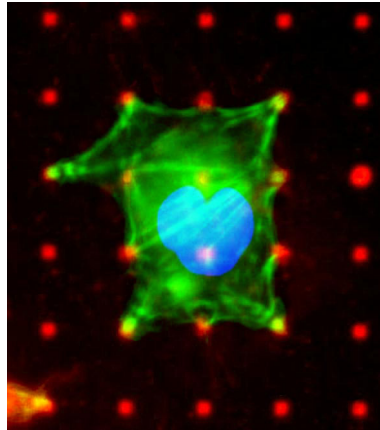


Einfluss von Mikro- und Nanostrukturen auf Zellwachstum und -migration



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie der
Universität Konstanz

vorgelegt von

Dirk Lehnert

Oktober 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 5.12.2003
1. Referent: Prof. Dr. Martin Bastmeyer
2. Referent: Prof. Dr. Dieter Malchow

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgende Publikation eingegangen:

Dirk Lehnert, Bernhard Wehrle-Haller, Christian David, Ulrich Weiland, Christoph Ballestrem, Beat A. Imhof & Martin Bastmeyer

Cell behavior on micropatterned substrates: limits of extracellular matrix geometry for adhesion and spreading

J Cell Sci. 2004 Jan 1;117(Pt 1):41-52.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis Oktober 2002 im Fachbereich Biologie der Universität Konstanz (im Laboratorium von Frau Prof. Dr. C. Stürmer) und von November 2002 bis Oktober 2003 am Institut für allgemeine Zoologie und Tierphysiologie der Universität Jena angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
ZUSAMMENFASSUNG	1
1 EINLEITUNG.....	2
1.1 Die Zelle und ihre Umgebung	2
1.1.1 Die Extrazelluläre Matrix (ECM)	2
1.1.2 Das Aktin-Zytoskelett	4
1.1.2.1 Aufgaben.....	4
1.1.2.2 Aufbau und Struktur	5
1.1.2.3 Organisationsformen.....	5
1.1.2.4 Regulation	6
1.1.3 Die Zell-Matrix-Kontakte	8
1.1.3.1 Integrine und Kontaktausbildung.....	8
1.1.3.2 Komplexität der Kontakte.....	10
1.1.3.3 Diversität und Klassifizierung.....	10
1.1.3.4 Dynamik	11
1.1.4 Zellkräfte und Mechanosensitivität.....	12
1.2 Zweidimensionale Substrate und ihre Herstellung.....	13
1.2.1 Die Problematik von Zellkultursubstraten in vitro.....	13
1.2.2 Microcontact Printing (μ CP).....	14
1.3 Zweidimensionale Substrate in der Zellbiologie	16
1.3.1 Kontrolle über zelluläres Verhalten	16
1.4 Zielsetzung	17
2 MATERIAL UND METHODEN.....	19
2.1 Chemikalien und Lösungsmittel	19
2.2 Entwicklung und Handhabung der Stempel	19
2.2.1 Stempelmuster	19
2.2.2 Herstellung der Stempel	22
2.2.2.1 Herstellung der Stempelformen (Master).....	22
2.2.2.2 Reinigung der Silizium-Master.....	22
2.2.2.3 Silylierung der Silizium-Master	22
2.2.2.4 Herstellung der Silikonstempel	23
2.2.2.5 Verwendete Silikonarten	23
2.2.3 Reinigung der Stempel	24

2.3	Substratherstellung: Homogen beschichtete Substrate	24
2.3.1	Reinigung der Deckgläser	24
2.3.2	Substratbeschichtung.....	25
2.4	Substratherstellung: Strukturierte Substrate mit Gold-Thiol-Chemie	25
2.4.1	Reinigung der Deckgläser	25
2.4.2	Bedampfung der Deckgläser mit Gold.....	25
2.4.3	Stempelvorgang und Proteinbeschichtung.....	25
2.4.4	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen.....	26
2.5	Substratherstellung: Strukturierte Substrate durch direktes Proteinstempeln ..	27
2.5.1	Reinigung der Deckgläser	27
2.5.2	Der Stempelvorgang mit ECM-Proteinen.....	27
2.5.3	Der Stempelvorgang mit Ephrin-A5	27
2.6	Substratherstellung: Strukturierte Substrate durch kovalente Proteinkopplung an Glas.....	27
2.6.1	Reinigung der Deckgläser	27
2.6.2	Aktivierung der Deckgläser	28
2.6.3	Stempelvorgang und Proteinbeschichtung.....	28
2.7	Zellkultur	29
2.7.1	Verwendete Zelltypen	29
2.7.2	Routine-Zellkultur	29
2.7.3	Auszählung der Zellen	30
2.7.4	Zell-Aussaat auf ECM-Substrate	30
2.8	Histochemie.....	30
2.8.1	Ablauf.....	30
2.8.2	Verwendete Primärantikörper	31
2.8.3	Verwendete Sekundärantikörper	31
2.8.4	Andere Färbesubstanzen	32
2.8.5	Herstellung des Einbettmediums („Mowiol“)......	32
2.9	Hilfsmittel zur Auswertung	32
2.9.1	Verwendete Optiken zur Analyse der Präparate	32
2.9.1.1	<i>Mikroskope</i>	32
2.9.1.2	<i>Objektive</i>	32
2.9.1.3	<i>CCD-Kamera</i>	32
2.9.2	Verwendete Software zur Bildbearbeitung, Bildanalyse und Auswertung.....	33
2.9.3	Verwendete Hilfsmittel zur Erstellung der Videozeitrafferaufnahmen	33
2.10	Zeitraffer-Untersuchungen	33
2.11	Quantifizierungen.....	34
2.11.1	Fibronectin-Adsorption auf Thiol-beschichteten Goldsubstraten.....	34
2.11.2	Initiale Zelladhäsion.....	34
2.11.3	Überbrückung anti-adhäsiver Distanzen	34
2.11.4	Zellspreading.....	35
2.11.5	Dottnutzung	35

3	ERGEBNISSE	36
3.1	Charakterisierung der verwendeten mikrostrukturierten Protein-Substrate	36
3.1.1	Das Material des Stempels ist entscheidend für kleine Substratgeometrien	36
3.1.2	Fibronectin adsorbiert selektiv an hydrophob terminierte Alkanthiole und bildet eine Monolage	36
3.2	Grundlegendes Zellverhalten auf mikrostrukturierten Protein-Substraten	38
3.2.1	Die Zelladhäsion saturiert bei einer Proteinbedeckung des Substrates von ca. 20%	38
3.2.2	Die Zellmorphologie wird durch das Substrat stark beeinflusst	41
3.2.3	Zellen bilden funktionelle Kontakte über ECM-Dots aus	41
3.2.4	Für funktionelles Zellspreading ist das Signal der ECM essentiell	44
3.2.5	Staurosporin unterdrückt nicht die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten über strukturierten Substraten	45
3.2.6	Auch Mikrotubuli orientieren sich in Abhängigkeit des unterliegenden Musters	47
3.3	Zellspreading und seine geometrischen Grenzen	48
3.3.1	Zellen migrieren und spreaden durch Ausbildung von Lamellipodien, mit denen sie das strukturierte Substrat „lesen“	48
3.3.1.1	<i>Migration und Spreading über kleine anti-adhäsive Distanzen</i>	48
3.3.1.2	<i>Spreading über größere anti-adhäsive Distanzen</i>	51
3.3.2	Zellen können anti-adhäsive Distanzen von 25 µm überbrücken	52
3.3.3	Fibronectin-Dots einer Fläche von 0,1 µm ² induzieren die Bildung von Zell-Substrat-Kontakten, unterstützen jedoch nur bedingt Zellspreading	54
3.3.4	Für optimales Zellspreading sind mind. 15% Substratbedeckung nötig	57
3.3.5	Zellen nutzen die ihnen zur Verfügung stehenden Kontaktflächen unterschiedlich	61
3.3.6	Reduzierung der ECM-Menge auf identischen Substratgeometrien führt zu veränderter Kontaktbildung	63
3.4	Varianten des Microcontact Printing zur Herstellung mikrostrukturierter Substrate	65
3.4.1	Direktes Stempeln von ECM-Proteinen auf Glas	66
3.4.2	Kovalente Kopplung von ECM-Proteinen auf Glas	67
4	DISKUSSION	70
4.1	Methodisches	70
4.1.1	Biologische Relevanz zweidimensionaler Substrate	70
4.1.2	Substratherstellung	71
4.2	Grundlegendes Zellverhalten auf geometrisch strukturierten Substraten	72
4.2.1	Bisherige Studien und neue Fragestellungen	72
4.2.2	Substratmodifikation durch die Zellen	73
4.2.3	Kontaktzusammensetzung	75
4.2.4	Regulation der Kontakte	76
4.2.5	Kanteneffekt durch Kontrastverstärkung	77
4.2.6	Kanteneffekt durch Kontraktilität	78
4.2.7	Kleine Dots und Kontraktilität	79

4.2.8	Signale statt Kraft.....	82
4.2.9	Zell-Matrix-Interaktionen und Proteinbedarf.....	84
4.2.10	Drei geometrische Grenzwerte für das Zellspreading.....	86
4.3	Ausblick.....	88
5	ANHANG: AXONALE LENKUNG IN EPHRIN-A5-GRADIENTEN.....	91
6	LITERATURVERZEICHNIS	94
7	DANKSAGUNG	102

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha-, oder: anti-	l	Liter
% w/v	Gewichtsprozent pro Volumen	LSM	Laser Scanning Mikroskop
°C	Grad Celcius	M	molar (mol/l)
μCP	Microcontact Printing	m	Meter
μg	Mikrogramm (10^{-6} g)	mAb	monoklonaler Antikörper (zumeist aus Maus)
μl	Mikroliter (10^{-6} l)	max.	maximal
μm	Mikrometer (10^{-6} m)	mbar	millibar (10^{-3} bar)
Abb.	Abbildung	min	Minuten
AFM	atomic force microscope, Rasterkraftmikroskop	mind.	mindestens
APTS	Aminopropyltrimethoxysilan	ml	Milliliter (10^{-6} l)
ATCC	American Type Culture Collection	MLCK	myosin light chain kinase, Myosin-Leichtketten-Kinase
Au	Gold	mM	Millimolar (10^{-3} M)
AVL	Antikörperverdünnungslösung	mm	Millimeter (10^{-3} m)
bzw.	beziehungsweise	N	Newton, oder: normal (z.B. 1 N)
BSA	bovine serumalbumin, Rinderserumalbumin	NaOH	Natriumhydroxid
ca.	circa	NH₃	Ammoniak
cm	Zentimeter (10^{-2} m)	NHS-Ester	N-hydroxysuccinimid-Ester
CMU	Centre Medical Universitaire, Uni Genf	NIH	National Institute of Health
CO₂	Kohlendioxid	nm	Nanometer (10^{-9} m)
Cr	Crom	nN	Nanonewton (10^{-9} N)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole-, dilacetate	NOGI	not of general interest
ddH₂O	Bidest, zweifach destilliertes Wasser	ODM	Octadecylmercaptan
DIC	differential interference contrast, differentieller Interferenzkontrast	OGI	of general interest
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Growth Medium	OTS	Octadecyltrichlorosilan
DMF	Dimethylformamid	p.a.	pro analysis, zur Analyse
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PDMS	Polydimethyl-Siloxan
ECM	Extrazelluläre Matrix	PEG	Polyethylenglykol
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetic acid, Titrierkomplex III	PFA	Paraformaldehyd
EG3-O-Me	Ethylenglykol-3-O-Mercaptan	pkl	polyklonaler Antikörper (zumeist aus Kaninchen)
EGFP	enhanced (verstärkt) grün fluoreszierendes Protein	PLL	Poly-L-Lysin
evtl.	eventuell	pN	Piconewton (10^{-12} N)
FAK	Focal Adhesion Kinase	PT	Phosphotyrosin
FCS	fetal Calf serum, Fötales Rinderserum	RGZ	retinale Ganglienzellen
FN	Fibronectin	s	Sekunden
FN I - III	Fibronektindomäne I - III	s.o.	siehe oben
g	Gramm	s.u.	siehe unten
GFP	grün fluoreszierendes Protein	SAM	self-assembled Monolayer, sich selbst-organisierende Einzelschicht
GTP	Guanosin-triphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
h	Stunden	sog.	sogenannte (-r, -s)
H₂O₂	Wasserstoffperoxid, mind. 30%	Tab.	Tabelle
H₂SO₄	Schwefelsäure	u.a.	unter anderem
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution, Hanks gepufferte Salzlösung	u.ä.	und ähnliches
IgG/M	Immunglobulin G/M	u.U.	Unter Umständen
Kap.	Kapitel	U/min	Umdrehungen pro Minute
		vergl.	vergleiche
		z.B.	Zum Beispiel
		z.T.	zum Teil
		z.Z.	zur Zeit

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1.1	Fibronektinstruktur.	3
Abb. 1.2	Organisationsformen des Aktin-Zytoskeletts.	6
Abb. 1.3	Regulation des Aktin-Zytoskeletts in Fibroblasten.	7
Abb. 1.4	Methodenschema: Microcontact Printing.	16
Abb. 2.1	Stempel 1: Dots.	20
Abb. 2.2	Stempel 2: Kleindots.	20
Abb. 2.3	Stempel 3: Dot- und Liniengradienten.	21
Abb. 2.4	Herstellung der Silikonstempel.	23
Abb. 3.1	Protein-Adsorption auf thiolstrukturierten Substraten: Rasterkraftmikroskopie eines mit Fibronektin beschichteten mikrostrukturierten Substrates.	37
Abb. 3.2	Proteinbedeckung auf 0,1 μm^2 -Dots.	38
Abb. 3.3	Initiale Zelladhäsion: Überblick.	39
Abb. 3.4	Initiale Zelladhäsion: Quantifizierung.	40
Abb. 3.5	Zellmorphologie auf mikrostrukturierten Substraten.	41
Abb. 3.6	Molekulare Zusammensetzung von Zell-Matrix-Kontakten auf mikrostrukturierten Substraten.	42
Abb. 3.7	Zellreaktion auf unspezifisch beschichtete Substrate.	44
Abb. 3.8	Zell-Matrix-Kontakte nach Behandlung mit Staurosporin.	46
Abb. 3.9	Zytoskelett auf mikrostrukturierten Substraten: Mikrotubuli.	47
Abb. 3.10	Zeitrafferaufnahme einer Integrin- β_3 -Zelle auf mikrostrukturiertem Fibronektin-Substrat.	49
Abb. 3.11	Zeitrafferaufnahme einer Aktin-Zelle auf mikrostrukturiertem Fibronektin-Substrat (Dot-Kantenlänge: 3 μm , Abstand: 10 μm).	50
Abb. 3.12	Zeitrafferaufnahme einer Aktin-Zelle auf mikrostrukturiertem Fibronektin-Substrat (Dot-Kantenlänge: 3 μm , Abstand: 20 μm).	51
Abb. 3.13	Zellspreading: Überbrückbare anti-adhäsive Distanzen.	52
Abb. 3.14	Zellspreading: Überbrückung von anti-adhäsiven Distanzen.	53
Abb. 3.15	Einfluß der Dotgröße auf das Zellspreading.	54
Abb. 3.16	Zeitrafferaufnahme einer Zelle auf mikrostrukturiertem Fibronektin-Substrat (Dotgröße: 0,1 μm^2 , Abstand: 5 μm).	55
Abb. 3.17	Substratmodifizierung durch Zellen bei geringen Dotgrößen.	56
Abb. 3.18	B16-Zellen im Fibronektin-Gradienten.	58
Abb. 3.19	Zellen auf Substraten mit unterschiedlicher Fibronektinmenge.	59
Abb. 3.20	Korrelation zwischen präsentierter Fibronektin-Menge und Zellgröße.	60
Abb. 3.21	Nutzung der zur Verfügung stehenden Adhäsionsfläche.	63
Abb. 3.22	Reduzierung der Fibronektinmenge durch Titrierung.	64
Abb. 3.23	Direkt auf Glas gestempeltes Fibronektin.	67
Abb. 3.24	Kovalent auf Glas immobilisiertes Fibronektin.	68
Abb. 3.25	Zellreaktionen auf kovalent an Glas gekoppeltes Fibronektin.	69
Abb. 4.1	Fibronektinsekretion durch Fibroblasten.	74
Abb. 4.2	Abschätzung der an einem Zell-Substrat-Kontakt wirkenden Kräfte.	81
Abb. 5.1	Axonlenkung mit Hilfe von Ephrin-A5-Gradienten.	92

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tab. 2.1	ECM-Proteine für die Substratbeschichtung.	26
Tab. 2.2	Verwendete Zelltypen und Ablösung vom Substrat.	29
Tab. 2.3	Verwendete Primärantikörper und ihre Verdünnungen.	31
Tab. 2.4	Verwendete Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen.	31
Tab. 2.5	Verwendete weitere Färbesubstanzen und ihre Verdünnungen.	32
Tab. 3.1	Zelladhäsion auf unterschiedlich strukturierten Substraten mit gleicher Fibronectinbedeckung.	40
Tab. 3.2	Vergleich der Kontaktkomponenten auf unterschiedlich beschichteten ECM-Substraten.	45
Tab. 3.3	Übersicht: Zellverhalten auf getesteten strukturierten Substraten.	61
Tab. 4.1	Vergleich der Komponenten in unterschiedlichen Kontakt-Typen.	76

Zusammenfassung

Zelladhäsion und -migration spielen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung multizellulärer Organismen. Um ihre Aufgaben zuverlässig erfüllen zu können, werden Zellen in ihren Reaktionen u.a. durch die sie umgebende Extrazelluläre Matrix (ECM) gesteuert. Treten dabei Störungen auf, kann dies zu Fehlfunktionen und krankhaften Entwicklungen führen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der ECM-Geometrie auf das Verhalten von Zelltypen untersucht, die in vivo innerhalb einer dreidimensional strukturierten ECM wachsen. Da die Analyse zellulären Verhaltens in dreidimensionalen Strukturen schwer durchführbar ist, wurden zweidimensional strukturierte Substrate hergestellt. Diese bestehen aus einer zellabweisenden Oberfläche von mehreren mm² Größe, in die eine Vielzahl kleiner, quadratischer Strukturen aus ECM-Protein eingebettet sind. Die Fläche der einzelnen, regelmäßig angeordneten Protein-Inseln („Dots“) wurde zwischen 12 μm² und 0,1 μm², zwischenliegende Abstände zwischen 1 μm und 30 μm variiert. Durch diese Variationen wurden in vivo vorkommende ECM-Organisationen wie z.B. Bindegewebe oder Basallaminae imitiert und auf definierte zweidimensionale Strukturen projiziert.

Zur Herstellung der mikrostrukturierten Substrate wurde die Technik des Microcontact Printing (μCP) eingesetzt und weiterentwickelt. Die kleinsten reproduzierbar erzielten Proteinstrukturen besitzen eine Fläche von 0,1 μm². Mit einer Kantenlänge von 300 nm liegen diese in der Nähe des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens und an der Grenze des technisch möglichen. Erstmals konnte so im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Potenzial dieser Methode voll ausgeschöpft werden.

Auf die Substrate wurden drei Fibroblasten-ähnliche Zelltypen ausplattiert und ihr Verhalten während der ersten Stunde quantitativ analysiert. Die Zellen wachsen über mehrere Protein-Dots, bilden über diesen lokal begrenzt funktionelle Zell-Matrix-Kontakte aus und zeigen eine Morphologie mit rechtwinkligen Ecken und geraden Kanten, die sich strikt am ECM-Muster orientiert. Durch Variation der Muster wurden unterschiedliche Bedeckungen des Substrates mit ECM-Protein erreicht und somit die Analyse der geometrischen Grenzen von Zelladhäsion, Zellspreading und Zellmigration ermöglicht. Es zeigte sich, dass die Anzahl adhärrierender Zellen positiv mit der präsentierten Proteinmenge korreliert und dass ab einer Proteinbedeckung von 20% eine optimale Zelladhäsion erreicht wird. Ein positiver Zusammenhang besteht ebenfalls zwischen Proteinbedeckung und Zellgröße, wobei mindestens 15% Substratbedeckung für optimales Größenwachstum (Zellspreading) nötig sind. Erstaunlicherweise scheint bei den hier getesteten Mustern eine direkte Korrelation des Zellspreading nur mit der Proteinbedeckung, nicht aber mit deren Geometrie zu bestehen. Da sich die Substratbedeckung aus den Dotflächen und -abständen ergibt, wurde der Einfluss der anti-adhäsiven Distanzen auf das Zellspreading untersucht. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Zelltypen Abstände von bis zu 25 μm überbrücken können. Die Variation der Dotfläche ergab, dass ECM-Punkte von 0,1 μm² intrazelluläre Signaltransduktion induzieren und bei Abständen von ≤ 4 μm Zellspreading ermöglichen. Bei größeren Distanzen werden diese Dots jedoch aus dem Substrat gerissen und internalisiert. Protein-Dots einer Größe von bis zu 3 μm² werden über ihre gesamte Fläche von Zellen zur Kontaktbildung genutzt, während 12 μm² große Protein-Dots nur teilweise und hauptsächlich entlang ihrer Kanten eine zelluläre Kontaktbildung aufweisen.

Diese Ergebnisse führten zur Entwicklung neuer Modelle der Zell-Matrix-Interaktionen. Zusätzlich können bestehende Hypothesen mit dem nun verfügbaren System experimentell genauer überprüft werden. Dadurch wird ein besseres Verständnis zellulären Verhaltens erzielt, das beispielsweise zur Optimierung der Oberflächen medizinischer Implantate beitragen kann.

1 Einleitung

Die naturwissenschaftlichen Teildisziplinen Biologie, Physik und Chemie wachsen immer mehr zusammen. Durch diese zunehmende Interdisziplinarität können Synergieeffekte ausgenutzt werden, wie z.B. die Entwicklung der Biochiptechnologie zeigt. Auch die vorliegende Dissertation entsprang einem solchen interdisziplinären Projekt. Methoden aus der Physik wurden in biologischen Systemen und zur Beantwortung biologischer Fragestellungen eingesetzt, angepasst und weiterentwickelt. Mit Hilfe von Microcontact Printing (μ CP) wurden zweidimensional strukturierte Zellkultursubstrate in verschiedenen Geometrien hergestellt. Sie dienten der Untersuchung von Zell-Matrix-Interaktionen und lieferten Erkenntnisse über die geometrischen Grenzen von Zelladhäsion und Zellmigration.

1.1 Die Zelle und ihre Umgebung

1.1.1 Die Extrazelluläre Matrix (ECM)

Zellen interagieren sehr stark mit ihrer Umgebung. Dies gilt für frei lebende einzellige Organismen genauso wie für Zellen innerhalb eines höheren Organismus. Diese Interaktionen erfolgen mit anderen Zellen oder mit der Extrazellulären Matrix (ECM) und spielen eine große Rolle bei der Morphogenese, Entwicklung und Regeneration vielzelliger Organismen (Gumbiner, 1996). Während der Entwicklung eines Organismus ist jede Zelle auf Signale aus dem Umfeld angewiesen, um an der richtigen Stelle und zum richtigen Zeitpunkt zu differenzieren und ihre endgültige Funktion zu übernehmen. Auch in voll entwickelten Organismen erhalten die einzelnen Zellen Informationen aus der Umgebung. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Wundheilung, bei der Makrophagen und Fibroblasten zur Erfüllung ihrer Aufgaben gezielt aktiviert werden.

Grundlegende Bedeutung für die Steuerung des Zellverhaltens in höheren Organismen besitzt die Extrazelluläre Matrix (ECM), die in sehr unterschiedlichen Formen vorliegen kann. Dabei handelt es sich um ein komplexes dreidimensionales Netzwerk von Proteinen und Kohlehydraten, das den Raum zwischen den Zellen füllt. Bindegewebe enthalten einen besonders hohen Anteil an ECM. Die ECM gewährleistet den Zusammenhalt der Zellen in Geweben und trägt zu deren Schutz bei. Ferner spielt sie eine entscheidende Rolle bei der Steuerung von zellulärem Wachstum, zellulärer Wanderung und Differenzierung. Die ECM ist nicht als starres, unveränderliches Gerüst zu sehen, sondern als eine Struktur, die ständig abgebaut, umgebaut und neu aufgebaut wird. Dies gilt nicht nur während der Entwicklung eines Organismus sondern auch in bereits voll entwickelten Individuen. Bei der Wundheilung wird beispielsweise ein sehr grobmaschiges Protein-Netzwerk neu aufgebaut. Dieses Gitter bildet die Grundlage für Zellwanderungen von z.B. Makrophagen und für die Regeneration des verletzten Gewebes. Die ECM kann aber auch in Form äußerst engmaschiger, quasi zweidimensionaler Netze mit einer Dicke von unter 100 nm vorliegen. Diese sog. Basallaminae unterliegen sämtlichen Epithelien und fördern damit den Zusammenhalt der Epithelzellen, die stark in der Basallamina verankert sind. Die ECM kann neben der stützenden und schützenden Funktion einen aktiven Einfluss auf Zellen ausüben, indem sie über signalgebende Proteine direkt das Verhalten der Zellen steuert. Die Beeinflussung des Zellverhaltens kann z.B. über Hormone und Wachstumsfaktoren erfolgen, denen die ECM als

Reservoir dient, oder über spezielle ECM-Komponenten, die sogenannten Multiadhäsionsmatrixproteine. Diese werden von Zellen über spezifische Oberflächenrezeptoren erkannt und greifen so direkt in die Signaltransduktionsweg der Zellen ein. Zu diesen Proteinen gehören Fibronectin, Vitronectin und Laminin.

Fibronectin ist ein sehr häufig vorkommendes Multiadhäsionsmatrixprotein. Man findet es vor allem in Bindegeweben und auf Zelloberflächen, aber auch gelöst in Körperflüssigkeiten wie z.B. Blut. Seine Hauptaufgabe ist die Vermittlung der Zelladhäsion in kollagenreichen Matrices. Aufgrund dieser Funktion reguliert Fibronectin die Zellform und die Zytoskelett-Organisation adhärerender Zellen. Es ist essentiell für die Zellmigration sowie die zelluläre Differenzierung während der Embryogenese (Übersicht in Pankov und Yamada, 2002). Fibronectin ist ein großes glykosyliertes Protein, das zumeist als Dimer zweier langer Ketten vorliegt, die c-terminal über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Ca. 20 verschiedene Spleißvarianten der Fibronectinketten sind bekannt, von denen jede ca. 130 nm lang und 2 – 3 nm dick ist (Engel et al., 1981). Jede Kette besteht aus 29 Domänen, die durch kurze Spacer-Sequenzen voneinander getrennt sind (Abb. 1.1). Eine Fibronectindomäne ist ein Modul, das sich unabhängig von anderen Proteinbereichen in spezifischer Weise faltet. Funktionelle Einheiten von Fibronectin, wie z.B. Bindestellen für andere Proteine, können mehrere Domänen umfassen. Über das gesamte Protein verteilt, befinden sich Bindestellen, die die Interaktion von Fibronectin mit einer Vielzahl anderer Proteine ermöglichen. Zu den

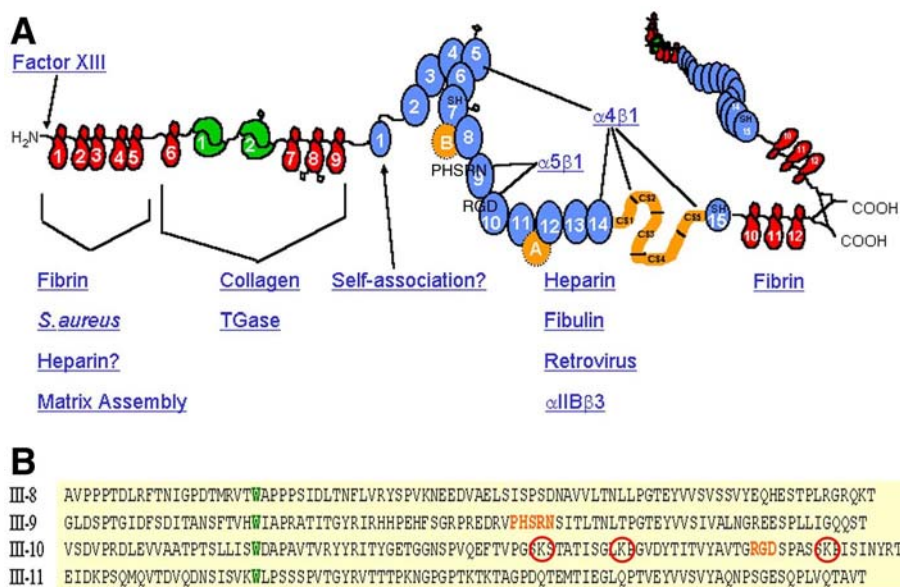


Abb. 1.1: Fibronectinstruktur.

(A) Modell eines Fibronectin-Dimers. Die beiden Fibronectinketten sind carboxy-terminal über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (rechts). Jede Kette besteht aus aneinandergereihten Fibronectindomänen, die durch kurze Spacer voneinander getrennt sind. Die drei Typen von Fibronectindomänen sind farblich unterschieden: FN I (rot), FN II (grün) und FN III (blau). Potenzielle Interaktionsbereiche mit anderen Proteinen (blaue Schrift) sind angegeben. Für die Zelladhäsion wichtig sind vor allem die beiden synergistisch wirkenden Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Bindestellen in FN III₉₊₁₀. (B) Aminosäuresequenz der Fibronectindomänen FN III₈₋₁₁. Die Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Bindestellen sind orange hervorgehoben. Lysine (K), die sich in Nähe der Bindestellen befinden und zur Inaktivierung von Fibronectin durch Reaktion mit NHS-Estern führen könnten (Kap. 3.4.2), sind mit roten Kreisen markiert.

Abb. modifiziert nach Ingham, 2003.

mit Fibronectin interagierenden Proteinen gehören Kollagene, Bestandteile des Blutes wie z.B. Heparin sowie zelluläre Oberflächenrezeptoren wie beispielsweise die Integrine (Abb. 1.1). Verschiedene Zelltypen wie Fibroblasten und Neurone besitzen Oberflächenrezeptoren für Fibronectin. Ihnen dient die Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD-Sequenz) in der Fibronectindomäne FN III₁₀ als Erkennungssequenz. Sie ist hoch konserviert und findet sich auch in anderen Multiadhäsionsproteinen. In der Domäne FN III₉, also im zur RGD-Sequenz benachbarten Modul, befindet sich eine synergistisch wirkende Sequenz der Aminosäurefolge PHSRN (Abb. 1.1). Sie sorgt für eine optimale Adhäsion des Hauptrezeptors für Fibronectin (Integrin- $\alpha_5\beta_1$). Fibronectin kann direkten Einfluss auf das Verhalten einer Zelle ausüben, indem es Zelladhäsion vermittelt und intrazelluläre Signalkaskaden induziert. Eine gute Übersicht über die Eigenschaften von Fibronectin liefert Pankov und Yamada, 2002.

Vitronectin ermöglicht Zelladhäsion ebenfalls über die RGD-Signalsequenz und beeinflusst in ganz ähnlicher Weise das Zellverhalten. Ein drittes Adhäsion-vermittelndes ECM-Molekül ist Laminin. Im Gegensatz zu Fibronectin und Vitronectin verfügt es nicht über eine RGD-Signalsequenz und besitzt eine andere Struktur. Die Zelladhäsion auf Laminin wird über eine eigene Gruppe von Integrin-Rezeptoren vermittelt.

1.1.2 Das Aktin-Zytoskelett

Für die Erfüllung ihrer Aufgabe müssen Zellen genau definierte Eigenschaften besitzen. In der Regel bedürfen diese Spezialisierungen der Ausbildung einer bestimmten Morphologie (z.B. Neurone mit langem Axon) und/oder Beweglichkeit (z.B. migrierende Fibroblasten). Beides wird den Zellen vor allem von einer Klasse der Zytoskelett-Filamente ermöglicht, den Mikrofilamenten oder Aktinfilamenten (Lauffenburger und Horwitz, 1996).

1.1.2.1 Aufgaben

Das bisherige Wissen um die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts und seine Bedeutung für die Zellentwicklung, -morphologie und -migration entspringt vor allem Zellkulturversuchen auf homogenen Substraten. Im Unterschied zu geometrisch strukturierten, zweidimensionalen Substraten enthalten homogene Substrate lediglich eine biochemische Information, die gleichmäßig über das gesamte Substrat verteilt ist. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit für homogene Substrate auch der Begriff „eindimensionale Substrate“ verwendet. Solche eindimensionalen Zellunterlagen sind eine relativ unnatürliche Umgebung für die Zellen (siehe auch Kap. 1.2.1). Dennoch ist zu erwarten, dass die bisher entdeckten Grundprinzipien auf die Situation *in vivo* übertragbar sind. Lässt man Fibroblasten oder ähnliche Zellen in Kultur auf einem homogenen, mit ECM-Protein beschichteten Substrat adhären, organisieren sie ihr Aktin-Zytoskelett nach einem bestimmten zeitlichen Ablauf. In der ersten Phase der Adhäsion kommen die Zellen in Kontakt mit dem Substrat und haften am ECM-Protein. Es folgt eine Phase des Abflachens und Ausbreitens, in der die Zellen aufgrund von Integrin-Signalen eine zunehmende Fläche des unterliegenden Substrates bedecken (Spreading). Das Spreading erfolgt durch Ausbildung von peripheren Membranausstülpungen. Dabei wird das Aktin so organisiert, dass flächige Lamellipodien und fingerförmige Filopodien entstehen. Diese tasten die nahe Zellumgebung ab und werden durch kleine Zell-Matrix-Kontakte (Fokalkomplexe, Kap. 1.1.3.3) stabilisiert. Innerhalb einer Stunde erreichen die Zellen ihre maximale Größe und beginnen, Aktin in dicken Bündeln, den

sog. Stressfasern, zu organisieren. Da die Stressfasern auch Myosin II enthalten, können die Zellen über sie Zugkräfte auf das Substrat ausüben. Die Zugkräfte sind für die typische aufgespannte Morphologie adhärent wachsender Zellen verantwortlich. Außerdem bewirken sie die Reifung und Vergrößerung der anfangs kleinen Fokalkomplexe zu Fokalkontakten (Kap. 1.1.3.3).

Migrierende Zellen bilden eine stark asymmetrische Morphologie aus, wobei ähnliche Vorgänge wie beim Spreading ablaufen. Zunächst werden aktinreiche Lamellipodien und Filopodien ausgebildet (Small et al., 2002), die durch Fokalkomplexe stabilisiert werden. Während die Filamente im dichten Aktinengeflecht des Lamellipodiums zur Zellperipherie hin polymerisieren und die Zellfront vorantreiben, werden sie an der Basis des Lamellipodiums teilweise wieder abgebaut. Zwischen dem führenden Lamellipodium und dem eigentlichen Zellkörper entsteht eine aktinärmere, flächige Zone, die als Lamelle bezeichnet wird (Ballestrem et al., 1998). In Fibroblasten bilden hier die Aktinfilamente, die nicht an der Basis des Lamellipodiums depolymerisiert wurden, Stressfasern aus. Sie enthalten neben Aktin auch Myosin II und können daher Zugkräfte entwickeln (s.o.). Mit Hilfe der Zugkräfte wird der Zellkörper dem führenden Lamellipodium nachgezogen. Für einen reibungslosen Ablauf der Migration bedarf es einer kontrollierten Ablösung der Zell-Matrix-Kontakte im hinteren Bereich der Zelle (Palecek et al., 1998; Horwitz und Parsons, 1999; Ballestrem et al., 2000). Da bei all diesen Prozessen Aktin eine zentrale Rolle spielt, muss die Organisation des Aktin-Zytoskeletts genau geregelt werden. Die zu Grunde liegenden Mechanismen werden in Kap. 1.1.2.4 näher erläutert.

1.1.2.2 Aufbau und Struktur

Aktin ist das häufigste intrazelluläre Protein eukaryotischer Zellen. Die globulären Aktin-Monomere (G-Aktin) lagern sich zu polaren Filamenten zusammen (F-Aktin), die ihrerseits wieder in unterschiedlichen Strukturen organisiert werden (Abb. 1.2). Allen Filamenten gemeinsam ist ihre Dynamik. Sie werden an beiden Enden kontinuierlich auf- und abgebaut. Dies geschieht aufgrund der Polarität der Filamente jeweils mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Es bilden sich ein sog. „stumpfes“ Ende („+“-Ende) mit höherer und ein „spitzes“ Ende („-“-Ende) mit geringerer (De-) Polymerisierungsrate aus. Der ständige Auf- und Abbau der Filamente gewährleistet, dass die Zelle flexibel und schnell auf eine veränderte Umgebung reagieren kann.

1.1.2.3 Organisationsformen

Die einzelnen Filamente lagern sich zu unterschiedlichen übergeordneten Strukturen zusammen. Eine stark vereinfachte Übersicht über diese Strukturen zeigt Abb. 1.2 anhand einer migrierenden Zelle. Die verschiedenen Organisationsformen lassen sich in unipolare und bipolare Strukturen einteilen. Unipolare Strukturen enthalten nur Filamente gleich orientierter Polarität. Sie haben alle ihr schnell polymerisierendes, stumpfes Ende zur Zellperipherie gerichtet. Durch die Polymerisation wird die Plasmamembran nach außen geschoben und Ausstülpungen der Plasmamembran entstehen. Lagern sich die Filamente parallel zusammen, entstehen die fingerförmigen Filopodien. Lamellipodien bilden sich, wenn die Aktinfilamente nicht parallel zueinander liegen, sondern zu einem feinen Netzwerk polymerisieren. Ein besonderes Merkmal der hoch beweglichen, unipolaren Strukturen ist, dass sie sich ohne Verankerung im Substrat entwickeln und ausbilden können. Die bipolaren

Strukturen hingegen sind auf solche Verankerungen angewiesen. Sie enthalten neben entgegengesetzt orientierten Aktinfilamenten zusätzlich Myosin II und besitzen daher die Fähigkeit, zu kontrahieren. Zu dieser Gruppe gehören die Stressfasern stationärer und migrierender Zellen. Die Ausbildung von intrazellulärem Zug ist für adhären wachsende Zellen essentiell. Er sichert ihr Überleben und trägt wesentlich zur Organisation von Zell-Matrix-Kontakten bei (Kap. 1.1.4).

Die Zusammenlagerung und Stabilisierung der unterschiedlichen Aktinstrukturen wird von einer Vielzahl von Proteinen gesteuert und vermittelt. Sie interagieren mit mehreren Aktinfilamenten und vernetzen diese. Kurze Vernetzungsproteine wie z.B. Fascin sorgen für eine parallele Zusammenlagerung der Filamente zu dicken Bündeln, wie sie in Filopodien und Stressfasern vorkommen. Filamin dagegen ist beispielsweise ein längeres Vernetzungsprotein und verknüpft Filamente zu einem feinen Geflecht.

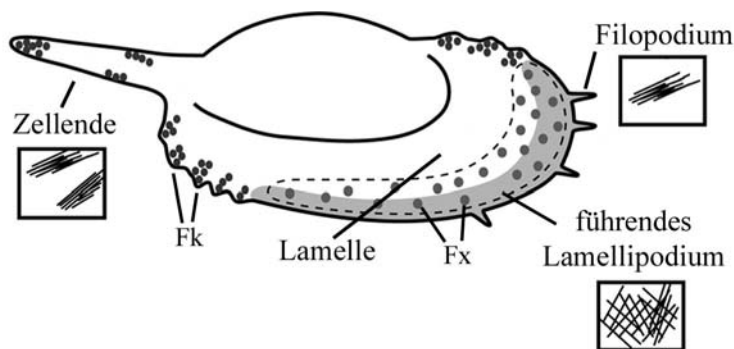


Abb. 1.2:
Organisationsformen des Aktin-Zytoskeletts.

Schematische Darstellung einer migrierenden Zelle. Rechteckig umrandet sind die im jeweiligen Zellbereich vorliegenden faserigen oder netzförmigen Aktinstrukturen. Die Lamelle enthält keine besonders ausgeprägten Strukturen und bildet den Übergang vom Lamellipodium zum Zellkörper.

Fk = Fokalkontakt, Fx = Fokal-komplex

Modifiziert nach Ballestrem et al., 2001.

1.1.2.4 Regulation

Die Ausbildung der beschriebenen Strukturen wird durch die Aktivität der Rho-Familie der monomeren GTPasen (Rac1, Cdc42, RhoA) gesteuert. Rac1 bewirkt die Bildung des flachen Aktin-Netzwerkes von Lamellipodien. Aktinbündel in Filopodien entstehen aufgrund von Cdc42 und Stressfasern werden durch RhoA-Aktivität induziert. Das Lamellipodium gilt als der Entstehungsort der Aktinfilamente einer Zelle (Small et al., 1998). Hier wird die Aktinpolymerisation durch Rac1 induziert und die entstehenden kleinen Filamente bilden den Ausgangspunkt für den Aufbau der höheren Aktin-Strukturen, d.h. der Stressfasern und feinen Aktinengeflechte. Das Zusammenspiel der drei GTPasen bedingt die unterschiedlichen Aktin-Organisationsmuster innerhalb einer Zelle. Aber auch die Integrin-vermittelten Signale aus der Zellumgebung spielen eine Rolle (Kap. 1.1.3.1). Die Aktinorganisation in Zellen variiert, je nachdem ob sie auf einem ECM-Substrat oder einem unspezifisch adhäsiven Substrat wachsen. Abb. 1.3 soll anhand einiger Beispiele experimente die Einflüsse der drei Rho-GTPasen in Kombination mit dem Substrat verdeutlichen.

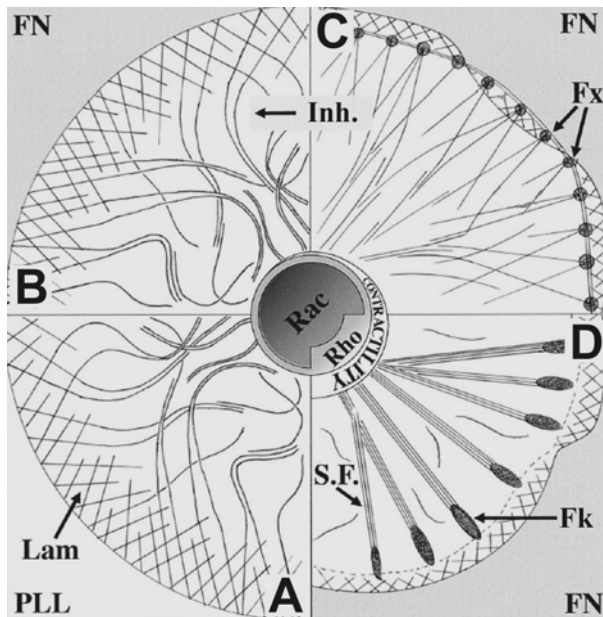


Abb. 1.3:
Regulation des Aktin-Zytoskeletts in Fibroblasten.

Die Zellen spreaden entweder auf Fibronectin (FN) oder Poly-L-Lysin (PLL). Mittig ist die Aktivität der monomeren Rho-GTPasen Rac und RhoA angegeben. (A) Auf Poly-L-Lysin bildet sich ein großes Lamellipodium (Lam) aus, dem lose Aktinbündel ins Zellinnere entspringen. (B) Auf Fibronectin ist das Aktin-Zytoskelett sehr ähnlich zu (A) organisiert, wenn zusätzlich zur Hemmung von RhoA jegliche weitere zelluläre Kontraktilität durch Inhibitoren (Inh.) unterdrückt wird. (C) Ausbildung eines peripheren Rings aus Fokalkomplexen (Fk) bei Unterdrückung der Rho-Aktivität auf Fibronectin. Es entwickelt sich nur ein sehr kleines Lamellipodium. (D) Ausbildung von Stressfasern (S.F.) und großen Fokalkontakten (Fk) unter Einfluss von RhoA auf Fibronectin. Modifiziert nach Small et al., 1999.

Die Kulturbedingungen von Fibroblasten sind *in vitro* sehr genau kontrollierbar. Sie können auf chemisch definierten Substraten und in definierten Medien gezogen werden. Der Einfluss unbekannter Stimuli kann dadurch weitgehend ausgeschaltet werden. In diesem System können die Zellen durch Präsentation bestimmter Substrate und Applikation bestimmter Substanzen gezielt manipuliert werden. Lässt man Fibroblasten auf unspezifisch adhäsivem Poly-L-Lysin wachsen, wird das Clustern von Integrinen und die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten unterdrückt (Hotchin und Hall, 1995). Aktiviert man in solchen Zellen Rac, entwickeln sie in der Peripherie ein sehr breites, engmaschiges Aktin-Netzwerk und extrem große Lamellipodien (Machesky und Hall, 1997; Flinn und Ridley, 1996). Diesem Aktinengeflecht entspringen einige Aktinbündel, die sich in loser Anordnung ins Zellinnere erstrecken (Abb. 1.3 A) (Small et al., 1999). Fibroblasten dagegen, die auf Fibronectin kultiviert werden, erhalten Integrin-vermittelte Signale der ECM und bilden kleine Kontaktstellen aus (Hotchin und Hall, 1995). Das Erscheinungsbild dieser Kontakte und des Aktin-Zytoskeletts hängt von der Aktivität der verschiedenen Rho-GTPasen ab (Abb. 1.3 B – D). Ist z.B. Rac aktiv und wird gleichzeitig RhoA unterdrückt, finden sich Fokalkomplexe lediglich ringförmig verteilt am Zellrand (Abb. 1.3 C) (Nobes und Hall, 1995). Außerhalb des Kontakttringes existiert ein schmales aber sehr aktives und bewegliches Lamellipodium. Ferner erstrecken sich ausgehend von den peripheren Fokalkomplexen Aktinbündel ins Zytoplasma. Unterbindet man in solchen Zellen die Ausbildung jeglicher weiterer Kontraktilität durch Inhibitoren, ähnelt das Erscheinungsbild der Zellen stark den Rac-aktivierten Zellen auf Poly-L-Lysin (Abb. 1.3 B) (Small et al., 1999). Dies lässt darauf schließen, dass die Organisation des Aktin-Zytoskeletts durch Zell-Matrix-Kontakte und intrazelluläre Kontraktilität beeinflusst wird. Die gegenseitigen Wechselwirkungen von Zell-Matrix-Kontakten, Aktin-Zytoskelett und Myosin-vermittelter Kontraktilität werden auch bei gesteigerter Rho-Aktivität deutlich. Auf Fibronectin kultivierte Fibroblasten bilden unter Einfluss von RhoA vergrößerte Zell-Matrix-Kontakte aus, an denen dicke Aktinbündel ansetzen (Abb. 1.3 D) (Small et al., 1999; Verkhovskiy et al., 1995). RhoA vermittelt die Ausbildung von Stressfasern, myosingetriebene Kontraktilität (Chrzanowska-Wodnicka und Burridge, 1996) sowie die Reifung von Zell-Matrix-Kontakten (Kap. 1.1.3). Die Bedeutung

der intrazellulären Zugentwicklung für die Aktin-Organisation zeigt sich auch in Experimenten mit Zellen, die auf flexiblen Silikon- oder Polyacrylamid-Substraten unterschiedlicher Härte kultiviert werden. Da sich die intrazellulären Kräfte über Zell-Matrix-Kontakte auf das Substrat übertragen, werden weiche Unterlagen durch Zellen deformiert. Sie erlauben es daher nicht, intrazelluläre Spannungen zu entwickeln und die Ausbildung von Stressfasern sowie großer Fokalkontakte wird verhindert (Pelham und Wang, 1997; Katz et al., 2000).

Die Beschaffenheit des Substrates und das Zusammenspiel der Rho-GTPasen sind also von entscheidender Bedeutung für die Organisation des Aktin-Zytoskeletts. Da die unterschiedlichen Organisationsmuster nebeneinander in einer Zelle vorkommen und auch ineinander umorganisiert werden, muss die Aktivität der GTPasen strikt reguliert werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch weitgehend unbekannt. Ein Modell schlägt Aktin-Subkompartimente innerhalb der Zelle vor, die räumlich getrennt sind (Small et al., 1999). Nach diesem Modell werden in der Zellperipherie unter dem Einfluss von Rac1 ein feines Aktin-Netzwerk und Fokalkomplexe gebildet. Diese Strukturen unterliegen einer hohen Umsatzrate und werden u.U. wieder abgebaut. Existieren sie lange genug, geraten sie an der Basis des Lamellipodiums unter den Einfluss von RhoA, das zentral in der Zelle aktiv ist. Es entstehen Stressfasern und durch deren Zugeinwirkung größere Fokalkontakte. Während Rac1 und auch Cdc42 für die Ausbildung neuer Aktinstrukturen und Kontakte notwendig sind, sorgt RhoA für die längerfristigen Strukturen und Verankerung der Zelle auf dem Substrat. Die Effekte der Rho-GTPasen auf das Zytoskelett sind unumstritten. Die genauen Mechanismen werden aber nur langsam besser verstanden. Gute Übersichten hierüber bieten Hall, 1998, Defilippi et al., 1999 sowie Ridley, 2001.

1.1.3 Die Zell-Matrix-Kontakte

Zell-Matrix-Kontakte bilden die Schnittstellen zwischen intrazellulärem Zytoskelett und Extrazellulärer Matrix. Ihnen kommt daher bei Zelladhäsion und -migration eine besondere Bedeutung zu. Ihre Entstehung beruht auf Integrin-vermittelten Signalen der ECM. Reguliert werden sie in engem Zusammenspiel mit dem Aktin-Zytoskelett. Dieses Kapitel soll die Entstehung, Zusammensetzung und unterschiedlichen Erscheinungsformen der Zell-Matrix-Kontakte vorstellen.

1.1.3.1 Integrine und Kontaktausbildung

Die Integrine sind Ausgangspunkt für die Bildung und wichtiger Bestandteil von Zell-Matrix-Kontakten. Neben den Proteoglykanen bilden sie eine Klasse zellulärer Transmembran-Oberflächenrezeptoren für Zell-Matrix-Interaktionen. Sie stehen intrazellulär mit dem Zytoskelett in Verbindung und vermitteln dessen Kopplung an die umgebende Matrix. Die Integrine sind als nicht kovalent verbundene Heterodimere aufgebaut, die aus je einer α - und β -Untereinheit bestehen. Bisher wurden 18 verschiedene α -Untereinheiten sowie acht unterschiedliche β -Untereinheiten entdeckt, die sich zu 24 bekannten Kombinationen zusammenlagern können (Hynes, 2002). Jede dieser Kombinationen besitzt eine besondere Affinität für einen bestimmten Liganden. Die Heterodimere sind allerdings nur selten für einen einzigen Liganden spezifisch. So erkennt z.B. der Hauptrezeptor für Vitronektin $\alpha_v\beta_3$ auch Fibronektin, allerdings mit geringerer Affinität. Auch Liganden können häufig an unterschiedliche Integrin-Rezeptoren binden (Hynes, 1992). Die Ligandenbindestelle der

Integrine befindet sich extrazellulär zwischen den beiden Untereinheiten, von denen jede ihren Teil zur Spezifität und Affinität des Rezeptors beiträgt. Die gleiche Untereinheit kann daher in unterschiedlichen Heterodimeren andere Rezeptoraffinitäten bewirken. Zudem wird die Affinität der Integrine durch divalente Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) verstärkt, die sich in der Nähe der Bindestelle in das Heterodimer einlagern.

Eine Zelle kann die Aktivität ihrer Integrine regulieren. Viele Integrine sind nicht ständig aktiv, sondern liegen meist in einem inaktivierten Zustand vor, in dem sie weder ihre Liganden binden noch Signale an die Zelle geben können. Dieser Zustand ist von großer biologischer Bedeutung. Ein gutes Beispiel hierfür ist die Aktivierung von Leukozyten. Bei Stimulation der Zellen z.B. durch Cytokine, werden Integrine der β_2 -Unterfamilie aktiviert, vermitteln das Anheften der Zellen an Gefäßwände und ermöglichen dadurch z.B. den Übertritt der Zellen ins Gewebe und in der Folge Phagozytose. Auch bei der Migration von Fibroblasten könnte die (In-) Aktivierung der Integrine eine Rolle spielen. Wandernde Zellen müssen einerseits über Integrine an der Matrix haften. Andererseits muss die Integrin-Matrix-Interaktion wieder aufgelöst werden, wenn sich die Zelle während der Migration vom Substrat ablöst. Die Steuerung der Integrin-Aktivität ist unter dem Begriff des „inside-out-signaling“ bekannt.

Im Gegensatz dazu steht das sog. „outside-in-signaling“, das bei der Zelladhäsion eine große Rolle spielt. Hier verläuft die Signalvermittlung vom Integrin in die Zelle hinein. Integrine sind prinzipiell frei in der Zellmembran beweglich (Duband et al., 1988). Nach Kontakt mit einem ECM-Liganden clustern sie jedoch und werden auf ihrer zytoplasmatischen Seite über eine Reihe von Proteinen wie z.B. Vinculin, Talin, Paxillin u.a. an Aktinfilamente gekoppelt (Miyamoto et al., 1995). Der entstehende Proteinkomplex bildet eine spezialisierte Struktur, den Zell-Matrix-Kontakt. Die Integrine stellen damit die Verbindung des Aktin-Zytoskeletts zur extrazellulären Umgebung her und beeinflussen seine Organisation maßgeblich. Die genauen Transduktionswege der Integrin-Signale bei der Kontaktbildung sind noch nicht bekannt. Man weiß jedoch, dass Integrine eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes bewirken können. Auch die Phosphorylierung von Tyrosinresten kann ausgelöst werden. Nach einem Integrin-Signal aktiviert sich z.B. die Focal Adhesion Kinase (FAK) durch Autophosphorylierung. Auch andere Tyrosinkinase vor allem der src-Familie werden in Folge eines Integrin-Signals aktiviert. Dies könnte der Start von komplexen Phosphorylierungskaskaden sein und zur Rekrutierung der kontaktspezifischen Proteine über SH2- und SH3-Domänen beitragen. Diese Domänen binden an phosphorylierte Tyrosinreste. In den Zell-Matrix-Kontakten findet sich durch die starken Kinase-Aktivitäten ein hoher Gehalt an Phosphotyrosin. Die Integrin-Signalkaskaden konvergieren oft mit den Transduktionswegen von Rezeptoren für lösliche Wachstumsfaktoren. Sie verlaufen dann z.B. über die Proteinkinase C, den Phosphatidylinositolphosphat-Metabolismus oder den MAP-Kinase-Weg. Die wichtigste Zielgruppe dieser Signalkaskaden hinsichtlich der Zytoskelett-Organisation ist die Rho-Familie der monomeren GTPasen. Über sie wird die Ausbildung von Lamellipodien, Filopodien und Stressfasern gesteuert (Kap. 1.1.2.4). Umfassende Übersichten über die Integrine und ihre Funktionen liefern Schoenwaelder und Burridge, 1999, van der Flier und Sonnenberg, 2001, Danen und Yamada, 2001, Miranti und Brugge, 2002 sowie Hynes, 2002.

Die wichtigsten Integrine für die Zelladhäsion auf den ECM-Proteinen Fibronectin und Vitronectin sind die Heterodimere $\alpha_5\beta_1$ und sowie $\alpha_v\beta_3$. Sie erkennen die für diese Proteine typische RGD-Signalsequenz (Kap. 1.1.1). Während die β_1 -Untereinheit in einer Vielzahl weiterer Integrin-Rezeptoren vorkommt, findet sich die β_3 -Untereinheit ausschließlich im

Heterodimer $\alpha_v\beta_3$. Sie ist daher besonders gut geeignet für Untersuchungen zur Verteilung und Dynamik der Integrine während der Zelladhäsion (Ballestrem et al., 2001).

1.1.3.2 Komplexität der Kontakte

Zell-Matrix-Kontakte sind spezialisierte Strukturen, die einer Zelle Substrathaftung vermitteln. Sie verbinden das Aktin-Zytoskelett mit der ECM und interagieren je nach Aktivität der Zelle und ihrer Position in der Zelle unterschiedlich stark mit dem Substrat (Cox und Huttenlocher, 1998). Der Abstand zwischen der Zellmembran und dem Substrat beträgt in Zell-Matrix-Kontakten ca. 10 – 15 nm. Sie sind in der Regel nur wenige μm^2 groß und enthalten mehr als 50 verschiedene bisher bekannte Proteine (Zamir und Geiger, 2001). Neben den Hauptrezeptoren für die ECM, den Integrinen (Kap. 1.1.3.1), finden sich in den Kontakten weitere Transmembrankomponenten, z.B. Proteoglykane (Zimmermann und David, 1999) und Glykosaminoglykan-Rezeptoren (Bono et al., 2001), sowie ein äußerst komplexes Protein-Netzwerk. Dieses verbindet die Membran mit dem Zytoskelett und vermittelt der Zelle Signale. Das Netzwerk kann zelltypspezifisch unterschiedlich zusammengesetzt sein. Stark verbreitete Komponenten sind Paxillin, Vinculin, Talin, FAK (Focal Adhesion Kinase) sowie weitere Kinasen vor allem der src-Familie. Auch verschiedene Phosphatasen (z.B. SHP-2) und Proteasen (z.B. Calpain) sind oft enthalten. Es ist zu vermuten, dass in den nächsten Jahren noch weitere Komponenten entdeckt werden. All diese Proteine stehen in engen Wechselwirkungen zueinander und jedes Protein kann zumeist mit mehr als zehn anderen Kontaktkomponenten interagieren. Die Komplexität dieser Strukturen wird dadurch noch weiter erhöht, dass die einzelnen Proteine in unterschiedlichen Formen vorliegen können. Viele Proteine kommen in verschiedenen Spleißvarianten vor, werden posttranslational unterschiedlich modifiziert oder durchlaufen Konformationsänderungen. Letztere werden z.B. durch Phosphorylierung von Tyrosinresten bewirkt, einem besonderen Merkmal der Zell-Matrix-Kontakte. Konformationsänderungen können die Interaktionen eines Proteins mit anderen Proteinen innerhalb des Netzes vollkommen verändern. In diesem Zusammenhang sind die Regulationsmechanismen von Vinculin relativ gut untersucht (Übersicht in Jockusch und Rüdiger, 1996).

1.1.3.3 Diversität und Klassifizierung

In Hinblick auf die Komplexität des Aufbaus von Zell-Matrix-Kontakten, ist es nicht verwunderlich, dass Unterschiede in ihrer Morphologie, Zusammensetzung und Funktion existieren. Bei Fibroblasten werden z.B. Fokalkomplexe, Fokalkontakte und fibrilläre Kontakte unterschieden. Fokalkomplexe sind kleine, punktförmige Strukturen in der Zellperipherie. Sie bilden sich vor allem an den Kanten der Lamellipodien unter dem Einfluss der monomeren GTPase Rac1 (Clark et al., 1998 ; Nobes und Hall, 1995; Rottner et al., 1999) und bleiben auch in migrierenden Zellen relativ zum Substrat stationär. Ihre molekulare Zusammensetzung im Vergleich zu den anderen Kontaktklassen wurde bisher noch nicht genau quantitativ bestimmt. Es scheint jedoch, dass sich in ihnen aktives Integrin- $\alpha_v\beta_3$ anreichert (Kiosses et al., 2001). Während der Zellmigration üben sie zudem eine stärkere Zugkraft auf das Substrat aus als andere Kontakte (Beningo et al., 2001). Bei Inhibierung der Rho-vermittelten Kontraktilität treten sie verstärkt an den Zellkanten auf und bilden einen peripheren Ring (Kap. 1.1.2.4; Zamir et al., 1999). Eine Rho-unabhängige Restkontraktilität in der Zelle genügt, um die Fokalkomplexe aufrecht zu erhalten. Wird diese jedoch ebenfalls

unterdrückt, dissoziieren sie und verschwinden (Small et al., 1999). Unter dem Einfluss von RhoA oder bei Anwendung einer externen mechanischen Kraft, reifen die Fokalkomplexe zu klassischen Fokalkontakten (Clark et al., 1998 ; Rottner et al., 1999 ; Riveline et al., 2001). Fokalkontakte sind strichförmige Strukturen in der Zellperipherie, die deutlich größer als Fokalkomplexe sind und einige μm lang werden können. Im Gegensatz zu den Fokalkomplexen sind sie nicht in Lamellipodien migrierender Zellen zu finden, sondern vor allem peripher im nachziehenden Zellkörper. Sie wurden bereits Mitte der 1970iger Jahre elektronenmikroskopisch entdeckt (Abercrombie und Dunn, 1975; Izzard und Lochner, 1976) und enthalten besonders viel Integrin- $\alpha_v\beta_3$, Paxillin und Vinculin (Katz et al., 2000; Zamir et al., 1999). Während die Fokalkomplexe eher stationär sind, wurde bei Fokalkontakten ein Gleiten über das Substrat beobachtet (Smilenov et al., 1999; Ballestrem et al., 2001). Sowohl morphologisch als auch strukturell von den beiden anderen Zell-Matrix-Kontakten verschieden sind die fibrillären Kontakte. Sie unterliegen eher dem Zellzentrum denn der Zellperipherie, sind meist stark verlängerte Strukturen und weisen typischerweise eine hohen Gehalt an Tensin auf. Sie enthalten kaum Integrin- $\alpha_v\beta_3$, dafür jedoch viel Integrin- $\alpha_5\beta_1$. Des Weiteren sind viele Kontaktmarkerproteine (Vinculin, Paxillin, F-Aktin) nur in geringeren Mengen vorhanden (Katz et al., 2000). Ihr augenfälligstes Merkmal ist das Auftreten entlang von Fibronectinfibrillen, woher auch die Bezeichnung „fibrilläre Kontakte“ kommt (Zamir et al., 1999; Katz et al., 2000; Olski et al., 2001).

1.1.3.4 Dynamik

Bei allen Klassen der Zell-Matrix-Kontakte handelt es sich um dynamische Strukturen. Sie werden während des Zellspreading, der Zellmigration und der Zellteilung ständig neu auf-, ab- und umgebaut. Wie beim Aktin-Zytoskelett ist dieser Umsatz nötig, um die Kontakte schnell ihren Aufgaben oder veränderten Bedingungen anpassen zu können. Mit Hilfe der Umsatzrate wird z.B. die Adhäsionsstärke der Kontakte reguliert. Diese Kontrolle ist essentiell für die Zelladhäsion und -migration. So zeigen Fibroblasten ein gestörtes Spreading mit stark vergrößerten Kontakten in der Peripherie, wenn der Umsatz unterbrochen wird (Huttenlocher et al., 1997; Klinghoffer et al., 1999). Bei der Zellmigration interagieren die neu entstehenden Fokalkomplexe im führenden Lamellipodium stark mit der Matrix (Beningo et al., 2001). Die alten Kontakte im nachgezogenen Zellkörper dagegen müssen sich bei Bedarf vom Substrat ablösen und haften schwächer (Cox und Huttenlocher, 1998). Auch hier erfolgt eine Anpassung der Kontakte durch ständigen Umsatz ihrer Komponenten. Innerhalb von 10 min wird in Fokalkontakten der komplette Integrinbesatz ausgetauscht und durch neue Moleküle ersetzt (Ballestrem et al., 2001). Es spielt dabei keine Rolle, ob es sich um einen stationären oder gleitenden Fokalkontakt handelt. In anderen Studien wurde die Dynamik von Paxillin (Zamir et al., 2000; Laukaitis et al., 2001) und α -Actinin in Fokalkontakten (Laukaitis et al., 2001) und Tensin in fibrillären Kontakten untersucht (Zamir et al., 2000). Paxillin taucht in jungen Kontakten (Fokalkomplexen) auf, die sich zunächst vergrößern und dann entweder unter Rho-Einfluss zur Zellmitte gleiten und stabilisieren oder aber wieder verschwinden. Tensin dagegen verlagert sich stets von peripheren Kontakten aus zur Zellmitte und formt dabei fibrilläre Kontakte (Zamir et al., 2000). Dieser Versatz wird durch die Aktivität von myosinhaltigen Aktinstrukturen getrieben (Zamir et al., 2000). Im Gegensatz zu den Fokalkontakten, die nur unter Zug aufrecht erhalten werden, verschwinden die fibrillären Kontakte nicht bei Unterdrückung der Kontraktilität (Zamir et al., 1999; Zamir et al., 2000).

Die Dynamik der unterschiedlichen Kontakte ist also eng mit der Organisation des Aktin-Zytoskeletts und den Eigenschaften der Matrix verknüpft. Dies zeigt sich auch daran, dass auf Substraten mit kovalent immobilisiertem Fibronectin keine fibrillären Kontakte entstehen. Statt dessen finden sich deren Markerproteine Tensin und Integrin- $\alpha_5\beta_1$ in peripheren Kontakten (Katz et al., 2000) wieder. Vor diesem Hintergrund wurde das Modell entwickelt, dass junge Zell-Matrix-Kontakte zunächst nicht differenziert sind. Erst durch die Einwirkung von Kontraktilität entstehen daraus die unterschiedlich spezialisierten Kontaktformen (Zamir und Geiger, 2001). Dies setzt eine Mechanosensorik der Kontaktstellen voraus, da die intrazelluläre Kontraktilität nicht nur vom Aktin-Zytoskelett, sondern auch von der Rigidität der ECM bestimmt wird. Die genaue Funktion einer solchen Sensorik ist noch nicht bekannt, aber es gibt erste Hinweise auf mögliche Mechanismen (Kap. 1.1.4).

1.1.4 Zellkräfte und Mechanosensitivität

Die Entstehung von Zell-Matrix-Kontakten beruht zum Einen auf der biochemischen Aktivierung der Integrin-Rezeptoren. Andererseits üben die Zellen über ihr Zytoskelett und die Integrine Kraft auf die ECM aus. Neben der biochemischen Einflussnahme über die Integrin-Aktivierung bestimmen somit auch die mechanischen Eigenschaften der Matrix das Verhalten einer Zelle. Die Rigidität der ECM bildet die Gegenkraft zur Kontraktilität einer Zelle und ermöglicht dadurch deren Kraftentwicklung. Die Fähigkeit, Kraft auf die ECM auszuüben, ist essentiell für adhärent wachsende Zellen. Besteht diese Möglichkeit nicht, sterben die Zellen apoptotisch ab. Diese spezielle Form der verankerungsabhängigen Apoptose wird Anoikis genannt (Frisch und Francis, 1994; Frisch und Ruoslahti, 1997). Bei der Zellmigration und damit auch bei Wundheilung, Embryogenese und Tumorbildung spielen intrazelluläre Kräfte eine entscheidende Rolle (Martin und Sanes, 1997; Bray, 2001). Im führenden Lamellipodium einer migrierenden Zelle entstehen neue Integrin-Matrix-Kontakte, an denen die treibenden Kräfte für die Zellmigration ansetzen (Beningo et al., 2001). Im hinteren Bereich der Zelle sind die Kräfte abgeschwächt und erlauben das Loslösen der Zelle vom Substrat (Lauffenburger und Horwitz, 1996; Sheetz et al., 1998). Die auftretenden Kräfte sind stets zur Zellmitte gerichtet, was zur Folge hat, dass im Zellzentrum eine Umorientierung der Migrationskräfte stattfindet (Galbraith und Sheetz, 1997; Tan et al., 2003). Die regionalen Unterschiede in der Kontaktmorphologie (Kap. 1.1.3.3) und der Kraftverteilung zeigen, dass Zellen ihre Kontakte und die an ihnen ansetzenden Kräfte während der Migration sehr genau regulieren. Die zu Grunde liegenden Mechanismen bilden schon länger einen Forschungsschwerpunkt (Übersicht in Geiger und Bershadsky, 2002).

Frühe Modellsysteme zur Untersuchung der mechanischen Aktivität einzelner Zellen beruhten auf der Beobachtung, dass Fibroblasten während der Migration über Silikonsubstrate Falten im Substrat erzeugten (Harris et al., 1980). Aufgrund des Faltenmusters wurde vermutet, dass zum Zellzentrum gerichtete Zugkräfte im führenden Lamellipodium für die strukturelle Ausbildung der ECM während der Ontogenese (Harris, 1986) und für die Kontraktion offener Wunden (Ehrlich, 1988; Ehrlich und Rajaratnam, 1990) verantwortlich sind. Diese Untersuchungen lieferten jedoch nur qualitative Analysen. Seit einigen Jahren stehen neu entwickelte Techniken der Substratherstellung zur Verfügung, die es erlauben, die Kraftentwicklung von Zellen auf subzellulärer Ebene quantitativ zu untersuchen. Zum Teil erscheinen die bisherigen Erkenntnisse noch widersprüchlich. Während einerseits bei Kontakten eine positive Korrelation von ausgeübter Kraft und Kontaktfläche gefunden wurde (Lee et al., 1994; Balaban et al., 2001; Galbraith et al., 2002), zeigten andere Arbeiten, dass

kleine Fokalkomplexe große Kräfte ausüben können (Pelham und Wang, 1999; Beningo et al., 2001). Mit der Reifung der Fokalkomplexe zu Fokalkontakten nehmen die ansetzenden Kräfte ab. Tan und Mitarbeiter zeigten eine positive Korrelation von Kontaktfläche und Kraft für Kontakte von $> 1 \mu\text{m}^2$ Größe, fanden diesen Zusammenhang jedoch nicht für $< 1 \mu\text{m}^2$ große Kontakte (Tan et al., 2003). Einigkeit herrscht darüber, dass die Ausübung der Zugkräfte in engem Zusammenhang mit der Kontaktbildung steht und für die Ausbildung der Zellmorphologie entscheidend ist. Die Größenordnung der gemessenen Kräfte liegt bei Fibroblasten zwischen $0,9 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ in der Lamellenregion (Galbraith und Sheetz, 1997) und $5,5 \text{ nN}/\mu\text{m}^2$ in Fokalkontakten (Galbraith und Sheetz, 1997; Balaban et al., 2001; Beningo et al., 2001). Einzelne Fokalkontakte erzeugten Kräfte von bis zu 30 nN (Balaban et al., 2001) oder 75 nN (Tan et al., 2003).

Die Morphologie von Zellen wird durch das Aktin-Zytoskelett und dessen Zugkräfte bestimmt. Die Kräfte werden dabei sehr definiert (Stärke) und gezielt (Ansatzstellen) entwickelt. Für diese Kontrolle müssen die Zellen auch über eine Möglichkeit verfügen, die Kräfte zu messen. Allgemein akzeptiert ist, dass die Zell-Matrix-Kontakte als mechanosensorische Organelle fungieren (Balaban et al., 2001; Galbraith et al., 2002; Rivelino et al., 2001). Die genauen Mechanismen der Mechanosensorik und ihr Einfluss auf die Zellform sind aber noch unklar. Ingber überträgt in seinem „Tensegrity-Modell“ (Ingber, 2003a; Ingber, 2003b) Prinzipien aus der Architektur in die Zellbiologie. Dieses Modell geht davon aus, dass die Form einer Zelle dem Zusammenspiel von mechanischer Spannung und einem stabilisierenden Gerüst entspringt. Durch die Kontraktibilität des Aktin-Zytoskeletts steht nach diesem Modell eine Zelle stets unter einer gewissen Vor- oder Grundspannung. Würde dieser Spannung keine Kraft entgegenwirken, würde die Zelle kollabieren und eine Kugelmorphologie ausbilden, wie dies z.B. in suspendierten Zellen der Fall ist. Jedoch existieren bei adhärennten Zellen sowohl intra- als auch extrazelluläre Stützen, die der intrazellulären Grundspannung entgegenwirken. Intrazellulär wird diese Rolle von den Mikrotubuli übernommen, die gegen Kompression resistent sind und durch Intermediärfilamente zusätzlich verstärkt werden (Wang et al., 1993). Als extrazelluläre Stütze fungiert die ECM, deren stabilisierende Wirkung über die Zell-Matrix-Kontakte vermittelt wird. Experimentelle Evidenzen für diese Theorie sind vorhanden (z.B. Bershadsky et al., 1996; Pelham und Wang, 1997; Maniotis et al., 1997; u.a.). Ein anderes Modell besagt, dass die zelluläre Morphologie von lokalen Signalen der Zell-Matrix-Kontakte bewirkt wird. In den Zell-Matrix-Kontakten werden nach diesem Modell sowohl intra- als auch extrazellulär wirkende Kräfte über Mechanosensoren in biochemische Signale umgewandelt (Galbraith und Sheetz, 1998). Diese greifen dann in die Organisation des Zytoskeletts ein. Auch für dieses Modell gibt es experimentelle Evidenzen (Choquet et al., 1997; Sawada und Sheetz, 2002).

1.2 Zweidimensionale Substrate und ihre Herstellung

1.2.1 Die Problematik von Zellkultursubstraten in vitro

Adhärennt wachsende Zelltypen stehen eng mit der dreidimensionalen ECM in Verbindung (Kap. 1.1.1). Die Untersuchung von Zell-Matrix-Interaktionen ist komplexer als diejenige von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen in Lösung, z.B. zwischen Wachstumsfaktoren und Rezeptortyrosinkinasen. Die traditionelle Herangehensweise an diese Fragestellung beinhaltet die homogene Beschichtung von Trägermaterialien wie z.B. Glas oder Plastik mit ECM-

Proteinen aus Lösung. Diese Methode ist einfach durchzuführen und liefert eine gute Kontrollmöglichkeit über die Proteinzusammensetzung einer Oberfläche. Allerdings ist diese Methode stark limitiert. Sie gewährleistet nicht, dass den Zellen aktive Liganden in definierter Form präsentiert werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei der Adsorption an die Trägeroberfläche die Orientierung des Proteins und damit die Zugänglichkeit seiner aktiven Region nicht kontrollierbar ist. Zudem denaturieren Proteine während des Adsorptionsprozesses in unterschiedlichem Ausmaß, was ebenfalls zur Inaktivierung oder gar Zerstörung der aktiven Regionen führen kann (Talbot et al., 2000). Ein weiterer Nachteil dieser Methode liegt in ihrer Eindimensionalität. Der Begriff „Eindimensionalität“ ist in diesem Zusammenhang nicht streng geometrisch, sondern als Umschreibung der gleichförmigen und nicht geometrisch zweidimensionalen Verteilung einer biochemischen Information zu verstehen. Die homogene, dicht mit Protein beschichtete Oberfläche entspricht nur sehr begrenzt den realen Strukturen in der dreidimensionalen Matrix. In vitro-Studien von Zellen in dreidimensionalen Gelen zeigen, dass dieser Unterschied nicht zu vernachlässigen ist. Epithelzellen sind z.B. auf die dreidimensionale ECM angewiesen, um normal zu differenzieren (Roskelley und Bissell, 1995). Fibroblasten zeigen in dreidimensionalen Kollagengelen im Vergleich zu homogenen Substraten eine andere Morphologie sowie ein verändertes Migrationsverhalten (Elsdale und Bard, 1972; Friedl und Brocker, 2000). Auch Funktion und Struktur der Zell-Matrix-Kontakte sind unterschiedlich (Cukierman et al., 2001). Diese im Prinzip richtigen, dreidimensionalen Experimentansätze haben den Nachteil, dass eine exakte Analyse des Zellverhaltens durch die undefinierte Geometrie der Matrices behindert wird. Auch der Einsatz moderner fluoreszenzmikroskopischer Methoden erlaubt lediglich die Beobachtung, nicht jedoch die Kontrolle der Matrixstrukturen (Petroll et al., 2003). Sehr gut kontrollierbar ist dagegen die zweidimensionale Strukturierung der Substrate. Es stehen eine Reihe von Methoden zur Verfügung, die die Mikrostrukturierung von Zellkultursubstraten (Ito, 1999) und das Aufbringen von Proteinen in geometrischen Mustern erlauben (Blawas und Reichert, 1998). Einige dieser Techniken wie z.B. die konventionelle Lithographie und die Photochemie sind schon lange bekannt und stammen ursprünglich aus der Halbleiterindustrie (MacAlear und Wehrung, 1978). Ihr Einsatz in biologischen Systemen ist jedoch nicht praktikabel, da sie einen hohen technischen Aufwand erfordern. Seit Mitte der 1990iger Jahre hat sich nun eine Technologie durchgesetzt, die unter dem Begriff „weiche Lithographie“ bekannt ist. Damit wird eine Gruppe verwandter Methoden umschrieben, die aus elastischen („weichen“) Materialien bestehende Stempel oder Kanälchensysteme verwendet, um definierte Proteinmuster auf Oberflächen zu übertragen. Die Vorteile dieser Techniken bestehen in der einfachen Durchführbarkeit, der Anwendungsvielfalt sowie dem geringen technischen und finanziellen Aufwand. Gute Übersichten über die unterschiedlichen Verfahren der weichen Lithographie und ihre technischen Details bieten Xia und Whitesides, 1998, Kane et al., 1999 sowie Michel et al., 2001.

1.2.2 Microcontact Printing (μ CP)

Eine Methode der weichen Lithographie ist das Microcontact Printing (μ CP) (Kumar und Whitesides, 1993; Jackman et al., 1995). Dabei wird ein dreidimensional strukturierter Stempel verwendet, mit dessen Hilfe eine Substanz in geometrischen Mustern auf eine zweidimensionale Oberfläche (Substrat) aufgebracht werden kann. Der Stempel wird zunächst mit der zu übertragenden Substanz beschichtet. Ihre Übertragung auf das Substrat

erfolgt dann durch direkten Kontakt der vorstehenden Stempelstrukturen mit der Substratoberfläche.

Für die Herstellung der verwendeten Stempel wird ein sog. Master benötigt. Dabei handelt es sich um eine dreidimensionale Relief-Form, deren Struktur zu der des eigentlichen Stempels invers ist. Die Herstellung des Masters ist der technisch aufwändigste Teil des μ CP. In mehreren Schritten wird hierfür unter Verwendung von lithographischen Verfahren die gewünschte Form in eine glatte Siliziumoberfläche eingätzt (David und Hambach, 1999; David und Souvorov, 1999). Auf die entstandene Struktur wird ein flüssiges Silikon-Präpolymer gegeben, das die Relief-Form ausfüllt. Es härtet unter Wärmeeinwirkung aus und bildet nach Ablösen vom Master den eigentlichen Stempel. Ein Vorteil dieses Verfahrens ist, dass ein einziger Master mehrfach zum Abguss von Stempeln verwendet werden kann. Der technische Aufwand zu seiner Herstellung ist somit nur einmal vonnöten und genügt zur Herstellung einer Reihe von Stempeln, die ihrerseits wieder häufig einsetzbar sind. Als elastisches Stempelmaterial für die Abgüsse wird zumeist Polydimethyl-Siloxan (PDMS) verwendet. Seine Biokompatibilität, optische Transparenz, Elastizität und Stabilität prädestinieren es zur Verwendung in biologischen Experimenten, die eine häufige Verwendbarkeit des Stempels bei gleichzeitig guter Kontrolle über die Musterübertragung erfordern.

Es existieren verschiedene Varianten des μ CP, u.a. das direkte Stempeln von Proteinen. Diese Methode wurde bereits häufig und in unterschiedlichen Zusammenhängen erfolgreich eingesetzt (Patel et al., 2000; Bernard et al., 2000; Bernard et al., 2001). Sie garantiert jedoch nicht, dass die Funktionalität der gestempelten Proteine erhalten bleibt (Kap. 3.4.1; Bernard et al., 1998). Die ursprüngliche und häufigste Anwendung des μ CP macht sich die enge Wechselwirkung von Alkanthiolen mit Gold und die daraus resultierende Ausbildung von „self-assembled monolayers“ (SAMs) (Ulman, 1996; Whitesides, 1995) zu Nutze (Abb. 1.4). Diese Schichten entstehen spontan durch Ausbildung einer stabilen, nur teilweise verstandenen Schwefel-Gold-Bindung (Fenter et al., 1994) in deren Folge sich die Alkylketten der Alkanthiole zu einer definierten und gut untersuchten Struktur zusammenlagern (Laibinis et al., 1991). Die Alkylketten können an ihrem Ende durch funktionelle Gruppen gezielt derivatisiert werden, wodurch eine Kontrolle der Oberflächeneigenschaften der SAMs auf molekularer Ebene möglich wird. Je nach verwendeter Gruppe kann so z.B. das Ausmaß unspezifischer Proteinadsorption aus Lösung gesteuert werden. Proteine adsorbieren an hydrophobe Oberflächen in der Regel irreversibel (Sigal et al., 1998) wohingegen Ethylenglykol-terminierte Oberflächen proteinabweisende Eigenschaften besitzen (Prime und Whitesides, 1991; Prime und Whitesides, 1993). Diesen Effekt macht sich μ CP zu Nutze, indem ein hydrophob terminiertes Alkanthiol als „Tinte“ für den Stempel eingesetzt wird. Bei Aufbringen des Stempels auf eine Goldoberfläche wird das Alkanthiol übertragen und an den Stellen direkten Kontaktes bilden sich hydrophobe SAMs aus. Das verbleibende freie Gold wird mit einem Ethylenglykol-terminierten Alkanthiol abgesättigt und es entsteht eine hydrophob-hydrophil strukturierte Oberfläche. Wird sie in eine Proteinlösung eingetaucht, adsorbiert das Protein selektiv an den hydrophob bestempelten Bereichen. Ein so präpariertes Substrat bleibt auch unter Zellkulturbedingungen in wässriger Lösung bei 37°C über mehrere Tage stabil (Mrksich et al., 1997). Trotz auftretender Denaturierungseffekte (Keselowsky et al., 2003) ist diese Methode wesentlich proteinschonender als das direkte Stempeln der Proteine.

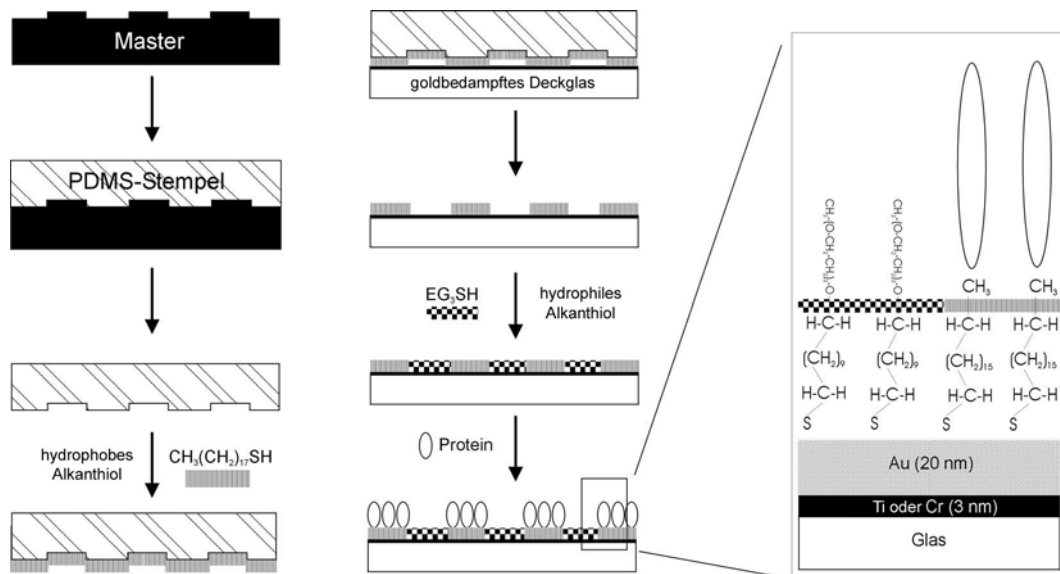


Abb. 1.4: Methodenschema: Microcontact Printing.

Mit Hilfe einer dreidimensional strukturierten Siliziumform (Master) wird ein elastischer Silikonstempel (PDMS = Polydimethyl-Siloxan) gefertigt. Dieser wird mit einem hydrophob terminierten Alkanthiol beschichtet und mit einer Goldoberfläche in Kontakt gebracht. Dadurch wird das Thiol auf das Gold übertragen. Die frei bleibenden Zwischenräume werden mit einem zweiten, hydrophilen Alkanthiol abgesättigt. Bei Eintauchen in eine Proteinlösung adsorbiert das Protein selektiv an die hydrophob terminierten Thiolstrukturen.

Für Details siehe Text und Kap. 2.4.

1.3 Zweidimensionale Substrate in der Zellbiologie

1.3.1 Kontrolle über zelluläres Verhalten

Mikrostrukturierte Substrate werden zunehmend in biologischen Systemen eingesetzt (LeDuc et al., 2002, Kapitel 19). Adhärenz wachsende Zellen benötigen ein Substrat, auf dem sie haften und spreaden können (Kap. 1.1.4). Proteinabweisende Substrate wie z.B. Ethylenglykol-terminierte Oberflächen verhindern nicht nur die Adsorption eines Proteins aus Lösung sondern auch die aktive Adhäsion von Zellen, da zelluläre Oberflächenproteine ebenfalls abgewiesen werden. Passive, unspezifische Adhäsion, wie sie z.B. durch Poly-L-Lysin vermittelt wird (Kap. 3.2.4), kann ebenfalls nicht stattfinden. Die Anwendung von μCP ermöglicht es, Proteine in geometrischen Mustern so auf Oberflächen aufzubringen, dass bestimmte Bereiche des Substrates proteinfrei bleiben. Durch Beschichtung mit ECM-Proteinen erhält man Substrate, bei denen adhäsive Regionen mit zellabweisenden Flächen kontrastieren. So kann eine gemusterte Verteilung der Zellen auf dem Substrat erzielt werden, bei der die Zellen regional begrenzt z.B. auf Fibronectin-beschichteten Substratflächen haften (Lopez et al., 1993). Sie wachsen und überleben bis zu einer Woche ohne in die benachbarten proteinabweisenden Flächen einzudringen (Mrksich et al., 1997).

Verwendet man eine Substratgeometrie, bei der einzelne, wenige $1000 \mu\text{m}^2$ große ECM-Inseln voneinander durch genügend große anti-adhäsive Flächen getrennt sind, wachsen Zellen selektiv auf diesen Inseln (Singhvi et al., 1994). Dadurch werden die Zellen einer Population vereinzelt. Zudem erlauben solche Inseln auch die Kontrolle über Größe und Form

der Zellen. Sie beschränken das zelluläre Wachstum auf die Größe der Inselfläche. Die Morphologie der Zellen kopiert die Geometrie der Inseln, indem die zur Verfügung stehende Fläche vollständig genutzt wird. Je nach Substratgeometrie, bilden diese Zellen rechtwinklige Ecken und scharfe Kanten (Singhvi et al., 1994) oder eine Kreisform aus (Chen et al., 1997). Die bisher geschilderten Beispiele beziehen sich vor allem auf Fragestellungen der Zelladhäsion und ihrer Folgen. Zweidimensionale Substrate müssen jedoch nicht unbedingt aus adhäsiven und anti-adhäsiven Mustern aufgebaut sein. Sie können ebenfalls eingesetzt werden, um die Zellmobilität und ihre Steuerung zu untersuchen. Aus der Entwicklungsbiologie sind viele Faktoren bekannt, die das Einwandern einer Zelle in ein bestimmtes Gebiet oder die Wegfindung eines wachsenden Axons steuern. Solche Faktoren können z.B. in bestimmten Mustern auf einem Substrat strukturiert und ihr Einfluss auf das zelluläre Verhalten unter definierten Bedingungen untersucht werden. Anstelle des starken Kontrastes zwischen Adhäsion und Antiadhäsion (Signal – kein Signal) tritt hier ein milder Kontrast von neutralem und nicht neutralem, also lenkendem Signal. Ein frühes Beispiel für den Einsatz solcher Substrate ist der „Bonhoeffer'sche Streifenteppich“, bei dem sich schmale parallele Bahnen unterschiedlicher axonlenkender Substanzen abwechseln (Walter et al., 1987a; Walter et al., 1987b; vergl. auch Kap. 5).

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion von Zellen mit der Extrazellulären Matrix (ECM) genauer zu untersuchen und geometrische Grenzen von Zelladhäsion und -migration zu bestimmen. Bisher durchgeführte Studien mit strukturierten Substraten verwendeten relativ große Substratgeometrien, deren kleinste Flächen ca. $7 \mu\text{m}^2$ betragen, oft aber weitaus größer als $100 \mu\text{m}^2$ sind (z.B. Singhvi et al., 1994; Chen et al., 1997; Parker et al., 2002; Chen et al., 2003). Sie dürften einem Vergleich mit den geometrischen Bedingungen in vivo nicht standhalten. Diese Untersuchungen lieferten interessante Aspekte vor allem hinsichtlich der Korrelationen von Zellmorphologie bzw. Zellgröße und zellulärem Verhalten aber weniger hinsichtlich der Zell-Substrat-Interaktionen. Massia und Hubble untersuchten Zell-Substrat-Interaktionen, indem sie Adhäsion-vermittelnde RGD-Peptide in unterschiedlichen Verdünnungen auf ein homogenes Substrat aufbrachten (Massia und Hubbell, 1991). Sie zeigten, dass einzelne Peptide maximal 440 nm voneinander entfernt sein dürfen, um Fibroblasten das Spreading zu erlauben. Ein Maximalabstand von 140 nm muss für die Bildung von Fokalkontakten eingehalten werden (Massia und Hubbell, 1991). Andere Arbeiten versuchten, Zell-Matrix-Interaktionen zu untersuchen, indem sie Zellen mit kleinen Clustern von RGD-Peptiden (Maheshwari et al., 2000) oder einzelnen ECM-beschichteten Kügelchen (Coussen et al., 2002) in Kontakt brachten und die Reaktionen des Aktin-Zytoskeletts beobachteten. Diese Experimente haben jedoch den Nachteil, dass sie entweder keine exakt definierbare Substratoberfläche aufweisen (Verdünnungsexperimente) oder aber sehr lokal auf einen kleinen Zellbereich begrenzt sind (Kügelchen).

Die Anwendung von Microcontact Printing (μCP) erlaubt die einfache Herstellung geometrisch definierter Substrate über große Bereiche und in großer Anzahl. Im Gegensatz zu den bisherigen Studien sollten Substrate eingesetzt werden, deren Strukturen aus Elementen bestehen, die maximal wenige μm^2 , z.T. sogar nur wenige 100nm^2 groß sind. Zu diesem Zweck sollte die Technik des μCP in Kombination mit Proteinbeschichtung bis zur höchstmöglichen Auflösung weiterentwickelt werden. Mit dieser Methode wurde versucht,

die in vivo vorhandene dreidimensionale ECM in vitro auf zweidimensional strukturierte Substrate zu projizieren. Die unterschiedlichen in vivo-Strukturen der ECM sollten dabei durch Variation der Protein-beschichteten Inseln („Dots“) imitiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Möglichkeiten zweidimensionaler Substrate voll ausgeschöpft und folgende Fragen konnten durch Einsatz verschiedener Substratgeometrien untersucht werden: Welche anti-adhäsiven Distanzen kann eine Zelle während Adhäsion und Migration überbrücken? Wie klein darf eine Proteinstruktur sein, um noch funktionelle Zell-Matrix-Kontakte zu induzieren? Welche Mindestmengen an ECM-Protein benötigt eine Zelle zur Adhäsion? Kann eine Zelle die Gesamtmenge an zur Verfügung stehendem ECM-Protein erkennen und verrechnen? Welcher Zusammenhang besteht zwischen der Menge an zur Verfügung stehendem Protein und zellulärem Verhalten hinsichtlich Zellgröße, Kontaktorganisation und Kraftausübung?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien und Lösungsmittel von Carl Roth GmbH, Karlsruhe, bezogen.

2.2 Entwicklung und Handhabung der Stempel

2.2.1 Stempelmuster

Für die Beantwortung unterschiedlicher Fragestellungen und Problematiken wurden verschiedene Stempelmuster entworfen. Die in den Abb. 2.1 – 2.3 gezeigten Muster wurden entwickelt und eingesetzt. Prinzipiell sind die Muster aus quadratischen Strukturen („Dots“) aufgebaut, die später im fertigen Zellkultursubstrat proteinbeschichtete Bereiche bilden (Abb. 2.1 A, grau). Sie sind durch nicht beschichtete Bereiche voneinander getrennt (Abb. 2.1 A, weiß). Abb. 2.1 B zeigt den vergrößerten Ausschnitt eines solchen Dotmusters. Es entsteht beim Stempelvorgang aufgrund der Stempeltopographie. Der Stempel besteht aus hervorstehenden Silikon-Strukturen, die beim Stempelvorgang in Kontakt mit der zu bestempelnden Oberfläche treten. Sie sind von tiefer liegenden, zurückstehenden Bereichen umgeben. Die grau unterlegten Flächen markieren die vorstehenden Strukturen, zu denen neben den Dots auch die Stege gehören, die ein Dotmuster umgeben. Sie dienen sowohl der Abgrenzung unterschiedlicher Muster voneinander (Abb. 2.1 C) als auch der mechanischen Stabilisierung des gesamten Stempels. Das Profil der Stempeltopographie entlang der gestrichelten Linie in Abb. 2.1 B wird in Abb. 2.1 B' dargestellt. Die nach unten vorstehenden Silikonstrukturen des Stempels (grau unterlegt) kommen mit der zu bestempelnden Oberfläche in Kontakt und übertragen das Muster. Im Beispiel der Abb. 2.1 B' handelt es sich um zwei Dots (links und mittig) sowie den Steg (rechts), der die Musterbahn umgibt und sie von den benachbarten Bahnen trennt. Ein komplettes Stempelmuster besteht aus mehreren rechteckigen (2 x 9) Bahnen, von denen jede Bahn ein anderes Dotmuster enthält (Abb. 2.1 C). Für jede Bahn sind die Kantenlängen der Dots (d) sowie die Abstände (a) zwischen zwei Dotzentren angegeben. Stempel 2 ist prinzipiell wie Stempel 1 aus einer Anordnung rechteckiger Bahnen (2 x 5) mit unterschiedlichen Mustern aufgebaut. Seine Muster bestehen jedoch nur aus zwei Dotgrößen, die fein abgestufte Abstände aufweisen (Abb. 2.2).

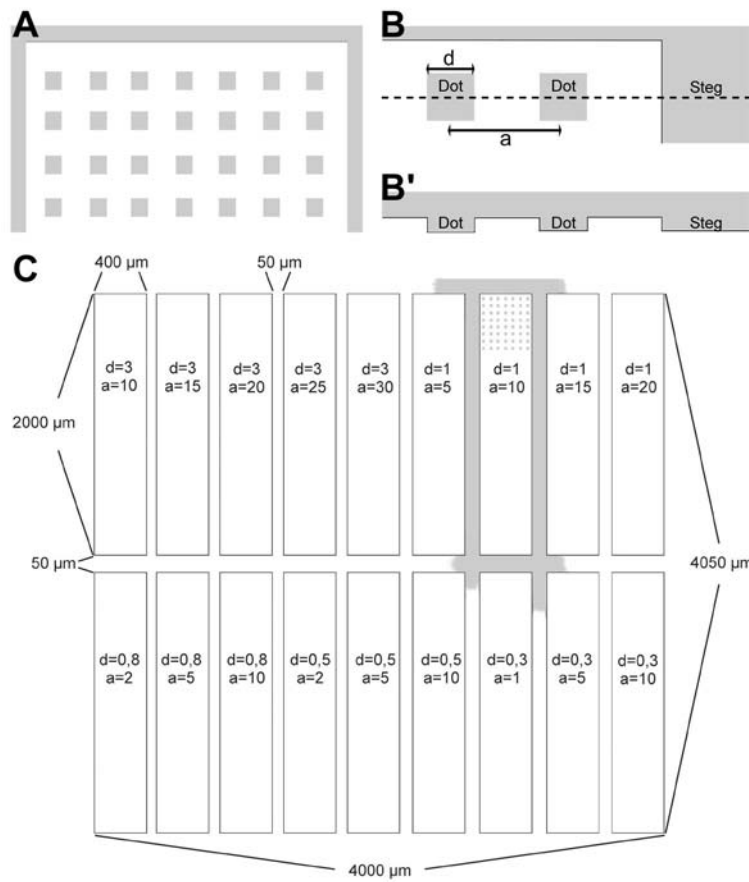
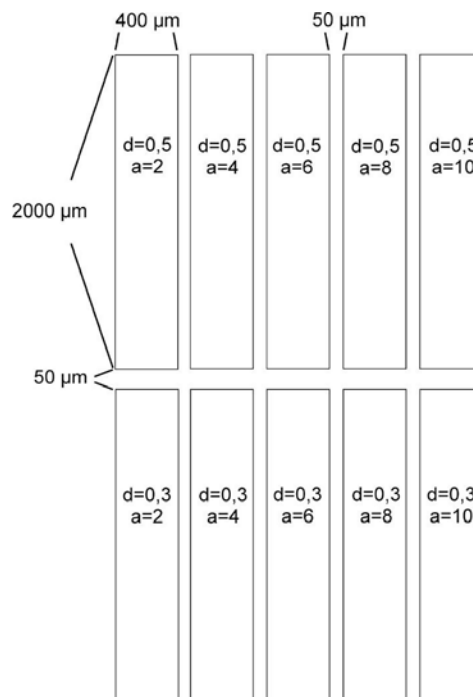


Abb. 2.1:

Stempel 1: Dots.

(A) Prinzipieller Aufbau der Muster aus quadratischen Strukturen („Dots“). Grau unterlegt sind Protein-beschichtete Substratbereiche. (B) Vergrößerter Ausschnitt eines Musters. (B') Profil der Topographie des Silikonstempels entlang der gestrichelten Linie in (B). Grau unterlegt ist das Silikon des Stempels (C) Übersicht über die komplette Stempelstruktur, bestehend aus 2 x 9 rechteckigen, unterschiedlich strukturierten Bahnen. Für jede Bahn sind die Kantenlängen der Dots (d) sowie die Abstände (a) zwischen zwei Dotzentren angegeben. Für weitere Details siehe Text.

Abb. 2.2:
Stempel 2: Kleindots.
 Details siehe Text.



Etwas komplizierter aufgebaut ist Stempel 3 (Abb. 2.3). Er wird zur Herstellung von Gradientenmustern verwendet. Wie bei den beiden anderen Stempeln besteht die Gesamtstruktur des Stempels 3 aus rechteckigen Bahnen (2 x 8), die jeweils unterschiedliche Strukturen enthalten. Jede Bahn dient der Herstellung eines speziellen Gradientenmusters. Die Verläufe der einzelnen Gradienten sind in Abb. 2.3 in den unteren Bahnen schematisch als ansteigende Kurven skizziert. Es existieren flach ansteigende (F), mittlere (M) und steil ansteigende (S) Gradienten sowie Gradienten, die ein Plateau (P) enthalten, in dem kein Anstieg des Gradienten zu verzeichnen ist. Gegenüberliegende Bahnen weisen dabei prinzipiell identische Gradientenverläufe auf, unterscheiden sich jedoch in der Größe der Strukturen, die den Gradienten bilden (Dots bzw. Linien). Die entsprechenden Kantenlängen bzw. Linienbreiten betragen entweder $1\ \mu\text{m}$ (Abb. 2.3 oben) oder $0,5\ \mu\text{m}$ (Abb. 2.3 unten). Die einzelnen Gradienten werden aus Dots oder Linien (L) gebildet, deren Abstand sich zur Stempelmitte hin verkürzt (Abb. 2.3 links oben), wodurch eine Zunahme der Struktur- und damit der Proteindichte erreicht wird (siehe auch Kap. 3.3.4). Die unterschiedlich steilen Gradienten entstehen durch Variation der Abstandsänderungen zwischen den horizontalen Dotreihen bzw. Linien.

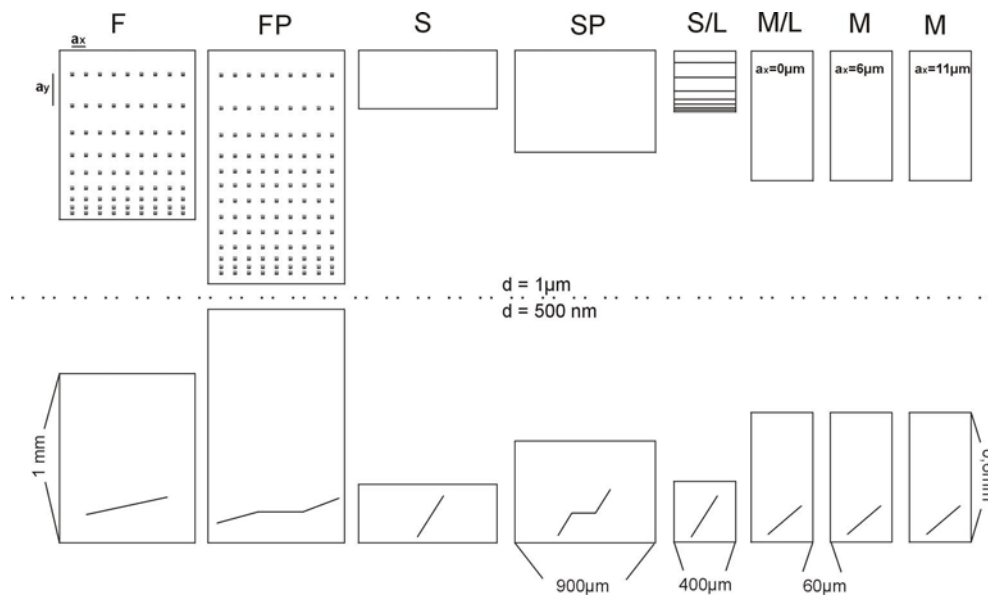


Abb. 2.3: Stempel 3: Dot- und Liniengradienten.

Beschreibung siehe Text.

a_x = seitlicher Abstand zwischen Dottmitten in μm ; a_y = Abstand in Gradientenrichtung zwischen Dottmitten in μm ; **F** = flacher Gradient: $a_y = 20$ bis $0\ \mu\text{m}$ über $1\ \text{mm}$, $a_x = 6\ \mu\text{m}$; **FP** = flacher Gradient mit Plateau, wie F, $a_y = 15\ \mu\text{m}$ konstant über $250\ \mu\text{m}$; **M** = mittelsteiler Gradient, $a_y = 20$ bis $0\ \mu\text{m}$ über $0,6\ \mu\text{m}$, $a_x =$ variabel; **S** = Steiler Gradient, $a_y = 20$ bis $0\ \mu\text{m}$ über $0,3\ \text{mm}$, $a_x = 6\ \mu\text{m}$; **SP** = steiler Gradient mit Plateau, wie S, $a_y = 15\ \mu\text{m}$ konstant über $250\ \mu\text{m}$; **L** = Gradient aus Linien bestehend; **d** = Kantenlänge bzw. Linienbreite in μm .

2.2.2 Herstellung der Stempel

2.2.2.1 Herstellung der Stempelformen (Master)

Zur Herstellung der Silikonstempel werden Abgussformen, sog. Master benötigt. Sie bestehen aus reinem metallischem Silizium, in die eine zum späteren Silikonstempel inverse dreidimensionale Struktur eingätzt wurde. Die Strukturierung erfolgte mittels Elektronenstrahl-Lithographie. Hierzu wurde zunächst von Dr. Ralf Bubeck, LS Leiderer, Universität Konstanz, ein Programm zur elektronischen Erfassung und Darstellung der jeweiligen Muster geschrieben. Dieses Programm codiert die Muster in einer für die Belichtungsmaschine der Lithographie kompatiblen Form. Die eigentliche Herstellung der Master anhand dieser Daten wurde von Dr. Christian David am Paul-Scherrer-Institut in Villigen, Schweiz, durchgeführt. Hierzu wurde das Verfahren der Niederspannungselektronenstrahl-Lithographie unter Verwendung eines positiven Photolackes verwendet (David und Hambach, 1999). Das erhaltene Muster wurde mit Hilfe eines Lift-off Prozesses und HF-Ätzung invertiert (David und Souvorov, 1999) und auf eine Tiefe von 650 – 700 nm in das Silizium geätzt.

2.2.2.2 Reinigung der Silizium-Master

Zur Entfernung von organischen Materialien werden die Silizium-Master in Piranha-Lösung (50% H_2SO_4 , 50% H_2O_2) getaucht und für 15 min auf einer Heizplatte im Abzug erwärmt, bis sich Blasen bilden (ca. 80°C). Anschließend wurden die Master mehrfach mit je 10 ml Bidest (ddH_2O) gespült und mit Stickstoff der Reinheit 5.0 (Linde) trocken geblasen.

In Fällen besonders starker Verschmutzung (z.B. nicht auspolymerisierte Silikonreste) wird der Piranha-Reinigung eine Flusssäure-Ätzung angeschlossen, um die oxidierte Oberfläche des Silizium-Masters zu entfernen. Dazu wird der Master unter dem Abzug für 10 min in 2% Flusssäure in ddH_2O getaucht, anschließend mehrfach mit je ca. 10 ml ddH_2O gespült und mit Stickstoff der Reinheit 5.0 trocken geblasen. Nach der Reinigung werden die Master mit Octadecyltrichlorosilan (OTS; s.u.) beschichtet, ehe sie zur Herstellung von Silikonstempeln eingesetzt werden können.

2.2.2.3 Silylierung der Silizium-Master

Um ein sauberes und sicheres Ablösen der Silikon-Stempelabgüsse vom Master zu gewährleisten, werden die Silizium-Master mit Octadecyltrichlorosilan (OTS; Aldrich) beschichtet. OTS ist eine wasserempfindliche Substanz, die bereits unter Einwirkung von Luftfeuchtigkeit zur Polymerisierung neigt. Die Lagerung erfolgt deshalb unter Stickstoffatmosphäre. Vor Einsatz des OTS ist zu prüfen, ob die Flüssigkeit noch klar und ohne Schwebstoffe ist. Die Silylierung von Silizium-Mastern erfolgt durch Eintauchen der Master in eine 1 mM OTS-Lösung in Hexan, p.a. (4,1 μl OTS in 10 ml Hexan) bei Raumtemperatur für 10 min. Dies geschieht unter Stickstoffatmosphäre. Nach Entnahme wird der Master sofort mit Stickstoff trocken geblasen. Der Erfolg der Silylierung kann anhand des Kontaktwinkels eines Tropfens ddH_2O (5 μl) getestet werden. Bei großen Kontaktwinkeln, also abperlender Flüssigkeit, ist die Silylierung erfolgreich.

2.2.2.4 Herstellung der Silikonstempel

Abbildung 2.4 zeigt einen schematischen Überblick über die Stempelherstellung. Auf die dreidimensionale Struktur im Silizium-Master werden blasenfrei ca. 50 µl flüssiges, entgastes Silikon (siehe Kap. 2.2.2.5) gegeben. Auf diesen Tropfen wird ein Objektträgerglasstreifen ohne Einschluss von Blasen gelegt. Zur Herstellung dieser Glas-Streifen werden Objektträger für die Mikroskopie (Menzel-Gläser) mit einem Isopropanol-getränkten Tuch gereinigt und mit Hilfe eines Diamantstiftes in ca. 1 cm breite Stücke gebrochen. Das auf das Silikon gelegte Glasstück wird mit ca. 70 g schweren Messingklötzchen beschwert. Master und Glas werden mit Messingklötzchen seitlich fixiert und gegen Verrutschen gesichert. Das Auspolymerisieren des Silikons erfolgt über Nacht bei 60°C im Ofen. Anschließend wird der Master vorsichtig vom Silikon, welches am Objektträgerglas haften bleibt, getrennt. Überschüssiges Silikon um die Stempelstruktur herum wird mittels einer Rasierklinge vorsichtig vom Objektträgerglas entfernt, so dass nur die Struktur sowie ein ca. 2 mm breiter Rand zurückbleibt. Die Rückseite des Glases wird mit Zweikomponenten-Klebstoff (UHUplus endfest oder UHUplus schnellfest) auf einen kleinen Glasquader, der als Griff dient, zentral aufgeklebt und ausgehärtet. Überstehendes Objektträgerglas wird mit dem Diamantstift angeritzt und entfernt.

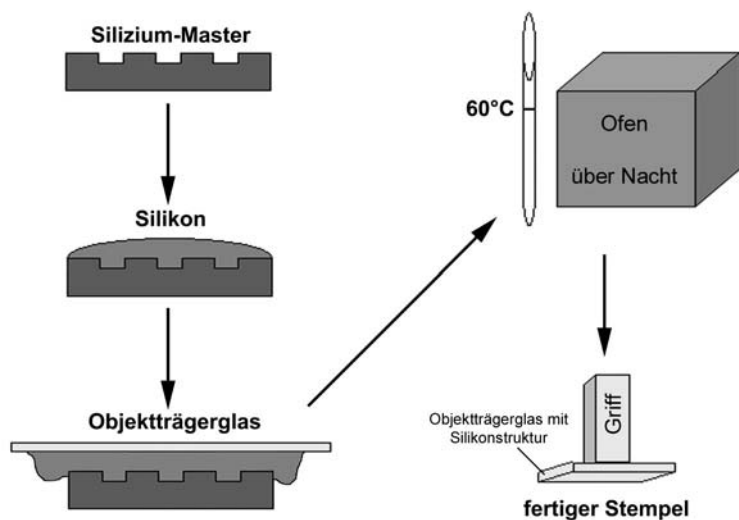


Abb. 2.4:
Herstellung der Silikonstempel.
Beschreibung siehe Text.

2.2.2.5 Verwendete Silikonarten

Silikon ist der Überbegriff für Polydimethyl-Siloxan (PDMS). Es handelt sich dabei um eine inerte Stoffklasse, die vor allem aus Siloxan-Molekülen besteht. Die elastischen Eigenschaften im polymerisierten Zustand können durch Variation der verwendeten chemischen Grundsubstanzen wie z.B. Siloxane unterschiedlicher Kettenlänge, Katalysatoren, Modulatoren u.ä. beeinflusst werden. Zur Herstellung der Stempel wurden zwei verschiedene Silikone verwendet. Für die größeren, stabileren Stempelmuster kommt das kommerziell erhältliche Sylgard 184 (Dow Corning) zum Einsatz. Seine Komponenten Gel und Härter werden im Verhältnis 10:1 in einer runden Petrischale mit 35 mm Durchmesser für ca. 2 min gründlich mit einem Stab verrührt und gemischt. Für kleine Strukturen wie z.B. Stempel 2

(Abb. 2.2) ist ein von IBM (Rüschlikon, Schweiz) entwickeltes, härteres Silikon (Schmid und Michel, 2000) besser geeignet. Die hierfür verwendeten Chemikalien sind luftempfindlich und werden daher unter Stickstoff- oder Argonatmosphäre aufbewahrt. 3,4 g VDT-731 (ABCR), 0,22 g Silica (hexamethyldisilazan-behandelt; ABCR) und 5 µl 2,4,6,8-Tetramethyl-tetramethyl-cyclotetrasiloxan (Fluka) werden mit 0,5 µl Platin-divinyl-tetramethyl-disiloxan complex in Xylol, low color (ABCR) in einer Petrischale von 35 mm Durchmesser für mehrere Minuten mit einem Stab vorsichtig aber gründlich verrührt. Dabei ist zu beachten, dass das fein zerstäubte vorliegende Silica komplett untergerührt wird. Der Rührstab muss dafür sauber und frei von jeglichen Chemikalienrückständen sein, da vor allem Schwefel das spätere Auspolymerisieren des Silikons verhindern kann. Anschließend wird 1 g HMS-301 (ABCR) zugegeben und erneut alles gründlich durchmischt. Das so präparierte Silikon kann bei -20°C über mehrere Wochen gelagert werden, ohne dass es aushärtet. Zur Stempelherstellung wird das jeweils verwendete, flüssige Silikon entweder im Exsikator oder durch einfaches Stehen lassen entgast.

2.2.3 Reinigung der Stempel

Vor jeder und nach jeder Stempelreihe werden die verwendeten Stempel vorsichtig mit klarem Tesafilm® drei Mal abgezogen, um Staubpartikel und andere grobe Verschmutzungen zu entfernen. Das anschließende gründliche Abspülen mit Ethanol (> 99,8 %, p.a.) dient dem Entfernen evtl. zurückgebliebener Klebereste. Bei Bedarf erfolgt die Reinigung öfters, so z.B. wenn sich der Stempel während des Stempelvorgangs nicht mehr richtig festsaugt. Dies ist der Fall, wenn Thiolrückstände auf der Stempelfläche auskristallisieren oder sich Gold aus der bestempelten Schicht löst und Rückstände am Silikon hängen bleiben.

Bei starker Verschmutzung der Stempel erfolgt eine 10 minütige Behandlung im Ultraschallbad, wobei der Stempel in Ethanol getaucht wird. Alternativ kann der Stempel in 1% SDS in ddH₂O für 15 min ebenfalls im Ultraschallbad gereinigt und anschließend im Abzug mit 5 ml Heptan, p.a. gespült und mit Stickstoff trocken geblasen werden.

2.3 Substratherstellung: Homogen beschichtete Substrate

2.3.1 Reinigung der Deckgläser

Handelsübliche Deckgläser #1 (Roth, 22 x 22 mm) werden in einem 2 l-Erlenmeyerkolben mit rauchender Salpetersäure (alternativ: > 65%ige Salpetersäure) bedeckt, auf einer Heizplatte unter dem Abzug langsam bis zur Blasenbildung erhitzt und für 20 min bei konstanter Temperatur inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Säure vorsichtig abgegossen (Schutzkleidung!). Anschließend werden die Deckgläser im Erlenmeyerkolben mehrfach gründlich mit ca. 200 ml ddH₂O gespült und autoklaviert. Die Lagerung erfolgt in ddH₂O. Vor Verwendung in Zellkulturexperimenten werden die Deckgläser sterilisiert, indem sie einzeln zunächst unter der Sterilbank getrocknet und dann gebacken werden.

2.3.2 Substratbeschichtung

Für homogen beschichtete Zellkultursubstrate werden gereinigte Deckgläschen unter sterilen Bedingungen zunächst für 1 h bei Raumtemperatur mit Poly-L-Lysin (Sigma; 200 µg/ml in PBS) beschichtet. Hierzu werden pro Deckglas 50 µl Poly-L-Lysin-Lösung auf die Glasfläche pipettiert. Ein zweites Deckglas wird auf diesen Tropfen gelegt (=> „Sandwich“). Für die spätere Bestimmung der Protein-beschichteten Deckglasseite ist eine Kennzeichnung mit asymmetrischen Zeichen sinnvoll. Nach Spülen mit 5 ml PBS folgt eine Beschichtung mit Fibronectin oder Laminin (Tab. 2.1) ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur im Sandwich. Die Proteinlösung wird mit 2 x 5 ml PBS entfernt. Damit sind die Deckgläschen zur Aufnahme von Zellen bereit.

2.4 Substratherstellung: Strukturierte Substrate mit Gold-Thiol-Chemie

2.4.1 Reinigung der Deckgläser

Handelsübliche Deckgläser #1 (Roth, 22 x 22 mm) wurden einzeln in speziell angefertigte Halter aus Porzellan oder Teflon gestellt. Unter dem Abzug wird in einem Becherglas eine Lösung von NH₃, H₂O₂ und ddH₂O im Verhältnis 1 : 1 : 5 auf 80°C erwärmt. Die beladenen Deckglashalter werden für 10 min komplett in diese Flüssigkeit eingetaucht und anschließend in ein Becherglas mit 400 ml ddH₂O überführt. Die so behandelten Deckgläser werden bis zur Goldbedampfung in ddH₂O gelagert.

2.4.2 Bedampfung der Deckgläser mit Gold

Frisch gereinigte Deckgläser werden mit einer Pinzette dem Wasser entnommen, zügig mit Stickstoff der Reinheit 5.0 (Linde) trocken geblasen und sofort in eine spezielle Halterung der Aufdampfanlage gelegt. Diese kann 5 x 5 = 25 Deckgläser aufnehmen. Die beladene Halterung wird in die Aufdampfanlage (BAE 250; Balzers) eingebaut und der Rezipient für ≥ 5 Stunden evakuiert. Bei einem Druck im Rezipienten von ≤ 1 x 10⁻⁶ mbar wird zunächst eine 3 - 5 nm dicke Schicht Chrom oder Titan als Haftvermittler auf die Deckgläser aufgedampft. Direkt im Anschluss erfolgt das Aufdampfen der 15 - 20 nm dicken Goldschicht. Nach Abkühlung und Belüftung des Rezipienten werden die fertig bedampften Deckgläser vorsichtig entnommen und in einer Petrischale oder einem Exsikator gelagert. Sie sollten innerhalb eines Monats benutzt werden, da sich bei zunehmender Lagerzeit eine Adsorptionsschicht bildet, die bei Zellkulturexperimenten einen Hintergrund und schlechte Qualität der Stempelmuster verursacht.

2.4.3 Stempelvorgang und Proteinbeschichtung

Eine schematische Darstellung des im Folgenden geschilderten Ablaufes liefert Abb. 1.4 (Kap. 1.2.2). Zu Beginn jeder Stempelreihe wird der Stempel gereinigt (Kap. 2.2.3). Die Stempelstrukturen werden dann für 1 min mit 1,5 mM Octadecylmercaptan (ODM; Aldrich) in Ethanol (> 99,8%, p.a.) inkubiert und anschließend mit Stickstoff (Reinheit 5.0; Linde) für ca. 30 s trocken geblasen. Der Stempel wird daraufhin vorsichtig auf ein goldbedampftes

Deckglas aufgesetzt und beginnt im Idealfall von selbst, sich anzusaugen. Dieser Prozess wird mit Hilfe der Newton'schen Ringe, die gut von der Rückseite des Deckgläschens aus beobachtbar sind, überprüft. Unter Umständen muss durch vorsichtigen lokalen Druck mit einer spitzen Pinzette auf die Deckglasrückseite nachgeholfen werden. Sobald sich der Stempel angesaugt hat, wird das Deckglas vom Stempel mit einer Pinzette zügig entfernt. Eine lange Verweildauer des Stempels auf der Goldfläche bewirkt einen hohen Hintergrund im Substrat aufgrund von Diffusionsvorgängen des Thiols. Nach Beendigung des Stempelvorgangs wird das Deckgläschen sofort mit reinem Ethanol (> 99,8%, p.a.) aus der Spritzflasche gespült und mit Stickstoff getrocknet. Die verbliebenen freien Goldflächen des Deckglases werden durch Bedecken mit 1,5 mM Ethylenglycol-3-O-Mercaptan (EG3-O-Me; zur Verfügung gestellt von Dr. Eck, Universität Heidelberg) in Ethanol (> 99,8%, p.a.) für 30 min bei Raumtemperatur inaktiviert. EG3-O-Me wird anschließend gründlich mit Ethanol (> 99,8%, p.a.) aus der Spritzflasche entfernt und das Deckglas mit Stickstoff getrocknet. Die so präparierten Substrate werden sofort für 60 min bei 4°C mit sterilen Lösungen von Proteinen der Extrazellulären Matrix (ECM) in PBS inkubiert. Zur Herstellung der Lösungen wurden die ECM-Protein-Stammlösungen 5 min im Ultraschallbad behandelt und auf folgende Endkonzentrationen verdünnt:

Protein	Hersteller	Konzentration
Humanes Plasma-Fibronectin	Gibco	10 µg/ml
Fluoreszenz-markiertes Fibronectin	selbst hergestellt (Kap. 2.4.4)	div.
Laminin	Sigma	10 µg/ml
Humanes Plasma-Vitronectin	Sigma	5 µg/ml
BSA	Sigma	10 µg/ml
Fluoreszenz-markiertes BSA	Sigma	div.
Poly-L-Lysin	Sigma	200 µg/ml

Tab. 2.1: ECM-Proteine für die Substratbeschichtung.

Die proteinbeschichteten Substrate werden zwei Mal mit PBS gewaschen und für weitere 60 min mit 1% BSA in PBS bei 4°C geblockt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS werden die Substrate in einer 6-well-plate mit je 2 ml serumfreiem Medium (DMEM; Gibco, # 41966-029) überschichtet und zur Akklimatisierung bis zur Zellaussaat in den Brutschrank gestellt. Zum Schluss der Stempelreihe wird der verwendete Stempel wie oben beschrieben gereinigt (Kap. 2.2.3).

2.4.4 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Für Videozeitraffer-Aufnahmen bzw. zur Inaktivierung von Fibronectin wurden Rinderserumalbumin (BSA; Sigma) und humanes Plasma-Fibronectin (Sigma) mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies erfolgte mittels kommerziell erhältlichen Kits von Molecular Probes („Alexa546 protein labeling kit“ bzw. „Alexa633 protein labeling kit“). Die Markierung sowie die Quantifizierung von Proteinmenge und Markierungsrate wurde nach mitgelieferter Anleitung durchgeführt.

2.5 Substratherstellung: Strukturierte Substrate durch direktes Proteinstempeln

2.5.1 Reinigung der Deckgläser

Die Deckgläser werden nach dem gleichen Protokoll wie zur Herstellung homogen beschichteter Substrate gereinigt (siehe Kap. 2.3.1).

2.5.2 Der Stempelvorgang mit ECM-Proteinen

Der Stempel wird wie zum Einsatz der Gold-Thiol-Chemie gereinigt (Kap. 2.2.3). Zusätzlich werden evtl. noch vorhandene Proteinreste und Verunreinigungen im plasma cleaner (Plasma Cleaner / Sterilizer PDC - 3xG; Harrick) entfernt. Die 10 s lange Behandlung verbessert gleichzeitig die Benetzbarkeit der Silikonoberfläche. Anschließend wird der Stempel für 10 min mit einer Proteinlösung (Tab. 2.1) inkubiert, 5-10 s mit Stickstoff trocken geblasen und auf ein gereinigtes und getrocknetes Deckglas aufgelegt. Das Ansaugen des Stempels kann auch hier anhand der von der Rückseite des Glases gut zu sehenden Newton'schen Ringe kontrolliert werden. Der Stempel verbleibt 1 min auf dem Deckglas. Nach der Abtrennung vom Stempel wird das Glas sofort in PBS gelegt. Zur Inaktivierung der freigebliebenen Glasoberflächen wird entweder BSA (1% in PBS; Sigma) oder Poly-L-Lysin-Polyethylenglycol (PLL-PEG, 1 mg/ml in 10 mM HEPES, pH 7,4; zur Verfügung gestellt von R. Michel, ETH Zürich) für 60 min bei Raumtemperatur auf das Deckglas gegeben. Nach jedem Stempelvorgang wird der Stempel gereinigt und erneut mit Protein beschichtet.

2.5.3 Der Stempelvorgang mit Ephrin-A5

Der Stempel wird wie beim Stempeln von ECM-Proteinen vorbehandelt. Ephrin-A5-Fc (R&D) wird in einer Konzentration von 8 µg/ml mit Alexa488-konjugiertem Antikörper gegen humanes Fc (80 µg/ml; Molecular Probes) in PBS für 30 min bei Raumtemperatur komplexiert. Die Lösung wird dann für 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Stempel wird mit dem Überstand für 10 min beschichtet. Nach dreimaligem Spülen mit ddH₂O wird der Stempel mit Stickstoff trocken geblasen und für 1 min auf ein gereinigtes und getrocknetes Deckglas aufgebracht. Unmittelbar nach Abnahme des Stempels erfolgt die Beschichtung des Substrates mit Laminin (20 µg/ml in HBSS, 60 min, Raumtemperatur; Sigma), um aus Hühnchenretina auswachsenden Axonen eine positive Grundlage zu bieten.

2.6 Substratherstellung: Strukturierte Substrate durch kovalente Proteinkopplung an Glas

2.6.1 Reinigung der Deckgläser

Handelsübliche Deckgläser #1 (22 x 22 mm, Roth; Ø 18 mm, Marienfeld) werden in einer Petrischale für 5 min in Hellmanex II (Hellma) im Ultraschallbad behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit ddH₂O folgt eine zweite Behandlung im Ultraschallbad für 5 min (in ddH₂O) sowie erneutes Waschen in ddH₂O.

2.6.2 Aktivierung der Deckgläser

Zur Aktivierung werden frisch gereinigte Deckgläser in einem Teflonhalter für 5 h bei 90°C (Ofen) in verdünnter Salzsäure (6%; 210 ml ddH₂O + 40 ml 37% Salzsäure, p.a.) inkubiert. Dadurch wird die Glasoberfläche mit OH-Gruppen abgesättigt. Nach dreimaligem gründlichen Waschen mit ddH₂O folgt das Trockenblasen mit Stickstoff. Zur weiteren Trocknung werden die Gläser zwei Mal in Aceton (> 99,5%, p.a.) getaucht. Die Gläser werden wieder mit Stickstoff trocken geblasen und für 15 min bei 70°C im Ofen getrocknet. Die noch warmen Gläser kommen sofort in eine Silanlösung, bestehend aus 10 ml Dimethylformamid (DMF, für Spektroskopie), 0,15 g Imidazol (Sigma) und 200 µl 3-Aminopropyltrimethoxysilan 97% (APTS; Aldrich). Der Ansatz wird mit Stickstoff begast und gasdicht für 14 h bei 100°C im Ofen inkubiert. Nach Entnahme aus der Silanlösung erfolgt zweimaliges Waschen der Deckgläser in jeweils ca. 10 ml Aceton (> 99,5%, p.a.) und anschließendes Trockenblasen mit Stickstoff. Zum Schluss werden die Gläser für 1 h bei 100°C im Ofen getrocknet. Durch diese Behandlung weisen die Gläser eine möglichst große Dichte an Aminogruppen auf ihrer Oberfläche auf.

2.6.3 Stempelvorgang und Proteinbeschichtung

Die kovalente Kopplung von Proteinen auf die Glasoberfläche erfolgt mit Hilfe von bifunktionalen Crosslinkern. Diese besitzen zwei reaktive Gruppen, mit denen sie kovalente Bindungen zu Proteinen bzw. bestimmten chemischen Gruppen ausbilden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vor allem BS³ und *Sulfo*-KMUS verwendet. BS³ (Pierce) ist ein wasserlöslicher homobifunktionaler Crosslinker mit zwei N-hydroxysuccinimid-Ester-Gruppen (NHS-Ester), die jeweils mit primären Aminen kovalente Amidbindungen ausbilden können. *Sulfo*-KMUS (Molecular Biosciences, Inc.) ist ein heterobifunktionaler Crosslinker mit einer N-hydroxysuccinimid-Ester-Gruppe sowie einer Maleimid-Gruppe, die mit Sulfhydryl-Gruppen von Proteinen und Peptiden reagieren kann. Lösungen dieser Crosslinker werden analog zu den Thiolen bei der Gold-Thiol-Chemie als „Tinte“ für den Stempel verwendet.

Ein gereinigter Stempel wird für 10 min bei Raumtemperatur mit 220 µg/ml BS³ bzw. 66 oder 100 µg/ml *Sulfo*-KMUS in PBS inkubiert und für ca. 20 s trocken geblasen. Der Stempel wird dann flach auf ein aktiviertes Deckglas (s.o.) aufgesetzt und dort nach gutem Ansaugen für 10 min belassen. In der Zwischenzeit wird für jedes Substrat eine kleine Spatelspitze α -Methoxy- ω -NHS-Ester-Polyethylenglycol (NHS-PEG; Molekulargewicht: 2000 Dalton; Rapp) in 10 µl DMSO (> 99,5%, p.a.) gelöst und auf ein Deckglas pipettiert. Nach Abnehmen des Stempels vom Deckglas wird das Glas sofort mit der bestempelten Seite nach unten blasenfrei auf den Tropfen NHS-PEG-Lösung gelegt und für 60 min bei 55°C im Ofen inkubiert. Dieser Schritt entspricht der Hintergrundabsättigung mit EG3-O-Me bei Einsatz der Gold-Thiol-Chemie. Fibronectin wird in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS für 2 h bei Raumtemperatur aufgebracht. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Substrate in einer 6-well-plate mit 2 ml serumfreiem Medium (DMEM; Gibco, # 41966-029) überschichtet und zur Akklimation bis zur Zellaussaat in den Brutschrank gestellt. Nach jedem Stempelvorgang wird der Stempel gereinigt und erneut mit Crosslinker beschichtet.

2.7 Zellkultur

2.7.1 Verwendete Zelltypen

Folgende adhärent wachsenden Zelltypen und -Linien wurden verwendet:

Zell-Linie	Zelltyp	Herkunft	Ablösung vom Substrat
B16-F1	Maus-Melanomzelle	Prof. Dr. Beat Imhof, CMU, Genf	Abklopfen
B16-F1 transfiziert mit: Aktin-EGFP	Maus-Melanomzelle	Prof. Dr. Beat Imhof, CMU, Genf	0,3% EDTA in PBS 5 min
B16-F1 transfiziert mit: β_3 -Integrin-EGFP	Maus-Melanomzelle	Prof. Dr. Beat Imhof, CMU, Genf	0,3% EDTA in PBS 5 min
3T3 NIH	Maus-Fibroblasten	Prof. Dr. Beat Imhof, CMU, Genf	0,14% Trypsin + 4 mM EDTA; 5 min
3T3 NIH transfiziert mit: Aktin-EGFP	Maus-Fibroblasten	Prof. Dr. Beat Imhof, CMU, Genf	0,14% Trypsin + 4 mM EDTA; 5 min
3T3 NIH transfiziert mit: β_3 -Integrin-EGFP	Maus-Fibroblasten	Prof. Dr. Beat Imhof, CMU, Genf	0,14% Trypsin + 4 mM EDTA; 5 min
BRL	Büffelratte-Leberzellen	ATCC	0,14% Trypsin + 4 mM EDTA; 5 min

Tab. 2.2: Verwendete Zelltypen und Ablösung vom Substrat.

2.7.2 Routine-Zellkultur

Die Zellen werden in 25 cm²-Zellkulturflaschen (Costar, TPP) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit mit 5 ml Medium pro Flasche gezogen. Alle Zelltypen wachsen in Dulbecco's Modified Eagle Growth Medium (DMEM; Gibco # 41966-029) mit 10% Fötalem Rinderserum (FCS; Gibco # 16000-044) ohne Zusatz von Antibiotika. Das Medium für die GFP-transfizierten Zell-Linien wird außerdem mit 1 mg/ml Geneticin G418-Sulfat (Gibco) versetzt. Drei Mal wöchentlich werden die Zellen unter sterilen Bedingungen zwei Mal mit je 5 ml PBS gewaschen, vom Substrat abgelöst (siehe Tab. 2.2), in 5 ml serumhaltigem Medium aufgenommen und 5 min mit 200 g (1000 U/min) abzentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Dadurch wird Trypsin und/oder EDTA entfernt. Das Zellpellet wird in 5 ml serumhaltigem Medium (10% FCS) resuspendiert und die Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen auf neue Flaschen verteilt, in die bereits 5 ml frisches, serumhaltiges Medium (10% FCS) vorgelegt wurde.

2.7.3 Auszählung der Zellen

Die Zellen werden wie zur Routine-Kultur gewaschen, abgelöst und zentrifugiert (Kap. 2.7.2), dann jedoch in 5 ml serumfreiem Medium (DMEM, Gibco # 41966-029) aufgenommen. Die Zellanzahl wird mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu werden 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Trypanblaulösung (50% w/v in PBS) versetzt und 10 µl dieser Mischung auf die Kammer aufgetragen. Vier Quadranten der Kammer werden ausgezählt und gemittelt. Tote Zellen färben sich durch das Trypanblau und werden nicht mitgezählt. Die mittlere Zellzahl wird mit 10^4 multipliziert und ergibt die Zellzahl/ml in der mit Trypanblau versetzten Zellsuspension.

2.7.4 Zell-Aussaat auf ECM-Substrate

Für die Experimente wurden Zellkulturflaschen geerntet, die zu 40 - 80% konfluent bewachsen sind. Die Zellanzahl wird bestimmt (Kap. 2.7.3) und die Zellen nochmals für 5 min abzentrifugiert (200 g bzw. 1000 U/min; Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Das Zellpellet wird in serumfreiem Medium (DMEM; Gibco # 41966-029) resuspendiert, so dass sich eine Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/ml ergibt. Jeweils 2 ml dieser Zellsuspension werden pro well in einer 6-well-plate auf frisch hergestellte und akklimatisierte Substrate ausplattiert. Dies ergibt eine Zellbedeckung von 1×10^4 Zellen/cm². Die Zellen werden in serumfreiem Medium (DMEM) unter Standardkulturbedingungen (37°C, 5% CO₂, 98% Luftfeuchtigkeit) für 10 min, 1 h oder über Nacht inkubiert.

2.8 Histochemie

2.8.1 Ablauf

Die Zellen werden bei Raumtemperatur für 10 min mit 4% Paraformaldehyd (PFA; Sigma) in PBS fixiert und anschließend 3 x 5 min mit 0,1% Triton X-100 in PBS (PBS-Triton) gewaschen und permeabilisiert. Die Inkubation mit Primärantikörpern erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Primärantikörper werden in Antikörperverdünnungslösung (AVL, 1% BSA in PBS + 0,02% Thimerosal) verdünnt (Tab. 2.3). Nach 3 x 5 min Waschen mit PBS-Triton erfolgt die Inkubation mit Sekundärantikörpern für ebenfalls 1 h. Dabei handelt es sich um fluoreszenzmarkierte F(ab')₂-Fragmente, die wie die Primärantikörper in AVL verdünnt werden (Tab. 2.4). Für die Färbung des Aktin-Zytoskeletts sowie der Zellkerne wird dem Sekundärantikörpermix fluoreszenzmarkiertes Phalloidin sowie DAPI zugegeben (Tab. 2.5). Zum Schluss wird nochmals 3 x 5 min mit PBS-Triton gewaschen und die Präparate schließlich in Mowiol (Kap. 2.8.5) eingebettet und im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.8.2 Verwendete Primärantikörper

Antigen	Antikörper-Typ	Herkunft	Verdünnung
FAK	mAb IgG	BD Transduction Laboratories	1:100
Fibronectin	pkI IgG	Sigma	1:400
Fibronectin	mAb IgG	BD Transduction Laboratories	1:500
Laminin	pkI IgG	Sigma	1:100
Paxillin	mAb IgG	BD Transduction Laboratories	1:500
Phospho-Tyrosin	mAb IgG	Santa Cruz Biotechnology	1:100
β_1 -Integrin	mAb IgG	BD Transduction Laboratories	1:100
β_1 -Integrin	pkI	Pharmingen	1:50
Talin	mAb IgG	Biotrend	1:100
Talin	mAb IgG	Sigma	1:200
Tensin	mAb IgG	BD Transduction Laboratories	1:50
Tubulin	mAb IgG	Sigma	1:1000
Tubulin	pkI IgG	Sigma	1:500
Vinculin	mAb IgG	Sigma	1:50
Vitronectin	mAb IgM	Sigma	1:1000
α_5 -Integrin	pkI IgG (Ziege)	Santa Cruz Biotechnology	1:100
α -Actinin	mAb IgG	Biotrend	1:50

Tab. 2.3: Verwendete Primärantikörper (1:2 vorverdünnt in Glycerol) und ihre Verdünnungen.

2.8.3 Verwendete Sekundärantikörper

Antigen	Farbstoff	Herkunft	Verdünnung
Maus IgG	Cy3	Dianova	1:500
Maus IgG	Cy5	Dianova	1:200
Maus IgG	AMCA	Dianova	1:200
Maus IgG	Alexa488	Molecular Probes	1:200
Maus IgM; μ -Kette	Cy3	Dianova	1:200
Maus IgM; μ -Kette	AMCA	Dianova	1:200
Kaninchen IgG	Cy3	Dianova	1:500
Kaninchen IgG	Cy5	Dianova	1:200
Kaninchen IgG	AMCA	Dianova	1:200
Kaninchen IgG	Alexa488	Molecular Probes	1:200
Ziege IgG	Cy3	Dianova	1:500

Tab. 2.4: Verwendete Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen.

2.8.4 Andere Färbesubstanzen

„Antigen“	Farbstoff	Herkunft	Verdünnung
Aktin	Alexa543	Molecular Probes	1:200
Aktin	Alexa488	Molecular Probes	1:200
DNA	DAPI	Sigma	1:1000

Tab. 2.5: Verwendete weitere Färbesubstanzen und ihre Verdünnungen.

2.8.5 Herstellung des Einbettmediums („Mowiol“)

50 g Mowiol 4-88 (Hoechst) werden in 200 ml PBS über Nacht gerührt, 100 ml Glycerin zugegeben und weitere 8 h gerührt. Zum besseren Lösen des Pulvers kann der Ansatz auf $\leq 40^\circ\text{C}$ erwärmt werden. Nach Einstellen eines pH-Wertes von 8 – 8,5 mit 1 N NaOH werden 300 μl Thimerosal (2% in ddH₂O) zugegeben und anschließend die Masse für 15 min bei 4000 U/min zentrifugiert (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). Der Überstand wird in 10 ml-Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch wird dem in der Mikrowelle aufgetauten Mowiol eine Spatelspitze N-Propyl-Gallat (Sigma) zugegeben und die Masse gründlich durchmischt. Nicht gelöstes N-Propyl-Gallat wird abzentrifugiert (10 min, 4000 U/min, Centrifuge 5810 R, Eppendorf). N-Propyl-Gallat schützt Fluoreszenzfärbungen vor dem vorzeitigen Ausbleichen.

2.9 Hilfsmittel zur Auswertung

2.9.1 Verwendete Optiken zur Analyse der Präparate

2.9.1.1 Mikroskope

LSM 510, Zeiss	konfokales Laser Scanning Mikroskop, invers
Axioplan, Zeiss	konventionelles Mikroskop mit Durchlicht- und Fluoreszenzeinrichtung, aufrecht

2.9.1.2 Objektive

Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC, Zeiss
 Plan-Neofluar 40x/1,3 Oil DIC, Zeiss
 Plan-Neofluar 10x/0,30, Zeiss

2.9.1.3 CCD-Kamera

Spot 1.3.0 (diagnostic Instruments, Inc.)

2.9.2 Verwendete Software zur Bildbearbeitung, Bildanalyse und Auswertung

Photoshop 6.0 (Adobe)
LSM 510 (Zeiss)
Metamorph 3.0 (Visitron)
Origin 6.0 (Microcal)
Excel 2000 (Microsoft)

2.9.3 Verwendete Hilfsmittel zur Erstellung der Videozeitrafferaufnahmen

Axiovert 100, Zeiss	konventionelles Mikroskop mit Durchlicht- und Fluoreszenzeinrichtung, invers
Plan-Apochromat 63x/1,4 Oil DIC, Zeiss	Objektiv
C4742-95-10, Hamamatsu	CCD-Kamera
Openlab (Improvision)	Software für Mikroskopsteuerung und Bildverarbeitung

2.10 Zeitraffer-Untersuchungen

Die Zeitraffer-Untersuchungen wurden am Centre Medical Universitaire (CMU) der Universität Genf im Labor von Prof. Dr. Beat Imhof durchgeführt. Sämtliche Substrate wurden mit der Gold-Thiol-Chemie und Fibronectin gefertigt. Um die Muster am lebenden Präparat sichtbar zu machen, wurde bei der Substrat-Beschichtung dem unbehandelten Fibronectin 10% Alexa546 fluoreszenz-markiertes BSA beigemischt. Da die Zeitraffer-Untersuchungen an einem inversen Mikroskop (Axiovert 100, Zeiss) durchgeführt wurden, mussten geeignete Gefäße hergestellt werden. Für solche Gefäße wird von Zellkultur-Petrischalen (Durchmesser: 35 mm) der Boden so ausgestanzt, dass ein kleiner Rand von ca. 1 mm noch vorhanden bleibt. Dieser Rand wird vom Schaleninneren her mit Xylol für ca. 10 min unter dem Abzug angelöst und dann ein Deckglas #1 mit einem Durchmesser von 35 mm eingepasst. Im Verlauf von 1 h verdunstet das Xylol, das angeweichte Polypropylen der Petrischalen härtet wieder aus und das Deckglas ist fixiert. Die Dichtigkeit wird durch Einfüllen von Ethanol für mehrere Minuten überprüft. B16F1-Zellen, transfiziert mit Integrin- β_3 -GFP (B16- β_3 -Zellen) oder Aktin-GFP (B16-Aktin-Zellen), werden wie beschrieben vom Routine-Substrat abgelöst (Kap. 2.7.2), auf den mikrostrukturierten Substraten in 6-well-plates ausplattiert und für 10 min im Brutschrank inkubiert. Diese Zeitspanne ist für die Zellen ausreichend, um am Substrat zu adhären. Die Substrate werden dann vorsichtig entnommen, umgedreht und in mit 2 ml serumfreiem Ham's F12-Medium (Gibco, # 21765-029) gefüllte Glasboden-Petrischalen gelegt. Damit haften die Zellen „an der Decke“. Um das Substrat gegen Verrutschen zu sichern, wird es mit einem 5 g schweren Teflonscheibchen beschwert. Das Verhalten der Zellen wird dadurch nicht beeinträchtigt. Während der Zeitraffer-Aufnahme werden die Zellen in einer Inkubationskammer auf dem Mikroskop bei konstant 37°C, 5% CO₂ sowie 98% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Zellen und Muster wurden mit Standard-Filtersets (Omega) und einer CCD-Kamera (Hamamatsu C4742-95-10) visualisiert. Die Bilder wurden in Intervallen von 30 oder 60 s aufgenommen und mit Openlab (Improvision) verarbeitet.

2.11 Quantifizierungen

2.11.1 Fibronectin-Adsorption auf Thiol-beschichteten Goldsubstraten

Die Untersuchungen am Rasterkraftmikroskop (AFM) wurden von Dr. U. Weiland, Universität Konstanz, durchgeführt. Standardsubstrate der Gold-Thiol-Chemie (Abb. 1.4) wurden auf einer Stahlunterlage fixiert, ohne dass die Substrate austrockneten. Die Substratoberfläche wurde in PBS abgebildet unter Verwendung eines Digital Instruments Multimode MMAFM-2, das mit einer Nanoscope IIIa Controller-Einheit, einem JV-Scanner (120 µm seitlicher Scanbereich) und einer Flüssigkeitszelle von Digital Instruments (ohne O-Ring) ausgestattet war. Des Weiteren wurden Olympus sensor chips (OMCL-RC-800PS-2) mit rechtwinkligen Cantilevers mit einer Nominalkraft von 0,05 N/m und 0,09 N/m und einer geschärften Siliziumnitrid-Spitze eingesetzt. Die Substratoberfläche wurde im Kontaktmodus unter minimaler Auflagekraft abgebildet und mit Hilfe der Nanoscope-Software analysiert. Zur Charakterisierung der Fibronectin-Substrate mit Hilfe von Fluoreszenz (Kap. 3.3.6) wurden die Substrate immunhistochemisch markiert und unter standardisierten Einstellungen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop aufgenommen. Die Rohdaten der Fluoreszenz-Intensitäten einzelner Pixel wurden unter Verwendung der LSM-Software ermittelt und mit Hilfe der Excel-Software dargestellt.

2.11.2 Initiale Zelladhäsion

Abgelöste B16-Zellen in einer homogenen Suspension wurden über mikrostrukturierten Fibronectin-Dots substraten (Stempel 1, Abb. 2.1) mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² ausgesät. Nach 10 min wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert. Das Substrat wurde immunhistochemisch, die Zellen mit Hilfe einer Kernfärbung markiert. Die Bahnen mit unterschiedlichen Mustern wurden einzeln am Mikroskop auf ihre Qualität überprüft und eine digitale Übersichtsaufnahme (Kamera: Spot 1.3.0) der gesamten Stempelstruktur (alle Bahnen) gemacht. Hierzu mussten einzelne Bilder aufgrund des zu kleinen Bildausschnittes zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden. Die Anzahl adhärrierender Zellen wurde bestimmt, indem am Computer-Monitor mit Hilfe der Metamorph- bzw. Photoshop-Software über jedem qualitativ hochwertigem Muster ein rechteckiger Bereich definierter, stets gleicher Größe markiert wurde und die Kerne innerhalb dieses Bereichs ausgezählt wurden. Die effektive Bedeckung der Substratoberfläche wurde am konfokalen Laser Scanning Mikroskop mit Hilfe des Histogramm-Werkzeugs bestimmt. Vier Stempelstrukturen aus zwei Experimenten wurden ausgewertet. Von jeder Stempelstruktur konnten 12 – 15 Bahnen ausgewertet werden. Unbedeckten Substratbereichen wurde der Wert 0% Oberflächenbedeckung zugeordnet. Homogen beschichtete Substratbereiche, die als 100% Oberflächenbedeckung gewertet werden könnten, standen leider nicht in genügender Fläche zur Verfügung.

2.11.3 Überbrückung anti-adhäsiver Distanzen

B16-Zellen sowie BRL-Zellen wurden für 1 h auf Substraten mit 9 µm²-Dots und unterschiedlichen Abständen (Stempel 1) ausplattiert, fixiert und histochemisch das Aktin-Zytoskelett sowie das Substratmuster markiert. Die Zellen wurden entsprechend ihrer

Morphologie in drei Gruppen aufgeteilt: (1) Zellen, die 5 Dots und mehr bedecken, (2) Zellen, die sich über 2 – 4 Dots ausbreiten und (3) Zellen, die auf nur einem Dot haften. Am Mikroskop wurden acht Stempelstrukturen aus zwei Experimenten auf ihre Qualität überprüft und die Zellen der jeweiligen Gruppen ausgezählt. Die prozentuale Verteilung wurde ermittelt und mit Hilfe der Origin-Software gegen den jeweiligen Dotabstand aufgetragen.

2.11.4 Zellspreading

B16-Wildtyp-Zellen sowie 3T3 NIH-Fibroblasten wurden auf strukturierten Fibronectin-Substraten (hergestellt mit Gold-Thiol-Chemie, Stempel 1 und 2) für 1 h kultiviert und das Substrat sowie das Aktin-Zytoskelett fluoreszent markiert. Die effektiven Dotgrößen und –abstände wurden mit Hilfe des Histogramm-Werkzeugs im LSM-Programms ermittelt. Hierzu wurde jeweils ein Schwellenwert gesetzt, um die Dots klar vom Hintergrundrauschen trennen zu können. Die so erhaltenen Flächen von – je nach Substratgeometrie – 3 bis 20 Dots lieferten die durchschnittliche Dotgröße. Aus diesen Daten wurde für jedes Muster der ECM-Proteinanteil der Substratoberfläche (Oberflächenbedeckung) berechnet. Unbedeckten Substratbereichen wurde der Wert 0% Oberflächenbedeckung zugeordnet, homogen beschichtete Bereiche galten als 100% Oberflächenbedeckung. Die Zellgrößen von 10 – 13 Zellen auf 11 Mustern wurden anhand der Aktinfärbung mit Hilfe des Histogramm-Werkzeugs der LSM-Software gemessen. Sie wurden mit Hilfe der Origin-Software gemittelt und mit dem Standardfehler gegen die Substratbedeckung mit ECM-Protein aufgetragen.

2.11.5 Dotnutzung

B16-Wildtyp-Zellen wurden auf strukturierten Fibronectin-Substraten (hergestellt mit Gold-Thiol-Chemie, Stempel 1, Abb. 2.1) für 1 h kultiviert und das Substrat, das Aktin-Zytoskelett sowie die Fokalkontakte fluoreszent markiert. Als Marker für die Kontakte wurden Phosphotyrosin und Paxillin gewählt. Von drei Dotgrößen mit jeweils einem Abstand von 10 μm wurden die effektiven Dotgrößen ebenso wie die Größe der zugehörigen Kontakte mit Hilfe des Histogramm-Werkzeugs im LSM-Programm bestimmt (siehe auch Kap. 2.11.4). Auf jedem Muster wurden von vier verschiedenen Zellen jeweils 3 Kontakte in der Zellperipherie ausgemessen. Das Verhältnis „Kontaktgröße/Dotgröße“ wurde als „Dotnutzung“ bezeichnet und prozentual angegeben. Auf homogen beschichteten Substratstellen sowie 12,6 μm^2 großen Dots mit unterschiedlichen Abständen wurden die Phosphotyrosin- und Paxillin-positiven Bereiche ebenfalls in der Zellperipherie auf die gleiche Weise untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 *Charakterisierung der verwendeten mikrostrukturierten Protein-Substrate*

Zur Untersuchung der Zelladhäsion wurden zweidimensionale, mikrostrukturierte Protein-Substrate verwendet. Die Substrate wurden mit Hilfe von Microcontact Printing (μ CP) hergestellt. Bei dieser Methode wird ein Stempel aus Silikon mit einer gelösten Substanz („Tinte“) beschichtet und mit einer Oberfläche in Kontakt gebracht. An den Stellen direkten Kontaktes wird die „Tinte“ vom Silikon auf die Oberfläche übertragen. In der vorliegenden Arbeit wurde – soweit nicht anders erwähnt – Alkanthiol auf Gold gestempelt und das Substrat anschließend mit Protein beschichtet. Diese Methode kommt ursprünglich aus der Chiptechnologie und wurde Mitte der 1990iger Jahre erstmals auch in der Biologie eingesetzt. Sie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für biologische Fragestellungen weiterentwickelt und optimiert. Es gelang erstmals, proteinbeschichtete Substrate herzustellen, deren Strukturen weniger als $1 \mu\text{m}^2$ groß sind und damit Grenzen der Zelladhäsion auszuloten. Zu Beginn wurden die physikalischen Eigenschaften der Substrate untersucht.

3.1.1 **Das Material des Stempels ist entscheidend für kleine Substratgeometrien**

Beim eigentlichen Stempelvorgang, dem Aufbringen des Stempels auf die zu bestempelnde Oberfläche, saugt sich der Stempel an dieser fest. Dabei entstehen lokal variierende Kräfte, die Deformationen des Stempelsilikons bewirken können. Solche Deformationen verhindern häufig, dass das Muster des Stempels treu auf die Oberfläche übertragen wird. Statt dessen treten Musterfehler im Substrat auf, so dass dieses von der ursprünglichen Geometrie abweicht. Dieser Effekt tritt umso stärker auf, je kleiner die gestempelten Strukturen werden. Er kann durch geeignete Wahl des Silikons bei der Stempelherstellung verringert werden. Experimente vor allem mit Stempel 2 (Abb. 2.2), aber auch mit Stempel 1 (Abb. 2.1), zeigten, dass bei Verwendung eines härteren Silikons nach IBM-Rezeptur (Schmid und Michel, 2000) das Muster wesentlich exakter übertragen wird, als bei Verwendung des weichen Sylgard 184. Bei letzterem fallen Strukturen wie z.B. die Fläche von Proteinquadraten („Dots“) häufig um $> 10\%$ größer aus als bei Stempeln, die mit dem IBM-Silikon hergestellt wurden. Unter Umständen werden bei Verwendung von Sylgard 184 Dots sogar mit dem doppelten der theoretischen Fläche übertragen ($1 \mu\text{m}^2$ statt theoretisch $0,5 \mu\text{m}^2$).

3.1.2 **Fibronektin adsorbiert selektiv an hydrophob terminierte Alkanthiole und bildet eine Monolage**

Die Methode des μ CP ist sehr flexibel einsetzbar. Auf einige Varianten soll später in dieser Arbeit genauer eingegangen werden (Kap. 3.4). Hauptsächlich kam das Verfahren der Gold-Thiol-Chemie zum Einsatz. Bei diesem Verfahren wird der Stempel mit einem methylterminierten Alkanthiol (Octadecylmercaptan, ODM) beschichtet und auf eine Goldoberfläche aufgebracht. An Stellen mit direktem Kontakt zwischen Stempel und Goldoberfläche bindet

das Alkanthiol über seine Mercaptogruppe an das Gold und wird so darauf übertragen. Verbliebene freie Flächen der Goldoberfläche werden nach dem Stempelvorgang mit einem Ethylenglykol-terminierten Alkanthiol abgesättigt. Gibt man auf ein so präpariertes Substrat eine Proteinlösung, lagert sich Protein selektiv an die gestempelten hydrophoben, methyl-terminierten Thiolstrukturen an. Die Zwischenräume sind durch das hydrophile Ethylenglykol-terminierte Thiol proteinabweisend. Die Proteinverteilung auf einem solchen Präparat läßt sich mit einem Rasterkraftmikroskop (atomic force microscope = AFM) darstellen. Rasterkraftmikroskope tasten mit einer winzigen Spitze die Oberfläche eines Präparates ab und liefern durch die vertikalen Auslenkungen, die sie beim Kontakt mit der Oberfläche erfahren, Informationen über die dreidimensionale Struktur der abgetasteten Oberfläche. Abb. 3.1 A zeigt die Übersichtsaufnahme eines Substrates, das aus $1,4 \mu\text{m}^2$ großen Fibronectin-Quadraten besteht, die im Abstand von $5 \mu\text{m}$ zueinander angeordnet sind. Diese Proteinstrukturen werden im folgenden als „Dots“ bezeichnet. Die Zwischenräume lassen nur wenig adsorbiertes Protein erkennen, und bestätigen die proteinabweisende Eigenschaft des Ethylenglykols. Die Dots hingegen erheben sich um ca. 3 nm gegenüber dem Hintergrund (Abb. 3.1 D), was gut mit dem ungefähren Durchmesser eines Fibronectin-Moleküls übereinstimmt (2 - 3 nm; Engel et al., 1981) und auf eine Monolage des Proteins schließen lässt. Das Höhenprofil über einen Dot hinweg bestätigt die zumeist einfache Proteinschicht (Abb. 3.1 D). Es zeigt aber auch, dass Regionen mit doppelter oder dreifacher Proteinschichtung vorkommen können. Dies wird vor allem an den Kanten der Dots beobachtet. Die Fibronectin-Moleküle sind z.T. nur über schwache Wechselwirkungen an das Substrat gebunden. Trotz der geringen Auflagekraft beim Abtasten des Dots in Abb. 3.1 B treten Artefakte auf, die auf das Verschieben von Fibronectin-Molekülen durch die AFM-Spitze zurückzuführen sind. Sie zeigen sich in den horizontal verlaufenden Linie, die der Abtastrichtung entsprechen. Erhöht man die Abtastkraft, verstärkt sich dieser Effekt und die ursprünglich annähernd 100%ige Proteinbedeckung der Dots wird auf 40 – 60% reduziert.

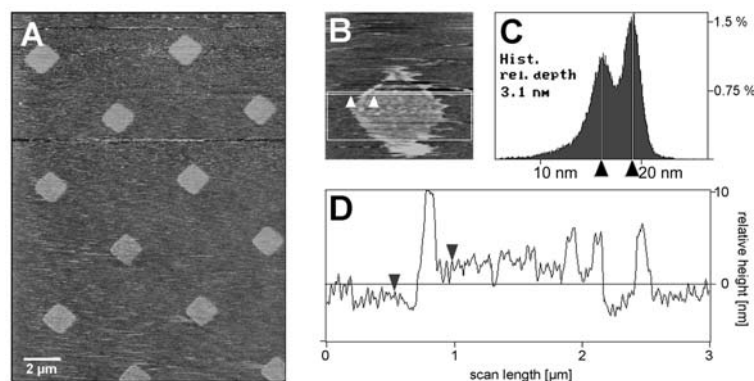


Abb. 3.1: Protein-Adsorption auf thiolstrukturierten Substraten: Rasterkraftmikroskopie eines mit Fibronectin beschichteten mikrostrukturierten Substrates.

(A) Die Übersichtsaufnahme (Muster von Quadraten mit $1,2 \mu\text{m}$ Kantenlänge und $5 \mu\text{m}$ Abstand, Scanrate 0,5 Hz) zeigt, daß das Protein fast ausschließlich auf den hydrophob terminierten Strukturen adsorbiert. (B) Großaufnahme eines einzelnen Fibronectin-Dots. (C) Das Höhen-Histogramm der in (B) markierten Fläche zeigt eine Höhendifferenz von ca. 3 nm zwischen der proteinbedeckten Fläche und der sie umgebenden Ethylenglykol-Oberfläche. (D) Das Höhenprofil über einen Dot (Linie und Pfeilspitzen aus B; Scanrate 1,5 Hz) zeigt vor allem eine Proteinmonolage. Jedoch können vor allem im Randbereich von Dots bis zu drei Lagen übereinander beobachtet werden.

Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ulrich Weiland, Universität Konstanz.

Kleinere Dots sind mit Hilfe des AFM nur äußerst schwer auffindbar. Es wurde daher versucht, ihre Fibronectinbedeckung durch eine Immunfluoreszenzfärbung am konfokalen Laser Scanning-Mikroskop zu quantifizieren. Die kleinsten reproduzierbar herstellbaren Dots besitzen eine Fläche von $0,1 \mu\text{m}^2$. Die Analyse der Pixelintensitäten für $0,1 \mu\text{m}^2$ große Dots eine Verminderung der Fluoreszenzstärke um ca. 25% im Vergleich zu $1,1 \mu\text{m}^2$ -Dots (Abb. 3.2). Dies muss jedoch nicht zwingend auf eine reduzierte Proteinbedeckung zurückzuführen sein, sondern kann in der Methodik begründet liegen. Die geringe Anzahl von Fluorophoren in solch kleinen Strukturen bedingt u.U. ein schnelles Ausbleichen der Dots.

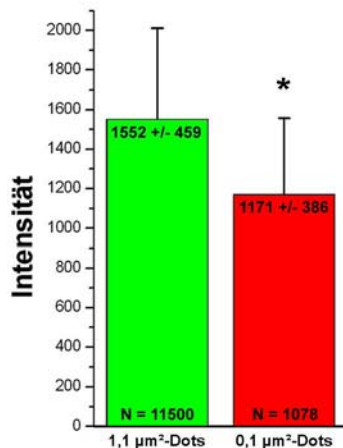


Abb. 3.2:
Proteinbedeckung auf $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots.

Von $1,1 \mu\text{m}^2$ und $0,1 \mu\text{m}^2$ großen Fibronectin-Dots wurde nach immunhistochemischer Färbung die Intensität der Fluoreszenz pixelweise gemessen. Die $0,1 \mu\text{m}^2$ kleinen Dots zeigten im arithmetischen Mittel eine geringere Intensität als die $1,1 \mu\text{m}^2$ großen Dots (t-Test).

Balken: Standardabweichung

3.2 Grundlegendes Zellverhalten auf mikrostrukturierten Protein-Substraten

Adhärenent wachsende Zellen benötigen für ihr Überleben ein Substrat auf dem sie haften (adhärieren) und sich abflachen bzw. ausbreiten (spreaden) können. Zu dieser Gruppe von Zellen gehören u.a. Fibroblasten, Epithelzellen sowie eine Anzahl unterschiedlicher Krebszelltypen. Löst man solche Zellen enzymatisch oder mechanisch von ihrem Substrat ab, kugeln sich die ursprünglich flach auf der Unterlage ausgebreiteten Zellen aufgrund ihrer intrazellulären Spannung ab. Die nun in Suspension befindlichen Zellen setzen sich der Schwerkraft folgend ab, kommen mit dem unterliegenden Substrat in Kontakt und haften. Dieser Vorgang wird als Adhäsion bezeichnet. Von adhäsionsfördernden Substraten erhalten die Zellen Signale, die sie veranlassen, sich wieder auszubreiten, zu spreaden. Auf anti-adhäsiven Substraten können sich die Zellen nicht abflachen. Sie bleiben kugelig und sterben nach einigen Stunden apoptotisch ab.

3.2.1 Die Zelladhäsion saturiert bei einer Proteinbedeckung des Substrates von ca. 20%

Adhärenent wachsende Zellen, die in Suspension über einem mikrostrukturierten Substrat ausplattiert werden, kommen beim Absetzen mit dem unterliegenden Muster in Kontakt. Dieser Vorgang geschieht innerhalb von Minuten. Um zu untersuchen, ob das geometrische Muster auf die Adhäsion der Zellen einen Einfluss hat, wurden B16-Zellen in einer

homogenen Suspension über mikrostrukturierten Fibronectin-Substraten mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/cm² ausgesät. Nach 10 min wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert. Das Substrat wurde immunhistochemisch, die Zellen mit Hilfe einer Kernfärbung markiert. Im Durchlichtmikroskop zeigt sich schon vor Fixierung der Zellen, dass die homogen proteinbeschichteten Stege (vergl. Abb. 2.1) zwischen den unterschiedlich strukturierten Mustern dichter mit Zellen besiedelt sind als die meisten Muster selbst (Pfeile in Abb. 3.3). Die Grundzüge des strukturierten Substrats sind so bereits ohne Markierung zu erkennen. Die Kernfärbung bestätigt diese Beobachtung (Abb. 3.3 B) und zeigt zusätzlich, dass die verschiedenen Muster unterschiedlich dicht mit Zellen besetzt sind. Dabei sind Substrate mit größerer ECM-Oberflächenbedeckung auch dichter besiedelt. Auf Bahnen mit $\geq 16\%$ Oberflächenbedeckung adhären so viele Zellen, daß kaum ein Unterschied zu den homogen beschichteten Flächen zu erkennen ist (★ in Abb. 3.3). Auch Bahnen mit einer Fibronectinbedeckung von 10% bzw. 7% sind sofort als dichter besiedelt erkennbar (+). Dabei scheint die exakte Geometrie der Substrate eine untergeordnete Rolle zu spielen.

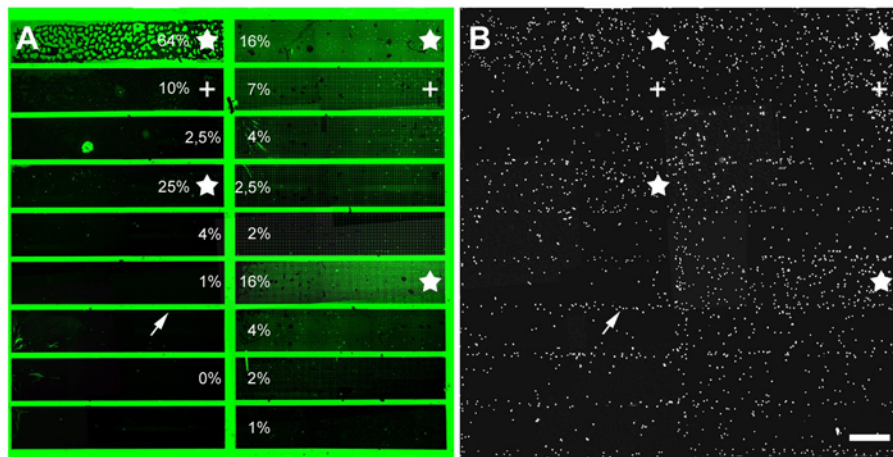


Abb. 3.3: Initiale Zelladhäsion: Überblick.

B16-Maus-Melanoma-Zellen wurden in serumfreiem Medium über einem Fibronectin-Substrat ausplattiert. Nach 10 min wurden die Zellen fixiert und eine Kernfärbung durchgeführt. **(A)** Immunhistochemische Färbung des Substrates. Man erkennt klar die einzelnen Bahnen, von denen jede ein anderes Dottmuster präsentiert. Die Prozentangaben beziehen sich auf die effektiv gemessene prozentuale Bedeckung der Bahnen mit Fibronectin. Der optische Eindruck der Färbung entspricht in der Abbildung nicht den realen Bedingungen, da kleine Dots bei schwacher Vergrößerung schwer detektierbar sind. Daher erscheint z.B. die effektiv zu 25% bedeckte Bahn ($0,25 \mu\text{m}^2$ -Dots) dunkler als die nebenliegende Bahn mit 2,5% Bedeckung ($9 \mu\text{m}^2$ -Dots). **(B)** Kernfärbung der Zellen auf dem Substrat aus A. Bereits ohne Quantifizierung sind einige Bahnen mit bloßem Auge als sehr dicht (Sterne) oder dicht (+) besiedelt zu erkennen. Ebenfalls gut anhand der Zelldichte zu erkennen sind die homogenen Fibronectinstege zwischen den Bahnen (Pfeile).

Maßstab: 400 μm .

Die relative Zellanzahl auf den einzelnen Musterbahnen von vier Präparaten wurde bestimmt (Gesamtzahl der ausgezählten Zellen über den gemusterten Substraten: 1107 = 100%) und gegen die zugehörige effektive Fibronectinbedeckung aufgetragen (Abb. 3.4). Diese wurde mit Hilfe der LSM-Software von Zeiss bestimmt. Es zeigt sich, daß eine enge Korrelation zwischen der Substratbedeckung mit Fibronectin und der Anzahl adhärerender Zellen besteht. Je dichter das Substrat mit Fibronectin bedeckt ist, desto mehr Zellen adhären darauf. Die Anzahl adhärerender Zellen steigt bis zu einer Bedeckung von ca. 20% nahezu

linear an. Im stärker bedeckten Bereich standen leider nur wenige Muster zu Verfügung, aber eine Sättigung der Kurve ist zu vermuten. Die Geometrie des Musters scheint für die Adhäsion von untergeordneter Bedeutung zu sein. Die Bedeckungen von 2%, 2,5%, 4% und 16% Fibronectin liegen jeweils doppelt in unterschiedlichen Geometrien vor, sind jedoch stets vergleichbar dicht besiedelt (Tab. 3.1).

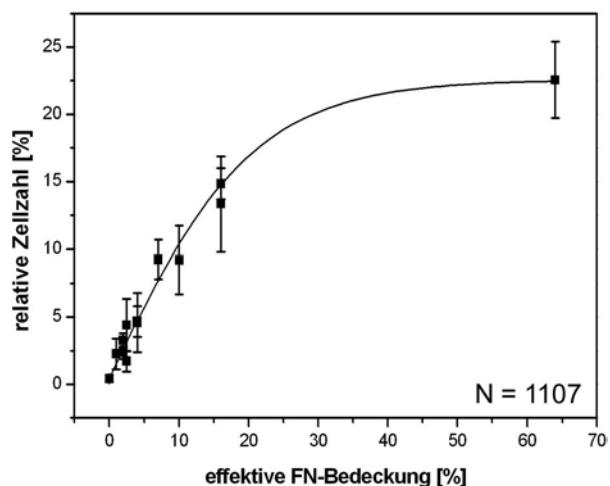


Abb. 3.4:

Initiale Zelladhäsion: Quantifizierung.

B16-Maus-Melanoma-Zellen wurden in serumfreiem Medium über einem Fibronectin-Substrat ausplattiert. Nach 10 min wurden die Zellen fixiert und eine Kernfärbung durchgeführt. Die Auszählung der Zellen von vier Experimenten ergab eine Korrelation von präsentiertem Fibronectin und Anzahl der adhärierenden Zellen. Je stärker die Fibronectinbedeckung ist, desto stärker werden die Bereiche besiedelt.

Angegeben sind die arithmetischen Mittel aus vier Substraten mit den zugehörigen Standardfehlern.

Effektive FN-Bedeckung [%]	Theoretisches Muster [d/a] [µm]	Relative Zellzahl [%]	Standardfehler
2	1/15	3,28	± 0,53
2	3/30	2,35	± 0,48
2,5	0,8/10	1,73	± 0,77
2,5	3/25	4,4	± 1,95
4	3/20	4,58	± 2,21
4	1/10	4,68	± 1,14
16	3/10	13,35	± 1,17
16	1/5	14,83	± 2,84

Tab. 3.1: Zelladhäsion auf unterschiedlich strukturierten Substraten mit gleicher Fibronectinbedeckung.

B16-Zellen wurden über strukturierten Substraten ausplattiert, nach 10 min fixiert und das Substrat sowie die Zellkerne fluoreszent markiert. Die aufgeführten Werte sind den Experimenten von Abb. 3.4 entnommen. Auf Bereichen gleicher effektiver Fibronectinbedeckung adhäreren gleich viele Zellen unabhängig von der Geometrie des Substrates.

d = Dot-Kantenlänge; a = Dotabstand von Mitte zu Mitte

3.2.2 Die Zellmorphologie wird durch das Substrat stark beeinflusst

Nach dem primären Kontakt der Zellen mit dem Substrat beginnen die Zellen innerhalb weniger Minuten sich auszubreiten. Dazu tasten sie mit flachen Ausläufern (Lamellipodien) ihre Umgebung ab und bilden neue Kontakte zum Substrat aus (Kap. 1.1.2.1). Auf diese Weise bedecken die Zellen nach und nach eine größere Substratfläche (Spreading). Für die Zellmorphologie ist das Aktin-Zytoskelett verantwortlich. Dieses spannt sich zwischen Zell-Matrix-Kontakten auf und legt so die äußere Form der Zelle fest. Breiten sich die Zellen über strukturierten Substraten aus, können sie nur über proteinbeschichteten Stellen Kontakte ausbilden und sich „festhalten“. Dadurch werden die Zellen in eine geometrische Form gezwungen, die vom unterliegenden Proteinmuster vorgegeben wird. Rechtwinklige Zellecken, gerade Zellkanten und sich zwischen Dots aufspannende Bögen sind innerhalb einer Stunde nach Ausplattierung charakteristisch und im Durchlichtmikroskop erkennbar (Abb. 3.5 A). Bedingt werden diese morphologischen Besonderheiten durch das Aktin-Zytoskelett, das sich nur zwischen den Dots aufspannen kann (Abb. 3.5 B). Auf homogenen Substraten organisiert sich das Aktin-Zytoskelett und die Zell-Matrix-Kontakte in einer eher willkürlichen Anordnung (z.B. Abb. 3.6 A).

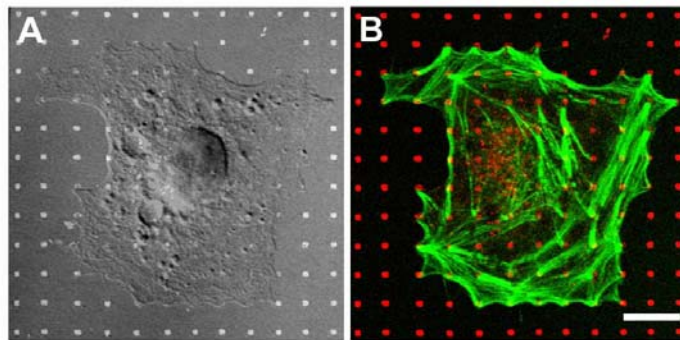


Abb. 3.5: Zellmorphologie auf mikrostrukturierten Substraten.

B16-Maus-Melanoma-Zelle, eine Stunde auf mikrostrukturierten Fibronectin-Substrat ($1 \mu\text{m}^2$ -Dots mit $5 \mu\text{m}$ Abstand) in serumfreiem Medium kultiviert. (A) Differenzielles Interferenzkontrastbild (DIC) der Zelle mit unterlegtem immunhistochemisch gefärbtem Substrat. Die Zelle richtet ihre Form strikt nach dem Muster aus. (B) Aktin-Zytoskelett-Färbung (grün) der selben Zelle wie in A mit unterlegtem Muster (rot). Die Aktinfasern enden über Fibronectin-Dots und bedingen so die Form der Zelle.

Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

3.2.3 Zellen bilden funktionelle Kontakte über ECM-Dots aus

Wie oben gezeigt, adhären Zellen bereits nach 10 min auf ihrem Substrat. Nach einer Stunde sind die Zellen sowohl auf homogenem als auch auf strukturiertem Substrat flach ausgebreitet und zeigen eine substratabhängige Morphologie (s.o.; Abb. 3.5). Zu diesem Zeitpunkt ist der Vorgang des Spreading abgeschlossen und es zeigen sich weder auf homogenem noch auf strukturiertem Substrat morphologische Unterschiede zu Zellen, die 18 Stunden kultiviert wurden. Da die länger kultivierten Zellen jedoch häufig ihr Substrat verändern, wurde für die Experimente eine Inkubationszeit von einer Stunde gewählt. Auf

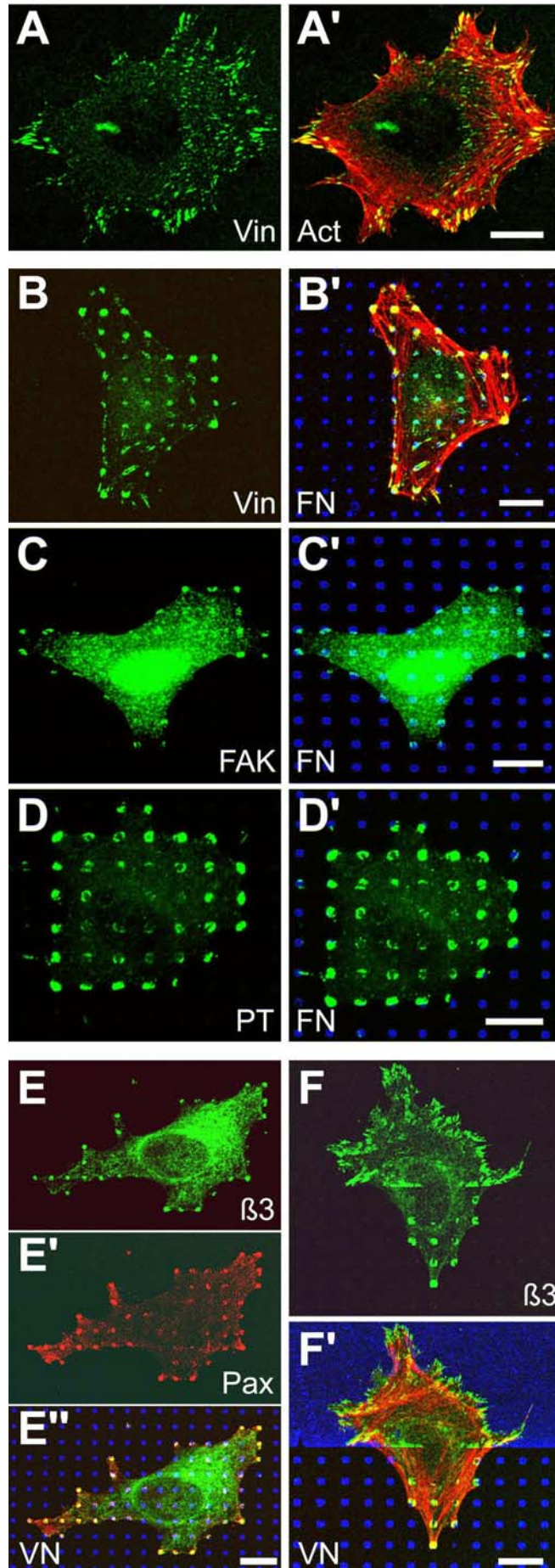


Abb. 3.6:
Molekulare Zusammensetzung von Zell-Matrix-Kontakten auf mikrostrukturierten Substraten.

B16-Maus-Melanoma-Zellen wurden für eine Stunde auf mit Gold-Thiol-Chemie hergestellten mikrostrukturierten ECM-Substraten in serumfreiem Medium kultiviert. ECM-Moleküle sowie Zytoskelett- und Kontaktproteine wurden mittels Immunhistochemie markiert. (A, A') Zelle auf homogenem Fibronectin-Substrat, das durch μ CP hergestellt wurde. Vinculin (Vin, grün) zeigt eine punkt- und strichförmige Verteilung vor allem in der Zellperipherie. Aktinfasern (Act, rot) enden häufig in Vinculin-positiven Kontakten. (B, B') Zelle auf einem Muster bestehend aus $0,6 \mu\text{m}^2$ großen Fibronectin-Dots (FN, blau) mit $5 \mu\text{m}$ Abstand. Vinculin (Vin, grün) akkumuliert intrazellulär über diesen ECM-Dots. Aktinfasern (rot) enden in Vinculin-positiven Kontakten wie auf homogenem Substrat. (C, C') Focal Adhesion Kinase-Färbung (FAK, grün) einer Zelle, auf $1 \mu\text{m}^2$ großen Fibronectin-Dots (FN, blau) sitzend. (D, D') Phosphotyrosin-Färbung (PT, grün) einer Zelle, auf $1 \mu\text{m}^2$ großen Fibronectin-Dots (FN, blau) sitzend. (E, E', E'') B16- Zelle, die Integrin- β_3 -GFP exprimiert (β_3 , grün) und in der zusätzlich Paxillin (Pax, rot) markiert wurde, auf $1 \mu\text{m}^2$ großen Vitronectin-Dots (VN, blau) sitzend. (F, F') Integrin- β_3 -GFP exprimierende (β_3 , grün) Zelle auf der Grenze zwischen einem homogenen Vitronectin-Substrat und $1 \mu\text{m}^2$ großen Vitronectin-Dots (VN, blau). Beachte die unterschiedliche Verteilung und Form der Integrincluster auf homogenem und strukturiertem Substrat. Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

diese Weise wird die Gefahr minimiert, dass die Zellen die Substratgeometrie durch Synthese und Sekretion von Matrixproteinen verändern oder zerstören. Ein möglicher Einfluss substrat-unabhängiger, nicht zu definierender Faktoren (z.B. Wachstumsfaktoren) auf das Zellverhalten wurde ausgeschlossen, indem die Experimente in serumfreiem Medium

durchgeführt wurden. Die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten unter diesen Bedingungen wurde im Vergleich zu den klassischen Bedingungen (homogen beschichtete Glasplättchen, serumhaltiges Medium) untersucht. Typische Zell-Matrix-Kontakte enthalten intrazellulär normalerweise eine Vielzahl von Zytoskelett-Elementen und signalgebenden Molekülen, die dort stark gehäuft vorkommen. Prominente Beispiele für Zytoskelett-assoziierte Proteine sind Paxillin, Vinculin und Talin. Marker für Signaltransduktion sind z.B. Phosphotyrosin und FAK (focal adhesion kinase). Zellen, die auf homogenem Substrat kultiviert werden, weisen nach immunhistochemischer Färbung ein typisches Verteilungsmuster dieser Markerproteine auf. Es besteht aus kleinen, punktförmigen Anhäufungen sowie in der Zellperipherie hauptsächlich aus großen, länglichen Strukturen. Die meisten dieser Strukturen befinden sich an Enden von Aktinbündeln. Dabei zeigt sich kein Unterschied zwischen Zellen, die auf ECM-beschichteten Glasplättchen kultiviert werden (z.B. Katz et al., 2000 u.a.), und Zellen, die auf homogenen, mit μ CP hergestellten Flächen wachsen (Abb. 3.6 A). Betrachtet man die Zellen auf strukturierten ECM-Substraten, zeigen sich starke Veränderungen in der Verteilung der Markerproteine. Vinculin (Abb. 3.6 B) und Paxillin (Abb. 3.6 E') z.B. akkumulieren strikt über den vom Substrat vorgegebenen ECM-Dots. Gleiches gilt für Signaltransduktionsmarker Phosphotyrosin und Fokal Adhesion Kinase (FAK), wobei sich Phosphotyrosin fast ausschließlich über den ECM-Dots findet. Es fällt auf, dass auf strukturierten Substraten die unterschiedlichen punkt- und streichförmigen Kontaktmorphologien homogener Substrate (Abb. 3.6 A) verschwunden sind und sich alle Kontakte stark ähneln. Wie auf homogenem Substrat enden Aktinbündel in diesen Strukturen und damit über den Dots. Diese typisch veränderte Verteilung der Kontakte zeigt sich bereits 10 min nach Aussaat der Zellen.

Rezeptoren für die Extrazelluläre Matrix (ECM) und damit Schlüssel-moleküle für die Akkumulierung der Kontaktmarker sind die Integrine. Diese Heterodimere bestehen aus einer α - und einer β -Untereinheit und akkumulieren an Stellen enger Zell-Substrat-Interaktionen (Kap. 1.1.3.1). Für die immunhistochemische Untersuchung der Integrinverteilung wurden mehrere Antikörper gegen unterschiedliche Integrin-Untereinheiten getestet, von denen jedoch keiner zufriedenstellende Ergebnisse lieferte. Daher wurden B16-Zellen eingesetzt, die mit Integrin- β_3 -GFP (Green Fluorescent Protein) stabil transfiziert sind (B16- β_3 -Zellen; Ballestrem et al., 2001). Die Integrin- β_3 -Untereinheit kommt nur in Kombination mit der Untereinheit α_v vor. Dieses Dimer bildet den Hauptrezeptor für Vitronektin, vermittelt der Zelle jedoch auch Fibronektinsignale. Das Verteilungsmuster über strukturierten Vitronektin-Substraten entsprach der Verteilung der anderen untersuchten Markerproteine (Abb. 3.6 E, F). Besonders gut zeigt sich der Einfluß des Substrates in Abb. 3.6 F, die eine B16- β_3 -Zelle an der Grenze von homogenem und strukturiertem Substrat zeigt. Während sich über dem homogenen Substrat die klassische Verteilung mit länglichen Strukturen findet, akkumuliert Integrin- β_3 in der unteren Hälfte strikt über den Vitronektin-Dots. Auch hier enden Aktinbündel in den Integrin-positiven Kontaktstellen.

Die Tatsache, dass sämtliche untersuchten Kontaktmarkerproteine ebenso wie das Aktin-Zytoskelett in Abhängigkeit des unterliegenden ECM-Substrates organisiert werden, zeigt, daß die Zellen auch unter den gewählten Experimentbedingungen funktionelle Kontakte ausbilden. Die geschilderten zellulären Verhaltensweisen wurden bei allen drei verwendeten Zell-Linien beobachtet und gelten für Substrate, die mit den ECM-Proteinen Fibronektin, Laminin oder Vitronektin hergestellt wurden (Tab. 3.2).

3.2.4 Für funktionelles Zellspreading ist das Signal der ECM essentiell

Bei den bisher gezeigten Experimenten wurden Substrate verwendet, die mit Proteinen der Extrazellulären Matrix beschichtet worden waren (Fibronektin, Laminin, Vitronektin). Diese Proteine bilden natürliche Wachstumssubstrate für Zellen und verfügen über eine Signalsequenz, die von Zellen rezeptorvermittelt erkannt wird. Kultiviert man Zellen unter ansonsten gleichen Bedingungen auf Substraten, die Proteine oder Peptide ohne diese Signalsequenz präsentieren, werden das Zytoskeletts und die Zell-Matrix-Kontakte weniger strikt organisiert. Teilweise ist gar keine Organisation mehr erkennbar sondern die Strukturen erscheinen willkürlich bzw. sind nicht detektierbar. Poly-L-Lysin ist z.B. solch ein Peptid, das aufgrund seiner starken Ladungswechselwirkungen Haftung vermitteln kann, ohne in den Zellen Signale zu induzieren. Zellen, die auf strukturiertem Poly-L-Lysin-Substrat wachsen, adhären zwar, jedoch ist diese Adhäsion unspezifisch. Anstelle von Aktinbündeln, die sich zwischen Fibronektin-Dots aufspannen (Abb. 3.7 A) findet man auf Poly-L-Lysin morphologisch veränderte Zellen, die eine Vielzahl filopodienähnlicher Ausläufer ausbilden (Abb. 3.7 B) oder starke Einbuchtungen des Zellrandes zeigen (Abb. 3.7 C). Das Aufspannen der Zellen zwischen den einzelnen Dots erscheint dabei eher zufällig als organisiert. Außerdem entfällt das Akkumulieren der Kontaktmarkerproteine wie z.B. Paxillin über den Dots. Statt dessen weisen diese Proteine eine gleichmäßige Verteilung über die ganze Zelle auf (Abb. 3.7 C). Ganz ähnliche Beobachtungen wie bei Poly-L-Lysin macht man auch bei Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) als Substrat. BSA besitzt ebenfalls keine Signalsequenz für Zellspreading. Wie bei Poly-L-Lysin haften Zellen unspezifisch, wenn auch in geringerem Ausmaß, und bilden weder ein organisiertes Zytoskelett noch funktionelle Zell-Substrat-Kontakte aus.

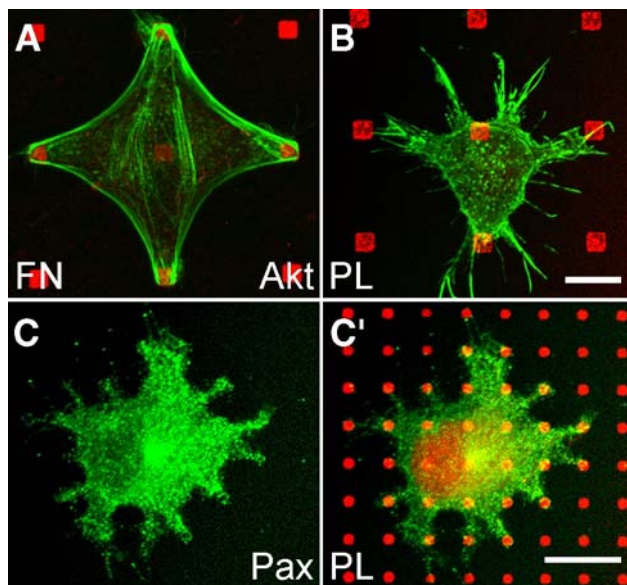


Abb. 3.7:
Zellreaktion auf unspezifisch beschichtete Substrate.

B16-Maus-Melanoma-Zellen wurden eine Stunde auf mikrostrukturierten Fibronektin- bzw. Poly-L-Lysin-Substraten in serumfreiem Medium kultiviert und Zytoskelettelemente markiert (A) Auf Fibronektin (FN, rot) spannen die Zellen ihr Aktin-Zytoskelett (Akt, grün) straff zwischen möglichen Kontaktstellen auf. (B) Auf gleichem Muster, jedoch nur mit unspezifischem Poly-L-Lysin beschichtet (PL, rot), zeigen die Zellen keine klare Zytoskelett-Organisation mehr. (C, C') Auch Markerproteine für Fokalkontakte (Paxillin, Pax, grün) akkumulieren nicht über den Dots sondern sind nur diffus in der ganzen Zelle verteilt. Maßstäbe: 10 μ m.

Die Bedeutung der ECM-Proteine für das Zellspreading wird auch durch die Tatsache unterstrichen, daß Zellen auf Substraten, die nicht mit Protein beschichtet wurden und nur die beiden Alkanthiole an der Oberfläche aufweisen, nicht haften. Trotz ihrer Fähigkeit, Proteine zu binden, genügt die Präsentation von strukturierten hydrophoben Regionen nicht, bei Zellen

Adhäsion und Spreading zu induzieren. Tab. 3.2 zeigt eine Übersicht der untersuchten Kontaktmarker auf den unterschiedlich beschichteten Substraten.

Komponente	Fibronektin	Laminin	Vitronektin	Poly-L-Lysin
α -Actinin	+/-	+/-	-	-
Integrin- β_3	+	+/-	+	-
FAK	+	-	+	-
Paxillin	+	+	+	-
Phosphotyrosin	+	+	+	+/-
Talin	+	n.d.	+	n.d.
Tensin	+	+/-	-	-
Vinculin	+	+	+	-

Tab. 3.2:

Vergleich der Kontaktkomponenten auf unterschiedlich beschichteten ECM-Substraten

Während auf Fibronektin alle untersuchten Markerproteine über Dots akkumulieren, finden sich bei Laminin und Vitronektin einige Ausnahmen, die nicht oder in geringerem Ausmaß in den Kontakten zu finden sind (z.B. Tensin). Auf Poly-L-Lysin lassen sich über den Dots keine akkumulierten Kontaktmarkerproteine nachweisen.

+ = klare Akkumulation der Komponente; +/- = die Komponente akkumuliert entweder selten (< 10% der überprüften Kontakte) oder mit schwacher Intensität; - = die Komponente kann nicht in den Kontakten nachgewiesen werden; n.d. = nicht durchgeführt.

3.2.5 Staurosporin unterdrückt nicht die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten über strukturierten Substraten

Auf homogenen Substraten werden Zell-Matrix-Kontakte durch intrazellulären Zug vergrößert und verstärkt (Small et al., 1999; Wehrle-Haller und Imhof, 2002). Er entsteht durch das Zusammenwirken von Myosin II und Aktin und wird über die Aktinfilamente auf die Kontaktstellen übertragen. Um seine Rolle bei der Kraftentwicklung zu erfüllen, wird das Myosin zyklisch aktiviert und deaktiviert. Während dieses Zyklus erfolgt auch eine zyklische Phosphorylierung und Dephosphorylierung der leichten Myosinketten. Die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) übernimmt dabei die Rolle des Aktivators, indem sie für die Phosphorylierung der leichten Ketten sorgt. Sie kann durch Staurosporin gehemmt werden, was den Verlust der intrazellulären Zugentwicklung zur Folge hat. Staurosporin ist ein breit wirkender Kinaseinhibitor, der u.a. auch die MLCK hemmt. Die Auswirkungen von Staurosporin auf die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und die Kontaktbildung zeigt Abb. 3.8 anhand immunhistochemischer Färbungen. Zellen auf homogenem ECM-Substrat zeigen unter normalen Bedingungen die bereits oben beschriebenen länglichen großen Kontaktstellen in der Zellperipherie, in denen Aktinbündel enden (Abb. 3.8 A). Gibt man 50 nM Staurosporin ins Zellkulturmedium, beobachtet man bei Zellen, die 20 min nach Zugabe fixiert und gefärbt wurden, deutliche Veränderungen in der Zellmorphologie und im Zytoskelettapparat. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Staurosporin bereits beim Ausplattieren der Zellen oder erst eine Stunde danach zu bereits flach ausgebreiteten Zellen gegeben wird. In beiden Fällen weisen die Zellen morphologisch stark eingebuchtete

Zellränder, deutlich verkleinerte und weniger stark gebündelte Aktinfilamente sowie eine saumförmige Verteilung von Kontaktmarkerproteinen in der Zellperipherie auf (Abb. 3.8 B, B'). Auf strukturiertem Substrat fallen unter Staurosporin-Einwirkung ebenfalls die eingebuchteten Zellränder sowie die kleineren, kaum gebündelten Aktinfilamente auf (Abb. 3.8 D'). Die Verteilung der Kontaktmarkerproteine weist jedoch anders als auf homogenen Substraten nur geringe Staurosporin-bedingte Unterschiede auf. Das Färbemuster Staurosporin-behandelter Zellen (Abb. 3.8 D) ähnelt stark der Kontaktverteilung in unbehandelten Kontrollzellen (Abb. 3.8 C). In beiden Fällen akkumulieren Paxillin, Vinculin und Phosphotyrosin über den präsentierten ECM-Dots, wobei feine Unterschiede dennoch erkennbar sind. Dazu gehört eine etwas weniger prominente Ausprägung der Kontakte in Staurosporin-behandelten Zellen. Außerdem erscheinen die Kontakte gleichmäßiger über die ganze Zelle verteilt. Sie sind in der Zellmitte sogar etwas stärker ausgeprägt. In unbehandelten Zellen dagegen sind die Kontakte in der Peripherie auffälliger als im Zellzentrum.

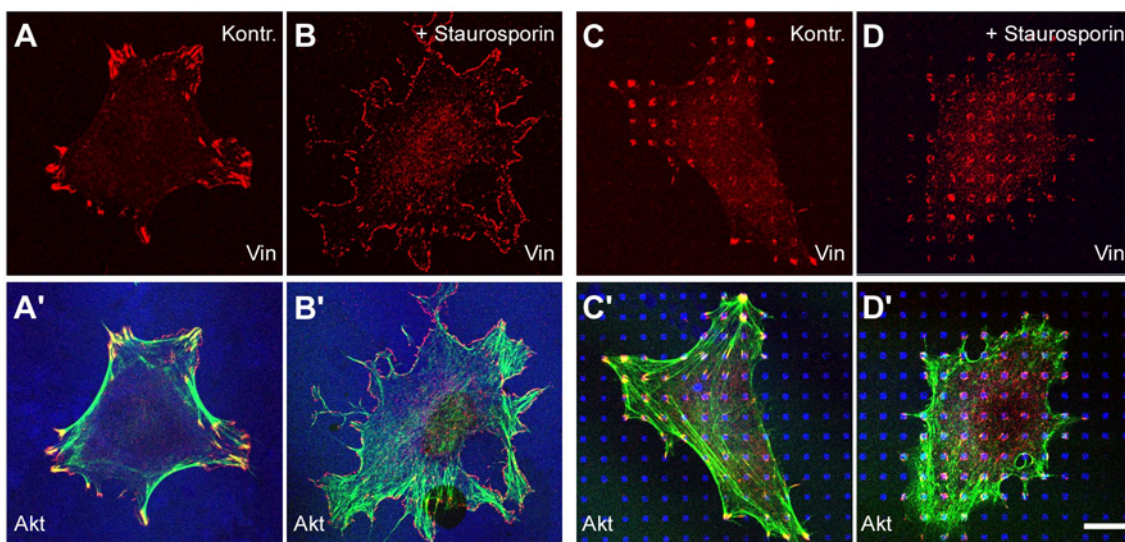


Abb. 3.8:
Zell-Matrix-Kontakte nach Behandlung mit Staurosporin.

B16-Maus-Melanoma-Zellen wurden eine Stunde auf mikrostrukturierten Fibronectin-Substraten in serumfreiem Medium mit bzw. ohne Staurosporin kultiviert und Zytoskelettelemente markiert. (A, A') Auf homogenem Fibronectin (blau) bilden die Zellen vor allem in der Peripherie große Vinculin-positive (Vin, grün) Kontakte und starke Aktinfasern (Akt, rot) aus. (B, B') In Gegenwart von Staurosporin finden sich nur kleine Aktinbündel (Akt, rot) und die Zelle zeigt eine zerklüftete Morphologie. Anstelle großer Cluster bildet Vinculin (Vin, grün) einen fein gepunkteten Saum in der Zellperipherie. (C, C') Über mikrostrukturierten Substraten akkumuliert Vinculin (Vin, grün) über den Fibronectin-Dots (blau) und starke Aktinfasern (Akt, rot) setzen an ihnen an. (D, D') Auch in Gegenwart von Staurosporin akkumuliert Vinculin (Vin, grün) über den Fibronectin-Dots (blau). Das kaum organisierte Aktin-Zytoskelett (Akt, rot) und die zerklüftete Zellmorphologie sind auf den Einfluß von Staurosporin zurückzuführen.

Maßstab: 10 µm.

3.2.6 Auch Mikrotubuli orientieren sich in Abhängigkeit des unterliegenden Musters

Das dichte Netzwerk der Mikrotubuli durchzieht die ganze Zelle und befindet sich analog zu den Mikrofilamenten in einem ständigen Auf-, Ab- und Umbau. Durch diesen Zustand „dynamischer Instabilität“ kann das Mikrotubuli-Netzwerk rasch umorganisiert und angepasst werden. Die Hauptaufgabe der Mikrotubuli besteht im intrazellulären Stofftransport, jedoch ist eine zellmechanische Rolle schon lange bekannt (Vasiliev et al., 1970). Neben Aktin als treibender Kraft für die Ausbildung der zellulären Fortsätze bei Spreading und Migration wurde schon früh der Einfluss der Mikrotubuli auf diese Aktivitäten erkannt (Vasiliev et al., 1976). Neuere Experimente zeigen, dass Depolymerisierung der Mikrotubuli innerhalb von Minuten zu einer verstärkten Kontraktilität bei Fibroblasten führt (Danowski, 1989) und die Ausbildung vergrößerter Fokalkontakte induziert (Enomoto, 1996; Bershadsky et al., 1996). Diese Effekte sind reversibel (Danowski, 1989; Kaverina et al., 1999). Vermutlich destabilisieren Mikrotubuli gezielt einzelne Zell-Matrix-Kontakte, indem sie hier lokal Regulatoren freisetzen. Dafür spricht u.a., dass Mikrotubuli häufig direkt in Zell-Matrix-Kontakte enden (Kaverina et al., 1998; Abb. 3.9). Aufgrund dieser Eigenschaft spielen Mikrotubuli wohl eine wichtige Rolle bei der Ablösung des Schwanzbereiches migrierender Zellen (Ballestrem et al., 2000; Small et al., 2002). Das genaue Zusammenspiel der Filamentsysteme von Aktin und Tubulin ist noch weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass die monomeren GTPasen der Rho-Familie in die Vorgänge involviert sind. Übersichten über das Zusammenspiel von Aktin-Zytoskelett, Rho-GTPasen und Mikrotubuli liefern

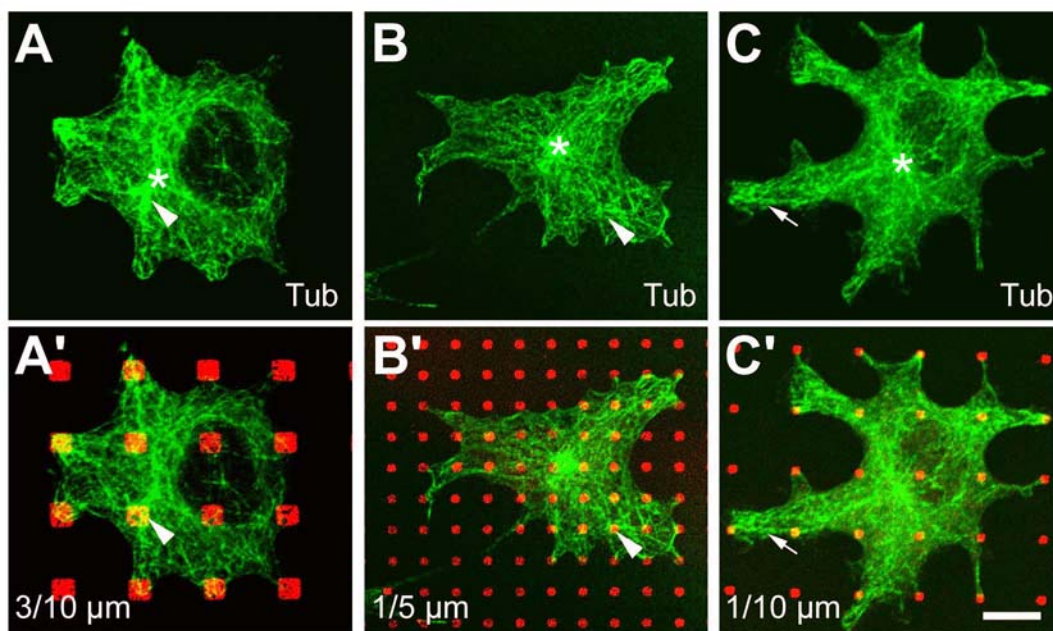


Abb. 3.9: Zytoskelett auf mikrostrukturierten Substraten: Mikrotubuli.

B16-Zellen wurden eine Stunde auf mikrostrukturierten Fibronectin-Substraten (Angaben jeweils links unten: Dotkantenlänge/Abstand) in serumfreiem Medium kultiviert und die Mikrotubuli (Tub, grün) sowie Fibronectin (rot) markiert. (A, B) Mikrotubuli enden verstärkt an oder über Fibronectin-Dots (z.B. Pfeilspitzen). (C) Zwischen Fibronectin-Dots bilden sich direkte Mikrotubuli-Verbindungen aus (Pfeil).

Maßstab: 10 µm.

Waterman-Storer und Salmon, 1999; Wittmann und Waterman-Storer, 2001 und Small et al., 2002.

Die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten und die Organisation des Aktin-Zytoskeletts sind stark von der Substratgeometrie abhängig (Kap. 3.2.2, Kap.3.2.3). Um zu untersuchen, ob dies für die Organisation der Mikrotubuli ebenso zutrifft, wurden B16-Zellen für eine Stunde unter Standardbedingungen auf strukturierten Substraten kultiviert. Die immunhistochemische Tubulin-Färbung zeigt, dass die Anordnung der Mikrotubuli vom unterliegenden Substrat beeinflusst wird (Abb. 3.9). Das kernnahe Centrosom (★ in Abb. 3.9) ist für die Organisation des kompletten Mikrotubuliapparates der Zelle zuständig. Es vereint daher ein hohe Tubulinmenge auf sich. Daneben finden sich in Abhängigkeit des unterliegenden Substrates intrazellulär weitere Regionen mit hohem Tubulingehalt. Abb. 3.9 zeigt mehrere solcher Tubulin-Knotenpunkte auf unterschiedlich strukturierten Fibronektin substraten. In Abb. 3.9 A und B ist jeweils ein solcher exemplarisch mit einer Pfeilspitze markiert. Außerdem findet man auch Mikrotubuli, die scheinbar auf direktem Wege zwei benachbarte Dots verbinden (Abb. 3.9 C, Pfeil). Der Substrateinfluss auf die Mikrotubuli-Organisation ist allerdings im Vergleich zum Aktin-Zytoskelett weniger offensichtlich.

3.3 Zellspreading und seine geometrischen Grenzen

Bisher wurde der Einfluss strukturierter ECM-Substrate auf die Morphologie und die Zytoskelett-Organisation von Zellen allgemein untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Grundmechanismen zellulärer Adhäsion und zellulären Spreadings auf homogenen wie auf mikrostrukturierten Substraten weitgehend identisch sind. In beiden Fällen bilden die Zellen funktionelle Zell-Matrix-Kontakte aus, die als Ankerpunkte für das Zytoskelett dienen. Im Gegensatz zu einer homogenen Unterlage sind die Zellen auf strukturierten Substraten jedoch gezwungen, ihre Kontakte und ihr Zytoskelett in Abhängigkeit des unterliegenden Musters zu organisieren. Damit erhält man ein Kontrollsystem über die Zelle, das es prinzipiell ermöglicht, die Zell-Substrat-Interaktionen unter bestimmten vorgegebenen äußeren Parametern zu untersuchen. Durch Variationen des Substratmusters wurden nun die geometrischen Grenzen des Zellspreading untersucht. Folgende Fragen sollten beantwortet werden: Welche anti-adhäsiven Distanzen zwischen zwei adhäsiven Punkten können Zellen maximal überbrücken? Wie groß ist die kleinste Fläche, die zelluläre Kontaktausbildung noch induzieren kann? Welche Mindestmenge an ECM-Protein benötigen Zellen für optimales Spreading? Außerdem wurde untersucht, inwieweit Zellen das ihnen zur Verfügung stehende Substrat für die Kontaktbildung ausnutzen. Zunächst soll jedoch anhand von Zeitraffervideoaufnahmen dargestellt werden, wie sich Zellen auf strukturierten Substraten bewegen.

3.3.1 Zellen migrieren und spreaden durch Ausbildung von Lamellipodien, mit denen sie das strukturierte Substrat „lesen“

3.3.1.1 Migration und Spreading über kleine anti-adhäsive Distanzen

Zellen, die migrieren oder spreaden, bilden vom Zellkörper ausgehend flächige Ausläufer, sog. Lamellipodien, aus, mit denen sie ihre Umgebung abtasten. Bei positiven Signalen, wie

sie z.B. von ECM-Proteinen ausgehen, bilden sich in den Lamellipodien Fokalkomplexe aus. Sie werden entweder wieder aufgelöst oder reifen zu Fokalkontakten, die der Zelle als feste Substrat-Verankerung dienen. Diese Vorgänge sind von Untersuchungen auf homogenen Substraten hinlänglich bekannt (Kap. 1.1.2.1).

Wie aus den Abb. 3.10 – 3.12 ersichtlich, verläuft das Zell-Spreading auf strukturierten Substraten nach dem gleichen Schema. Die Video-Zeitrafferaufnahmen zeigen lebende B16-Zellen, die fluoreszierendes Integrin- β_3 -GFP (B16- β_3 ; Abb. 3.10) oder Aktin-GFP (Abb. 3.11 und 3.12) exprimieren und sich auf strukturierten Fibronectin-Substraten ausbreiten. Integrin- β_3 ist gleichmäßig auf der gesamten Zelloberfläche verteilt, wodurch der Umriss der Zelle gut erkennbar wird (Abb. 3.10). Außerdem lässt sich gut die Ausbildung von Integrin- β_3 -enthaltenden Kontakten beobachten. Die Zelle in Abb. 3.10 befindet sich auf einem Substrat, das aus $1 \mu\text{m}^2$ großen Dots im Abstand von $5 \mu\text{m}$ besteht (Abb. 3.10 A). Sie hat sich bereits zwischen zwei Polen aufgespannt, an denen sie über Fibronectin-Dots stabile Kontakte ausgebildet hat, die während der gesamten Sequenz erhalten bleiben (Abb. 3.10 B, Pfeile). Abweichend von dieser Hauptachse bildet die Zelle im linken unteren Bildviertel ein flächiges Lamellipodium aus. Mit diesem tastet sie ihre Umgebung ab und versucht, sich zu verankern und weiter auszubreiten. Wie an den Enden der Hauptachse sind hier Integrincluster über den Substrat-Dots erkennbar. Dabei fällt auf, dass die Kontakte am Rand des Lamellipodiums deutlich stärker ausgebildet werden als in der Mitte. Die beiden äußeren dem Lamellipodium unterliegenden Dotreihen sind in der Integrinverteilung gut erkennbar, wohingegen die mittlere Dotreihe weniger klar ausgeprägte Anhäufungen von Integrin- β_3 zeigt (Abb. 3.10 E, Pfeil). Diese erscheinen zudem nur temporär und werden innerhalb von Minuten wieder abgeschwächt oder verschwinden ganz (Abb. 3.10 F). Zellbereiche, die für Spreading und Haftung der Zelle von großer Bedeutung sind (Zellpole der Hauptachse, Peripherie des Lamellipodiums), bilden also stabile Kontakte, die über längere Zeiträume Integrin- β_3 enthalten. Kontakte, die von untergeordneter Bedeutung für das Spreading sind,

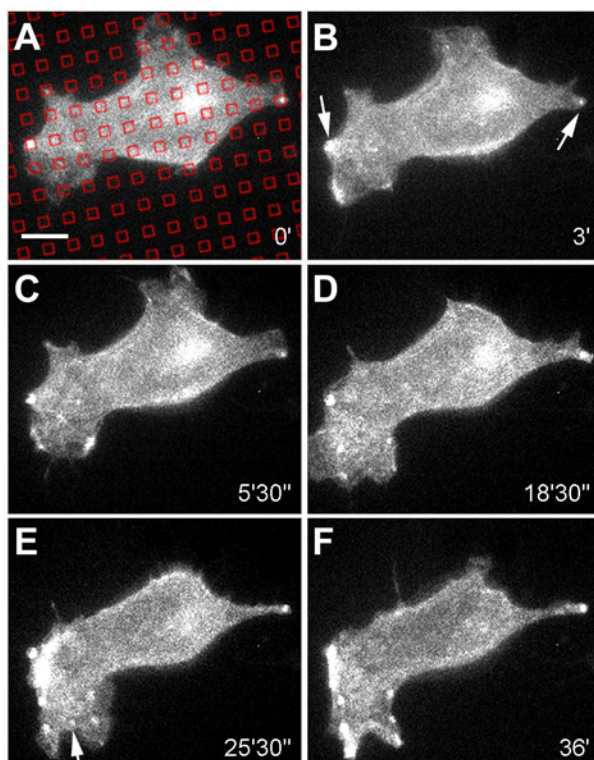


Abb. 3.10:
Zeitrafferaufnahme einer Integrin- β_3 -Zelle auf mikrostrukturiertem Fibronectin-Substrat.

Einzelbilder einer B16-Zelle, die Integrin- β_3 -GFP exprimiert. Das unterliegende Fibronectin-Substrat (Dot-Kantenlänge: $1 \mu\text{m}$, Abstand: $5 \mu\text{m}$) wurde in das erste Bild (A) rot eingezeichnet. Die Zelle bildet links unten ein neues Lamellipodium aus. Während der gesamten Sequenz über bleiben zwei Integrincluster an exponierten Stellen der Zelle bestehen (Pfeile in (B)). Im neuen Lamellipodium entstehen Integrincluster über Fibronectin-Dots. Periphere Kontakte werden dabei verstärkt und bleiben bestehen während die Kontakte über der Mittelreihe der unterliegenden Fibronectin-Dots (Pfeil in (E)) nur schwächer aufleuchten und wieder verblasen können.

Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

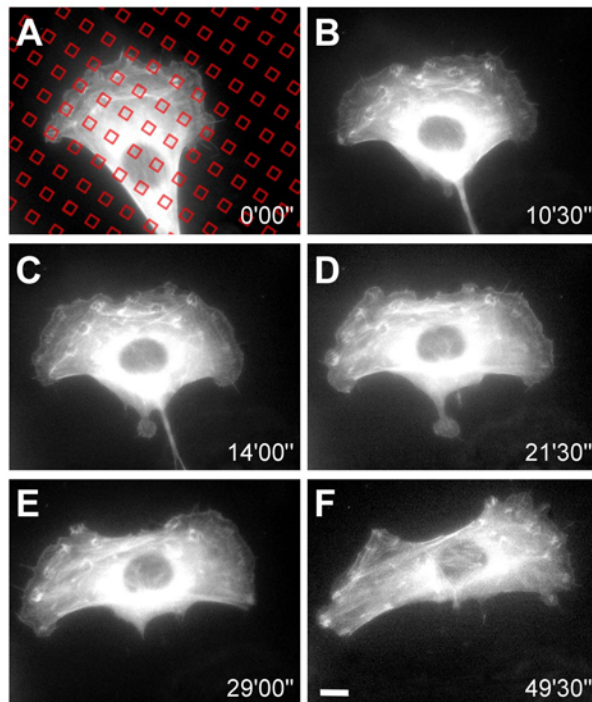


Abb. 3.11:
Zeitrafferaufnahme einer Aktin-Zelle auf
mikrostrukturiertem Fibronectin-Substrat
(Dot-Kantenlänge: 3 μm , Abstand: 10 μm).

Einzelbilder einer B16-Zelle, die Aktin-GFP exprimiert. Das unterliegende Fibronectin-Substrat wurde in den Sequenzbeginn (A) rot eingezeichnet. Die Zelle wandert vom unteren Bildrand zur Bildmitte und spannt sich dann auf. Sie bildet dabei Lamellipodien aus und tritt mit neuen Fibronectin-Dots in Kontakt (C, z.B. linker Zellrand). Anschließend akkumuliert Aktin über den Fibronectin-Dots (D) und daran ansetzende Aktinfasern werden ausgebildet (E). Die Kontakte werden ebenso wie die Aktinfasern verstärkt, während die Zelle zur Ruhe kommt (F). Maßstab: 10 μm .

werden weniger stabilisiert und zeigen nur vorübergehend erhöhte Integrin- β_3 -Fluoreszenz. Die substratabhängige Ausbildung von Kontakten in Lamellipodien ist auch anhand der Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts erkennbar. Die Sequenz einer Video-Zeitrafferaufnahme in Abb. 3.11 zeigt eine lebende B16-Zelle, die fluoreszierendes Aktin-GFP exprimiert (B16-Aktin-Zelle). Sie befindet sich auf einem Fibronectin-Substrat bestehend aus 9 μm^2 großen Dots im Abstand von 10 μm . Innerhalb der ersten 14 min der Aufnahme migriert die Zelle über das Substrat (Abb. 3.11 A - C). In den folgenden 30 min spannt sie sich über dem Muster auf und reduziert ihre Aktivität (Abb. 3.11 D - F, beachte die Zeitspannen). Während der Migrationphase weist die Zelle eine stark asymmetrische Morphologie auf. Dem Zellkörper geht in Migrationsrichtung ein flächiges Lamellipodium voran, mit dem die Zelle das Substrat erkundet. Das hintere Ende der Zelle wird nachgezogen (Abb. 3.11 A). Im führenden Lamellipodium beobachtet man eine Akkumulation von Aktin-GFP über den Fibronectin-Dots sowie kleinere Aktinfasern, die an ihnen ansetzen (Abb. 3.11 B). Während des Übergangs in die stationäre Phase teilt sich das Führungs-Lamellipodium in zwei Lamellipodien links und rechts des Zellkörpers auf (Abb. 3.11 C, D). Diese tasten weiterhin das Substrat ab und bilden über neu erreichten Fibronectin-Dots Kontakte aus. Sehr gut zu erkennen ist das z.B. am linken Zellrand, wo das Lamellipodium zunächst über anti-adhäsiven Regionen eine schwach ausgeprägte und kaum strukturierte Fluoreszenz aufweist (Ab. 3.11 B). Bei Kontakt mit Fibronectin-Dots ist lokal eine leicht erhöhte Fluoreszenz zu erkennen (Abb 3.11 C). Einige Minuten später leuchtet im Lamellipodium lokal gehäuft Aktin-GFP auf, was auf verstärkte Akkumulation des Aktins über den Dots zurückzuführen ist (Abb. 3.11 D). Im weiteren Verlauf werden die von den Dots ausgehenden Aktinfasern verstärkt (Abb. 3.11 E, F). Die Zelle spannt sich auf und reduziert ihre Aktivität, wobei sie nur noch kleine Lamellipodien am rechten Zellrand ausbildet (Abb. 3.11 F). Das linke Lamellipodium wird komplett eingezogen und die Zelle zeigt dort eine streng am Muster orientierte geometrische Morphologie (Abb. 3.11 F). Sie weist exakt die bereits von den Untersuchungen an fixierten Präparaten bekannten Merkmale auf (Kap. 3.2.2, Kap. 3.2.3).

3.3.1.2 Spreading über größere anti-adhäsive Distanzen

In Abb. 3.11 wurde die Lamellipodienausbildung und Zytoskelett-Organisation von Zellen beschrieben, die sich auf einem strukturierten Substrat mit einer anti-adhäsiven Distanz von 10 μm befinden. Beim Spreading auf Substraten mit größeren Abständen zwischen den ECM-Dots verhalten sich Zellen im Prinzip gleich. Zunächst wird ein tastendes Lamellipodium sowie Filopodien ausgebildet. Bei Kontakt mit einem neu erreichten Dot wird lokal Aktin akkumuliert und das Aktin-Zytoskelett wird umorientiert und verstärkt. Aufgrund der größeren anti-adhäsiven Distanzen ist jedoch der Einfluss des Substrates auf die Zelle stärker und die einzelnen Vorgänge sind klarer erkennbar. Die Zelle in Abb. 3.12 muss im Vergleich zur oben beschriebenen Zelle (Abb. 3.11) mit 20 μm eine doppelt so große Distanz überbrücken, um den nächsten adhäsiven Dot zu erreichen. Die Video-Zeitrafferaufnahme zeigt eine B16-Aktin-Zelle auf 9 μm^2 großen Fibronectin-Dots. Die Zelle haftet zunächst an vier Fibronectin-Dots, wobei das Aktin-Zytoskelett hauptsächlich zwischen den beiden rechten aufgespannt ist (Abb. 3.12 A, 0 min). Im Verlauf der Sequenz breitet sich die Zelle über zwei weitere Dots aus. Mit einem großen Lamellipodium, das ca. ein Drittel der gesamten Zellfläche einnimmt, überbrückt sie dabei die anti-adhäsiven Regionen. Es fällt auf, dass vom Lamellipodium radial viele kleine, fingerähnliche Aktinfortsätze ausgehen. Diese sog. Filopodien überstreifen in einer bogenförmigen, scheibenwischerartigen Bewegung das Vorfeld des Lamellipodiums. Sie verschwinden dann wieder und werden an anderer Stelle neu gebildet. Kommen Filopodien in Kontakt mit einem Fibronectin-Dot, so wird an diesem Dot das Lamellipodium innerhalb von eineinhalb Minuten stabilisiert (Abb. 3.12 B, 3'-4'30''). Die einzelnen Aktinfortsätze, die mit dem Dot in Kontakt kommen, leuchten auf und knicken dann an der Dotkante ab (Abb. 3.12 B, 4'30'' – 6'). Mit Ausnahme der kurzfristigen Verstärkung der Filopodien bleibt die Fluoreszenz über dem neuen Kontakt unauffällig (10').

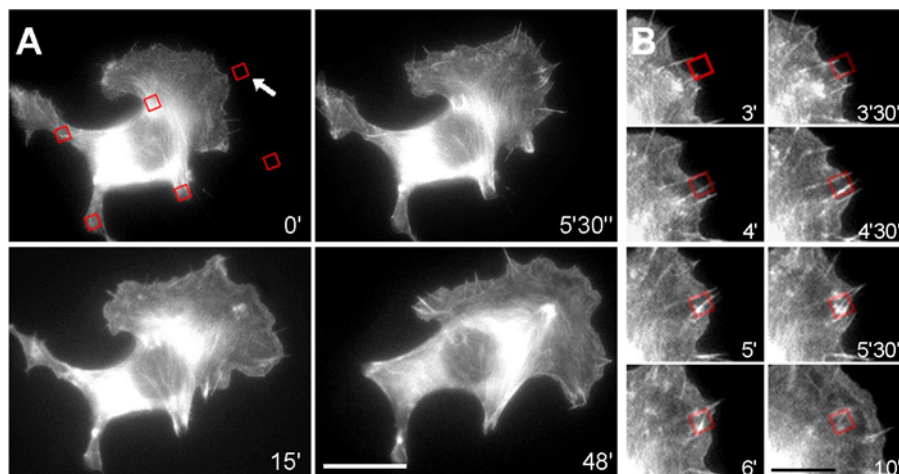


Abb. 3.12:

Zeitrafferaufnahme einer Aktin-Zelle auf mikrostrukturiertem Fibronectin-Substrat(Dot-Kantenlänge: 3 μm , Abstand: 20 μm).

(A) Einzelbilder einer B16-Zelle, die Aktin-GFP exprimiert. Das unterliegende Fibronectin-Substrat wurde in den Sequenzbeginn (0') rot eingezeichnet. Adhärierend auf vier Fibronectin-Dots, tastet die Zelle ihre Umgebung rechts mit einem Lamellipodium ab und bildet im Verlauf der Sequenz Kontakte zu zwei weiteren Dots aus. 5'30'' nach Beginn der Sequenz wird der erste neue Fibronectin-Dot (Pfeil) erreicht und erkannt. Zehn Minuten später beginnt der Kontakt aufzuleuchten und im Verlauf der folgenden halben Stunde wird das Aktin-Zytoskelett neu darauf ausgerichtet. Maßstab: 20 μm . (B) Detail der Kontaktausbildung. Der in (A) markierte Fibronectin-Dot (Pfeil) wurde rot unterlegt. Kurz nach Berühren des Dots bildet das Lamellipodium Aktinspikes aus, die mit dem Dot interagieren und an ihm abknicken. Danach bleibt der neue Kontakt zunächst unauffällig (10'), ehe er beginnt, Aktin zu akkumulieren und aufzuleuchten (A). Maßstab: 10 μm .

(Abb. 3.12 B, 10'). Erst 12 min nach der ersten Berührung ist eine leichte Zunahme der Fluoreszenz über dem Kontakt erkennbar (Abb. 3.12 A, 15'). Obwohl der Kontakt erst nach weiteren 30 min stark aufleuchtet, stabilisiert er die Zelle schon jetzt. Das Lamellipodium kann sich weiter vergrößern und ein weiterer Dot wird erreicht. Während der erste neue Kontakt bereits aufleuchtet, ist dieser zweite erreichte Dot noch unauffällig mit Fluoreszenz umrandet (Abb. 3.12 A, 48' rechts unten). Zu diesem Zeitpunkt wurden die ursprünglich zwischen den beiden mittleren Fibronectin-Dots aufgespannten Aktinfasern aufgefächert und umorientiert. Sie verbinden nun hauptsächlich den unteren der beiden ursprünglichen Kontakte mit dem neu entstandenen rechts oben (Abb. 3.12 A, 48'). Damit ist der neue Kontakt ca. 45 min nach der ersten Berührung voll in das Zytoskelett integriert und spielt eine tragende Rolle.

3.3.2 Zellen können anti-adhäsive Distanzen von 25 μm überbrücken

Der vorangehende Abschnitt hat gezeigt, wie sich Zellen auf strukturierten Substraten bewegen und ausbreiten. Es wurde dargelegt, dass Zellen anti-adhäsive Distanzen mit Hilfe eines flachen Lamellipodiums zu überbrücken versuchen. Um den Einfluss dieser Distanzen auf das Zellspreading zu untersuchen, wurden B16-Zellen auf Fibronectin-Substraten mit unterschiedlichen Geometrien ausplattiert, nach einer Stunde fixiert und das Aktin-Zytoskelett sowie das Substratmuster fluoreszent markiert. Sind die Distanzen zwischen zwei Dots kleiner als 2 μm (Abb. 3.13 B, C), unterscheidet sich die Zellmorphologie kaum im Vergleich zu Zellen auf homogenen Substraten (Abb. 3.13 A). Die Gesamtorganisation der Aktinfasern und der Zellumriss zeigt sich nahezu unverändert. Im Detail betrachtet, beeinflusst das Substratmuster die Zellorganisation trotzdem. Auch bei kleinen Dots und kleinen Abständen enden Aktinfasern zumeist über den Fibronectin-Dots des Substrates. Bei zunehmendem Abstand zwischen adhäsiven Dots wird der Einfluss des unterliegenden Musters auf die Zelle deutlicher. Die Zellen in Abb. 3.13 D – I spreaden auf Substraten mit jeweils 9 μm^2 großen

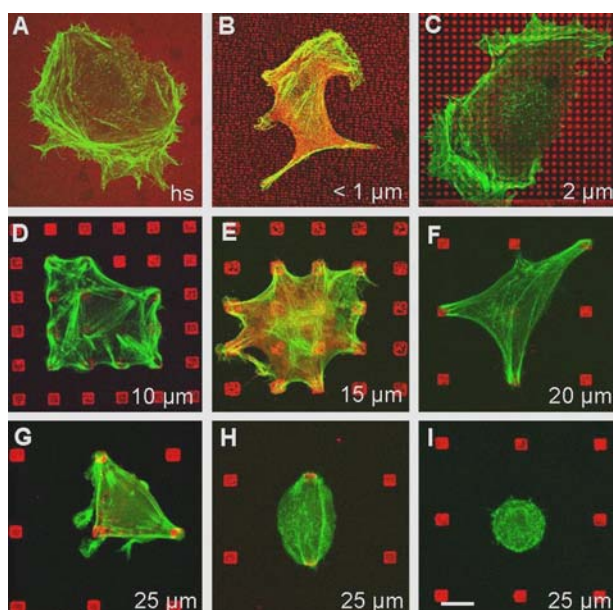


Abb. 3.13:
Zellspreading: Überbrückbare anti-adhäsive Distanzen.

B16-Maus-Melanoma-Zellen wurden eine Stunde auf mikrostrukturierten Fibronectin-Substraten in serumfreiem Medium kultiviert und das Aktin-Zytoskelett (grün) sowie Fibronectin (rot) fluoreszent markiert. (B, C) Auf Substraten mit Abständen $\leq 2 \mu\text{m}$ sind die Zellen morphologisch Zellen auf homogenen Substraten (A) sehr ähnlich. (D – F) Bei Abständen von 10 μm bis 20 μm zeigen die Zellen eine streng geometrische und an das Muster angelehnte Morphologie. (G – I) Ab einer Distanz von 25 μm spannen sich die Zellen höchstens noch über wenigen Dots auf (G, H), haften häufig jedoch nur auf einem einzigen Dot (I).

Die Abstände zwischen den Dots sind jeweils in der rechten unteren Bildecke angegeben. Maßstab: 10 μm .

Dots und unterschiedlichen Abständen. Bis zu einem Abstand von 20 μm nehmen die Zellen in Abhängigkeit des Musters geometrische Formen mit rechtwinkligen Ecken sowie geraden Kanten an. Die Aktinfasern spannen sich dabei bogenförmig zwischen benachbarten Dots auf. Überschreitet die Distanz 20 μm , spannen sich die Zellen höchstens zwischen drei, meist aber nur zwischen zwei benachbarten Dots auf. Zum Teil haften sie abgekugelt auf einem einzigen Dot (Abb. 3.13 G – I). Bei einem Abstand von 30 μm adhären die Zellen fast ausschließlich nur auf einem Dot.

Zur Quantifizierung dieser Beobachtungen wurden die Zellen auf Substraten mit jeweils 9 μm^2 -Dots und unterschiedlichen Abständen ausgezählt. Sie wurden in drei Gruppen aufgeteilt: (1) Zellen, die 5 Dots und mehr bedecken, (2) Zellen, die über 2 – 4 Dots spreaden und (3) Zellen, die auf nur einem Dot haften. Die prozentuale Verteilung dieser drei Gruppen wurde für 9 μm^2 große Dots gegen den jeweiligen Dotabstand aufgetragen (Abb. 3.14). Für B16-Zellen und BRL-Zellen, aber auch für 3T3-Fibroblasten zeigt sich, dass bei einem Dotabstand von 30 μm der überwiegende Teil der Zellen diese Distanz nicht überbrücken kann. Bei 20 μm Dotabstand ist der Anteil der Zellen, die 2 – 4 Dots bedecken, jeweils am größten. Die über viele Dots spreadenden Zellen sind bei einer Distanz von mehr als 15 μm in der Minderheit. Für die getesteten fibroblastenähnlichen Zellen zeigt sich somit, dass anti-adhäsive Distanzen von 25 μm noch überbrückt werden können. Darüber hinausgehende Abstände stellen ein zu großes Hindernis für das Zellspreading dar. Dies gilt für die größten zur Verfügung stehenden Dots. Wie Tab. 3.3 zeigt, steht die überbrückbare Distanz anscheinend in Zusammenhang mit der Dotgröße.

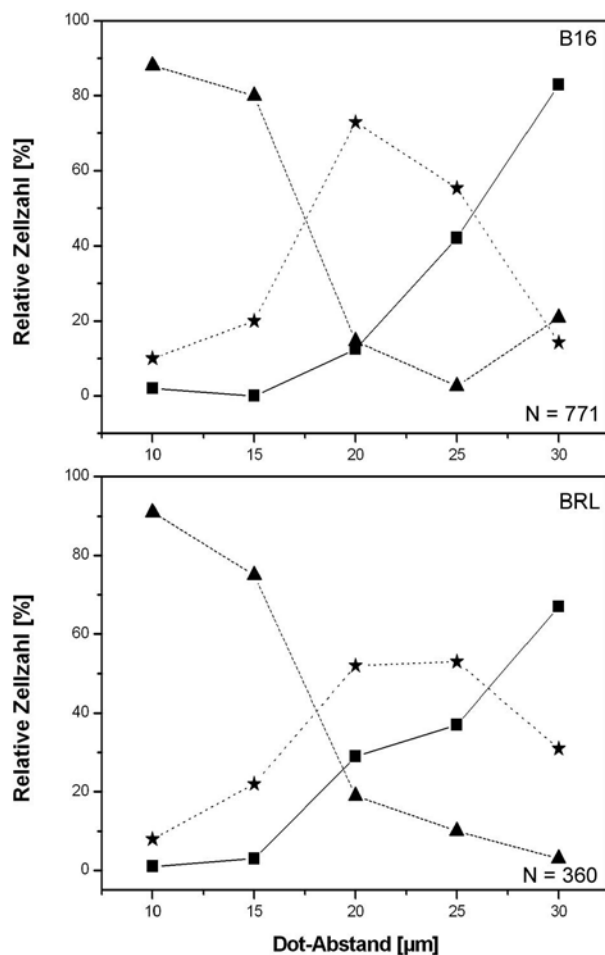


Abb. 3.14:
Zellspreading: Überbrückung von anti-adhäsiven Distanzen.

B16-Maus-Melanoma-Zellen (oben) bzw. BRL-Zellen (unten) wurden eine Stunde auf mikrostrukturierten Fibronectin-Substraten in serumfreiem Medium kultiviert. Zellen auf Bahnen mit 9 μm^2 -Dots wurden ausgezählt und klassifiziert in Zellen, die lediglich an einem Dot haften (■), die 2 – 4 Dots bedecken (*) bzw. die ≥ 5 Dots überwachsen (▲). Der prozentuale Anteil der drei Klassen wurde gegen den Dot-Abstand aufgetragen. Mit zunehmendem Abstand ist ein Anstieg des Anteils der Zellen, die nur auf einem Dot haften, zu verzeichnen. Zellen, die ≥ 5 Dots bedecken sind dagegen ab einer Distanz von 20 μm in der Minderheit. Der Anteil der Zellen, die 2 – 4 Dots überwachsen zeigt ein Maximum bei einem Abstand von 20 μm .

3.3.3 Fibronektin-Dots einer Fläche von $0,1 \mu\text{m}^2$ induzieren die Bildung von Zell-Substrat-Kontakten, unterstützen jedoch nur bedingt Zellspreading

Im vorigen Abschnitt wurde untersucht, inwieweit Zellen anti-adhäsive Regionen überbrücken können. Die Untersuchungen wurden auf Substraten durchgeführt, deren Dotgröße mit $9 \mu\text{m}^2$ genügend Platz für die Ausbildung von Kontakten lässt. Auf homogenen Substraten variieren die Kontaktgrößen zwischen $0,25 \mu\text{m}^2$ und max. $10 \mu\text{m}^2$ und liegen entweder als kleine Fokalkomplexe oder als große, ausgereifte Fokalkontakte vor (Kap. 1.1.3). Um die Frage zu beantworten, welche Rolle die Größe der Fibronektin-Dots spielt und welchen Einfluss sie auf das Zellspreading ausübt, wurden Zellen auf Fibronektin-Substraten mit konstantem Abstand von $5 \mu\text{m}$ und unterschiedlichen Dotgrößen ($0,1 \mu\text{m}^2 - 1 \mu\text{m}^2$) ausplattiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen fixiert und das Substrat sowie das Aktin-Zytoskelett markiert (Abb. 3.15). Bei Dotgrößen $\geq 0,25 \mu\text{m}^2$ zeigen die Zellen die typische substratorientierte, kantige und eckige Morphologie. Ihre Aktinfasern spannen sich zwischen den Dots auf. Bei kleinen Dots mit einer Fläche von $0,1 \mu\text{m}^2$ Fläche verlieren die Zellen ihre geometrische Form und erscheinen eher abgerundet (Abb. 3.15 A). Obwohl die Zellen adhäreren, sind die Aktinfasern nicht mehr deutlich ausgeprägt und die klare Organisation des Zytoskeletts ist verschwunden. Diese Beobachtung könnte darauf

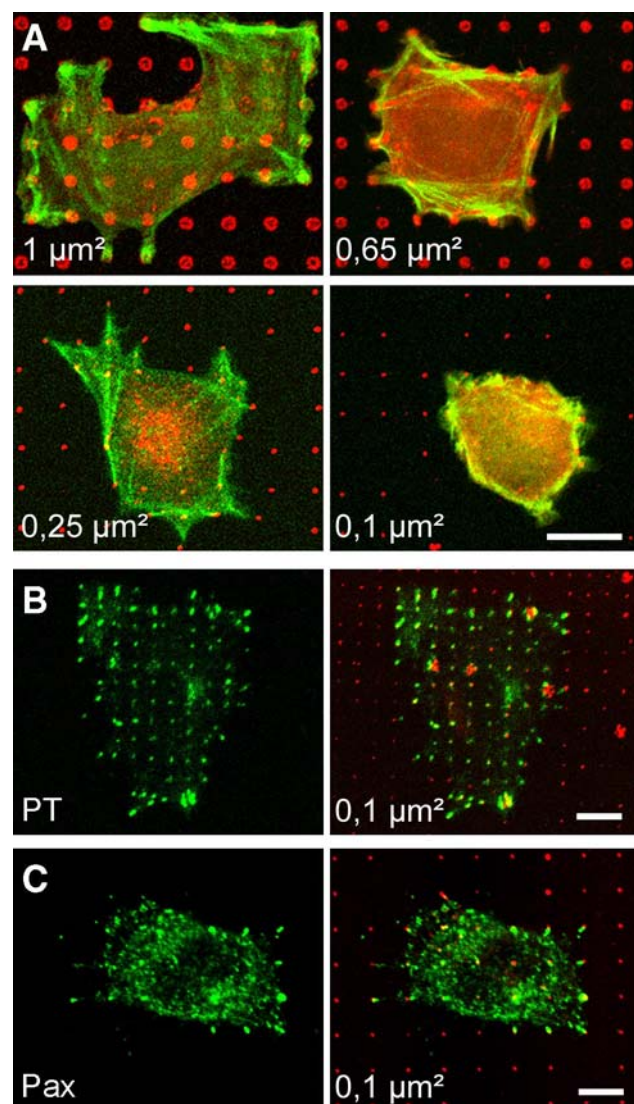


Abb. 3.15:
Einfluß der Dotgröße auf das Zellspreading.

(A) B16-Zellen auf Fibronektin-Dots (rot) unterschiedlicher Größe (jeweils links unten angegeben) jedoch mit gleichem Abstand von $5 \mu\text{m}$. Das Aktin-Zytoskelett wurde grün markiert. Bis zu einer Dotgröße von $0,25 \mu\text{m}^2$ spreaden Zellen und bilden Aktinfasern. Auf $0,1 \mu\text{m}^2$ kleinen Dots adhäreren die Zellen zwar, können aber keine Aktinfasern mehr ausbilden. Beachte die zellnahen Lücken im Fibronektinmuster auf $0,25$ und $0,1 \mu\text{m}^2$ großen Dots. Maßstab: $10 \mu\text{m}$. (B) Phosphotyrosin- (PT, grün) bzw. (C) Paxillin-Färbung (Pax, grün) von B16-Zellen auf $0,1 \mu\text{m}^2$ kleinen Fibronektin-Dots (rot) mit 2 bzw. $4 \mu\text{m}$ Abstand. Beide Marker akkumulieren über dem vorgegebenen ECM-Muster trotz der geringen Dotgröße. Beachte wiederum die zellnahen Substratlücken. Maßstab: $5 \mu\text{m}$.

zurückzuführen sein, dass die Dots zu klein sind, um die Bildung von Zell-Substrat-Kontakten zu induzieren. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen für eine Stunde auf $0,1 \mu\text{m}^2$ kleinen Fibronectin-Dots mit unterschiedlichen Abständen kultiviert und die Kontaktbildung immunhistochemisch anhand von Markerproteinen wie z.B. Paxillin, Vinculin und Phosphotyrosin überprüft (Abb. 3.15 B, C). Es zeigt sich, dass die kleinen Dots durchaus in der Lage sind, sowohl intrazelluläre Signaltransduktion (Phosphotyrosin, Abb. 3.15 B) als auch Akkumulation von Kontaktproteinen (Paxillin, Abb. 3.15 C) über den Dots hervorzurufen. Dies geschieht sehr lokal begrenzt. Auf Substraten mit nur $2 \mu\text{m}$ anti-adhäsivem Abstand zwischen den Dots wird auch intrazellulär dieser Abstand zwischen den einzelnen Kontakten eingehalten (Abb. 3.15 B). Die Unfähigkeit der Zellen, auf Fibronectin-Mustern bestehend aus $0,1 \mu\text{m}^2$ kleinen Dots und $5 \mu\text{m}$ Abstand zu spreaden, beruht somit nicht darauf, dass die präsentierten Proteinflächen zu klein sind, um Kontaktbildung zu induzieren. Zellen, die auf $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots mit geringem Abstand ($< 5 \mu\text{m}$) sitzen, können sich gut abflachen und entwickeln Zell-Matrix-Kontakte (Abb. 3.15 B, C).

Auffallend in Abb. 3.15 A ist, dass mit abnehmender Dotgröße verstärkt Fehler im Substrat auftreten. Während bei $1 \mu\text{m}^2$ -Dots das regelmäßige Substrat komplett erhalten ist, treten bei den $0,65 \mu\text{m}^2$ -Dots vereinzelt verschobene Dots auf. Bei $0,25 \mu\text{m}^2$ -Dots sind ebenfalls einige Dots deplaziert, an wenigen Stellen scheinen sie zu fehlen. Verschobene Dots fallen bei den $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots nicht auf. Im Umfeld der Zelle fehlen jedoch mehr Dots als beim Substrat mit $0,25 \mu\text{m}^2$ -Dots. Um den Grund für diese deformierten Substrate zu klären, wurden Video-Zeitrafferaufnahmen von B16- β_3 -Zellen auf diesen Substraten gemacht. Wie in Abb. 3.10 diente die homogene Oberflächenverteilung der Integrine in der Membran zur Darstellung der Zellmorphologie. Bei Dotgrößen $\geq 0,25 \mu\text{m}^2$ bilden die Zellen Lamellipodien aus, stabilisieren sie und spreaden. Auf $0,1 \mu\text{m}^2$ kleinen Dots mit $5 \mu\text{m}$ Abstand hingegen erscheinen die Zellen sehr motil und sind nicht in der Lage, klassische Lamellipodien auszubilden bzw. sie zu stabilisieren. Statt dessen werden Dots wenige Minuten nach der

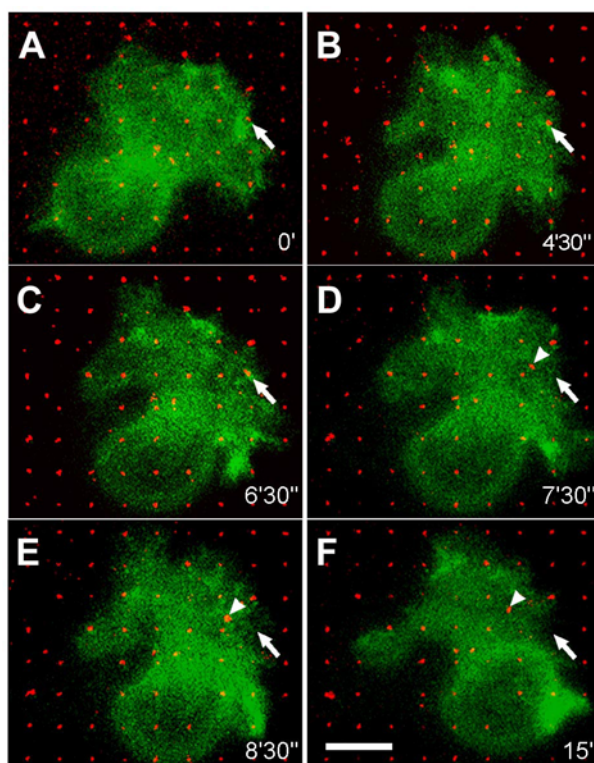


Abb. 3.16:
Zeitrafferaufnahme einer Zelle auf mikrostrukturiertem Fibronectin-Substrat (Dotgröße: $0,1 \mu\text{m}^2$, Abstand: $5 \mu\text{m}$).

Einzelbilder einer B16-Zelle, die Integrin- β_3 -GFP exprimiert, das hier aufgrund seiner homogenen Verteilung auf der Zelloberfläche zur Visualisierung der Zellmorphologie dient. Dem Fibronectin wurde fluoreszent markiertes BSA beigemischt. (A - C) Die Zelle kommt in Kontakt mit einem Dot (Pfeil). (D - F) Der Dot wird aus dem Substrat gerissen und von der Zelle internalisiert (Pfeilspitze). Die ursprüngliche Position des Dots im Muster ist mit dem Pfeil markiert. Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

ersten Berührung durch die Zelle zunächst deformiert (Abb. 3.16 C, Pfeil) und kurz darauf abgerissen und internalisiert (Abb. 3.16 D – F, Pfeilspitze). Diese Zellaktivitäten erzeugen ein verändertes Substrat, das dem ursprünglich gestempelten Muster nicht mehr entspricht. Neben dem durch Pfeile hervorgehobenen Dot erkennt man an auch anderen Substratstellen, fehlende Dots.

Die Ergebnisse der Video-Zeitrafferaufnahmen werden durch fixierte und immunhistochemisch markierte Präparate von B16-Zellen bestätigt. Abb. 3.17 zeigt Aktin-Zytoskelett-Färbungen von Zellen auf Fibronektin-Substraten unterschiedlicher Dotgröße und konstantem Abstand von $5\ \mu\text{m}$. Auf $1\ \mu\text{m}^2$ -Dots bilden die Zellen typische Aktinfasern aus und das Muster ist kaum deformiert (Abb. 3.17 A). Bei kleineren Dots, ist im direkten Umfeld der Zelle ein ringförmiger Bereich erkennbar, in dem viele Dots fehlen (Abb. 3.17 B). Außerdem finden sich hier in oder unter der Zelle Fibronektin-positive Strukturen außerhalb der Substratgeometrie, die auf Substraten mit größeren Dots nicht zu sehen sind (Abb. 3.17 A). Sie entsprechen teilweise in etwa der Größe der Substratdots (Abb. 3.17 B, Pfeile). Vereinzelt gehen kleine Aktinbündel zu Dots, die noch in der nahen Umgebung der Zelle verblieben sind. Das Aktin-Zytoskelett ist ansonsten kaum organisiert und besteht vor allem aus einem die Zelle umschließenden Ring. Noch stärker ausgeprägt ist dieser Effekt bei Zellen auf $0,1\ \mu\text{m}^2$ -Dots (Abb. 3.17 C).

Bei einem Abstand von $5\ \mu\text{m}$ benötigen Zellen also eine Dotgröße von mindestens $0,25\ \mu\text{m}^2$, um sich abflachen und spreaden zu können. Kleinere Dots erlauben bei diesem Abstand zwar die Adhäsion von Zellen, nicht jedoch deren Spreading. Das Substrat wird hier teilweise zerstört. Bei $0,1\ \mu\text{m}^2$ -Dots mit einem Abstand von $< 5\ \mu\text{m}$ können Zellen dagegen nach

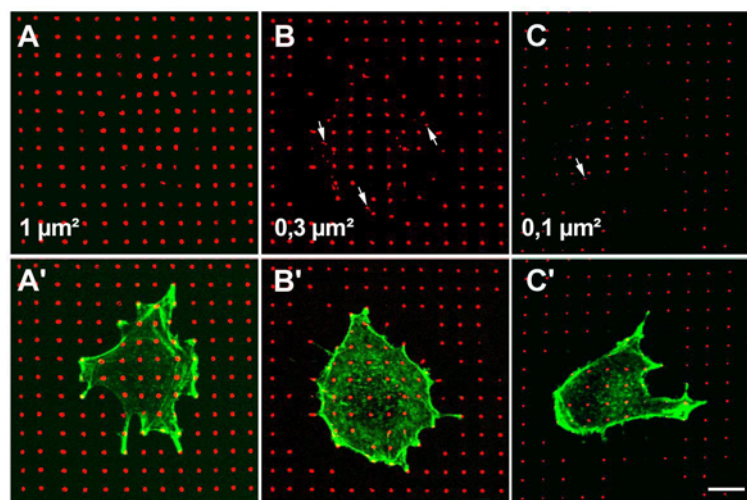


Abb. 3.17: Substratmodifizierung durch Zellen bei geringen Dotgrößen.

B16-Zellen auf mikrostrukturierten Fibronektin-Substraten (rot) mit unterschiedlichen Dotgrößen (jeweils links unten angegeben) jedoch gleichem Abstand von $5\ \mu\text{m}$. Das Aktin-Zytoskelett wurde fluoreszent markiert (grün). (A) Bei $1\ \mu\text{m}^2$ großen Dots wird das Substrat durch die Zelle kaum verändert. (B) Dots einer Größe von $0,3\ \mu\text{m}^2$ fehlen in der unmittelbaren Umgebung der Zelle. In oder unter der Zelle sind Fibronektinpunkte erkennbar, die nicht ins Substratraster passen (z.B. Pfeile). (C) Das Muster mit $0,1\ \mu\text{m}^2$ kleinen Dots wird noch stärker zerstört. Auch hier findet sich herausgerissenes Fibronektin in oder unter der Zelle (Pfeil).

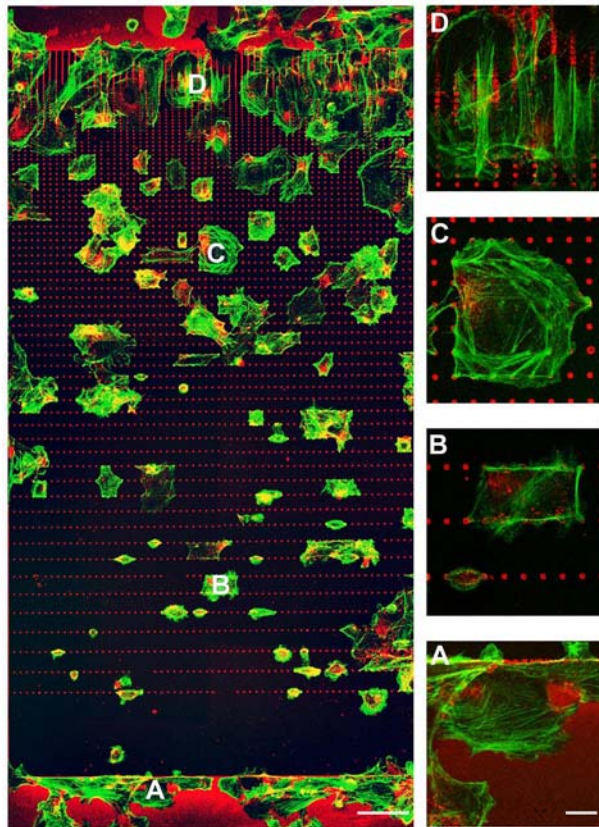
Maßstab: $10\ \mu\text{m}$.

Adhäsion auch spreaden. Einen Überblick über die verschiedenen getesteten Kombinationen von Dotgröße und –abstand sowie deren Einfluss auf Zelladhäsion und Zellspreading liefert Tab. 3.3 in Kap. 3.3.4. Es zeigt sich, dass der Dotabstand bei jeder Dotgröße eine Rolle spielt. Die entscheidende Größe für das Zellspreading ist die Kombination aus Abstand und Fläche der Dots, die Substratbedeckung.

3.3.4 Für optimales Zellspreading sind mind. 15% Substratbedeckung nötig

Bisher wurde der Einfluss von Abstand und Fläche der Dots auf das Zellspreading voneinander getrennt untersucht. Für jede dieser beiden Größen wurde versucht, die Grenzen auszuloten, bei denen Zellen nicht mehr spreaden können. Die Experimente auf den $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots (Kap. 3.3.3) zeigen jedoch, dass Dotgröße und Dotabstand in engem Zusammenhang stehen. Sie können nur bedingt getrennt voneinander betrachtet werden. Wie oben dargestellt, können Zellen auf $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots spreaden, wenn der Abstand zwischen ihnen kleiner als $5 \mu\text{m}$ ist. Bei größeren Abständen gelingt dies nicht mehr. Auf Substraten mit $3 \mu\text{m}^2$ -Dots stellen Abstände von $> 15 \mu\text{m}$ dagegen keinerlei Problem dar (Kap. 3.3.2). Die stark reduzierte Fähigkeit der Zellen, auf $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots mit $\geq 5 \mu\text{m}$ Abstand zu spreaden, könnte mit einer zu großen Kraftausübung der Zellen auf das Substrat zusammenhängen (Kap. 4.2.7). Eine andere mögliche Erklärung ist, dass hier die Lamellipodien der Zellen durch die insgesamt geringe Menge an präsentiertem Protein nicht genügend stimuliert und stabilisiert werden. Auf kleinen Dots mit $< 5 \mu\text{m}$ Abstand könnte aufgrund der höheren Proteinmenge entsprechend den großen Dots eine verstärkte Stimulation erfolgen. Bei Erreichen eines Schwellenwerts erhielt die Zelle ausreichend Signal für das Spreading. Abstand und Fläche von Dots lassen sich in der relativen Größe der Substratbedeckung zusammenfassen. Mit deren Hilfe lässt sich überprüfen, ob nicht nur die geometrischen Grenzen von Dotabstand und -größe an sich einen Einfluss auf das Zellspreading haben, sondern auch die Menge an insgesamt präsentiertem Protein eine Rolle spielt.

Einen ersten Hinweis darauf, dass die Substratbedeckung eine Rolle für das Zellspreading spielt, liefern Zellen auf gradiert strukturierten Substraten. Eine gradierte Protein-Verteilung mit Hilfe von Dotmustern kann dadurch erzeugt werden, dass die Abstände zwischen benachbarten Dots in einer Reihe unverändert bleiben, in dazu senkrechter Richtung die Abstände zwischen den Dotreihen hingegen kontinuierlich abnehmen. In dieser Richtung liegen die Dots also immer dichter beieinander und der Proteinanteil pro Substratfläche steigt. Man erhält so einen ansteigenden Gradienten des präsentierten Proteins. Durch Variation der Abstandsänderung in Gradientenrichtung lassen sich unterschiedlich steile Gradienten herstellen. So ist ein Gradient, bei dem jeder Abstand 10% kleiner als der vorangehende ist, steiler als ein Gradient, dessen Abstandsabnahme bei 5% liegt. Die Übersichtsaufnahme in Abb. 3.18 zeigt einen mittelsteilen Fibronektin-Gradienten, auf dem Zellen für eine Stunde ausplattiert wurden. Ihr Aktin-Zytoskelett und das Substrat wurden anschließend fluoreszent markiert. Am unteren sowie oberen Bildrand befinden sich Flächen mit homogener Fibronektinbeschichtung. Die seitlichen Dotabstände im von unten nach oben ansteigenden Gradienten betragen konstant $5 \mu\text{m}$. Der Abstand zwischen erster und zweiter Dotreihe beträgt $20 \mu\text{m}$. Man erkennt, dass die Zellen in Abhängigkeit der unterliegenden Fibronektinmenge in unterschiedlicher Dichte adhärieren. Im unteren Teil des Gradienten, also dort, wo prozentual weniger Fibronektin präsentiert wird, befinden sich auch weniger Zellen als im oberen Teil, wo der Fibronektinanteil an der Substratfläche größer ist. Die Beobachtung aus Kap. 3.2.1, dass für optimale Zelladhäsion eine Mindestmenge an

**Abb. 3.18:****B16-Zellen im Fibronectin-Gradienten.**

Die Zellen wurden über einem Substrat ausplattiert, bei dem der Abstand zwischen den Fibronectin-Dots in einer Richtung ab- und daher die Fibronectindichte in dieser Richtung zunimmt (von unten nach oben). Mit zunehmender Fibronectindichte steigt auch die Anzahl adhärerender Zellen. Ebenso nimmt deren Größe zu. (A – D) Detailaufnahmen von Zellen auf homogenem Fibronectin (A) bzw. an unterschiedlichen Positionen im Gradienten. Ihre Lage ist in der Übersicht (links) entsprechend gekennzeichnet. Das Aktin-Zytoskelett (grün) der Zellen wird hauptsächlich in Richtung des geringeren Dotabstandes orientiert (B und D).

Maßstab Übersicht: 50 μm .

Maßstab Details: 10 μm .

Fibronectinbedeckung von ca. 20% benötigt wird, wird hier nochmals bestätigt. Der Gradient hat jedoch nicht nur einen Einfluss auf die Dichte der adhärerenden Zellen, sondern auch auf das Aktin-Zytoskelett und damit das Zellspreading. In Abb. 3.18 A – D wurden einige Zellen aus verschiedenen Positionen der Übersicht vergrößert dargestellt. Die Zelle auf homogenem Fibronectin (Abb. 3.18 A) organisiert ihr Aktin-Zytoskelett wie gewohnt ohne eine bestimmte Vorzugsrichtung. Sie bildet im Bild nach unten ein flächiges Lamellipodium aus, in dem das Aktin typisch und ohne Vorzugsrichtung organisiert ist (vergleiche auch Abb. 3.6 A). Zelle B befindet sich im unteren Teil des Fibronectingradienten. Hier sind die Dots in Richtung des Gradienten mit ca. 18 μm deutlich weiter auseinander als innerhalb der Dotreihe selbst (5 μm). Die Zelle hat sich zwischen zwei Dotreihen aufgespannt und zeigt eine strikt geometrische Morphologie, die „breiter als lang“ ist. Als Breite wird dabei die Richtung senkrecht zum Gradientenverlauf bezeichnet. Die Übersicht zeigt, dass Zellen, die im Gradienten noch weiter unten haften, sich oft nur entlang einer einzigen Dotreihe strecken. Für diese Zellen ist der Abstand von 5 μm innerhalb der Dotreihe wesentlich besser und schneller überbrückbar als die 20 μm zur nächsten Dotreihe. Im mittleren Bereich des Gradienten sind die Abstände zwischen den Dots in beiden Richtungen in etwa gleich groß. Entsprechend orientiert die Zelle ihr Aktin-Zytoskelett, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, zwischen den Dots. Dabei entwickelt die Zelle keine stark gestreckte Morphologie wie Zelle A, sondern sie spannt sich nahezu quadratisch zwischen den Dots auf. Im mittleren Gradientenbereich weist kaum eine Zelle eine Vorzugsrichtung auf. Dies ändert sich im obersten Teil des Gradienten, wo die Dots in Gradientenrichtung deutlich näher zusammenliegen als innerhalb einer Dotreihe. Wie im unteren Bereich des Gradienten wird das Zytoskelett vor allem in Richtung des kleineren Dotabstandes orientiert. Die Aktinfasern von Zelle D verlaufen stark gebündelt senkrecht zu den Hauptfasern der Zelle B.

Zusammengefasst bestätigen diese Beobachtungen eine wichtige Rolle des Dotabstandes für das Zellspreading, wie bereits in Kap. 3.3.3 dargestellt.

Eine weitere Beobachtung der Zellen auf dem Gradientenmuster führt zur Frage zurück, welche Rolle die Substratbedeckung als zusammengefasste Größe von Abstand und Größe für das Zellspreading spielt. Während im unteren Bereich des Gradienten die Zellen relativ klein bleiben, scheinen sie mit zunehmender Fibronectinbedeckung des Substrates nach oben hin immer größer zu werden. Zelle C ist z.B. deutlich größer als Zelle B. Für eine genauere Untersuchung wurden Zellen auf Fibronectinsubstraten ausplattiert, die aus Dotmustern mit konstanten Abständen aber unterschiedlichen Dotgrößen bestehen. So entstehen unterschiedliche Fibronectinbedeckungen auf den verschiedenen Substraten. Die Zellen wurden nach einer Stunde fixiert, das Substrat sowie das Aktin-Zytoskelett fluoreszent markiert und die Zellgrößen vermessen. Wie bereits aufgrund des Gradientenmusters (Abb. 3.18) vermutet, ergab sich ein Zusammenhang von Zellgröße und Fibronectinbedeckung des Substrats. Abb. 3.19 zeigt exemplarisch einige Beispiele von B16-Zellen, die auf unterschiedlich stark bedeckten Substraten wachsen. Auf einer fibronectinfreien Region kugelt sich die Zelle ab und bedeckt eine Fläche von lediglich $240 \mu\text{m}^2$. Die Zelle auf einem mit nur zu 1% bedeckten Substrat ist mit $362 \mu\text{m}^2$ bereits deutlich größer. Dieser Trend setzt sich mit zunehmender Substratbedeckung weiter fort. Zur Quantifizierung wurden zwei Zelllinien herangezogen. Es wurden jeweils 10 – 12 B16-Zellen auf 13 und ebenso viele 3T3-Fibroblasten auf 14 unterschiedlich bedeckten Substraten vermessen. Die durchschnittlichen Zellgrößen wurden gegen die ebenfalls vermessene effektive Fibronectinbedeckung aufgetragen (Abb. 3.20). Auf unbedecktem Substrat (0% Fibronectin) beträgt die Zellfläche von B16-Zellen $232 \pm 22 \mu\text{m}^2$, die der 3T3-Fibroblasten $197 \pm 15 \mu\text{m}^2$. Mit zunehmender Substratbedeckung wächst die Zellgröße, bis schließlich Zellgrößen von $1447 \pm 127 \mu\text{m}^2$ bei B16-Zellen bzw. $1622 \pm 75 \mu\text{m}^2$ bei 3T3-Fibroblasten auf homogen bedecktem Substrat (100% Fibronectin) erreicht werden. Sowohl bei den 3T3-Fibroblasten (Abb. 3.20 A) als auch bei den B16-Zellen (Abb. 3.20 B) wird die halbmaximale Zellgröße bei einer Fibronectinbedeckung von ca. 5–8% erreicht. Ab ca. 15% Fibronectinbedeckung können sich die Zellen optimal ausbreiten, was 80% der maximalen Ausbreitung entspricht. Während die Größe der Zellen mit steigendem Proteinanteil im Substrat bis 15% stark zunimmt, ist bei höheren Fibronectinanteilen kaum ein Unterschied im

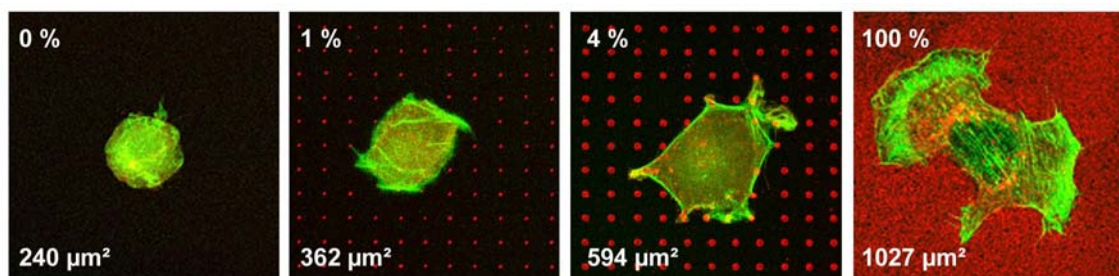


Abb. 3.19: Zellen auf Substraten mit unterschiedlicher Fibronectinmenge.

B16-Zellen wurden eine Stunde auf mikrostrukturierten Fibronectin-Substraten in serumfreiem Medium kultiviert und das Aktin-Zytoskelett (grün) sowie Fibronectin (rot) fluoreszirens markiert. Von links nach rechts steigt die Menge an präsentiertem Fibronectin. Der effektive prozentuale Fibronectin-Anteil an der Gesamtfläche wurde gemessen und ist jeweils oben links angegeben. Mit zunehmender ECM-Menge breiten sich die Zellen stärker aus und werden flacher und größer. Die von ihnen bedeckte Fläche ist jeweils unten links angegeben.

Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Zellspreading mehr erkennbar. Die verschiedenen Substratbedeckungen wurden mit völlig unterschiedlichen Mustern erzielt. Da sich dennoch eine Korrelation mit der Zellgröße ergibt, scheinen die Zellen die Menge des präsentierten Proteins unabhängig von der Geometrie des Substratmusters zu erkennen. Ein weiterer Hinweis darauf ergibt sich aus dem Vergleich von Zellen, die auf drei unterschiedlich strukturierten Substraten mit jeweils identischer effektiver Fibronektinbedeckung von 4% wachsen (Abb. 3.20 B, Pfeil, und C). B16-Zellen auf einem Dotmuster mit 4 μm Kantenlänge und einem Abstand von 16 μm (von Rand zu Rand) bedecken eine Fläche von $609 \pm 60 \mu\text{m}^2$. Dieser Wert ist statistisch nicht unterscheidbar (U-test nach Mann-Whitney) von den Zellflächen, die man auf Substraten mit Dots von 2 μm Kantenlänge und 8 μm Abstand ($564 \pm 46 \mu\text{m}^2$) und auf Substraten mit Dots von 1 μm Kantenlänge und 4 μm Abstand ($611 \pm 40 \mu\text{m}^2$) misst.

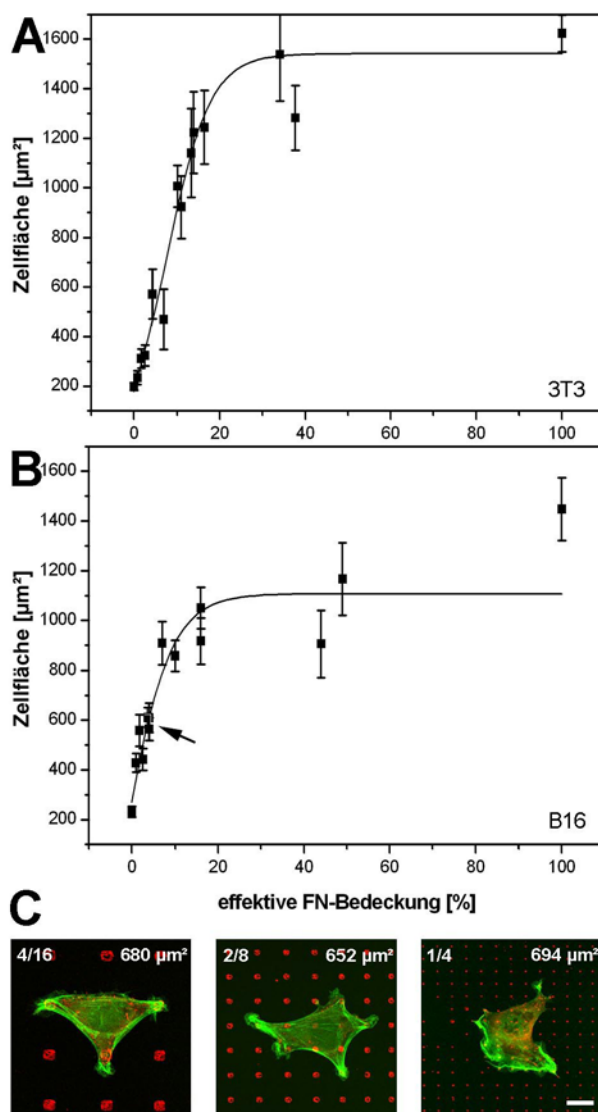


Abb. 3.20:

Korrelation zwischen präsentierter Fibronektin-Menge und Zellgröße.

NIH/3T3-Fibroblasten (A) bzw. B16-Maus-Melanoma-Zellen (B) wurden eine Stunde auf mikrostrukturierten Fibronektin-Substraten in serumfreiem Medium kultiviert und das Aktin-Zytoskelett (grün) sowie Fibronektin (rot) markiert. Von jeweils 12 unterschiedlichen Mustern wurden die Zellgrößen gegen die effektive Fibronektinbedeckung aufgetragen. Die Balken zeigen den Standardfehler. (C) Repräsentative B16-Zellen auf unterschiedlichen Mustern (Angaben jeweils links oben in μm : Dot-Kantenlänge/Abstand) mit gleicher Fibronektinbedeckung (4%, Pfeil in B). Trotz unterschiedlicher Fibronektinmuster weisen die Zellen in etwa die gleiche Größe auf (jeweils oben rechts angegeben). Maßstab: 10 μm .

Tab. 3.3 liefert einen Überblick über die getesteten Substratgeometrien und das entsprechende Zellverhalten hinsichtlich Adhäsion und Spreading. Es zeigt sich, dass die Kombination von Dotfläche und –abstand, also die Substratbedeckung, von zentraler Bedeutung ist. Je größer die Dots sind, desto mehr Zellen können bei gleichem Abstand adhären und desto größere Abstände können überbrückt werden. Während bei 0,1 μm^2 -Dots und 10 μm Abstand die Zellen nicht einmal mehr adhären können, ist das Muster mit 3 μm Dotkantenlänge und 10 μm Abstand hinsichtlich Zelladhäsion und -spreading kaum vom homogenen Substrat zu unterscheiden.

		Dotabstand [μm]							
		1	2	5	10	15	20	25	30
Dot-Kantenlänge [μm]	0,3	A S	A S	a ns	na ns				
	0,5		A S	a s	a ns				
	1			A S	a s	a s	a s		
	3				A S	A S	a s	a s	a ns

Tab. 3.3: Übersicht: Zellverhalten auf getesteten strukturierten Substraten.

Allgemeiner Überblick über die Fähigkeiten von Zellen, auf ECM-Substraten unterschiedlicher Geometrie zu adhären bzw. zu spreaden.

Adhäsion: A = Zellanzahl entspricht Anzahl auf homogenem FN; a = deutlich geringere Zellanzahl als auf homogenem FN; na = keine adhären Zellen

Spreading: S = Zellen werden $\geq 50\%$ der Größe auf homogenem FN; s = Zellen werden $\leq 50\%$ der Größe auf homogenem FN, jedoch größer als auf 0% FN-Bedeckung; ns = Zellen werden nicht größer als auf 0% FN-Bedeckung

3.3.5 Zellen nutzen die ihnen zur Verfügung stehenden Kontaktflächen unterschiedlich

Zellen scheinen also die Gesamtmenge an verfügbarem Protein erkennen zu können. Sie werden in Abhängigkeit des Fibronectinanteils im strukturierten Substrat unterschiedlich groß. Wie aber erkennen die Zellen die Fibronectinmenge auf der Substratoberfläche, wenn deren Geometrie keine Rolle zu spielen scheint? Bisher wurden die Zellen als Ganzes betrachtet und ihre Anzahl oder Größe als Parameter zur Beschreibung der Beobachtungen herangezogen. Nun sollen die Zellen auf subzellulärem Niveau untersucht und die einzelnen, lokal über den Dots entstehenden Kontakte genauer betrachtet werden. Auf 1 μm^2 großen Dots mit 5 μm Abstand akkumulieren Kontaktmarker wie FAK, Paxillin, Integrin- β_3 und Phosphotyrosin annähernd über der gesamten Dotfläche (Abb. 3.6). Dabei unterscheidet sich die Verteilung von Vinculin über strukturiertem Substrat (Abb. 3.6 B) insofern etwas von den anderen Markern, als es nicht nur direkt über den Dotflächen akkumuliert. Es entstehen längliche Strukturen, die sich von den Dots ausgehend entlang der Aktinfasern erstrecken. An den Dots setzen zumeist nur ein bis zwei dicke Aktinbündel an, die von ihrer Richtung her ähnlich orientiert sind. Ab einer Kantenlänge von ca. 2 μm , ändert sich die Verteilung der Kontaktmarker über den Dots. Alle untersuchten Moleküle clustern bei Dots dieser Größe

über den Randbereichen, wohingegen das Dotzentrum kaum Färbung aufweist (Abb. 3.21). Bei Dots, die in der Zellperipherie liegen, sind die nach außen gerichteten Dotkanten zumeist deutlich stärker markiert als die zum Zellzentrum gewendeten. Außerdem setzen dicke Aktinfasern häufig in diesen äußeren Randbereichen an und verlaufen – im Gegensatz zu den $1 \mu\text{m}^2$ -Dots - in zwei bis drei sehr unterschiedlichen Richtungen (Abb. 3.21).

Um diese unterschiedlichen Dotnutzungen zu quantifizieren, wurden zwei repräsentative Marker ausgewählt: Phosphotyrosin als Marker für intrazelluläre Signaltransduktion und Paxillin als spezielles Markerprotein für Zell-Matrix-Kontakte. B16- Zellen wurden für eine Stunde auf strukturierten Fibronektinsubstraten kultiviert, fixiert und Fibronektin, Aktin und Phosphotyrosin bzw. Paxillin fluoreszent markiert. Auf homogenen Substraten, die mit Hilfe von Microcontact Printing hergestellt wurden, formen die Zellen kleine, punktförmige oder längliche Strukturen im Randbereich der Lamellipodien. Dies steht in Einklang mit der Situation auf konventionell beschichteten homogenen Substraten. Die Größe dieser Kontakte wurde gemessen und ergab durchschnittlich $0,66 \pm 0,15 \mu\text{m}^2$ (min.: $0,34 \mu\text{m}^2$; max.: $1,05 \mu\text{m}^2$) für Phosphotyrosin (Abb. 3.21 A) und $0,28 \pm 0,04 \mu\text{m}^2$ (min.: $0,13 \mu\text{m}^2$; max.: $0,6 \mu\text{m}^2$) für Paxillin (Abb. 3.21 B). Die gleichen Kontaktflächen wurden auf Substraten gemessen, die bei einem identischen Abstand von $10 \mu\text{m}$ mit $1 \mu\text{m}^2$, $3 \mu\text{m}^2$ und $12,6 \mu\text{m}^2$ unterschiedliche Dotflächen aufweisen. Wie bei den Messungen auf homogenem Substrat wurden nur Kontakte vermessen, die in der Zellperipherie unter flächigen, dünnen Lamellipodien lagen. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass die Fluoreszenzintensität der vermessenen Kontakte durch den dickeren Zellkörper reduziert wurde. Das Ergebnis ist in Abb. 3.21 dargestellt. Die absolute Größe der Phosphotyrosin- und Paxillin-positiven Zell-Matrix-Kontakte nimmt mit steigender Dotgröße zu. Die prozentuale Dotnutzung hingegen (definiert als Kontaktgröße $\times 100$ / unterliegende Fibronektinfläche) fällt von ca. 90% bei 1 und $3 \mu\text{m}^2$ großen Dots auf 20 – 30% bei $12,6 \mu\text{m}^2$ großen Dots. Ähnliche geringe Substratnutzungen von unter 20% wurden auch in peripheren Lamellipodien von Zellen auf homogenem Fibronektin beobachtet (Abb. 3.21).

Als nächstes wurde untersucht, ob sich die Dotnutzung der $12,6 \mu\text{m}^2$ großen Dots in Abhängigkeit der Fibronektinbedeckung ändert. Hierzu wurden die Kontaktgrößen auf $12,6 \mu\text{m}^2$ großen Dots mit unterschiedlichen Abständen vermessen. Es stellte sich heraus, dass der Dotabstand für die Dotnutzung keine Rolle spielt (Abb. 3.21). Sie bleibt für Phosphotyrosin und Paxillin bei Distanzen von 10, 15, 20 und $25 \mu\text{m}$ unverändert. Die untersuchten Substrate weisen Fibronektinbedeckungen von 9, 4, 2,25 und 1,44% auf. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die maximale Kontaktgröße von B16-Zellen weder von der Verfügbarkeit der intrazellulären Kontaktproteine noch von der Substratbedeckung mit Fibronektin abhängt. Wäre einer dieser beiden Faktoren limitierend, müsste bei Substraten mit größerer Fibronektinbedeckung eine geringere Dotnutzung zu beobachten sein. Entscheidend für die Dotnutzung scheinen vielmehr andere Faktoren wie z.B. die intrazelluläre Spannung zu sein.

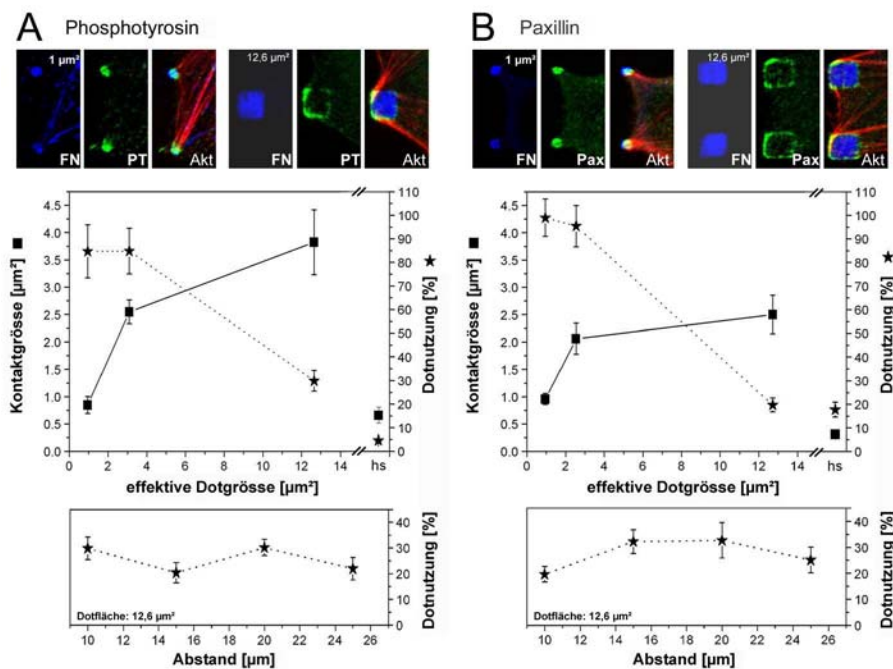


Abb. 3.21: Nutzung der zur Verfügung stehenden Adhäsionsfläche.

B16-Zellen wurden für eine Stunde auf mikrostrukturierten Substraten kultiviert und Fibronectin (FN, blau), Aktin (act, rot) sowie Phosphotyrosin (PT, grün) bzw. Paxillin (Pax, grün) fluoreszent markiert. Die Fläche von Phosphotyrosin (A) bzw. Paxillin (B) von Kontakten in der Zellperipherie wurde auf homogenem Substrat (hs) sowie für drei Dotgrößen bestimmt (Kontaktgröße: -■-). Die Kontaktgröße wurde in Relation zur unterliegenden Fibronectin-Fläche gesetzt und ebenfalls aufgetragen (Dotnutzung: -★-). Außerdem wurde die Dotnutzung für 12,6 μm^2 große Dots mit unterschiedlichen Abständen ermittelt. Die Balken repräsentieren die Standardfehler.

3.3.6 Reduzierung der ECM-Menge auf identischen Substratgeometrien führt zu veränderter Kontaktbildung

Das Zellspreading ist von der ECM-Bedeckung des Substrates abhängig (Kap. 3.3.4) und verschieden große Dots werden unterschiedlich stark für die Kontaktbildung genutzt (Kap. 3.3.5). Daher wurde die Kontaktbildung der Zellen untersucht, wenn identische Substratgeometrien unterschiedliche Mengen an aktivem Fibronectin präsentieren. Dies wurde durch Beschichtung des Substrates mit unterschiedlichen Konzentrationen an aktivem Fibronectin erreicht. In einigen Experimenten wurde lediglich bei der Substratbeschichtung die Fibronectinkonzentration vermindert, was mit einer Reduzierung der Gesamtmenge an Protein auf dem Substrat einhergeht. Bei anderen Versuchen wurde der sinkende Fibronectinanteil durch nicht adhäsive Proteine ersetzt, um die Gesamtmenge an Protein konstant zu halten. Als nicht adhäsive Proteine wurden Rinderserumalbumin oder inaktiviertes Fibronectin eingesetzt. Fibronectin verliert seine Adhäsion-vermittelnden Eigenschaften, wenn es unter Verwendung von NHS-Ester-aktivierten Farbstoffen fluoreszent markiert wird (vergl. auch Kap. 3.4.2). Die Wahl des inaktiven Proteins hatte keinerlei Einfluss auf die Ergebnisse. Abb. 3.22 zeigt ein Experiment bei dem aktives Fibronectin zu unterschiedlichen Anteilen mit inaktivem, Alexa633-markiertem Fibronectin gemischt wurde. Auf den mit unterschiedlichen Mengen aktiven Fibronectins beschichteten Substraten wurden B16-Zellen unter Standardbedingungen für eine Stunde kultiviert und anschließend eine immunhistochemische Färbung für Phosphotyrosin und Fibronectin durchgeführt. Am

konfokalen Laser Scanning Mikroskop wurden unter standardisierten Einstellungen die Fluoreszenz-Intensitäten der Färbungen gemessen und die einzelnen Substratbeschichtungen verglichen (Abb. 3.22). Zunächst wurde überprüft, ob sich mit Hilfe der Verdünnungsprozedur die Menge an aktivem Fibronectin auf dem Substrat kontrollieren lässt. Abb. 3.22 A zeigt, dass die Intensität der immunhistochemischen Fibronectinfärbung mit abnehmendem Anteil an aktivem Fibronectin ebenfalls abnimmt. Es ist daher zu vermuten, dass der eingesetzte Antikörper das Fluoreszenz-markierte Fibronectin nicht ebenso gut erkennt wie das unbehandelte Protein. Im Gegensatz dazu nimmt die Intensität der Fluoreszenz des markierten Fibronectin mit abnehmendem Anteil an nativem Fibronectin zu.

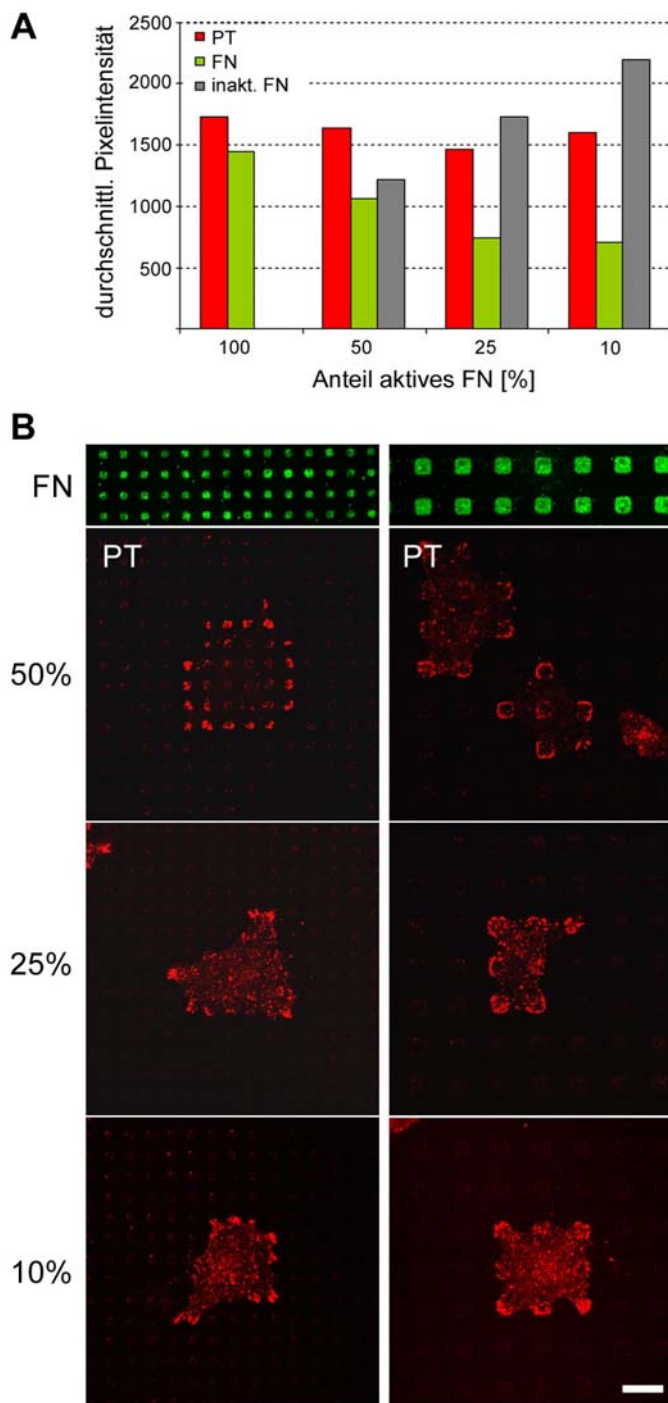


Abb. 3.22:
Reduzierung der Fibronectinmenge durch Titrierung.

Mikrostrukturierte Substrate wurden mit unterschiedlichen Mengen an aktivem Fibronectin beschichtet. Die Gesamtmenge an Protein blieb durch Untermischen von inaktiviertem Fibronectin konstant. Die Prozentangaben geben den Anteil aktiven Fibronectins am Gesamtprotein an. B16-Zellen wurden für eine Stunde unter Standardbedingungen kultiviert und Phosphotyrosin (PT) sowie Fibronectin (FN) immunhistochemisch markiert.

(A) Mit abnehmendem Anteil des aktiven Fibronectins steigt die Menge inaktivierten Proteins (grau) auf den Substraten an. Die nachlassende Intensität der immunhistochemischen Fibronectinfärbung (grün) deutet auf eine verminderte Affinität des verwendeten Antikörpers zum inaktivierten Fibronectin hin. Unabhängig von der Substratbeschichtung bleibt die Intensität der Phosphotyrosinfärbung über peripheren Dots konstant (rot).

(B) Verteilung der Phosphotyrosinfärbung (PT, rot) auf Substraten mit unterschiedlichem Anteil an aktivem Fibronectin (FN, grün). Sowohl auf feiner strukturierten Substraten ($1 \mu\text{m}^2$ -Dots, $5 \mu\text{m}$ Abstand; links) als auch auf gröberen Strukturen ($9 \mu\text{m}^2$ -Dots, $10 \mu\text{m}$ Abstand; rechts) zeigen die Zellen bei einem aktiven Fibronectinanteil von $\leq 25\%$ weniger klar abgegrenzte Kontakte und eine diffuse Hintergrundfärbung. Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Die Verdünnung des Fibronectin schlägt sich auf dem Substrat also wie gewünscht in einem verminderten Anteil nieder. Betrachtet man die Phosphotyrosin-Färbung, zeigt sich, dass unabhängig von der funktionellen Fibronectinmenge die Intensität der Kontakte unverändert bleibt. Für diese Quantifizierung wurden nur Intensitäten gemessen, die über $9 \mu\text{m}^2$ -Dots der Zellperipherie liegen. Die Zellen scheinen keinen Unterschied zwischen den einzelnen Substraten zu machen. Optisch ist jedoch ein Unterschied in der Kontaktmorphologie erkennbar (Abb. 3.22 B). Bei einem aktiven Fibonektinanteil von 50% entspricht die Kontaktverteilung den Standardsubstraten mit reinem Fibronectin. Es sind klar abgegrenzte Kontakte erkennbar, die in der Zellperipherie stärker ausgeprägt sind. Bei $9 \mu\text{m}^2$ großen Dots ist die typische Randverteilung klar erkennbar. Ab einem Anteil von 25% erscheinen die Kontakte jedoch verändert. Vor allem auf dem feiner strukturierten Muster mit $1 \mu\text{m}^2$ -dots sind sie weniger klar abgegrenzt und die Zellen weisen eine diffuse körnige Hintergrundfärbung auf. Während auf $9 \mu\text{m}^2$ -Dots die Randverteilung bei 25% aktivem Fibronectin noch erkennbar ist, verschwindet sie auch hier bei 10% aktivem Fibronectin. Dabei scheint eine positive Korrelation zwischen der Änderung der Kontaktmorphologie und der Zunahme des Hintergrundes zu bestehen.

Die vorangehenden Abschnitte zeigen, dass μCP ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung von Zell-Matrix-Interaktionen ist. Die Zellen sind gezwungen, auf die präsentierte Substratgeometrie zu reagieren und ihre Kontakte sowie ihr Zytoskelett daran auszurichten. Dadurch wurde es möglich, geometrische Grenzwerte der Zelladhäsion aufzudecken. Außerdem stellte sich heraus, dass Fibroblasten-ähnliche Zellen die Gesamtmenge an zur Verfügung stehendem ECM-Protein integrieren können, was entscheidenden Einfluss auf das Zelluläre Verhalten hinsichtlich Adhäsion und Größenwachstum hat.

3.4 Varianten des Microcontact Printing zur Herstellung mikrostrukturierter Substrate

Microcontact Printing ist eine sehr flexibel einsetzbare Methode zur Herstellung mikrostrukturierter Substrate. Die in den vorangehenden Kapiteln vorgestellten Experimente wurden mit der Grundvariante unter Verwendung der Gold-Thiol-Chemie durchgeführt. Für biologische Fragestellungen ist diese Verfahrensweise nicht optimal geeignet, da sie die Verwendung einer Goldoberfläche voraussetzt. Diese erschwert die Auswertung der Experimente mittels Mikroskopie in mehrfacher Hinsicht. Erstens ist Gold nicht lichtdurchlässig. Es wird zwar eine sehr dünne Goldschicht von max. 20 nm Dicke verwendet, die eine gewisse Menge Licht noch durchdringen kann. Dennoch wird die Intensität des Lichtes sehr stark herabgesetzt, was die Mikroskopie mit Hilfe verschiedener Durchlichtverfahren enorm erschwert. Zweitens bringt Gold aufgrund seiner metallischen Eigenschaften auch Probleme für die Auflichtmikroskopie mit sich, wie sie bei der Immunfluoreszenz eingesetzt wird. Gold löscht durch Fluoreszenz emittiertes Licht. Dieser Effekt kommt in den durchgeführten Experimenten aufgrund der oberflächennahen Strukturen (Substratmuster, Zellunterseite) zum Tragen. Andererseits reflektiert Gold aufgestrahltes Licht, was z.T. zu einem schlechten Signal-Hintergrund-Verhältnis und damit zu erheblichen Problemen bei der Signaldetektion führen kann. Es ist daher wünschenswert, die strukturierten Substrate auf lichtdurchlässigen und nicht metallischen Oberflächen wie z.B. Glas herstellen zu können. In der Literatur sind bereits Varianten der weichen Lithographie beschrieben, wie dies z.B. durch direktes Proteinstempeln erreicht werden kann (Bernard et

al., 2000). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde versucht, einige dieser Methoden für die Experimente einzusetzen und sie weiter zu entwickeln. Im Folgenden sollen zwei dieser Varianten beschrieben werden.

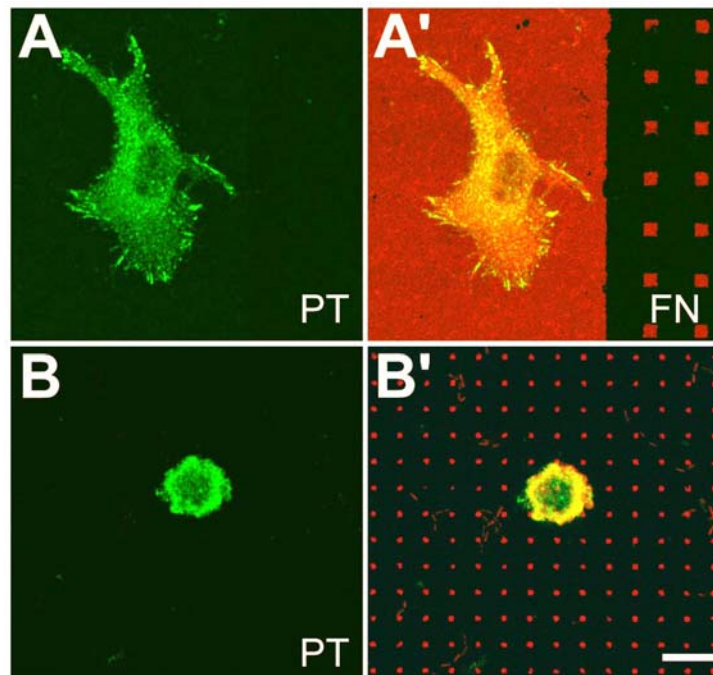
3.4.1 Direktes Stempeln von ECM-Proteinen auf Glas

Bei dieser Methode wird der Stempel anstelle von einer Alkanthiollösung direkt mit einer Proteinlösung beschichtet. So kann das strukturiert aufzubringende Protein durch den Stempelvorgang direkt auf eine Glasoberfläche übertragen werden. Dieses Verfahren ist in der Literatur bereits beschrieben (Bernard et al., 2000; Bernard et al., 2001) und funktioniert prinzipiell sehr gut. Es ist jedoch für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fragestellungen aus mehreren Gründen nicht geeignet. So stellte sich heraus, dass sich nicht alle Proteine direkt stampeln lassen. Während Fibronectin und Laminin sehr saubere Muster mit extrem niedrigem Hintergrund lieferten (Abb. 3.23), konnte z.B. Vitronectin nicht in nachweisbaren Mengen auf eine Glasoberfläche übertragen werden. Das stark verminderte Ansaugverhalten des Stempels lässt vermuten, dass bereits die Beschichtung des Stempels mit Vitronectin nicht optimal erfolgt. Wenngleich das strukturierte Aufbringen von Fibronectin und Laminin auf Glas sehr gut erfolgt, stellt sich als nächstes Problem die Inaktivierung der verbliebenen freien Glasoberfläche, um dort Zelladhäsion zu unterbinden. Es wurde versucht, dies durch Beschichtung des Substrates mit Rinderserumalbumin (BSA) oder Poly-L-Lysin-Polyethylenglycol (PLL-PEG) zu erreichen.

Durch direktes Proteinstampeln können strukturell sehr saubere Substrate hergestellt werden. Die Zellen zeigen jedoch nicht die typischen starken Reaktionen, wie sie bei Verwendung der Gold-Thiol-Chemie auftreten (Abb. 3.23; vergl. Abb. 3.6, Kap. 3.2). Nach einer Stunde haften B16-Zellen auf homogenem Fibronectinsubstrat und sind abgeflacht. Das Verteilungsmuster der Phosphotyrosinfärbung als Marker für intrazelluläre Signaltransduktion weist jedoch deutliche Unterschiede zu Zellen auf, die auf anders hergestellten homogenen Flächen wachsen (Abb. 3.23 A). Statt länglicher, klar abgegrenzter Kontakte in der Zellperipherie und geringem Hintergrund, tritt eine vor allem diffus über die Zelle verteilte Färbung auf. Sie lässt nur wenige kontaktähnliche Strukturen in der Peripherie erkennen. Auf strukturiertem Substrat wird der Unterschied zwischen den verschiedenen hergestellten Substraten noch deutlicher. Abb. 3.23 B zeigt eine Zelle, die unter gleichen Bedingungen und auf gleicher Substratgeometrie wie die Zellen in Abb. 3.6 D (Kap. 3.2.3) kultiviert wurde. Während die Zelle auf dem mit Gold-Thiol-Chemie hergestellten Substrat spreadet und Phosphotyrosin klar über den unterliegenden Dots akkumuliert (Abb. 3.6 D), kann sich die Zelle auf direkt gestempeltem Fibronectin (Abb. 3.23 B) weder abflachen noch ist in der Phosphotyrosinfärbung eine intrazelluläre Reaktion auf das Muster erkennbar. Bei einigen Experimenten waren in der direkten Umgebung von Zellen Lücken im Substrat zu beobachten. Diese Beobachtung ähnelte den Erfahrungen mit $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots auf Gold-Thiol-Substraten (Kap. 3.3.3), war jedoch unabhängig von der Dotgröße.

Abb. 3.23:
Direkt auf Glas gestempeltes
Fibronectin.

B16-Maus-Melanoma-Zellen wurden für eine Stunde auf direkt mit Fibronectin bestempelten Glassubstraten in serumfreiem Medium kultiviert. Fibronectin sowie Phosphotyrosin wurden mittels Immunhistochemie markiert. **(A, A')** Zelle auf homogenem Fibronectin-Substrat (FN, rot). Die Zelle breitet sich zwar aus, jedoch zeigt sie kaum Kontaktbildung, hier dargestellt durch Phosphotyrosin (PT, grün). **(B, B')** Auf strukturiertem (hier: $1\ \mu\text{m}^2$ -Dots mit $5\ \mu\text{m}$ Abstand) Fibronectin-Substrat (FN, rot) flachen sich die Zellen weder richtig ab noch findet die typische Signaltransduktion über den Dots statt (PT, grün).
 Maßstab: $10\ \mu\text{m}$.



3.4.2 Kovalente Kopplung von ECM-Proteinen auf Glas

Nachdem sich das direkte Stempeln von ECM-Proteinen für die Fragestellungen der Zelladhäsion als wenig erfolgversprechend herausgestellt hatte, wurde versucht, die Proteinmuster mit Hilfe eines chemischen Crosslinkers kovalent auf Glas zu koppeln. Chemische Crosslinker sind kommerziell erhältliche kleine Moleküle, die aus zwei spezifischen reaktiven Gruppen und einem dazwischenliegenden kurzen Spacer bestehen. Eine solche Methode hat mehrere Vorteile. Wie beim direkten Stempeln von Protein wird die störende Goldoberfläche unnötig und kann umgangen werden. Durch das Stempeln von chemischen Crosslinkern und anschließender Inaktivierung der restlichen Glasoberfläche steht ein vorstrukturiertes Substrat zur Verfügung, das sehr flexibel und schonend mit Protein aus Lösung beschichtet werden kann. Damit bleiben die beiden größten Vorteile der Gold-Thiol-Chemie, nämlich die große Bandbreite verwendbarer Proteine und deren schonende Behandlung, erhalten. Ein Vorteil der kovalenten Kopplung von Protein an Glas gegenüber der Gold-Thiol-Chemie ist, dass Zellen das Protein nicht aus dem Substratmuster reißen können und so die Untersuchungen im Grenzbereich für die Zelladhäsion (kleine Dots und geringe Substratbedeckungen) zuverlässiger durchgeführt werden können.

Der erste Schritt zur Herstellung solcher Substrate ist die Aminosilylierung von Deckgläschen. Dies kann nach verschiedenen Standardprotokollen aus der Flüssig- oder Dampfphase erfolgen. Auf die so aktivierte Glasoberfläche kann dann ein Crosslinker aufgebracht werden, der mit den vom Glas präsentierten Aminogruppen kovalente Verbindungen eingeht. Diese Reaktion erfolgt in der Regel über eine N-hydroxysuccinimidyl-Gruppe (NHS-Ester) im Crosslinker. Erste Versuche zeigen, dass solche Crosslinker prinzipiell analog zu den Alkanthiolen einsetzbar sind und mit Hilfe eines Stempels in geometrischen Mustern aufgebracht werden können. Abb. 3.24 zeigt zwei unterschiedlich

strukturierte Fibronektinsubstrate, bei denen nach Stempeln des Crosslinkers die verbleibende Glasoberfläche analog zur Gold-Thiol-Chemie mit NHS-aktiviertem Polyethylenglykol (PEG) inaktiviert wurde. Anschließend wurde das Substrat mit Protein beschichtet und das Muster anhand einer immunfluoreszenten Fibronektinfärbung überprüft. Obwohl ein starker und inhomogener Hintergrund vorhanden ist, sind die gestempelten Muster klar erkennbar. Vor allem Abb. 3.24 A beweist, mit welcher Präzision diese Variante des Microcontact Printing erfolgen kann. Die nur $0,25 \mu\text{m}^2$ großen Dots mit $2 \mu\text{m}$ Abstand werden ganz klar getrennt, was bei Anwendung der Gold-Thiol-Chemie nicht immer der Fall ist.

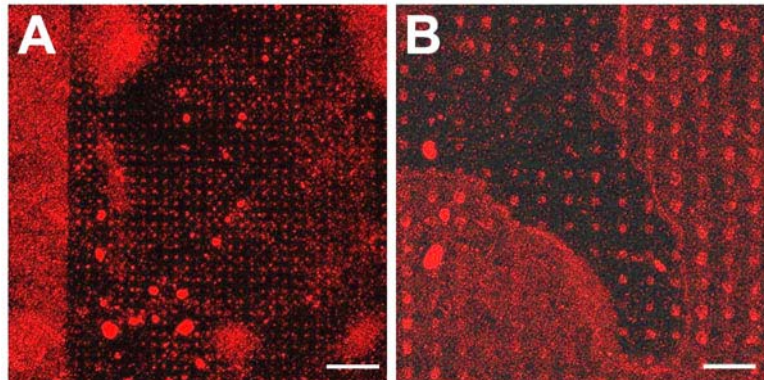


Abb. 3.24: Kovalent auf Glas immobilisiertes Fibronektin.

Ein aktiviertes Deckglas wurde mit einem heterobifunktionalen Crosslinker bestempelt und mit NHS-aktiviertem Polyethylenglykol gesättigt. Gelöstes Fibronektin wurde auf das Substrat gegeben und anschließend mit Immunhistochemie nachgewiesen. Die Stempelmuster sind klar erkennbar, weisen jedoch einen hohen Hintergrund auf.

Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

Von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität der kovalenten Substrate ist die richtige Wahl des Crosslinkers. Eine genaue Überprüfung der Aminosäuresequenz von Fibronektin ergab, dass sich im weiteren Umfeld der RGD-Signalsequenz Aminogruppen u.a. auch von Lysin befinden (Abb. 1.1 B). Diese Sequenz könnte blockiert werden, wenn die Reaktion mit einem NHS-Kreuzvernetzer durchgeführt wird. Ist dies der Fall, erkennen die Zellen die Signalsequenz nicht und werden somit nicht zum Spreading stimuliert. Das Fibronektin wäre mit dieser Methode wie beim direkten Proteinstempeln erneut nicht funktionell. Die Überprüfung der Fibronektinstruktur zeigt auch, dass in jeder Fibronektinkette zwei freie, nicht in Disulfidbrücken gebundene Sulfhydrylgruppen vorliegen. Sie befinden sich jeweils in den Fibronektindomänen FN III₇ sowie FN III₁₅ und liegen damit weit von der Signalsequenz (FN III₁₀ bzw. FN III₉) entfernt (Pankov und Yamada, 2002). Aus diesem Grund wurde ein heterobifunktionaler Crosslinker (*Sulfo*-KMUS) eingesetzt. Mit seiner NHS-Gruppe kann er an die aminosilylierte Glasoberfläche binden, während seine Maleimid-Gruppe spezifisch mit Sulfhydrylgruppen reagiert. Ein solcher Crosslinker bringt also optimale Voraussetzungen mit sich, um ein funktionelles Substrat zu erhalten.

Während die Verwendung eines homobifunktionalen Crosslinkers tatsächlich kein funktionelles Substrat liefert – das Ergebnis zeigt große Ähnlichkeit mit den direkt proteinbestempelten Substraten –, sind mit dem heterobifunktionalen Crosslinker vielversprechende Ansätze vorhanden. Wie in Abb. 3.25 A dargestellt, weisen B16-Zellen

nach einer Stunde auf homogenem Substrat die typischen Färbemuster für Zell-Matrix-Kontakte auf, wie sie auch auf klassisch hergestellten homogenen Substraten gefunden werden. Auch ist die Glasoberfläche mit dieser Methode prinzipiell gut inaktivierbar. Das verwendete NHS-aktivierte PEG unterbindet die Proteinadsorption an das Substrat. Dennoch haftende Zellen sind abgekugelt und nach einer Stunde noch nicht abgeflacht (Abb. 3.25 C). Was an dieser Methode noch verbessert werden muss, ist die Inaktivierung der Zwischenräume, die die einzelnen Dots voneinander trennen. Trotz des hohen Hintergrundes ist bei B16-Zellen eine intrazelluläre Reaktion auf das Muster erkennbar. Die Phosphotyrosinfärbung in Abb. 3.25 B zeigt, dass lokal über den präsentierten Fibronectin-Dots eine verstärkte Signaltransduktion stattfindet.

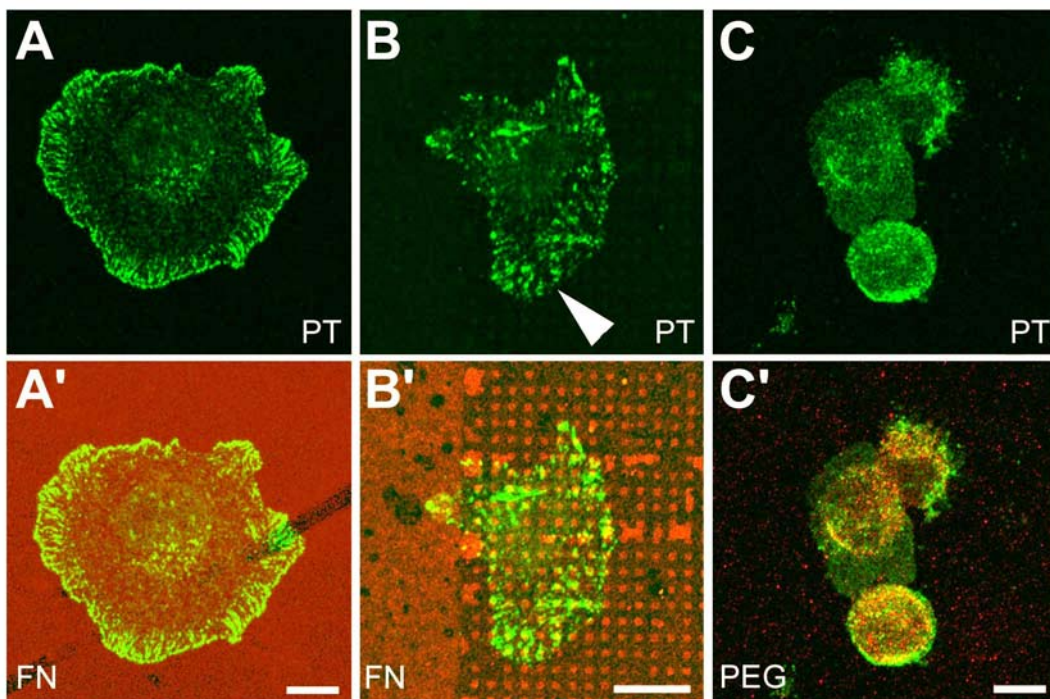


Abb. 3.25: Zellreaktionen auf kovalent an Glas gekoppeltes Fibronectin.

B16-Maus-Melanoma-Zellen wurden für eine Stunde auf kovalent an Glas gekoppeltem Fibronectin in serumfreiem Medium kultiviert. Fibronectin sowie Phosphotyrosin wurden mittels Immunhistochemie fluoreszent markiert. (A, A') Auf homogenen Flächen von kovalent an Glas gekoppeltem Fibronectin (FN, rot) breiten sich Zellen aus und Signaltransduktion findet statt. In der Zellperipherie sind typische Zell-Matrix-Kontakte vorhanden. (B, B') Auf strukturierten Substraten (hier: Grenze von homogenem Substrat und $0,8 \mu\text{m}^2$ -Dots mit $2 \mu\text{m}$ Abstand) reagieren die Zellen mit Signaltransduktion Phosphotyrosin PT, grün) über den Fibronectin-Strukturen (FN, rot), sofern der Kontrast zum Hintergrund genügend groß ist (z.B. Pfeilspitze). (C, C') Mit Polyethylenglykol (PEG, schwarz) inaktivierte Glasoberflächen sind protein- und zellabweisend. Die Fibronectin-Färbung (rot) zeigt einen geringen Hintergrund. Es ist keine kontaktinduzierte Signaltransduktion in den drei abgerundeten Zellen erkennbar. Maßstab: $10 \mu\text{m}$.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Zell-Substrat-Interaktionen auf geometrisch strukturierten Substraten zu untersuchen. Die frühen Vorgänge bei Zelladhäsion und Zellspreading bildeten dabei den thematischen Schwerpunkt. Mit Hilfe von μ CP wurden verschiedene zweidimensionale Zellkultursubstrate der ECM-Proteine Fibronectin, Vitronectin und Laminin hergestellt. Die Größen der einzelnen Strukturen lagen dabei z.T. deutlich im Submikrometerbereich. Es wurde gezeigt, dass Fibroblasten-ähnliche Zellen das unterliegende Muster erkennen und die Gesamtmenge an verfügbarem Protein errechnen können. Innerhalb bestimmter geometrischer Grenzen regulieren die Zellen Morphologie, Adhäsion und Spreading in Abhängigkeit von der Substratgeometrie und ECM-Bedeckung.

4.1 Methodisches

4.1.1 Biologische Relevanz zweidimensionaler Substrate

Die Extrazelluläre Matrix (ECM) innerhalb eines Organismus nimmt vielgestaltige Formen an. Die einzelnen Zellen werden mit so unterschiedlichen Strukturen wie nahezu homogenen Netzwerken oder grob strukturierten Fasergeflechten konfrontiert. Die Dimensionen dieser Strukturen reichen dabei von den äußerst feinen Nanostrukturen der Basallaminae (Abrams et al., 2000) bis hin zu Faserabständen von mehreren μm z.B. in Bindegeweben (Wezeman, 1998). Das heutige Wissen um die Vorgänge bei der Zelladhäsion und Migration beruht vor allem auf Experimenten mit homogenen Substraten (Übersichten in Zamir und Geiger, 2001; Geiger und Bershadsky, 2002; Wehrle-Haller und Imhof, 2002). Diese sind zwar chemisch gut definiert und kontrollierbar, jedoch entsprechen sie kaum den verschiedenen dreidimensionalen Strukturen natürlicher Zellumgebungen. Experimente mit dreidimensionalen ECM-Strukturen zeigen zwar Unterschiede im zellulären Verhalten im Vergleich zu homogenen Substraten auf (Elsdale und Bard, 1972; Friedl und Brocker, 2000; Cukierman et al., 2001), ihre Geometrie ist jedoch schwer kontrollierbar. Zweidimensional strukturierte Substrate bilden daher einen interessanten Kompromiss. Sie übertreffen die Komplexität homogen beschichteter Flächen bei weitem während ihre geometrischen Strukturen sehr gut kontrollierbar sind. Das Ausschöpfen der methodischen Möglichkeiten erlaubt die Herstellung von Substraten, deren Dimensionen im subzellulären Bereich liegen. Dadurch wird es möglich, die von Natur aus nahezu zweidimensionalen Strukturen von Basallaminae ebenso *in vitro* zu simulieren (Abb. 3.13 B, C) wie die größeren Fasergeflechte der ECM (Abb. 3.13 G - I). Letztere werden dabei auf zwei Dimensionen projiziert. Auf diese Weise konnten in der vorliegenden Arbeit geometrische Grenzen der Zell-Matrix-Interaktionen gefunden werden. Das Wissen um diese Grenzen führt zu einem besseren Verständnis des Zellverhaltens *in vivo* während Embryogenese, Wundheilung, Fibroblastenmigration oder auch Metastasenbildung von Tumoren. Es trägt daher zu den Grundlagen für evtl. zukünftige medizinische Anwendungen bei. Beispielsweise können die Oberflächeneigenschaften von Implantaten optimiert und eine verbesserte Interaktion mit dem Gewebe erreicht werden.

4.1.2 Substratherstellung

Die technischen Feinheiten und bisherigen biologischen Anwendungen von μ CP wurden bereits mehrfach diskutiert (Mrksich, 1998; Michel et al., 2001; LeDuc et al., 2002; Mrksich, 2002). Allgemein lässt sich sagen, dass μ CP eine flexible und sehr gut geeignete Methode zur Herstellung geometrisch strukturierter Proteinsubstrate ist. In Kap. 3.4 wurden die Nachteile der Gold-Thiol-Chemie dargelegt sowie zwei alternative Varianten des μ CP vorgestellt. Es wurde gezeigt, dass die in anderen Zusammenhängen erfolgreich eingesetzte Methode des direkten Proteinstempeln (Patel et al., 2000; Bernard et al., 2000; Bernard et al., 2001) für Fragestellungen der Zelladhäsion auf subzellulär strukturierten Substraten nicht geeignet ist. Zellen können auf solchen Substraten nur sehr schlecht adhären und reagieren nicht auf die präsentierten Muster. Mögliche Gründe sollen hier kurz aufgezeigt werden.

Durch die nachträgliche Beschichtung der Substrate mit BSA oder Poly-L-Lysin-Polyethylenglykol (PLL-PEG) kann das zuvor strukturiert aufgebrachte ECM-Protein verdeckt und seine Signalsequenzen für Zellen unzugänglich werden. Dies kann die Unfähigkeit der Zellen, das Substratmuster zu erkennen, erklären. Aber auch auf homogenen Substratflächen beobachtetes Zellspreading und reduzierte Kontaktbildung ist so erklärbar. Homogene ECM-Flächen präsentieren eine ausreichende Anzahl von Adhäsionsstellen, so dass eine komplette Maskierung und damit absolute Verhinderung von Zelladhäsion und Kontaktausbildung nicht möglich ist. PLL-PEG wurde von Michel und Mitarbeitern speziell zum Zwecke der Oberflächeninaktivierung entwickelt, erfolgreich in Zellkulturexperimenten auf strukturierten Substraten eingesetzt (Michel et al., 2002a; Michel et al., 2002b) und auch in Kombination mit direktem Proteinstempeln angewendet (Csucs et al., 2003). Diese Experimente erfolgten jedoch unter Verwendung sehr großer Strukturen und Abstände, d.h. $> 400 \mu\text{m}^2$ große Flächen mit Abständen von $> 30 \mu\text{m}$. Bei $400 \mu\text{m}^2$ -Flächen und Distanzen von $20 \mu\text{m}$, zeigen die verwendeten Zellen keine streng substratabhängige geometrische Morphologie mehr. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Strukturen sind deutlich kleiner, und PLL-PEG erwies sich als ungeeignet für die Herstellung solcher subzellulär strukturierter Substrate. Neben der Problematik der Hintergrundinaktivierung besteht außerdem die Möglichkeit, dass z.B. Fibronectin während des Stempelvorgangs mechanisch zu sehr beansprucht wird, um seine Funktionalität zu behalten. Zwar denaturiert Fibronectin auch während der Adsorption an CH_3 -terminierte Alkanthiole auf Gold (Keselowsky et al., 2003), dennoch wird bei Verwendung der Gold-Thiol-Chemie das Protein schonend aus Lösung auf das Substrat aufgebracht und in der Folge stets unter physiologischen Puffern gehalten. Zum direkten Stempeln muss es dagegen zunächst auf dem Stempel getrocknet werden und beim anschließenden Stempelvorgang treten Ansaugkräfte auf, die das Protein zusätzlich deformieren können. Zumindest Fibronectin ist ein sehr empfindliches Adhäsionsprotein. Dies wird bestätigt durch die Beobachtung, dass getrocknete Fibronectin-Substrate auf Gold-Thiol-Basis eine stark veränderte und weniger gleichmäßige Fibronectinverteilung auf den Dots aufweisen (eigene Beobachtung, siehe auch LeDuc et al., 2002, Kapitel 19). Die Dots können somit eine verminderte Funktionalität besitzen. Auch die mangelhaften Substrate bei Verwendung von BSA zur Inaktivierung des Hintergrundes sind damit erklärbar.

4.2 Grundlegendes Zellverhalten auf geometrisch strukturierten Substraten

4.2.1 Bisherige Studien und neue Fragestellungen

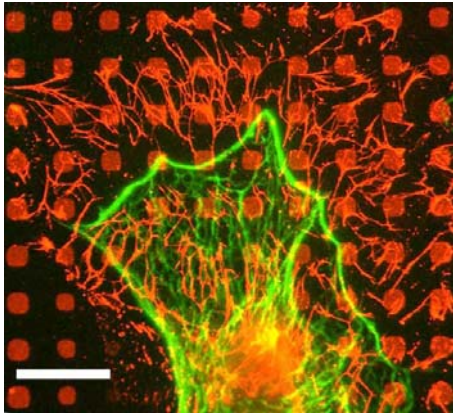
Das Verhalten von Zellen wird stark von der Interaktion mit ihrer Umgebung beeinflusst. In vivo sind diese Interaktionen häufig nur schwer zu untersuchen. Die Verwendung zweidimensionaler Substrate bietet die Möglichkeit, den Einfluss der zellulären Umgebung auf das Zellverhalten experimentell unter definierten Bedingungen zu beobachten. Die Interaktionen von Zellen mit mikrostrukturierten Substraten wurde in den letzten Jahren ausführlich untersucht (Übersichten in Folch und Toner, 2000; LeDuc et al., 2002, Kapitel 19). Die eingesetzten Techniken zur Substratherstellung sowie die verwendeten Geometrien waren dabei von sehr unterschiedlicher Art. Dreidimensionale Quarzoberflächen zur Untersuchung des Topologieeinflusses auf das Zellverhalten (den Braber et al., 1998; Curtis und Wilkinson, 1997; Curtis und Wilkinson, 1998) wurden ebenso verwendet wie mikrostrukturiert aufgebrachte Peptide (Matsuzawa et al., 1996). Der Einsatz von Substraten mit adhäsiven und anti-adhäsiven Regionen erlaubt es, Zellgröße und Zellform zu kontrollieren. Dies lieferte bereits einige interessante Aspekte, was den Zusammenhang von Zellmorphologie und Zellfunktion betrifft. So stellte sich z.B. heraus, dass in Rattenhepatozyten die Synthese von DNA und damit der Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus mit der Zellgröße korreliert. Auf homogenen Laminin-beschichteten Substraten, die das Zellwachstum nicht begrenzen, wurde bei ca. 60% aller Zellen DNA-Synthese beobachtet. Wird die Zellgröße durch das Substrat auf $1600 \mu\text{m}^2$ begrenzt, synthetisieren dagegen nur noch 3% der Zellen DNA (Singhvi et al., 1994). Auch hinsichtlich der Differenzierung von Hepatozyten ergab sich eine Korrelation mit der Zellgröße. Ausdifferenzierte Hepatozyten sezernieren Albumin. Während sie diese Eigenschaft in Kultur auf homogenen Substraten rasch verlieren, steigert sich die Sekretionsrate auf strukturierten Substraten bei abnehmender Größe der Lamininflächen (Singhvi et al., 1994). Die beobachteten Effekte können auf die Größe der Zellen zurückgeführt werden, da die unterschiedlich großen Laminin-Inseln alle eine identische Proteindichte aufweisen. Bei endothelialen Rinderkapillarzellen (BCE) wurde mit Hilfe zweidimensional strukturierter Substrate ebenfalls gezeigt, dass die Differenzierung der Zellen durch ihre Geometrie beeinflusst werden kann. In Abhängigkeit des unterliegenden Substrates differenzieren die Zellen aus und bilden röhrenförmige Strukturen oder sie treten in die Apoptose ein (Dike et al., 1999). Ingber und Mitarbeiter lieferten Hinweise, dass die Begrenzung des Zellwachstums unabhängig von der verfügbaren Matrixfläche zur Apoptose führen kann (Chen et al., 1997). Sie verwendeten unterschiedlich strukturierte ECM-beschichtete Substrate, deren Gesamtbedeckung an Protein nahezu identisch war, die sich jedoch in der geometrischen Anordnung des Proteins unterschieden. Auf den verschiedenen Substratgeometrien wachsen Endothelzellen zu unterschiedlicher Größe heran und sterben in Abhängigkeit davon entweder apoptotisch ab oder überleben. Neben der Adressierung so grundlegender Fragestellungen wie Zelltod und Überleben dienen Substrate mit adhäsiven und anti-adhäsiven Regionen auch dazu, die Vorgänge bei der Mobilität von Zellen zu untersuchen. Durch den Einsatz solcher Substrate konnte gezeigt werden, dass sich Lamellipodien ohne Substratkontakt ausbilden, für ihre Stabilisierung der Kontakt zur Matrix jedoch erforderlich ist (Bailly et al., 1998).

Die meisten publizierten Studien setzten Substratgeometrien ein, deren Strukturgrößen im Bereich von 3 – 100 μm Durchmesser bzw. Kantenlänge liegen. Daher wurde stets das Zellverhalten als Ganzes untersucht und die subzellulären Vorgänge kaum beachtet. Chen und

Mitarbeiter (Chen et al., 1997; Chen et al., 1998) waren die ersten, die mit Fibronectin-Dots von 3 bzw. 5 μm Durchmesser Geometrien verwendeten, die im subzellulären Größenbereich liegen. Sie trennten die Fibronectin-Dots durch anti-adhäsive Bereiche und kontrollierten so die Zellgröße unabhängig von der Substratbedeckung mit Fibronectin. Neuere Studien verwenden nach wie vor Strukturen, deren Größen weit im Mikrometerbereich liegen (Csucs et al., 2003; Chen et al., 2003). Im Gegensatz zu den relativ grob strukturierten Mustern der bisherigen Studien, wurden in der vorliegenden Arbeit auch wesentlich feinere Substratgeometrien eingesetzt. Die Methode des μCP wurde für biologische Fragestellungen weiterentwickelt, so dass erstmals auch zweidimensionale Zellkultursubstrate hergestellt werden konnten, deren kleinste Strukturen an der Grenze des lichtmikroskopischen Auflösungsvermögens liegen. Der Einsatz strukturierter Substrate mit subzellulären Dimensionen ermöglicht es, die frühe Phase von Zell-Substrat-Interaktionen zu beobachten. Adhäsive Inseln von mehreren 100 μm^2 Größe sind für solche Untersuchungen ungeeignet, da sie für sich ausbreitende Zellen nach der initialen Adhäsion zunächst ein homogenes Substrat darstellen. Erst einige Zeit nach Ausplattieren der Zellen wirken sich die begrenzenden Eigenschaften solcher Substrate auf bereits abgeflachte Zellen aus. Subzellulär strukturierte Substrate dagegen präsentieren den Zellen zum frühest möglichen Zeitpunkt ihre Geometrien und zwingen sie, vom ersten Kontakt an auf das Muster zu reagieren. Während sich frühere Arbeiten mit Langzeiteffekten wie z.B. DNA-Synthese oder Apoptose beschäftigen (Singhvi et al., 1994; Chen et al., 1997; Mrksich et al., 1997; Csucs et al., 2003), war es in den Experimenten der vorliegenden Arbeit möglich, sich auf die Vorgänge während der ersten Stunde nach Ausplattierung der Zellen zu konzentrieren.

4.2.2 Substratmodifikation durch die Zellen

Je kleiner die Strukturgrößen der Substrate sind, desto anfälliger sind die Muster gegenüber Fehlern. Dies gilt nicht nur für den technischen Vorgang der Substratherstellung, sondern auch für Substrat-Modifikationen durch die Zellen. Beim Einsatz fein strukturierter Substratgeometrien in der Zellkultur fällt öfters ein Effekt auf, der bei groben Strukturen weniger ersichtlich wird. Es ist bekannt, dass Zellen ihre eigene Matrix sezernieren können. Fibroblasten tun dies z.B. mit Hilfe eines bestimmten Typs von Zell-Matrix-Kontakten, der auf die Sekretion von Fibronectinfibrillen spezialisiert ist (Kap. 1.1.3.3). Experimente mit strukturierten Substraten zeigen, dass die Anordnung der sezernierten Fibrillen stark vom Substrat abhängt. Bei Einsatz von topographisch strukturierten Substraten werden z.B. die Fibrillen parallel zu grabenartigen Vertiefungen angeordnet und sezerniert (den Braber et al., 1998). Auf zweidimensionalen Substraten wird Fibronectin selektiv über adhäsiven, mit ECM-Protein beschichteten Inseln abgelagert (Brock et al., 2003). Kultiviert man Fibroblasten auf subzellulär strukturierten ECM-Substraten, so beginnt die Sezernierung von Fibronectinfibrillen analog zu gröber strukturierten Substraten (Brock et al., 2003) über den Proteindots. Von diesen ausgehend verlängern sich die Fibronectinfasern und es entwickelt sich ein Matrixgeflecht, das auch proteinabweisende Bereiche bedeckt. Nach 12 Stunden ist das Substratmuster durch die Zellaktivität stark verändert (Abb. 4.1) und die Zellen werden zunehmend von der ursprünglichen Substratgeometrie unabhängig.

**Abb. 4.1:****Fibronektinsekretion durch Fibroblasten.**

3T3-Fibroblasten wurden in serumhaltigem Medium für 12 Stunden auf mikrostrukturiertem Fibronektin-Substrat kultiviert. Anschließend wurden Fibronektin (rot) sowie das Aktin-Zytoskelett (grün) immunhistochemisch markiert. Vom geometrischen Substrat ausgehend sind die von der Zelle sezernierten Fibronektinfibrillen zu erkennen. Die Aktinfärbung zeigt den Umriss der Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung. Der Vergleich von Zellumriss und sezerniertem Fibronektin lässt Rückschlüsse auf die Fortbewegung der Zelle während der Kultivierung zu. Maßstab: 10 μm .

Diese typische substratabhängige Anordnung der Fibronektinfibrillen erschwert einerseits die Auswertung von Experimenten, deren Fragestellung sich ausschließlich auf die Zellinteraktion mit der Substratgeometrie bezieht. Sie liefert aber andererseits auch Ansatzpunkte für genauere Untersuchungen des Vorgangs der Proteinsekretion und deren Steuerung. Die Beobachtung z.B., dass Tensin auf strukturierten Fibronektin-Substraten nach einer Stunde über Dots akkumuliert, könnte ein Hinweis auf die intrazellulären Signalübertragungsmechanismen sein. Tensin gilt zwar als Markerprotein für Fokalkontakte, akkumuliert jedoch als einziger der untersuchten klassischen Marker (Vinculin, Paxillin, Talin, Phosphotyrosin) nur über Dots aus Fibronektin. Auf Vitronektin- und Laminin-Substraten konnte keine oder eine nur schwache Akkumulation von Tensin beobachtet werden (Tab. 3.2). Auf homogenen Substraten kommt Tensin im Gegensatz zu den meisten anderen Markerproteinen verstärkt in fibrillären Kontakten vor (Katz et al., 2000) und spielt eine wichtige Rolle bei der Sekretion von Fibronektinfibrillen (Pankov et al., 2000). Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der frühen Vorgänge von Zelladhäsion und -spreading lag, wurden diese Beobachtungen nicht weiter verfolgt. Die Beeinträchtigung der Substratgeometrie durch Proteinsekretion spielte aufgrund der kurzen Experimentdauern ebenfalls eine untergeordnete Rolle. Um die Gefahr der zellulären Substratmodifikation dennoch weiter zu minimieren wurden die Untersuchungen in serumfreiem Medium durchgeführt. Dadurch kann ausgeschlossen werden, dass undefinierte Wachstumsfaktoren die Zellen zu unerwünschter Proteinsekretion stimulieren. Was jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, sind Substratveränderungen aufgrund von Proteininternalisierung durch die Zellen. Dieser Vorgang fiel in zwei unterschiedlichen Zusammenhängen auf. Während der Herstellung der Zeitraffervideoaufnahmen (Kap. 3.3.1) wurden B16-Zellen auf strukturierten Substraten kultiviert, die aufgrund der Transfizierung mit GFP grün fluoreszieren. Zur Markierung des Substrates wurde bei der Beschichtung dem Fibronektin rot fluoreszierendes BSA beigemischt. Mit zunehmender Inkubationsdauer wurde in den Zellen neben der normalen grünen GFP-Fluoreszenz eine ansteigende Rotfluoreszenz beobachtet. Dies ist einzig auf die Internalisierung von fluoreszierendem Protein aus dem Substrat zurückführbar. Auch bei Experimenten mit immunhistochemischer Fibronektinmarkierung fielen Zellen auf, die nach einer Stunde einen erhöhten intrazellulären Fibronektin Gehalt aufwiesen (z.B. Abb. 3.13 B, E). Diese Beobachtungen sind unabhängig von der Substratgeometrie und stehen durchaus im Einklang mit früheren Studien auf homogenen Substraten. So ist seit Anfang der 1980iger Jahre bekannt, dass auf homogenen Substraten unter den Zell-Matrix-Kontakten Fibronektin entfernt wird (Chen und Singer,

1980; Avnur und Geiger, 1981). Neben dieser Substrat-unabhängigen Proteininternalisierung wurden auch Substrat-abhängige Internalisierungsvorgänge beobachtet. Unterschreiten die ECM-Dots eine Größe von ca. $0,25 \mu\text{m}^2$, werden Dots im Umfeld der Zelle aus dem Substrat entfernt (Abb. 3.16, Abb. 3.17). Ob es sich dabei um einen aktiven Internalisierungsprozess analog zum oben beschriebenen handelt, lässt sich nicht sagen. Eine grobe Abschätzung der im System auftretenden Kräfte sowie die Zeitraffervideoaufnahmen lassen vermuten, dass es sich um eine ungewollte Folge der zellulären Spreadingversuche handelt. Dieser Zusammenhang wird in Kap. 4.2.7 ausführlich diskutiert. Ganz ausschließen lässt sich ein aktiver Internalisierungsprozess jedoch nicht, da die Mechanismen der Proteinaufnahme vom Substrat in die Zelle noch unbekannt sind. Nachweisbar in Zell-Matrix-Kontakten vorkommende Proteinasen wie z.B. Calpain (Zamir und Geiger, 2001; Bhatt et al., 2002) könnten dabei eine Rolle spielen.

4.2.3 Kontaktzusammensetzung

Die Morphologie und Zusammensetzung der Zell-Matrix-Kontakte hängt mit ihren Aufgaben zusammen (Kap. 1.1.3.3). So ist z.B. Tensin ein Markerprotein für fibrilläre Kontakte. Im vorangehenden Abschnitt wurde bereits auf die Besonderheiten der Tensinverteilung eingegangen. Ein genauerer Vergleich der Kontaktzusammensetzung auf strukturierten Substraten mit der aktuellen Kontaktklassifizierung (Kap. 1.1.3.3) zeigt weitere Unterschiede zwischen Kontakten auf zweidimensionalen strukturierten und homogenen Substraten auf. Während die meisten der untersuchten Kontaktproteine eine für Fokalkontakte typische Verteilung aufweisen, weichen andere vom momentan gültigen Schema (Katz et al., 2000) ab. So wird Tensin in der Regel in Fokalkontakten und fibrillären Kontakten stark exprimiert. Die beobachtete Akkumulation auf zweidimensional strukturierten Substraten fiel dagegen schwächer aus als bei vergleichbaren Kontaktmarkern wie z.B. Paxillin. Auch das Vorkommen und die Verteilung von α -Actinin entspricht nicht ganz klassischen Fokalkontakten. Wie bei Tensin konnte nur eine schwache Akkumulation über den Dots nachgewiesen werden. Da sowohl die Tensin- als auch die α -Actinin-Färbung zumindest in einigen Fällen Muster aufweisen, die eine Kolo-kalisation mit den unterliegenden Dots zeigen, kann ein Versagen der verwendeten Antikörper weitgehend ausgeschlossen werden. Auf Vitronectin-Substraten wurde mit Hilfe des GFP-Fusionsproteins zumeist ein Clustern von Integrinen über den Dots beobachtet (Abb. 3.6). Die β_3 -Untereinheit kommt nur in Kombination mit der α_v -Untereinheit vor und bildet den Hauptrezeptor für Vitronectin, besitzt aber auch eine Affinität für Fibronectin. Es ist daher nicht unerwartet, dass über Fibronectin-Dots ebenfalls häufig β_3 -Cluster beobachtet werden. Allerdings tritt dieser Effekt in geringerem Ausmaß als bei Vitronectin-Substraten auf, wie die Zeitraffervideoaufnahme in Abb. 3.10 darlegt. Die gezeigte Zelle erhält auf Fibronectin nur wenige Integrin- β_3 -haltige Kontakte stabil und über einen längeren Zeitraum aufrecht. Die Kontaktzusammensetzung entspricht somit nicht den klassischen Fokalkontakten, sie stimmt aber auch nicht mit fibrillären Kontakten überein. Diese weisen zwar ebenfalls einen geringeren Gehalt an Integrin- β_3 und α -Actinin auf, zeigen jedoch eine hohe Tensinintensität. Zudem sind Paxillin, Talin, Vinculin und Phosphotyrosin in fibrillären Kontakten im Gegensatz zu den beobachteten Kontakten auf strukturierten Substraten reduziert (Tab. 4.1).

Komponente	Fokalkontakt (Katz et al., 2000)	Fibrillärer Kontakt (Katz et al., 2000)	2D-Kontakt	3D-Kontakt (Cukierman et al., 2001)
Integrin- α_5	+/-	+	n.d.	+
Integrin- β_1	+/-	+	n.d.	+
Integrin- β_3	+	-	+/-	-
Vinculin	+	+/-	+	+
Paxillin	+	+/-	+	+
α -Actinin	+	+/-	+/-	+
Tensin	+	+	+/-	+
Talin	+	+/-	+	+
F-Aktin	+	+/-	+	+
FAK	+	-	+	+
Phosphotyrosin	+	+/-	+	+

Tab. 4.1: Vergleich der Komponenten in unterschiedlichen Kontakt-Typen.

Die Zusammensetzung der 2D-Kontakte entspricht weder vollkommen den klassischen Kontakten noch den 3D-Kontakten.

+, klare Akkumulation der Komponente; +/-, die Komponente akkumuliert entweder selten (< 10% der überprüften Kontakte) oder mit schwacher Intensität; -, die Komponente kann nicht in den Kontakten nachgewiesen werden; n.d., nicht durchgeführt.

Es ist wahrscheinlich, dass auf strukturierten Substraten ein Kontakttyp – im Folgenden als „2D-Kontakt“ bezeichnet – ausgebildet wird, der auf homogenen ECM-Flächen nicht auftritt und daher nicht in das aktuelle Kontaktschema (Katz et al., 2000) passt. Cukierman und Mitarbeiter zeigten, dass in dreidimensionalen Matrices im Vergleich zu homogenen Substraten ebenfalls andere Kontaktzusammensetzungen auftreten (3D-Kontakt; Tab. 4.1). Sie postulieren, dass die in vitro beobachteten Kontakte Vorläufer der in vivo-Kontakte darstellen (Cukierman et al., 2001).

4.2.4 Regulation der Kontakte

Wenngleich die 2D-Kontakte nicht identisch mit den klassischen Kontakten auf homogenen Substraten zu sein scheinen, weisen sie doch eine Reihe von Gemeinsamkeiten auf. Auch ihre Regulation scheint auf ähnlichen Mechanismen zu basieren. Während des Zellspredding wird zunächst ein Lamellipodium ausgebildet, das ohne Verankerung im Substrat die Umgebung der Zelle abtastet. Dieser Vorgang wird durch die Aktivität der monomeren Rho-GTPase Rac1 induziert. Die im Lamellipodium entstehenden neuen Kontakte, die Fokalkomplexe, werden ebenfalls unter dem Einfluss von Rac1 gebildet und weisen einen hohen Integrin- $\alpha_v\beta_3$ -Gehalt auf. Dies steht im Einklang mit der Videozeitrafferaufnahme in Abb. 3.10. Sie zeigt eine B16- β_3 -Zelle auf strukturiertem Fibronectin-Substrat, die ein Lamellipodium ausbildet. In diesem Lamellipodium treten im Vergleich zur restlichen Zelle gehäuft Integrin-

β_3 -Cluster über Dots auf, was auf die lokal erhöhte Aktivität von Rac1 zurückzuführen ist. Diese Cluster sind vermutlich den Fokalkomplexen gleichzusetzen. Unter Einfluss von intrazellulärer RhoA-induzierter Zugentwicklung über Stressfasern reifen Fokalkomplexe zu Fokalkontakten. Diese weisen typischerweise ebenfalls einen hohen Gehalt an Integrin- $\alpha_v\beta_3$ auf (Kap. 1.1.3.3). Die Zelle in Abb. 3.10 weist jedoch nur noch zwei weitere prominente Integrin- β_3 -Cluster außerhalb des Lamellipodiums auf. Diese befinden sich an den beiden Endpunkten der Längsachse der Zelle. Die exponierte Position der beiden Kontakte an den Zellpolen lässt vermuten, dass an diesen Stellen besonders starke Zugkräfte ansetzen und die Kontakte daher besonders verstärkt sind. Da Integrin- $\alpha_v\beta_3$ der Hauptrezeptor für Vitronektin ist und für Fibronektin eine etwas verminderte Affinität besitzt, ist davon auszugehen, dass diese beiden Kontakte eine besondere Bedeutung für die Zelle besitzen. Vermutlich findet sich in diesen Kontakten Integrin- $\alpha_v\beta_3$ zur Verstärkung, während über den zentralen Dots keine ausreichenden Zugkräfte aufgebaut werden, um dieses „Ersatz-Heterodimer“ zu rekrutieren. Dies steht im Einklang mit der häufig gemachten Beobachtung, dass Kontakte der Zellperipherie stärker ausgeprägt sind als im Zellzentrum (Abb. 3.6, Abb. 3.8). Auf Vitronektin-Substraten kolokalisiert Integrin- β_3 häufiger mit den unterliegenden Dots (Abb. 3.6 E, F).

Wird die intrazelluläre Zugausbildung pharmakologisch unterbunden, entwickeln sich auf homogenen Substraten keine großen Fokalkontakte und bereits existierende lösen sich auf. Anstelle der typischen länglichen Proteincluster findet man einen saumförmigen Rand entlang der Zellperipherie, in dem die Kontaktproteine verteilt sind (Kap 1.1.2.4 und Abb. 3.8). Erstaunlicherweise tritt dieser Effekt nicht auf, wenn Zellen auf strukturierten Substraten kultiviert werden. Statt dessen ähnelt das Färbemuster der Kontaktmarkerproteine stark der unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.8). Die etwas stärkere Intensität der Kontakte bei unbehandelten Kontrollzellen ist darauf zurückzuführen, dass durch Rho-vermittelten intrazellulären Zug die Kontakte modifiziert und verstärkt werden. Bei Kontrollzellen ist zudem ein deutlicher Unterschied zwischen zentralen und peripheren Kontakten zu erkennen. Während im Zellzentrum die Kontakte nur sehr schwach ausgeprägt sind, leuchten sie in den Randbereichen der Zelle hell auf, was durch die Kontraktilität der Zelle bedingt ist. In Staurosporin-behandelten Zellen fällt dagegen auf, dass über die Zelle verteilt die Intensität der Kontakte nahezu konstant ist. Periphere Kontakte erscheinen weniger intensiv gefärbt als in Kontrollzellen, dafür treten zentrale Kontakte wesentlich klarer in Erscheinung. Da durch die Behandlung mit Staurosporin die Kontraktilität der Zellen unterdrückt wird, sind die auftretenden Kontakte vermutlich wie die Fokalkomplexe Rac1-induziert. Warum treten sie aber gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt auf, während auf homogenem Substrat sich ein peripherer Saum bildet?

4.2.5 Kanteneffekt durch Kontrastverstärkung

Eine mögliche Erklärung für den oben ausgeführten Effekt setzt einen zellulären Mechanismus der Kontrastverstärkung voraus. Strukturierte Substrate weisen im Gegensatz zu homogenen einen hohen Anteil an Ecken und Kanten auf. Jede Kante besteht aus einem Kontrast zwischen Adhäsion-vermittelndem Protein und zellabweisender Fläche. Wenn eine Zelle solche Kontraste erkennen und darauf verstärkt mit Kontaktbildung reagieren kann, ergäbe sich exakt das vorliegende Färbemuster mit gleichmäßig verteilten Kontakten. Die in unbehandelten Zellen beobachtete ungleichmäßige Verteilung mit stärker ausgeprägten Kontakten in der Zellperipherie entsteht nach diesem Modell erst durch den zeitlich

nachfolgenden Einfluss von Rho bzw. zellulärer Kontraktilität. Dieser wird durch die Behandlung mit Staurosporin unterdrückt. Ein Mechanismus der Kontrastverstärkung kann ferner erklären, weshalb Zellen bei Dotflächen $> 1 \mu\text{m}^2$ an den Kanten verstärkt Kontakte ausbilden, das Zentrum der Dotfläche dagegen kaum genutzt wird (Kap. 3.3.5). Eine Beobachtung, die auch unter dem Einfluss von Staurosporin gemacht wird (Abb. 3.8 D') und für die keine zelluläre Kontraktilität benötigt wird. Mit der „Hypothese der Kontrastverstärkung“ ist des weiteren vereinbar, dass sezernierte Fibronectinfibrillen vorwiegend an den Kanten von Dots ansetzen und nicht mittig auf der Fläche (Abb. 4.1). Biologisch wäre ein solcher Mechanismus durchaus sinnvoll, wenn man bedenkt, dass Zellen *in vivo* ihre aus ECM-Protein bestehenden Haftpunkte dreidimensional verteilt und eingebettet in andere Substanzen vorfinden. Es ergeben sich dabei teilweise beträchtliche Lücken von mehreren μm zwischen einzelnen Haftpunkten. Die Fähigkeit, Kontraste zu erkennen, würde wesentlich dazu beitragen, schnell neue Kontakte auszubilden. Wie schnell neue Kontakte ausgebildet werden können, zeigen z.B. die Zeitraffervideoaufnahmen der Abb. 3.11 und 3.12, wo dies innerhalb von 2 – 5 min erfolgt. Interessanterweise knicken in Abb. 3.12 B (4'30'') die Filopodien exakt an der Dotkante ab und leuchten dort verstärkt auf. Im Moment ist es noch schwer zu verstehen, wie Zellen Kontraste erkennen und lokal mit verstärkter Signaltransduktion und Kontaktausbildung reagieren können, da Proteine und Lipide in Membranen frei beweglich sind. Das Beispiel der Lipid Rafts zeigt jedoch, dass trotz der Fluidität innerhalb von Membranen hoch spezialisierte Bereiche existieren können. Lipid Rafts sind Membranstrukturen, die auf der extrazellulären Seite aus inselartig angeordneten Proteinen und Rezeptoren bestehen. Intrazellulär bilden sie ein Konglomerat aus zyttoplasmatischen Signalmolekülen (Zajchowski und Robbins, 2002). Zudem spielen membranständige Proteoglykane bei der Zelladhäsion eine Rolle (Saoncella et al., 1999) und mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) sowie Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat sind zwei Lipide bekannt, die aufgrund extrazellulärer Stimuli in die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und die Mechanismen der Zelladhäsion eingreifen (Fukami et al., 1994; Sechi und Wehland, 2000; Greenwood et al., 2000; Übersicht in Takenawa und Itoh, 2001). Es ist vorstellbar, dass durch ein komplexes Zusammenspiel dieser und evtl. weiterer, bisher noch unbekannter Komponenten ein Mechanismus der Kontrastverstärkung existiert. Dieses Modell entbehrt jedoch noch fundierteren experimentellen Grundlagen. Fest steht jedoch, dass einzelne Zellen prinzipiell Konzentrationsunterschiede extrazellulärer Substanzen erkennen und darauf reagieren können. Als Beispiel sei die bakterielle Chemotaxis angeführt. Auch höher entwickelte Zellen wie beispielsweise *Dictyostelium discoideum* besitzen die Fähigkeit, auf extrazelluläre Gradienten unterschiedlicher Substanzen spezifisch zu reagieren (Korohoda et al., 2002). Hierzu sind die Verstärkungsmechanismen der intrazellulären Signaltransduktionswege notwendig, und es ist denkbar, dass ähnliche Mechanismen Zellen das Erkennen und Verstärken von Kontrasten ermöglichen. In einem solchen Zusammenhang ist eine biochemische Kante im Substrat, wie sie z.B. bei Dotmustern vorliegt, durchaus als sehr kurzer und steiler Gradient anzusehen.

4.2.6 Kanteneffekt durch Kontraktilität

Der oben beschriebene Effekt, dass sich bei zunehmender Dotgröße die Zell-Matrix-Kontakte vor allem an der Grenze von Protein und anti-adhäsiver Oberfläche ausbilden, wurde auch in anderen Studien beobachtet. So weisen die Vinculin-Färbungen von Endothelzellen, die auf

ECM-Inseln mit 5 μm Durchmesser kultiviert wurden (Chen et al., 1997, Brock et al., 2003) ebenso ein ähnliches Muster auf wie Muskelzellen, die auf Fibronectin-beschichteten Silikonpfeilern von 2 μm Durchmesser kultiviert wurden (Tan et al., 2003). Da Kontraktilität eine Kontaktverstärkung verursacht, steht dies im Einklang mit der Erkenntnis, dass in Zellen, die auf quadratischen Inseln mit 50 μm Kantenlänge wachsen, Zugkräfte verstärkt in den Ecken auftreten (Wang et al., 2002; Parker et al., 2002). Die Verteilung der Kontaktproteine und der Verlauf der mit ihnen assoziierten Aktinfasern könnten somit aus dem Zusammenspiel von intrazellulärer Kontraktilität und verfügbaren ECM-Kontaktstellen resultieren. Dafür spricht, dass intrazelluläre Zugkräfte stets zur Zellmitte gerichtet sind. Durch den starken Unterschied in der Adhäsivität von ECM-Protein und anti-adhäsiven Bereichen haften sich Kontakte, die unter dem Einfluss von Aktomyosin bewegt werden, an den Dotkanten an. In der Folge entwickeln sich dort die stärksten Zugkräfte in der Zelle, was zur lokalen Verstärkung der Kontakte führt (Lo et al., 2000; Geiger und Bershadsky, 2002; Wehrle-Haller und Imhof, 2002). In vitro-Experimente zeigen, dass eine Steigerung der mechanischen Spannung in existierenden Kontakten die Aktivierung von Bindestellen bewirkt, und somit die Rekrutierung weiterer Proteine in die Kontaktstelle ermöglicht wird (Sawada und Sheetz, 2002).

Die Tatsache, dass der Kanteneffekt auch in Staurosporin-behandelten Zellen beobachtet wird, steht dazu nicht unbedingt im Widerspruch. Staurosporin hemmt unter anderem die Myosin-Leichtkettenkinase (MLCK). Es ist jedoch nicht garantiert, dass jegliche intrazelluläre Zugentwicklung unterbunden wird. Wäre dies der Fall, würden vermutlich gar keine klassischen Zell-Matrix-Kontakte detektierbar sein (Kap. 1.1.2.4, Abb. 1.3), was jedoch auf strukturierten Substraten noch zu überprüfen ist.

Eine dritte, nicht vollkommen auszuschließende Erklärungsmöglichkeit für den beobachteten Kanteneffekt liegt in der Herstellung des strukturierten Substrates begründet. Die Untersuchungen von Fibronectin-beschichteten Dots mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) zeigen, dass an Dotkanten teilweise eine mehrfache Proteinschicht adsorbiert. Die bis zu drei Fibronectinmoleküle dicken Schichten stellen eine erhöhte Menge an Integrin-Bindestellen zur Verfügung und könnten so eine verstärkte Kontaktbildung bewirken. Jedoch ist der Kanteneffekt der Kontakte stärker ausgeprägt, als man aufgrund der beobachteten Fibronectinadsorption erwarten würde. Es ist fraglich, ob die vorkommenden Mehrfachsichten an ECM-Protein ausreichen, um die Kanteneffekte auszulösen. Jedoch könnten sie eine besonders wirksame Barriere bilden, an der Aktin-gekoppelte Integrine bei der Rückbildung eines Lamellipodiums hängen bleiben. Dies würde die biochemische Grenze an den Dotkanten betonen und könnte einen Kontraktilitäts-bedingten Kanteneffekt verstärken.

4.2.7 Kleine Dots und Kontraktilität

Bei einer Dotfläche von $\leq 2 \mu\text{m}^2$ sind Kanteneffekte mit fluoreszenzmikroskopischen Methoden nicht mehr detektierbar. Statt dessen werden die Dotflächen zu ca. 90% von den Zell-Matrix-Kontakten bedeckt (Abb. 3.21). Auf diese Kontakte wirken ebenfalls Zugkräfte, wie sie bei Kontakten auf homogenen Substraten bzw. größeren Dots auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen auf Fibronectin-Dots von nur 0,1 μm^2 Größe mit verstärkter Signaltransduktion, Akkumulierung von Kontaktproteinen sowie Ausübung von Zugkräften reagieren. Dies deutet darauf hin, dass das Aktin-Zytoskelett auch in diesen kleinen Kontakten, deren Größe weitestgehend den unterliegenden 0,1 μm^2 -Dots entspricht, fest

verankert ist. Die kleinsten bisher beschriebenen Kontakte sind mit einer Größe von $0,25 \mu\text{m}^2$ deutlich größer (Bershadsky et al., 1985; Tawil et al., 1993). Mit Hilfe des μCP gelang es erstmals, noch kleinere Kontakte zu untersuchen und nachzuweisen, dass sie volle Funktionalität besitzen und im Aktin-Zytoskelett verankert werden. Voraussetzung hierfür ist das Clustern von Integrin-Rezeptoren (Miyamoto et al., 1995). Coussen und Mitarbeiter benutzten mit Fibronektinfragmenten beschichtete Kügelchen, um den Zusammenhang zwischen Integrin-Aktivierung und mechanischer Kopplung ans Aktin-Zytoskelett genauer zu charakterisieren. Sie konnten zeigen, dass ein Trimer von Integrin-Bindestellen ausreicht, um die Kopplung zu induzieren (Coussen et al., 2002). Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten zweidimensional strukturierten Substraten wurde mit Hilfe des Rasterkraftmikroskops (AFM) eine ca. 50%ige Bedeckung mit einer einfachen Fibronektinschicht festgestellt (persönliche Information von Dr. U. Weiland, Universität Konstanz). Da mit ca. 3 nm die Dicke und mit ca. 130 nm die Länge von Fibronektinmolekülen bekannt sind (Engel et al., 1981), ergibt eine grobe Abschätzung eine Fibronektinbedeckung auf den Dots von ca. 1000 Molekülen / μm^2 . Auf einer Dotfläche von $0,1 \mu\text{m}^2$ befinden sich somit ca. 100 Fibronektin-Moleküle. Die tatsächliche Anzahl der zugänglichen Integrin-Bindestellen kann geringer sein, da der Vorgang der Proteinadsorption aus Lösung ans Substrat nicht kontrollierbar ist. Die Proteine adsorbieren in einer zufälligen Orientierung an das Thiol und ein Teil der Bindestellen kann dadurch verdeckt werden. Dennoch sollte eine ausreichende Menge an Integrin-Liganden vorliegen, um die Integrine an das Aktin-Zytoskelett zu koppeln. Wie oben dargestellt, genügt bereits ein Trimer, um die Kopplung zu induzieren. Dass Zellen auf Substraten mit $0,1 \mu\text{m}^2$ Dotfläche im Abstand von $\geq 5 \mu\text{m}$ nicht mehr spreaden können, ist daher vermutlich auf eine Unzulänglichkeit der Substratherstellung zurückzuführen. Diese besteht darin, dass beim μCP unter Verwendung der Gold-Thiol-Chemie die hydrophobe Wechselwirkung, die zur Adsorption der Proteine an die Alkylreste der Thiole führt, noch nicht sehr gut verstanden und charakterisiert ist. Aus diesem Grund sind die Bindungsstärken, mit denen Proteine am hydrophob terminierten Alkanthiol (ODM) haften, nicht bekannt. Zur Abschätzung der Adhäsionskräfte von einzelnen Fibronektin-Molekülen auf ODM wurden von Dr. U. Weiland, Universität Konstanz, Abrissexperimente mit dem Rasterkraftmikroskop (AFM) durchgeführt. Sie lieferten uneinheitliche Ergebnisse im Bereich von 10 – 100 pN / Molekül. Da Zellen komplette $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots aus dem Substrat herausreißen und internalisieren, erscheint es wahrscheinlich, dass diese Protein-Adsorptionskräfte geringer sind als die von der Zelle auf die kleinen Dots ausgeübten Zugkräfte. Eine grobe Kalkulation der auftretenden Kräfte bestätigt diese Vermutung unter der Voraussetzung, dass der Kontakt als Einheit verstanden wird und nur die Summe der einzelnen Protein-Wechselwirkungen betrachtet wird (Abb. 4.2). Ferner wird ein nicht völlig auszuschließender Einfluss von Proteasen nicht berücksichtigt. Die Schwefel-Gold-Bindung zwischen dem gestempelten Alkanthiol und der Substratoberfläche ist mit 1,4 nN die stabilste im System (Fenter et al., 1994). Sie ist nahezu kovalent und kann durch Zellen nicht zerstört werden. An das hydrophobe Thiol adsorbieren die einzelnen Fibronektin-Moleküle nach eigenen Messungen mit einer Kraft von 10 – 100 pN (s.o.). Feiya und Mitarbeiter untersuchten mit Hilfe von AFM-Messungen die Wechselwirkungen zwischen den Integrin-bindenden Fibronektindomänen FN III₇₋₁₀ und einzelnen Integrin- $\alpha_5\beta_1$ -Heterodimeren von K562-Zellen (Li et al., 2003). Im nicht aktivierten Zustand betragen die gemessenen Kräfte $69 \text{ pN} \pm 1,5$. Wurden die Integrine durch einen monoklonalen Antikörper aktiviert, stieg der Wert auf $93 \text{ pN} \pm 1,5$. Man kann voraussetzen, dass während des Zellspreading die Integrine in aktivierter Form vorliegen. Daher ist die Wechselwirkung

zwischen Integrinen und Fibronectin mit > 90 pN mindestens so stark wie die hydrophobe Wechselwirkung zwischen Fibronectin und Thiol. Im Falle einer an den Integrinen ansetzenden Kraft würden daher die Adsorptionskräfte zwischen Fibronectin und Alkylrest zuerst überwunden und das Protein von Substrat gelöst.

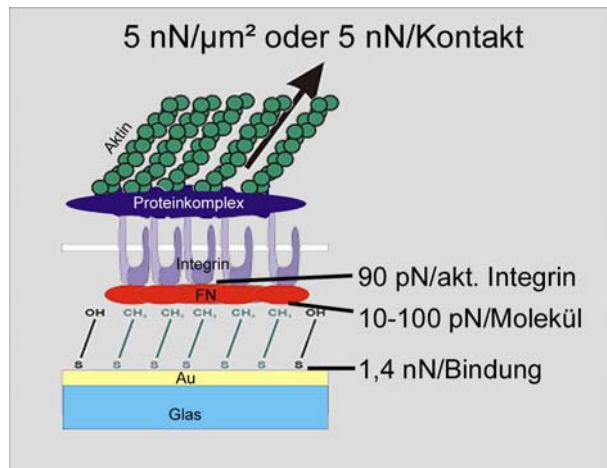


Abb. 4.2:

Abschätzung der an einem Zell-Substrat-Kontakt wirkenden Kräfte.

Schematische Darstellung eines Zell-Substrat-Kontaktes. Die jeweils wirkenden intermolekularen Kräfte sind angegeben.

FN = Fibronectinmolekül, Au = Goldschicht, akt. Integrin = aktiviertes Integrin

In Zell-Matrix-Kontakten werden Kräfte von ca. 5,5 nN entwickelt (Galbraith und Sheetz, 1997; Balaban et al., 2001; Benigno et al., 2001). Während sich bei Kontakten von $> 1 \mu\text{m}^2$ eine positive Korrelation von Kontaktgröße und Kraft zeigt, existiert dieser Zusammenhang für Kontakte $< 1 \mu\text{m}^2$ nicht (Tan et al., 2003). In Lamellipodien wurde bei so kleinen Kontakten sogar eine negative Korrelation beobachtet, d.h. kleinere Kontakte üben größere Kräfte aus (Benigno et al., 2001). Geht man davon aus, dass ein kleiner Kontakt ($< 1 \mu\text{m}^2$) eine Kraft von 5 nN entwickelt, würde auf jedes der 100 Fibronectin-Moleküle eines $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots durchschnittlich eine Kraft von 50 pN ausgeübt. Dieser Wert liegt im Bereich der Bindungsstärken zwischen Fibronectin und Thiol und könnte zur Ablösung des Proteins führen. Weiterhin unter der Annahme, dass eine Zelle eine Kraft von 5 nN gleichmäßig auf die verfügbaren Bindestellen eines Dots verteilt, erfährt jedes der ca. 250 Fibronectin-Moleküle auf einem $0,25 \mu\text{m}^2$ großen Dot nur noch eine Kraft von ca. 20 pN. Dieser Wert liegt im unteren Bereich der gemessenen Fibronectin-Thiol-Wechselwirkungen. Diese Abschätzung entspricht der Beobachtung, dass $0,25 \mu\text{m}^2$ -Dots zwar häufig aus dem eigentlichen Muster verschoben sind, selten jedoch ganz herausgerissen und internalisiert werden. Anders berechnet, müsste eine Zelle auf einen $0,25 \mu\text{m}^2$ -Dot eine Kraft von 12,5 nN ausüben, um diesen vom Substrat zu lösen (Annahmen: 250 Moleküle pro Dot, Abrisskraft von 50 pN pro Molekül). Dies entspricht in etwa der dreifachen bisher experimentell ermittelten Kontaktkraft in Fibroblasten.

Die beobachtete Fähigkeit von Kontakten, $0,1 \mu\text{m}^2$ kleine Dots vom Substrat zu entfernen und zu internalisieren, spiegelt das Verhalten von Fokalkomplexen in migrierenden Fibroblasten wider (Benigno et al., 2001). In beiden Fällen üben die Kontakte trotz begrenzter Größe starke Kräfte auf das Substrat aus. Bei migrierenden Fibroblasten dienen die Kräfte dazu, den Zellkörper dem führenden Lamellipodium nachzuziehen. Die Zellen auf $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots mit $\geq 5 \mu\text{m}$ Abstand versuchen, genügend intrazelluläre Spannung aufzubauen und zu spreaden, um längerfristig nicht in die Anoikis (verankerungsabhängige Apoptose, Kap. 1.1.4) zu geraten. Die Tatsache, dass Zellen auf Substraten mit $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots mit einem Abstand von

$< 5 \mu\text{m}$ ohne Probleme spreaden und wachsen können, wäre damit erklärbar, dass sich hier genügend Ankerpunkte finden. Unter der Annahme, dass für das Überleben der Zelle ein Mindestmaß an intrazellulärer Gesamtkontraktilität notwendig ist, verteilt sich diese auf mehr Kontakte als bei größeren Abständen. Somit wird auf jeden einzelnen Dot durchschnittlich eine geringere Kraft ausgeübt, die nicht ausreicht, um ihn aus dem Substrat zu entfernen. Dieses Modell setzt allerdings einen intrazellulären Mechanismus voraus, der die Gesamtspannung einer Zelle erkennt. Im Prinzip könnte ein solcher Messmechanismus in der spannungsabhängig regulierten Konzentration eines Botenstoffs bestehen. Eventuell käme hierfür Adenosindiphosphat (ADP) in Frage, das als Verbrauchsprodukt bei der Kraftentwicklung anfällt. Eine alternative Erklärung für die erfolglosen Spreadingversuche auf Substraten mit $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots und $\geq 5 \mu\text{m}$ Abstand liefert die Beobachtung, dass Zellen mit zunehmender Größe durchschnittlich stärkere Kräfte auf die einzelnen Kontakte ausüben (Tan et al., 2003). Zur Überbrückung größerer Distanzen müssen Zellen größere Flächen bedecken. Es ist möglich, dass sie dadurch Kräfte entwickeln, die zur Entfernung des Dots aus dem Substrat führen. Zellen der glatten Muskulatur einer Größe von $400 \mu\text{m}^2$ entwickeln durchschnittlich eine Kraft von 10 nN pro Kontakt, was die Adsorptionskräfte eines $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots bei weitem übersteigt, wie oben ausgeführt wurde. Diese Kraft liegt eher im Bereich der $0,25 \mu\text{m}^2$ -Dots, die dadurch evtl. verschoben werden könnten. Bei diesem Vergleich ist zu beachten, dass die gemessenen Kräfte aus Experimenten mit Zellen der glatten Muskulatur stammen und daher nur bedingt auf Fibroblasten und ähnliche Zellen übertragbar sind. Es ist wahrscheinlich, dass die Absolutwerte der Kräfte von Muskelzellen diejenigen von Fibroblasten übersteigen.

4.2.8 Signale statt Kraft

Im vorangegangenen Abschnitt wurde diskutiert, warum Zellen auf $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots mit $\geq 5 \mu\text{m}$ Abstand nicht spreaden können. Die Begründung basiert auf der Annahme, dass die Zellen zu starke Zugkräfte auf kleine Dots ausüben. Die Dots können die notwendige Gegenkraft nicht aufbringen und werden aus dem Muster gerissen. Eine alternative Erklärung bezieht sich auf die Substrat-induzierte intrazelluläre Signaltransduktion. In serumfreiem Medium, wie es in den Experimenten verwendet wurde, sind keine Wachstumsfaktoren oder ähnliche Faktoren enthalten, die in die Regulation der monomeren Rho-GTPasen eingreifen können. Daher beruht der Rac1-abhängige Spreadingprozess einzig auf Signalen, die von Clustern der Integrin-Rezeptoren ausgehen. Das Clustern von Integrinen wiederum wird durch die Geometrie des Substrates bestimmt und induziert lokal die Aktivierung der FAK (Focal Adhesion Kinase; Price, 1997). In der Folge werden ebenfalls lokal eine Reihe von Kontakt-assoziierten Proteinen wie beispielsweise Tensin (Bockholt und Burridge, 1993) und Paxillin (Turner, 2000b) phosphoryliert (Übersicht in Turner, 2000a). Bei stark ausgedünnten Substraten, wie sie z.B. bei den $0,1 \mu\text{m}^2$ -Dots mit $5 \mu\text{m}$ Abstand vorliegen, könnten daher die lokal induzierten Signale nicht ausreichen, um eine stabile Ausbildung von Lamellipodien zu bewirken. Es lässt sich hier ein biochemischer Schwellenwert postulieren, der zur Stabilisierung der Lamellipodien und damit zum Zellspreading führt. Wird dieser Schwellenwert in der Signaltransduktion nicht erreicht, wäre nach diesem Modell der frühzeitige Rückzug der zellulären Fortsätze die Folge. Anstelle der Stabilisierung von Lamellipodien und Ausbildung der typischen Zellmorphologie würden die Lamellipodien kollabieren und die Zellen sich aufgrund der intrazellulären Kontraktilität immer wieder abkugeln.

Es wurde bereits begonnen, das Verhalten der Zellen auf Substraten mit unterschiedlichen Mengen an aktivem Fibronectin zu untersuchen (Kap. 3.3.6). Dabei ist zu beachten, dass sich die prozentualen Angaben zum aktiven Fibronectinanteil auf das Mischungsverhältnis während der Substratbeschichtung beziehen. Das effektiv auf dem Substrat vorliegende Verhältnis kann nicht exakt bestimmt werden. Wie die Quantifizierung mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie jedoch zeigt, funktioniert das Verdünnen aktiven Proteins prinzipiell (Abb. 3.22 A). In diesen Experimenten wird die Menge an präsentiertem Fibronectin nicht nur durch die Oberflächenbedeckung des Substrates variiert, sondern auch durch unterschiedliche Mengen an adsorbiertem, aktivem Fibronectin. Auf diese Weise können zwei identische Substratgeometrien den Zellen unterschiedlich viele Integrin-Liganden zur Verfügung stellen. Bisher liegen zu diesen Experimenten noch keine quantitativen Analysen hinsichtlich des Zellspreading und seiner geometrischen Grenzen vor. Sie werden sicherlich interessante Hinweise liefern, inwiefern das Schwellenwertmodell der Signaltransduktion zutreffend ist. Ein Hinweis wäre z.B., wenn bei identischen Substratgeometrien die Zellgröße mit dem aktivem Fibronectinanteil abnehmen würde. Die Experimente mit reinem aktivem Fibronectin liefern Anzeichen, dass Zellen die Gesamtmenge an zur Verfügung stehenden Integrin-Bindestellen erkennen können (Kap. 3.3.4). Ergänzt wird dies durch erste Ergebnisse der Verdünnungsexperimente. Bei einer Halbierung des aktiven Fibronectins ist noch kein Unterschied zu Substraten erkennen, die mit reinem aktivem Fibronectin beschichtet worden sind. Unabhängig von der Substratgeometrie zeigt die Phosphotyrosinfärbung eine unverändert klare Signaltransduktion über Dots und einen geringen Hintergrund. Bei einem Anteil von 25% erscheinen die Kontakte jedoch im Vergleich zu Substraten mit 100% aktivem Fibronectin morphologisch verändert. Die Beobachtung, dass sich bei dieser Fibronectinverdünnung die Kontaktmorphologie auf einem Substrat mit der Oberflächenbedeckung von 4% stärker ändert (Abb. 3.22 links) als auf einem Substrat mit 9% Oberflächenbedeckung (Abb. 3.22 rechts), könnte darauf zurückzuführen sein, dass Zellen die insgesamt zur Verfügung stehende Fibronectinmenge erkennen können. Zusätzlich wird dieses Modell dadurch gestützt, dass bei einer weiteren Reduzierung des aktiven Fibronectinanteils auf 10% auch beim Muster mit 9% Oberflächenbedeckung eine stärkere Veränderung der Kontaktmorphologie auftritt. Der Vergleich der Fibronectinanteile von 25% bzw. 10% beim Muster mit 4% Oberflächenbedeckung ergibt keinen Unterschied. Hier tritt die Hauptveränderung bereits bei 25% Fibronectinverdünnung auf.

Rätselhaft erscheint die parallel zur Änderung der Kontaktmorphologie auftretende Hintergrundfärbung. Auffallend ist vor allem die positive Korrelation. Aufgrund der Kontaktbildung steht fest, dass die absolut vorhandene Anzahl an Integrin-Bindestellen ausreicht, um intrazelluläre Signalkaskaden auszulösen. Es ist möglich, dass zwar die Signalkaskaden ausgelöst werden, aufgrund der limitierten Anzahl von Integrin-Liganden jedoch nicht genügend Andockstellen für die zu rekrutierenden Kontaktproteine zu Verfügung gestellt werden. In diesem Fall würden die phosphorylierten und aktivierten Kontaktproteine frei durch die Zelle diffundieren. Da aktivierte Kontaktproteine häufig mit anderen Kontaktproteinen interagieren besteht die Möglichkeit, dass sich im Zytosol Proteincluster bilden, die von ihrer Zusammensetzung her Zell-Matrix-Kontakten ähneln. Das Auftreten solcher Cluster kann die punktierte Erscheinung der intrazellulären Hintergrundfärbung erklären. Auch die etwas diffuse, weniger scharf strukturierte Kontaktmorphologie lässt sich mit einer reduzierten Anzahl der Andockstellen erklären. Aufgrund der geringeren Dichte von Integrin-Liganden müssen sich die Kontakte vergrößern, um eine äquivalente Menge an ECM-Signal zu erhalten und sterische Möglichkeiten zum Einbau neuer Proteine in die

Kontakte zu schaffen. Hier scheint wieder ein Schwellenwert zu existieren. Das Erreichen einer Mindestmenge an ECM-Signal sowie von Andockstellen ist lebenswichtig für die Zellen, was zur Verbreiterung der Kontakte führt. Mit den eingesetzten Fibronektinverdünnungen wird dieser Wert stets erreicht und die Zellen können unter Veränderung der Kontaktmorphologie spreaden. Auf reinem inaktiviertem Fibronektin findet man viele kugelig abgerundete Zellen, die aufgrund mangelnder ECM-Signale nicht spreaden können und Anoikis durchlaufen.

Auf Substraten mit hohem Anteil an aktivem Fibronektin muss in diesem Modell ein negativer Rückkopplungsmechanismus angreifen. Durch das Andocken von Kontaktproteinen in den Zell-Matrix-Kontakten sollte die Signalkaskade reduziert werden, so dass nur eine bestimmte, notwendige Anzahl von Proteinen aktiviert und in der Folge rekrutiert wird. Es ist daher auf solchen Substraten keine diffuse oder körnige Hintergrundfärbung detektierbar, da keine „überzähligen“ Proteine durch Phosphorylierung aktiviert werden. Alle phosphorylierten Proteine finden ihren Platz in Kontakten. Lösen sich durch die natürliche Proteinumsatzrate (Kap. 1.1.3.4) Proteine aus den Kontakten, werden Andockstellen frei und die Signalkaskade verstärkt. Dies führt zur Bereitstellung neuer aktivierter Proteine als Ersatz und zum Auffüllen der entstandenen Lücken. Solche Vorgänge, die in einem fließenden Gleichgewicht gehalten werden, dienen der Flexibilität und sind sehr schnell regulier- und anpassbar. Durch einen Eingriff in dieses System über andere Signaltransduktionswege kann das Gleichgewicht in kürzester Zeit verschoben oder zerstört werden. Da Zell-Matrix-Kontakte sehr genau reguliert werden müssen, schafft ein Rückkopplungsmechanismus der beschriebenen Art hierfür optimale Voraussetzungen. Eine wichtige Rolle innerhalb eines solchen Mechanismus könnte Paxillin spielen. Vor kurzem wurde gezeigt, dass in Leukozyten eine verstärkte Assoziation von Paxillin mit der Integrin-Untereinheit α_4 die Zellmigration hemmt und die Stabilität von Lamellipodien reduziert (Goldfinger et al., 2003). Andererseits wird die Bindung von Paxillin durch eine Proteinkinase A-vermittelte Phosphorylierung von Integrin- α_4 blockiert (Goldfinger et al., 2003).

Überraschend ist, dass die Intensität der Phosphotyrosinfärbung über den Dots durch die Fibronektin-Titrierung unverändert bleibt. Man erwartet auf verdünnten Substraten eher eine reduzierte Intensität. Dies kann jedoch methodisch begründet sein. Im Gegensatz zu den anderen vorgestellten Experimenten werden hier Vorgänge untersucht, die zumindest teilweise im Inneren eines Kontaktes ablaufen. Sterische Effekte können verantwortlich dafür sein, dass die Antikörper lediglich die Oberfläche der Kontakte markieren, nicht jedoch in die Kontakte eindringen und dort aktivierte Proteine anzeigen. Es ist daher möglich, dass Kontakte mit effektiv reduziertem Phosphotyrosingehalt eine annähernd gleiche Fluoreszenzintensität erreichen wie voll ausgebildete Kontakte. Die hier entwickelten Modelle beruhen noch auf rudimentären experimentellen Ergebnissen. Es ist klar, dass weitere Experimente und quantitative Auswertungen notwendig sind, um die Existenz der diskutierten Systeme zu bestätigen oder zu widerlegen. Vom momentanen Stand der Experimente erscheinen die ausgeführten Schlussfolgerungen jedoch konsistent.

4.2.9 Zell-Matrix-Interaktionen und Proteinbedarf

Bezieht man in die bisher diskutierten Beobachtungen mit ein, dass die Zellen bereits sehr früh nach dem ersten Kontakt mit der Substratgeometrie interagieren, zeigt sich, dass unterschiedliche Phasen der Zell-Matrix-Interaktionen verschiedene Mengen an ECM-Protein zu benötigen scheinen. Die Zell-Matrix-Interaktionen lassen sich in drei Phasen gliedern.

Nach Resuspension der Zellen stellt der initiale Kontakt mit dem Substrat die erste Phase dar. Hier kann eine Adhäsion unabhängig von ECM-Protein erfolgen. Wie die Experimente mit strukturierten Poly-L-Lysin-Substraten zeigen, haften die Zellen auch ohne Integrin-Signale am Substrat. Solche Integrin-unabhängigen Kontakte können z.B. durch Zelloberflächenmoleküle wie Hyaluronan vermittelt werden (Zimmerman et al., 2002).

Die zweite Phase ist das eigentliche Zellspreading, also das Abflachen und Ausbreiten der Zellen. Sie beginnt mit dem Clustern von Integrinen und in deren Folge mit der Ausbildung von Fokalkomplexen sowie der Unterdrückung möglicher Rho-Aktivität durch FAK (Ren et al., 2000). Diese Phase setzt sich mit der Entwicklung von Rac1-abhängigen Lamellipodien sowie Cdc42-abhängigen Filopodien fort. Da die Prozesse auf Integrin-Signalen beruhen, ist hierfür die Verfügbarkeit von ECM-Protein notwendig. Es zeigt sich bereits nach 10 min, dass die Zellen intrazellulär mit der Akkumulation von Kontaktproteinen auf die vorgegebene Substratgeometrie reagieren. Die Reaktion erfolgt dabei unabhängig vom eigentlichen Muster, wohingegen die Gesamtbedeckung der Substratoberfläche mit ECM-Protein von Bedeutung ist. Die Zellen benötigen eine Bedeckung von knapp 20%, um optimal adhärieren zu können. Der Begriff „Adhäsion“ umschließt dabei die Entwicklung von zu diesem frühen Zeitpunkt noch kleinen Lamellipodien und Filopodien, da die Zellen aufgrund dieser Strukturen besser am Substrat haften können. Interessanterweise ist der Wert von knapp 20% Substratbedeckung für die optimale Zelladhäsion (Abb. 3.4) nahezu identisch mit dem Bedarf von ca. 20% Oberflächenbedeckung für das Erreichen maximaler Zellgröße (Abb. 3.20). Die Zellen scheinen vom ersten Substratkontakt an die Gesamtmenge an verfügbarem ECM-Protein erkennen zu können, was sich in analoger Weise sowohl auf die frühe Zelladhäsion als auch auf das eigentliche Spreading auswirkt. Auf Substraten mit geringerer Oberflächenbedeckung haften weniger Zellen, die zudem eine geringere Größe erreichen.

Nach dem Rac1- und Cdc42-abhängigen Schritt des Spreading wird die dritte Phase der Zell-Matrix-Interaktionen durch die Aktivierung von RhoA und die Ausbildung von Stressfasern sowie intrazellulären Zuges eingeleitet (Nobes und Hall, 1995). Sie dient der Beibehaltung der Zellform bzw. der Fortbewegung. Stationäre Zellen weisen zwar in Abhängigkeit der Substratbedeckung unterschiedliche Zellgrößen auf, sie nutzen jedoch von 12 μm^2 -Dots lediglich einen Teil der zur Verfügung stehenden Integrin-Liganden, wie die Untersuchungen zur Dotnutzung zeigen (Abb. 3.21). Chen und Mitarbeiter machten ähnliche Beobachtungen (Chen et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kontakte scheinen eine maximale Größe von ca. 4 μm^2 (Phosphotyrosin) bzw. 2,5 μm^2 (Paxillin) nicht zu überschreiten, wobei die Gesamtbedeckung der Substratoberfläche keine Rolle spielt. Dies legt den Schluss nahe, dass im Vergleich zum Zellspreading für die Beibehaltung der Zellmorphologie eine geringere Menge an ECM-Protein benötigt wird. Die Gesamtmenge an verfügbarem ECM-Protein ist entscheidend für das Erreichen einer gewissen Zellgröße. Diese wiederum ist entscheidend für den Bedarf an Integrin-Liganden zur Beibehaltung der Morphologie, so dass der Schritt vom Spreading (Phase 2) zur Formerhaltung (Phase 3) mit einer Reduktion der genutzten Menge an ECM-Protein einhergeht. Allerdings scheint dies nur innerhalb bestimmter geometrischer Grenzen zu gelten, da bei einer Dotgröße von $< 4 \mu\text{m}^2$ die zur Verfügung stehenden Dotflächen fast vollständig genutzt werden. Leider erlauben die bisher verfügbaren Substratgeometrien keine genauere Bestimmung dieser Grenzen.

4.2.10 Drei geometrische Grenzwerte für das Zellspreeding

Es wurde bereits mehrfach die Existenz von Schwellenwerten diskutiert, die für das Zellspreeding von entscheidender Bedeutung sein könnten. Jedoch handelte es sich dabei stets um intrazelluläre Schwellenwerte im Rahmen der Signaltransduktion. Im folgenden sollen äußere Grenzwerte diskutiert werden, die sich auf die Geometrie und die physikalischen Eigenschaften der Zellkultursubstrate beziehen. Die durchgeführten Untersuchungen zur Zelladhäsion auf mikrostrukturierten Substraten zeigen drei solcher geometrischer Grenzwerte auf. Dabei handelt es sich um eine Dottdichte mit einem Dotabstand von $2\ \mu\text{m}$, eine ECM-Oberflächenbedeckung von knapp 20% sowie die maximale überbrückbare anti-adhäsive Distanz von $25\ \mu\text{m}$.

Der erste Grenzwert bezieht sich auf die Dottdichte der Substrate und liegt bei einem Dotabstand von $\leq 2\ \mu\text{m}$. Auf homogenen Substraten bilden Zellen während des Zellspreeding ihre Fokalkontakte und Stressfasern in einem scheinbar willkürlichen Muster aus. Ihre Morphologie erscheint dadurch ebenfalls willkürlich. Auf strukturierten Substraten wird den Zellen jedoch die lokale Ausbildung der Zell-Matrix-Kontakte vorgegeben, und sie werden in eine geometrische Form gezwungen. Während Zellen auf Substraten, deren Dots einen Abstand von $\leq 2\ \mu\text{m}$ aufweisen, rein morphologisch kaum von Zellen auf homogenen Substraten zu unterscheiden sind, wirkt sich die Substratgeometrie bei Abständen von $\geq 4\ \mu\text{m}$ klar auf die Zellform aus. Dieser Effekt wird mit zunehmendem Abstand immer deutlicher. Bei genauer Betrachtung zeigt sich, dass die Zellen intrazellulär jedoch auch auf die fein strukturierten Substrate mit geringen Abständen reagieren. Sie akkumulieren Kontaktproteine über den Dots und ihre Aktinfasern setzen gezielt an diesen Strukturen an. Die intrazelluläre Spannung, die von den Stressfasern zwischen zwei Zell-Matrix-Kontakten entwickelt wird, ist für die Ausbildung und Beibehaltung der Zellform verantwortlich. Eine zum Zellzentrum gerichtete Kraft bewirkt bei größeren Abständen zwischen zwei Kontaktstellen die Ausbildung von typischen bogenförmigen Zellrändern (z.B. Abb. 3.7 A, Abb. 3.13). Es ist möglich, dass auf die kurze Distanz von $\leq 2\ \mu\text{m}$ die Stabilität der Aktinfasern größer ist als die zum Zellzentrum wirkende Kraft, so dass deren Einfluss auf die Zellmorphologie minimiert wird. Alternativ können dicht gepackte Zell-Matrix-Kontakte funktionell verknüpft sein, um die auftretenden Zellkräfte zu integrieren sowie die starken Kräften, die für die Zellmigration notwendig sind, zu entwickeln. Im hinteren Bereich einer migrierenden Zelle kann sich eine Kraft nur auf eine geringere Anzahl von Fokalkontakten verteilen, verglichen mit den zahlreichen Fokalkomplexen im führenden Lamellipodium. Einzelne Fokalkontakte sind daher höheren Kräften ausgesetzt als einzelne kleine, dicht gepackte Kontakte. Im Falle der Kraftintegration würde auf strukturierten Substraten bei Dot-Abständen von $\leq 2\ \mu\text{m}$ die hohe Kontaktdichte in der führenden Zellfront stärkere Kräfte entwickeln als diejenigen, die auf einzelne Fokalkontakte der hinteren Zellregionen wirken (Beningo et al., 2001). Dadurch wäre die Vorwärtsbewegung der Zelle gewährleistet. Eine solche Verknüpfung der Kontakte erschwert es enorm, mit den bekannten Methoden die Zugkräfte der einzelnen Kontakte zu bestimmen. Das Auflösungsvermögen der bisher eingesetzten flexiblen Substrate (Harris et al., 1980; Balaban et al., 2001; Beningo et al., 2002; Übersicht in Beningo und Wang, 2002) ist hierfür nicht ausreichend. Auch neuere Experimente, die lokale Kräfte auf begrenzte Flächen von $7\ \mu\text{m}^2$ messen, erreichen hierfür noch nicht das nötige Auflösungsvermögen (Tan et al., 2003). Diese Experimente haben zudem den Nachteil, dass sie auf dreidimensionalen Substraten beruhen, die nicht der natürlichen ECM entsprechen. Die Zellen werden auf Stelzen kultiviert. Es ist wünschenswert, die mit Hilfe der Gold-Thiol-Chemie erreichten

Strukturen auf flexible Trägermaterialien übertragen zu können. Mit Hilfe solcher Substrate könnte gezielt die von einzelnen Kontakten ausgeübten Kräfte und deren Zusammenspiel genauer untersucht werden. Mit der kovalenten Kopplung von Fibronectin auf Glas wurde ein erster Schritt in diese Richtung getan. Aufgrund der ähnlichen Oberflächenchemie von Glas und Silikon müsste die entwickelte Methode gut auf flexible Silikonsubstrate übertragbar sein. Die Silylierung von Silikonoberflächen wird in einigen Labors bereits standardmäßig eingesetzt (persönliche Mitteilung von A. Bernard, Indigon GmbH, Tübingen). Somit kann die Herstellung subzellulär strukturierter Substrate auf Silikon analog zur Substratherstellung auf Glas durchgeführt werden.

Die soeben diskutierte Dottdichte geht zwar mit der Oberflächenbedeckung eines Substrates einher, ist von dieser jedoch getrennt zu betrachten. Im Gegensatz zur Dottdichte ist die Substratbedeckung unabhängig von der exakten Substratgeometrie, da mehrere unterschiedliche Muster eine identische relative Fläche bedecken können. Der zweite vorgestellte geometrische Grenzwert ist daher die knapp 20%ige Oberflächenbedeckung des Substrates mit ECM-Protein. Die präsentierten Experimente zeigen unabhängig von der exakten Substratgeometrie eine direkte positive Korrelation von Zellgröße und Substratbedeckung mit Fibronectin. Dies deutet darauf hin, dass Fibroblasten-ähnliche Zellen die Gesamtmenge des zur Verfügung stehenden ECM-Proteins erkennen können und darauf mit unterschiedlichem Größenwachstum reagieren. Diese Beobachtung steht in direktem Widerspruch zu Studien von Chen und Mitarbeitern, die zeigten, dass das Größenwachstum von Zellen durch die Zellform und nicht durch die Menge an präsentierter ECM bestimmt wird (Chen et al., 1997; Chen et al., 2003). Mit Hilfe von zwei unterschiedlich subzellulär strukturierten Substratgeometrien wiesen sie nach, dass bei gleicher prozentualer Substratbedeckung Epithelzellen auf dem Substrat mit größeren Dottabständen ein stärkeres Größenwachstum entwickeln. Es gibt jedoch einige Unterschiede in den experimentellen Ansätzen, die die abweichenden Ergebnisse erklären könnten. Zunächst verwendeten Chen und Mitarbeiter in ihren Studien mit humanen und Rinder-Epithelzellen einen anderen Zelltyp. Es ist möglich, dass Epithelzellen über einen anderen Regulationsmechanismus verfügen als Fibroblasten-ähnliche Zellen, wie sie in der vorgelegten Arbeit eingesetzt wurden. Zweitens wurden in den erwähnten Studien Langzeiteffekte untersucht, in denen die Zellen 24 Stunden auf den Substraten kultiviert wurden. Allerdings zeigten die wenigen Langzeitexperimente mit Fibroblasten-ähnlichen Zellen keine augenfälligen Unterschiede zu den Kurzzeitexperimenten. Eine quantitative Auswertung erfolgte noch nicht. Schlussendlich beruhen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse auf mehreren und auch anders strukturierten Substraten. Chen und Mitarbeiter setzten zwei Substratgeometrien ein, deren Verhältnis Dottdurchmesser / Abstand $5 / 10 \mu\text{m}$ bzw. $3 / 6 \mu\text{m}$ beträgt. In der vorliegenden Arbeit wurden 10 bis 13 unterschiedliche Substratmuster ausgewertet, deren Muster mit Dotflächen von bis zu $0,1 \mu\text{m}^2$ und Abständen von bis zu $2 \mu\text{m}$ meist wesentlich feiner strukturiert sind. Unter Umständen wird das Zellspreading in Abhängigkeit von Substratdimensionen, Zeiträumen und/oder Zelltyp über jeweils andere Mechanismen reguliert. Der auf den ersten Blick rätselhaft erscheinende Widerspruch könnte somit durchaus erklärbar sein.

Alternativ zu geometrisch strukturierten Substraten kann der Grenzwert der verfügbaren ECM-Proteinmenge durch den Einsatz verdünnter Integrin-Liganden untersucht werden. Auf homogenen Substraten wurden bereits Experimente durchgeführt, in denen durch Titration die Menge an ECM-Protein bestimmt wurde, die gerade noch Zelladhäsion erlaubt (Massia und Hubbell, 1991; Koo et al., 2002; Übersicht in Wehrle-Haller und Imhof, 2002). Diese

Untersuchungen liefern jedoch eher Hinweise darauf, welche Proteindichten zur Ausbildung von funktionellen Zell-Matrix-Kontakten ausreichen, als dass Aussagen über zelluläre Mechanismen und Integrationen getroffen werden können. Microcontact Printing dagegen erlaubt es, den Einfluss von vollkommen funktionellen Kontakten auf das Zellverhalten zu untersuchen. Bei dieser Methode stehen im Gegensatz zu homogenen Verdünnungen lokal genügend Integrin-Liganden zur Verfügung, die ausreichend Signale liefern, um funktionelle Kontakte auszubilden. In vivo sind ECM-Strukturen wahrscheinlich ebenfalls in einem komplexen, nicht-homogenem Muster verteilt, bei dem kleine Aggregate mit hoher Integrinbindedichte lokal begrenzt in große anti-adhäsive Regionen eingebettet sind.

Der dritte geometrische Grenzwert der Zelladhäsion liegt in der überbrückbaren Distanz von 25 μm . Bei größeren Distanzen schafft es keiner der drei untersuchten Zelltypen, anti-adhäsive Regionen mit Hilfe von Lamellipodien oder Filopodien zuverlässig zu überwinden. Das sich selbst organisierende Aktin-Zytoskelett kann diese sensorischen Fortsätze spreadender oder migrierender Zellen nicht mehr genügend stabilisieren, so dass sie kollabieren und zurückgezogen werden. Dadurch wird das Zellspreading begrenzt und die Zellen haften nur noch auf einem Dot. Während für Fibroblasten-ähnliche Zellen eine Distanz von 30 μm unüberbrückbar erscheint, sind neuronale Zellen mit ihren spezialisierten Wachstumskegeln fähig, noch größere Entfernungen zu überwinden (Hammarback und Letourneau, 1986). Dieser Grenzwert ist vermutlich Zelltyp-abhängig, gilt jedoch für Fibroblasten-ähnliche Zellen.

4.3 Ausblick

Die vorgestellten Experimente liefern neue Einblicke in die Mechanismen der Zelladhäsion. Es wurden einige geometrische Grenzen für zelluläres Verhalten aufgezeigt und neue Modelle aufgestellt, wie Zellen ihre Umgebung erkennen und die erhaltenen Informationen verrechnen. Dabei ergaben sich die Grundlagen für mehrere Arbeitshypothesen und einige interessante Beobachtungen stellen gute Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen und Projekte dar. So bedarf es zusätzlicher Experimente zur Unterstützung oder Widerlegung der aufgestellten Hypothesen. Eines der aufgestellten Modelle besagt, dass die Regulation von Fokalkontakten einen negativen Rückkopplungsmechanismus mit einschließt. Ob dieser Ansatz weiterhin verfolgenswert erscheint, werden demnächst Untersuchungen zum Verteilungsmuster von Kontaktmarkerproteinen wie Paxillin, Vinculin etc. zeigen. Die Phosphotyrosinfärbung alleine liefert noch keine gesicherte Grundlage für den Ausbau dieser Hypothese, wenngleich sie sehr gut zu der Beobachtung passt, dass Zellen die Gesamtmenge an verfügbarem ECM-Protein integrieren können. Die Kombination von Proteintitrierung und μCP liefert auch unabhängig von der aufgestellten Rückkopplungs-Hypothese interessante Ergebnisse und wird weiterhin verfolgt werden. In diesem experimentellen System werden die Vorteile zweier methodischer Ansätze vereinigt. Durch das Verdünnen von ECM-Proteinen können extrem niedrige Grenzwerte ausgelotet werden. Die geometrische Strukturierung mittels μCP erhöht noch zusätzlich die Genauigkeit und ermöglicht neben der Untersuchung des Zellverhaltens als Ganzes (Zelladhäsion und -spreading) auch die Analyse von Grenzwerten für die Ausbildung einzelner Kontakte. Hier wurden bereits erste Ergebnisse erzielt. Die quantitative Auswertung sowie weitere Experimente zur Kontaktmarkerverteilung werden in Zusammenhang mit bereits vorliegenden Ergebnissen gestellt. Noch kaum verstandene Beobachtungen wie z.B. die unterschiedlichen Dotnutzungen könnten dadurch

zumindest teilweise geklärt werden. Evtl. entwickelt sich ein einheitliches Gesamtbild, das die aufgestellten Modelle zur Zell-Substrat-Interaktion weiter festigt.

Hinsichtlich Kanteneffekt und Kontrastverstärkung (Kap. 4.2.5), wäre es interessant zu wissen, wie sich Zellen in Gradienten verhalten, die aus parallelen Streifen mit zunehmender Breite bestehen. Diese Substratgeometrien sind bereits verfügbar (vergl. Kap. 5). Mit ihnen können unterschiedliche Mengen an ECM-Protein unter Beibehaltung der absoluten Kantenlänge präsentiert werden. Möglich wird dies durch die Breitenzunahme der Proteinstreifen, die in nur einer Richtung erfolgt. Die grundlegende Substratgeometrie paralleler Streifen bleibt unverändert. Bei den bisher eingesetzten Substraten, deren Muster aus geometrisch angeordneten Dots bestehen, ändert sich mit der Substratbedeckung auch stets die Gesamtkantenlänge, mit der eine Zelle in Kontakt kommt. Bei Einsatz dieser Gradienten wird eine quantitative Analyse der Morphologie, Verteilung und Anordnung von Zell-Matrix-Kontakten in Zusammenhang mit der Zellgröße Hinweise auf mögliche Mechanismen liefern.

Ein anderer Ansatz, der auf den Experimenten mit Staurosporin und der unerwarteten Kontaktverteilung basiert, bildet die Grundlage für eine jüngst begonnene Diplomarbeit. Durch gezielten Einsatz verschiedener Pharmaka soll die Regulation der Kontakte genauer beleuchtet werden. Bei diesen Substanzen handelt es sich wie bei Staurosporin um Inhibitoren, die unterhalb von Rho an definierten Stellen in die Signalkaskade eingreifen und die Ausbildung intrazellulären Zuges unterbinden. Auf die quantitative Analyse der geometrischen Grenzen unter Inhibitoreinfluss wird der Einsatz von dominant positiven sowie dominant negativen Mutanten monomerer GTPasen der Rho-Familie folgen. Durch Transfektion der Zellen mit den GTPasen alleine und in Kombination mit Inhibitoren wird ein besseres Verständnis des Zusammenhangs von extrazellulären Bedingungen, intrazellulären Signalkaskaden und zellulärem Verhalten erreicht.

Die Weiterentwicklung der Substrate mit kovalent gebundenem Fibronectin auf Glas wird ebenfalls einen Schwerpunkt bilden. Dies hat zwei Gründe. Zum einen wird ein experimentelles System zur Kraftmessung einzelner Zell-Matrix-Kontakte angestrebt. Die Oberflächenchemie von Glas und flexiblem Silikon ist sehr ähnlich. Eine Übertragung der Methode von Glas auf Silikon wäre vermutlich nur ein kleiner Schritt, der dann zur Kraftmessung notwendig wird. Bis die Methode jedoch optimiert ist, wird Glas als die kostengünstigere und einfacher handhabbare Variante des Trägermaterials bevorzugt. Des Weiteren werden funktionelle strukturierte Substrate auf Glas für dynamische Studien an lebenden Zellen benötigt. Wie bereits erwähnt erschwert der Einsatz einer Goldoberfläche die mikroskopische Detektion von Fluoreszenz-Signalen. Die Aufnahme von Videozeitrafferaufnahmen mit Hilfe konfokaler Laser Scanning Mikroskopie ist unmöglich. Die Kombination von hoher Laserenergie und Reflexion durch die Goldschicht verhindert ein zufriedenstellendes Signal-Rausch-Verhältnis. Außerdem entsteht durch die Absorption von Laserlicht in der Goldschicht eine Art Interferometer, was zu ständigen, periodisch auftretenden Intensitätsschwankungen in der Detektion führt. Für quantitative Analysen ist dieses System damit wertlos. Ein geeignetes experimentelles Setup zur Aufnahme von Videozeitrafferaufnahmen ist jedoch wünschenswert, weil damit ein bisher nur unzureichend ausgeschöpfter Vorteil des μ CP zum Tragen kommt. Durch die Präsentation strukturierter Substrate kann nämlich exakt vorherbestimmt werden, wo ein neuer Zell-Matrix-Kontakt entsteht. Dies gestattet die Beobachtung sehr früher Phasen der Kontaktbildung, was bisher noch nicht möglich war. Die vorgestellten Videozeitrafferaufnahmen wurden alle an einem nicht-konfokalen Setup am CMU in Genf durchgeführt. Sie deuten die Möglichkeiten an, die

sich durch die Beobachtung lebender Zellen ergeben. Wird diese Form des Experiments in Kombination mit Konfokalmikroskopie und unter Verwendung weiterer fluoreszenzmarkierter Proteine neben Integrin- β_3 und Aktin eingesetzt, lässt dies eine beträchtliche Erweiterung der Kenntnisse über die Zelladhäsion zu.

5 Anhang: Axonale Lenkung in Ephrin-A5-Gradienten

Neurone bilden mit anderen Zellen Verbindungen aus, die Synapsen. Oft liegen dabei die Zellkörper weit auseinander. Die Distanz wird von den Neuronen mit Hilfe langer Fortsätze, den Neuriten, überbrückt. Wie kann eine Zelle über Entfernungen von z.T. über einem Meter gezielt eine andere Zelle kontaktieren? Während des Axonwachstums geht dem Axonschaft eine flächige Struktur voran, der Wachstumskegel. Er bildet Lamellipodien und Filopodien aus, ist empfänglich für Lenkungssignale aus der Umgebung und findet so den Weg durch die ECM zu seinem Zielgebiet. Gut untersuchte Modellsysteme für die axonale Wegfindung sind die retino-tektalen Projektionen bei Goldfischen und Hühnchen (Abb. 5.1). Die retinalen Ganglienzellen (RGZ) des Auges senden Axone aus, die ihr Zielgebiet in einer bestimmten Hirnregion, dem Tektum, haben. Die Anordnung der dort ausgebildeten Verbindungen entspricht dabei der räumlichen Verteilung der RGZ in der Retina, da sämtliche Axone nasaler RGZ ins posteriore Tektum projizieren und alle temporalen RGZ im anterioren Tektum terminieren. Man spricht hier von einem topographischen Abbild (Hamdi und Whitteridge, 1954; McGill et al., 1966). Schon früh wurde vermutet, dass die Wachstumskegel ihr Zielgebiet mit Hilfe molekularer Gradienten finden, die sich über die Oberflächen von Retina und Tektum erstrecken (Sperry, 1963). Zwischenzeitlich sind eine Reihe von Molekülen bekannt, die gradiert über das Tektum verteilt sind (Udin und Fawcett, 1988; Stirling, 1991; Sanes, 1993; Harris und Holt, 1995). Im Fokus der Forschungen stehen dabei vor allem die beiden Zelloberflächen-Moleküle Ephrin-A5 und Ephrin-A2 (Drescher et al., 1995; Cheng et al., 1995) sowie deren Rezeptoren. Sie werden im Tektum in einem von anterior nach posterior zunehmenden Gradienten exprimiert und zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* axonabstoßende Eigenschaften für temporale Axone (Nakamoto et al., 1996; Monschau et al., 1997; Frisen et al., 1998). Außerdem zeigen einige *in vitro*-Experimente, dass Axone fähig sind, Gradienten zu erkennen und auf sie zu reagieren (Gundersen und Barrett, 1980; Song et al., 1997; Weinl et al., 2003). Dieses System scheint daher eine bedeutsame Rolle bei der Ausbildung der anterior-posterioren Achse der retino-tektalen Projektion zu spielen (Übersicht in Knoll und Drescher, 2002; Wilkinson, 2000).

Die meisten der diesem Modell zugrunde liegenden Experimente erlauben keine exakte Quantifizierung. Um die zu erreichen, wird im Rahmen einer Kooperation mit der Gruppe von Prof. Dr. F. Bonhoeffer am Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie in Tübingen μ CP zur Herstellung definierter Gradienten eingesetzt. Ziel ist es, mit Hilfe zweidimensionaler Ephrin-A5-Muster *in vitro* die gradierte Verteilung des Moleküls im Tektum nachzuahmen (Abb. 5.1 B). Die Ephrin-freien Bereiche werden dabei mit Laminin beschichtet, so dass sich in den Gradienten einwachsende Axone zunächst in einem wachstumsförderlichen Umfeld befinden. In dieses eingebettet ist eine in Richtung des Gradienten zunehmende Menge des repulsiv wirkenden Ephrin-A5. Je weiter die Axone in den Gradienten einwachsen, mit desto mehr Ephrin kommen sie in Kontakt. Zunächst wurde versucht, aus Dots bestehende Gradienten zu verwenden (Dot-Gradient). Bei diesem Gradiententyp verringert sich der Abstand zweier Dotreihen stetig in einer Richtung, während der Abstand der Dots innerhalb einer Reihe konstant bleibt (Abb. 5.1 B; vergl. Abb. 3.18). Ein einwachsender Wachstumskegel hat so zu immer mehr Dotreihen gleichzeitig Kontakt je weiter er in den Gradienten eindringt. Diese Art von Gradient erwies sich jedoch für die Untersuchung axonaler Lenkung als ungeeignet. Axone von Hühnchen-RGZ wachsen während eines Tages durch solche Gradienten ungehindert hindurch bis sie die Grenze zur homogenen Ephrin-A5-Fläche erreichen. Dort bleiben sie abrupt stehen oder biegen ab, wachsen jedoch nicht in die

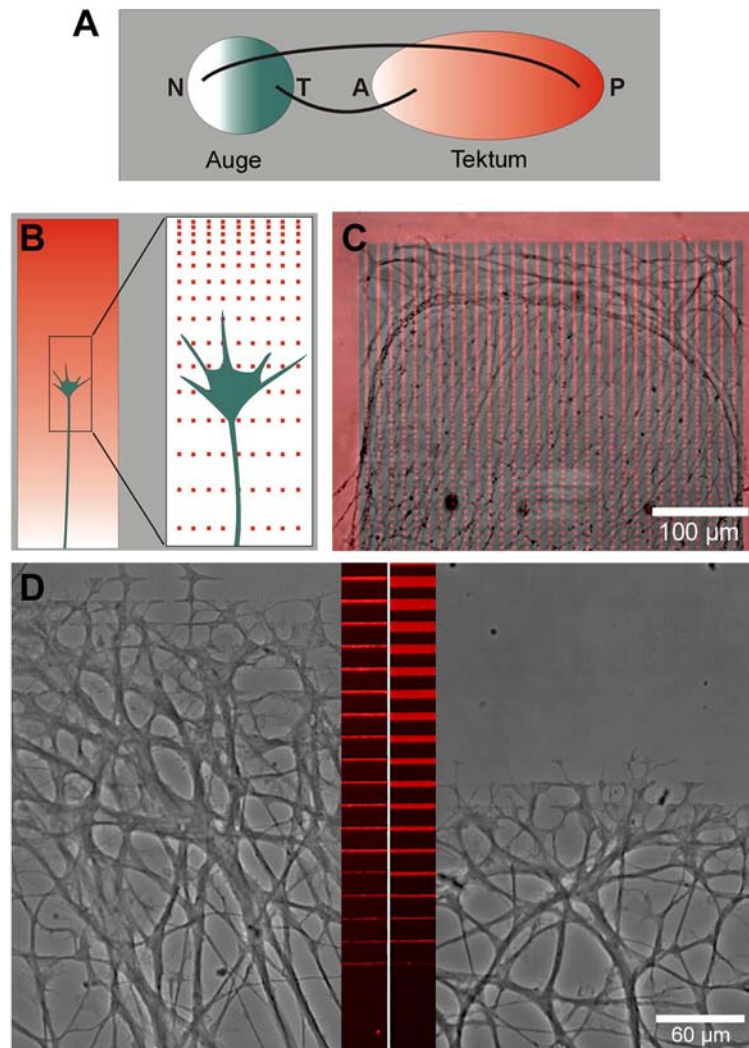


Abb. 5.1: Axonlenkung mit Hilfe von Ephrin-A5-Gradienten.

(A) Retino-tektale Projektion: In Hühnchen projizieren die Axone retinaler Ganglienzellen positionsabhängig ins Tektum. Nasale (N) Axone terminieren posterior (P), temporale (T) enden anterior (A) im Tektum. Diese Topographie wird durch gradiert im Tektum exprimierte Lenkungsmoleküle vermittelt (rot). (B) Schematisch: Simulation des tektalen Gradienten mit Hilfe eines zweidimensional strukturierten Substrates (rechts). In grün wird ein in den Gradienten einwachsender Wachstumskegel mit Axon dargestellt. (C) Durchlichtaufnahme von Axonen retinaler Ganglienzellen vom Hühnchen, die einen Tag in einen Dot-Gradienten eingewachsen sind. Das Ephrin-Muster des Gradienten wurde fluoreszent markiert (rot). Der übersichtlicheren Darstellung wegen wurde es vergrößert und nicht maßstabsgerecht unterlegt. Die gesamte Gradientenfläche ist dicht mit Axonen besiedelt. (D) Durchlichtaufnahmen von Axonen retinaler Ganglienzellen vom Hühnchen, die einen Tag in Linien-Gradienten eingewachsen sind. Ausschnitte des fluoreszierenden Ephrin-Musters wurden maßstabsgerecht dargestellt (rot). In flachere Gradienten wachsen die Axone weiter ein (links) als in steile (rechts). In beiden Fällen stoppen sie deutlich früher als in Dot-Gradienten und gelangen nicht bis zur homogenen Ephrinfläche.

Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Susanne Lang, MPI Tübingen.

homogen bedeckte Fläche ein (Abb. 5.1 C). Während die strukturierte Gradientenfläche bis an ihre Grenzen dicht mit Axonen besiedelt wird, bleiben homogene Ephrin-Flächen axonfrei. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass hier die Mengen an präsentiertem Ephrin nicht ausreichen, um eine Reaktion der Wachstumskegel hervorzurufen. Daher werden seit kurzem anders strukturierte Gradienten eingesetzt, die aus Linien zunehmender Breite bestehen

(Linien-Gradient; Abb. 5.1 D). Die Linien sind in einem regelmäßigen Abstand zueinander angeordnet, jede Linie ist jedoch breiter als ihre vorangehende. Je nach Zunahme der Breite variiert dabei die Steilheit des erzeugten Gradienten (Abb. 5.1 D). Ein Gradient, dessen Linien jeweils um 10% breiter werden ist z.B. flacher als ein Gradient, dessen Linienbreite sich jeweils verdoppelt. Lässt man RGZ von Hühnchen über einen Tag in solche Gradienten einwachsen, zeigt sich ein klarer Effekt. Die Axone wachsen nicht mehr bis an die homogenen Flächen, sondern stoppen früh im Gradienten. Auffallend dabei ist, dass sie in flache Gradienten weiter einwachsen (Abb. 5.1 D links) als in steile (Abb. 5.1 D rechts). Damit steht erstmals ein System zur Verfügung, das es ermöglicht, die Reaktion von Axonen auf potenzielle Axonlenkungsmoleküle quantitativ zu erfassen. Die exakte Auswertung der ersten erfolgreichen Experimente läuft z.Z. am MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen durch Susanne Lang.

6 Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M., und G.A. Dunn. 1975. Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp Cell Res.* 92:57-62.
- Abrams, G.A., S.L. Goodman, P.F. Nealey, M. Franco, und C.J. Murphy. 2000. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res.* 299:39-46.
- Avnur, Z., und B. Geiger. 1981. The removal of extracellular fibronectin from areas of cell-substrate contact. *Cell.* 25:121-32.
- Bailly, M., J.S. Condeelis, und J.E. Segall. 1998. Chemoattractant-induced lamellipod extension. *Microsc Res Tech.* 43:433-43.
- 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. *Nat Cell Biol.* 3:466-72.
- Ballestrem, C., B. Hinz, B.A. Imhof, und B. Wehrle-Haller. 2001. Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior. *J Cell Biol.* 155:1319-32.
- Ballestrem, C., B. Wehrle-Haller, B. Hinz, und B.A. Imhof. 2000. Actin-dependent lamellipodia formation and microtubule-dependent tail retraction control-directed cell migration. *Mol Biol Cell.* 11:2999-3012.
- Ballestrem, C., B. Wehrle-Haller, und B.A. Imhof. 1998. Actin dynamics in living mammalian cells. *J Cell Sci.* 111 (Pt 12):1649-58.
- Beningo, K.A., M. Dembo, I. Kaverina, J.V. Small, und Y.L. Wang. 2001. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J Cell Biol.* 153:881-8.
- Beningo, K.A., C.M. Lo, und Y.L. Wang. 2002. Flexible polyacrylamide substrata for the analysis of mechanical interactions at cell-substratum adhesions. *Methods Cell Biol.* 69:325-39.
- Beningo, K.A., und Y.L. Wang. 2002. Flexible substrata for the detection of cellular traction forces. *Trends Cell Biol.* 12:79-84.
- Bernard, A., E. Delamarche, H. Schmid, B. Michel, H.R. Bosshard, und H. Biebuyck. 1998. Printing patterns of proteins. *Langmuir.* 14:2225-2229.
- Bernard, A., D. Fitzli, P. Sonderegger, E. Delamarche, B. Michel, H.R. Bosshard, und H. Biebuyck. 2001. Affinity capture of proteins from solution and their dissociation by contact printing. *Nat Biotechnol.* 19:866-9.
- Bernard, A., J.-P. Renault, B. Michel, H.R. Bosshard, und E. Delamarche. 2000. Microcontact Printing of Proteins. *Adv Mater.* 12:1067-1070.
- Bershadsky, A., A. Chausovsky, E. Becker, A. Lyubimova, und B. Geiger. 1996. Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol.* 6:1279-89.
- Bershadsky, A.D., I.S. Tint, A.A. Neyfakh, Jr., und J.M. Vasiliev. 1985. Focal contacts of normal and RSV-transformed quail cells. Hypothesis of the transformation-induced deficient maturation of focal contacts. *Exp Cell Res.* 158:433-44.
- Bhatt, A., I. Kaverina, C. Otey, und A. Huttenlocher. 2002. Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *J Cell Sci.* 115:3415-25.
- Blawas, A.S., und W.M. Reichert. 1998. Protein patterning. *Biomaterials.* 19:595-609.
- Bockholt, S.M., und K. Burridge. 1993. Cell spreading on extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of tensin. *J Biol Chem.* 268:14565-7.
- Bono, P., K. Rubin, J.M. Higgins, und R.O. Hynes. 2001. Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Mol Biol Cell.* 12:891-900.
- Bray, D. 2001. Cell Movements - From Molecules to Motility. Garland Publishing, New York.
- Brock, A., E. Chang, C.C. Ho, P. LeDuc, X.Y. Jiang, G.M. Whitesides, und D.E. Ingber. 2003. Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir.* 19:1611-1617.
- Chen, C.S., J.L. Alonso, E. Ostuni, G.M. Whitesides, und D.E. Ingber. 2003. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem Biophys Res Commun.* 307:355-61.
- Chen, C.S., M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, und D.E. Ingber. 1997. Geometric control of cell life and death. *Science.* 276:1425-8.

- Chen, C.S., M. Mrksich, S. Huang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1998. Micropatterned surfaces for control of cell shape, position, and function. *Biotechnol Prog.* 14:356-63.
- Chen, W.T., and S.J. Singer. 1980. Fibronectin is not present in the focal adhesions formed between normal cultured fibroblasts and their substrata. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:7318-22.
- Cheng, H.J., M. Nakamoto, A.D. Bergemann, and J.G. Flanagan. 1995. Complementary gradients in expression and binding of ELF-1 and Mek4 in development of the topographic retinotectal projection map. *Cell.* 82:371-81.
- Choquet, D., D.P. Felsenfeld, and M.P. Sheetz. 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell.* 88:39-48.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and K. Burridge. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol.* 133:1403-15.
- Clark, E.A., W.G. King, J.S. Brugge, M. Symons, and R.O. Hynes. 1998. Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol.* 142:573-86.
- Coussen, F., D. Choquet, M.P. Sheetz, and H.P. Erickson. 2002. Trimers of the fibronectin cell adhesion domain localize to actin filament bundles and undergo rearward translocation. *J Cell Sci.* 115:2581-90.
- Cox, E.A., and A. Huttenlocher. 1998. Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc Res Tech.* 43:412-9.
- Csucs, G., R. Michel, J.W. Lussi, M. Textor, and G. Danuser. 2003. Microcontact printing of novel co-polymers in combination with proteins for cell-biological applications. *Biomaterials.* 24:1713-20.
- Cukierman, E., R. Pankov, D.R. Stevens, and K.M. Yamada. 2001. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 294:1708-12.
- Curtis, A., and C. Wilkinson. 1997. Topographical control of cells. *Biomaterials.* 18:1573-83.
- Curtis, A.S., and C.D. Wilkinson. 1998. Reactions of cells to topography. *J Biomater Sci Polym Ed.* 9:1313-29.
- Danen, E.H.J., and K.M. Yamada. 2001. Fibronectin, Integrins, and Growth Control. *Journal of Cellular Physiology.* 189:1-13.
- Danowski, B.A. 1989. Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors. *J Cell Sci.* 93 (Pt 2):255-66.
- David, C., and D. Hambach. 1999. Line width control using a defocused low voltage electron beam. *Microelectronic Engineering.* 46:219-222.
- David, C., and A. Souvorov. 1999. High efficiency Bragg-Fresnel lenses with 100 nm outermost zones width. *Rev. of Sci. Instrum.* 70:4168-4173.
- Defilippi, P., C. Olivo, M. Venturino, L. Dolce, L. Silengo, and G. Tarone. 1999. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc Res Tech.* 47:67-78.
- den Braber, E.T., J.E. de Ruijter, L.A. Ginsel, A.F. von Recum, and J.A. Jansen. 1998. Orientation of ECM protein deposition, fibroblast cytoskeleton, and attachment complex components on silicone microgrooved surfaces. *J Biomed Mater Res.* 40:291-300.
- Dike, L.E., C.S. Chen, M. Mrksich, J. Tien, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1999. Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 35:441-8.
- Drescher, U., C. Kremoser, C. Handwerker, J. Loschinger, M. Noda, and F. Bonhoeffer. 1995. In vitro guidance of retinal ganglion cell axons by RAGS, a 25 kDa tectal protein related to ligands for Eph receptor tyrosine kinases. *Cell.* 82:359-70.
- Duband, J.L., G.H. Nuckolls, A. Ishihara, T. Hasegawa, K.M. Yamada, J.P. Thiery, and K. Jacobson. 1988. Fibronectin receptor exhibits high lateral mobility in embryonic locomoting cells but is immobile in focal contacts and fibrillar streaks in stationary cells. *J Cell Biol.* 107:1385-96.
- Ehrlich, H.P. 1988. Wound closure: evidence of cooperation between fibroblasts and collagen matrix. *Eye.* 2 (Pt 2):149-57.
- Ehrlich, H.P., and J.B. Rajaratnam. 1990. Cell locomotion forces versus cell contraction forces for collagen lattice contraction: an in vitro model of wound contraction. *Tissue Cell.* 22:407-17.
- Elsdale, T., and J. Bard. 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol.* 54:626-37.
- Engel, J., E. Odermatt, A. Engel, J.A. Madri, H. Furthmayr, H. Rohde, and R. Timpl. 1981. Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Mol Biol.* 150:97-120.
- Enomoto, T. 1996. Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct Funct.* 21:317-26.

- Fenter, P., A. Eberhardt, und P. Eisenberger. 1994. Self-assembly of N-Alkyl Thiols as Disulfides on Au(111). *Science*. 266:1216-1218.
- Flinn, H.M., und A.J. Ridley. 1996. Rho stimulates tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase, p130 and paxillin. *J Cell Sci*. 109 (Pt 5):1133-41.
- Folch, A., und M. Toner. 2000. Microengineering of cellular interactions. *Annu Rev Biomed Eng*. 2:227-56.
- Friedl, P., und E.B. Brocker. 2000. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 57:41-64.
- Frisch, S.M., und H. Francis. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol*. 124:619-26.
- Frisch, S.M., und E. Ruoslahti. 1997. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol*. 9:701-6.
- Frisen, J., P.A. Yates, T. McLaughlin, G.C. Friedman, D.D. O'Leary, und M. Barbacid. 1998. Ephrin-A5 (AL-1/RAGS) is essential for proper retinal axon guidance and topographic mapping in the mammalian visual system. *Neuron*. 20:235-43.
- Fukami, K., T. Endo, M. Imamura, und T. Takenawa. 1994. alpha-Actinin and vinculin are PIP2-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. *J Biol Chem*. 269:1518-22.
- Galbraith, C.G., und M.P. Sheetz. 1997. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:9114-8.
- Galbraith, C.G., und M.P. Sheetz. 1998. Forces on adhesive contacts affect cell function. *Curr Opin Cell Biol*. 10:566-71.
- Galbraith, C.G., K.M. Yamada, und M.P. Sheetz. 2002. The relationship between force and focal complex development. *J Cell Biol*. 159:695-705.
- Geiger, B., und A. Bershadsky. 2002. Exploring the neighborhood: adhesion-coupled cell mechanosensors. *Cell*. 110:139-42.
- Goldfinger, L.E., J. Han, W.B. Kiosses, A.K. Howe, und M.H. Ginsberg. 2003. Spatial restriction of alpha4 integrin phosphorylation regulates lamellipodial stability and alpha4beta1-dependent cell migration. *J Cell Biol*. 162:731-41.
- Greenwood, J.A., A.B. Theibert, G.D. Prestwich, und J.E. Murphy-Ullrich. 2000. Restructuring of focal adhesion plaques by PI 3-kinase. Regulation by PtdIns (3,4,5)-p(3) binding to alpha-actinin. *J Cell Biol*. 150:627-42.
- Gumbiner, B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*. 84:345-57.
- Gundersen, R.W., und J.N. Barrett. 1980. Characterization of the turning response of dorsal root neurites toward nerve growth factor. *J Cell Biol*. 87:546-54.
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. 279:509-14.
- Hamdi, F.A., und D. Whitteridge. 1954. The representation of the retina on the optic tectum in the pigeon. *Q J Exp Physiol*. 39:111-119.
- Hammarback, J.A., und P.C. Letourneau. 1986. Neurite extension across regions of low cell-substratum adhesivity: implications for the guidepost hypothesis of axonal pathfinding. *Dev Biol*. 117:655-62.
- Harris, A.K. 1986. Cell traction in relationship to morphogenesis and malignancy. *Dev Biol (N Y 1985)*. 3:339-57.
- Harris, A.K., P. Wild, und D. Stopak. 1980. Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science*. 208:177-9.
- Harris, W.A., und C.E. Holt. 1995. From tags to RAGS: chemoaffinity finally has receptors and ligands. *Neuron*. 15:241-4.
- Horwitz, A.R., und J.T. Parsons. 1999. Cell migration--movin' on. *Science*. 286:1102-3.
- Hotchin, N.A., und A. Hall. 1995. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol*. 131:1857-65.
- Huttenlocher, A., S.P. Palecek, Q. Lu, W. Zhang, R.L. Mellgren, D.A. Lauffenburger, M.H. Ginsberg, und A.F. Horwitz. 1997. Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain. *J Biol Chem*. 272:32719-22.
- Hynes, R.O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 69:11-25.
- Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 110:673-87.
- Ingber, D.E. 2003a. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J Cell Sci*. 116:1157-73.
- Ingber, D.E. 2003b. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci*. 116:1397-408.
- Ingham, K.C. Jan 2003, <http://www.gwumc.edu/biochem/ingham/fnreview.htm>

- Ito, Y. 1999. Surface micropatterning to regulate cell functions. *Biomaterials*. 20:2333-42.
- Izzard, C.S., and L.R. Lochner. 1976. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci*. 21:129-59.
- Jackman, R.J., J.L. Wilbur, and G.M. Whitesides. 1995. Fabrication of submicrometer features on curved substrates by microcontact printing. *Science*. 269:664-6.
- Jockusch, B., and M. Rüdiger. 1996. Crosstalk between cell adhesion molecules: vinculin as a paradigm for regulation by conformation. *Trends in Cell Biology*. 6:311-315.
- Kane, R.S., S. Takayama, E. Ostuni, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. 1999. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials*. 20:2363-76.
- Katz, B.Z., E. Zamir, A. Bershadsky, Z. Kam, K.M. Yamada, and B. Geiger. 2000. Physical state of the extracellular matrix regulates the structure and molecular composition of cell-matrix adhesions. *Mol Biol Cell*. 11:1047-60.
- Kaverina, I., O. Krylyshkina, and J.V. Small. 1999. Microtubule targeting of substrate contacts promotes their relaxation and dissociation. *J Cell Biol*. 146:1033-44.
- Kaverina, I., K. Rottner, and J.V. Small. 1998. Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions. *J Cell Biol*. 142:181-90.
- Keselowsky, B.G., D.M. Collard, and A.J. Garcia. 2003. Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion. *J Biomed Mater Res*. 66A:247-59.
- Kiosses, W.B., S.J. Shattil, N. Pampori, and M.A. Schwartz. 2001. Rac recruits high-affinity integrin α v β 3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat Cell Biol*. 3:316-20.
- Klinghoffer, R.A., C. Sachsenmaier, J.A. Cooper, and P. Soriano. 1999. Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction. *Embo J*. 18:2459-71.
- Knoll, B., and U. Drescher. 2002. Ephrin-As as receptors in topographic projections. *Trends Neurosci*. 25:145-9.
- Koo, L.Y., D.J. Irvine, A.M. Mayes, D.A. Lauffenburger, and L.G. Griffith. 2002. Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus. *J Cell Sci*. 115:1423-33.
- Korohoda, W., Z. Madeja, and J. Sroka. 2002. Diverse chemotactic responses of Dictyostelium discoideum amoebae in the developing (temporal) and stationary (spatial) concentration gradients of folic acid, cAMP, Ca(2+) and Mg(2+). *Cell Motil Cytoskeleton*. 53:1-25.
- Kumar, A., and G.M. Whitesides. 1993. Features of gold having micrometer to centimeter dimensions can be formed through a combination of stamping with an elastomeric stamp and an alkanethiol ink followed by chemical etching. *Appl. Phys. Lett*. 63:2002.
- Laibinis, P.E., G.M. Whitesides, D.L. Allara, Y.T. Tao, A.N. Parikh, and R.G. Nuzzo. 1991. Comparison of the Structures and Wetting Properties of Self-assembled Monolayers of Normal-Alkanethiols on the Coinage Metal-Surfaces, Cu, Ag, Au. *J Am Chem Soc*. 113:7152-7167.
- Lauffenburger, D.A., and A.F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 84:359-69.
- Laukaitis, C.M., D.J. Webb, K. Donais, and A.F. Horwitz. 2001. Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells. *J Cell Biol*. 153:1427-40.
- LeDuc, P., E. Ostuni, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2002. Use of Micropatterned Adhesive Surfaces for Control of Cell Behavior. In *Methods in Cell Biology*. Vol. 69. Elsevier Science (USA). 385-401.
- Lee, J., M. Leonard, T. Oliver, A. Ishihara, and K. Jacobson. 1994. Traction forces generated by locomoting keratocytes. *J Cell Biol*. 127:1957-64.
- Li, F., S.D. Redick, H.P. Erickson, and V.T. Moy. 2003. Force measurements of the alpha5beta1 integrin-fibronectin interaction. *Biophys J*. 84:1252-62.
- Lo, C.M., H.B. Wang, M. Dembo, and Y.L. Wang. 2000. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys J*. 79:144-52.
- Lopez, G.P., H. Biebuyck, R. Härter, A. Kumar, and G.M. Whitesides. 1993. Fabrication and imaging of two-dimensional patterns of proteins adsorbed on self-assembled monolayers by scanning electron microscopy. *J Am Chem Soc*. 115:10774-10781.
- MacAlear, J.M., and J. Wehrung. 1978. Microsubstrates and method for making micropattern devices., USA.
- Machesky, L.M., and A. Hall. 1997. Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J Cell Biol*. 138:913-26.

- Maheshwari, G., G. Brown, D.A. Lauffenburger, A. Wells, and L.G. Griffith. 2000. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J Cell Sci.* 113 (Pt 10):1677-86.
- Maniotis, A.J., C.S. Chen, and D.E. Ingber. 1997. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:849-54.
- Martin, P.T., and J.R. Sanes. 1997. Integrins mediate adhesion to agrin and modulate agrin signaling. *Development.* 124:3909-17.
- Massia, S.P., and J.A. Hubbell. 1991. An RGD spacing of 440 nm is sufficient for integrin alpha V beta 3-mediated fibroblast spreading and 140 nm for focal contact and stress fiber formation. *J Cell Biol.* 114:1089-100.
- Matsuzawa, M., P. Liesi, and W. Knoll. 1996. Chemically modifying glass surfaces to study substratum-guided neurite outgrowth in culture. *J Neurosci Methods.* 69:189-96.
- McGill, J.I., T.P. Powell, and W.M. Cowan. 1966. The retinal representation upon the optic tectum and isthmo-optic nucleus in the pigeon. *J Anat.* 100:5-33.
- Michel, B., A. Bernard, A. Bietsch, E. Delamarche, M. Geissler, D. Juncker, H. Kind, J.-P. Renault, H. Rothuizen, H. Schmid, P. Schmidt-Winkel, R. Stutz, and H. Wolf. 2001. Printing meets lithography: Soft approaches to high-resolution patterning. *IBM J. RES. & DEV.* 45:697-719.
- Michel, R., J.W. Lussi, G. Csucs, I. Reviakine, G. Danuser, B. Ketterer, J.A. Hubbell, M. Textor, and N.D. Spencer. 2002a. Selective molecular assembly patterning: A new approach to micro- and nanochemical patterning of surfaces for biological applications. *Langmuir.* 18:3281-3287.
- Michel, R., I. Reviakine, D. Sutherland, C. Fokas, G. Csucs, G. Danuser, N.D. Spencer, and M. Textor. 2002b. A novel approach to produce biologically relevant chemical patterns at the nanometer scale: Selective molecular assembly patterning combined with colloidal lithography. *Langmuir.* 18:8580-8586.
- Miranti, C.K., and J.S. Brugge. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol.* 4:E83-90.
- Miyamoto, S., H. Teramoto, O.A. Coso, J.S. Gutkind, P.D. Burbelo, S.K. Akiyama, and K.M. Yamada. 1995. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol.* 131:791-805.
- Monschau, B., C. Kremoser, K. Ohta, H. Tanaka, T. Kaneko, T. Yamada, C. Handwerker, M.R. Hornberger, J. Loschinger, E.B. Pasquale, D.A. Siever, M.F. Verderame, B.K. Muller, F. Bonhoeffer, and U. Drescher. 1997. Shared and distinct functions of RAGS and ELF-1 in guiding retinal axons. *Embo J.* 16:1258-67.
- Mrksich, M. 1998. Tailored substrates for studies of attached cell culture. *Cell Mol Life Sci.* 54:653-62.
- Mrksich, M. 2002. What can surface chemistry do for cell biology? *Curr Opin Chem Biol.* 6:794-7.
- Mrksich, M., L.E. Dike, J. Tien, D.E. Ingber, and G.M. Whitesides. 1997. Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver. *Exp Cell Res.* 235:305-13.
- Nakamoto, M., H.J. Cheng, G.C. Friedman, T. McLaughlin, M.J. Hansen, C.H. Yoon, D.D. O'Leary, and J.G. Flanagan. 1996. Topographically specific effects of ELF-1 on retinal axon guidance in vitro and retinal axon mapping in vivo. *Cell.* 86:755-66.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell.* 81:53-62.
- Olski, T.M., A.A. Noegel, and E. Korenbaum. 2001. Parvin, a 42 kDa focal adhesion protein, related to the alpha-actinin superfamily. *J Cell Sci.* 114:525-38.
- Palecek, S.P., A. Huttenlocher, A.F. Horwitz, and D.A. Lauffenburger. 1998. Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells. *J Cell Sci.* 111 (Pt 7):929-40.
- Pankov, R., E. Cukierman, B.Z. Katz, K. Matsumoto, D.C. Lin, S. Lin, C. Hahn, and K.M. Yamada. 2000. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of alpha(5)beta(1) integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol.* 148:1075-90.
- Pankov, R., and K.M. Yamada. 2002. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 115:3861-3.
- Parker, K.K., A.L. Brock, C. Brangwynne, R.J. Mannix, N. Wang, E. Ostuni, N.A. Geisse, J.C. Adams, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2002. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *Faseb J.* 16:1195-204.

- Patel, N., R. Bhandari, K.M. Shakesheff, S.M. Cannizzaro, M.C. Davies, R. Langer, C.J. Roberts, S.J. Tendler, and P.M. Williams. 2000. Printing patterns of biospecifically-adsorbed protein. *J Biomater Sci Polym Ed.* 11:319-31.
- Pelham, R.J., Jr., and Y. Wang. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13661-5.
- Pelham, R.J., Jr., and Y. Wang. 1999. High resolution detection of mechanical forces exerted by locomoting fibroblasts on the substrate. *Mol Biol Cell.* 10:935-45.
- Petroll, W.M., L. Ma, and J.V. Jester. 2003. Direct correlation of collagen matrix deformation with focal adhesion dynamics in living corneal fibroblasts. *J Cell Sci.* 116:1481-91.
- Price, L.S. 1997. Morphological control of cell growth and viability. *Bioessays.* 19:941-3.
- Prime, K.L., and G.M. Whitesides. 1991. Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces. *Science.* 252:1164-7.
- Prime, K.L., and G.M. Whitesides. 1993. Adsorption of Proteins onto Surfaces containing End-attached Oligo(ethylene oxide) - A Model System using Self-assembled Monolayers. *J Am Chem Soc.* 115:10714-10721.
- Ren, X.D., W.B. Kiosses, D.J. Sieg, C.A. Otey, D.D. Schlaepfer, and M.A. Schwartz. 2000. Focal adhesion kinase suppresses Rho activity to promote focal adhesion turnover. *J Cell Sci.* 113 (Pt 20):3673-8.
- Ridley, A.J. 2001. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 114:2713-22.
- Riveline, D., E. Zamir, N.Q. Balaban, U.S. Schwarz, T. Ishizaki, S. Narumiya, Z. Kam, B. Geiger, and A.D. Bershadsky. 2001. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J Cell Biol.* 153:1175-86.
- Roskelley, C.D., and M.J. Bissell. 1995. Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem Cell Biol.* 73:391-7.
- Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small. 1999. Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol.* 9:640-8.
- Sanes, J.R. 1993. Topographic maps and molecular gradients. *Curr Opin Neurobiol.* 3:67-74.
- Saoncella, S., F. Echtermeyer, F. Denhez, J.K. Nowlen, D.F. Mosher, S.D. Robinson, R.O. Hynes, and P.F. Goetinck. 1999. Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2805-10.
- Sawada, Y., and M.P. Sheetz. 2002. Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol.* 156:609-15.
- Schmid, H., and B. Michel. 2000. Siloxane Polymers for High-Resolution, High-Accuracy Soft Lithography. *Macromolecules.* 33:3042-3049.
- Schoenwaelder, S.M., and K. Burridge. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol.* 11:274-86.
- Sechi, A.S., and J. Wehland. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3685-95.
- Sheetz, M.P., D.P. Felsenfeld, and C.G. Galbraith. 1998. Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* 8:51-4.
- Sigal, G.B., M. Mrksich, and G.M. Whitesides. 1998. Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents. *J Am Chem Soc.* 120:3464-3473.
- Singhvi, R., A. Kumar, G.P. Lopez, G.N. Stephanopoulos, D.I. Wang, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 1994. Engineering cell shape and function. *Science.* 264:696-8.
- Small, J.V., K. Rottner, and I. Kaverina. 1999. Functional design in the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 11:54-60.
- Small, J.V., K. Rottner, I. Kaverina, and K.I. Anderson. 1998. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta.* 1404:271-81.
- Small, J.V., T. Stradal, E. Vignat, and K. Rottner. 2002. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* 12:112-20.
- Smilenov, L.B., A. Mikhailov, R.J. Pelham, E.E. Marcantonio, and G.G. Gundersen. 1999. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science.* 286:1172-4.
- Song, H.J., G.L. Ming, and M.M. Poo. 1997. cAMP-induced switching in turning direction of nerve growth cones. *Nature.* 388:275-9.

- Sperry, R.W. 1963. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 50:703-710.
- Stirling, R.V. 1991. Molecules, maps and gradients in the retinotectal projection. *Trends Neurosci.* 14:509-12.
- Takenawa, T., and T. Itoh. 2001. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1533:190-206.
- Talbot, J., G. Tarjus, P.R. Van Tassel, and P. Viot. 2000. From car parking to protein adsorption: An overview of sequential adsorption processes. *Colloids Surf A-Physicochem. Eng. Aspects.* 165:287-324.
- Tan, J.L., J. Tien, D.M. Pirone, D.S. Gray, K. Bhadriraju, and C.S. Chen. 2003. Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:1484-9.
- Tawil, N., P. Wilson, and S. Carbonetto. 1993. Integrins in point contacts mediate cell spreading: factors that regulate integrin accumulation in point contacts vs. focal contacts. *J Cell Biol.* 120:261-71.
- Turner, C.E. 2000a. Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol.* 2:E231-6.
- Turner, C.E. 2000b. Paxillin interactions. *J Cell Sci.* 113 Pt 23:4139-40.
- Udin, S.B., and J.W. Fawcett. 1988. Formation of topographic maps. *Annu Rev Neurosci.* 11:289-327.
- Ulman, A. 1996. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem Rev.* 96:1533-1554.
- van der Flier, A., and A. Sonnenberg. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 305:285-98.
- Vasiliev, J.M., I.M. Gelfand, L.V. Dominina, N.A. Dorfman, and O.Y. Pletyushkina. 1976. Active cell edge and movements of concanavalin A receptors of the surface of epithelial and fibroblastic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73:4085-9.
- Vasiliev, J.M., I.M. Gelfand, L.V. Domnina, O.Y. Ivanova, S.G. Komm, and L.V. Olshevskaja. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J Embryol Exp Morphol.* 24:625-40.
- Verkhovskiy, A.B., T.M. Svitkina, and 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. *J Cell Biol.* 131:989-1002.
- Walter, J., S. Henke-Fahle, and F. Bonhoeffer. 1987a. Avoidance of posterior tectal membranes by temporal retinal axons. *Development.* 101:909-13.
- Walter, J., B. Kern-Veits, J. Huf, B. Stolze, and F. Bonhoeffer. 1987b. Recognition of position-specific properties of tectal cell membranes by retinal axons in vitro. *Development.* 101:685-96.
- Wang, N., J.P. Butler, and D.E. Ingber. 1993. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science.* 260:1124-7.
- Wang, N., E. Ostuni, G.M. Whitesides, and D.E. Ingber. 2002. Micropatterning tractional forces in living cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 52:97-106.
- Waterman-Storer, C.M., and E. Salmon. 1999. Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr Opin Cell Biol.* 11:61-7.
- Wehrle-Haller, B., and B. Imhof. 2002. The inner lives of focal adhesions. *Trends Cell Biol.* 12:382-9.
- Weinl, C., U. Drescher, S. Lang, F. Bonhoeffer, and J. Loschinger. 2003. On the turning of Xenopus retinal axons induced by ephrin-A5. *Development.* 130:1635-43.
- Wezeman, F.H. 1998. Morphological foundations of precartilag development in mesenchyme. *Microsc Res Tech.* 43:91-101.
- Whitesides, G.M. 1995. Self-assembling Materials. *SCIENTIFIC AMERICAN.* 273:146-149.
- Wilkinson, D.G. 2000. Topographic mapping: organising by repulsion and competition? *Curr Biol.* 10:R447-51.
- Wittmann, T., and C.M. Waterman-Storer. 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci.* 114:3795-803.
- Xia, Y., and G.M. Whitesides. 1998. Soft Lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37:550-575.
- Zajchowski, L.D., and S.M. Robbins. 2002. Lipid rafts and little caves. Compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur J Biochem.* 269:737-52.
- Zamir, E., and B. Geiger. 2001. Components of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114:3577-9.
- Zamir, E., B.Z. Katz, S. Aota, K.M. Yamada, B. Geiger, and Z. Kam. 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 112 (Pt 11):1655-69.

- Zamir, E., M. Katz, Y. Posen, N. Erez, K.M. Yamada, B.Z. Katz, S. Lin, D.C. Lin, A. Bershadsky, Z. Kam, und B. Geiger. 2000. Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 2:191-6.
- Zimmerman, E., B. Geiger, und L. Addadi. 2002. Initial stages of cell-matrix adhesion can be mediated and modulated by cell-surface hyaluronan. *Biophys J.* 82:1848-57.
- Zimmermann, P., und G. David. 1999. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *Faseb J.* 13 Suppl:S91-S100.

7 Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei:

Prof. Dr. Martin Bastmeyer für das höchst interessante Thema, seine hervorragende „Drei-Sekunden“-Betreuung, die großen Freiräume und das in mich gesetzte Vertrauen.

Prof. Dr. Claudia Stürmer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Laborgeräte während der Konstanzer Zeit.

Ein dickes „Merci vielmals“ geht an.....

..... MB – unvergesslich bleiben die vielen kulinarischen Erlebnisse von den „Raubtierfütterungen“ mit Dressurcharakter bis zum gepflegten 3-Gänge-Menü des Abends mit Whisk(e)y-Abschluss (mit oder ohne Seeblick). Die harten Duelle unterm Basketballkorb waren stets fair, und die Niederlagen seiner K'Lauterner gegen den VfB trug er mit Fassung sowie dem ihn auszeichnenden Humor.

..... Moni, die mich nach Jena voranziehen ließ und sich dann mitnichten in ein gemachtes Nest setzte, sondern mich tatkräftig entlastete. Außerdem vielen Dank für meinen Status als „Versuchskaninchen“ und das äußerst angenehme Laborklima (abgesehen von Temperaturstreitigkeiten ☺).

..... NOGI und OGI für besonders emotionale Momente während meiner Doktorarbeit.

..... das komplette Stürmer-Lab. Ich war stets einer „der Ihren“. Insbesondere gilt mein Dank Ulrike für ihre Hilfe bei diversen Experimenten, die Gespräche über den See und den Osten. Ein Extradankeschön geht an Marianne für die tolle Arbeitsplatznachbarschaft, die Labororganisation und die abendlichen Zusammenkünfte. Heike danke ich für die Denkkameradschaft und Silvi für ihre ausgleichende Art verbunden mit unerschütterlichem Optimismus.

..... Uli Weiland, dessen Fähigkeiten am AFM ebenso unübertroffen sind wie seine Diskussionsbereitschaft und Gelassenheit. Dies war von unschätzbarem Wert für das Gelingen dieser Arbeit und für das Laborklima.

..... den Bodensee. Auf 40 m ist die Welt friedlich, sind die Wracks schön und ist das Labor weit weg.

..... die tolle TSGK-Truppe. Allen voran Matze, Notker, Ralf, Sandra, Stephan und Till. Sie wissen, warum!

Ein großes Dankeschön auch an unsere Kooperationspartner in der Schweiz: An Prof. Dr. B. Imhof, Dr. B. Wehrle-Haller („Berni“) und Dr. C. Ballestrem vom Centre Medical Universitaire für Ihre Gastfreundschaft während meiner Aufenthalte in Genf. Die Diskussionen v.a. mit Berni waren sehr produktiv und trugen Wesentliches zur Veröffentlichung und dieser Arbeit bei. Außerdem vielen Dank an Dr. C. David vom Paul-Scherrer-Institut in Villigen. Er stellte für uns in nimmermüder Wochenendarbeit Master von bester Qualität her.

Bedanken möchte ich mich des weiteren bei Prof. Dr. F. Bonhoeffer, Susanne Lang und Dr. J. Löschinger vom MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen für die problemlose Zusammenarbeit und die vielen interessanten Diskussionen.

Vielen Dank nach Jena: André, Christiane, Franco, Geraldine, Katharina, Mausi, Ronny, Tina, Frau Winkler und auch Institutsdirektor Prof. Dr. J. Bolz haben mich nicht nur prächtig aufgenommen und den Start in einer neuen Stadt erleichtert. Sie waren auch bei allen Problemen, die ein Umzug und das (Labor-) Leben mit sich bringen, stets hilfreich zur Stelle. Franco gebührt ein Extradank für das intensive Korrekturlesen meiner Arbeit. Danke an Ina und Fränzi für ihren Einsatz im Praktikum und das Schmunzeln.

Ein Dankeschön an meinen Bruder und meine Eltern, die mich während der letzten Monate noch seltener zu Gesicht bekamen als sonst und dafür sogar Verständnis aufbrachten.

Mein größter Dank aber geht nach - inzwischen - Mainz. Trotz eigener „bewegter Zeiten“ war und ist Marion immer verständnisvoll und geduldig mit mir. Sie arbeitet voller Energie mit am Beweis, dass große Distanzen auch über Jahre hinweg kein unüberbrückbares Hindernis sein müssen. Es wird eine Zeit ohne 350 – 6000 km zwischen uns kommen!