

**Die Rolle der β 1-Integrine, E-Cadherine
und EGF-Rezeptoren in der mechanisch
induzierten Signalperzeption und
Signaltransduktion bei Keratinozyten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Yvonne Knies
aus Langen / Kreis Offenbach

Frankfurt am Main, 2005

(D F 1)

vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation
angenommen

Dekan :

1. Gutachter : Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn

2. Gutachter : Pr. Doz. Dr. A. Bernd

Datum der Dissertation :

Meinen Eltern

Die modernen Naturwissenschaften haben die Grenzen des Vorstellbaren längst überschritten. Trotzdem werden sich zumindest in einem Punkt die Wissenschaften der Zukunft nicht von den früherer Zeiten unterscheiden: Jede Antwort auf eine Frage wird neue Fragen aufwerfen.

John Maddox

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anregung und wissenschaftlicher Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn

und

Herrn Pr. Doz. Dr. August Bernd

in der Zeit vom 9.1997-1.2005 am Biozentrum / Niederursel in der Arbeitsgruppe „Kinematische Zellforschung“ der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main als auch im Labor für Dermatologische und Klinische Biochemie (B-Labor) an der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main angefertigt.

Herrn Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn gilt mein ganz besonderer Dank für die Vergabe des interessanten und herausfordernden Themas, für wertvolle Diskussionen, zahlreiche fachliche Hinweise und konstruktive Kritik.

Herrn Pr. Doz. Dr. A. Bernd sei vielfach gedankt für die guten Arbeitsbedingungen, die Möglichkeit zum selbstständigen und eigenverantwortlichen Arbeiten, für Anregungen zur Vorgehensweise beim Durchführen der Versuche und insgesamt für eine lehrreiche Zeit.

Herrn Prof. Dr. Roland Kaufmann danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Labor für Dermatologische und Klinische Biochemie der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.

Dank sage ich weiterhin Herrn Pr. Doz. Dr. Stefan Kippenberger für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und für seine guten Ratschläge.

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die vielfältige Hilfe der Service-Abteilungen nicht möglich gewesen; deshalb sage ich herzlichen Dank allen Mitarbeiter des Biochemischen- und Immunologischen-Labors. Und bei Frau Barbara Engel bedanke ich mich für die Hilfe bei administrativen Dingen.

Für die Unterweisung am Laser Scanning Mikroskop im Biozentrum sei Frau Monika Vöth und Herrn Dipl. Phys. Karl-Heinz Schewe gedankt.

Der Arbeitsgruppe „Kinematische Zellforschung“ danke ich für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft in vielen Seminarstunden.

Zum Dank verpflichtet bin ich der Firma „Die Bilderstürmer – Gesellschaft für visuelle Medien“. Die Geschäftsleitung hat mir die Nutzung zahlreicher Spezialgeräte gestattet.

Den Herren Daniel Röhler und Ralph Windischhofer verdanke ich die wiederholte Instandsetzung meines Rechners und die Bereitstellung ihres Wissens im PC-Bereich.

Dank Herrn Bürgermeister Bernd Abeln und dem Magistrat der Stadt Dreieich für die Vergabe des Stipendiums zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses von Dreieich.

Dem Graduiertenkolleg der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main danke ich für die großzügige Gewährung des Promotionsstipendiums.

Der Volkswagenstiftung (Aktenzeichen I/77 731) danke ich für die teilweise Unterstützung meiner Arbeit.

Herr Dipl. Biol. David Langer war mir ein verlässlicher Ansprechpartner in Computerfragen und im Fachbereich. Danke für die Hilfsbereitschaft, David !

Sehr dankbar bin ich meiner Schwester Evelyn. Sie übernahm das mühevollen Korrekturlesen dieser Arbeit.

All die Studienjahre konnte ich mich über die finanzielle Hilfe meiner Großeltern freuen. Herzlichen Dank.

Nicht genug danken kann ich meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist und auf deren grenzenlose Hilfe ich während meines gesamten Studiums vertrauen konnte.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
1.1. Allgemeines zur Haut.....	10
1.2. Die Epidermis.....	12
1.2.1. Die Basalzelle.....	13
1.2.2. Der Verhornungsprozess.....	13
1.2.3. Der Lipidverschluss.....	14
1.3. Die Bedeutung der mechanischen Reizung.....	15
1.4. Die Signalperzeption.....	16
1.4.1. Zelladhäsionsmoleküle.....	16
1.4.1.1. Integrine.....	18
1.4.1.2. Integrine und Mechanotransduktion.....	22
1.4.1.3. Cadherine.....	24
1.4.1.4. Cadherine und Mechanotransduktion.....	25
1.4.2. EGF-Rezeptor.....	26
1.5. Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK).....	27
1.5.1. Komponenten der MAPK-Wege.....	27
1.5.2. Integrine und MAPK.....	30
1.6. Das Zytoskelett.....	32
1.7. Fragestellung.....	34
2. Material und Methoden	35
2.1. Material	35
2.2. Methoden	38
2.2.1. HaCat-Keratinocyten.....	38
2.2.1.1. Zellkultur der HaCaT-Zellen.....	38
2.2.2. Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer.....	40
2.2.3. Das Konzept der mechanischen Reizung.....	41
2.2.3.1. Herstellung von flexiblen Silikonkammern.....	41
2.2.3.2. Apparatur zur Streckung.....	41
2.2.4. Untersuchungen mittels Konfokalem Laserscan Mikroskop.....	43
2.2.4.1. Anzucht der Zellen für Immunfluoreszenzfärbungen.....	43
2.2.4.2. Fixierung und Vorbereitung der Zellkulturen für das CLSM.....	43
2.2.4.3. Immunfluoreszenzfärbung.....	44

2.2.4.4. Das Konfokale Laserscan Mikroskop.....	45
2.2.4.5. Kolokalisations-Analyse der CLSM-Bilder.....	48
2.2.4.6. Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzpräparate.....	49
2.2.5. FACS-Analyse der β 1-Integrine.....	49
2.2.6. Adhäsions-Assay.....	50
2.2.7. BrdU-Nachweis.....	51
2.2.8. Blockierung der Oberflächenrezeptoren: β 1-Integrine, E-Cadherine, EGFR.....	52
2.2.9. Gelelektrophorese und Western Blot.....	53
2.2.9.1. Abarbeitung der Proben für die Gelelektrophorese.....	53
2.2.9.2. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.....	54
2.2.9.3. Western Blot.....	57
3. Ergebnisse.....	60
3.1. Beeinflussung der Verteilung von β 1-Integrinen auf der Zelloberfläche durch mechanische Streckung.....	60
3.2. Beeinflussung der β 1-Integrin-Menge auf der Zelloberfläche durch mechanische Streckung.....	61
3.3. Quantitative Analyse der Bildung von Fokalkontakten.....	62
3.4. Adhäsionseigenschaften gestreckter HaCaT-Zellen.....	63
3.4.1. Vorversuche.....	63
3.4.2. Morphologie der Zellen während des Adhäsionsversuchs.....	66
3.4.3. Adhäsionseigenschaften gestreckter HaCaTs auf verschiedenen Matrices.....	67
3.4.4. Nähere Betrachtung der Arginin+Serum-Beschichtung.....	69
3.4.5. Adhäsionsverhalten nach Behandlung mit einem funktionsblockierenden Antikörper gegen β 1-Integrine.....	69
3.5. Steigerung der Proliferationsrate gestreckter HaCaT-Zellen.....	72
3.5.1. Proliferations-Kinetik gestreckter HaCaTs.....	73
3.5.2. Proliferationsverhalten auf unterschiedlichen Matrices.....	74
3.6. Räumliche Kolokalisation von β 1-Integrinen bzw. E-Cadherinen mit EGF-Rezeptoren.....	75
3.6.1. β 1-Integrine und EGF-Rezeptoren.....	75
3.6.2. E-Cadherine und EGF-Rezeptoren.....	82
3.7. Funktionelles Zusammenarbeiten von β 1-Integrinen bzw. E-Cadherinen mit EGF-Rezeptoren bei der Übermittlung mechanischer Streckungsreize.....	85
3.7.1. Aktivierungs-Kinetiken für ERK1/2 und den EGF-Rezeptor.....	85

3.7.2. Beteiligung von β 1-Integrinen, E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren bei der Aktivierung von MAP-Kinasen.....	87
3.8. Kolokalisation von β 1-Integrinen, EGF-Rezeptoren und verschiedenen Zytoskelett-Elementen nach Inhibition von β 1-Integrinen und E-Cadherinen.....	89
3.8.1. β 1-Integrine und EGF-Rezeptoren.....	90
3.8.2. Aktin und EGF-Rezeptoren.....	94
3.8.3. Intermediärfilamente (Keratin) und EGF-Rezeptoren.....	98
3.8.4. Mikrotubuli und EGF-Rezeptoren.....	102
4. Diskussion.....	106
4.1. Beteiligung von β 1-Integrinen an der Mechanotransduktion des Dehnungsreizes...	107
4.1.1. Räumliche Reorganisation der β 1-Integrine nach mechanischer Streckung....	107
4.1.2. Adhäsionsverhalten vorgestreckter HaCaT-Keratinocyten auf unterschiedlichen Matrices.....	109
4.1.3. Proliferationsverhalten mechanisch gedehnter HaCaT-Keratinocyten.....	114
4.2. Räumliche und funktionelle Interaktion zwischen β 1-Integrinen bzw. E-Cadherinen mit dem Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren.....	115
4.2.1. Räumliche Assoziationen von β 1-Integrinen bzw. E-Cadherinen mit dem EGF-Rezeptor.....	116
4.2.2. Funktionelle Interaktionen von β 1-Integrinen bzw. E-Cadherinen mit dem EGF-Rezeptor.....	118
4.3. Assoziationen zwischen β 1-Integrinen und E-Cadherinen mit Bestandteilen des Zytoskeletts.....	121
5. Zusammenfassung.....	125
6. Literaturnachweis.....	127
Lebenslauf.....	140
Posterbeiträge.....	141

1. Einleitung

Der Bedeutung von mechanischen Kräften für die Regulation zellulärer Prozesse, wie der Proliferation und Differenzierung der Zelle sowie der Organisation des Zytoskeletts, wird zunehmend Interesse entgegengebracht. So wurde die Auswirkung mechanischer Stimulierung in unterschiedlicher Form bereits an verschiedenen Zelltypen getestet: z.B. an Endothelzellen, Myoblasten und Osteoblasten (Ando, 1996; Ballermann, 1995; Carvalho, 1995; Malek, 1996; Morigi, 1995; Vandeburgh, 1988).

Auch die Haut ist permanent Druck- und Dehnungsreizen ausgesetzt, die aus der Bewegung und der Kontaktaufnahme mit der Umwelt resultieren (Asselineau et al, 1986). Über den Einfluss von mechanischem Stress auf Keratinozyten ist allerdings noch wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit soll gezeigt werden, dass die adhäsionsvermittelnden Oberflächenrezeptoren – β 1-Integrine und E-Cadherine – und der Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren bei Keratinozyten einen Teil des Signalnetzwerkes darstellen, durch das extrazelluläre mechanische Reize in eine biochemische Antwort umgewandelt werden. Für einige andere Zelltypen wurde schon bewiesen, dass Integrine tatsächlich als Mechanotransducer fungieren können (siehe unten).

1.1. Allgemeines zur Haut

Die Haut ist ein großes, flächenhaftes Organ, welches aus zwei Schichten besteht: Einer äußeren epithelialen (Epidermis) und einer inneren bindegewebigen (Dermis) (Benninghoff, 1994). Epidermis und Dermis zusammen bezeichnet man als Cutis. Darunter liegt aufgelockertes, fetthaltiges Bindegewebe, die Subcutis (Hammerschmid-Gollwitzer, J.).

Die *Epidermis* ist ein geschichtetes, verhornendes Plattenepithel (Abb. 1), das sich aus Keratinozyten in verschiedenen Stadien der Differenzierung zusammensetzt, daneben aber auch sogenannte symbiotische Zellen beherbergt (Melanozyten, Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen). Als funktionelles Endprodukt produziert sie eine Hornschicht, die Trägerin der Barrierefunktion der Haut (Benninghoff, 1994).

Die *Dermis* verfügt als fibroelastische Schicht aus kollagenem Bindegewebe über eine hohe Reißfestigkeit sowie Elastizität. In ihr befinden sich Fibroblasten und Mastzellen, versorgende Gefäße und Nerven sowie Schweiß- und Talgdrüsen (Benninghoff, 1994).

Die *Subcutis* mit ihren Fettzellen fungiert als mechanischer Schutz, Energiespeicher und Wärmeisolation (Rassner, 2000).

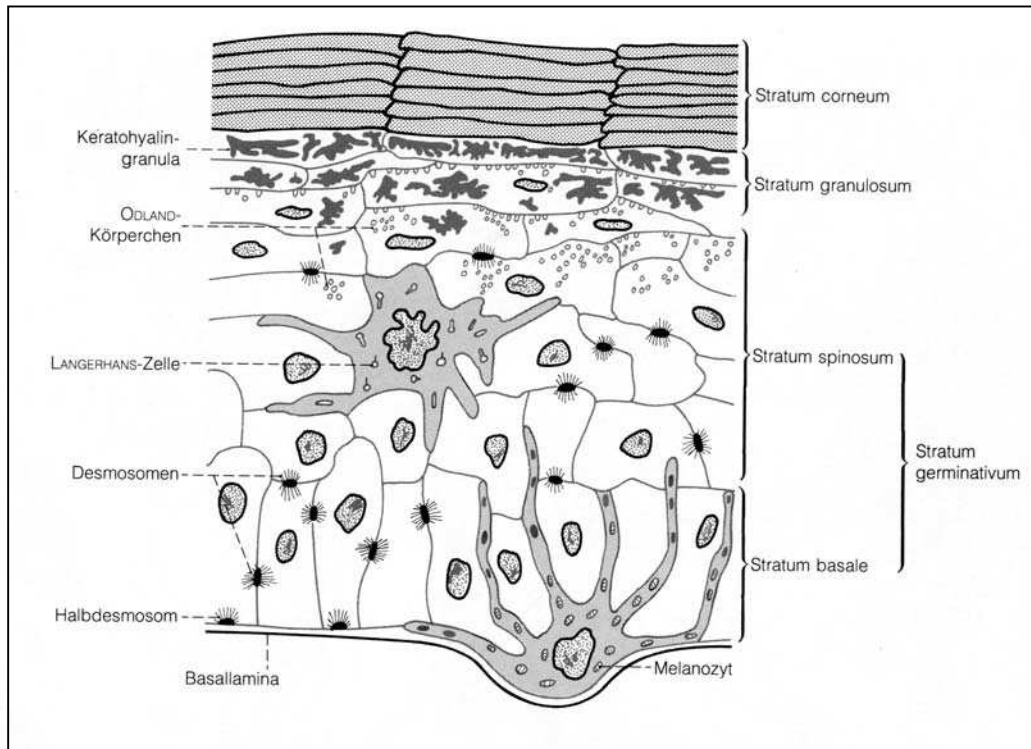


Abb. 1.1 Aufbau der Epidermis; aus Benninghoff, Makroskopische und Mikroskopische Anatomie des Menschen, 1994.

Das Integument der Vertebraten ist das Grenzorgan des Organismus zur Umwelt und besitzt als solches Kontakt- (Sinnes-) und Schutzfunktion.

Die *Kontaktfunktionen* ergeben sich aus dem Vorhandensein der Rezeptoren für Temperatur-, Schmerz- und Tastreize, welche Informationen aus der Umwelt erkennen und an die Sinneszentren weiterleiten.

Die Schutzfunktionen der Haut sind von sehr komplexer Natur:

Mechanischer Schutz: Das straffe reißfeste Fasergeflecht der Dermis gleicht scherende Kräfte aus, die aus den Bewegungen und Formveränderungen des Körpers hervorgehen. Das subcutane Fett fängt als Schutzpolster Druckkräfte auf, verteilt sie und mildert sie dadurch ab.

Thermoregulation: Die Haut besitzt eine äußere (das abortive Haarkleid) und eine innere Isolationsschicht (das subkutane Fett). Zur Wärmeregulation dient ein fein regulierbares Kühlsystem (Gefäßsystem und Schweißdrüsen).

Aktinischer Schutz: Schutz gegen Ultraviolettstrahlung durch eine Melaninpigmentierung.

Schutz gegen Infektionen: Die Hautoberfläche ist aufgrund ihres trockenen und sauren Milieus keimfeindlich.

Immunologischer Schutz: Die in der Epidermis als Symbionten befindlichen Langerhans-Zellen stellen den peripheren Teil des Immunsystems dar, sie besitzen die Fähigkeit der Antigenverarbeitung und -präsentation.

Barrierefunktion: Diese wesentliche Funktion der Haut bewirkt die Unterbindung des Stoffaustausches zwischen Organismus und Umwelt und verhindert daher das Austrocknen des Körpers sowie das Eindringen körperfremder Substanzen.

Veränderungen der äußeren Umweltbedingungen beeinflussen die innere Homöostase und werden deshalb durch entsprechende Gegenregulationen kompensiert. Dabei werden die oben beschriebenen Umweltreize in der Haut in biochemische und elektrische Signale übersetzt, die zu lokalen oder systemübergreifenden Reaktionen führen, z.B. zu Veränderungen der Proliferation, Differenzierung oder Pigmentierung der Haut (Benninghoff, 1994).

1.2. Die Epidermis

Die Epidermis ist aus horizontalen Zellschichten aufgebaut, die aufgrund der verschiedenen Differenzierungsstadien der Keratinozyten in vier Schichten unterteilt werden: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum.

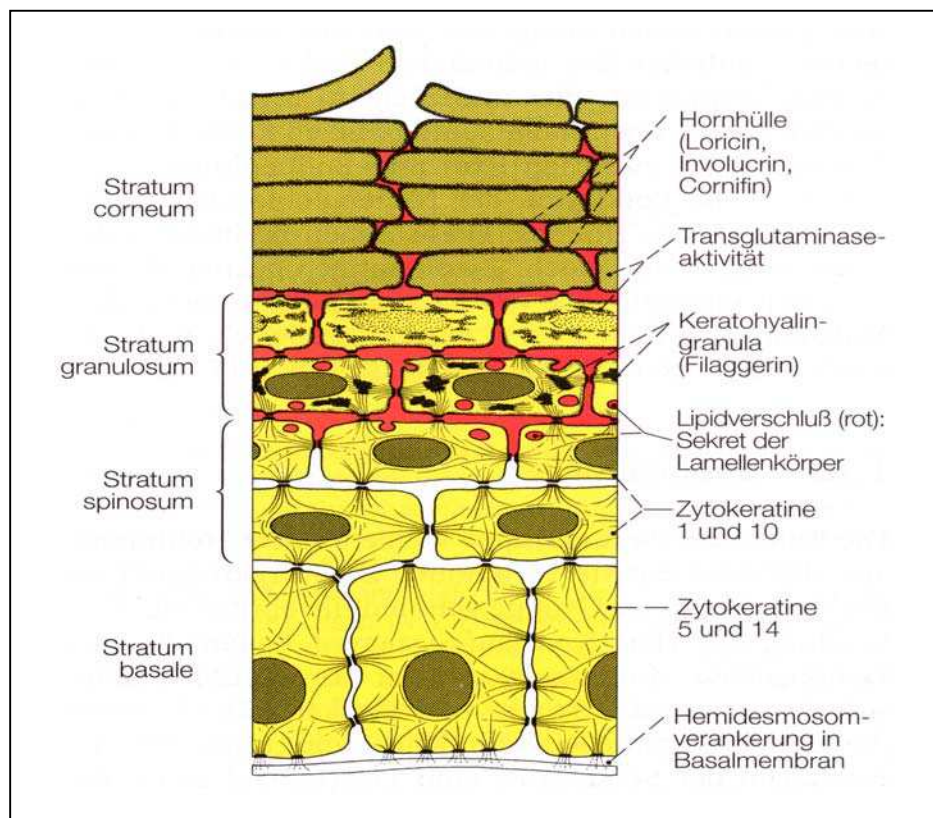


Abb. 1.2 Funktionelle Histologie des verhornten Plattenepithels; aus Benninghoff, Makroskopische und Mikroskopische Anatomie des Menschen, 1994.

1.2.1. Die Basalzelle

Die innerste Schicht der Epidermis bildet das *Stratum basale*, dessen zylindrische Zellen mit der Basallamina über Hemidesmosomen verbunden sind. Innerhalb dieser Schicht finden sich teilungsfähige Stammzellen, die nicht der terminalen Differenzierung der übrigen Keratinozyten unterliegen. Durch die Teilung einer Stammzelle können zwei Subpopulationen entstehen: Entweder neue Stammzellen oder Amplifikationszellen. Die Amplifikationszellen können ihrerseits noch 3-5 Mitosen durchlaufen. Die daraus hervorgehenden Zellen sind nicht mehr teilungsfähig und werden zu terminal differenzierenden Keratinozyten, wie letztendlich die Amplifikationszelle auch (Watt, 1993). Die basalen Keratinozyten synthetisieren die Zytokeratine 5/14. Diese Zytokeratine binden sowohl an Desmosomen als auch an Hemidesmosomen. Die Struktur der basalen Zytokeratine ist fein vernetzt. Während des Differenzierungsprozesses werden die basalen Zytokeratine abgebaut und durch hochmolekulare Zytokeratine (K1/10) ersetzt, welche eine weniger stark vernetzte Struktur aufweisen (Fritsch, 1998).

1.2.2. Der Verhornungsprozess

Zwischen *Stratum basale* und *Stratum granulosum* liegt das aus 2-5 Zelllagen bestehende *Stratum spinosum*. Hier tritt eine allmähliche horizontale Umorientierung der Zellachse ein (Die Keratinozyten nehmen automatisch die oberflächensparendste Form eines Polyeders ein). Zudem kommt es zu einer vermehrten Bildung von Desmosomen mit einstrahlenden Bündeln von Keratinfilamenten, die überwiegend aus 1/10 Zytokeratinen bestehen.

Die Verhornung beginnt im *Stratum granulosum*, einer ein- bis dreischichtigen Zone, deren Zellen durch den Gehalt an basophilen Keratohyalingranula und membrane-coating granules (Bereiter-Hahn, et al., 1998) charakterisiert sind. Die Keratohyalingranula stellen Aggregate von Zytokeratinfilamenten dar, die in eine homogene, elektronendichte Masse eingebettet sind. Die Hauptkomponente der Granula ist das Protein Filaggrin. In dieser Zellschicht platten sich die Zellen ab, werden starr, immobil und in einer streng geometrischen Anordnung aneinander fixiert.

In der an das *Stratum granulosum* anschließenden Zellschicht des *Stratum corneum* (15-25 Zelllagen) lösen sich die Keratohyalingranula auf, und das Filaggrin verteilt sich im gesamten Zytoplasma, was zu einer starken, irreversiblen Vernetzung der Keratinfilamente führt. Zusätzlich wird eine Transglutaminase aktiviert, die sowohl im Zytoplasma als auch an der Plasmamembran der Zellen lokalisiert ist. Das Enzym katalysiert die Quervernetzung zwischen Lysin- und Glutamin-Seitengruppen von Proteinen. An der Innenseite der

Zellmembran entsteht dadurch eine stark quervernetzte Proteinschicht, die Hornhülle (cornified envelope). Die drei quervernetzten Hauptkomponenten der Hornhülle sind das Loricin, Involucrin und Cornifin. Durch weitere Quervernetzungsreaktionen und den Abbau der Zellorganellen und des Zellkerns sowie der meisten Zellproteine entsteht die Hornsubstanz. Diese besteht im wesentlichen aus stark quervernetzten Zytokeratinfilamenten und der Hornhülle. Die cornified envelopes sind resistent gegen die meisten Chemikalien (Green, 1976), wie Detergenzien, Säuren, Laugen und organische Lösungsmittel, jedoch nicht gegen proteolytische Enzyme. Die terminale Differenzierung der Keratinozyten findet synchron statt, so dass eine sogenannte Säulenarchitektur entsteht. D.h. die hexagonalen, plättchenartigen, sich überlappenden Zellen sind mehr oder weniger übereinander gestapelt. Durch Zerfall der Zementsubstanz zerbröckelt die Hornschicht in ihrer oberflächlichsten Lage zu Einzelzellen bzw. Zellaggregaten, die abschuppen (Benninghoff, 1994).

Eine konstante Dicke der Epidermis wird durch das Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose bewirkt (Budtz, 1989). Diese Prozesse spielen auch bei regenerativen Vorgängen in der Epidermis eine wichtige Rolle (Pinkus, 1952).

1.2.3. Der Lipidverschluss

Die Epithelzellen des Stratum granulosum und des angrenzenden Stratum spinosum enthalten Sekretgranula, die mit Lipiden und Enzymen gefüllt sind und wegen des Lipidreichtums eine lamelläre Struktur besitzen (Lamellenkörperchen, Odland-Körperchen). Der Inhalt wird durch Exozytose in den Interzellularspalt abgegeben und bildet die zementartige Kittsubstanz der Hornschicht. Dieser Lipidverschluß erschwert die Resorption von hydrophilen chemischen Verbindungen, während hydrophobe Verbindungen die Epidermis viel besser durchdringen können (Benninghoff, 1994).

1.3. Die Bedeutung der mechanischen Reizung

Die Wirkung einer mechanischen Stimulierung für den Metabolismus und die Bewegung der Zellen ist bereits für verschiedene Zelltypen beschrieben worden (Bereiter-Hahn, 1987, 1991). Hierzu einige Beispiele:

Aus naheliegenden Gründen wurden besonders viele Untersuchungen an Endothelzellen durchgeführt: Diese Zellen sind in vivo stetigen Scherkräften ausgesetzt, welche durch die Strömung des Blutes hervorgerufen werden (Ando, 1996). Endothelzellen sind hoch adhärent und stark differenziert (organisiertes Zytoskelett, Stressfasern mit fokalen Adhäsionsplaques), deshalb können sie dieser mechanische Beanspruchung standhalten (Ballermann, 1995). Zahlreiche in vivo- und vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass mechanische Kräfte in Form von Scherkräften die Morphologie (Ando, 1996), die Expression der Adhäsionsmoleküle (Morigi, 1995), das F-Aktin-Netz (Malek, 1996) und eine Reihe anderer Funktionen der Endothelzelle modulieren (Ando, 1996).

Darüber hinaus zeigen Studien, dass Dehnungsreize sich proliferationsfördernd auf Hühnerfibroblasten auswirken (Curtis, 1978). Bei Muskelzellen löst eine periodische Dehnung des Substrates sowohl richtungsorientiertes Wachstum als auch Differenzierung aus (Kada et al., 1999, Sadoshima et al., 1997). Mechanische Spannung führt zudem zu einer Veränderung in der Verteilung des Zytoskeletts von Osteoblasten (Carvalho, 1995).

In vivo existieren einige Indizien für einen Zusammenhang zwischen mechanischer Reizung und Reaktivität der Haut:

1. Die Haut ist aufgrund ihrer Lage stetigen Druck- und Dehnungsreizen ausgesetzt, die durch Berührung und Bewegung hervorgerufen werden.
2. Während der Schwangerschaft nimmt die Abdominalhaut zu.
3. Durch Einsetzen eines Skin Expanders, Muskelaufbau, Ödeme oder Wachstum von kutanen Tumoren kommt es zu einer dehnungsbedingten Zunahme der Haut.
4. Eine länger anhaltende Druckexposition führt an diesen Stellen zu einer Verdickung der Epidermis = Akanthose, Schwielenbildung
5. Äußere mechanische Stimulationen können den Ausbruch latent vorhandener Erkrankungen der Haut auslösen (= Köbner Phänomen). Das bekannteste aus vielen Beispielen ist das vermehrte Auftreten der Psoriasisläsionen an Knien und Ellenbogen, die starken Druck- und Dehnungsreizen ausgesetzt sind.

Trotz dieser Tatsachen sind die Auswirkungen von mechanischen Stimuli auf Keratinozyten noch recht unerforscht. Studien von Kippenberger, Görmär und Hofmann geben allerdings Hinweise, dass mechanische Stimuli auch in vitro für Keratinozyten von Bedeutung sind:

1. Eine mechanische Dehnung führt zu einer Proliferationssteigerung der Keratinozyten (Kippenberger et al., 1999, 2000A, 2000B).
2. Mechanische Dehnung aktiviert die Mitogen-aktivierten Proteinkinase EKR1/2 und JNK (Kippenberger et al., 2000A).
3. Das β 1-Integrin vermittelte Adhäsionsverhalten von Keratinozyten wird durch die Ligandbesetzung von β 4-Integrinen über einen Inside-Out-Mechanismus reguliert (Kippenberger et al., 2004).
4. Mechanischer Druck fördert die Differenzierung der Keratinozyten. Dies lässt sich an der druckinduzierten Synthese von hochmolekularen Keratinfilamenten und der Involucrin-Synthese belegen (Görmar et al., 1990, 1993).
5. Mechanischer Druck aktiviert den p38-Signalweg (MAPK) in Epithelzellen über Src und die Proteinkinase C (Hofmann et al., 2004).

1.4. Die Signalperzeption

1.4.1. Zelladhäsionsmoleküle

Zelladhäsionsmoleküle (CAM) sind Rezeptoren der Zelloberfläche, die eine Bindung von Zellen an andere Zellen oder an die extrazelluläre Matrix vermitteln. Sie stellen dadurch nicht nur den für jeden mehrzelligen Organismus grundlegenden statischen Zusammenhalt der Gewebe und Organe her, sondern ermöglichen auch dynamische Vorgänge, z.B. im Rahmen der Morphogenese, der Wundheilung, von Entzündungsreaktionen, aber auch der Metastasierung. Manche CAM wirken gleichzeitig als Signaltransduktionsrezeptoren, d.h. bei Ligandbindung werden Signale zur Proliferation und/oder Differenzierung gesetzt. Für die Haut bedeutsame Klassen der CAM sind die Cadherine und Integrine (Abb. 1.3).

Die bekannten CAM sind zahlreich. Es sind vorwiegend transmembrane Proteine, deren extrazellulärer Anteil über definierte Domänen an die betreffenden Liganden bindet und deren intrazellulärer Anteil im Zytoplasma verankert ist. Bei Cadherinen und Integrinen, die großen Zugkräften ausgesetzt sind, erfolgt die Verankerung durch spezielle Verbindungsmoleküle (Linkerproteine – z.B. Talin, Vinkulin, Aktinine) am Zytoskelett. Cadherine und Integrine sind konstitutiv exprimiert. Bindungspartner der Cadherine ist dasselbe Molekül am Gegenüber (homotypische Bindung); der der Integrine ein andersartiger Ligand (heterotypische Bindung) (Tab. 1.1). Die Bindung vieler CAM wird durch Kalziumionen (oder andere divalente Kationen) reguliert; bei Cadherinen ist die Bindungsstärke konstant, bei Integrinen durch exogene oder endogene Signale regulierbar (Fritsch, 1998).

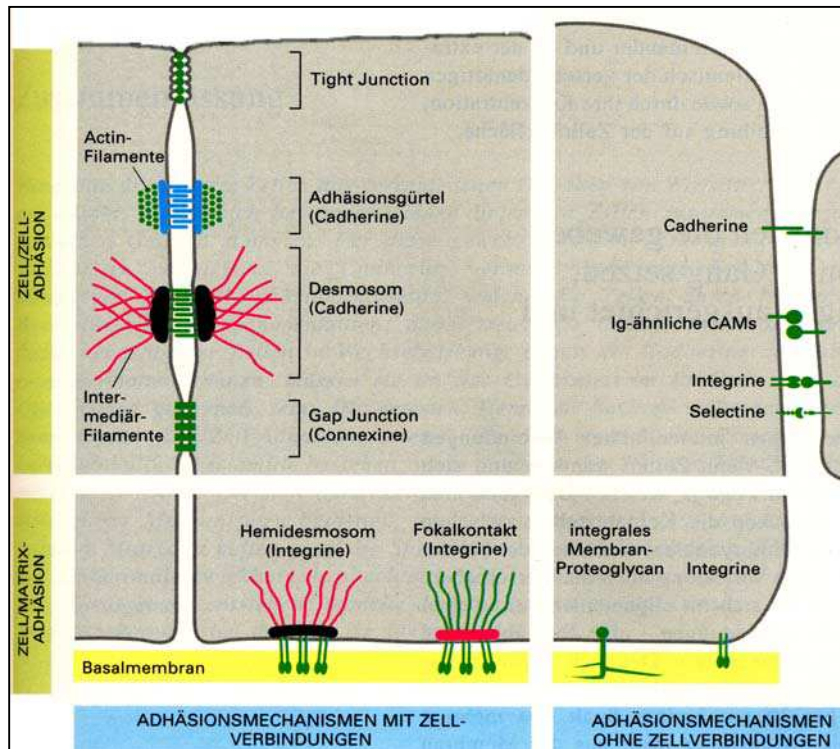


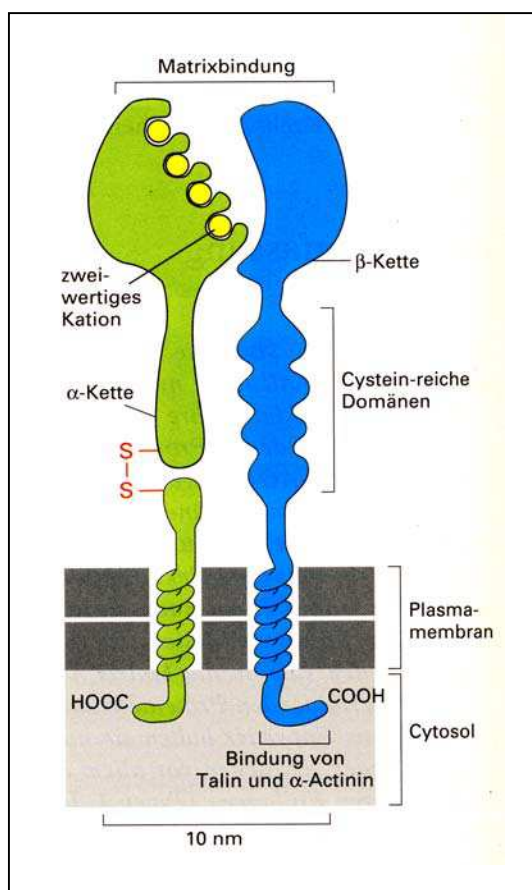
Abb. 1.3 Zusammenstellung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen; aus Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995.

Verbindung	Transmembrane Verbindungsproteine	Extrazellulärer Ligand	Zytoskelett-Assoziationen	Einige intrazelluläre Anheftungsproteine	homophil oder heterophil	Ca ²⁺ - oder Mg ²⁺ -Abhängigkeit
Zell-Zell-Adhärenz	Cadherine (E-Cadherine)	Cadherine in der Nachbarzelle	Aktin-Filamente	Catenine, Vinkulin, α -Aktinin, Plakoglobin	homophil	ja
Desmosomen	Cadherine (Desmogleine und Desmocolline)	Cadherine in der Nachbarzelle	Intermediär-Filamente	Desmoplakine, Plakoglobin	homophil	ja
Fokalkontakte	Integrine	Proteine der Extrazellulären Matrix	Aktin-Filamente	Talin, Vinkulin, α -Aktinin	heterophil	ja
Hemidesmosomen	Integrine ($\alpha_6\beta_4$)	Proteine der Basalmembran	Intermediär-Filamente	Desmoplakin-ähnliche Proteine	heterophil	ja

Tab. 1.1 Haftverbindungen zusammengestellt; aus Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995.

1.4.1.1. Integrine

Integrine stellen die größte Gruppe der CAM und sind universell an allen Körperzellen außer an Erythrozyten vorhanden. Es sind heterodimere, transmembrane Glycoproteine, die aus je einer α - und β -Kette kombiniert sind (Abb. 1.4). Aus einer Gesamtheit von ca. 8 β - und 16 α -Ketten – nur bestimmte Kombinationen sind möglich – sind bislang 21 Integrine bekannt (Tab. 1.2). α - und β -Ketten sind nicht kovalent aneinander gebunden und nur als komplettes Dimer aktiv; β -Ketten sind zu 40-50% homolog; α -Ketten sind heterogener. Die Ligandenspezifität wird von beiden Ketten vermittelt, eine größere Rolle spielt allerdings die α -Kette. Viele Integrine haben mehrere Liganden. Die Bindung zwischen Integrinen und ihren Liganden hängt von extrazellulären zweiwertigen Ionen ab (Ca^{2+} oder Mg^{2+}). Integrine werden nach ihren β -Ketten in insgesamt 8 Subklassen eingeteilt; die wichtigsten sind die $\beta 1$ -, $\beta 2$ - und $\beta 3$ -Integrine sowie einzelne Integrine anderer Subklassen. $\beta 1$ -Integrine (früher VAL – „very late antigens“) vermitteln vorwiegend Zell-Matrixadhäsionen. In der Epidermis werden $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 3\beta 1$ -Integrine konstitutiv an den basalen Keratinozyten exprimiert, vorwiegend an deren Lateralseite. $\alpha \nu \beta 1$ - und $\alpha \nu \beta 3$ -Integrine wirken entscheidend bei der Wundheilung und Reepithelisierung mit. Wichtige Integrine anderer Subklassen sind $\alpha 6\beta 4$ - konstitutiv in Hemidesmosomem exprimiert – sowie $\alpha \nu \beta 5$, $\alpha \nu \beta 6$ und $\alpha 4\beta 7$ – Bindung an Fibronectin und Vitronectin; Wundheilung (Fritsch, 1998).



Dimer	Alternative Bezeichnung	Ligand
$\alpha 2\beta 1$	VLA2, CDw49b/CD29	Laminin, Kollagen
$\alpha 3\beta 1$	VLA3, CDw49c/CD29	Laminin, Fibronectin, Kollagen
$\alpha 5\beta 1$	VLA5, CDw49e/CD29	Fibronectin
$\alpha 6\beta 1$	VLA6, CDw49f/CD29	Laminin
$\alpha \nu \beta 1$	CD51/CD29	Vitronectin, Fibronectin
$\alpha 6\beta 4$	CDw49f	Laminin

Tab. 1.2 Integrine der Keratinozyten und ihre Liganden; verändert nach Defilippi Signal transduction by integrins, 1997.

Abb. 1.4 Untereinheiten-Zusammensetzung eines Integrins, das auf der Zelloberfläche als Matrix-Rezeptor dient. (Schematische Darstellung); Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995.

Eigenschaften der Integrine:

◆ Integrine binden ihren Liganden mit relativ geringer Affinität und sind dafür auf der Zelle in sehr hoher Konzentration zu finden. Die Anheftung erfolgt also über viele schwache Adhäsionsreaktionen nach dem Klettverschluss-Prinzip. So können die Zellen ihre Umgebung erkunden, ohne den Kontakt zu verlieren (Alberts et al., 1995).

◆ Die Affinität der Integrine kann durch Konformationsänderung reguliert werden (Abb. 1.5): Die Ligand-Bindungsstellen sind in inaktivem Zustand (I_1) verborgen und werden in aktivem Zustand (I_2) enthüllt. In der Abwesenheit von divalenten Kationen befinden sich Integrine im inaktiven Zustand. Bei Bindung von Kationen (Mn^{2+} oder Mg^{2+}) wird das Gleichgewicht zwischen I_1 und I_2 zugunsten des I_2 -Zustandes verschoben. Ca^{2+} hat bei den meisten Integrinen einen inhibitorischen Effekt auf die Ligand-Bindung und verschiebt das Gleichgewicht zugunsten des I_1 -Zustandes. Das Gleichgewicht kann weiterhin durch aktivierende Antikörper und in vivo vermutlich durch zellspezifische Faktoren beeinflusst werden. Bindet ein aktives Integrin einen Liganden, verursacht das eine weitere Konformationsänderung (I_3). Diese beinhaltet die vermehrte Präsentation der Epitope für Ligand-induzierte Bindungsstellen (ligand induced binding site epitope = LIBS) und die reduzierte Zurschaustellung der Epitope für Ligand-verminderte Bindungsstellen (ligand attenuated binding site epitopes = LABS). Antikörper, die LIBS-Epitope erkennen, verschieben das Konformations-Gleichgewicht zugunsten des ligandbesetzten Zustandes (I_3) und stimulieren dabei die Ligandbindung. Demgegenüber verschieben Antikörper, die LABS-Epitope erkennen, das Konformations-Gleichgewicht zugunsten des I_2 -Zustandes und inhibieren damit die Ligandbindung.

Nur der Teil des Liganden (schwarzes Rechteck), der innerhalb der Ligandbindungs-Tasche liegt, ist in der Abbildung dargestellt (Mould, 1996)

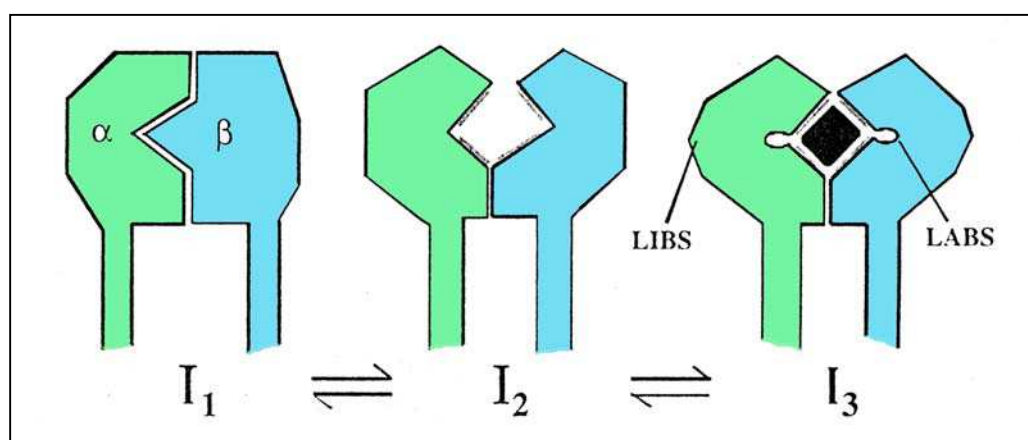


Abb. 1.5 Schematisches Modell der Modulation der Integrin Affinität durch Konformationsänderungen; verändert nach Mould, 1996.

- ◆ Integrine wirken als Integratoren: Sie vermitteln die Wechselwirkungen zwischen Zytoskelett und extrazellulärer Matrix. Die meisten Integrine sind mit Bündeln von Aktinfilamenten verbunden. Eine Ausnahme ist das hemidesmosomale $\alpha 6\beta 4$ -Integrin, das an Intermediärfilamente bindet. Wenn ein typisches Integrin seinen Liganden in der Matrix gefunden hat, werden an die cytoplasmatische Domäne der β -Kette sogenannte Anheftungsproteine angelagert, die das Integrin mit dem Aktin der Zellrinde verbindet. Diese Anheftung an das Zytoskelett trägt dazu bei, dass sich die Integrine in den Fokalkontakten (Abb. 1.6 + Tab. 1.1) sammeln und starke gemeinsame Bindungen erzeugen (Alberts et al., 1995).
- ◆ Die Wechselwirkung zwischen extrazellulärer Matrix und Zytoskelett funktioniert in beide Richtungen (Alberts et al., 1995) (Abb.1.6).
- ◆ Eine Phosphorylierung von Tyrosin oder Threonin 788-789 (Suzuki et al., 2003) an der cytoplasmatischen Domäne stört die Fähigkeit der Integrine an das Zytoskelett zu binden; damit wird auch die Bindung zwischen Integrin und Matrix lockerer (Alberts et al., 1995).
- ◆ Integrine können intrazelluläre Signalkaskaden auslösen: Die Zusammenballung der Integrine in Fokalkontakten kann im Zellinneren mehrere Signalübertragungswege aktivieren. Z.B. werden mehrere intrazelluläre Proteine an Tyrosinresten phosphoryliert, wie die Focal Adhesion Kinase (=Tyrosinkinase) (Alberts et al., 1995) (Abb.1.6).

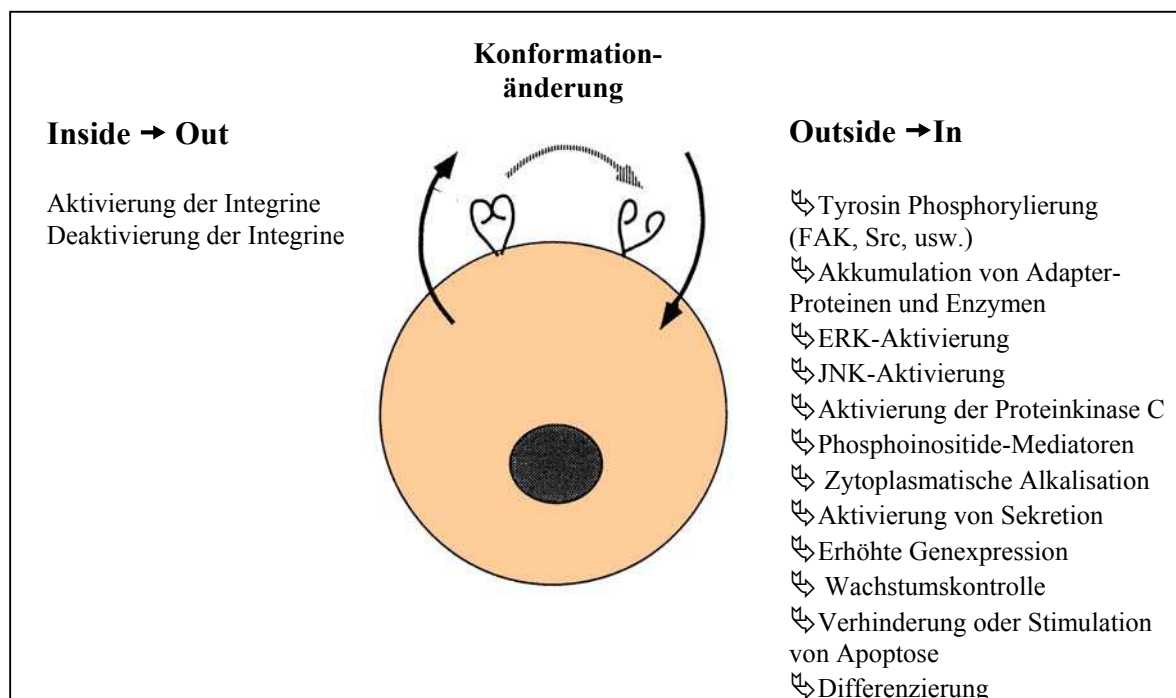


Abb. 1.6 Die Integrin-Rezeptoren unterliegen Konformationsänderungen: Inaktiv (geschlossenes Symbol) und Aktiv (offenes Symbol). 1. Die Signalverarbeitung durch Integrine kennt zwei Formen: Die Regulierung der Affinität und der Konformation von Rezeptoren aus dem Zellinneren (inside-out signaling). 2. Das Auslösen intrazellulärer Signaltransduktionewege durch die Besetzung der Integrine durch ihren Liganden (outside-in signaling). (Abbildung: Hynes, 1992; Text: Yamada, 1995).

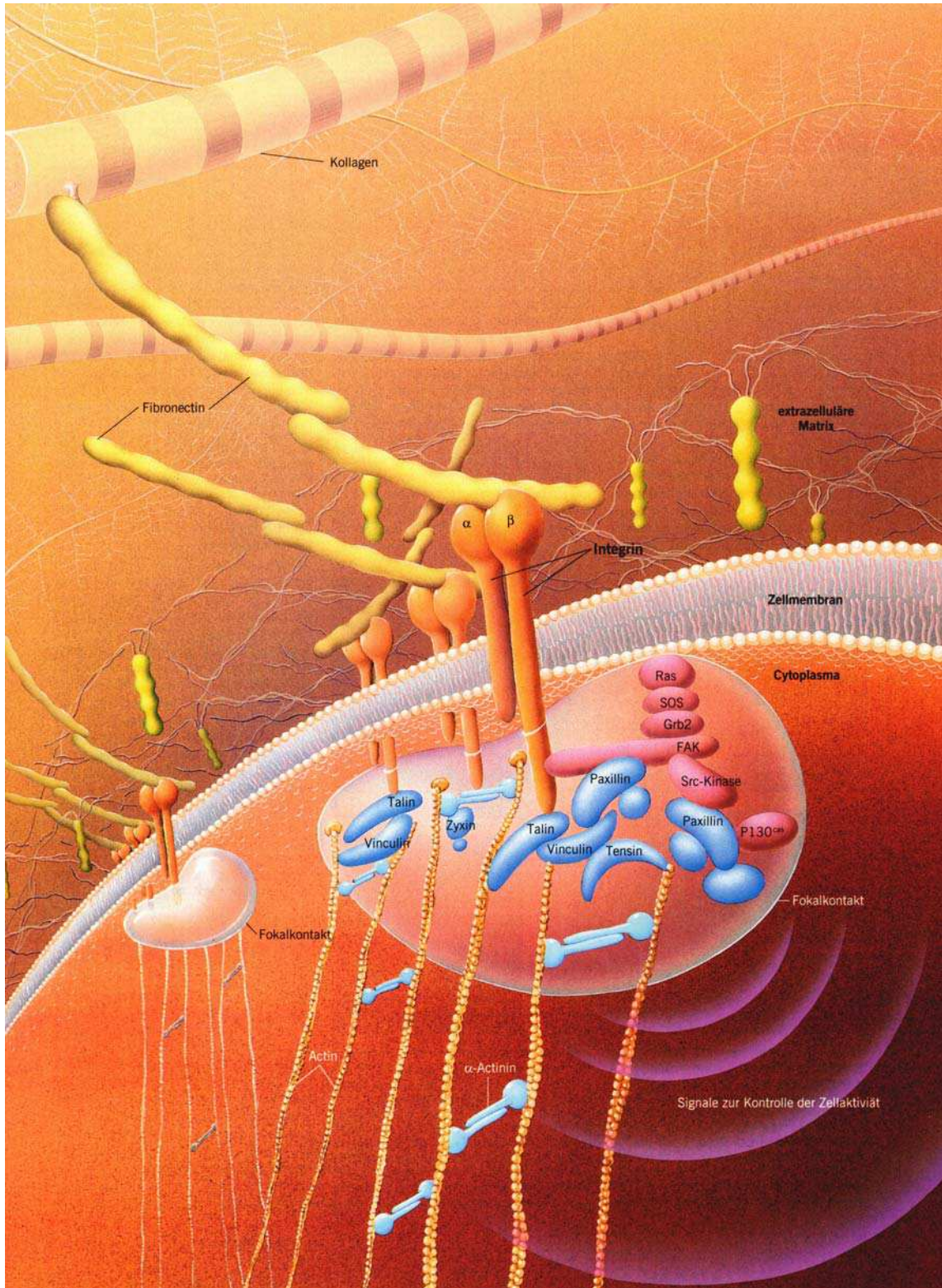


Abb. 1.7 Integrine (keulenförmige orangefarbene Doppelmoleküle) binden die Zellen in die Umgebung ein. Sie durchspannen die Zellmembran, wobei sie sich oft zu Gruppen ansammeln. Ihr äußeres Ende verankert sich an der Matrix, ihr inneres am Zytoskelett. Dazu bilden sich unter Beteiligung vieler anderer Moleküle komplexe, hochorganisierte Fokalkontakte aus (bläuliche Blase), die je nach Funktion verschieden aufgebaut sein können. Sie umfassen diverse Komponenten des Zytoskeletts wie Aktinfasern und damit assoziierte Proteine (blau), darunter Talin und Vinculin, welche das Integrin am Aktingerüst ankoppeln. Integrine übermitteln auch Botschaften von außen nach innen (hier dargestellt) und umgekehrt oder helfen dabei. Daran sind noch verschiedene andere Moleküle im Fokalkontakt beteiligt (rötlich). Horwitz; Spektrum der Wissenschaft; 1/1998.

1.4.1.2. Integrine und Mechanotransduktion

Integrine werden schon seit langem im Zusammenhang mit der Transduktion mechanischer Reize diskutiert (Ingber, 1991, 1997, Shyy et al., 2001). Die Signaltransduktionsreaktionen als Antwort auf eine mechanische Stimulierung haben viele Gemeinsamkeiten mit den Prozessen der Zelladhäsion, wie z.B. die Zunahme der Tyrosin Phosphorylierung von Proteinen der Fokalkontakte. Dies deutet darauf hin, dass Integrine als Mechanotransducer fungieren können (Shyy et al., 1997).

Weitere Studien belegen eine Beteiligung von Integrinen an der Übermittlung mechanischer Kräfte:

- ◆ Zellen, die sich über eine große Fläche ausbreiten können, überleben besser und proliferieren schneller als Zellen mit abgerundeter Form. Dies zeigt folgendes Experiment: Zellen werden verschiedene Muster adhäsiver ECM-Punkten angeboten; entweder ein einzelner großer Punkt oder mehrere kleine Punkte mit nicht-adhäsiven Zwischenräumen. Die kleinen Punkte zusammen ergeben die gleiche Fläche wie der große einzelne Punkt und sprechen deshalb dieselbe Menge an Integrinen an. Jedoch die Zellen, die an viele kleine Adhäsionspunkte andocken können, haben nur eine geringe Tendenz in Apoptose überzugehen (Ruoslahti et al., 1997).

- ◆ Eine mechanische Stimulierung verursacht eine Reorganisation der Integrin-Verteilung im Vergleich mit unstimulierten Zellen (Calvalho et al., 1996).

- ◆ Eine einfache Integrin-Aggregation löst eine lokalisierte transmembrane Akkumulation von ca. 20 Signaltransduktionsmolekülen, wie pp125^{FAK}, Rho, Rac, Ras, Raf, MEK, ERK und JNK, aus (Miyamoto et al., 1995).

- ◆ Eine Methode, die Beteiligung von Integrinen an der Mechanotransduktion nachzuweisen, sind Magnet-Twisting-Versuche: Magnetische Kügelchen werden mit ECM-Komponenten (Fibronektin, Kollagen, usw.) beschichtet, die dann an die Integrine adhäreren. Nachfolgend werden die Kügelchen mit einem Magneten gedreht. D.h. der mechanische Stress wird dabei direkt an den Zell-Oberflächen-Rezeptoren angelegt. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass β 1-Integrine die Formation von Fokal-Kontakten induzieren und eine kräfteabhängige Versteifung des Zytoskeletts unterstützen. Diese Reaktion des Zytoskeletts nimmt im direkten Verhältnis zum angelegten Stress zu und fordert intakte Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Aktin-Filamente (Wang et al., 1993). Diese drei Hauptelemente des Zytoskeletts befinden sich im Gleichgewicht der zellulären Kräftebalance. Wird das Gleichgewicht durch extrazelluläre mechanische Reize gestört, kommt es zu einer kräfteabhängigen Umverteilungen innerhalb des Zytoskeletts (Chicurel et al., 1998). Dadurch

kann die Mechanotransduktion gleichzeitig an mehrere Orten innerhalb der Zelle vermittelt werden (Wang et al., 1993). Somit liefern die molekularen Verbindungen zwischen Integrinen, zytoskelettalen Filamenten und nuklerärem Gerüst einen direkten Weg der Signalübertragung durch die Zelle. Dieser Mechanismus ruft einen integrierten Wechsel der Zell- und Nukleusstruktur als Antwort auf Änderungen der Adhäsivität oder mechanischen Eigenschaften der ECM hervor (Maniotis et al., 1997).

- ◆ Humane Fibroblasten besitzen die Fähigkeit, dreidimensionale Kollagengele umzuorganisieren und zu kontrahieren. An diesem Prozess sind $\alpha2\beta1$ -Integrine beteiligt, denn diese sind während des Kontraktionsprozesses selektiv hochreguliert und kehren nach vollendeter Kontraktion wieder zum Basiswert zurück. Darüber hinaus inhibieren funktionsblockierende Antikörper gegen $\alpha2\beta1$ -Integrine die Gelkontraktion (Klein et al., 1991).

- ◆ Bei Herzmuskelzellen wird die Bildung und Erhaltung von Fokalkontakten durch mechanischen Zug beeinflusst: Der mechanische Stress stabilisiert den Level von $\beta1$ -Integrinen sowie die Bildung und Erhaltung von Fokalkontakten. Eine Stressverminderung führt zum Verlust von $\beta1$ -Integrine auf der Zelloberfläche und zum Abbau der Fokalkontakte (Sharp et al., 1997).

- ◆ Bei einer mechanischen Stimulierung von Integrinen reagieren Osteoblasten mit einer Akkumulation zytoskelettaler Proteine (Vinculin + Talin), und zwar an Stellen, an denen mechanischer Stress an den Oberflächen-Integrinen ausgeübt wurde (Rychly et al., 1998).

- ◆ Endothelzellen zeigen vielfältige Antworten auf Scherkräfte, wie eine schnelle Umformung von Fokalkontakte (Ishida et al., 1996) und eine erhöhte Integrin Expression (Urbich et al., 2000). Funktionelle Konsequenzen davon sind verstärkte Anheftung und eine vermehrte Aktivität von ERK1/2 als Antwort auf die Anheftung. Allerdings sind dafür RGD-sensitive Integrine notwendig (Urbich et al., 2000).

1.4.1.3. Cadherine

Cadherine sind eine weitere Gruppe von transmembranen Glykoproteinen (Abb. 1.7), die eine Wechselwirkung zwischen den Aktin-Netzwerken der beteiligten Zellen herstellen. Sie bewirken eine homophile kalziumabhängige Adhäsion der Zellen aller epithelialer Organe und des Endothels. 11 Cadherine sind bisher bekannt, zwischen diesen bestehen Aminosäuresequenzhomologien von 40-60%. Sie sind diffus über die Zelloberfläche verteilt, in Adhäsionsgürteln jedoch verdichtet. In der Epidermis finden sich sowohl die „klassischen“ – vorwiegend E- und P-Cadherine – als auch die desmosomalen Cadherine (Tab. 1.2). Die klassischen Cadherine sind an den Aktin-, die desmosomalen an den Keratinfilamenten verankert. E-Cadherine sind die verbreitetsten epithelialen Cadherine mit einem Molekulargewicht von 120kD (Fritsch, 1998).

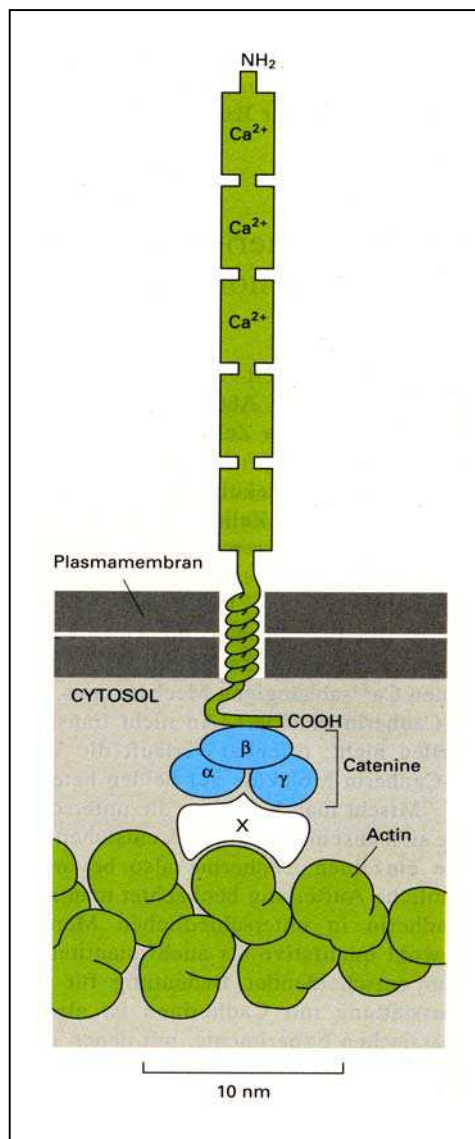


Abb. 1.8 Ein typisches Cadherin-Molekül in schematischer Darstellung; aus Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995.

1.4.1.4. Cadherine und Mechanotransduktion

Auch für Cadherine wurde schon eine Beteiligung an der Mechanotransduktion nachgewiesen:

- ◆ In Endothelzellen wird die Transduktion des Scherkraft-Signals zum Teil von VE-Cadherinen vermittelt. Denn in Endothelzellen, denen diese Cadherine fehlen, führen Scherkräfte nicht zu einer nukleären Translokation des VEGF-Rezeptors² und zur Phosphorylierung von Akt und P38 (Shay-Salit et al., 2002).
- ◆ Scherkräfte bewirken in Endothelzellen eine Umverteilung der Proteine VE-Cadherine, α - und β -Catenine und Plakoglobin. Unter Ruhebedingungen sind diese Proteine peripher und bilden ein nahezu kontinuierliches Band um die Zelle an den Zell-Zell-Verbindungen. Nachdem die Zellen 8 Stunden Scherkräften ausgesetzt sind, ist die Verteilung der Proteine punktförmig und tritt nur an den Stellen der beständigen Zell-Anheftung auf. Nach 24-48-Stunden andauernder mechanischer Reizung sind die Proteine wieder peripher lokalisiert und formen ein Band von Adhäsions-Plaques. Diese Plaques sind mit den Enden der Stressfasern verbunden, welche in die laterale Membran einstrahlen (Noria et al., 1999).
- ◆ Bei kultivierten Muskelzellen führt eine zyklische Streckung zu einer dramatischen Hochregulierung der interzellulären Verbindungsproteine, unter anderem der N-Cadherine (Zhuang et al., 2000).
- ◆ In Magnet-Twisting-Experimenten (Erklärung siehe vorne) sollte der Kräftetransfer über Zell-ECM- oder Zell-Zell-Verbindungen getestet werden. Dabei wurde sowohl an Integrinen als auch an Cadherinen die gleiche Stärke an mechanischer Reizung angelegt: Obwohl beide Oberflächenrezeptoren fähig sind, mechanische Kräfte über die Zellmembran zu übermitteln, ist die Versteifung des Zytoskeletts durch einen Integrin-vermittelten Kräftetransfer stärker als durch einen Cadherin-vermittelten (Potard et al., 1997).

1.4.2. EGF-Rezeptor

Viele Rezeptoren für Wachstums- und Differenzierungsfaktoren sind Rezeptor-Tyrosinkinasen, so auch der Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren (EGF-R) (Abb. 1.8). Er durchspannt die Membran einmal und hat einen großen extrazellulären Teil, der glykolisiert ist und EGF bindet. Durch die Bindung des Liganden erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne, was die Dimerisierung des Rezeptors zur Folge hat. Durch die Dimer-Bildung können sich die beiden cytoplasmatischen Domänen gegenseitig an mehreren Tyrosinresten phosphorylieren. Diese Autophosphorylierung von Tyrosinresten dient als Schaltmechanismus, der die vorübergehende Bildung eines intrazellulären Signalkomplexes auslöst, wodurch das Signal in das Innere der Zelle weitergeleitet wird. So sind die autophosphorylierten Tyrosinreste hochaffine Bindestellen für eine Reihe intrazellulärer Signalproteine der Zielzelle, die dadurch oft selbst an Tyrosinresten phosphoryliert werden. Die sogenannten Adapterproteine – wie Shc und Grb2 – besitzen hochkonservierte SH2- und SH3-Domänen, mit denen phosphorylierte Tyrosine erkannt werden können. Diese kleinen Proteine werden dazu verwendet, tyrosinphosphorylierte Proteine – wie aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen – mit anderen Proteinen zu verbrücken. (Alberts et al., 1995). Die Bindung des GDP/GTP exchange-factors Sos an solche Adapterproteine führt zu einer Verknüpfung des EGF-R mit Ras-Proteinen, welche ihrerseits eine Verbindung zu den Signalkaskaden der MAP-Kinasen herstellen (Pawson et al., 1997). Der EGF-R wird nicht nur vom EGF, seinem spezifischen Liganden, sondern auch von einer Reihe anderer Stimuli aktiviert: darunter sind Cytokine, Osmostress und auch mechanischer Stress. In Endothelzellen, Herzmuskelzellen und glatten Muskelzellen können mechanische Reize zu einer Aktivierung des EGF-R sowie anderer Rezeptor-Tyrosinkinasen führen und stromabwärts dieser Signalkaskade die MAPK – speziell ERK1/2 – aktivieren (Naruse et al., 1998; Sadoshima et al., 1997; Iwasaki et al., 2000).

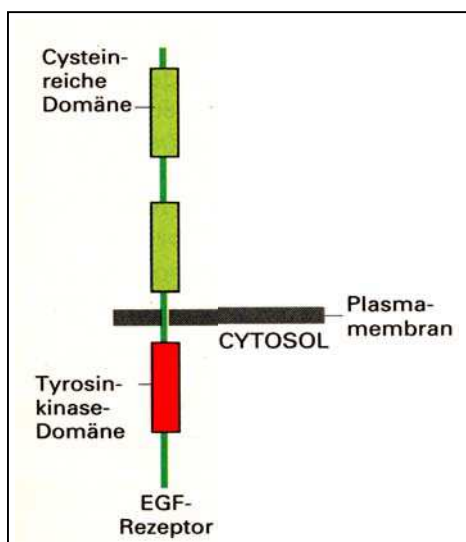


Abb. 1.9 Stark schematische Darstellung des Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren; verändert nach Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995.

1.5. Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK)

Ausgehend von aktivierten Transmembranrezeptoren erfolgt die intrazelluläre Signalleitung für die Regulation von Wachstums- und Differenzierungsreaktionen überwiegend über eine Kaskade von hintereinandergeschalteten Proteinkinasen; d.h. ein extrazelluläres Signal wird von einem Transmembranrezeptor registriert, der Rezeptor wird aktiviert und gibt dann das Signal in Form einer Stimulierung der Tyrosin-Phosphorylierung nachgeschalteter Effektormoleküle weiter. Als zentrale Schaltstation werden hier häufig das Ras-Protein oder andere Mitglieder der Superfamilie der Ras-Proteine benutzt. Bis zum Ras verlaufen die beteiligten Reaktionen überwiegend membranassoziiert ab. Vom Ras-Protein aus wird das Signal mit Hilfe von Proteinkinasen, die in Form einer Kaskade hintereinandergeschaltet sind, ins Zellinnere geleitet. Das Signal kann so bis in den Zellkern hineingetragen werden. Als Resultat wird die Phosphorylierung und Aktivierung von genregulatorischen Proteinen oder Enzymen beobachtet, die Schlüsselreaktionen des Stoffwechsels katalysieren (Davis, 1994; Blumer et al., 1994; Cano et al., 1995; Marshall, 1995). Die Signalkaskade der sequenziell hintereinandergeschalteten Proteinkinasen ist ein sehr flexibles und leistungsfähiges Prinzip, mit dem Signale amplifiziert, diversifiziert und reguliert werden können. Proteinkaskaden sind einer Vielzahl von regulatorischen Einflüssen zugänglich. Auf jeder Stufe einer Proteinkinase-Kaskade ist sowohl eine positive als auch eine negative Regulation möglich, und die Intensität eines Signals kann in weiten Grenzen moduliert werden (Krauss, 2001).

1.5.1. Komponenten der MAPK-Wege

Ein Merkmal der MAPK ist ihr Aktivierungsmechanismus, der aus drei zytoplasmatischen, aufeinanderfolgenden Kinasen aufgebaut ist. Die MAPK stehen am unteren Ende der Signalübertragung und haben häufig zwei weitere Proteinkinasen vorgeschaltet (Abb. 1.9): Die MAPK empfangen das Signal in Form einer aktivierenden Phosphorylierung durch die MAPK-Kinase (MAPKK, MEK, MKK). Die MAPKK ist wiederum Substrat der MAPKK-Kinase (MAPKKK, MEKK) (Kraus, 2001).

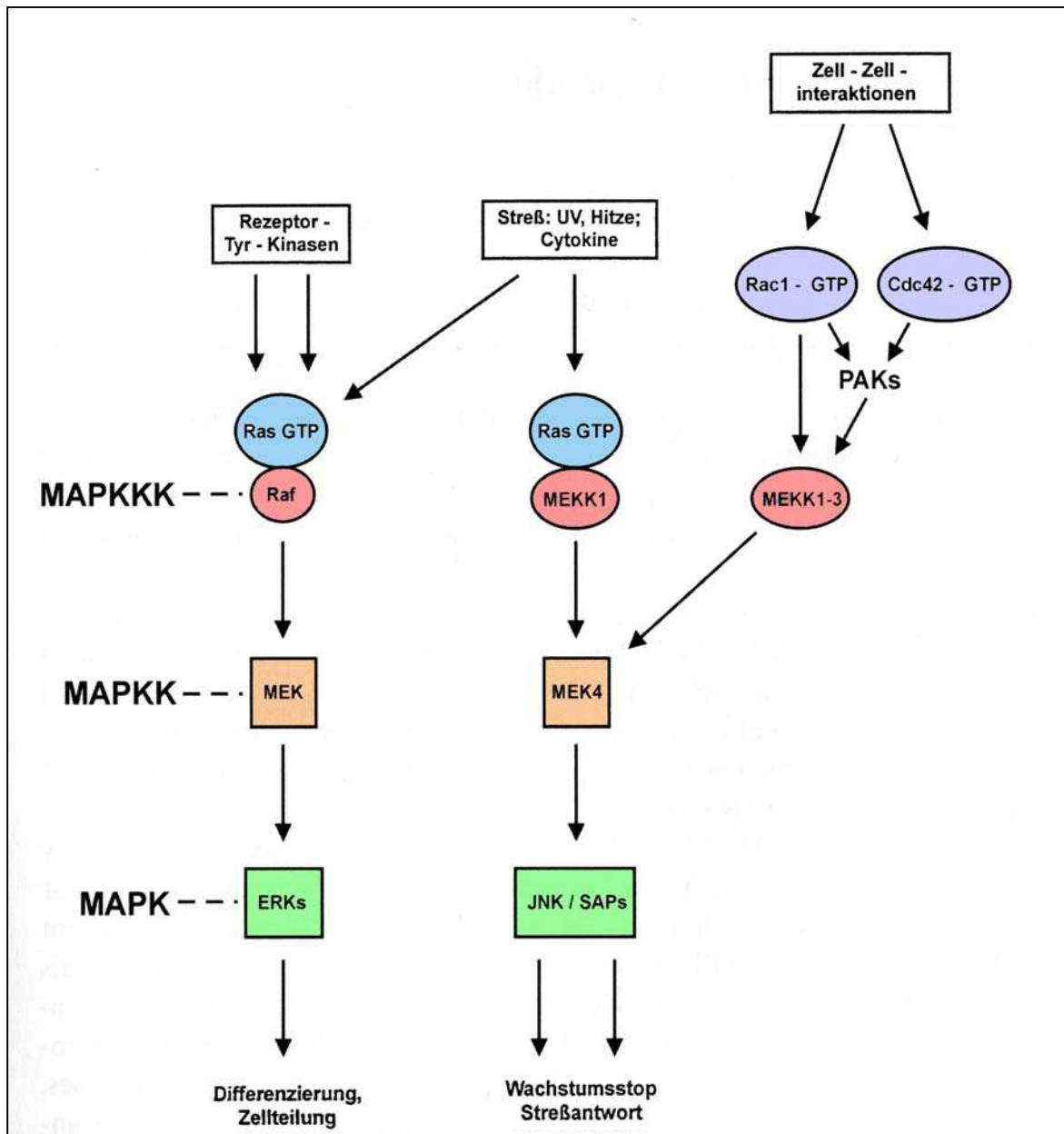


Abb. 1.10 MAPK-Wege in Säugetierzellen. Neben dem Ras/Raf/MEK/ERK-Weg, der über Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert wird und die Zellteilung und Differenzierung anregt, gibt es auch MAPK-Wege, die durch andere Signale, wie z.B. UV-Strahlung oder Hitzestress, aktiviert werden und einen Wachstumsstop und eine Stressantwort auslösen; verändert nach Krauss, *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 2001.

Die MAPK-Familie umfasst bislang vier verschiedene Mitglieder (Davis, 1994; Cobb et al.: 1995), die unter mehreren Namen bekannt sind (Tab.1.3).

MAPK	Synonym
ERK 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2)	p44/42 MAPK
JNK (c-jun NH ₂ -terminal kinase)	SAPK1 (stress-activated protein kinase 1)
p38 MAPK (Isoformen: p38 α , p38 β 1/2, p38 γ , p38 δ)	HOG 1 (homologe Kinase bei <i>S. cerevisiae</i>) SAPK2, SAPK 3a/b, SAPK4, SAPK 5 CSBP (CSAID TM -binding protein)
ERK 5 (extracellular signal regulated kinase 5)	BMK 1 (Big MAPK 1)

Tab. 1.3 MAPK-Familien und deren am häufigsten gebrauchten Synonyme.

Die MAPKs unterscheiden sich hinsichtlich der extrazellulären Stimuli, die zu ihrer Aktivierung führen, und der durch sie nachfolgend ausgelösten Zellantwort.

Die Aktivierung von ERK 1/2 erfolgt vor allem über Wachstumsfaktoren, z.B. Epidermal Growth Factor (EGF) und Phorbol ester. Aber auch Integrine und Cadherine können die Aktivierung dieser Signalkaskade auslösen (siehe unten). Im Gegensatz dazu haben Stress und inflammatorische Zytokine nur einen geringen Effekt auf die Aktivierung von ERK 1/2 (Whitmarsh et al., 1995; Xia et al., 1995). Der ERK 1/2 Signalweg reguliert die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und viele Entwicklungsprozesse der Zelle.

Demgegenüber werden JNK und p38 MAPK vor allem durch externe Stressfaktoren aktiviert, wie Hyperosmolarität, Hitzestress, UV-Bestrahlung, Chemikalien sowie interne inflammatorische Prozesse (Ausschüttung von Zytokinen) und den Tumor Necrosis Factor (TNF) (Canman et al., 1996; Raingeaud et al., 1995). Die Aktivierung dieser Signalwege kann zu Entzündungsreaktionen, Apoptose, Proliferation oder Differenzierung führen.

Nicht jeder MAPK Signalweg läuft separat ab und aktiviert ein spezielles Zielprotein oder einen Transkriptionsfaktor. Die Signalwege sind komplex miteinander verknüpft, und viele Transkriptionsfaktoren werden von allen Mitgliedern der MAPK-Familie aktiviert. So kann der Transkriptionsfaktor Elk-1 von ERK 1/2 (Gille et al., 1995), JNK (Cavigelli et al., 1996; Gille et al., 1995) und p38 MAPK (Raingeaud et al., 1996) durch Phosphorylierung aktiviert werden. Ähnliches gilt für andere Transkriptionsfaktoren, wie ATF-2, c-Jun oder Zielproteine wie Mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 3 (MAPKAPK-3) (Schaefer et al., 1999)

1.5.2. Integrine und MAPK

Schon länger wird dem Ras/MAPK Signalweg für die Kopplung von Integrinen mit der Genexpression und der Kontrolle der Zellproliferation eine Bedeutung zugesprochen. Die ersten Hinweise, dass die Zelladhäsion an die extrazelluläre Matrix den MAPK-Weg aktiviert, wurden von Chen geliefert (Chen et al., 1994). Die Daten zeigten, dass die Adhäsion von Swiss 3T3 – oder REF52 Fibroblasten an Fibronectin, Laminin oder Peptide, welche die Arg-Gly-Asp-Sequenz beinhalten, eine starke und sofortige Aktivierung von ERK 1/2 auslöst. Das setzt eine Integrität des Aktin-Zytoskeletts voraus, denn eine Zerstörung des Aktin-Netztes mit Cytochalasin D verhindert eine adhäsionsinduzierte ERK 1/2 –Aktivierung.

Eine direkte Beteiligung von β 1-Integrinen an der Aktivierung von ERK 1/2 wurde von Morino beschrieben (Morino et al., 1995): Sowohl ein Antikörper-vermitteltes Crosslinking von β 1-Integrinen als auch die Adhäsion von menschlichen Haut-Fibroblasten an Fibronectin führt zu einer schnellen Phosphorylierung von ERK 1/2.

Zhu und Assoian (Zhu and Assoian, 1995) verglichen die Fähigkeit von Wachstumsfaktoren und Komponenten der extrazellulären Matrix ERK 1/2 zu aktivieren. Die Ergebnisse dieser beiden Stimuli zeigten große Unterschiede: Die wachstumsfaktorabhängige Aktivierung von ERK 1/2 ist schnell und vorübergehend (maximal 10 min). Demgegenüber ist die Aktivierung als Antwort auf eine Adhäsion an Fibronectin graduell und beständig (das Maximum wird nach 1 Std. erreicht, die Aktivierung bleibt für wenigstens 3 Std. erhöht) und mit einer Zellausbreitung verbunden. Eine Aktivierung von ERK 1/2 erfolgt auch nach einer Adhäsion an Vitronectin oder Kollagen Typ 4 mit Kinetiken, die der Zellausbreitung auf diesen extrazellulären Matrices entsprechen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine kombinierte Stimulierung der ERK 1/2-Aktivierung durch Integrine und Wachstumsfaktoren für ein optimales Voranschreiten des Zellzyklus notwendig ist.

Der EGF-Rezeptor nimmt eine Schlüsselrolle in der Integration verschiedener Signalsysteme ein. So empfängt der EGF-Rezeptor von Oberflächenrezeptoren mehrerer Klassen Signale, wie von anderen Mitgliedern der Tyrosin-Kinasen-Familie, Zytokin-Rezeptoren, Ionenkanälen, G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren und Integrinen. Dadurch wird er zu einer Stelle im Signalnetzwerk, an der die Signale zusammenlaufen und neu verteilt werden. Diese nichtklassische Art und Weise des Crosstalks von Signalsystemen, bei dem der Rezeptor nicht durch seinen spezifischen Liganden aktiviert wird, nennt man „Signal-Transaktivierung“ (Prenzel et al, 2000).

Moro und Mitarbeiter beschrieben 1998 in ihrem Artikel „Integrins induce activation of EGF-Receptor: role in MAP-kinase induction and adhesion-dependent cell survival“ erstmals die

Integrin-abhängige EGF-Rezeptor Aktivierung mit nachfolgender Induktion der MAPK ERK1: Integrine besitzen die Fähigkeit direkt auf der Membranebene mit dem EGF-Rezeptor zu kooperieren, um spezifische Signalwege zu aktivieren; d.h. nach Aktivierung der Integrine durch die Adhäsion an extrazelluläre Matrix-Bestandteile, assoziieren diese auf der Membran mit EGF-Rezeptoren und bilden einen molekularen Komplex. Dadurch können Integrine den EGF-Rezeptor in Abwesenheit seines spezifischen Liganden transaktivieren und so als Transduktions-Molekül benutzen, um den MAPK-Weg zu aktivieren.

Es wurden aber auch andere Mechanismen einer MAPK Aktivierung durch Integrine beschrieben. Dafür nur zwei Beispiele:

Ein Teil der Integrin-Heterodimere kann mit Caveolin assoziieren und so die Tyrosin-Phosphorylierung von Shc fördern, was zu einer Aktivierung der MAPK über Ras führt (Wary et al., 1996).

Weiterhin können aktivierte Integrine die Focal Adhesion Kinase (FAK) phosphorylieren. Diese kann in phosphoryliertem Zustand Grb2 rekrutieren und das führt wiederum zur Aktivierung des Ras-MAPK-Signalweges (Schlaefer and Hunter, 1997).

1.6. Das Zytoskelett

Das Zytoplasma der Eukaryontenzelle erhält seine räumliche Organisation durch ein Geflecht von Proteinfilamenten, das man als Zytoskelett bezeichnet. In diesem Geflecht gibt es drei Haupttypen von Filamenten: Mikrotubuli, Aktin-Filamente und Intermediärfilamente (Abb. 1.10).

Mikrotubuli sind steife Polymere aus Tubulin-Molekülen und sind meist mit einem Ende am Centrosom verankert, während das andere frei ins Zytoplasma ragt. In vielen Zellen sind Mikrotubuli höchst dynamische Gebilde, die durch Anfügen und Abdissoziieren der Tubulin-Untereinheiten abwechselnd wachsen und schrumpfen. Motorproteine bewegen sich in der einen oder anderen Richtung an den Mikrotubuli entlang und tragen ganz bestimmte membranumhüllte Organellen zu festgelegten Stellen in der Zelle.

Aktin-Filamente sind ebenfalls dynamische Strukturen, die normalerweise nicht als einzelne Filamente vorliegen, sondern in Form von Netzen oder Bündeln. Die Zellrinde ist eine Schicht unmittelbar unter der Plasmamembran, die aus Aktin-Filamenten und verschiedenen Aktin-bindenden Proteinen besteht. Die Aktin-Moleküle der Zellrinde polymerisieren und depolymerisieren stetig und dabei entstehen Fortsätze der Zelloberfläche wie Lamellipodien und Mikrospikes. Die Polymerisation kann von außen durch Signalmoleküle gesteuert werden, die an Zelloberflächen-Rezeptoren binden; diese Rezeptoren wirken über heterodimere G-Proteine und die kleinen GTPasen Rac und Rho.

Intermediärfilamente sind kräftige, seilartige Polymere aus faserartigen Polypeptiden, die Zugkräften widerstehen und für Struktur und mechanische Belastbarkeit der Zelle bedeutend sind. Man kennt eine ganze Reihe gewebespezifischer Formen, welche sich durch die in ihnen enthaltenen Aminosäuren unterscheiden: Unter anderen gibt es die Keratin-Filamente der Epithelzellen, die Glia-Filamente der Astrozyten und Schwann-Zellen, die Desmin-Filamente der Muskelzellen und die Vimentin-Filamente in Fibroblasten und vielen anderen Zelltypen.

Die Filamente der drei Typen sind untereinander verbunden, und ihre Funktionen werden koordiniert (Alberts, 1995).

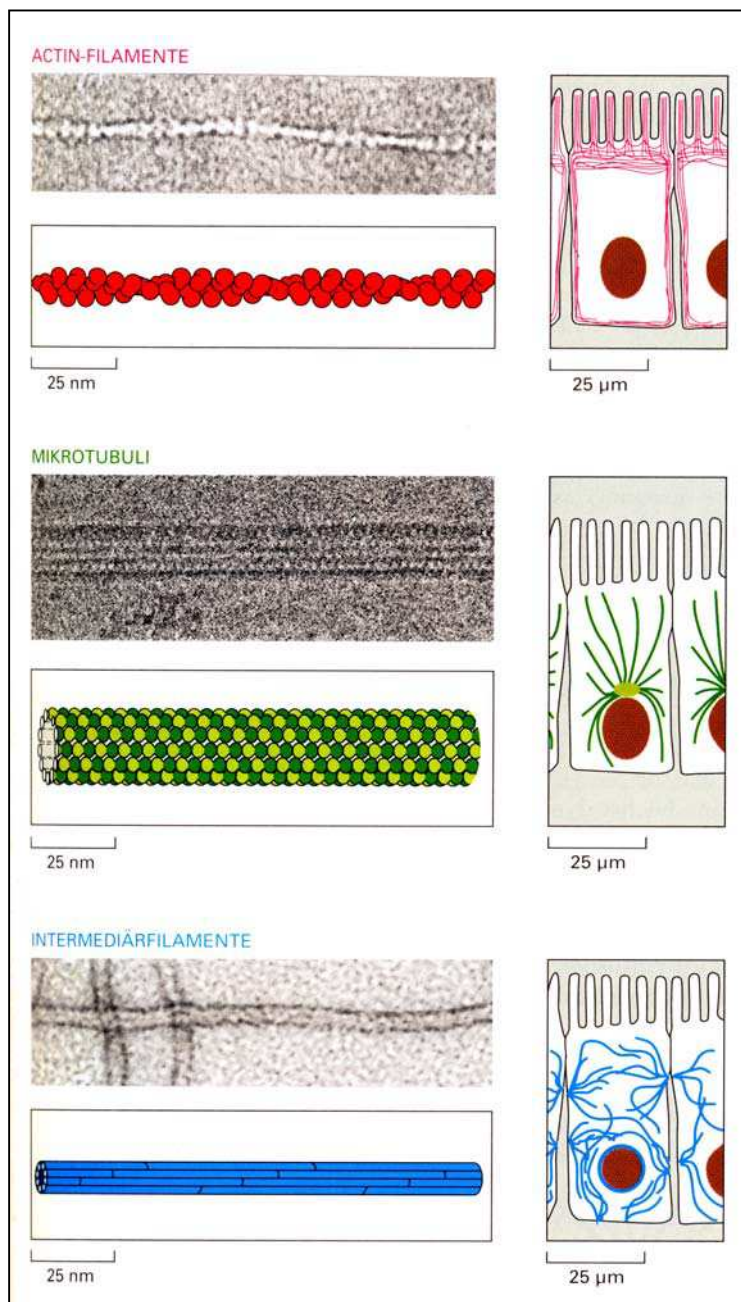


Abb. 1.11 Die Abbildung zeigt die drei Arten von Proteinfilamenten, die das Zytoskelett bilden, jeweils in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme und einer Schemazeichnung, in der man den Aufbau aus Untereinheiten erkennt. Zudem ist die Verteilung der Filamente in einem Typ von Epithelzellen gezeigt; aus Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995.

1.7. Fragestellung

Mechanische Kräfte in unterschiedlicher Form spielen bei der Regulierung zellulärer Prozesse eine bedeutende Rolle.

Epithelzellen bedecken die inneren und äußeren Körperflächen und sind somit stetiger mechanischer Beanspruchung ausgesetzt. Mechanische Reize induzieren bei Keratinozyten z.B. die Ausbildung von Schwielen, können Hauterkrankungen auslösen und das Hautwachstum anregen. Dennoch ist über den Einfluss von Dehnungsreizen auf Keratinozyten noch recht wenig bekannt.

Die Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit ist daher auszuarbeiten, inwieweit die Oberflächenrezeptoren β 1-Integrine, E-Cadherine und der Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren an der Aufnahme und Weiterleitung mechanischer Streckungsreize bei humanen Keratinozyten der Zelllinie HaCaT beteiligt sind.

Die Eigenschaften der Zelle, wie Form, Innenorganisation und Bewegung, beruhen auf den komplexen Proteinfilament-Geflechten des Zytoskeletts. Ein Ausfall der Adhäsionsrezeptoren könnte sich in einer Veränderung der Organisation des Zytoskeletts äußern.

Folgende Hypothese soll daher näher betrachtet werden:

Untersuchung der Rolle von β 1-Integrinen und E-Cadherinen als Sensoren für Dehnungsreize im Rahmen einer proliferationsaktivierenden Signaltransduktionskette unter Einbeziehung des EGF-Rezeptors und des Zytoskeletts.

- Untersuchung der Verteilung und/oder Mengenänderung der β 1-Integrine auf der Zellmembran unter mechanischem Stress. Sind solche Änderungen gegebenenfalls mitverantwortlich für das Adhäsions- und Proliferationsverhalten der Zellen?
- Untersuchung einer räumlichen und funktionellen Zusammenarbeit von β 1-Integrinen, E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren bei der Transduktion von Dehnungsreizen im Hinblick auf eine mögliche Rezeptor-Koclusterung direkt auf der Ebene der Plasmamembran sowie eine EGF-Rezeptor-Transaktivierung.
- Auswirkung einer Funktionsblockierung von β 1-Integrinen und E-Cadherinen auf die verschiedenen Zytoskelettelemente.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Geräte und Gefäße	Firma
Axioskop (Aufsichtfluoreszenzmikroskopie)	Zeiss, Oberkochen
Brutschränke, begasbar	Heraeus, Hanau Nunc, Wiesbaden Thermo Life Science
Cell Scraper	TPP, Trasadingen; Schweiz
Dehnungsapparatur	Werkstatt des zoologischen Institutes der J.W.Goethe Universität
Drehschieber-Vacuum-Pumpe	Leybold Vacuum, Köln ⁵⁶
Einmalpipetten (25ml / 10ml / 5ml)	Corning, Wiesbaden
Facsalibur (Flow Cytometer)	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen, 4-2052-2	Becton Dickinson, Heidelberg
Eppendorf-Cups	Eppendorf, Hamburg
Glaspipetten	Brandt, Wertheim
Glasplatten, Spacer, Kämme	Peqlab, Erlangen
Gel Casting System Joey TM	Owl scientific; USA
Immobilon TM -P (Transfer Membran)	Millipore, Bedford, MA, USA
Konfokales Laserscanning Mikroskop (CLSM)	Leica TCS,
Lab Tek plastik 4er	Nunc, Roskilde, Dänemark
Lichtmikroskop (invers)	Zeiss, Oberkochen
Mikrotiterplatte	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mini Transblot Cell (Blotting Kammer)	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Pasteurpipetten	Brandt, Wertheim
Penguin TM Doppelgelsystem P8DS	Owl scientific; USA
Perfect Blue TM Foppelgelsystem Twin S	Peqlab, Erlangen
Petrischalen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Spectrofluoro-Photometer RF-540	Shimadzu, Duisburg
Pipetten (1000µl-0,5µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (1000µl-0,5µl)	Sarstedt, Nürtingen
Power Pac 200	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK
Teflonmatrizen	Werkstatt des zoologischen Institutes der J.W.Goethe Universität
Tischzentrifuge (centrifuge5417R)	Eppendorf, Hanau
Zellkulturflaschen (150 cm ²)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturflaschen (75 cm ²)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Zentrifuge, Biofuge 5414	Eppendorf, Hanau
Zentrifugenröhrchen (50ml / 15ml)	Sarstedt, Nürtingen
6-Well-Multischalen (Wuchsfläche 9,6cm ²)	Nunc, Roskilde, Dänemark

Substanzen	Firma
AG-1478 (4-(3-Chloranilino)-6,7-dimethoxyquinazoline	Calbiochem
Ammoniumperoxidsulfat (ASP)	Roth, Karlsruhe
Antipain	Sigma, Diesenhofen
Aprotinin	Sigma, Diesenhofen
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Arginin	Sigma, Diesenhofen
Bio Rad DC Protein Assay Kit	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA, Linz, Österreich
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bisbenzimid	Riedel-de-Haen
BrdU-Kit II	Boehringer Mannheim
Cellwash	Becton Dickinson, Heidelberg
Curing Agent (Silikon > Komponente A)	Armado Medizin Technik, Düsseldorf
Dithiothreitol (DTT)	Appli Chem, Darmstadt
Doexychylate	Sigma, Diesenhofen
EDTA (Ethylendinrilotetra-Essigsäure-Dnatrium-Dihydrate)	Merck, Darmstadt
EGTA	Appli Chem, Darmstadt
Einschlußmedium für die indirekten Immunfloureszenz, PH7,5	Bios, München
Elastomer (Silkon > Komponente B)	Armado Medizin Technik, Düsseldorf
Ethanol	J.T. Baker, USA
Fibronektin	TEBU
Formaldehyd	Appli Chem, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Linz, Österreich
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hank's Salzlösung (HBSS)	Biochrom KG (Seromed), Berlin
KOH	Merck, Darmstadt
Kollagen	Boehringer Mannheim
Laminin	TEBU
Leupeptin	Sigma, Diesenhofen
L-Glutamin	Invitrogen, Paisley, UK
Magermilch-Pulver	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell
MEM-Aminosäuren (essentiell)	Biochrom KG (Seromed), Berlin
MEM-Vitamine	Biochrom KG (Seromed), Berlin
Methanol	J.T. Baker, USA
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Natrium-Bicarbonat	Biochrom KG (Seromed), Berlin
Natrium-Chlorid (NaCl)	Appli Chem, Darmstadt
Natrium-Vanadate	Appli Chem, Darmstadt
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom KG (Seromed), Berlin
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Nonidet	Sigma, Diesenhofen
Phosphate Buffered Salin (PBS)	Invitrogen, Paisley, UK
PMSF	Sigma, Diesenhofen
Penicilin / Steptomycin	Biochrom KG (Seromed), Berlin
Pepstain	Sigma, Diesenhofen
Prestained SDS PAGE Srandards, Low Range	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Prestained SDS PAGE Srandards, High Range	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Rotiporese-Gel (Acrylamid-Lösung)	Roth, Karlsruhe
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	Appli Chem, Darmstadt

Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
TRIS	UBS, Cleveland, OH, USA
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Bio Rad, Hercules, CA, USA
Trypsin	Invitrogen, Paisley, UK

Antikörper	Firma
Alexa 488, donkey-anti-goat (IF)	Molecular Probes, Göttingen
Alexa 488, goat-anti-mouse (IF)	Molecular Probes, Göttingen
Alexa 546, goat-anti-mouse (IF)	Molecular Probes, Göttingen
Anti-E-Cadherin, monoclonal, mouse, Clone 34, IgG2b (IF)	Transduction Laboratories
Anti-E-Cadherin, function blocking, polyclonal, goat, Clone sc1500P(IF+WB)	Santa Cruz Biotechnology,
Anti-EGF-Rezeptor, polyclonal, goat (IF)	Santa Cruz Biotechnology,
Anti-EGF-Rezeptor, monoclonal, mouse, Clone 13, IgG1(WB)	Transduction Laboratories
Anti-EGF-Rezeptor activated, monoclonal, mouse, Clone 74, IgG1 WB)	Transduction Laboratories
Anti-PanKeratin, monoclonal, mouse, IgG1 (IF)	Sigma, Deisenhofen
Anti-Tubulin, monoclonal, mouse (IF)	Sigma, Deisenhofen
Anti-β1-Integrin, monoclonal, mouse, Clone 18, IgG1 (IF)	Transduction Laboratories
Anti-Human-β1-Integrin, function blocking, monoclonal, mouse, clone 6S6, IgG1(IF+WB)	Chemicon International INC. Temecula
CD29-FITC, monoclonal, mouse, Clone K20, IgG2a	Immunotech, Hamburg
IgG2a-FITC, mouse, Clone U7.27 (Isotypic Control)	Immunotech, Hamburg
p44/42 MAP Kinase, polyclonal, rabbit (WB)	Cell Signaling, Beverley, MA, USA
Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204), monoclonal, mouse, IgG1 (WB)	Cell Signaling, Beverley, MA, USA
Phototope-HRP Western Blot Detection Kit	Cell Signaling, Beverley, MA, USA
TRITC-Phalloidin	Sigma, Deisenhofen

2.2. Methoden

2.2.1. HaCaT-Keratinocyten

Die Mehrheit der Experimente wurde mit der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT (**H**uman **a**dult **l**ow **C**alcium **h**igh **T**emperature) durchgeführt. Diese Zellen sind bei niedrigem Calciumgehalt und erhöhter Temperatur spontan zu einer Zelllinie immortalisiert. Die HaCaT-Zelllinie besitzt einen transformierten Phänotyp, verhält sich jedoch nicht tumorinduzierend und weist ein ähnliches Differenzierungspotential auf wie epitheliale Keratinozyten (Breitkreuz et al., 1989). Wie der Name HaCaT schon besagt, benötigen diese Zellen als optimale Wachstumsbedingungen einen niedrigen Calciumgehalt (0,2mM) und eine relativ hohe Umgebungstemperatur von 38,5°C (Boukamp et al., 1988). Im Gegensatz zu primären Keratinozyten weisen HaCaT-Zellen keine individuellen Unterschiede auf und sind somit gut als Versuchszelllinie von zellbiologischen Vorgängen an Hautmodellen geeignet. Wir danken Herrn Prof. N.E. Fusenig vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg, er hat uns diese Zelllinie zur Verfügung gestellt.

2.2.1.1. Zellkultur der HaCaT-Zellen

Die HaCaT-Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in Kunststoff-Kulturflaschen mit Hank's Medium kultiviert (Abb. 2.1).



Abb. 2.1 Kunststoff-Zellkulturflasche (Greiner)

Hank's-Medium:

- Hank's-Salzlösung (HBSS) ohne NaHCO₃, Phenolrot als pH-Indikator
- Aqua ad iniectabilia
- MEM-Vitamine (100x)
- MEM essentielle Aminosäuren
- Natriumbicarbonat 7,5% , PH 7,0 (Puffer)
- Penicilin/Streptomycin (10.000E/10.000µl/ml)
- L-Glutamin (100x) 1%
- Fötale Kälberserum (FKS) hitzeinaktiviert
- Calciumgehalt des Mediums = 0,9mM

Die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert, da sie aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate schnell eine hohe Zelldichte erreichen. Beim Splitten und Aussäen wurde wie folgt verfahren:

1. Entfernen des alten Mediums und einmalige Waschung mit PBS⁻.
2. EDTA-Lösung (0,2% in Ca-Mg freiem PBS) zugeben und ca. 10min bei 37°C inkubieren. EDTA ist ein Komplexbildner, der zweiwertige Metallionen bindet; dadurch kann die über Integrine und Cadherine vermittelte Zelladhäsion nicht mehr aufrechterhalten werden und die Zellen lösen sich leichter vom Untergrund ab.
3. EDTA abkippen und Trypsin/EDTA-Lösung (0,125%/0,1% in Ca-Mg freiem PBS) zufügen.
4. Nach ca. 10min Inkubationszeit (37°C) die entsprechende Menge Medium dazugeben, um den Vorgang des Trypsinierens zu beenden.
5. Aussäen der Zellen in der gewünschten Zelldichte:
 - Einfaches Splitten = 1:5-1:8
 - Aussäen in definierter Zelldichte = zuvor Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer- Zählkammer und Einstellung der gewünschten Zellzahl in frischem Medium.

Für alle Versuche wurden die HaCaT-Zellen in flexiblen Silikonkammern -Wuchsfläche: 8cm²- mit 2ml Hank's Medium kultiviert (Abb. 2.2).

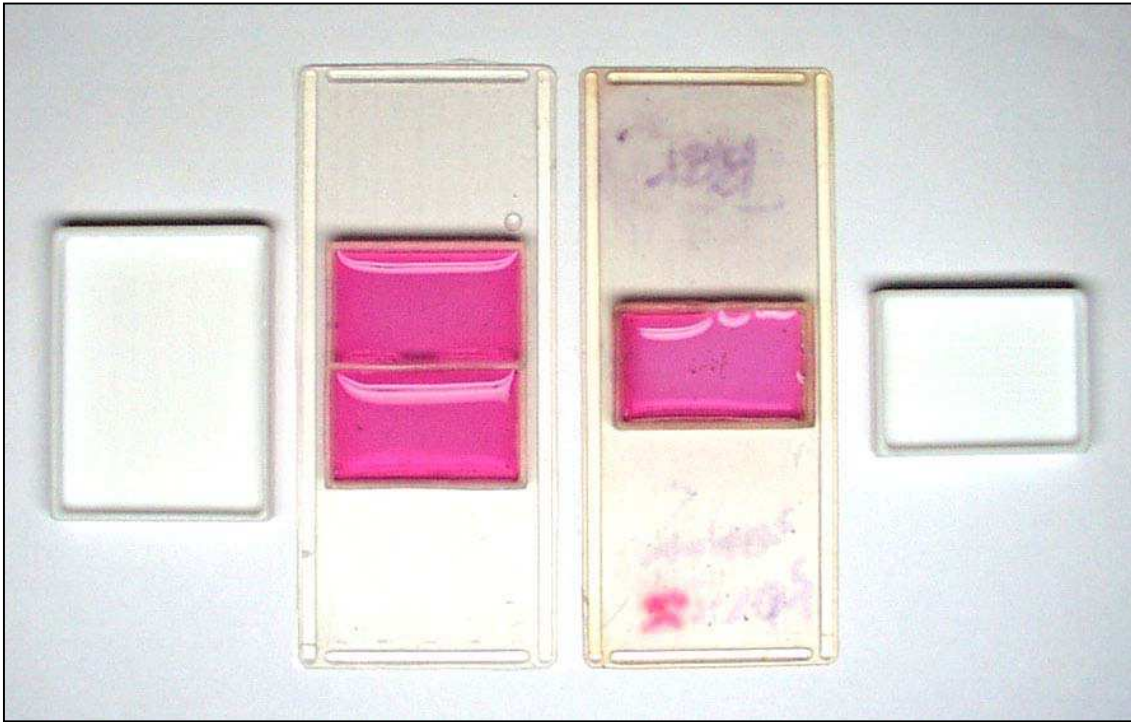


Abb. 2.2 Silikonkammern: Links = Doppelkammer + Medium
Rechts = Einfachkammer + Medium

2.2.2. Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer

Die Zellzahl wurde in Neubauer-Zählkammern bestimmt. Eine Zählkammer weist zwei Zählnetze auf. Jedes Zählnetz beinhaltet vier große Eckquadrate, ein jedes unterteilt in 16 kleinere Quadrate. Eines dieser großen Eckquadrate repräsentiert ein definiertes Volumen von 0,1µl, insgesamt ergeben sich dann 0,4µl. Nach Beschickung der Kammer mit Zellsuspension (Verdünnung mit PBS⁻ oder Abzentrifugieren je nach Zelldichte) wurden die Eckquadrate beider Zählnetze ausgezählt, der Mittelwert errechnet und aus der ermittelten Zahl die Zellzahl der Gesamtsuspension errechnet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ml Zellsuspension} \times 1000}{0,4}$$

0,4

2.2.3. Das Konzept der mechanischen Reizung

2.2.3.1. Herstellung von flexiblen Silikonkammern

Eine Silikonkammer besteht aus zwei Komponenten (Elastomer und Curing Agent), die im Verhältnis 10+1 gemischt und anschließend in einem Kondensator entgast wurden. Die Silikonmasse wurde in vorgefertigte Teflonmatrizen eingebracht und bei 80°C für mindestens drei Stunden polymerisieren lassen. Nach dem Entfernen der Silikonkammern aus den Matrizen wurden diese mit 5,7%iger KOH-Lösung (in Methanol) behandelt, um die durch die Polymerisation entstandene Salzsäure zu neutralisieren und oberflächliche Polymere aufzubrechen, zuletzt gründlich mit Aqua dest. gespült und autoklaviert.

2.2.3.2. Apparatur zur Streckung

Die fertige Silikonkammer wurde in die Dehnungsapparatur (Abb. 2.3 + 2.4) eingespannt und nacheinander für jeweils mindestens zwei Stunden mit 2%igem Arginin und FKS beschichtet, um die Zelladhäsion zu erleichtern. Danach konnten die Zellen in die flexiblen Kammern ausgesät werden. Nach einer Anheftungszeit von ca. 24 Stunden wurden die Kammern + Zellen um 10% ihrer initialen Länge gedehnt (Abb. 2.4 B + D). Diese Dehnung erfolgte mit Hilfe eines Hebels im Fall der 6er-Anlage (siehe Abb. 2.3) oder eines Schraubgewindes bei der Einzelstreckungs-Apparatur (Abb. 2.4). Für alle Experimente wurden die Zellen einem Singlestretch ausgesetzt, d.h. die Kammern wurden gedehnt und für die gewählten Zeiten im gestreckten Zustand belassen. Das „Abarbeiten“ der Zellen geschah bei den Einzelstreckungs-Apparaturen in gestrecktem Zustand der Kammern, dabei stellte man die komplette Kammer z.B. auf Eis.

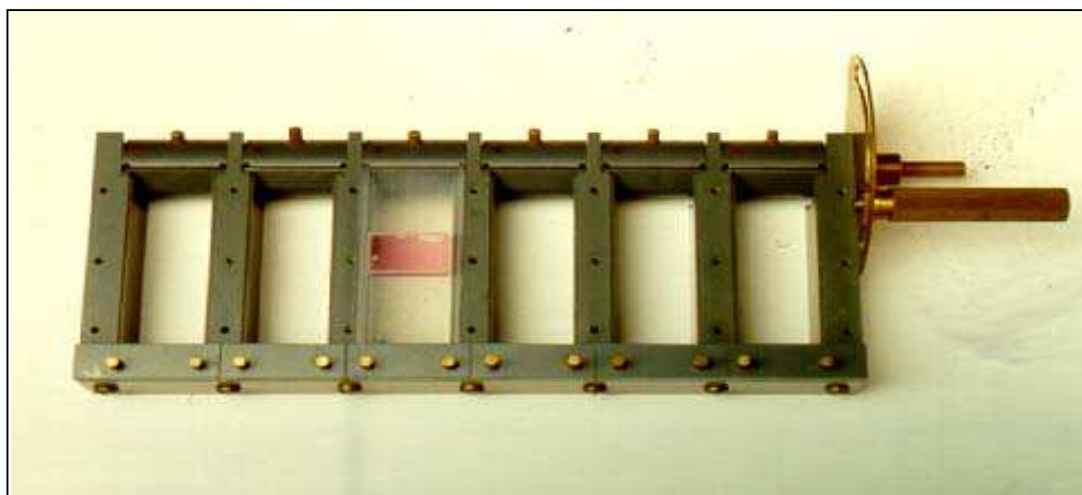


Abb. 2.3 Streckungsapparatur: 6er-Anlage

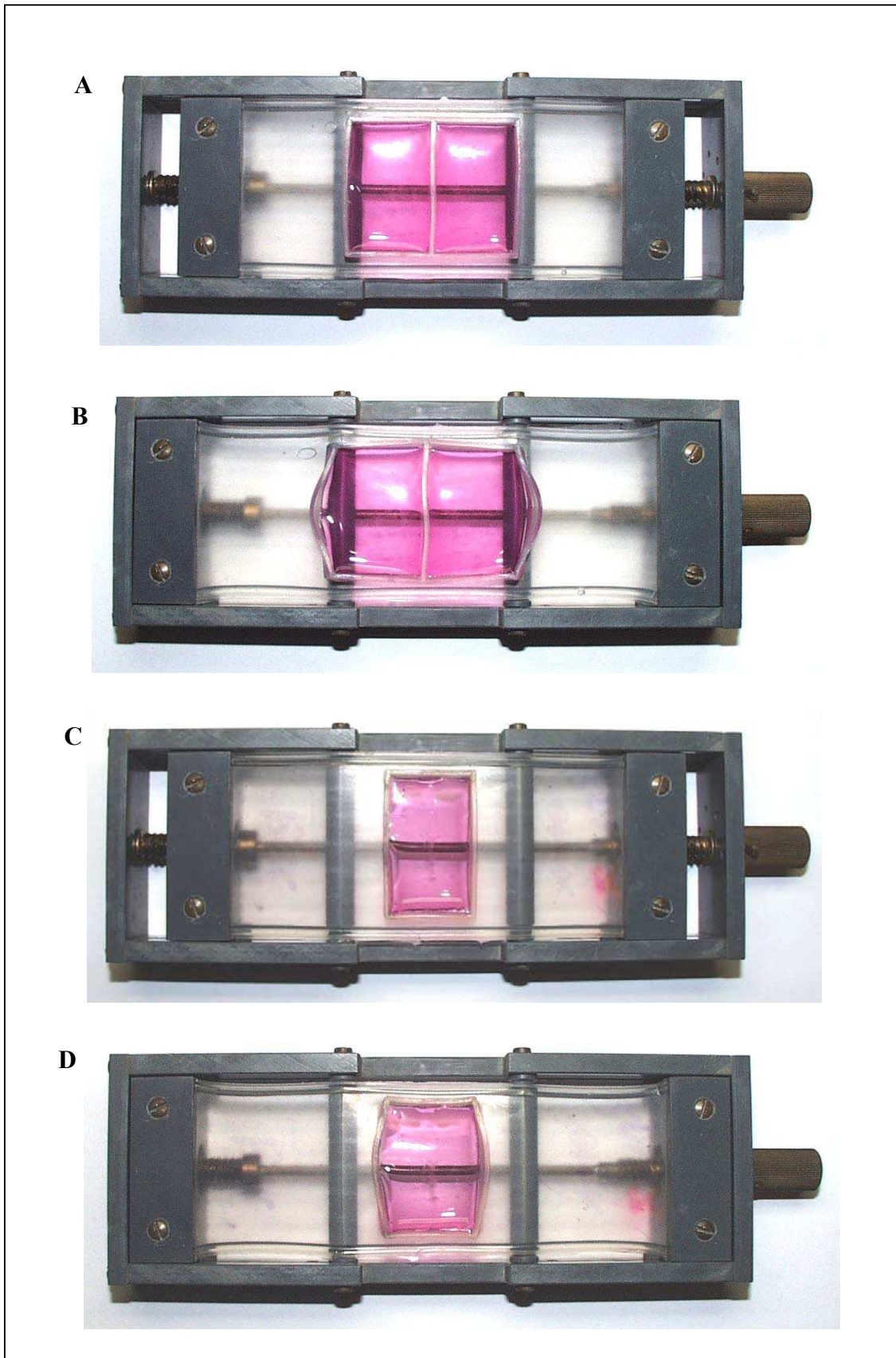


Abb. 2.4 Einzel-Streckungapparaturen:

- A) Doppelkammer; entspannter Zustand
- B) Doppelkammer; gespannter Zustand
- C) Einzelkammer; entspannter Zustand
- D) Einzelkammer; gespannter Zustand

2.2.4. Untersuchungen mittels Konfokalem Laserscan Mikroskop

2.2.4.1. Anzucht der Zellen für Immunfluoreszenzfärbungen

Die HaCaT-Keratinocyten wurden in Silikonkammern in einer Dichte von 5×10^5 - 1×10^6 (je nach dem momentanen Proliferationsverhalten) ausgesät und nach 24h einem 5, 15 oder 30 minütigem Singlestretch ausgesetzt.

2.2.4.2. Fixierung und Vorbereitung der Zellkulturen für das CLSM

Die Zellkulturen wurden in gestrecktem Zustand nach dem Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit PBS⁻ mit 5%igem Formaldehyd + 0,1% Nonidet für 1min bei RT fixiert und permeabilisiert. Diese Lösung wurde sofort durch dreimaliges Waschen mit PBS⁻ entfernt, darauf weitere 30min mit 5%igem Formaldehyd bei RT fixiert und wiederum dreimal mit PBS⁻ gewaschen.

Nach der Fixierung folgte die Aufbereitung der Silikonkammern für das CLSM (Abb. 2.5):

Die Silikonkammer wurde in vier Stücke geteilt und je so ein Stück in eine der mittleren Kammern eines 4er Lab-Tek gelegt. Die anderen Kammern des 4er Lab-Tek blieben frei, um das Präparat später noch gut in die Vorrichtung am CLSM einbringen zu können. Die Arbeitsschritte erfolgten in einer großen Petrischale mit PBS⁻.

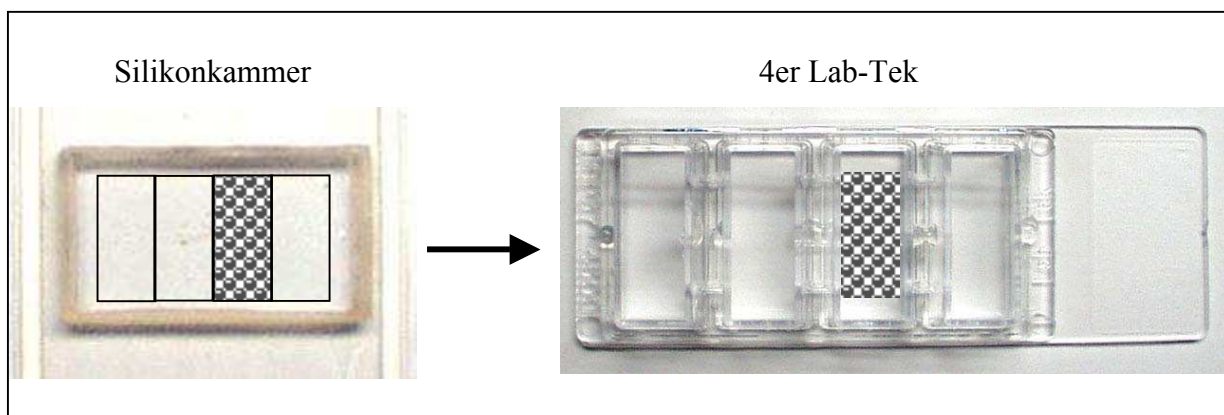


Abb.2.5 Silikonkammer mit dem ausgewählten Stück – gerastert dargestellt - welches in das 4er LabTek übertagen werden soll.

2.2.4.3. Immunfluoreszenzfärbungen

Die Präparate wurden ca. 10min mit einer PBS+1%BSA-Lösung vorbehandelt, um die unspezifischen Bindungen abzusättigen. Sodann wurden pro LabTek-Kammer 500µl Primärantikörper zugegeben, welcher entsprechend mit PBS+1%BSA-Lösung verdünnt für 60min bei 5% CO₂-Atmosphäre und 37°C inkubiert wurde. Folgende Primärantikörper-Kombinationen fanden dabei Verwendung:

1. Negativ-Kontrolle = nur Sekundärantikörper
2. Einfachfärbungen:
 - ⇒ Anti-β1-Integrin, monoclonal, Maus ➔ Verdünnung 1:500
 - ⇒ Anti-E-Cadherin, monoclonal, Maus ➔ Verdünnung 1:50
 - ⇒ Anti-EGF-Rezeptor, polyclonal, Ziege ➔ Verdünnung 1:50
3. Doppelfärbungen
 - ⇒ Anti-β1-Integrin + Anti-EGF-Rezeptor ➔ Verdünnung 1:500 +1:50
 - ⇒ Anti-E-Cadherin + Anti-EGF-Rezeptor ➔ Verdünnung 1:50 +1:50
 - ⇒ Anti-EGF-Rezeptor + TRITC-Phalloidon ➔ Verdünnung 1:50 +1:2 → 20µl/Kammer
 - ⇒ Anti-EGF-Rezeptor + Anti-Tubulin, monoclonal, Maus ➔ Verdünnung 1:50+1:100
 - ⇒ Anti-EGF-Rezeptor + Anti-Pan-Keratin, monoclonal, Maus ➔ Verdünnung 1:50 + 1:100

Nach drei Waschschritten von je 10min bei RT mit PBS+1%BSA zum nochmaligen Blocken, wurde jede Lab-Tek-Kammer 30min bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre mit 500µl Sekundärantikörper inkubiert. Entsprechend den Primärantikörpern wurden folgende Sekundärantikörper verwendet, verdünnt in PBS+1%BSA:

- a. Alexa 546, Ziege-Anti-Maus (rot) ➔ Verdünnung 1:200
- b. Alexa 488, Esel-Anti-Ziege (grün) ➔ Verdünnung 1:200

Alexa 546 ist ein TRITC Analoger rot-fluoreszierender Sekundärantikörper und Alexa 488 ist ein FITC Analoger grün-fluoreszierender Sekundärantikörper. Beide weisen gegenüber dem „normalen“ FITC und TRITC eine höhere Stabilität auf, sie verbleichen deshalb bei Bestrahlung nicht so schnell. Die Kammern wurden nach der Inkubationszeit dreimal mit PBS⁻ gespült (je 10min, RT), in das Eindeckmedium eingebettet und mit zurechtgeschnittenen Deckgläschen versehen. Hierauf konnten von den Präparaten am Konfocalen Laserscan Mikroskop optische Schnitte angefertigt werden.

2.2.4.4. Das Konfocale Laserscan Mikroskop

Biologische Objekte sind komplex und auf mikroskopischer Ebene oftmals aus vielen sich überlagernden Strukturelementen aufgebaut. Das Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) ermöglicht es, Strukturen in den drei Richtungen des Raumes abzubilden und zu vermessen. Die wichtigsten Konsequenzen, die sich aus der konfokalen Abbildung ergeben, können wie folgt zusammengefasst werden (Robenek, 1995):

- ◆ Licht von außerhalb der Brennebene wird unterdrückt.
- ◆ Defokussierung erzeugt keine Unschärfe, sondern Ausblendung der Objektteile, die sich von der Brennebene entfernen. Das Bild des Objektes wird beim Defokussieren dunkel, bevor es unscharf wird. Man spricht daher vom optischen Schneiden.
- ◆ Reale 3-dimensionale Datensätze können aufgenommen werden.
- ◆ Kontinuierliches Bewegen des Objektes entlang der optischen Achse ermöglicht Seitenansichten (xz-Schnitte).
- ◆ Durch die punktförmige Beleuchtung kommt es zu einer Streulichtreduktion von benachbarten Strukturen.
- ◆ Mit Hilfe von Bildverarbeitung können viele Bilder unterschiedlicher Brennebene zu einem neuen Bild mit großer Tiefenschärfe zusammengesetzt werden. Im konventionellen Mikroskop dagegen muß zur Vergrößerung der Tiefenschärfe die Apparatur und damit auch das Auflösungsvermögen reduziert werden.
- ◆ Quantitative Messungen sind nicht mehr fokus- bzw. bedienerabhängig, da das gesamte Objekt in seiner 3-dimensionalen Ausdehnung aufgenommen werden kann.

Ein weiterer Vorteil des CLSMs ist, dass die Abweichungen in den Absorptions- und Emissionsspektren von unterschiedlichen Fluorochromen (Abb. 2.6) dazu genutzt werden können, zwei oder mehrere Strukturen gleichzeitig darzustellen. Diese Anwendung ist für die räumliche Zuordnung einzelner Zellelemente von großer Bedeutung.

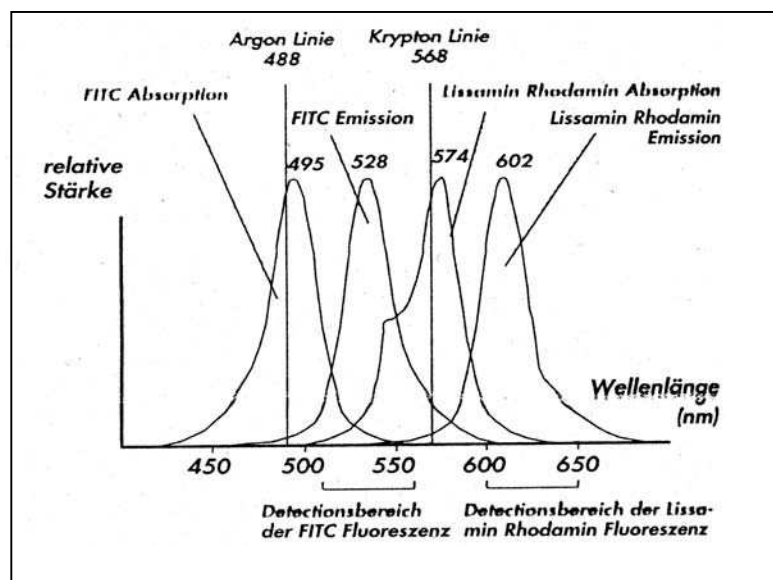


Abb.2.6 Spektren von Laserlinien sowie von zwei typischen Fluoreszenzfarbstoffen; aus Robenek, Mikroskopie in Forschung und Technik, 1995.

In dieser Arbeit wurde die dreidimensionale Verteilung verschiedener Oberflächenrezeptoren (β 1-Integrine, E-Cadherine und EGF-Rezeptoren) und Zytoskelettelemente (F-Aktin, Mikrotubuli und Keratinfilamenten) vor und nach der mechanischen Reizung sowie vor und nach Ausschaltung einer der oben angeführten Rezeptoren mittels CLSM untersucht. Hierzu wurden sowohl von Zellkolonien als auch von einzelnen Zellen verschiedene xy-Ebenen im Abstand von $0,8\mu\text{m}$ in z-Richtung aufgenommen (Abb. 2.7) Von den Schnittserien wurden nach Durchführung unterschiedlicher Bildverarbeitungsfunktionen jeweils die basale Ebene, eine mediane Ebene und die apikale Ebene ausgesucht und gegenübergestellt.

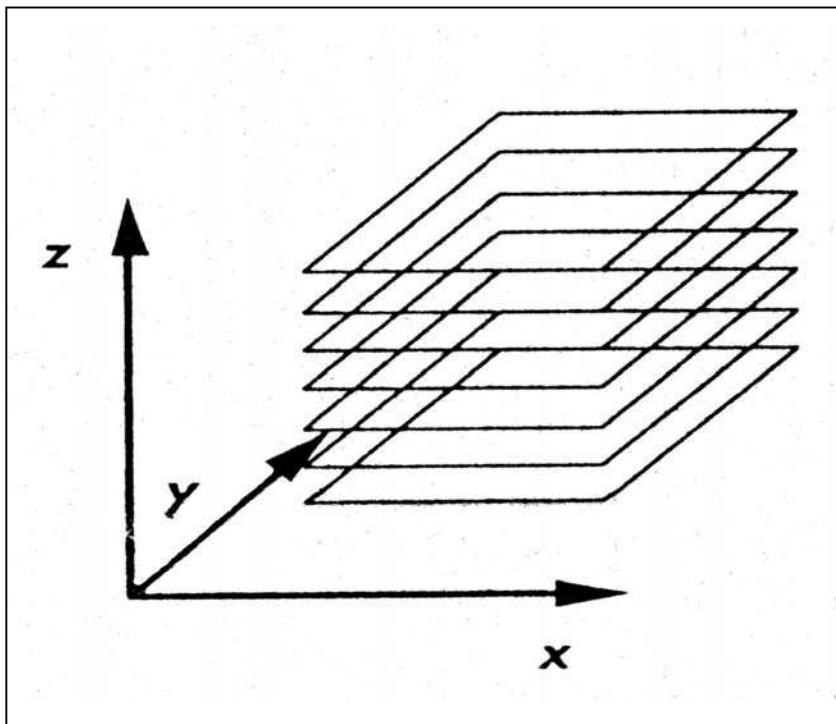
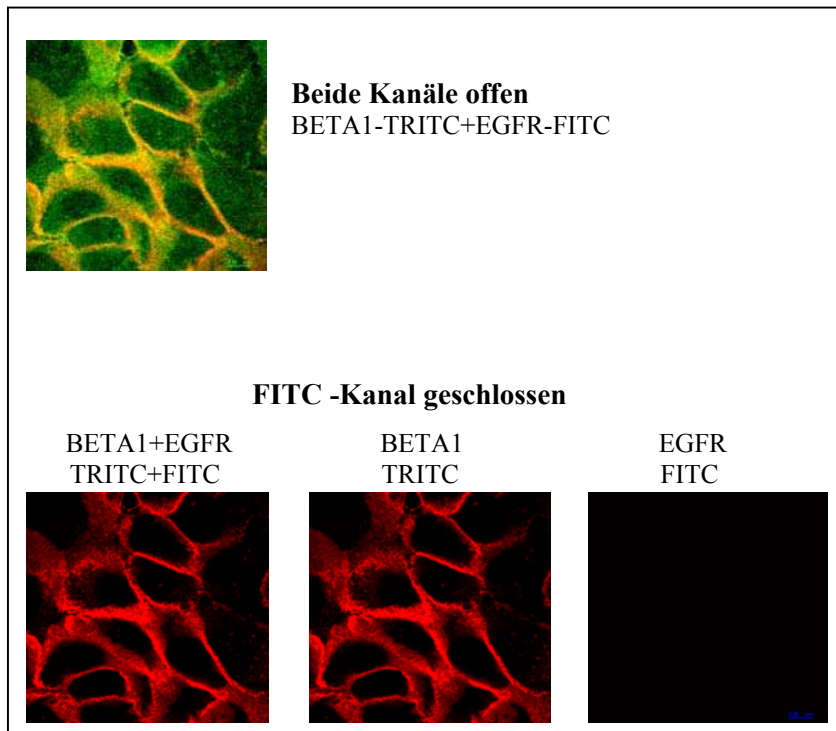


Abb. 2.7 Bildstapel aus xy-Schnitten; aus Robenek, Mikroskopie in Forschung und Technik, 1995.

Da die meisten Präparate eine Doppelfärbung aufwiesen, musste vor jeder Aufnahme die optimale Verstärkung bei gleichzeitiger Ausschaltung des Crosstalks beider Fluoreszenzen eingestellt werden. Dies erfolgte mit dem Acusto Optical Tunibale Filter (AOTF). Mit dieser Funktion lassen sich sowohl die Verstärkung des Photomultiplieiers als auch die vom Laser zur Verfügung gestellte Transmission so regulieren, dass es zwischen den gewählten Fluoreszenzen-Farbstoffen zu keinem Crosstalk kommt (Abb.2.8).

1. Einstellung des TRITC-Kanals



2. Einstellung des FITC-Kanals

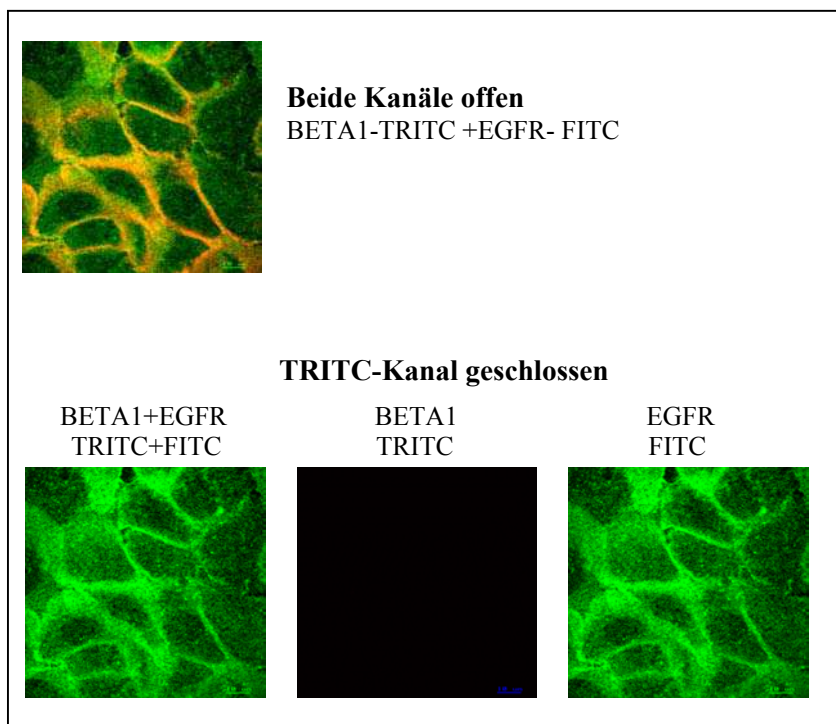


Abb. 2.8 Ausschaltung des Crosstalks mittels AOTF-Funktion

2.2.4.5. Kolokalisations-Analyse der CLSM-Bilder

Für eine genaue Aussage über die Kolokalisation der am CLSM aufgenommenen Bildserien mit Doppelfärbungen (β 1-Integrine + EGF-Rezeptor und E-Cadherine + EGF-Rezeptor) wurde wie folgt vorgegangen:

Die Bildserien des FITC-Kanals = EGF-Rezeptor und des TRITC-Kanals = β 1-Integrin wurden mit verschiedenen Funktionen der Imaris-Software überlagert und von diesen 2-Kanal-Bildern mit der Imaris-Software \rightarrow colocalisation ein Intensitätsverteilungsschema erstellt. Anhand dieses Diagramms, welches alle Kolokalisationen angezeigt, konnten verschiedene Intensitätsverteilungen gezielt analysiert werden (Abb. 2.9). Dabei repräsentiert die vertikale Achse die Grün-Werte und die horizontale Achse die Rot-Werte. Auf diesen Achsen nimmt die Intensität von links nach rechts bzw. von unten nach oben zu. Die Farben im Diagramm geben die Häufigkeit der betreffenden Intensitätsverteilung an: gelb = sehr häufig > rot = mittlere Häufigkeit > blau/lila = geringe Häufigkeit. Zum Beispiel besitzen die höchsten Grün- und Rot-Intensitäten eine geringe Häufigkeit, dagegen sind niedrige Grün- und Rot-Intensitäten sehr häufig. Nach Auswahl der gewünschten Intensitätsverteilung im Diagramm wurde ein dritter Kanal (gelb) kreiert, der die Kolokalisation in diesem Feld bildlich darstellt. In die Kolokalisations-Analyse wurde pro Bildserie jeweils das gesamte Diagramm und zwei Teil-Auswahlen einbezogen. Dabei zeigt die 1. Teil-Auswahl Strukturen von besonderem Interesse, z.B. die Cluster. Demgegenüber repräsentiert die 2. Teil-Auswahl entweder den Hintergrund oder die entsprechend komplementären Strukturen zur 1. Teil-Auswahl, weshalb teilweise auf die Darstellung der 2. Teil-Auswahl verzichtet wurde.

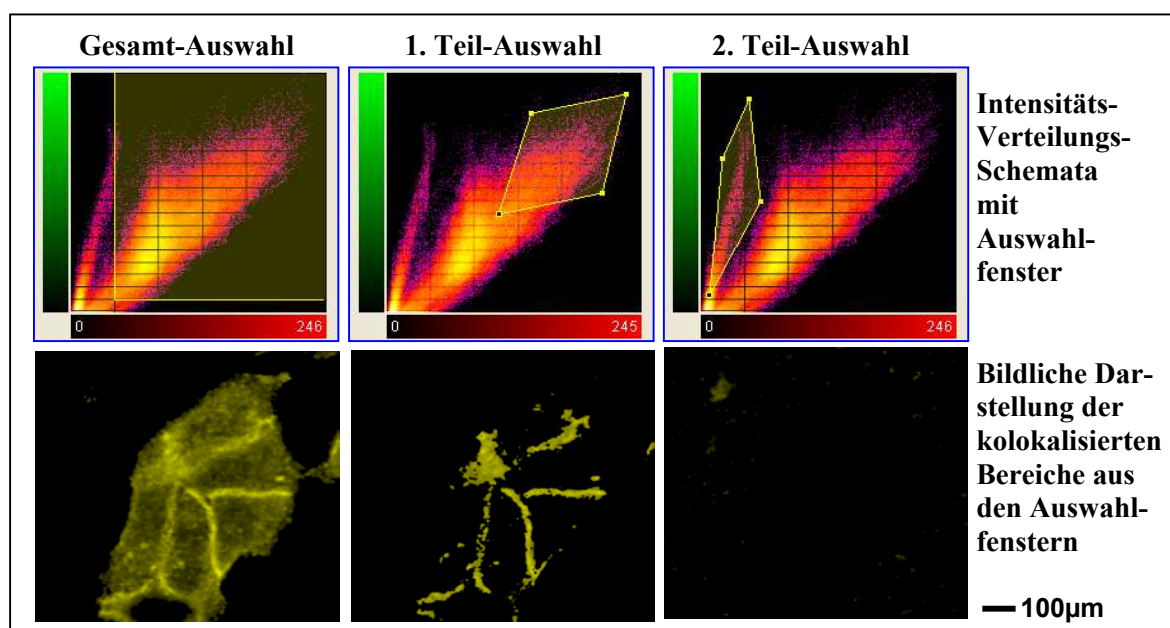


Abb. 2.9 Kolokalisations-Analyse

2.2.4.6. Quantitative Auswertung der Immunfluoreszenzpräparate

In diesem Fall wurde die Fluoreszenz mittels eines Aufsicht-Fluoreszenz-Mikroskopes sichtbar gemacht. Folgende Filterkombination fand dafür Verwendung:

Erregerfilter: TRITC: BP546/12

Farbfilter: T580

Sperrfilter: P590

Wellenlänge: 612nm

Zur Bewertung der Vermehrung von Adhäsionskontakten durch mechanische Dehnung wurden nur die β 1-Integrin Färbungen herangezogen (auch bei Doppelfärbungen). Dazu wurde auf den Kulturen jeweils ein ca. 1cm großes Areal bei einer 1000fachen Vergrößerung (Objectiv Neofluor 100/1,3) ausgezählt. Die Fläche wurde hierbei systematisch abgefahren und jeder Bildausschnitt nach folgenden Kriterien bewertet:

1. Gesamtzellzahl = Die einzelnen Zellen sind in der β 1-Integrin-Färbung deutlich zu erkennen.
2. Anzahl der Zellen, die größere Cluster von β 1-Integrinen (=Adhäsionskontakte) in der basalen Zellmembran aufweisen.

Auf diese Weise wurden pro Kammer jeweils 30 Blickfelder ausgewertet und die daraus ermittelten Durchschnittswerte jeweils auf 100 Zellen bezogen.

2.2.5. FACS-Analyse der β 1-Integrine

Um zu prüfen, ob sich die β 1-Integrin-Menge auf der Zelloberfläche durch mechanische Streckung ändert, wurden die Zellen auf diese Rezeptoren getestet. Die Vorbereitungen zur FACS-Analyse wurden wie nachfolgend beschrieben vorgenommen:

Einen Tag nach der Aussaat wurden die Zellkulturen für unterschiedliche Zeitintervalle gestreckt: 0, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 4, 24, 48, 72 Stunden. Danach wurden die Zellen geerntet (siehe vorne) und in Zentrifugenröhrchen überführt. Sodann wurde die Zellzahl bestimmt, bei 1100 UpM ohne Bremse 10min zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit PBS+10%FKS eine Zellzahl von $2-5 \times 10^5$ eingestellt. 100 μ l einer jeden Zellsuspension wurden jeweils zusammen mit 2,5 μ l CD29-Fitc (= β 1-Integrin) bzw. 5 μ l Fitc-IgG2a-mouse (= Kontrolle) in ein FACS-Röhrchen pipetiert. Nach 15 Minuten Inkubationsdauer bei RT (Dunkel) wurde der überschüssige Antikörper mit 2ml Cellwash ausgewaschen. Nach 5min Zentrifugation bei 1100UpM ohne Bremse wurde der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Pellet in 500 μ l Cellwash aufgenommen. Die Messung erfolgte an einem FACS-Gerät.

2.2.6. Adhäsions Assay

Zur Überprüfung einer möglichen Steigerung der adhäsiven Eigenschaften von HaCaT-Zellen durch mechanische Reizung wurde ein Adhäsions-Assay durchgeführt.

1.Tag: Für diese Experimente wurden die Zellen in speziell beschichtete Silikonkammern in einer Dichte von 2×10^6 ausgesät. Folgende Beschichtungen wurden getestet: Fibronectin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Kollagen ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Laminin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Arginin (2%) + Serum, Arginin (2%), Serum, Arginin (2%) + BSA(5%).

2. Tag: Mediumwechsel: → Medium ohne Serum

→ Medium ohne Serum + $\beta 1$ -Integrin blockierendem Antikörper

3.Tag: Die Zellkulturen wurden 30min gestreckt, die Zellen danach mit EDTA und Trypsin geerntet und definiert in 6-Well-Multischalen ausgesät ($1-5 \times 10^5$) (Abb. 2.9). Jeweils nach 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 Minuten Anheftungszeit wurden pro Kontroll- und gestreckten Populationen drei Wells abgearbeitet. Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

⇒ Zweimaliges Waschen mit PBS⁻

⇒ Kernfärbung mit Bisbenzimid (Höchst-Farbstoff): Verdünnung 1:100 in Hanks-Medium, 45min, 37°C, 5%CO²

⇒ Zweimaliges Waschen mit PBS⁻

⇒ Lysieren der Zellen mit 2ml 0,1%igem SDS und überführen in ein Reagenzglas

⇒ Nochmaliges Nachspülen der Wells mit 2ml 0,1%igem SDS und ebenfalls in das Reagenzglas überführen (= insgesamt 4ml)

4.Tag: Zentrifugieren bei 2000 UpM 10min und die Kernfluoreszenz des Überstandes am Photometer messen. Pro Bedingung wurden jeweils drei voneinander unabhängige Proben gemessen.

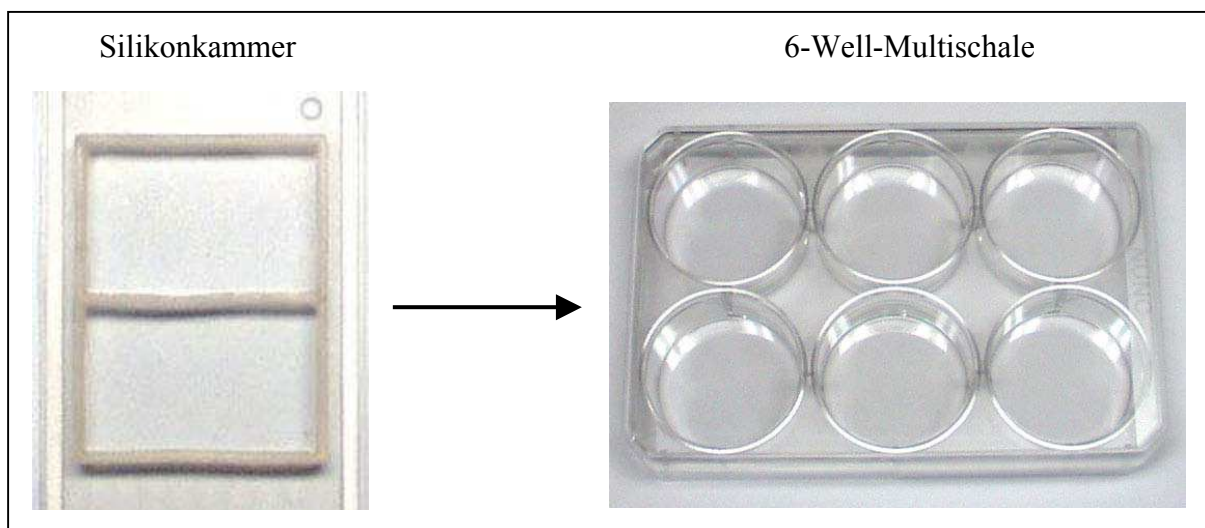


Abb. 2.10 Nach erfolgter Streckung wurden die Zellen in Suspension gebracht und in 6-Well-Multischalen wieder ausgesät.

Um die Zellzahl der adhären Zellen bestimmen zu können, wurde parallel zum eigentlichen Versuch aus derselben Ursprungspopulation eine Standardkurve erstellt. Hierzu wurden die Zellen einer kleinen Kulturflasche 45min bei 37°C und 5%CO² mit Bisbenzimid behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁻ wurden die Zellen mit EDTA und Trypsin abgelöst, die Zellzahl bestimmt, eine Verdünnungsreihe mit 0,1%igem SDS hergestellt, z.B. 0,2×10⁵, 0,4×10⁵, 0,6×10⁵, 0,8×10⁵, 1×10⁵, 1,2×10⁵ und ebenfalls am Photometer die Kernfluoreszenz gemessen. Anhand dieser Standardkurve konnte dann genau bestimmt werden, welche Fluoreszenzintensität der Proben welcher Zellzahl entspricht. Die absoluten Zellzahlen der Proben wurden abschließend in Prozent umgerechnet.

2.2.7. BrdU Nachweis

Zur Messung der Zellproliferation wurde der BrdU-Assay gewählt. BrdU (=5-Brom-2'-desoxy-uridin) kann anstelle von Thymidin in die zelluläre DNA inkorporiert werden. Zellen, die BrdU in ihre DNA eingebaut haben, können durch Verwendung eines monoclonalen Antikörpers gegen BrdU und eines Fluorochrom-gekoppelten zweiten Antikörpers schnell nachgewiesen werden. Die Testdurchführung für adhären Zellen sieht wie folgt aus:

1×10⁶ Zellen wurden pro Silikonkammer eingesät. Diese Aussaatdichte erreichte nach 28h eine 50%ige Konfluenz und die Zellkulturen wurden nun einer 24stündigen mechanischen Dehnung ausgesetzt. Während der letzten 90min der Streckungsdauer wurde das Zellkulturmedium gegen eine ausreichende Menge BrdU-Markierungsmedium ausgetauscht. Danach wurde das Markierungsmedium entfernt und dreimal mit Waschpuffer gespült. Die Zellen wurden nun in 70% Ethanol (in 50mM Glycin-Puffer, pH 2) mindestens 20min bei – 20°C fixiert und wiederum dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Präparate mit ausreichend Anti-BrdUArbeitslösung überschichtet, 30min bei 37°C inkubiert und dreimal mit Waschpuffer behandelt. Sodann wurde ausreichend Anti-Maus-Ig-AP Arbeitslösung zugegeben, 30min bei 37°C inkubiert und wiederum dreimal gewaschen. Die Zellen wurden sodann mit ausreichend frisch hergestellter Farbsubstratlösung überschichtet und 15-30min bei RT inkubiert. Die Farbsubstratlösung wurde abgesaugt, die Zellen dreimal gewaschen und eine Kernfärbung mit dem Höchst-Farbstoff Bisbenzimid durchgeführt. Nach Entfernung des Bisbenzimid wurden die Präparate eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Dazu wurden sowohl die Gesamtzellzahlen (Höchstfärbung) als auch die Zahlen der BrdU-positiven Zellen ermittelt und die Werte in Prozent umgerechnet.

2.2.8. Blockierung der Oberflächenrezeptoren: β 1-Integrine, E-Cadherine und EGF-Rezeptoren

Durch die Blockierung der β 1-Integrine, E-Cadherine und EGF-Rezeptoren wurde die Bedeutung dieser Oberflächenrezeptoren bei der Signaltransduktion nach mechanischer Streckung untersucht. Zur Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine wurden die Zellen unter serumfreien Bedingungen mit den entsprechenden Antikörpern für 24h inkubiert. Hierzu wurden 30 μ g/ml des β 1-Integrin-funktionsblockierenden Antikörpers oder 20 μ g/ml des E-Cadherin-funktionsblockierenden Antikörpers den Zellkulturen beigegeben. Die Inhibition des EGF-Rezeptors erfolgte mittels der hoch spezifischen Substanz AG1478; eine teilweise Blockierung ist hier schon nach Zugabe von 5nM AG1478 für 30min erreicht. Die funktionsblockierenden Effekte wurden sowohl mit der Western Blot Technik als auch am Konfokalen Laserscan Mikroskop untersucht.

2.2.9. Gelelektrophorese und Western Blot

2.2.9.1. Abarbeitung der Proben für die Gelelektrophorese

Zur Detektion der Aktivierung von ERK1/2 und des EGF-Rezeptors wurden die HaCaT-Zellen in einer Zelldichte von 2×10^6 in Silikonkammern gesät. Nach 24h wurde das Medium gegen serumfreies Medium ohne oder mit funktionsblockierenden Antikörpern ersetzt. Nach weiteren 24h wurden die Zellen gestreckt und anschließend die Proteine extrahiert.

ERK 1/2

Zur Überprüfung der Aktivierung von ERK1/2 wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS zum Stoppen der Stimulierung direkt in 50µl SDS-Probenpuffer (187,5mM Tris-HCL (pH6,8), 6% Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS), 30% Glycerol, 150mM Dithiothreitol (DTT), 0,3% Bromphenolblau) aufgenommen. Um die Viskosität der Flüssigkeit zu verringern, wurden die Proben mit Ultraschall (3×10 sec) behandelt. Dadurch kam es zu einer Zerkleinerung des DNA-Stranges. Damit die Reagenzien SDS und DTT bei der Denaturierung der Proteine ihre volle Wirkung entfalten konnten, wurde die Sample-Buffer-Lösung noch 5min auf 95°C erhitzt.

EGF-Rezeptor

Zum Nachweis des phosphorylierten RGF-R sowie des Gesamtgehalts des EGF-R wurden Proteinrohextrakte hergestellt. Hierzu wurden die Zellen zuerst zweimal mit kaltem PBS gewaschen und sodann in 50µl eiskaltem Lysispuffer (10mM Tris, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 0,1% SDS, 0,5% Deoxychylate, 2mM Natrium-Vanadate, 1mM PMSF, Protease Inhibitor Coctail: Aprotinin, Antipain, DTT, Leupeptin, Pepstatin) aufgenommen. Das Lysat wurde 30min auf Eis gestellt, in dieser Zeit dreimal gevortext und danach abzentrifugiert (10min, 4°C, 14000UpM). Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde bestimmt, gegen bovines Serumalbumin standardisiert und die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer versetzt. Auch hier wurden die Proben nachfolgend 5min gekocht (95°C).

2.2.9.2. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

Elektrophorese ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Unterschiedliche Ladung und Größe der Teilchen bewirkt eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Ein Substanzgemisch wird dabei in einzelne Zonen aufgetrennt. Elektrophoretische Trennungen kann man in verschiedenen Medien durchführen, z.B. in einer stabilisierenden Matrix wie einem Polyacrylamid-Gel (Abb. 2.10) (Lottspeich, 1998).

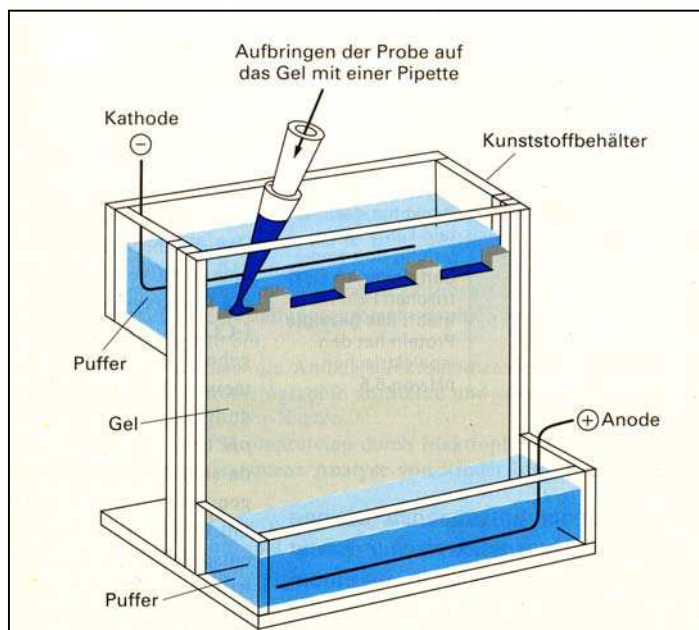


Abb. 2.11 Apparative Anordnung einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese; aus Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird eine inerte Matrix aus stark vernetztem Polyacrylamid-Gel aufgebaut, durch welches die Proteine wandern. Das Gel wird kurz vor Gebrauch durch Polymerisation aus Monomeren hergestellt. Dabei kann die Porengröße des Gels durch die eingesetzte Menge an Acrylamid/Methylenbisacrylamid so eingestellt werden, dass entweder kleine Proteine, z.B. ERK1/2 (12%iges Gel), oder große Proteine, z.B. der EGF-Rezeptor (6%iges Gel), detektiert werden.

Die SDS-Page ist ein diskontinuierliches Gel, das sich aus zwei unterschiedlich stark vernetzten Gelen zusammensetzt, dem Sammelgel und dem Trenngel. Das Sammelgel enthält nur eine geringe Menge an Acrylamid, die in allen SDS-PAGE Ansätzen gleich ist. Das Sammelgel dient dazu, die Proteinbanden an der Grenzfläche zwischen Sammel- und Trenngel zu sammeln, um einen gleichzeitigen Übergang der Proben in das Trenngel zu gewährleisten. Im Trenngel findet die Proteinauftrennung statt und hierfür verfügt es über eine jeweils den gesuchten Proteinen angepasste spezielle Acrylamid-Konzentration.

Die Proteine selbst befinden sich im Probenpuffer. Diese Lösung enthält das stark negativ geladene Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS). Das SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine, wodurch sich diese zu gestreckten Polypeptidketten entfalten. Durch die Streckung werden einzelnen Proteinmoleküle aus ihrer Assoziation mit anderen Proteinen und Lipiden entlassen und dadurch frei lösbar in der Detergenz-Lösung. Durchschnittlich bindet alle zwei Aminosäurereste ein SDS-Molekül. Das an ein Protein gebundene SDS und somit die negative Ladung ist proportional zur Masse des Proteins, d.h. je größer ein Protein, desto mehr SDS-Moleküle bindet es, desto größer ist die negative Ladung. Die eigene Ladung des Proteins wird dabei vernachlässigbar (Abb. 2.11) (verändert nach Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995).

Der Probenpuffer enthält neben SDS noch andere Substanzen: Dithiothreitol (DTT) reduziert die Disulfidbrücken zwischen den schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein. Tris/HCL dient der Aufrechterhaltung des pH-Wertes. Bromphenolblau färbt die Lauffront und Glycerol erhöht die Dichte der Proben.

Jeweils 30µl Gesamtprotein wurden auf den SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Beladen nochmals gevortext und zentrifugiert (5min, 4°C, 14000UPM).

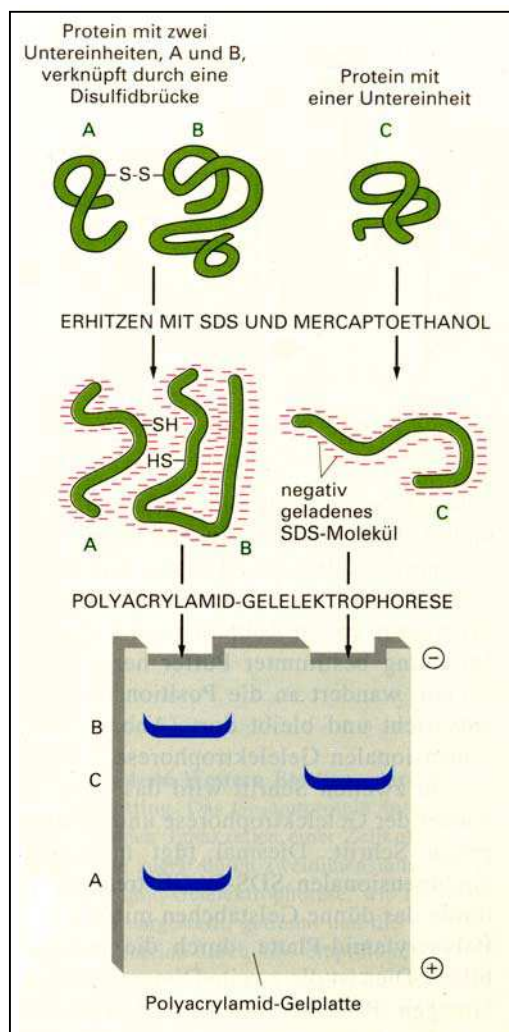


Abb. 2.12 Einzelne Polypeptidketten komplexieren mit dem negativ geladenen SDS und wandern als negativ geladene SDS-Proteinkomplexe durch das poröse Polyacrylamid-Gel; aus Alberts, Molekularbiologie der Zelle, 1995.

Materialien für die SDS-PAGE

Tab. 2.1. Lösungen für die SDS-PAGE

Fertige Lösung	Zusammensetzung
5x Leammli Running Buffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1% SDS
4x Tris / HCL / SDS pH 6,8	0,5 M Tris 0,4% SDS 5 N HCL
4x Tris / HCL / SDS pH 8,8	0,5 M Tris 0,4% SDS 5 N HCL
TEMED (N,N,N', N' - Tetrametylendiamin)	
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	
Acrylamid/Disacrylamid	

Tab. 2.2. Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel (Volumenangabe für zwei Gele)

	6%iges Gel	12iges Gel	Sammelgel
Acrylamid/Bisacrylamid	3,0 ml	6,0 ml	1,3 ml
4x Tris / HCL / SDS / pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	/
4x Tris / HCL / SDS / pH 6,8	/	/	2,5 ml
Aqua ad injectabilia	8,25	5,25 ml	6,1 ml
TEMED	10µl	10µl	10µl
10% APS	100µl	100µl	100µl

Weiterhin wird benötigt:

Gel Casting System Joey™

Pengjun™

Glasplatten, Spacer und Kämmen

Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range

Prestained SDS-PAGE Standards, High Range

2.2.9.3. Western Blot

Western Blotting ist ein Verfahren, mit dem die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes auf eine Polyvinyliden-Difluorid-(PVDF)-Membran transferiert und immobilisiert werden. Mit dieser Technik lassen sich Proteine mit spezifischen Bindungseigenschaften z.B. über Antikörper direkt auf der Membran nachweisen.

Beim Tankblotting werden Gel und Membran zwischen Schwämme und Filterpapier gelegt und in eine Gitterkassette eingeklemmt. Die gepackten Kassetten werden senkrecht in den Puffertank geschoben (Abb. 2.12. und Tabelle 3) und 45-60min eine konstante Spannung von 50V angelegt. Während des Transfers nimmt der Ohmsche Widerstand kontinuierlich zu, weswegen eine effiziente Kühlung notwendig ist. Dies wird durch einen vertikalen Kühleinsatz erreicht (verändert nach Lottspeich,1998).

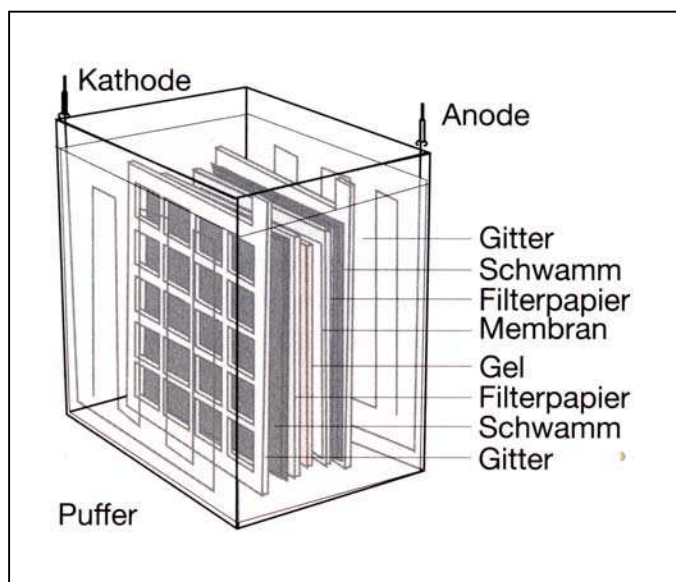


Abb. 2.13 Standardapparatur für das Tankblotting: Die mäanderförmig verlaufenden Elektrodendrähte sind in der hinteren Wand angebracht. Das Gel und die Membran werden zwischen Filterpapier, Schwämme und Gitter eingeklemmt; Lottspeich, Bioanalytik, 1998.

Tab. 2.3. Sandwich-Verfahren beim Western Blot: Oben befindet sich die Kathode und unten die Anode

Abfolge der einzelnen Lagen	Vorinkubation in:
Schwamm	Transfer-Puffer
Filterpapier	Transfer-Puffer
PVDF-Membran	Methanol + Transfer-Puffer
Gel	Transfer-Puffer
Filterpapier	Transfer-Puffer
Schwamm	Transfer-Puffer

Durch das Elektplotting werden die Proteine aus der Polyacrylamidmatrix über das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld eluiert und auf die Membran transferiert. Dabei bleibt die lokale Auflösung der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Die Elution der Proteine aus dem Gel erfolgt mit Hilfe des an die Proteine direkt gebundenen SDS und durch freies SDS in der Gelmatrix. Während des Blottvorgangs kommt es zu folgendem Effekt, der durch den Zusatz von Methanol verstärkt wird: Die Wechselwirkung zwischen Protein- und SDS-Molekülen wird verringert, und die Adsorption der Proteine an die hydrophobe Membranoberfläche begünstigt. Bei diesem Effekt und somit auch bei der Transfereffizienz spielen auch Eigenschaften der Proteine eine Rolle: Erstens hängt die Wanderungsgeschwindigkeit vom Molekulargewicht der Proteine ab. Zweitens wird die Stärke der Wechselwirkung von Proteinen mit dem SDS, der Polyacrylamidmatrix oder der Membranoberfläche durch die Aminosäurezusammensetzung der Proteine beeinflusst. Weiterhin müssen für eine hohe Transfereffizienz Parameter wie Ionenstärke, pH-Wert des Transferpuffers und Additive wie Methanol, die Proteinkonzentration und die Vernetzung des Gels berücksichtigt werden (verändert nach Lottspeich,1998).

Nach erfolgtem Transfer wurde die Gitterkassette auseinandergebaut und die Membranen für 1h bei RT in Blockierungspuffer - 5% Trockenmilch bei ERK1/2 bzw. 5% BSA bei EGF-R – gelegt und leicht gerüttelt. Dadurch werden die unspezifischen Bindungen der Proteine abgesättigt.

Um die gewünschten Proteine sichtbar zu machen wurde wie folgt verfahren:

Die spezifischen Erstantikörper wurden in dem jeweiligen Blockierungspuffer auf die Membranen gegeben und über Nacht bei 4°C in ständiger Bewegung gehalten.

- a. Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2 phospho) → Verdünnung = 1:5000
- b. P44/42 MAPK (ERK1/2 gesamt) → Verdünnung = 1:2000
- c. EGF-Receptor activated → Verdünnung = 1:1000
- d. EGF-Receptor → Verdünnung = 1:2000

Anschließend wurden die Membranen dreimal 5min mit TBST gewaschen, die gebundenen Erstantikörper mit einem anti-mouse bzw. anti-rabbit IgG-horseradish Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper (1:2000 in dem jeweiligen Blockierungspuffer) markiert (1h, RT, Bewegung) und erneut dreimal 5min mit TBST gewaschen. Zuletzt wurden die Signale mittels Chemilumineszenz auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht.

Materialien für den Western Blot

Tab. 2.4 Lösungen für den Western Blot

Fertige Lösungen	Zusammensetzung
Towbin Blotting Buffer PH 8,3	25 mM Tris 192 mM Glycin 10% Methanol
10x TBS PH 7,6	200mM Tris 1,4M NaCl 5N HCL
TBS-T	1x TBS 0,1% Tween 20 (polyoxyethylensorbitanmonalaureat)
Blocking Buffer	TBS-T 5% BSA oder 5% Milchpulver

Weiterhin wird benötigt:

Mini Trans Blot[®] Cell

Power Pac 200

Immobilin[™]-P (Transfer Membran)

Lumi-Glo Reagent

Hyperfilm ECL

3. Ergebnisse

3.1. Beeinflussung der Verteilung von $\beta 1$ -Integrinen auf der Zelloberfläche durch mechanische Streckung

Um festzustellen, ob eine mechanische Dehnung Auswirkungen auf die Verteilung von $\beta 1$ -Integrinen auf der Zelloberfläche hat, wurden von gestreckten – und ungestreckten Zellen am CLSM Bildserien aufgenommen. Hierzu erfolgte die Aussaat der Zellen in einer Dichte von 1×10^6 /Silikonkammer. Nach 24h Anheftungszeit wurde 15min gestreckt, fixiert + permeabilisiert und mit einem mAb gegen $\beta 1$ -Integrine gefärbt (Abb. 3.1).

Im Vergleich der drei Schnittebenen - basal, medial, apikal - ist zu erkennen, dass die $\beta 1$ -Integrine über die gesamte Zelloberfläche verteilt sind. Als Antwort auf die Streckung kommt es zu einer Umverteilung der $\beta 1$ -Integrine: Sie wandern vermehrt auf die basale Seite der Zelle und akkumulieren hier zu größeren Komplexen (= Cluster).

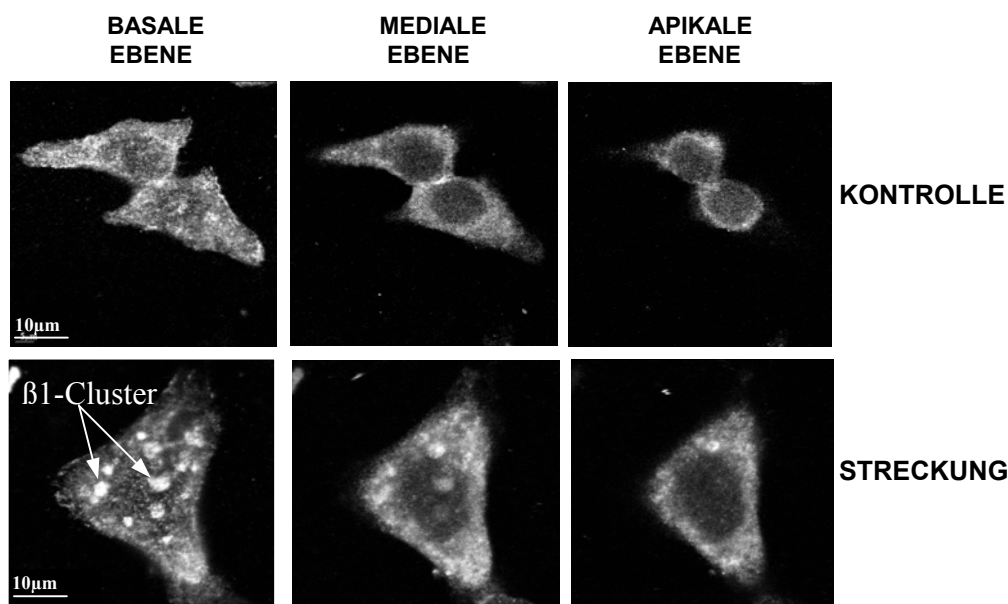


Abb. 3.1 Verteilung von $\beta 1$ -Integrinen auf der Membran

Die erste Spalte stellt die basale Ebene der Zellen dar, die zweite Spalte eine mediale Ebene und die dritte Spalte die apikale Ebene. Die obere Zeile zeigt zwei Kontrollzellen. Die untere Zeile ist beispielhaft für Zellen nach mechanischer Reizung; es ist deutlich die Bildung von $\beta 1$ -Integrin-Clustern (siehe Pfeile) zu erkennen.

3.2. Beeinflussung der $\beta 1$ -Integrin-Menge auf der Zelloberfläche durch mechanische Streckung

Zur Überprüfung, ob es neben der Clusterung von $\beta 1$ -Integrine in Adhäsionsstellen auch zu einer mengenmäßigen Zunahme dieser Integrine auf der Zellmembran kommt, wurden die Zellen in einer Dichte von 2×10^6 /Silikonkammer eingesät, nach 24h Anheftungszeit für die angegebenen Zeiten (Abb. 3.2) gestreckt, in Suspension gebracht, fixiert, mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrine gefärbt und die Fluoreszenzintensität am Flow Zytometer gemessen.

Interessanterweise nimmt die $\beta 1$ -Integrin-Menge auf der Zelloberfläche durch die mechanische Stimulierung nicht zu: Im Vergleich der Kontroll- mit den gestreckten Zellen, unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Streckzeiten, bleibt die $\beta 1$ -Integrin-Menge zu allen Bedingungen mit nahezu 100% konstant.

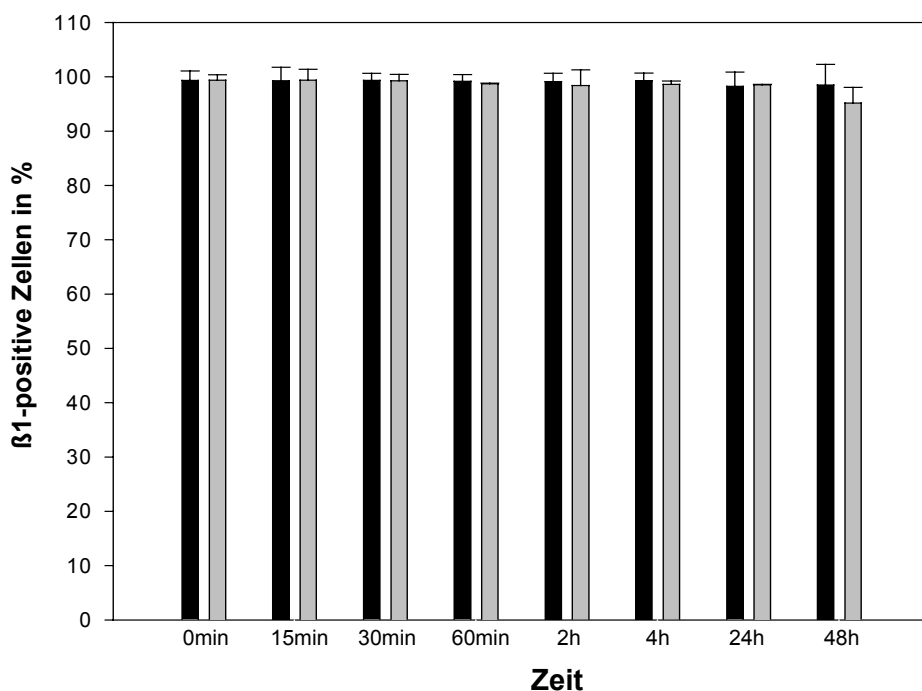


Abb. 3.2 $\beta 1$ -Integrin-Menge auf der Zelloberfläche

Die schwarzen Balken repräsentieren die Kontrollkulturen, die grauen Balken die gestreckten Kulturen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus sechs parallelen, unabhängigen Kulturen ($n=3$). Unter allen Bedingungen ist die $\beta 1$ -Integrin-Menge unbeeinflusst.

3.3 Quantitative Analyse der Bildung von Fokalkontakte

Zur quantitativen Analyse der Bildung von $\beta 1$ -Integrin-Komplexen wurde der Prozentsatz der Zellen mit einer deutlichen $\beta 1$ -Integrin-Clusterung (siehe Material+Methoden) ermittelt. Die Quantifizierung dieser Zellen wurde nach der CLSM-Untersuchung vorgenommen, d.h. zur Auswertung wurden dieselben Präparate herangezogen. Die Aussaatdichte in den Silikonkammern betrug 1×10^6 . Nach 24-stündiger Anheftungszeit wurden die Kulturen gestreckt, fixiert + permeabilisiert, mit anti- $\beta 1$ mAb gefärbt, am Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt und die Werte auf jeweils 100 Zellen bezogen (Abb. 3.3).

Schon nach fünfminütiger Streckung zeigt sich eine Verdreifachung der $\beta 1$ -Integrin-Cluster (17,2%) gegenüber den Kontrollpräparaten (5,6%). Der Wert bleibt nach 15min Streckung mit 17,16% konstant und nimmt nach 30min (15,5%) wieder leicht ab.

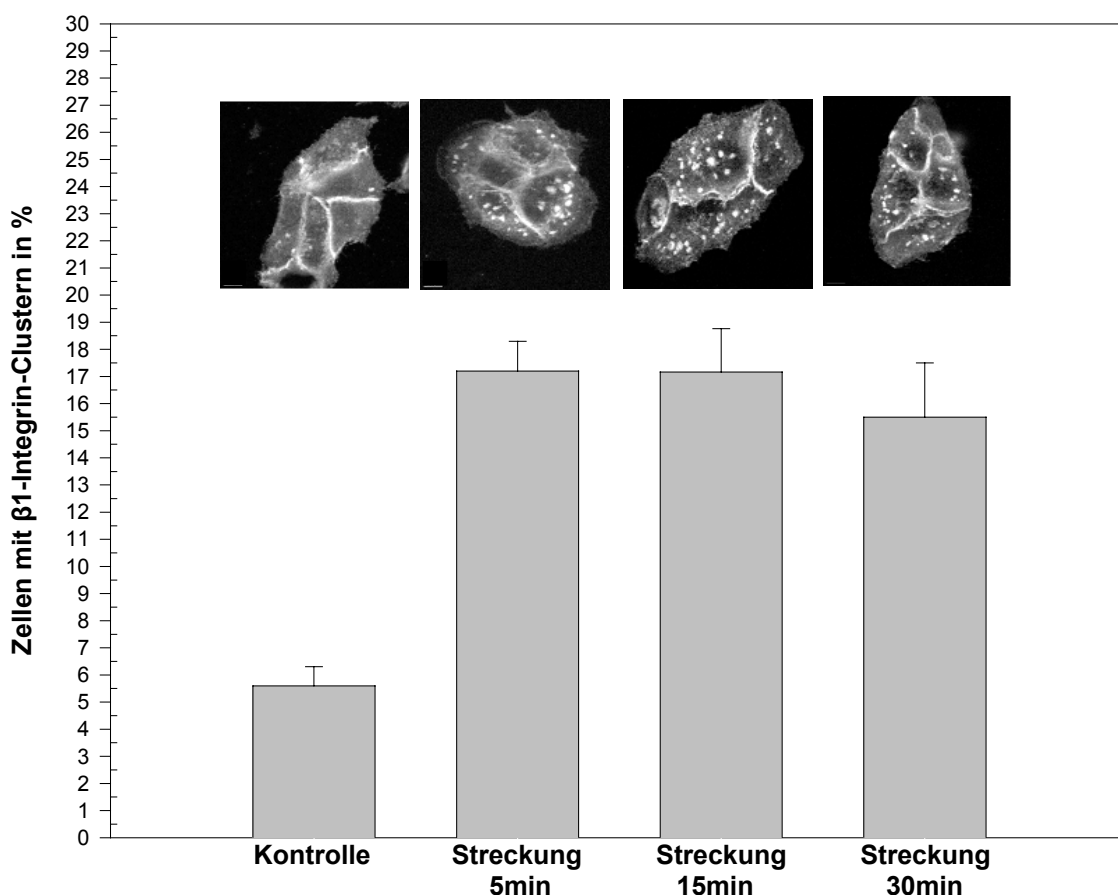


Abb. 3.3 Quantifizierung der $\beta 1$ -Clusterung

Der erste Balken stellt die Kontrollpopulationen dar, die Balken 2-4 die Zellpopulationen nach 5, 15 und 30min Streckung. Die Bild-Beispiele über den Balken verdeutlichen, welche Zellen für die Auswertung herangezogen wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnen sich aus drei parallelen, unabhängigen Präparaten ($n=3$). Ein signifikanter ($p < 0,001$) Anstieg der $\beta 1$ -Integrin-Cluster in den gestreckten Kulturen gegenüber den Kontrollkulturen ist bereits nach 5min zu sehen.

3.4. Adhäsionseigenschaften gestreckter HaCaT-Zellen

In Anbetracht der bisherigen Ergebnisse liegt die Vermutung nahe, dass es durch die vermehrte Bildung von β 1-Integrin-Komplexen zu einer erhöhten Adhäsion der mechanisch stimulierten Zellen kommt. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Experimentserien durchgeführt, wobei die Aussaat der Zellen in einer Dichte von jeweils 2×10^6 /Silikonkammer erfolgte. Die Anzahl der angehefteten Zellen wurde mittels eines Adhäsions-Assays (siehe Material+Methoden) bestimmt.

3.4.1. Vorversuche

Im Vorfeld dieser Experimenten-Reihe waren noch mehrere Fragen zu klären:

- 1) Die optimale Konzentration der adhäsionsvermittelnden Moleküle Fibronectin, Kollegen Typ1 und Laminin war zu ermitteln: Bei allen drei Matrix-Proteinen ist eine maximale Adhäsionsrate bei $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ erreicht (Abb. 3.4).
- 2) Zweitens wurde die optimale Zeit für den adhäsionsfördernden Dehnungsreiz bestimmt. Hierzu wurden die HaCaT-Zellen in Silikonkammern 5min, 15min oder 30min gestreckt, geerntet und wieder ausgesät. → Alle drei Streckzeiten haben auf die Adhäsion eine ähnliche Wirkung: Nach 90- und 120min Anheftungsdauer in den Multischalen verdoppelt sich die Adhäsionsrate der vorgestreckten Zellen gegenüber den Kontrollzellen (Abb. 3.5). Bei allen folgenden Testansätzen wurden die Kulturen jeweils 30min gestreckt.
- 3) In Testreihen wurde die optimale Einsatzkonzentration des adhäsionsblockierenden Antikörpers gegen die β 1-Integrin-Untereinheiten bestimmt. → Eine wirkungsvolle Adhäsions-Blockierung ist bei $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ gewährleistet.
- 4) Der für die Zugabe des Antikörpers optimale Zeitpunkt war zu bestimmen: Entweder direkt bei der Aussaat oder nach der Anheftungszeit der Zellen. → Eine direkte Zugabe bei der Aussaat beeinträchtigt das erhöhte Adhäsionspotential vorgestreckter HaCaT-Zellen nicht; erwartet wurde eine Verminderung der Adhäsion bei der Wiederaussaat in Multischalen der mit dem Antikörper behandelten Kulturen. Eine Zugabe nach der Anheftungszeit war bei der Adhäsionsinhibierung erfolgreicher und wurde somit für die Experimente gewählt.

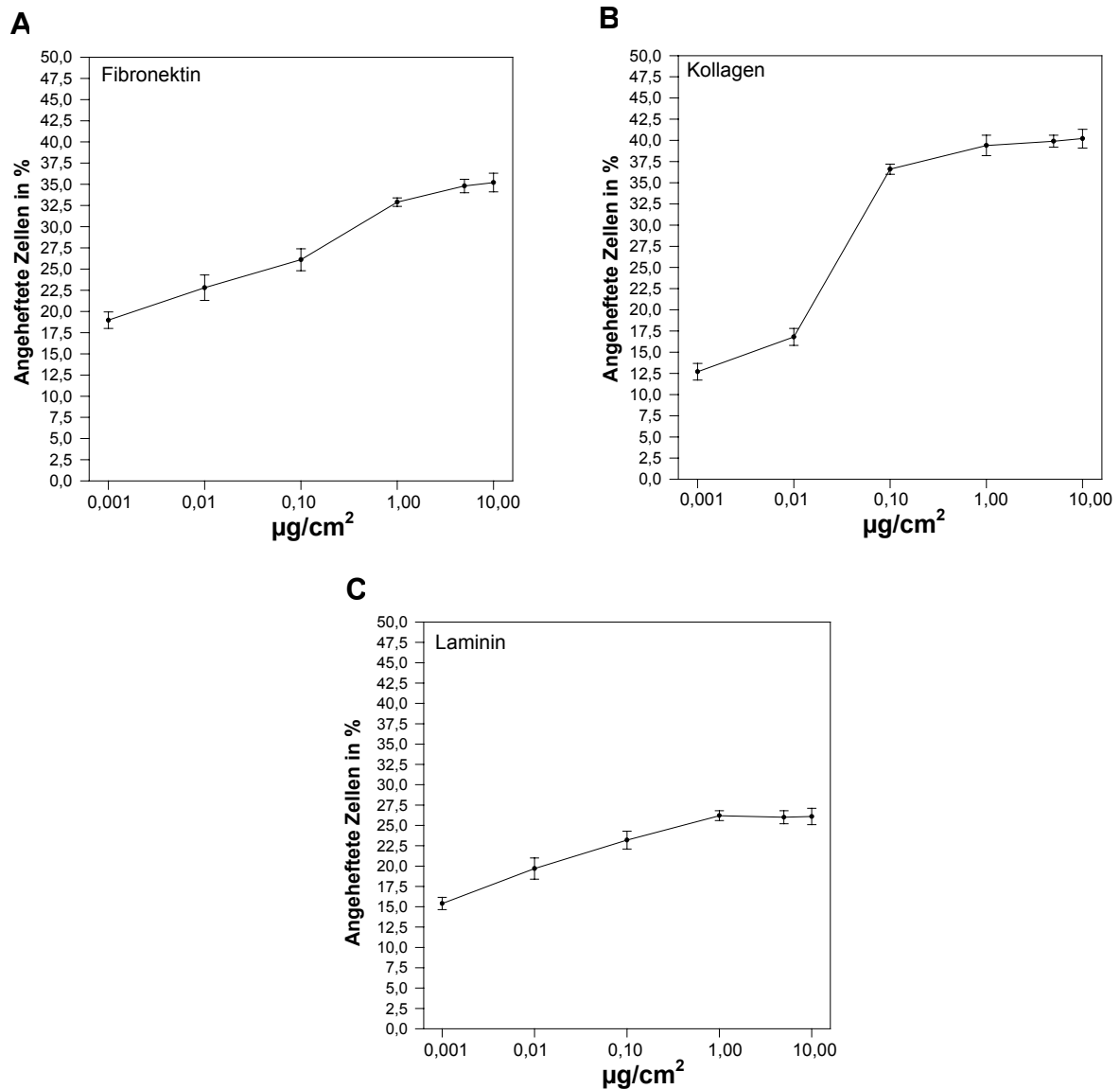


Abb. 3.4 Konzentrationsreihen von Fibronectin, Kollagen und Laminin

Für jedes Matrix-Protein wurde folgende Konzentrationsreihe getestet: 0,001, 0,01, 0,1, 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Hierzu wurden die Silikonkammern mit den entsprechenden Konzentrationen der Matrix-Proteine beschichtet und jeweils 1×10^6 Zellen pro Kammer eingesät. Nach einer Anheftungszeit von einer Stunde wurden die Zellen zweimal mit PBS⁻ gewaschen und die Höchst-Färbung direkt in den Silikonkammern durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit 0,1%igem SDS lysiert und die Zellzahl der angehefteten Zellen anhand der mitgeführten Standardkurve photometrisch bestimmt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergaben sich aus drei parallelen, unabhängigen Kulturen (n=2).

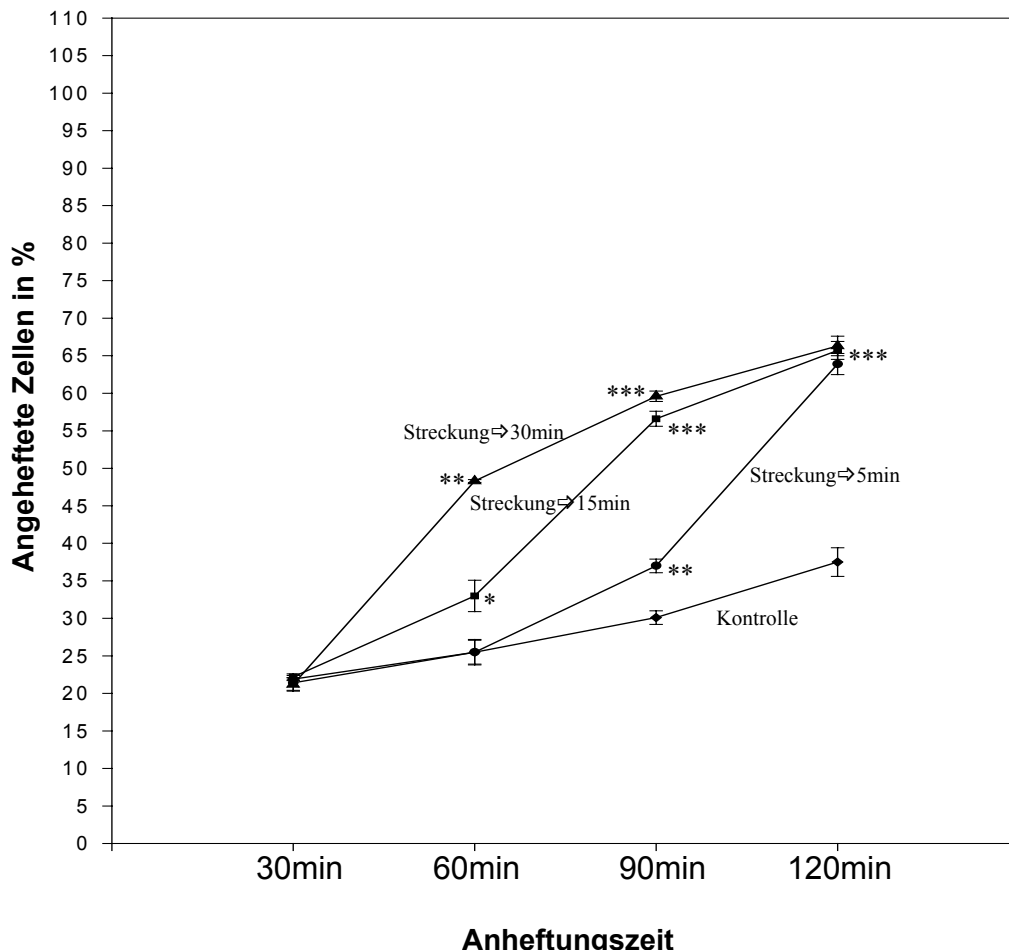


Abb. 3.5 Kinetik des Adhäsionsverhaltens bei unterschiedlichen Streckungszeiten

Jeder Punkt steht für die Mittelwerte und Standardabweichungen von sechs parallelen, unabhängigen Kulturen (n=3).

Im Signifikanztest wurden die jeweiligen Streckzeiten gegen die Kontrolle verglichen: * = p<0,1 (niedrig signifikant), ** = p<0,01 (hoch signifikant), *** = p<0,001 (höchst signifikant)

Alle Streckzeiten (5, 15, 30min) führen bereits nach 60-90min zu einem deutlichen Anstieg der Adhäsionsrate und enden nach 120min in einer annähernden Verdopplung der adhärenierten Zellen.

3.4.2. Morphologie der Zellen während des Adhäsionsversuchs

Abbildung 3.6 stellt ein Beispiel für die Morphologie der Zellen während des Anheftungs- und Adhäsionsprozesses dar. Abgerundete Zellen, die nach 15min und 30min Anheftungszeit ausschließlich angetroffen werden, sind angeheftet aber noch nicht adhärirt. Nach 45min sieht man neben den abgerundeten Zellen bereits einige Zellen, die sich auf der Matrix auszubreiten beginnen, diese Zellen sind adhärirt. Das Verhältnis von angehefteten zu adhärirten Zellen verschiebt sich mit zunehmender Anheftungszeit zu Gunsten der adhärirten Zellen. Nach 90min sind nur noch wenige, nicht adhärirt Zellen vorhanden.

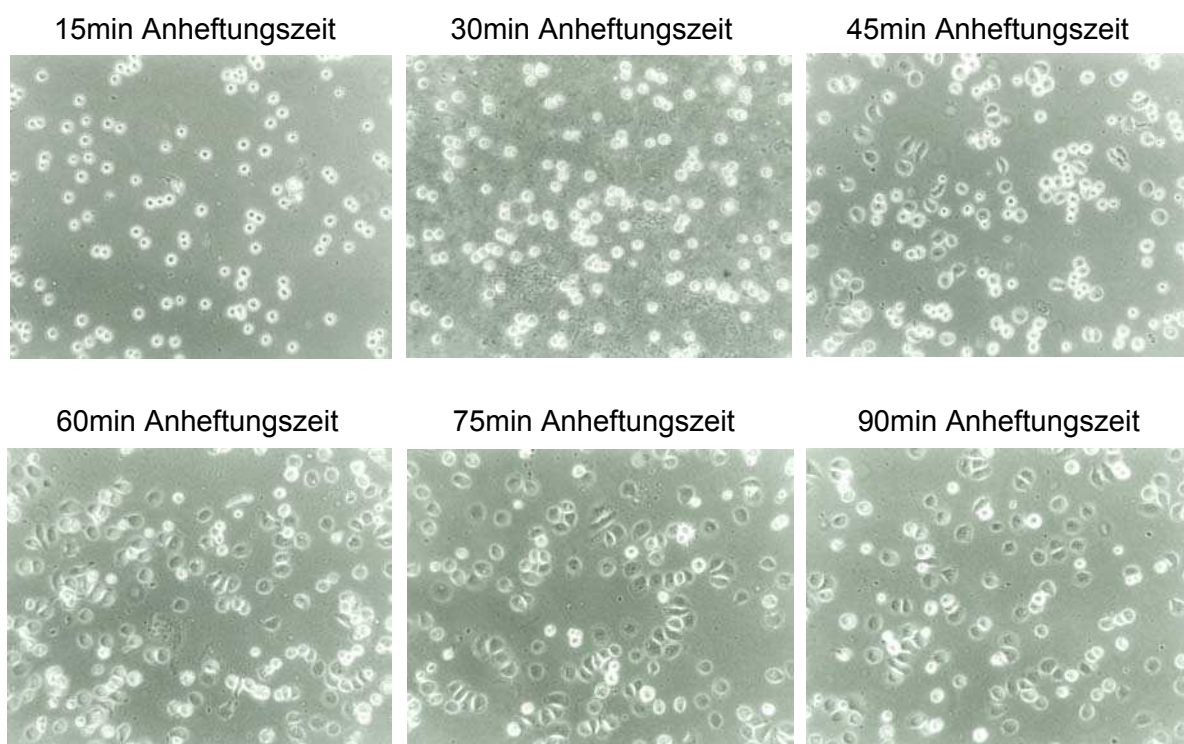


Abb. 3.6 Morphologie der Zellen während des Adhäsionsprozesses

Die Zellen wurden zuerst in Silikonkammern gestreckt, geerntet, in Multischalen wiederausgesät und die Kulturen für die angegebenen Zeiten ruhen lassen. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen, um die losen Zellen zu entfernen. Dabei wurden nur angeheftete Zellen leichter ausgewaschen als adhärirte Zellen, was die Zunahme der Adhäsionsrate in den nachfolgenden Grafiken erklärt. Die Morphologie der Zellen wurde mittels eines Fotoapparates festgehalten.

3.4.3. Adhäsionseigenschaften gestreckter HaCaTs auf verschiedenen Matrices

Die Betrachtung der Ergebnisse verdeutlicht, dass es erwartungsgemäß zu einer gesteigerten Adhäsion kommt und dass diese auf verschiedenen Matrices unterschiedlich ausfällt (Abb. 3.7 A-D):

1. Grafik A zeigt eine signifikant erhöhte Adhäsionsrate der gestreckten Zellen gegenüber den Kontrollzellen auf einer Arginin+Serum-Beschichtung. Ein deutlicher Unterschied in der Adhäsionsrate ist nach 60min zu sehen. Ab diesem Zeitpunkt verzeichnen die Kontrollkulturen nur eine geringe Steigerung der Adhäsionsrate. Dagegen nimmt die Adhäsionsrate der gestreckten Kulturen enorm zu und erreicht erst nach 90min mit 75% eine Sättigung ($P \leq 0,001$).
2. In der Abbildung B ist das Adhäsionsverhalten auf Fibronektin dargestellt. Auf dieser Matrix scheinen die gestreckten Zellen schneller zu adhären als die Kontrollzellen, da in dem Abschnitt zwischen 30-60min die gestreckten Zellen eine signifikant höhere Adhäsionsrate aufweisen als die Kontrollzellen ($P \leq 0,01$). Nach 90min haben aber beide Population die gleiche Adhäsionsrate von 85% erreicht.
3. Grafik C zeigt das Adhäsionsverhalten auf Kollagen. Hier adhären bis zu einem Zeitpunkt von 45min gleich viele Zellen der Kontroll- und gestreckten Populationen. Danach haben die Kontrollkulturen mit 65% Adhäsionsrate bereits ihre Sättigung erlangt, wohingegen die gestreckten Kulturen erst nach 60min mit 90% Adhäsionsrate die Sättigung erreichen ($P \leq 0,01$).
4. Im Gegensatz dazu ist auf Laminin kein Unterschied in der Adhäsionsrate zwischen den Kontroll- und gestreckten Zellen zu beobachten (Abb. D). Beide Kurven verlaufen parallel und gehen nach 60min mit 60% Adhäsionsrate in den Sättigungsbereich über.

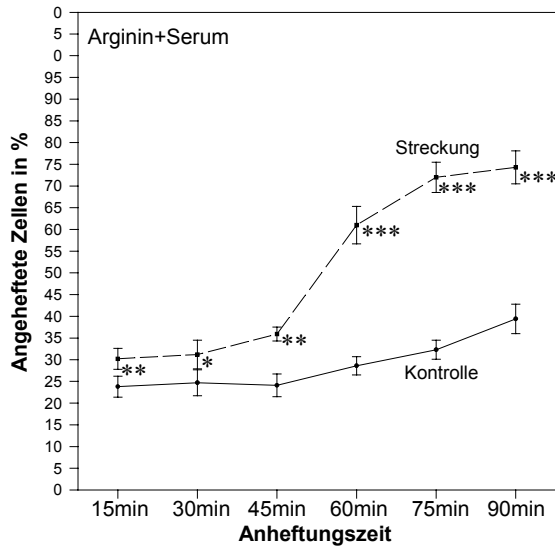
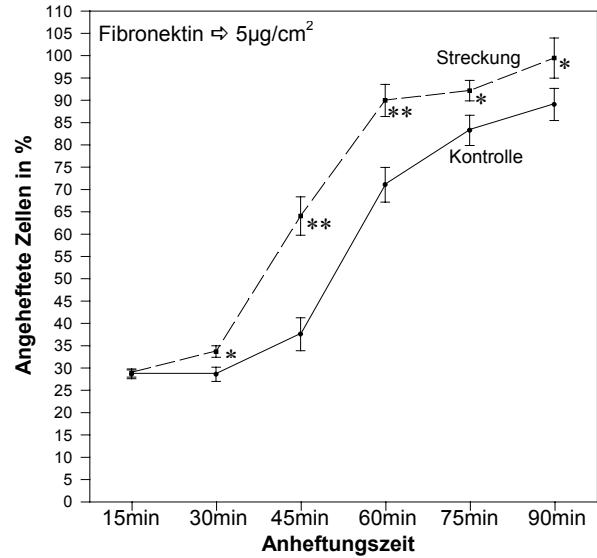
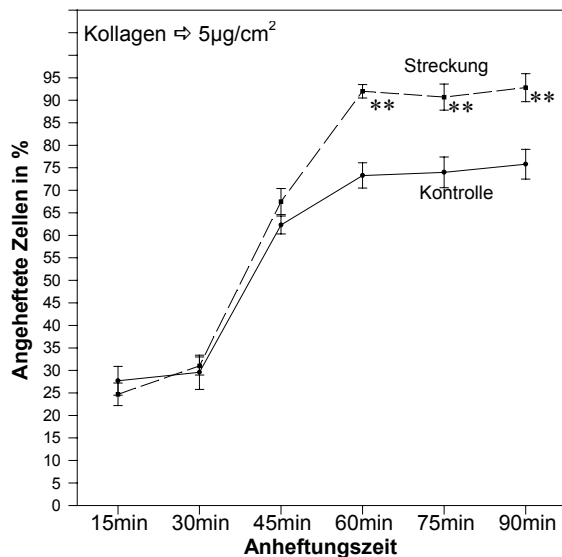
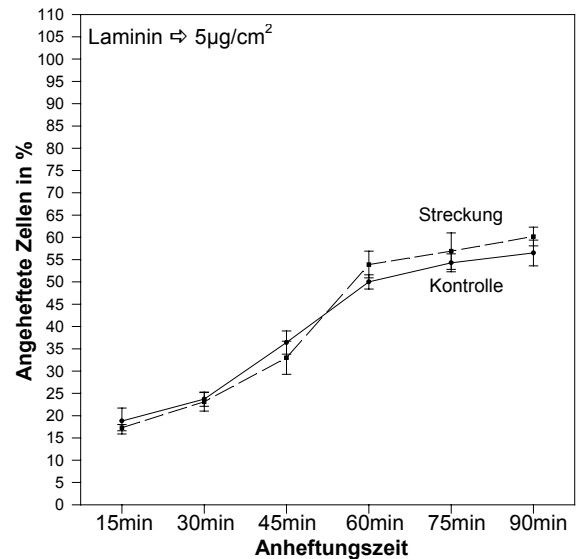
A**B****C****D**

Abb. 3.7 Adhäsionsverhalten auf unterschiedlichen Matrices

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus jeweils drei parallelen, voneinander unabhängigen Testansätzen ermittelt (n=6).

Signifikanzen (p) jeweils Streckung gegen Kontrolle: * = $p < 0,1$ (niedrig signifikant), ** = $p < 0,01$ (hoch signifikant), *** = $p < 0,001$ (höchst signifikant)

- A) Arginin+Serum
- B) Fibronektin
- C) Kollagen
- D) Laminin

Auf den Matrices Arginin+Serum, Fibronektin und Kollagen konnte durch eine mechanische Streckung der Zellen eine Steigerung der Adhäsionsrate erzielt werden.

3.4.4. Nähere Betrachtung der Arginin+Serum-Beschichtung

Im Anschluss an die obige Experimenten-Serie wurde untersucht, welche Komponente in der Arginin+Serum-Beschichtung für die stark erhöhte Adhäsion verantwortlich ist. Dazu wurde der Versuch entweder auf Arginin oder Serum wiederholt (Abb. 3.8 B+C). Dabei zeigte sich, dass die Einzelkomponenten im Vergleich mit der Arginin+Serum-Beschichtung keinen Einfluss auf die Adhäsionsrate der Zellen haben. Die Daten der Kontroll- und gestreckten Zellen lassen erst nach 90min eine leicht vermehrte Adhäsion beider Populationen erkennen. Weiterhin wurde den Hinweisen nachgegangen, dass Serumalbumine für den adhäsionssteigernden Effekt mitverantwortlich sein könnten. Für dieses Experiment wurde eine Arginin+BSA-Beschichtung gewählt (Abb. 3.8 D). Tatsächlich konnte erneut eine ebenso starke Steigerung der Adhäsionsrate verzeichnet werden wie auf der Arginin+Serum-Beschichtung (Abb. 3.8 A). Bereits nach 45min haben sowohl die Kontroll- als auch die gestreckten Populationen ihren Sättigungsbereich erreicht, wobei die gestreckten Kulturen mit 90% eine doppelt so hohe Adhäsionsrate aufweisen als die Kontrollkulturen mit 45% ($p \leq 0,001$).

3.4.5. Adhäsionsverhalten nach Behandlung mit einem funktionsblockierenden Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrine

Da ein besonderes Interesse den $\beta 1$ -Integrinen zukommt, sollte im letzten Adhäsions-experiment nachgewiesen werden, dass diese Oberflächenrezeptoren tatsächlich an der Zunahme der Adhäsionsstärke beteiligt sind, was schon anhand den CLSM-Bildern angedeutet wird. Hierzu wurden die Zellkulturen vor der Durchführung des Adhäsions-Assay 24h mit einem funktionsblockierenden Antikörper gegen $\beta 1$ -Integrine inkubiert. Dieser Versuch lieferte die erwarteten Ergebnisse: Die Kulturen, die mit dem Antikörper vorbehandelt wurden, wiesen eine stark verminderte Adhäsionsrate auf. Nach 120min wurden folgende Werte erlangt (abnehmende Reihenfolge): Gestreckte Kulturen ohne $\beta 1$ -Blockierung (62,9%) > Gestreckte Kulturen mit $\beta 1$ -Blockierung (40,3%) > Kontrollkulturen ohne $\beta 1$ -Blockierung (37,8%) > Kontrollkulturen mit $\beta 1$ -Blockierung (33,5%). Somit konnte eine Beteiligung von $\beta 1$ -Integrinen an dem Prozess der Adhäsionssteigerung durch mechanische Dehnung bestätigt werden (Abb. 3.9).

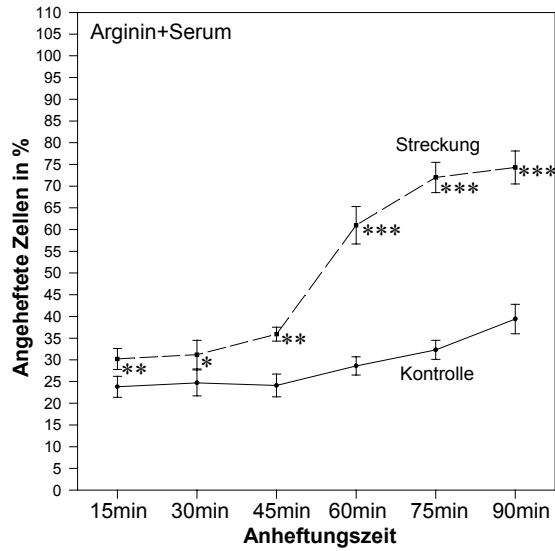
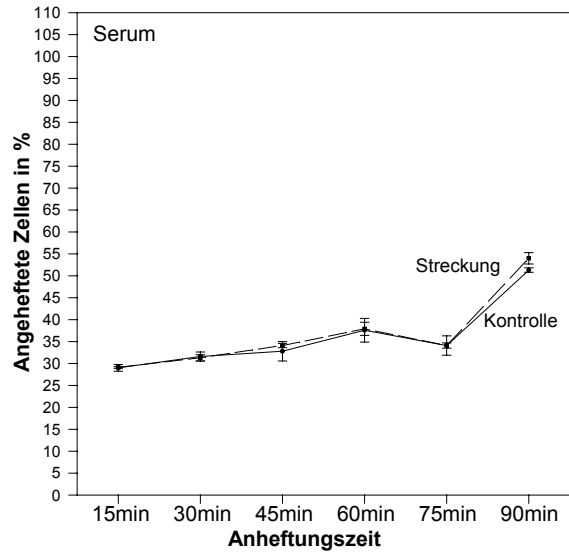
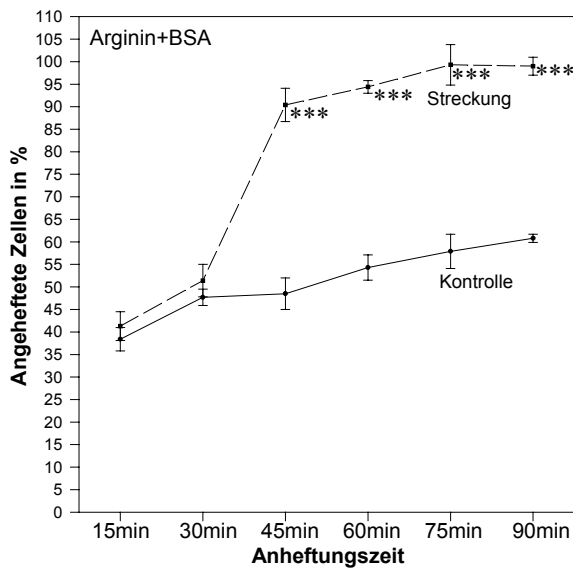
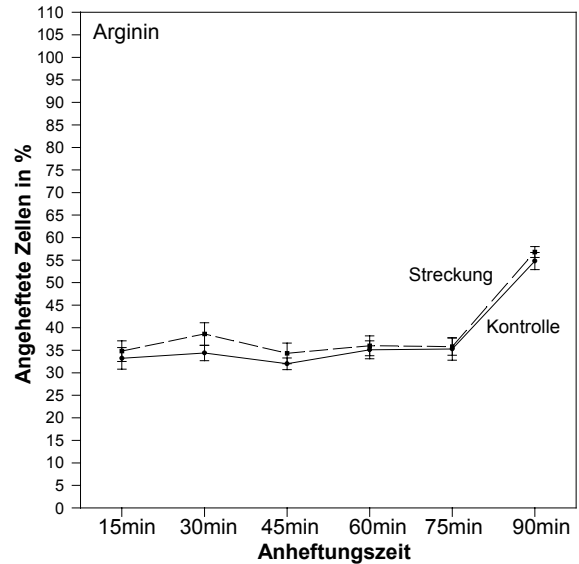
A**B****D****C**

Abb. 3.8 Adhäsionsverhalten auf unterschiedlichen Matrices

Die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnen sich jeweils aus drei parallelen, unabhängigen Kulturen (n=5).

Signifikanzen (p) jeweils Streckung gegen Kontrolle: * = $p < 0,1$ (niedrig signifikant), ** = $p < 0,01$ (hoch signifikant), *** = $p < 0,001$ (höchst signifikant)

- A) Arginin+Serum
- B) Serum
- C) Arginin
- D) Arginin+BSA

Ein Vergleich der angeführten Beschichtungen zeigt, dass bestimmte Serumbestandteile in Kombination mit Arginin für die Steigerung der Adhäsionsrate mitverantwortlich zu sein scheinen.

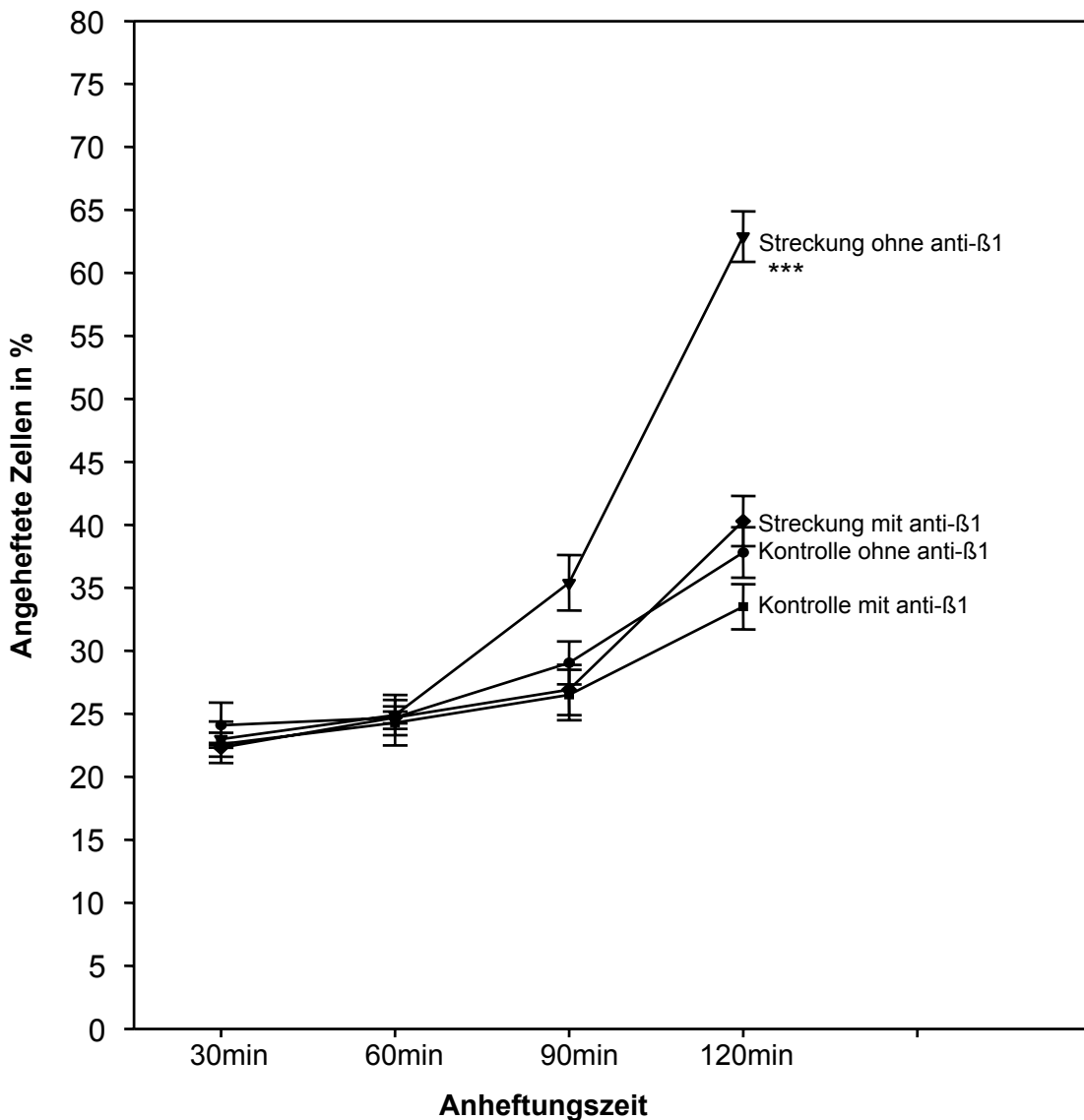


Abb. 3.9 Einfluss der β1-Integrine auf das Adhäsionsverhalten

Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich wiederum aus drei parallelen, unabhängigen Kulturen (n=3). Signifikanzen (p) / ohne β1-Antikörper (-) / mit β1-Antikörper (+):
 Streckung - gegen Kontrolle - : 30min > p=0,5 / 60min > p=1 / 90min > p=0,01 / 120min > p=0,001
 Streckung - gegen Streckung + : 30min > p=0,5 / 60min > p=1 / 90min > p=0,01 / 120min > p=0,001
 Kontrolle - gegen Kontrolle + : 30min > p=0,5 / 60min > p=0,5 / 90min > p=0,1 / 120min > p=0,05
 Die mit dem funktionsblockierenden anti- β1-Integrin Antikörper vorbehandelten Kulturen weisen eine niedrigere Adhäsionsrate auf als die Kontrollkulturen. Dies spricht für eine Beteiligung von β1-Integrinen an dem mechanisch stimulierten Adhäsionsprozess.

3.5. Steigerung der Proliferationsrate gestreckter HaCaT-Zellen

Literaturstellen (Wilso et al., 1995, Yano et al., 2004) belegen, dass eine mechanische Stimulierung von Zellen die Proliferation erhöht. Um zu prüfen, ob dies auch bei einer Dehnung der Zellen so ist, wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 in Silikonkammern ausgesät und nach einer 28-stündigen Ruhephase die BrdU-Inkorporationsrate (=S-Phasenanteil) ermittelt. Die Zellkulturen wurden hierzu einer Doppelfärbung mit einem anti-BrdU-Antikörper und Bisbenzimid (Höchst-Färbung) unterzogen und anschließend sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Zahl der BrdU-positiven Zellen am Lichtmikroskop ausgezählt und in Prozent umgerechnet.

Die Wirkung der mechanischen Stimulierung auf die Zellproliferation einer konfluenten – und einer subkonfluenten Kultur ist in Abbildung 3.10 zu sehen. Die blauen Zellkerne sind einzig mit Bisbenzimid gefärbt, die violetten Zellkerne haben zusätzlich BrdU inkorporiert. Unter beiden Bedingungen (konfluent und subkonfluent) ist in den gestreckten Zellkulturen eine Zunahme der in der S-Phase befindlichen Zellen zu beobachten, die in den subkonfluenten Populationen erwartungsgemäß stärker ausfällt.

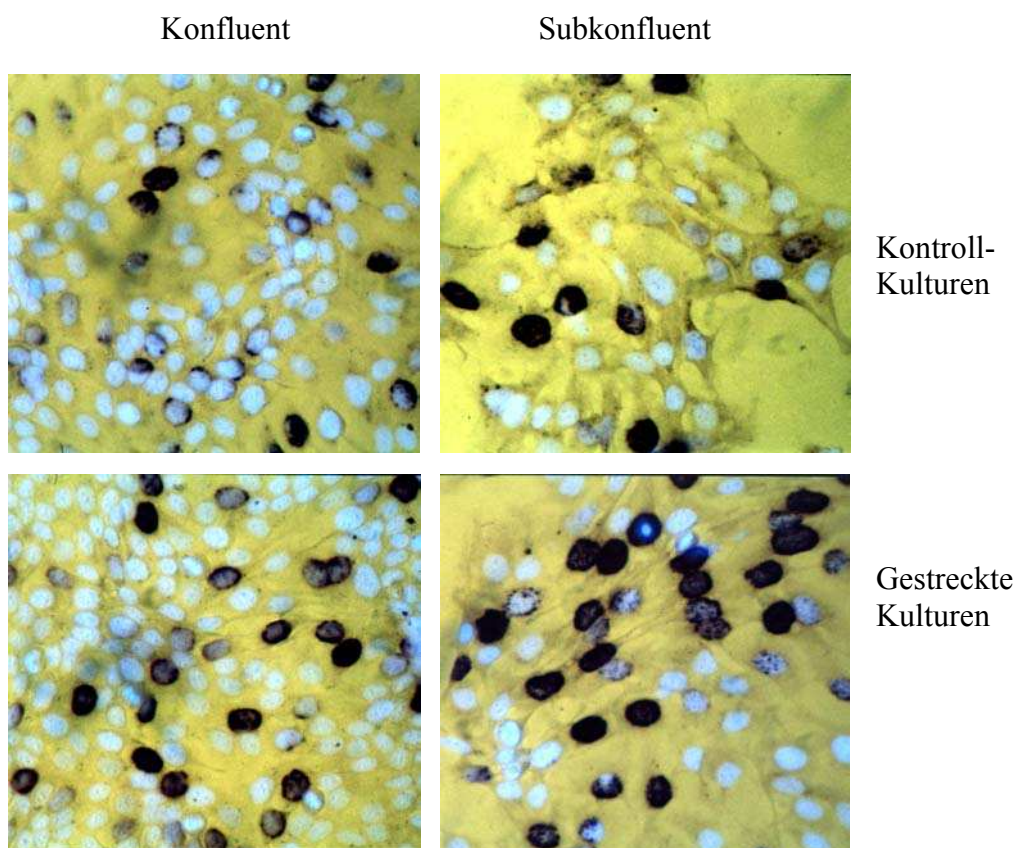


Abb. 3.10 BrdU-Einbaurate unter mechanischer Stimulierung

Doppelfärbung von Zellkulturen mit anti-BrdU und Bisbenzimid. Zeile 1 zeigt Kontrollzellen, Zeile 2 gestreckte Zellen. In Spalte 1 ist eine konfluente und in Spalte 2 eine subkonfluente Kultur dargestellt. Die Bilder lassen die proliferationsfördernde Wirkung der Streckung erkennen.

3.5.1. Proliferations-Kinetik gestreckter HaCaTs

Die Versuche, deren Ergebnisse in Abbildung 3.11 dargestellt sind, beschreiben die Auswirkung von Einzelstreckungen verschiedener Zeiträume (12h, 14h, 16h, 18h, 20h, 22h, 24h) in Bezug auf das Proliferationsverhalten. In allen untersuchten Kulturen kam es zu einer mehr oder weniger starken Steigerung der Proliferationsrate der gestreckten Zellen gegenüber den Kontrollzellen. Darüber hinaus ist zu sehen, dass die Proliferationsrate der gestreckten Zellen oszilliert, wobei beginnend bei 12h alle 6h ein Proliferationshöhepunkt erreicht wird. Diese Oszillation der Proliferationsrate ist in den Kontrollkulturen nicht zu beobachten. Außerdem nimmt die Proliferationsrate sowohl der Kontroll- als auch der gestreckten Zellen in jeder „Zellteilungsrunde“ leicht zu.

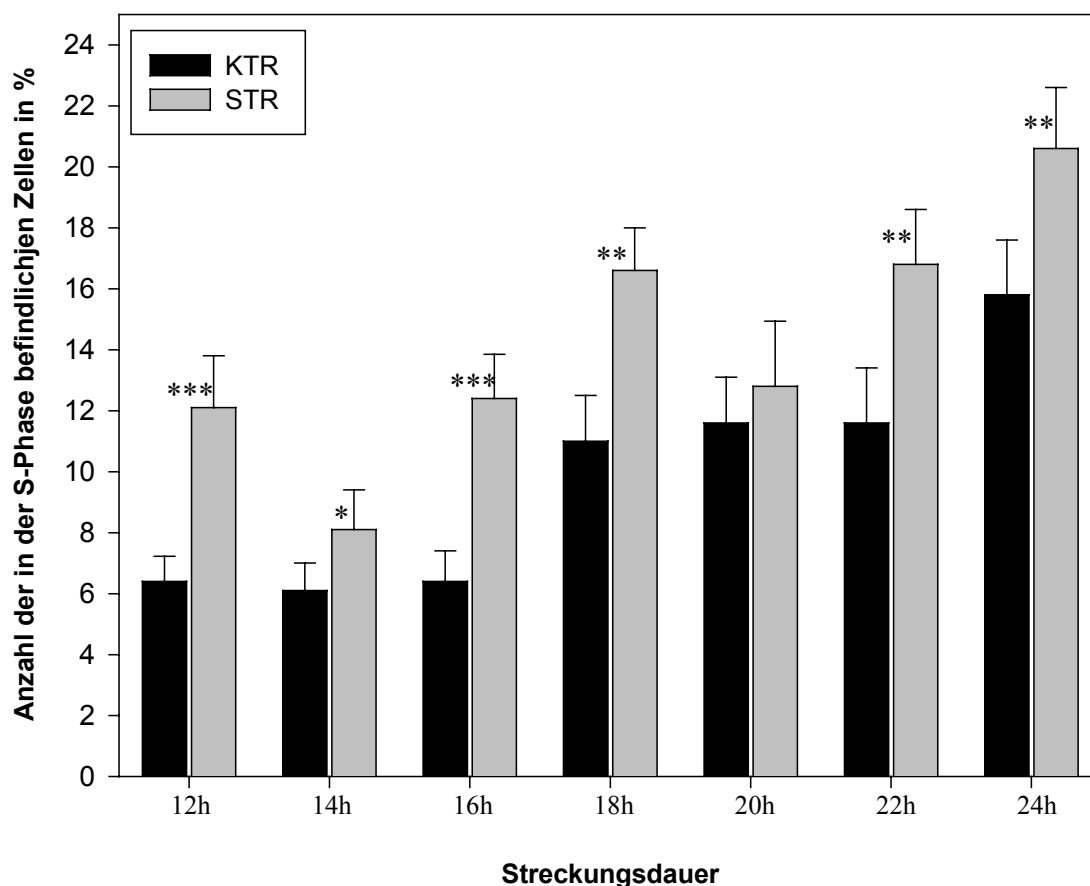


Abb. 3.11 Proliferations-Kinetik

Die schwarzen Balken repräsentieren die Kontrollkulturen, die grauen Balken die gestreckten Kulturen. Jeder Balken beinhaltet die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Ansätzen (n=2).

Signifikanzen (p) jeweils Streckung gegen Kontrolle: * = $p < 0,1$ (niedrig signifikant), ** = $p < 0,01$ (hoch signifikant), *** = $p < 0,001$ (höchst signifikant).

Die Proliferationsrate der gestreckten Zellen ist gegenüber den Kontrollzellen erhöht.

3.5.2. Proliferationsverhalten auf unterschiedlichen Matrices

Mit diesen Experimenten sollte eine Abhängigkeit der Proliferationsrate von den Matrices – Arginin+Serum, Fibronectin, Kollagen - nachgewiesen werden.

Die Resultate sind mit den Ergebnissen der Adhäsionsstudien vergleichbar: Die höchste Proliferationsrate allgemein und die größte Steigerung der Proliferationsrate der gestreckten Zellen gegenüber den Kontrollzellen wurde auf der Arginin+Serum-Beschichtung erzielt (Abb. 3.12). Auf Fibronectin und Kollagen fiel die Proliferationsrate geringer aus. Auch der proliferationsfördernde Effekt der Streckung ist auf beiden Matrices weniger ausgeprägt.

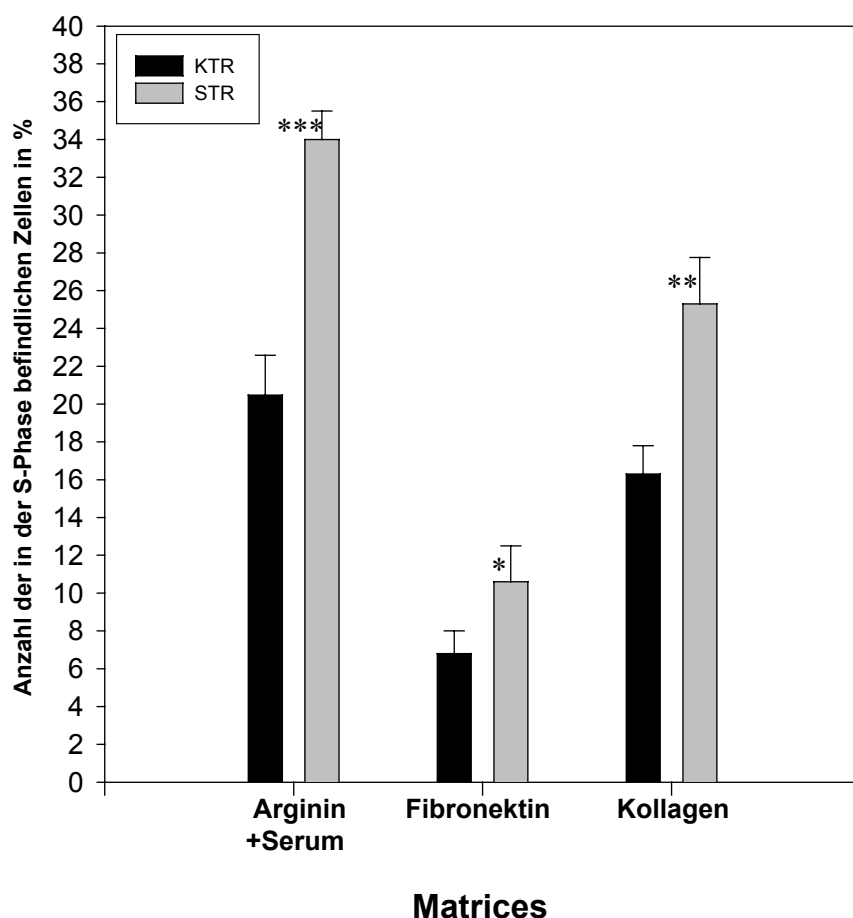


Abb. 3.12 Proliferationsverhalten auf verschiedenen Matrices

Die schwarzen Balken repräsentieren wiederum die Kontrollzellen, die grauen Balken die gestreckten Zellen. Jeder Balken zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Testansätzen (n=2).

Signifikanzen (p) jeweils Streckung gegen Kontrolle: * = $p < 0,1$ (niedrig signifikant), ** = $p < 0,01$ (hoch signifikant), *** = $p < 0,001$ (höchst signifikant).

Wie die Adhäsion ist auch die Proliferation matrixabhängig, wobei die größte Proliferationssteigerung der gestreckten Zellen auf einer Arginin+Serum-Beschichtung erzielt wurde.

3.6. Räumliche Kolokalisation von β 1-Integrinen bzw. E-Cadherine mit EGF-Rezeptoren

3.6.1. β 1-Integrine und EGF-Rezeptoren

Integrine können unter bestimmten Bedingungen mit dem EGF-Rezeptor zusammenarbeiten. Die Hypothese war, dass dies auch bei mechanischer Reizung der Fall ist. Um eine Antwort darauf zu bekommen, wurden die HaCaT-Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 in die Silikonkammern eingesät. Nach einer Anheftungszeit von 24h wurden die Kulturen 5-, 15- oder 30 Minuten gestreckt, fixiert, permeabilisiert, „CLSM-tauglich“ gemacht und eine Doppelfärbung mit anti- β 1- und anti-EGFR Antikörpern durchgeführt. Die räumliche Verteilung der β 1-Integrine und EGF-Rezeptoren wurde dann am Konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht und anschließend mit der „Imaris Software > colocalisation“ analysiert.

Erkennbar ist, dass sowohl β 1-Integrine als auch EGF-Rezeptoren über die gesamte Zelloberfläche verteilt sind (Abb. 3.13A-3.16A). Demzufolge sind auch alle gefärbten Strukturen prinzipiell kolokalisiert (Abb. 3.13B-3.16B > Gesamt-Auswahl). Nach Auswahl eines Bereiches aus dem Intensitätsverteilungs-Diagramm mit hohen Grün- und Rot-Fluoreszenzintensitäten sind genau die Elemente der Zelle zu sehen (Abb. 3.13B-3.16B > 1.Teil-Auswahl), welche auch die Überlagerung des FITC- und TRITC-Kanals in Abb. 3.13A-3.16A zeigen: Eine Kolokalisation beider Oberflächenrezeptoren ist vornehmlich an den Zell-Zell-Grenzen sowohl der Kontroll- als auch der gestreckten Zellen vorhanden. Darüber hinaus koclustern in den gestreckten Zellen β 1-Integrine und EGF-Rezeptoren in der Basalmembran. Die Auswahl einer anderer Haupttrichtungen im Intensitätsverteilungs-Diagramm stellt entweder den Hintergrund oder andere Strukturen der Zelle dar, die nicht zur Untersuchung standen (Abb. 3.13B-3.16B > 2.Teil-Auswahl).

Eine 3D-Darstellung der kolokalisierten Bereiche aller Schnittebenen aus Abb. 3.15 ergibt, dass die Cluster aus β 1-Integrinen und EGF-Rezeptoren direkt in der Basalmembran beginnen und sich in das Zytoplasma der Zelle hinein ausdehnen. Die Kolokalisation der Zell-Zell-Membran erstreckt sich jeweils von der basalen bis zur apikalen Seite der Zellen (Abb. 3.17).

Um zusätzlich auszuschließen, dass es bei der räumlichen Nähe beider Strukturen durch die Anregung des einen Moleküls zu einem Energietransfer auf das andere Molekül kommt (FRET), wurden die Präparate entweder nur mit einem anti- β 1-Antikörper oder nur mit einem anti-EGFR-Antikörper gefärbt und die Clusterung der Moleküle untersucht (Abb. 3.18). Wie zu erwarten, zeigten auch bei einer Einzelfärbung beide Oberflächenrezeptoren eine Zusammenballung in der Basalmembran der Zellen.

KONTROLLE

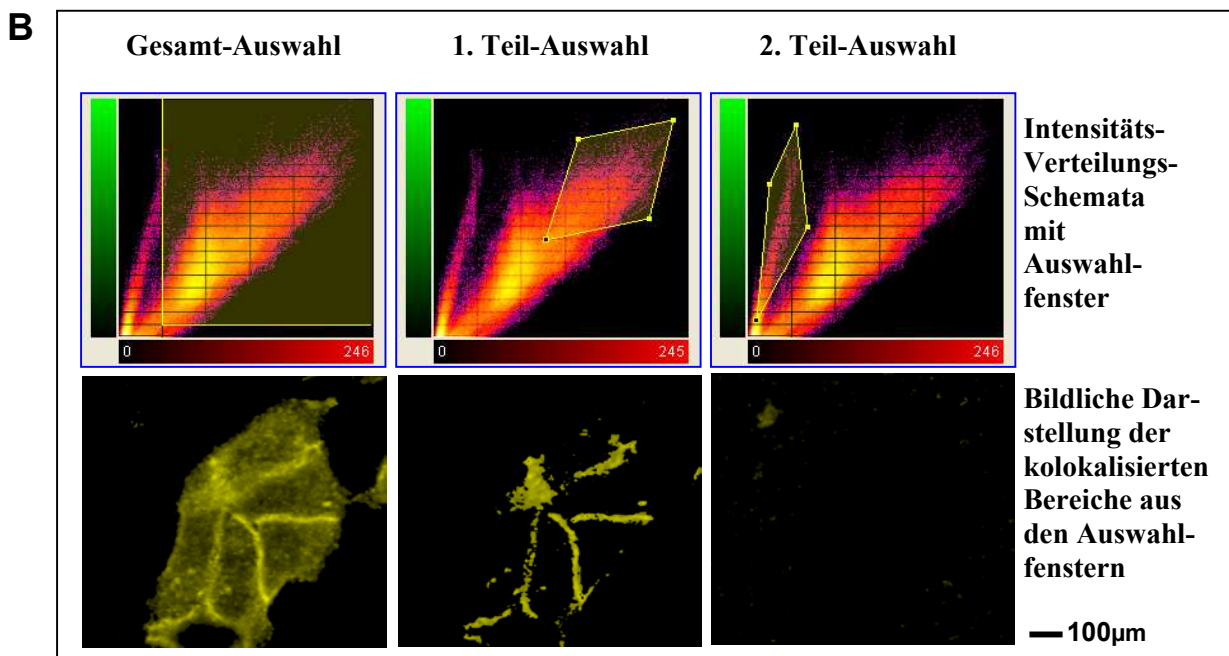
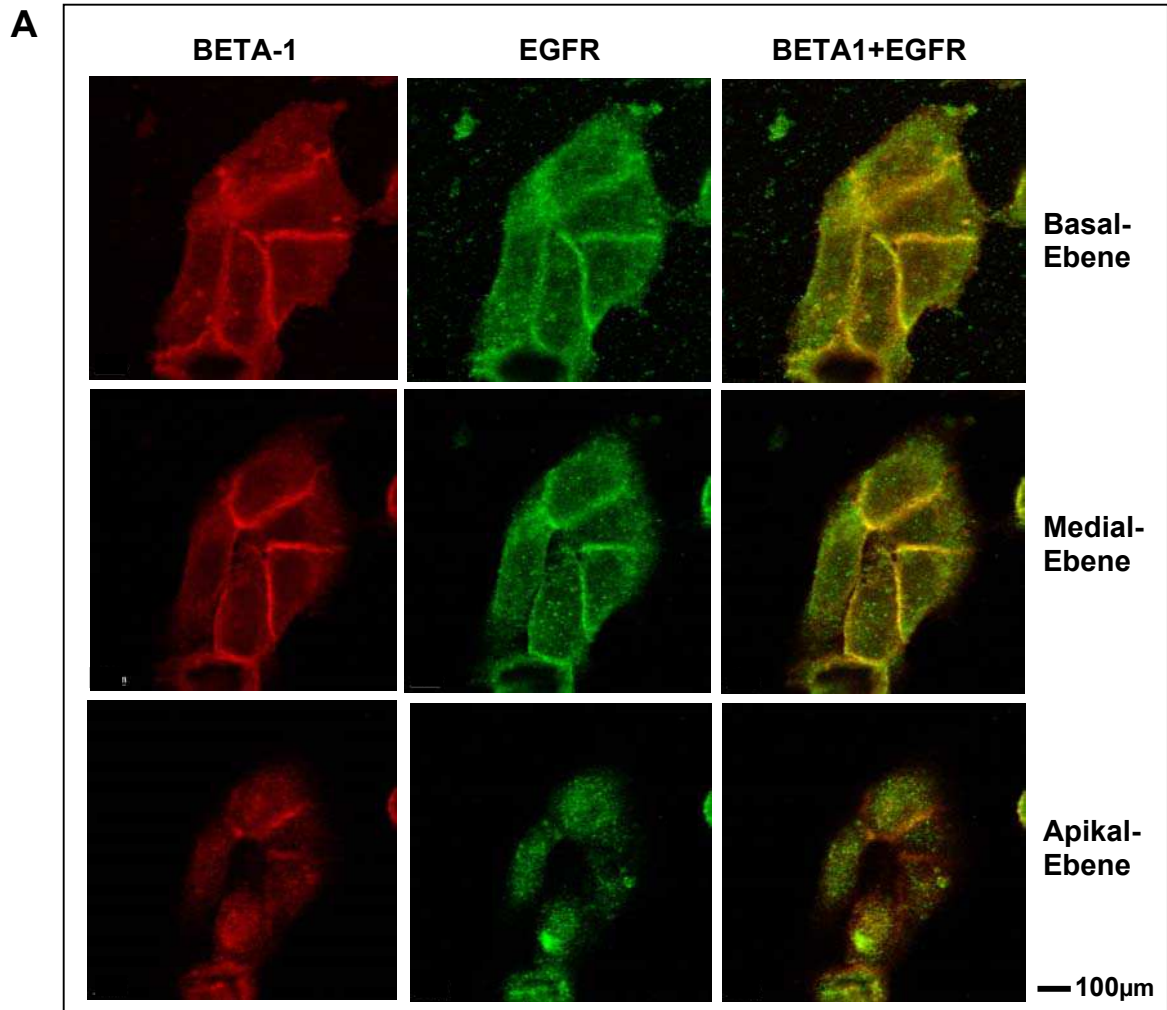


Abb. 3.13 A) Kolokalisation von β 1-Integrinen und EGF-Rezeptor
 B) Kolokalisationstest des basalen Ebene

STRECKUNG ⇒ 5min

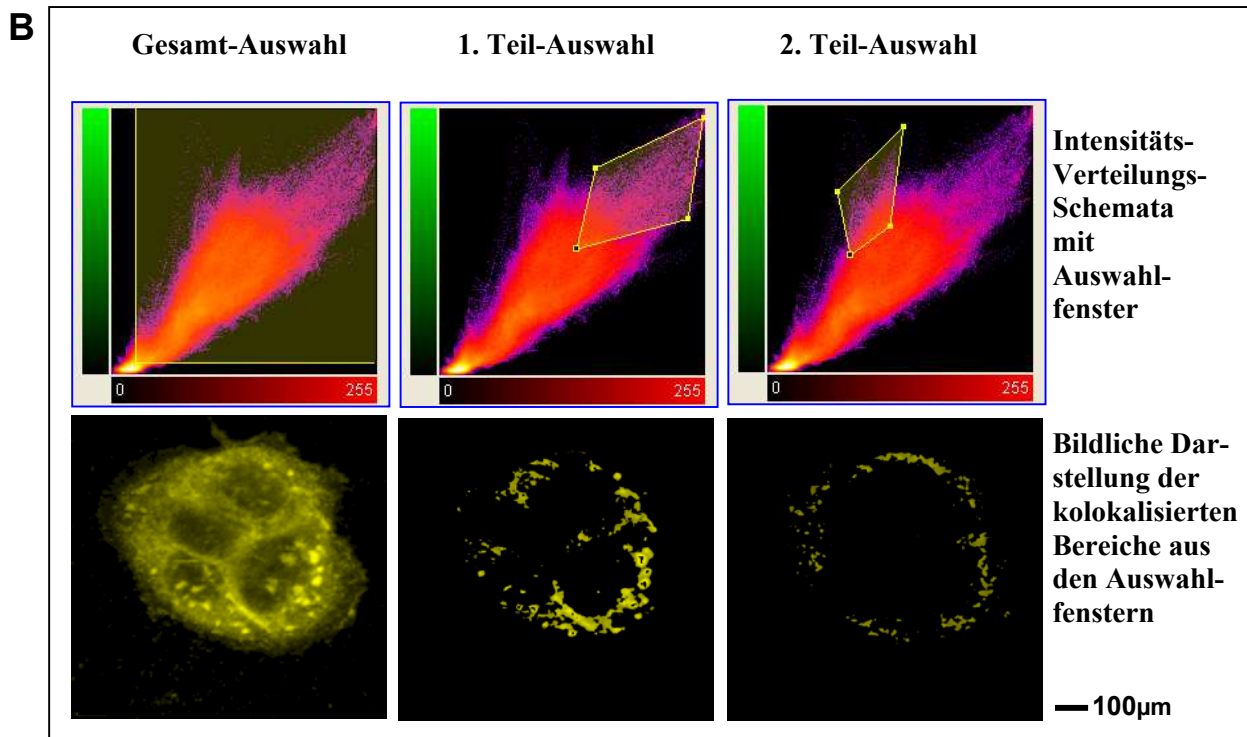
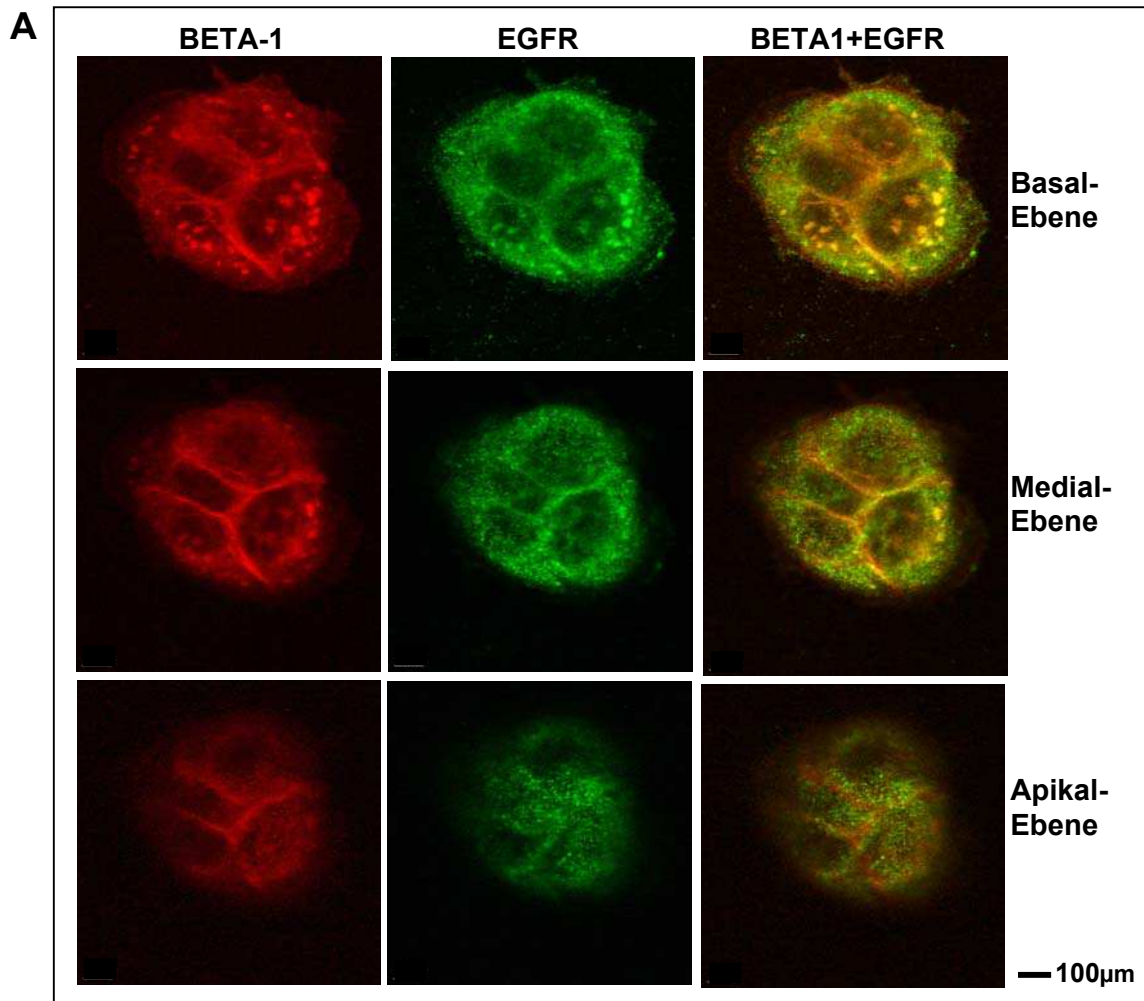


Abb. 3.14 A) Kolokalisation von β 1-Integrinen und EGF-Rezeptore
B) Kolokalisationstest des basalen Ebene

STRECKUNG ⇒ 15min

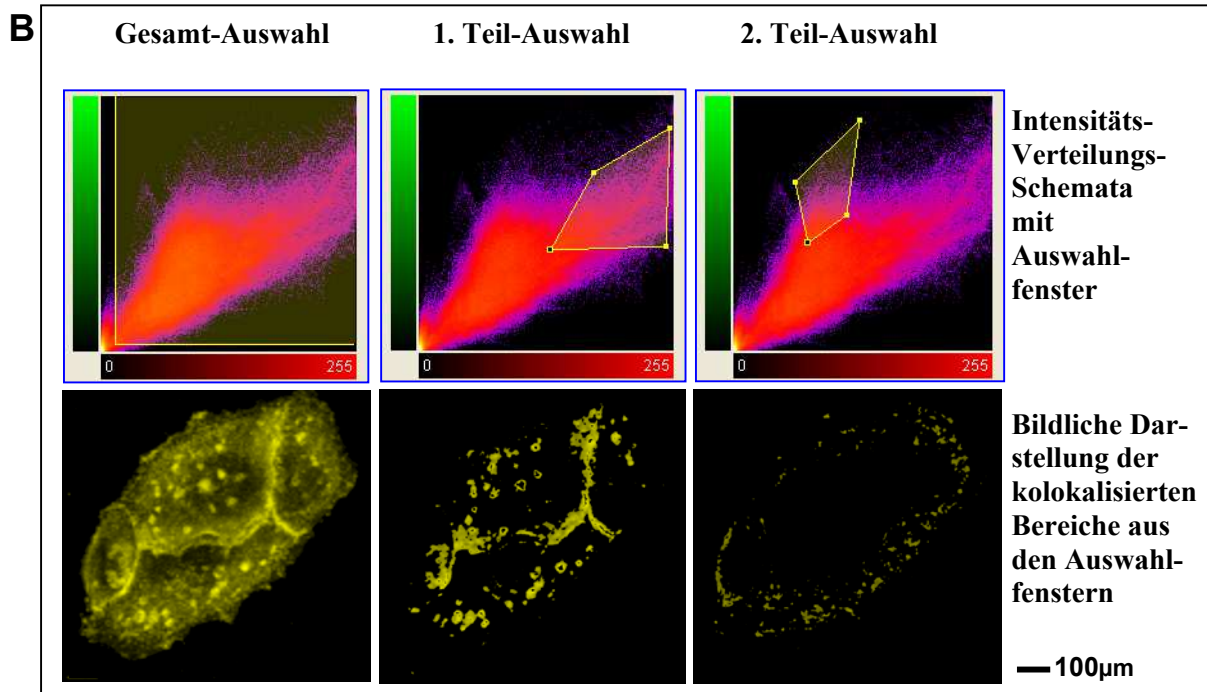
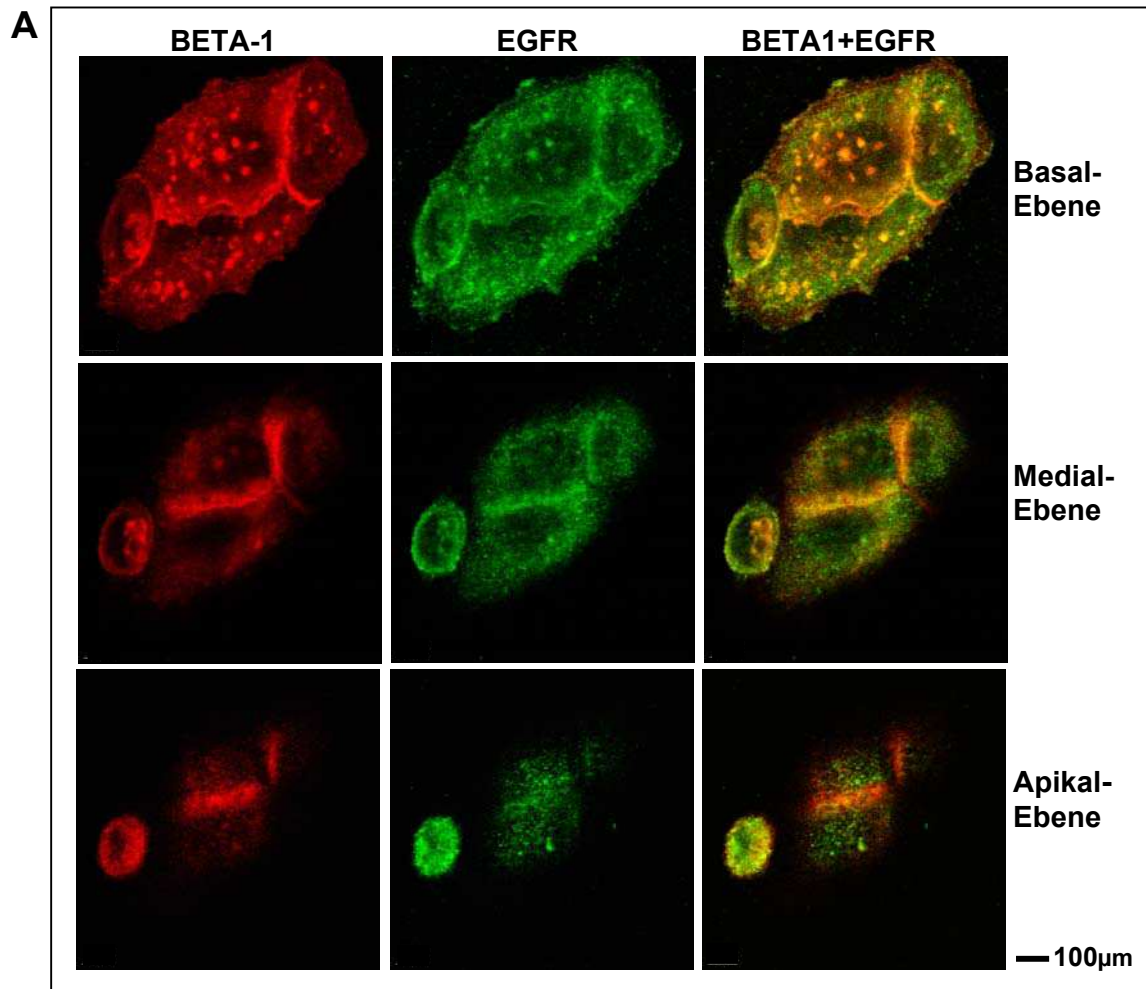


Abb. 3.15 A) Kolokalisation von $\beta 1$ -Integrinen und EGF-Rezeptoren
B) Kolokalisationstest der basalen Ebene

STRECKUNG \Rightarrow 30min

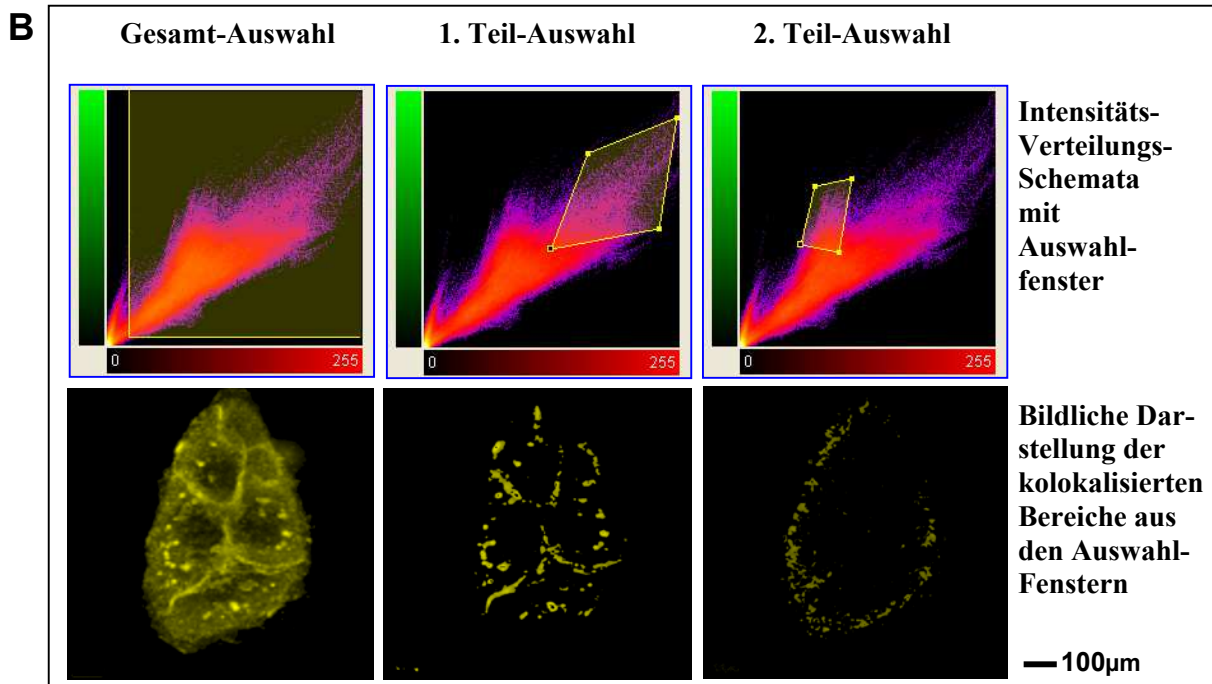
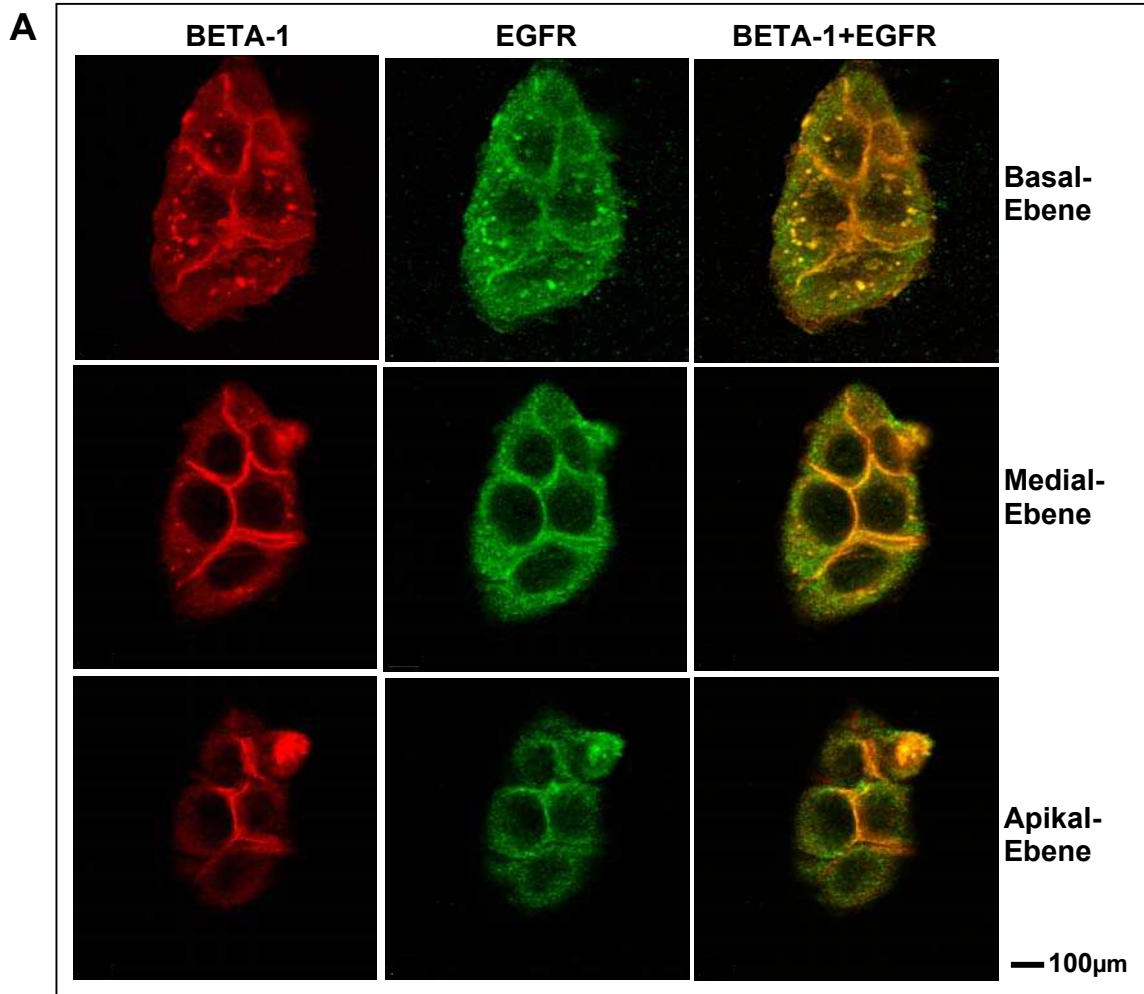


Abb. 3.16 A) Kolokalisation von β 1-Integrinen und EGF-Rezeptoren
B) Kolokalisationstest der basalen Ebene

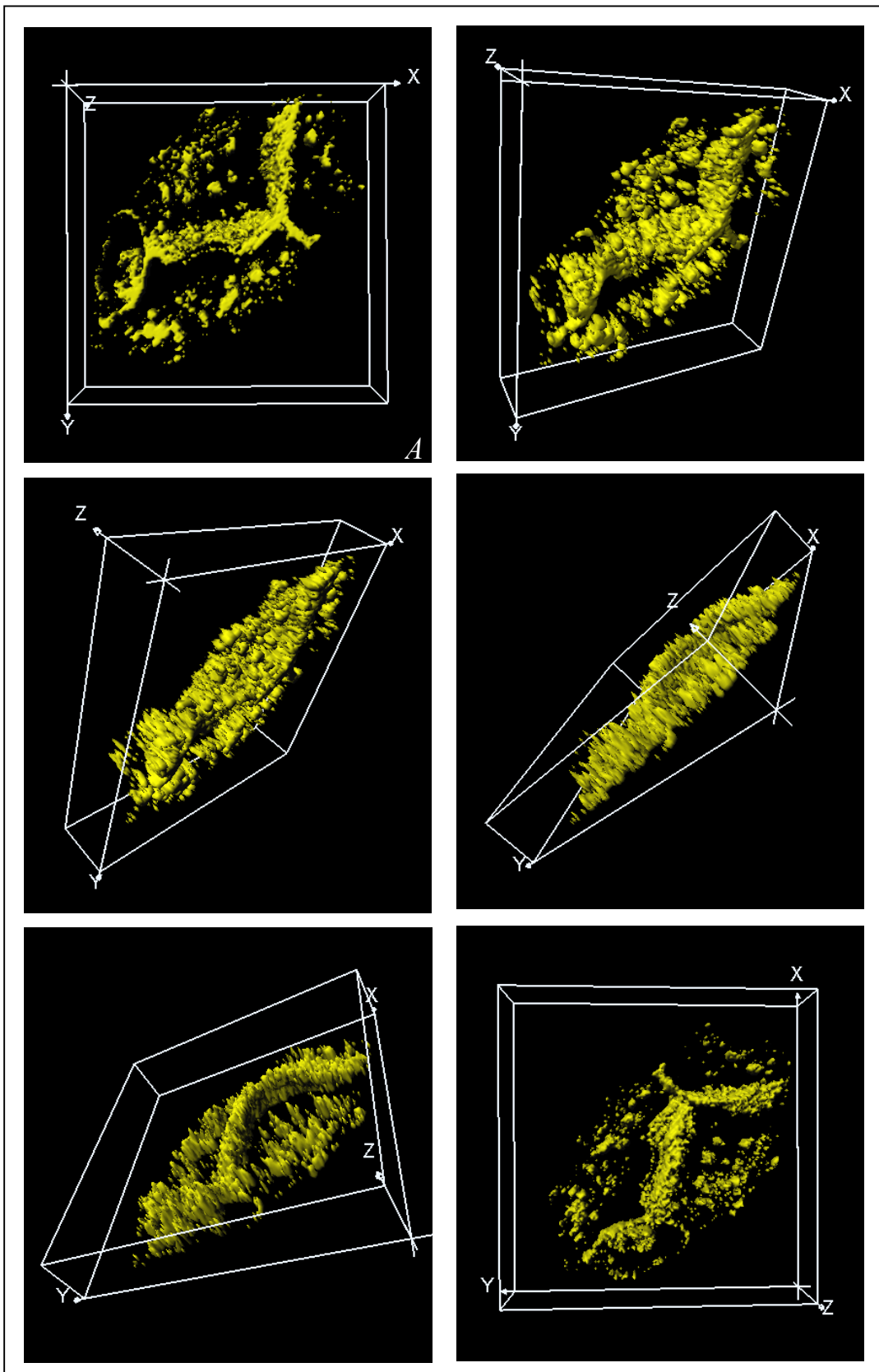


Abb. 3.17 3D-Darstellung einer Zellgruppe nach 15minütiger mechanischer Reizung

Dargestellt wurden die kolokalisierten Bereiche, welche die höchste Fluoreszenzintensität des roten Kanals = $\beta 1$ -Integrine und des grünen Kanals = EGF-Rezeptor aufweisen. Die Drehung erfolgte diagonal von links oben nach rechts unten: A) Basale Ansicht, B) Basale Ansicht, leicht gekippt, C) Basale Ansicht, stark gekippt, D) Seitenansicht, E) Apikale Ansicht, leicht gekippt, F) Apikale Ansicht.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die kolokalisierten Akkumulationen von $\beta 1$ -Integrinen und EGF-Rezeptoren dort anzutreffen sind, wo die Zellen am Untergund anheften (abgeplattete Bereiche) und sich ins Zytoplasma ausdehnen. Es handelt sich demnach wahrscheinlich um Fokalkontakte.

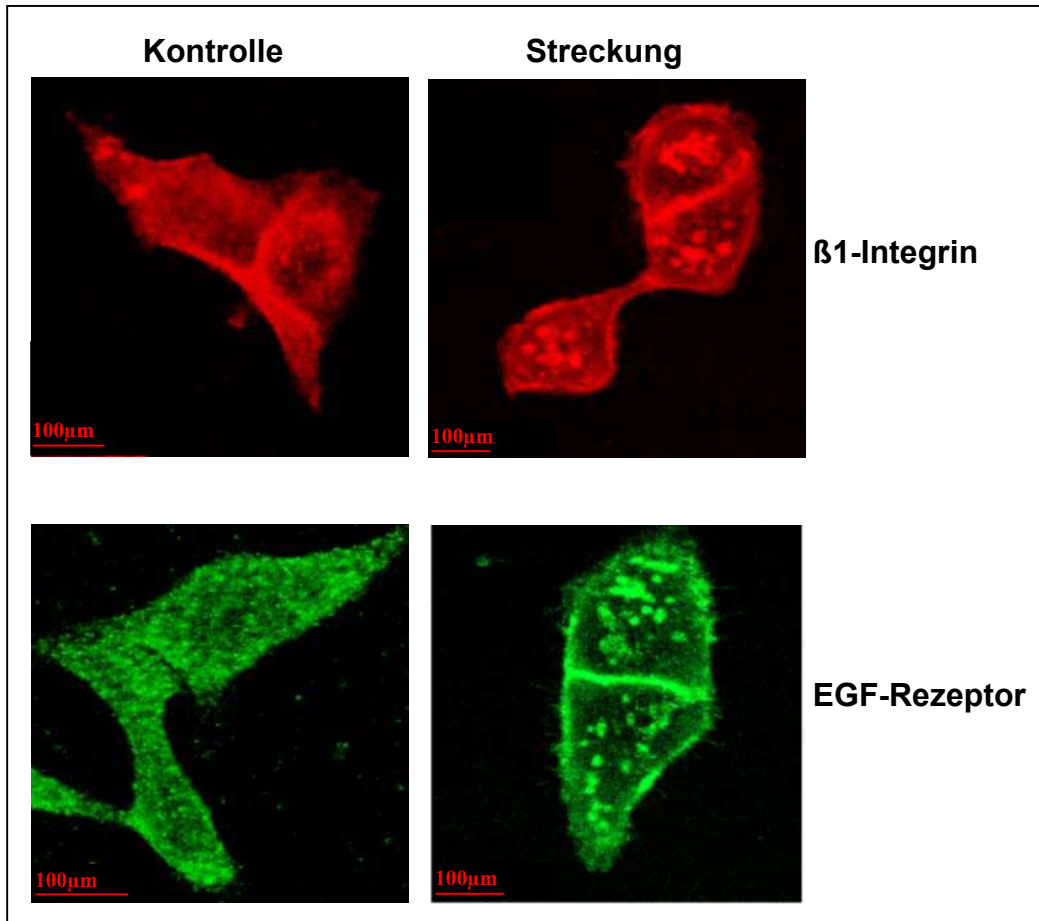


Abb. 3.18 Einzelfärbungen von β 1-Integrinen und EGF-Rezeptoren

Abbildungen von Basalebene der Zellen. Färbungen mit einem anti- β 1-Integrin Antikörper (Zeile 1) oder einem anti-EGFR Antikörper (Zeile 2). Spalte 1 zeigt Kontrollzellen und Spalte 2 gestreckte Zellen.

Auch eine getrennte Färbung von Integrinen und EGF-Rezeptoren zeigt, dass beide Oberflächenrezeptoren auf der Basalseite der Zelle clustern.

3.6.2. E-Cadherine und EGF-Rezeptoren

Um festzustellen, ob auch E-Cadherine mit dem EGF-Rezeptor bei mechanischer Belastung interagieren, wurden die gleichen Versuchsbedingungen wie für β 1-Integrine + EGF-Rezeptoren gewählt (Aussaatdichte: 1×10^6 , Anheftungszeit: 24h, Streckung: 15min, Fixierung + Permeabilisierung, Aufbereitung für das CLSM) und eine Doppelfärbung mit anti-E-Cadherin- und anti-EGF-Rezeptor-Antikörpern durchgeführt. Die Untersuchung der Verteilung von E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren auf der Zellmembran wurde am Konfokalen Laserscanning Mikroskop vorgenommen und die Bildserien anschließend mit der „Imaris Software > colocalisation“ analysiert.

Die Abbildungen 3.19A und 3.20A zeigen, dass beide Oberflächenrezeptoren sowohl unter Kontroll- als auch unter Streckungsbedingungen relativ gleichmäßig über die gesamte Zellmembran verteilt sind. Der Kolokalisationstest erbrachte, E-Cadherine und EGF-Rezeptoren sind ebenfalls grundsätzlich koverteilt (Abb.3.19+3.20B > Gesamt-Auswahl). Die Auswahl hoher Grün- und Rot-Fluoreszenzintensitäten aus dem Intensitätsverteilungs-Diagrammen stellt dieselben Strukturen, nur nicht so intensiv gefärbt, dar (Abb. 3.19B+3.20B > 1.Teil-Auswahl). Dies bedeutet, dass E-Cadherine und EGF-Rezeptoren eine diffus über die Zellmembran verteilte Kolokalisation aufweisen, die nicht in besonderen Strukturen, z.B. Cluster anzutreffen ist. (Im Fall des EGF-Rezeptors ist wiederum eine Cluster-Bildung vorhanden (Abb. 3.20A)).

KONTROLLE

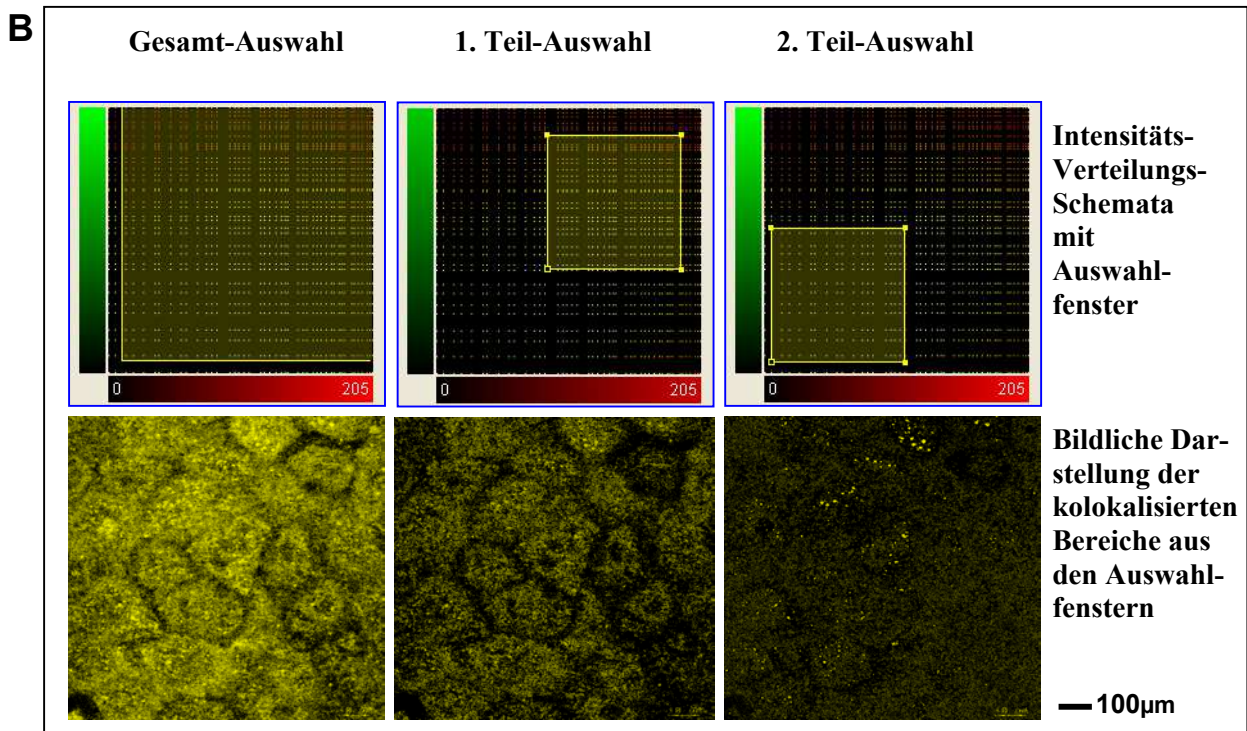
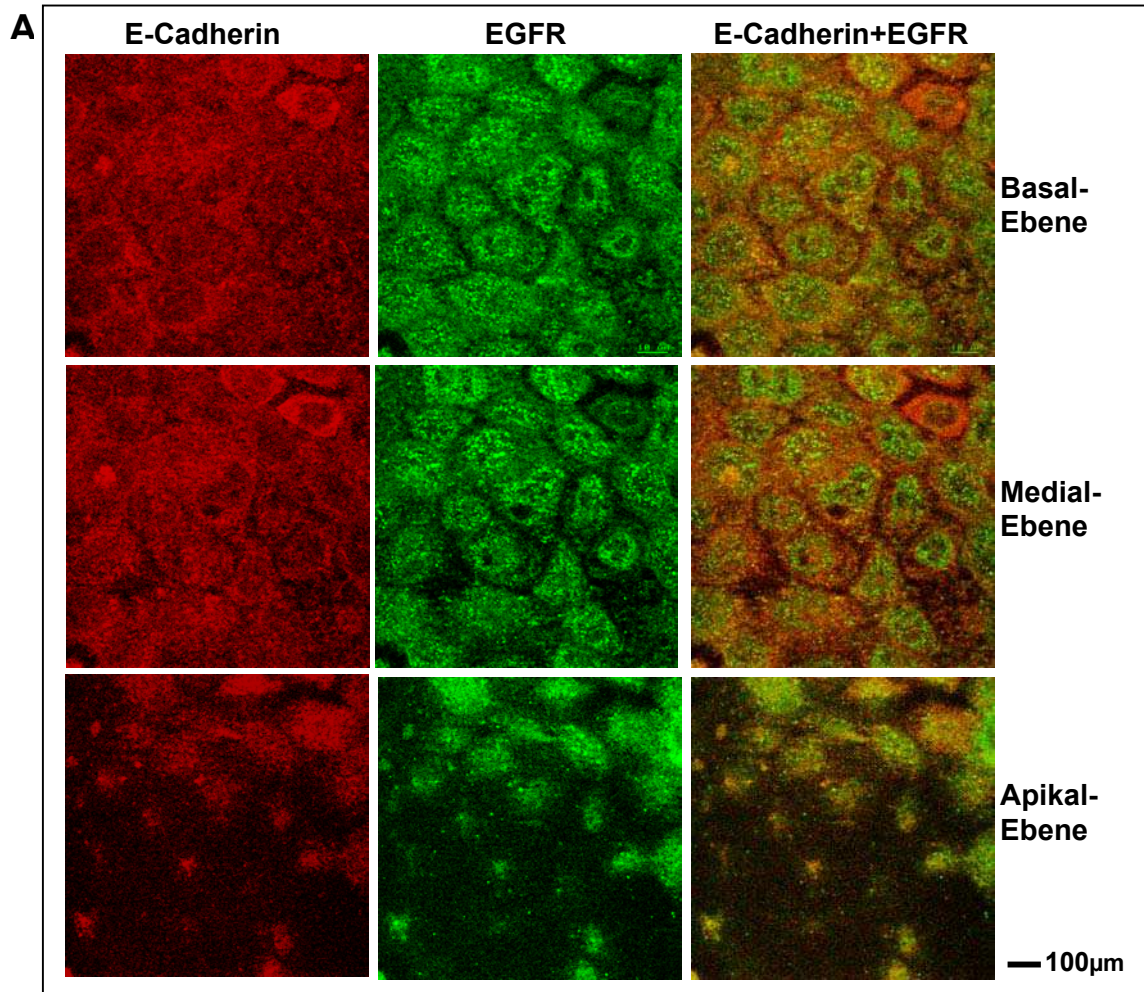


Abb. 3.19 A) Kolokalisation von E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren
 B) Kolokalisationstest der basalen Ebene

STRECKUNG ⇒ 15min

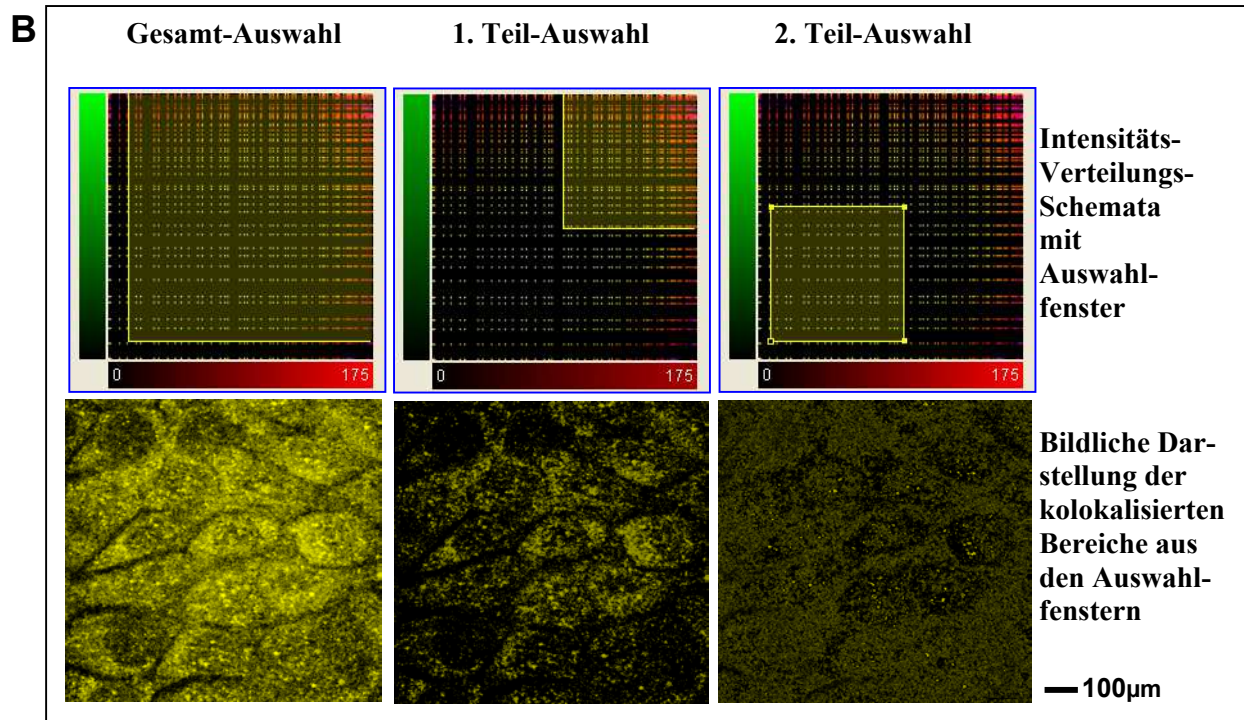
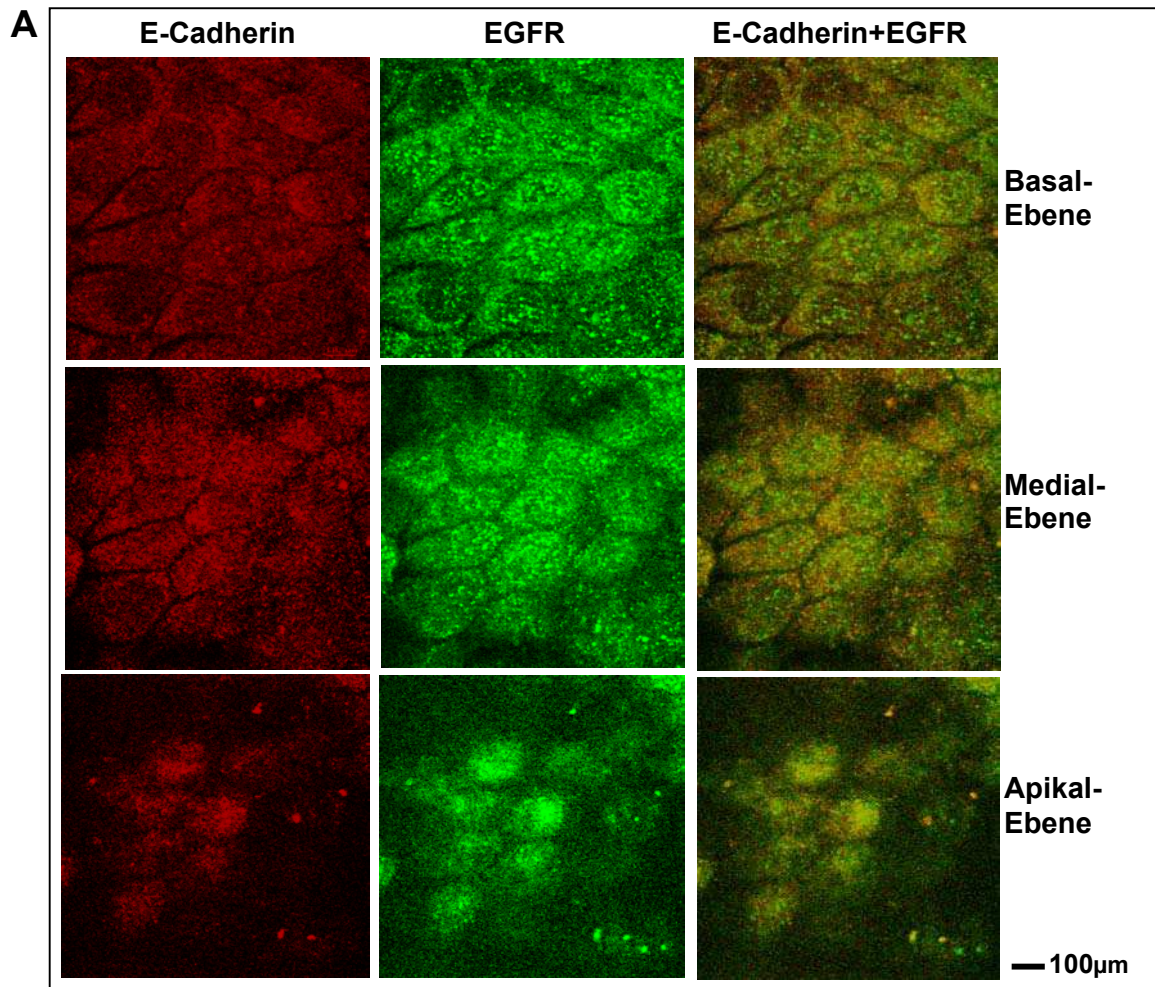


Abb. 3.20 A) Kolokalisation von E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren
B) Kolokalisationstest der basalen Ebene

3.7. Funktionelles Zusammenarbeiten von β 1-Integrinen bzw. E-Cadherinen mit EGF-Rezeptoren bei der Übermittlung mechanischer Streckungsreize

Aufgrund zweier Ergebnisse ist zu vermuten, dass β 1-Integrine und EGF-Rezeptoren in der mechanische induzierten Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges (ERK1/2) zusammenarbeiten:

1. Gestreckte Zellpopulationen besitzen eine höhere Proliferationsrate als Kontrollpopulationen.

2. Eine Kolo-kalisation von β 1-Integrinen und EGF-Rezeptoren in basalen Komplexen.

Man weiß, dass ein extrazelluläres Signal, wie z.B. eine mechanische Streckung, von Integrinen und E-Cadherinen registriert wird (Ingber, 1997, Shyy et al., 2001, Potard et al., 1997). Weiterhin wird angenommen, dass diese Oberflächenrezeptoren nach ihrer Aktivierung den EGF-Rezeptor transaktivieren; d.h. der EGF-Rezeptor würde ohne seinen natürlichen Liganden (= Wachstumsfaktor) von den Integrinen und/oder Cadherinen aktiviert. Von dem nun aktivierten EGF-Rezeptor könnte die Signaltransduktions-Kaskade in Richtung Proliferationskontrolle (=MAP-Kinasen) fortgesetzt werden (Prenzel et al., 2000).

Zu dieser Arbeitshypothese wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Aktivierung von ERK1/2 sowie des EGF-Rezeptors nach dem Dehnungsreiz mit und ohne Blockierung der β 1-Integrine, E-Cadherine oder EGF-Rezeptoren mittels Western Blot detektiert wurde.

3.7.1. Aktivierungs-Kinetiken für ERK1/2 und den EGF-Rezeptor

Um die optimale Streckungsdauer zu ermitteln wurde eine Aktivierungs-Kinetik für ERK1/2 und den EGF-Rezeptor (Abb. 3.21) erstellt.

In Abbildung A ist die Aktivierung von ERK1/2 dargestellt. Die Zellkulturen wurden einem 0,5-, 5-, 15- und 30-minütigem Dehnungsreiz ausgesetzt. Dabei wird eine transiente Aktivierung der MAP-Kinasen – ERK1/2 – sichtbar: Bereits nach 5min nimmt die ERK1/2-Aktivität zu, erreicht nach 15min den Höhepunkt und geht nach 30min wieder auf den basalen Wert zurück.

Abbildung B zeigt die Aktivierung des EGF-Rezeptors. Es wurden folgende Intervalle für die mechanische Dehnung ausgewählt: 0,5-, 2-, 5- und 15min. Wie erwartet beginnt die Aktivierung des EGF-Rezeptors mit 2min vor der von ERK1/2, hat das Maximum bei 5min erreicht und kehrt nach 15min auf den Basalwert zurück.

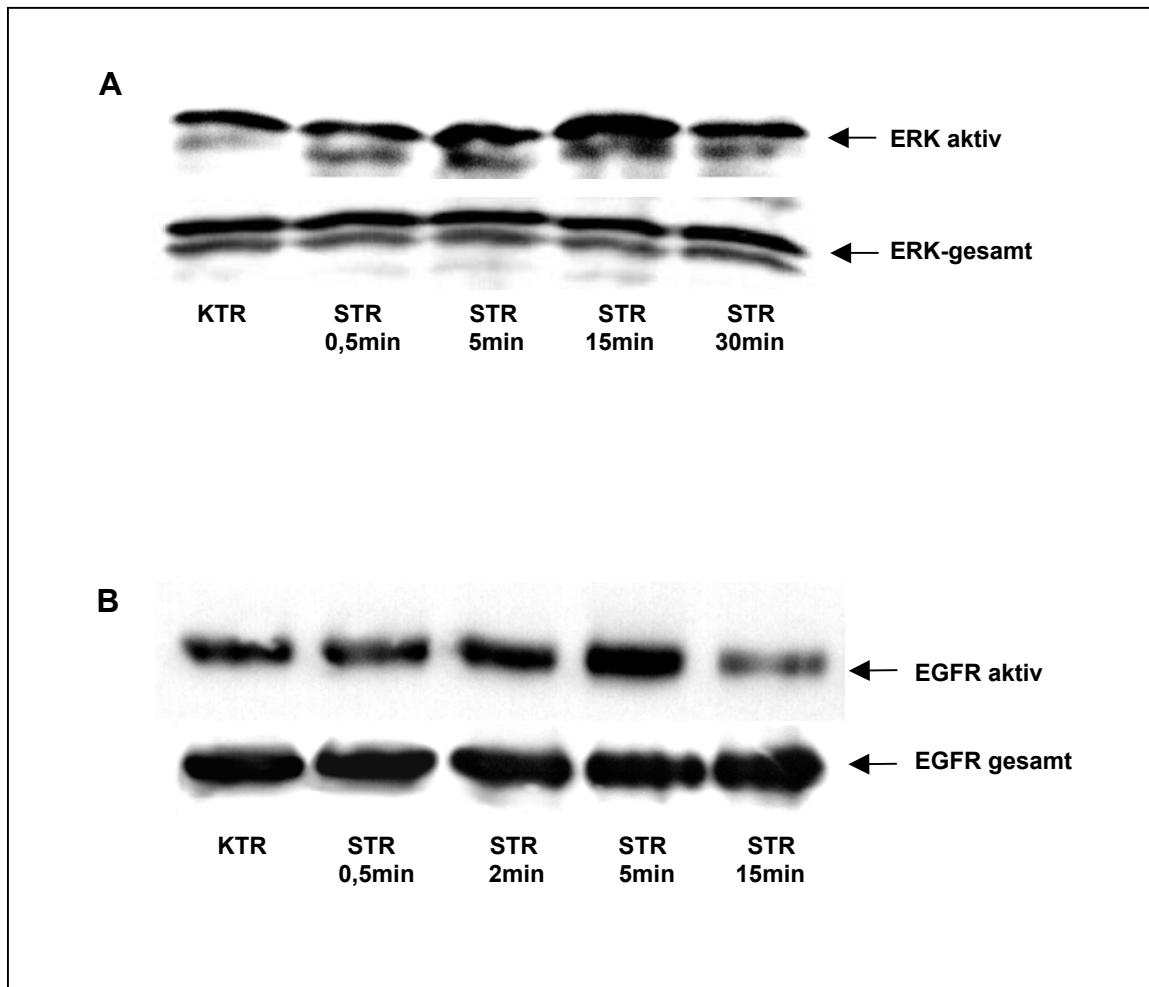


Abb. 3.21 Aktivierungskinetiken für ERK1/2 und den EGF-Rezeptor

A: Aktivierung der MAP-Kinasen > ERK1/2

B: Aktivierung des EGF-Rezeptors

Sowohl der EGF-Rezeptor als auch ERK1/2 besitzen eine transiente Aktivierungskinetik, wobei die Aktivierung des EGF-Rezeptors bereits wieder abklingt, wenn die Aktivierung von ERK1/2 ihren Höhepunkt erreicht.

3.7.2. Beteiligung von β 1-Integrinen, E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren bei der Aktivierung von MAP-Kinasen

In dieser Versuchsreihe sollte die Relevanz von β 1-Integrinen, E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren bei der dehnungsvermittelten Aktivierung von ERK1/2 untersucht werden (Abb. 3.22). Um dies herauszufinden, wurden die Zellkulturen 24h mit einem funktionsblockierenden Antikörper gegen β 1-Integrine oder E-Cadherine vorinkubiert. Zur Inhibition des EGF-Rezeptors wurde die hoch spezifische Substanz AG1478 eingesetzt. Diese wurde den Kulturen 30min vor der Streckung zugegeben. Um eine maximale Aktivierung von ERK1/2 und dem EGF-Rezeptor zu erreichen, wurden die Zellen für den zuvor ermittelten Zeitraum gestreckt: ERK1/2 = 10min und EGF-Rezeptor = 5min.

Die Abbildungen 3.22 A+B zeigen die Aktivierung des EGF-Rezeptors (A) und von ERK1/2 (B) nach mechanischer Reizung und Blockierung der β 1-Integrine oder E-Cadherine. Die basale Aktivität von EGF-Rezeptoren und ERK1/2 bleibt durch Inkubation mit den funktionsblockierenden Antikörpern gegen β 1-Integrine und E-Cadherine unbeeinflusst. Die Dehnung führt in beiden Fällen zu einer deutlich gesteigerten Aktivität. Im Gegensatz dazu kam es in den Kulturen, die mit dem β 1-Integrin oder E-Cadherin-Antikörper vorbehandelt wurden, zu keiner erhöhten Aktivität der EGF-Rezeptoren und von ERK1/2 über den Basalwert hinaus.

In Abbildung 3.22 C ist die Aktivierung von ERK1/2 nach Inhibition des EGF-Rezeptors dargestellt. Eine 10minütige Streckung führt erwartungsgemäß zu einer Aktivitätssteigerung von ERK1/2. Durch die Zugabe von AG1478 wird eine konzentrationsabhängige Verminderung der ERK1/2-Aktivität erreicht.

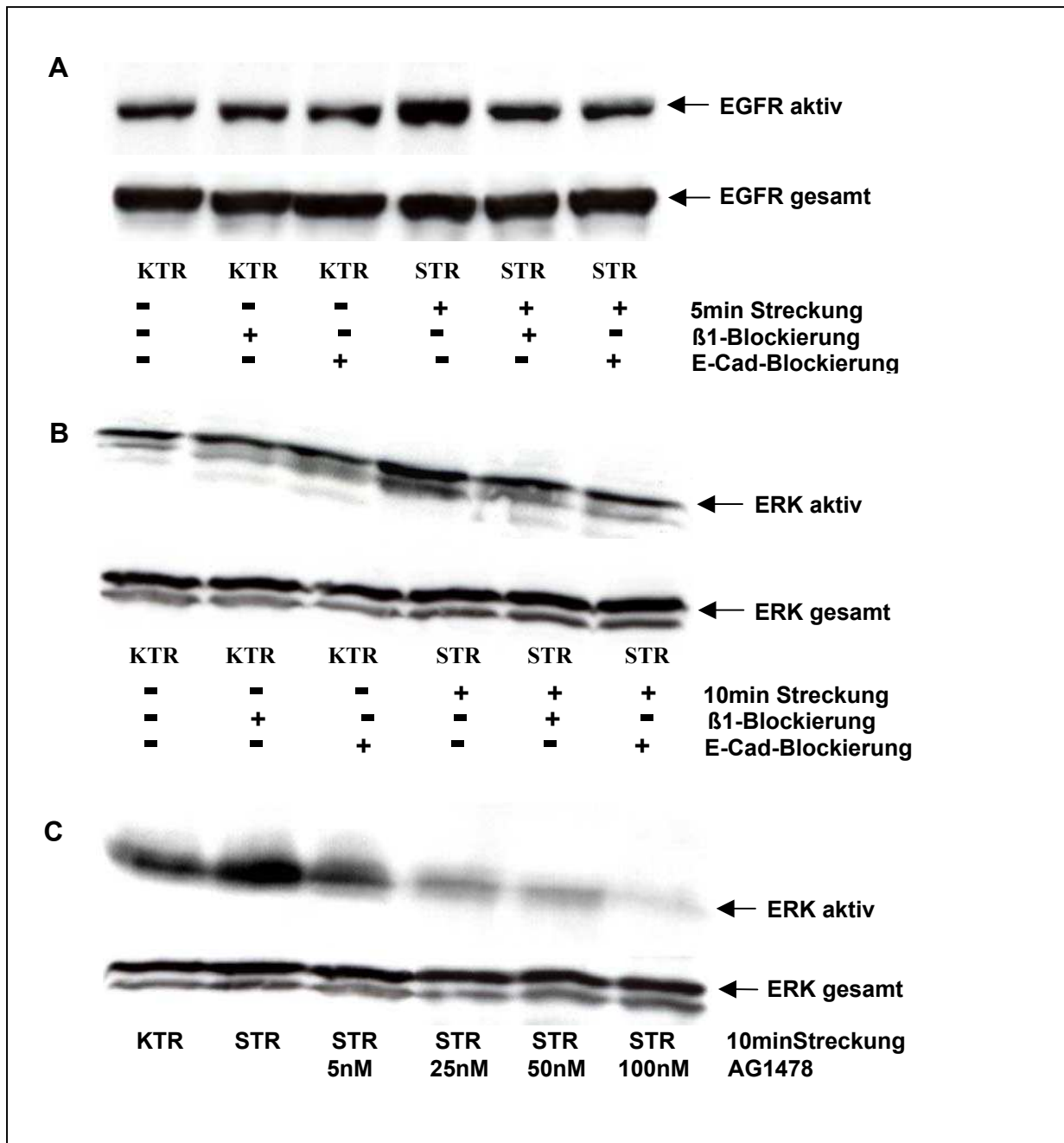


Abb. 3.22 Beteiligung von β 1-Integrinen, E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren bei der Aktivierung von MAP-Kinasen

A: Aktivierung des EGF-Rezeptors durch mechanische Stimulierung mit- und ohne funktionsblockierendem Antikörper gegen β 1-Integrine und Cadherine

B: Aktivierung von ERK1/2 durch mechanische Stimulierung mit- und ohne funktionsblockierendem Antikörper gegen β 1-Integrine und Cadherine

C: Aktivierung von ERK1/2 durch mechanische Stimulierung nach Blockierung des EGF-Rezeptors

Alle drei getesteten Oberflächenrezeptoren scheinen an der Übermittlung der mechanischen Reize zu dem ERK1/2-Signalweg beteiligt zu sein.

3.8. Kolokalisation von β 1-Integrinen, EGF-Rezeptoren und verschiedenen Zytoskelett-Elementen nach Inhibition von β 1-Integrinen und E-Cadherinen

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die Blockierung von β 1-Integrinen und E-Cadherinen Auswirkungen auf das Zytoskelett, die adhäsionsvermittelnden Moleküle und den EGF-Rezeptor hat. Mit immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen sollte folgenden Fragen nachgegangen werden:

1. Was geschieht mit den Zell-Matrix- und Zell-Zell-Strukturen – sind sie gelockert?
2. Kommt es zu einer Umverteilung der Zytoskelett-Elemente F-Aktin, Mikrotubuli und Intermediärfilamente (Zytokeratin) ?
3. Sucht sich der EGF-Rezeptor einen neuen Partner ?

Um diese Punkte zu klären, wurden HaCaT-Keratinocyten in einer Dichte von 1×10^6 in Silikonkammern eingesät. Nach 24h hatten sich die Zellen angeheftet, so dass die Kulturen fixiert, permeabilisiert und „CLSM-tauglich“ gemacht werden konnten. Die ausgewählten Strukturen wurden mit den entsprechenden Antikörpern in Einzel- und Doppelfärbungen spezifisch angefärbt und am Konfokalen Laserscanning Mikroskop untersucht. Die Bildserien wurden im Anschluss mit der Imaris-Software > colocalisation analysiert (Abb. 3.23-3.34).

Einfachfärbungen:	Doppelfärbungen:	Kolokalisationstest
⇒ β 1-Integrin (Abb. 3.23) ⇒ Aktin (Abb. 3.26) ⇒ PanZytokeratin (Abb. 3.29) ⇒ Mikrotubuli (Abb. 3.32)	⇒ β 1-Integrin + EGFR-Rezeptor (Abb. 3.24) ⇒ Aktin + EGF-Rezeptor (Abb. 3.27) ⇒ PanZytokeratin + EGF-Rezeptor (Abb. 3.30) ⇒ Mikrotubuli + EGF-Rezeptor (Abb. 3.33)	⇒ β 1-Integrin + EGFR-Rezeptor (Abb. 3.25) ⇒ Aktin + EGF-Rezeptor (Abb. 3.28) ⇒ PanZytokeratin + EGF-Rezeptor (Abb. 3.31) ⇒ Mikrotubuli + EGF-Rezeptor (Abb. 3.34)
Die Abbildungen der Einfachfärbungen zeigen verschiedene Schnittebenen. In Spalte 1 ist die basale Ebene, in Spalte 2 eine mediale Ebene und in Spalte 3 die apikale Ebene dargestellt. Die Zeilen beschreiben die unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Die Blockierung von β 1-Integrinen oder E-Cadherinen bewirkt unter Kontroll- und Streckungsbedingungen die gleichen Effekte, weshalb jeweils nur ein Bild dargestellt wird.	Die Abbildungen der Doppelfärbungen sind wie folgt aufgebaut: Alle Teilbilder stellen basale Schnittebenen dar. Spalte 1 zeigt β 1-Integrine bzw. eines der Zytoskelett-Elemente, Spalte 2 EGF-Rezeptoren und Spalte 3 eine Überlagerung beider Kanäle. Die Zeilen veranschaulichen die unterschiedlichen Versuchsbedingungen. Da sich die Effekte einer Blockierung von β 1-Integrinen oder E-Cadherinen unter Kontroll- und Streckungsbedingungen gleichen, wird jeweils nur ein Bild gezeigt.	Die Bilder des Kolokalisations-tests sind folgendermaßen arrangiert: Die 4er-Gruppen repräsentieren die Versuchsbedingungen (Kontrolle, Streckung, β 1-Integrin- oder E-Cadherin-Blockierung). Innerhalb einer 4er-Gruppe steht eine Spalte für Gesamt-Auswahl und eine Spalte für die Teil-Auswahl des Intensitätsverteilungs-Diagramms.

Tab. 3.1 Diese Tabelle steht für alle nachfolgenden Abbildungen

3.8.1. β 1-Integrine und EGF-Rezeptoren

Abbildung 3.24 zeigt die β 1-Integrin- und EGF-Rezeptoren-Verteilung in der Basalmembran; die Teilbilder in Abb. 3.25 sind die entsprechenden Intensitätsverteilungsschemata mit dazugehöriger bildlicher Darstellung. In Abbildung 3.23 ist die Distribution von β 1-Integrinen über die gesamte Zelloberfläche anhand von drei Schnittebenen – basal, medial, apikal – dargestellt.

Wie zuvor erwähnt, sind β 1-Integrine über die gesamte Zelloberfläche verteilt. Die Linien der Zell-Zell-Grenzen sind streng begrenzt. Als Reaktion auf die Dehnung kommt es zu einer Zusammenballung der β 1-Integrine in der Basalmembran (Abb. 3.23).

Eine Kolokalisation von β 1-Integrinen und EGF-Rezeptoren besteht vornehmlich an den Zell-Zell-Grenzen der Kontroll- und gestreckten Zellen sowie in den Clustern der gedehnten Zellen (Abb. 3.24 + Abb. 3.25 > Kontrolle und Streckung).

Nach einer Blockierung der β 1-Integrine bzw. E-Cadherine kommt es zu einer „Aufweichung“ der Zell-Zell-Kontakte in den Kontroll- und gestreckten Kulturen. Sowohl die β 1-Integrin- (Abb. 3.23 + 3.24) als auch die EGF-Rezeptor-Färbung (Abb. 3.24) ist an der Zell-Zell-Grenze diffuser als in den unbehandelten Zellkulturen, d.h. die Zell-Zell-Grenzen sind nicht mehr so scharf gezeichnet. Dieser Effekt ist allerdings in den gestreckten Kulturen stärker ausgeprägt. Darüber hinaus scheinen auch die Zell-Matrix-Kontakte beeinflusst zu sein, da nach der β 1-Integrin- oder E-Cadherin-Blockierung keine Zusammenballung von β 1-Integrinen (Abb. 3.23 + 3.24) bzw. EGF-Rezeptoren (Abb. 3.24) in der Basalmembran zu erkennen ist. Jedoch bleibt die Kolokalisation von β 1-Integrinen und EGF-Rezeptoren an den Zell-Zell-Grenzen erhalten (Abb. 3.24 + Abb. 3.25 > β 1-Integrin- bzw. E-Cadherin-Blockierung)

Eine Inhibition des EGF-Rezeptors hat dagegen keinen Einfluß auf die Verteilung der β 1-Integrine, es kommt sogar zu einer β 1-Clusterung (Abb. 3.23). Auch die Verteilung des EGF-Rezeptors ist durch dessen funktionelle Blockierung wenig beeinflusst; allerdings unterbleibt eine Clusterung nach mechanischer Stimulierung (Abb. 3.24).

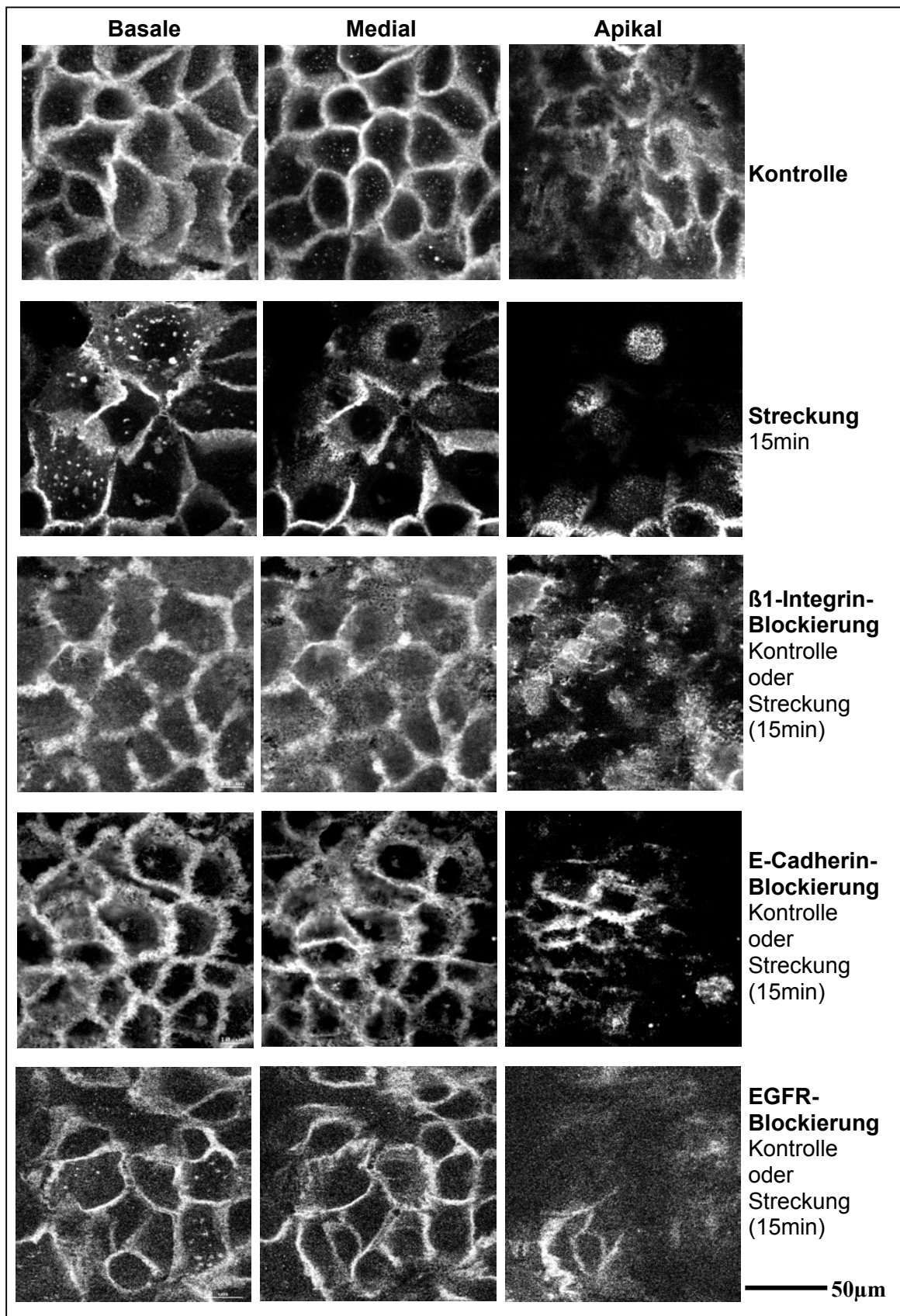


Abb. 3.23 Verteilung der β 1-Integrine auf der Zellmembran nach funktioneller Blockierung der β 1-Integrine, E-Cadherine und EGF-Rezeptoren

Nach mechanischer Streckung ist deutlich die Clusterung der β 1-Integrine in der Basalmembran zu sehen. Dieser Effekt wird durch eine Blockierung des EGF-Rezeptors nicht wesentlich beeinflusst. Dagegen verhindert die Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine diese Clusterung der β 1-Integrine, zudem sind die Zell-Zell-Kontakte gelockert.

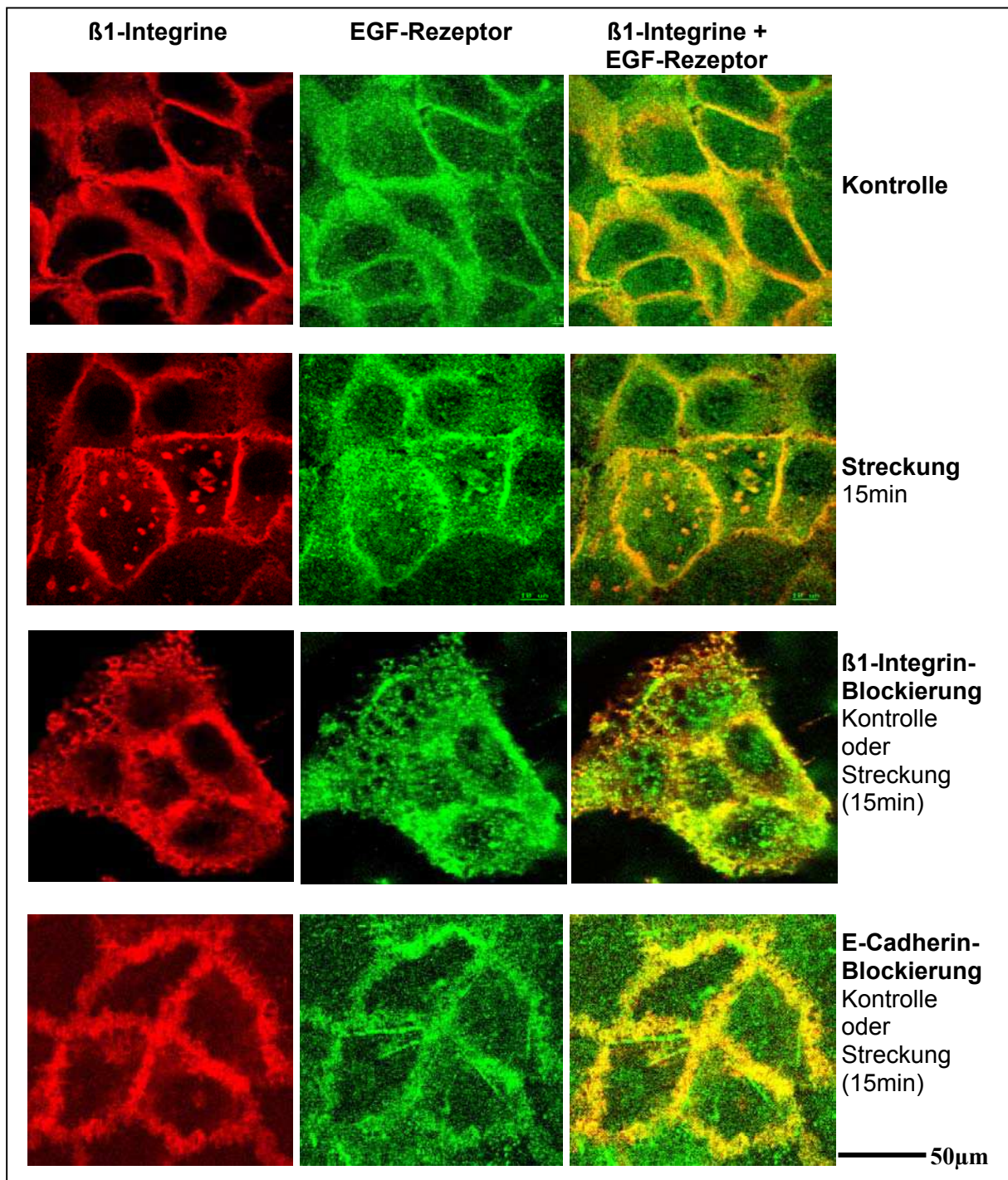


Abb. 3.24 Kolokalisation von β 1-Integrinen und EGF-Rezeptoren nach funktioneller Blockierung der β 1-Integrine, E-Cadherine und EGF-Rezeptoren

Eine Kolokalisation von β 1-Integrinen und dem EGF-Rezeptor ist unter allen Bedingungen an den Zell-Zell-Grenzen zu erkennen. Bei den gestreckten Kulturen akkumulieren β 1-Integrinen und EGF-Rezeptoren an denselben Stellen. Durch die Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine kommt es zu einer teilweisen Zerstörung der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte.

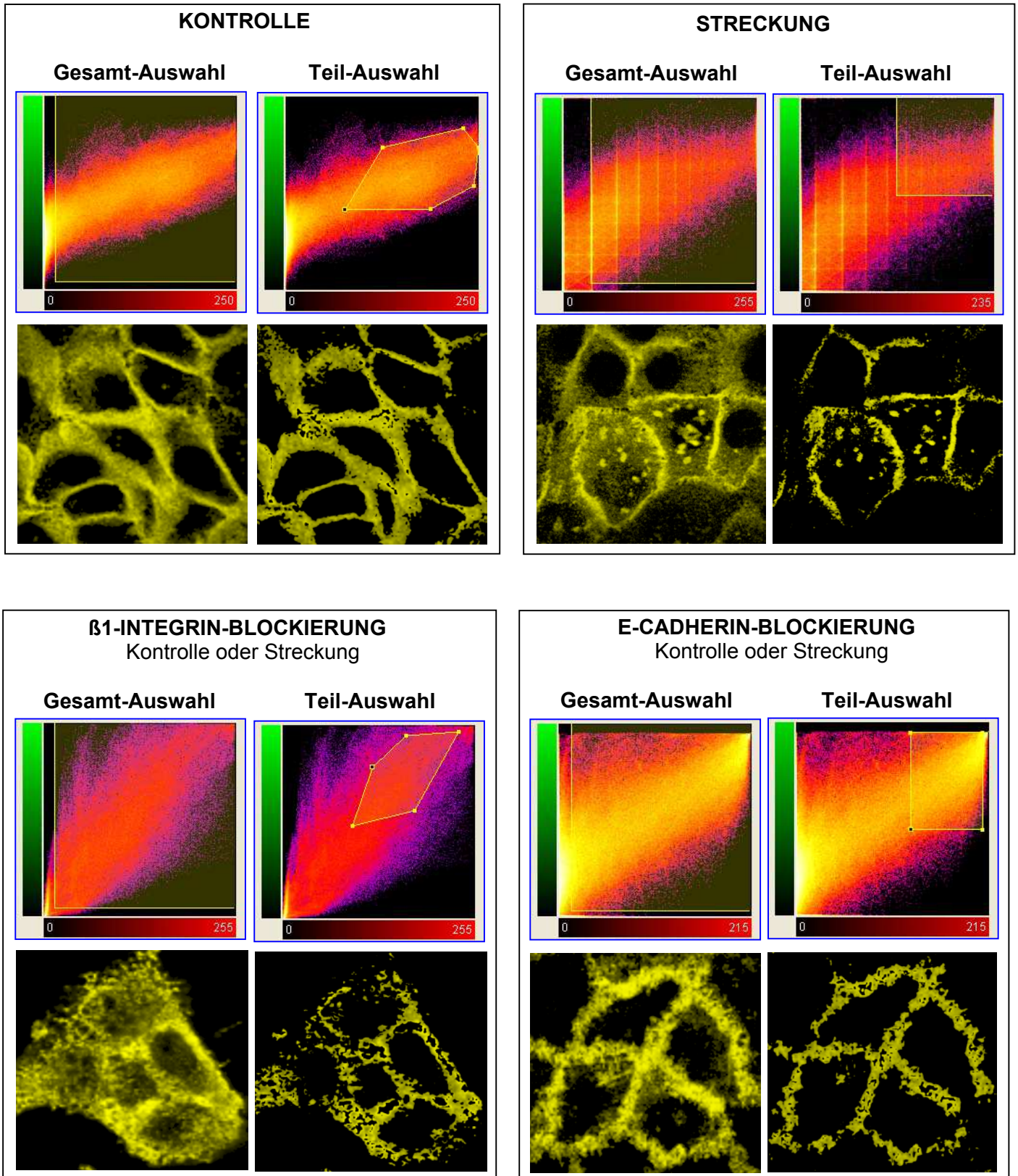


Abb. 3.25 Überprüfung der Kolo­kalisierung von β 1-Integrinen und EGF-Rezeptoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Der Kolo­kalisierungstest bestätigt die Resultate der Überlagerung des TRITC-Kanals = β 1-Integrine und des FITC-Kanals = EGF-Rezeptoren der Abb. 3.24.

3.8.2. Aktin und EGF-Rezeptoren

In Abbildung 3.27 sind Basalschnitte von Zellen dargestellt, die mit anti-EGF-Rezeptor und TRITC-Phalloidin = Aktin gefärbt wurden; die Teilbilder in Abb. 3.28 sind die entsprechenden Intensitätsverteilungsschemata mit dazugehöriger bildlicher Darstellung. Abbildung 3.26 veranschaulicht die Verteilung des F-Aktins über die gesamte Zelle, wobei eine basale-, eine mediale- und eine apikale Schnittebene als Beispiele ausgesucht wurden.

Das Aktin-Netzwerk durchspannt die ganze Zelle und bildet an der Peripherie einen dünnen Aktinring. Dabei sind die einzelnen Aktinfilamente bei HaCaT-Keratinocyten nicht so ausgeprägt wie bei primären Keratinocyten. Auch Stressfasern sind in den gestreckten Zellen selten zu finden. Allerdings kommt es nach der mechanischen Reizung zur Bildung von Aktin-Spots in der Basalmembran, die wahrscheinlich durch das Zusammenlaufen und Verankern von Aktin-Fasern an diesen Membranstellen zustande kommen (Abb. 3.26).

Eine teilweise Kolo-kalisation von Aktinfilamenten und EGF-Rezeptoren ist wiederum in den Zell-Zell-Grenzen der Kontroll- und gestreckten Zellen zu sehen. Die Koverteilung beider Strukturen ist jedoch in den gestreckten Kulturen stärker ausgeprägt, mehr auf die Zell-Zell-Membranen beschränkt und beinhaltet abermals die Cluster, die sich durch die Dehnung gebildet haben (Abb. 3.27 + Abb. 3.28 > Kontrolle und Streckung).

Durch die funktionelle Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine kommt es zu einem Zerfall des Aktin-Netzes mit Verringerung der Aktinfilamente. Auffällig ist ein dicker, diffus erscheinender, peripherer Aktinring, was auf eine „Lockerung“ der Zell-Zell-Kontakte hindeutet. Das Zytoplasma durchziehen hingegen nur noch wenige, dicke Aktinfilamente (Abb. 3.26 + 3.27). Trotzdem zeigt sich eine ausgeprägte Kolo-kalisation von F-Aktin und dem EGF-Rezeptor, die streng auf die Interzellulär-Membranen beschränkt sind (Abb. 3.27 + Abb. 3.28 > β 1-Integrin- bzw. E-Cadherin-Blockierung).

Darüber hinaus scheinen die Zell-Matrix-Verbindungen überwiegend zerstört zu sein, da keine Cluster-Bildung vorhanden ist (Abb. 3.26 + 3.27). Die beschriebenen Effekte treten unabhängig von einer mechanischen Reizung auf.

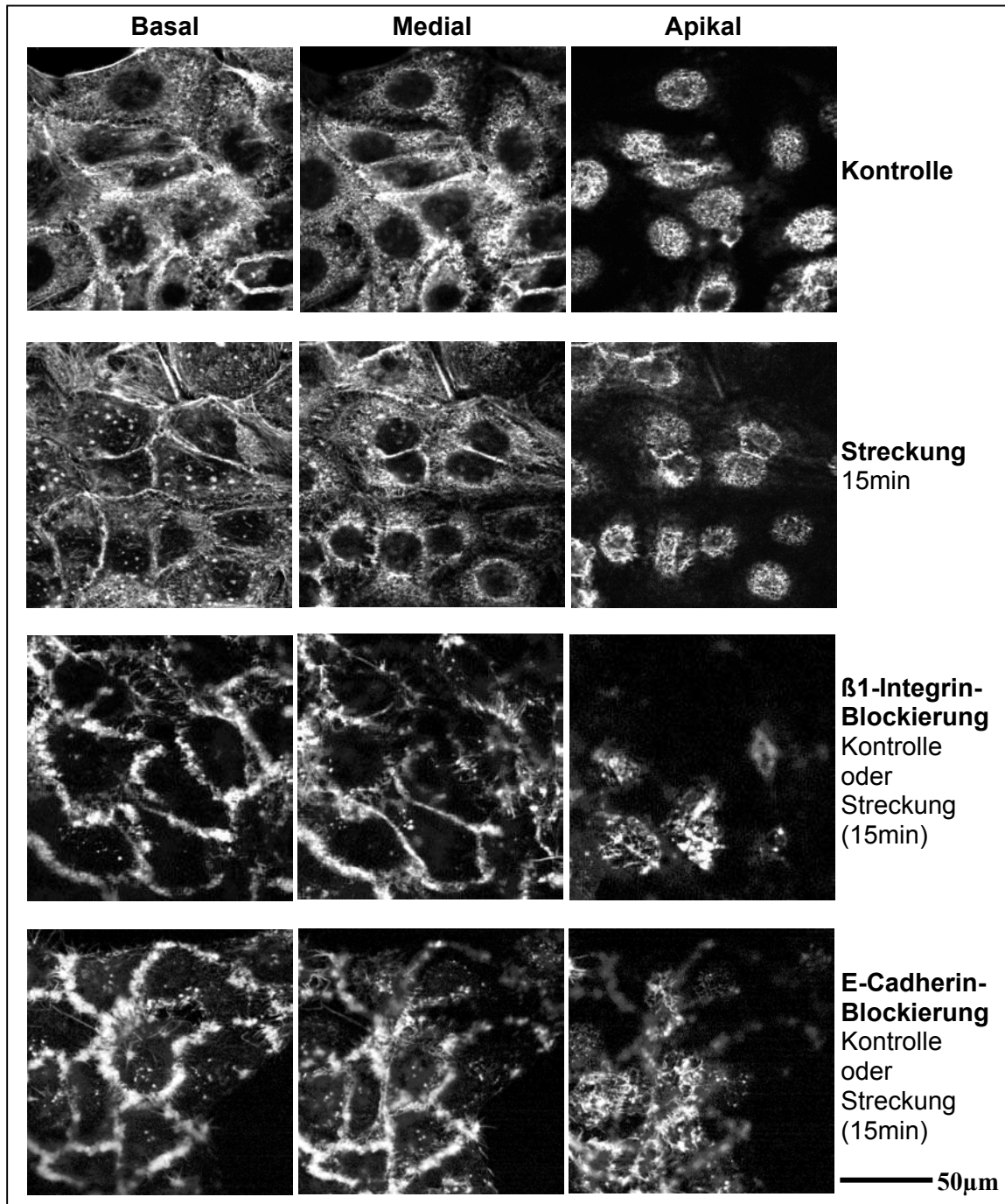


Abb. 3.26 Verteilung von Aktin nach funktioneller Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine

Ein ausgeprägtes Aktin-Netz, das die ganze Zelle durchspannt, ist unter Kontroll- und Streckungs-Bedingungen zu sehen. Durch die Streckung wird die Bildung von Fokalkontakten induziert. Nach der Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine ist das Aktin-Gerüst überwiegend zerstört.

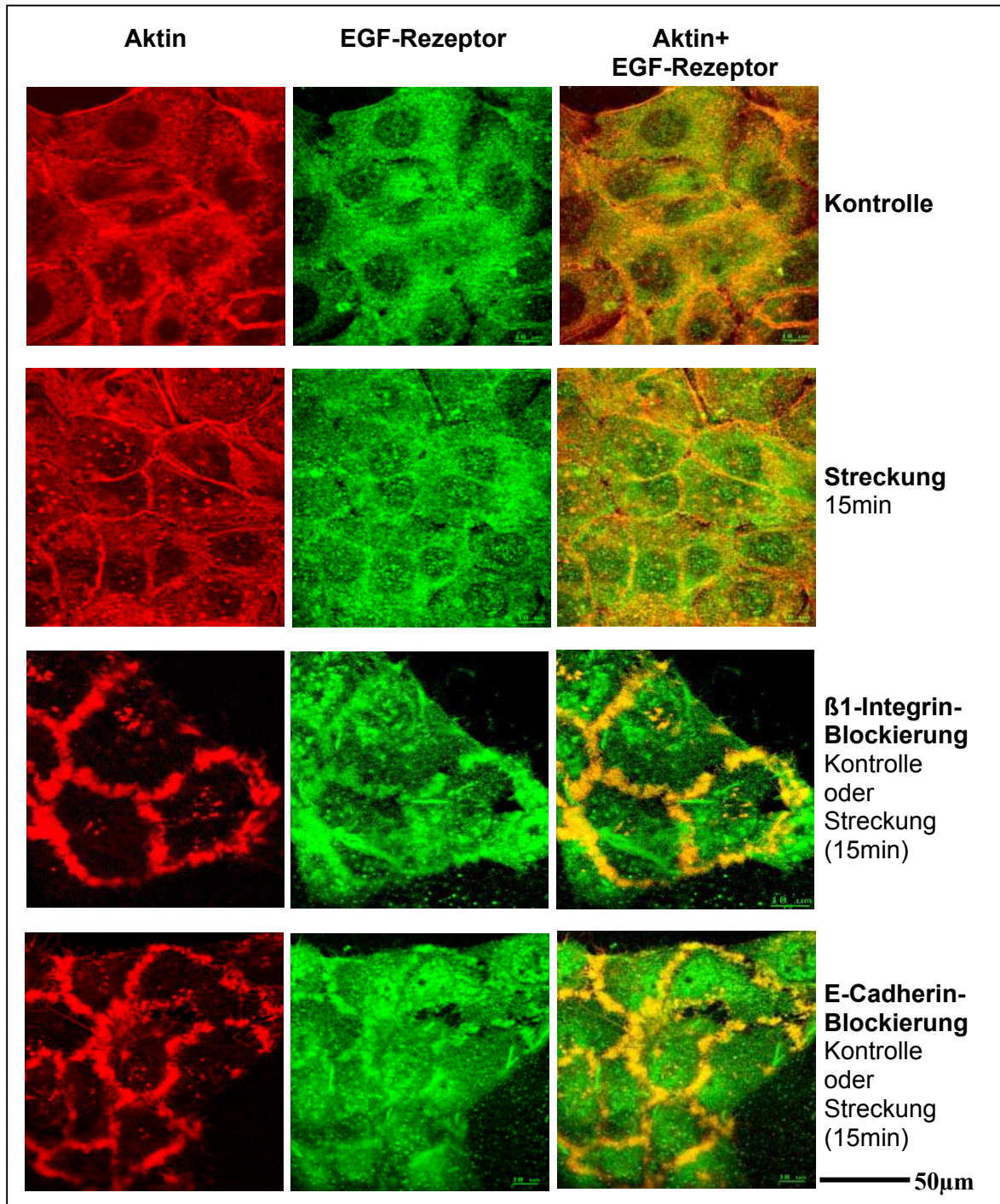


Abb. 3.27 Kolokalisation von Aktin und EGF-Rezeptoren nach funktioneller Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine

Eine Kolokalisation von F-Aktin und dem EGF-Rezeptor besteht unter allen Bedingungen – ähnlich der Kolokalisation von β 1-Integrinen und dem EGF-Rezeptor – an den Zell-Zell-Grenzen und den Fokalkontakten der gestreckten Zellen. Durch die Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine kommt es zu einer Zerstörung und Umstrukturierung des Aktin-Netztes.

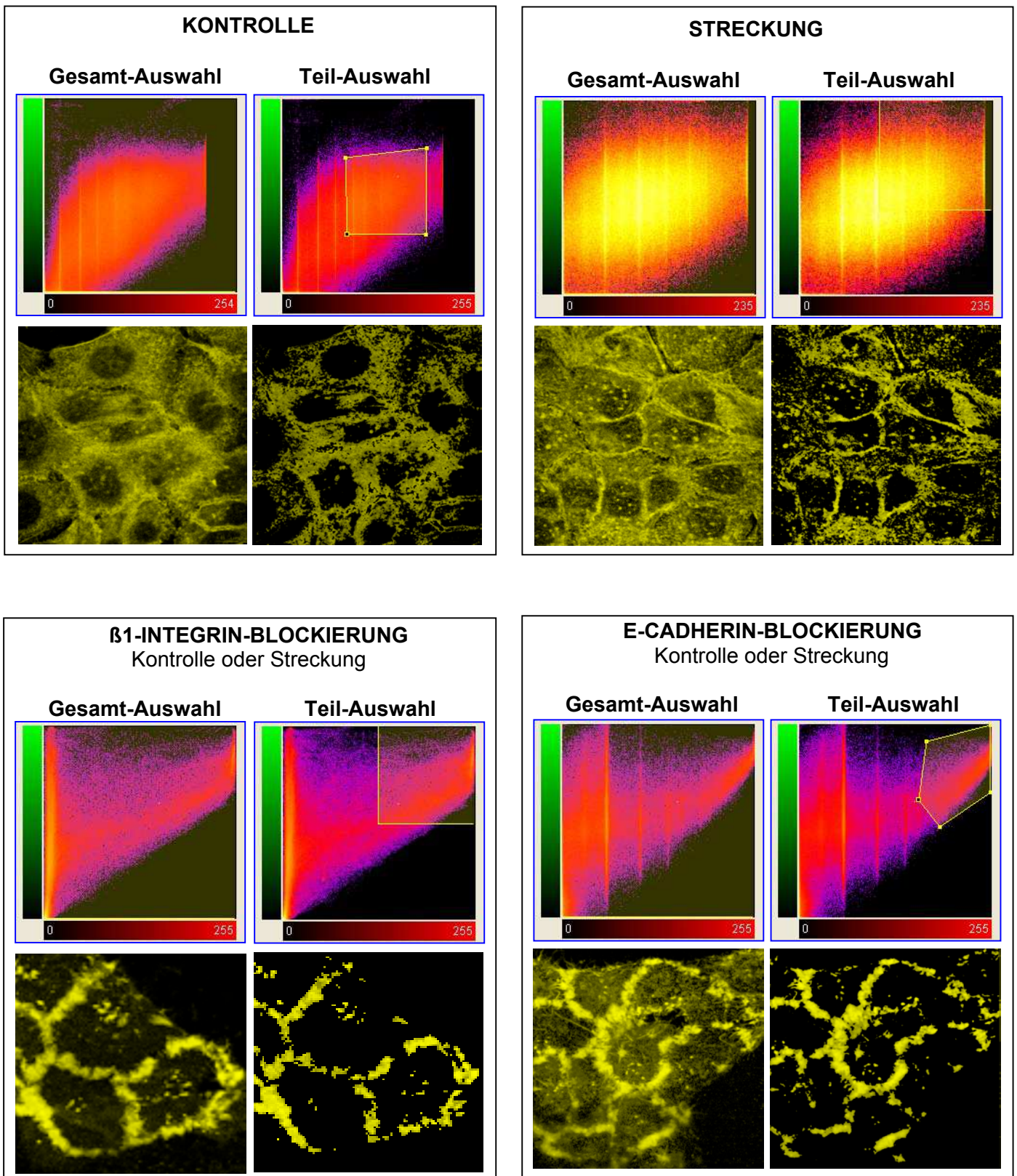


Abb. 3.28 Überprüfung der Kolokalisation von Aktin und EGF-Rezeptoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Der Kolokalisationstest bestätigt die Resultate der Überlagerung des TRITC-Kanals = F-Aktin und des FITC-Kanals = EGF-Rezeptoren der Abb. 3.27.

3.8.3. Intermediärfilamente (Keratin) und EGF-Rezeptoren

Die räumliche Anordnung von Pan-Zytokeratin und EGF-Rezeptoren ist in Abbildung 3.30 anhand von Basalschnitten verdeutlicht und die Teilbilder in Abb. 3.31 sind die dazugehörigen Intensitätsverteilungsschemata + Bild. Die Verteilung des Pan-Zytokeratins in drei Ebenen – basal, medial, apikal- ist in Abbildung 3.29 dargestellt.

Die Keratinfilamente sind im gesamten Zytoplasma mit Ausnahme des Zellkortex anzutreffen und bilden hier ein verzweigtes Netzwerk. Die Zell-Zell-Grenzen sind keratin-frei, mit Ausnahme der desmosomalen Verbindungen. Dabei gibt es keine Unterschiede zwischen den mechanisch stimulierten Kulturen und den Kontrollkulturen (Abb. 3.29).

Eine Kovertelung von Keratinfilamenten und EGF-Rezeptoren ist ausschließlich im Zytoplasma anzutreffen. In den Zellmembranen und membrannahen Bereichen findet sich nur der EGF-Rezeptor. Durch die mechanische Reizung ergibt sich keine Umverteilung der dargestellten Strukturen (Abb. 3.30 + Abb. 3.31 > Kontrolle und Steckung).

Die Immunfluoreszenz-Untersuchungen brachten bei funktioneller Blockierung der β 1-Integrine oder E-Cadherine unterschiedliche Reaktionen (Abb. 3.29 + 3.30 + Abb. 3.31 > β 1-Integrin- bzw. E-Cadherin-Blockierung):

β 1-Integrin-Blockierung: Sowohl in den Kontroll- als auch in den gestreckten Kulturen ist das Keratin-Netzwerk zerstört. Es sind kaum noch filamentäre Strukturen zu erkennen. Zudem ist die Verteilung des EGF-Rezeptors in beiden Fällen diffuser. Die Kolokalisation der Keratinfilamente und des EGF-Rezeptors im Zytoplasma ist nicht mehr einheitlich.

E-Cadherin-Blockierung: Die Blockierung der E-Cadherine scheint keine sichtbare Veränderung des Pan-Keratin-Musters hervorzurufen, d.h. die Kontroll- und die gestreckten Zellen gleichen unbehandelten Kulturen. Auch ist der EGF-Rezeptors ähnlich wie in den Kontrollkulturen verteilt, jedoch sind die interzellulären Membranbereiche deutlich stärker gefärbt. Die Kolokalisation im Zytoplasma bleibt bestehen.

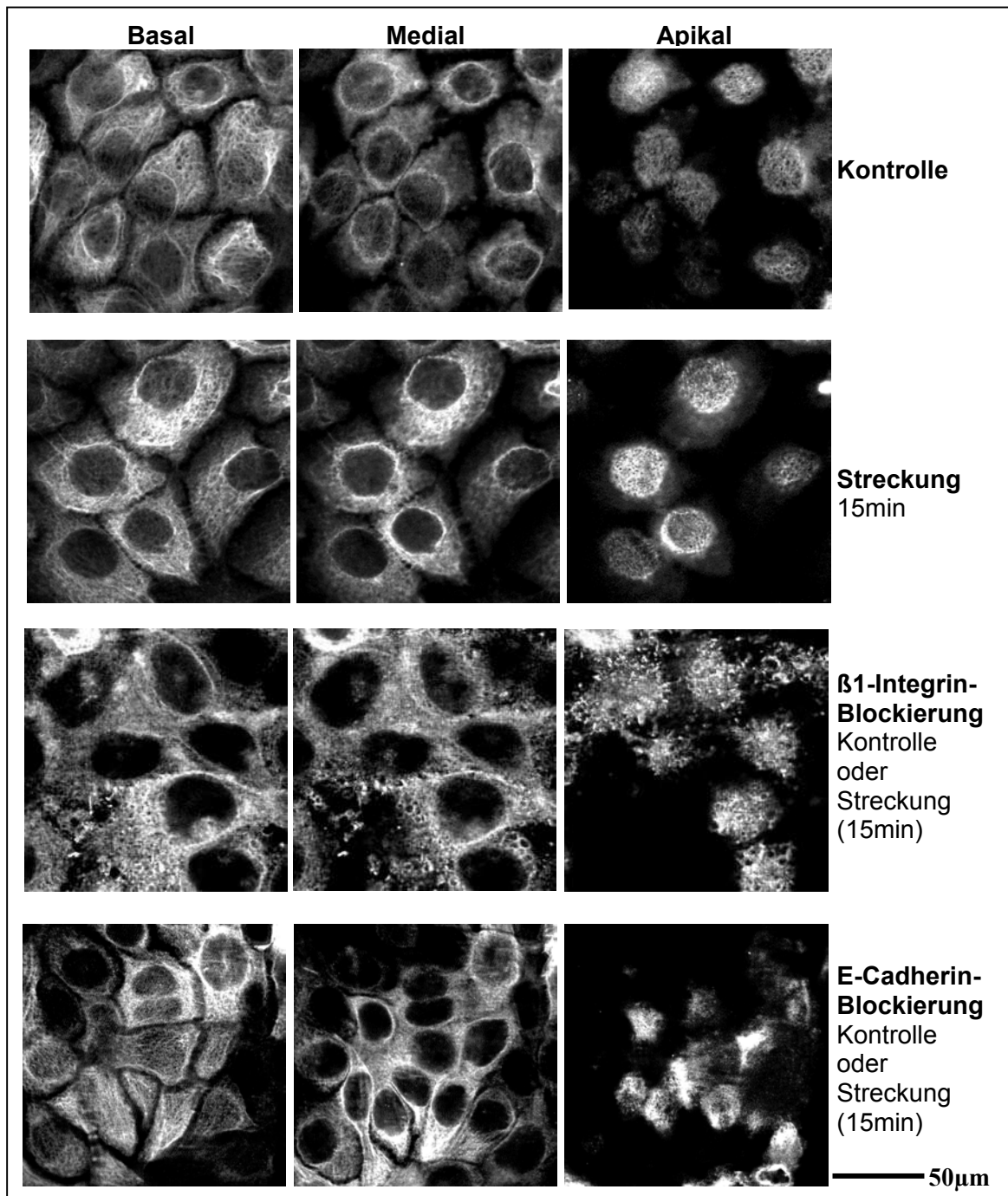


Abb. 3.29 Verteilung von Pan-Zytokeratin nach funktioneller Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine

Das gleichmäßig ausgebildete Keratin-Netzwerk der Kontroll- und Streckungs-Zellen zerfällt durch die Blockierung der β 1-Integrine. Eine E-Cadherin-Blockierung hat nicht diesen zerstörerischen Effekt.

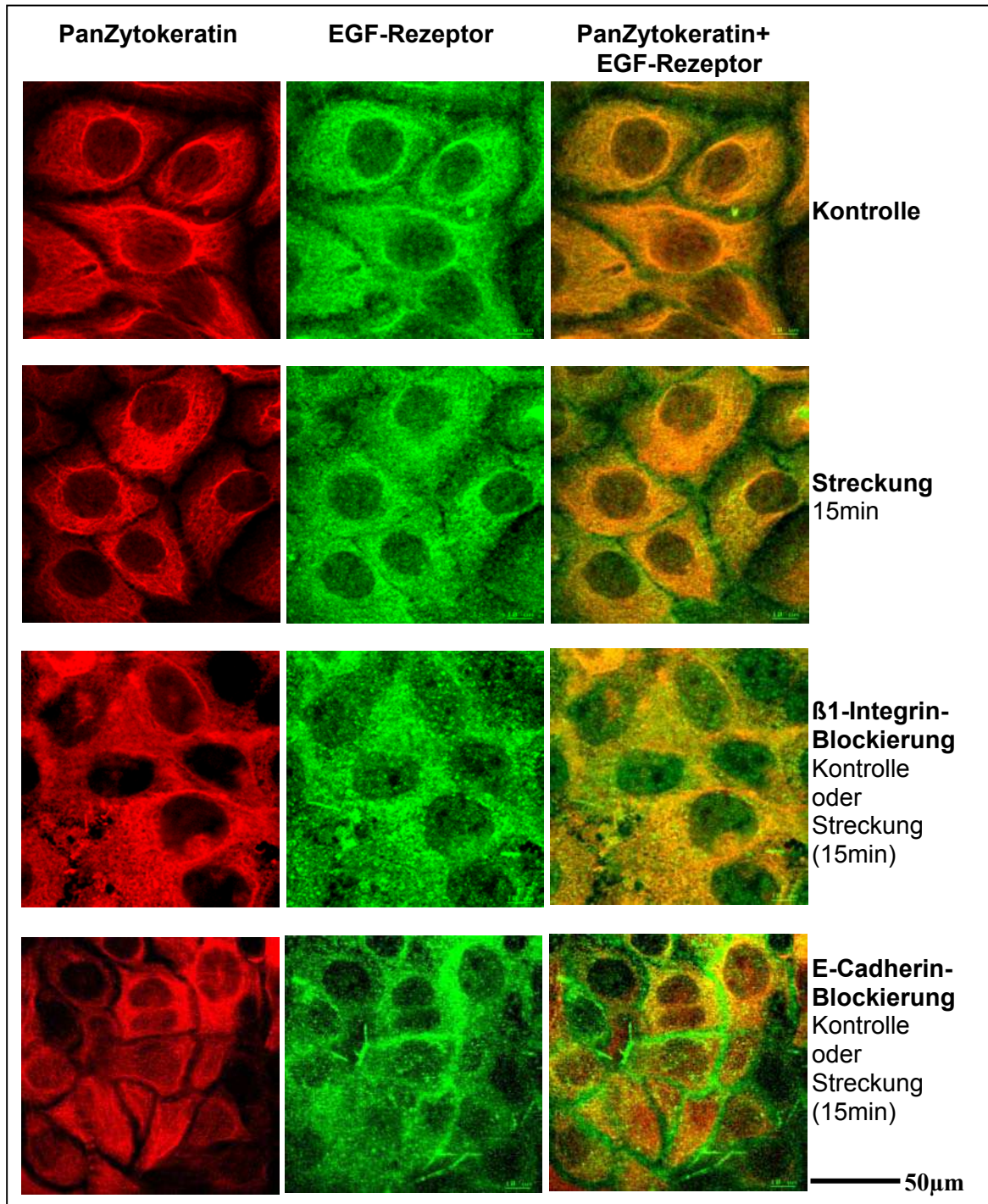


Abb. 3.30 Kolokalisation von Pan-Zytokeratin und EGF-Rezeptoren nach funktioneller Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine

Eine Koverteilung von PanZytokeratin und dem EGF-Rezeptor wird im Zytoplasma deutlich, an den Zell-Zell-Grenzen ist fast ausschließlich der EGF-Rezeptor vorhanden. Eine Blockierung der E-Cadherine scheint keine Auswirkungen auf das Keratin-Muster zu haben. Im Gegensatz dazu bewirkt die Blockierung der β 1-Integrine eine überwiegende Zertörung der Keratinfilamente.

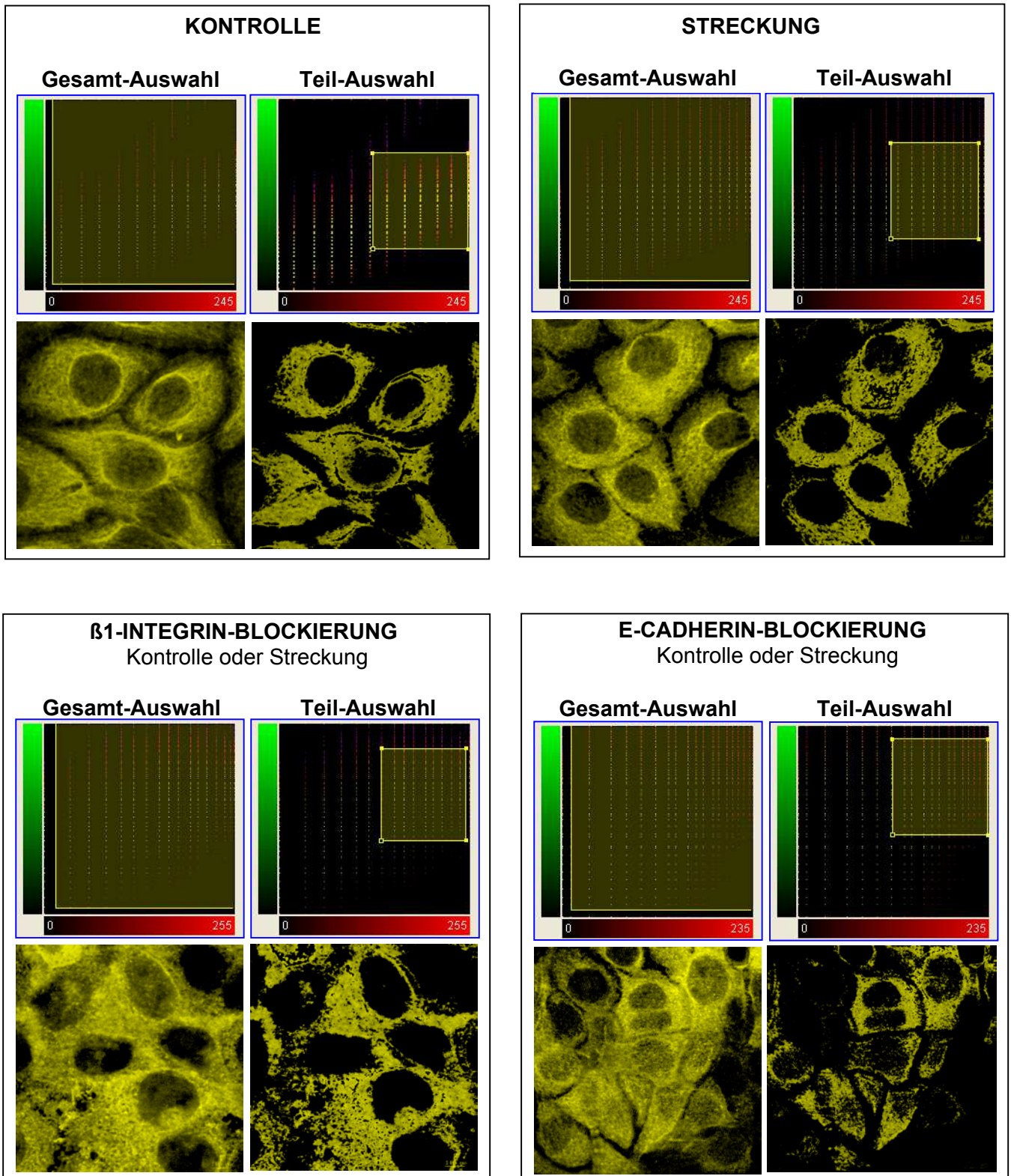


Abb.3.31 Überprüfung der Kolokalisation von Pan-Zytokeratin und EGF-Rezeptoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Der Kolokalisationstest bestätigt die Resultate der Überlagerung des TRITC-Kanals = Keratin und des FITC-Kanals = EGF-Rezeptoren der Abb. 3.30.

3.8.4. Mikrotubuli und EGF-Rezeptoren

Abbildung 3.33 zeigt die Färbungen mit anti- α -Tubulin und anti-EGF-Rezeptor anhand von Basalschnitten und die Teilbilder in Abb. 3.34 sind die dazugehörigen Intensitätsverteilungsschemata + Bild. Die Anordnung des Mikrotubuli-Systems innerhalb der Zellen ist in Abbildung 3.32 mit einem basalen, einem medialen und einem apikalen Schnitt dargestellt.

Die Kontrollzellen und die gestreckten Zellen besitzen ein ausgedehntes Mikrotubuli-System im Zytoplasma, das aber nicht bis in den vordersten Lamellenrand hineinreicht. Die Dehnung bewirkt keine nennenswerte Umstrukturierung dieses Systems (Abb. 3.32).

In den unbehandelten Kulturen (Kontroll- und gedehnten Kulturen) besteht eine Kolokalisation entlang des Mikrotubuli-Netzes, die in Kernnähe stärker ist und zur Peripherie hin abnimmt (Abb. 3.33 + Abb. 3.34 > Kontrolle und Streckung).

Sowohl durch die β 1-Integrin- als auch die E-Cadherin-Blockierung wird die gleiche Reaktion hervorgerufen: Es kommt zu einer Umstrukturierung des Mikrotubuli-Systems dahingehend, dass eine Reduktion der Mikrotubuli stattgefunden hat; der bleibende Teil geht sternförmig von einem Punkt aus und strebt der Membran entgegen (Abb. 3.32 + 3.33). Es besteht noch eine teilweise Koverteilung der Mikrotubuli und der EGF-Rezeptoren, die aber nicht mehr so einheitlich ist (Abb. 3.33 + Abb. 3.34 > β 1-Integrin- bzw. E-Cadherin-Blockierung). Diese durch die β 1-Integrin- und E-Cadherin-Blockierung entstandenen Resultate sind unabhängig von der mechanischen Reizung sichtbar.

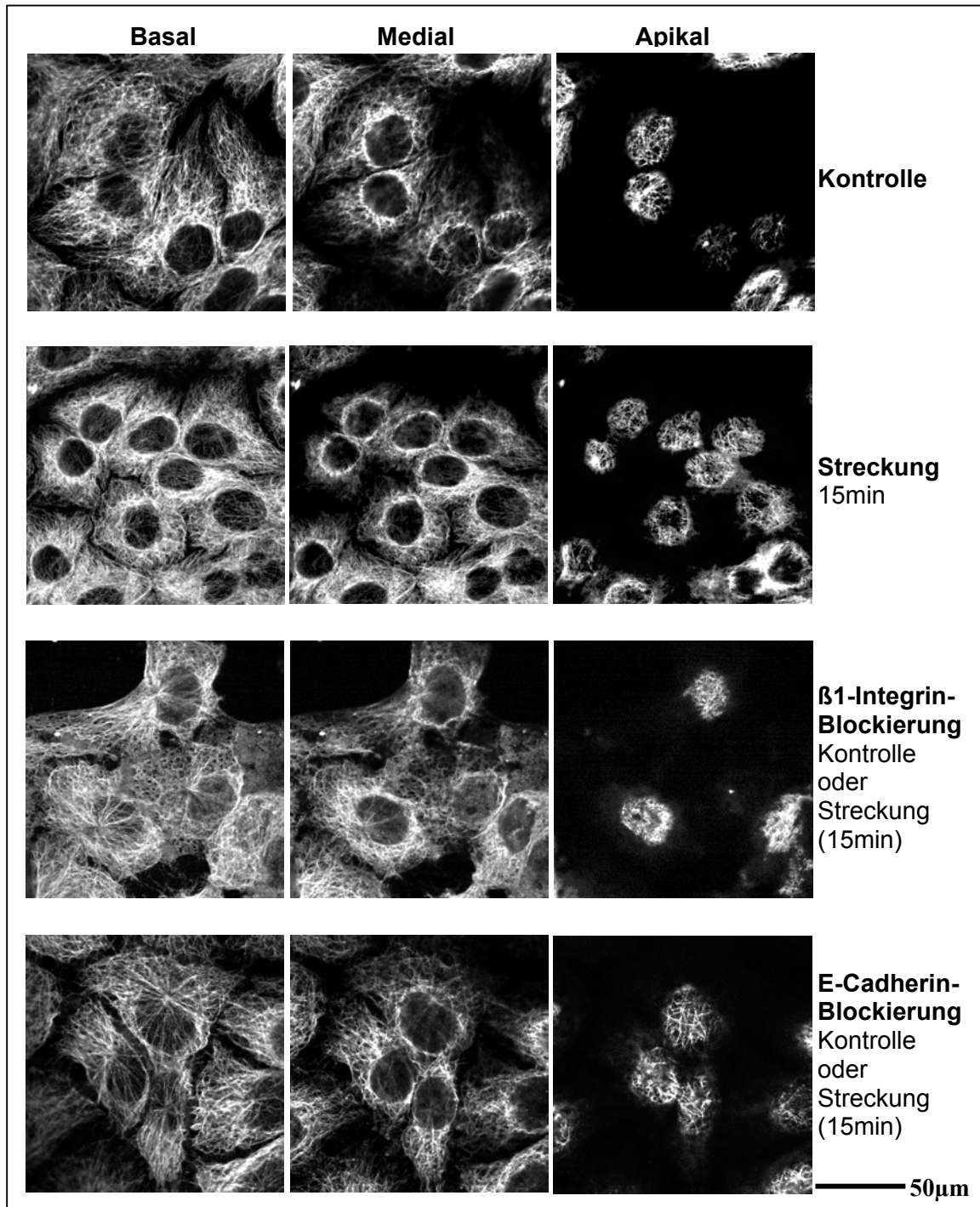


Abb. 3.32 Verteilung der Mikrotubuli nach funktioneller Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine

Das Mikrotubuli-System der Kontroll- und gestreckten Zellen erfährt durch die Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine eine Umstrukturierung, wobei die Mikrotubuli nun sternförmig von der Zellmitte ausgehen und auf die Membran zulaufen.

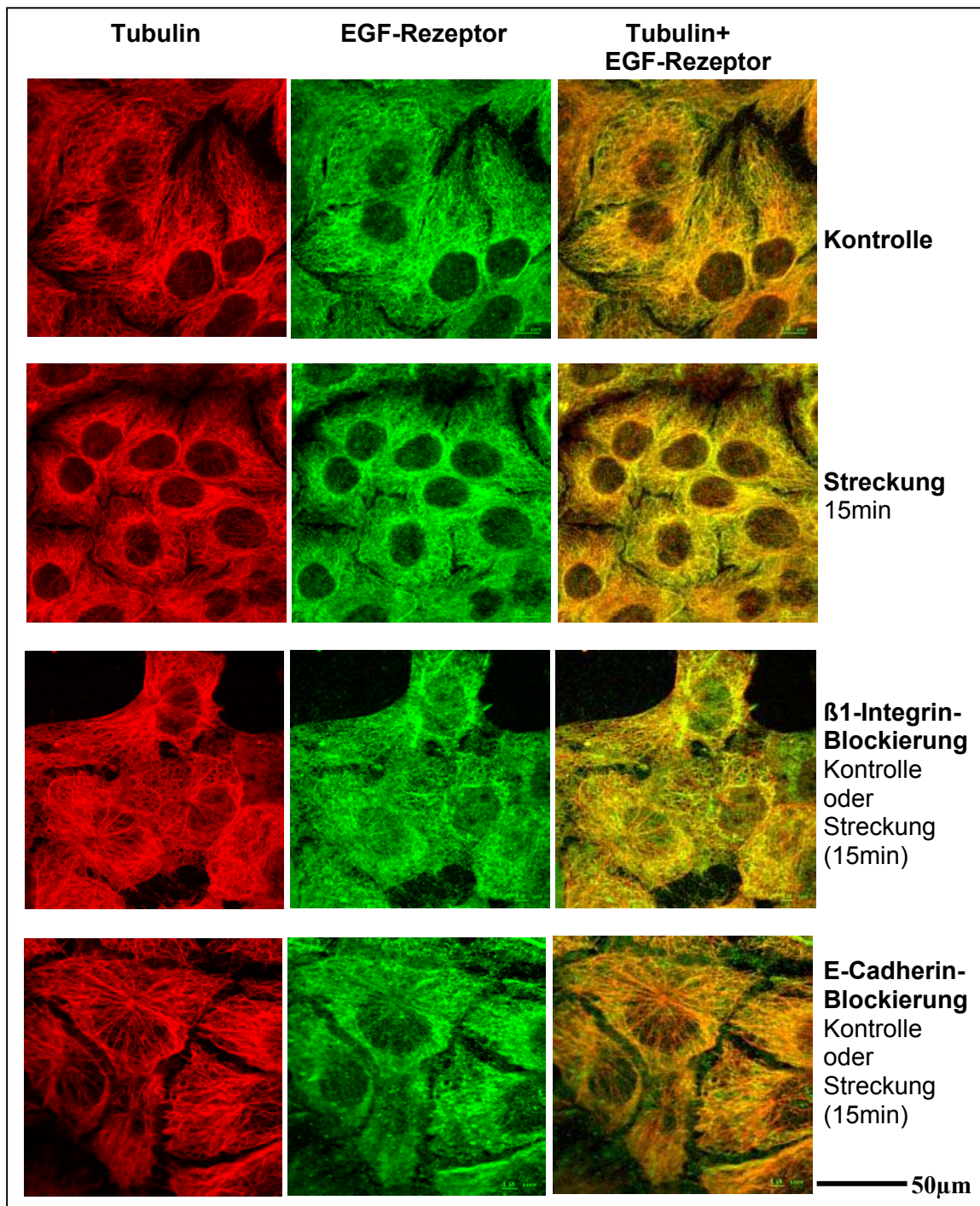


Abb. 3.33 Kolokalisation von Mikrotubuli und EGF-Rezeptoren nach funktioneller Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine

In den Kontroll- und gedehnten Kulturen besteht eine Kolokalisation der gefärbten Strukturen entlang des Mikrotubuli-Gerüsts. Die Blockierung der β 1-Integrine oder E-Cadherine ruft folgende Reaktion hervor: Die Mikrotubuli gehen sternförmig von der Zellmitte aus. Dabei bleibt die Kolokalisation zwischen Mikrotubuli und EGF-Rezeptor teilweise erhalten.

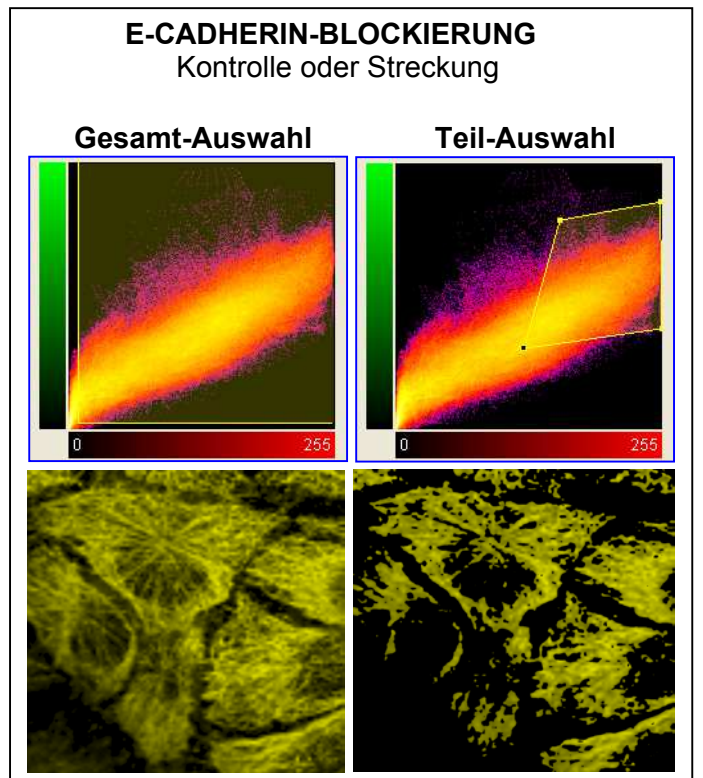
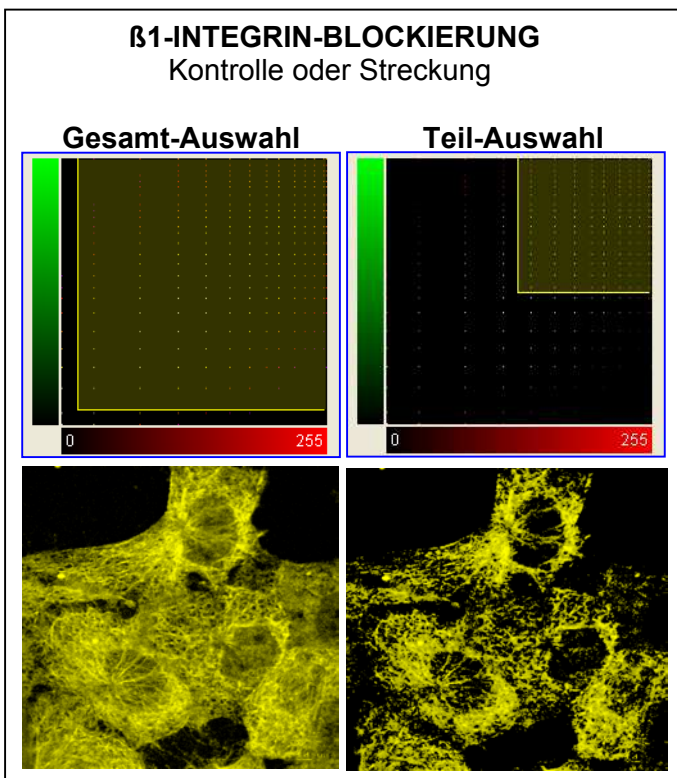
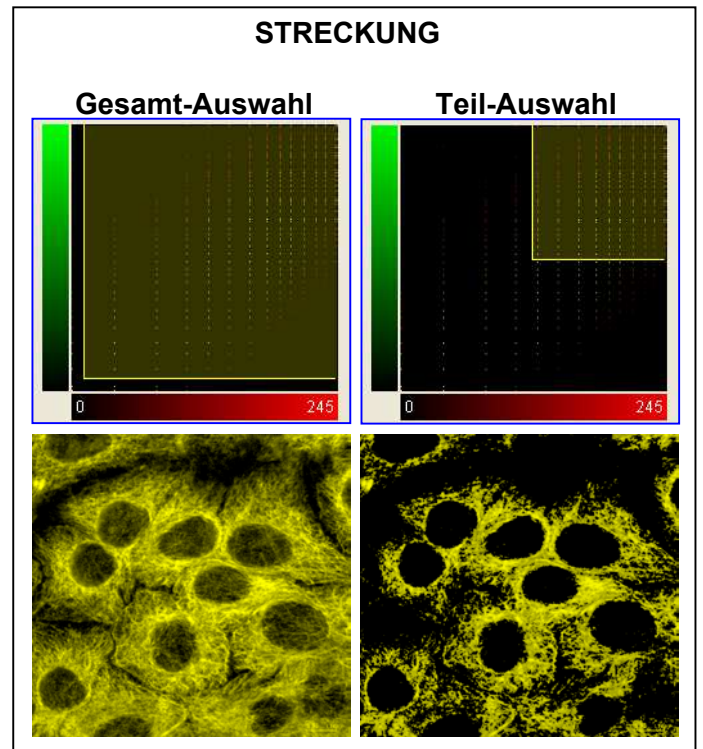
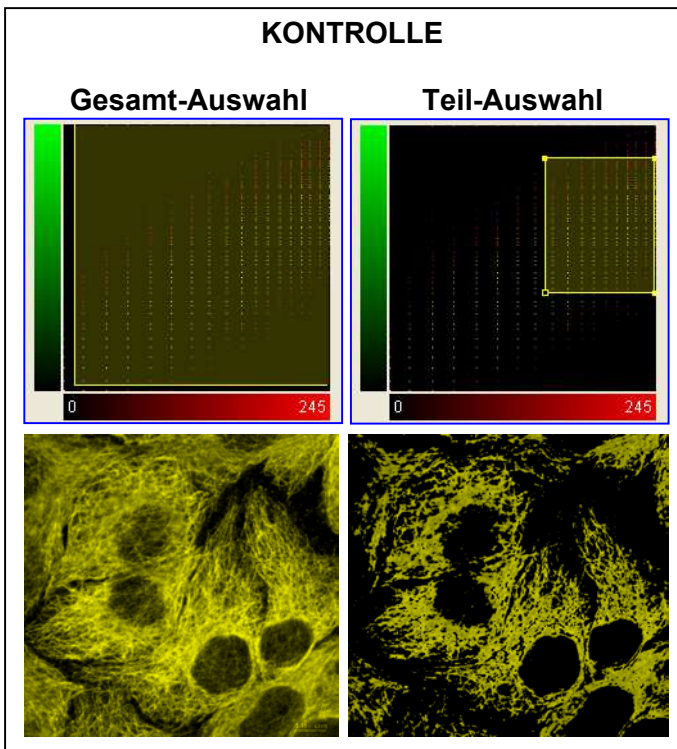


Abb. 3.34 Überprüfung der Kolo-kalisation von Mikrotubuli und EGF-Rezeptoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen

Der Kolo-kalisationstest bestätigt die Resultate der Überlagerung des TRITC-Kanals = Tubulin und des FITC-Kanals = EGF-Rezeptoren der Abb. 3.33.

4. Diskussion

Ausgehend von der Tatsache, dass mechanischer Stress in unterschiedlicher Form eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse verschiedener Zelltypen spielt, sollte in dieser Arbeit die Signalaufnahme und die Signalweiterleitung nach mechanischen Dehnungsreizen bei humanen Keratinozyten der Zelllinie HaCaT untersucht werden. Besonderes Interesse galt dabei den Integrinen, Cadherinen und dem EGF-Rezeptor. Diese Oberflächenrezeptoren sind mit den Komplexen der Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakte assoziiert, vermitteln vermutlich den Transfer von mechanischen Reizen durch die Zellmembran und leiten deren Signaltransduktion ein. Zur Stimulation wurden die Zellen in die zuvor beschriebene Dehnungsapparatur eingebracht und für unterschiedliche Zeitspannen einer einfachen Streckung um 10% ihrer initialen Länge ausgesetzt.

Der Übersichtlichkeit wegen ist die Arbeit zwei Teile gegliedert:

Der erste Abschnitt befasst sich ausschließlich mit der Beteiligung von Integrinen an der Übermittlung des Dehnungsreizes. Dabei wird sowohl die unmittelbare Reaktion von Integrinen auf eine mechanische Stimulation, wie z.B. deren Verteilung auf der Membran gezeigt, als auch die Antwort auf eine Streckung von zellulären Prozessen, an denen Integrine beteiligt sind, wie z.B. die Adhäsion an die ECM oder die Proliferation, untersucht.

Der zweite Abschnitt beinhaltet Untersuchungen zu einer räumlichen und funktionellen Interaktion von Integrinen und/oder Cadherinen mit dem EGF-Rezeptor bei der Transduktion einer mechanischen Dehnung.

4.1. Beteiligung von β 1-Integrinen an der Mechanotransduktion des Dehnungsreizes

Mechanische Stimuli, verliehen durch Dehnung, Spannung, Druck, Scherkraft und dem Strömen von Flüssigkeit, resultieren in einer Vielfalt biochemischer Reaktionen (Salter et al., 2000). Gemein unter den verschiedenen Antworten auf mechanische Reizung ist die Relevanz einer direkten oder indirekten Verbindung zwischen dem Zytoskelett, der ECM und den traditionellen Signaltransduktionsmolekülen. In vielen Fällen konvergieren diese Elemente in den Fokalkontakten, Stellen einer strukturellen Berührung zwischen Zytoskelett und ECM, welche durch Zelloberflächen-Integrin-Rezeptoren angebunden sind (Alenghat et al., 2002).

4.1.1. Räumliche Reorganisation der β 1-Integrine nach mechanischer Streckung

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die Signale zwischen dem extrazellulären - und dem intrazellulären Kompartiment austauschen (Quarana et al., 1991); dabei können die Zell-Matrix-Kontakte an der Signaltransduktion beteiligt sein und als spannungssensitive Vorrichtung dienen, welche die Zellkontraktion in Proteinmodifikationen umwandelt. In diesem Zusammenhang fördert eine interne isometrische Zellspannung sowie eine externe Streckung der Zelle die Tyrosin-Phosphorylierung und die Formation von Stressfasern und Fokalkontakten. Mit anderen Worten, eine mechanische Spannung erhöht die Tyrosin-Phosphorylierung in den Fokalkontakten, was zur Stärkung der vorhandenen Zell-Matrix-Kontakte beiträgt, den Zusammenbau weiterer Fokalkontakte als auch die Bildung von Stressfasern fördert (Breshadsky et al., 1996). Ein essentieller Schritt zur Entwicklung von Fokalkontakten ist die Clusterung von Integrinen (Ward et al., 1994).

Carvalho et al. beschrieben schon 1995, dass mechanische Streckung von Knochenzellen zu einer signifikanten Änderung in der Verteilung und Expression der β 1-Integrin-Untereinheit führt. Festzustellen, ob ein Dehnungsreiz bei Keratinozyten ebenfalls diese zellulären Reaktionen auslöst, war das erste Ziel dieser Arbeit. Zur Untersuchung einer möglichen Umverteilung der β 1-Integrine auf der Zellmembran wurden optische Schnitte am CLSM angefertigt; parallel dazu wurde die Menge an β 1-Integrinen auf der Zelloberfläche am FACS gemessen.

Es konnte gezeigt werden, dass der mechanische Reiz eine Reorganisation der β 1-Integrin-Verteilung im Vergleich mit unstimulierten Zellen dahingehend hervorruft, dass sich die β 1-Integrine auf der basalen Membranseite zu größeren Komplexen zusammenballen (Abb. 3.1, 3.13-3.16). Dieses Phänomen der Clusterung von β 1-Integrinen wurde bereits für Knochenzellen (Carvalho et al., 1995), Endothelzellen (Ishida et al., 1996), Herzmuskelzellen

(Sharp et al., 1997) und Fibroblasten (Molina et al., 2001) beschrieben. Eine quantitative Analyse der Clusterbildung anhand der CLSM-Bilder ergab schon nach einer fünfminütigen Streckung eine Verdreifachung der $\beta 1$ -Komplexe im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese signifikante Zunahme bleibt auch nach 15min Streckung unverändert und verzeichnet nach 30min einen leichten Rückgang (Abb. 3.3). Die Zu- und Abnahme der Clusteranzahl repräsentiert einen Anpassungsprozess der Zellen an die Streckung: Zuerst wird die Formation von größeren $\beta 1$ -Aggregaten gefördert, um der mechanischen Belastung standhalten zu können (=Klettverschluß-Prinzip). Haben sich die Zellen an den neuen Zustand angepasst, kann die Adhäsion auch von weniger $\beta 1$ -Komplexen aufrecht erhalten werden. Diese Erklärung wird durch mehrere Literaturstellen gestützt: Das kotikale Aktin-Netz erfährt durch äußere Krafteinwirkung eine adaptive Reorganisation (Gunst et al., 2003); das Zytoskelett wird versteift und erlaubt so eine stärkere Kraftausübung auf die Integrine (Choquet et al., 1997). Weiterhin kommt es zu einer Anpassung an die Streckung und dadurch zu einer Desensitivierung gegenüber nachfolgenden Applikationen (Glogauer et al., 1998).

Die Flow-Cytometrischen-Untersuchungen verdeutlichen, dass die Menge der $\beta 1$ -Integrine auf der Zelloberfläche durch die Dehnung unbeeinflusst bleibt (Abb. 3.2). Die Ergebnisse decken sich mit den Angaben von Donaldson et al., 1995: Bei ruhenden Keratinozyten ist die $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit generell über die gesamte Zellmembran verteilt. Dagegen befinden sich $\beta 1$ -Integrine bei wandernden Kertinozyten bevorzugt an der Membranseite, die der Matrix zugewandt ist (= Akkumulation). Dabei zeigt ein Vergleich der $\beta 1$ -Integrin-Menge auf der Zelloberfläche von ruhenden und wandernden Kertainozyten keinen Unterschied.

Dies ist konträr zu anderen Literaturangaben, die eine Hochregulierung des Proteinlevels und der Expression von $\beta 1$ -Integrinen nach mechanischer Reizung beschreiben (Carvalho et al., 1995, Klein et al., 1991, Urbich et al., 2000). Eine Ausnahme scheinen außer den Keratinozyten auch die Chondrozyten zu sein. Denn bei Knorpelzellen hat mechanischer Stress keinen Einfluss auf den mRNA- und den Proteinlevel der $\beta 1$ -Integrin-Untereinheit (Holmvall et al., 1995).

Ein Artikel von Kadi et al., 1998 macht deutlich, dass durch eine extern induzierte Erhöhung der Zellspannung die Zelladhäsion verstärkt wird. Diese Zunahme der Adhäsionsstärke wird durch Integrine vermittelt, ist aber nicht auf eine quantitative Mengenänderung von Integrinen auf der Zelloberfläche zurückzuführen. So scheint bei Keratinozyten wie auch bei Leukozyten die dynamische Reorganisation der Integrine in Microcluster der Hauptmechanismus zu sein, um die Bindungskapazität zu regulieren (Van Kooyk et al., 2000).

4.1.2. Adhäsionsverhalten vorgestreckter HaCaT-Keratinocyten auf unterschiedlichen Matrices

Die Menge an Fokalkontakten nimmt im direkten Verhältnis zur Zellausbreitung zu. Dabei sind die Fokalkontakte am häufigsten dort anzutreffen, wo die Zelle den größten Spannungsstress erfährt; sie nehmen in ihrer Zahl zu, wenn die zytoskelettale Spannung erhöht wird (Chen et al., 2003). Durch diesen Vorgang wird eine stärkere Zelladhäsion erreicht (Kadi et al., 1998 / Van Kooyk et al., 2000).

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt: Die Streckung ruft eine Umverteilung der bereits vorhandenen Zelloberflächen- β 1-Integrine und eine Clusterung in Adhäsionsstellen hervor. Im Folgenden soll der naheliegenden Hypothese nachgegangen werden, dass eine mechanische Stimulierung überdies zu einer gesteigerten Adhäsion der Zellen führt und dass diese β 1-integrinabhängig ist. Um das zu bestätigen, wurden Adhäsions-Assays mit unterschiedlichen Matrices und β 1-Integrin-blockierenden Antikörpern durchgeführt.

Der Adhäsionsprozess läuft bei adhären Zelltypen folgendermaßen ab (Abb. 4.1):

- a. Adorption: Die abgerundete Zelle adsorbiert über divalente Kationen an die Substratoberfläche.
- b. Kontakt: Über Glykoproteine nehmen die Zellen Kontakt mit dem Substrat auf, wobei sie immer noch eine abgerundete Form aufweisen.
- c. Anheftung: Die Zellen heften sich über zelleigene Oberflächenproteine - z.B. Integrine - an die Matrix an und beginnen sich auszubreiten, ihre Gestalt flacht sich dabei allmählich ab.
- d. Ausbreitung und Adhäsion: Erst wenn die Zellen vollständig ausgebreitet und somit adhärirt sind - ihre Form gleicht nun einem Spiegele - beginnen sie zu proliferieren.

Überträgt man die Schritte des Anheftungs- und Ausbreitungsprozess auf die Morphologie der vorgestreckten Zellen während des Adhäsions-Assay (Abb. 3.6) kann gesagt werden, dass die Zellen nach 15min Anheftungszeit an die Oberfläche adsorbieren, nach 30min mit dem Substrat in Kontakt treten und ab 45min der Anheftungs- und Ausbreitungsvorgang beginnt, der letztendlich zur vollständigen Adhäsion führt. Mit fortschreitender Anheftungszeit finden sich immer mehr ausgebreitete, adhärirte Zellen und immer weniger abgerundete, locker angebundene Zellen in den Kulturen. Für den Adhäsions-Assay bedeutet dies: Zellen, die sich in der Adsorptions- und Kontaktphase befinden, werden leichter ausgewaschen als Zellen in der Anheftungs- und Adhäsionsphase. Daraus kann die Zunahme der Adhäsionsrate in den Grafiken erklärt werden.

Bereits diese Tatsache spricht für eine Beteiligung von $\beta 1$ -Integrinen an der mechanisch induzierten Steigerung der Adhäsionsrate.

Die Grafiken im einzelnen betrachtet ergeben:

1. Die Anheftungskinetik von Keratinozyten an Kollagen ist schnell (Abb. 3.7 C). Das Plateau wird schon nach 60min erreicht, liegt bei den gestreckten Zellen aber signifikant über den Kontrollzellen. Dieses Ergebnis deckt sich in Bezug auf die Anheftungskinetik mit den Angaben von Karasek et al., 1980. Mit dem Modell der Anheftungsphasen (Abb. 4.1) lässt sich das folgendermaßen erklären: Die Zellen treten sowohl unter Kontroll- als auch unter Streckungsbedingungen nach kurzer Zeit (30min) in die Anheftungsphase ein und beginnen sich auszubreiten, wodurch es zu der raschen Zunahme der adhären Zellen kommt. Überdies ist die Adhäsionsstärke in den gestreckten Kulturen gegenüber den Kontrollen erhöht, wodurch auch eine größere Adhäsionsrate erreicht wird.

2. Demgegenüber ist Fibronectin ein Low-Affinity-Zelladhäsionsprotein (Mathur et al., 2003). Dies wird dadurch ersichtlich, dass unter Kontrollbedingungen die Zahl der adhären Zellen erst nach 45min Anheftungszeit signifikant zunimmt (Abb. 3.7 B). Unter dem Einfluss der Streckung dagegen steigt die Adhäsionsrate schon nach 30min stark an. Die mechanisch stimulierten Zellen befinden sich also bereits in der Anheftungs- und Ausbreitungsphase, wenn die Kontrollzellen noch in der Kontaktphase sind. D.h. die mechanische Reizung bewirkt auf Fibronectin eine Verkürzung der Phasen, in denen die Zellen mit dem Substrat nur locker verbunden sind (Adsorptions- und Kontaktphase). Nach 90min Anheftungszeit gehen beide Populationen in den Sättigungsbereich über, die Anzahl der adhären Kontrollzellen liegt dann nur schwach signifikant unter dem Adhäsionslevel der gestreckten Zellen.

3. Auf Laminin lässt sich keine Adhäsionssteigerung verzeichnen (Abb. 3.7 D). Da Laminin im Gegensatz zu Fibronectin und Kollagen keinen Ausbreitungsfaktor für Keratinozyten darstellt (O'Keefe et al., 1985), bewirkt es in diesem Fall auch keine Adhäsionssteigerung.

4. Die Arginin+Serum-Beschichtung hat einen kombinatorischen Effekt, der wahrscheinlich auf die Serumbestandteile zurückzuführen ist (Abb.3.7 A). Das Serum ist ein komplex zusammengesetztes Gemisch aus Substanzen, die zum Teil in unbekannter Form und Konzentration enthalten sind. Zu diesen Substanzen zählen unter anderem: Anheftungsfaktoren (wie Fibronectin, Kollagen, usw.), Wachstumsfaktoren, Hormone, verschiedene Enzyme, Elektrolyte, Proteine (wie Albumin, Bilirubin, Hämoglobin, usw.) und viele mehr (Lindl, 2002). Durch die Kombination unterschiedlich adhäsionsfördernder Bestandteile werden eine Vielzahl von Anheftungsrezeptoren angesprochen und es kommt zu

einer optimalen Adhäsion der Zellen. Die Verschiebung der Adhäsionskinetik durch die mechanische Stimulierung zugunsten einer früher beginnenden Anheftungs- und Ausbreitungsphase ist auf diesem Substrat besonders auffällig. Die Anzahl der adhären Zellen vorgestreckter Populationen nimmt nach 45min Anheftungszeit sprunghaft zu und hat nach 90min den Sättigungsbereich erreicht. Dagegen verläuft der Adhäsionsvorgang bei den Populationen der Kontrollzellen im Vergleich mit den anderen Matrices sehr viel langsamer; sie weisen innerhalb der 90min Anheftungszeit nur eine geringe Zunahme der adhären Zellen auf und haben das Plateau noch lange nicht erreicht. Die unstimulierten Zellen befinden sich also bei der Arginin+Serum-Beschichtung lange in der Adsorptions- und Kontakt-Phase, bevor sie in die Anheftungs- und Ausbreitungsphase übergehen. Es ist wahrscheinlich, dass die Kontrollzellen nach entsprechend langer Anheftungszeit annähernd die gleiche Anzahl adhären Zellen erreichen wie die gestreckten Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Obwohl der Adhäsionsprozess an die Arginin+Serum-Matrix im Vergleich zu Fibronectin und Kollagen langsamer verläuft, tritt durch die mechanische Dehnung doch der größte adhäsionssteigernde Effekt auf.

Um der Ursache hierfür nachzugehen, wurde der Adhäsions-Assay zunächst getrennt auf Arginin oder Serum wiederholt (Abb.3.8 B+C). Die Ergebnisse fallen auf beiden Matrices annähernd gleich aus: Sowohl die Kontroll- als auch die gestreckten Zellen lassen erst nach 90min Anheftungszeit eine Erhöhung der Adhäsionsrate erkennen, dabei besteht kein Unterschied zwischen beiden Populationen. Eine Erklärung dafür wäre, dass die Inkubation mit Arginin das Silikon für die Adsorption weiterer Substanzen vorbereitet, Arginin selbst aber keine adhäsionsfördernden Eigenschaften besitzt. Demgegenüber hat das Serum zwar gute adhäsionsfördernde Eigenschaften kann aber nur über Arginin auf dem Silikon immobilisiert werden. Daraus ist zu folgern, nur eine Kombination aus vorheriger Inkubation mit Arginin und anschließender Serum-Beschichtung entfaltet die volle Wirkung.

Eine weitere Frage war, ob ein bestimmter Bestandteil des Serums gefunden werden kann, der für die Adhäsionssteigerung der mechanisch gedehnten Zellen verantwortlich ist. Mehrere Hinweise deuteten auf das Albumin im Serum hin:

1. Albumin zählt zu den Transport- und Bindungssubstanzen (Lindl, 2002)
2. Humanes Serum Albumin kann an RGD-Peptide adsorbieren (Oliverieri et al., 1999).
3. In einem Versuch von Grzeski et al., 1998 wurden synthetische Peptide, welche die RGD-Sequenz beinhalten, mit BSA konjugiert. Diese Konjugate (zyklisch oder linear), Typ 1 Kollagen, Mixturen aus Kollagen und Konjugaten (1:1) und BSA wurden hinsichtlich ihrer anheftungsfördernden- und proliferationstimulierenden

Eigenschaften untersucht. In Bezug auf ihre anheftungs- und ausbreitungsfördernde Wirkung sind das zyklische Konjugat und reines Kollagen gleich potent, gefolgt vom linearen Konjugat. Alle Mixturen entsprechen dem Potential von Kollagen, wobei wiederum die lineare Konjugat-Mixtur etwas weniger potent ist. Im Hinblick auf die Stimulierung der Proliferation sind die Konjugate (rein oder gemischt) sogar effizienter als reines Kollagen, welches die Proliferation nicht über den Kontrolllevel hinaus steigert.

4. Ein weiterer Punkt ist, dass BSA schon seit längerer Zeit in mehreren Versuchsdurchführungen zum Absättigen unspezifischer Bindungen Verwendung findet.

So wurde für einen weiteren Adhäsions-Assay die Silikonoberfläche zuerst mit Arginin behandelt und darauf mit 5%igem BSA inkubiert. In der Tat konnte mit dieser Beschichtungskombination der gleiche Effekt wie mit der Arginin+Serum-Beschichtung erzielt werden: Bei den gestreckten Kulturen kam es zu einer enormen Steigerung der Adhäsionsrate, wogegen die Kontrollkulturen während der Testdauer wieder nur eine sehr geringe Zunahme der adhärenierten Zellen aufwiesen.

Zur Bestätigung, dass die mechanische Streckung eine integrinabhängige Steigerung der Adhäsion zur Folge hat, sollte in einem letzten Adhäsionsexperiment direkt die Beteiligung von β 1-Integrinen an diesem Vorgang nachgewiesen werden. Hierzu wurde ein funktionsblockierender Antikörper gegen β 1-Integrine eingesetzt (Carter et al., 1990). Wie erwartet wiesen die Kulturen, die mit dem Antikörper vorinkubiert wurden, eine verminderte Anzahl an adhärenierten Zellen gegenüber den unbehandelten Kulturen auf. Besonders auffällig war dies bei den gestreckten Zellen, deren Adhäsionsrate durch die Inkubation mit dem funktionsblockierenden Antikörper auf den Level der unbehandelnden Kontrollzellen zurückging (Abb.3.9). Diese Ergebnisse der Adhäsionsexperimente zusammen mit den CLSM-Untersuchungen sprechen eindeutig für eine Beteiligung von β 1-Integrinen an der adhäsionsfördernden Eigenschaft der mechanischen Streckung.

4.1.3. Proliferationsverhalten mechanisch gedehnter HaCaT-Keratinocyten

Mehrfach wurde schon beschrieben, dass mechanische Reize Einfluss auf das mitogene Verhalten von Zellen haben und dass dieser Effekt matrix- und integrinabhängig ist (Wilso et al., 1995, Yano et al., 2004). Um festzustellen, ob diese Aussage auch für mechanisch gestreckte Keratinocyten zutrifft, wurde die BrdU-Inkorporationsrate (= Syntheserate der Zellen) nach unterschiedlicher Streckungsdauer und auf verschiedenen Matrices ermittelt.

Erwartungsgemäß konnte ein proliferationsfördernder Effekt der mechanischen Reizung nachgewiesen werden (Abb. 3.10 +3.11): Unter Streckungsbedingungen erhöht sich der Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen. Dabei ist die Proliferation in subkonfluenten Kulturen gegenüber konfluenten Kulturen nochmals gesteigert.

Das Proliferationsverhalten von HaCaT-Zellen auf den Matrices Arginin+Serum, Fibronectin und Kollagen spiegelt die Adhäsion auf diesen Substraten wieder (Abb. 3.12): Die größte, mechanisch induzierte Steigerung der Proliferationsrate wird ebenfalls auf der Arginin+Serum-Beschichtung erzielt. Demgegenüber ist auf Fibronectin sowohl die Syntheserate als auch der proliferationsfördernde Effekt der Streckung sehr gering ausgeprägt. Die Kollagen-Beschichtung nimmt, wie bei den Adhäsionsexperimenten, hinsichtlich der Proliferationsrate und dem Streckungseffekt eine Mittelstellung ein. Da bei den meisten Zellen eine Konvergenz von Wachstumsfaktoren- und adhäsionsvermittelten Signalwegen nötig ist, um den Zellzyklus und die Proliferation voranzutreiben (Grose et al., 2002, May et al., 2001, Ivankovic-Dikic et al., 2000, Chen et al, 1994, Tinois et al., 1987), wird die höchste Syntheserate folglich auf dem Substrat verzeichnet, auf dem auch die größte Adhäsion erreicht wird. Damit sind die Ergebnisse der Adhäsions- und Proliferationsstudien direkt vergleichbar. Die Matrixabhängigkeit des Proliferationsgeschehens und somit das Ansprechen verschiedener Untermengen von Integrinen (siehe Diskussion der Adhäsionsexperimente) führt wiederum zu der Annahme, dass Integrine an dem Prozess beteiligt sind. Auch Blomme et al., 1998 beschreiben, dass verschiedene Typen von ECM-Proteinen die morphologischen-, funktionalen- und proliferativen Eigenschaften von Keratinocyten unterschiedlich beeinflussen.

4.2. Räumliche und funktionelle Interaktionen zwischen β 1-Integrinen bzw. E-Cadherinen mit dem Rezeptor für epidermale Wachstumsfaktoren

Integrine stehen mit der ECM und anderen Zelloberflächen-Proteinen in Verbindung und vermitteln einen bidirektionalen Transfer von Informationen über die Zellmembran.

Die Integrin-Signaltransduktion beinhaltet die Besetzung der Integrine mit Liganden, die Aktivierung von Integrinen, eine laterale Clusterung von Integrinen auf der Plasmamembran-Ebene und die Formation von organisierten Komplexen (Howe et al, 1998). In diesen Fokalkontakten erfolgt eine Koordination mit dem Zytoskelett und dem Signal der Wachstumsfaktoren, was für die integrinabhängige Signaltransduktion erforderlich ist (Dedhar et al, 1996).

Die integrinvermittelte Signaltransduktion kann in zwei Kategorien unterteilt werden:

1. Eine direkte Signaltransduktion, wobei viele intrazelluläre Proteine – zytoskelettale-, regulatorische- und Signaltransduktionsproteine - direkt mit der β -Untereinheit der Integrine interagieren.
2. Ein kolaboratives Signalisieren, bei dem die zytoskelettalen- und Signalmoleküle räumlich mit den Integrinen nach deren Clusterung assoziieren (Dedhar et al, 1996). Integrine können also mit anderen Rezeptoren und Signalmolekülen ko-clustern, um eine funktionelle Einheit zu bilden (Porter et al., 1998).

Integrine geben Signale nur sehr selten, wenn überhaupt, exklusiv über integrinspezifische Signalwege weiter. Sie kooperieren überwiegend mit anderen Zelloberflächen-Rezeptoren, um eine Vielzahl von Signalwegen zu modulieren (Porter et al., 1998). So wurde schon mehrfach berichtet, dass Integrine fähig sind, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren in einer ligandunabhängigen Weise, d.h. in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, zu aktivieren und deren Signalwege zu nutzen (Chen et al, 1994, Sundberg et al, 1996, Miyamoto et al., 1996, Porter et al, 1998).

Auch bei Cadherinen wurde das Phänomen der Rezeptor-Transaktivierung beobachtet: Diese Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle können ebenfalls Rezeptor-Tyrosinkinasen, z.B. Wachstumsfaktor-Rezeptoren, ohne spezifischen Liganden aktivieren (Pece et al., 2000 / Saffell et al, 1997). Zudem finden sich mehrfach Hinweise auf eine räumliche Assoziation zwischen Cadherinen und EGF-Rezeptoren (Pece et al., 2000 / (Fedor-Chaikin et al., 2003 / Ochiai et al, 1999, Hoschuetzky et al, 1994).

Aufgrund dieser Informationen sowie unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob die zuvor beschriebene mechanisch

induzierte Clusterung der $\beta 1$ -Integrine mit der Ko-Clusterung des EGF-Rezeptors einhergeht, ob eventuell räumliche Interaktionen zwischen E-Cadherinen und dem EGF-Rezeptor bestehen und ob es dadurch möglicherweise zu einer Transaktivierung des EGF-Rezeptors kommt, die zur Aktivierung der MAPK-Kaskade führt.

4.2.1. Räumliche Assoziation von $\beta 1$ -Integrinen bzw. E-Cadherinen mit dem EGF-Rezeptor

Um die oben angeführte Hypothese zu überprüfen, wurden am CLSM optische Schnitte angefertigt und hinsichtlich der Kovertelung von $\beta 1$ -Integrinen bzw. E-Cadherinen mit dem EGF-Rezeptor untersucht.

Eine Doppelfärbung von $\beta 1$ -Integrinen und EGF-Rezeptoren zeigt, dass beide Oberflächenrezeptoren prinzipiell auf der gesamten Zellmembran anzutreffen und dort auch kolokalisiert sind. Diese Kolokalisation resultiert überwiegend aus den Rot- und Grün-Fluoreszenzintensitäten im mittleren Bereich. An den Zell-Zell-Grenzen und in den Clustern der gestreckten Zellen besteht eine besonders starke Kolokalisation, die sich aus hohen Rot- und Grün-Fluoreszenzintensitäten zusammensetzt. Dies besagt, dass die Dichte beider Moleküle in diesen Strukturen sehr hoch ist. Eine fünfminütige Streckung der Zellen reicht aus, um ein Ko-Clustern beider Moleküle in der Basalmembran zu erreichen (Abb. 3.13-3.16). Wie bereits bei der quantitativen Analyse der CLSM-Bilder beschrieben, nimmt die Bildung der $\beta 1$ -Cluster nach 15min mechanischer Dehnung leicht zu und geht nach 30min wieder zurück (Anpassung an den neuen stationären Zustand). Dass $\beta 1$ -Integrine nicht nur in der Basalmembran sondern auf der ganzen Zelloberfläche anzutreffen sind, wurde auch von Jensen et al., 1995 und Larjava et al., 1990 bestätigt: Der Hauptaktionsort von Integrinen ist zwar die Zell-Matrix-Adhäsion, doch haben sie eine weitere Funktion in Zell-Zell-Interaktionen. Bei Keratinozyten sind $\alpha 2\beta 1$ - und $\alpha 3\beta 1$ -Integrine in Zell-Matrix- und Zell-Zell-Kontakten zu finden; $\alpha 5\beta 1$ -Integrine sind generell diffus über die Plasmamembran verteilt.

Von Abb. 3.15 wurde beispielhaft eine 3D-Darstellung konstruiert. Diese zeigt den nach der Überlagerung der $\beta 1$ -Integrin(rot)- und EGF-Rezeptor(grün)-Färbung gebildeten Kolokalisations-Kanal (gelb) in allen Schnittebenen und offenbart, dass die $\beta 1$ -Integrin+EGF-Rezeptor-Cluster direkt dort ansetzen, wo die Zellen am Substrat adhärirt sind (abgeplattete Seite) und sich ins Zytoplasma ausdehnen (Abb.3.17).

Der erste Schritt zur Entwicklung von Fokalkontakten ist die Zusammenballung von Integrinen (Ward et al, 1994). Da die CLSM-Untersuchungen eine Clusterung von β 1-Integrinen, EGF-Rezeptoren und F-Aktin in der Basalmembran zeigen – wobei entweder β 1-Integrine+EGF-Rezeptoren oder EGF-Rezeptoren+F-Aktin kolokalisiert sind - ist anzunehmen, dass es sich bei diesen Komplexen tatsächlich um Fokalkontakte oder zumindest um deren Vorstufe handelt (Abb. 3.13-3.16, 3.24, 3.25, 3.27, 3.28). Die 3D-Darstellung erhärtet diese Vermutung, da die Akkumulate direkt in der Basalmembran beginnen (Abb.3.17). Zur eindeutigen Prüfung müssten hier noch elektronenmikroskopische Aufnahmen herangezogen werden.

Die kombinierte Färbung von E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren verdeutlicht eine relativ gleichmäßige Verteilung beider Strukturen auf der gesamten Plasmamembran. Sowohl unter Kontroll- als auch unter Streckungsbedingungen besteht nur eine teilweise Kovertelung, die allerdings nicht in speziellen Strukturen der Zelle, wie z.B. den β 1-Integrin-Clustern, anzutreffen ist (Abb. 3.19 + 3.20). Gleich den Integrinen sind auch Cadherine nicht nur an Stellen der Zell-Zell-Adhäsion konzentriert, sondern über die gesamte Zelloberfläche verteilt (Kusumi et al., 1999). Wie im Kapitel Material und Methoden erläutert wurden die Versuche auf einer Silikonmembran durchgeführt. Diese besitzt unter Anregung mit den für die Färbung erforderlichen Wellenlängen eine gewisse Eigenfluoreszenz, die von Membran zu Membran unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Da die Färbung der E-Cadherine relativ schwach ausfällt und dieser Kanal zudem, um Crosstalk zu vermeiden, mit dem AOTF herunterreguliert werden musste, sind in diesem Fall Hintergrund und gefärbte Strukturen in ihrer Fluoreszenzintensität fast gleich und es kommt zu einem Bildrauschen. Dieses „Rauschen“ war mit keinem Filter oder anderen Funktionen zu eliminieren. Aufgrund dieser Tatsache und dem Ergebnis, dass eine Kolokalisation von E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren über die gesamte Zellmembran verteilt ist, wobei sich Kontrolle und Streckung nicht unterscheiden, wurde in weiteren Versuchsreihen auf eine E-Cadherin-Färbung verzichtet.

Die Verteilung des EGF-Rezeptors innerhalb der Zelle ist abhängig vom Zelltyp und dem Konfluenzgrad der Kultur: So ist der EGF-Rezeptor in A431-Zellen bei Konfluenz hauptsächlich in den Zell-Zell-Grenzen lokalisiert und in subkonfluenten Kulturen meist diffus verteilt (Lichtner et al., 1990). In HaCaT-Zellen scheint der EGF-Rezeptor unter allen Bedingungen sowohl in der Membran als auch im Zytoplasma vorhanden zu sein.

Diese Ergebnisse bestätigen die Eingangsvermutung, dass die mechanisch induzierte Zusammenballung von β 1-Integrinen ein Ko-Clustern des EGF-Rezeptors zur Folge hat. Für E-Cadherine ist eine räumliche Zusammenarbeit mit dem EGF-Rezeptor zum Teil ebenfalls gegeben. Diese ist aber im Vergleich mit der Kooperation von β 1-Integrine und EGF-Rezeptoren nicht so ausgeprägt.

So scheint der erste Schritt bei der Kooperation von Integrinen mit EGF-Rezeptoren die räumliche Zusammenlagerung beider Moleküle zu sein. Eine Spekulation ist, dass durch eine Assoziation von Wachstumsfaktor-Rezeptoren und Integrinen eine Clusterung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren möglich wird, um so eine effizientere Signalverarbeitung zu erzielen oder eine frühe Dephosphorylierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren zu verhindern und damit die Aktivität der Tyrosinkinase dieser Rezeptoren aufrechtzuerhalten. Eine andere Hypothese ist, dass Integrine für die Modulation der Adhäsions-Signaltransduktion Wachstumsfaktor-Rezeptoren nutzen (Porter et al., 1998). Dieser mögliche Signalweg soll im nächsten Abschnitt im Hinblick auf die Mechanotransduktion weiter verfolgt werden.

4.2.2. Funktionelle Interaktionen von β 1-Integrinen bzw. E-Cadherinen mit dem EGF-Rezeptor

Die Cross-Kommunikation zwischen verschiedenen Signal-Verarbeitungs-Systemen ist notwendig für die Integration der vielen und wechselnden Umwelteinflüsse einer individuellen Zelle. Der EGF-Rezeptor wurde als Schlüsselement im komplexen Signal-Verarbeitungs-Netzwerk identifiziert, welches von verschiedenen Zell-Oberflächen Rezeptoren genutzt wird. Diese nichtklassische Methode des Crosstalks von Signal-Verarbeitungs-Systemen in Hinblick auf die Rezeptor-Aktivierung induziert durch nicht-spezifische Liganden wird „Signal-Transaktivierung“ genannt. Mit dem EGF-Rezeptor als Konvergenz + Verteilungs-Punkt erhält dieses System Signale von Integrinen, Cadherinen, anderen Mitgliedern der Tyrosine-Kinase-Familie, Zytokin-Rezeptoren, Ionen-Kanälen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Prenzel et al., 2000).

Es existieren zahlreiche Hinweise, dass es durch eine Integrin-Ligation und Integrin-Clusterung zu einer Transaktivierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren – u.a. auch des EGF-Rezeptors - und nachfolgend zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade kommt (Sundberg et al., 1996, Howe et al., 1998, Miyamoto et al., 1996, Yu et al., 2000, Li et al., 1999).

Ein Beispiel sei hier ausführlicher beschrieben, bei dem Integrine und EGF-Rezeptoren direkt auf der Ebene der Plasmamembran zu kooperieren scheinen, um spezifische Signalwege auszulösen (Moro et al., 1998):

Die Adhäsion an immobilisierte Matrix-Proteine oder β 1-Integrin-Antikörper stimuliert die Tyrosin-Phosphorylierung des EGF-Rezeptors. Diese Phosphorylierung ist vorübergehend,

erreicht ihr Maximum 30min nach der Adhäsion und tritt in Abwesenheit des spezifischen Rezeptor-Liganden auf. Die integrinvermittelte Aktivierung des EGF-Rezeptors führt zur Induktion von ERK. Eine Inhibition des EGF-Rezeptors mit AG1478 verhindert die adhäsioninduzierte Aktivierung dieser MAP-Kinase gänzlich. Die durch die Adhäsion induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors repräsentiert eine partielle Rezeptoraktivierung, die durch die Zugabe von EGF weiter erhöht werden kann. Weiterhin ist die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors bei der gleichen Dosis EGF in adhärenen Zellen effizienter als in Suspensionszellen. Der Level der ERK-Aktivierung, induziert durch den integrinabhängigen EGF-Rezeptor-Signalweg, ist nicht ausreichend, um das Zellwachstum zu fördern. Erst der erhöhte Level der ERK-Aktivierung durch eine Kostimulation von Matrix-Proteinen und EGF induziert die Proliferation. Dies lässt vermuten, dass ein Aktivierungsschwellenwert existiert, welcher durch Zell-Matrix-Interaktionen erreicht wird, und der notwendig zu sein scheint, um die volle Antwort des EGF-Rezeptors auf seinen Liganden zu erhalten.

Auch E-Cadherine können, neben ihrem Beitrag zur Zelladhäsion, Signale über die Zellmembran übermitteln. Sie sind ebenfalls Komponenten von Signalwegen, in die Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren involviert sind (Barth et al., 1997); d.h. Cadherine können nach ihrer Besetzung mit Liganden Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie z.B. den EGF-Rezeptor, in einer ligandunabhängigen Weise aktivieren (Saffell et al., 1997 / Pece et al., 2000). Diese Aktivierung resultiert in der Tyrosin-Phosphorylierung von bekannten Substraten des EGF-Rezeptors, wie den MAP-Kinasen (Fedor-Chaikin et al., 2003 / Pece et al., 2000).

Demzufolge sollte mit dem Western-Blot-Verfahren der Annahme nachgegangen werden, ob die gezeigten Auswirkungen der Streckung auf die Zelloberflächen-Verteilung der β 1-Integrine, E-Cadherine und EGF-Rezeptoren eine ligandunabhängige Aktivierung (= Transaktivierung unter serumfreien Bedingungen) des EGF-Rezeptors herbeiführen und ob dieser seinerseits ERK1/2 aktiviert (Abb. 4.2).

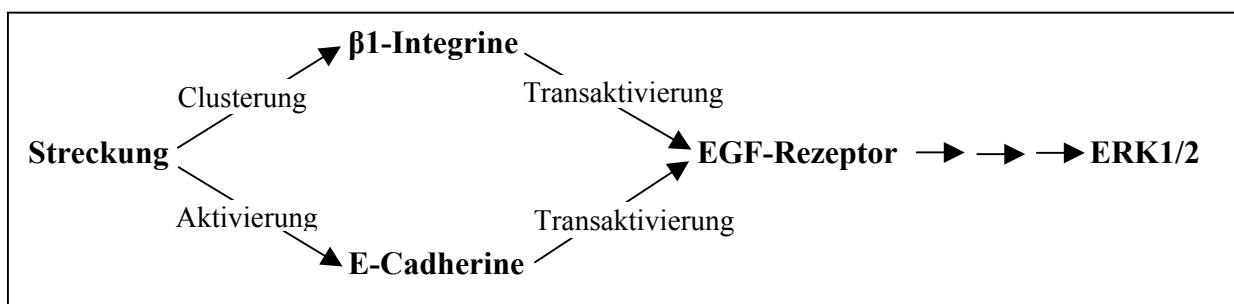


Abb. 4.2 Arbeitshypothese

In diesem Zusammenhang wurde zuerst eine Aktivierungskinetik des EGF-Rezeptors und von ERK1/2 erstellt. Es zeigte sich, dass die mechanische Dehnung sowohl den EGF-Rezeptor als auch ERK1/2 aktiviert, wobei der Aktivitätshöhepunkt des EGF-Rezeptors (5min) erwartungsgemäß vor dem Aktivitätsmaximum der MAP-Kinase ERK1/2 (15min) liegt (Abb. 3.21). Danach wurden die β 1-Integrine oder E-Cadherine mit funktionsblockierenden Antikörpern behandelt und die Auswirkungen auf die streckungsinduzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors und von ERK1/2 ermittelt. Die Aktivität der gemessenen Parameter steigerte sich nach der Inkubation mit den Antikörpern nicht über den Basalwert hinaus. Dies zeigt, dass β 1-Integrine und E-Cadherine an der Aktivierung des EGF-Rezeptors und von ERK1/2 beteiligt sind. Sodann wurde der EGF-Rezeptor mit der hochspezifischen Substanz AG1478 blockiert. Dadurch konnte auch eine Beteiligung des EGF-Rezeptors an dem Signalweg nachgewiesen werden, denn nach dessen Blockierung kam es zu einer dosisabhängigen Verminderung der ERK1/2-Aktivität (Abb. 3.22).

So konnte für die Transduktion des Dehnungsreizes in Keratinozyten der Signalweg - Streckung \Rightarrow Integrine bzw. Cadherine \Rightarrow EGF-Rezeptor-Transaktivierung $\Rightarrow \Rightarrow \Rightarrow$ ERK1/2 - nachvollzogen werden. Der direkte Mechanismus für die integrinvermittelte Modulation des mitogenen Signals scheint die Bindung und Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen durch Integrine und Cadherine einzubeziehen. Wahrscheinlich wirken dabei mehrere Typen von Zelloberflächen-Adhäsions-Molekülen zusammen, wobei ein jedes eine einmalige Facette der anliegenden Zelle oder Matrix erkennt. Denn sowohl die Blockierung der β 1-Integrine als auch der E-Cadherine bewirkt, dass eine Aktivierung des EGF-Rezeptors unterbleibt und die Signalweiterleitung zu ERK1/2 unterbrochen wird. Dieser Mechanismus der Rezeptor-Transaktivierung durch Adhäsionsrezeptoren wurde für Integrine von Moro et al., 1998 und für E-Cadherine von Pece et al., 2000 beschreiben.

Unter normalen Bedingungen koordinieren Zellen biochemische und positionelle Signale. Um zu bestimmen, wann der Zellzyklus beginnt, benutzen Zellen nicht nur Informationen über die Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren sondern auch Positions-Informationen über ihre Beziehung zu der ECM und anderen Zellen. Hierzu liefern Adhäsions-Rezeptoren die Positions-Information durch eine Modulation der Signalkaskade, welche von Rezeptoren für lösliche Faktoren eingeleitet wird (Howe et al., 1998). Aber auch die Aktivierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren auf nicht spezifischem Wege, also in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren, scheint ein generelles Phänomen darzustellen. Viele der bekannten Signaltransduktionswege, die ursprünglich für Wachstumsfaktoren identifiziert wurden, werden ebenso von Integrinen aktiviert (siehe unten), was für eine Transaktivierung der Wachstumsfaktor-Rezeptoren spricht.

Beispiele für integrinaktivierte Signalwege (Yamada et al., 1995):

1. Beeinflussung des Ca^{2+} -Levels
2. H^+ -Einstrom (Alkalisierung)
3. Tyrosin-Phosphorylierung von FAK
4. Aktivierung von Src und verwandten Tyrosinkinasen
5. Akkumulation von Signaltransduktions-Adapter und Enzymen
6. Phosphoinositide-Mediatoren
7. Aktivierung der Proteinkinase C
8. Wachstumsregulation
9. Verhinderung oder Stimulation von Apoptose
10. ERK-Aktivierung
11. JNK-Aktivierung
12. Änderung der Genexpression

4.3. Assoziationen zwischen β 1-Integrinen und E-Cadherinen mit Bestandteilen des Zytoskeletts

Wie bekannt ist eine Assoziation von Integrinen (Quaranta et al., 1991 / Haier et al., 1999 / Chen et al., 2003) bzw. Cadherinen (Kee et al., 2001 / Kee et al., 2002) mit dem Zytoskelett für eine starke Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Adhäsion von Epithelzellen notwendig. Andererseits könnte sich eine Blockierung der Integrine oder Cadherine auf das Zytoskelett auswirken (Wang et al., 1994). Dem soll im letzten Teil der Arbeit nachgegangen werden.

Lebende Zellen strukturieren ihr Zytoskelett nach dem Tensigrity-Modell (tensional integrity) (Polte et al., 2004 / Ingber, 2002 / Ingber et al., 1985 / Ingber, 1993 / Ingber, 1998 / Wang et al., 1998), bei dem die gesamte Zelle als Mechanosensor angesehen werden kann. Die Tensigrity-Struktur erhält ihre Stabilität durch eine interne, kontinuierliche, isometrische Spannung. Dabei stehen den einwärts gerichteten Spannungskräften, erzeugt durch flexible Aktinfilamente, kompressionsresistente, stützende Elemente gegenüber, die Mikrotubuli. In diesem Modell dienen die Intermediär-Filamente, welche an vielen Stellen entlang der Mikrotubuli, der Aktinfilamente und der Kernoberfläche angebunden sind, als mechanische Integratoren, um das ganze Zytoskelett und das Kerngerüst spannungsabhängig zu versteifen. Die Adhäsionen an der ECM oder an anderen Zellen unterstützen die Mikrotubuli, dem Zug der Aktinfilamente zu widerstehen. Durch diese Integration aller drei zytoskelettalen Filament-

Systeme und der Verankerung im Gewebe wird eine dynamische Kräftebalance etabliert, welche die Gestalt der Zelle stabilisiert und die mechanischen Eigenschaften einer Zelle bestimmt.

Die Verschiebung der Kräfte bewirkt eine Umorganisation des Zytoskeletts, was in Raum und Zeit gleichermaßen einen Mechanismus für die Signaltransduktion liefert. Werden die Spannungselemente des Modells (Aktinfilamente und Intermediärfilamente) zerstört, nehmen die Spannungskräfte, welche auf die ECM-Anker ausgeübt werden, ab (Kolodney et al., 1992 / Eckes et al., 1998 / Wang et al., 2000). Werden dagegen die Stützen (Mikrotubuli) zerstört, nimmt der Zug auf die ECM zu (Danowski et al., 1989 / Kolodney et al., 1995 / Wang et al., 2001). Wird umgekehrt ein Zug auf die Integrine, durch die Ab- oder Zunahme der ECM-StEIFheit, oder auf die Cadherine, durch die Kontraktion anderer Zellen, ausgeübt, nimmt die Spannung im Zytoskelett ab, die Mikrotubuli werden dekomprimiert und dies fördert deren Polymerisation.

Aufgrund dessen können die Adhäsionsrezeptoren, die das extrazelluläre Umfeld der Zelle mit dem Zytoskelett verbinden, als Mechanorezeptoren fungieren. (Ingber et al., 1985 / Ingber, 1991 / Ingber, 1997). Dabei liefern Adhäsionsmoleküle, die mit dem Zytoskelett verbunden sind – Integrine, Cadherine, usw. - eine größere mechanische Kopplung über die Zellmembran als andere transmembrane Rezeptoren. Jedoch gibt es unter den mit dem Zytoskelett verbundenen Rezeptoren in Bezug auf die mechanischen Kopplung Unterschiede; diese sind unmittelbar von der Fähigkeit der Rezeptoren abhängig, Fokalkontakte zu organisieren und eine Verbindung zum Zytoskelett herzustellen. Dabei stehen Integrine an erster Stelle. In diesem Zusammenhang bedingt eine Mechanotransduktion durch Integrine eine relativ große Versteifung des Zytoskeletts, eine Mechanotransduktion durch E-Cadherine eine eher geringe Versteifung (Potard et al., 1997).

Tensigrity besagt also, dass Zellen stark vernetzt sind, um sofort auf einen mechanischen Stress antworten zu können, welcher über die Zelloberflächenrezeptoren vermittelt wird, die das Zytoskelett entweder mit der Matrix = Integrine oder mit anderen Zellen = Cadherine koppeln (Ingber, 1997).

Die Ergebnisse der CLSM-Untersuchungen lassen sich in die Tensigrity-Theorie einfügen:

Durch eine mechanische Streckung des Substrats wird ein Zug auf die Integrine und Cadherine ausgeübt. Dadurch kommt es in einem intakten Zytoskelett zu einer Spannungsverminderung, die durch die Polymerisation der Mikrotubuli und der Bildung von Stressfasern kompensiert wird. Das wiederum führt zu einer vermehrten Bildung von Fokalkontakten und somit zu einer verstärkten Anheftung an die Matrix (Abb. 3.1, 3.13-3.16).

Weiterhin wurde der Einfluss einer funktionellen Blockierung der β 1-Integrine, E-Cadherine und des EGF-Rezeptors auf die β 1-Integrine untersucht (Abb. 3.23-3.25). Wie erwartet kommt es durch die Blockierung der Adhäsionsrezeptoren - β 1-Integrine und E-Cadherine - zu starken Beeinträchtigungen der Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion, die unter Kontroll- und Streckungsbedingungen recht ähnlich aussehen; die Zell-Zell-Kontakte sind gelockert und die streckungsinduzierte Neubildung der Zell-Matrix-Kontakte entfällt. Die Kolo-kalisation mit dem EGF-Rezeptor bleibt dagegen bestehen. Eine Blockierung des EGF-Rezeptors hingegen scheint die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsionen nicht zu beeinträchtigen, weshalb im weiteren auf die EGF-Rezeptor-Blockierung verzichtet wurde.

Bezugnehmend auf das Tensigrity-Modell ist zu erwarten, dass ein Verlust der Verankerung einer Zelle an der ECM und an anderen Zellen, zu einer Umorganisation innerhalb des kontinuierlich spannungsintegrierten Zytoskelettgerüsts führt. In der Tat hat eine funktionelle Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine Einfluss auf alle drei Zytoskelett-Elemente – Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente = Zytokeratine.

Aktinfilamente (Abb. 3.26-3.28): Das feine Aktin-Netz, welches unter Kontrollbedingungen die Zellen durchzieht, ist nach β 1-Integrin- und E-Cadherin-Blockierung weitgehend zerstört. Im Zytoplasma sind nur noch wenige Aktinfilamente vorhanden. Im Ektoplasma findet sich ein kortikaler dicker Aktinring, der gewisse Ähnlichkeit mit der β 1-Integrin-Färbung aufweist. Fokalkontakte sind keine vorhanden. Dies deutet wieder auf eine Lockerung der Zell-Matrix- und Zell-Zell-Adhäsion hin.

Mikrotubuli (Abb. 3.32-3.34): Die Zellen der Kontrollkulturen besitzen ein ausgedehntes Mikrotubuli-Netz, welches durch eine Blockierung der Adhäsionsrezeptoren modifiziert wird. Es kommt zu einer Reduktion der Mikrotubuli und der verbliebene Teil scheint verstärkt, geht sternförmig von einem Punkt aus und strebt der Zellmembran entgegen.

Zytokeratine (Abb. 3.29-3.31): Die Intermediärfilamente bilden in unbehandelten Zellen ein verzweigtes Netzwerk. Nach einer Blockierung der β 1-Integrine ist dieses Keratin-Netz weitgehend zerstört; es sind kaum noch filamentäre Strukturen zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigt sich nach der Blockierung der E-Cadherine kaum eine Veränderung der Keratin-Verteilung.

Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass für eine normale Funktion des Zytoskeletts eine mechanische Einbindung der Keratinozyten in die extrazelluläre Umgebung unabdingbar ist. Eine Blockierung der Adhäsionsrezeptoren ruft eine erhebliche Zerstörung mit verdichteten Aggregaten fragmentierten Aktins und reduzierter Mikrotubuli hervor (Sethi et al., 2002).

Mit dem Tensigrity-Modell lassen sich die Ergebnisse folgendermaßen erklären:

Durch die funktionelle Blockierung der β 1-Integrine oder E-Cadherine fehlt der Zelle die Verankerung am Substrat oder an den Nachbarzellen. Damit fehlt den Spannungselementen des Zytoskeletts (Aktinfilamente und Intermediärfilamente) der extrazelluläre Gegenzug, was ihren Zerfall begünstigt. Die stützenden Strukturen (Mikrotubuli) werden dekomprimiert, wodurch sie polymerisieren und sich bei dem Versuch umorganisieren, die Zelle durch Drücken gegen die Membran zu stabilisieren. Das Ergebnis dieses Prozesses könnte das sternförmige Muster darstellen, welches in den CLSM-Bildern zu sehen ist.

Die Auswirkungen der funktionellen Inhibition der Adhäsionsrezeptoren auf das Zytoskelett sind unabhängig von der mechanischen Reizung zu beobachten. Dafür gibt es zwei Erklärungen: Zum einen reagieren die Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente eher gering auf diese Art der mechanischen Reizung. Zum anderen ist das Zytoskelett bereits in ungestrecktem Zustand durch die Behandlung mit den anti- β 1-Integrin- bzw. anti-E-Cadherin-Antikörpern teilweise zerstört und kann deshalb auf die Streckung nicht mehr reagieren.

Der EGF-Rezeptor kann die Zelladhäsion, die Zellmigration und die zytoskelettale Organisation modulieren (Toral et al., 2003). Dabei besteht eine räumliche Interaktion zwischen dem EGF-Rezeptor und den zytoskelettalen Filamenten (Wiegant et al., 1986). So scheint die aufgezeigte Kollokalisierung von EGF-Rezeptoren mit β 1-Integrinen (Abb. 3.24+3.25), F-Aktin (Abb. 3.27+3.28), Mikrotubuli (Abb. 3.33+3.34) und Zytokeratinen (Abb. 3.30+3.31) ein bekanntes Phänomen zu sein. Diese Assoziationen bleiben auch nach Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine weitgehend erhalten. Es wäre denkbar, dass der EGF-Rezeptor unter diesen Bedingungen als Adhäsionsprotein fungiert und somit eine Teilaufgabe der β 1-Integrine und E-Cadherine übernimmt. Eine Publikation von Are et al., 2001 unterstützt diese Theorie: A431-Zellen adhäreren auf einer mit anti-EGFR Antikörpern beschichteten Oberfläche und breiten sich aus. Auf diese Weise können EGF-Rezeptoren das Zytoskelett-Filament-System umorganisieren, dadurch die Signal-Transduktionsmaschinerie aufrecht erhalten und die Zelle somit vor dem sofortigen Übergang in die Apoptose bewahren. Interessanterweise ist in intakten Zellen die zuvor beschriebene Transaktivierung des EGF-Rezeptors durch eine integrinvermittelte Zelladhäsion neben der Aktivierung der MAP-Kinasen ebenfalls eine Grundvoraussetzung für die integrinabhängige Aktivierung von Rac. Denn Zellen, in denen der EGF-Rezeptor inhibiert wurde, können sich auf Fibronectin weder ausbreiten noch Lamellipodia bilden. Rac, gehörig zu den kleinen GTPasen der Rho-Familie, kontrolliert in eukaryotischen Zellen die Organisation des Aktin-Zytoskeletts und benötigt zur Aktivierung eine Wachstumsfaktorstimulation und die integrinvermittelte Adhäsion an die ECM (Marcoux et al., 2003).

5. Zusammenfassung

Die mechanische Streckung hat einen großen Einfluss auf Keratinozyten und bei der Transduktion dieses Reizes nehmen β 1-Integrine, E-Cadherine und EGF-Rezeptoren eine zentrale Rolle ein:

Eine einfache mechanische Dehnung von HaCaT-Zellen um 10% führt innerhalb von 5min zu einer schnellen Umorientierung der β 1-Integrine auf der Zellmembran, ohne dass sich dabei die Menge dieser Oberflächenrezeptoren ändert. Die Integrine sammeln sich in der basalen Membran zu größeren Adhäsionskomplexen. Dies hat Auswirkungen auf das Adhäsionsverhalten der Zellen. Eine Streckung bewirkt, dass die mechanisch stimulierten Zellen gegenüber den Kontrollzellen sowohl schneller an das Substrat anheften als auch eine stärkere Zell-Matrix-Adhäsion aufweisen. Das unterschiedliche Adhäsionsverhalten auf den verschiedenen Substraten (Arginin+Serum, Fibronectin, Kollagen) und Experimente mit funktionsblockierenden Antikörpern gegen β 1-Integrine sind Beweise für die Beteiligung dieser Oberflächenrezeptoren an diesem Vorgang. Da adhärente Zellen, wie Keratinozyten, neben Wachstumsfaktoren den Zell-Matrix-Kontakt benötigen, um in die S-Phase eintreten zu können, hat das unterschiedliche Adhäsionsverhalten von gestreckten und ungestreckten Zellen wiederum Einfluss auf die Proliferation. Diese ist bei den mechanisch gereizten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen gesteigert und zwar im direkten Verhältnis zu der mechanisch induzierten Steigerung der Adhäsion.

Im Rahmen einer Rezeptor-Transaktivierung (siehe vorne) kooperieren β 1-Integrine und E-Cadherine sowohl räumlich als auch funktionell mit dem EGF-Rezeptor bei der Übermittlung des Dehnungsreizes:

Räumliche Interaktionen: Eine Koclusterung von β 1-Integrinen mit dem EGF-Rezeptor tritt bereits nach 5minütiger mechanischer Reizung an den Zell-Zell-Grenzen und den Fokalkontakten auf. Eine Kolokalisation zwischen E-Cadherinen und EGF-Rezeptoren besteht ebenfalls, wobei sich allerdings Kontrolle und Streckung nicht unterscheiden.

Funktionelle Interaktionen: Eine mechanische Stimulation führt zu einer transienten Aktivierung des EGF-Rezeptors (Aktivitätsmaximum: 5min) und der MAP-Kinase ERK1/2 (Aktivitätsmaximum: 15min). Diese streckungsinduzierte Aktivierung von ERK1/2 wird sowohl durch die Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine als auch durch die Inhibition des EGF-Rezeptors unterbunden. Weiterhin hemmt die Blockierung der Adhäsionsmoleküle die Aktivierung des EGF-Rezeptors. Dies spricht für die Transaktivierungs-Theorie des EGF-Rezeptors durch die β 1-Integrine und E-Cadherine.

Die Zellstrukturen und viele zelluläre Prozesse werden durch eine zellintern erzeugte Grundspannung im Zytoskelett aufrechterhalten. Ohne eine Verankerung der Zelle an der ECM oder den Nachbarzellen, was durch die Blockierung der β 1-Integrine und E-Cadherine erreicht wird, bricht dieses fein ausbalancierte System zusammen; die Zytoskelett-Elemente F-Aktin, Intermediär-Filamente und Mikrotubuli zerfallen.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wird ersichtlich, welche enorme Bedeutung den Adhäsionsrezeptoren – β 1-Integrine und E-Cadherine – für die Formstabilität und die funktionellen Eigenschaften der Zelle zukommt.

Ein Ausfall dieser Adhäsionsmoleküle beeinträchtigt sowohl die Form der Zelle (Adhäsionsvorgänge und Tensigrity-Modell) als auch die Transduktion von Umweltreizen durch die Plasmamembran, z.B. einer mechanischen Stimulation, die letztendlich das Überleben der Zelle und die Proliferation bestimmt.

Daher wäre denkbar, dass die Ergebnisse dieser Grundlagenforschung in Zukunft zur Behandlung von Hautkrankheiten herangezogen werden können.

6. Literaturnachweis

Alberts,B., Bray,D., Lewis,J., Raff,M., Roberts,K., Wotson,J.D. (1995)
Molekularbiologie der Zelle
(3.Auflage) VCH-Verlag, Weinheim

Ando,J. (1996)
Shear stress and vascular formation
Nippon-Yakurigaku-Zasshi, 107(3): 141-152

Ando,J., Kamiya,A. (1996)
Flow-dependent regulation of gene expression in vascular endothelial cells
Jpn-Heart-J, 37(1):19-32

Alenghat,F.J., Ingber,D.E. (2002)
Mechanotransduction: all sights point to cytoskeleton, matrix, and integrins
Sci. STKE, 2002(119): PE6

Are,A., Pinaeva,G., Burova,E., Lindberg,U. (2001)
Attachment of A-431 cells on immobilized antibodies to the EGF receptor promotes cell spreading and reorganisation of the microfilament system
Cell Motil Cytoskeleton 48(1): 24-36

Asselineau,D., Bernard,B.A., Baliyy,C., Darmon,M., Prunieras,M. (1986)
Human epidermis reconstructed by culture : Is it "normal" ?
J. Invest. Dermatol., 86: 181-186

Ballermann,B.J., Ott,M.J. (1995)
Adhesion and differentiation of endothelial cells by exposure to chronical shear stress: a vascular graft model
Blood-Purif, 13(3-4): 125-134

Benninghoff,A., Akert,K., Firbas,W., Fritsch,P., Gruber,H., Mayr,R., Neuhuber,W., Petsche,H., Rager,G., (eds.) (1985)
Makroskopische und Mikroskopische Anatomie des Menschen, Bd 1+2
Urban & Scharzenberg Verlag München Wien Baltimore

Bereiter-Hahn,J. (1991)
Cytomechanics and biochemistry
In: Schmitd-Kittler,N., Vogels,K. Springer Verlag, Berlin, pp 81-90

Bereiter-Hahn,J., Anderson,O.,R., Reif,W.E. (eds.) (1987)
Cytomechanics: The mechanical bases of cell form and structure
Springer Verlag, Berlin

Bershadsky,A., Chausovsky,A., Becker,E., Lyubimova,A. (1996)
Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction
Curr. Biol., 6(10): 1279-1289

Birukov,K.G., Shirinsky,V.P., Stepanova,O.V., Tkachuk,V.A., Hahn,A.W., Resink,T.J. (1995)

Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells

Mol. Cell Biochem., 144(2): 131-139

Blomme,E.A., Weckmann,M.T., Capen,C.C., Rosol,T.J. (1998)

Influence of extracellular matrix macromolecules on normal human keratinocytes phenotype and parathyroid hormone-related protein secretion and expression in vitro

Exp. Cell Res., 238(1): 204-215

Boukamp,P., Petrussevska,R.T., Breitkreutz,D., Hornung,J., Markham,A., Fussenig,N.E. (1988)

Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid keratinocyte cell line

J. Cell Biol., 106: 761-771

Budtz,P.E., Spies,I. (1989)

Epidermal tissue homeostasis: apoptosis and cell emigration as mechanisms of controlled cell deletion in the epidermis of the toad, *Bufo bufo*

Cell Tissue Res, 256: 475-486

Canman,C.E., Kastan,M.B. (1996)

Signal transduction: Three path to stress relief

Nature, 384: 213-214

Carter,W.G., Wayner,E.A., Bouchard,T.S., Kaur,P. (1990)

The role of integrins alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 in cell-cell and cell-substrat adhesion of human epidermal cells

J. Cell Biol., 110(4): 1387-1404

Carvalho,R.S., Bumann,A., Schwarzer,C., Scott,E., Yen,E.H. (1996)

A molecular mechanism of integrin regulation from bone cells stimulated by orthodontic forces

Eur. J. Orthod., 18(3): 227-235

Carvalho,R.S., Scott,J.E., Yen,E.H.K. (1995)

The effect of mechanical stimulation on the distribution of $\beta 1$ Integrin and expression of $\beta 1$ integrin mRNA in TE-85 human osteosarcoma cells

Archs oral Biol, 40: 257-264

Cavigelli,M., Dolfi,F., Claret,F.X., Karin,M. (1995)

Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation in vivo

Biochem. J., 342: 287-292

Chen,Q., Kinch,M.S., Lin,T.H., Burridge K., Juliano,R.L. (1994)

Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinase

J. Biol. Chem., 269: 26602-26605

Chen,C.S., Alonso,J.L., Ostuni,E., Whitesides,G.M., Ingber,D.E. (2003)

Cell shape provides global control of focal adhesion assambly

Biochem. Biophys. Res. Commun., 307(2): 355-361

- Choquet,D., Felsenfeld,D.P., Sheetz,M.P. (1997)
Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages
Cell, 88(1):39-48
- Cobb,M.H., Goldsmith, E.J. (1995)
How MAP kinases are regulated
J. Biol. Chem., 270: 14843-14846
- Curtis,A.S.G., Seehar,G. M. (/1978)
The control of cell division by tension or diffusion
Nature, 274: 52-53
- Davis,R.J. (1994)
MAPKs: new JNK expands the group
Trends Biochem Sci., 19: 470-473
- Dedhar,S., Hannigan,G.E. (1996)
Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signaling
Curr. Opin. Cell Biol., 8:657-669
- Defilippi,P., Tarone,G., Gismondi,A., Santoni,A. (1997)
Signal transduction by integrins
Springer Verlag, Berlin
- Donaldson,D.J., Mahan,J.T., Yang,H., Yamada,K.M. (1995)
Integrin and phosphorytyrosine expression in normal and migrating newt keratinocytes
Anat. Rec., 241(1) : 49-58
- Danowski,B.A. (1989)
Fibroblast contractility and actin organisation are stimulated by microtubule inhibitors
J.Cell.Sci., 93: 255-266
- Eckes,B., Dogic,D., Colucci-Guyon,E., Wang,N., Maniotis,A., Ingber,D.E., Meckerling,A.,
Aumailley,M., Koteliansky,V., Babinet,C., Krieg,T. (1998)
**Impaired mechanical stability, migration, and contractility capacity in vimentin-
deficient fibroblasts**
J. Cell Sci., 111: 1897-1907
- Fedor-Chaiken,M., Hein,P.W., Stewart,J.C., Brackenbury,R., Kinch,M.S. (2003)
E-Cadherin binding modulates EGF receptor activation
Cell Commun. Adhes., 10(2): 105-118
- Fritsch,P. (1998)
Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas
Springer Verlag, Berlin
- Gille,H., Kortenjann,M., Thomae,O., Moomaw,C., Slaughter,C., Cobb,M.H., Shaw,P.E.
(1995)
**ERK phosphorylation potentiates Elk-1 mediated ternary complex formation and
transduction**
EMBO J., 14: 915-962

- Gille,H., Strahl,T., Shaw,P.E. (1995)
Activation of ternal complex factor Elk-1by stress-activated protein kinase
Curr. Biol., 5: 1191-1200
- Glogauer,M., Arora,P., Chou,D., Janmey,P.A., Downey,G.P., McCulloch,C.A. (1998)
The role of actin-binding protein 280 in integrin-dependent mechanoprotection
J.Biol.Chem., 273(3): 1689-1698
- Görmar,F.E., Bernd,A., Bereiter-Hahn,J., Holzmann,H. (1993)
Mechanical stimulation enhances human keratinocyte differentiation in culture: Induction of cytokeratin 9 synthesis
In: Bernd,A., Bereiter-Hahn,J., Hevert,F., Holzmann,H. (eds.): Cell and Tissue Culture Models in Dermatological Research. Springer Verlag, Berlin
- Görmar,F.E., Bernd,A., Bereiter-Hahn,J., Holzmann,H. (1990)
A new model of epidermal differentiation: Induction by mechanucal stimulation
In: Archives of Dermatological Research. Springer Verlag, Berlin
- Green,H., Sun,T-T. (1976)
Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: Formation of the cornified envelope
Cell, 9: 511-521
- Grose,R., Hutter,C., Bloch,W., Thorey,I., Watt,F.M., Fassler,R., Brakebusch,C., Werner,S. (2002)
A crucial role of beta1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair
Development, 129(9):2303-2315
- Grzesik,W.J., Ivanov,B., Robey,F.A., Southerland,J., Yamauchi,M. (1998)
Synthetic integrin-binding peptides promote adhesion and proliferation of human peridontal ligament cells in vitro
J. Dent. Res., 77(8) : 1606-1612
- Gunst,S.J., Tang,D.D., Opazo Saez,A. (2003)
Cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell: a mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung
Respir. Physiol. Neurobiol. 137(2-3): 151-168
- Haier,J., Nicolson,G.L. (1999)
Role of the cytoskeleton in adhesion stabilization of human colorectal carcinoma cells to extracellular matrix components under dynamic conditions of laminar flow
Clin. Exp. Metastasis, 17(8): 713-721
- Hammerschmid-Gollwitzer,J.
Wörterbuch der medizinischen Fachausdrücke
Goldmann Verlag, München, neueste Ausgabe
- Heidmann,S.R., Buxbaum.R.E. (1990)
Tension as a regulator and integrator of axonal growth
Cell Motil Cytoskeleton. 17: 6-10

Hofmann,M., Zaper,J., Bernd,A., Bereiter-Hahn,J., Kaufmann,R., Kippenberger,S. (2004)
Mechanical pressure-induced phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase in epithelial cells via Src and protein kinase C
Biochemical and Biophysical Research Communications, 316: 673-679

Holmvalk,K., Camper,L., Johansson,S., Kimura,J.H., Lundgren-Akerlund,E. (1995)
Chondrocyte and chondrosarcoma cell integrins with affinity for collagen type 2 and their response to mechanical stress
Exp. Cell Res., 221(2): 496-503

Horwitz,A.F. (1998)
Integrine
Spektrum der Wissenschaften; Januar 1998

Howe,A., Alpin,A.E., Alahari,S.K., Juliano, R.L. (1998)
Integrin signaling and cell growth control
Curr Opin Cell Biol., 10: 220-231

Ingber,D., Jamieson,J.D. (1985)
Cells as tensigrity structures: Architectural regulation of histodifferentiation by physical forces transduced over basement membrane
In: Anderson,L.C., Gahmberg,C.G., Ekblom,P., eds. Gene Expression During Normal and Malignant Differentiation. Orlando, Fla: Academic Press; 13-32.

Ingber,D. (1991)
Integrins as mechanochemical transducer
Current Opinion in Cell Biology. 3: 841-848

Ingber,D.E. (1993)
Cellular tensigrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton
J. Cell Sci., 104: 613-627

Ingber,D.E. (1997)
Tensigrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction
Annu. Rev. Physiol. 59: 575-599

Ingber,D.E. (1998)
The architecture of life
Sci. Am. 278: 48-57

Ingber,D.E. (2002)
Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology
Circ. Res., 91: 877-887

Ishida,T., Peterson,T.E., Kovach,N.L., Berk,B.C. (1996)
MAP kinase activation by flow in endothelial cells. Role of beta 1 integrins and tyrosine kinases
Circ. Res., 79(2): 310-316

- Ivankovic-Dikic,I., Gronroos,E., Blaukat,A., Barth,B.U., Dikic,I. (2000)
Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins
Nat. Cell Biol. 2(9): 574-581
- Iwasaki,H., Eguchi,S., Ueno,H., Marumo,F., Hirata,Y. (2000)
Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor
Am. J. physiol. Heart Circ. Physiol., 278: H521-H529
- Jensen,P.J., Wheelock,M.J. (1995)
Beta1 integrins do not have a major role in keratinocyte intracellular adhesion
Exp. Cell Res., 219(2): 322-331
- Kada,K., Yasui,K., Naruse,K., Kaniya,K., Kodama,I., Toyama,J. (1999)
Orientation change of cardiocytes induced by cyclic stretch stimulation: time dependency and involvement of protein kinase.
J. Mol. Cell Cardiol., 31(1): 147-259.
- Karasek,M.A. (1980)
Effekt of chemical modification of keratinocytes and collagen in keratinocyte-collagen interaction
Curr. Probl. Dermatol., 10: 143-158
- Kadi,A., Pichard,V., Lehmann,M., Briand,C., Braguer,D., Marvaldi.J., Rognoni,J.B., Luis,J. (1998)
Effect of microtubule disruption on cell adhesion and spreading
Biochem. Biophys. Res. Commun., 246(3): 690-695
- Kee,S.-H., Steinert,P.M. (2001)
Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell-adhesion through activation of endogenous E-Cadherin
Mol. Biol. Cell, 12: 1983-1993
- Kee,S.-H., Jang,S.-J., Ahvazi,B., Larsen,M., Yamada,K.M., Steinert,P.M. (2002)
Cell-cell adhesion and RhoA-mediated actin polymerization are independent phenomena in microtubule disrupted keratinocytes
J. Invest. Dermatol., 119: 440-448
- Kippenberger,S., Bernd,A., Loitsch,S.M., Guschel,M., Müller,J., Bereiter-Hahn,J., Kaufmann,R. (2000A)
Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases
J. Invest. Dermatol., 114: 408-412
- Kippenberger,S., Bernd,A., Loitsch,S.M., Müller,J., Guschel,M., Kaufmann,R. (1999)
Cyclic stretch up-regulates proliferation and heat shock protein 90 expression in human keratinocytes
Pigment Cell Res., 12: 246-251

Kippenberger,S., Loitsch,S.M., Müller,J., Guschel,M., Ramirez-Bosca,A., Kaufmann,R., Bernd,A. (2000B)

Melanocytes respond to mechanical stretch by activation of mitogen-activated protein kinases (MAPK)

Pigment Cell Res., 13: 278-280

Kippenberger,S., Loitsch,S., Müller,J., Guschel,M., Kaufmann,R., Bernd,A. (2004)

Ligation of the $\beta 4$ Integrin Triggers Adhesion Behavior of Human Keratinocytes by an „Inside-Out“ Mechanism

J. Invest. Dermatol., 123: 444-451

Klein,C.E., Dressel,D., Steinmeyer,T., Mauch,C., Eckes,B., Krieg,T., Bankert,R.B., Weber,L. (1991)

Integrin $\alpha 2\beta 1$ is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen 1 fibrills

J. Cell Biol., 115: 1427-1436

Koivisto,L., Larjava,K., Häkkinen,L., Uitto,V-J., Heino,J., Larjava,H. (1999)

Different Integrins mediate cell spreading, haptotaxis and lateral migration of HaCaT Keratinocytes on fibronectin

Cell adhesion and Communication, 7(3):245-257

Kolodney,M.S., Wysolmerski,R.B. (1992)

Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study

J. Cell Biol., 117: 73-82

Kolodney,M.S., Elson,E.L. (1995)

Contraction due to microtubule disruption is associated with increasing phosphorylation of myosin light chain

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 10252-10256

Krauss,G., (2001)

Biochemistry of Signal Transduction and Regulation (Second edition)

VCH-Verlag, Weinheim

Kusumi,A., Suzuki,K., Koyasako,K. (1999)

Motility and cytoskeletal interactions of cell adhesion receptors

Curr. Opin. Cell Biol., 11: 582-590

Larjava,H., Peltonen,J., Akiyama,S.K., Yamada,S.S., Gralnick,H.R., Uitto,J., Yamada,K.M. (1990)

Novel Function for $\beta 1$ Integrins in Keratinocyte Cell-Cell-Interaction

J. Cell Biol., 110: 803-815

Li,J., Lin,M.L., Wiepzig,G.J., Guadrarrama,A.G., Bertics,P.J. (1999)

Integrin-mediated migration of murine B82L fibroblasts is dependent on the expression of an intact epidermal growth factor receptor

J. Biol. Chem., 274(16): 11209-11219

- Lichtner,R.B., Schirmacher,V. (1990)
Cellular distribution and biological activity of epidermal growth factor receptor in A431 cells are influenced by cell-cell contact
J. Cell Physiol., 144(2): 303-321
- Lindl,T. (2002)
Zell- und Gewebekultur (5.Auflage)
 Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Lottspeich.F., Zorbas,H. (1998)
Bioanalytik
 Hrsg.: Spektrum, Akademischer verlag, Heidelberg
- Malek,A.M., Izumo,S. (1996)
Mechanism of endothelial cell shape change and cytoskeletal remodeling in response to fluid shear stress
J. Cell Sci., 109 (Pt 4): 713-726
- Mathur,A.B., Chan,B.P., Truskey,G.A., Reichert,W.M. (2003)
High-affinity augmentation of endothelial cell attachment: Long-term effect on focal contact and actin filament formation
J.Biomed Mater Res., 66A(4): 729-737
- Maniotis,A.J., Chen,C.S., Ingber,D.E. (1997)
Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure
Proc.Natl. Acad. Sci. USA, 94(3): 849-54
- Marcoux,N., Vuori,K. (2003)
EGF receptor mediates adhesion-dependent activation of the Rac GTPase: a role for phosphatidylinositol 3-kinase and Vav2
Oncogene 22(38): 6100-6106
- May,A.L., Wood,F.M., Stoner,M.L. (2001)
Assessment of adhesion assays for use with keratinocytes
Exp. Dermatol., 10(1): 62-69
- Miyamoto,S., Teramoto,O.A.C., Gutkind,J.S., Burbelo,P.D., Akiyama,S.K., Yamada,K.M. (1995)
Integrin Function: Molecular Hierarchies of Cytoskeletal and Signaling Molecules
J. Cell Biol., 131 (3): 791-805
- Miyamoto,S., Teramoto,H., Gutkind,J.S.,Yamada,K.M. (1996)
Integrins can collaborate with growth factor for phosphorylation of receptor tyrosin kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors
J. Cell Biol., 135: 1633-1642
- Molina,T., Kabsch,K., Alonso,A., Kohl,A., Komposch,G., Tomakidi,P. (2001)
Topographic changes of focal adhesion components and modulation of p125FAK activation in stretched human periodontal ligament fibroblasts
J.Dent.Res., 80(11) : 1984-1989

- Mould, A.P., (1996)
Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes
J. Cell Sci., 109: 2613-2618
- Morigi, M., Zoja, C., Figliuzzi, M., Foppolo, M., Micheletti, G., Bontempelli, M., Saonni, M., Remuzzi, G., Remuzzi, A. (1995)
Fluid shear stress modulates surface expression of adhesion molecules by endothelial cells
Blood, 85(7): 1696-1703
- Morino, N., Mimura, T., Hamasaki, K., Tobe, K., Ueki, K., Kikuchi, K., Takehara, K., Kadowaki, T., Yazaki, Y., Nojima, Y. (1995)
Matrix/integrin interaction activates the mitogen-activated protein kinase, p44^{erk-1} and p42^{erk-2}
J. Biol. Chem., 270: 269-273
- Moro, L., Venturino, M., Bozzo, C., Silengo, L., Altruda, F., Beguinot, L., Tarone, G., Defilippi, P. (1998)
Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival
EMBO J., 17: 6622-6632
- Naruse, K., Yamada, T., Sai, X.R., Hamaguchi, M., Sokabe, M. (1998)
pp125^{FAK} is required for stretch dependent morphological response of endothelial cells
Oncogene, 17: 455-463
- Noria, S., Cowan, D.B., Gotlieb, A.J., Langille, B.L. (1999)
Transient and steady-state effect of shear stress on endothelial cell adhesion junctions
Circ.Res., 85(6): 504-514
- Ochiai, A. (1999)
Dysfunction of cadherin cell adhesion system in cancer invasion and metastasis
Gan To Kagaku Ryoho., 26(4): 565-571
- O'Keefe, E.J., Payne, Jr, R.E., Russell, N., Woodley, D.T. (1985)
Spreading and enhanced motility of human keratinocytes on fibronectin
J. Invest. Dermatol., 85: 125-130
- Olivieri, M.P., Tweden, K.S. (1999)
Human serum albumin and fibrinogen interactions with an adsorbed RGD-containing peptide
J. Biomed. Mater Res., 46(3): 355-359
- Pawson, T., Scott, J.D. (1997)
Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins
Science, 278: 2075-208
- Pinkus, H. (1952)
Examination of the epidermis by the strip method. II. Biometric data on regeneration of the human epidermis
J. Invest. Dermatol., 19: 431-447

- Polte,T.R., Eichler,G.S., Wang,N., Ingber,D.E. (2004)
Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress
Am. J. Physiol. Cell Physiol., 286(3): C518-C528
- Potard,U.S., Butler,J.P., Wang. (1997)
Cytoskeletal mechanics in confluent epithelial cells probed through integrins and E-Cadherins
Am. J. Physiol., 272(5Pt1): C1654-C1663
- Porter,J.C., Hogg,N. (1998)
Integrins take partners: cross-talk between integrins and other membrane receptors
Trends in Cell Biology, 8: 390-396
- Prenzel,N., Zwick,E., Leserer,M., Ullrich,A. (2000)
Tyrosine kinase signalling in breast cancer Epidermal growth factor receptor: convergence point for signal integration and diversification
Breast Cancer Res, 2: 184-190
- Quarana,V., Jones,J.C. (1991)
The internal affairs of an integrin
Trends Cell Biol., 1(1): 2-4
- Raingeaud,J., Gupta,S., Rogers,J.S., Dickens,M., Han,J., Ulevitch,R.J., Davis,R.J. (1995)
Proinflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activity by dual phosphorylation on tyrosin and threonine
J. Biol. Chem., 270: 7420-7426
- Raingeaud,J., Whitmarsh,A.J., Barrett,B., Derijard,B., Davis,R.J. (1996)
MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway
Mol. Cell Biol., 16: 1247-1255
- Rassner,G. (2000)
Dermatologie, Lehrbuch und Atlas (6.Auflage)
Urban & Fischer Verlag, München
- Robeneck,H. (1995)
Mikroskopie in Forschung und Technik
GIT-Verlag, Darmstadt
- Ruoslahti,E. (1997)
Stretching is good for a Cell
Science, 276: 1345-1346
- Rychly,J., Pommerenke,H., Durr,F., Schreiber,E., Nebe,B. (1998)
Analysis of spatial distribution of cellular molecules during mechanical stressing of cell surface receptors using confocal microscopy
Cell Biol. Int., 22(1): 7-12
- Sadoshima,J., Izumo,S. (1997)
The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress
Annu. Rev. Physiol., 59: 551-571

- Saffell,J.L., Williams,E.J., Mason,I.L., Walsh,F.S., Doherty,P. (1997)
Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs
Neuron, 18: 231-242
- Salter,D.M., Wallace,W.H., Robb,J.E., Caldwell,H., Wright,M.O. (2000)
Human bone cell hyperpolarization response to cyclical mechanical strain is mediated by an interleukin-1beta autocrine/paracrine loop
J. Bone Miner. Res., 15(9): 1746-1755
- Schaefer,H.J., Weber,M.J. (1999)
Mitogen-activated protein kinase: specific messages from ubiquitous messengers
Mol. Cell Biol., 19: 2435-2444
- Schlaepfer,D.D., Hunter,T. (1997)
Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src
J. Biol. Chem., 272: 13189-13195
- Sethi,K.K., Mudera,V., Sutterlin,R., Baschong,W., Brown,R.A. (2002)
Contraction-mediated pinocytosis of RGD-peptide by dermal fibroblasts: inhibition of matrix attachment blocks contraction and disrupts microfilament organisation
Cell Motil Cytoskeleton, 52(4): 231-241
- Sharp, W.W., Simpson,D.G., Borg, T.K., Samarel,A.M., Terracio, L. (1997)
Mechanical forces regulate focal adhesion and costamere assembly in cardiac myocytes
Am J. Physiol., 273(2Pt 2): H546-556
- Shay-Salit,A., Shushy,M., Wolfovitz,E., Yakav,H., Breviario,F., Dejana,E., Resnick,N. (2002)
VEGF receptor 2 and the adherens function as a mechanical transducer in vascular endothelial cells
Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 99(14): 9462-9467
- Shizaki,H., Kadowaki,T., Doki,Y., Inoue,M., Tamura,S., Oka,H., Iwazawa,T., Matsui,S., Shimaya,K., Takeichi,M, et al. (1995)
Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line
Br.J. Cancer, 71(2): 250-258
- Sundberg,C., Rubin,K. (1996)
Stimulation of $\beta 1$ integrins on fibroblasts induces PDGF independent tyrosin phosphorylation of PDGF β receptors
J. Cell Biol., 132: 741-75
- Shyy,J.Y., Chien,S. (1997)
Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion
Curr. Opin. Cell Biol., 9(5): 707-713

- Suzuki,K., Takahashi,K. (2003)
Reduced cell adhesion during mitosis by threonine phosphorylation of beta1 integrin
J. Cell Physiol., 197(2): 297-305
- Tinoise,E., Faure,M., Chatelain,P., Vallier,P., Schmitt,D. (1987)
Growth and differentiation of human keratinocytes on extracellular matrix
Arch. Dermatol Res., 279: 241-246
- Toral,C., Solano-Agama,M.C., Luna,J., Romano,M.C., Mendoza-Garrido,M.E. (2003)
Epidermal growth factor induces an increase in cell adhesion and an arrangement of actin skeleton in stress fibres in pituitary cultured cells from infantile rats but not adult rats
J. Cell Physiol., 195(1): 80-91
- Urbich,C., Walter,D.H., Zeither,A.M., Dimmeler,S. (2000)
Laminar shear stress upregulates integrin expression - role in endothelial cell adhesion and apoptosis
Circ Res., 683-689
- Vandenburgh, H.A. (1988)
Computerized mechanical cell stimulator for tissue culture: Effects on skeletal muscle organogenesis
In Vitro Cell Develop Biol., 24: 609-619
- Van Kooyk,Y., Figdor,C.G. (2000)
Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion
Curr. Opin. Cell Biol., 12(5): 542-547
- Wang,N., Butler,J.P., Ingber,D.E. (1993)
Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton
Science, 260: 1124-1127
- Wang,N., Ingber,D.E. (1994)
Control of cytoskeletal mechanics by extracellular matrix, cell shape, and mechanical tension
J. Biophys., 66: 2181-2189
- Wang,N., Stamenovic,D. (2000)
Contribution of intermediate filament to cell stiffness, stiffening, and growth
Am J. Physiol Cell Physiol. 279: C188-C194
- Wang,N., Naruse,K., Sannenic,D., Fredberg,J., Mijailovic,S.M., Maksym.G., Polte,T., Ingber,D.E. (2001)
Complex mechanical behavior in living cells
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:7765-7770
- Ward,M.D., Dembo,M., Hammer,D.A. (1994)
Kinetics of cell detachment: peeling of discrete receptor cluster
Biophys J., 67(6): 2522-2534

- Wary,K.K., Mainiero,F., Isakoff,S.J., Marcantonio,E.E., Giancotti,F.G. (1996)
The adapter protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression
Cell, 87: 733-743
- Watt,F.M., Jones,P.H. (1993)
Separation of epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression
Cell, 73: 713-724
- Whitmarsh,A.J., Shore,P., Sharrocks,A.D., Davis,R.J. (1995)
Integration of MAP kinase signal transduction pathway at the serum response element
Science, 269: 403-407
- Wiegant,F.A., Blok,F.J., Defize,L.H., Linnemans,W.A., Verkley,A.J., Boonstra,J. (1986)
Epidermal growth factor receptor associated to cytoskeletal elements of epidermal carcinoma (A431) cells
J. Cell Biol., 103(1): 87-94
- Wilso,E., Sudhir,K., Ives,H.E. (1995)
Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular Matrix/Integrin interactions
J. Clin. Invest., 96: 2364-2372
- Yamada,K.M., Miyamoto,S. (1995)
Integrin transmembran signaling and cytoskeletal control
Current Opinon in Cell Biology, 7: 681-689
- Yano,S., Komine,M., Fujimoto,M., Okochi,H., Tamaki,K. (2004)
Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes
J. Invest Dermatol., 122(3): 783-790
- Yu,X., Miyamoto,S., Mekada,E. (2000)
Integrin alpha 2 beta 1-dependent EGFreceptor activation at cell-cell contact sites
J.Cell Sci., 113(pt 12): 2139-2147
- Xia,Z., Dickens,M., Raingeaud,J., Davis,R.J., Grennberg,M.E. (1995)
Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis
Science, 270: 1326-1331
- Zhu,X., Assoian,R.K. (1995)
Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation
Mol. Biol. Cell, 6: 273-282
- Zhuang,J., Yamada,K.A., Saffitz,J.E., Kleber,A.G. (2000)
Pulsatile stretch remodels cell-to-cell communication in cultured myocytes
Circ. Res., 87(4): 272-274

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Yvonne Karina Knies
Geburtsdatum und Geburtsort 31. Juli 1971, Langen; Kreis Offenbach
Eltern Rainer Knies und Karin Knies-Elzenbeck (geb. Elzenbeck)
Familienstand Ledig

Schulbildung

1978-1982 Wingertschule Dreieich-Offental
1982-1988 Weibelfeldschule in Dreieich-Sprendlingen
(Förderstufe und Gymnasialer Zweig)
1988-1991 Ricarda Huch Gymnasium, Dreieich-Sprendlingen
Juni 1991 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

Oktober 1991 Beginn des Studiums der Biologie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Oktober 1993 Vordiplom in Biologie mit dem Gesamturteil „sehr gut“
Juli 1997 Erhalt des Diploms mit dem Gesamturteil „sehr gut“

Promotion

September 1997 Die Ausarbeitung des Promotionsthemas erfolgte sowohl in der Arbeitsgruppe „Kinematische Zellforschung“ von Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn am Biozentrum als auch im Labor für Dermatologische und Klinische Biochemie (B-Labor) unter der Leitung von PD. Dr. A. Bernd an der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Lehrtätigkeit

Promotionsbegleitend Betreuung verschiedener biologischer Praktika an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Stipendien

November 1998-Oktober 1999 Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses von Dreieich
November 1999-März 2001 Graduiertenförderung der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Posterbeiträge:

S. Kippenberger, Y. Knies, M. Guschel, J. Müller, R. Kaufmann, A. Bernd (2000)

β -1 integrins mediate stretch-induced activation of MAP kinase ERK 1/2

Journal of Investigative Dermatology, 114, p829

(61st Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Chicago)

Y Knies, S Kippenberger, J Bereiter-Hahn, R Kaufmann and A Bernd (2001)

Co-localization of β 1-Integrins and EGF-Receptors in Stretch Induced Integrin Clusters of Human Keratinocytes

Journal of Investigative Dermatology, 117, p396

(62rd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Washington)

Y Knies, S Kippenberger, J Bereiter-Hahn, R Kaufmann and A Bernd (2003)

Stretching of Human Keratinocytes Results in Co-Localisation of β 1-Integrins and EGF-Receptors

Archives of Dermatological Research 294, p514

(Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Frankfurt/M).

S. Kippenberger, Y. Knies, S. Simon, R. Kaufmann, A. Bernd (2003)

Adhesion and signal transduction of human keratinocytes growing on flexible membranes

Abstract-book S. 44

(1st International Symposium on Complex Materials, Bremen)

Knies Y, Kippenberger S, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Bernd A (2004)

Stretch induced transactivation of EGF-receptors by integrins

Journal for Investigative Dermatology 122, p32

(65th Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, Providence, USA).

Publikationen:

Knies Y, Bernd A, Kaufmann R, Bereiter-Hahn J, Kippenberger S. (2006)

Mechanical stretch induces clustering of β 1-integrins and facilitates adhesion

Journal of Experimental Dermatology, 15: p347-355.