keine kontrollierbare Zelladhäsion erlauben und aufgrund der Dichte des Materials nur schwer eine fundierte Analyse der Zellen mit konventionellen Mikroskopie-Techniken ermöglichen. Eine zweite offene Frage ist, welche spezifischen Einflüsse die unterschiedlichen NM II-Isoformen auf das gesamte Aktomyosin-System in nicht-muskulären Zellen ausüben. Mehrere Studien haben bereits begonnen, die Rolle von NM IIA und NM IIB genauer zu charakterisieren (Beach et al., 2011; Beach et al., 2014; Cai et al., 2006; Chang und Kumar, 2015; Shutova et al., 2017; Shutova et al., 2014; Thomas et al., 2015). Dabei zeigten sich im Speziellen bei NM IIB sehr subtile zelluläre Effekte, welche auf homogenen Zellkultursubstraten nur unzureichend quantitativ evaluiert werden konnten und zu inkonsistenten Interpretationen führten. Über die Funktion von NM IIC ist zudem bisher so gut wie nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Fragestellungen aufgegriffen und analysiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden rekapituliert und in den Kontext zum aktuellen Forschungsstand gesetzt.

5.1 Vergleich von Zellphänotypen und Aktinstrukturen in 2D und 3D

Der morphologische Vergleich von Zellphänotypen und Aktinstrukturen in 2D und 3D gestaltet sich aufgrund der zellulären Heterogenität und der Substratvariabilität anspruchsvoll. Auf homogen-beschichteten Deckgläsern nehmen die Zellen eine stark abgeflachte Morphologie an und es bilden sich zahlreiche SF. In 3D zeichnen sich Fibroblasten oftmals durch einen spindelförmigen, elongierten Phänotyp aus, der sich abhängig von den Verankerung variabel verzweigt und nur wenige SF ausbildet (Cukierman et al., 2001; Cukierman et al., 2002; Elliott et al., 2015). Um einen quantitativen Vergleich der Zellen in 2D und 3D zu ermöglichen, war in beiden Fällen die Definition der Substratgeometrie essentiell. Strukturierte Substrate erlauben die Restriktion und Steuerung der Zelladhäsion auf vorgegebene Bereiche, wodurch eine Vereinheitlichung der Zellphänotypen erreicht werden kann. Den Ausgangspunkt für die vergleichenden Analysen bildeten die Resultate von Bischofs und Kollegen. In dieser Publikation wurden mikrostrukturierte Dot-Substrate verwendet, um eine Vereinheitlichung des Phänotyps zu gewährleisten. Die gleichen Substrate wurden in Abb. 4.1 für die phänotypische Analyse von NIH 3T3 Fibroblasten auf 2D-Substraten verwendet. Der qualitative und quantitative Vergleich zeigt, dass NIH 3T3 Zellen eine identische Morphologie wie B16- oder BRL-Zellen annehmen (Bischofs et al., 2008). Zwischen den passivierten Bereichen bilden sich entlang der Zellkontur konkave Aktinbögen. Die Ausbildung solcher Bögen wurde nicht nur in Fibroblasten, sondern auch in Zellen epithelialen Ursprungs und auf anderen Substrat-Geometrien beobachtet (They et al., 2006). Es

handelt sich bei den Aktinbögen daher nicht um eine Zelltyp-spezifische Ausprägung oder ein Artefakt, welches auf eine limitierte Adhäsionsfläche zurückzuführen ist. Weiterhin zeigt die Quantifizierung der Kreisradien, dass ein Anstieg von R mit zunehmender Spanndistanz d vorhanden ist. Das Konzept von Spannung und Elastizität kann somit auch im Fall von NIH 3T3 Zellen angewendet werden und dient als Basis, für den experimentellen Vergleich der Phänotypen in 2D und 3D.

Für die Herstellung von 3D-Zellkultursubstraten mit einer definierten Anordnung der Adhäsionsstellen, hat sich das DLS bewährt. Das hohe Auflösungsvermögen dieser Methode ermöglicht die Herstellung von 3D-Mikrostrukturen für die Einzelzellkultivierung. Durch die gezielte Funktionalisierung der 3D-Strukturen kann zudem die Zelladhäsion in 3D präzise gesteuert werden (Klein et al., 2011; Richter et al., 2017). Ein weiterer Vorteil solcher Strukturen ist, dass die Analyse der Zellen nicht durch die Struktur selbst behindert wird, da diese nur eine minimale Größe in X/Y/Z aufweist. Für die Visualisierung der Zellen sind konventionelle Konfokal-Mikroskope und Objektive mit üblichem Arbeitsabstand ausreichend. Die hier verwendeten 3D-Strukturen haben sich als geeignet erwiesen, um den Phänotyp und die Aktinstruktur von NIH 3T3 Zellen im Vergleich zu strukturierten 2D-Substraten zu untersuchen. Abstand und Anordnung der Adhäsionsstellen in den 3D-Strukturen wurden dabei so gewählt, dass eine Vergleichbarkeit zu den strukturierten 2D-Substraten gewährleistet ist. Ein zentraler Adhäsionspunkt, der in der Z-Achse zu den anderen Adhäsionspunkten versetzt ist, führt zudem zur Z-Ausdehnung des Zellkörpers (Abb. 4.2). Durch die dreidimensionale Anordnung der Adhäsionsstellen, wurde in dieser Arbeit der 3D-Phänotyp von NIH 3T3 Zellen kontrolliert gesteuert, was erstmals eine quantitativ vergleichbare Analyse von Zellphänotypen und Aktinstruktur in 2D und 3D ermöglichte.

5.1.1 Spannung und Elastizität tragen zum Zellphänotyp in 3D bei

Um den Phänotyp der NIH 3T3 Zellen in den 3D-Strukturen zu charakterisieren, wurden REM Aufnahmen angefertigt. Anhand dieser Aufnahmen wurde deutlich, dass sich die Zellform strikt an der gegebenen pentagonalen Anordnung der Adhäsionsstellen orientiert. Die Form der Zelle entspricht dadurch einer invertierten Pyramide. Es ist zudem zu erkennen, dass die Zellkontur zwischen den Adhäsionspunkten einer nach innen gerichteten Kreisform entspricht. Diese Einbuchtungen bilden sich sowohl zwischen den Adhäsionspunkten in der lateralen Ebene, als auch bei der Aufspannung des Zellkörpers in axialer Ebene (Abb. 4.2D). Bereits diese morphologischen Charakteristika lassen darauf schließen, dass NIH 3T3 Zellen in 3D-Mikrostrukturen ähnliche morphologische Ausprägungen wie auf strukturierten 2D-Substraten ausbilden.

Fluoreszenzmikroskopische 3D-Projektionen der Aktinfasern zeigen, dass der im Raum aufgespannte Zellkörper entlang der Zellkonturen durch konkave Aktinbögen verstärkt ist. Wie im Fall der 2D Situation entspricht die Form der konkaven Fasern einem Kreisbogen. Auch in axialer Richtung werden die nicht-adhäsiven Bereiche durch konkave, strukturverstärkende Aktinfasern überspannt (Abb.4.2G-I). Die axiale Aufspannung des Zellkörpers bewirkt zudem eine Neigung der lateralen Aktinfasern in der Z-Achse, was vermutlich durch die kontraktile Oberflächenspannung zustande kommt (Abb. 4.3B).

Dabei zieht die Oberflächenspannung σ des Aktincortex die im Raum aufgespannte Fläche zusammen, eine Linienspannung λ in den Aktinbögen wirkt dem entgegen. Das auf dem Laplace-Gesetz basierende Modell von Oberflächen- und Linienspannung gilt demnach auch in einer dreidimensionalen Umgebung. Die quantitative Analyse der lateralen Bögen zeigt, dass die gleiche Abhängigkeit der Kreisradien R zur Spanndistanz d besteht, was auf die Anwendbarkeit des TEM in 3D hindeutet (Brand et al., 2017). Die axial verlaufenden Aktinbögen konnten aufgrund der schlechteren optischen Auflösung in Z sowie der schwierigen Segmentierung nicht zuverlässig quantitativ analysiert werden. Allerdings deutet die visuelle Analyse auch hier darauf hin, dass die Fasern einem Kreisbogen entsprechen.

Die Abhängigkeit der phänotypischen Ausprägung von Spannung und Elastizität ist demnach nicht auf eine stark abgeflachte 2D Zellmorphologie beschränkt, sondern spielt auch bei der Ausbildung von 3D-Zellmorphologien eine entscheidende Rolle. In der Arbeitsgruppe von Prof. Schwarz wurde aufbauend auf dem 2D TEM ein computergesteuertes Modell für 3D Zellformen entwickelt (Brand et al., 2017). Die computergesteuerten Simulationen sowie der Vergleich von Theorie und experimentellen Messwerten zeigen auch im Fall von 3D eine gute Übereinstimmung (Abb. 4.3). Beide Modelle zeigen, dass Aktomyosin-Kontraktilität in Form von Spannung alleine nicht ausreichend ist, um die Anpassung des Phänotyps zu vermitteln. Diese Ergebnisse stimmen mit aktuellen Publikationen überein, die elastischen Effekten eine entscheidende Rolle bei der intrazellulären Krafterzeugung zuschreiben (Oakes et al., 2017; Sunyer et al., 2016). Nur durch eine Kombination aus Spannung und Elastizität können die resultierenden 3D-Phänotypen erklärt werden.

5.1.2 Unterschiede in der Aktinstruktur zwischen 2D und 3D

Auch wenn grundlegende Übereinstimmung zwischen den Zellmorphologien in 2D und 3D sowie der zugrundeliegenden Mechanismen besteht, wurden Unterschiede in der Aktinstruktur der Zellen deutlich. Insgesamt bilden NIH 3T3 Zellen in 3D wesentlich weniger Aktinfasern. Die prominentesten Fasern bilden sich dabei jeweils in der Peripherie der Zelle, entlang der lateralen Zellkonturen. Interne Fasern, welche den Zellkörper durchspannen, wurden kaum beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Struktur des Aktincortex in 3D liefern. Es wird angenommen, dass der Aktincortex in Zellen auf flachen Substraten hauptsächlich auf der dorsalen, Substrat-abgewandten Zelloberfläche ausgebildet wird, da eine Oberflächenspannung auf der ventralen, Substrat-zugewandten Seite wenig mechanischen Nutzen besitzt (Xu et al., 2012). In den 3D-Strukturen ist der Zellkörper hingegen an allen Seiten frei aufgespannt und die Oberflächenspannung muss auf die gesamte Zelloberfläche verteilt werden. Daraus ergibt sich eine wesentlich komplexere Struktur des Aktincortex im Vergleich zu 2D. Es wäre daher möglich, dass die Mehrheit der Aktinmonomere im Cortex assembliert und der Anteil an quervernetztem Aktin gegenüber gebündelten Fasern überwiegt. Ob die Cortexspannung in einer solchen Situation wirklich überwiegt, ist allerdings experimentell schwer adressierbar, da eine gezielte Inhibierung der Cortexspannung nach aktuellem Wissensstand nicht möglich ist.

Eine weitere Beobachtung betrifft die Entstehung der lateralen und axialen Aktinbögen entlang der Zellkontur. Während sich die lateralen Bögen regelmäßig ausbilden, sind die axialen Fasern nicht zwangsläufig zwischen allen Adhäsionsstellen vorhanden (Vgl. Abb. 4.2H&I). Die prinzipielle Existenz dieser axialen Fasern spricht gegen die These, dass SF in 3D nicht existieren (Burrige und Wittchen, 2013). Es bleibt jedoch die Frage, warum die Ausbildung axialer Fasern scheinbar weniger wichtig ist, als das laterale Pendant. Bei der visuellen Inspektion der Aktinbögen entstand der Eindruck, dass die axialen Fasern gegenüber den lateralen oftmals eine schwächere Intensität aufweisen. Eine schwächere Ausprägung von SF in 3D wurde in einem Übersichtsartikel postuliert, über den Grund wird dabei jedoch nicht spekuliert (Lee und Kumar, 2016). Computersimulationen der Zellen in 3D-Mikrostrukturen schlagen vor, dass der mechanische Stress in der lateralen Ebene größer als in der axialen Ebene ist (Abb. 4.3D). Es ist in der Literatur weitgehend akzeptiert, dass sich SF in Abhängigkeit von der Lokalisation des höchsten Stresses in der Zelle bilden (Burrige und Wittchen, 2013; Sandbo und Dulin, 2011; Tzima et al., 2005; Wong et al., 1983). Geringerer mechanischer Stress in der axialen Ebene kann sich daher in unregelmäßigen und schwächeren axialen Aktinbögen widerspiegeln.

Da die Cortexspannung asymmetrisch aufgebaut sein kann, wäre eine mechanosensitive Bildung der axialen SF in Abhängigkeit von der Cortexspannung möglich. Computersimulationen zeigen, dass sich die lateralen und axialen Anteile des Cortex, welche die peripheren Aktinbögen umgeben, teilweise selbst kompensieren. Dadurch entsteht eine abgeschwächte Oberflächenspannung um die peripheren Bögen, was zu einer schwächeren Bildung von SF führen könnte (Brand et al., 2017; Tabdanov et al., 2018). Nimmt man eine asymmetrische Verteilung der Cortexspannung in der Z-Ebene an, kann die Ausbildung von axialen SF davon abhängen, an welchen subzellulären Bereichen die höchste Cortexspannung vorhanden ist.

Eine offene Frage, die sich bisher experimentell nicht adressieren lässt, ist inwiefern sich Oberflächenspannung und Linienspannung in 2D und 3D unterscheiden. Das 3D-Modell schlägt vor, dass Fibroblasten in 3D gegenüber 2D entweder eine höhere Oberflächenspannung (größeres σ) oder eine geringere Linienspannung (kleineres λ) innehaben. Möglich wäre auch eine Kombination aus beiden Effekten. Da sich Cortexspannung und Linienspannung nicht entkoppeln lassen, kann über diese Frage bisher nur spekuliert werden. Zieht man die im Modell vorgeschlagene Eigenkompensation der Cortexspannung und die schwächere Ausbildung von SF in Betracht, könnte der Effekt einer geringeren Linienspannung dominieren (Brand et al., 2017). Untersuchungen zum Einfluss der Dreidimensionalität auf den zellulären Phänotyp und die Aktomyosin-Kontraktilität, stehen noch am Anfang. Die hier gezeigten Resultate bieten erste Anhaltspunkte in Bezug auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen 2D und 3D. Weitere Experimente können in Zukunft mehr Aufschluss geben, dabei ist die Kraftmessung von Zellen in 3D-Substraten von besonderem Interesse. Mittels DLS können 3D-Mikrostrukturen hergestellt werden, die eine ausreichende Flexibilität aufweisen, um von Zellen deformiert zu werden. Auch wenn die mechanische Charakterisierung und Kalibrierung dieser Substrate eine Herausforderung darstellt, ermöglicht diese Methode prinzipiell den Vergleich der Kontraktionskraft von Zellen in 3D Gerüsten und Zellen, bei denen die Kraft auf strukturierten 2D-Substraten gemessen wurde (Balaban et al., 2001; Sabass et al., 2008).

5.2 Einfluss der NM II-Isoformen auf die Aktinstruktur, Zelladhäsion und Zellmigration

Die Blockierung der NM II-Aktivität durch pharmakologische Inhibitoren stellt eine gängige und einfache Methode dar, um den Einfluss der Aktomyosin-Kontraktilität auf zelluläre Prozesse zu untersuchen. Anhand der unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen von Blebbistatin-behandelten NIH 3T3 Zellen und NM IIA-defizitären COS-7 Zellen wird jedoch deutlich, dass ein Verlust einzelner NM II-Isoformen nicht mit der pharmakologischen Inhibition der NM II-Aktivität gleichgesetzt werden kann (Vgl. Abb. 4.4). Die Inhibierung der NM II-Aktivität durch Blebbistatin führt zu einer Blockierung aller NM II-Isoformen gleichzeitig. Unterschiedliche kinetische Eigenschaften deuten jedoch darauf hin, dass die Isoformen nicht nur redundante Versionen eines krafterzeugenden Apparates sind, sondern spezifische Funktionen einnehmen.

➤ **Der Verlust von NM IIA führt zu starken Beeinträchtigungen bei der Morphogenese, SF-Bildung, Zelladhäsion und Zellmigration**

Die drastischsten zellulären Beeinträchtigungen wurden durch den Verlust von NM IIA herbeigeführt. Die morphologische Veränderung der NM IIA-KO Zellen ist bereits mittels Phasenkontrastmikroskopie deutlich erkennbar und erinnert an Zellen, welche mit Blebbistatin behandelt wurden. Ein Verlust der Polarisierung sowie eine stark abgeflachte und weit verzweigte Morphologie sind die prägnantesten Charakteristika, welche sowohl in Blebbistatin-behandelten Zellen als auch in den hier analysierten NM IIA-KO Zellen beobachtet wurden. Die Färbung des Aktinzytoskeletts zeigte zudem, dass ein Verlust von NM IIA mit dem fast vollständigen Verlust der SF in U2OS Zellen einhergeht (Abb. 4.8B). Der gleiche Effekt wurde bereits in diversen Fibroblasten und epithelialen Zelllinien nachgewiesen (Cai et al., 2010; Even-Ram et al., 2007; Sandquist et al., 2006; Shutova et al., 2017). Shutova et al. zeigen zudem, dass die einzigen verbleibenden SF in NM IIA-defizitären Fibroblasten vSF entsprechen (Shutova et al., 2017), was ebenfalls den Beobachtungen dieser Arbeit entspricht.

Durch die mechanosensitive Kopplung von SF und Fokalkontakten, wirkt sich der Verlust von SF in NM IIA-KO Zellen auch auf die Maturierung der Fokalkontakte aus (Abb.4.9) (Even-Ram et al., 2007; Sandquist et al., 2006; Shutova et al., 2017). Der Verlust von NM IIA führt zur Ausbildung kleiner, naszenter Kontakte, wie sie auch durch eine Blebbistatinbehandlung entstehen (Bachmann et al., 2018; Schiller et al., 2013). Der Einfluss von NM IIA ist nicht auf Fokalkontakte begrenzt, sondern beeinträchtigt auch die Bildung von Zell-Zell-Adhäsionen, zumindest im Fall von Adhärenzkontakten (Abb. 4.10). Der Aktinürtel, welcher die Adhärenzkontakte mechanisch miteinander koppelt, wird hauptsächlich vom Aktincortex aufgebaut (Burridge und Wittchen, 2013; Heuze et al., 2019). NM IIA beeinträchtigt demnach nicht nur die Aktinstruktur und -kontraktilität der SF, sondern auch des Aktincortex. Eine kraftabhängige Maturierung von Fokalkontakten und Zell-Zell-Adhäsionen wurde in diversen Publikationen postuliert (Bachmann et al., 2018; Conti et al., 2004; Heuze et al., 2019; Schiller et al., 2013) und verdeutlicht, dass der Verlust von NM IIA zu einer drastischen Reduktion der Aktomyosin-Kontraktilität führt (Cai et al., 2006; Shutova et al., 2017; Thomas et al., 2015).

Durch die Beeinträchtigung der Aktinstruktur ergeben sich auch Auswirkungen auf die Zellmigration (Abb. 4.11). Färbungen des Aktinzytoskeletts zeigen, dass NM IIA-KO Zellen oftmals ihre polarisierte Morphologie verlieren und dabei mehrere Lamellipodien gleichzeitig bilden. Außerdem bilden sich lange Ausläufer am *trailing edge* der Zelle. Zeitrafferaufnahmen während der Zellmigration verdeutlichen, dass sich die Zellfront stetig nach vorne schiebt, während die Zellausläufer vermutlich aufgrund fehlender Kontraktilität nicht verkürzt werden können. Effektiv waren die Zellen nicht in der Lage, eine komplette Translokation des Zellkörpers abzuschließen. Die fehlende Zellkörper-Retraktion führt schließlich dazu, dass sich die Migrationsfront aufspaltet und mehrere, kleine Lamellipodien entstehen. Diese Ergebnisse spiegeln auch die Resultate einer aktuellen Publikation von Shutova und Kollegen wider. Ein Knockdown von NM IIA in REF-52 Zellen führt hier zu einer Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit, die Expression von NM IIA in COS-7 Zellen führt hingegen zu einer Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit (Shutova et al., 2017). Jedoch finden sich auch zahlreiche Publikationen, welche eine Zunahme der Migrationsgeschwindigkeit durch den Verlust von NM IIA nachweisen (Doyle et al., 2012; Even-Ram et al., 2007; Jorrich et al., 2013; Sandquist et al., 2006). Die Zellmigration ist ein äußerst komplexer Vorgang, der von einer Vielzahl unterschiedlicher Einflüsse abhängt. Die effektive Migrationsgeschwindigkeit wird daher nicht ausschließlich von der Aktomyosin-Kontraktilität gesteuert, sondern hängt beispielsweise auch von der Stabilität der Zelladhäsion, Ausprägung der Mikrotubuli und der Substratgeometrie ab (Doyle et al., 2015; Doyle et al., 2012; Jorrich et al., 2013; Shih und Yamada, 2010). Die phänotypischen Ausprägungen während der Zellmigration, welche durch den Verlust von NM IIA einhergehen, sind mit Ausnahme von speziellen Zelltypen wie Leukozyten jedoch immer gleich und spiegeln sich in der Bildung langer Zellausläufer und damit einhergehender verzögerter Retraktion des Zellkörpers wider (Doyle et al., 2012; Even-Ram et al., 2007; Jorrich et al., 2013).

➤ **Der Verlust von NM IIB führt zu einer subtilen Beeinflussung der SF-Bildung und der Zellmigration**

Der Verlust von NM IIB führt zu subtilen Effekten, die sich darüber hinaus nicht in allen Zellen gleich stark ausprägen. Eine morphologische Differenz zu WT Zellen ist anhand von Phasenkontrastaufnahmen nicht zu erkennen, auch ohne NM IIB weisen die Zellen einen polarisierten Phänotyp auf. Die Bildung von SF im Allgemeinen ist nicht beeinträchtigt, alle SF-Subtypen sind generell vorhanden. Bei genauer Betrachtung des Aktinzytoskeletts entstand jedoch der Eindruck, dass sich Ausprägung und Lokalisation der unterschiedlichen SF-Subtypen gegenüber WT Zellen unterscheiden. dSF waren oftmals sehr kurz und schwach ausgeprägt. Transversale Arcs und vSF waren hingegen zahlreich vorhanden, konnten jedoch häufig nur schwer unterschieden werden, da sich vSF bis ins Lamellum verteilten. Während die verschiedenen SF-Subtypen in WT Zellen aufgrund ihrer distinkten Lokalisation klar voneinander abgegrenzt werden konnten, war eine Unterscheidung in NM IIB-KO Zellen aufgrund überlagernder Lokalisationsmuster oftmals schwierig.

Bisher findet sich in der Literatur keine explizite Beschreibung von veränderten SF-Lokalisationsmustern in Abhängigkeit von NM IIB. Shutova et al. sowie Even-Ram et al. erwähnen in ihren Publikationen keine Beeinflussung der SF-Bildung durch den Verlust von NM IIB (Even-Ram et al., 2007;

Shutova et al., 2017). Even-Ram betrachten dabei jedoch humane Fibroblasten, die fast ausschließlich vSF ausbilden. Dieser Subtyp wurde auch in U2OS NM IIB-KO Zellen verstärkt ausgeprägt. Falls ein Verlust von NM IIB zu verstärkter Bildung von vSF führt, dürfte ein Unterschied in Fibroblasten nur schwer erkennbar sein. Shutova et al. zeigen, dass REF-52 Fibroblasten alle SF-Subtypen ausbilden, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit prinzipiell übereinstimmt. Über das Mengenverhältnis der SF-Subtypen zueinander wird in der Publikation nicht spekuliert. Sandquist und Kollegen zeigen hingegen, dass der Verlust von NM IIB zur Bildung von prominenten Aktinbündeln entlang der Migrationsfront in epithelialen A549 Zellen führt (Sandquist et al., 2006). Auch wenn hier keine SF-Subtypen erwähnt werden, führt der Verlust von NM IIB dennoch zu einer atypischen Aktin-Lokalisation. In mehreren Arbeiten von Vicente-Manzanares und Kollegen wurde zudem deutlich, dass NM IIB eine Funktion bei der Bildung langer, stabiler Aktinfasern im Zellzentrum einnimmt, wodurch die Morphologie des Zellzentrums stabilisiert wird (Vicente-Manzanares et al., 2008; Vicente-Manzanares et al., 2011; Vicente-Manzanares et al., 2007). SF im Zellzentrum können in den meisten Fällen als vSF klassifiziert werden. Wie bereits erwähnt, wurden im Fall von U2OS NM IIB-KO Zellen zahlreiche vSF beobachtet, deren Lokalisation sich jedoch nicht auf das Zellzentrum beschränkte, sondern sich bis zum Lamellum ausbreitete (Abb. 4.8C). Durch den Vergleich dieser Ergebnisse wird deutlich, dass NM IIB nicht ausschließlich eine Rolle bei der Stabilisierung der SF einnimmt, sondern dadurch auch die Verteilung der SF im Zellkörper reguliert. Ohne die stabilisierende Funktion von NM IIB, kommt es zu einer Veränderung der SF-Dynamik (Chang und Kumar, 2015; Shutova et al., 2017), wodurch die distinkte Lokalisation der SF-Subtypen innerhalb des Zellkörpers gestört wird. Diese Effekte können wiederum zu einer unkoordinierten Zelladhäsion und Zellmigration führen.

Im Fall von U2OS Zellen ist die Zelladhäsion durch den Verlust von NM IIB jedoch zumindest morphologisch nicht beeinträchtigt. Sowohl Fokalkontakte als auch Adhärenzkontakte zeigen typische Lokalisationsmuster und morphologische Ausprägungen, die sich nicht von WT Zellen unterscheiden (Abb. 4.9 & 4.10). Allerdings können Stabilität und Dynamik der Adhäsionen variieren, was in weiteren Experimenten untersucht werden muss. Identisch zu den subtilen Unterschieden der Aktinstruktur, kann auch der Effekt auf die Zelladhäsion subtil sein und sich eher in einer Veränderung der Adhäsionsdynamik manifestieren. Heuzé und Kollegen zeigen beispielsweise, dass NM IIB eine Rolle beim Clustering und der Aufrechterhaltung von E-Cadherin Komplexen in Adhärenzkontakten spielt (Heuze et al., 2019).

Die unkoordinierte Ausbildung von SF in NM IIB-KO Zellen wirkt sich jedoch erkennbar auf die Zellmigration, zumindest in Teilen der Zellpopulation, aus. Die Zellen migrieren in diesen Fällen effektiv um die eigene Achse und bilden teilweise lange Zellausläufer unabhängig von der Polaritätsachse (Abb. 4.11C). Ein solches Migrationsverhalten könnte durch eine zeitliche Fehlkoordination von Aktinpolymerisation und Zellkörper-Retraktion erklärt werden. Wie in den Arbeiten von Vicente-Manzanares und Kollegen gezeigt wurde, stabilisiert NM IIB die Morphologie des Zellzentrums und wirkt der Ausbildung von Zellausläufern an der Migrationsfront entgegen (Vicente-Manzanares et al., 2008; Vicente-Manzanares et al., 2011; Vicente-Manzanares et al., 2007). U2OS NM IIB-KO Zellen bilden teilweise unverhältnismäßig viele vSF zwischen Zellzentrum und Lamellum, wodurch die SF-

Subtypen sind nicht mehr differenziert lokalisiert sind und das Verhältnis von definiertem Zellzentrum und Ausbildung von Zellausläufern an der Migrationsfront gestört sein kann. Da der Verlust von NM IIB zu einer überhöhten Dynamik der SF führt (Shutova et al., 2017), könnte sich der Zellkörper bereits verkürzen, bevor sich an der Migrationsfront ausreichend neue Kontakte verankert haben. Ein solches Szenario würde die kreisenden Bewegungen der Zellen erklären, da die Retraktion des Zellkörpers von der Ausbildung der Migrationsfront entkoppelt ist.

➤ **Der Verlust von NM IIC hat keine Auswirkung auf die Zellmorphologie, SF-Bildung, Zelladhäsion oder Zellmigration**

Der Verlust von NM IIC führte in keiner der durchgeführten Analysen zu einem erkennbaren Unterschied gegenüber WT Zellen. NM IIC-KO Zellen bilden einen polarisierten Phänotyp aus, in welchem alle SF-Subtypen vorkommen. Die SF-Subtypen zeigen dabei die charakteristischen Ausprägungen und Lokalisationsmuster. Es wurden keine sonstigen, auffälligen Aktinstrukturen entdeckt. Die morphologische Ausprägung der Zelladhäsion war weder im Fall von Fokalkontakten, noch bei Adhärenzkontakten auffällig. Auch die Zellmigration läuft nach dem klassischen Muster ab, wobei die Zellgröße und -struktur konstant bleibt. Weitere Experimente auf strukturierten Substraten zeigten ebenfalls keinerlei Unterschiede gegenüber WT Zellen. Einzig das Lokalisationsmuster von NM IIC unterscheidet sich deutlich von den anderen Paralogen (Abb. 4.5&4.6). Die Funktion von NM IIC ist an diesem Punkt jedoch vollkommen unklar und kann aufgrund der spärlichen Literatur nur spekulativ angerissen werden. Über mögliche Funktionen von NM IIC wird deshalb in einem separaten Abschnitt am Ende des Kapitels diskutiert.

5.3 Komplementäre Effekte von NM IIA & NM IIB regulieren die SF-Struktur

Setzt man die Auswirkungen des NM IIA-KO und NM IIB-KO auf die SF-Struktur in Relation zueinander, ergibt sich ein Bild von komplementären Effekten. Wird in den Zellen kein NM IIA mehr exprimiert, führt dies zum Verlust aller dSF und transversalen Arcs sowie einer Reduktion der vSF und ihrer Intensität. Wird hingegen kein NM IIB mehr exprimiert, sind zwar alle SF-Subtypen nach wie vor vorhanden, allerdings ist ihre morphologische Ausprägung und intrazelluläre Lokalisation gestört. Die Überexpression von NM IIB in NM IIA-KO Zellen induziert zwar die Bildung einiger dSF und transversaler Arcs (Abb. A1). Quantität, Anordnung und Struktur der SF erreichen jedoch unabhängig von der NM IIB-Expressionsstärke nicht das WT-Level. Die Überexpression von NM IIA in U2OS NM IIB-KO Zellen führt hingegen zur Bildung zahlreicher, stark gebündelter Aktinfasern, die in einer noch chaotischeren Anordnung vorliegen, als dies bei NM IIB-KO Zellen ohnehin der Fall ist. Die meisten SF entsprechen dabei vSF, dSF und transversale Arcs sind kaum mehr vorhanden (Abb. A1). Daraus lässt sich ableiten, dass kooperative Effekte zwischen NM IIA und NM IIB die Struktur, Organisation und Lokalisation der SF in nicht-muskulären Zellen regulieren. Nicht nur die Expression von NM IIA und NM IIB, sondern auch die Balance beider Paraloge zueinander, ist für die Strukturierung und

Anordnung der SF essentiell. Diese These wird durch eine aktuelle Publikation unterstützt (Shutova et al., 2017). Die exogene Expression von NM IIA in COS-7 Zellen führt zur Bildung von dSF und transversalen Arcs. Da die Expression von NM IIA in COS-7 Zellen keiner Überexpression entspricht, sondern effektiv eine WT-Situation widerspiegelt, kommt es hier zur Ausbildung eines strukturierten und geordneten SF-Systems mit allen SF-Subtypen. Die Überexpression von NM IIB führt hingegen nur zur verstärkten Bildung von vSF, kann jedoch die Funktion von NM IIA nicht kompensieren.

5.3.1 NM IIA beeinflusst die Spannung, NM IIB die Elastizität von SF

Um die komplementären Effekte von NM IIA und NM IIB quantitativ zu untermauern, wurden die Phänotypen und Aktinstrukturen von NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen auf mikrostrukturierten 2D-Substraten analysiert. Zur Quantifizierung wurden die Kreisradien peripherer Aktinbögen in Relation zur Spanndistanz der SF vermessen, um anschließend den Einfluss der verschiedenen NM II-KO Zelllinien auf die Spannung und Elastizität der SF anhand des TEM zu beschreiben (Abb. 4.13). Die Abhängigkeit der Kreisbögen von der Spanndistanz kann durch das TEM erklärt werden, indem ein einfaches Spannungsmodell durch elastische Komponenten erweitert wurde. Das einfachste Modell ist ein kontraktiles Kabelnetzwerk, das jedoch nicht vollelastisch ist, sondern bei Kompression keinen Verformungswiderstand zeigt (Bischofs et al., 2008; Guthardt Torres et al., 2012). U2OS WT Zellen überspannen passivierte Substratbereiche mit Hilfe von peripheren Aktinbögen und zeigen dabei als Referenz eine positive Korrelation zwischen R und d , größere Spanndistanzen führen auch im Fall von U2OS Zellen zur Ausbildung größerer Kreisradien.

NM IIA-KO Zellen zeigen einen klar abweichenden Phänotyp. Die peripheren Aktinbögen sind oft stark nach innen gekrümmt, was sich in kleinen Kreisradien und kurzen Spanndistanzen widerspiegelt. Passivierte Substratflächen werden weniger stark überspannt und der Zellkörper breitet sich verstärkt durch Aktinpolymerisation entlang der Substratkonturen aus. Die Steigung der Radien in Relation zur Spanndistanz fällt dadurch niedriger aus (Vgl. Abb. 4.14B). In Relation zum TEM deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass durch den Verlust von NM IIA vor allem die Linienspannung verringert wird. Durch geringe Spannungen werden kleine Kreisbögen erwartet und umgekehrt. Der spannungsabhängige Kontrollweg des Modells wurde durch pharmakologische Inhibition der Aktomyosin-Kontraktilität überprüft, auch hier zeigen sich kleinere Bögen (Bischofs et al., 2008). Trotzdem ist in NM IIA-KO Zellen ein positiver Anstieg von R mit zunehmender d vorhanden. Auch eine Überexpression von NM IIB in NM IIA-KO Zellen verändert dieses Verhältnis nicht (Abb. A2). Die peripheren Aktinbögen sind regelmäßig vorhanden und entsprechen durch ihre Verankerung an Fokalkontakten vSF (Naumanen et al., 2008; Small et al., 1998). Sie entsprechen damit dem einzigen SF-Subtyp, der in NM IIA-KO Zellen noch vorhanden ist, interne SF werden hingegen kaum und nur schwach ausgebildet. Der positive Anstieg von R und d in NM IIA-KO Zellen deutet darauf hin, dass Elastizität einen entscheidenden Einfluss auf die Korrelation von R und d ausübt. Elastizität ermöglicht eine reversible Deformation der SF, wodurch die Faser-Architektur während der intrazellulären Kraftübertragung erhalten bleibt (Oakes et al., 2017). NM IIA-KO Zellen exprimieren nach wie vor NM IIB, welches an den peripheren Aktinbögen lokalisiert und eine geringe Dynamik aufweist. NM IIB besitzt somit prinzipiell

die kinetischen Eigenschaften, nicht nur als kontraktile Motor, sondern auch als elastisches Element zu fungieren (Billington et al., 2013; Heissler und Sellers, 2016; Kovacs et al., 2007; Nagy et al., 2013).

Die quantitative Analyse der NM IIB-KO Zellen zeigt, dass der Knockout von NM IIB mit dem Verlust der positiven Korrelation zwischen R und d einhergeht. Die verbleibende NM IIA-Aktivität der NM IIB-KO Zellen ermöglicht zwar die Bildung von peripheren Aktinbögen und internen SF, zahlreiche periphere Bögen weisen jedoch eine sehr geringe Krümmung auf, sodass die Fasern fast gerade erscheinen. Quantitativ reflektieren sich diese Ergebnisse durch viele Kreisbögen mit sehr großen Radien, welche unabhängig von der Spanndistanz auftreten. Der durchschnittliche Kreisradius ist bei NM IIB-KO Zellen signifikant größer, als bei NM IIA-KO Zellen. Die großen Radien weisen auf eine hohe Linienspannung in NM IIB-KO Zellen hin, da die phänotypische Ausprägung der Zellen ausschließlich über den Spannungs-Kontrollweg gesteuert wird. Die breite Streuung der Datenpunkte in Abbildung 4.14C verdeutlicht jedoch, dass nicht alle peripheren Bögen eine hohe Linienspannung aufbauen. Vielmehr reflektiert die gestreute Punktwolke eine Mischung aus Fasern, die verschiedene Linienspannungen ausprägen, wodurch keine klare Steigung mehr abgeleitet werden kann. Auch die Überexpression von NM IIA in NM IIB-KO Zellen ist nicht in der Lage die positive Korrelation von R und d wiederherzustellen (Abb. A2). Wann die Fasern eine starke Linienspannung aufweisen und wann nicht, wird anhand dieser Experimente nicht deutlich. Es wurde in einer Arbeit von Baird und Kollegen gezeigt, dass pulsierende Kontraktionen eine intrinsische Eigenschaft von NM IIA sind (Baird et al., 2017). Je nach Ausprägung der NM IIA-Kontraktilität im Moment der Zellfixierung kann es daher zu starken oder weniger starken Linienspannungen kommen, wodurch die heterogene Ausprägung der NM IIB-KO Phänotypen erklärt werden könnte. Zeitrafferaufnahmen von NM IIB-KO Zellen auf strukturierten Substraten können hier mehr Aufschluss bringen. Diese Ergebnisse untermauern quantitativ, dass NM IIB eine regulierende Funktion im Aktomyosin-System einnimmt. Dabei entspricht die Rolle von NM IIB weniger der eines kontraktile Motors, als der eines elastischen, sensorischen Elements, welche die kontraktile Kräfte, die durch NM IIA aufgebaut werden, ausbalanciert. Diese Interpretation spiegelt auch die aufrechterhaltende Funktion von NM IIB bei der Stabilisierung und Strukturierung bei der SF Bildung wider (Vicente-Manzanares et al., 2008). Die Vermittlung von elastischen Eigenschaften in SF wurde bisher vor allem passiven quervernetzenden Proteinen wie α -Aktinin oder Komponenten der Fokalkontakte wie Zyxin zugeschrieben (Kassianidou und Kumar, 2015; Livne und Geiger, 2016; Oakes et al., 2017). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse erweitern das Repertoire möglicher elastischer Komponenten in SF um NM IIB als aktive Komponente.

Der Vergleich von NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen anhand des TEM verdeutlicht, dass die SF-Struktur und phänotypische Ausprägung der Zellen durch komplementäre Effekte von NM IIA und NM IIB im Aktomyosin-System gesteuert werden. NM IIA beeinflusst die Kontraktilität in den SF über den Spannungs-Kontrollweg, während NM IIB über den Elastizitäts-Kontrollweg die Kontraktilität der SF ausbalanciert. Die Beeinflussung der Phänotypen durch die unterschiedlichen TEM-Kontrollwege ist in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt.

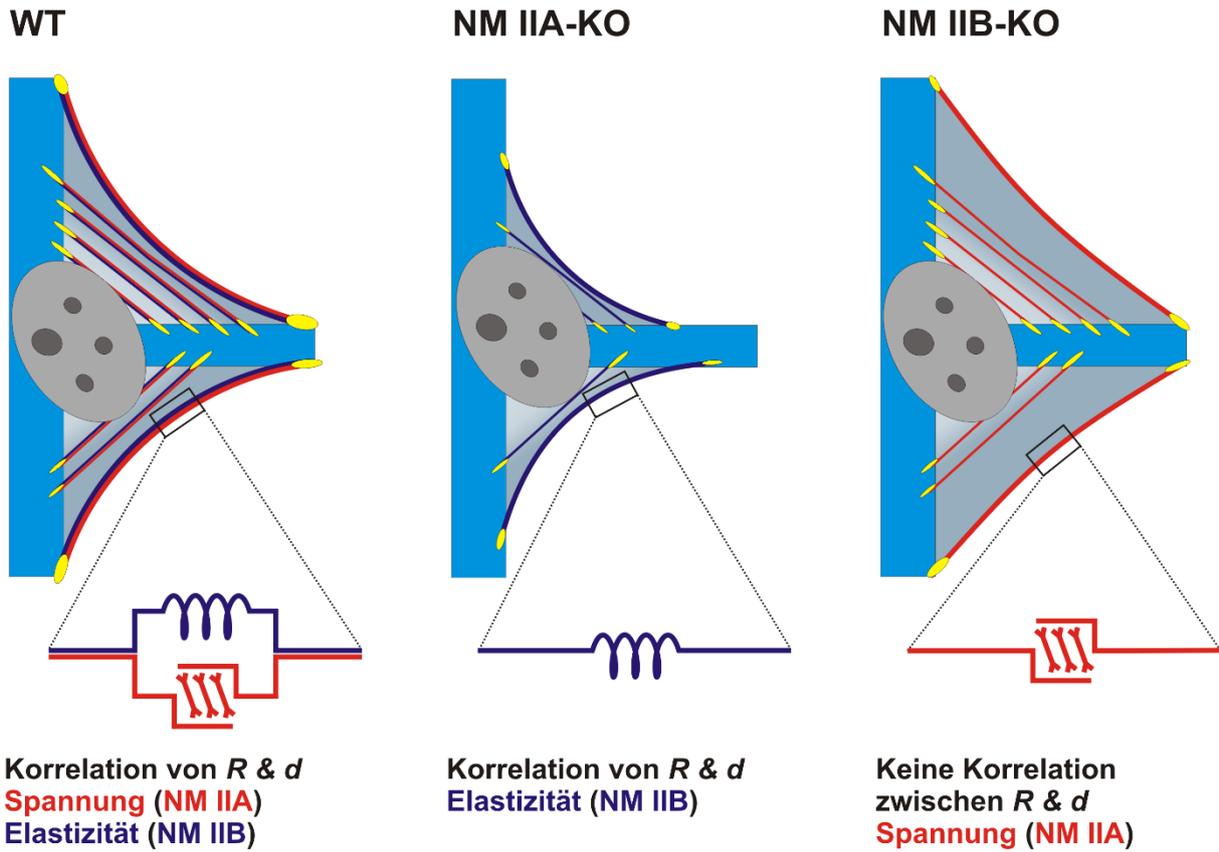


Abbildung 5.1: Einfluss von NM IIA und NM IIB auf Spannung und Elastizität im TEM.

Experimente auf strukturierten Substraten verdeutlichen, dass NM IIA den zellulären Phänotyp hauptsächlich über den Spannungs-Kontrollweg reguliert, während NM IIB hauptsächlich den Elastizitäts-Kontrollweg steuert. WT Zellen exprimieren beide Isoformen, weshalb durch Elastizität eine positive Korrelation von R und d zustande kommt und die Zelle in der Lage ist, durch Spannung passivierte Substratflächen zu überbrücken. NM IIA-KO Zellen weisen aufgrund der elastischen Eigenschaften von NM IIB eine Korrelation zwischen R und d auf, sind jedoch nicht in der Lage, größere passivierte Flächen zu überbrücken, da die Spannung durch den Verlust von NM IIA fehlt. NM IIB-KO Zellen sind in der Lage größere passivierte Flächen zu überbrücken, weisen jedoch keine positive Korrelation zwischen R und d mehr auf, da der Phänotyp ausschließlich über die Spannung in Form der NM IIA-Kontraktilität definiert wird.

5.3.2 Die Überassemblierung von NM IIA führt zum Verlust der positiven Korrelation von R und d in Anwesenheit von NM IIB

Wie bereits im vorausgegangenen Abschnitt beschrieben, deutet die Ausbildung großer Kreisbögen in NM IIB-KO Zellen auf eine Zunahme der Linienspannung in den peripheren Aktinbögen hin, welche aufgrund verminderter Elastizität unabhängig von der Spanndistanz ist. Während die Entkopplung von der Spanndistanz durch den Verlust von NM IIB erklärt werden kann, wird daraus jedoch nicht deutlich, warum die Linienspannung in einem Großteil der Aktinbögen zunimmt. Eine mögliche Erklärung ist, dass die verstärkte Linienspannung aus einer verstärkten NM IIA-Aktivität in NM IIB-KO Zellen resultiert. Wenn NM IIB nicht exprimiert wird, sind zusätzliche Bindestellen für NM IIA entlang der

Aktinfasern verfügbar. Außerdem kann die Motoraktivität sowie die Verweildauer der Hexamere in den Filamenten durch Phosphorylierungen der RLC und NMHC IIA angepasst werden (Vgl. Abschnitt 1.2.4) (Dulyaninova und Bresnick, 2013; Dulyaninova et al., 2007; Dulyaninova et al., 2005). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Auswirkung einer erhöhten NM IIA-Aktivität auf die Linienspannung bzw. auf die Kreisradien experimentell untersucht. Breckenridge und Kollegen beschreiben in einer Publikation die Auswirkungen diverser Mutationen in der NMHC IIA, welche alle zu einer Überassemblierung der NM IIA Hexamere in den Filamenten führen (Breckenridge et al., 2009). Eine genaue Beschreibung der einzelnen Mutanten ist in Abbildung 4.16 zu finden. Die Rekonstitution von NM IIA in NM IIA-KO Zellen mittels dieser Mutanten ermöglicht eine spezifische Analyse der Kreisradien in Abhängigkeit von gesteigerter NM IIA-Aktivität, ohne dass endogenes und exogenes NM IIA interferieren. In diesem Fall ist zusätzlich NM IIB in den Zellen vorhanden aber der Einfluss von NM IIA wird konstitutiv erhöht. Da in NM IIA-KO Zellen die positive Korrelation von R und d durch NM IIB aufrechterhalten wird, kann der Einfluss gesteigerter NM IIA-Aktivität auf die Linienspannung anhand der Abweichungen in den Streudiagrammen abgeschätzt werden.

Anhand dieser Experimente wurde deutlich, dass eine erhöhte Aktivität von NM IIA zur Ausbildung einer hohen Linienspannung, auch in Anwesenheit von NM IIB, führen kann (Abb. 4.17 & 4.18). Phosphorylierungen der c-terminalen Region von NM IIA führen zur Disassemblierung der Filamente (Dulyaninova und Bresnick, 2013; Vicente-Manzanares et al., 2009b). Blockierungen der c-terminalen Phosphorylierung führen dementsprechend zu einer niedrigeren *Turnover*-Rate von NM IIA (Breckenridge et al., 2009). Die NM IIA-Filamente sind dadurch in der Lage, eine größere Linienspannung in den Aktinbögen aufzubauen, da der Motorzyklus über einen längeren Zeitraum konstant ablaufen kann. Es bilden sich in diesem Fall häufig Aktinbögen mit auffällig großen Kreisradien. Dieser Effekt tritt bereits ein, wenn nur eine der beiden c-terminalen Phosphorylierungen geblockt wird (NMHC IIA- Δ NHT), eine Blockierung beider Phosphorylierungsstellen (NMHC IIA-3xA) verstärkt die Ausbildung großer Kreisradien zusätzlich. Die konstitutive Aktivierung der NM IIA-Hexamere durch Entfernung des RLC-Bindemotivs (NMHC IIA- Δ IQ2) führt hingegen nicht zur Ausbildung größerer Kreisradien. Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass nicht die verfügbare Menge der NM IIA-Hexamere, sondern ihre Aktivität im Filament ausschlaggebend für die Bildung einer hohen Linienspannung ist. FRAP-Analysen zeigen, dass NM IIA schneller in den Aktinfasern assembliert (Abbildung 4.15), was in einem präferentiellen Aufbau von Spannung resultiert. Wenn die Bindestellen entlang der Aktinfasern bereits durch NM IIA belegt sind und die Filamente eine geringere *Turnover*-Rate aufweisen, können möglicherweise weniger NM IIB-Hexamere co-assemblieren, um die Spannung auszubalancieren. Zieht man in Betracht, dass die Aktivität von NM IIA durch individuelle Anpassung der Disassemblierungskinetik reguliert werden kann, lässt sich dadurch sowohl die Entstehung hoher Linienspannung, als auch die variable Größe der Kreisradien in NM IIB-KO Zellen, erklären. Einerseits kann eine Erhöhung der NM IIA-Aktivität zur Ausbildung großer Kreisradien in NM IIB-KO Zellen führen. Wenn jedoch die Aktivität der Filamente individuell reguliert wird (Baird et al., 2017), kann sich das in der Bildung von Aktinbögen unterschiedlicher Krümmung widerspiegeln, was die breite Streuung der Datenpunkte in Abbildung 4.13C reflektiert.

Zusammengefasst zeigt sich durch diese Ergebnisse erneut, dass nicht nur die NM II-Isoformen selbst, sondern auch ihr relatives Verhältnis zueinander sowie die individuelle Aktivität die Ausprägung des zellulären Phänotyps steuern. Die Regulierung der Assemblierung und Disassemblierung der Filamente anhand c-terminaler Phosphorylierung ermöglicht dabei eine präzise Steuerung der Aktomyosin-Kontraktilität in verschiedenen Regionen der Zelle. Die c-terminale Phosphorylierung der NMHC IIA wurde in diversen Arbeiten untersucht und charakterisiert, über die c-terminale Phosphorylierung von NMHC IIB ist bisher jedoch weniger bekannt. Strukturanalysen zeigen, dass NMHC IIB ein noch wesentlich komplexeres Phosphorylierungsmuster aufweist (Vicente-Manzanares et al., 2009b). Zukünftige Arbeiten, die gezielt die Phosphorylierung der NMHC IIB untersuchen, können mehr Aufschluss darüber geben, inwiefern Spannung und Elastizität durch die Aktivität von NM IIB reguliert werden können.

5.3.3 Regulierung der SF-Struktur durch kooperative Effekte

Ein Mechanismus für die Strukturierung der SF anhand kooperativer Effekte von NM IIA und NM IIB, kann durch die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften der Isoformen abgeleitet werden. NM IIA Motoren besitzen eine kurze *duty ratio* mit geringer Abhängigkeit von mechanischer Belastung und eine hohe ATPase Aktivität, wodurch schnell Zugkräfte auf Aktinfasern ausgeübt werden können (Billington et al., 2013). NM IIA Filamente weisen zudem eine hohe *Turnover*-Rate auf (Abb. 4.15) (Sandquist et al., 2006; Vicente-Manzanares et al., 2008) und sind homogen im Zellkörper verteilt (Abb. 4.5). Diese Eigenschaften ermöglichen eine schnelle Remodellierung und Umstrukturierung der dSF und transversale Arcs in der hoch-dynamischen Zellfront durch NM IIA-vermittelte Kontraktilität. NM IIB Motoren besitzen hingegen eine hohe *duty ratio*, welche in Abhängigkeit von mechanischer Belastung zusätzlich gesteigert werden kann (Heissler und Sellers, 2016; Kovacs et al., 2007; Nagy et al., 2013). Zudem weisen NM IIB Filamente eine geringere *Turnover*-Rate als NM IIA auf (Abb. 4.15). Durch diese Eigenschaften ist NM IIB weniger effizient in der Umstrukturierung von Aktinfasern, kann jedoch stabilisierend auf die SF wirken, indem es durch quervernetzende Eigenschaften die bereits aufgebaute Spannung aufrechterhält (Wang et al., 2003). Aufgrund der verstärkten Lokalisation von NM IIB im Zellzentrum (Abb. 4.5) betrifft dies insbesondere vSF. Die Kooperation von NM IIA und NM IIB spiegelt sich somit in einer Initiationsfunktion von NM IIA und einer Regulierungsfunktion von NM IIB wider. NM IIA kann alle SF-Subtypen induzieren und aufrechterhalten, eine Überexpression von NM IIA in Abwesenheit von NM IIB führt jedoch zu einer übermäßigen Bildung von SF. NM IIB ermöglicht aufgrund des langsamen Motorzyklus hingegen einen regulierten Aufbau der SF. Ohne NM IIB kann es durch ausschließliche NM IIA Aktivität zur gesteigerten Zusammenlagerung von SF und zur Unordnung im Aktinzytoskelett kommen (Abb. A1). Eine ausschließliche NM IIB-Aktivität ist hingegen aufgrund der geringen Motordynamik nicht ausreichend, um die Organisation und Strukturierung aller SF zu gewährleisten, wodurch effektiv wenige, statische vSF verbleiben.

Anhand dieser Hypothese lassen sich präzise die Beobachtungen der Zellmigrationsstudien erklären (Abb. 4.11). In NM IIA-KO Zellen entstehen häufig zahlreiche Zellausläufer und es bilden sich teilweise mehrere Lamellipodien gleichzeitig. Ohne die dynamischen Remodellierungen und Kontraktionen von

SF im Lamellum kann eine durchgängige Migrationsfront nicht aufrechterhalten werden, da keine Gegenkraft der Aktinpolymerisation entgegenwirkt (Cai et al., 2010; Yam et al., 2007). Zusätzlich fehlt die Kontraktilität im Zellzentrum, um den Zellkörper zu verkürzen, wodurch lange Zellausläufer am *trailing edge* der Zelle zurückbleiben. In Anwesenheit von NM IIA kann NM IIB hingegen die Dynamik der bereits gebildeten SF regulieren und somit zu einer koordinierten Zellbewegung beitragen. Die Stabilisierung des Zellzentrums durch NM IIB zeigt sich in der geringeren Dynamik und hohen mechanischen Vorbelastung von zentralen vSF (Chang und Kumar, 2015; Lee et al., 2018; Vicente-Manzanares et al., 2008). Ohne NM IIB ist die Dynamik dieser zentralen Fasern deutlich höher (Shutova et al., 2017). Wenn die Stabilisierung der SF durch NM IIB fehlt, ist die Vorwärtsbewegung und die Retraktion des Zellkörpers nicht mehr koordiniert und der Zellkörper zieht sich schneller zusammen, als sich neue stabilisierende Zelladhäsionen an der Migrationsfront bilden können. Auch hierbei wird deutlich, dass die Prozesse während der Zellmigration wie beispielsweise die Aufrechterhaltung der Polarität, nicht durch einzelne NM II-Isoformen reguliert werden, sondern ein optimales Verhältnis und Zusammenspiel von NM IIA und NM IIB erforderlich ist.

5.4 NM IIA initiiert das Aktomyosin-System

Durch ihre unterschiedlichen Motordynamiken eignen sich die verschiedenen NM II-Isoformen besser für die Erzeugung von Kontraktilität (NM IIA) oder die Aufrechterhaltung von Spannung (NM IIB) (Billington et al., 2013; Heissler und Sellers, 2016; Kovacs et al., 2007; Wang et al., 2003). Der Knockdown von NM IIA führt zum nahezu kompletten Verlust der zellulären Kontraktilität, während der Verlust von NM IIB nur zu einer marginalen bis gar keiner Reduktion der Kontraktilität führt (Cai et al., 2006; Lo et al., 2004; Shutova et al., 2017; Thomas et al., 2015). Anhand dieser Beobachtungen erscheint eine zeitlich-regulierte Aktivierung von NM IIA (Spannungsaufbau) und NM IIB (Elastizitätskontrolle) sinnvoll. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der Aufbau der Aktomyosin-Kontraktilität nicht nur anhand stochastischer Co-Polymerisation von NM IIA und NM IIB stattfindet, sondern durch eine präferenzielle Aktivierung von NM IIA initiiert wird.

5.4.1 Bildung von NM IIA-Pionierfilamenten durch verstärkte Aktivierung.

Die Phosphorylierung der RLC dient als Marker für aktive NM II-Hexamere. Da die RLC-Bindung an die unterschiedlichen NMHC IIs Isoform-unspezifisch stattfindet, repräsentiert das pRLC-Signal aktive NM IIA- und NM IIB-Hexamere. Interessanterweise zeigen immunhistochemische Färbungen, dass der Knockout von NM IIA mit dem nahezu kompletten Verlust der pRLC-Intensität einhergeht (Abb. 4.19C-E). Lediglich bei sehr starker Anhebung des Kontrastes zeigten sich vereinzelte, schwache Signale entlang der verbleibenden SF. Der Verlust von NM IIB führt hingegen zu keiner Reduktion des pRLC-Signals (Abb. 4.19A&B). Obwohl der Verlust von NM IIB zu einer Reduktion der NM II-Gesamtpopulation führt, ist kein Unterschied bei der Aktivität der Gesamtpopulation vorhanden (Abb. 4.19E). Diese Resultate lassen darauf schließen, dass die Initiierung der Aktomyosin-Kontraktilität fast

ausschließlich über NM IIA gesteuert wird. Diverse Experimente und Kontrollen untermauern diese Interpretation. Die Rekonstitution von NM IIA in NM IIA-KO Zellen führt zur Wiederherstellung des pRLC Signals (Abb. 4.20). Die pRLC-Intensität steigt dabei linear mit der NM IIA-Expression, was auf eine strikte positive Korrelation zwischen der absoluten Menge von NM IIA und der Aktivierung von NM II-Hexameren hindeutet. Die Expression von NMHC IIA- Δ IQ2, welche keine RLC binden kann, führt zur Bildung von NM IIA-Filamenten, zeigt jedoch keinen Anstieg der pRLC-Intensität, unabhängig von der Expressionsstärke. Durch die Expression von NMHC IIA- Δ ACD können zwar keine bipolaren NM IIA-Filamente aufgebaut werden, jedoch orientiert sich die Lokalisation des pRLC Signals klar an der homogenen Verteilung von NMHC IIA- Δ ACD. Dass diese Effekte eindeutig auf den Verlust der NMHC IIA zurückzuführen sind, zeigt sich auch daran, dass die Expression einer phosphomimetischen RLC nicht in der Lage ist, die Aktivierung der NM II-Hexamere zu retten.

Diese Ergebnisse stehen in klarem Kontrast zu der Annahme, dass die Aktomyosin-Kontraktilität durch stochastische Co-Polymerisation von NM IIA und NM IIB gleichermaßen initiiert wird (Shutova et al., 2017; Shutova et al., 2014). Vielmehr zeigt sich hier, dass eine präferenzielle Aktivierung von NM IIA zur Initiierung der Aktomyosin-Kontraktilität führt. Ausgehend von dieser Annahme stellt sich die Frage, wie eine differenzielle Aktivierung von NM IIA gegenüber NM IIB auf molekularer Ebene ablaufen kann? Eine ausschließliche Aktivierung von NM IIA erscheint unwahrscheinlich, da in allen drei NMHC IIs ein sehr konserviertes IQ-Bindemotiv vorhanden ist, welches für die Bindung der RLC und damit für die Regulation der Holoenzym-Aktivität zuständig ist (Abb. A3). Die Überexpression von NM IIB in NM IIA-KO Zellen zeigt zudem, dass ein Anstieg der pRLC Intensität mit zunehmender NM IIB-Expression vorhanden ist, wobei die Steigung jedoch sehr moderat ausfällt (Abb. A3). Daraus wird ersichtlich, dass NM IIB durch die Phosphorylierung der RLC aktiviert werden kann, was auch mit Strukturanalysen aus *in vitro* Experimenten übereinstimmt (Billington et al., 2013). Auch macht eine fehlende Regulierung der NM IIB-Aktivität über die RLC-Phosphorylierung insofern wenig Sinn, da NM IIB in einem solchen Szenario permanent in der assemblierungskompetenten 6S-Konformation vorliegen würde. Demnach wäre NM IIB eher verstärkt in der Lage, zu Filamenten zu assemblieren.

Durch eine Vielzahl von verschiedenen Kinasen und Phosphatasen, welche die Phosphorylierung der RLC regulieren können, ergeben sich vielfältige Möglichkeiten für eine differenzielle Aktivierung oder Blockierung der NM II-Isoformen (Vicente-Manzanares et al., 2009b). Mehrere Publikationen postulieren eine räumliche Trennung verschiedener Kinasen, wodurch intrazellulär unterschiedliche Aktivierungsmuster zustande kommen können (Beach et al., 2017; Katoh et al., 2001; Totsukawa et al., 2000). Eine weitere Hypothese besteht darin, dass einzelne Kinasen oder Phosphatasen verstärkt oder exklusiv die RLCs an bestimmten NM II-Isoformen phosphorylieren oder dephosphorylieren (Chang und Kumar, 2015; Sandquist et al., 2006). Vor allem ROCK wird eine tragende Rolle bei der Aktivierung und Regulierung der NM II-Isoformen zugesprochen (Katoh et al., 2001; Roy et al., 2016; Sandquist et al., 2006). ROCK ist dabei in der Lage entweder die RLC direkt zu phosphorylieren oder deren Phosphorylierung durch andere Kinasen zu verstärken, indem es die MLC-Phosphatase Aktivität blockiert (Amano et al., 1996; Amano et al., 2010). Durch diese bidirektionale Funktion, die es erlaubt sowohl Aktivierung als auch Blockierung der NM II-Hexamere zu steuern, ist ROCK ein interessanter

Kandidat für die differenzielle Regulation von NM IIA und NM IIB. Zwei unabhängige Publikationen postulieren, dass ROCK präferenziell die RLC an der NMHC IIA phosphoryliert (Chang und Kumar, 2015; Sandquist et al., 2006) und unterstützen dadurch die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, dass NM IIA präferenziell aktiviert wird. Die präferenzielle Assoziation von ROCK und NM IIA könnte dabei indirekt zu einer Blockierung von NM IIB führen. Wenn ROCK verstärkt mit NM IIA assoziiert ist, kann die MLC-Phosphatase Aktivität an NM IIB in geringerem Maße durch ROCK blockiert werden, wodurch sich eine Aktivierung von NM IIB zumindest verzögern würde. Auf diese Weise könnte anhand eines Signalweges gleichzeitig die Aktivierung von NM IIA verstärkt und die Aktivierung von NM IIB blockiert werden.

Zusätzlich zu einer präferenziellen Phosphorylierung der RLC an der NMHC IIA besteht die Möglichkeit, dass wesentlich mehr NMHC IIA als NMHC IIB in den Zellen exprimiert wird, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer bevorzugten Aktivierung von NM IIA höher wäre. In einer Arbeit von Sandquist wurde versucht, das Verhältnis von NM IIA zu NM IIB anhand von Western Blot Analysen und Standardisierung durch Bradford-Tests zu quantifizieren. Die Resultate ergaben, dass in den vier untersuchten Zelllinien jeweils deutlich mehr NMHC IIA als NMHC IIB vorhanden war (Sandquist, 2008). Quantitative Analysen der Proteinverhältnisse mittels Fluoreszenzkorrelationspektroskopie können hier exaktere Ergebnisse liefern und Aufschluss über die Wahrscheinlichkeit einer Phosphorylierung der NMHC IIA bringen.

5.4.2 Bildung von heterotypischen NM IIA/NM IIB Filamenten.

Anschließend an die Hypothese einer präferenziellen Aktivierung der Aktomyosin-Kontraktilität durch NM IIA stellt sich die Frage, wie in einem solchen Szenario die Assemblierung der NM IIB-Filamente reguliert wird? Auch die Lokalisation von NM IIB ist in U2OS NM IIA-KO Zellen drastisch verändert (Abb. 4.19C&D). Insgesamt sind in U2OS NM IIA-KO Zellen wesentlich weniger NM IIB-Filamente vorhanden, als dies bei WT Zellen der Fall ist. Die verbleibenden NM IIB-Filamente sind dabei an den wenigen SF der Zelle aufgereiht. Ähnliche Ergebnisse erzielen auch Shutova und Kollegen in REF-52 Fibroblasten (Shutova et al., 2017).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Assemblierung und Lokalisation der NM IIB Filamente räumlich an NM IIA gekoppelt ist. Die Rekonstitution von NM IIA in NM IIA-KO Zellen führt zur Umstrukturierung der NM IIB-Lokalisation (Abb. 4.21) (Baulesch, 2019). Die logische Schlussfolgerung daraus ist, dass NM IIA und NM IIB co-assemblieren müssen, um eine Beeinflussung der NM IIB Lokalisation durch NM IIA erklären zu können. Entgegen der Meinung, dass die Mehrheit der NM II-Filamente aus homotypischen NM IIA- und NM IIB-Filamenten besteht, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass alle NM II-Filamente in ihrer Lebenszeit den Status eines heterotypischen NM IIA/NM IIB-Filaments zumindest zeitweise durchlaufen. Um diese Hypothese zu verdeutlichen, wurden mittels SIM hochaufgelöste fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von heterotypischen NM IIA/NM IIB-Filamenten quantitativ analysiert (Abb. 4.21). Die Rekonstitution eines c-terminal getaggten NMHC IIA in NM IIA-KO Zellen, kombiniert mit einer c-terminalen immunhistochemischen Markierung des

endogenen NM IIB, ermöglicht die Analyse der heterotypischen Filamente durch die Messung der Kolo-kalisation. Es wurden jeweils an der Zellfront, im Zellzentrum und am Zellende Filamente auf ihre Kolo-kalisation zwischen NM IIA und NM IIB überprüft. An der Zellfront, wo neue Filamente assemblieren, bilden sich kleine Cluster, welche ausschließlich aus NM IIA bestehen. Erst mit zunehmender Filamentgröße und Abstand von der Migrationsfront, co-assemblieren NM IIB Hexamere in das NM IIA-Pionierfilament. Im Zellzentrum ist schließlich in fast allen Filamenten eine Balance aus NM IIA und NM IIB vorhanden, homotypische NM IIA oder NM IIB Filamente wurden deutlich seltener visualisiert. Die Bildung von heterotypischen Filamenten ist nicht auf motile Zellen beschränkt, auch in statischen, nicht polarisierten Zellen sind fast alle Filamente heterotypischer Natur (Vgl. Abb. 4.21C). Des Weiteren sind auch alle NMHC IIA-Mutanten, mit Ausnahme von NMHC IIA- Δ ACD dazu in der Lage, heterotypische Filamente zu induzieren (Abb. A4), was darauf hindeutet, dass die Initiation der heterotypischen Filamente unabhängig von der Assemblierungs- und Disassemblierungskinetik von NM IIA stattfindet. Im Gegensatz zur Lokalisation deutet jedoch nichts darauf hin, dass die Expression von NM IIA Einfluss auf die Regulation von NM IIB ausübt. Expressionsstärke und die c-terminale Phosphorylierung von NM IIA haben keinen Einfluss auf die Intensität von NM IIB in heterotypischen Filamenten (Abb. 4.21D und A4). Die Disassemblierung der NM IIA- oder NM IIB-Hexamere wird über die c-terminalen Phosphorylierungsmuster der HCs gesteuert und ist demnach ein Isoform-spezifischer Prozess. Ein Austausch des c-terminalen ACD-Motivs zeigt, dass sich die Lokalisationsmuster von NM IIA und NM IIB invertieren lassen, sobald der c-Terminus der jeweiligen Isoform durch den des Paralogs ausgetauscht wird (Sandquist und Means, 2008). Auch wenn NM IIA einen drastischen Einfluss auf die Lokalisation von NM IIB ausübt, werden die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften der Isoformen dadurch nicht beeinflusst.

Die hier vorgestellte Hypothese steht in klarem Kontrast zu bisherigen Annahmen, die NM IIA und NM IIB als getrennte Motorproteine einstufen und eine Regulierung der NM II-Aktivität durch stochastische Selbstsortierung von NM IIA und NM IIB aufgrund der kinetischen Eigenschaften postulieren (Heissler und Manstein, 2013; Kelley et al., 1996; Kolega, 1998; Shutova et al., 2017; Shutova et al., 2014). Vielmehr zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass NM IIA und NM IIB durch direkte räumliche Interaktion gemeinsam die Dynamik und Kontraktilität des Aktomyosin-Systems steuern. Diese Hypothese wird von Ergebnissen einer Publikation gestützt, die ebenfalls eine permanente Co-Assemblierung von NM IIA und NM IIB postulieren (Shutova et al., 2017).

5.5 Spezielle Funktionen von NM IIC?

Die Funktion von NM IIC konnte im Kontext dieser Arbeit nicht geklärt werden. Der einzige Unterschied zu NM IIA und NM IIB wurde in den Lokalisationsstudien in Abb. 4.5 und 4.6 deutlich. Während die Lokalisation von NM IIA und NM IIB strikt an den SF ausgerichtet ist, wurde für NM IIC erstmals ein Myosin II-untypisches Lokalisationsmuster visualisiert. Eine Kolo-kalisation zwischen den SF und den NM IIC-Clustern ist dabei nicht zwingend vorhanden. Teilweise ist eine Aufreihung der NM IIC-Cluster entlang von einzelnen SF erkennbar, insgesamt erscheint das Lokalisationsmuster gegenüber den

anderen Paralogen jedoch ungeordnet (Abb. 4.5C). Ein ähnliches Bild ergab sich auch bei der Untersuchung der Filament-Strukturen (Abb. 4.6). Während im Fall von NM IIA und NM IIB jeweils die zu erwartende bipolare Struktur visualisiert werden konnte, zeigten sich im Fall von NM IIC erneut ein atypisches Lokalisationsmuster. Eine bipolare Anordnung der NM IIC Hexamere konnte zwar vereinzelt beobachtet werden, die Mehrheit der NM IIC-Cluster war jedoch nicht zwischen den Kopfregionen lokalisiert, sondern an einer der Kopfregionen angelagert. In einigen Fällen fehlte hingegen jegliche Assoziation mit Kopfregionen. Diese Ergebnisse widersprechen dem Bild von NM IIC als bipolares, Aktin-assoziiertes Motorprotein mit kraftausübender Funktion.

In vitro Assays zeigen, dass NM IIC Hexamere prinzipiell dazu in der Lage sind, in bipolare Filamente zu assemblieren (Billington et al., 2013; Golomb et al., 2004). Auch wurden bipolare NM IIC Filamente in sensorischen und nicht-sensorischen Epithelgeweben von Mäusen mikroskopisch nachgewiesen. Inwiefern die hier vorgestellten Ergebnisse auf eine differenzielle Funktion von NM IIC gegenüber NM IIA und NM IIB in U2OS Zellen hinweisen, muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Wie in einer betreuten Bachelorarbeit festgestellt wurde, verändert sich das Lokalisationsmuster von NM IIC in COS-7 oder U2OS NM IIA-KO Zellen gegenüber U2OS WT Zellen (Schornick, 2019). Die willkürliche Anordnung von NM IIC in U2OS WT Zellen kann daher nicht auf unspezifische Antikörperbindungen zurückgeführt werden. Allerdings deutet dieses Ergebnis auch darauf hin, dass die NM IIC Lokalisation abhängig vom Expressionsmuster der Paraloge ist. Beach und Kollegen zeigten bereits, dass die Expression von NM IIC durch die Einleitung der EMT in primären Epithelzellen unterdrückt werden kann (Beach et al., 2011). Weitere Analysen der intrazellulären Lokalisation und Minifilament-Struktur in Fibroblasten und Epithelzellen können hier mehr Aufschluss bringen.

Die langsamen kinetischen Eigenschaften könnten darauf hinweisen, dass NM IIC *in cellula* weniger eine kontraktile, als mehr eine strukturelle Rolle einnimmt (Billington et al., 2013). Die Lokalisation von NM IIC in U2OS WT Zellen entspricht zwar nicht dem klassischen Lokalisationsmuster von NM IIA oder NM IIB, jedoch ist teilweise eine spezifische Lokalisation mit Aktinfasern oder weiteren NM II-Filamenten vorhanden. Daraus könnte sich schließen lassen, dass NM IIC eine Rolle bei der strukturellen Anordnung von höher geordneten Strukturen wie Aktinbündeln oder NM II-Filamenten einnimmt. Neben der beschriebenen Anordnung von NM II-Hexameren in Minifilamenten wurde für NM IIA zusätzlich die Anordnung von mehreren Filamenten zu präzise aufgereihten Stapeln beschrieben (Fenix et al., 2016; Hu et al., 2017). Die Verkettung und Ausrichtung einzelner Filamente durch Helferproteine wie Myosin 18B wurde von Jiu und Kollegen beschrieben und experimentell untermauert (Billington et al., 2015; Jiu et al., 2019). Eine ähnliche Rolle könnte möglicherweise NM IIC in U2OS Zellen einnehmen. Eine weitere mögliche Funktion könnte NM IIC beim Aufbau der Polarität von epithelialen Geweben zugesprochen werden. NM IIC wird häufig in Epithelzellen, jedoch selten in Fibroblasten exprimiert (Schornick, 2019). In epithelialen Zellen von Mäusen wurde zudem eine verstärkte Lokalisation von NM IIC an der apikalen Seite der Zellen beobachtet (Golomb et al., 2004). Da eine asymmetrische, apikale Cortexspannung den Aufbau der Polarität in Epithelien steuert und NM IIC-Filamente im Vergleich zu NM IIA und NM IIB weniger Hexamere enthalten, könnte NM IIC eine Rolle bei der Polarisierung von Epithelien durch verstärkte Lokalisation in dichten Aktin-Netzwerken

des Cortex spielen. Da die Cortexspannung auch maßgeblich von der Dicke und Viskosität der Struktur abhängt (Chugh und Paluch, 2018), könnten die verhältnismäßig dünneren NM IIC-Filamente sowohl strukturelle als auch kontraktile Funktionen im Aktomyosin-Gürtel von Epithelien einnehmen.

Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass die Mehrzahl der Zelllinien nach aktuellem Wissensstand eher zwei als alle drei Isoformen exprimieren. Da die Expression von NM IIC in verschiedenen Zelllinien bisher jedoch nicht gut charakterisiert ist, muss sich in weiteren Studien zeigen, inwiefern die zeitgleiche Expression aller drei Isoformen einer Ausnahme oder der Regel entspricht. Aufgrund mangelnder Antikörper aus unterschiedlichen Organismen, kann zudem bisher nicht untersucht werden, ob es heterotypische Filamente gibt, die aus allen drei NM II-Isoformen bestehen. Unter den hier vorgestellten Voraussetzungen erscheint die Ausbildung von heterotypischen NM IIB/NM IIC-Filamenten unwahrscheinlich, da die komplette Maschinerie von NM IIA initiiert wird. Beach und Kollegen zeigen jedoch, dass es während der Zytokinese zur Bildung von heterotypischen NM IIA/NM IIC-Filamenten kommen kann (Beach et al., 2014). Im Zuge dieser Arbeit wurde die Bildung von heterotypischen NM IIA/NM IIC- oder NM IIB/NM IIC-Filamenten nicht analysiert. Die unübliche Lokalisation von NM IIC (Abb. 4.5 & 4.6), die bereits in Abschnitt 5.2 angesprochen wurde, deutet jedoch nicht darauf hin, dass solche Filamente in der Regelmäßigkeit vorkommen, wie es bei heterotypischen NM IIA/NM IIB-Filamenten der Fall ist. In speziellen Situationen könnten heterotypische NM IIA/NM IIC- oder NM IIB/NM IIC-Filamente dennoch verstärkt auftreten. Beispielsweise führt der Verlust von NM IIA zu einer Relokalisation von NM IIC entlang der verbleibenden SF, wodurch sich in diesem speziellen Fall heterotypische NM IIB/NM IIC-Filamente bilden könnten (Schornick, 2019).

5.6 Fazit und Modell

In dieser Arbeit wurden zwei grundlegende Fragen über den Einfluss der Aktomyosin-Kontraktilität auf die phänotypische Ausprägung der Zellen analysiert. Dabei wurden in beiden Fällen mikrostrukturierte Substrate erfolgreich als Werkzeug eingesetzt, um eine systematische, quantitative Analyse der zellulären Phänotypen und der Aktinstruktur zu realisieren. Ein Abgleich der experimentellen Daten mit physikalischen Modellen und Computersimulationen ermöglichte zudem die weitere Aufschlüsselung der Mechanismen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde der Einfluss einer dreidimensionalen Umgebung auf die zelluläre Formgebung und die Aktinstruktur untersucht. Durch die Verwendung von mikrostrukturierten 3D-Substraten mit definierten Adhäsionspunkten, wurde eine Normalisierung der Zellform erreicht und ein Vergleich der Zellformen auf analogen mikrostrukturierten 2D-Substraten ermöglicht. Dabei wurde beobachtet, dass sich in 3D analoge konkave Aktinbögen entlang der Zellkontur bilden, wie sie bereits in 2D beobachtet wurden (Bischofs et al., 2008). Die Bögen bilden sich in Abhängigkeit von der Aktomyosin-Kontraktilität und verstärken die zelluläre Kontur zwischen den Adhäsionspunkten in lateraler und teilweise in axialer Ebene. Durch quantitative Bildanalyse und mathematische

Modellierung wurde deutlich, dass die resultierenden Zellformen nicht nur durch Kontraktilität alleine, sondern auch durch elastischen Stress in den peripheren Aktinbögen erklärt werden können. Computersimulationen von 3D Zellmodellen, die auf dem 2D TEM von Bischofs und Kollegen aufbauen (Bischofs et al., 2008), zeigen eine gute Übereinstimmung mit den experimentellen Daten. Zusammengefasst zeigt sich dadurch, dass Zellformen in 3D Situationen anhand der gleichen Parameter wie in 2D beschrieben werden können, das Konzept von Spannung und Elastizität in Aktin-SF hat demnach auch hier Bestand (Brand et al., 2017).

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Funktion der unterschiedlichen NM II-Isoformen im Aktomyosin-System untersucht. Der Verlust von NM IIA geht mit drastischen Defekten bei der Morphogenese, SF-Bildung, Zelladhäsion und Zellmigration einher. Diese Ergebnisse spiegeln die eminent wichtige Rolle von NM IIA beim Aufbau von intrazellulären Kräften wider. Für NM IIB kann aufgrund der Ergebnisse eine regulierende Funktion durch die Stabilisierung und Koordination der SF-Dynamik und -Lokalisation postuliert werden. Die Bedeutung von NM IIB als stabilisierende und koordinierende Komponente zeigt sich besonders in Migrationsstudien, wo der koordinierte Ablauf von Aktinpolymerisation und Zellkörperretraktion durch NM IIB gesichert wird. Im Fall von NM IIC konnte im Zuge dieser Arbeit kein Unterschied gegenüber WT Zellen festgestellt werden. Die qualitativen Beobachtungen wurden durch quantitative Analysen der Zellen auf strukturierten 2D-Substraten untermauert und in Relation zum TEM gesetzt. Dadurch zeigte sich, dass NM IIA und NM IIB komplementäre Funktionen beim Aufbau der Aktomyosin-Kontraktilität in nicht-muskulären Zellen ausüben. NM IIA steuert hauptsächlich die Ausprägung der Kontraktilität über den Spannungs-Kontrollweg, während NM IIB die aufgebaute Spannung über den Elastizitäts-Kontrollweg ausbalanciert. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass nicht nur die Funktionen, sondern auch die Assemblierung und Lokalisation von NM IIA und NM IIB eng miteinander verflochten sind. Kolokalisationsstudien verdeutlichen, dass NM IIA durch präferenzielle Aktivierung und der Bildung von Pionierfilamenten das Aktomyosin-System initiiert und Kontraktilität aufbaut, während NM IIB in NM IIA-Pionierfilamente co-assembliert und die Kontraktilität der NM IIA-Pionierfilamente ausbalanciert. Diese Ergebnisse zeigen, dass NM IIA und NM IIB permanent in heterotypischen Filamenten co-assemblieren und als eine Einheit fungieren, deren Dynamik und Kontraktilität durch die relativen Verhältnisse der beiden Isoformen zueinander sensibel gesteuert werden kann.

Im folgenden Modell (Abb. 5.2) wird die Assemblierung und Strukturierung des Aktomyosin-Systems ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit schematisch dargestellt und daraus abgeleitet, wie durch heterotypische NM IIA/NM IIB-Filamente die Dynamik der SF und der Zellmigration beeinflusst werden kann.

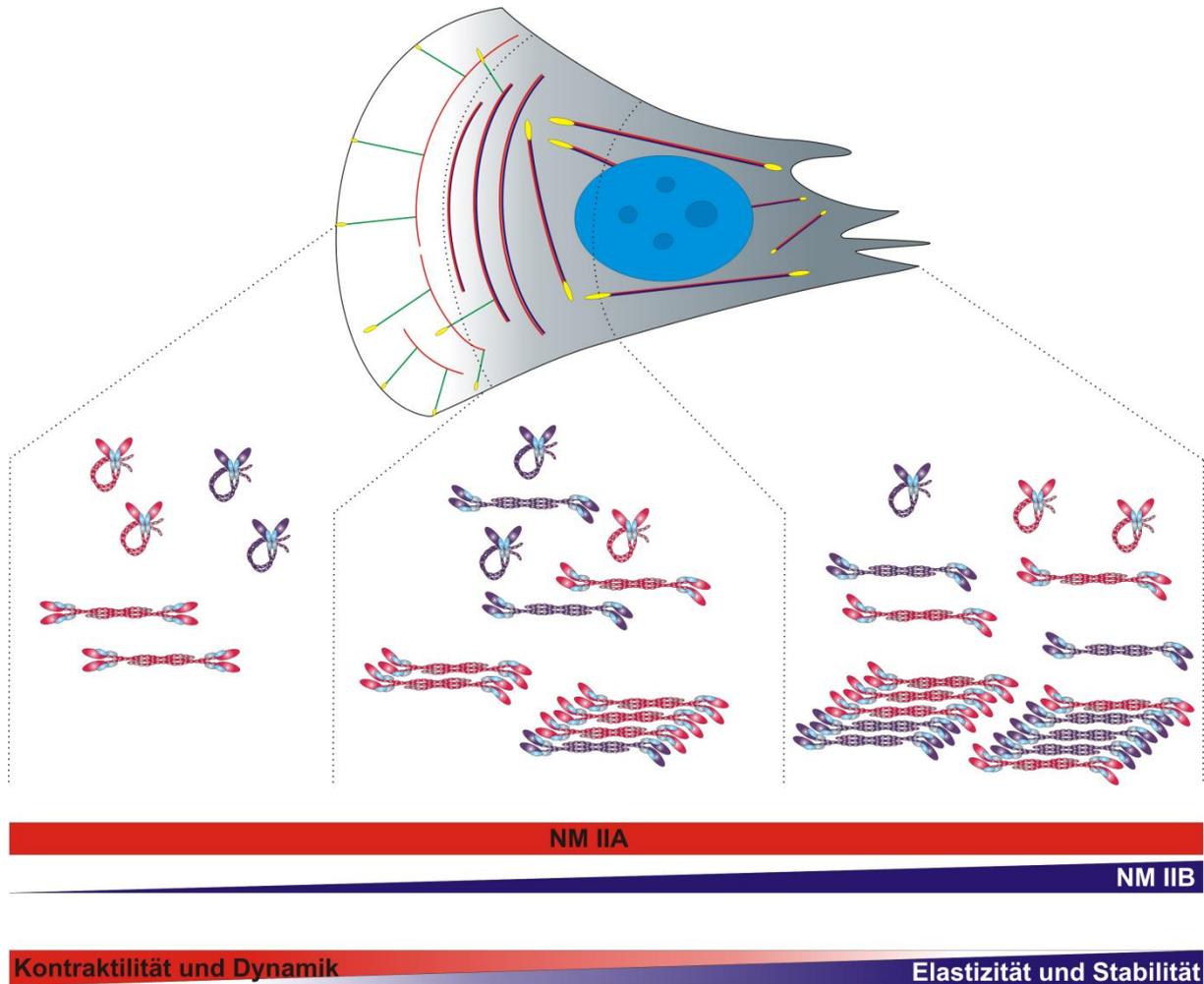


Abbildung 5.2: Modell der NM II-vermittelten Aktomyosin-Kontraktilität ausgehend von heterotypischen NM IIA/NM IIB-Filamenten.

An der Migrationsfront von motilen Zellen bilden sich NM IIA-Pionierfilamente, welche durch präferenzielle Phosphorylierung der RLC an der NMHC IIA aktiviert werden. NM IIB co-assembliert in diese Pionierfilamente und bleibt länger im Filamentverbund als NM IIA. Dadurch wandert NM IIB länger mit dem retrograden Aktinfluss und akkumuliert schließlich an den zentralen SF im Zellzentrum und dem *trailing edge*. Da beide Isoformen permanent co-assemblieren, entsteht ein fein regulierbares Aktomyosin-System, welches auf den kinetischen Eigenschaften der unterschiedlichen Isoformen beruht. NM IIA vermittelt Kontraktilität und Dynamik in den SF, während NM IIB diese Eigenschaften ausbalanciert und dadurch Elastizität und Stabilität in den zentralen SF vermittelt. Dieses selbstregulierende System sichert die korrekte Zellmigration. An der Migrationsfront ist ein hohes NM IIA zu NM IIB Verhältnis vorhanden, wodurch Kontraktilität und Dynamik überwiegen und der Aktinpolymerisation entgegenwirken können. Dadurch kann die Ausprägung des Phänotyps schnell angepasst werden, wie bei einer Änderung der Migrationsrichtung. Im Zellzentrum ist ein ausbalanciertes NM IIA zu NM IIB Verhältnis vorhanden, wodurch die SF hier stabiler und langlebiger sind. Dadurch wird die Stabilisierung des Zellkörpers bis zur Dissoziation der zentralen Aktinfasern gewährleistet.

Das Modell geht davon aus, dass alle bipolaren Filamente in ihrem Grundwesen heterotypische Filamente sind und diesen Status mindestens einmal in ihrem Assemblierungs-/Disassemblierungszyklus innehaben. Beginnend mit der Annahme, dass die RLC an NM IIA-Hexameren präferenziell gegenüber den anderen Paralogen phosphoryliert wird, kommt es zu einer bevorzugten Aktivierung der NM IIA-Hexamere. Dadurch bilden sich am Lamellum der Zelle NM IIA Pionierfilamente, welche die Aktomyosin-Maschinerie initiieren. NM IIA besitzt eine hohe ATPase Aktivität und kann daher schnell Zugkräfte auf die Aktinfasern ausüben. Diese Eigenschaften machen NM IIA zu einem geeigneten Strukturgeber und Initiator der intrazellulären Kontraktilität. Die NM IIA-Hexamere weisen dabei einen schnellen Assemblierungs-/Disassemblierungszyklus auf, wodurch einzelne NM IIA-Hexamere schnell ausgetauscht werden können. Das führt dazu, dass sich NM IIA homogen in der Zelle verteilt und prinzipiell überall Kontraktilität aufbauen kann. NM IIB ist hingegen nicht in der Lage stabile Pionierfilamente in großer Zahl zu assemblieren und co-assembliert stattdessen in NM IIA-Pionierfilamente. Alle bipolaren Filamente gehen dadurch zu Beginn von NM IIA aus und erst mit zunehmender Filamentgröße co-assemblieren NM IIB Hexamere in das Filament. Aufgrund der hohen *duty ratio* bleibt NM IIB im Vergleich zu NM IIA jedoch länger in den Filamenten gebunden, weshalb es länger mit dem retrograden Aktinfluss in das Zellzentrum wandert. Das führt dazu, dass NM IIB zunehmend in den heterotypischen Filamenten im Zellzentrum akkumuliert und dort verweilt, bis die Aktinfasern oder die NM II-Filamente dissoziieren.

Das Zusammenspiel der synergistisch wirkenden Isoformen, führt zu einer Selbstsortierung der SF-Dynamik und -Mechanik ausgehend von den kinetischen Eigenschaften der heterotypischen Filamente. Beide Isoformen sind gleichzeitig in den Filamenten vorhanden, jedoch überwiegt je nach Verhältnis der Isoformen eine der biochemischen Eigenschaften lokal innerhalb der Zelle. NM IIA vermittelt aufgrund des schnellen Querbrückenzyklus einen schnellen Aufbau hoher Kontraktilität. Der schnelle *Turnover* der NM IIA-Hexamere führt jedoch gleichzeitig zu einer hohen Dynamik der SF, da NM IIA alleine nur schlechte quervernetzenden Eigenschaften auf die Aktinfasern ausübt. NM IIB weist hingegen eine langsamere *Turnover*-Rate auf, wodurch es quervernetzende Eigenschaften auf die SF hat. Zusätzlich kann es aufgrund seiner hohen *duty ratio* starken Zugspannungen widerstehen, wodurch es den SF Stabilität verleiht. Je mehr NM IIB in den heterotypischen Filamenten vorhanden ist, desto mehr wird die Kontraktilität von NM IIA durch die elastischen Eigenschaften von NM IIB ausbalanciert. Die Aktinfasern werden dadurch weniger dynamisch, ihre Stabilität nimmt aber gleichzeitig zu. Durch c-terminale Phosphorylierungen wird die Verweildauer der NM II-Hexamere in den Filamenten zusätzlich individuell reguliert, wodurch ein fein gesteuertes System entsteht, welches den lokalen Gegebenheiten jederzeit angepasst werden kann.

Diese Feinregulierung der SF-Dynamik ermöglicht das präzise modulieren des Zellkörpers während der Zellmigration. An der Migrationsfront von motilen Zellen ist ein hohes Verhältnis von NM IIA zu NM IIB vorhanden, wodurch in diesem Bereich Kontraktilität und Dynamik der SF überwiegen. Dem gegenüber stehen stabile und langlebige SF im Zellzentrum und dem *trailing edge*, die durch ein ausgeglichenes Verhältnis von NM IIA und NM IIB zu Stande kommen. An der Migrationsfront wirkt Kontraktilität der Aktinpolymerisation entgegen und die phänotypische Ausprägung der Zelle wird definiert. Gleichzeitig

verändert sich die Zellstruktur hier schnell, weshalb eine hohe Dynamik der Aktinstrukturen notwendig ist. Diese wird durch den schnellen *Turnover* von NM IIA gewährleistet. Im Zellzentrum und am *trailing edge* werden hingegen langlebigere Strukturen benötigt, welche die Zellstruktur aufrechterhalten. Dort hält NM IIB die Faserstruktur der SF solange aufrecht, bis sich die Fokalkontakte am *trailing edge* auflösen, wodurch es schließlich zur Dissoziation der zentralen Fasern kommt und der Zellkörper durch NM IIA-vermittelte Kontraktionen verkürzt werden kann. Demnach nimmt NM IIA eine aktive, kontrahierende Rolle und NM IIB eine aufrechterhaltende, regulierende Rolle ein. Das korrekt ausbalancierte Verhältnis der Isoformen ist dabei essentiell für eine optimal gesteuerte Zellmigration. In statischen Zellen ist hingegen keine differenzielle Aufteilung der Dynamik von heterotypischen NM IIA/NM IIB Filamenten notwendig, da hier eine stabile Verankerung vermittelt werden muss. Das erfordert eine Vielzahl stabiler SF, was sich darin widerspiegelt, dass fast alle SF-Subtypen vSF entsprechen. Dementsprechend ist auch in allen NM II-Filamenten ein ausbalanciertes Verhältnis von NM IIA und NM IIB vorhanden.

6 Weiterer Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse über den Aufbau und die Funktion der Aktomyosin-Kontraktilität in nicht-muskulären Zellen. Ausgehend von den hier erzielten Ergebnissen, können die molekularen Mechanismen der Aktomyosin-Kontraktilität weiter entschlüsselt werden. Im Folgenden wird ein Überblick über fortsetzende Untersuchungen gegeben, die ein tieferes Verständnis der Thematik ermöglichen sollen.

➤ **Aktivierung und Assemblierung von heterotypischen Filamenten.**

Ergebnisse dieser Arbeit postulieren, dass die Bildung heterotypischer Filamente ein kontinuierlich ablaufender Prozess ist, der durch die präferenzielle Aktivierung von NM IIA initiiert wird (Vgl. Abb. 4.19 - 4.21 & Abb.5.2). Eine präferenzielle Aktivierung von NM IIA könnte entweder durch eine quantitative Überlegenheit von NM IIA gegenüber NM IIB, oder durch eine präferenzielle Phosphorylierung der RLC an NM IIA erklärt werden. Eine Kombination von beiden Effekten ist ebenfalls denkbar. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurde im Zuge dieser Arbeit mit der Herstellung von NM IIA-GFP und NM IIB-GFP Reporterzelllinien begonnen (Koch et al., 2018). Das GFP sitzt dabei jeweils am Anfang des Leserasters der kodierenden Sequenzen, wodurch bei gleichbleibenden Belichtungsintensitäten und -zeiten, eine Aussage über die relative Expression von NM IIA zu NM IIB getroffen werden kann. Mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie kann dadurch eine absolute Quantifizierung der Proteinmengen ermöglicht und das Verhältnis von NM IIA zu NM IIB präzise bestimmt werden (Politi et al., 2018). Des Weiteren können diese Zelllinien verwendet werden, um anhand von Co-Immunopräzipitationen das relative Verhältnis der RLC-Phosphorylierung an NM IIA und NM IIB zu bestimmen. Ebenfalls kann auf die gleiche Weise das Verhältnis von heterotypischen NM IIA/NM IIB Filamenten gegenüber homotypischen NM IIA und NM IIB Filamenten bestimmt werden. Ausgehend von den Resultaten solcher Experimente können zudem weitere Experimente Klarheit schaffen, inwiefern eine differenzielle Aktivierung der unterschiedlichen NM II-Isoformen durch unterschiedliche RLC-assoziierte Kinasen und Phosphatasen reguliert werden könnte.

➤ **Experimentelle Trennung von Oberflächenspannung und Linienspannung**

Die Entstehung kleiner Kreisbögen in NM IIA-KO Zellen und großer Kreisbögen in NM IIB-KO Zellen, deutet auf eine verminderte bzw. erhöhte Linienspannung in den peripheren Aktinbögen hin (Bischofs et al., 2008; Kassianidou et al., 2019; Tabdanov et al., 2018; Thery et al., 2006). Der Linienspannung in den peripheren Aktinbögen wirkt die Oberflächenspannung des Aktincortex entgegen. Da beide Aktin-Strukturen kontraktile Eigenschaften aufweisen, beeinflussen sich auch beide entsprechend des TEM gegenseitig (Bischofs et al., 2008). Wie bereits erwähnt, ist die experimentelle Trennung der beiden kontraktilen Strukturen jedoch anspruchsvoll. Werden die Zellen von ihrem Substrat abgelöst, disassemblieren alle SF, wodurch die Zelle einen runden Phänotyp einnimmt, der prinzipiell nur auf der Oberflächenspannung beruht. In diesem Stadium kann mittels Mikropipetten-Aspiration, Rasterkraft-Mikroskopie oder Cantilever-Kompression eine ungefähre Größe der Oberflächenspannung bestimmt werden. Ziel zukünftiger Experimente ist es, auf diese Weise die

Oberflächenspannung von WT und NM II-KO Zellen zu vergleichen, um zu untersuchen, ob die verschiedenen NM II-Isoformen unterschiedliche Einflüsse auf die Oberflächenspannung und die Linienspannung ausüben können.

Durch die Bestimmung der Oberflächenspannung in den verschiedenen Zelllinien kann in weiteren Experimenten möglicherweise abgeleitet werden, wie die einzelnen NM II-Filamente verschaltet sind, um pN-Kräfte der NM II-Filamente in nN-Kräfte an den Fokalkontakten zu konvertieren. Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie sowie die aktuelle Entwicklung der *expansion microscopy* (Wassie et al., 2019) ermöglichen dabei prinzipiell die quantitative Bestimmung der NM II-Filamente entlang von SF, wodurch abgeleitet werden kann, ob die Kraft der Filamente aufsummiert wird, oder ob weitere Mechanismen die Konvertierung der Kraft steuern.

➤ **Intrazelluläre Kontraktilität und Einfluss der NM II-Isoformen in 3D**

Die hier vorgestellten Ergebnisse über zelluläre Phänotypen in 3D liefern interessante Einblicke über die intrazelluläre Kontraktilität von Zellen in dreidimensionalen Umgebungen. Computergesteuerte Simulationen postulieren, dass der mechanische Stress in axialen Aktinbögen deutlich niedriger ist, als in lateralen Aktinbögen (Brand et al., 2017). Durch die verbesserte Z-Auflösung neuester Konfokalmikroskope können zukünftig mehr Infos aus der Aktinstruktur in axialer Ebene abgeleitet werden, wie beispielsweise die Vermessung des Bogenradius oder der SF-Intensität. Das beinhaltet auch die Kraftmessung von Zellen in 3D-Substraten. DLS Mikrostrukturen können so geschrieben werden, dass die Struktur flexibel genug ist, um von Zellen deformiert zu werden. Das ermöglicht prinzipiell den Vergleich der Kontraktionskraft von Zellen in 3D Gerüsten und Zellen, die auf strukturierten Substraten für die TFM in 2D kultiviert wurden (Balaban et al., 2001; Sabass et al., 2008).

Außerdem kann der Einfluss der NM II-Isoformen in 3D genauer charakterisiert werden. Der niedrige mechanische Stress in axialen Aktinstrukturen könnte auf eine differenzielle Lokalisation von NM IIA und NM IIB hindeuten, bzw. das Verhältnis der Isoformen könnte in heterotypischen Filamenten verstärkt in eine Richtung tendieren. Für NM IIB wurde bereits eine Rolle während der nukleären Translokation in 3D (Thomas et al., 2015) sowie bei der 3D Migration im Zuge der EMT (Beach et al., 2011) postuliert. Lokalisationsstudien der NM II-Isoformen in 3D Zellkulturen sowie die Kultivierung von NM IIA- oder NM IIB-defizitären Fibroblasten in 3D Mikrostrukturen, bieten interessante Ansatzpunkte, um den Aufbau der Aktomyosin-Kontraktilität in 3D besser zu charakterisieren.

➤ **Mechanische Stimulation von NM II-defizitären Zelllinien**

Wie aus den vorausgegangenen Kapiteln deutlich wurde, ist die NM II-vermittelte Kontraktilität ein integraler Bestandteil der mechanoregulatorischen Vermittlung von Zellfunktionen. Alle drei NM II-Isoformen reagieren sensitiv auf mechanischen Stress, was zu einer Anpassung der NM II-Kontraktilität durch mechanoresponsive Signalkaskaden führt (Schiffhauer et al., 2016; Vicente-Manzanares et al., 2009b). Auf diese Weise stellen NM II-Motorproteine einen Konvergenzpunkt zwischen extrazellulären und intrazellulären Kräften dar. Es wurde für diverse Myosin-Motorproteine gezeigt, dass die *Turnover-Rate* abnimmt, wenn mechanischer Zug auf den Motorproteinen lastet (Khan und Sheetz, 1997; Purcell

et al., 2005). In der AG Bastmeyer wurden aktuell Stimuli-responsive 3D-Strukturen entwickelt, die sich in Abhängigkeit von Licht, Temperatur oder auf Basis einer *Host-Guest* Chemie verformen lassen (Hippler et al., 2019). In ersten Versuchen zeigte sich, dass diese Strukturen dazu verwendet werden können, um mechanischen Stress auf Zellen auszuüben. In weiteren Experimenten soll daher die Zellantwort von WT und NM II-defizitären Zellen auf die mechanische Stimulation genauer untersucht werden. Diese Experimente können weiteren Aufschluss liefern, wie Zellen durch das Aktomyosin-System eine Anpassung der Zellform auf wechselnde extrazelluläre Gegebenheiten vermitteln.

➤ **Charakterisierung der Funktion von NM IIC in U2OS Zellen**

Eine spezifische Funktion von NM IIC wurde im Kontext dieser Arbeit nicht entdeckt und erfordert daher weiterführende Experimente. Mögliche Funktionen von NM IIC wurden in Abschnitt 5.4.3 erörtert. Von besonderem Interesse ist dabei die Relokalisation von NM IIC in U2OS NM IIA-KO Zellen, welche in einer betreuten Bachelorarbeit beobachtet wurde (Schornick, 2019). Aufbauend auf dieser Beobachtung soll anhand von Zeitrafferaufnahmen und Kollokalisationsstudien, die Relokalisation von NM IIC genauer charakterisiert werden. Auch hier ermöglicht der Einsatz von hochauflösenden Mikroskopie-Techniken eine detaillierte Analyse der Strukturen. Es wäre beispielsweise möglich, dass sich im Fall von NM IIA-defizitären Zellen heterotypische NM IIB/NM IIC-Filamente bilden. Die Funktion solcher Filamente muss in weiteren Funktionsanalysen charakterisiert werden. Auf diese Weise kann aufgeklärt werden, ob NM IIC tatsächlich eher eine Rolle bei der Umstrukturierung von NM IIB-Filamenten einnimmt, oder ob die Motoraktivität in diesem speziellen Fall angepasst wird, und NM IIC dadurch kontraktile Eigenschaften aufweist.

7 Anhang

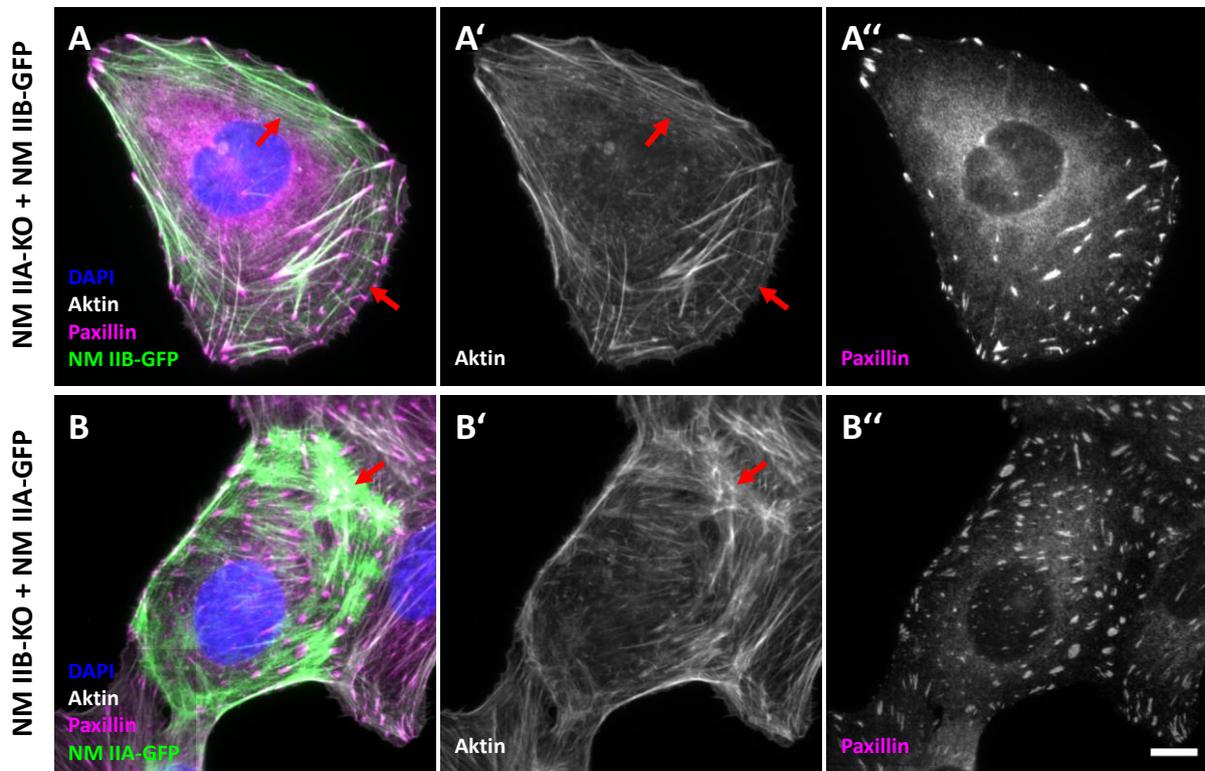


Abbildung A1: Die Überexpression von NM IIB kann den Verlust von NM IIA nicht kompensieren.

(A-A'') NM IIA-KO Zellen wurden mit GFP-getaggtm NM IIB (grün) transfiziert, fixiert und immunhistochemisch markiert. Um den Einfluss der NM IIB-Überexpression auf die SF-Bildung und die Maturierung der Fokalkontakte zu untersuchen, wurde das Aktinzytoskelett (grau) sowie Paxillin (magenta) angefärbt. Zusätzlich ist der Zellkern (blau) markiert. (A') Eine starke Überexpression von NM IIB führt zur Bildung zusätzlicher SF gegenüber untransfizierten NM IIA-KO Zellen. Die SF erreichen jedoch nie eine Anzahl und Anordnung, die mit WT Zellen oder rekonstituierten NM IIA-KO Zellen vergleichbar sind. Die meisten der entstehenden SF können als vSFs klassifiziert werden, gelegentlich treten auch dünne Aktinbündel auf, die transversalen Arcs ähneln (Pfeile). dSF sind hingegen nie vorhanden. (A'') Die Anzahl maturierter Fokalkontakte nimmt gegenüber untransfizierten NM IIA-KO Zellen ebenfalls zu, erreicht jedoch nicht die Anzahl der Kontakte in WT Zellen oder rekonstituierten NM IIA-KO Zellen. Gegenüber NM IIA-KO Zellen sind insgesamt weniger Fokalkontakte pro Zelle vorhanden, dafür sind die Paxillin-Cluster in NM IIB-überexprimierenden Zellen größer und lokalisieren auch im Zellzentrum. (B-B'') NM IIB-KO Zellen wurden mit GFP-getaggtm NM IIA (grün) transfiziert, fixiert und immunhistochemisch markiert. Es wurden die gleichen Strukturen wie in (A) angefärbt. (B') Die Überexpression von NM IIA führt zur Ausbildung zahlreicher, kurzer SF, die unkoordiniert im Zellkörper verteilt sind. Speziell in den Bereichen mit hoher NM IIA-GFP Lokalisation sind dicht gebündelte Aktinfasern zu erkennen, in denen die Anordnung der einzelnen Fasern schwer zu differenzieren sind (Pfeil). Ein Lokalisationsmuster verschiedener SF-Subtypen, wie es in WT-Zellen vorkommt, ist nicht mehr zu erkennen. Auch sind kaum SF-Subtypen differenzierbar. Die meisten erkennbaren Fasern entsprechen kurzen vSF. (B'') Maturierte Fokalkontakte sind zahlreich vorhanden und im gesamten Zellkörper verteilt. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μm .

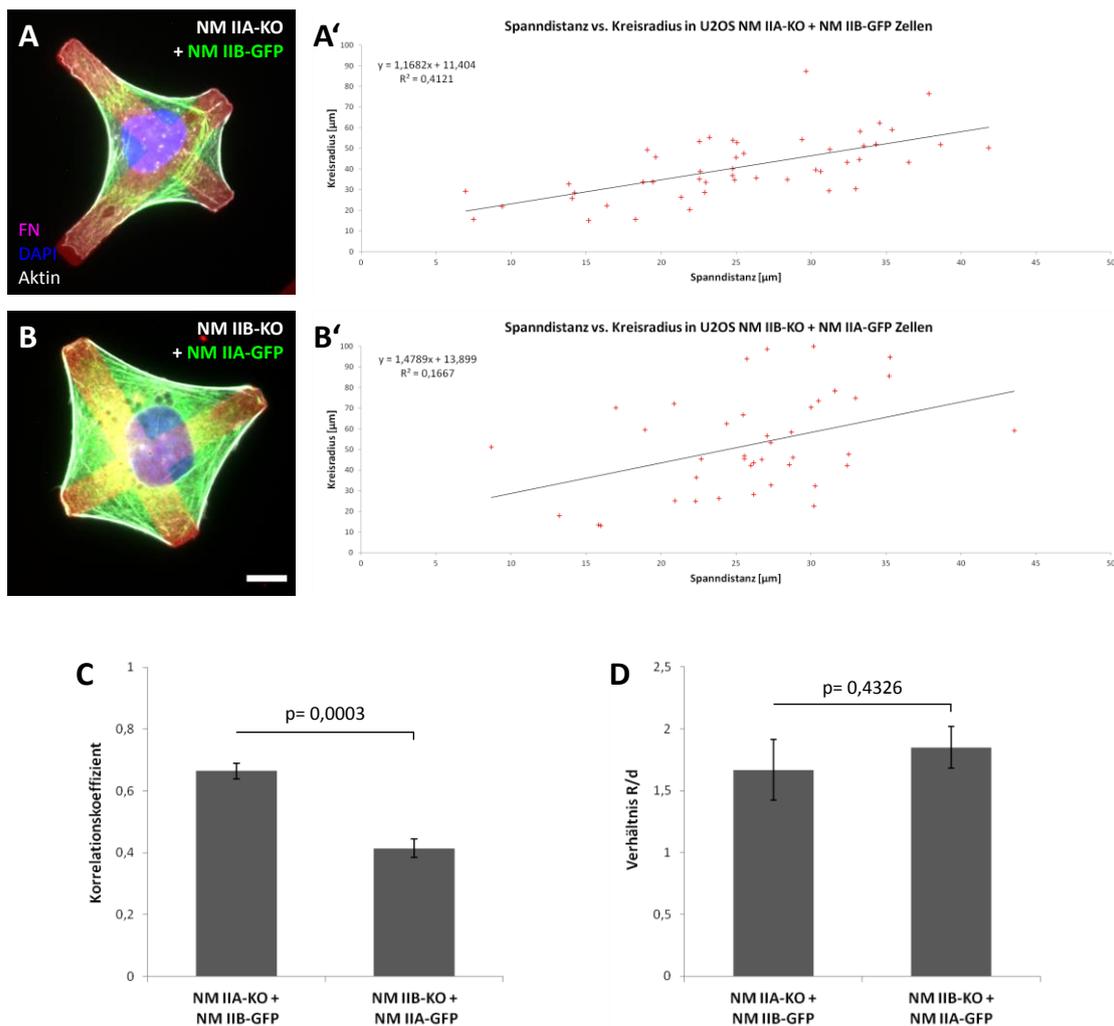


Abbildung A2: Die Überexpression von NM IIA kann die $R(d)$ -Abhängigkeit in NM IIB-KO Zellen nicht retten.

(A) NM IIA-KO Zellen wurden mit NM IIB-GFP (grün) transfiziert und auf FN-beschichteten Kreuz-Substraten (rot) kultiviert. Der Zellphänotyp entspricht weitgehend dem von untransfizierten NM IIA-KO Zellen. In der Zellkontur sind konkave Aktinbögen vorhanden. Der Zellkörper überbrückt oftmals nur geringere passivierte Flächen und breitet sich stattdessen durch quervernetztes Aktin auf dem Kreuz-Substrat aus. Teilweise sind im Vergleich zu untransfizierten NM IIA-KO mehr zentrale, gerade SF zu erkennen. **(A')** Die $R(d)$ -Abhängigkeit wurde in drei unabhängigen Experimenten quantifiziert, gezeigt ist das Streudiagramm aus einem unabhängigen Experiment. Die Abhängigkeit bleibt auch bei einer Überexpression von NM IIB bestehen. **(B)** NM IIB-KO Zellen wurden mit NM IIA-GFP (grün) transfiziert. Die Überexpression von NM IIA resultiert oftmals in einer unspezifischen Lokalisation des GFP-Signals innerhalb des kompletten Zellkörpers. Eine Koloalisation des GFP-Signals mit den SF ist nur bedingt zu erkennen. Der Zellphänotyp unterscheidet sich nicht von NM IIB-KO Zellen. Es sind gekrümmte Aktinbögen erkennbar, der Kreisradius der Bögen ist jedoch oftmals sehr groß. **(B')** Die quantitative Analyse zeigt, dass die Überexpression von NM IIA in NM IIB-KO Zellen die $R(d)$ -Abhängigkeit nicht retten kann. **(C)** Quantitativer Vergleich aus drei unabhängigen Experimenten. NM IIA überexprimierende NM IIB-KO Zellen zeigen einen signifikant niedrigeren Korrelationskoeffizienten als NM IIB überexprimierende NM IIA-KO Zellen. Der Koeffizient von NM IIA-KO Zellen mit NM IIB Überexpression weicht nicht von dem untransfizierter NM IIA-KO Zellen ab. Selbiges gilt für NM IIB-KO Zellen mit NM IIA Überexpression und untransfizierten NM IIB-KO Zellen. **(D)** Entgegen untransfizierten NM IIB-KO Zellen ist bei NM IIB-KO Zellen, die NM IIA überexprimieren jedoch keine signifikante Erhöhung des $R(d)$ -Verhältnisses vorhanden.

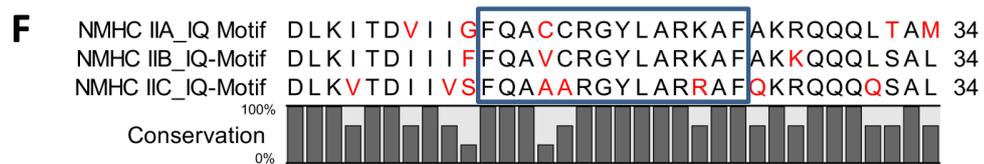
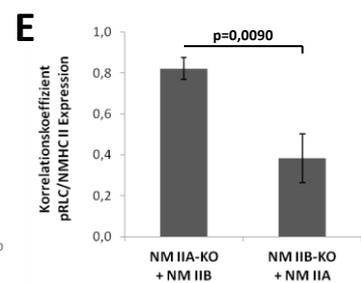
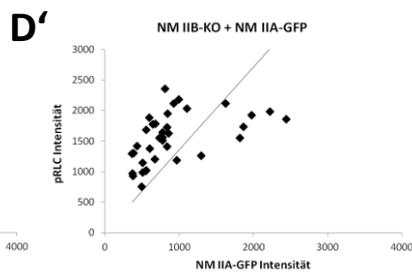
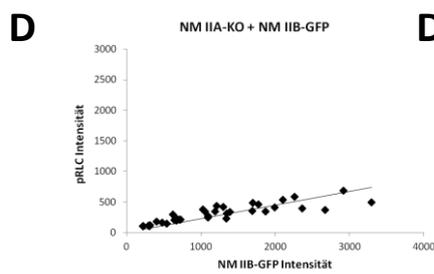
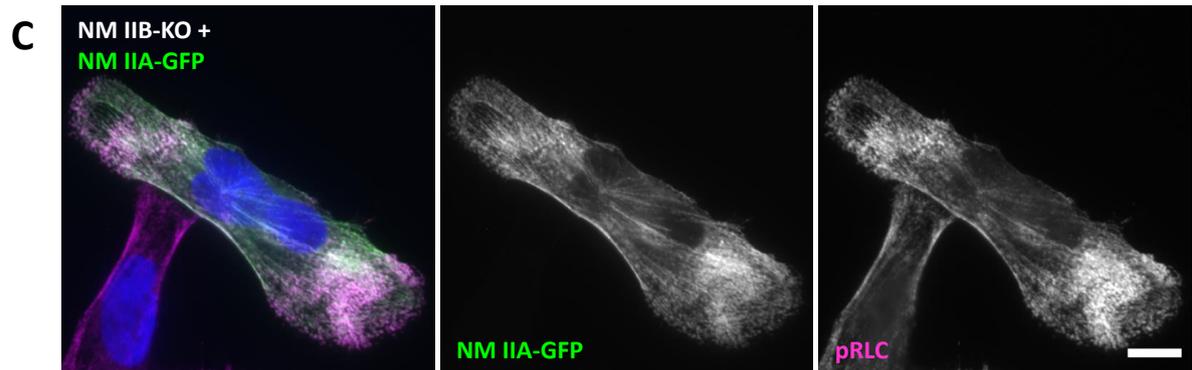
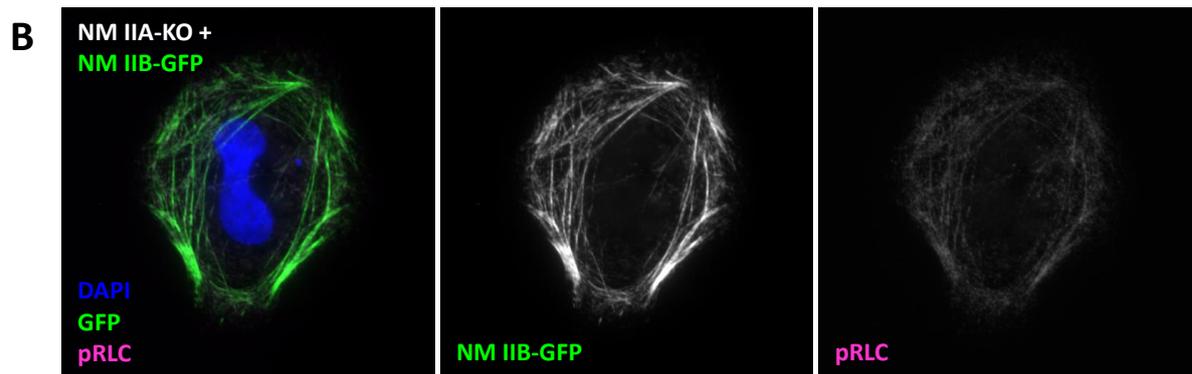
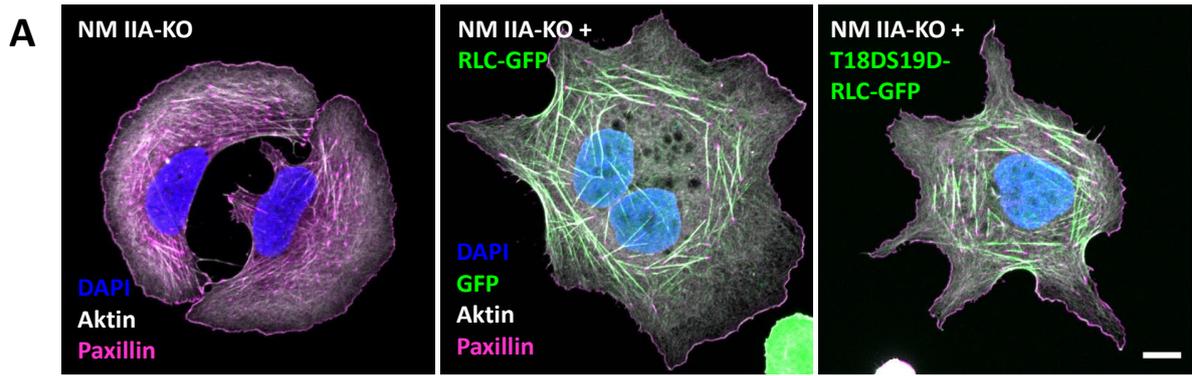


Abbildung A3: RLC- oder NM IIB-Überexpression können die Phosphorylierung der RLC nicht retten.

Es wurden Kontrollen durchgeführt, um zu überprüfen, ob es sich bei dem beobachteten Verlust des pRLC Signals in NM IIA-KO Zellen um einen spezifischen Effekt handelt, der auf den Verlust der NMHC IIA zurückzuführen ist und nicht auf Nebeneffekten beruht. **(A)** Eine Überexpression der RLC kann den Phänotyp von NM IIA-KO Zellen nicht retten. NM IIA-KO Zellen wurden mit einer WT-RLC oder einer phosphomimetischen RLC transfiziert. Bei der phosphomimetischen Variante wurden das Threonin¹⁸ und das Serin¹⁹ zu Asparaginsäuren substituiert, wodurch eine Phosphorylierung der RLC imitiert wird. Zur phänotypischen Analyse wurde das Aktinzytoskelett (grau), der Zellkern (blau) und die Fokalkontakte (magenta) immunhistochemisch markiert. Keine der beiden RLC-Varianten kann die SF-Bildung oder die Maturierung der Fokalkontakte retten. Es verbleiben nach wie vor nur einige zentrale SF und die Fokalkontakte sind als kleine, punktförmige Paxillin-Cluster in der Zellperipherie oder an den Enden der zentralen SF zu erkennen. **(B)** und **(C)** zeigen, dass eine Überexpression der verbleibenden Paralog-Isoform sich unterschiedlich auf die pRLC-Intensität auswirkt. **(B)** Wird NM IIB in NM IIA-KO Zellen überexprimiert, ist ein leicht verstärktes pRLC-Signal gegenüber untransfizierten NM IIA-KO Zellen zu erkennen. Die Quantifizierung in **(D)** zeigt einen leichten Anstieg der pRLC Intensität in Abhängigkeit von der NM IIB Expression. **(C)** Eine Überexpression von NM IIA in NM IIB-KO Zellen zeigt analog zu WT-Zellen eine starkes pRLC-Signal entlang der NM IIA Lokalisation. Die Quantifizierung in **(D')** zeigt einen starken Anstieg der pRLC Intensität mit zunehmender NM IIA Expressionsstärke. Der Werte korrelieren dabei allerdings signifikant weniger, als im Fall einer NM IIB Überexpression in NM IIA-KO Zellen **(E)**. Daraus wird deutlich, dass die Phosphorylierung der RLC nicht Isoform-unabhängig gesteuert wird, obwohl das IQ-Bindemotiv für die RLC in allen NMHC II-Isoformen konserviert ist **(F)**. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 10 µm.

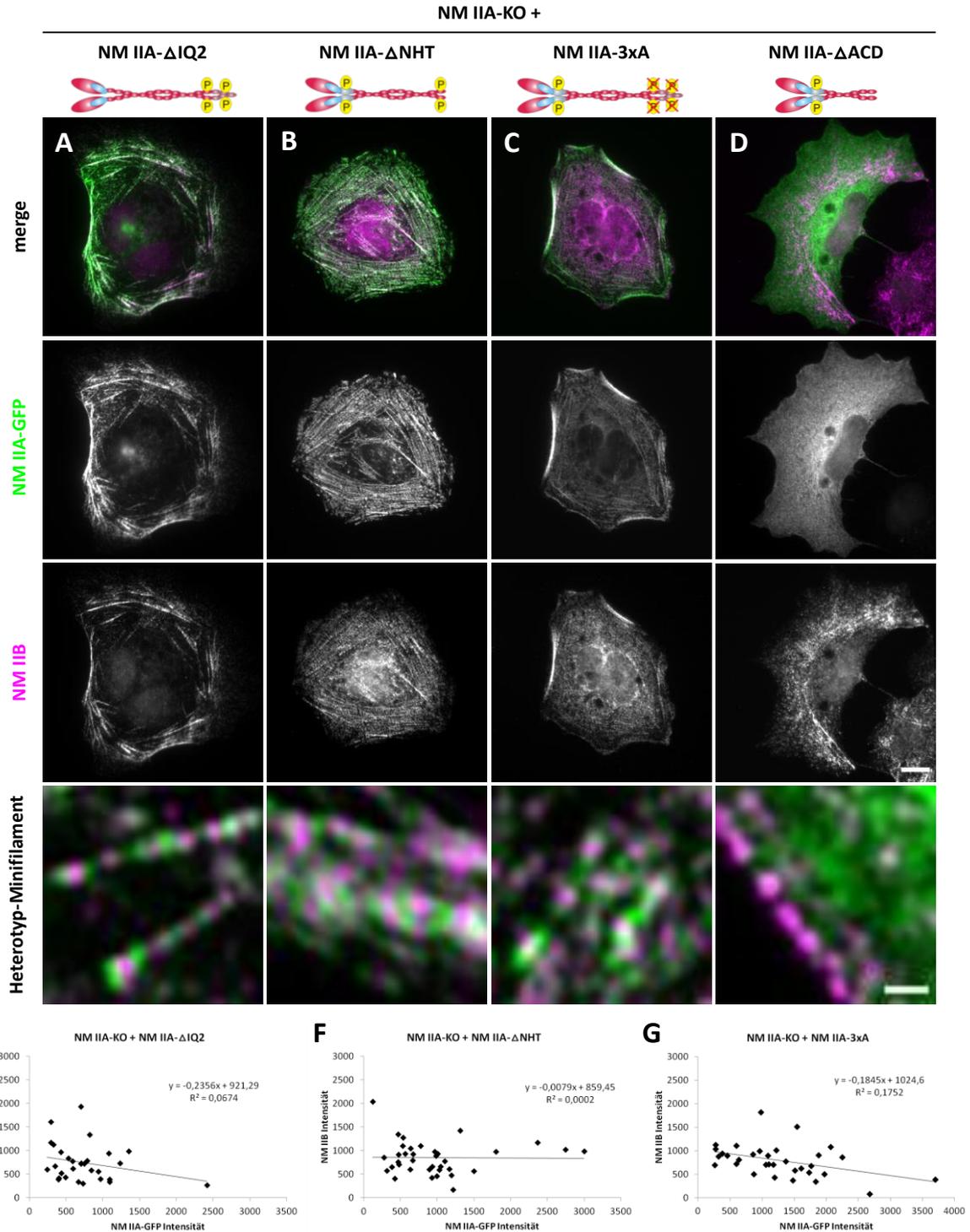


Abbildung A4: NM IIA-Mutanten, NM IIB Lokalisation und Formierung heterotypischer Filamente.

Rekonstitutionsexperimente mit den NMHC IIA-Mutanten zeigen, dass die Bildung heterotypischer Filamente von der NMHC IIA initiiert wird und unabhängig von der c-terminalen Phosphorylierung der NMHC IIA stattfindet. **(A)** Auch ohne die RLC initiiert NMHC IIA- Δ IQ2 die Bildung heterotypischer Filamente. Die Lokalisation von NM IIB orientiert sich dabei an der Lokalisation von NM IIA. Gleiches gilt für **(B)** NMHC IIA- Δ NHT und **(C)** NMHC IIA-3xA. **(D)** Die Negativkontrolle mit NMHC IIA- Δ ACD zeigt hingegen keine Bildung heterotypischer Filamente, da NM IIA nicht zu bipolaren Filamenten assemblieren kann. Die NM IIB Lokalisation ist in diesem Fall unabhängig von der NM IIA Lokalisation. **(E-G)** Die Intensität von NM IIB korreliert in keinem der Fälle mit der Expressionsstärke der NMHC IIA.

8 Literaturverzeichnis

- Adelstein, R.S., T.D. Pollard, und W.M. Kuehl. 1971. Isolation and characterization of myosin and two myosin fragments from human blood platelets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 68:2703-2707.
- Aguilar-Cuenca, R., A. Juanes-Garcia, und M. Vicente-Manzanares. 2014. Myosin II in mechanotransduction: master and commander of cell migration, morphogenesis, and cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 71:479-492.
- Albert, P.J., und U.S. Schwarz. 2014. Dynamics of cell shape and forces on micropatterned substrates predicted by a cellular Potts model. *Biophysical journal*. 106:2340-2352.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, und K. Kaibuchi. 1996. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *The Journal of biological chemistry*. 271:20246-20249.
- Amano, M., M. Nakayama, und K. Kaibuchi. 2010. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton*. 67:545-554.
- Arnaout, M.A., S.L. Goodman, und J.P. Xiong. 2007. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Current opinion in cell biology*. 19:495-507.
- Bachmann, M. 2015. Analyse Integrin-vermittelter Zellkontakte auf differenziellen Fibronectin/Vitronectin-Substraten mit hochaufgelöster Fluoreszenzmikroskopie. *Dissertation*. KIT.
- Bachmann, M., M. Schäfer, V.V. Mykuliak, M. Ripamonti, L. Heiser, K. Weißenbruch, S. Krübel, C.M. Franz, V.P. Hytönen, B. Wehrle-Haller, und M. Bastmeyer. 2018. Force-dependent ligand sensing enables $\alpha V\beta 3$ integrin to differentiate between fibronectin and high-affinity ligands. *bioRxiv* pre-print: not peer-reviewed.
- Baird, M.A., N. Billington, A. Wang, R.S. Adelstein, J.R. Sellers, R.S. Fischer, und C.M. Waterman. 2017. Local pulsatile contractions are an intrinsic property of the myosin 2A motor in the cortical cytoskeleton of adherent cells. *Molecular biology of the cell*. 28:240-251.
- Balaban, N.Q., U.S. Schwarz, D. Riveline, P. Goichberg, G. Tzur, I. Sabanay, D. Mahalu, S. Safran, A. Bershadsky, L. Addadi, und B. Geiger. 2001. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nature cell biology*. 3:466-472.
- Banerjee, S., und L. Giomi. 2013. Polymorphism and bistability in adherent cells. *Soft Matter*. 2013:5251-5260.
- Bao, J., S.S. Jana, und R.S. Adelstein. 2005. Vertebrate nonmuscle myosin II isoforms rescue small interfering RNA-induced defects in COS-7 cell cytokinesis. *The Journal of biological chemistry*. 280:19594-19599.
- Bar-Ziv, R., T. Tlusty, E. Moses, S.A. Safran, und A. Bershadsky. 1999. Pearling in cells: a clue to understanding cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:10140-10145.
- Baulesch, L. 2019. Mikrostrukturierte und Stimulus-responsive Zellkultursysteme zur Untersuchung der Aktomyosin-Kontraktilität. *Masterthesis*. KIT.
- Beach, J.R., K.S. Bruun, L. Shao, D. Li, Z. Swider, K. Remmert, Y. Zhang, M.A. Conti, R.S. Adelstein, N.M. Rusan, E. Betzig, und J.A. Hammer. 2017. Actin dynamics and competition for myosin monomer govern the sequential amplification of myosin filaments. *Nature cell biology*. 19:85-93.

- Beach, J.R., und J.A. Hammer, 3rd. 2015. Myosin II isoform co-assembly and differential regulation in mammalian systems. *Experimental cell research*. 334:2-9.
- Beach, J.R., G.S. Hussey, T.E. Miller, A. Chaudhury, P. Patel, J. Monslow, Q. Zheng, R.A. Keri, O. Reizes, A.R. Bresnick, P.H. Howe, und T.T. Egelhoff. 2011. Myosin II isoform switching mediates invasiveness after TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:17991-17996.
- Beach, J.R., L. Shao, K. Remmert, D. Li, E. Betzig, und J.A. Hammer, 3rd. 2014. Nonmuscle myosin II isoforms coassemble in living cells. *Current biology : CB*. 24:1160-1166.
- Belmonte, J.M., M. Leptin, und F. Nedelec. 2017. A theory that predicts behaviors of disordered cytoskeletal networks. *Molecular systems biology*. 13:941.
- Berg, J.S., B.C. Powell, und R.E. Cheney. 2001. A millennial myosin census. *Molecular biology of the cell*. 12:780-794.
- Betapudi, V., L.S. Licate, und T.T. Egelhoff. 2006. Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231 breast cancer cell spreading and migration. *Cancer research*. 66:4725-4733.
- Billington, N., J.R. Beach, S.M. Heissler, K. Remmert, S. Guzik-Lendrum, A. Nagy, Y. Takagi, L. Shao, D. Li, Y. Yang, Y. Zhang, M. Barzik, E. Betzig, J.A. Hammer, 3rd, und J.R. Sellers. 2015. Myosin 18A coassembles with nonmuscle myosin 2 to form mixed bipolar filaments. *Current biology : CB*. 25:942-948.
- Billington, N., A. Wang, J. Mao, R.S. Adelstein, und J.R. Sellers. 2013. Characterization of three full-length human nonmuscle myosin II paralogs. *The Journal of biological chemistry*. 288:33398-33410.
- Biro, M., Y. Romeo, S. Kroschwald, M. Bovellan, A. Boden, J. Tcherkezian, P.P. Roux, G. Charras, und E.K. Paluch. 2013. Cell cortex composition and homeostasis resolved by integrating proteomics and quantitative imaging. *Cytoskeleton*. 70:741-754.
- Bischofs, I.B., F. Klein, D. Lehnert, M. Bastmeyer, und U.S. Schwarz. 2008. Filamentous network mechanics and active contractility determine cell and tissue shape. *Biophysical journal*. 95:3488-3496.
- Bischofs, I.B., S.S. Schmidt, und U.S. Schwarz. 2009. Effect of adhesion geometry and rigidity on cellular force distributions. *Physical review letters*. 103:048101.
- Blanchoin, L., R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes, und J. Plastino. 2014. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiological reviews*. 94:235-263.
- Bond, L.M., D.A. Tumbarello, J. Kendrick-Jones, und F. Buss. 2013. Small-molecule inhibitors of myosin proteins. *Future medicinal chemistry*. 5:41-52.
- Brand, C.A., M. Linke, K. Weissenbruch, B. Richter, M. Bastmeyer, und U.S. Schwarz. 2017. Tension and Elasticity Contribute to Fibroblast Cell Shape in Three Dimensions. *Biophysical journal*. 113:770-774.
- Breckenridge, M.T., N.G. Dulyaninova, und T.T. Egelhoff. 2009. Multiple regulatory steps control mammalian nonmuscle myosin II assembly in live cells. *Molecular biology of the cell*. 20:338-347.
- Bretscher, A., K. Edwards, und R.G. Fehon. 2002. ERM proteins und merlin: integrators at the cell cortex. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 3:586-599.

- Burnette, D.T., L. Shao, C. Ott, A.M. Pasapera, R.S. Fischer, M.A. Baird, C. Der Loughian, H. Delanoé-Ayari, M.J. Paszek, M.W. Davidson, E. Betzig, und J. Lippincott-Schwartz. 2014. A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells. *The Journal of cell biology*. 205:83-96.
- Burridge, K., und E.S. Wittchen. 2013. The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *The Journal of cell biology*. 200:9-19.
- Bushuev, M.B., V.A. Daletsky, D.P. Pishchur, Y.V. Gatilov, I.V. Korolkov, E.B. Nikolaenkova, und V.P. Krivopalov. 2014. Unprecedented bistability domain and interplay between spin crossover and polymorphism in a mononuclear iron(II) complex. *Dalton transactions*. 43:3906-3910.
- Cai, Y., N. Biais, G. Giannone, M. Tanase, G. Jiang, J.M. Hofman, C.H. Wiggins, P. Silberzan, A. Buguin, B. Ladoux, und M.P. Sheetz. 2006. Nonmuscle myosin IIA-dependent force inhibits cell spreading and drives F-actin flow. *Biophysical journal*. 91:3907-3920.
- Cai, Y., O. Rossier, N.C. Gauthier, N. Biais, M.A. Fardin, X. Zhang, L.W. Miller, B. Ladoux, V.W. Cornish, und M.P. Sheetz. 2010. Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility. *Journal of cell science*. 123:413-423.
- Chabaud, M., M.L. Heuze, M. Bretou, P. Vargas, P. Maiuri, P. Solanes, M. Maurin, E. Terriac, M. Le Berre, D. Lankar, T. Pilot, R.S. Adelstein, Y. Zhang, M. Sixt, J. Jacobelli, O. Benichou, R. Voituriez, M. Piel, und A.M. Lennon-Dumenil. 2015. Cell migration and antigen capture are antagonistic processes coupled by myosin II in dendritic cells. *Nature communications*. 6:7526.
- Chaigne, A., C. Campillo, N.S. Gov, R. Voituriez, J. Azoury, C. Umana-Diaz, M. Almonacid, I. Queguiner, P. Nassoy, C. Sykes, M.H. Verlhac, und M.E. Terret. 2013. A soft cortex is essential for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Nature cell biology*. 15:958-966.
- Chang, C.W., und S. Kumar. 2015. Differential Contributions of Nonmuscle Myosin II Isoforms and Functional Domains to Stress Fiber Mechanics. *Scientific reports*. 5:13736.
- Cheney, R.E., und M.S. Mooseker. 1992. Unconventional myosins. *Current opinion in cell biology*. 4:27-35.
- Chugh, P., A.G. Clark, M.B. Smith, D.A.D. Cassani, K. Dierkes, A. Ragab, P.P. Roux, G. Charras, G. Salbreux, und E.K. Paluch. 2017. Actin cortex architecture regulates cell surface tension. *Nature cell biology*. 19:689-697.
- Chugh, P., und E.K. Paluch. 2018. The actin cortex at a glance. *Journal of cell science*. 131.
- Clark, A.G., K. Dierkes, und E.K. Paluch. 2013. Monitoring actin cortex thickness in live cells. *Biophysical journal*. 105:570-580.
- Clausen, M.P., H. Colin-York, F. Schneider, C. Eggeling, und M. Fritzsche. 2017. Dissecting the actin cortex density and membrane-cortex distance in living cells by super-resolution microscopy. *Journal of physics D: Applied physics*. 50:064002.
- Conti, M.A., und R.S. Adelstein. 2008. Nonmuscle myosin II moves in new directions. *Journal of cell science*. 121:11-18.
- Conti, M.A., S. Even-Ram, C. Liu, K.M. Yamada, und R.S. Adelstein. 2004. Defects in cell adhesion and the visceral endoderm following ablation of nonmuscle myosin heavy chain II-A in mice. *The Journal of biological chemistry*. 279:41263-41266.
- Cramer, L.P., M. Siebert, und T.J. Mitchison. 1997. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *The Journal of cell biology*. 136:1287-1305.
- Cukierman, E., R. Pankov, D.R. Stevens, und K.M. Yamada. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science*. 294:1708-1712.

- Cukierman, E., R. Pankov, und K.M. Yamada. 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Current opinion in cell biology*. 14:633-639.
- Dasbiswas, K., S. Hu, F. Schnorrer, S.A. Safran, und A.D. Bershadsky. 2018. Ordering of myosin II filaments driven by mechanical forces: experiments and theory. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 373.
- Deguchi, S., und M. Sato. 2009. Biomechanical properties of actin stress fibers of non-motile cells. *Biorheology*. 46:93-105.
- del Rio, A., R. Perez-Jimenez, R. Liu, P. Roca-Cusachs, J.M. Fernandez, und M.P. Sheetz. 2009. Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science*. 323:638-641.
- Diz-Munoz, A., P. Romanczuk, W. Yu, M. Bergert, K. Ivanovitch, G. Salbreux, C.P. Heisenberg, und E.K. Paluch. 2016. Steering cell migration by alternating blebs and actin-rich protrusions. *BMC biology*. 14:74.
- Dominguez, R., und K.C. Holmes. 2011. Actin structure and function. *Annual review of biophysics*. 40:169-186.
- dos Remedios, C.G., D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D.A. Berry, und N.J. Nosworthy. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological reviews*. 83:433-473.
- Doyle, A.D., N. Carvajal, A. Jin, K. Matsumoto, und K.M. Yamada. 2015. Local 3D matrix microenvironment regulates cell migration through spatiotemporal dynamics of contractility-dependent adhesions. *Nature communications*. 6:8720.
- Doyle, A.D., M.L. Kutys, M.A. Conti, K. Matsumoto, R.S. Adelstein, und K.M. Yamada. 2012. Micro-environmental control of cell migration--myosin IIA is required for efficient migration in fibrillar environments through control of cell adhesion dynamics. *Journal of cell science*. 125:2244-2256.
- Dulyaninova, N.G., und A.R. Bresnick. 2013. The heavy chain has its day: regulation of myosin-II assembly. *Bioarchitecture*. 3:77-85.
- Dulyaninova, N.G., R.P. House, V. Betapudi, und A.R. Bresnick. 2007. Myosin-IIA heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells. *Molecular biology of the cell*. 18:3144-3155.
- Dulyaninova, N.G., V.N. Malashkevich, S.C. Almo, und A.R. Bresnick. 2005. Regulation of myosin-IIA assembly and Mts1 binding by heavy chain phosphorylation. *Biochemistry*. 44:6867-6876.
- Elliott, H., R.S. Fischer, K.A. Myers, R.A. Desai, L. Gao, C.S. Chen, R.S. Adelstein, C.M. Waterman, und G. Danuser. 2015. Myosin II controls cellular branching morphogenesis and migration in three dimensions by minimizing cell-surface curvature. *Nature cell biology*. 17:137-147.
- Even-Faitelson, L., und S. Ravid. 2006. PAK1 and aPKCzeta regulate myosin II-B phosphorylation: a novel signaling pathway regulating filament assembly. *Molecular biology of the cell*. 17:2869-2881.
- Even-Ram, S., A.D. Doyle, M.A. Conti, K. Matsumoto, R.S. Adelstein, und K.M. Yamada. 2007. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nature cell biology*. 9:299-309.
- Fenix, A.M., N. Taneja, C.A. Buttler, J. Lewis, S.B. Van Engelenburg, R. Ohi, und D.T. Burnette. 2016. Expansion and concatenation of non-muscle myosin IIA filaments drive cellular contractile system formation during interphase and mitosis. *Molecular biology of the cell*.
- Galli, C., S. Guizzardi, G. Passeri, G.M. Macaluso, und R. Scandroglio. 2005. Life on the wire: on tensegrity and force balance in cells. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 76:5-12.

- Gateva, G., S. Tojkander, S. Koho, O. Carpen, und P. Lappalainen. 2014. Palladin promotes assembly of non-contractile dorsal stress fibers through VASP recruitment. *Journal of cell science*. 127:1887-1898.
- Geiger, B., J.P. Spatz, und A.D. Bershadsky. 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:21-33.
- Golomb, E., X. Ma, S.S. Jana, Y.A. Preston, S. Kawamoto, N.G. Shoham, E. Goldin, M.A. Conti, J.R. Sellers, und R.S. Adelstein. 2004. Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family. *The Journal of biological chemistry*. 279:2800-2808.
- Greiner, A.M., F. Klein, T. Gudzenko, B. Richter, T. Striebel, B.G. Wundari, T.J. Autenrieth, M. Wegener, C.M. Franz, und M. Bastmeyer. 2015. Cell type-specific adaptation of cellular and nuclear volume in micro-engineered 3D environments. *Biomaterials*. 69:121-132.
- Grinnell, F., C.H. Ho, E. Tamariz, D.J. Lee, und G. Skuta. 2003. Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. *Molecular biology of the cell*. 14:384-395.
- Guilluy, C., R. Garcia-Mata, und K. Burridge. 2011. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends in cell biology*. 21:718-726.
- Guthardt Torres, P., I.B. Bischofs, und U.S. Schwarz. 2012. Contractile network models for adherent cells. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. 85:011913.
- Hasson, T. 2003. Myosin VI: two distinct roles in endocytosis. *Journal of cell science*. 116:3453-3461.
- Hayakawa, K., H. Tatsumi, und M. Sokabe. 2011. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *The Journal of cell biology*. 195:721-727.
- Heasman, S.J., und A.J. Ridley. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:690-701.
- Heissler, S.M., und D.J. Manstein. 2013. Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 70:1-21.
- Heissler, S.M., und J.R. Sellers. 2016. Kinetic Adaptations of Myosins for Their Diverse Cellular Functions. *Traffic*. 17:839-859.
- Henson, J.H., C.E. Ditzler, A. Germain, P.M. Irwin, E.T. Vogt, S. Yang, X. Wu, und C.B. Shuster. 2017. The ultrastructural organization of actin and myosin II filaments in the contractile ring: new support for an old model of cytokinesis. *Molecular biology of the cell*. 28:613-623.
- Heuze, M.L., G.H.N. Sankara Narayana, J. D'Alessandro, V. Cellerin, T. Dang, D.S. Williams, J.C. Van Hest, P. Marcq, R.M. Mege, und B. Ladoux. 2019. Myosin II isoforms play distinct roles in adherens junction biogenesis. *eLife*. 8.
- Hippler, M., E. Blasco, J. Qu, M. Tanaka, C. Barner-Kowollik, M. Wegener, und M. Bastmeyer. 2019. Controlling the shape of 3D microstructures by temperature and light. *Nature communications*. 10:232.
- Hotulainen, P., und P. Lappalainen. 2006. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology*. 173:383-394.
- Hu, S., K. Dasbiswas, Z. Guo, Y.H. Tee, V. Thiagarajan, P. Hersen, T.L. Chew, S.A. Safran, R. Zaidel-Bar, und A.D. Bershadsky. 2017. Long-range self-organization of cytoskeletal myosin II filament stacks. *Nature cell biology*. 19:133-141.
- Jana, S.S., S. Kawamoto, und R.S. Adelstein. 2006. A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. *The Journal of biological chemistry*. 281:24662-24670.

- Janmey, P.A. 1998. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiological reviews*. 78:763-781.
- Jiu, Y., R. Kumari, A.M. Fenix, N. Schaible, X. Liu, M. Varjosalo, R. Krishnan, D.T. Burnette, und P. Lappalainen. 2019. Myosin-18B Promotes the Assembly of Myosin II Stacks for Maturation of Contractile Actomyosin Bundles. *Current biology : CB*. 29:81-92 e85.
- Jorrich, M.H., W. Shih, und S. Yamada. 2013. Myosin IIA deficient cells migrate efficiently despite reduced traction forces at cell periphery. *Biology open*. 2:368-372.
- Jung, H.S., S. Komatsu, M. Ikebe, und R. Craig. 2008. Head-head and head-tail interaction: a general mechanism for switching off myosin II activity in cells. *Molecular biology of the cell*. 19:3234-3242.
- Kassianidou, E., C.A. Brand, U.S. Schwarz, und S. Kumar. 2017. Geometry and network connectivity govern the mechanics of stress fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114:2622-2627.
- Kassianidou, E., und S. Kumar. 2015. A biomechanical perspective on stress fiber structure and function. *Biochimica et biophysica acta*. 1853:3065-3074.
- Kassianidou, E., D. Probst, J. Jager, S. Lee, A.L. Roguet, U.S. Schwarz, und S. Kumar. 2019. Extracellular Matrix Geometry and Initial Adhesive Position Determine Stress Fiber Network Organization during Cell Spreading. *Cell reports*. 27:1897-1909 e1894.
- Katoh, K., Y. Kano, M. Amano, H. Onishi, K. Kaibuchi, und K. Fujiwara. 2001. Rho-kinase--mediated contraction of isolated stress fibers. *The Journal of cell biology*. 153:569-584.
- Katz, B.Z., E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K.M. Yamada, und B. Geiger. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Molecular biology of the cell*. 11:1047-1060.
- Kelley, C.A., J.R. Sellers, D.L. Gard, D. Bui, R.S. Adelstein, und I.C. Baines. 1996. Xenopus nonmuscle myosin heavy chain isoforms have different subcellular localizations and enzymatic activities. *The Journal of cell biology*. 134:675-687.
- Khan, S., und M.P. Sheetz. 1997. Force effects on biochemical kinetics. *Annual review of biochemistry*. 66:785-805.
- Khatau, S.B., C.M. Hale, P.J. Stewart-Hutchinson, M.S. Patel, C.L. Stewart, P.C. Searson, D. Hodzic, und D. Wirtz. 2009. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:19017-19022.
- Kim, J.H., und R.S. Adelstein. 2011. LPA(1) -induced migration requires nonmuscle myosin II light chain phosphorylation in breast cancer cells. *Journal of cellular physiology*. 226:2881-2893.
- Kim, K.Y., M. Kovacs, S. Kawamoto, J.R. Sellers, und R.S. Adelstein. 2005. Disease-associated mutations and alternative splicing alter the enzymatic and motile activity of nonmuscle myosins II-B and II-C. *The Journal of biological chemistry*. 280:22769-22775.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, und K. Kaibuchi. 1996. Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. 273:245-248.
- Klein, F., B. Richter, T. Striebel, C.M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, und M. Bastmeyer. 2011. Two-component polymer scaffolds for controlled three-dimensional cell culture. *Advanced materials*. 23:1341-1345.
- Klein, F., T. Striebel, J. Fischer, Z. Jiang, C.M. Franz, G. von Freymann, M. Wegener, und M. Bastmeyer. 2010. Elastic fully three-dimensional microstructure scaffolds for cell force measurements. *Advanced materials*. 22:868-871.

- Koch, B., B. Nijmeijer, M. Kueblbeck, Y. Cai, N. Walther, und J. Ellenberg. 2018. Generation and validation of homozygous fluorescent knock-in cells using CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature protocols*. 13:1465-1487.
- Kolega, J. 1998. Cytoplasmic dynamics of myosin IIA and IIB: spatial 'sorting' of isoforms in locomoting cells. *Journal of cell science*. 111 (Pt 15):2085-2095.
- Kovacs, M., K. Thirumurugan, P.J. Knight, und J.R. Sellers. 2007. Load-dependent mechanism of nonmuscle myosin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:9994-9999.
- Kovacs, M., J. Toth, C. Hetenyi, A. Malnasi-Csizmadia, und J.R. Sellers. 2004. Mechanism of blebbistatin inhibition of myosin II. *The Journal of biological chemistry*. 279:35557-35563.
- Kovacs, M., F. Wang, A. Hu, Y. Zhang, und J.R. Sellers. 2003. Functional divergence of human cytoplasmic myosin II: kinetic characterization of the non-muscle IIA isoform. *The Journal of biological chemistry*. 278:38132-38140.
- Kruse, K., und F. Julicher. 2000. Actively contracting bundles of polar filaments. *Physical review letters*. 85:1778-1781.
- Kumar, S., I.Z. Maxwell, A. Heisterkamp, T.R. Polte, T.P. Lele, M. Salanga, E. Mazur, und D.E. Ingber. 2006. Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophysical journal*. 90:3762-3773.
- Labouesse, C., A.B. Verkhovsky, J.J. Meister, C. Gabella, und B. Vianay. 2015. Cell shape dynamics reveal balance of elasticity and contractility in peripheral arcs. *Biophysical journal*. 108:2437-2447.
- Ladoux, B., und R.M. Mege. 2017. Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 18:743-757.
- Lee, S., E. Kassianidou, und S. Kumar. 2018. Actomyosin stress fiber subtypes have unique viscoelastic properties and roles in tension generation. *Molecular biology of the cell*. 29:1992-2004.
- Lee, S., und S. Kumar. 2016. Actomyosin stress fiber mechanosensing in 2D and 3D. *F1000Research*. 5.
- Lehnert, D., B. Wehrle-Haller, C. David, U. Weiland, C. Ballestrem, B.A. Imhof, und M. Bastmeyer. 2004. Cell behaviour on micropatterned substrata: limits of extracellular matrix geometry for spreading and adhesion. *Journal of cell science*. 117:41-52.
- Lele, T.P., J. Pendse, S. Kumar, M. Salanga, J. Karavitis, und D.E. Ingber. 2006. Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. *Journal of cellular physiology*. 207:187-194.
- Leung, T., X.Q. Chen, E. Manser, und L. Lim. 1996. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Molecular and cellular biology*. 16:5313-5327.
- Linke, P., R. Suzuki, A. Yamamoto, M. Nakahata, M. Kengaku, T. Fujiwara, T. Ohzono, und M. Tanaka. 2019. Dynamic Contact Guidance of Myoblasts by Feature Size and Reversible Switching of Substrate Topography: Orchestration of Cell Shape, Orientation, and Nematic Ordering of Actin Cytoskeletons. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. 35:7538-7551.
- Liu, K.C., und R.E. Cheney. 2012. Myosins in cell junctions. *Bioarchitecture*. 2:158-170.
- Livne, A., und B. Geiger. 2016. The inner workings of stress fibers - from contractile machinery to focal adhesions and back. *Journal of cell science*. 129:1293-1304.
- Lo, C.M., D.B. Buxton, G.C. Chua, M. Dembo, R.S. Adelstein, und Y.L. Wang. 2004. Nonmuscle myosin IIb is involved in the guidance of fibroblast migration. *Molecular biology of the cell*. 15:982-989.

- Ma, R., und J. Berro. 2018. Structural organization and energy storage in crosslinked actin assemblies. *PLoS computational biology*. 14:e1006150.
- Ma, X., S. Kawamoto, Y. Hara, und R.S. Adelstein. 2004. A point mutation in the motor domain of nonmuscle myosin II-B impairs migration of distinct groups of neurons. *Molecular biology of the cell*. 15:2568-2579.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno, und S. Narumiya. 1999. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science*. 285:895-898.
- Maitre, J.L., H. Turlier, R. Illukkumbura, B. Eismann, R. Niwayama, F. Nedelec, und T. Hiiragi. 2016. Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature*. 536:344-348.
- Matsumura, F. 2005. Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends in cell biology*. 15:371-377.
- Matthews, B.D., D.R. Overby, R. Mannix, und D.E. Ingber. 2006. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *Journal of cell science*. 119:508-518.
- McIntosh, B.B., und E.M. Ostap. 2016. Myosin-I molecular motors at a glance. *Journal of cell science*. 129:2689-2695.
- Milberg, O., A. Shitara, S. Ebrahim, A. Masedunskas, M. Tora, D.T. Tran, Y. Chen, M.A. Conti, R.S. Adelstein, K.G. Ten Hagen, und R. Weigert. 2017. Concerted actions of distinct nonmuscle myosin II isoforms drive intracellular membrane remodeling in live animals. *The Journal of cell biology*. 216:1925-1936.
- Mrksich, M., und G.M. Whitesides. 1996. Using self-assembled monolayers to understand the interactions of man-made surfaces with proteins and cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 25:55-78.
- Murrell, M., P.W. Oakes, M. Lenz, und M.L. Gardel. 2015. Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 16:486-498.
- Nagy, A., Y. Takagi, N. Billington, S.A. Sun, D.K. Hong, E. Homsher, A. Wang, und J.R. Sellers. 2013. Kinetic characterization of nonmuscle myosin IIb at the single molecule level. *The Journal of biological chemistry*. 288:709-722.
- Naumanen, P., P. Lappalainen, und P. Hotulainen. 2008. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *Journal of microscopy*. 231:446-454.
- Niederman, R., und T.D. Pollard. 1975. Human platelet myosin. II. In vitro assembly and structure of myosin filaments. *The Journal of cell biology*. 67:72-92.
- Oakes, P.W., E. Wagner, C.A. Brand, D. Probst, M. Linke, U.S. Schwarz, M. Glotzer, und M.L. Gardel. 2017. Optogenetic control of RhoA reveals zyxin-mediated elasticity of stress fibres. *Nature communications*. 8:15817.
- Oliver, T., J. Lee, und K. Jacobson. 1994. Forces exerted by locomoting cells. *Seminars in cell biology*. 5:139-147.
- Owen, L.M., A.S. Adhikari, M. Patel, P. Grimmer, N. Leijnse, M.C. Kim, J. Notbohm, C. Franck, und A.R. Dunn. 2017. A cytoskeletal clutch mediates cellular force transmission in a soft, three-dimensional extracellular matrix. *Molecular biology of the cell*. 28:1959-1974.
- Paluch, E.K., und E. Raz. 2013. The role and regulation of blebs in cell migration. *Current opinion in cell biology*. 25:582-590.

- Papusheva, E., und C.P. Heisenberg. 2010. Spatial organization of adhesion: force-dependent regulation and function in tissue morphogenesis. *The EMBO journal*. 29:2753-2768.
- Pellegrin, S., und H. Mellor. 2007. Actin stress fibres. *Journal of cell science*. 120:3491-3499.
- Peterson, L.J., Z. Rajfur, A.S. Maddox, C.D. Freel, Y. Chen, M. Edlund, C. Otey, und K. Burridge. 2004. Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo. *Molecular biology of the cell*. 15:3497-3508.
- Politi, A.Z., Y. Cai, N. Walther, M.J. Hossain, B. Koch, M. Wachsmuth, und J. Ellenberg. 2018. Quantitative mapping of fluorescently tagged cellular proteins using FCS-calibrated four-dimensional imaging. *Nature protocols*. 13:1445-1464.
- Pollard, T.D. 1975. Electron microscopy of synthetic myosin filaments. Evidence for cross-bridge. Flexibility and copolymer formation. *The Journal of cell biology*. 67:93-104.
- Ponti, A., M. Machacek, S.L. Gupton, C.M. Waterman-Storer, und G. Danuser. 2004. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science*. 305:1782-1786.
- Prager-Khoutorsky, M., A. Lichtenstein, R. Krishnan, K. Rajendran, A. Mayo, Z. Kam, B. Geiger, und A.D. Bershadsky. 2011. Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nature cell biology*. 13:1457-1465.
- Purcell, T.J., H.L. Sweeney, und J.A. Spudich. 2005. A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:13873-13878.
- Ramanathan, S.P., J. Helenius, M.P. Stewart, C.J. Cattin, A.A. Hyman, und D.J. Muller. 2015. Cdk1-dependent mitotic enrichment of cortical myosin II promotes cell rounding against confinement. *Nature cell biology*. 17:148-159.
- Ran, F.A., P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott, und F. Zhang. 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*. 8:2281-2308.
- Richter, B., V. Hahn, S. Bertels, T.K. Claus, M. Wegener, G. Delaittre, C. Barner-Kowollik, und M. Bastmeyer. 2017. Guiding Cell Attachment in 3D Microscaffolds Selectively Functionalized with Two Distinct Adhesion Proteins. *Advanced materials*. 29.
- Ronen, D., und S. Ravid. 2009. Myosin II tailpiece determines its paracrystal structure, filament assembly properties, and cellular localization. *The Journal of biological chemistry*. 284:24948-24957.
- Roy, A., L. Lordier, S. Mazzi, Y. Chang, V. Lapierre, J. Larghero, N. Debili, H. Raslova, und W. Vainchenker. 2016. Activity of nonmuscle myosin II isoforms determines localization at the cleavage furrow of megakaryocytes. *Blood*. 128:3137-3145.
- Sabass, B., M.L. Gardel, C.M. Waterman, und U.S. Schwarz. 2008. High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances. *Biophysical journal*. 94:207-220.
- Sandbo, N., und N. Dulin. 2011. Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: ultrastructure defining form and driving function. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*. 158:181-196.
- Sandquist, J.C. 2008. Distinct Functions and Regulation of nonmuscle Myosin II Isoforms A and B in Cell motility. *Dissertation*. Duke University.
- Sandquist, J.C., und A.R. Means. 2008. The C-terminal tail region of nonmuscle myosin II directs isoform-specific distribution in migrating cells. *Molecular biology of the cell*. 19:5156-5167.

- Sandquist, J.C., K.I. Swenson, K.A. Demali, K. Burrige, und A.R. Means. 2006. Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *The Journal of biological chemistry*. 281:35873-35883.
- Schiffhauer, E.S., T. Luo, K. Mohan, V. Srivastava, X. Qian, E.R. Griffis, P.A. Iglesias, und D.N. Robinson. 2016. Mechanoaccumulative Elements of the Mammalian Actin Cytoskeleton. *Current biology : CB*. 26:1473-1479.
- Schiller, H.B., M.R. Hermann, J. Polleux, T. Vignaud, S. Zanivan, C.C. Friedel, Z. Sun, A. Raducanu, K.E. Gottschalk, M. Thery, M. Mann, und R. Fassler. 2013. beta1- and alphaV-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nature cell biology*. 15:625-636.
- Schornick, B. 2019. Expression, Lokalisation und Funktion von NM IIC im Aktomyosin-System. *Bachelorthesis*. KIT.
- Schwarz, U.S., N.Q. Balaban, D. Riveline, A. Bershadsky, B. Geiger, und S.A. Safran. 2002. Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization. *Biophysical journal*. 83:1380-1394.
- Schwarz, U.S., und S.A. Safran. 2002. Elastic interactions of cells. *Physical review letters*. 88:048102.
- Sellers, J.R. 2000. Myosins: a diverse superfamily. *Biochimica et biophysica acta*. 1496:3-22.
- Sellers, J.R., und S.M. Heissler. 2019. Nonmuscle myosin-2 isoforms. *Current biology : CB*. 29:R275-R278.
- Sheetz, M.P. 2001. Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:392-396.
- Shih, W., und S. Yamada. 2010. Myosin IIA dependent retrograde flow drives 3D cell migration. *Biophysical journal*. 98:L29-31.
- Shutova, M.S., S.B. Asokan, S. Talwar, R.K. Assoian, J.E. Bear, und T.M. Svitkina. 2017. Self-sorting of nonmuscle myosins IIA and IIB polarizes the cytoskeleton and modulates cell motility. *The Journal of cell biology*. 216:2877-2889.
- Shutova, M.S., W.A. Spessott, C.G. Giraudo, und T. Svitkina. 2014. Endogenous species of mammalian nonmuscle myosin IIA and IIB include activated monomers and heteropolymers. *Current biology : CB*. 24:1958-1968.
- Singhvi, R., G. Stephanopoulos, und D.I. Wang. 1994. Effects of substratum morphology on cell physiology. *Biotechnology and bioengineering*. 43:764-771.
- Skau, K.I., R.B. Hoyle, und M.S. Turner. 2006. A kinetic model describing the processivity of myosin-V. *Biophysical journal*. 91:2475-2489.
- Small, J.V., K. Rottner, I. Kaverina, und K.I. Anderson. 1998. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochimica et biophysica acta*. 1404:271-281.
- Stachowiak, M.R., P.M. McCall, T. Thoresen, H.E. Balciglu, L. Kasiewicz, M.L. Gardel, und B. O'Shaughnessy. 2012. Self-organization of myosin II in reconstituted actomyosin bundles. *Biophysical journal*. 103:1265-1274.
- Stewart, M.P., J. Helenius, Y. Toyoda, S.P. Ramanathan, D.J. Muller, und A.A. Hyman. 2011. Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature*. 469:226-230.
- Stricker, K. 2017. Erzeugung und Charakterisierung einer nichtmuskulären-Myosin IIB Knockout Zelllinie mittels CRISPR / Cas9. *Masterthesis*. KIT.

- Sunyer, R., V. Conte, J. Escribano, A. Elosegui-Artola, A. Labernadie, L. Valon, D. Navajas, J.M. Garcia-Aznar, J.J. Munoz, P. Roca-Cusachs, and X. Trepast. 2016. Collective cell durotaxis emerges from long-range intercellular force transmission. *Science*. 353:1157-1161.
- Svitkina, T. 2018. The Actin Cytoskeleton und Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 10.
- Svitkina, T.M., A.B. Verkhovskiy, K.M. McQuade, and G.G. Borisy. 1997. Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *The Journal of cell biology*. 139:397-415.
- Tabdanov, E.D., V.V. Puram, Z. Win, A. Alamgir, P.W. Alford, and P.P. Provenzano. 2018. Bimodal sensing of guidance cues in mechanically distinct microenvironments. *Nature communications*. 9:4891.
- Takahashi, M., S. Kawamoto, and R.S. Adelstein. 1992. Evidence for inserted sequences in the head region of nonmuscle myosin specific to the nervous system. Cloning of the cDNA encoding the myosin heavy chain-B isoform of vertebrate nonmuscle myosin. *The Journal of biological chemistry*. 267:17864-17871.
- Takeda, K., H. Kishi, X. Ma, Z.X. Yu, and R.S. Adelstein. 2003. Ablation and mutation of nonmuscle myosin heavy chain II-B results in a defect in cardiac myocyte cytokinesis. *Circulation research*. 93:330-337.
- Thery, M., A. Pepin, E. Dreesaire, Y. Chen, and M. Bornens. 2006. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell motility and the cytoskeleton*. 63:341-355.
- Thomas, D.G., A. Yenepalli, C.M. Denais, A. Rape, J.R. Beach, Y.L. Wang, W.P. Schiemann, H. Baskaran, J. Lammerding, and T.T. Egelhoff. 2015. Non-muscle myosin IIB is critical for nuclear translocation during 3D invasion. *The Journal of cell biology*. 210:583-594.
- Tinevez, J.Y., U. Schulze, G. Salbreux, J. Roensch, J.F. Joanny, and E. Paluch. 2009. Role of cortical tension in bleb growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:18581-18586.
- Tojkander, S., G. Gateva, G. Schevzov, P. Hotulainen, P. Naumanen, C. Martin, P.W. Gunning, and P. Lappalainen. 2011. A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers. *Current biology : CB*. 21:539-550.
- Totsukawa, G., Y. Yamakita, S. Yamashiro, D.J. Hartshorne, Y. Sasaki, and F. Matsumura. 2000. Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *The Journal of cell biology*. 150:797-806.
- Tullio, A.N., D. Accili, V.J. Ferrans, Z.X. Yu, K. Takeda, A. Grinberg, H. Westphal, Y.A. Preston, and R.S. Adelstein. 1997. Nonmuscle myosin II-B is required for normal development of the mouse heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:12407-12412.
- Tullio, A.N., P.C. Bridgman, N.J. Tresser, C.C. Chan, M.A. Conti, R.S. Adelstein, and Y. Hara. 2001. Structural abnormalities develop in the brain after ablation of the gene encoding nonmuscle myosin II-B heavy chain. *The Journal of comparative neurology*. 433:62-74.
- Turner, C.E., J.R. Glenney, Jr., and K. Burridge. 1990. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. *The Journal of cell biology*. 111:1059-1068.
- Tzima, E., M.A. Del Pozo, W.B. Kiosses, S.A. Mohamed, S. Li, S. Chien, and M.A. Schwartz. 2002. Activation of Rac1 by shear stress in endothelial cells mediates both cytoskeletal reorganization and effects on gene expression. *The EMBO journal*. 21:6791-6800.

- Tzima, E., M. Irani-Tehrani, W.B. Kiosses, E. Dejana, D.A. Schultz, B. Engelhardt, G. Cao, H. DeLisser, und M.A. Schwartz. 2005. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*. 437:426-431.
- Vallenius, T. 2013. Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells. *Open biology*. 3:130001.
- Verkhovsky, A.B., und G.G. Borisy. 1993. Non-sarcomeric mode of myosin II organization in the fibroblast lamellum. *The Journal of cell biology*. 123:637-652.
- Verkhovsky, A.B., T.M. Svitkina, und G.G. Borisy. 1995. Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. *The Journal of cell biology*. 131:989-1002.
- Vicente-Manzanares, M., C.K. Choi, und A.R. Horwitz. 2009a. Integrins in cell migration--the actin connection. *Journal of cell science*. 122:199-206.
- Vicente-Manzanares, M., M.A. Koach, L. Whitmore, M.L. Lamers, und A.F. Horwitz. 2008. Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *The Journal of cell biology*. 183:543-554.
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, und A.R. Horwitz. 2009b. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:778-790.
- Vicente-Manzanares, M., K. Newell-Litwa, A.I. Bachir, L.A. Whitmore, und A.R. Horwitz. 2011. Myosin IIA/IIB restrict adhesive and protrusive signaling to generate front-back polarity in migrating cells. *The Journal of cell biology*. 193:381-396.
- Vicente-Manzanares, M., J. Zareno, L. Whitmore, C.K. Choi, und A.F. Horwitz. 2007. Regulation of protrusion, adhesion dynamics, and polarity by myosins IIA and IIB in migrating cells. *The Journal of cell biology*. 176:573-580.
- Vogel, V., und M. Sheetz. 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7:265-275.
- Wang, F., M. Kovacs, A. Hu, J. Limouze, E.V. Harvey, und J.R. Sellers. 2003. Kinetic mechanism of non-muscle myosin IIB: functional adaptations for tension generation and maintenance. *The Journal of biological chemistry*. 278:27439-27448.
- Warrick, H.M., und J.A. Spudich. 1987. Myosin structure and function in cell motility. *Annual review of cell biology*. 3:379-421.
- Wassie, A.T., Y. Zhao, und E.S. Boyden. 2019. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. *Nature methods*. 16:33-41.
- Wen, Q., und P.A. Janmey. 2011. Polymer physics of the cytoskeleton. *Current opinion in solid state & materials science*. 15:177-182.
- Wong, A.J., T.D. Pollard, und I.M. Herman. 1983. Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science*. 219:867-869.
- Wylie, S.R., und P.D. Chantler. 2008. Myosin IIC: a third molecular motor driving neuronal dynamics. *Molecular biology of the cell*. 19:3956-3968.
- Xie, P., S.X. Dou, und P.Y. Wang. 2006. Model for kinetics of myosin-V molecular motors. *Biophysical chemistry*. 120:225-236.
- Xu, K., H.P. Babcock, und X. Zhuang. 2012. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nature methods*. 9:185-188.

- Yam, P.T., C.A. Wilson, L. Ji, B. Hebert, E.L. Barnhart, N.A. Dye, P.W. Wiseman, G. Danuser, und J.A. Theriot. 2007. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *The Journal of cell biology*. 178:1207-1221.
- Yoshinaga, N., J.F. Joanny, J. Prost, und P. Marcq. 2010. Polarity patterns of stress fibers. *Physical review letters*. 105:238103.
- Zenker, J., M.D. White, M. Gasnier, Y.D. Alvarez, H.Y.G. Lim, S. Bissiere, M. Biro, und N. Plachta. 2018. Expanding Actin Rings Zipper the Mouse Embryo for Blastocyst Formation. *Cell*. 173:776-791 e717.
- Ziebert, F., und W. Zimmermann. 2004. Pattern formation driven by nematic ordering of assembling biopolymers. *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. 70:022902.
- Zimerman, B., T. Volberg, und B. Geiger. 2004. Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading. *Cell motility and the cytoskeleton*. 58:143-159.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung einer SF in nicht-muskulären Zellen.	4
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der SF-Subtypen in polarisierten Zellen.	6
Abbildung 1.3: Hexamerstruktur und bipolare Anordnung von Myosin II Filamenten.....	9
Abbildung 1.4: Phylogenetischer Stammbaum der Klasse II Myosine nach Golomb et al.....	9
Abbildung 1.5: Hexamer-Struktur und Kombinatorik der NM II-Isoformen.	13
Abbildung 1.6: Aktivierung, Assemblierung und Disassemblierung von NM II-Filamenten.	15
Abbildung 1.7: Konkave Aktinbögen und Spannungs-Elastizitätsmodell nach Bischofs et al.	21
Abbildung 3.1: Plasmid System zur Erzeugung von KO-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9.....	35
Abbildung 3.2: Verwendete Muster für die Herstellung von mikrostrukturierten 2D-Substraten.....	38
Abbildung 3.3: μ CP-basierte Herstellungsmethoden von strukturierten 2D-Substraten.	41
Abbildung 3.4: Herstellung von 3D Mikrostrukturen mittels DLS.	43
Abbildung 3.5: Bestimmung der Spanndistanz d auf mikrostrukturierten 2D-Substraten.	46
Abbildung 4.1: Kreisbogenförmige Zellkontur und $R(d)$ -Abhängigkeit in NIH 3T3 Fibroblasten.	49
Abbildung 4.2: Zelluläre Phänotypen und Aktinfasern in 3D Mikrostrukturen.	51
Abbildung 4.3: Quantitative Analyse und Modellierung der Phänotypen in 3D Mikrostrukturen.	53
Abbildung 4.4: Vergleich von Blebbistatin-behandelten und NM IIA-defizitären Zellphänotypen.	55
Abbildung 4.5: Expression und subzelluläre Lokalisation der NM II-Isoformen in U2OS Zellen.	57
Abbildung 4.6: Bipolare Filament-Strukturen der NM II-Isoformen in U2OS Zellen.	59
Abbildung 4.7: Erzeugung und Validierung von stabilen NM II-KO Zelllinien mittels CRISPR/Cas9.....	60
Abbildung 4.8: Phänotypischer Vergleich der Aktinstruktur in NM II-KO Zellen.	62
Abbildung 4.9: Phänotypischer Vergleich von Fokalkontakten in NM II-KO Zellen.	63
Abbildung 4.10: Phänotypischer Vergleich von Adhärenzkontakten in NM II-KO Zellen.	64
Abbildung 4.11: Vergleich der Zellmigration in NM II-KO Zellen.	66
Abbildung 4.12: Darstellung der verwendeten Kreuz-Substrate und der quantitativen Analyse.....	67
Abbildung 4.13: Phänotypen von NM II-KO Zellen auf strukturierten Kreuz-Substraten.	69
Abbildung 4.14: Quantitative Analyse der NM II-KO Zelllinien auf strukturierten Kreuz-Substraten. .	71
Abbildung 4.15: Molekulare Dynamik von NM IIA und NM IIB.....	72
Abbildung 4.16: Schematische Darstellung der verwendeten NMHC IIA Mutanten.	75
Abbildung 4.17: Die Blockierung der NMHC IIA-Phosphorylierung führt zum Verlust der $R(d)$ -Abhängigkeit.	76
Abbildung 4.18: Quantitativer Vergleich der $R(d)$ -Abhängigkeit aus Abbildung 4.17.....	78
Abbildung 4.19: pRLC-Intensität und Paralog-Lokalisation in NM IIA-KO und NM IIB-KO Zellen.	81
Abbildung 4.20: Das Phosphorylierungslevel der RLC wird durch die NMHC IIA gesteuert.	82
Abbildung 4.21: NM IIA initiiert die Bildung heterotypischer Filamente.	85

Abbildung 5.1: Einfluss von NM IIA und NM IIB auf Spannung und Elastizität im TEM.....	96
Abbildung 5.2: Modell der NM II-vermittelten Aktomyosin-Kontraktilität ausgehend von heterotypischen NM IIA/NM IIB-Filamenten.....	106
Abbildung A1: Die Überexpression von NM IIB kann den Verlust von NM IIA nicht kompensieren.	112
Abbildung A2: Die Überexpression von NM IIA kann die $R(d)$ -Abhängigkeit in NM IIB-KO Zellen nicht retten.	113
Abbildung A3: RLC- oder NM IIB-Überexpression können die Phosphorylierung der RLC nicht retten.	115
Abbildung A4: NM IIA-Mutanten, NM IIB Lokalisation und Formierung heterotypischer Filamente.	116

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	23
Tabelle 2: Puffer und Lösungen.....	25
Tabelle 3: Antibiotika und Toxine.....	26
Tabelle 4: Kulturmedien.....	26
Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotid-Sequenzen.....	27
Tabelle 6: Restriktionsendonukleasen und DNA-modifizierende Enzyme.....	27
Tabelle 7: Kits.....	27
Tabelle 8: Primärantikörper.....	28
Tabelle 9: Sekundärantikörper.....	28
Tabelle 10: Affinitätsfarbstoffe.....	29
Tabelle 11: Geräte.....	29
Tabelle 12: Mikroskope und Objektive.....	29
Tabelle 13: Verwendete Plasmide.....	32
Tabelle 14: Verwendete Zelllinien.....	33
Tabelle 15: Zusammensetzung der PCR-Reaktionen.....	36
Tabelle 16: PCR-Protokoll.....	36
Tabelle 17: Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE.....	37
Tabelle 18: Inkubationsschritte für die Proteindetektion in Western Blots.....	37
Tabelle 19: Inkubationsschritte für immunhistochemische Färbungen.....	44
Tabelle 20: FRAP-Profil zur Bestimmung der Dynamik von NM IIA und NM IIB.....	45

11 Abkürzungen

μCP	<i>Microcontact printing</i>
ACD	<i>Assembly competence domain</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDS	<i>Coding sequence</i>
CK II	Casein Kinase II
CRISPR	<i>Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat</i>
DAPI	4',6-Diamidin-3-phenylindol
DLS	Direktes Laserschreiben
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dSF	Dorsale Stressfaser
ELC	<i>Essential light chain</i> (Essentielle leichte Kette)
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
FRAP	<i>Fluorescence recovery after photobleaching</i>
GA	Glutaraldehyd
gDNA	Genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HC	<i>Heavy chain</i> (Schwere Kette)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
IHC	Immunhistochemie
KO	<i>Knockout</i>
MLCK	<i>Myosin light chain kinase</i>
MLCP	<i>Myosin light chain phosphatase</i>
MYH	<i>Myosin heavy chain</i> Gen
NHT	Nicht-helikale Taildomäne
NM II	<i>Non-muscle myosin II</i> (Nicht-muskuläres Myosin II)
NMHC II	<i>Non-muscle myosin heavy chain II</i>
ODM	Octadecylmercaptan
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
rc	<i>reverse complement</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RLC	<i>Regulatory light chain</i> (Regulatorische leichte Kette)
ROCK	<i>Rho-associated Kinase</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	<i>Self-assembled monolayer</i>
SF	Stressfaser
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
SIM	<i>Structured illumination microscopy</i>
TEM	<i>Tension-Elasticity Model</i> (Spannungs-Elastizitätsmodell)
vSF	Ventral Stressfaser
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

12 Publikationen und Manuskripte

Bachmann, M., M. Schäfer, V.V. Mykuliak, M. Ripamonti, L. Heiser, **K. Weißenbruch**, S. Krübel, C.M. Franz, V.P. Hytönen, B. Wehrle-Haller, und M. Bastmeyer. 2018. Force-dependent ligand sensing enables $\alpha V\beta 3$ integrin to differentiate between fibronectin and high-affinity ligands. *bioRxiv* (doi: <https://doi.org/10.1101/200493>)

Unter Begutachtung.

Brand, C.A*, M. Linke*, **K. Weißenbruch***, B. Richter, M. Bastmeyer, und U.S. Schwarz. 2017. Tension and Elasticity Contribute to Fibroblast Cell Shape in Three Dimensions. *Biophysical journal*. 113:770-774.

* Die Autoren trugen gleichermaßen zu der Studie bei.

Danksagung

Allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen. Die großartige Unterstützung vieler Menschen hat dazu geführt, dass ich immer wieder mit neuem Mut, Freude und Enthusiasmus an die Arbeit gegangen bin.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Martin Bastmeyer für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation an seinem Institut anzufertigen. Darüber hinaus bedanke ich mich herzlich für das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung in den letzten Jahren. Die Freiheiten bei der Ausarbeitung des Projektes haben mich ermutigt, eigene Ideen einzubringen und diese umzusetzen. Ich bin mir sicher, dass ich dadurch nicht nur in meiner wissenschaftlichen Entwicklung profitiert habe.

Prof. Dr. Ulrich Schwarz danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats. Des Weiteren bedanke ich mich für die spannenden Diskussionen rund um das Feld der Mechanobiologie sowie für die Vermittlung der entsprechenden physikalischen Grundlagen.

Zahlreiche Leute haben aktiv zu dieser Arbeit beigetragen. Ein großes Dankeschön geht an Marc Hippler und Dr. Benjamin Richter für die Hilfe bei der Herstellung von 3D-Mikrostrukturen. Ich danke Justin Grewe für die Analyse der FRAP-Daten und Philipp Linke für die Bestimmung der Ordnungsparameter. Dr. Yue He und Dr. Ramona Dries danke ich für jegliche Hilfestellungen rund um die Widrigkeiten der Molekularbiologie.

All meinen Kollegen am Institut danke ich vielmals für die immerwährende Hilfsbereitschaft untereinander und die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, welche diese Arbeit vorangebracht haben. Vor allem möchte ich mich aber auch für das herzliche Miteinander bedanken. Durch all die fröhlichen Stunden, welche wir in freundschaftlicher Runde bei Institutsfeiern, Grillabenden oder beim Socializen miteinander verbracht haben, sind die letzten Jahre wie im Fluge vergangen.

Dr. Markus Schäfer und Marc Hippler danke ich besonders für ihre Hilfe und das Interesse an meiner Arbeit, welches weit über das Übliche hinausgegangen ist. Unsere Duelle auf dem Squash-Court sind hart aber stets fair und stellen immer eine willkommene Ablenkung dar, um den manchmal doch etwas frustrierenden Laboralltag hinter sich zu lassen.

Ein weiteres besonderes Dankeschön möchte ich an Dr. Sarah Bertels richten, der guten Seele in der Zellbiologie. Egal ob bei Kaffee, thailändischem Essen oder auf sonstigen kulinarischen Exkursionen durch die Karlsruher Innenstadt, die Gespräche mit dir rund um den Laboralltag und das tägliche Leben sind durch deine offenherzige und ehrliche Art stets eine Bereicherung des Tages.

Meiner Familie und meinen Freunden gebührt größter Dank für den Rückhalt und die Unterstützung in jeglicher Form während der letzten Jahre. Ich weiß, dass ich stets auf euch zählen kann, wenn es darauf ankommt.

Ein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern. Ihr habt mir stets den Rücken freigehalten, habt mich moralisch gestärkt und in all meinen Entscheidungen bedingungslos unterstützt. Ihr habt dafür gesorgt, dass ich heute diese Zeilen schreiben darf und dafür danke ich euch von ganzem Herzen.