

# Das Formin INF2 reguliert die Größe und die Dynamiken von Podosomen in primären humanen Makrophagen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,  
Fachbereich Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
Leona Trübe  
aus Rostock

Hamburg, 2015

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2010 bis August 2015 unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Linder am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf angefertigt.

Tag der Disputation: 04.12.2015

Gutachter: Prof. Dr. Stefan Linder

PD Dr. Andreas Pommerening-Röser

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XI
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Makrophagen.....	1
1.2 Podosomen.....	3
1.2.1 Funktion von Podosomen .....	5
1.2.2 Struktur von Podosomen .....	7
1.2.3 Dynamiken und Regulation von Podosomen .....	9
1.3 Mechanismen der Aktin-Nukleation und Regulation von Aktin durch Formine.....	11
1.4 INF2.....	14
1.4.1 Biochemische Eigenschaften von INF2 .....	14
1.4.2 Zelluläre Funktionen von INF2.....	17
1.5 Zielsetzung .....	18
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte .....	20
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3 Kits .....	22
2.1.4 Bakterienstämme und eukaryotische Zellen .....	22
2.1.5 Medien, Medienzusätze und Antibiotika.....	22
2.1.6 Chemikalien und Puffer .....	23
2.1.7 Protein-Größenstandards .....	25
2.1.8 Plasmide .....	25
2.1.9 siRNA.....	25
2.1.10 Antikörper.....	26
2.1.10.1 Primäre Antikörper.....	26
2.1.10.2 Sekundäre Antikörper .....	26
2.1.11 Programme ( <i>software</i> ).....	26
2.2 Methoden.....	27

---

2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	27
2.2.1.1	Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	27
2.2.1.2	Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> .....	27
2.2.1.3	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> .....	27
2.2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA (Maxi-Prep, endofree).....	28
2.2.2	Zellbiologische Methoden .....	28
2.2.2.1	Isolierung und Kultivierung von primären humanen Makrophagen .....	28
2.2.2.2	Ablösen von adhärenenten Makrophagen .....	29
2.2.2.3	Transfektion von Makrophagen .....	29
2.2.2.4	Fixierung von Makrophagen .....	30
2.2.2.5	Herstellung von Zelllysaten.....	30
2.2.3	Biochemische Methoden .....	31
2.2.3.1	SDS-PAGE.....	31
2.2.3.2	Western Blot.....	31
2.2.4	Mikroskopie und Analyse fixierter Proben.....	32
2.2.4.1	Immunfluoreszenzfärbung .....	32
2.2.4.2	Immunfluoreszenzfärbung für SIM.....	33
2.2.4.3	Anzahl von Podosomen.....	34
2.2.4.4	Durchmesser von Podosomen.....	35
2.2.4.5	Höhe von Podosomen .....	35
2.2.4.6	Matrixabbau.....	36
2.2.4.7	Podosomen-Neubildungs-Assay.....	37
2.2.4.8	Podosomendichte während der Neubildung .....	37
2.2.5	Mikroskopie und Analyse von lebenden Proben .....	38
2.2.5.1	Lebensdauer von Podosomen .....	38
2.2.5.2	Podosomenoszillation.....	39
2.2.5.3	FRAP ( <i>Fluorescence Recovery after Photobleaching</i> ).....	39
2.2.5.4	Podosomen-Neubildungs-Assay.....	40
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>
3.1	INF2-nonCAAX wird in humanen Makrophagen exprimiert und lokalisiert in der Podosomenkappe .....	41
3.2	Knockdown von INF2.....	44
3.3	INF2 hat geringen Einfluss auf die Podosomenanzahl.....	44
3.4	INF2 reguliert die Größe von Podosomen.....	46
3.5	INF2 beeinflusst die Lebensdauer von Podosomen .....	48

---

3.6	INF2 reguliert die Oszillation von Podosomen.....	49
3.7	Der Austausch von Aktin im Podosomenkern ist nicht von INF2 beeinflusst.....	51
3.8	INF2 beeinflusst die Neubildung von Podosomen.....	53
3.9	INF2 ist an der <i>de novo</i> Bildung von Podosomen beteiligt .....	57
3.10	SIM zeigt den Einfluss von INF2 auf das Erscheinungsbild von Kabeln und Podosomen.....	60
3.11	INF2 beeinflusst den Abbau von extrazellulärer Matrix .....	61
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>
4.1	Podosomale Subpopulationen von Aktin.....	63
4.2	INF2 lokalisiert in der Podosomenkappe.....	64
4.3	Untersuchung von verschiedenen Podosomen-assoziierten Parametern.....	65
4.4	INF2 reguliert die Größe von Podosomen.....	66
4.5	INF2 beeinflusst die Lebensdauer der Podosomen.....	70
4.6	INF2 spielt eine Rolle beim <i>mechanosensing</i> .....	70
4.7	INF2 beeinflusst die <i>de novo</i> -Bildung von Podosomen .....	72
4.8	Einfluss von INF2 auf Podosomen-verbindende Aktin-Kabel .....	74
4.9	INF2 reguliert den Abbau extrazellulärer Matrix .....	75
4.10	Hinweise auf die Funktion der Podosomenkappe.....	77
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>93</b>
7.1	Publikationen und Posterpräsentationen.....	93
7.2	Verwendete Macros für ImageJ .....	94
7.3	Inhalt der Video-CD .....	96
	Danksagung .....	98
	Eidesstattliche Versicherung .....	99

## Abkürzungsverzeichnis

#	Nummer
%	Prozent
°C	Grad Celsius
<	kleiner als
>	größer als
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
A	Alanin/ Österreich
Abb.	Abbildung
ABPs	Aktin-bindende Proteine
ADP	Adenosindiphosphat
AOBS	Akusto-optischer Strahler
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	<i>actin-related protein</i>
ArpC	<i>actin-related protein complex</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Carboxy
CA	Kalifornien
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CB	Cytoskelettpuffer
Cdc42	<i>Cell division cycle 42 GTP binding protein</i>
CH	Schweiz
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSF	<i>colony stimulation factor</i> , koloniestimulierender Faktor
D	Asparaginsäure/ Deutschland
d	Tag
DAD	<i>Diaphanous autoregulatory domain</i> , Diaphanous-Autoregulations-Domäne
DD	Dimerisierungsdomäne
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DID	<i>Diaphanous inhibitory domain</i> , Diaphanous-Inhibitions-Domäne

---

<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
<b>DPBS</b>	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
<b>DRFs</b>	<i>Diaphanous-related formins</i> , Diaphanous-ähnliche Formine
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EGFP</b>	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
<b>EGTA</b>	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<b><i>et al.</i></b>	<i>et alii</i> (und andere)
<b>EZM</b>	extrazelluläre Matrix
<b>F</b>	<i>filamentous</i>
<b>FH</b>	Formin-Homologie
<b>FHOD1</b>	<i>FH1/FH2 domain-containing protein 1</i>
<b>FMNL1</b>	<i>Formin-like protein 1</i>
<b>FMNL3</b>	<i>Formin-like protein 3</i>
<b>FRAP</b>	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
<b>FSGS</b>	fokal segmentale Glomerulosklerose
<b>g</b>	Gramm/ Erdbeschleunigung
<b>G</b>	globulär
<b>GB</b>	Großbritannien
<b>GFP</b>	<i>green fluorescent protein</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>granulocyte macrophage-colony stimulation factor</i>
<b>h</b>	Stunde
<b>HCl</b>	Salzsäure
<b>HRP</b>	<i>Horseradish peroxidase</i>
<b>HyD</b>	<i>hybrid detector</i>
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>INF2</b>	<i>Inverted formin-2</i> , INF2-nonCAAX
<b>INF2-A149D</b>	INF2-nonCAAX-A149D
<b>INF2-FFC</b>	FH1+FH2+C-Terminus von INF2
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumdihydrogenphosphat
<b>L</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>M</b>	Molar

---

<b>M-CSF</b>	<i>macrophage-colony stimulation factor</i>
<b>MA</b>	Massachusetts
<b>MCS</b>	<i>Multiple Cloning Site</i>
<b>mDia</b>	Diapanous
<b>MES</b>	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MgCl</b>	Magnesiumchlorid
<b>min</b>	Minute
<b>mL</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloprotease
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	Mangan(II)-chlorid
<b>MOPS</b>	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
<b>MPS</b>	mononukleäres Phagozytensystem
<b>ms</b>	Millisekunde
<b>MT1</b>	<i>membrane-type-1</i>
<b>N</b>	Amino
<b>N-WASp</b>	<i>Neuronal Wiskott-Aldrich-Syndrome protein</i>
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Dinatriumhydrogenphosphat
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>NGS</b>	<i>normal goat serum</i> , normales Ziegenserum
<b>NHS</b>	<i>normal human serum</i> , normales Humanserum
<b>NL</b>	Niederlande
<b>nm</b>	Nanometer
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NPFs</b>	<i>nucleation-promoting factors</i> , Nukleations-fördernde Faktoren
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAGE</b>	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>Pi</b>	Phosphat
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PM</b>	Plasmamembran
<b>PMT</b>	<i>photon multiplier tubes</i>
<b>PtdIns(3,4)P<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat
<b>RbCl</b>	Rubidiumchlorid

---

<b>Rho(A)</b>	Ras homolog gene family (, member A)
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>ROI</b>	<i>region of interest</i>
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
<b>s</b>	Sekunde
<b>SDS</b>	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
<b>SEM</b>	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
<b>SH3</b>	Src-homology 3
<b>SIM</b>	<i>structured illumination microscopy</i>
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>T</b>	Tween
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>THP1</b>	humane Monozyten-Zelllinie
<b>TKS5</b>	<i>tyrosin kinase substrate</i> mit 5 SH3-Domänen
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>U2O2</b>	humane Osteosarkom-Zelllinie
<b>UKE</b>	Universitätsklinikum Eppendorf
<b>USA</b>	Vereinigte Staaten von Amerika
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
<b>WA</b>	Washington
<b>WASp</b>	<i>Wiskott-Aldrich-Syndrome protein</i>
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WH2</b>	WASp-Homologie 2
<b>w/v</b>	<i>weight per volume</i> , Gewicht pro Volumen
<b>z.B.</b>	zum Beispiel
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µL</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>µM</b>	Mikromolar

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.1:</b>	Migration von Makrophagen in 2D und 3D.....	2
<b>Abbildung 1.2:</b>	Podosomen in Zellen monozytischer Abstammung .....	4
<b>Abbildung 1.3:</b>	Funktion von Podosomen .....	6
<b>Abbildung 1.4:</b>	Detailliertes Modell des Podosomen-Aufbaus.....	8
<b>Abbildung 1.5:</b>	Schrittweise Assoziation und Dissoziation typischer Podosomen-Komponenten in Bezug auf den F-Aktin-Kern.....	10
<b>Abbildung 1.6:</b>	Vergleich der Mechanismen der Aktin-Nukleation .....	13
<b>Abbildung 1.7:</b>	Modelle vom Aktin-turnover im stationären Zustand .....	16
<b>Abbildung 1.8:</b>	INF2 lokalisiert an dorsalen Stressfasern und an fokalen Adhäsionen .....	17
<b>Abbildung 3.1:</b>	Expression und Lokalisation von INF2.....	42
<b>Abbildung 3.2:</b>	Lokalisation von endogenem INF2 und INF2-nonCAAX-A149D.....	43
<b>Abbildung 3.3:</b>	Knockdown von INF2 .....	44
<b>Abbildung 3.4:</b>	Einfluss von INF2 auf die Podosomenanzahl in humanen Makrophagen.....	45
<b>Abbildung 3.5:</b>	Einfluss von INF2 auf die Größe von Podosomen .....	47
<b>Abbildung 3.6:</b>	Einfluss von INF2 auf die Lebensdauer .....	49
<b>Abbildung 3.7:</b>	INF2 reguliert die Oszillation von Podosomenkernen (Teil 1) .....	50
<b>Abbildung 3.8:</b>	INF2 reguliert die Oszillation von Podosomenkernen (Teil 2) .....	51
<b>Abbildung 3.9:</b>	INF2 hat keinen Einfluss auf den internen Austausch von Aktin .....	52
<b>Abbildung 3.10:</b>	Einfluss von INF2 auf die Podosomen-Neubildung .....	54
<b>Abbildung 3.11:</b>	INF2-Knockdown beeinträchtigt nicht die Ausbildung einer Kappenstruktur.....	56
<b>Abbildung 3.12:</b>	Dynamiken von Podosomen.....	57
<b>Abbildung 3.13:</b>	Einfluss von INF2 auf die Neubildung von Podosomen in der Lebendzellmikroskopie .....	59
<b>Abbildung 3.14:</b>	Einfluss von INF2 auf das Erscheinungsbild von Kabeln und Podosomen .....	61
<b>Abbildung 3.14:</b>	Einfluss von INF2 auf den Matrixabbau .....	62
<b>Abbildung 4.1:</b>	Mögliche Regulationsmechanismen der Größe von Podosomen durch INF2 .....	68
<b>Abbildung 4.2:</b>	Modulation der lateralen Aktin-Filamente durch INF2 beim <i>mechanosensing</i> .....	71

<b>Abbildung 4.3:</b>	INF2 hat Einfluss auf die <i>de novo</i> Bildung von Podosomen.....	73
<b>Abbildung 4.4:</b>	Funktionen von INF2 in primären humanen Makrophagen .....	78

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b>	Verwendete Geräte .....	20
<b>Tabelle 2.2:</b>	Verwendete Materialien.....	21
<b>Tabelle 2.3:</b>	Verwendete Kits .....	22
<b>Tabelle 2.4:</b>	Verwendete Bakterienstämme.....	22
<b>Tabelle 2.5:</b>	Verwendete eukaryotische Zellen.....	22
<b>Tabelle 2.6:</b>	Verwendete Medien.....	22
<b>Tabelle 2.7:</b>	Verwendete Antibiotika und Medienzusätze .....	23
<b>Tabelle 2.8:</b>	Häufig verwendete Puffer .....	23
<b>Tabelle 2.9:</b>	Verwendete Protein-Größenstandards .....	25
<b>Tabelle 2.10:</b>	Verwendete Plasmide.....	25
<b>Tabelle 2.11:</b>	siRNA-Sequenzen .....	25
<b>Tabelle 2.12:</b>	Verwendete primäre Antikörper .....	26
<b>Tabelle 2.13:</b>	Verwendete sekundäre Antikörper.....	26
<b>Tabelle 2.14:</b>	Verwendete Programme.....	26
<b>Tabelle 2.15:</b>	Gelzusammensetzung (SDS-PAGE) .....	31

# 1 Einleitung

## 1.1 Makrophagen

Makrophagen gehören zusammen mit Monozyten und dendritischen Zellen zum mononukleären Phagozytensystem (MPS) (van Furth *et al.*, 1972; van Furth, 1982). Die Zellen des MPS stammen von den im Knochenmark gebildeten myeloiden Vorläuferzellen ab. Gelenkt von koloniestimulierenden Faktoren (*colony stimulation factors*, CSF), wie dem *granulocyte macrophage* (GM)-CSF und dem *macrophage* (M)-CSF, entwickeln sich die Vorläuferzellen zu im Blut zirkulierenden Monozyten (Gordon und Taylor, 2005). Durch den Einfluss verschiedener Signale wandern sie aus dem Blutkreislauf in das periphere Gewebe ein und differenzieren zu Makrophagen (van Furth *et al.*, 1972).

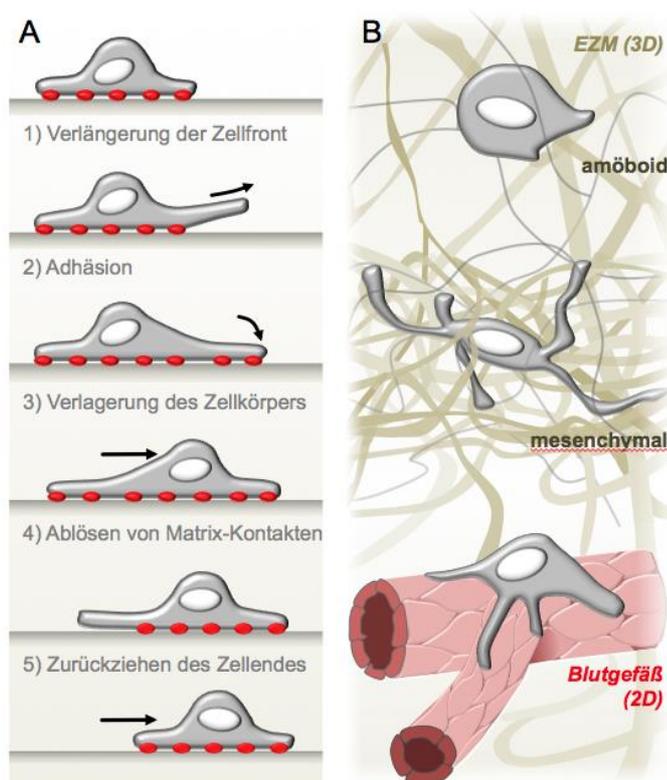
Makrophagen sind über den gesamten Körper verteilt. Je nach Gewebespezifität werden sie z.B. Mikroglia-Zelle im Gehirn, Langerhans-Zelle in der Epidermis, Kupffer'sche Zelle in der Leber oder Alveolar-Makrophage in der Lunge genannt (Pollard, 2009; Murray und Wynn, 2011).

Gewebespezifische Makrophagen spielen eine Rolle beim Erhalt des Gewebes, indem sie apoptotische Zellen und toxisches Material entfernen. Zusätzlich überprüfen sie ihre unmittelbare Umgebung und rekrutieren als Antwort auf eindringende Organismen oder Gewebebeschädigungen weitere Makrophagen. Die nachträglich rekrutierten Makrophagen werden nach ihrem Phänotyp und ihrer Funktion in verschiedene Untergruppen geteilt. Es sind unter anderem klassisch aktivierte Makrophagen (M1-Makrophagen), die entzündungsfördernd sind und als professionelle Phagozyten Mechanismen gegen eine Vielzahl von Bakterien, Protozoen und Viren vermitteln. Alternativ aktivierte Makrophagen (M2-Makrophagen) sind hingegen entzündungshemmend und regulieren die Wundheilung. Zudem entfernen sie apoptotische Zellen, Zelltrümmer und Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) (Murray und Wynn, 2011).

Makrophagen sind somit wichtige Koordinatoren und Effektoren der homöostatischen Aufrechterhaltung des gesunden Organismus sowie von Entzündungen im peripheren Gewebe (Haniffa *et al.*, 2015; Varol *et al.*, 2015).

Die Fähigkeit zur Migration durch die verschiedenen Gewebearten im Körper ist eine

wichtige Voraussetzung für Makrophagen, damit sie ihre Funktionen als Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort erfüllen können. Dabei begegnen sie *in vivo* zweidimensionalen Oberflächen, wie z.B. dem Endothelium der Blutgefäße, Barrieren in der EZM und Basalmembranen, sowie dreidimensionalen Bereichen mit unterschiedlichen mechanischen und biochemischen Zusammensetzungen (Abbildung 1.1; Wiesner *et al.*, 2014).



**Abb. 1.1: Migration von Makrophagen in 2D und 3D.** (A) auf 2D-Oberflächen *in vitro* nehmen Makrophagen eine runde, flache Zellform an und folgen einem klassischen, fünfstufigen Modell der Zellmigration. Adhäsion ist durch rote Punkte markiert. (B) *In vivo* begegnen Makrophagen 2D (B, unten) und 3D (B, oben und Mitte) Oberflächen. Abhängig von der Dichte der extrazellulären Matrix, migrieren Makrophagen amöboid und nicht-lytisch durch interfibrilläre Zwischenräume (B, oben) oder adaptieren eine mesenchymale, proteolyseabhängige Migration (B, Mitte). (modifiziert nach Wiesner *et al.*, 2014)

Auf zweidimensionalen Oberflächen *in vitro* nehmen humane Makrophagen eine runde, flache Zellform an und folgen einem klassischen fünfstufigen Migrations-Zyklus (Abbildung 1.1 A). Dieser beinhaltet (1) die Verlängerung der Zellfront, (2) die Adhäsion an Matrix-Kontakte, (3) die Kontraktion des Zytoplasmas und Verlagerung des Zellkörpers, (4) das Ablösen von Kontaktflächen und (5) das Recycling von Membranrezeptoren von der hinteren zur vorderen Seite der Zelle sowie das Zurückziehen des Zellendes (Wiesner *et al.*, 2014; Sheetz *et al.*, 1999).

In dreidimensionalen Umgebungen migrieren Makrophagen durch mindestens zwei

verschiedene Migrationsmodi, amöboide oder mesenchymale Migration (Wiesner *et al.*, 2014; Van Goethem *et al.*, 2010; Friedl und Wolf, 2010). Die amöboide Migration ist durch eine sphärische Zellform mit einer geringen Anzahl an Protrusionen (Abbildung 1.1 B, oben) und einer relativ hohen Migrationsgeschwindigkeit (ca. 0,7  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) gekennzeichnet. Diese Zellen zeigen keine reifen fokalen Adhäsionen bzw. Stressfasern und bewegen sich ohne proteolytische Aktivität durch eine vorwärts schiebende Migration (Friedl und Wolf, 2010). Im Gegensatz dazu nehmen Zellen im mesenchymalen Migrationsmodus eine gestreckte Morphologie mit vielen langen Protrusionen an (Abbildung 1.1 B, Mitte) und haben eine geringere Migrationsgeschwindigkeit (ca. 0,2  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Diese Art der Fortbewegung wird vor allem von Zellen angewendet, die ausgeprägte Adhäsionen und Kontraktionen des Zytoskeletts zeigen (Friedl und Wolf, 2010). Je nach Dichte der EZM, migrieren Zellen amöboid und nicht-lytisch durch interfibrilläre Zwischenräume oder bauen dichtere Matrix proteolytisch ab (Friedl und Wolf, 2003). In Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die mesenchymale Bewegung proteolytische Aktivität an den Spitzen der Zellprotrusionen beinhaltet. Abhängig von der Architektur des Netzwerkes können sie zwischen den Migrationsmodi wechseln (Van Goethem *et al.*, 2010).

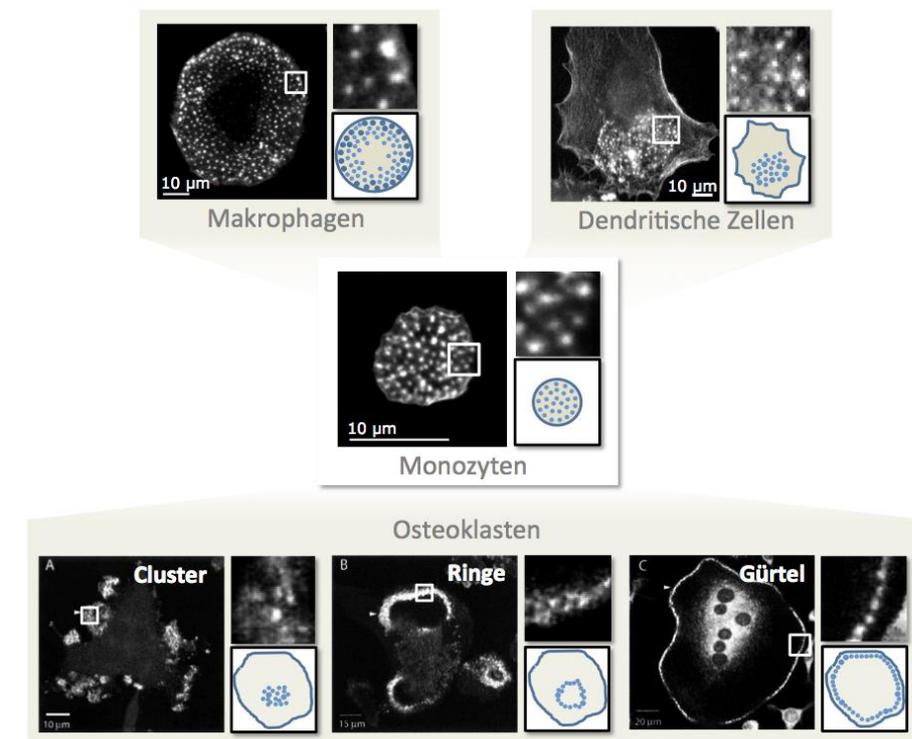
In Makrophagen sind Adhäsion und proteolytischer Abbau von EZM-Material eng miteinander verbunden. Beide Funktionen werden durch Podosomen vermittelt (Linder, 2007).

## 1.2 Podosomen

Podosomen sind Adhäsions- und Invasionsstrukturen, die vor allem von Zellen monozytischer Abstammung ausgebildet werden (Abbildung 1.2): Makrophagen (Linder *et al.*, 1999), dendritische Zellen (Burns *et al.*, 2001) und Osteoklasten (Destaing *et al.*, 2003).

Podosomen verbinden verschiedene Funktionen, die für das Erkennen und Überwinden von natürlichen Barrieren, wie z.B. Blutgefäße, Gewebegrenzen und die EZM, wichtig sind: Zell-Substrat-Adhäsion, EZM-Abbau (Gimona und Buccione, 2006; Gimona *et al.*, 2008; Linder 2007; Linder und Aepfelbacher, 2003), Erkennen von Matrix-Elastizität und topographischen Veränderungen der Umgebung (*mechanosensing*) (van den Dries *et al.*, 2012), Antigenaufnahme (Gawden-Bone *et al.*, 2010), Knochenabbau (Destaing *et al.*, 2003) und den Einfluss auf die Stabilisierung von Zellprotrusionen und Transmigration (Linder und Wiesner, 2015). In

migrierenden Zellen werden Podosomen typischerweise an der Zellfront gebildet (Evans *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006). Osteoklasten können ihre Podosomen in Clustern, Ringen, Wellen oder einem Gürtel arrangieren. Auf Knochen reorganisieren sich diese zu einer zirkulären Adhäsionsstruktur an der Zellperipherie (*sealing zone*). In den Raum zwischen Zelle und Knochen (*resorption lacuna*) sekretieren Osteoklasten Protonen und lysosomale Enzyme für den Abbau des Knochens (Luxenburg *et al.*, 2006).



**Abb. 1.2: Podosomen in Zellen monozytischer Abstammung.** *Mitte:* Monozyt, fixiert 6 h nach dem Aussäen; *oben:* Makrophage und unreife dendritische Zelle; *unten:* Osteoklasten mit verschiedenen Podosomen-Anordnungen (Cluster, Ringe und Gürtel). Die Zellen wurden fixiert und F-Aktin gefärbt. Die weißen Boxen kennzeichnen die Bildausschnitte oben rechts. Einzelne Podosomen sind als F-Aktin-reiche Punkte erkennbar. Die graphischen Darstellungen unten links veranschaulichen die typischen Größen und Anordnungen der Podosomen des entsprechenden Zelltyps. Maßstab: 10 µm. (modifiziert nach Linder und Wiesner, 2015)

Aber auch andere Zelltypen wie Endothelzellen (Moreau *et al.*, 2003; Osiak *et al.*, 2005), Megakaryozyten (Sabri *et al.*, 2006; Schachtner *et al.*, 2013) und Zellen der glatten Muskulatur (Burgstaller und Gimona, 2004) können Podosomen formen. Letztere bilden die Adhäsionsstrukturen vor allem nach Stimulation mit Phorbol ester und daraus folgender Aktivierung von Proteinkinase C (Burgstaller und Gimona, 2006) sowie nach Einwirkung von physiologischen, physikalischen Signalen wie räumliche Struktur, Druck oder Verwundung und darauf folgender Aktivierung des Src-Signalwegs aus (Kim *et al.*, 2015).

## 1.2.1 Funktion von Podosomen

### **Adhäsion**

Da Podosomen nur von adhärenen Zellen an der Substrat-kontaktierenden Seite gebildet werden, vermitteln sie vermutlich den Kontakt zur extrazellulären Matrix (EZM) an diesen Stellen. Die EZM ist eine Mischung aus fibrillären Proteinen und Polysacchariden, die von Zellen sekretiert werden und den interzellulären Raum füllen (Hynes, 2009). Der Kontakt zur EZM wird von Transmembran-Proteinen vermittelt, die Komponenten der EZM binden und in Podosomen angereichert sind (Abbildung 1.3 A). Es handelt sich dabei vor allem um Integrine mit  $\beta$ 1- oder  $\beta$ 3-Untereinheit (Destaign *et al.*, 2010; Pfaff und Jurdic, 2001; Teti *et al.*, 1989; Chellaiah, 2006; Gimona *et al.*, 2008; Zambonin-Zallone *et al.* 1989) sowie dem Hyaluronan-Rezeptor CD44 (Chabadel *et al.*, 2007).  $\beta$ 1-Integrine vermitteln die Bindung zu EZM-Bestandteilen wie verschiedene Collagen-Isoformen, Fibronectin und Laminin, wohingegen  $\beta$ 3-Integrine vor allem Vitronectin, Fibronectin, Fibrogen und Osteopontin binden (Lal *et al.*, 2009).

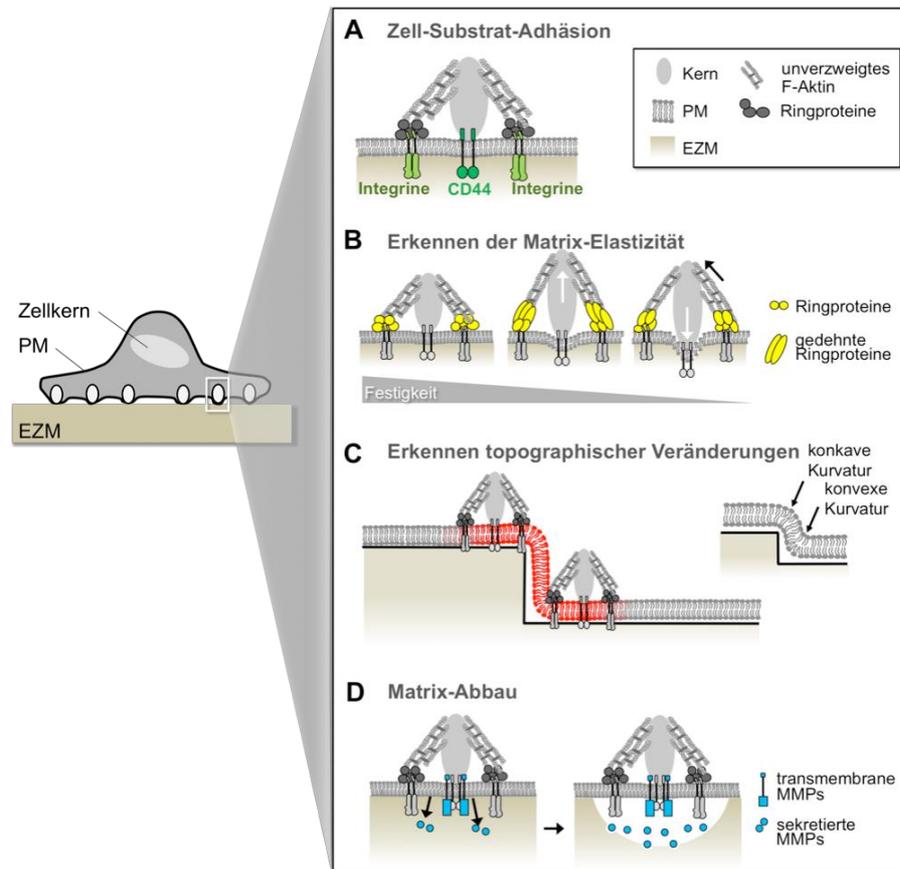
### ***Mechanosensing***

*Mechanosensing* ist der Prozess, bei dem die Zelle physikalische Eigenschaften oder mechanische Signale wie Matrix-Elastizität (Abbildung 1.3 B) und topographische Veränderungen (Abbildung 1.3 C) in chemische Signale umwandelt (van den Dries *et al.*, 2014; Collin *et al.*, 2006).

Informationen über die Elastizität der Matrix werden vermutlich durch die besondere Architektur der Podosomen vermittelt (Abbildung 1.3 B). Podosomen zeigen interne Kontraktionen, welche ihnen zyklische Bewegungen ermöglichen. Diese Oszillationen werden vermutlich durch laterale F-Aktin-Kabel verursacht, die den Podosomenkern mit den Ringproteinen verbinden (Labernadie *et al.*, 2014; Labernadie *et al.*, 2010; van den Dries *et al.*, 2013; Akisaka *et al.*, 2008; Luxenburg *et al.*, 2007). Durch das Wachstum des Kerns werden Kräfte auf die Plasmamembran ausgeübt, was zur Entstehung von Gegenkräften in den lateralen Aktomyosin-Kabeln und zur Rekrutierung und Streckung von spannungssensitiven Ringproteinen führt. Je nach Elastizität der Matrix werden auf diese Weise die biochemischen Eigenschaften der Podosomen an die physikalische Beschaffenheit des Untergrundes angepasst und die Podosomen können mehr oder weniger in die Matrix eindringen (Linder und Wiesner, 2015; Luxenburg *et al.*, 2012; van den Dries *et al.*, 2014; Labernadie *et al.*, 2014).

Die Spannung im Aktin-Netzwerk könnte ebenso von strukturellen Proteinen wie Cofilin

(Hayakawa *et al.*, 2011) oder Forminen zusammen mit Profilin (Courtemanche *et al.*, 2013) wahrgenommen werden, die anschließend die Podosomen-Oszillation und die Rekrutierung von spannungssensitiven Proteinen kontrollieren (van den Dries *et al.*, 2014).



**Abb. 1.3: Funktion von Podosomen.** Modell von einem Makrophagen auf 2D-Matrix (PM: Plasmamembran, EZM: extrazelluläre Matrix). **(A-D)** Etablierte Funktionen von Podosomen. **(A)** Zell-Substrat-Adhäsion. Die Adhäsion an den Untergrund erfolgt durch transmembrane Proteine, die an Podosomen lokalisieren, wie Integrine (hellgrün) und CD44 (dunkelgrün). **(B,C)** *Mechanosensing*. **(B)** Messen der Matrix-Elastizität. Durch das Wachstum des Podosomenkerns wirken Kräfte auf die Plasmamembran (weiße Pfeile), die zur Entstehung von Gegenkräften an den lateralen Aktin-Kabeln (schwarzer Pfeil) und zur Streckung spannungssensitiver Ringproteine (gelb) führen. Je nach Festigkeit der Matrix (absteigende Fläche in grau) können Podosomen mehr oder weniger in die Matrix ragen. **(C)** Messen geometrischer Veränderungen. Podosomen werden vor allem an Diskontinuitäten der Matrix gebildet. Erhöhte Kurvature der Plasmamembran (rot) könnte zu einer ungleichmäßigen Verteilung von Proteinen und Lipiden sowie zur Rekrutierung von Membran-Kurvatur-wahnehmenden Proteinen führen. Die dadurch vermittelten Signale könnte die Akkumulation von podosomalen Proteinen beeinflussen. Die konkave und konvexe Kurvature der Membran ist dargestellt. **(D)** Matrix-Abbau. Für den lokalen Abbau der Matrix (weißer Bereich) rekrutieren Podosomen Matrix-lyisierende Proteine (Matrix-Metalloproteasen, MMPs), die membranständig sind (blaue Boxen) oder sekretiert werden (blaue Punkte). (modifiziert nach Linder und Wiesner, 2015)

Zudem können Podosomen topographische Veränderungen wahrnehmen (Abbildung 1.3 C). Dendritische Zellen bilden Podosomen vorwiegend entlang den Kanten von

mikrostrukturierten 3D-Oberflächen aus. Bis zu einem Höhenunterschied des Untergrunds von 100 nm werden sie an der konkaven und konvexen Seite der Plasmamembran-Kurvatur gebildet (van den Dries *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu können *sealing zone*-ähnliche Strukturen in Osteoklasten Änderungen der Oberfläche von mehr als 3  $\mu\text{m}$  wahrnehmen (Geblinger *et al.*, 2012). Die topographischen Veränderungen der EZM-Oberfläche könnten zu einer ungleichmäßigen Verteilung von Proteinen und Lipiden in der Plasmamembran oder zur Rekrutierung von Membran-Kurvatur-wahrnehmenden Proteinen führen. Die entstehenden Signale könnten daher die lokale Akkumulation von podosomalen Proteinen beeinflussen. (Destaign *et al.*, 2011; Linder und Wiesner, 2015).

### **Abbau von extrazellulärer Matrix**

Je nach Dichte der EZM, migrieren Zellen amöboid und nicht-lytisch durch interfibrilläre Zwischenräume oder sind gezwungen, dichtere Matrix proteolytisch abzubauen (Friedl und Wolf, 2003). Am Abbau der EZM sind Podosomen beteiligt (Abbildung 1.5 D; Linder, 2007). Gezeigt wurde dies unter anderem für Makrophagen (Wiesner *et al.*, 2010), Osteoklasten (Delaissé *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 1997), Endothelzellen (Osiak *et al.*, 2005; Tatin *et al.*, 2006) und Zellen der glatten Muskulatur (Burgstaller und Gimona, 2005; Mak, 2011). Für den lokalen Abbau der EZM werden Matrix-lysierende Enzyme wie Matrix-Metalloproteasen (MMPs), vor allem *membrane-type-1* (MT1)-MMP, MMP-2 und MMP-9, an der ventralen Plasmamembran sekretiert oder als membranständige Enzyme an Podosomen präsentiert (Linder *et al.*, 2011; Wiesner *et al.*, 2010).

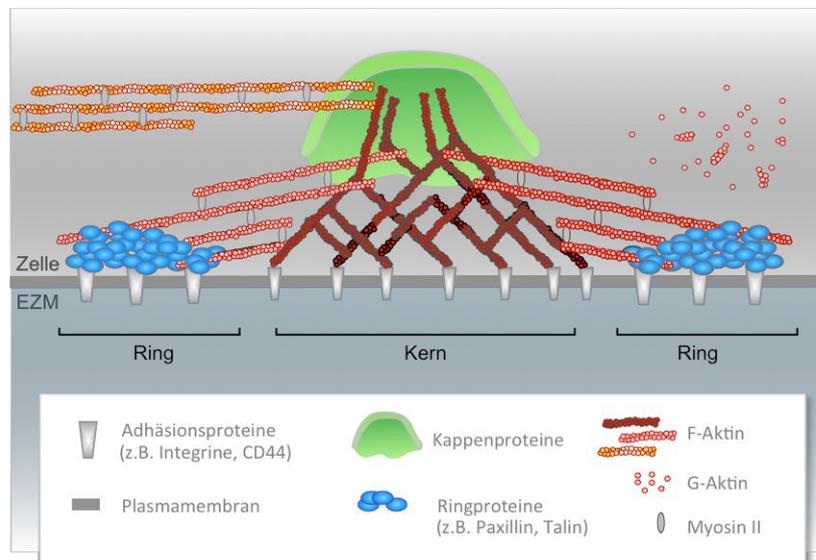
## **1.2.2 Struktur von Podosomen**

Podosomen sind punktförmige, Aktin-reiche Strukturen an der Substrat-verbundenen Zellseite mit einem Durchmesser von 0,5-1  $\mu\text{m}$  und einer Höhe von ca. 0,6  $\mu\text{m}$  (Linder, 2009; Labernadie *et al.*, 2010). Abbildung 1.4 zeigt ein detailliertes Modell von einem Podosom. Der Kern besteht aus einem stark verzweigtem F-Aktin-Netzwerk, das Aktin-assoziierte Proteine wie den *actin-related protein* (Arp) 2/3-Komplex (Osiak *et al.*, 2005; Linder *et al.*, 2000a; Kaverina *et al.*, 2003), Cortactin (Ochoa *et al.*, 2000; Hiura *et al.*, 1995), *Wiskott-Aldrich-Syndrome protein* (WASp) (Linder *et al.*, 1999), Gelsolin (Chellaiah *et al.*, 2000) und Dynamin (Ochoa *et al.*, 2000) enthält.

Umgeben ist der Kern von einem Ring aus Plaque-Proteinen wie Paxillin, Vinculin und Talin (Zambonin-Zallone *et al.*, 1989; Pfaff und Jurdic, 2001; Linder und Aepfelbacher,

2003). Hochauflösende Mikroskopie (*high-resolution microscopy*) offenbarte, dass der in der Fluoreszenzmikroskopie als einheitliche Struktur erscheinende Ring aus mehreren, eigenständigen Protein-Clustern aufgebaut ist (Cox *et al.*, 2012; van den Dries *et al.*, 2013; Walde *et al.*, 2014).

Über dem Kern befindet sich die Podosomenkappe, eine neu entdeckte Substruktur, die Proteine wie das Formin FMNL1 (Mersich *et al.*, 2010), Supervillin (Bhuwania *et al.*, 2012) und Fascin (Van Audenhove *et al.*, 2015) enthält. Sie könnte mögliche Funktionen beim Andocken von Vesikeln, der Regulation der Größe (Van Audenhove *et al.*, 2015) oder bei der Podosomen-assoziierten Kontraktilität haben (Bhuwania *et al.*, 2012; Linder *et al.*, 2011).



**Abb. 1.4: Detailliertes Modell des Podosomen-Aufbaus.** Der Kern aus verzweigtem F-Aktin (*dunkelrot*) ist umgeben von einem Ring aus Plaque-Proteinen (*blau*). Das Aktin des Kerns ist verbunden mit den Ringproteinen über unverzweigte Aktin-Filamente (*hellrot*), die von Myosin II gebündelt sind (*oval, grau*). Über dem Kern befindet sich die Kappen-Struktur (*grün*). Der Kontakt zur extrazellulären Matrix ist über Integrine und CD44 vermittelt (*Trapez, grau*). Eine Wolke aus G-Aktin und F-Aktin lokalisiert über dem Podosom. Individuelle Podosomen sind über laterale Aktin-Kabel miteinander verbunden (*orange*), die von Myosin II gebündelt sind (*oval, grau*). (modifiziert nach Linder *et al.*, 2011)

Zusätzlich zum stark verzweigten F-Aktin des Podosomenkerns befinden sich zwei weitere Populationen von unverzweigtem F-Aktin an Podosomen. Zum einen sind das laterale Aktin-Filamente, die eine Verbindung zwischen der Spitze des Kerns mit den Ringkomponenten und der Plasmamembran vermitteln (Linder und Wiesner, 2015; Labernadie *et al.*, 2014; Labernadie *et al.*, 2010; van den Dries *et al.*, 2013; Destaing *et al.*, 2003; Akisaka *et al.*, 2008; Luxenburg *et al.* 2007). Zum anderen sind das unverzweigte F-Aktin-Kabel, die einzelne Podosomen untereinander verbinden (Linder und Wiesner, 2015); Luxenburg *et al.*, 2007). Das Protein Myosin IIa, das die

Kontraktilität an Podosomen hauptsächlich vermittelt, umgibt den Podosomenkern (Bhuwania *et al.*, 2012; van Helden *et al.*, 2008) und lokalisiert zusätzlich an den Podosomen-verbindenden Aktin-Kabeln (Linder und Wiesner, 2015). Die daraus entstehende Aktomyosin-Kontraktilität an diesen unverzweigten F-Aktin-Populationen beeinflusst die Oszillation einzelner Podosomen (van den Dries *et al.*, 2013) und organisiert mehrere Podosomen in größere Gruppen (Linder *et al.*, 2011; Kopp *et al.*, 2006; van Helden *et al.*, 2008).

Der Zell-Matrixkontakt wird von Transmembran-Proteinen vermittelt, die Komponenten der EZM binden. Dabei handelt es sich vor allem um Integrine mit der  $\beta$ 1- (Destaing *et al.*, 2010; Van Goethem *et al.*, 2010) oder  $\beta$ 3-Untereinheit (Pfaff und Jurdic, 2001; Teti *et al.*, 1989) sowie dem Hyaluronan-Rezeptor CD44 (Chabadel *et al.*, 2007).

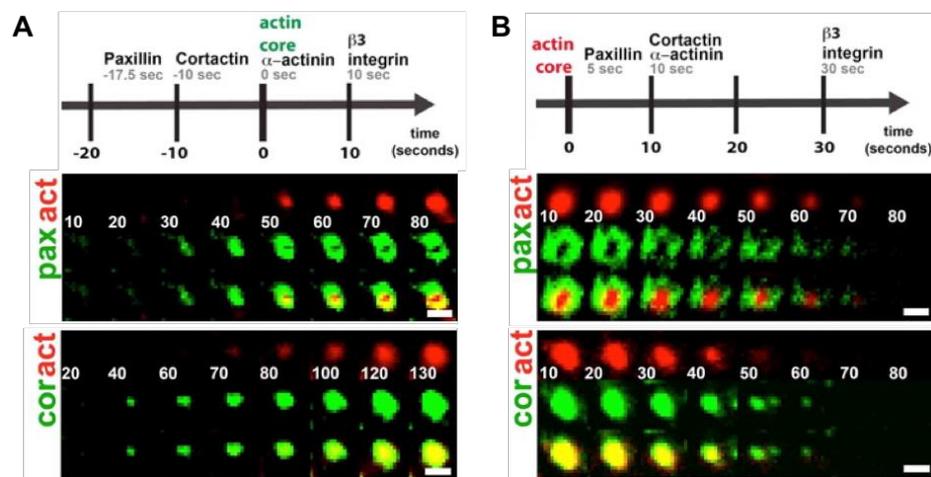
### 1.2.3 Dynamiken und Regulation von Podosomen

Podosomen sind sehr dynamische Strukturen, die *de novo* oder durch Abspaltung von einem bereits vorhandenen Podosom entstehen können (Evans *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006).

Während der *de novo* Bildung von Podosomen in Zellen monozytischer Abstammung assoziieren typische Podosomen-Komponenten nacheinander (Abbildung 1.5 A). Die einleitenden Prozesse für die Rekrutierung dieser podosomalen Marker-Proteine sind teilweise bereits bekannt. Die Voraussetzung für die Bildung der Podosomen ist die anfängliche Adhäsion der Zelle durch EZM-bindende Transmembran-Proteine (van den Dries *et al.*, 2012). Da  $\beta$ 3-Integrine erst nach dem Wachstum des Podosomenkerns im Ring akkumulieren (Abbildung 1.5 A; Luxenburg *et al.*, 2012), sind vermutlich Integrine wie  $\beta$ 1A für diese Adhäsion von Bedeutung (Destaing *et al.*, 2010). Durch Cluster-Bildung der Integrine wird die Reorganisation der Plasmamembran zu stark geordneten *lipid rafts* induziert (Destaing *et al.*, 2011). In Src-transformierten Fibroblasten wird die Bildung der Podosomen zum Beispiel durch die Akkumulation von Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>) initiiert (Oikawa *et al.*, 2008). Dieses Lipid rekrutiert TKS5 (*tyrosine kinase substrate* mit 5 SH3-Domänen) an die Plasmamembran (Abram *et al.*, 2003). Durch TKS5 werden die Aktin-Regulatoren Cortactin (Crimaldi *et al.*, 2009) und (N)-WASp ((neural)-*Wiskott-Aldrich-Syndrome protein*) rekrutiert (Oikawa *et al.*, 2008). Während der Akkumulation von Cortactin im Podosomenkern kommt es zur lokalen Cluster-Bildung von Ringproteinen wie Paxillin. Anschließend kommt es zur Arp2/3-abhängigen Nukleation und Polymerisation des F-

Aktins im Podosomenkern (Abbildung 1.5 A), was durch die Proteine Cortactin und (N)-WASp reguliert wird (Campellone und Welch, 2010). Die Aktin-Polymerisation ist wiederum essentiell für die Rekrutierung und die Erhaltung der Ring-Komponenten (Luxenburg *et al.*, 2012).

Eine Schlüsselrolle spielt dabei auch die Tyrosin-Kinase Src, die Signale von Integrinen zum Aktin-Zytoskelett vermittelt (Obergefell *et al.*, 2002) und zusammen mit Proteinkinase C (PKC) die Bildung von Podosomen reguliert (Tatin *et al.*, 2006). Neben der Bildung reguliert Src auch die Struktur, die Rate der Aktin-Polymerisation sowie Lebensdauer von Podosomen (Destaing *et al.*, 2008).



**Abb. 1.5: Schrittweise Assoziation und Dissoziation typischer Podosomen-Komponenten in Bezug auf den F-Aktin-Kern. (A)** Zeitliche Assoziation von Ringproteinen ( $\beta_3$ -Integrin, Paxillin) und Kernproteinen ( $\alpha$ -Actinin, Cortactin) während der Bildung von Podosomen. **(B)** Zeitliche Dissoziation von Ringproteinen ( $\beta_3$ -Integrin, Paxillin) und Kernproteinen ( $\alpha$ -Actinin, Cortactin) während der Auflösung von Podosomen. **(A-B, unten)** Exemplarische Bilder aus Lebendzellenaufnahmen der Bildung und Auflösung von Podosomen in Osteoklasten, die Cherry-actin (*rot*) und GFP-gekoppeltes Paxillin oder Cortactin (*grün*) exprimieren. Maßstabsbalken: 1  $\mu$ m. (modifiziert nach Luxenburg *et al.*, 2012)

Nach einer Lebensdauer der Podosomen von 2 bis 12 min kann deren Abbau durch das individuelle Auflösen stattfinden (Destaing *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006). Beim Auflösen dissoziieren die podosomalen Marker-Proteine schrittweise von den Podosomen (Abbildung 1.5 B; Luxenburg *et al.*, 2012). Die genauen Prozesse sind jedoch noch nicht untersucht. Ein neu beschriebener Faktor, der eventuell bei der Auflösung eine Rolle spielt, ist das Aktin-bündelnde Protein Fascin (Van Audenhove *et al.*, 2015). Zusätzlich können Podosomen mit anderen Podosomen fusionieren (Evans *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006).

Die Positionen der Podosomen innerhalb der Zelle und die verschiedenen Podosomen-Dynamiken wie *de novo* Bildung, Abspaltung, Fusion und Auflösung

werden unter anderem von Mikrotubuli beeinflusst (Destaing *et al.*, 2005; McMichael *et al.*, 2010; Linder *et al.*, 2000b; Kopp *et al.*, 2006; Evans *et al.*, 2003). Dabei ist auch die Stabilität der Mikrotubuli von Bedeutung. Das Formin mDia2 beeinflusst über den Rho-Signalweg die Mikrotubuli-Dynamiken und ändert so die Stabilität des Podosomengürtels in Osteoklasten (Destaing *et al.*, 2005). Auch in Makrophagen führt die Acetylierung und somit Stabilisierung von Mikrotubuli zu einer verringerten Kontaktierung der Podosomen durch Mikrotubuli-Plusenden und Anzahl der Podosomen pro Zelle (Bhuwania *et al.*, 2014).

In Makrophagen können zwei Subpopulationen von Podosomen unterschieden werden. Die größeren und sehr mobilen Vorläufer oder *precursors* befinden sich in der Zellperipherie oder an der Zellfront von migrierenden Zellen. Sie grenzen sich vor allem durch häufige Abspaltungen und Fusionen von den eher stabileren, kleineren Podosomen oder *successors* in der Zellmitte ab (Evans *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006). Das einzige in der Fachliteratur beschriebene Protein, das vorzugsweise an den stabileren Podosomen lokalisiert, ist Supervillin, das zu der Familie der Villin/Gelsoline gehört. Es besitzt regulatorische Eigenschaften bezüglich des *turnovers* und der Funktion von Podosomen. Supervillin kann Myosin IIa binden, das um den Kern und an den Podosomen-verbindenden Aktin-Kabeln lokalisiert (Linder und Wiesner, 2015; Bhuwania *et al.*, 2012; van Helden *et al.*, 2008). Durch eine Erhöhung der lokalen Aktomyosin-Kontraktilität fördert Supervillin das Auflösen von Podosomen (Bhuwania *et al.*, 2012). Die Aktomyosin-Kontraktilität beeinflusst zusätzlich die Dynamiken einzelner Podosomen (van den Dries *et al.*, 2013) und vermittelt vermutlich die typischen Äquidistanzen zwischen den Podosomen (Linder *et al.*, 2011; Kopp *et al.*, 2006; van Helden *et al.*, 2008).

### **1.3 Mechanismen der Aktin-Nukleation und Regulation von Aktin durch Formine**

Aktin-Filamente (F-Aktin) bestehen aus zwei Ketten von polymerisierten globulären Aktin-Monomeren (G-Aktin), die sich umeinander winden und eine rechtsgängige Helix bilden (Hanson und Lowy, 1963). Es sind polarisierte Strukturen mit einem schnell wachsendem Plusende (*barbed end*) und einem langsam wachsenden Minusende (*pointed end*) (Goode und Eck, 2007). G-Aktin bindet im Adenosintriphosphat (ATP)-gebundenen Zustand an das schnell wachsende Plusende. Im Filament findet die Hydrolyse von ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) statt und ADP-gebundene Aktin-Monomere dissoziieren anschließend vorzugsweise vom Minusende. Dieser

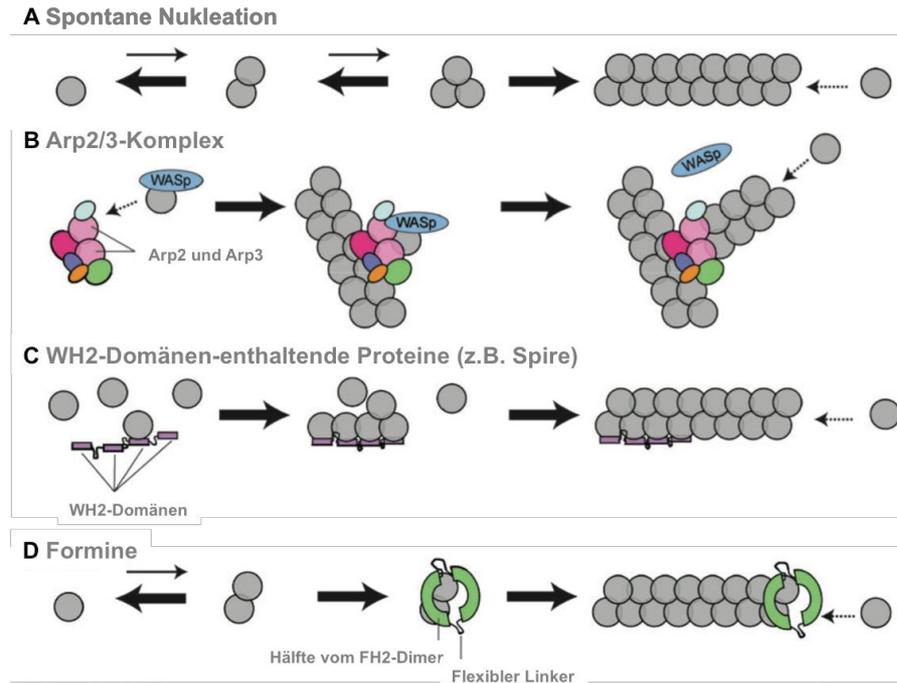
ausbalancierte Zustand der Polymerisation und Depolymerisation von Aktin wird *treadmilling* genannt (Wegner und Isenberg, 1983).

In Zellen ist der Wechsel zwischen G- und F-Aktin streng von vielen G- und F-Aktin-bindenden Proteinen (ABPs) reguliert. ABPs haben eine Vielzahl an Funktionen, wie Nukleation, Verlängerung, Schneiden, *capping* und Vernetzung von Aktin-Filamenten sowie die Sequestrierung von Aktin-Monomeren (Lee und Dominguez, 2010).

Eine wichtige Gruppe der ABPs sind Proteine, die die *de novo* Bildung von Aktin-Filamenten (inklusive Nukleation und Elongation) regulieren (Dominguez und Holmes, 2011). Der erste Schritt der Polymerisation von F-Aktin ist die Bildung eines Dimers und anschließend eines Trimers aus Aktin-Monomeren (Nukleation; Abbildung 1.6 A). Diese Intermediate sind sehr instabil und deren Bildung ist kinetisch ungünstig (Campellone und Welch, 2010; Goode und Eck, 2007). Daher sind Nukleationsfaktoren notwendig, die diese kinetische Barriere überwinden und Filamente bilden können. Bis heute sind drei verschiedene Klassen von Nukleationsfaktoren bekannt (1) der Arp2/3-Komplex, (2) WASp-Homologie (WH)<sub>2</sub>-Domänen-enthaltende Proteine und (3) Formine (Abbildung 1.6; Goode und Eck, 2007).

Der Arp2/3-Komplex besteht aus sieben assoziierten Proteinen, die in Eukaryoten hoch konserviert sind: Arp2, Arp3 und die fünf Untereinheiten ArpC1-ArpC5 (Campellone und Welch, 2010). Diese binden an die Seite eines bereits existierenden und initiieren die Bildung eines neuen Filaments in einem 70°-Winkel (Abbildung 1.6 B; Goley und Welch, 2006). Die Arp2/3-vermittelte Nukleation wird aktiviert durch die Bindung von Nukleations-fördernden Faktoren (*nucleation-promoting factors*, NPFs), wie z.B. (N)-WASp oder Cortactin (Campellone und Welch, 2010). Während der Protein-Komplex am Mutterfilament und am Minusende des neuen Filaments gebunden bleibt, kann das Plusende weiter verlängert werden (Goode und Eck, 2007). Dadurch entsteht das für den Arp2/3-Komplex typische, stark verzweigte F-Aktin-Netzwerk.

Ein WH<sub>2</sub>-Domänen-enthaltender Nukleationsfaktor ist zum Beispiel Spire (Abbildung 1.6 C). Das Protein enthält einen Cluster aus vier WH<sub>2</sub>-Domänen. Diese Domänen rekrutieren und organisieren bis zu vier Aktin-Monomere in einen stabilen Prä-Nukleations-Komplex, der als Vorlage für die Filament-Bildung dient. Dabei entstehen lineare, unverzweigte Filamente wobei das Protein, wie der Arp2/3-Komplex, am Minusende des neuen Filaments gebunden bleibt (Quinlan *et al.*, 2005).



**Abb. 1.6: Vergleich der Mechanismen der Aktin-Nukleation.** (A) Spontane Nukleation von Aktin *in vitro*. Dimere und Trimere von Aktin sind sehr instabile Intermediate, die schnell dissoziieren. Die drei Klassen der Aktin-Nukleatoren überwinden diese kinetische Barriere durch verschiedene Mechanismen. (B) Aktiviert durch Nukleations-fördernde Faktoren (hier WASp) bindet der Arp2/3-Komplex (*bunt*) an ein Mutter-Filament und nukleiert ein neues Filament in einem 70°-Winkel. Daher entsteht ein verzweigtes Aktin-Netzwerk. (C) Spire (*lila*), ein WH2-Domänen-enthaltendes Protein, rekrutiert und organisiert bis zu vier Aktin-Monomere in einen stabilen Prä-Nukleations-Komplex. Es entsteht ein unverzweigtes Filament, wobei Spire am Minusende des Filaments gebunden bleibt. (D) Formine stabilisieren als Dimere (grün, verbunden über Linker, *schwarz*) vermutlich Dimere oder Trimere von Aktin und bleiben am Plusende des Filaments gebunden und regulieren die Verlängerung des Filaments. (A-D) Der gestrichelte Pfeil zeigt zu den Plusenden des polymerisierten Filaments. (modifiziert nach Goode und Eck, 2007)

Die funktionellen Schlüsseldomänen aller Formine sind die konservierten Formin-Homologie (FH)-Domänen FH1 und FH2. Als antiparalleles, Donut-förmiges Dimer kann die FH2-Domäne die Nukleation von Aktin biochemisch beschleunigen und reguliert durch die bleibende Bindung am schnell wachsenden Plusende die Verlängerung des Aktin-Filaments (Abbildung 1.6 D; Goode und Eck, 2007). Der genaue Mechanismus der Aktin-Nukleation durch Formine ist noch nicht vollständig ermittelt (Breitsprecher und Goode, 2013). Frühere *in vitro*-Studien ließen vermuten, dass nur die FH2-Domäne der Formine Aktin durch Bindung und Stabilisierung von spontan gebildeten Dimeren oder Trimeren nukleiert (Breitsprecher und Goode, 2013; Goode und Eck, 2007; Pring *et al.*, 2003; Otomo *et al.*, 2005). Profilin-Aktin ist mit einer zellulären Konzentration von 5-40  $\mu\text{M}$  die Hauptquelle für Aktin-Monomere für die Polymerisation *in vivo* (Pollard und Borisy, 2003). Die FH2-vermittelte Nukleation von Profilin-gebundenem G-Aktin wurde jedoch als sehr ineffizient beschrieben (Chesarone *et al.*, 2010). Über die FH1-Domäne, die sich direkt N-terminal von FH2 befindet,

können Formine mit dem G-Aktin-bindenden Protein Profilin interagieren (Paul und Pollard, 2009). Die Rekrutierung von Profilin-Aktin durch die FH1-Domäne beschleunigt die Ergänzung der Aktin-Monomere an das FH2-bedeckte Plusende des Aktin-Filaments (Breitsprecher und Goode, 2013). Auch die Region C-terminal von FH2 ist an der Filament-Verlängerung beteiligt, indem sie die Aktin Polymerisation beschleunigt. Gezeigt wurde das unter anderem für FMNL3 und mDia1 (Gould CJ *et al.*, 2011; Heimsath und Higgs, 2012). Zusammenfassend wird die Nukleation von Aktin durch Formine in der Anwesenheit von Profilin vermutlich durch die FH1-, FH2-Domäne und die C-terminale Region reguliert (Breitsprecher und Goode, 2013).

Die durch Formine gebildeten Aktin-Filamente sind unverzweigt und linear (Sagot *et al.*, 2002). Neben der Nukleation und der Filament-Verlängerung können Formine weitere regulatorische Funktionen auf Aktin ausüben. Da die FH2-Domänen während der Polymerisation mit einer hohen Affinität am Plusende des Filaments gebunden bleiben, wird die Bindung von *capping*-Proteinen inhibiert (Harris *et al.*, 2004). Manche Formine, wie z.B. FMNL1 (Harris *et al.*, 2006), haben eine hohe Aktin-Bündelungs-Aktivität (Goode und Eck, 2007). Das besondere Formin *Inverted formin-2* (INF2) kann zusätzlich zu diesen allgemeinen Funktionen Aktin-Filamente schneiden und deren Depolymerisation beschleunigen (Chhabra und Higgs, 2006).

Die größte Gruppe der 15 Formine, die in Säugetieren vorkommen (Schönichen und Geyer, 2010), sind die Diaphanous-ähnlichen Formine (*diaphanous-related formins*, DRFs). DRFs sind über Autoinhibition reguliert (Alberts, 2001). Am besten beschrieben ist es für das Formin mDia1 (Li und Higgs, 2003). Die N-terminale Diaphanous-Inhibitions-Domäne (*diaphanous inhibitory domain*, DID) bindet die Diaphanous-Autoregulations-Domäne (*diaphanous autoregulatory domain*, DAD) (Lammers *et al.*, 2005) und bildet einen autoinhibitorischen Loop (Nezami *et al.*, 2010; Otomo *et al.*, 2010). Durch Bindung der GTPase RhoA an die DAD-interagierende Region von DID wird die Autoinhibition aufgehoben (Lammers *et al.*, 2005).

## 1.4 INF2

### 1.4.1 Biochemische Eigenschaften von INF2

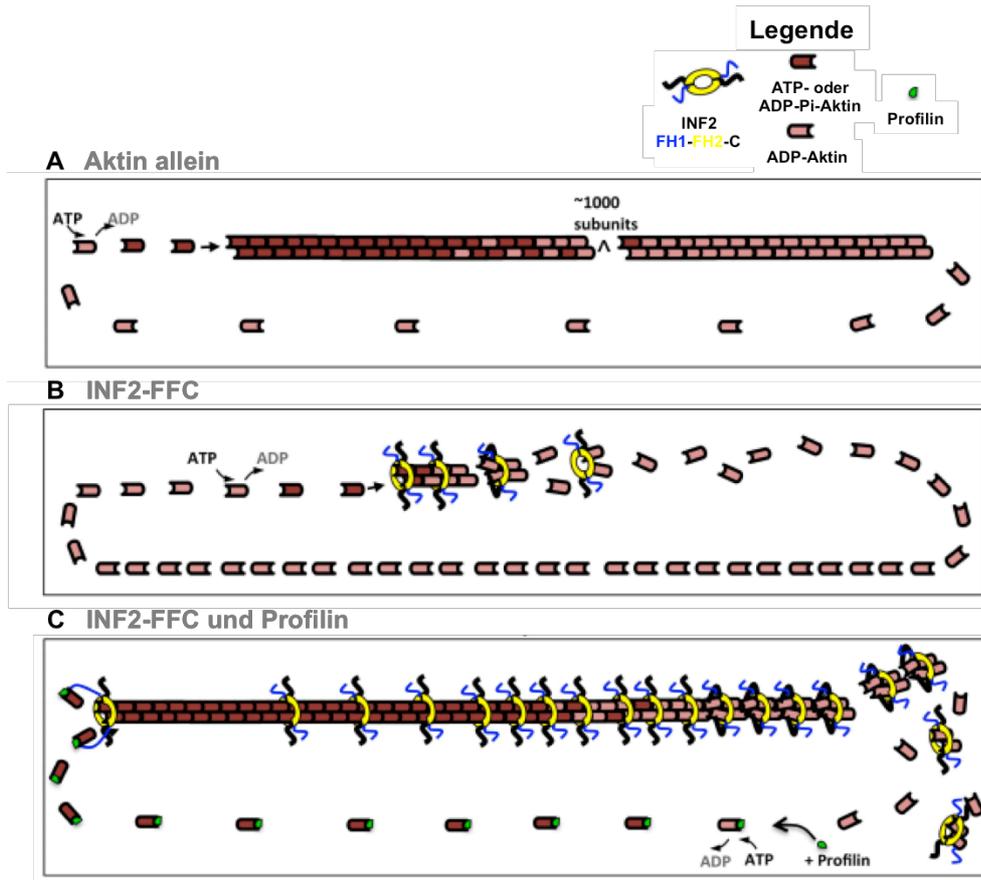
*Inverted formin-2* (INF2) gehört zu der Familie der Formine. INF2 ist in der Zelle autoinhibiert. Wie bei den DRFs, bindet die INF2-DAD-Domäne an die N-terminale DID-Domäne und bildet einen autoinhibitorischen Loop. Die DAD-Domäne enthält eine

*Wiskott-Aldrich-Syndrome protein homology 2* (WH2)-Sequenz, die Aktin-Monomere binden kann (Chhabra und Higgs, 2006). Durch Bindung eines Aktin-Monomers an die WH2-Sequenz wird die Autoinhibition von INF2 aufgehoben und die Aktin-Polymerisation aktiviert (Ramabhadran *et al.*, 2013). Zusätzlich ist die WH2-Sequenz für die scheidende und depolymerisierende Funktion von INF2 notwendig (Chhabra und Higgs, 2006).

Durch *in vitro*-Studien mit einem INF2-Konstrukt, das die FH1- und FH2-Domäne sowie den C-terminalen Bereich enthält (INF2-FFC), ergibt sich folgendes Modell über die Aktivitäten von INF2 auf Aktin, welche Nukleations-Beschleunigung, Plusenden-Verlängerung, Schneiden und Monomer-Bindung durch die WH2-Sequenz beinhaltet (Abbildung 1.7; Gurel *et al.*, 2015).

In der Abwesenheit von Profilin sind die von INF2-FFC gebildeten Filamente relativ kurz (< 60 nm) und stehen unter konstantem *turnover* der Aktin-Untereinheiten (Gurel *et al.*, 2015). INF2-FFC nukleiert Aktin-Filamente und bleibt am Plusende des Filaments gebunden. Durch das Hinzufügen von ATP-gebundenen Aktin-Monomeren verlängert das am Plusende gebundene INF2-FFC das Filament circa 40 % schneller als Aktin allein (Abbildung 1.7 A,B). Zusätzlich bindet INF2-FFC an die Seiten des Filaments. Dabei bilden die INF2-FFC-Dimere ringähnliche Strukturen um das Aktin-Filament (Sharma *et al.*, 2014). Während der Filament-Verlängerung hydrolysieren die Aktin-Untereinheiten ATP und spalten Phosphat ab. Durch die Phosphat-Abspaltung schneidet seitlich gebundenes INF2-FFC das Filament durch Bindung der WH2-Sequenzen an die Aktin-Untereinheiten am Plusende des FH2-Dimers (Gurel *et al.*, 2014). Die Aktin-Monomere dissoziieren anschließend von den WH2-Sequenzen und den FH2-Domänen. Die freien Aktin-Untereinheiten tauschen ADP gegen ATP aus und können erneut in das Filament eingebaut werden. Der Nukleotidaustausch von ADP zu ATP in den Aktin-Monomeren ist der limitierende Faktor in diesem Zyklus (Gurel *et al.*, 2015).

In der Anwesenheit von Profilin in dem Zyklus von Polymerisation und Depolymerisation durch INF2-FFC sind die entstehenden Filamente länger als in der Abwesenheit von diesem G-Aktin-bindenden Protein (Abbildung 1.7 C). Da es den Austausch von ADP zu ATP katalysiert, wird die Menge an ATP-Aktin-Monomeren in diesem Zyklus schneller regeneriert als in der Abwesenheit von Profilin. Durch Profilin wird in dem Zyklus daher der limitierende Faktor zu der Polymerisations-Geschwindigkeit von INF2-FFC verschoben. Zusätzlich wird durch die Interaktion von Profilin mit der FH1-Domäne die Rate der Polymerisation erhöht (Gurel *et al.*, 2015; Paul und Pollard, 2009).



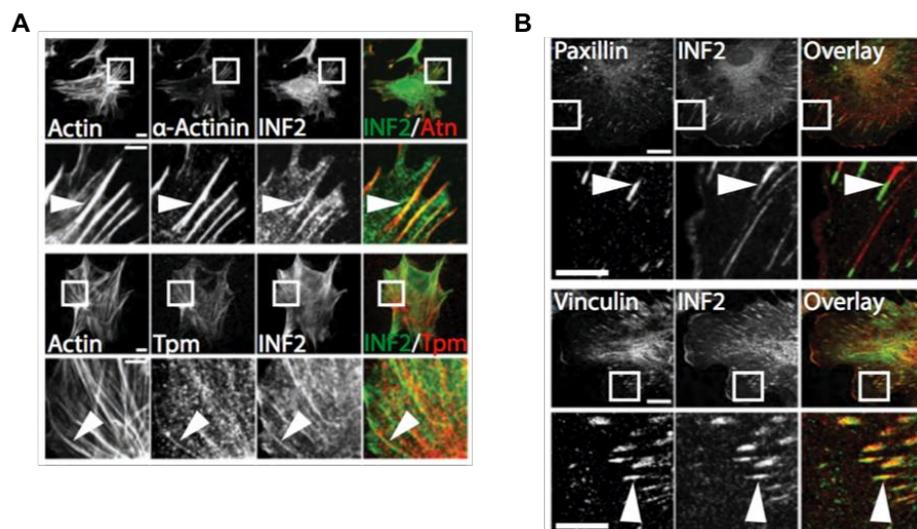
**Abb. 1.7: Modelle vom Aktin-turnover im stationären Zustand.** ATP- und ADP-Pi-gebundene Aktin-Untereinheiten sind *dunkelrot*, ADP-gebundene Aktin-Untereinheiten sind *hellrot* markiert. INF2-FFC ist *blau* (FH1), *gelb* (FH2) und *schwarz* (C-Terminus), Profilin *grün* dargestellt. **(A)** Aktin allein. (1) ATP-gebundenes Aktin fügt sich an das Plusende. (2) Das eingebaute Aktin hydrolysiert ATP und spaltet das Phosphat ab. (3) ADP-gebundenes Aktin dissoziiert am Minusende. (4) Dissoziierte ADP-Aktin-Monomere tauschen ADP gegen ATP, welche wieder neu an das Plusende binden können. **(B)** Aktin mit INF2-FFC. (1) ATP-gebundenes Aktin wird dem INF2-FFC-gebundenen Plusende hinzugefügt. (2) INF2 bindet an die Seiten des Filaments (3) ATP-Hydrolyse und Phosphat-Abspaltung im Filament. (4) INF2-vermitteltes Schneiden des Filaments. (5) Ablösen des ADP-Aktins von der WH2-Sequenz von INF2 nach dem Schneiden. (6) Nukleotidaustausch. **(C)** Aktin mit INF2-FFC und Profilin. (1) Profilin-gebundenes ATP-Aktin wird dem INF2-gebundenen Plusende hinzugefügt. (2) INF2 bindet an die Seiten des Filaments. (3) ATP-Hydrolyse und Phosphat-Abspaltung im Filament. (4) INF2-vermitteltes Schneiden des Filaments. (5) Ablösen des ADP-Aktins von der WH2-Sequenz von INF2 nach dem Schneiden. (6) Profilin-verstärkter Nukleotidaustausch. (modifiziert nach Gurel *et al.*, 2015)

Eine Vielzahl von Prozessen in der Zelle werden gleichzeitig durch Mikrotubuli und Aktin-Filamente reguliert. Eine *in vitro*-Studie mit INF2-FFC zeigte, dass INF2 Mikrotubuli binden und wirksam bündeln kann. Dabei kann das Formin mit Aktin und Mikrotubuli gleichzeitig eine Bindung ausbilden. Die Mikrotubuli-Bindung inhibiert dabei nicht die Aktin-Polymerisation durch INF2. Umgekehrt dazu inhibieren Aktin-Monomere jedoch die Bindung und Bündelung der Mikrotubuli durch INF2. Somit könnte INF2 eine wichtige Verknüpfung zwischen Mikrotubuli und Aktin in der Zelle darstellen (Gaillard *et al.*, 2011).

## 1.4.2 Zelluläre Funktionen von INF2

INF2 wird Zelltyp-abhängig in zwei verschiedenen *splice*-Varianten exprimiert. Die prenylierte INF2-CAAX-Variante bindet an das endoplasmatische Retikulum (Chhabra *et al.*, 2009) und vermittelt dort die Teilung von Mitochondrien (Korobova *et al.*, 2013). Die Funktion von INF2-nonCAAX ist noch ungenügend charakterisiert. Die *splice*-Variante ist meist zytoplasmatisch und spielt eine Rolle bei der Organisation des Golgi-Apparats (Ramabhadran *et al.*, 2011).

Eine interessante Funktion von INF2 wurde für fokale und fibrilläre Adhäsionen beschrieben, welche wie Podosomen den Kontakt zur extrazellulären Matrix vermitteln (Skau *et al.*, 2015; Costa und Parson, 2010). In Fibroblasten lokalisiert INF2 an fokalen Adhäsionen und an den distalen Spitzen von dorsalen Stressfasern (Abbildung 1.8). Durch die Fähigkeit die dorsalen Stressfasern zu generieren, fördert INF2 die schnelle Verlängerung und Reifung der fokalen zu fibrillären Adhäsionen im Zellzentrum. Diese sind auf die Umgestaltung der extrazellulären Matrix aus Fibronektin spezialisiert (Skau *et al.*, 2015).



**Abb. 1.8: INF2 lokalisiert an dorsalen Stressfasern und an fokalen Adhäsionen. (A)** Dorsale Stressfasern: Lokalisation von INF2 und den Marker-Proteinen  $\alpha$ -Actinin und pan-Tropomyosin. Konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen von INF2 (grün), Aktin gefärbt mit Alexa Fluor<sup>®</sup> 488-gekoppeltem Phalloidin und den Aktin-Bindeproteinen  $\alpha$ -Actinin (*oben, rot*) und pan-Tropomyosin (*unten, rot*) in embryonalen Mausfibroblasten. Die weißen Kästchen markieren den Bereich, der darunter vergrößert dargestellt ist. Die weißen Pfeilköpfe zeigen die Kolokalisation an Aktinstrukturen. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m (*oben*), 5  $\mu$ m (*unten*). **(B)** Fokale Adhäsionen: Lokalisation von INF2 und den Marker-Proteinen Paxillin und Vinculin. Konfokale Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen von INF2 (grün) und den fokalen Adhäsions-Proteinen Paxillin (*oben, rot*) und Vinculin (*unten, rot*). Die weißen Kästchen markieren den Bereich, der darunter vergrößert dargestellt ist. Die weißen Pfeilköpfe zeigen die Kolokalisation an den fokalen Adhäsionen. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m (*oben*), 5  $\mu$ m (*unten*). (modifiziert nach Skau *et al.*, 2015)

Die Bedeutung von INF2 und dessen Wichtigkeit bei der Regulation von Aktin wird auch in Bezug auf die Funktion von Podozyten deutlich. Mutationen in der DID-Region von INF2 führen zu einer humanen Erkrankung der Niere, der fokal segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) (Brown *et al.*, 2010), und zu der häufig mit FSGS assoziierten, neuronalen Erkrankung Charcot-Marie-Tooth (Boyer *et al.*, 2011). Die genauen Mechanismen über den Einfluss dieser Mutationen *in vivo* sind jedoch noch nicht bekannt. INF2 reguliert in Podozyten die Aktin-abhängigen Prozesse, die durch Rho und mDia vermittelt werden (Sun *et al.*, 2013). Zuvor zeigten *In vitro*-Studien, dass INF2-DID an mDia-DAD bindet und so die mDia-vermittelte, Rho-aktivierte Aktin-Polymerisation inhibiert (Sun *et al.*, 2011). Fehlregulationen in diesem Signalweg könnten zur Entwicklung von FSGS führen (Sun *et al.*, 2013).

Außerdem könnte INF2 in Assoziation mit der Rho-GTPase Cdc42 einen durch die Polymerisation und Depolymerisation von Aktin vermittelten Einfluss auf den vesikulären Transport in Epithelzellen und in T-Zellen haben (Madrid *et al.*, 2010; Andrés-Delgado *et al.*, 2010). In T-Zellen ist zusätzlich auch der Einfluss von INF2 auf Mikrotubuli von Bedeutung. Die FH2-Domäne von INF2 vermittelt dort die Bildung von stabilen, de-tyrosinierten Mikrotubuli. Diese Mikrotubuli-Stabilisierung ist für die Polarisation des Zentrosoms in T-Zellen notwendig (Andrés-Delgado *et al.*, 2012). Die Reorientierung des Zentrosoms wird durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors induziert und ist für den Transport der sekretorischen Maschine in Richtung immunologische Synapse wichtig (Andrés-Delgado *et al.*, 2013).

Auch eine Reaktion auf externe, mechanische Reize durch INF2 konnte bereits gezeigt werden. In Fibroblasten wird durch mechanische Reize eine perinukleare Aktin-Polymerisation induziert, die von  $Ca^{2+}$  und INF2 vermittelt wird (Shao *et al.*, 2015).

## 1.5 Zielsetzung

Podosomen sind hochdynamische, auf Aktin basierende Adhäsions-, Invasions- und mechanosensorische Strukturen in Zellen monozytischer Abstammung. Sie bestehen aus einem F-Aktin-reichen Kern, der von einem Ring aus verschiedenen Proteinen, wie z.B. Vinculin, Talin oder Paxillin, umgeben ist (Linder *et al.*, 2011; Zambonin-Zallone *et al.*, 1989; Pfaff und Jurdic, 2001; Linder und Aepfelbacher, 2003). Proteine, wie z.B. Supervillin oder Fascin, befinden sich oberhalb des Kerns in Form einer Kappe (Linder *et al.*, 2011; Bhuwania *et al.*, 2012; Van Audenhove *et al.*, 2015). Die Nukleation des verzweigten F-Aktins im Podosomenkern ist Arp2/3-Komplex-abhängig (Osiak *et al.*,

2005; Linder *et al.*, 2000a; Kaverina *et al.*, 2003). Zusätzlich befinden sich an Podosomen unverzweigte F-Aktin-Kabel, die verschiedene Podosomen miteinander verbinden und in größere Gruppen organisieren (Linder und Wiesner, 2015; Luxenburg *et al.*, 2007). Außerdem zeigen Podosomen interne Kontraktionen, welche ihnen zyklische Oszillationen ermöglichen. Diese Bewegungen werden vermutlich durch F-Aktin-Kabel verursacht, die den Podosomenkern mit den Ringproteinen verbinden (Labernadie *et al.*, 2014; Labernadie *et al.*, 2010; van den Dries *et al.*, 2013; Akisaka *et al.*, 2008; Luxenburg *et al.*, 2007). Proteine der Formin-Familie sind wichtige Nukleations- und Polymerisationsfaktoren von F-Aktin in eukaryotischen Zellen. Die von Forminen gebildeten Aktin-Filamente sind unverzweigt und linear (Sagot *et al.*, 2002). Die Anwesenheit von lateralen und verbindenden Aktin-Kabeln an Podosomen lässt daher eine Regulation durch Formine vermuten. So konnte für das Formin FMNL1 die Lokalisation an Podosomen bereits gezeigt werden (Mersich *et al.*, 2010). In vorausgehenden proteomischen Analysen in unserem Labor (Arbeitsgruppe Linder, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) konnte die Anwesenheit von verschiedenen Forminen in der Podosomen-angereicherten Fraktion von Makrophagen nachgewiesen werden, darunter auch das Formin INF2 (Cervero *et al.*, 2012). Die Untersuchung des Formins INF2 und dessen spezifischer Einfluss auf die Struktur, Dynamiken und Funktion von Podosomen war Gegenstand dieser Arbeit.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Typ, Hersteller
Autoklav	Varioklav, Thermo Scientific, Rockford (USA)
Eismaschine	Flockeneisbereiter AF-10, Scotsman, Vernon Hills (USA)
Filmkassette	Hartenstein, Würzburg (D)
Gel-Apparaturen	PeqLab, Erlangen (D)
Heizplatte/Magnetrührwerk IKAMAG®RET	Janke&Kunkel GmbH&Co. KG, Staufen (D)
iBlot	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Inkubatoren	CB Series, Binder, Tuttlingen (D); BBD 6220, Heraeus, Hanau (D)
µMACS™ Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach (D)
NanoDrop® ND-1000	PeqLab, Erlangen (D)
NEON Transfektionssystem	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Netzgeräte	PeqPower 250, PeqLab, Erlangen (D)
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen (D)
Photometer	Ultraspec 3100 pro, Amersham/GE Healthcare, München (D)
Scanner	CanoScan 4400F, Canon, Amsterdam (NL)
Schüttelinkubator	Certomat BS-1, Sartorius, Göttingen (D)
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Tübingen (D)
Sterilbank	Hera Safe, Thermo Scientific, Rockford (USA)
Vortex-Gerät	Janke&Kunkel GmbH&Co. KG, Staufen (D)
Waage	440-47N, Kern, Balingen-Frommern (D)
Wasserbad	Grant Instruments, Cambridge (GB)
Zählkammer	Neubauer Zählkammer, Hartenstein, Würzburg (D)

Zentrifugen	Sorvall RC-5B, RC28S, Thermo Scientific, Rockford (USA) 5417R und 5810R, Eppendorf, Hamburg (D) MiniSpin®, Eppendorf, Hamburg, D
-------------	--

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Verwendete Materialien

Bezeichnung	Typ, Hersteller
Deckgläschen	12 mm; Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v.d.Rhön (D)
Slide-A-Lyser™	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Dialysekassetten	
Einmalpipettenspitzen	5 mL, 10 mL, 25 mL; Sarstedt, Nümbrecht (D)
Falcon-Röhrchen	15 mL, 50 mL; Sarstedt, Nümbrecht (D)
Kodak® X-Omat® AR Filme	GE Healthcare, München (D)
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
S-Monovette®	9 mL, Sarstedt, Nümbrecht (D)
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v.d.Rhön (D)
Parafilm „M“®	American Can Company, Jersey City (USA)
Pasteurpipetten, Glas	Brand, Wertheim (D)
WillCo-dish®-Glasboden-Petrischalen	WillCo Wells B.V., Amsterdam (NL)
Pinzetten	Manufactures D'Outils Dumont SA, Montignez (CH)
Pipettenspitzen	10 µL, 200 µL, 1000 µL; Sarstedt, Nümbrecht (D)
12-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht (D)
6-well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Reaktionsgefäß	1,5 mL; Sarstedt, Nümbrecht (D)
Sterilfilter, Filtopur S 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Stericup™ Vacuum Filter Cubs	Millipore, Billerica (USA)
Spritzen	PeqLab, Erlangen (D)

### 2.1.3 Kits

Tab. 2.3: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Life Technologies, Carlsberg (USA)
BioRad Protein Assay	BioRad, München (D)
Neon® Transfection System	Life Technologies, Carlsbad (USA)
SuperSignal West Pico Detektion	Thermo Scientific, Rockford (USA)

### 2.1.4 Bakterienstämme und eukaryotische Zellen

Tab. 2.4: Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften
DH5 $\alpha$	F $^-$ $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>endA1</i> <i>glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> <i>hsdR17</i> (rK- mK+), $\lambda^-$

Tab. 2.5: Verwendete eukaryotische Zellen

Zellen	Herkunft
Primäre humane Makrophagen	Eigene Isolation <i>buffy coats</i> wurden von Frank Bentzin (Institut für Transfusionsmedizin, UKE, Hamburg) gestellt

### 2.1.5 Medien, Medienzusätze und Antibiotika

Tab. 2.6: Verwendete Medien

Bezeichnung	Hersteller/ Herstellung
Kulturmedium	Zur Kultivierung von primären humanen Makrophagen; RPMI-1640 (PromoCell, Heidelberg (D)) 100 Einheiten/ mL Penicillin 100 $\mu$ g/mL Streptomycin

	2 mM Glutamin
	20 % humanes Serum (gewonnen aus Vollblut; Zentrifugation: 3220 x g, 10 min)
LB-Broth	Zur Kultivierung von <i>E. coli</i> ; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	20 g/L
LB-Agar	Zur Kultivierung von <i>E. coli</i> ; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	35 g/L

Tab. 2.7: Verwendete Antibiotika und Medienzusätze

Substanz	Endkonzentration/ Hersteller
Penicillin	100 Einheiten/mL
PP2	25 µM
Streptomycin	100 µg/mL
Kanamycin	50 µg/mL

## 2.1.6 Chemikalien und Puffer

Alle Chemikalien und Antibiotika wurden bei Amersham/GE Healthcare, München (D); BD Biosciences, Heidelberg (D); Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad (USA); Roche, Mannheim (D); Biozym, Oldendorf (D); Merck, Darmstadt (D); PromoCell, Heidelberg (A); Roth, Karlsruhe (A) oder Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) erworben. Die Puffer wurden für 20 min bei 120 °C und 1,4 bar autoklaviert. Der Complete Protease Inhibitor Cocktail wurde bei Roche, Basel (CH), erworben.

Tab. 2.8: Häufig verwendete Puffer

Puffer	Zutaten	Konzentration
PBS (10x)	NaCl	137 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	26,5 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M
	KCl	17,6 mM
	ddH <sub>2</sub> O	pH 7,7

PBST	Tween20	0,3 %
	1x PBS	
Trenngel-Puffer (SDS-PAGE)	Tris Base	1,5 M
	SDS	0,004 % w/v
	ddH <sub>2</sub> O	pH 8,8
Sammelgel-Puffer (SDS-PAGE)	Tris Base	0,5 M
	SDS	0,004 % w/v
	ddH <sub>2</sub> O	pH 6,8
Ladepuffer (5x) (SDS-PAGE)	Tris/HCL, pH 6,8	250 mM
	Glycerol	20 % w/v
	SDS	8 % w/v
	Bromphenolblau	4 mg
	β-Mercaptoethanol	4 % v/v
	ddH <sub>2</sub> O	
Laufpuffer (10x) (SDS-PAGE)	Tris Base	0,025 M
	Glycin	0,192 M
	SDS	0,1 % w/v
	ddH <sub>2</sub> O	
TBS (10x)	Tris HCl	200 mM
	NaCl	1,5 M
	ddH <sub>2</sub> O	pH 7,4
RF1 (4 °C)	RbCl	100 mM
	MnCl <sub>2</sub>	50 mM
	Kaliumacetat	30 mM
	CaCl <sub>2</sub>	10 mM
	Glycerin	15 % w/v
	ddH <sub>2</sub> O	pH 5,8
RF2 (4 °C)	MOPS	10 mM
	RbCl	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	75 mM
	Glycerin	15 % w/v
	ddH <sub>2</sub> O	pH 6,8

## 2.1.7 Protein-Größenstandards

Tab. 2.9: Verwendete Protein-Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
PageRuler™	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Prestained Protein Ladder	
PageRuler™	Thermo Scientific, Rockford (USA)
Unstained Protein Ladder	

## 2.1.8 Plasmide

Tab. 2.10: Verwendete Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Hersteller/ bezogen von
pEGFP-C1	Expression von EGFP, leere MCS, N-terminaler <i>tag</i>	Clontech, Heidelberg (D)
pLifeActTagGFP2-N	LifeAct mit TagGFP2- Fusionsprotein	Ibidi, Martinsried (D)
pEGFP-Aktin	pEGFP mit G-Aktin	
pEGFPINF2-nonCAAX	pEGFP mit INF2-nonCAAX	H. Higgs
pEGFPINF2-nonCAAX-A149D	pEGFP mit INF2-nonCAAX, Aminosäureaustausch A149D, konstitutiv aktiv	H. Higgs
GFP-Supervillin	Supervillin mit GFP- Fusionsprotein	E. J. Luna

## 2.1.9 siRNA

Tab. 2.11: siRNA-Sequenzen

Zielprotein	Sequenz (5'-3')	Hersteller
Luciferase	non-targeting siRNA #2	Dharmacon
INF2 siRNA#1	CCAUGAAGGCUUCCGGGA	Ambion®
INF2 siRNA#2	CAUCCAACGUGAUGGUGAA	Ambion®

## 2.1.10 Antikörper

### 2.1.10.1 Primäre Antikörper

Tab. 2.12: Verwendete primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller/ bezogen von	Verdünnung WB	Verdünnung IF
Aktin	Maus	Millipore	1:5000	-
Vinculin	Maus	Sigma	-	1:500
INF2	Kaninchen	H. Higgs	1:500	1:50
INF2-nonCAAX	Kaninchen	H. Higgs	1,5 ng/mL	-
INF2-CAAX	Kaninchen	H. Higgs	1,5 ng/mL	-

F-Aktin wurde mit AlexaFluor® 488-, 568- oder 647-markiertem Phalloidin (Invitrogen) in einer Verdünnung von 1:50 visualisiert.

### 2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Tab. 2.13: Verwendete sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor® 568 Ziege anti-Maus	Invitrogen	1:200
Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Kaninchen	Invitrogen	1:200
Alexa Fluor® 568 Ziege anti-Kaninchen	Invitrogen	1:200
Anti-Maus IgG, HRP-konjugiert	GE Healthcare	1:5000
Anti-Kaninchen IgG, HRP-konjugiert	GE Healthcare	1:5000

## 2.1.11 Programme (*software*)

Tab. 2.14: Verwendete Programme

Programm	Hersteller
Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems GmbH, München (D)
Excel	Microsoft, Redmond (WA)
ImageJ	Bethesda (USA)
Leica confocal software	Leica, Wetzlar (D)

---

Prism 6	GraphPad, La Jolla (CA)
Volocity 6.0	PerkinElmer Life Sciences, Boston (USA)
Volocity DEMO	PerkinElmer Life Sciences, Boston (USA)

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

In dieser Arbeit wurden *E. coli* DH5 $\alpha$  verwendet. *E. coli* wurden über Nacht bei 37 °C unter aeroben Bedingungen in flüssigem LB-Medium (160-210 rpm) oder auf festem LB-Agar kultiviert. Bei transformierten *E. coli* wurde 50  $\mu$ g/mL Kanamycin zugegeben.

#### 2.2.1.2 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*

Die Herstellung von chemisch kompetenten Bakterien wurde beschrieben von Hanahan *et al.* (1991). Zur Anzucht wurden 5 mL LB-Broth mit einer *E. coli* DH5 $\alpha$ -Kolonie beimpft und über Nacht inkubiert. Mit 500  $\mu$ L der Übernachtskultur wurden 500 mL LB-Broth angeimpft. Diese wurden inkubiert bis sie eine OD<sub>600</sub> (optische Dichte bei 600 nm) von 0,3 bis 0,6 erreicht hat. Nach Abkühlen der Kultur auf Eis wurden die Bakterien 5 min bei 3000 rpm, 4 °C sedimentiert und das Pellet in 15 mL RF1 resuspendiert und für 1,5 h auf Eis inkubiert. Nach erneutem Pelletieren für 5 min bei 3000 rpm und 4 °C wurde das Pellet in 20 mL RF2 durch vorsichtiges Schwenken des Gefäßes auf Eis resuspendiert. Aliquots von 100  $\mu$ L wurden schockgefroren in flüssigem Stickstoff und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.1.3 Transformation von kompetenten *E. coli*

Ein Aliquot von 100  $\mu$ L kompetenter Bakterien wurde für 30 min auf Eis aufgetaut und 1-100 ng Plasmid-DNA hinzugefügt. Nach weiteren 30 min Inkubation auf Eis wurde die DNA durch einen Hitzeschock von 5 min bei 37 °C in die Bakterien eingeführt. Nach einer Erholungsphase von 2 min auf Eis wurden die Zellen in 500  $\mu$ L LB-Medium

mit 20 % Glucose aufgenommen und für 1 h bei 37 °C mit 1400 rpm geschüttelt. Danach wurden die Bakterien auf LB-Selektionsagarplatten (50 µg/mL Kanamycin) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht zur Selektion auf Plasmid-positive Klone inkubiert.

#### **2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA (Maxi-Prep, endofree)**

Zur Gewinnung von reiner, Endotoxin-freier Plasmid-DNA für die Transfektion von Makrophagen wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in einem Maßstab von 100 mL. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA erfolgte spektralphotometrisch mit Hilfe des NanoDrop® ND-1000 bei einer Wellenlänge von 260 nm. Sequenzierungen zur Überprüfung der Plasmide erfolgten bei SEQLAB Sequence Laboratories GmbH, Göttingen (D) nach den von der Firma gewünschten Angaben.

### **2.2.2 Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.2.1 Isolierung und Kultivierung von primären humanen Makrophagen**

Humane Monozyten wurden aus *buffy coats* isoliert und anschließend für sechs bis sieben Tage zu Makrophagen differenziert. Die *buffy coats*, in denen Lymphozyten nach der Zellseparation von peripherem, humanem Blut angereichert vorliegen, wurden freundlicherweise von Frank Bentzin (Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) gestellt.

Zur Isolation wurden 15 mL eisgekühltes Lymphozytenseparationsmedium (*lymphocyte separation medium*, GE Healthcare) mit 20 mL Blut vorsichtig beschichtet und das Blut durch eine Zentrifugation für 30 min bei 4 °C, 460 x g, ohne Bremse in seine Bestandteile aufgetrennt. Der Leukozytenfilm (*buffy coat*) wurde anschließend in eisgekühltes RPMI-1640 überführt, auf 50 mL aufgefüllt und 10 min bei 4 °C und 460 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 50 mL eiskaltem RPMI-1640 resuspendiert und für 10 min bei 4 °C und 460 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Das Pellet wurde anschließend in 1,5 mL Monozytenpuffer resuspendiert, 250 µL anti-CD14-Antikörper-gekoppelte

Magnetkugeln (CD14 MACS MicroBeads, Miltenyi) dazugegeben, vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Separierungssäulen ( $\mu$  Columns, Miltenyi) am  $\mu$ MACS™ Separator befestigt und mit 1 mL Monozytenpuffer äquilibriert. Die oben genannte Zellsuspension wurde auf die Separierungssäulen aufgetragen, 1x mit 1 mL Monozytenpuffer gewaschen und anschließend mit 3 mL Monozytenpuffer in 10 mL eiskaltes RPMI-1640 eluiert. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königsfeld) unter Verwendung eines Mikroskops (Nikon Eclipse TS100) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro well in 6-well-Platten ausgesät. Nach 2 bis 4 h Adhärenz wurde das RPMI-1640 entfernt und je 1,5 mL Kulturmedium zugefügt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt.

Monozytenpuffer:	2 mM EDTA, pH 7,4
	0,5 % humanes Serumalbumin
	DPBS (Gibco)

### 2.2.2.2 Ablösen von adhärennten Makrophagen

Die Zellen wurden nach dem Entfernen des Kulturmediums mit 1 mL sterilem DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500  $\mu$ L Accutase® Cell Detachment Solution (Innovative Cell Technologies, San Diego, USA) und eine Inkubation von 15 min bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit. Die enzymatische Wirkung der Accutase wurde durch Zugabe von 500  $\mu$ L Kulturmedium gestoppt und die Zellen durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren abgelöst und in einem Falcon gesammelt. Durch anschließende Zentrifugation bei 460 x g wurden die Zellen sedimentiert, das Accutase/Kulturmedium-Gemisch entfernt und in DPBS resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und die benötigte Menge an Zellen für nachfolgende Versuche erneut bei 460 x g sedimentiert.

### 2.2.2.3 Transfektion von Makrophagen

Die Transfektion von Makrophagen erfolgte am sechsten oder siebten Tag nach der Isolierung. Sie wurde mit Hilfe des Neon® Transfektions-Systems der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) mit Standardeinstellungen (1000 V, 40 ms, zwei Pulse)

durchgeführt. Für die Transfektion von  $1 \times 10^5$  Zellen wurden 10  $\mu\text{L}$  Neon<sup>®</sup>-Pipettenspitzen mit einer Menge von 0,5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA oder 1  $\mu\text{M}$  siRNA und für  $6 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen wurden 100  $\mu\text{L}$  Neon<sup>®</sup>-Pipettenspitzen mit einer Menge von 5  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA oder 1  $\mu\text{M}$  siRNA nach Herstellerangaben verwendet. Für Western-Blot-Analysen wurden die Zellen in 6-well-Platten, für Immunfluoreszenzexperimente mit fixierten Zellen auf Deckgläschen und für die Mikroskopie von lebenden Zellen auf WillCo-dish<sup>®</sup>-Glasboden-Petrischalen mit 12 mm Durchmesser (WillCo, Amsterdam, NL) ausgesät.

#### 2.2.2.4 Fixierung von Makrophagen

Zur Fixierung von Makrophagen wurde 1,5 mL 3,7 % Formaldehyd/PBS vorgelegt und das Deckgläschen mit den Makrophagen vorsichtig in die Lösung transferiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Deckgläschen in 1 x PBS überführt und konnte bis zur Immunfluoreszenzfärbung bei 4 °C gelagert werden.

#### 2.2.2.5 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden für 1 min auf Eis inkubiert, das Kulturmedium entfernt und 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Je nach Dichte der Zellen erfolgte das Abschaben mit einem sterilen Zellschaber unter Zugabe von 100 bis 200  $\mu\text{L}$  Lysepuffer. Das Lysat wurde in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und unter mehrfachem Vortexen für 30 min auf Eis inkubiert. Für das Entfernen der Zelltrümmer wurden die Lysate für 10 min, 1000 x g, 4 °C sedimentiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Zur Bestimmung der Konzentration wurde das BSA-Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Messungen erfolgten mit dem NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000.

Lysepuffer:	150 mM NaCl
	1 % Triton X-100
	50 mM Tris-HCl
	pH 8,0
	Protease Inhibitor (Roche, Basel, Schweiz)

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 SDS-PAGE

Die Proben wurden mit 5x SDS-PAGE-Ladepuffer gemischt, 5 min bei 95 °C gekocht und anschließend in die Kammern des Gels überführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 100-150 V.

**Tab. 2.15: Gelzusammensetzung (SDS-PAGE)**

Zutaten	Sammelgel	Trenngel (10 %)
ddH <sub>2</sub> O	2,6 mL	4,2 mL
Sammelgel-Puffer	1,4 mL	-
Trenngel-Puffer	-	2,5 mL
30 % Acylamid	1 mL	3,3 mL
10 % SDS	50 µL	100 µL
10 % APS	25 µL	50 µL
TEMED	7 µL	10 µL

### 2.2.3.2 Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE wurde das Bandenmuster der Proteine unter Verwendung des iBlot® Dry Blotting Systems (Life Technologies) auf die bereitgestellte Nitrozellulosemembran nach Herstellerangaben (Programm 2, 11 min) übertragen. Die Membran wurde anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver in PBST blockiert und mit primärem Antikörper in entsprechender Verdünnung (Tabelle 2.12) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für je 10 min wurde die Membran mit einem HRP-gekoppeltem, sekundären Antikörper (Tabelle 2.13) in PBST für 45 min inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten mit PBST für 10 min wurden die Proteinbanden mit dem SuperSignal West Pico Detektions-Kit auf X-Omat AR Filmen (Kodak) detektiert. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit ImageJ.

## 2.2.4 Mikroskopie und Analyse fixierter Proben

Die Aufnahmen (bis auf SIM) wurden mittels des konfokalen *laser scanning* Mikroskops Leica TCS SP2 durchgeführt, das mit dem automatisierten Leica Mikroskopstativ DM-IRE2, einem Akusto-optischen Strahlteiler (AOBS), dem Objektiv HCX PL APO 63x (NA 1.4, Öl, lambda blue) und drei PMT (*photon multiplier tubes*)-Detektoren ausgestattet ist.

### 2.2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Visualisierung von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurden die fixierten Zellen (2.2.2.4) mit 0,5 % Triton/PBS für 5 min permeabilisiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungen mit 5 % NGS (normales Ziegen Serum, *normal goat serum*) und 5 % NHS (normales Humanserum, *normal human serum*) in 0,05 % Triton/PBS für 1 h bei Raumtemperatur gesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit 0,05 % Triton/PBS wurden die Zellen für 45 min bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (Tabelle 2.12) in 0,05 % Triton/PBS inkubiert. Sollte eine Detektion von mehreren Proteinen erfolgen, wurden die nichtgebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 0,05 % Triton/PBS entfernt und mit einem weiteren primären Antikörper in 0,05 % Triton/PBS für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit dem speziesspezifischem, fluoreszenzmarkierten Antikörper in 0,05 % Triton/PBS für 30 min bei Raumtemperatur. Bei Färbung mehrerer Zielproteine erfolgte diese Inkubation gleichzeitig. Die nichtgebundenen Antikörper wurden erneut in drei Waschschrritten mit 0,05 % Triton/PBS entfernt. Abschließend wurde F-Aktin mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin für 20 min bei Raumtemperatur gefärbt, einmal mit PBS und zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und die Deckgläschen auf Objektträgern mit Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, D) / 25 mg/mL DABCO 626 (Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) eingedeckelt. Idealerweise konnte das Mowiol über Nacht bei 4 °C aushärten.

Wurden die Zellen nur mit fluoreszenz-gekoppeltem Phalloidin gefärbt, wurden die fixierten Zellen wie oben beschrieben permeabilisiert, einmal mit 0,05 % Triton/PBS gewaschen, 20 min mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin inkubiert und abschließend einmal mit PBS und zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen sowie die Deckgläschen auf Objektträgern mit Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, D) / 25 mg/mL DABCO 626 (Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) eingedeckelt.

## 2.2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung für SIM

Je  $1 \times 10^6$  Zellen wurden mit Kontroll-siRNA, INF2 siRNA#1 und INF2 siRNA#2 transfiziert und in 1 mL Kulturmedium aufgenommen. Davon wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen (100  $\mu$ L) auf Deckgläschen in einer 12-well-Platte ausgesät und die restlichen  $9 \times 10^5$  Zellen (900  $\mu$ L) für den Nachweis des Knockdowns mittels Western-Blot in 6-well-Platten überführt. Nach Absetzen der Zellen (30 min) wurde 1 mL Kulturmedium zugegeben und die Zellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 72 h wurden die  $9 \times 10^5$  Zellen wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben lysiert und der Knockdown mittels Western-Blot nachgewiesen.

Die Immunfluoreszenzfärbung der verbleibenden  $1 \times 10^5$  erfolgte in 12-well-Platten nach einem Protokoll von Alessandra Cambi und Ben Joosten (Department of Tumour Immunology, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center, Nijmegen, NL). Dazu wurde das Kulturmedium von den Zellen entfernt, 1x mit PBS gewaschen und zur Vor-Permeabilisierung und Vor-Fixierung Cytoskelettpuffer (CB) / 0,25 % Formaldehyd (Methanolfrei) / 0,05 % Triton-X100 hinzugegeben und für 1 min bei 37 °C inkubiert. Die Fixierung folgte mit 4 % Formaldehyd (Methanolfrei) / CB für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mit CB / 0,5 % Triton-X100 für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach 1x waschen mit CB / 0,1 M Glycin und 2x waschen mit TBS-T für jeweils 10 min bei Raumtemperatur wurden die unspezifischen Antigene durch Blockieren für 60 min bei Raumtemperatur mit TBS-T / 5 % NGS (normales Ziegen Serum (*normal goat serum*)) und 5 % NHS (normales Humanserum (*normal human serum*)) gesättigt. Zudem wurde der Blockierungslösung Phalloidin-Alexa Fluor® 488 zur Färbung des F-Aktins hinzugefügt.

Die Zellen wurden 2x 5 min mit TBS-T und 2x mit TBS gewaschen und anschließend mit 250  $\mu$ L 0,1  $\mu$ m Tetraspec *beads* (life technologies, Darmstadt, D) in einer Verdünnung von 1:2000 für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 2x waschen wurden die Deckgläschen mit 6  $\mu$ L Mowiol (Calbiochem, Darmstadt, D) / 25 mg/mL DABCO 626 (Sigma–Aldrich, Saint Louis, USA) auf Objektträgern eingedeckelt.

Die hochauflösende Mikroskopie wurde freundlicherweise von Ben Joosten und Alessandra Cambi (Department of Tumour Immunology, Radboud Institute for Molecular Life Sciences, Radboud University Medical Center, Nijmegen, NL) mit einem Zeiss Elyra PS1 System durchgeführt. Die SIM-Daten wurden mit einem 63x 1.4NA Ölobjectiv aufgenommen. Die Anregung der Fluorophore erfolgte mit 405, 488, 561,

642 100mW Diodenlasern zusammen mit entsprechenden BP420-480 + LP750, BP495-575 + LP750, BP570-650 + LP750 oder LP655 Anregungsfiltern.

Zur Analyse wurden die erhaltenen Erscheinungsbilder der Podosomen und F-Aktin-Kabel in vier subjektive Kategorien eingeteilt und demnach je zwei Ausschnitte von sechs verschiedenen Zellen pro Kondition bewertet.

Cytoskelettpuffer (CB):	10 mM MES 138 mM KCl 3 mM MgCl 2 mM EGTA pH 6,1 steril filtriert mit 0,22 µm-Filter Lagerung bei 4 °C
TBS-T:	TBS 0,1 % Tween 20

### 2.2.4.3 Anzahl von Podosomen

Zur Bestimmung der Anzahl von Podosomen pro Zelle wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen mit Kontroll-siRNA, INF2 siRNA#1 oder INF2 siRNA#2 transfiziert. Je  $1 \times 10^5$  Zellen wurden auf einem Deckgläschen in einer 12-well-Platte, die restlichen  $9 \times 10^5$  Zellen zur Überprüfung des Knockdowns mit Hilfe des Western-Blots in 6-well-Platten ausgesät. Nach 30 min Absetzen der Zellen erfolgte die Zugabe von 1 mL Kulturmedium und eine Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit. Nach 72 h wurden die Zellen für den Nachweis im Western-Blot lysiert, die Zellen auf den Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und mit AlexaFluor®-488-gekoppeltem Phalloidin gefärbt.

Des Weiteren wurde die Anzahl von Podosomen in Makrophagen bestimmt, die das konstitutiv aktive INF2 überexprimieren. Dazu wurden je  $1 \times 10^5$  Zellen mit pEGFP-INF2-nonCAAX-A149D oder dem Kontrollvektor (Leervektor, pEGFPC1) transfiziert. Nach Absetzen der Zellen erfolgte die Zugabe von 500 µL Kulturmedium. Nach insgesamt 6 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit AlexaFluor®-568-gekoppeltem Phalloidin gefärbt.

Zur Auswertung wurden Bilder von je 100 Zellen pro Knockdown und je 30 Zellen pro Überexpression von drei individuellen Donoren mit dem oben erwähnten Mikroskop aufgenommen (Zoom 1,5). Die Auswertung erfolgte mit ImageJ. Dazu wurden die einzelnen Zellen eingerahmt, dem ROI-Manager hinzugefügt und mit dem Macro 1 (Anhang, Kapitel 7, Tabelle 7.1) die Anzahl der Podosomen pro Zelle bestimmt. Die in dieser Arbeit verwendeten Macros wurden Cervero *et al.* entnommen oder anlehndend verändert (2013). Die Daten wurden mit Excel 2013 prozessiert und die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 und dem unpaired Student's t-test.

#### **2.2.4.4 Durchmesser von Podosomen**

Zur Bestimmung des Durchmessers von Podosomen wurden die Zellen (Knockdown und Überexpression) aus 2.2.4.3 erneut ausgewertet.

Die Auswertung erfolgte mit ImageJ. Dazu wurde von den Podosomen aus je acht Makrophagen aus drei individuellen Donoren der Durchmesser mit dem Linientool von ImageJ bestimmt. Die Daten wurden mit Excel 2013 prozessiert und die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 und dem unpaired Student's t-test.

#### **2.2.4.5 Höhe von Podosomen**

Zur Bestimmung der Höhe von Podosomen wurden erneut je  $1 \times 10^6$  Zellen mit Kontroll-siRNA, INF2 siRNA#1 oder INF2 siRNA#2 transfiziert. Je  $1 \times 10^5$  Zellen wurden auf einem Deckgläschen in einer 12-well-Platte, die restlichen  $9 \times 10^5$  Zellen zur Überprüfung des Knockdowns mit Hilfe des Western-Blots in 6-well-Platten ausgesät. Nach 30 min Absetzen der Zellen erfolgte die Zugabe von 1 mL Kulturmedium und die Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit. Nach 72 h wurden die Zellen für den Nachweis im Western-Blot lysiert, die Zellen auf den Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und mit AlexaFluor®-488-gekoppeltem Phalloidin gefärbt.

Zur Auswertung wurden Z-stacks im Abstand von 0,122 µm von je acht Zellen pro Knockdown von drei individuellen Donoren mit dem oben erwähnten Mikroskop aufgenommen (Zoom 3,5). Die anschließende Auswertung erfolgte mit ImageJ. Dazu wurden den einzelnen Podosomen mit Macro 2 (Anhang, Kapitel 7, Tabelle 7.2) ROIs zugewiesen, die Intensität der individuellen ROIs von jeder Z-stack-Aufnahme mit Macro 3 (Anhang, Kapitel 7, Tabelle 7.3) gemessen und mit Hilfe von Excel die Höhe

der Podosomen berechnet. Die Daten wurden mit Excel 2013 prozessiert und die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 und dem unpaired Student's t-test.

#### **2.2.4.6 Matrixabbau**

Zur Untersuchung des Effekts eines Knockdowns von INF2 auf den Matrixabbau wurden Deckgläschen mit Rhodamin-markierter Gelatine beschichtet. Die Gelatine (aus Schwein, ROTH, Karlsruhe, D) wurde mit NHS-Rhodamin (Thermo Scientific, Rockford, IL) nach Chen (1996) markiert. Die Beschichtung der Deckgläschen erfolgte in einer abgedunkelten, feuchten Kammer, die mit Parafilm ausgelegt war. Dazu wurden 30  $\mu\text{L}$  pro Deckgläschen der Rhodamin-markierten Gelatine mit 2 % Sucroslösung (Sucrose/PBS, 1 g/mL) auf dem Parafilm vorgelegt und die Deckgläschen vorsichtig darauf platziert. Nach einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurde je 100  $\mu\text{L}$  PBS unter die Deckgläschen pipettiert und die Deckgläschen, ohne die Matrix zu zerstören, mit einer Pinzette auf vorgelegtes 0,5 %iges Glutaraldehyd in ddH<sub>2</sub>O überführt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Deckgläschen wie oben beschrieben in eine 12-well-Platte überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Für die sterile Verwendung der beschichteten Deckgläschen folgte eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur mit 70 %igem Ethanol. Abschließend wurden die beschichteten Deckgläschen 15 min mit RPMI-1640 und 2x 15 min mit Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Mit siRNA- und Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen wurden, nach 72 h Inkubation, mit einer Dichte von  $8 \times 10^4$  auf den beschichteten Deckgläschen ausgesät und nach einer Inkubation von 6 h fixiert und mit AlexaFluor®-647-gekoppeltem Phalloidin gefärbt.

Für die Auswertung wurden Bilder von je 30 Zellen von drei verschiedenen Donoren aufgenommen und mit ImageJ der Abbau der Matrix bestimmt. Der Abbau der Gelatine durch die Zellen zeigt sich durch eine Abnahme oder einen Verlust der Fluoreszenzintensität der Gelatine. Die abgebauten Bereiche wurden markiert und die Intensität bestimmt. Die gewonnenen Daten wurden mit Excel prozessiert. Die Fluoreszenzintensität von nicht-abgebauter Gelatine wurde auf 100 % gesetzt und die Reduktion der Fluoreszenzintensität entsprach dem Matrixabbau. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 und dem unpaired Student's t-test.

### 2.2.4.7 Podosomen-Neubildungs-Assay

Die Durchführung des Podosomen-Neubildungs-Assays erfolgte nach Cervero *et al.* (2013). Dafür wurden je  $6 \times 10^5$  Zellen mit Kontroll-siRNA, INF2 siRNA#1 und INF2 siRNA#2 transfiziert und in 600  $\mu\text{L}$  Kulturmedium aufgenommen und auf je sechs Deckgläschen (je  $1 \times 10^5$  Zellen) in 12-*well*-Platten ausgesät. Nach Absetzen der Zellen für 30 min bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 90 % Luftfeuchtigkeit erfolgte die Zugabe von je 1 mL Kulturmedium. Nach 72 h Inkubation bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 90 % Luftfeuchtigkeit, wurde das Kulturmedium entfernt, 1x mit RPMI-1640 gewaschen und je 500  $\mu\text{L}$  RPMI-1640 hinzugegeben und für weitere 2 h inkubiert (Serumentzug). Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen für 30 min bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 90 % Luftfeuchtigkeit mit 25  $\mu\text{M}$  PP2/ RPMI-1640, während ein Deckgläschen als DMSO-Kontrolle (1,25  $\mu\text{L}$  DMSO/ 500  $\mu\text{L}$  RPMI-1640) mitgeführt wurde. Nach Ablauf der 30 min, wurden die Zellen eines PP2-behandelten Deckgläschens (+PP2) sowie die DMSO-Kontrolle (-PP2) fixiert. Die übrigen vier Deckgläschen wurden in ein neues 12-*well*-Gefäß mit je 500  $\mu\text{L}$  vorgelegtem Kulturmedium überführt (Auswaschen des Inhibitors). Die Fixierung der Zellen erfolgte nach 30 min, 60 min, 90 min oder 120 min Inkubation. Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und mit AlexaFluor®-488-gekoppeltem Phalloidin gefärbt.

Zur Auswertung wurden jeweils zehn Bilder von jeder Kondition pro Knockdown von drei individuellen Donoren aufgenommen und die Anzahl der Podosomen von mindestens 30 Zellen, wie in 2.2.4.3 beschrieben, bestimmt. Die Daten wurden mit Excel 2013 prozessiert und die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 und dem unpaired Student's t-test.

### 2.2.4.8 Podosomendichte während der Neubildung

Die Dichte der Podosomen wurde von den in 2.2.4.7 aufgenommenen und ausgewerteten Zellen bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit ImageJ, ausgenommen war die Kondition +PP2. Dazu wurde den Podosomen-bedeckten Flächen der Zellen ROIs zugewiesen und die Anzahl der Podosomen/ROI mit Macro 1 bestimmt. Zur Berechnung der Dichte wurde die Anzahl der Podosomen/ROI durch die ROI-Fläche geteilt (Podosomen/  $\mu\text{m}^2$ ). Die Daten wurden mit Excel 2013 prozessiert. Dabei wurde die Kontrolle -PP2 auf 1 gesetzt und die Werte entsprechend normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 und dem unpaired Student's t-test.

## 2.2.5 Mikroskopie und Analyse von lebenden Proben

Die Filme der lebenden Zellen wurden mit Hilfe des *spinning disc* Systems UltraVIEW VoX (Perkin Elmer, Waltham, MA) mit dem inversen Mikroskop Nikon Eclipse Ti (Düsseldorf, Deutschland) aufgenommen. An das Mikroskop war eine Temperatur- und CO<sub>2</sub>-kontrollierbare Inkubationskammer, die mit einer Objektivheizung verbunden war, angeschlossen (Tokai Hit INU-F1, Japan). Des Weiteren verfügte das System über das Yokogawa CSU X1 *spinning disc*, das Ölimmersionsobjektiv 60x Apo TIRF (corr.), einen 527 nm (W55) Emissionsfilter und eine Hamamatsu EM-CCD C9100-50 Kamera.

Die Filme für die FRAP-Experimente wurden mittels des konfokalen *laser scanning* Systems Leica TCS SP5 mit inversem Mikroskop DMI 6000, das mit einem Akustooptischen Strahlleiter (AOBS), einem Objektiv HCX PL APO 63x (NA 1.4, Öl), zwei HyD (*hybrid detector*)- und zwei PMT-Detektoren ausgestattet ist, aufgenommen.

### 2.2.5.1 Lebensdauer von Podosomen

Zur Ermittlung der Lebensdauer von Podosomen wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen mit Kontroll-siRNA, INF2 siRNA#1 und INF2 siRNA#2 transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit, wurden die Zellen abgelöst und je  $1 \times 10^5$  Zellen erneut mit siRNA und 0,5 µg pLifeActTagGFP2-N transfiziert und auf WillCo-dish®-Glasboden-Petrischalen ausgesät. Nach Absetzen der Zellen erfolgte eine Zugabe von 1,5 mL Kulturmedium und eine weitere Inkubation von 24 h.

Es wurden Filme von je drei Zellen von drei individuellen Donoren mit einem Bilderfassungsintervall von 15 s (4 Zeitpunkte/ min) über einen Zeitraum von 45 min mit dem *spinning disc* Mikroskop aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Volocity Demo. Die Lebensdauer eines Podosoms beginnt bei seinem Erscheinen oder bei der Abspaltung von einem vorhandenen Podosom und endet bei seiner Auflösung oder der Fusion mit einem vorhandenen Podosom. Bei der Auswertung wurden auch Podosomen berücksichtigt, die bereits zu Beginn oder bei Ende der 45 min-Filme vorhanden waren und eine Lebensdauer von 20 min überschritten. Die Daten wurden mit Excel 2013 prozessiert und die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 und dem unpaired Student's t-test.

### 2.2.5.2 Podosomenoszillation

Für die Ermittlung der Oszillationen von einzelnen Podosomen standen die Filme aus 2.2.5.1 zur Verfügung. Dabei wurden die Intensitäten von fünf einzelnen Podosomen einer Zelle von drei individuellen Donoren pro Kondition mit ImageJ über einen Zeitraum von ungefähr 20 min für jeden Zeitpunkt gemessen. Für die Auswertung wurden nur langlebige Podosomen berücksichtigt. Die Daten wurden mit Excel 2013 und GraphPad Prism 6 prozessiert. Die Variationskoeffizienten wurden mit GraphPad Prism 6 bestimmt und statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 und dem unpaired Student's t-test.

### 2.2.5.3 FRAP (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*)

Für die FRAP-Experimente wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen mit Kontroll-siRNA, INF2 siRNA#1 und INF2 siRNA#2 transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit, wurden die Zellen abgelöst und je  $1 \times 10^5$  Zellen erneut mit siRNA und 0,5 µg pEGFP-Aktin transfiziert und auf WillCo-dish®-Glasboden-Petrischalen ausgesät. Nach Absetzen der Zellen erfolgte eine Zugabe von 1,5 mL Kulturmedium und eine weitere Inkubation von 24 h.

Die Fluoreszenzerholung wurde für jeweils 30 einzelne Podosomen von drei Zellen aus drei individuellen Donoren gemessen. Die Aufnahmen erfolgten alle 1,29 s mit dem konfokalen *laser scanning* System Leica TCS SP5. Nach der Detektion von fünf Bildern vor der Photobleichung, wurden je zwei zirkuläre ROIs mit je einem Podosom für fünf Zeitpunkte mit 78 % Laserintensität des 405-Lasers geblichen. Die Fluoreszenzerholung wurde für weitere 60 s aufgenommen. Die Analyse der geblichenen Regionen erfolgte mit dem *FRAP profiler* von ImageJ, was die Normalisierung der Erholung gegen die Fluoreszenzintensitäten vor der Photobleichung beinhaltete. Die normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten wurden mit Excel 2013 prozessiert und mit GraphPad Prism 6 einer *two-phase* exponentiellen Kurve angepasst. Auch die Halbwertszeiten der Erholung wurden mit GraphPad Prism 6 bestimmt.

#### 2.2.5.4 Podosomen-Neubildungs-Assay

Zur genaueren Auswertung der Prozesse während der Neubildung der Podosomen wurde der Podosomen-Neubildungs-Assay ebenfalls in der Lebendzellmikroskopie durchgeführt. Dazu wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen mit Kontroll-siRNA und INF2 siRNA#1 transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchtigkeit, wurden die Zellen abgelöst und je  $1 \times 10^5$  Zellen erneut mit siRNA und 0,5 µg pLifeActTagGFP2-N transfiziert und auf WillCo-dish®-Glasboden-Petrischalen ausgesät. Nach Absetzen der Zellen erfolgte eine Zugabe von 1,5 mL Kulturmedium und eine weitere Inkubation von 24 h. Für die Behandlung mit PP2 ist ein Serumentzug notwendig. Dazu wurden die Zellen einmal mit RPMI 1640 gewaschen, 750 µL RPMI 1640 hinzugegeben und für weitere 2 h inkubiert.

Die Aufnahmen erfolgten mit dem *spinning disc* Mikroskop mit einem Bilderfassungsintervall von 15 s (4 Zeitpunkte/ min). Nach der Erfassung einer Zelle für 5 min erfolgte die Zugabe von 750 µL PP2 in RPMI 1640 (50 µM; Endkonzentration: 25 µM). Je nach Wirkung des Inhibitors wurde die Zelle bis zum vollständigen Verschwinden der Podosomen für weitere 30 min bis maximal 45 min aufgezeichnet. Durch zügiges, zweimaliges Waschen mit 1 mL Kulturmedium wurde der Inhibitor entfernt und die Aufnahme des Filmes für 1 h oder bis zum Erreichen des *steady states* (Zelle und Podosomenverteilung im Normalzustand) fortgesetzt.

Die Auswertung erfolgte mit Volocity Demo. Dazu wurden die *de novo* Bildung, die Abspaltung und das Verschwinden von Podosomen in einem definierten Bereich von je fünf Zellen von drei verschiedenen Donoren bis zum Erreichen des *steady states* gezählt. Die Daten wurden mit Excel 2013 prozessiert und die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6 und dem unpaired Student's t-test. Für die Regenbogenanalyse wurden die Filme mit ImageJ bearbeitet, indem jedem Zeitpunkt ein temporärer Farbton zugeteilt wurde, die in einem einzelnen Bild zusammengefasst wurden.

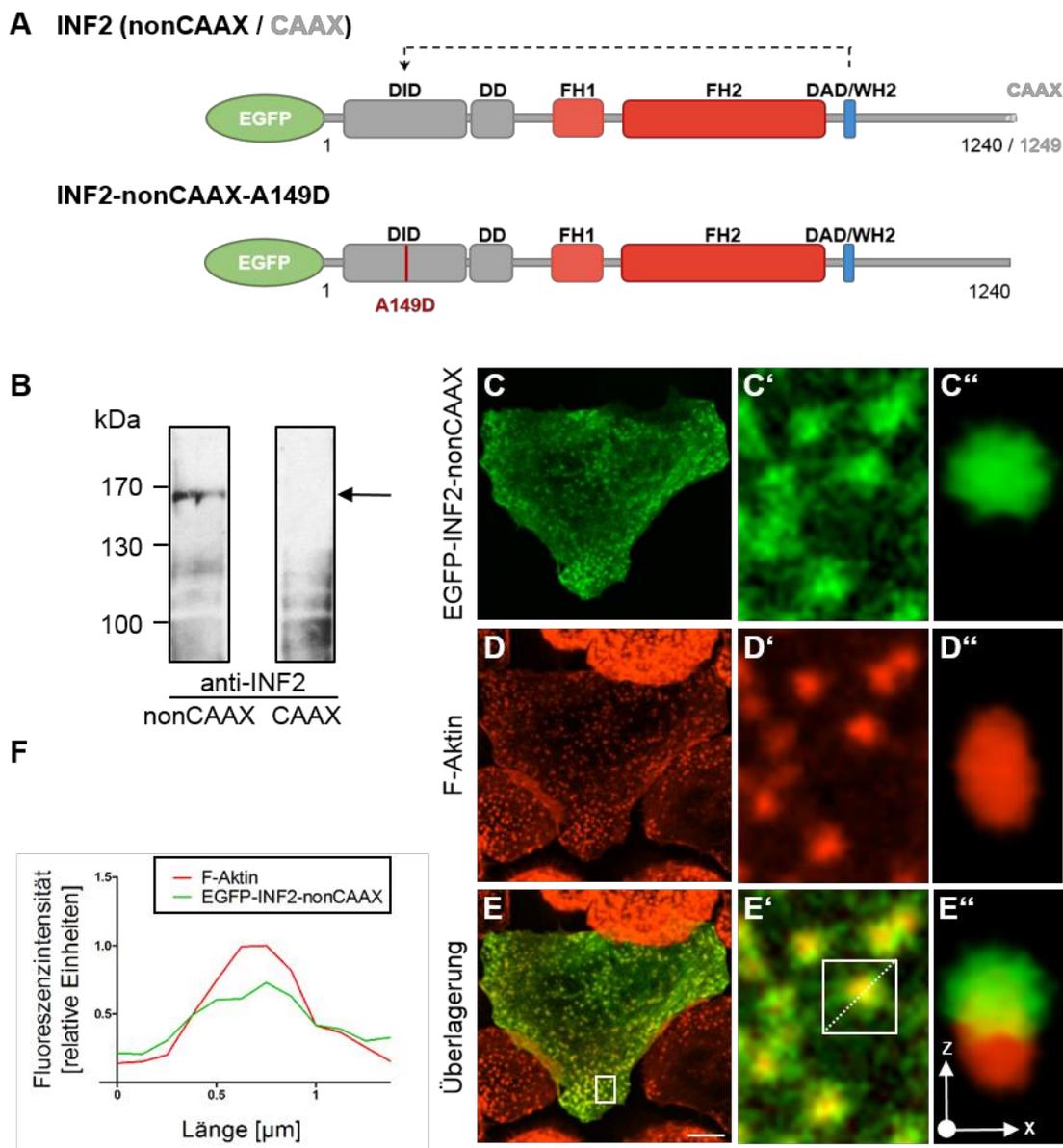
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 INF2-nonCAAX wird in humanen Makrophagen exprimiert und lokalisiert in der Podosomenkappe

INF2 wird Zelltyp-abhängig in zwei verschiedenen *splice*-Varianten exprimiert, welche sich durch das Vorhandensein einer CAAX-Box am C-Terminus unterscheiden. Die Prenylierung des Cysteinrestes in diesem Motiv vermittelt die Bindung an das endoplasmatische Retikulum (Ramabhadran *et al.*, 2011). Abbildung 3.1 A (oben) zeigt eine schematische Darstellung von INF2-CAAX und INF2-nonCAAX.

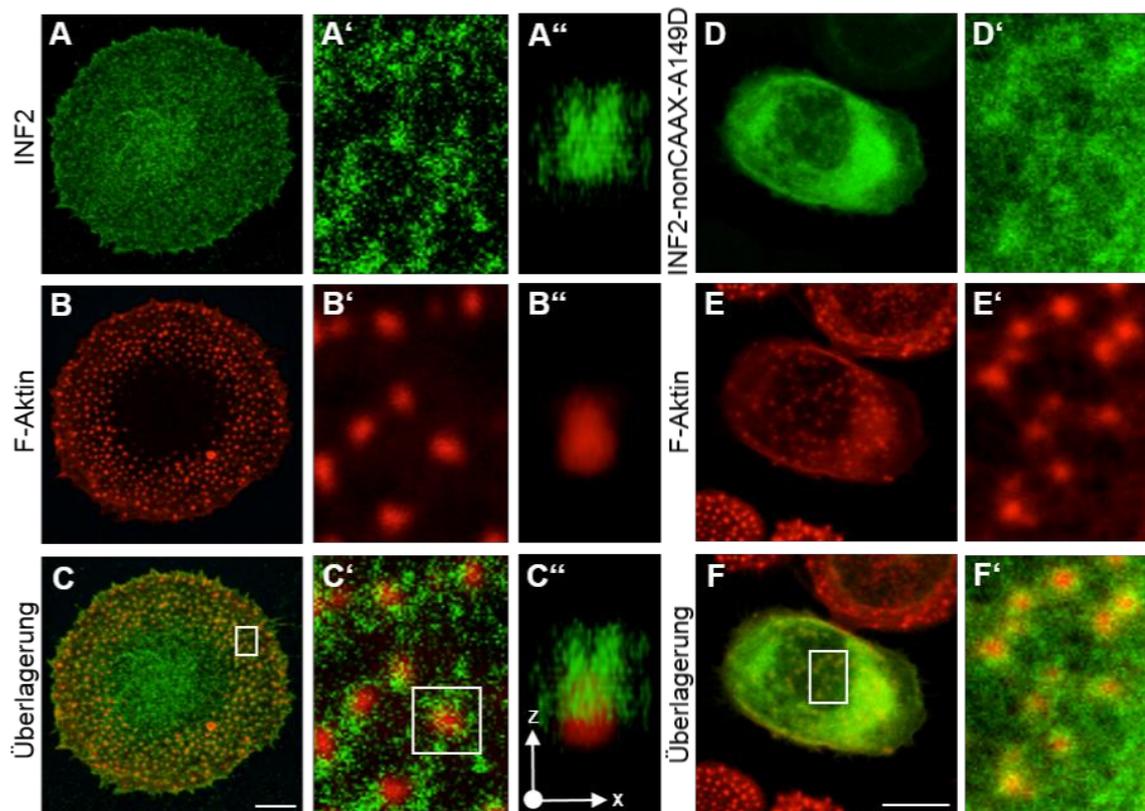
Durch Western-Blot-Analysen von Makrophagenlysaten unter Verwendung Isoform-spezifischer Antikörper wurde gezeigt, dass in humanen Makrophagen INF2 endogen exprimiert wird. Dabei konnte spezifisch nur die nonCAAX-Isoform detektiert werden (Abbildung 3.1 B).

Immunfluoreszenzfärbungen von EGFP-INF2-nonCAAX-exprimierenden Makrophagen zeigten, dass INF2 mit dem F-Aktin des Kerns kolokalisiert, das durch Alexa Fluor® 568-gekoppeltes Phalloidin markiert wurde (Abbildung 3.1 C-E, C'-E', F). Zusätzlich lokalisiert es geringfügig an den Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabeln. Interessanterweise zeigte eine dreidimensionale Rekonstruktionen einzelner Podosomen, dass INF2-nonCAAX nur partiell mit dem Podosomenkern kolokalisiert und hauptsächlich eine Kappe über dem Kern bildet (Abbildung 3.1 C''-E'').



**Abb. 3.1: Expression und Lokalisation von INF2.** (A) Domänenstruktur der EGFP-fusionierten INF2-Konstrukte. nonCAAX/CAAX: INF2-Isoformen mit unterschiedlichem C-Terminus (Zahlen der ersten und letzten Aminosäuren sind angegeben). Der Pfeil deutet die Autoinhibition durch die Bindung der DAD- an die DID-Domäne an. INF2-nonCAAX-A149D: die Mutation A149D in der DID-Domäne führt zur Aktivierung des Proteins (Ramabhadran *et al.*, 2012). EGFP: *enhanced green fluorescent protein*, DID: *diaphanous inhibitory domain*, DD: Dimerisierungsdomäne, FH: *formin homology domain*, DAD/WH2: *diaphanous autoregulatory domain/ Wiskott-Aldrich-Sydrome protein homology 2-Sequenz*. (B) Western-Blots von Makrophagenlysaten, die mit Isoform-spezifischen Antikörpern inkubiert wurden. Der Pfeil zeigt das detektierte INF2. Massenstandard in kDa. (C-E) Konfokale Aufnahmen von primären humanen Makrophagen, die EGFP-INF2-nonCAAX exprimieren (C, grün). Das F-Aktin des Podosomenkerns wurde durch Alexa Fluor® 568-gekoppeltes Phalloidin markiert (D, rot). Die Überlagerung zeigt die Lokalisation von EGFP-INF2-nonCAAX am Podosomenkern (E). Maßstabsbalken: 10 µm. Das weiße Kästchen zeigt die Auswahl, die in (C'-E') vergrößert dargestellt ist. Das weiße Kästchen in (E') zeigt den Bereich, von dem über konfokale z-Aufnahmen die 3D-Rekonstruktion eines einzelnen Podosoms erstellt wurde (C''-E''). Die Überlagerung (E'') zeigt die Lokalisation von EGFP-INF2-nonCAAX in der Podosomenkappe und partielle Kolo-kalisation mit dem Podosomenkern. Die gestrichelte Linie in (E') zeigt die Auswahl, die für das Intensitätsprofil verwendet wurde (F).

Die Lokalisation wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen von endogenem INF2 bestätigt (Abbildung 3.2 A-C). Endogenes INF2 lokalisierte ebenfalls an Podosomen und den verbindenden F-Aktin-Kabeln (Abbildung 3.2 A'-C'). Eine dreidimensionale Rekonstruktion einzelner Podosomen zeigte ebenfalls die Anreicherung von endogenem INF2 in der Podosomenkappe (Abbildung 3.2 A''-C''). (D-F) Konfokale Aufnahmen von primären humanen Makrophagen, die EGFP-INF2-nonCAAX-A149D exprimieren (D, grün). Das F-Aktin des Podosomenkerns wurde durch Alexa Fluor® 568-gekoppeltes Phalloidin markiert (E, rot). Entsprechende Überlagerung in (F). Das *weiße Kästchen* zeigt die Auswahl, die in (D'-F') vergrößert dargestellt ist. Maßstabsbalken: 10 µm.



**Abb. 3.2: Lokalisation von endogenem INF2 und INF2-nonCAAX-A149D.** Konfokale Aufnahmen von primären humanen Makrophagen gefärbt mit INF2-spezifischem Antikörper (**A**, grün) und entsprechendem sekundären Alexa Fluor® 488-gekoppeltem Antikörper, Alexa Fluor® 568-gekoppeltem Phalloidin für das F-Aktin des Podosomenkerns (**B**, rot) und entsprechender Überlagerung (**C**). Das *weiße Kästchen* zeigt die Auswahl, die in (**A'**-**C'**) vergrößert dargestellt ist. Das *weiße Kästchen* in (**C'**) zeigt den Bereich, von dem über konfokale z-Aufnahmen die 3D-Rekonstruktion eines einzelnen Podosoms erstellt wurde (**A''**-**C''**). (**D**-**F**) Konfokale Aufnahmen von primären humanen Makrophagen, die EGFP-INF2-nonCAAX-A149D exprimieren (**D**, grün). Das F-Aktin des Podosomenkerns wurde durch Alexa Fluor® 568-gekoppeltes Phalloidin markiert (**E**, rot). Entsprechende Überlagerung in (**F**). Das *weiße Kästchen* zeigt die Auswahl, die in (**D'**-**F'**) vergrößert dargestellt ist. Maßstabsbalken: 10 µm.

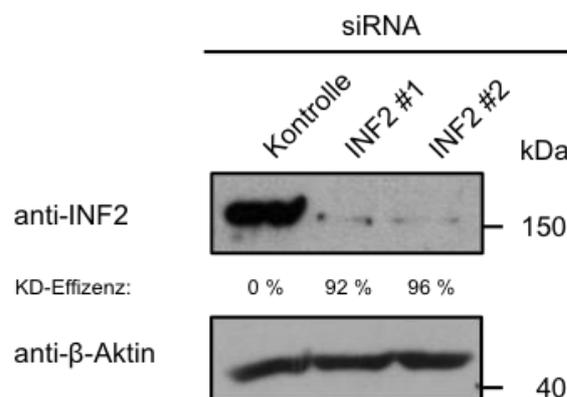
Da viele Formine durch Bindung der DAD-Domäne an die DID-Domäne autoinhibiert werden, wurde in dieser Arbeit zusätzlich eine konstitutiv aktive Form von INF2-nonCAAX verwendet (INF2-nonCAAX-A149D, Abbildung 3.1 A, unten). Die Autoinhibition wird durch einen Aminosäureaustausch an der Position 149 von Alanin zu Asparaginsäure verhindert (Ramabhadran *et al.* 2013). Auch die Überexpression von konstitutiv aktivem INF2-nonCAAX zeigte eine Lokalisation am Podosomenkern

(Abbildung 3.2 D-E, D'-E'). Zusätzlich kam es in der Zelle zu einer erhöhten Polymerisation von Aktin (Abbildung 3.2. E).

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird INF2-nonCAAX zur Vereinfachung als INF2 und INF2-nonCAAX-A149D als INF2-A149D abgekürzt.

### 3.2 Knockdown von INF2

Zur Untersuchung der strukturellen und funktionellen Rolle von INF2 an Podosomen in humanen Makrophagen wurde ein Knockdown des Proteins mit zwei kommerziell erworbenen siRNAs etabliert. Nach einmaliger Transfektion der Makrophagen und Inkubation von 72 h konnte mit beiden siRNAs ein Knockdown mit einer Effizienz von 92 % bzw. 96 %, normalisiert gegen  $\beta$ -Aktin, erreicht werden (Abbildung 3.3). Als Kontrolle diente siRNA, die gegen die Luciferase aus Glühwürmchen gerichtet. Dieses Gen ist im humanen Genom nicht vorhanden. Dieser Knockdown ist repräsentativ für alle folgenden Knockdown-Experimente zur Untersuchung von Podosomen-assoziierten Parametern, wie Anzahl, Größe, Lebensdauer, Oszillationen und Neubildung sowie dem Abbau extrazellulärer Matrix.



**Abb. 3.3: Knockdown von INF2.** Western-Blots von Makrophagenlysaten, die mit INF2-siRNA #1, INF2-siRNA #2 oder Luciferase-siRNA als Kontrolle transfiziert und nach 72 h lysiert wurden. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin (unterer Western-Blot). Die Knockdown-Effizienz ist unter den entsprechenden Banden angegeben. Molekulargewicht in kDa ist rechts dargestellt. Dieser Knockdown ist repräsentativ für alle Knockdown-Experimente.

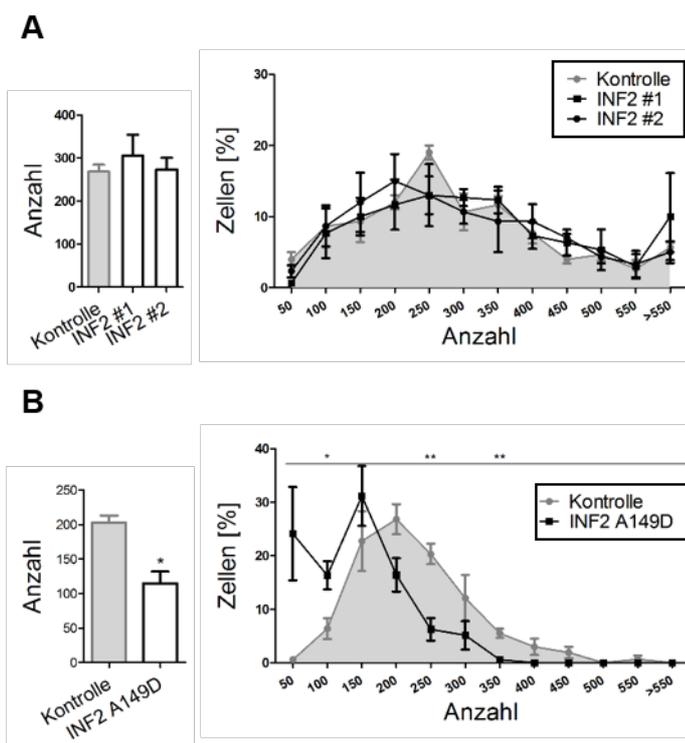
### 3.3 INF2 hat geringen Einfluss auf die Podosomenanzahl

Zum Nachweis der Funktion von INF2 an Podosomen von humanen Makrophagen wurde einleitend geprüft, ob die Anzahl der Podosomen im stationären Zustand durch

einen Knockdown von INF2 sowie durch Überexpression von INF2-A149D verändert wird.

SiRNA-transfizierte Zellen wurden nach 72 h fixiert und die Podosomen durch Alexa Fluor® 488-gekoppeltes Phalloidin sichtbar gemacht. Anschließend wurde die Podosomenanzahl von 3 x 100 Zellen mit ImageJ bestimmt und statistisch ausgewertet.

Die Quantifizierung ergab, dass INF2-siRNA-transfizierte Zellen keine signifikanten Unterschiede zu Kontrollzellen in der Anzahl an Podosomen haben (Durchschnittliche Podosomenanzahl pro Zelle: INF2 siRNA #1:  $305,33 \pm 15,76$ ; INF2 siRNA #2:  $273,67 \pm 27,30$ ; Kontrollzellen:  $268,67 \pm 15,76$ ; Abbildung 3.4 A, links). Zur genaueren Überprüfung wurden die Makrophagen nach ihrer Anzahl an Podosomen in Gruppen eingeteilt und ihr prozentuales Vorkommen bestimmt. Auch hier ist keine Veränderung durch einen INF2-Knockdown im Vergleich zu den Kontrollzellen nachweisbar (Abbildung 3.4 A, rechts).



**Abb. 3.4: Einfluss von INF2 auf die Podosomenanzahl in humanen Makrophagen.** Die totale und detaillierte Podosomenanzahl wurde von Zellen bestimmt, die **(A)** mit INF2-spezifischer siRNA (siRNA #1, siRNA #2: *schwarz*) oder Kontroll-siRNA (*grau*) behandelt waren oder **(B)** EGFP-INF2-nonCAAX-A149D (*schwarz*) und als Kontrolle EGFP-C1 (*grau*) exprimieren. Balkendiagramme links zeigen die durchschnittliche Anzahl der Podosomen pro Zelle. Für die Diagramme rechts wurden die Zellen nach der Anzahl der Podosomen in Gruppen geteilt und ihr prozentuales Vorkommen bestimmt. (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3 \times 100$  **(A)**; Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3 \times 30$  **(B)**). P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

Im Gegensatz dazu führt die Überexpression von INF2-A149D zu einer signifikanten Verringerung der Podosomenanzahl von  $202,70 \pm 10,4$  Podosomen pro Zelle in Kontrollzellen auf  $114,7 \pm 17,19$  Podosomen pro Zelle in INF2-A149D-überexprimierenden Zellen ( $P=0,0119$ ; Abbildung 3.4 B, links). Für die Bestimmung der Anzahl der Podosomen wurden Makrophagen mit INF2-A149D transfiziert, nach 6 h fixiert und die Podosomen mit Alexa Fluor® 568-gekoppeltem Phalloidin gekennzeichnet. Als Kontrolle dienten GFP-C1-transfizierte Zellen. Für die Quantifizierung wurde die Anzahl der Podosomen von 3 x 30 Zellen mit ImageJ bestimmt und statistisch ausgewertet. Teilt man die Makrophagen erneut nach ihrer Podosomenanzahl in Gruppen und bestimmt ihr prozentuales Vorkommen, zeigt sich eine signifikante Verschiebung des Graphen zu Zellen mit weniger Podosomen in INF2-A149D-exprimierenden Makrophagen im Vergleich zu den Kontrollzellen.

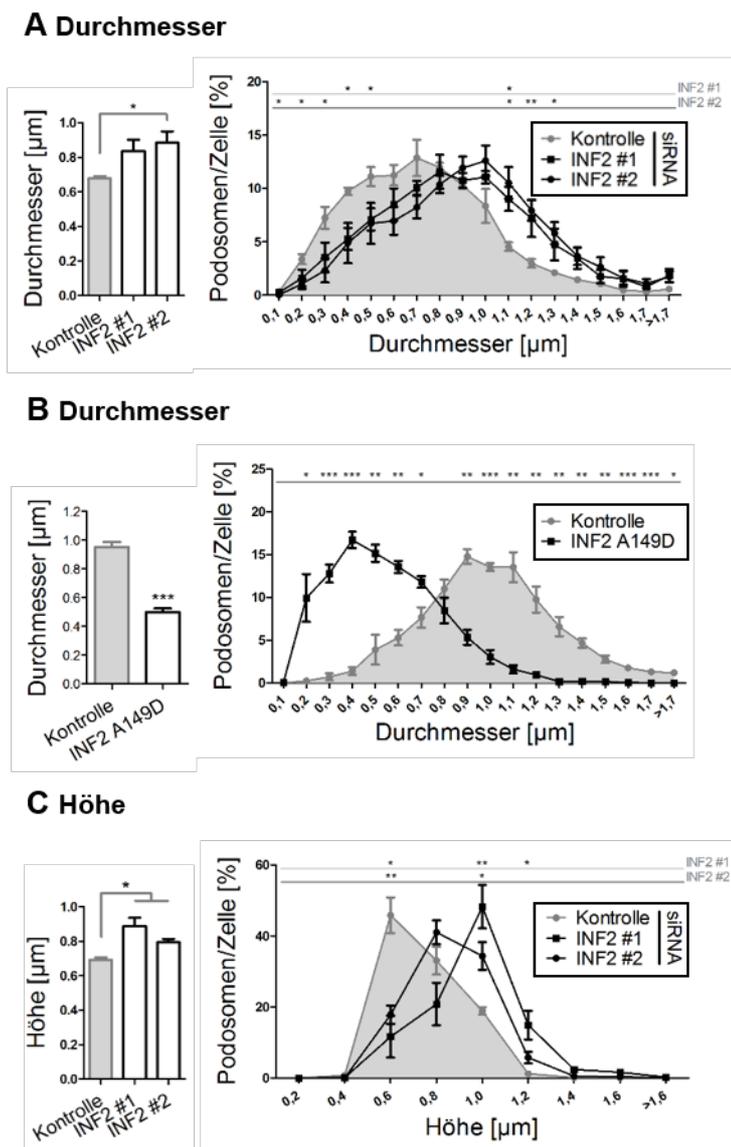
Zusammenfassend hat ein Knockdown von INF2 keinen Einfluss auf die Anzahl der Podosomen. Die Überexpression von konstitutiv aktivem INF2 verringert dagegen die Anzahl der Podosomen pro Zelle.

### **3.4 INF2 reguliert die Größe von Podosomen**

INF2 ist ein einzigartiges Formin, das neben der Nukleation und Polymerisation von F-Aktin auch Filamente schneiden und depolymerisieren kann (Chhabra und Higgs, 2006). Das lässt vermuten, dass INF2 diese Funktionen auf das F-Aktin im Podosomenkern ausüben kann und die Größe von Podosomen beeinflusst.

Zur Bestimmung der Größe wurden die Durchmesser der Podosomenkerne, die durch Alexa Fluor® 488-gekoppeltes Phalloidin markiert waren, von 3 x 8 siRNA-transfizierten Zellen mit ImageJ gemessen und statistisch ausgewertet.

Die Podosomenkerne von Makrophagen mit einem INF2-Knockdown zeigten im Durchschnitt einen signifikant größeren Durchmesser als die Podosomenkerne der Kontrollzellen (INF2 siRNA #1:  $0,84 \pm 0,06 \mu\text{m}$ ; INF2 siRNA #2:  $0,88 \pm 0,07 \mu\text{m}$ ,  $P=0,0365$ ; Kontrolle:  $0,68 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ; Abbildung 3.5 A, links). Bei genauerer Analyse der Durchmesser von Podosomenkernen in Gruppierungen nach ihrer Größe und ihrem prozentualen Anteil in der Zelle war eine signifikante Verschiebung von kleineren zu größeren Podosomen mit beiden INF2-siRNAs im Vergleich zu den Kontrollzellen nachweisbar (Abbildung 3.5 A, rechts).



**Abb. 3.5: Einfluss von INF2 auf die Größe von Podosomen.** Der Durchmesser von Podosomen von primären humanen Makrophagen wurde bestimmt, die **(A)** mit INF2-spezifischer siRNA (siRNA #1, siRNA #2: *schwarz*) oder Kontroll-siRNA (*grau*) transfiziert waren oder **(B)** EGFP-INF2-nonCAAX-A149D (*schwarz*) und als Kontrolle EGFP-C1 (*grau*) exprimieren. Balkendiagramme links zeigen die durchschnittlichen Durchmesser in  $\mu\text{m}$ . Für die Diagramme rechts wurden die Zellen nach den Durchmessern in Gruppen geteilt und ihr prozentuales Vorkommen in der Zelle bestimmt. Die Höhe der Podosomen wurde von primären humanen Makrophagen bestimmt, die mit INF2-spezifischer siRNA (siRNA #1, siRNA #2: *schwarz*) oder Kontroll-siRNA (*grau*) behandelt waren **(C)**. Das Balkendiagramm links zeigt die durchschnittliche Höhe in  $\mu\text{m}$ . Für das Diagramm rechts wurden die Zellen nach der Höhe in Gruppen geteilt und ihr prozentuales Vorkommen in der Zelle bestimmt. (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3 \times 8$  **(A, B, C)**). P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

In einem weiteren Experiment wurden die Durchmesser der Podosomenkerne, die durch Alexa Fluor<sup>®</sup> 568-gekoppeltes Phalloidin markiert waren, von 3 x 8 INF2-A149D-überexprimierenden Makrophagen gemessen. Überexpression der nicht-autoinhibierten Form von INF2 führte zu einer signifikanten Reduktion des

durchschnittlichen Durchmessers der Podosomenkerne (INF2-A149D:  $0,50 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ,  $P= 0,0005$ ; Kontrolle:  $0,95 \pm 0,03 \mu\text{m}$ ; Abbildung 3.5 B, rechts), was aus einer generellen Verschiebung der Durchmesser von größeren zu kleineren Podosomen resultierte (Abbildung 3.5 B, links).

Der Durchmesser gibt jedoch keinen eindeutigen Hinweis darauf, ob die Podosomenkerne im Allgemeinen größer sind (größerer Durchmesser und größeres Volumen) oder ob die reguläre Form der Podosomenkerne verändert ist (größerer Durchmesser, aber kleinere Höhe, was in einem unveränderten Volumen resultieren würde). Daher wurden zusätzlich z-Aufnahmen von Podosomen siRNA-transfizierter Makrophagen aufgenommen und die Höhe der Podosomenkerne, die durch Alexa Fluor® 488-gekoppeltes Phalloidin gekennzeichnet waren, bestimmt.

Auch die durchschnittliche Höhe der Podosomen war in INF2-Knockdown-Zellen signifikant größer als in Kontrollzellen (INF2 siRNA #1:  $0,89 \pm 0,05 \mu\text{m}$ ,  $P= 0,0154$ ; INF2 siRNA #2:  $0,79 \pm 0,02 \mu\text{m}$ ,  $P= 0,0118$ ; Kontrolle:  $0,69 \pm 0,01 \mu\text{m}$ ; Abbildung 3.5 C, links). Eine detaillierte Analyse der Höhe zeigte eine signifikante Verschiebung des prozentualen Anteils pro Zelle von niedrigeren zu höheren Podosomenkernen (Abbildung 3.5 C, rechts).

Zusammenfassend zeigen die Experimente, dass INF2 ein negativer Regulator des Podosomengröße ist und die reguläre Struktur von Podosomenkernen nicht beeinflusst.

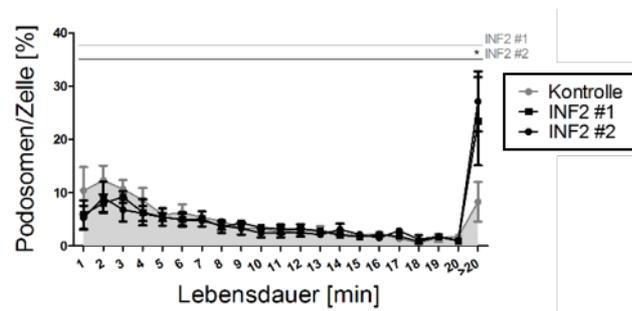
### **3.5 INF2 beeinflusst die Lebensdauer von Podosomen**

Podosomen sind sehr dynamische Strukturen mit einer durchschnittlichen Lebensdauer von 2-12 min (Destaing *et al.*, 2003). Da INF2 ein negativer Regulator der Größe von Podosomen ist, könnte das Formin über dessen Funktion auf das F-Aktin im Podosomenkern auch einen Einfluss auf die Lebensdauer der Podosomen von humanen Makrophagen haben.

Zur Untersuchung der Lebensdauer der Podosomen in INF2-Knockdown-Zellen wurden Filme von Lifeact-GFP-transfizierten Makrophagen über einen Zeitraum von 45 min (vier Zeitpunkte pro min) aufgenommen und die Lebensdauer von 3 x 300 Podosomen aus drei verschiedenen siRNA-transfizierten Zellen über diesen Zeitraum evaluiert.

Die Podosomen wurde anhand ihrer Lebensdauer in Gruppen eingeteilt und der

prozentuale Anteil pro Zelle bestimmt (Abbildung 3.6). Unter geringer Abnahme der kurzlebigen Podosomen war der prozentuale Anteil der Untergruppe der langlebigen, über 20 min persistierenden Podosomen pro Zelle in INF2-Knockdown-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant erhöht (INF2 siRNA #1:  $23,41 \pm 8,29$  %; INF2 siRNA #2:  $27,15 \pm 5,63$  %,  $P = 0,0490$ ; Kontrolle:  $8,29 \pm 3,71$  %).



**Abb. 3.6: Einfluss von INF2 auf die Lebensdauer.** Die Lebensdauer von Podosomen wurde von Zellen bestimmt, die mit INF2-spezifischer siRNA (siRNA #1, siRNA #2: *schwarz*) oder Kontroll-siRNA (*grau*) behandelt waren. Für das Diagramm wurden die Zellen nach der Lebensdauer in Gruppen geteilt und ihr prozentuales Vorkommen in der Zelle bestimmt. (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3 \times 300$  aus drei Zellen). P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (\*  $p < 0,05$ ).

Das Ergebnis lässt vermuten, dass INF2 über die Regulation der Größe von Podosomenkernen auch die Lebensdauer der Podosomen beeinflusst.

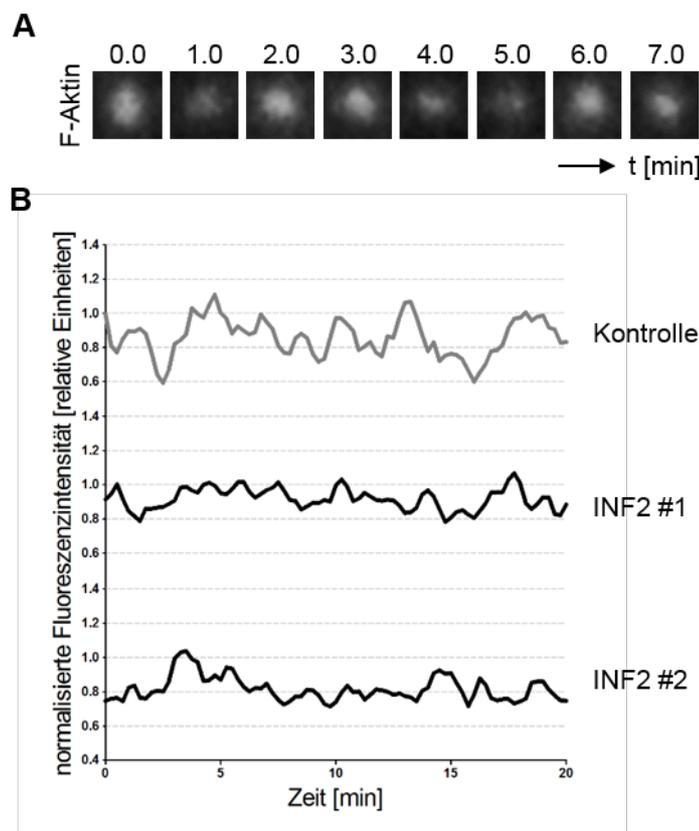
### 3.6 INF2 reguliert die Oszillation von Podosomen

Anschließend sollte untersucht werden, ob INF2 neben der Größe auch die Dynamiken von einzelnen Podosomen beeinflusst. Wie bereits erwähnt, zeigen Podosomen zyklische Bewegungen. Diese Oszillationen entstehen vermutlich durch die wachsenden beziehungsweise schrumpfenden Podosomenkerne in Verbindung mit der Kontraktion von den lateralen F-Aktin-Kabel und sind z.B. über die daraus resultierende Intensitätsänderungen des F-Aktins im Kern nachweisbar (van den Dries *et al.*, 2013).

Für die Untersuchung der Dynamik einzelner Podosomenkerne in INF2-Knockdown-Zellen wurden die Intensitätsfluktuationen der Podosomenkerne in einer konfokalen Ebene über einen Zeitraum von 20 min gemessen.

In Abbildung 3.7 A ist beispielhaft die Intensitätsänderung von Lifeact-GFP und somit des F-Aktins im Kern eines einzelnen Podosoms in einer Bildergalerie dargestellt. Es ist erkennbar, dass sich die Fluoreszenz-Intensitäten des F-Aktins in den abgebildeten

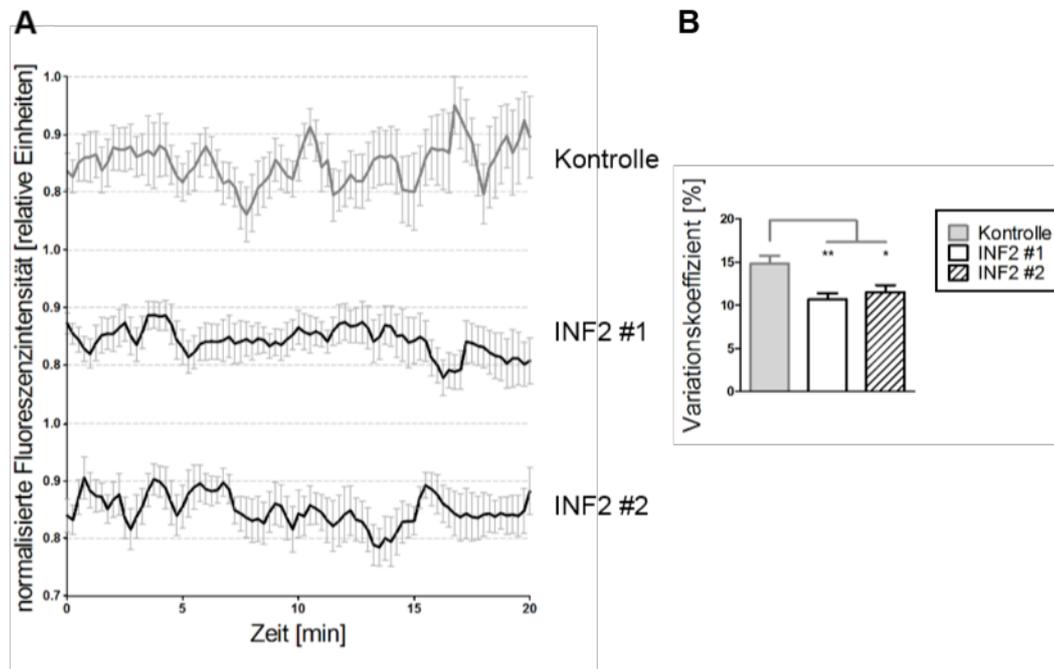
7 min mehrfach ändern. Abbildung 3.7 B zeigt repräsentative, normalisierte Fluoreszenz-Intensitätsänderungen eines Podosoms von einem Makrophagen, der mit Kontroll-siRNA transfiziert wurde, sowie jeweils ein Podosom von Makrophagen, die mit INF2 siRNA #1 und INF2 siRNA #2 transfiziert wurden. Es zeigte sich, dass das F-Aktin der Podosomenkerne von INF2-Knockdown-Zellen weniger stark oszilliert als bei den entsprechenden Kontrollen.



**Abb. 3.7: INF2 reguliert die Oszillation von Podosomenkernen (Teil 1).** (A) Bildergalerie von konfokalen Video-Aufnahmen eines einzelnen Podosoms von primären humanen Makrophagen, der Lifeact-GFP zur Hervorhebung des F-Aktins exprimiert. Zu beobachten sind die Fluktuationen der Fluoreszenz-Intensität während des Zeitraumes (angegeben in min). Das Diagramm in (B) zeigt repräsentative Beispiele von Lifeact-basierenden, normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten über einen Zeitraum von 20 min von einzelnen Podosomen aus Makrophagen, die mit INF2-spezifischer (*schwarz*) und Kontroll-siRNA (*grau*) transfiziert waren.

Dieser Effekt wurde auch deutlich, nachdem die Intensitätsänderungen des Aktins von 3 x 5 Podosomen zusammengefasst wurden (Abbildung 3.8 A). Da die Amplitude und Dauer der Oszillationen innerhalb der Lebensdauer eines Podosoms und auch unter verschiedenen Podosomen sehr heterogen sind, wurde der Variationskoeffizient für die in Abbildung 3.8 A dargestellten podosomalenen Oszillationen bestimmt (Abbildung 3.8 B). Dieser Wert erlaubt eine Aussage über die Streuung der Intensitäten und somit über die Stärke der Oszillation von Podosomen. Podosomen von INF2-siRNA-transfizierten Makrophagen zeigten eine signifikante Reduktion des

Variationskoeffizienten und somit geringere Intensitätsänderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen (INF2 siRNA#1:  $10,68 \pm 0,72$  %,  $P=0,0017$  und INF2 siRNA#2:  $11,51 \pm 0,82$  %,  $P=0,0137$  im Vergleich zu  $14,64 \pm 0,94$  % bei der Kontrolle).



**Abb. 3.8: INF2 reguliert die Oszillation von Podosomenkernen (Teil 2).** Das Diagramm in **(A)** zeigt die mittleren, auf Lifeact-basierenden, normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten über einen Zeitraum von 20 min von 3x5 Podosomen aus Makrophagen, die mit INF2-spezifischer (*schwarz*) und Kontroll-siRNA (*grau*) transfiziert waren (Mittelwerte  $\pm$  SEM). **(B)** Variationskoeffizienten von dem Diagramm in **(A)**. P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

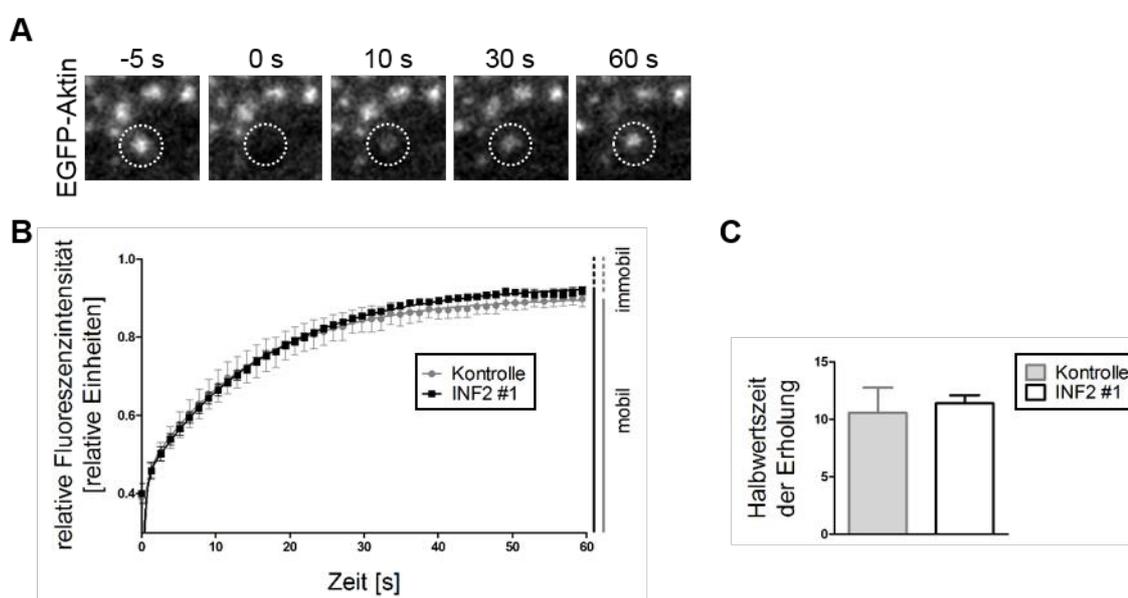
Zusammenfassend zeigen die Experimente, dass INF2 nicht nur ein negativer Regulator der Podosomengröße ist und die Anzahl an langlebigen Podosomen erhöht, sondern ebenfalls die Oszillation von Podosomen reguliert. Das lässt vermuten, dass INF2 die intra-podosomale Kontraktilität beeinflusst.

### 3.7 Der Austausch von Aktin im Podosomenkern ist nicht von INF2 beeinflusst

Die Wirkung von INF2 auf die podosomalen Oszillationen könnte jedoch auch durch einen generellen Einfluss von INF2 auf den regelmäßigen Austausch des F-Aktins im Kern entstehen. In Osteoklasten ist dieser Aktin-Austausch zwei- bis dreimal schneller als die Lebensdauer der Podosomen, die als 2-12 min angegeben wird (Destaing *et al.*, 2003). Zur Untersuchung des Einflusses von INF2 auf den Austausch von Aktin in

einzelnen Podosomen wurde FRAP angewendet. Dabei handelt es sich um eine mikroskopische Methode, bei der die Diffusion beziehungsweise der Einbau eines Fluoreszenz-gekoppelten Proteins in einen vorher gebleichten Bereich gemessen wird.

Für diesen Versuch wurden Kontroll- und INF2-Knockdown-Zellen mit EGFP-Aktin transfiziert. Das Fluoreszenzsignal von EGFP-Aktin im Kern von je 3 x 30 einzelnen Podosomen aus drei verschiedenen Zellen wurde gebleicht und die anschließende Erholung der Fluoreszenz mit ImageJ ausgewertet. Die Analyse beinhaltet die Korrektur des erholenden Fluoreszenzsignals in der gebleichten Region auf die Intensität der gesamten Zelle und die Normalisierung gegen die mittleren Intensitäten vor dem Bleichen.



**Abb. 3.9: INF2 hat keinen Einfluss auf den internen Austausch von Aktin.** FRAP-Analyse des Austausches von Aktin in Podosomen von primären humanen Makrophagen. Die Bildergalerie in **(A)** zeigt eine repräsentative Detailansicht einer konfokalen Video-Aufnahme von einem GFP-Aktin-exprimierenden Makrophagen. Der gestrichelte Kreis zeigt das Bleichen eines einzelnen Podosoms und die anschließende Erholung des Fluoreszenz-Signals (Zeitangabe in s über jedem Einzelbild). **(B)** FRAP-Diagramm von auf GFP-basierenden, normalisierten Fluoreszenz-Intensitäten über einen Zeitraum von 60 s einzelner Podosomen von Makrophagen, die mit INF2-spezifischer (*schwarz*) und Kontroll-siRNA (*grau*) transfiziert waren (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3 \times 30$  Podosomen aus drei verschiedenen Zellen). **(C)** Halbwertszeiten der Erholung der FRAP-Experimente aus **(B)**.

Abbildung 3.9 A zeigt exemplarisch das Bleichen eines einzelnen Podosoms und die Erholung des Fluoreszenzsignals von EGFP-Aktin in einem Zeitraum von 60 s. Die Analyse der normalisierten Fluoreszenzintensitäten von Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen zeigte, dass das Bleichen in einer Verringerung der EGFP-Aktin-Fluoreszenz von ungefähr 60 % resultierte (Abbildung 3.9 B). Innerhalb von 60 s erholte sich die Fluoreszenz in der gebleichten Region bis  $89,8 \pm 2,1$  % der anfänglichen Intensität. Die

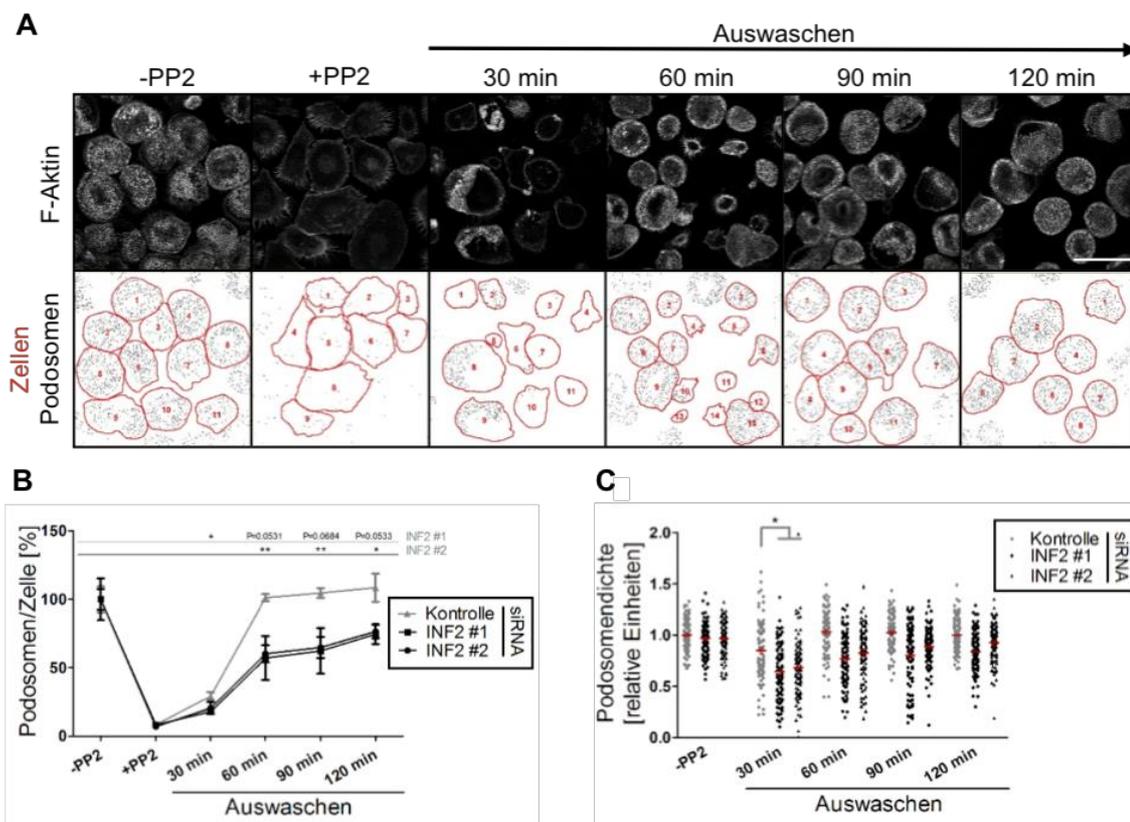
Halbwertszeit der Erholung beträgt  $10,5 \pm 2,2$  s (Abbildung 3.9 C). In Zellen, die mit INF2-siRNA transfiziert wurden, sind keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollzellen nachweisbar (Abbildung 3.9 B). Das Fluoreszenzsignal der gebleichten Region erholt sich bis  $91,9 \pm 1,1$  % der Anfangsintensität und die Halbwertszeit der Erholung beträgt  $11,4 \pm 0,7$  s (Abbildung 3.9 C).

Diese Befunde weisen darauf hin, dass INF2 ein positiver Regulator der podosomalen Oszillation ist, dies aber nicht über einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Austausches von Aktin innerhalb der Podosomen reguliert wird.

### 3.8 INF2 beeinflusst die Neubildung von Podosomen

Die vorher durchgeführten Experimente beschreiben den Einfluss von INF2 auf Podosomen, die sich im stationären Zustand befinden. Um festzustellen, ob INF2 auch einen Einfluss auf die Neubildung von Podosomen hat, wurde der bereits beschriebene Podosomen-Neubildungs-Assay verwendet (Cervero *et al.* 2013). Bei dieser Methode werden die Zellen mit PP2, einem Inhibitor der Tyrosinkinase Src, behandelt, was zu einem Verlust der Podosomen führt. Durch anschließendes Auswaschen des Inhibitors kann die Neubildung der Podosomen beobachtet und mit ImageJ analysiert werden (Cervero *et al.* 2013, Linder *et al.* 2000a, Abbildung 3.10 A).

Dazu wurden siRNA-transfizierte Zellen mit  $25 \mu\text{M}$  PP2 behandelt (+PP2), was zu einem Verlust der Podosomen von  $>90$  % bei INF2-Knockdown- und Kontrollzellen führte (Abbildung 3.10 B). Als Kontrolle dienten DMSO-behandelte Zellen (-PP2). In dem darauf folgenden Auswaschen des Inhibitors zeigten INF2-Knockdown-Zellen für die Zeitpunkte 30, 60, 90 und 120 min eine signifikante Verzögerung der Podosomen-Neubildung im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Anzahl an Podosomen pro Zelle war in INF2-Knockdown-Zellen zu allen Zeitpunkten geringer als bei den Kontrollzellen. Auch nach 120 min konnte die ausgehende Anzahl an Podosomen pro Zelle (-PP2) bei INF2-Knockdown-Zellen nicht erreicht werden. Im Gegensatz dazu ist bei den Kontrollzellen bereits nach 60 min die Podosomenanzahl der DMSO-Kontrolle erreicht.



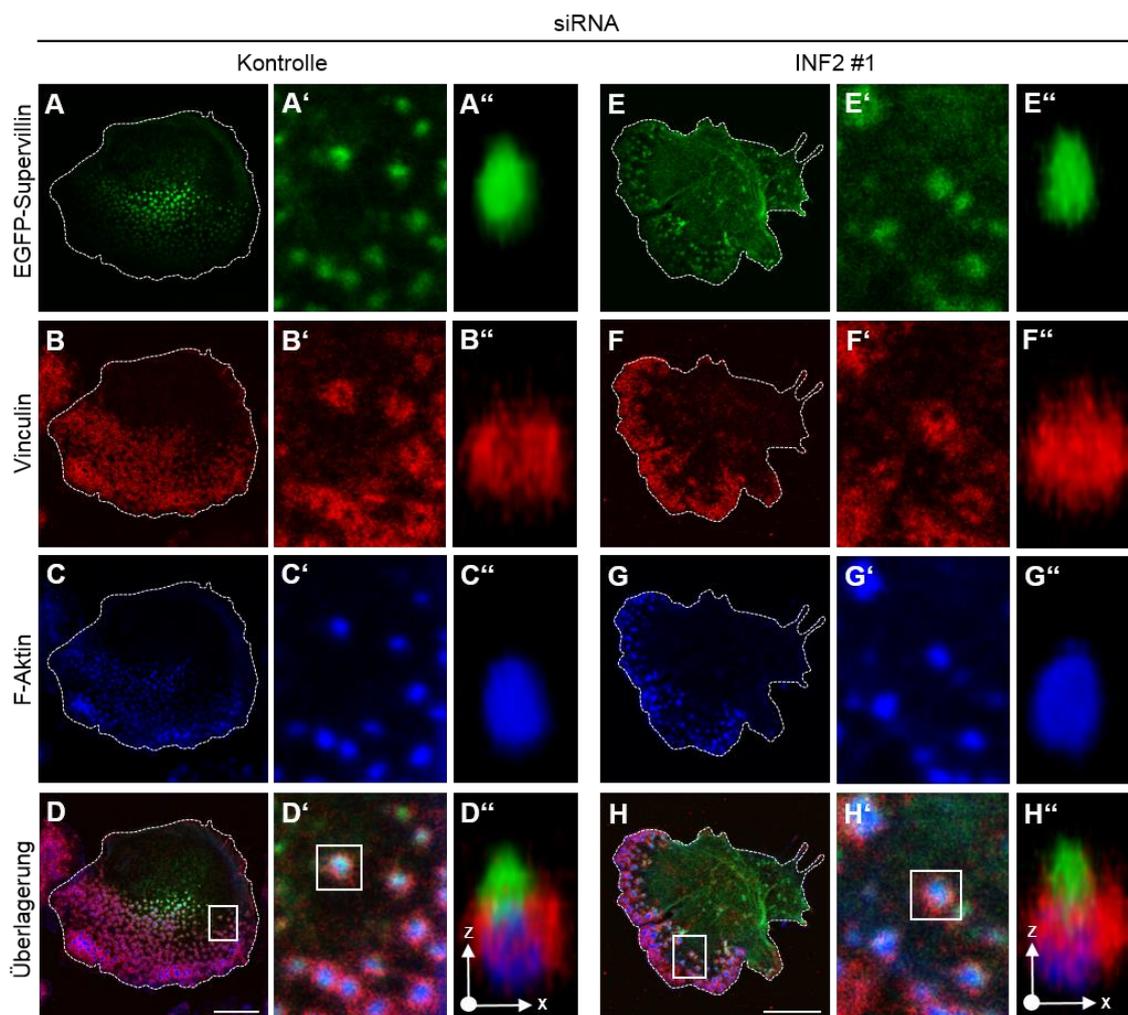
**Abb. 3.10: Einfluss von INF2 auf die Podosomen-Neubildung.** (A) Das Prinzip des Podosomen-Neubildungs-Assay. Primäre humane Makrophagen wurden 30 min mit dem Podosomen-auflösenden Tyrosinkinase Src-Inhibitor PP2 inkubiert (+PP2). Anschließendes Auswaschen erlaubt die Neubildung der Podosomen. Kontrollzellen wurden mit DMSO als Kontrolle behandelt (-PP2). Obere Reihe: konfokale Aufnahmen zu den ausgewerteten Zeitpunkten von fixierten Makrophagen mit F-Aktin-Färbung durch Alexa Fluor® 488-gekoppeltes Phalloidin. Untere Reihe: Bildanalyse mit ImageJ von den Aufnahmen aus der oberen Reihe. Individuelle Zellen sind durch rote Umrandungen und Podosomen als schwarze Punkte markiert. Maßstabsbalken: 50  $\mu$ m. (B) Analyse der Podosomen-Neubildung von Makrophagen, die mit INF2-spezifischer siRNA (siRNA #1, siRNA #2: schwarz) oder KontrollsiRNA (grau) behandelt waren (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3x30). (C) Podosomendichte während der Neubildung. Für die Ermittlung der Podosomendichte wurde das Verhältnis aus der Podosomen-Anzahl und der Podosomen-bedeckten Fläche der Zellen aus (B) ermittelt. Jeder Punkt repräsentiert das Verhältnis Podosomen-Anzahl/Podosomen-bedeckte Fläche einer Zelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3x30). P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01)

Die Podosomendichte gibt eine indirekte Aussage über die Abstände zwischen den Podosomen während der Neubildung. Sie wird über das Verhältnis von der Anzahl der Podosomen und von der Podosomen-bedeckten Fläche bestimmt.

Die mittlere Podosomendichte der Kontrollzellen wird während des Auswaschens nur bei dem Zeitpunkt 30 min geringer als in der DMSO-Kontrolle (-PP2) und erreicht nach 60 min Auswaschen den Ausgangswert. Bei INF2-siRNA-transfizierten Zellen war die Podosomendichte zu jedem Zeitpunkt des Auswaschens vermindert, nach 30 min Auswaschen signifikant geringer als bei den Kontrollzellen (Abbildung 3.10 C). Das

deutet darauf hin, dass die Abstände zwischen den neugebildeten Podosomen in INF2-Knockdown-Zellen geringer als bei den Podosomen der Kontrollzellen sind.

Da INF2 in der Podosomenkappe lokalisiert und ein negativer Regulator der Größe des Kerns ist, stellte sich die Frage, ob ein Knockdown von INF2 den generellen Aufbau von Podosomen in Kern, Ring und Kappe vor allem während der Neubildung beeinflusst. Dazu wurden INF2-Knockdown-Zellen und Kontrollzellen nach 48 h mit dem Kappenprotein EGFP-Supervillin (Bhuwania *et al.*, 2012) transfiziert und weitere 24 h inkubiert und der Podosomen-Neubildungs-Assay, wie in Kapitel 2.2.4.7 beschrieben, durchgeführt. Nach 60 min Auswaschen des Inhibitors wurden die Makrophagen fixiert und mit einem Vinculin-Antikörper mit entsprechendem Alexa Fluor® 568-gekoppeltem sekundären Antikörper als exemplarisches Ringprotein und Alexa Fluor® 647-gekoppeltem Phalloidin zur Hervorhebung des Podosomenkerns gefärbt (Abbildung 3.11 A-H). Supervillin kolokalisiert in INF2-Knockdown- und Kontrollzellen gleichermaßen mit dem Podosomenkern (Abbildung 3.11 A', D', E', H'). Eine dreidimensionale Rekonstruktion eines einzelnen Podosoms zeigte, dass die Lokalisation des Proteins in der Podosomenkappe nach einem Knockdown von INF2 unverändert ist (Abbildung 3.11 A'', D'', E'', H''). Auch das exemplarisch für den Ring gewählte Protein Vinculin zeigt nach einem Knockdown von INF2 keine veränderte Lokalisation im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 3.11 B', B'', D', D'', F', F'', H', H'').

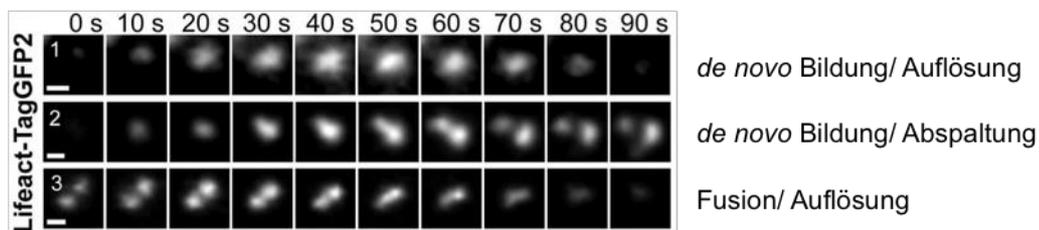


**Abb. 3.11: INF2-Knockdown beeinträchtigt nicht die Ausbildung einer Kappenstruktur.** Konfokale Aufnahmen von primären humanen Makrophagen, die mit Kontroll-siRNA (**A-D**) oder INF2-spezifischer siRNA (**E-H**) behandelt wurden, EGFP-Supervillin exprimieren (**A, E, grün**) sowie mit Vinculin-spezifischem Antikörper (**B, F, rot**) und entsprechendem sekundären Alexa Fluor® 568-gekoppeltem Antikörper gefärbt wurden. Das F-Aktin des Podosomenkerns wurde mit Alexa Fluor® 647-gekoppeltem Phalloidin markiert (**C, G, blau**). (**D, H**) zeigt die entsprechenden Überlagerungen. Die *weißen Kästchen* in (**D, H**) zeigen die jeweilige Auswahl, die in (**A'-D', E'-H'**) vergrößert dargestellt ist. Die *weißen Kästchen* in (**D', H'**) zeigt die Bereiche, von denen über konfokale z-Aufnahmen die 3D-Rekonstruktion eines einzelnen Podosoms erstellt wurde (**A''-D'', E''-H''**). Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass INF2 die Neubildung von Podosomen und die Abstände zwischen den gebildeten Podosomen beeinflusst. Obwohl INF2 die Größe von Podosomen reguliert, beeinträchtigt das Formin nicht die Lokalisation von Supervillin in der Kappe und Vinculin im Ring.

### 3.9 INF2 ist an der *de novo* Bildung von Podosomen beteiligt

Podosomen zeigen verschiedene Dynamiken (Abbildung 3.12). Sie können *de novo* entstehen oder sich von bereits vorhandenen Podosomen abspalten, was vor allem in Makrophagen vorkommt (Evans *et al.*, 2003; Kopp *et al.*, 2006). Zusätzlich können Podosomen fusionieren und sich auflösen. In Kapitel 3.8 wurde gezeigt, dass INF2-Knockdown-Zellen eine verzögerte Neubildung und geringere Dichte der Podosomen im Podosomen-Neubildungs-Assay aufweisen. Das lässt vermuten, dass einer dieser Dynamiken beeinträchtigt ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der Podosomen-Neubildungs-Assay auch in der Lebendzellmikroskopie durchgeführt.



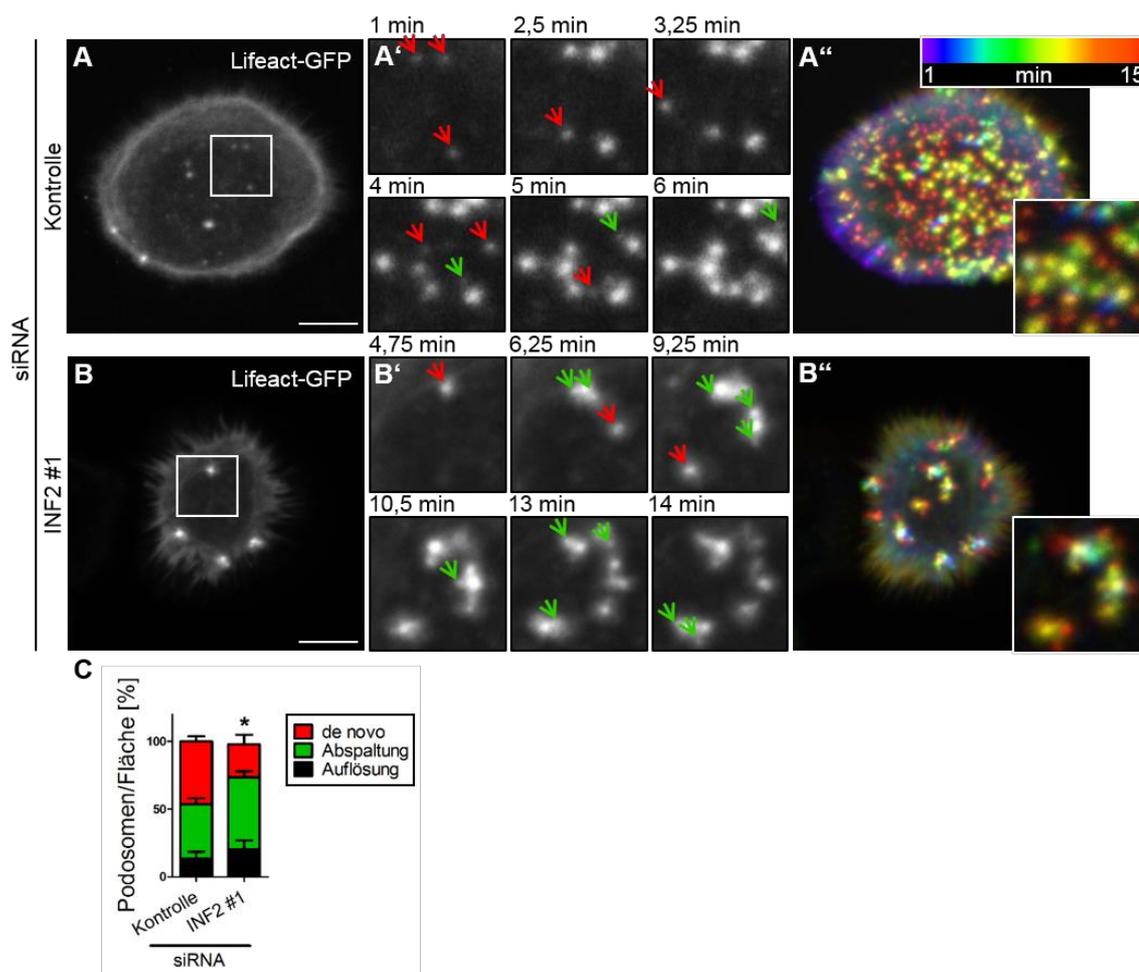
**Abb. 3.12: Dynamiken von Podosomen.** Beispiele von Dynamiken, die in der Auswertung des Podosomen-Neubildungs-Assay in lebenden Zellen berücksichtigt wurden. Gezeigt sind einzelne Podosomen von Makrophagen, die mit Lifeact-TagGFP2 transfiziert wurden. Podosomen können (1) *de novo* gebildet werden und sich auflösen, (2) durch Abspaltung von einem *de novo* gebildetem Podosom entstehen oder (3) sich durch Fusion mit einem anderen Podosom auflösen. (modifiziert nach Stöltzing *et al.*, 2012)

Zur Visualisierung der Entstehungsprozesse der Podosomen wurden INF2-Knockdown- und Kontrollzellen 24 h vor der Lebendzellmikroskopie mit Lifeact-GFP transfiziert. Nach 5-minütiger Aufnahme des Films wurde der Inhibitor PP2 hinzugegeben und nach Auflösen der Podosomen, was 30 bis 45 min dauerte, ausgewaschen. Die Entstehung der Podosomen wurde anschließend bis zum Erreichen des podosomal stationären Zustands manuell auf *de novo* Bildung, Abspaltung und Auflösung von Podosomen analysiert.

Abbildung 3.13 A und 3.13 B zeigen repräsentative Beispiele einer Kontroll- und einer INF2-Knockdown-Zelle während des Auswaschens des Inhibitors. In Kontrollzellen startete die Neubildung der Podosomen zu frühen Zeitpunkten des Auswaschens, meist direkt nach Zugabe des Kulturmediums. Es zeigte sich, dass die Neubildung ein zweiphasiger Prozess ist. Die erste Phase wird meist durch *de novo* Bildung bestimmt, wohingegen in der zweiten Phase die Neubildung der Podosomen ebenso durch Abspaltung von bereits vorhandenen Podosomen erfolgte (Abbildung 3.13 A'). Bei

INF2-Knockdown-Zellen startete die Neubildung der Podosomen, wie durch das Experiment mit fixierten Proben erwartet (Kapitel 3.8), später als bei den Kontrollzellen (Abbildung 3.13 B'). Dabei wurde der Prozess hauptsächlich durch Abspaltung neuer von bereits vorhandenen Podosomen bestimmt.

Zur besseren Visualisierung der Podosomen-Neubildung wurde den ersten 15 min des Entstehungsprozesses der Podosomen (des Auswaschens) der Kontroll- und der INF2-Knockdownzelle ein temporärer Farbcode mit ImageJ zugewiesen (Abbildung 3.13 A'', B''); Filme dazu in Kapitel 7, Film 1 bis 4). Dazu erhielt jedes Einzelbild der Videos eine individuelle Farbe entlang des oben rechts abgebildeten Spektrums. Diese wurden anschließend in einem endgültigen Bild zusammengefasst. Die Kontrolle verdeutlicht vor allem die *de novo* Bildung verschiedener Podosomen verteilt über die gesamte Zelle zu frühen Zeitpunkten (blau bis gelb), wohingegen Abspaltung neuer Podosomen von bereits vorhandenen Podosomen eher eine rote Färbung erhielten, also zu späteren Zeitpunkten stattfanden (Abbildung 3.13 A''). In der INF2-Knockdown-Zelle entstehen zu Beginn des Auswaschens vereinzelt Podosomen, die vor allem über Abspaltung neue Podosomen bilden. Daher ergibt sich eher ein Bild von Podosomen-Clustern innerhalb der Zelle (Abbildung 3.13 B''). Die Quantifizierung der Dynamiken während der Neubildung von je fünf verschiedenen Zellen aus drei verschiedenen Durchgängen zeigte eine signifikante Abnahme der *de novo* Bildung in INF2-Knockdown im Vergleich zu Kontrollzellen (INF2 siRNA #1:  $24,36 \pm 7,05$  %,  $P = 0,0285$ ; Kontrolle:  $46,55 \pm 3,82$  %). Die Anzahl der abspaltenden Podosomen von bereits Vorhandenen ist leicht erhöht, aber nicht signifikant (INF2 siRNA #1:  $53,26 \pm 4,41$  %, Kontrolle:  $39,87 \pm 4,70$  %). Da die Lebenszeit der Podosomen 2-12 min beträgt (Destaing *et al.*, 2003), kommt es neben der Neubildung der Podosomen auch zur ihrer Auflösung. Jedoch sind auch bei ihrer Auflösung keine signifikanten Unterschiede zwischen INF2-Knockdown- und Kontrollzellen zu beobachten (INF2 siRNA #1:  $20,27 \pm 6,59$  %, Kontrolle:  $13,59 \pm 4,96$  %).



**Abb. 3.13: Einfluss von INF2 auf die Neubildung von Podosomen in der Lebendzellmikroskopie.** (A,B) Konfokale Aufnahmen von Lifeact-exprimierenden primären humanen Makrophagen, die mit Kontroll-siRNA (A) oder INF2-spezifischer siRNA (B) transfiziert waren. Die weißen Kästchen in (A, B) zeigen die Auswahl, die in (A', B') als Bildergalerie dargestellt ist und aus Video-Aufnahmen von dem Auswaschen des Inhibitors PP2 entnommen wurden. Die Zeit ab Beginn des Auswaschens ist in min angegeben. Die roten und grünen Pfeile verdeutlichen *de novo* Bildung und Abspaltung von Podosomen. (A'', B'') Regenbogenanalyse der Podosomen-Neubildung. Dazu erhielt jedes Einzelbild der Video-Aufnahme von den ersten 15 min des Auswaschens eine Farbe entlang des oben rechts abgebildeten Spektrums, die in einem Bild zusammengefasst wurden. Die Vergrößerung entspricht der Region von (A', B'). Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m. (C) Statistische Auswertung der Neubildung von Podosomen von Zellen, die mit Kontroll-siRNA und INF2-spezifischer siRNA transfiziert waren. Podosomen, die während des Experiments *de novo* gebildet wurden oder durch Abspaltung von bereits vorhandenen Podosomen entstehen sowie die Auflösung von Podosomen sind in Prozent angegeben. (Mittelwerte  $\pm$  SEM, 5 Zellen aus drei verschiedenen Donoren). P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (\*  $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend zeigt das Experiment, dass die Neubildung der Podosomen in zwei Phasen stattfindet. Die erste Phase ist vorwiegend durch *de novo* Bildung geprägt, wohingegen in der zweiten Phase Podosomen ebenso durch Abspaltung von bereits vorhandenen Podosomen entstehen. INF2 wurde dabei als ein positiver Regulator der *de novo* Bildung von Podosomen identifiziert. Demnach erklärt das die Verzögerung der Neubildung von den Podosomen in INF2-Knockdown-Zellen im Experiment mit den

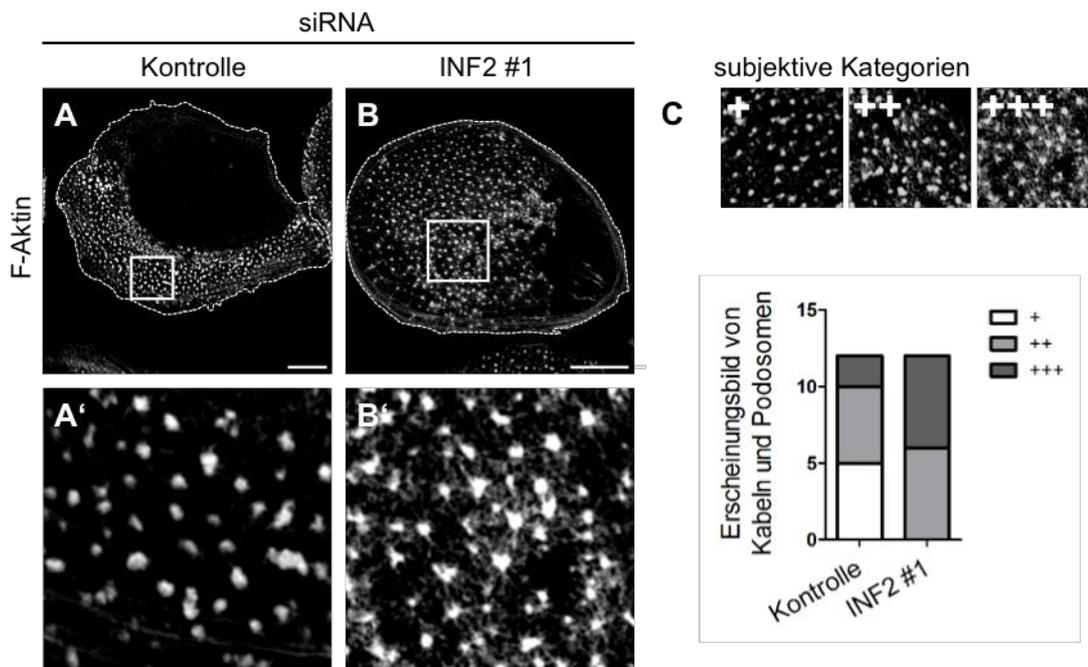
fixierten Proben (Kapitel 3.8), da es auf eine verringerte *de novo* Bildung von Podosomen zurückzuführen ist. Zusätzlich scheint die Verringerung der Podosomen-Dichte in den INF2-Knockdown-Zellen durch die wenigen Entstehungsorte von *de novo*-gebildeten Podosomen begründen zu lassen.

### **3.10 SIM zeigt den Einfluss von INF2 auf das Erscheinungsbild von Kabeln und Podosomen**

Wie einleitend bereits erwähnt, werden Podosomen durch F-Aktin-Kabel verbunden, die vermutlich die Äquidistanzen zwischen individuellen Podosomen vermitteln (Linder und Wiesner, 2015; Luxenburg *et al.*, 2007). Zur Untersuchung des Einflusses von INF2 auf das Erscheinungsbild dieser verbindenden F-Aktin-Kabel wurden Kontroll- und INF2-Knockdown-Zellen mit einem optimierten Protokoll zur Färbung des Zytoskeletts mit Alexa Fluor® 488-gekoppeltem Phalloidin gefärbt (Kapitel 2.2.4.2) und Aufnahmen mit SIM (*structured illumination microscopy*) gemacht.

In den Kontrollzellen (repräsentative Zelle in Abbildung 3.14 A) sind die Podosomenkerne deutlich sichtbar, wohingegen die Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel vorwiegend kaum erkennbar sind (Abbildung 3.14 A'). In INF2-Knockdown-Zellen (repräsentative Zelle in Abbildung 3.14 B) ist das Erscheinungsbild der Kabel hingegen eher diffus, wodurch die Podosomen-verbindenden Kabel deutlicher erkennbar sind, jedoch unstrukturierter wirken als in den Kontrollzellen (Abbildung 3.14 B'). Daher scheint in den INF2-Knockdown-Zellen die Menge an Aktin erhöht zu sein. Zur quantitativen Überprüfung wurden die Erscheinungsbilder der Podosomen und F-Aktin-Kabel (n=1 x 6 Zellen, je zwei Ausschnitte) je nach Stärke und Ausprägung des Phänotyps in Gruppen eingeteilt (Subjektive Kategorien in Abbildung 3.14 C). Die Graphik in Abbildung 3.14 C zeigt, dass Kontrollzellen vorwiegend den Phänotyp der Stärke + und ++ sowie in geringem Maße in der Stärke +++ ausbilden. In INF2-Knockdown-Zellen hingegen waren keine Bereiche in der Zelle mit der Kategorie +, dafür jedoch eine gleichmäßig verteilte Anzahl an Bereichen mit den Kategorien ++ und +++ bewertbar.

Bei diesen Daten handelt es sich um vorläufige Ergebnisse. Sie geben jedoch einen ersten möglichen Hinweis darauf, dass INF2 in die Aufrechterhaltung beziehungsweise die reguläre Ausbildung der Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel involviert ist.



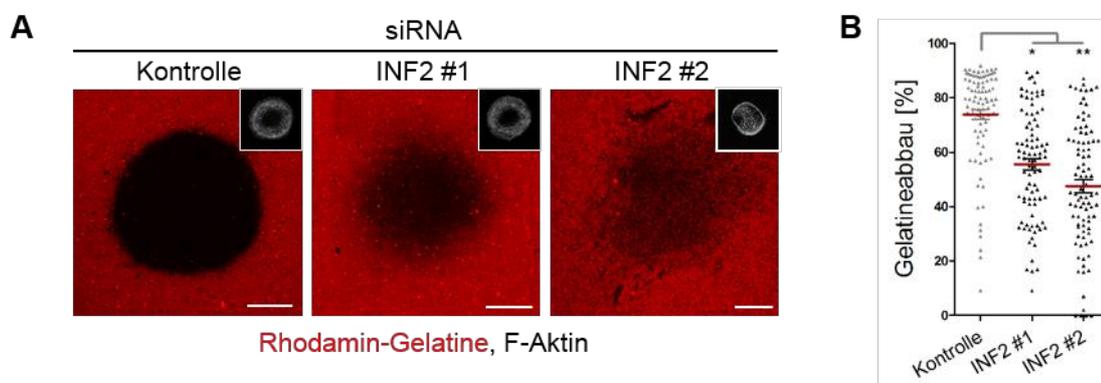
**Abb. 3.14: Einfluss von INF2 auf das Erscheinungsbild von Kabeln und Podosomen.** (A-C) Bilder von primären humanen Makrophagen, die mit Kontroll-siRNA (A) oder INF2-spezifischer siRNA (B) transfiziert waren. Das F-Aktin wurde Alexa Fluor® 647-gekoppeltem Phalloidin hervorgehoben. Die Bilder wurden mit *structured illumination microscopy* (SIM) aufgenommen. Maßstabsbalken: 10 µm (C) Auswertung des Erscheinungsbildes vom F-Aktin der Podosomen und den verbindenden Kabeln. Die oberen Aufnahmen zeigen die Gruppen, die nach der Ausprägung des Phänotyps erstellt wurden (+, ++, +++) und nach denen 12 Ausschnitte aus je sechs Zellen bewertet wurden.

### 3.11 INF2 beeinflusst den Abbau von extrazellulärer Matrix

In den vorherigen Abschnitten wurde der Einfluss von INF2 auf strukturelle und dynamische Eigenschaften von Podosomen beschrieben. Damit Makrophagen jedoch ihre Funktion als Immunzellen wahrnehmen können, müssen sie Gewebearrieren überwinden und durch das dichte Netzwerk der extrazellulären Matrix gelangen. Infolgedessen bilden sie Podosomen aus, die neben der Funktion als Adhäsionsorgane auch dem proteolytischen Abbau extrazellulärer Matrix dienen (Linder und Aepfelbacher, 2003; Linder und Wiesner, 2015; Murphy und Courtneidge, 2011). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob INF2 einen Einfluss auf den Abbau von Extrazellulärer Matrix hat.

Dazu wurden siRNA-transfizierte Zellen auf Deckgläschen ausgesät, die mit Rhodamin-markierter Gelatine beschichtet waren. Nach 6 h wurden die Zellen fixiert, gefärbt und 3x30 Zellen, wie in Kapitel 2.2.4.6 beschrieben, ausgewertet. Bei Kontrollzellen wurde durchschnittlich  $73,90 \pm 3,00$  % der Gelatine abgebaut, während

die Zellen mit INF2-Knockdown eine signifikante Verringerung des Matrixabbaus aufwiesen (INF2 siRNA #1:  $55,56 \pm 3,70$  %,  $P = 0,0183$ ; INF2 siRNA #2:  $47,58 \pm 3,05$  %,  $P = 0,0035$ ).



**Abb. 3.14: Einfluss von INF2 auf den Matrixabbau.** Die konfokalen Aufnahmen zeigen primäre humane Makrophagen, die mit INF2-spezifischer und Kontroll-siRNA behandelt und auf Rhodamin-markierter Gelatine ausgesät wurden (**A**). Der Abbau der Matrix ist durch den Verlust der Rhodamin-Fluoreszenz nachweisbar. Bilder oben rechts zeigen die entsprechende F-Aktin-Färbung der Podosomenkerne mit Alexa Fluor® 647-gekoppeltem Phalloidin. Maßstabbalken: 10  $\mu$ m. Das Diagramm zeigt den prozentualen Gelatineabbau, der über Intensitätsmessungen ermittelt wurde (**B**). Jeder Punkt repräsentiert eine gemessene Zelle (Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3 \times 30$ ). P-Werte wurden mittels *unpaired two-tailed Student's t-test* berechnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

Das Ergebnis zeigt, dass INF2 neben dem Einfluss auf die Struktur und Dynamiken der Podosomen auch ein positiver Regulator des Matrixabbaus ist und damit auch die Funktion von Podosomen beeinflusst.

## 4 Diskussion

Podosomen sind hoch dynamische, Aktin-reiche Adhäsions-, Invasions- und mechanosensorische Strukturen in Zellen monozytischer Abstammung, wie Makrophagen, dendritische Zellen und Osteoklasten (Linder *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2001; Destaing *et al.*, 2003), sowie in Endothelzellen, Megakaryozyten und Zellen der glatten Muskulatur (Moreau *et al.*, 2003; Osiak *et al.*, 2005; Sabri *et al.*, 2006; Schachtner *et al.*, 2013; Burgstaller und Gimona, 2004). Die Zellen bilden Podosomen an der Substrat-kontaktierenden Zellseite aus. Dabei können die Podosomen verschiedene Formen annehmen. So können sie als einzelne Podosomen oder zusammen in Clustern, Ringen, Rosetten oder Gürteln angeordnet sein (Linder und Wiesner, 2015). Podosomen verbinden verschiedene Funktionen, die den Zellen bei ihrer Migration durch verschiedene Gewebearten die Interaktion und Kontrolle über ihre Umgebung ermöglichen: Zell-Substrat-Adhäsion, EZM-Abbau (Gimona und Buccione, 2006; Gimona *et al.*, 2008; Linder 2007; Linder und Aepfelbacher, 2003), Erkennen von Matrix-Elastizität und topographischen Veränderungen der Umgebung (*mechanosensing*) (van den Dries *et al.*, 2012), Antigenaufnahme (Gawden-Bone *et al.*, 2010), Knochenabbau (Destaing *et al.*, 2003) und den Einfluss auf die Stabilisierung von Zellprotrusionen und Transmigration (Linder und Wiesner, 2015). Die Liste der podosomalen Komponenten, die vor allem mit den physiologischen Funktionen der Podosomen assoziiert sind, wird zunehmend erweitert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Formin INF2 als neue Komponente und neuer Regulator von Podosomen in primären humanen Makrophagen identifiziert werden.

### 4.1 Podosomale Subpopulationen von Aktin

Das Wissen über den genauen Aufbau von Podosomen in einen Aktin-reichen Kern und einen Ring aus Plaque-Proteinen wurde durch aktuelle Forschungsarbeiten stark erweitert. Die Bildung des F-Aktins im Kern ist von der Nukleation durch den Arp2/3-Komplex abhängig (Linder *et al.*, 2000). Durch Bindung des Protein-Komplexes an bereits existierende Filamente und die Nukleation von neuen Filamenten in 70°-Winkeln entsteht das stark verzweigte Aktin-Netzwerk im Podosomenkern. Der Kern ist von unverzweigten Aktin-Filamenten umgeben, welche die Spitze des Kerns mit den Ringproteinen und mit der Plasmamembran verankern (Luxenburg *et al.*, 2007). Zusätzlich sind einzelne Podosomen durch Aktin-Kabel verbunden und werden so in

größere Gruppen organisiert (Akisaka *et al.*, 2008; Luxenburg *et al.*, 2007).

Das Vorhandensein von linearen, unverzweigten lateralen Aktin-Filamenten und Podosomen-verbindenden Aktin-Kabeln lässt vermuten, dass neben dem Arp2/3-Komplex weitere Aktin-Nukleatoren an der Regulation der podosomalen Aktin-Strukturen beteiligt sind. Eine andere Klasse von Nukleations-Faktoren sind Formine. Diese sind wirksame Regulatoren von Aktin und beeinflussen eine Vielzahl von Prozessen in eukaryotischen Zellen (Campellone und Welch, 2010). Die von Forminen nukleierten und verlängerten Aktin-Filamente sind, im Gegensatz zu den vom Arp2/3-Komplex gebildeten Filamenten, unverzweigt und linear (Sagot *et al.*, 2002). Daher könnte das unverzweigte, podosomale Aktin durch Formine reguliert werden. Die Anwesenheit von Forminen in einer Podosomen-angereicherten Fraktion von Makrophagen konnte in früheren proteomischen Analysen in unserem Labor (Arbeitsgruppe Linder, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) nachgewiesen werden (Cervero *et al.*, 2012). Hinsichtlich dieser Erkenntnis wurden vorerst verschiedene Formine auf eine Lokalisation an Podosomen experimentell geprüft.

## 4.2 INF2 lokalisiert in der Podosomenkappe

Bei dem Screening der verschiedenen Formine erwies sich INF2 als vielversprechender Kandidat. Überexprimiertes INF2 kolokalisierte mit dem Podosomenkern. Dreidimensionale Rekonstruktionen einzelner Podosomen zeigten jedoch, dass INF2 nur partiell mit den Podosomenkernen kolokalisiert und bevorzugt eine Kappe über den Podosomen bildet. Die Lokalisation konnte durch Immunfluoreszenzfärbungen von endogenem sowie durch Überexpression von konstitutiv aktivem INF2 bestätigt werden. Die über dem Kern liegende Kappe ist eine neu beschriebene podosomale Substruktur (Linder *et al.*, 2011). Bisher sind nur drei weitere Kappenproteine in der Literatur beschrieben: FMNL1 (Mersich *et al.*, 2010), Supervillin (Bhuwania *et al.*, 2012) und Fascin (Van Audenhove *et al.*, 2015). Die genaue Funktion der Podosomenkappe ist zum heutigen Zeitpunkt nicht vollständig aufgeklärt. Sie könnte mögliche Funktionen beim Andocken von Vesikeln, der Regulation der Größe (Van Audenhove *et al.*, 2015) oder bei der Podosomen-assoziierten Kontraktilität haben (Bhuwania *et al.*, 2012; Linder *et al.*, 2011).

INF2 wird Zelltyp-abhängig in zwei unterschiedlichen *splice*-Varianten exprimiert. Die Isoformen unterscheiden sich durch das Vorhandensein einer CAAX-Box am C-terminalen Ende des Proteins. Durch Prenylierung des Cysteinrestes bindet die

Isoform INF2-CAAX an das endoplasmatische Retikulum (ER) (Chhabra *et al.*, 2009), wo es die Teilung von Mitochondrien vermittelt (Korobova *et al.*, 2013). Die Polymerisation von Aktin durch ER-gebundenes INF2-CAAX führt zu der Rekrutierung von Myosin II und anschließender Kontraktion an den Teilungsbereichen der Mitochondrien. Daraufhin wird die Akkumulation und Teilung durch die GTPase Drp1 verstärkt (Korobova *et al.*, 2014). Beide INF2-Isoformen scheinen jedoch unterschiedliche Funktion in Zellen auszuüben (Ramabhadran *et al.*, 2011). Die einzige bis heute beschriebene, spezifische Funktion von INF2-nonCAAX ist eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung des Golgi-Apparats in U2O2-Zellen (Ramabhadran *et al.*, 2011).

In humanen Makrophagen konnte mit Isoform-spezifischen Antikörpern nur INF2-nonCAAX detektiert werden. In anderen bisher beschriebenen Zelltypen ist diese Isoform vorwiegend zytoplasmatisch (Ramabhadran *et al.*, 2011). Bei Makrophagen ließ die deutliche Lokalisation von INF2-nonCAAX in der Podosomenkappe eine besondere Funktion und die Regulation des unverzweigten, podosomal Aktins durch das Formin vermuten. Die Lokalisation von INF2 an fokalen Adhäsionen von Fibroblasten, die einige Gemeinsamkeiten in der Proteinzusammensetzung mit Podosomen aufweisen, unterstützt diese Vermutung (Costa und Parsons, 2010; Skau *et al.*, 2015). In diesen Zellen reguliert das Formin die Verlängerung von dorsalen Stressfasern sowie die Reifung der fokalen zu fibrillären Adhäsionen (Skau *et al.*, 2015).

### **4.3 Untersuchung von verschiedenen Podosomen-assoziierten Parametern**

Zur Untersuchung der strukturellen und funktionellen Rolle von INF2 an Podosomen in primären humanen Makrophagen wurde ein siRNA-basierter Knockdown von INF2 etabliert. Der fast vollständige Verlust von INF2 (92 % beziehungsweise 96 %) konnte für die mikroskopische Untersuchung von verschiedenen Podosomen-assoziierten Parametern, wie Anzahl, Größe, Lebensdauer, Oszillationen und Neubildung sowie dem Abbau extrazellulärer Matrix, verwendet werden. Die Ergebnisse der Experimente wurden wahlweise durch Überexpression von konstitutiv aktivem INF2 verifiziert.

Einleitend wurde die Anzahl der Podosomen pro Zelle bestimmt. Der Knockdown von INF2 zeigte jedoch keinen Einfluss auf diesen Parameter. Überexpression von konstitutiv aktivem INF2 (INF2-A149D) führte hingegen zu einer Verringerung der

Anzahl an Podosomen pro Zelle von ungefähr 45 % im Vergleich zu den Kontrollzellen. Das könnte bedeuten, dass INF2 ein negativer Regulator der Anzahl der Podosomen pro Zelle ist. Die Überexpression von konstitutiv aktivem INF2 führt jedoch auch zu einer vermehrten Polymerisation von Aktin-Filamenten in der Zelle. Auch in anderen Zelltypen konnte eine vermehrte, zytosolische Aktin-Polymerisation durch konstitutiv aktives INF2 beobachtet werden (Ramabhadran *et al.*, 2013). In zukünftigen Experimenten könnten diese Aktin-Filamente mikroskopisch genauer untersucht werden. Dabei sollte ermittelt werden, ob sie eine verstärkte Ausprägung der Podosomen-verbindenden Kabel oder diffus in der Zelle gebildete Aktin-Filamente darstellen. Eine vermehrte Bildung von INF2-abhängigen Aktin-Filamenten könnte zu einer Sequestrierung der zellulären Aktin-Monomere führen, die daraufhin für die Bildung des F-Aktins der Podosomenkerne fehlen. Das würde eine Erklärung für die verringerte Anzahl der Podosomen pro Zelle in INF2-A149D-exprimierenden Makrophagen geben.

#### **4.4 INF2 reguliert die Größe von Podosomen**

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde der Einfluss von INF2 auf die Struktur von Podosomen in primären humanen Makrophagen untersucht.

Hierbei konnte INF2 als ein wichtiger negativer Regulator der Podosomengröße identifiziert werden. Ein Knockdown von INF2 führte zu einer Vergrößerung der Podosomendurchmesser von ungefähr 25 %. Dieses Ergebnis konnte durch die Überexpression von konstitutiv aktivem INF2 bestätigt werden. Die Überexpression von INF2-A149D führte zu einer Verringerung der Durchmesser von ungefähr 50 %. Dieser Wert gab jedoch keinen eindeutigen Hinweis darauf, ob die reguläre Form der Podosomen durch einen Knockdown von INF2 erhalten bleibt. Ein größerer Durchmesser in Verbindung mit einer kleineren Höhe der Podosomenkerne würde zu einer veränderten Form, aber einem gleichbleibenden Volumen führen. Zur Klärung dieser Frage wurde daher die Höhe der Podosomenkerne in INF2-Knockdown-Zellen bestimmt. Da die ermittelte Höhe ungefähr 20 % größer war als in den mitgeführten Kontrollzellen, kann von einer allgemeinen Erhöhung des Volumens und Erhalt der Struktur der Podosomenkerne ausgegangen werden (Abbildung 4.1 A).

Neben INF2 wurden bereits einige wenige Proteine beschrieben, die für die Regulation der Podosomengröße von Bedeutung sind. In humanen Makrophagen induziert die Kinase PAK4 Änderungen in den Dynamiken von Aktin und reguliert somit die Größe

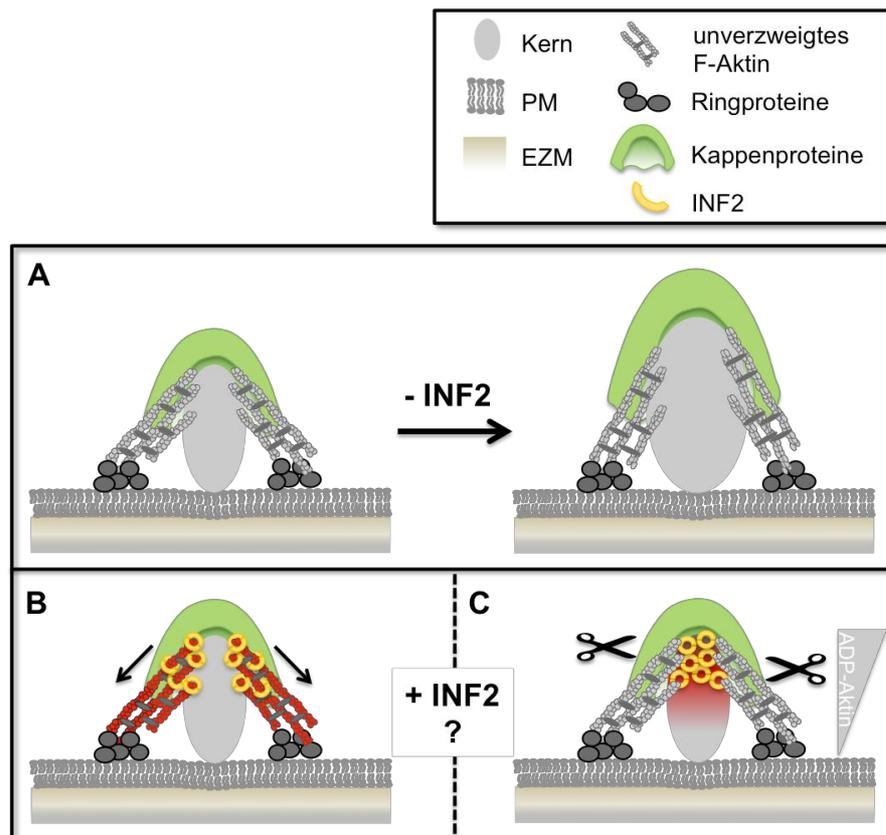
der Podosomen (Gringel *et al.*, 2006). Auch das Aktin-bündelnde Kappenprotein Fascin scheint die Podosomengröße über einen Einfluss auf den *turnover* und die Auflösung von Podosomen in THP1-Makrophagen zu regulieren (Van Audenhove *et al.*, 2015). Zusammenfassend ist INF2 das zweite identifizierte Kappenprotein, das an der Größenregulation beteiligt ist und erweitert damit die Kenntnisse über die Funktion dieser Substruktur an Podosomen. Vor allem weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Kappe eine wichtige Rolle bei der Regulation der Podosomengröße spielt.

Im Allgemeinen beschleunigen Formine als Dimere die Nukleation von F-Aktin und regulieren durch die bleibende Bindung am Plusende des Aktin-Filaments seine Verlängerung (Goode und Eck, 2007). Da die Plusenden des F-Aktin-Netzwerkes im Podosomenkern in Richtung Plasmamembran gerichtet sind (Linder, 2007), ist eine Regulation der Größe über die Fähigkeit von INF2 zur Polymerisation von F-Aktin unwahrscheinlich. Neben der Nukleation und Polymerisation von F-Aktin kann INF2 jedoch auch Filamente schneiden sowie die Depolymerisation beschleunigen (Chhabra und Higgs, 2006).

INF2 könnte demnach die Größe von Podosomen über die lateralen Aktin-Filamente regulieren, welche die Spitze des Podosomenkerns mit den Ringproteinen verbinden. Die abwechselnde Polymerisation und Depolymerisation dieser kontraktiven Aktin-Filamente durch INF2 könnten das Wachstum des Kerns über Spannungsaufbau um das F-Aktin-Netzwerk limitieren (Abbildung 4.1 B). Eine Kombination aus Polymerisation und Depolymerisation von F-Aktin durch INF2 ist auch bei der Mitochondrien-Teilung beschrieben und zeigt, dass beide INF2-vermittelten Funktionen auf Aktin gleichzeitig *in vivo* stattfinden können (Korobova *et al.*, 2013; Korobova *et al.*, 2014). Unterstützt wird diese Hypothese durch den Einfluss von INF2 auf die Oszillation und die *de novo* Bildung von Podosomen, auf die später eingegangen wird.

*In vitro*-Studien mit INF2-FFC (Gurel *et al.*, 2015) verweisen auf eine alternative Hypothese, wie INF2 die Größe der Podosomenkerne reguliert. Dabei wäre die fortlaufende Hydrolyse vom ATP in den Aktin-Filamenten des Kerns von Bedeutung. *In vitro* binden Aktin-Monomere im ATP-gebundenen Zustand an das schnell wachsende Plusende eines Filaments. Während der Verlängerung und der natürlichen Reifung findet im Filament die Hydrolyse von ATP statt und ein Phosphat wird abgespalten (Wegner und Isenberg, 1983). Da die Plusenden des F-Aktin-Netzwerkes im Podosomenkern in Richtung Plasmamembran zeigen (Linder, 2007), könnte die Dichte an ADP-gebundenen Aktin-Untereinheiten in Podosomenkernen durch die hydrolysierende Eigenschaft der Aktin-Filamente im Bereich der Kappe höher als in Richtung der Plasmamembran sein. Durch die Hydrolyse von ATP und die

Phosphatabspaltung in den Aktin-Untereinheiten schneidet seitlich gebundenes INF2 das Filament und beschleunigt so die Depolymerisation von F-Aktin (Gurel *et al.*, 2014; Gurel *et al.*, 2015). INF2-Dimere können seitlich über die gesamte Länge an Aktin-Filamente binden, was in hochauflösender *atomic force microscopy* mit INF2-FFC gezeigt wurde (Sharma *et al.*, 2014). Das in der Kappe, über dem Kern lokalisierte INF2 könnte über diese schneidende und depolymerisierende Funktion in den ADP-enhaltenen Bereichen die Größe des Podosomenkerns regulieren (Abbildung 4.1 C).



**Abb. 4.1: Mögliche Regulationsmechanismen der Größe von Podosomen durch INF2.** Modell von einem Podosom (PM: Plasmamembran, EZM: extrazelluläre Matrix). (A) Knockdown von INF2 führt zu einer Vergrößerung des Volumens vom Podosomenkern. Die Kappe und der Ring bleiben dabei erhalten. (B, C) Mögliche Regulationsmechanismen durch INF2. (B) Über Depolarisation und Polymerisation durch INF2 werden Spannungen in den lateralen Aktin-Filamenten (rot) erzeugt (schwarze Pfeile), die das Wachstum des Podosomenkerns limitieren. (C) Durch einen spekulierten, ansteigenden ADP-Aktin-Gehalt in der Spitze des Podosomenkerns (ansteigende Fläche, grau) schneidet seitlich gebundenes INF2 (Scheren, schwarz) und fördert so die Depolymerisation des F-Aktins. (modifiziert nach Linder und Wiesner, 2015)

Auch in Fibroblasten scheint die schneidende Funktion von INF2 für die Reifung von Adhäsionsstrukturen, den fokalen Adhäsionen, von Bedeutung zu sein. Ein Knockdown von INF2 führt zu einer verringerten Bildung von freien, polymerisierbaren Aktin-Plusenden an diesen Adhäsionsstrukturen. Anders als bei den hier beschriebenen Podosomen, sind die gebildeten fokalen Adhäsionen nach INF2-Knockdown kleiner als

in den Kontrollzellen. Die freien Plusenden fördern dort die Verlängerung der Aktin-Bündel, die mit den fokalen Adhäsionen assoziiert sind und der Bildung von dorsalen Stressfasern dienen (Skau *et al.*, 2015).

Die Regulation der Größe durch INF2 ist jedoch nicht vom Austausch des F-Aktins in den Podosomen abhängig, wie die Ergebnisse der FRAP-Experimente zeigen. Die ermittelte Geschwindigkeit des Aktin-Austausches in Podosomen von INF2-Knockdown-Zellen war im Vergleich zu der Kontrolle unverändert. Der Großteil des podosomal F-Aktins befindet sich jedoch im Podosomenkern und ist demnach vom Arp2/3-Komplex gebildet. Da die lateralen Aktin-Filamente nur einen kleinen Anteil der Gesamtmenge an F-Aktin der Podosomen darstellen, könnte ein Unterschied in der Geschwindigkeit des Austausches von Aktin in diesen Filamenten keinen messbaren Unterschied im Gesamtaustausch des podosomal Aktins haben.

Die mit FRAP ermittelten Halbwertszeiten der Erholung sind ungefähr 10 s. Dieser Wert ist deutlich geringer als die bereits veröffentlichten Werte von circa 30 s in Osteoklasten (Destaing *et al.*, 2003; Luxenburg *et al.*, 2012) und dendritischen Zellen (Götz und Jessberger, 2013) und circa 20 s in Makrophagen (Evans *et al.*, 2006). In diesen Forschungsarbeiten wurde jedoch ein Bereich geblichen, der mehrere Podosomen enthielt. In dieser Arbeit wurden hingegen nur einzelne Podosomen gewählt. Daher kann sich das Fluoreszenzsignal in den geblichenen Regionen schneller erholen und die berechneten Halbwertszeiten der Erholung sind geringer. Sie geben darüber hinaus eine genauere Aussage über den podosomal Aktin-Austausch.

Obwohl INF2 in dieser Arbeit als negativer Regulator der Größe der Podosomen identifiziert wurde, ist das Formin vermutlich nicht an der Aufrechterhaltung der Kappe beteiligt. Dreidimensionale Rekonstruktionen einzelner Podosomen zeigten, dass die Lokalisation von Supervillin in der Kappe in INF2-Knockdown-Zellen unverändert ist. Darüber hinaus scheint INF2 die Verteilung der Ringproteine nicht zu beeinflussen, da das Ringprotein Vinculin in INF2-Knockdown-Zellen die gleiche Lokalisation wie in den Kontrollzellen zeigte.

Zusammenfassend zeigt sich INF2 als negativer Regulator der Podosomenanzahl und der Größe, wobei es den Aufbau der Podosomen nicht beeinflusst. In anschließenden Experimenten sollte untersucht werden, ob INF2 auch einen Einfluss auf die verschiedenen Dynamiken und auf die Funktion der Podosomen hat.

## 4.5 INF2 beeinflusst die Lebensdauer der Podosomen

Die Lebensdauer von Podosomen wird der Literatur als 2 bis 12 min beschrieben (Destaing *et al.*, 2003). Diese Lebensdauer wurde von Podosomen in Osteoklasten bestimmt. In Makrophagen ist die Lebensdauer im Vergleich dazu erhöht. Ungefähr 10 % der Podosomen in Kontrollzellen bleiben länger als 20 min bestehen. In Osteoklasten werden Podosomen sehr früh während ihrer Differenzierung gebildet und werden in Cluster organisiert. Daraus entwickeln sich während der weiteren Reifung der Osteoklasten dynamische Ringe, die sich zum peripheren Gürtel zusammenfinden, der sich auf Knochenmaterial zur *sealing zone* entwickelt (Luxenburg *et al.*, 2007). Diese erhöhte Menge an podosomalen Erscheinungsformen in Osteoklasten könnte auf andere Dynamiken und Lebensdauern ihrer Podosomen im Vergleich zu den Podosomen in Makrophagen hinweisen.

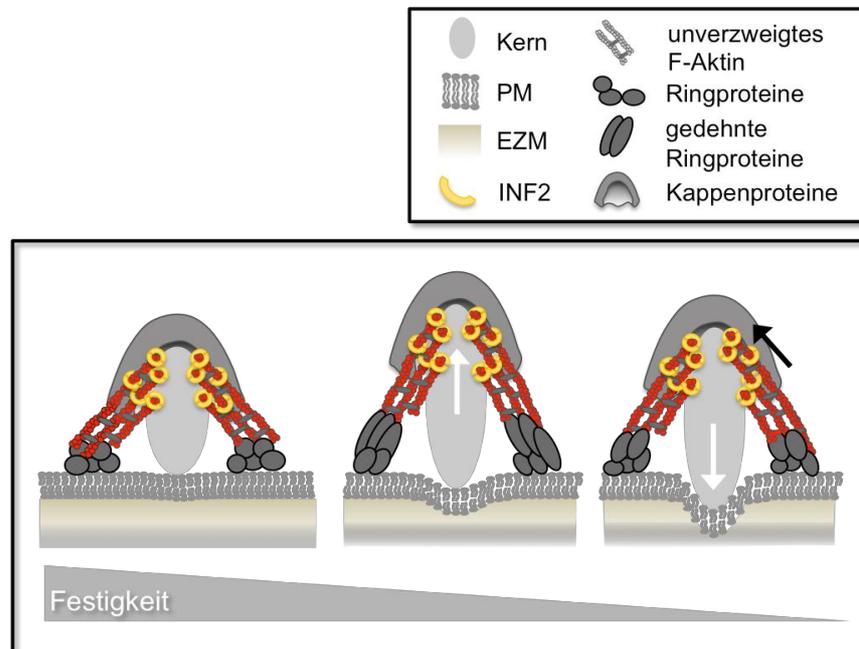
In Makrophagen mit einem INF2-Knockdown war zudem die Gruppe der langlebigen, über 20 min persistierenden Podosomen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant erhöht. Eine mögliche Erklärung könnte die erhöhte Größe der Podosomen in diesen Zellen sein. Die erhöhte Menge an Aktin im Kern könnte zu einer zeitlichen Verzögerung des Auflösens der Podosomen und demnach zu einer Erhöhung der Lebensdauer führen.

## 4.6 INF2 spielt eine Rolle beim *mechanosensing*

Podosomen zeigen Dynamiken, die eng an ihre Funktion als mechanosensorische Einheit gekoppelt sind. In Makrophagen und Osteoklasten wurde bereits gezeigt, dass durch eine Kombination aus wachsendem Podosomenkern und Kontraktion der lateralen Aktin-Filamente zyklische Bewegungen der Podosomen entstehen (Linder und Wiesner, 2015; Labernadie *et al.*, 2010; Labernadie *et al.*, 2014; van den Dries *et al.*, 2013). Diese Oszillationen sind an die Fähigkeit der Podosomen zum *mechanosensing* gekoppelt (Luxenburg *et al.*, 2012). Mit *Protrusion force microscopy* wurde in Makrophagen nachgewiesen, dass die zyklischen Bewegungen mit der Protrusionskraft der Podosomen korrelieren (Labernadie *et al.*, 2014). Auch *internal reflection microscopy* (IRM), mit der Podosomen von dendritischen Zellen untersucht wurden, zeigte die Korrelation zwischen den Oszillationen des Kerns und dem ausgeübten Druck auf das unterliegende Substrat (van den Dries *et al.*, 2013).

Auch in dieser Arbeit wurde die Oszillation der Podosomenkerne von humanen

Makrophagen in Hinblick auf ihre Fluktuationen in den Aktin-Intensitäten untersucht. In INF2-Knockdown-Zellen oszillierten die Podosomenkerne deutlich geringer als in den Kontrollzellen. Das lässt vermuten, dass INF2 das erste beschriebene Kappenprotein ist, das beim *mechanosensing* der Podosomen eine Rolle spielt (Abbildung 4.2).



**Abb. 4.2: Modulation der lateralen Aktin-Filamente durch INF2 beim *mechanosensing*.** Modell von einem Podosom bei der Messung der Matrix-Elastizität (PM: Plasmamembran, EZM: extrazelluläre Matrix). Durch das Wachstum des Podosomenkerns wirken Kräfte auf die Plasmamembran (*weiße Pfeile*), die zur Entstehung von Gegenkräften an den lateralen Aktin-Filamente (*schwarzer Pfeil*) und zur Streckung spannungssensitiver Ringproteine (*dunkelgrau*) führen. Die lateralen Aktin-Filamente (*rot*) werden dabei durch Polymerisation und Depolymerisation von INF2 (*gelb*) moduliert. Je nach Festigkeit der Matrix (*absteigende Fläche in grau*) können Podosomen mehr oder weniger in die Matrix ragen. (modifiziert nach Linder und Wiesner, 2015)

Die FRAP-Experimente zeigten, dass die positive Regulation der podosomalen Oszillation durch INF2 nicht über einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Austausches von Aktin innerhalb der Podosomenkerne reguliert wird. Die verminderte Oszillation entsteht daher vermutlich durch den Einfluss von INF2 auf die lateralen Aktin-Filamente. Diese Hypothese ist übereinstimmend mit dem Modell, dass INF2 die Größe der Podosomen über den Einfluss auf die lateralen Aktin-Filamente reguliert (Kapitel 4.4). *In vitro*-Studien mit INF2-FFC zeigten, dass INF2 allein einen Zyklus aus Polymerisation und Depolymerisation ermöglichen kann. *In vivo* könnte das in einer Bildung von kurzen Filamenten resultieren, die nur für eine kurze Zeit zur Verfügung stehen (Gurel *et al.*, 2014). Zukünftige Experimente sollten daher klären, ob die lateralen Aktin-Filamente eher langlebige, strukturelle Komponenten sind oder ob die Oszillation die Bildung zusätzlicher lateraler Aktin-Filamente benötigt. Langlebige,

laterale Aktin-Filamente könnten für die Oszillation von INF2 moduliert werden. Wie für INF2-CAAX in der Mitochondrien-Teilung beschrieben ist, führt die Bildung von kurzlebigen Aktin-Filamenten durch INF2 zur Rekrutierung von Myosin II (Korobova *et al.*, 2014). Somit könnte das Wachstum des Kerns auch als Signal für die Bildung von kurzlebigen, lateralen Aktin-Filamenten dienen, die Kontraktionen durch zusätzliche Rekrutierung von Myosin II vermitteln.

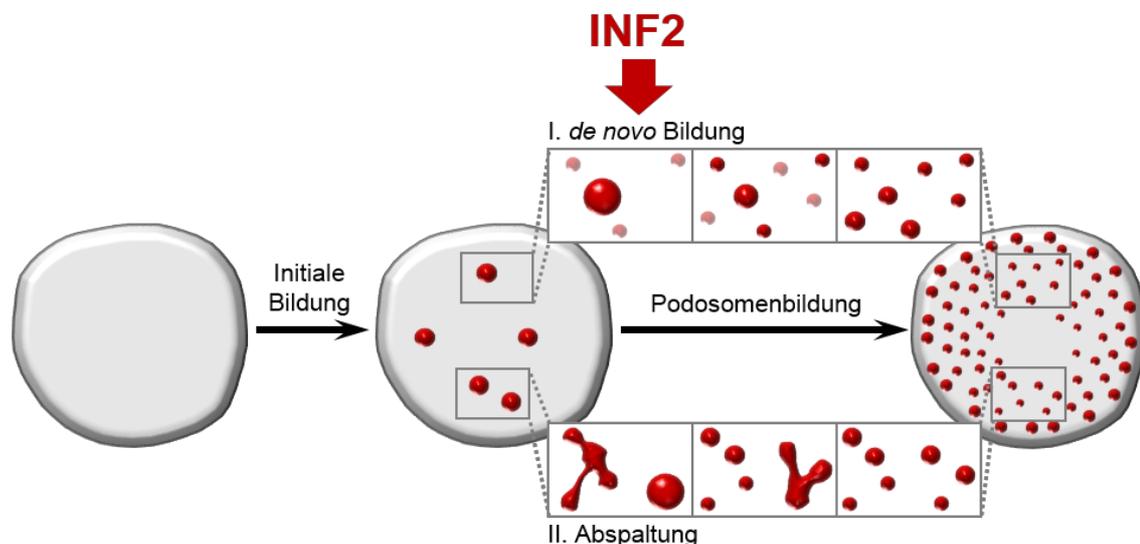
Beide Möglichkeiten passen in das heutige Modell, in dem die lateralen Aktin-Filamente als mechanische Federn dargestellt sind (Labernadie *et al.*, 2014). Die konstante Polymerisation und Depolymerisation durch INF2 könnte diesem System die notwendige Flexibilität geben.

#### 4.7 INF2 beeinflusst die *de novo*-Bildung von Podosomen

Im Verlauf dieser Arbeit wurde auch die Entstehung der Podosomen untersucht. Im Podosomen-Neubildungs-Assay wurden die Zellen mit PP2 behandelt, einem Inhibitor der Tyrosinkinase Src, was zu einem Verlust der Podosomen von ungefähr 90 % führte. Durch anschließendes Auswaschen des Inhibitors kann die Neubildung der Podosomen beobachtet und analysiert werden. Während des Auswaschens war die Neubildung der Podosomen in INF2-Knockdown-Zellen deutlich langsamer als in den Kontrollzellen. Ebenso konnte die Podosomenanzahl der Kontrollkondition (-PP2) in INF2-Knockdown-Zellen nach 120 min Auswaschen des Inhibitors nicht wieder erreicht werden. Im Gegensatz dazu war bei den Kontrollzellen bereits nach 60 min Auswaschen die Podosomenanzahl der DMSO-Kontrolle erreicht. Zudem waren in diesen Experimenten die Podosomendichten der INF2-Knockdown-Zellen nach 30 min Auswaschen des Inhibitors signifikant geringer als in den Kontrollzellen. Die Podosomendichte gibt eine indirekte Aussage über die Abstände zwischen den Podosomen. Sie wird über das Verhältnis von der Anzahl der Podosomen und von der Podosomen-bedeckten Fläche bestimmt. Das deutete darauf hin, dass die Abstände zwischen den neugebildeten Podosomen in INF2-Knockdown-Zellen geringer als bei denen der Kontrollzellen waren.

Podosomen zeigen zwei verschiedene Entstehungsmechanismen. Sie können *de novo* entstehen oder durch Abspaltung von bereits vorhandenen Podosomen gebildet werden (Abbildung 4.3; Evans *et al.*, 2003). Die verzögerte Neubildung und geringere Dichte der Podosomen in INF2-Knockdown-Zellen im Podosomen-Neubildungs-Assay lässt vermuten, dass einer der Entstehungsmechanismen der Podosomen durch die

Abwesenheit von INF2 beeinträchtigt wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde der Podosomen-Neubildungs-Assay auch in der Lebendzellmikroskopie durchgeführt. Eine neue Erkenntnis aus diesen Experimenten war, dass die Neubildung der Podosomen in zwei Phasen stattfindet. Die erste Phase ist vorwiegend durch *de novo* Bildung geprägt (Abbildung 4.3, initiale Bildung), wohingegen Podosomen in der zweiten Phase ebenso durch Abspaltung von bereits vorhandenen Podosomen entstehen (Abbildung 4.3, Podosomenbildung). In INF2-Knockdown-Zellen konnte eine signifikante Verringerung der *de novo* gebildeten Podosomen im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass INF2 ein positiver Regulator der *de novo* Bildung von Podosomen ist (Abbildung 4.3). Das erklärt auch die Ergebnisse der Experimente mit den fixierten Proben. Die Verzögerung der Neubildung in INF2-Knockdown-Zellen ist auf eine verminderte Anzahl an *de novo* gebildeten Podosomen zurückzuführen. Zusätzlich kann die Verringerung der Podosomen-Dichte in den INF2-Knockdown-Zellen durch die wenigen Entstehungsorte von *de novo*-gebildeten Podosomen begründet werden.



**Abb. 4.3: INF2 hat Einfluss auf die *de novo* Bildung von Podosomen.** Modell eines Makrophagen (*grau*) während der Bildung der Podosomen (*rot*). Die initiale Bildung ist vorwiegend durch *de novo* Bildung der Podosomen geprägt. In der zweiten Phase (Podosomenbildung) entstehen Podosomen durch *de novo* Bildung (I) und durch Abspaltung von bereits vorhandenen Podosomen (II). INF2 ist bei diesem Prozess ein positiver Regulator der *de novo* Bildung.

INF2 reguliert die *de novo* Bildung der Podosomen vermutlich über den Einfluss auf die lateralen Aktin-Filamente, der in Kapitel 4.4.2 zur Oszillation bereits beschrieben wurde. Der Fokus liegt bei der *de novo* Bildung jedoch hauptsächlich auf der polymerisierenden Funktion von INF2. Nach dieser Theorie assoziieren während der *de novo* Bildung von Podosomen die typischen Podosomen-Komponenten schrittweise

nacheinander. Nach der Akkumulation von Cortactin im Kern und Paxillin im Ring wird die Arp2/3-abhängige Nukleation des F-Aktins im Podosomenkern aktiviert (Luxenburg *et al.*, 2012; Linder *et al.*, 2000). Vermutlich entstehen während des Kern-Wachstums Signale, die die INF2-vermittelte Polymerisation der lateralen Aktin-Filamente aktivieren.

Alternativ könnte die *de novo* Bildung der Podosomen über die regulatorischen Eigenschaften von INF2 auf Mikrotubuli beeinflusst werden. Mikrotubuli sind für die Neubildung von Podosomen essentiell (Linder *et al.*, 2000). INF2 könnte eine mögliche Verknüpfung zwischen Mikrotubuli und Aktin, vor allem bei der *de novo* Bildung, darstellen. *In vitro* ist INF2-FFC ein wirksames Mikrotubuli-bündelndes Protein. Dabei kann es Mikrotubuli und Aktin gleichzeitig binden, wobei die Aktin-Polymerisation durch INF2 nicht beeinflusst wird (Gaillard *et al.*, 2011). Für das Formin mDia2 konnte in Osteoklasten bereits gezeigt werden, dass es über den Rho-Signalweg die Mikrotubuli-Dynamiken beeinflusst und die Stabilität des Podosomengürtels ändert (Destaing *et al.*, 2005). Auch in Makrophagen führt die Acetylierung und somit Stabilisierung von Mikrotubuli zu einer verringerten Kontaktierung der Podosomen durch Mikrotubuli-Plusenden und Anzahl der Podosomen pro Zelle (Bhuwania *et al.*, 2014). Auch die Regulation der Stabilität von Mikrotubuli durch INF2 ist denkbar. Für INF2 wurde in T-Zellen gezeigt, dass es die Stabilisierung von Mikrotubuli als Antwort auf die Bildung der immunologischen Synapse vermittelt (André-Delgado *et al.*, 2012). Ein interessanter Hinweis für zukünftige Experimente wäre die Untersuchung der Rolle von INF2 in der Regulation der Mikrotubuli-Dynamiken im Modell-System Podosomen.

#### **4.8 Einfluss von INF2 auf Podosomen-verbindende Aktin-Kabel**

Die Regulation der Größe, Oszillation und Neubildung der Podosomen ist vermutlich durch den Einfluss von INF2 auf die lateralen Aktin-Filamente vermittelt. Die zweite Population an linearem, unverzweigtem Aktin sind die Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel. Unter Verwendung von hochauflösender Mikroskopie (*structured illumination microscopy*) wurde daher der Einfluss von INF2 auf diese F-Aktin-Kabel untersucht. In den Kontrollzellen waren die Kabel kaum erkennbar. Der Knockdown von INF2 führte hingegen zu einer diffusen, unorganisierten Verteilung der Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel. Zwar waren die Kabel deutlicher erkennbar, wirkten jedoch eher unstrukturiert. Die subjektive Einteilung nach Ausprägung des Phänotyps zeigte in den INF2-Knockdown-Zellen eine Erhöhung der Anzahl an Zellen,

die den unstrukturierten Phänotyp aufweisen. INF2 scheint daher bei der regulären Bildung beziehungsweise an der Aufrechterhaltung dieser F-Aktin-Kabel involviert zu sein. Das Ergebnis gibt einen möglichen Hinweis auf die Funktion der Kappenstruktur als organisierende Struktur der Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel, was vorausgehend bereits spekuliert wurde (Linder und Wiesner, 2015).

Zum heutigen Zeitpunkt ist es noch unklar, ob es sich bei diesen unorganisierten Aktin-Filamenten in INF2-Knockdown-Zellen um eine wirkliche Zunahme der Podosomen-verbindenden Kabel handelt. Da INF2 Aktin-Filamente schneiden und depolymerisieren kann (Chhabra und Higgs, 2006), könnte das Formin die Menge an Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabeln kontrollieren.

Andererseits könnten die unorganisierten Aktin-Filamente auch auf eine verminderte Bündelung der Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel hinweisen und daher leichter zugänglich für Phalloidin-Färbungen sein. Einige Formine sind effektive Aktin-bündelnde Proteine, wie FMNL1, mDia2 oder FHOD1 (Harris *et al.*, 2006; Schönichen *et al.*, 2013). Die DID-Domäne von INF2 kann *in vitro* an die DAD-Domäne von mDia binden und das Formin durch diese Bindung inhibieren (Sun *et al.*, 2011). Über diesen Mechanismus reguliert INF2 in Podozyten die Aktin-abhängigen Prozesse, die durch Rho und mDia vermittelt werden (Sun *et al.*, 2013). Es ist vorstellbar, dass INF2 in Makrophagen über diesen Mechanismus ein anderes Formin, das die Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel bündelt, regulieren kann und somit die Organisation dieser F-Aktin-Kabel indirekt beeinflusst.

Weitere Untersuchungen über die Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel und das Zusammenspiel von verschiedenen Forminen an dieser Struktur wären für zukünftige Experimente denkbar.

## 4.9 INF2 reguliert den Abbau extrazellulärer Matrix

Die oben beschriebenen Ergebnisse über die Regulation der Größe, Oszillation, Neubildung und die Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel werden vermutlich über die Regulation der Podosomen-Struktur durch INF2 vermittelt. Zusätzlich zu diesen strukturellen und dynamischen Eigenschaften, beeinflusst INF2 auch die proteolytische Aktivität von Podosomen. INF2 konnte in dieser Arbeit als positiver Regulator des Abbaus von extrazellulärer Matrix durch Makrophagen identifiziert werden. Makrophagen mit einem INF2-Knockdown zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Abnahme des Podosomen-vermittelten Matrix-Abbaus von ungefähr 30 %. Da die

meisten Podosomen in INF2-Knockdown-Zellen eine normale Lebensdauer zeigen und die Anzahl der Podosomen pro Zelle unverändert ist, wird die Reduktion des Matrix-Abbaus nicht durch ein Fehlen dieser Strukturen vermittelt.

Da die Podosomenkappe möglicherweise beim Andocken von Vesikeln eine Bedeutung hat (Linder *et al.*, 2011), könnte INF2 regulatorische Funktionen bei der Rekrutierung und Sekretion von Matrix-abbauenden Enzymen haben. Der lokale Abbau der extrazellulären Matrix wird vor allem von den Matrix-Metalloproteasen MT1-MMP, MMP-2 und MMP-9 vermittelt (Linder *et al.*, 2011). Von Bedeutung ist dabei vor allem MT1-MMP, da es eine Vielzahl von Substraten spaltet, darunter Komponenten der extrazellulären Matrix, Matrix-Rezeptoren und andere MMPs (Barbolina und Stack, 2008). In primären humanen Makrophagen werden MT1-MMP-positive Vesikel über Mikrotubuli vom Golgi-Apparat bis zur Plasmamembran transportiert. Dort bleiben sie wenige Sekunden im Kontakt mit Podosomen, wobei sie sich an der Ringstruktur der Podosomen entlang bewegen (Wiesner *et al.*, 2010). Es wurde bereits spekuliert, dass die Vesikel mit Komponenten aus Ring, Kappe oder Kern in Kontakt treten (Linder *et al.*, 2011). Wie bereits erwähnt, kann INF2 Mikrotubuli und Aktin *in vitro* gleichzeitig binden (Gaillard *et al.*, 2001). Daher könnte das Kappenprotein den Kontakt zwischen Mikrotubuli und den Aktin-Substrukturen der Podosomen vermitteln und so die Rekrutierung und Sekretion von MT1-MMP an Podosomen beeinflussen. Da die Bindung von Mikrotubuli die Aktin-Polymerisation-Fähigkeit von INF2 nicht beeinflusst (Gaillard *et al.*, 2011), könnten die in dieser Arbeit ermittelten regulatorischen Funktionen von INF2 auf die Aktin-Subpopulationen gleichzeitig stattfinden.

Alternativ könnte INF2 auch einen direkten Einfluss auf den Vesikeltransport haben. Für den Transport von Vesikeln während der Transzytose in Hepatozyten (Madrid *et al.*, 2010) und von Lck-Tyrosinkinase-enthaltenden Vesikeln zu der Plasmamembran in Jurkat T-Zellen (Andrés-Delgado *et al.*, 2010) wurde gezeigt, dass sie durch die Bildung von kurzen Aktin-Filamenten durch INF2 reguliert werden.

Zukünftige Experimente könnten einerseits den Einfluss von INF2 auf den Mikotubuli-abhängigen Transport von Matrix-lysierenden Enzymen zu den Podosomen untersuchen. Andererseits könnte allgemeiner die Funktion von INF2-abhängig gebildeten, kurzen Aktin-Filamenten auf den Vesikeltransport in Makrophagen Grundlage für weitere Untersuchungen sein.

## 4.10 Hinweise auf die Funktion der Podosomenkappe

Das Formin INF2 wurde in dieser Arbeit als viertes Protein identifiziert, dass in der Podosomenkappe lokalisiert. Die Kappe ist eine relativ neu entdeckte und wenig charakterisierte Substruktur der Podosomen (Linder *et al.*, 2011). Bisher wurden nur drei weitere Kappenproteine beschrieben: FMNL1 (Mersich *et al.*, 2010), Supravillin (Bhuwania *et al.*, 2012) und Fascin (Van Audenhove *et al.*, 2015). Das Formin FMNL1 scheint für die Adhäsion von Makrophagen und für die Stabilität der Podosomen von Bedeutung zu sein (Mersich *et al.*, 2010). Supravillin lokalisiert vor allem in der Kappe von den stabileren und kleineren Podosomen (*successors*) in der Zellmitte. Es kann Myosin IIa binden und fördert durch eine Erhöhung der lokalen Aktomyosin-Kontraktilität das Auflösen der Podosomen (Bhuwania *et al.*, 2012). Auch das Aktin-bündelnde Protein Fascin ist an der Regulation der Auflösung sowie am *turnover* von Podosomen beteiligt (Van Audenhove *et al.*, 2015).

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse geben weitere Hinweise auf die Funktion der Podosomenkappe. In Abbildung 4.4 sind die wichtigsten, ermittelten Funktionen des Kappenproteins INF2 zusammengefasst. INF2 beeinflusst dabei die strukturellen, dynamischen und proteolytischen Eigenschaften von Podosomen.

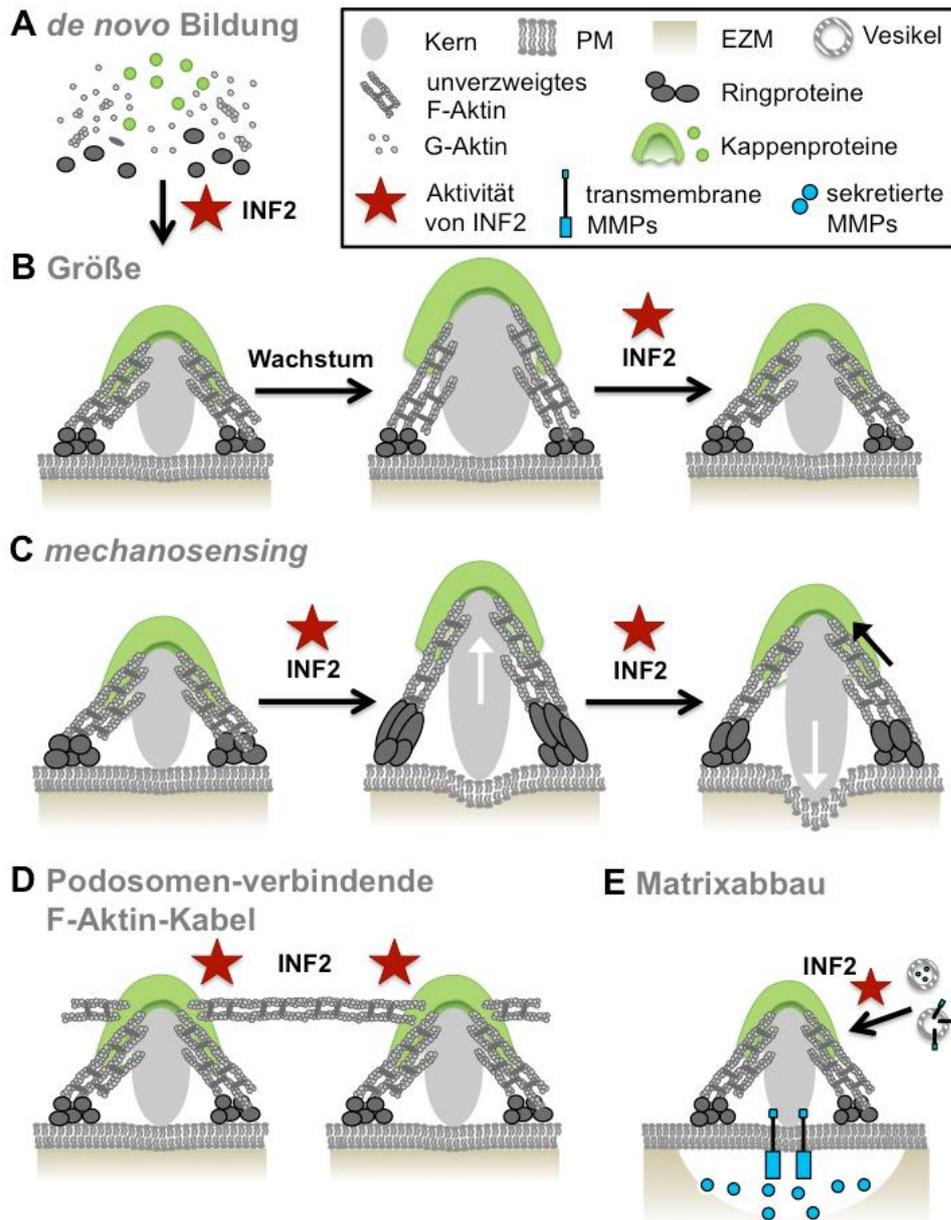
Wie das Kappenprotein Fascin (Van Audenhove *et al.*, 2015), ist INF2 an der Regulation der Größe von Podosomen beteiligt (Abbildung 4.4 B). Diese Ergebnisse weisen auf die wichtige Rolle der Podosomenkappe bei der Regulation der Podosomengröße hin.

Ein weiterer struktureller Aspekt ist die Beteiligung von INF2 an der Aufrechterhaltung beziehungsweise regulären Ausbildung der Podosomen-verbindenden Aktin-Kabel (Abbildung 4.4 D).

Neben der Arp2/3-abhängigen Nukleation des verzweigten F-Aktins im Kern ist auch die Polymerisation der lateralen Aktin-Filamente durch INF2 für die *de novo* Bildung der Podosomen notwendig (Abbildung 4.4 A). Über die Modifizierung der lateralen Aktin-Filamente beeinflusst INF2 darüber hinaus die Oszillation von Podosomen (Abbildung 4.4 C). Somit ist INF2 das erste Kappenprotein, das am *mechanosensing* beteiligt ist. Diese Ergebnisse liefern einen weiteren Hinweis über die Funktion der bisher wenig charakterisierten Kappe.

Eine weitere Funktion der Podosomen, die von INF2 positiv beeinflusst wird, ist der Abbau extrazellulärer Matrix (Abbildung 4.4, E). Der proteolytische Abbau der Matrix ist

vor allem bei der Migration von Makrophagen durch die verschiedenen Gewebearten im Körper bei zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen von Bedeutung. Es wurde bereits vermutet, dass die Kappe beim Andocken von Vesikeln wichtig ist (Linder *et al.*, 2011). INF2 reguliert den Abbau der extrazellulären Matrix wahrscheinlich über einen Einfluss auf die Rekrutierung oder Sekretion von Matrix-lyisierenden Enzymen.



**Abb. 4.4: Funktionen von INF2 in primären humanen Makrophagen.** Modell von einem Podosome (PM: Plasmamembran, EZM: extrazelluläre Matrix). **(A)** INF2 ist an der *de novo* Bildung von Podosomen beteiligt. **(B)** INF2 ist ein negativer Regulator der Größe von Podosomen. **(C)** Über die Regulation der lateralen Aktin-Filamente beeinflusst INF2 die Oszillation der Podosomen und ist daher in das *mechanosensing* (Erkennen der Matrix-Elastizität) involviert. **(D)** INF2 ist in die Aufrechterhaltung beziehungsweise die reguläre Ausbildung der Podosome-verbindernden F-Aktin-Kabel involviert. **(E)** INF2 ist ein positiver Regulator des Abbaus von extrazellulärer Matrix. (modifiziert nach Linder und Wiesner, 2015)

Zusammenfassend tragen die Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der Struktur, Regulation und Dynamik von Podosomen bei und geben neuste Hinweise auf die Funktion der Podosomenkappe. Des Weiteren erweitern die Resultate das derzeitige Wissen über die Funktion der nonCAAX-Isoform von INF2. Darüber hinaus weisen sie Podosomen als eine der wenigen identifizierten Strukturen aus, die sowohl auf die Aktivität vom Arp2/3-Komplex als auch auf die Aktivität von Forminen angewiesen sind.

## 5 Zusammenfassung

Podosomen sind hochdynamische, F-Aktin-reiche Strukturen in Zellen monozytischer Abstammung, einschließlich Makrophagen. Sie verbinden verschiedene Funktionen, die für das Erkennen und Überwinden von natürlichen Barrieren, wie z.B. Blutgefäße, Gewebegrenzen und die extrazelluläre Matrix, wichtig sind. Dazu gehören die Zell-Substrat-Adhäsion, der Abbau extrazellulärer Matrix und das Erkennen von Matrix-Elastizität und topographischen Veränderungen (*mechanosensing*).

Podosomen bestehen aus einem F-Aktin-reichen Kern, der von einem Ring aus Plaque-Proteinen, wie Vinculin, Talin oder Paxillin, umgeben ist. Über dem Kern befindet sich die Kappe, eine neu entdeckte Substruktur, die Proteine wie FMNL1, Supervillin oder Fascin enthält. Die Bildung des stark verzweigten F-Aktins im Kern ist von Arp2/3-vermittelter Nukleation abhängig. Zusätzlich befinden sich an Podosomen unverzweigte Aktin-Filamente, die den Kern mit den Ringproteinen verbinden und den Podosomen zyklische Bewegungen (Oszillation) ermöglichen. Außerdem werden einzelne Podosomen von F-Aktin-Kabeln verbunden, die vermutlich die Äquidistanzen zwischen den Podosomen vermitteln und sie in größere Gruppen organisieren.

Die Proteine der Formin-Familie sind wirksame Regulatoren der Aktin-Filamente. Die von ihnen nukleierten und polymerisierten Aktin-Filamente sind, im Gegensatz zu Arp2/3-abhängig gebildeten Filamenten, unverzweigt und linear. Die Anwesenheit von unverzweigten lateralen und verbindenden Aktin-Kabeln an Podosomen ließ daher eine Regulation dieser Aktin-Filamente durch Formine vermuten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der spezifische Einfluss des Formins INF2 auf die Struktur und Funktion von Podosomen experimentell geprüft.

INF2 konnte als neue Komponente der Kappe von Podosomen in primären humanen Makrophagen identifiziert werden. Mit siRNA-vermitteltem Knockdown sowie Expression von konstitutiv aktivem INF2 wurden verschiedene Podosomen-assoziierte Parameter untersucht. Unter diesen Methoden befand sich auch die Messung von podosomal Oszillationen, FRAP-Analyse von einzelnen Podosomen, ein halbautomatisierter Podosomen-Neubildungs-Assay, *structured illumination microscopy* (SIM) und ein Matrix-Degradations-Assay.

Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass die lateralen Aktin-Filamente der Podosomen durch INF2-vermittelte Polymerisation und Depolymerisation kontrolliert

werden. Als negativer Regulator beeinflusst INF2 über diese Funktionen die Größe der Podosomen. Dabei hat das Formin keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Austausches von Aktin in der Arp2/3-regulierten Kernstruktur. Durch die Modulation der lateralen Aktin-Filamente ist INF2 darüber hinaus in die Regulation der Oszillation von Podosomen und somit in das Podosomen-basierte *mechanosensing* involviert. INF2 ist daher das erste identifizierte Kappen-Protein, das am *mechanosensing* beteiligt ist, was auf eine Funktion dieser bisher wenig charakterisierten Substruktur von Podosomen hinweist. Zusätzlich ist INF2 in den Prozess der *de novo* Bildung von Podosomen involviert.

Die Verwendung von *structured illumination microscopy* gab einen ersten Hinweis darauf, dass INF2 neben den lateralen Aktin-Filamenten auch an der Aufrechterhaltung beziehungsweise der regulären Ausbildung der Podosomen-verbindenden F-Aktin-Kabel beteiligt ist.

Neben den ermittelten regulatorischen Funktionen auf die Struktur und Dynamiken der Podosomen beeinflusst INF2 zusätzlich indirekt als positiver Regulator den Abbau der extrazellulären Matrix. Dies geschieht möglicherweise über einen Einfluss auf die Rekrutierung oder Sekretion von Matrix-lysierenden Enzymen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass INF2 die strukturellen, dynamischen und proteolytischen Eigenschaften von Podosomen beeinflusst. Des Weiteren tragen die Resultate zum derzeitigen Wissen über die Funktion der neu entdeckten Kappen-Substruktur bei. Gleichzeitig weisen sie Podosomen als eine der wenigen identifizierten Strukturen aus, die sowohl auf die Aktivität vom Arp2/3-Komplex als auch von Forminen angewiesen sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abram, Clare L., Darren F. Seals, Ian Pass, Daniel Salinsky, Lisa Maurer, Therese M. Roth, und Sara A. Courtneidge. „The Adaptor Protein Fish Associates with Members of the ADAMs Family and Localizes to Podosomes of Src-Transformed Cells.“ *The Journal of Biological Chemistry* 278, Nr. 19 (9. Mai 2003): 16844–51. doi:10.1074/jbc.M300267200.
- Akisaka, Toshitaka, Hisaho Yoshida, Reiko Suzuki, und Keiko Takama. „Adhesion Structures and Their Cytoskeleton-Membrane Interactions at Podosomes of Osteoclasts in Culture.“ *Cell and Tissue Research* 331, Nr. 3 (März 2008): 625–41. doi:10.1007/s00441-007-0552-x.
- Alberts, A. S. „Identification of a Carboxyl-Terminal Diaphanous-Related Formin Homology Protein Autoregulatory Domain.“ *The Journal of Biological Chemistry* 276, Nr. 4 (26. Januar 2001): 2824–30. doi:10.1074/jbc.M006205200.
- Andrés-Delgado, Laura, Olga M. Antón, und Miguel Angel Alonso. „Centrosome Polarization in T Cells: A Task for Formins.“ *Frontiers in Immunology* 4 (2013): 191. doi:10.3389/fimmu.2013.00191.
- Andrés-Delgado, Laura, Olga M. Antón, Francesca Bartolini, Ana Ruiz-Sáenz, Isabel Correias, Gregg G. Gundersen, und Miguel A. Alonso. „INF2 Promotes the Formation of Detyrosinated Microtubules Necessary for Centrosome Reorientation in T Cells.“ *The Journal of Cell Biology* 198, Nr. 6 (17. September 2012): 1025–37. doi:10.1083/jcb.201202137.
- Andrés-Delgado, Laura, Olga M. Antón, Ricardo Madrid, Jennifer A. Byrne, und Miguel A. Alonso. „Formin INF2 Regulates MAL-Mediated Transport of Lck to the Plasma Membrane of Human T Lymphocytes.“ *Blood* 116, Nr. 26 (23. Dezember 2010): 5919–29. doi:10.1182/blood-2010-08-300665.
- Barbolina, Maria V., und M. Sharon Stack. „Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase: Substrate Diversity in Pericellular Proteolysis.“ *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19, Nr. 1 (Februar 2008): 24–33. doi:10.1016/j.semcdb.2007.06.008.
- Bhuwania, Ridhirama, Antonio Castro-Castro, und Stefan Linder. „Microtubule Acetylation Regulates Dynamics of KIF1C-Powered Vesicles and Contact of Microtubule plus Ends with Podosomes.“ *European Journal of Cell Biology* 93, Nr. 10–12 (Oktober 2014): 424–37. doi:10.1016/j.ejcb.2014.07.006.
- Bhuwania, Ridhirama, Susanne Cornfine, Zhiyou Fang, Marcus Krüger, Elizabeth J. Luna, und Stefan Linder. „Supervillin Couples Myosin-Dependent Contractility to Podosomes and Enables Their Turnover.“ *Journal of Cell Science* 125, Nr. Pt 9 (1. Mai 2012): 2300–2314. doi:10.1242/jcs.100032.
- Boyer, Olivia, Fabien Nevo, Emmanuelle Plaisier, Benoit Funalot, Olivier Gribouval, Geneviève Benoit, Evelyne Huynh Cong, u. a. „INF2 Mutations in Charcot-Marie-Tooth Disease with Glomerulopathy.“ *The New England Journal of Medicine* 365, Nr. 25 (22. Dezember 2011): 2377–88. doi:10.1056/NEJMoa1109122.
- Breitsprecher, Dennis, und Bruce L. Goode. „Formins at a Glance.“ *Journal of Cell*

- Science* 126, Nr. Pt 1 (1. Januar 2013): 1–7. doi:10.1242/jcs.107250.
- Brown, Elizabeth J., Johannes S. Schlöndorff, Daniel J. Becker, Hiroyasu Tsukaguchi, Stephen J. Tonna, Andrea L. Uscinski, Henry N. Higgs, Joel M. Henderson, und Martin R. Pollak. „Mutations in the Formin Gene INF2 Cause Focal Segmental Glomerulosclerosis.“ *Nature Genetics* 42, Nr. 1 (Januar 2010): 72–76. doi:10.1038/ng.505.
- Burgstaller, Gerald, und Mario Gimona. „Actin Cytoskeleton Remodelling via Local Inhibition of Contractility at Discrete Microdomains.“ *Journal of Cell Science* 117, Nr. Pt 2 (15. Januar 2004): 223–31. doi:10.1242/jcs.00839.
- . „Podosome-Mediated Matrix Resorption and Cell Motility in Vascular Smooth Muscle Cells.“ *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 288, Nr. 6 (Juni 2005): H3001–5. doi:10.1152/ajpheart.01002.2004.
- Burns, S., A. J. Thrasher, M. P. Blundell, L. Machesky, und G. E. Jones. „Configuration of Human Dendritic Cell Cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS Protein, and Differentiation.“ *Blood* 98, Nr. 4 (15. August 2001): 1142–49.
- Campellone, Kenneth G., und Matthew D. Welch. „A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly.“ *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11, Nr. 4 (April 2010): 237–51. doi:10.1038/nrm2867.
- Cervero, Pasquale, Mirko Himmel, Marcus Krüger, und Stefan Linder. „Proteomic Analysis of Podosome Fractions from Macrophages Reveals Similarities to Spreading Initiation Centres.“ *European Journal of Cell Biology* 91, Nr. 11–12 (Dezember 2012): 908–22. doi:10.1016/j.ejcb.2012.05.005.
- Cervero, Pasquale, Linda Panzer, und Stefan Linder. „Podosome Reformation in Macrophages: Assays and Analysis.“ *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1046 (2013): 97–121. doi:10.1007/978-1-62703-538-5\_6.
- Chabadel, Anne, Inmaculada Bañon-Rodríguez, David Cluet, Brian B. Rudkin, Bernhard Wehrle-Haller, Elisabeth Genot, Pierre Jurdic, Ines M. Anton, und Frédéric Saltel. „CD44 and beta3 Integrin Organize Two Functionally Distinct Actin-Based Domains in Osteoclasts.“ *Molecular Biology of the Cell* 18, Nr. 12 (Dezember 2007): 4899–4910. doi:10.1091/mbc.E07-04-0378.
- Chellaiah, Meenakshi A. „Regulation of Podosomes by Integrin alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub> and Rho GTPase-Facilitated Phosphoinositide Signaling.“ *European Journal of Cell Biology* 85, Nr. 3–4 (April 2006): 311–17. doi:10.1016/j.ejcb.2006.01.008.
- Chellaiah, M., N. Kizer, M. Silva, U. Alvarez, D. Kwiatkowski, und K. A. Hruska. „Gelsolin Deficiency Blocks Podosome Assembly and Produces Increased Bone Mass and Strength.“ *The Journal of Cell Biology* 148, Nr. 4 (21. Februar 2000): 665–78.
- Chen, W. T. „Proteases Associated with Invadopodia, and Their Role in Degradation of Extracellular Matrix.“ *Enzyme & Protein* 49, Nr. 1–3 (1996): 59–71.
- Chesarone, Melissa A., Amy Grace DuPage, und Bruce L. Goode. „Unleashing Formins to Remodel the Actin and Microtubule Cytoskeletons.“ *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11, Nr. 1 (Januar 2010): 62–74. doi:10.1038/nrm2816.

- Chhabra, Ekta Seth, und Henry N. Higgs. „INF2 Is a WASP Homology 2 Motif-Containing Formin That Severs Actin Filaments and Accelerates Both Polymerization and Depolymerization.“ *The Journal of Biological Chemistry* 281, Nr. 36 (8. September 2006): 26754–67. doi:10.1074/jbc.M604666200.
- Chhabra, Ekta Seth, Vinay Ramabhadran, Scott A. Gerber, und Henry N. Higgs. „INF2 Is an Endoplasmic Reticulum-Associated Formin Protein.“ *Journal of Cell Science* 122, Nr. Pt 9 (1. Mai 2009): 1430–40. doi:10.1242/jcs.040691.
- Collin, Olivier, Philippe Tracqui, Angélique Stephanou, Yves Usson, Jocelyne Clément-Lacroix, und Emmanuelle Planus. „Spatiotemporal Dynamics of Actin-Rich Adhesion Microdomains: Influence of Substrate Flexibility.“ *Journal of Cell Science* 119, Nr. Pt 9 (1. Mai 2006): 1914–25. doi:10.1242/jcs.02838.
- Costa, Patricia, und Maddy Parsons. „New Insights into the Dynamics of Cell Adhesions.“ *International Review of Cell and Molecular Biology* 283 (2010): 57–91. doi:10.1016/S1937-6448(10)83002-3.
- Courtemanche, Naomi, Ja Yil Lee, Thomas D. Pollard, und Eric C. Greene. „Tension Modulates Actin Filament Polymerization Mediated by Formin and Profilin.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, Nr. 24 (11. Juni 2013): 9752–57. doi:10.1073/pnas.1308257110.
- Cox, Susan, Edward Rosten, James Monypenny, Tijana Jovanovic-Taliman, Dylan T. Burnette, Jennifer Lippincott-Schwartz, Gareth E. Jones, und Rainer Heintzmann. „Bayesian Localization Microscopy Reveals Nanoscale Podosome Dynamics.“ *Nature Methods* 9, Nr. 2 (Februar 2012): 195–200. doi:10.1038/nmeth.1812.
- Crimaldi, Luca, Sara A. Courtneidge, und Mario Gimona. „Tks5 Recruits AFAP-110, p190RhoGAP, and Cortactin for Podosome Formation.“ *Experimental Cell Research* 315, Nr. 15 (10. September 2009): 2581–92. doi:10.1016/j.yexcr.2009.06.012.
- Delaissé, J. M., M. T. Engsig, V. Everts, M. del Carmen Ovejero, M. Ferreras, L. Lund, T. H. Vu, u. a. „Proteinases in Bone Resorption: Obvious and Less Obvious Roles.“ *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 291, Nr. 2 (15. Februar 2000): 223–34.
- Destaing, Olivier, Marc R. Block, Emmanuelle Planus, und Corinne Albiges-Rizo. „Invadosome Regulation by Adhesion Signaling.“ *Current Opinion in Cell Biology* 23, Nr. 5 (Oktober 2011): 597–606. doi:10.1016/j.ceb.2011.04.002.
- Destaing, Olivier, Emmanuelle Planus, Daniel Bouvard, Christiane Oddou, Cedric Badowski, Valentine Bossy, Aurelia Raducanu, Bertrand Fourcade, Corinne Albiges-Rizo, und Marc R. Block. „ $\beta$ 1A Integrin Is a Master Regulator of Invadosome Organization and Function.“ *Molecular Biology of the Cell* 21, Nr. 23 (Dezember 2010): 4108–19. doi:10.1091/mbc.E10-07-0580.
- Destaing, Olivier, Frédéric Saltel, Jean-Christophe Géminard, Pierre Jurdic, und Frédéric Bard. „Podosomes Display Actin Turnover and Dynamic Self-Organization in Osteoclasts Expressing Actin-Green Fluorescent Protein.“ *Molecular Biology of the Cell* 14, Nr. 2 (Februar 2003): 407–16. doi:10.1091/mbc.E02-07-0389.

- Destaing, Olivier, Frédéric Saltel, Benoit Gilquin, Anne Chabadel, Saadi Khochbin, Stéphane Ory, und Pierre Jurdic. „A Novel Rho-mDia2-HDAC6 Pathway Controls Podosome Patterning through Microtubule Acetylation in Osteoclasts.“ *Journal of Cell Science* 118, Nr. Pt 13 (1. Juli 2005): 2901–11. doi:10.1242/jcs.02425.
- Destaing, Olivier, Archana Sanjay, Cecile Itzstein, William C. Horne, Derek Toomre, Pietro De Camilli, und Roland Baron. „The Tyrosine Kinase Activity of c-Src Regulates Actin Dynamics and Organization of Podosomes in Osteoclasts.“ *Molecular Biology of the Cell* 19, Nr. 1 (Januar 2008): 394–404. doi:10.1091/mbc.E07-03-0227.
- Dominguez, Roberto, und Kenneth C. Holmes. „Actin Structure and Function.“ *Annual Review of Biophysics* 40 (2011): 169–86. doi:10.1146/annurev-biophys-042910-155359.
- Evans, James G., Ivan Correia, Olga Krasavina, Nicki Watson, und Paul Matsudaira. „Macrophage Podosomes Assemble at the Leading Lamella by Growth and Fragmentation.“ *The Journal of Cell Biology* 161, Nr. 4 (26. Mai 2003): 697–705. doi:10.1083/jcb.200212037.
- Friedl, Peter, und Katarina Wolf. „Plasticity of Cell Migration: A Multiscale Tuning Model.“ *The Journal of Cell Biology* 188, Nr. 1 (11. Januar 2010): 11–19. doi:10.1083/jcb.200909003.
- . „Proteolytic and Non-Proteolytic Migration of Tumour Cells and Leucocytes.“ *Biochemical Society Symposium*, Nr. 70 (2003): 277–85.
- Gaillard, Jeremie, Vinay Ramabhadran, Emmanuelle Neumanne, Pinar Gurel, Laurent Blanchoin, Marylin Vantard, und Henry N. Higgs. „Differential Interactions of the Formins INF2, mDia1, and mDia2 with Microtubules.“ *Molecular Biology of the Cell* 22, Nr. 23 (Dezember 2011): 4575–87. doi:10.1091/mbc.E11-07-0616.
- Gawden-Bone, Christian, Zhongjun Zhou, Emma King, Alan Prescott, Colin Watts, und John Lucocq. „Dendritic Cell Podosomes Are Protrusive and Invade the Extracellular Matrix Using Metalloproteinase MMP-14.“ *Journal of Cell Science* 123, Nr. Pt 9 (1. Mai 2010): 1427–37. doi:10.1242/jcs.056515.
- Geblinger, Dafna, Christian Zink, Nicholas D. Spencer, Lia Addadi, und Benjamin Geiger. „Effects of Surface Microtopography on the Assembly of the Osteoclast Resorption Apparatus.“ *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 9, Nr. 72 (7. Juli 2012): 1599–1608. doi:10.1098/rsif.2011.0659.
- Gimona, Mario, und Roberto Buccione. „Adhesions That Mediate Invasion.“ *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38, Nr. 11 (2006): 1875–92. doi:10.1016/j.biocel.2006.05.003.
- Gimona, Mario, Roberto Buccione, Sara A. Courtneidge, und Stefan Linder. „Assembly and Biological Role of Podosomes and Invadopodia.“ *Current Opinion in Cell Biology* 20, Nr. 2 (April 2008): 235–41. doi:10.1016/j.ceb.2008.01.005.
- Goley, Erin D., und Matthew D. Welch. „The ARP2/3 Complex: An Actin Nucleator Comes of Age.“ *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7, Nr. 10 (Oktober 2006): 713–26. doi:10.1038/nrm2026.
- Goode, Bruce L., und Michael J. Eck. „Mechanism and Function of Formins in the Control of Actin Assembly.“ *Annual Review of Biochemistry* 76 (2007): 593–627. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647.

- Gordon, Siamon, und Philip R. Taylor. „Monocyte and Macrophage Heterogeneity.“ *Nature Reviews. Immunology* 5, Nr. 12 (Dezember 2005): 953–64. doi:10.1038/nri1733.
- Götz, Anne, und Rolf Jessberger. „Dendritic Cell Podosome Dynamics Does Not Depend on the F-Actin Regulator SWAP-70.“ *PloS One* 8, Nr. 3 (2013): e60642. doi:10.1371/journal.pone.0060642.
- Gould, Christopher J., Sankar Maiti, Alphée Michelot, Brian R. Graziano, Laurent Blanchoin, und Bruce L. Goode. „The Formin DAD Domain Plays Dual Roles in Autoinhibition and Actin Nucleation.“ *Current Biology: CB* 21, Nr. 5 (8. März 2011): 384–90. doi:10.1016/j.cub.2011.01.047.
- Gringel, Alexandra, Daniel Walz, Georg Rosenberger, Audrey Minden, Kerstin Kutsche, Petra Kopp, und Stefan Linder. „PAK4 and alphaPIX Determine Podosome Size and Number in Macrophages through Localized Actin Regulation.“ *Journal of Cellular Physiology* 209, Nr. 2 (November 2006): 568–79. doi:10.1002/jcp.20777.
- Gurel, Pinar S., Mu A, Bingquan Guo, Rui Shu, Dale F. Mierke, und Henry N. Higgs. „Assembly and Turnover of Short Actin Filaments by the Formin INF2 and Profilin.“ *The Journal of Biological Chemistry*, 29. Juni 2015. doi:10.1074/jbc.M115.670166.
- Gurel, Pinar S., Peng Ge, Elena E. Grintsevich, Rui Shu, Laurent Blanchoin, Z. Hong Zhou, Emil Reisler, und Henry N. Higgs. „INF2-Mediated Severing through Actin Filament Encirclement and Disruption.“ *Current Biology: CB* 24, Nr. 2 (20. Januar 2014): 156–64. doi:10.1016/j.cub.2013.12.018.
- Hanahan, D., J. Jessee, und F. R. Bloom. „Plasmid Transformation of Escherichia Coli and Other Bacteria.“ *Methods in Enzymology* 204 (1991): 63–113.
- Haniffa, Muzlifah, Venetia Bigley, und Matthew Collin. „Human Mononuclear Phagocyte System Reunited.“ *Seminars in Cell & Developmental Biology* 41 (Mai 2015): 59–69. doi:10.1016/j.semcdb.2015.05.004.
- Hanson, und Lowy. „The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle.“ *Journal of Molecular Biology* 6, Nr. 1 (Januar 1963): 46.
- Harris, Elizabeth S., Fang Li, und Henry N. Higgs. „The Mouse Formin, FRLalpha, Slows Actin Filament Barbed End Elongation, Competes with Capping Protein, Accelerates Polymerization from Monomers, and Severs Filaments.“ *The Journal of Biological Chemistry* 279, Nr. 19 (7. Mai 2004): 20076–87. doi:10.1074/jbc.M312718200.
- Harris, Elizabeth S., Isabelle Rouiller, Dorit Hanein, und Henry N. Higgs. „Mechanistic Differences in Actin Bundling Activity of Two Mammalian Formins, FRL1 and mDia2.“ *The Journal of Biological Chemistry* 281, Nr. 20 (19. Mai 2006): 14383–92. doi:10.1074/jbc.M510923200.
- Hayakawa, Kimihide, Hitoshi Tatsumi, und Masahiro Sokabe. „Actin Filaments Function as a Tension Sensor by Tension-Dependent Binding of Cofilin to the Filament.“ *The Journal of Cell Biology* 195, Nr. 5 (28. November 2011): 721–27. doi:10.1083/jcb.201102039.

- Heimsath, Ernest G., und Henry N. Higgs. „The C Terminus of Formin FMNL3 Accelerates Actin Polymerization and Contains a WH2 Domain-like Sequence That Binds Both Monomers and Filament Barbed Ends.“ *The Journal of Biological Chemistry* 287, Nr. 5 (27. Januar 2012): 3087–98. doi:10.1074/jbc.M111.312207.
- Hiura, K., S. S. Lim, S. P. Little, S. Lin, und M. Sato. „Differentiation Dependent Expression of Tensin and Cortactin in Chicken Osteoclasts.“ *Cell Motility and the Cytoskeleton* 30, Nr. 4 (1995): 272–84. doi:10.1002/cm.970300405.
- Hynes, Richard O. „The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils.“ *Science (New York, N.Y.)* 326, Nr. 5957 (27. November 2009): 1216–19. doi:10.1126/science.1176009.
- Kaverina, Irina, Theresia E. B. Stradal, und Mario Gimona. „Podosome Formation in Cultured A7r5 Vascular Smooth Muscle Cells Requires Arp2/3-Dependent de-Novo Actin Polymerization at Discrete Microdomains.“ *Journal of Cell Science* 116, Nr. Pt 24 (15. Dezember 2003): 4915–24. doi:10.1242/jcs.00818.
- Kim, Na Young, Julie C. Kohn, John Huynh, Shawn P. Carey, Brooke N. Mason, Ageliki G. Vouyouka, und Cynthia A. Reinhart-King. „Biophysical Induction of Vascular Smooth Muscle Cell Podosomes.“ *PloS One* 10, Nr. 3 (2015): e0119008. doi:10.1371/journal.pone.0119008.
- Kopp, Petra, Reiner Lammers, Martin Aepfelbacher, Günther Woehlke, Thomas Rudel, Nikolaus Machuy, Walter Steffen, und Stefan Linder. „The Kinesin KIF1C and Microtubule plus Ends Regulate Podosome Dynamics in Macrophages.“ *Molecular Biology of the Cell* 17, Nr. 6 (Juni 2006): 2811–23. doi:10.1091/mbc.E05-11-1010.
- Korobova, Farida, Timothy J. Gauvin, und Henry N. Higgs. „A Role for Myosin II in Mammalian Mitochondrial Fission.“ *Current Biology: CB* 24, Nr. 4 (17. Februar 2014): 409–14. doi:10.1016/j.cub.2013.12.032.
- Korobova, Farida, Vinay Ramabhadran, und Henry N. Higgs. „An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2.“ *Science (New York, N.Y.)* 339, Nr. 6118 (25. Januar 2013): 464–67. doi:10.1126/science.1228360.
- Labernadie, Anna, Anaïs Bouissou, Patrick Delobelle, Stéphanie Balor, Raphael Voituriez, Amsha Proag, Isabelle Fourquaux, u. a. „Protrusion Force Microscopy Reveals Oscillatory Force Generation and Mechanosensing Activity of Human Macrophage Podosomes.“ *Nature Communications* 5 (2014): 5343. doi:10.1038/ncomms6343.
- Labernadie, Anna, Christophe Thibault, Christophe Vieu, Isabelle Maridonneau-Parini, und Guillaume M. Charrière. „Dynamics of Podosome Stiffness Revealed by Atomic Force Microscopy.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, Nr. 49 (7. Dezember 2010): 21016–21. doi:10.1073/pnas.1007835107.
- Lal, Hind, Suresh K. Verma, Donald M. Foster, Honey B. Golden, John C. Reneau, Linley E. Watson, Hitesh Singh, und David E. Dostal. „Integrins and Proximal Signaling Mechanisms in Cardiovascular Disease.“ *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 14 (2009): 2307–34.

- Lammers, Michael, Rolf Rose, Andrea Scrima, und Alfred Wittinghofer. „The Regulation of mDia1 by Autoinhibition and Its Release by Rho\*GTP.“ *The EMBO Journal* 24, Nr. 23 (7. Dezember 2005): 4176–87. doi:10.1038/sj.emboj.7600879.
- Lee, Sung Haeng, und Roberto Dominguez. „Regulation of Actin Cytoskeleton Dynamics in Cells.“ *Molecules and Cells* 29, Nr. 4 (April 2010): 311–25. doi:10.1007/s10059-010-0053-8.
- Li, Fang, und Henry N. Higgs. „The Mouse Formin mDia1 Is a Potent Actin Nucleation Factor Regulated by Autoinhibition.“ *Current Biology: CB* 13, Nr. 15 (5. August 2003): 1335–40.
- Linder, S., H. Higgs, K. Hübner, K. Schwarz, U. Pannicke, und M. Aepfelbacher. „The Polarization Defect of Wiskott-Aldrich Syndrome Macrophages Is Linked to Dislocalization of the Arp2/3 Complex.“ *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 165, Nr. 1 (1. Juli 2000a): 221–25.
- Linder, S., K. Hübner, U. Wintergerst, und M. Aepfelbacher. „Microtubule-Dependent Formation of Podosomal Adhesion Structures in Primary Human Macrophages.“ *Journal of Cell Science* 113 Pt 23 (Dezember 2000b): 4165–76.
- Linder, S., D. Nelson, M. Weiss, und M. Aepfelbacher. „Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Regulates Podosomes in Primary Human Macrophages.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, Nr. 17 (17. August 1999): 9648–53.
- Linder, Stefan. „The Matrix Corroded: Podosomes and Invadopodia in Extracellular Matrix Degradation.“ *Trends in Cell Biology* 17, Nr. 3 (März 2007): 107–17. doi:10.1016/j.tcb.2007.01.002.
- Linder, Stefan, und Martin Aepfelbacher. „Podosomes: Adhesion Hot-Spots of Invasive Cells.“ *Trends in Cell Biology* 13, Nr. 7 (Juli 2003): 376–85.
- Linder, Stefan, und Christiane Wiesner. „Tools of the Trade: Podosomes as Multipurpose Organelles of Monocytic Cells.“ *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 72, Nr. 1 (Januar 2015): 121–35. doi:10.1007/s00018-014-1731-z.
- Linder, Stefan, Christiane Wiesner, und Mirko Himmel. „Degrading Devices: Invadosomes in Proteolytic Cell Invasion.“ *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27 (2011): 185–211. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154216.
- Linder, Stefan. „Invadosomes at a Glance.“ *Journal of Cell Science* 122, Nr. Pt 17 (1. September 2009): 3009–13. doi:10.1242/jcs.032631.
- Luxenburg, Chen, Dafna Geblinger, Eugenia Klein, Karen Anderson, Dorit Hanein, Benny Geiger, und Lia Addadi. „The Architecture of the Adhesive Apparatus of Cultured Osteoclasts: From Podosome Formation to Sealing Zone Assembly.“ *PloS One* 2, Nr. 1 (2007): e179. doi:10.1371/journal.pone.0000179.
- Luxenburg, Chen, Sabina Winograd-Katz, Lia Addadi, und Benjamin Geiger. „Involvement of Actin Polymerization in Podosome Dynamics.“ *Journal of Cell*

- Madrid, Ricardo, Juan F. Aranda, Alejo E. Rodríguez-Fraticelli, Leandro Ventimiglia, Laura Andrés-Delgado, Mona Shehata, Susan Fanayan, u. a. „The Formin INF2 Regulates Basolateral-to-Apical Transcytosis and Lumen Formation in Association with Cdc42 and MAL2.“ *Developmental Cell* 18, Nr. 5 (18. Mai 2010): 814–27. doi:10.1016/j.devcel.2010.04.001.
- Mak, Alan S. „p53 Regulation of Podosome Formation and Cellular Invasion in Vascular Smooth Muscle Cells.“ *Cell Adhesion & Migration* 5, Nr. 2 (April 2011): 144–49.
- Murray, Peter J., und Thomas A. Wynn. „Protective and Pathogenic Functions of Macrophage Subsets.“ *Nature Reviews. Immunology* 11, Nr. 11 (November 2011): 723–37. doi:10.1038/nri3073.
- McMichael, Brooke K., Richard E. Cheney, und Beth S. Lee. „Myosin X Regulates Sealing Zone Patterning in Osteoclasts through Linkage of Podosomes and Microtubules.“ *The Journal of Biological Chemistry* 285, Nr. 13 (26. März 2010): 9506–15. doi:10.1074/jbc.M109.017269.
- Mersich, Akos T., Matthew R. Miller, Halina Chkourko, und Scott D. Blystone. „The Formin FRL1 (FMNL1) Is an Essential Component of Macrophage Podosomes.“ *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67, Nr. 9 (September 2010): 573–85. doi:10.1002/cm.20468.
- Moreau, Violaine, Florence Tatin, Christine Varon, und Elisabeth Génot. „Actin Can Reorganize into Podosomes in Aortic Endothelial Cells, a Process Controlled by Cdc42 and RhoA.“ *Molecular and Cellular Biology* 23, Nr. 19 (Oktober 2003): 6809–22.
- Murphy, Danielle A., und Sara A. Courtneidge. „The ‚Ins‘ and ‚Outs‘ of Podosomes and Invadopodia: Characteristics, Formation and Function“. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12, Nr. 7 (Juli 2011): 413–26. doi:10.1038/nrm3141.
- Nezami, Azin, Florence Poy, Angela Toms, Wei Zheng, und Michael J. Eck. „Crystal Structure of a Complex between Amino and Carboxy Terminal Fragments of mDia1: Insights into Autoinhibition of Diaphanous-Related Formins.“ *PloS One* 5, Nr. 9 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0012992.
- Obergfell, Achim, Koji Eto, Attila Mocsai, Charito Buensuceso, Sheri L. Moores, Joan S. Brugge, Clifford A. Lowell, und Sanford J. Shattil. „Coordinate Interactions of Csk, Src, and Syk Kinases with [alpha]IIb[beta]3 Initiate Integrin Signaling to the Cytoskeleton.“ *The Journal of Cell Biology* 157, Nr. 2 (15. April 2002): 265–75. doi:10.1083/jcb.200112113.
- Ochoa, G. C., V. I. Slepnev, L. Neff, N. Ringstad, K. Takei, L. Daniell, W. Kim, u. a. „A Functional Link between Dynamin and the Actin Cytoskeleton at Podosomes.“ *The Journal of Cell Biology* 150, Nr. 2 (24. Juli 2000): 377–89.
- Oikawa, Tsukasa, Toshiki Itoh, und Tadaomi Takenawa. „Sequential Signals toward Podosome Formation in NIH-Src Cells.“ *The Journal of Cell Biology* 182, Nr. 1 (14. Juli 2008): 157–69. doi:10.1083/jcb.200801042.
- Osiak, Anna-Eleonore, Gerhardt Zenner, und Stefan Linder. „Subconfluent Endothelial Cells Form Podosomes Downstream of Cytokine and RhoGTPase Signaling.“ *Experimental Cell Research* 307, Nr. 2 (15. Juli 2005): 342–53. doi:10.1016/j.yexcr.2005.03.035.

- Otomo, Takanori, Diana R. Tomchick, Chinatsu Otomo, Mischa Machius, und Michael K. Rosen. „Crystal Structure of the Formin mDia1 in Autoinhibited Conformation.“ *PLoS One* 5, Nr. 9 (2010). doi:10.1371/journal.pone.0012896.
- Paul, Aditya S., und Thomas D. Pollard. „Review of the Mechanism of Processive Actin Filament Elongation by Formins.“ *Cell Motility and the Cytoskeleton* 66, Nr. 8 (August 2009): 606–17. doi:10.1002/cm.20379.
- Pfaff, M., und P. Jurdic. „Podosomes in Osteoclast-like Cells: Structural Analysis and Cooperative Roles of Paxillin, Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 (Pyk2) and Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3.“ *Journal of Cell Science* 114, Nr. Pt 15 (August 2001): 2775–86.
- Pollard, Jeffrey W. „Trophic Macrophages in Development and Disease.“ *Nature Reviews. Immunology* 9, Nr. 4 (April 2009): 259–70. doi:10.1038/nri2528.
- Pollard, Thomas D., und Gary G. Borisy. „Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments.“ *Cell* 112, Nr. 4 (21. Februar 2003): 453–65.
- Quinlan, Margot E., John E. Heuser, Eugen Kerkhoff, und R. Dyche Mullins. „Drosophila Spire Is an Actin Nucleation Factor.“ *Nature* 433, Nr. 7024 (27. Januar 2005): 382–88. doi:10.1038/nature03241.
- Ramabhadran, Vinay, Anna L. Hatch, und Henry N. Higgs. „Actin Monomers Activate Inverted Formin 2 by Competing with Its Autoinhibitory Interaction.“ *The Journal of Biological Chemistry* 288, Nr. 37 (13. September 2013): 26847–55. doi:10.1074/jbc.M113.472415.
- Ramabhadran, Vinay, Farida Korobova, Gilbert J. Rahme, und Henry N. Higgs. „Splice Variant-Specific Cellular Function of the Formin INF2 in Maintenance of Golgi Architecture.“ *Molecular Biology of the Cell* 22, Nr. 24 (Dezember 2011): 4822–33. doi:10.1091/mbc.E11-05-0457.
- Sabri, Siham, Adlen Foudi, Siham Boukour, Brigitte Franc, Sabine Charrier, Martine Jandrot-Perrus, Richard W. Farndale, u. a. „Deficiency in the Wiskott-Aldrich Protein Induces Premature Proplatelet Formation and Platelet Production in the Bone Marrow Compartment.“ *Blood* 108, Nr. 1 (1. Juli 2006): 134–40. doi:10.1182/blood-2005-03-1219.
- Sagot, Isabelle, Avital A. Rodal, James Moseley, Bruce L. Goode, und David Pellman. „An Actin Nucleation Mechanism Mediated by Bni1 and Profilin.“ *Nature Cell Biology* 4, Nr. 8 (August 2002): 626–31. doi:10.1038/ncb834.
- Sato, T., M. del Carmen Ovejero, P. Hou, A. M. Heegaard, M. Kumegawa, N. T. Foged, und J. M. Delaissé. „Identification of the Membrane-Type Matrix Metalloproteinase MT1-MMP in Osteoclasts.“ *Journal of Cell Science* 110 ( Pt 5) (März 1997): 589–96.
- Schachtner, Hannah, Simon D. J. Calaminus, Amy Sinclair, James Monypenny, Michael P. Blundell, Catherine Leon, Tessa L. Holyoake, u. a. „Megakaryocytes Assemble Podosomes That Degrade Matrix and Protrude through Basement Membrane.“ *Blood* 121, Nr. 13 (28. März 2013): 2542–52. doi:10.1182/blood-2012-07-443457.
- Schönichen, André, und Matthias Geyer. „Fifteen Formins for an Actin Filament: A Molecular View on the Regulation of Human Formins.“ *Biochimica Et Biophysica Acta* 1803, Nr. 2 (Februar 2010): 152–63. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.014.

- Schönichen, André, Hans Georg Mannherz, Elmar Behrmann, Antonina J. Mazur, Sonja Kühn, Unai Silván, Cora-Ann Schoenenberger, u. a. „FHOD1 Is a Combined Actin Filament Capping and Bundling Factor That Selectively Associates with Actin Arcs and Stress Fibers.“ *Journal of Cell Science* 126, Nr. Pt 8 (15. April 2013): 1891–1901. doi:10.1242/jcs.126706.
- Shao, Xiaowei, Qingsen Li, Alex Mogilner, Alexander D. Bershadsky, und G. V. Shivashankar. „Mechanical Stimulation Induces Formin-Dependent Assembly of a Perinuclear Actin Rim.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, Nr. 20 (19. Mai 2015): E2595–2601. doi:10.1073/pnas.1504837112.
- Sharma, Shivani, Elena E. Grintsevich, JungReem Woo, Pinar S. Gurel, Henry N. Higgs, Emil Reisler, und James K. Gimzewski. „Nanostructured Self-Assembly of Inverted Formin 2 (INF2) and F-Actin-INF2 Complexes Revealed by Atomic Force Microscopy.“ *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 30, Nr. 25 (1. Juli 2014): 7533–39. doi:10.1021/la501748x.
- Sheetz, M. P., D. Felsenfeld, C. G. Galbraith, und D. Choquet. „Cell Migration as a Five-Step Cycle.“ *Biochemical Society Symposium* 65 (1999): 233–43.
- Skau, Colleen T., Sergey V. Plotnikov, Andrew D. Doyle, und Clare M. Waterman. „Inverted Formin 2 in Focal Adhesions Promotes Dorsal Stress Fiber and Fibrillar Adhesion Formation to Drive Extracellular Matrix Assembly.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112, Nr. 19 (12. Mai 2015): E2447–56. doi:10.1073/pnas.1505035112.
- Stölting, Miriam, Christiane Wiesner, Vanessa van Vliet, Elke Butt, Hermann Pavenstädt, Stefan Linder, und Joachim Kremerskothen. „Lasp-1 Regulates Podosome Function.“ *PloS One* 7, Nr. 4 (2012): e35340. doi:10.1371/journal.pone.0035340.
- Sun, Hua, Johannes Schlondorff, Henry N. Higgs, und Martin R. Pollak. „Inverted Formin 2 Regulates Actin Dynamics by Antagonizing Rho/diaphanous-Related Formin Signaling.“ *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 24, Nr. 6 (Mai 2013): 917–29. doi:10.1681/ASN.2012080834.
- Sun, Hua, Johannes S. Schlondorff, Elizabeth J. Brown, Henry N. Higgs, und Martin R. Pollak. „Rho Activation of mDia Formins Is Modulated by an Interaction with Inverted Formin 2 (INF2).“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, Nr. 7 (15. Februar 2011): 2933–38. doi:10.1073/pnas.1017010108.
- Tatin, Florence, Christine Varon, Elisabeth Génot, und Violaine Moreau. „A Signalling Cascade Involving PKC, Src and Cdc42 Regulates Podosome Assembly in Cultured Endothelial Cells in Response to Phorbol Ester.“ *Journal of Cell Science* 119, Nr. Pt 4 (15. Februar 2006): 769–81. doi:10.1242/jcs.02787.
- Teti, A., M. Grano, A. Carano, S. Colucci, und A. Zambonin Zallone. „Immunolocalization of Beta 3 Subunit of Integrins in Osteoclast Membrane.“ *Bollettino Della Società Italiana Di Biologia Sperimentale* 65, Nr. 11 (November 1989): 1031–37.

- Van Audenhove, Isabel, Nincy Debeuf, Ciska Boucherie, und Jan Gettemans. „Fascin Actin Bundling Controls Podosome Turnover and Disassembly While Cortactin Is Involved in Podosome Assembly by Its SH3 Domain in THP-1 Macrophages and Dendritic Cells.“ *Biochimica Et Biophysica Acta* 1853, Nr. 5 (Mai 2015): 940–52. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.01.003.
- van den Dries, K., M. B. M. Meddens, S. de Keijzer, S. Shekhar, V. Subramaniam, C. G. Figdor, und A. Cambi. „Interplay between Myosin IIA-Mediated Contractility and Actin Network Integrity Orchestrates Podosome Composition and Oscillations.“ *Nature Communications* 4 (2013): 1412. doi:10.1038/ncomms2402.
- van den Dries, Koen, Matteo Bolomini-Vittori, und Alessandra Cambi. „Spatiotemporal Organization and Mechanosensory Function of Podosomes.“ *Cell Adhesion & Migration* 8, Nr. 3 (2014): 268–72.
- van den Dries, Koen, Suzanne F. G. van Helden, Joost te Riet, Ruth Diez-Ahedo, Carlo Manzo, Machteld M. Oud, Frank N. van Leeuwen, u. a. „Geometry Sensing by Dendritic Cells Dictates Spatial Organization and PGE(2)-Induced Dissolution of Podosomes.“ *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69, Nr. 11 (Juni 2012): 1889–1901. doi:10.1007/s00018-011-0908-y.
- van den Dries, K., S. L. Schwartz, J. Byars, M. B. M. Meddens, M. Bolomini-Vittori, D. S. Lidke, C. G. Figdor, K. A. Lidke, und A. Cambi. „Dual-Color Superresolution Microscopy Reveals Nanoscale Organization of Mechanosensory Podosomes.“ *Molecular Biology of the Cell* 24, Nr. 13 (Juli 2013): 2112–23. doi:10.1091/mbc.E12-12-0856.
- van Furth, R. „Current View on the Mononuclear Phagocyte System.“ *Immunobiology* 161, Nr. 3–4 (April 1982): 178–85. doi:10.1016/S0171-2985(82)80072-7.
- van Furth, R., Z. A. Cohn, J. G. Hirsch, J. H. Humphrey, W. G. Spector, und H. L. Langevoort. „The Mononuclear Phagocyte System: A New Classification of Macrophages, Monocytes, and Their Precursor Cells.“ *Bulletin of the World Health Organization* 46, Nr. 6 (1972): 845–52.
- Van Goethem, Emeline, Renaud Poincloux, Fabienne Gauffre, Isabelle Maridonneau-Parini, und Véronique Le Cabec. „Matrix Architecture Dictates Three-Dimensional Migration Modes of Human Macrophages: Differential Involvement of Proteases and Podosome-like Structures.“ *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 184, Nr. 2 (15. Januar 2010): 1049–61. doi:10.4049/jimmunol.0902223.
- van Helden, Suzanne F. G., Machteld M. Oud, Ben Joosten, Niels Peterse, Carl G. Figdor, und Frank N. van Leeuwen. „PGE2-Mediated Podosome Loss in Dendritic Cells Is Dependent on Actomyosin Contraction Downstream of the RhoA-Rho-Kinase Axis.“ *Journal of Cell Science* 121, Nr. Pt 7 (1. April 2008): 1096–1106. doi:10.1242/jcs.020289.
- Varol, Chen, Alexander Mildner, und Steffen Jung. „Macrophages: Development and Tissue Specialization.“ *Annual Review of Immunology* 33 (2015): 643–75. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112220.
- Walde, Marie, James Monypenny, Rainer Heintzmann, Gareth E. Jones, und Susan Cox. „Vinculin Binding Angle in Podosomes Revealed by High Resolution Microscopy.“ *PloS One* 9, Nr. 2 (2014): e88251. doi:10.1371/journal.pone.0088251.

- Wegner, A., und G. Isenberg. „12-Fold Difference between the Critical Monomer Concentrations of the Two Ends of Actin Filaments in Physiological Salt Conditions.“ *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, Nr. 16 (August 1983): 4922–25.
- Wiesner, Christiane, Jan Faix, Mirko Himmel, Frank Bentzien, und Stefan Linder. „KIF5B and KIF3A/KIF3B Kinesins Drive MT1-MMP Surface Exposure, CD44 Shedding, and Extracellular Matrix Degradation in Primary Macrophages.“ *Blood* 116, Nr. 9 (2. September 2010): 1559–69. doi:10.1182/blood-2009-12-257089.
- Wiesner, Christiane, Véronique Le-Cabec, Karim El Azzouzi, Isabelle Maridonneau-Parini, und Stefan Linder. „Podosomes in Space: Macrophage Migration and Matrix Degradation in 2D and 3D Settings.“ *Cell Adhesion & Migration* 8, Nr. 3 (2014): 179–91.
- Zambonin-Zallone, A., A. Teti, M. Grano, A. Rubinacci, M. Abbadini, M. Gaboli, und P. C. Marchisio. „Immunocytochemical Distribution of Extracellular Matrix Receptors in Human Osteoclasts: A Beta 3 Integrin Is Colocalized with Vinculin and Talin in the Podosomes of Osteoclastoma Giant Cells.“ *Experimental Cell Research* 182, Nr. 2 (Juni 1989): 645–52.

## 7 Anhang

### 7.1 Publikationen und Posterpräsentationen

#### Publikationen

##### **The formins FHOD1 and INF2 regulate inter- and intra-structural contractility of podosomes**

Panzer L., Trübe L., Joosten B., Slotman J., Cambi A., Linder S.  
Journal of Cell Science, in Revision

#### Posterpräsentationen auf Konferenzen

##### **Leona Trübe, Mirko Himmel, Stefan Linder; “Regulation of podosome turnover and structure by the formins DAAM1 and INF2”**

2<sup>nd</sup> International Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ) on Actin Dynamics, Regensburg 2012

##### **Linda Panzer, Leona Trübe, Pasquale Cervero, Stefan Linder; “Podosome Reformation is regulated by the formins FHOD1 and INF2”**

5<sup>th</sup> Invadosome Meeting (“Cell Migration and Invasion in Physiology an Pathology”), Nijmegen 2013

##### **Linda Panzer, Leona Trübe, Pasquale Cervero, Stefan Linder; “Podosome Reformation is regulated by the formins FHOD1 and INF2”**

ASCB Annual Meeting, New Orleans 2013

##### **Linda Panzer, Leona Trübe, Pasquale Cervero, Stefan Linder; “Podosome Reformation is regulated by the formins FHOD1 and INF2”**

International Meeting of the German Society for Cell Biology, Regensburg 2014

##### **Linda Panzer, Leona Trübe, Pasquale Cervero, Stefan Linder; “Podosome Reformation is regulated by the formins FHOD1 and INF2”**

2<sup>nd</sup> UKE Microscopy Symposium, Hamburg 2014

Linda Panzer, Leona Trübe, Ben Joosten, Alessandra Cambi, Stefan Linder; **“The formins FHOD1 and INF2 regulate inter- and intra-structural contractility at macrophage podosomes”**

3<sup>rd</sup> International Meeting of the German Society for Cell Biology (DGZ) on Actin Dynamics, Regensburg 2015

## 7.2 Verwendete Macros für ImageJ

### Macro 1

```
run("8-bit");
```

```
run("Smooth");
```

```
run("Sharpen");
```

```
run("Subtract...", "value=20");
```

```
run("Convolve...", "text1=[-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 40 -1 -1\n-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 -1 -1\n] normalize");
```

```
run("Maximum...", "radius=0.0");
```

```
run("Smooth");
```

```
run("Sharpen");
```

```
//run("Threshold...");
```

```
setThreshold(0, 100);
```

```
run("Convert to Mask");
```

```
run("Make Binary");
```

```
run("Watershed");
```

```
run("Analyze Particles...", "size=5-60 pixel circularity=0.75-1.00 show=[Count Masks] exclude summarize record");
```

## Macro 2

```
run("8-bit");
```

```
run("Smooth");
```

```
run("Subtract Background...", "rolling=5");
```

```
run("Gamma...", "value=1.30");
```

```
run("Convolve...", "text1=[-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 30 -1 -1\n-1 -1 -1 -1 -1\n-1 -1 -1 -1\n] normalize");
```

```
run("Make Binary");
```

```
run("Watershed");
```

```
run("Analyze Particles...", "size=0.01-50 circularity=0.75-1.00 show=Masks clear  
exclude add");
```

## Macro 3

```
roiManager("Show None");
```

```
roiManager("Show all");
```

```
n = roiManager("count");
```

```
for (i=0; i<n; i++) {
```

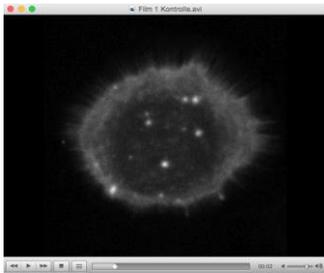
```
    roiManager("select", i);
```

```
run("Measure");
```

```
}
```

## 7.3 Inhalt der Video-CD

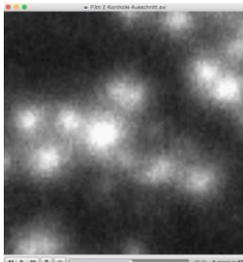
Film 1: Podosomen-Neubildung in einer Kontrollzelle.



Konfokale Videoaufnahme von neun Tage kultivierten primären, humanen Makrophagen, die LifeactGFP exprimieren, nach dem Auswaschen von PP2. Kontroll-siRNA-Transfektion erfolgte 72 h vor dem Experiment. Belichtungszeit: 250 ms. Aufnahmen wurden alle 15 s gemacht und mit einer Rate von drei Einzelbildern/s zurückgespielt. Absolute Zeit: 15 min.

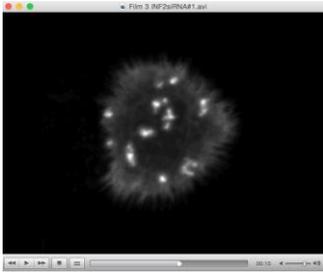
Bildbreite: 50  $\mu\text{m}$

Film 2: Podosomen-Neubildung in einer Kontrollzelle (Ausschnitt von Film 1).



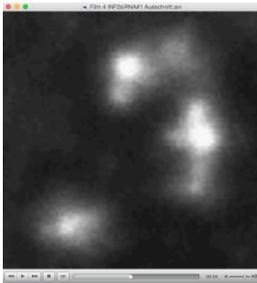
Konfokale Videoaufnahme von neun Tage kultivierten primären, humanen Makrophagen, die LifeactGFP exprimieren, nach dem Auswaschen von PP2. Kontroll-siRNA-Transfektion erfolgte 72 h vor dem Experiment. Belichtungszeit: 250 ms. Aufnahmen wurden alle 15 s gemacht und mit einer Rate von drei Einzelbildern/s zurückgespielt. Absolute Zeit: 15 min. Bildbreite: 9,9  $\mu\text{m}$

## Film 3: Podosomen-Neubildung in einer INF2-Knockdown-Zelle.



Konfokale Videoaufnahme von neun Tage kultivierten primären, humanen Makrophagen, die LifeactGFP exprimieren, nach dem Auswaschen von PP2. INF2 siRNA#1-Transfektion erfolgte 72 h vor dem Experiment. Belichtungszeit: 250 ms. Aufnahmen wurden alle 15 s gemacht und mit einer Rate von drei Einzelbildern/s zurückgespielt. Absolute Zeit: 15 min. Bildbreite: 50  $\mu\text{m}$

## Film 4: Podosomen-Neubildung in einer INF2-Knockdown-Zelle (Ausschnitt von Film 3).



Konfokale Videoaufnahme von neun Tage kultivierten primären, humanen Makrophagen, die LifeactGFP exprimieren, nach dem Auswaschen von PP2. INF2 siRNA#1-Transfektion erfolgte 72 h vor dem Experiment. Belichtungszeit: 250 ms. Aufnahmen wurden alle 15 s gemacht und mit einer Rate von drei Einzelbildern/s zurückgespielt. Absolute Zeit: 15 min. Bildbreite: 9,9  $\mu\text{m}$

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Stefan Linder für die Themenstellung, die interessanten Diskussionen und die sehr gute Betreuung meiner Doktorarbeit. Vor allem möchte ich mich für die aufbauenden Worte und Unterstützung in schwierigeren Zeiten bedanken.

Danke auch an PD Dr. Andreas Pommerening-Röser für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die freundlichen Gespräche während dieser Zeit.

Des Weiteren möchte ich allen früheren und bestehenden Mitglieder des LinderLabs für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung, Aufmunterung und vor allem für den Spaß während meiner Doktorarbeit danken. Auch der Rest der MiBi und die tollen Leute der Neuropatho sind zu erwähnen. Es war eine geniale Zeit mit euch!

Meinen Freunden danke ich vor allem für jegliche laborferne Ablenkung. Ihr seid wirklich die Besten!

Der größte Dank gilt meiner Mutter, die mich bei der Verwirklichung meiner Träume in jeglicher Hinsicht unterstützt hat.

Vor allem geht mein Dank an meinen Freund, Stefan Kramp. Mein Fels in der Brandung. Ohne Ihn wäre die Bewältigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank!

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

---

(Ort, Datum)

---

(Leona Trübe)